

# 二氧化矽、氧化鋅及氧化鉻奈米粉體的 細胞毒性評估

## The Assessment of the Cellular Toxicity of SiO<sub>2</sub>、 ZnO and Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanopowders

黃文濤<sup>1</sup> Wen-Tao Huang

元培科技大學放射技術系

賴哲民<sup>3</sup> Jer-Min Lai

元培科技大學通識教育中心

張林松<sup>2</sup> Lin-Song Chang

元培科技大學視光系

施科念<sup>\*1</sup> Ko-Nien Shih

元培科技大學放射技術系

<sup>1</sup>Department of Radiological Technology, Yuanpei University of Science and Technology

<sup>2</sup>Department of Optometry, Yuanpei University of Science and Technology

<sup>3</sup>General Education Center, Yuanpei University of Science and Technology

(Received, May 31, 2010; Revised, July 19, 2010; Accepted, September 1, 2010)

**摘要：**本實驗是分別將工業技術研究所研製的氧化錫、二氧化矽及氧化鉻普通粉體及奈米粉體，在不同濃度（1 ppm、10 ppm、100 ppm 及 1,000 ppm）下對四種人類細胞株進行細胞毒性測試。計算細胞存活率將以錐藍質排除測試 (trypan blue exclusion test) 及 MTT assay 的方法進行，並以倒立式顯微鏡觀察不同粉體濃度在細胞培養液下的變化，及細胞在受測環境下的型態改變。實驗結果顯示無論是普通或是奈米尺寸，這三種化合物對各種細胞的毒性依序是氧化錫>氧化鉻>二氧化矽，在 1,000 及 100 ppm 的氧化錫濃度下與細胞培養 24 小時，所有受測細胞的存活率幾乎等於零（K-562 細胞株除外），而二氧化矽及氧化鉻則仍有細胞存活。另一方面比較同一種化合物但不同尺寸的粉體對細胞的毒性如何，我們發現氧化錫在奈米化後似乎對細胞（HeLa、HepG2/C3A 及 MRC-5）的毒性變小了（在 100 ppm 濃度下各種細胞存活率平均約升高 8%），有趣的是二氧化矽在奈米化後對細胞的毒性反而增大（在

\*Corresponding author



100 ppm 濃度下各種細胞存活率平均約降低 40%)，而氧化鉻則較無較顯著的改變。在白血球細胞株 (K-562)則發現普通及奈米粉體的化合物，細胞毒性的差異較小。由上述實驗我們可清楚了解不同尺寸或型態的粉體對細胞的毒性是有極大的差異性，而且對不同型態的細胞（黏貼性或懸浮性）也會造成不同的影響。我們希望藉此實驗能提供各類奈米粉體對人體細胞影響的訊息給於相關單位，以建立奈米材料製造的安全法規。

**關鍵詞：**奈米粉體、細胞毒性、二氧化矽、氧化鋅和氧化鉻

**Abstract:** In this study, the normal- and nano-sized ZnO, SiO<sub>2</sub> and Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> powders, which provided from Industrial Technology Research Institute (ITRI), were assessed by cellular toxicity in four kinds of human cell lines under different concentrations (1 ppm, 10 ppm, 100 ppm and 1,000 ppm). Cell survival rate of test cells were measured by the method of trypan blue exclusion and MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay, and images of both types powders and cell morphological changes in different powders' concentrations were observed by the inverted microscope. The experimental results showed normal- or nano-sized compound powers all were toxic to various kinds of cells and the toxicity was in the following order: ZnO > Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> > SiO<sub>2</sub>. The survival rates of test cell lines in 24 hours incubation under the concentrations of ZnO in 1,000 and 100 ppm dropped nearly to zero (except K-562 cell line), but still had the cells that survived in the same treatment with SiO<sub>2</sub> or Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. On the other hand, the same property chemical compound but in different size were analyzed in cell toxicity test. We found the nano-sized ZnO toxicity in HeLa, HepG2/C3A and MRC-5 had diminished (the survival rates of various kinds of cells raised 8% averagely under 100 ppm concentration when compared to normal-size ZnO). Interestingly, the cell toxicity of nano-sized SiO<sub>2</sub> had increased (the survival rates of different types cells averagely reduced to 40% under the concentration in 100 ppm), however, there did not have apparent change in Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. We also found that the test powders whether in normal- or nano-sized, the cell toxicity was little different in the leukemia cells (K-562). These data suggest that different sizes or types of the powders have great different toxicities in cells, and will cause different influences on cells with different properties (adherent or suspend). We hope to make use of this study to offer the cellular toxicity information of nano-sized powders to the relevant unit, in order to set up the secure legislation of nanomaterial production.

**Key words:** Nanopowder, Cellular toxicity, SiO<sub>2</sub>, ZnO and Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

## 壹、前 言

### 一、奈米科技的快速發展與隱憂



二十一世紀無疑是奈米科技的世紀，奈米技術的發展一日千里，許多奈米的材料應運而生，目前奈米粉體和一維奈米線已經進入一些材料中，並進入市場，如化妝品、織物、抗菌材料等，但在含有奈米顆粒或奈米纖維的紡織品或生活用品中，奈米材料會隨時間推移而脫落，脫落的奈米顆粒、纖維或含有奈米材料的衣物是否會給直接使用的人體和環境帶來危害，目前仍待實驗證明<sup>1-2</sup>。在一樣新科技的發現總是在背後隱藏無法預知的社會及環境傷害，例如 DDT 的發明與濫用，就是一個可資借鏡的案例。DDT 的全名為「雙氯-雙苯-三氯乙醛」(Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane)。美國在 1940 年代初期大量生產使用，主要是控制植物病蟲害。由於 DDT 對於農業有極大的貢獻，當時 DDT 被學術界公認為安全的，無風險，且非常有效的殺蟲劑。但隨後科學家經過十幾年的調查研究與實驗，才逐漸了解 DDT 對生態環境與人體健康的影響是長久且嚴重的。於 1963 年 5 月，美國總統的科學顧問委員會才建議，DDT 應在短期內禁止使用。然而，美國環保署宣告 DDT 於農業方面，全面禁用，仍是拖延至 1972 年的 6 月。前後約 30 年，美國境內總共使用大約 13 億 5,000 萬磅的 DDT，另外有數億磅外銷。於 1980 年代，美國環保署調查美國人體內脂肪組織出現 DDT 衍生物的頻率是 100%，血清內出現的頻率也高達 99%<sup>3</sup>，這使我們知道在一樣新科技發明且將廣泛應用於人類生活環境之時，相關的人體健康危害評估是一定要進行的，若是只著重其經濟利益而忽視其對環境衛生及人體健康的影響，則將會產生不可預期的人為災難<sup>4</sup>。

