

## 金纳米颗粒对人肺腺癌细胞株 A549 的毒性效应

吴玉呈,刘正霞,郭志睿,周萍,鲁翔\*

(南京医科大学第二附属医院老年科,江苏 南京 210011)

**[摘要]** 目的:探讨直径 4 nm 的金颗粒对人肺腺癌细胞株 A549 的毒性以及浓度-效应关系。方法:在 A549 细胞培养液中,分别加入柠檬酸钠溶液(对照组)以及浓度分别为 12.5、25.0 和 50.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的直径 4 nm 的金颗粒溶液孵育 48 h。采用透射电子显微镜(TEM)鉴定金纳米颗粒并观察其在细胞内的分布情况;采用细胞增殖和毒性试剂盒检测细胞活力;采用流式细胞术检测 A549 的细胞周期和凋亡。结果:TEM 显示金纳米颗粒大小及形态均一,主要分布于 A549 细胞的微小囊泡、胞浆、溶酶体以及细胞核周围。与对照组相比,4 nm 金颗粒能显著降低细胞活力( $P < 0.05$ ),且具有浓度-效应关系。流式细胞检测结果显示,较高浓度(25 及 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 4 nm 金颗粒处理后,A549 细胞凋亡比例显著增加( $P < 0.05$ ),但细胞周期未见显著性差异。结论:直径 4 nm 的金颗粒能显著降低 A549 的细胞活力,促进 A549 凋亡,且具有浓度-效应关系,为肺癌的治疗提供了一种新思路。

**[关键词]** 金纳米颗粒;A549;毒性;浓度-效应关系

**[中图分类号]** R730.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)04-417-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20140403

## Toxicity of gold nanoparticles in human lung adenocarcinoma cell line A549

Wu Yucheng, Liu Zhengxia, Guo Zhirui, Zhou Ping, Lu Xiang\*

(Department of Geriatrics, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the toxicity and dose-response relationship of 4-nm gold nanoparticles (AuNPs) on human lung adenocarcinoma cell line A549. **Methods:** Sodium citrate solution (the control group) and three concentrations (12.5, 25.0 and 50.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of 4-nm AuNPs solution were respectively added to the culture medium of A549 cells for 48 h incubation. The morphology and internalization of AuNPs in A549 cells were observed by transmission electron microscopy (TEM); cell viability of A549 was detected using cell proliferation and toxicity kit; cell cycle and apoptosis of A549 were analyzed by flow cytometry. **Results:** TEM showed that the shape and size of AuNPs particles were homogeneous and mainly distributed in small vesicles, cytoplasm, lysosomes or the perinuclear region in A549 cells. Compared to the control group, 4-nm AuNPs significantly reduced the cell viability in a dose-response relationship ( $P < 0.05$ ). The results of flow cytometry showed that AuNPs with higher concentration (25 and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) significantly increased the apoptosis of A549 cells ( $P < 0.05$ ), while no significant difference in cell cycle. **Conclusion:** AuNPs with size of 4 nm can significantly reduce cell viability and promote apoptosis in a dose-response relationship in A549, which provides a new strategy for the treatment of lung cancer.

**[Key words]** gold nanoparticles; A549; toxicity; dose-response relationship

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(04):417-421]

金纳米颗粒(AuNPs)是指直径为 1~100 nm 的微小金颗粒,具有多种独特性质,如表面等离子共振、表面增强拉曼光谱、量子尺寸效应等。AuNPs 易于合成,尺寸形状可控,具有良好的稳定性和生物相

容性,且可以表面修饰后功能化,使得它在生物医学方面得以广泛应用,如药物载体、标记与成像、生物传感器和肿瘤的诊断治疗等<sup>[1]</sup>。目前,AuNPs 与细胞的相互作用是研究热点,其中 AuNPs 的尺寸、浓度、表面修饰物和表面电荷等多种因素均在其中发挥重要作用,而小尺寸 AuNPs 对肿瘤细胞的毒性作用仍存在一定争议<sup>[2-4]</sup>。因此,本研究旨在探讨 4 nm 金颗粒对人肺腺癌细胞 A549 的毒性以及浓度-效应关系。

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(81270428,81300999)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:luxiang66@njmu.edu.cn

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人肺腺癌细胞株 A549 来自本院老年医学研究室。细胞增殖和毒性试剂盒购自南京凯基公司,细胞凋亡和周期检测试剂盒购自美国 BD 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 金纳米颗粒的制备

