

## 奈米微粒對細胞毒性檢測技術之研究開發

關斌如<sup>1</sup> 莊秀美<sup>1</sup> 李怡慧<sup>1</sup> 梁瑞岳<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 國立中興大學生物醫學研究所

EPA 100-1605-02-01

EPA 101-1605-02-01

EPA 102-1605-02-01

### 摘要

奈米 (nanometer, nm) 是一種長度的單位, 指十億分之一 ( $10^{-9}$ ) 公尺, 而奈米微粒就是粒徑尺寸在 1 - 100 nm 奈米範圍內的物質。在日常生活中, 環境中就存在著許多奈米級的物質, 包含人為產生的奈米粒子、生物懸浮和土壤灰塵等。由於近年奈米科技產業的快速發展, 而使用奈米科技產品的領域又涵蓋日常民生用品、醫療器材、及工業用途等。正如在 Singh et al. (2009) 的文獻中指出, 根據 Woodrow Wilson Database 的數據估算出, 目前有超過 800 種含有奈米微粒的商品在市場上, 包括食品、電子元件、日常生活用品、家用器具等[1]。而根據英國及美國的估算, 奈米微粒的產量將會由現今的 2,300 公噸增加到 2020 年的 58,000 公噸重 (<http://www.raeng.org.uk>; Maynard, 2006)。在製造及使用這些奈米科技產品的過程中, 將會伴隨著更多樣化的奈米懸浮物質產生, 而人類暴露於奈米微粒的環境的狀況顯然已經發生, 並且在未來的幾年發生的機會更是會急遽的增加。但相較於目前所存在的奈米材料產品的數量與類型, 我們對其會引發對人體及環境影響的資料及訊息卻是遠遠不足的。小體積, 加上其特殊的物理-化學性質對生物體及生態環境所產生的影響, 都是目前最重要的研究課題。但在奈米物質的毒性檢測技術上, 目前仍未有一套標準檢測方法。因此自 100 年度的「奈米微粒對細胞毒性篩選技術及驗證方法」的計劃中, 開發建立以即時電子式細胞偵測分析儀做為奈米微粒細胞毒性監測的篩選平台, 利用此檢測方法可以免除傳統細胞毒性測試方法之染劑或指示劑的使用, 進而降低其與奈米物干擾所產生之不一致結果, 並利用數種傳統細胞毒性分析法驗證; 此外也著手建立不同粒徑之奈米金對細胞基因產生特定之分子生物標記 (molecular markers) 變化, 希望未來可由特定分子標記變化來快速評估奈米金檢測品對細胞之危害程度, 而本計劃所產出的研究成果, 期能供政府相關機構及研究單做參考。

**關鍵詞:** 奈米微粒、細胞毒性、生物標記

### 一、前言及研究目的

工程化奈米顆粒或奈米微粒 (ENPs, Engineered nanoparticles), 為工業用途所發展出的奈米顆粒, 其定義為其中一維的長度在 1 - 100 nm 奈米範圍內的物質。奈米微粒進入生物體的暴露途徑, 目前已知可經由呼吸道、皮膚穿透、口腔食入、及經由注射進入等路徑 [2]。在探討環境大氣中的奈米微粒對生物體影響的研究, 在生物體的呼吸道可以檢測到微粒之沉積, 並引發對肺部組織的毒害 [3,4]。更進一步的, 許多動物實驗也證實, 當動物個體的呼吸道暴露於奈米微粒的環境中, 其肺部組織的發炎現象及氧化壓力的產生都有增加的趨勢 [5-7]。對暴露於特定奈米微粒的動物實驗研究, 證實了暴