## 二、奈米粉體對人體的影響

許多處奈米級的物質會表現出與原本材料極不同的物理化學性質，物質的尺寸在奈米級時的性能可能與常規條件下的性能也有很大差異<sup>5</sup>。如導電性良好的金屬銀，當尺寸小於十幾個奈米時可成為非導體；化學惰性的金屬鉑製成奈米微粒後是活潑的激活劑等等。奈米化後的物質，有許多的性質與特性是需要學者專家再加以研究，特別是那些與人體和生命直接相關的醫療材料，因為奈米的尺寸較細胞微小，這為治療醫學、細胞生物學、藥理學研究帶來了方便，也可能帶來了隱憂，因為從粉體進入人體呼吸道的沈積作用來看，粒徑大於 10 μm 之粉塵在人體呼吸系統，可能在鼻孔、上呼吸道時即被阻擋，而無法深入肺部，而粒徑在 5 μm 至 102 μm 間之粉塵則主要沈積上呼吸道之粘液纖毛；粒徑在 5 μm 以下則可深入肺部，這種可深入肺部之粉塵一般稱之為可呼吸性粉塵 (respirable particles)。美國原子委員會 (NEC) 定義可呼吸性粉塵為 10 μm 以上為零，3.5 μm 以下百分之五十，2 μm 以下則百分之百沈積可在人體肺部<sup>6-7</sup>，這意味著物質顆粒越小越容易透過各種路徑 (包括呼吸道、消化道及皮膚接觸) 進入人體，並沈積在組織中，更可能通過細胞膜進入細胞，這對人體細胞是否具備更大的毒性<sup>8</sup>，目前雖無太多的資料可提供參考，但已有學者指出在防曬油中添加的二氧化鈦及氧化鋅奈米顆粒會在皮膚與肺部細胞產生更多的氧化游離基 (free radical) 而破壞細胞中的 DNA 並造成細胞損傷<sup>9-10</sup>。最近美國太空總署的強生太空中心 (Johnson Space center) 就報導在大白鼠的肺部實驗發現奈米碳管比石英粉塵的毒性還要來的大。而 1985 年由史摩萊及哈夫曼所發現由 60 個碳分子組成的封閉中空球體巴克球 (buckyball)，其直徑僅有數奈米，由於其成份、結構及化學性質獨特，未來可能半導體、觸媒、光電、高分子及醫學上帶來革命性的影響。初步的研究顯示，在經施壓後，其硬度比最硬的鑽石還高，猶如超微型的小鋼



珠，其應用除了擔任工業上的潤滑劑以外，並且廣泛運用在材料、電池、觸媒、半導體、癌症治療等等方面的應用研究，甚至可應用來當抗愛滋的藥物<sup>11</sup>。但最近的實驗證明，巴克球可輕易通過血腦屏障(blood brain barrier)而滯留在腦細胞，雖然在人類仍不知其傷害性為何，但魚類的實驗結果發現巴克球會導致魚苗的基因突變而使腦部受損，另一方面此實驗室亦證明其對小甲殼類(水蚤)也是有毒性的<sup>11-12</sup>，這些事實告訴我們這些奈米材料除了可直接經由接觸造成人體傷害外，亦可透過食物鏈間接影響到人類的健康，最近總部設在加拿大溫尼伯市的 ETC 組織，全名是「生態平衡、侵蝕、科技轉型暨企業控管」的執行長穆尼，更呼籲即將在南非約翰尼斯堡召開的第三屆地球永續發展高峰會的各國領袖，宣布暫停奈米物質的商業生產。他並寄望各國領袖建立一套透明化機制，藉以深入評估奈米科技隱含的社會、衛生、環境風險<sup>2</sup>。這也說明奈米顆粒的危險性確實存在我們的日常生活中。因此，在我們還不了解奈米材料的很多性質之前，應該未雨綢繆的考慮日後“奈米污染”的問題。專家建議在應用奈米化材料於人類的生活環境前，應先有完善的實驗報告提供給製造的廠商或是使用的人們，而生產者必須先瞭解將應用在人類身上的奈米顆粒或材料，是否會在使用時進入人體各個組織造成傷害，或造成細胞的 DNA 的突變進而導致癌症的產生<sup>7</sup>。