使用硼氢化钠还原法合成 4 nm 金颗粒,主要步骤如下:向双蒸水中分别加入氯金酸和柠檬酸钠溶液,配成 80 ml 含有 0.25 mmol/L 氯金酸和 0.25 mmol/L 柠檬酸钠的混合液,高速搅拌,然后在室温下快速加入新鲜配制的 2 ml 100 mmol/L 硼氢化钠溶液。为了使未反应的硼氢化钠完全水解,合成的 4 nm 金颗粒溶液在室温至少放置 2 h 后使用<sup>[5]</sup>。

#### 1.2.2 细胞培养

使用含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的完全培养基 (DMEM, Gibco 公司, 美国) 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 和 95% 湿度的培养箱中培养细胞。在 A549 细胞贴壁后,分别加入 2.5 ml 柠檬酸钠溶液(对照组)以及浓度为 12.5、25.0 和 50.0 μg/ml 的 4 nm 金颗粒溶液,孵育 48 h 后收集细胞。

#### 1.2.3 透射电子显微镜观察

加入柠檬酸钠溶液和 4 nm 金颗粒溶液 48 h 后,收集细胞,进行 TEM 样品制备,过程如下:四氧化锇固定细胞 2 h 后,用乙醇脱水,然后环氧丙烷洗涤细胞,用 agar-100 树脂(PLANO 公司,德国)包被样品后在 60℃ 聚合,持续 48 h。使用超薄切片机(Leica Microsystems 公司,德国)切片,放置于铜网上,在柠檬酸铅的醇溶液中用乙酸铀酰染色。透射电子显微镜 JEM-2100EX(JEOL, 日本)观察和显微

照像。

#### 1.2.4 细胞增殖和毒性分析

在铺有 A549 的 96 孔板中,分别加入 100 μl 的柠檬酸钠溶液以及浓度为 12.5、25.0 和 50.0 μg/ml 的 4 nm 金颗粒溶液,孵育 48 h 后加入细胞活力检测试剂,分别在孵育 1、2、3、4 h 后用酶标仪(Bio-Rad 公司,美国)检测其在 450 nm 的吸光度。每个样品设 3 个复孔,进行 3 次重复实验。

#### 1.2.5 细胞周期与凋亡检测

将收集的细胞进行碘化丙啶染色,然后用流式细胞仪(FACS canto II, BD 公司,美国)分析细胞周期。每个样品收集 20 000 个细胞,用分析软件计算 G0/G1 期、S 期和 G2/M 期的细胞比例。检测细胞凋亡时,选择对数生长期的细胞,使用冷 PBS 缓冲液洗细胞 2 次,再用 1×Binding Buffer 制成 1 × 10<sup>6</sup> 个/ml 的悬液,分别加入膜联蛋白 V-FITC 和碘化丙啶(BD 公司,美国),室温避光孵育 15 min,然后用流式细胞仪检测。每个样品设 3 个复孔,分别进行 3 次重复实验。

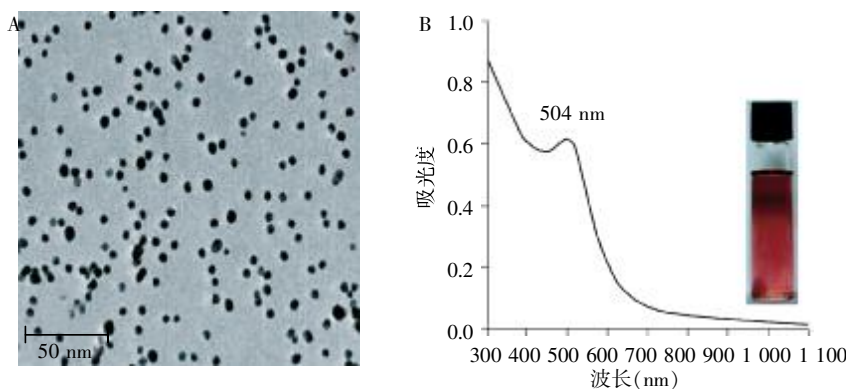
### 1.3 统计学方法

使用 SPSS18.0 软件进行数据分析,所有数据用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较使用单因素方差分析,随后再用 Dunnett 法分别比较各实验组与对照组的差异。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 金纳米颗粒的合成与鉴定