露於奈米二氧化鈦微粒下，會導致小鼠的肺部發炎及受損 [8]；相似的結論也發現在 Trouiller et al. 的報導中，認定奈米二氧化鈦微粒會造成小鼠的 DNA 及細胞組織受損 [9]。而在奈米物質對人類的影響，則是 Shvedova 於 2003 年中的調查，認為對於暴露於環境中含有石墨和碳材料的作業人員，發現有皮膚疾病的發生，如碳纖維導致的皮膚炎、皮膚過度角質化和癌症 [10]；雖然單壁奈米碳管 (SWCNT) 的潛在毒性和反應機制尚未完全研究清楚，但在這篇研究報告中採用的細胞組織模型，模擬 SWCNT 的逆向效應對人類的表皮角質化 (HaCaT) 的影響，單壁奈米碳管可破壞細胞的完整性，以及刺激氫氧自由基的形成，因而加速氧化壓力的產生，造成細胞內抗氧化劑的耗損及過氧化物的累積。研究中明確的指出單壁奈米碳管可引起皮膚的毒性反應。進一步的在 Shvedova 與 Kagan 的文獻回顧報導中，再以單層奈米碳管對肺部組織的影響為重點，提出動物暴露於單壁奈米碳管 (SWCNT) 下，因呼吸道進入生物體而對肺組織所造成的主要影響為細胞毒害、發炎反應、早期肺纖維化、氧化壓力的產生、免疫系統的抑制、被微生物感染的機會增加、甚至導致癌症的發生等 [11]。但在奈米物質的毒性檢測技術上，目前仍未有一套標準檢測方法。

一般而言，要瞭解一種物質對生物體的影響的研究，第一步就是利用體外細胞株為實驗模式，因為相較於動物實驗而言，體外細胞株研究容易控制實驗環境的條件，實驗本身也容易被重覆，實驗所需時間及經費都較動物模式來得經濟，再加上並沒有動物權或道德上的壓力，目前已被認定為一種取代動物模式研究最適當的實驗系統 [12]。在 2010 年六月新修訂的“Guidance manual for the testing of manufactured nanomaterials: OECD’s sponsorship programme; First revision”中提及的 Project 7: The role of Alternative Methods in Nanotoxicology，這個方案主要是研擬替代的測試方法，希望能 1) 降低在探討奈米物質危害所使用的動物數量，2) 減少在測試過程中對動物的傷害，3) 或改用非動物的其他實驗模式。這些替代的測試方法的選定有個 3R 定律為主要原則，即精緻化 (Refinement)、減少化 (Reduction)、及可替代化 (Replacement)；OECD 也建議希望這些替代的測試方法能用在大部份的奈米物質危害評估中，因此可以大量並快速篩選的方法也是非常重要的。因此體外細胞株毒性測試的實驗模式，就成了具潛力的動物模式的替代方法。但在這個建議指導中也指出，目前大多數的體外模式測試方法的適用性及有效性仍舊不清楚，而尋找適用性及有效性高的替代方法，首要就是強調其再現性 (Reproducibility) 及準確性 (Predictability)。利用體外細胞株為實驗模式為研究系統，最常用的檢測毒性的方式為，觀察測試物質對細胞造成的影響為生存或死亡，這種分析方式為最直接，也可測試奈米微粒的立即毒性，所以在毒性測試上，細胞的生存/死亡就成為一個重要的指標 (End-point)。但在探討細胞毒性時，需要注意的是細胞的生長對環境中的變化是非常敏感的，環境中的溫度變化、pH 值的改變、乃至於培養基營養成份的濃度，都會影響細胞的生長，因此在實驗過程中的各項條件，必須控制的非常好，以降低不必要的誤差，而導致細胞是因不穩定的培養條件而影響其生長。目前在這個領域中，我們不乏看到許多不一致或互相矛盾的結果，歸納其原因主要還是由於多種傳統的細胞毒性檢測方法，仍多仰賴染劑或指示劑的使用，但多數的染劑或指示劑目前已被發現容易與奈米物質產生干擾，因而常出現影響結果之判定。因此，新穎及取代傳統的細胞毒性檢測方法的奈米物質之毒性篩選平台之建立，則是進行此研究主要的目的。