### 三、國內奈米粉體製造及應用現況<sup>4-5</sup>

最近工研院材料所建立之直流熱電漿反應製造奈米粉體技術及設備，可低成本、連續式量產(>3 公斤/小時)不團聚之奈米氧化物粉體，並能精確控制奈米粉體之化學組成、相純度、結構、形狀、大小等性質。目前已研製出粉體平均粒徑 15 nm、比表面積 170 m<sup>2</sup>/g 之奈米二氧化矽；粉體平均粒徑 20 nm 之奈米二氧化錫；粉體平均粒徑 35 nm 之奈米氧化銅；粉體平均粒徑 40 nm、比表面積 41 m<sup>2</sup>/g 之奈米氧化鋁；球狀、棒狀及四足錐狀、比表面積可達 50 m<sup>2</sup>/g 之奈米氧化鋅粉。奈米二氧化矽為無定型白色粉末的無機非金屬材料呈絮狀和網狀的準顆粒結構，基本粒子為球形狀，主要應用領域為矽橡膠、有機矽化合物、聚酯、塗料、醫藥、粘合劑、油墨、化妝品、與電子材料等應用領域，而奈米氧化鋅由於粒子尺寸細微化，使比表面積劇增而產生的表面效應及小尺寸效應和宏觀的量子隧道效應等而使氧化鋅的奈米粒子在磁、光、電的性能上產生與傳統氧化鋅粒子所無的特殊性能及新用途，目前廣泛的應用於橡膠、電子、陶瓷、紡織、機械、塗料、國防工業。雖然奈米氧化鈷目前的應用範圍無前述兩樣奈米粉體應用的多，但現在已經可利用奈米鈷粉記錄密度高、矯頑力高(可達 119.4 KA/m)、和抗氧化性好等優點，來大幅度改善磁帶和大容量軟硬磁片的性能，也可應用於密封減震、醫療器械、聲音調節、光顯示等，在國防方面因其對電磁波有特殊的吸收作用也可作為軍事用高性能毫米波隱形材料。但值得注意的是，這些新合成的奈米粉體皆未進行過細胞毒性或是毒物藥理的測試，是否比原來常規條件下的粉體對人體傷害要來的大或小，目前仍不得而知。為了確保日後生產者及使用者的健康考量，因此本實驗室將與工研院合作將這些粉體進行體外的細胞毒性、基因毒性及對肺泡巨噬細胞釋放發炎物質的影響為評估因子，來加以研究及評估這些奈米粉體對人體健康危害的影響如何，並可提供國家建立奈米材料的安全研究和用法規的參考，以預防奈米材料所可能造成的人體及環境的危害。



## 貳、實驗材料與方法

### 一、實驗器材

1. 恆溫二氧化碳細胞培養箱：提供細胞生長所需的環境（37°C，CO<sub>2</sub> 濃度 5%及濕度 80%）。
2. 液態氮細胞保存桶：細胞株保存使用。
3. 低溫高速離心機 (Bekman)：以離心力使管內物質沈降進而造成細胞與培養液分離，或細胞胞器之分離。
4. 電動水平搖晃機：MTT assay 時溶出終產物時使用。
5. 無塵無菌操作台：細胞培養所需無塵無菌工作平台。
6. 倒立光學顯微鏡(放大倍數 100X,200X 及 400X)：計數細胞存活率及觀察細胞型態。
7. Nikon 995 數位相機：將顯微鏡呈現的影像數位化加以記錄。
8. 37°C 水浴槽：回溫培養液及所需實驗溶液。
9. Bio-Tec Instruments ELx808 ELISA Reader：以 570 nm 吸光值判讀 MTT assay 終產物的儀器。

### 二、實驗耗材

1. RPMI-1640 (for K-562 cells) 及 DMEM (for HepG2-C3A、MRC-5 及 HeLa cells) 細胞培養基 (Dulbecco's Modified Eagles Medium; Biowest) 皆添加 10% 去活性之胎牛血清 (Fetal bovine serum; GIBCO)，100U/ml 之青黴素 (penicillin)，100μg/ml 之鏈黴素 (streptomycin)，2 mM 麩胺酸 (L-glutamine) 及 1% 非必須胺基酸 (non-essential amino acid)。
2. PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.2) (磷酸緩衝生理食鹽水)
3. Trypsin-EDTA (胰蛋白酵素) in HBSS buffer (可使貼附性細胞自培養皿脫落，繼代培養所需) (Biowest)。
4. Trypan blue 錐蟲藍染料 (計算活細胞數目使用之染料)。
5. SiO<sub>2</sub>、Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 及 ZnO 之正常或奈米粉體 (工業研究院提供)。
6. DMSO (dimethyl sulfoxide)：有機溶劑 (作為 MTT 的溶劑亦為凍細胞之抗凍劑) (Sigma)。
7. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)：細胞毒性測試的化學成分，為黃色粉末 (Sigma)。

### 三、實驗細胞株及實驗方法 SiO<sub>2</sub>

HeLa cell: 人類子宮頸癌上皮細胞株。

HepG2/C3A cell: 人類肝癌細胞株。

K-562 cell: 人類慢性骨髓性血癌細胞株。

MRC-5 cell: 人類胚胎肝細胞株。



## 四、實驗方法

### (一) 細胞培養條件

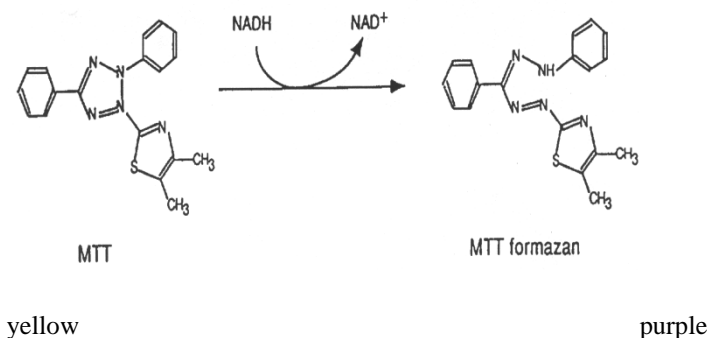
上述細胞培養 2~3 天後，視各類細胞生長狀況，當細胞佔滿生長平面空間 (confluence) 將培養液吸掉，加入 10 ml PBS 緩沖液洗細胞表面吸掉後再重複一次，接著加入 1 ml Trypsin-EDTA (潤濕後即可吸取出)，然後將 flask 置入 37 °C 細胞培養箱 3~5 分鐘，細胞會從培養皿表面脫落。加入 10 ml 培養液沖洗下細胞，再將此細胞懸浮液，分置於含 2~5 個 (視細胞多寡及特性) 含 10 ml 培養液的培養皿，置於 37 °C 細胞培養箱培養。