透射电镜显示,金纳米颗粒呈现尺寸均一的球形,平均尺寸为 4 nm(图 1A)。紫外-可见光谱显示,金纳米样品呈现单一尖锐的吸收带,位于 504 nm 附近(图 1B)。



A: 4 nm 金颗粒的 TEM 照片; B: 4 nm 金颗粒的紫外-可见光谱和数码照片。

图 1 金纳米颗粒的合成与鉴定

Figure 1 The synthesis and characterization of 4 nm AuNPs

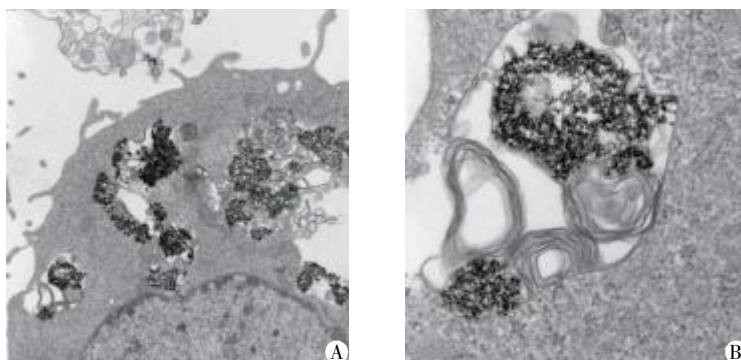
## 2.2 金纳米颗粒在细胞内的分布情况

透射电镜显示,A549 细胞内可见大量 4 nm 金颗粒,主要分布于微小囊泡、胞浆、溶酶体以及细胞核周围(图 2)。

## 2.3 金纳米颗粒对细胞活力的影响

在细胞增殖和毒性分析实验中,定义对照组细

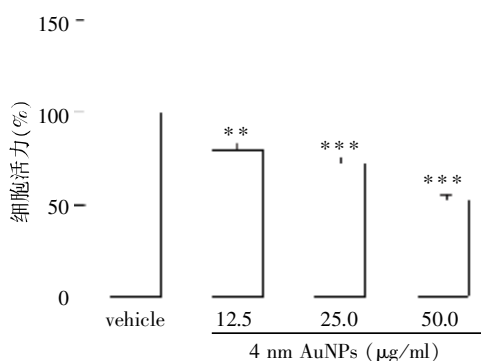
胞活力为 100%,12.5、25.0 和 50.0  $\mu\text{g/ml}$  的金纳米颗粒处理 48 h 后的 A549 活力分别为  $(81.57 \pm 7.33)\%$ 、 $72.30 \pm 7.90\%$ 和 $(51.86 \pm 7.94)\%$ 。金纳米颗粒处理组的细胞活力均明显下降,差异有统计学意义,并且处理组间存在浓度-效应关系,随着 4 nm 金颗粒的浓度增加,A549 的活力下降越明显(图 3)。



A:20 000 倍 TEM 照片;B:80 000 倍 TEM 照片。

图 2 TEM 观察金纳米颗粒在细胞内的分布情况

Figure 2 The intracellular distribution of 4 nm AuNPs observed by TEM



与对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图 3 4 nm 金颗粒对 A549 增殖的影响

Figure 3 The effect of 4 nm AuNPs on proliferation in A549

## 2.4 金纳米颗粒对细胞凋亡的影响

流式细胞术检测 A549 凋亡的结果显示,对照组凋亡率为  $5.00 \pm 0.46\%$ ,12.5、25.0 和 50.0  $\mu\text{g/ml}$  的金纳米颗粒处理 48 h 后的 A549 凋亡率分别为  $(5.53 \pm 0.23)\%$ 、 $(8.00 \pm 0.78)\%$ 和 $(12.47 \pm 1.01)\%$ 。25 和 50  $\mu\text{g/ml}$  金纳米颗粒处理组的 A549 凋亡率均明显增加,差异有统计学意义,而 12.5  $\mu\text{g/ml}$  组的 A549 凋亡率未见明显增加,处理组间存在一定的浓度-效应关系(图 4)。