## 二、研究方法

本研究團隊經過文獻回顧及從事奈米物質毒性測試經驗中，同意目前一般使用傳統體外細胞毒性檢測方法有其缺失及不足之處，因而尋找其他的替代方法。而在 Ponti et al. (2006) 的報告中指出，連續性長期觀測細胞電阻的變化的方式，較傳統體外細胞株毒性的檢測方法來得敏感及穩定，利用傳統細胞毒性分析法驗證，更證實即時電子式細胞偵測分析儀的準確性非常高 [13]。我們在 100 年度的計劃中，建立及開發即時電子式細胞偵測分析儀可為奈米微粒細胞毒性監測的標準方法；而在 101 年度的計劃中，持續開發符合 OECD 建議之細胞電阻 (CI) 檢測技術，並包含篩選可能之生物分子標誌，用以奈米微粒暴露時生物體產生細胞傷害之危險評估。今年度的計劃之建議工作內容，將持續以即時電子式細胞偵測分析儀做為奈米金微粒細胞毒性監測的篩選平台，並篩選出在不同粒徑奈米金暴露下，在同一種細胞株都可產生相似表現反應之分子標記，進行基因及其蛋白之即時定量 PCR (Real-time PCR) 及免疫轉漬法 (immunoblotting) 確認試驗，以找出具代表性之分子標記，未來將可用於奈米金微粒暴露時生物體產生細胞傷害之危險評估。

## 三、結果與討論

本計畫重要成果整理如下：

1. 奈米金溶液對用來測試的六株細胞株，皆有不同程度的細胞毒性。
2. 以即時電子式細胞偵測分析系統可以持續檢測奈米金對細胞生長所產生的動態影響，也因不需染劑的使用，進而降低一般傳統的細胞毒性分析法中因受奈米物質干擾所產生的結果不一致性。此方法也較一般傳統的細胞毒性分析法在時間及人力上使用方便，也有較寬廣的細胞株適用性。利用此方法得到奈米金對不同細胞株有不同程度的毒害，毒害嚴重度為 MRC5 > NIH3T3 > Vero > AGS > PK-15 > A549。
3. 以 MTS 細胞毒性測試法分析，奈米金對不同細胞株有不同程度的毒害，以濃度 IC50 分析可得到，奈米金毒害嚴重度為 Vero (207.8 ± 57 ng/mL) > AGS (317.7 ± 41 ng/mL) > NIH3T3 (342.9 ± 119 ng/mL) > PK-15 (688.5 ± 262 ng/mL) > A549 (740.6 ± 87 ng/mL)。但此方法無法用在 MRC5 細胞上。
4. 以 Trypan blue exclusion 細胞毒性測試法分析，奈米金對不同細胞株有不同程度的毒害，毒害嚴重度為 AGS > Vero > A549 > NIH3T3。但此方法無法用在 MRC5 細胞上。
5. 以 Colony forming 細胞毒性測試法分析，毒害嚴重度為 MRC5 > NIH3T3 > Vero > AGS > PK-15 > A549。但此方法無法用在 MRC5 及 PK-15 細胞上。
6. 奈米金處理對 AGS 細胞可產生凋亡，但在 A549 細胞則是引發細胞週期的停滯。
7. 以 Real-time PCR 及西方墨點分析法，可驗證基因晶片分析中所得到的結果，證實參與在基因損害及細胞週期調控的重要蛋白分子，皆有明顯的變化。

根據本計畫所建立各細胞株培養條件，即時電子式細胞偵測分析儀可為奈米微粒細胞毒性監測的標準方法，然而任何分析方法仍有其使用上須注意或不足之處，如 (1) 操作人員須熟習此儀器之設計原理與操作，可參考本計畫之成果，再依據欲分析之物質與細胞特性在實驗條件上做微調，便可分析不同細胞對不同奈米微粒之細胞毒性；(2) 依據本計畫所建立之平台，可以應用於任何藥物或化學物質之細胞毒性傷害評估，但仍須依據該藥物之特性慎選標的細胞；(3) 即時電子式細胞偵測分

析儀之設計原理不適合懸浮培養之細胞株；(4) 研究中使用的奈米金之濃度為因應實驗需求直接強迫細胞長期連續性暴露，所得數據僅作為細胞毒性產生與否之參考，與一般可能的人體暴露情況完全不同，勿直接以此分析結果斷然下定論，此計畫的目的旨在建立分析平台，並非依據有限結果得到毒性結論；(5) 依據本計畫所建立之平台可以應用於奈米物質開發過程中之先行評估，作為奈米物質製程修改或修飾奈米物質之參考，以期達到開發生物相容性奈米物質之最終目的，而非奈米材質成品上市後才做的細胞毒性評估。