若為 K-562 細胞(為懸浮性細胞，無須使用 Trypsin-EDTA)將視培養基的量來進行繼代培養。T-75 的 flask 內加入 10ml 的 RPMI-1640 培養基，每培養 3 天吸出培養液，離心後吸除上清液，再加入適量之培養基，用塑膠吸管多次沖散混和均勻，取原液 1/5 量種入 flask 內即可。

### (二) 細胞毒性試驗 (Cellular toxicity assay)

首先將  $10^5$  細胞/well 種植 (seeding) 於 12-well 細胞培養皿中，培養於 37°C 二氧化碳培養箱 12 小時，將測試粉體進行五個劑量組，劑量間隔可為 10 倍為參考值，分別為 0  $\mu\text{g/ml}$  (控制組)、1  $\mu\text{g/ml}$ 、10  $\mu\text{g/ml}$ 、100  $\mu\text{g/ml}$  及 1,000  $\mu\text{g/ml}$  加入細胞。細胞在試驗物質處理 24 小時及 48 小時後，在倒立式顯微鏡觀察細胞型態的變化，並以 trypan blue exclusion 及 MTT assay<sup>13</sup> 測試計算細胞細胞存活率。

MTT Assay 或稱 Tetrazolium assay (Mosmann, 1983) 是一般常用的細胞毒性試驗方法，原理為 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide 黃色水溶性固體可被細胞內粒腺體 (mitochondria) 中的去氫酵素 (dehydrogenase) 代謝，將 tetrazolium ring 切斷還原呈紫色不溶性沈澱物 formazan (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl-formazan) 堆積在細胞中，以 DMSO 溶解，用 589nm 測其吸光值(O.D.)。因活細胞才具有活性的粒腺體酵素，故所測得的吸光值會與活細胞數量成正比關係，因此利用 formazan 產量的多寡來評估細胞的存活率。活細胞代謝產生 formazan 之回應如下圖所示。



### (三) 試驗結果

用 Sigma plot 9.0 軟體來分析實驗結果，實驗所得數據以平均值加減標準差(MEAN±S.D.)來表示。比較兩組之間差異以 pair t-test 分析(本論文皆以控制組為標準以比較各組的差異)，當  $P < 0.05$  時表示具有統計上的顯著的差異。

## 參、結果與討論

本實驗主要以四種人類細胞株(圖 1)對不同化合物(氧化錫、二氧化矽及氧化鉻)的普通粉體及奈米粉體做細胞毒性的測試及顯微鏡下細胞及粉體型態的紀錄。實驗結果分為下列二個部分來描述：

### 一、氧化鋅、二氧化矽與氧化鉻普通粉體與奈米粉體的性質比較

在進行細胞實驗前，我們必須先將粉體溶於細胞培養液，而我們的原始濃度是將 10 mg 的粉體溶於 1 mL 的培養液，濃度為 10,000 mg/L (亦即 10,000 ppm)，實驗時再將其以培養液稀釋至實驗濃度。在配置粉體溶液時，我們可發現二氧化矽與氧化鉻的普通粉體較不易均勻溶於培養液，容易沈澱於試管底，而此兩者的奈米粉體則容易散布於培養液中，而不會緊密沈澱於管底如圖 2 所示。而在顯微鏡下觀察粉體的型態亦可發現，二氧化矽與氧化鉻的普通粉體與奈米粉體所形成的沈澱晶體也有些許不同，如圖 3 (普通粉體)及圖 4 (奈米粉體)所示：同樣是 100 ppm 二氧化矽在奈米化後的沈澱晶體似乎較普通粉體為小且形狀也較圓滑，而氧化鉻兩種粉體呈現同樣的顏色，但奈米化後的沈澱結晶較普通粉體為小。

上述資料可清楚告訴我們：化合物在經過奈米化後確實會改變其物理化學性質，而直接或間接改變其對人體細胞的作用方式。

### 二、氧化鋅、二氧化矽與氧化鉻普通粉體與奈米粉體的細胞毒性測試

此次實驗主要以人類四種細胞株為受測對象，來進行各類化合物粉體的細胞毒性分析，實驗的材料及流程請參照上個章節「實驗材料與方法」。實驗資料顯示在這三種化合物對各種細胞的毒性依序是氧化錫>氧化鉻>二氧化矽(圖 5、6、7、8、9 和 10)，在 1,000 ppm 的普通氧化鋅濃度下 24 小時，所有黏貼型的細胞的存活率幾乎等於零，二氧化矽實驗組平均約為 30%，氧化鉻實驗組則約有 5% 細胞存活，而懸浮型的血球細胞則仍有 40% 的存活率。當受測化合物為奈米粉體時，在 1,000 ppm 的普通氧化鋅濃度下 24 小時，所有黏貼型的細胞的存活率仍是趨近於零，只有 MRC-5 的細胞有約 3.5% ( $p < 0.01$ ) 的細胞存活率。

另一方面比較同一種化合物但不同尺寸的粉體對細胞的毒性，我們發現氧化鋅在奈米化後似乎對黏附型細胞(HeLa、HepG2/C3A 及 MRC-5)的毒性變小了，在 100 ppm 濃度下黏附型細胞存活率平均約升高 7.5% ( $p < 0.01$ )，其原因有可能是氧化鋅在奈米化後，於細胞培養液中所形成的沈澱晶體對細胞影響較小。有趣的是二氧化矽在奈米化後對黏附型細胞的毒性反而增大，在 100 ppm 濃度下 HeLa 細胞存活率平均從 88% 下降至 45% (圖 5 和圖 6)，HepG2/C3A 實驗結果與 HeLa 相似 (data not shown) 而 MRC-5 則從 86% 下降至 36%，而氧