## 2.5 金纳米颗粒对细胞周期的影响

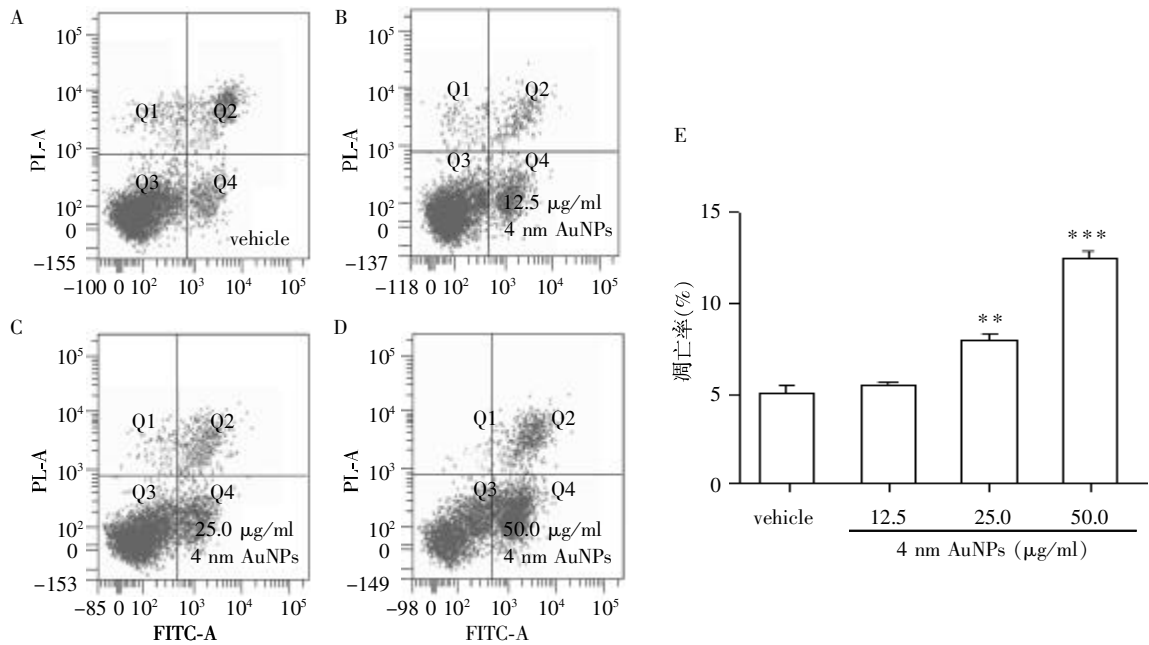
流式细胞术检测 A549 周期的结果显示,相对于对照组,金纳米颗粒处理后的 A549 细胞周期有所停滞,G0/G1 期有延长趋势,对照组和 12.5、25.0、

50.0  $\mu\text{g/ml}$  金纳米颗粒处理组 G0/G1 比例分别为  $(61.25 \pm 4.27)\%$ 、 $(66.94 \pm 5.07)\%$ 、 $(69.67 \pm 4.10)\%$ 和 $(70.35 \pm 3.36)\%$ ,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 5)。

## 3 讨论

肺癌已经成为我国癌症相关死亡的首要病因,占有癌症死亡的 22.7%,而且肺癌的发病率仍在快速增长,到 2025 年肺癌患者人数可能会达到 100 万<sup>[6]</sup>。目前,针对肺癌的治疗手段主要包括化疗、放疗和外科手术治疗等,更多有效的治疗手段仍有待探索。近年来关于 AuNPs 细胞毒性的研究报道较多,AuNPs 被证实对一些肿瘤细胞具有显著杀伤作用<sup>[7]</sup>,表明 AuNPs 在肿瘤治疗中具有很大的潜在应用价值。目前,关于小尺寸 AuNPs 对肿瘤细胞的毒性作用仍报道不一,本研究旨在观察 4 nm 金颗粒对人肺腺癌细胞 A549 的毒性作用。