#### 四、結論

本計畫以「即時電子式細胞偵測分析系統」在不使用傳統染劑之下連續性地觀察奈米金對細胞生長的影響，並佐以一般傳統細胞毒性測試法，分析奈米金所產生的細胞毒性。綜合計畫執行成果，本研究團隊針對多種哺乳類細胞株之生長特性，成功建立以細胞連續及即時生長分析儀分析奈米物質標毒性分析平台並確定奈米金溶液在本系統的評估之下是有細胞毒性，且不同粒徑的奈米金對不同的細胞株有不同程度的生長抑制作用，而一般細胞毒性分析系統較不易區分出不同細胞株對奈米金生長抑制作用之不同。細胞連續及即時生長分析儀可在整個測試過程中，全面觀察細胞生長的動態變化，而非單一時間點的細胞毒性方法。此方法並無一般傳統方法需要染劑的使用，因此並無染劑與奈米物質干擾的現象，此方法也較一般傳統的細胞毒性分析法在時間及人力上使用方便，也有較寬廣的細胞株適用性，如無法利用其它細胞毒性方法測試的 MRC-5 細胞以及無法應用於 colony-forming 及 flow cytometry 的 PK-15 細胞。此外細胞電阻的測量為電腦自動化，也降低減少以其他測試法容易產生的人為操作誤差。

#### 參考文獻

- [1] Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J. S., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffei, T. G. G., Wright, C. J., Doak, S. H. Nanogenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30, 3891-3914 (2009).
- [2] Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives* 113, 823-839 (2005).
- [3] Cheng, Y. S. Hansen, G. K., Su, Y. F., Yeh, H. C., Morgan, K. T. Deposition of ultrafine aerosols in rat nasal molds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 106, 222-233 (1990).
- [4] Kelly, J. T., Asgharian, B. Nasal molds as predictors of fine and coarse particle deposition in rat nasal airways. *Inhal. Toxicol.* 15, 859-875 (2003).
- [5] Ferin, J., Oberdorster, G., Penney, D. P. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6, 535-542 (1992).
- [6] Warheit, D. B. Laurence, B. R., Reed, K. L., Roach, D. H., Reynolds, G. A., Webb, T. R. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol. Sci.* 77, 117-125 (2004).
- [7] Zhang, Q., Kusaka, Y., Zhu, X., Sato, K., Mo, Y., Kluz, T., Donaldson, K. Comparative toxicity of standard nickel and ultrafine nickel in lung after intratracheal instillation. *J. Occup. Health* 45, 23-30 (2003).
- [8] Grassian, V. H., O'shaughnessy, P. T., Adamcakova-Dodd, A., Pettibone, J. M., Thorne, P. S. Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environ Health Perspect.* 115, 397-402 (2007).
- [9] Trouiller, B., Reliene, R., Westbrook, A., Solaimani, P., Schiestl, R. H. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res.* 69, 8784-8789 (2009).
- [10] Shvedova, A. A., Castranova, V., Kisin, E. R., Schwegler-Berry, D., Murray, A. R., Gandelsman, V.Z.,

- Maynard, A., Baron, P. Exposure to carbon nanotube material: Assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J. Toxicol. Environ. Health A* 66, 1909–1926 (2003).
- [11] Shvedova, A. A., Kagan, V. E. The role of nanotoxicology in realizing the “helping without harm” paradigm of nanomedicine: lessons from studies of pulmonary effects of single-walled carbon nanotubes. *J. Intern. Med.* 267, 106-118 (2010).
- [12] Lewinski, N., Colvin, V., Drezek, R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 4, 26-49 (2008).
- [13] Ponti, J., Ceriotti, L., Munaro, B., Farina, M., Munai, A., Whelan, M., Colpo, P., Sabbioni, E., Rossi, F. Comparison of impedance-based sensors for cell adhesion monitoring and in vitro methods for detecting cytotoxicity induced by chemicals. *Altern. Lab. Anim.* 34, 515-525 (2006).