化銻雖有此現象但差異不大（約下降 5~10%）（圖 7 和圖 8），這樣的現象似乎說明了二氧化矽在奈米化後可能較容易進入細胞，而致使毒性變大。在白血球細胞株（K-562）則發現普通及奈米粉體的化合物，細胞毒性的差異較小（圖 9 和圖 10），有趣的是在高濃度氧化鋅處理下（1,000 ppm 和 100 ppm）細胞仍分別有 35%和 38%的存活率，解釋此現象的原因，我們認為可能由於 K-562 屬懸浮性的細胞，而較不容易受到大量化合物沈澱物的傷害，反之，黏附性的細胞由於必須附著於培養皿上，與沈澱物接觸的面積較大，故容易導致細胞死亡，這也說明了不只粉體的型態會影響其細胞毒性，其接觸方式也是非常重要的影響因子。由上述實驗我們可清楚了解不同尺寸或型態的粉體對細胞的毒性是有極大的差異性，而且對不同型態的細胞（黏貼性或懸浮性）也會造成不同的影響。

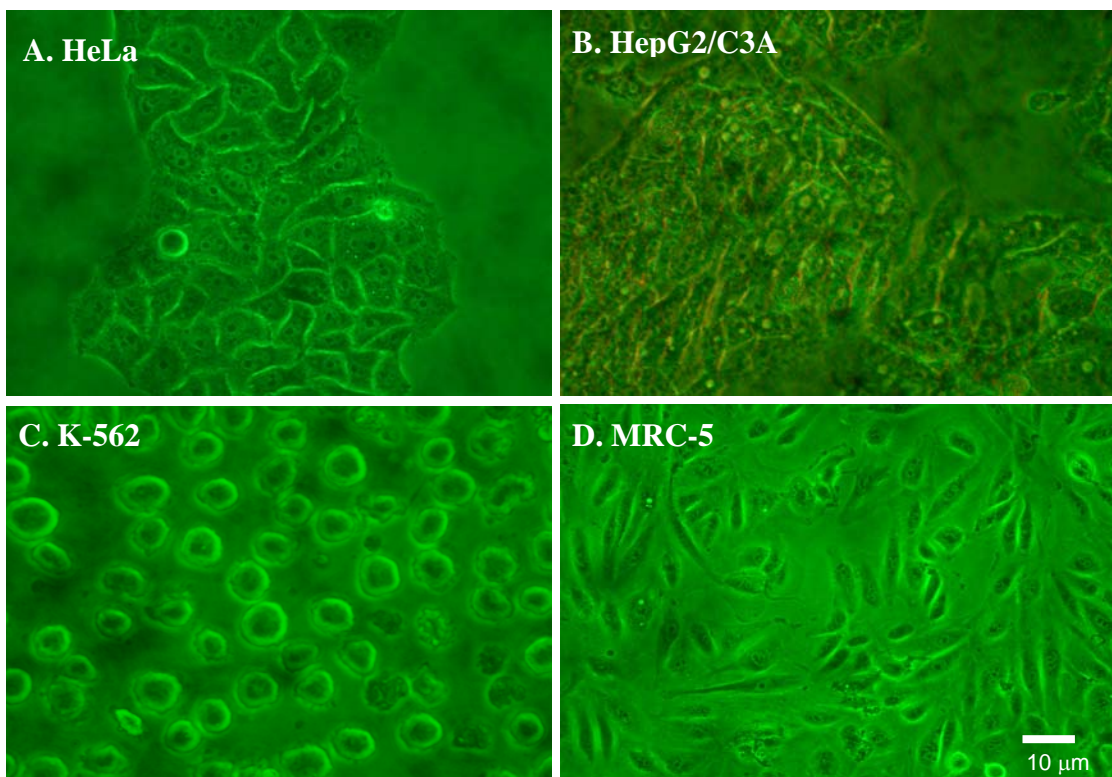


圖 1 四種受測人類細胞株的型態。A：HeLa 為人類子宮頸癌上皮細胞株，B：HepG2/C3A cell 為人類肝癌細胞株，C：K-562 為人類慢性骨髓性血癌細胞株，D：MRC-5 為人類胚胎肝細胞。





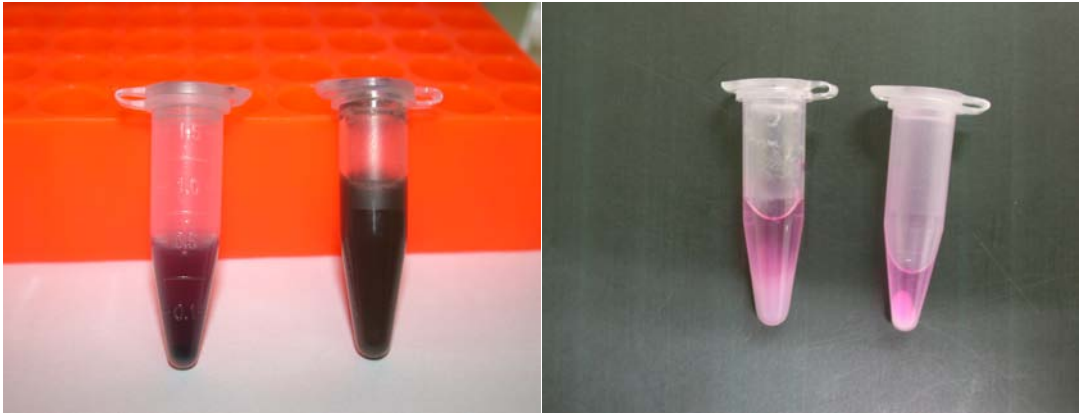


圖 2  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  和  $\text{SiO}_2$  的普通粉體及奈米粉體溶於細胞培養液的差異。A： $\text{Cr}_2\text{O}_3$  粉體；B： $\text{SiO}_2$  粉體。箭頭所指為奈米粉體。