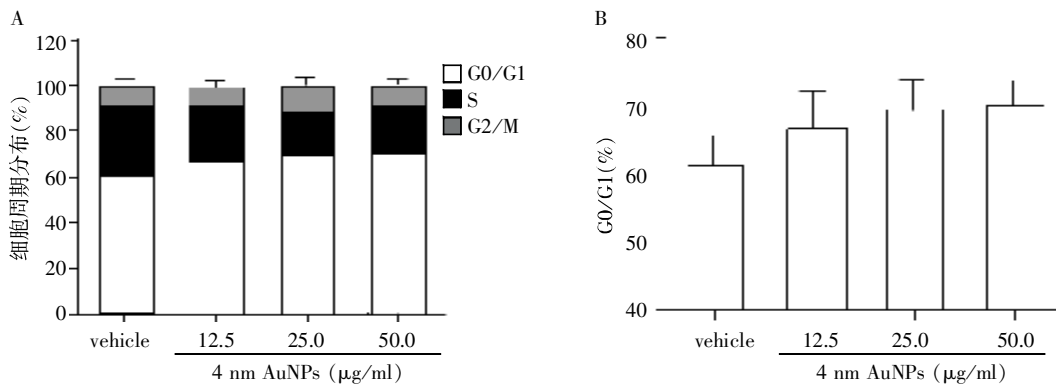
本研究结果显示,4 nm 金颗粒能明显降低 A549 细胞活力,且具有浓度-效应关系,提示 4 nm 金颗粒对 A549 有显著的抑制增殖作用,AuNPs 浓度越高,抑制作用越强。目前,关于 AuNPs 抑制细胞增殖的机制尚不确切。首先,多数研究<sup>[8-9]</sup>认为,活性氧(ROS)的产生是 AuNPs 引起细胞毒性的主要机制,适量的 ROS 是细胞生长所必需的物质,但是当 ROS 产生过多,可能会导致脂质过氧化、DNA 损伤、



A~D: 分别为对照组、12.5、25.0 和 50.0 μg/ml 金纳米颗粒组的细胞凋亡流式图;E: 对照组和金纳米颗粒组的凋亡率比较;与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 4 金纳米颗粒对 A549 凋亡的影响

Figure 4 The effect of 4-nm AuNPs on apoptosis in A549



A: 对照组和金纳米颗粒组的细胞周期分布柱状图;B: 对照组和金纳米颗粒组的 G0/G1 期比较。

图 5 金纳米颗粒对 A549 周期的影响

Figure 5 The effect of 4 nm AuNPs on cell cycle in A549

蛋白质功能低下以及线粒体活性下降等一系列不利于细胞生长的反应。Chompoosor 等<sup>[10]</sup>研究发现, 2 nm 金颗粒可以刺激 HeLa 细胞产生大量 ROS 并造成 DNA 损伤。Zhao 等<sup>[11]</sup> 研究提示, AuNPs 能够促使 A549 产生内源性 ROS, 造成细胞损伤。其次, AuNPs 可以引起细胞形态改变和细胞骨架缺陷, 从而造成细胞损伤, 抑制细胞增殖。Patra 等<sup>[12]</sup>发现 AuNPs 能引起 A549 细胞外形变圆, 细胞核固缩, 造成细胞毒性。Pernodet 等<sup>[13]</sup>研究显示 14 nm AuNPs 能导致人表皮成纤维细胞的细胞骨架消失, 继而抑制细胞增殖、黏附以及迁移。此外, AuNPs 还具有基因毒性,

能改变增殖相关基因的表达水平。Yang 等<sup>[14]</sup>发现 AuNPs 能够干扰胎儿表皮成纤维细胞(HDF-f)的相关基因表达, 调节细胞增殖、周期和氧化应激等。

然而, 一些研究却发现了不同的结果。Connor 等<sup>[3]</sup>研究报道, 尺寸为 4、12 和 18 nm 的 AuNPs 对白血病细胞 K562 均没有产生急性毒性, 他们认为细胞毒性来自于包覆 AuNPs 的溴化十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)。Cui 等<sup>[4]</sup>研究显示, 当 AuNPs 未被 HeLa 细胞胞吞, 而是吸附聚集在细胞表面时, 反而能够促进细胞增殖。同时, Patra 等<sup>[12]</sup>研究表明, 同样条件下 AuNPs 对 A549 有抑制生长作用, 但乳仓

鼠肾细胞(BHK21)和人肝癌细胞(HepG2)却未受影响,说明 AuNPs 的毒性作用具有细胞选择性。因此,作者推测小尺寸 AuNPs 对细胞毒性作用的结论不一可能归因于受处理的细胞不同。本研究结果证实,尺寸为 4 nm 的 AuNPs 对人肺腺癌细胞 A549 具有毒性,对于今后金纳米颗粒在生物学应用的尺寸选择上有重要的参考价值。