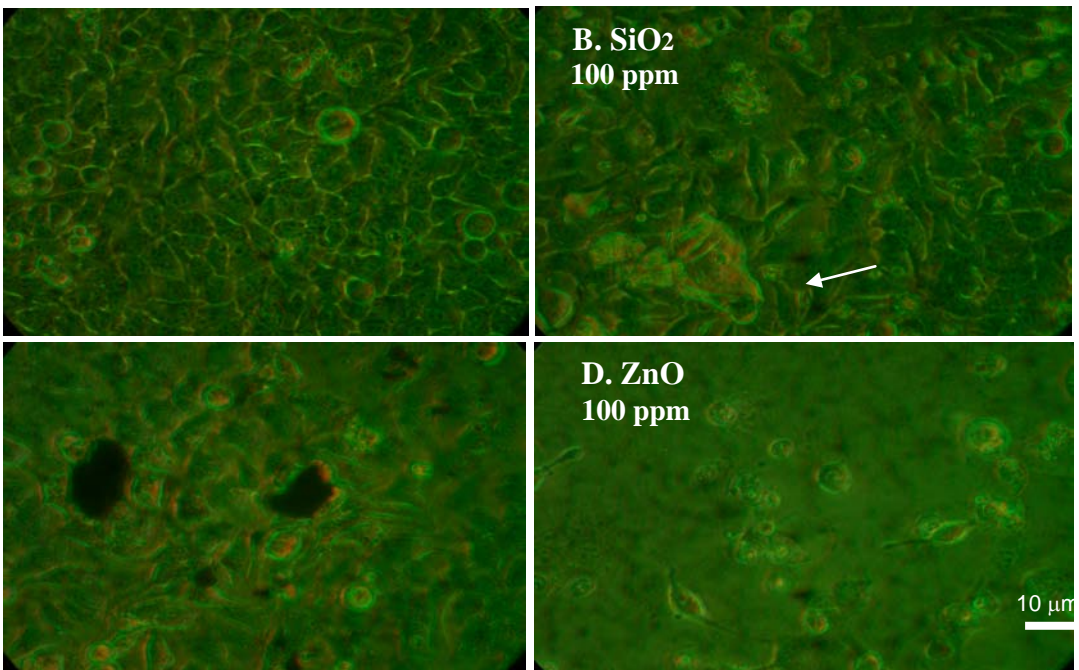


圖 3 HeLa 細胞在各種普通粉體（濃度 100 ppm）處理 24 小時後的顯微鏡圖(400X)。A：控制組只加培養液，B： $\text{SiO}_2$  普通粉體，C： $\text{Cr}_2\text{O}_3$  普通粉體，D：ZnO 普通粉體，箭頭所指為粉體在此濃度下的沈澱物。

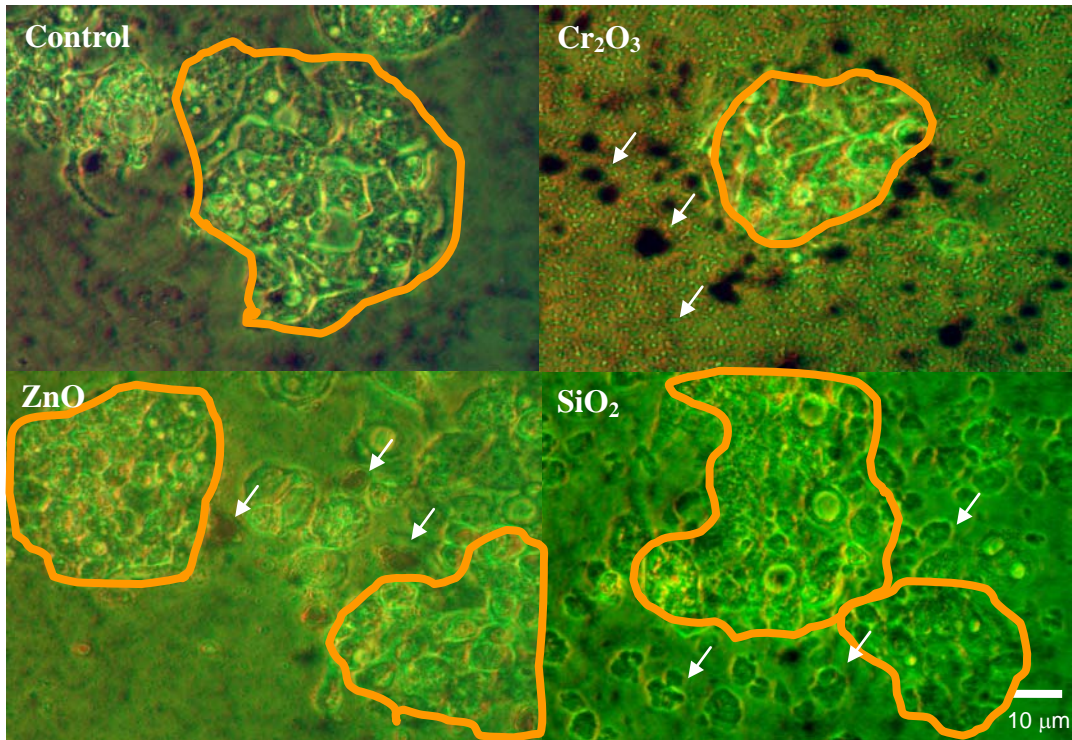


圖 4 HepG2/C3A 細胞在各種奈米粉體(濃度 100 ppm)處理 24 小時後的顯微鏡圖(400X)。A：控制組只加培養液，B：SiO<sub>2</sub> 奈米粉體，C：Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 奈米粉體，D：ZnO 奈米粉體，箭頭所指為粉體在此濃度下的沈澱物，橘色線條所圈選處為細胞生長區域。



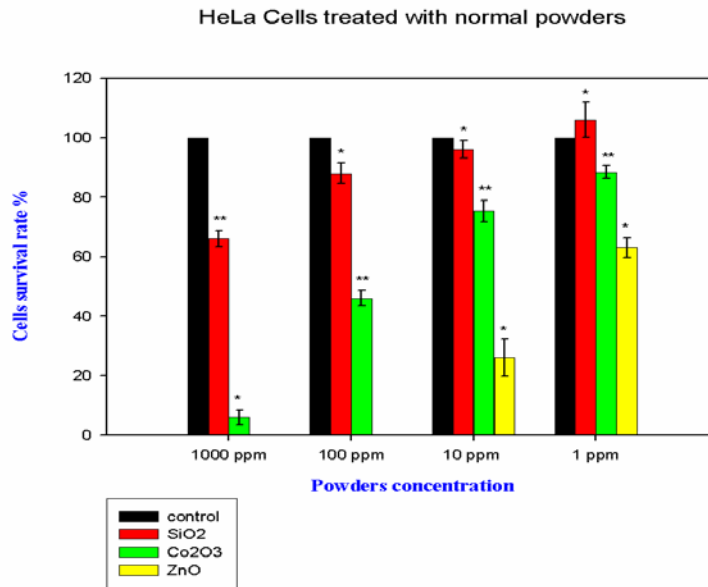


圖 5 HeLa 細胞在各種普通粉體（濃度 1,000~1 ppm）處理 24 小時後的細胞存活率。控制組只加培養液，\*代表  $p < 0.05$ ，\*\*代表  $p < 0.01$  ( $n = 3$ )。

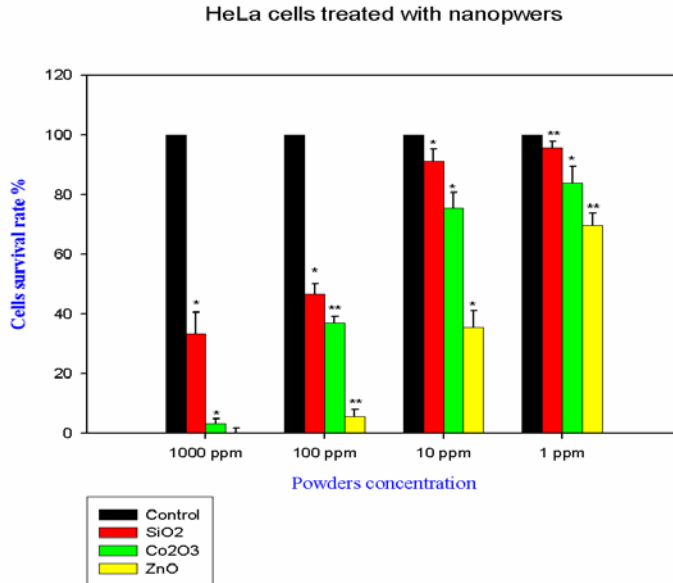


圖 6 HeLa 細胞在各種奈米粉體（濃度 1,000~1 ppm）處理 24 小時後的細胞存活率。控制組只加培養液，\*代表  $p < 0.05$ ，\*\*代表  $p < 0.01$  ( $n = 3$ )。



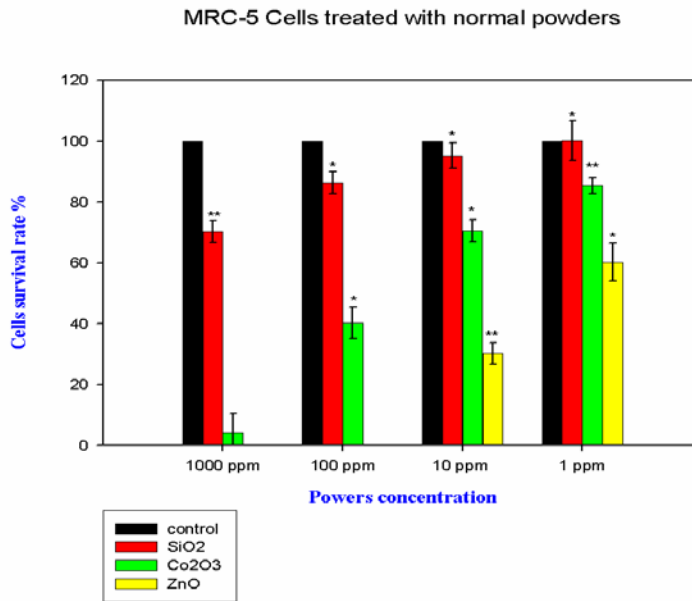


圖 7 MRC-5 細胞在各種普通粉體（濃度 1,000~1 ppm）處理 24 小時後的細胞存活率。控制組，\*代表  $p < 0.05$ , \*\*代表  $p < 0.01$  ( $n = 3$ )。

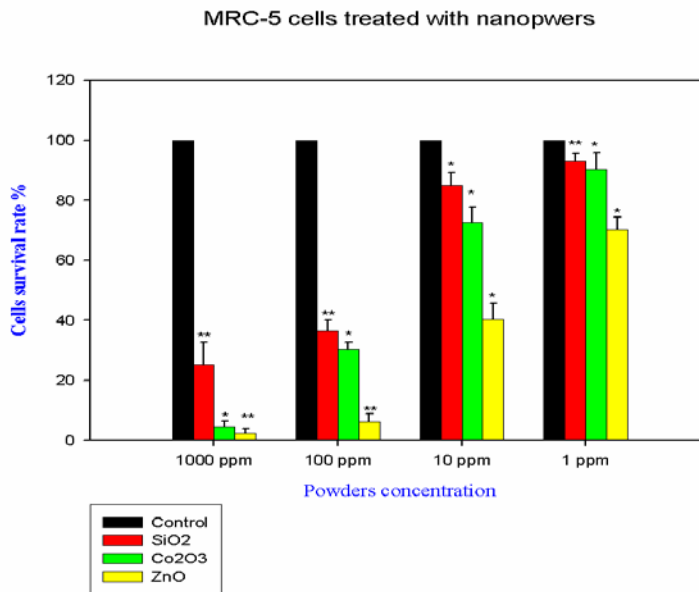


圖 8 MRC-5 細胞在各種奈米粉體（濃度 1,000~1 ppm）處理 24 小時後的細胞存活率。控制組，\*代表  $p < 0.05$ , \*\*代表  $p < 0.01$  ( $n = 3$ )。