流式细胞术结果显示,25 和 50  $\mu\text{g/ml}$  4 nm 金颗粒处理组的 A549 凋亡率均明显增加,提示一定浓度的 4 nm 金颗粒能够显著促进 A549 凋亡。Choudhury 等<sup>[15]</sup>发现 AuNPs 可以抑制 A549 细胞内微管蛋白聚合,促进微管聚集,导致细胞周期停滞于 G0/G1 期并激活线粒体凋亡通路。Liu 等<sup>[16]</sup>研究显示,13 nm 金颗粒能引起 A549 线粒体膜电位紊乱,钙内流增加以及胞内 caspase-3 活化,最终通过线粒体途径引发凋亡。Kang 等<sup>[17]</sup>证实 AuNPs 能靶向进入细胞核,引起肿瘤细胞的 DNA 损伤,细胞分裂停滞,进而导致凋亡。同时,Chuang 等<sup>[18]</sup>观察了多个尺寸的 AuNPs 对 6 种细胞系的凋亡和周期影响,发现 AuNPs 对细胞凋亡和周期的影响也具有细胞选择性。作者认为 AuNPs 影响细胞凋亡的机制比较复杂,包括破坏细胞骨架,增加氧化应激,干扰基因表达等,而其中相对肯定的是,最终的细胞凋亡是通过线粒体途径引发的。另外,本研究发现,4 nm 金颗粒处理后的 A549 细胞周期有所停滞,G0/G1 期有延长趋势,但差异无统计学意义,可能的原因是 AuNPs 浓度不够高或者孵育时间不够长,因此,下一步可以考虑提高 AuNPs 浓度,延长孵育时间来观察其对细胞周期的影响。

#### [参考文献]

[1] Arvizo RR, Bhattacharyya S, Kudgus RA, et al. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: Past, present and future[J]. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(7): 2943-2970

[2] Arvizo RR, Saha S, Wang E, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis by a self-therapeutic nanoparticle [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110 (17): 6700-6705

[3] Connor EE, Mwamuka J, Gole A, et al. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity[J]. *Small*, 2005, 1(3): 325-327

[4] Cui W, Li J, Zhang Y, et al. Effects of aggregation and the surface properties of gold nanoparticles on cytotoxicity and cell growth[J]. *Nanomedicine*, 2012, 8(1): 46-53

[5] Weare WW, Read SM, Warner MG, et al. Improved syn-

thesis of small (d core  $\approx 1.5$  nm) phosphine-stabilized gold nanoparticles[J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122(51): 12890-12891

[6] Zheng S, Qian P, Li F, et al. Association of mitochondrial DNA variations with lung cancer risk in a han chinese population from southwestern china[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31322

[7] Dreaden EC, Mackey MA, Huang X, et al. Beating cancer in multiple ways using nanogold [J]. *Chem Soc Rev*, 2011, 40(7): 3391-3404

[8] Thakor AS, Paulmurugan R, Kempen P, et al. Oxidative stress mediates the effects of raman-active gold nanoparticles in human cells [J]. *Small*, 2011, 7(1): 126-136

[9] Pan Y, Leifert A, Ruau D, et al. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage [J]. *Small*, 2009, 5 (18): 2067-2076

[10] Chomposor A, Saha K, Ghosh PS, et al. The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ros generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles [J]. *Small*, 2010, 6(20): 2246-2249

[11] Zhao Y, Gu X, Ma H, et al. Association of glutathione level and cytotoxicity of gold nanoparticles in lung cancer cells [J]. *J Phys Chem C*, 2011, 115(26): 12797-12802

[12] Patra HK, Banerjee S, Chaudhuri U, et al. Cell selective response to gold nanoparticles[J]. *Nanomedicine*, 2007, 3 (2): 111-119

[13] Pernodet N, Fang X, Sun Y, et al. Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts [J]. *Small*, 2006, 2(6): 766-773

[14] Yang Y, Qu Y, Lu X. Global gene expression analysis of the effects of gold nanoparticles on human dermal fibroblasts[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2010, 6(3): 234-246

[15] Choudhury D, Xavier PL, Chaudhari K, et al. Unprecedented inhibition of tubulin polymerization directed by gold nanoparticles inducing cell cycle arrest and apoptosis[J]. *Nanoscale*, 2013, 5(10): 4476-4489

[16] Liu M, Gu XH, Zhang K, et al. Gold nanoparticles trigger apoptosis and necrosis in lung cancer cells with low intracellular glutathione[J]. *J Nanopart Res*, 2013, 15(8): 1-14

[17] Kang B, Mackey MA, El-Sayed MA. Nuclear targeting of gold nanoparticles in cancer cells induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(5): 1517-1519

[18] Chuang SM, Lee YH, Liang RY, et al. Extensive evaluations of the cytotoxic effects of gold nanoparticles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(10): 4960-4973