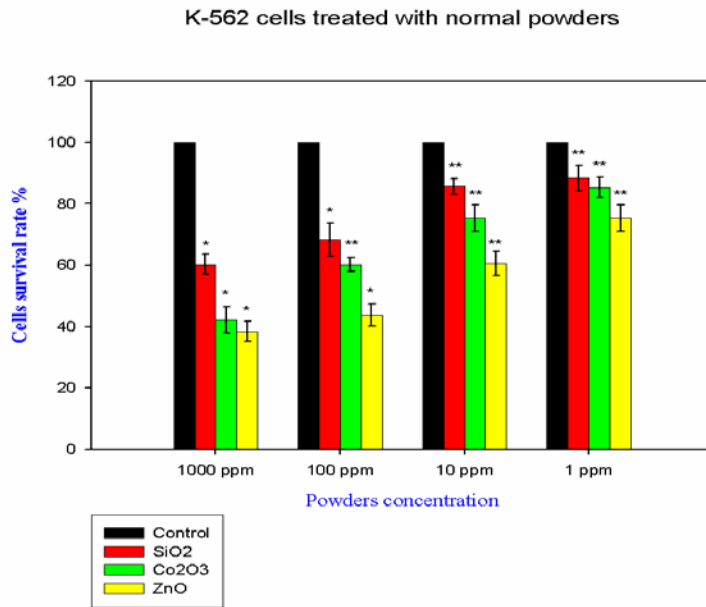


圖 9 K-562 細胞在各種普通粉體（濃度 1,000~1 ppm）處理 24 小時後的細胞存活率。控制組只加培養液，\*代表  $p < 0.05$ , \*\*代表  $p < 0.01$  ( $n = 3$ )。

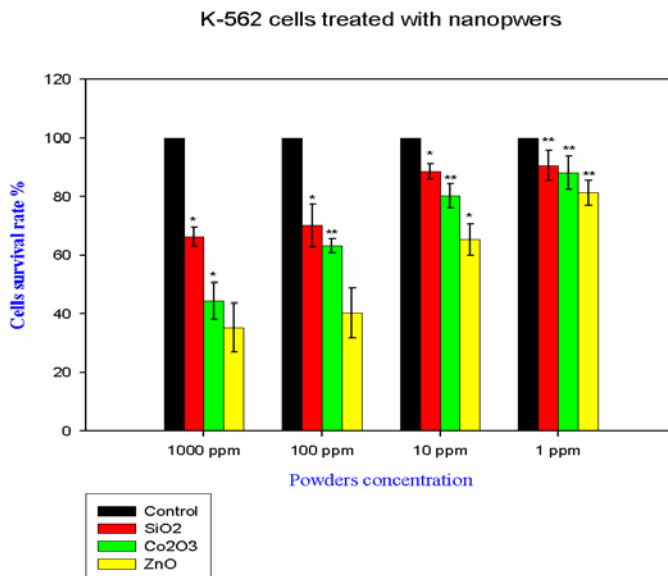


圖 10 K-562 細胞在各種奈米粉體（濃度 1,000~1 ppm）處理 24 小時後的細胞存活率。控制組只加培養液，\*代表  $p < 0.05$ , \*\*代表  $p < 0.01$  ( $n = 3$ )。



## 肆、未來展望

雖然奈米粉體可經由呼吸道、食道及皮膚接觸進入人體，但經由呼吸道的吸入則是最常見的路徑，而也是生產者較不自覺的進入體內方式，因此除了基本的細胞及基因毒性測試外，亦希望能將奈米粉體對肺泡巨噬細胞的影響列入研究項目，以其得到更完整的資料。肺泡巨噬細胞是正常人體呼吸道中含量豐富的細胞，在肺泡沖洗液內的細胞 95% 是巨噬細胞。肺泡巨噬細胞具有相當廣泛免疫生理功能，而且能夠自由移動，吞噬進入肺部的微小顆粒、侵入的微生物和死細胞的碎片，也能作抗原呈現細胞（antigen presenting cells）來活化 T 協助細胞及其他免疫細胞，並且防止一些不正常細胞生長和修補肺部的實質等，可謂是肺部免疫反應重要的防禦細胞<sup>14-15</sup>。肺泡巨噬細胞在活化後，除了具有抗原呈現的功能，亦可分泌分解酵素、補體（complement）、發炎媒介物、細胞激素（cytokine）和一氧化氮（nitric oxide）<sup>16-17</sup>。對於游離二氧化矽的動物實驗與體外細胞實驗的結果，皆表示侵入肺部的二氧化矽顆粒，一方面刺激呼吸道肺泡巨噬細胞產生發炎中媒介物質（如一氧化氮（NO）、前列腺素 E2（PGE2）、IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$ ）<sup>18</sup>；另一方面過多累積的顆粒亦會造成肺泡巨噬細胞的死亡釋放出所含大量酵素之液體和顆粒到肺泡中一部份顆粒又被其他巨噬細胞所吞食，反覆經過上述過程；如果已無巨噬細胞可用（或者巨噬細胞的數目，不足以處理存在的石英晶粒），則石英晶粒乃被顆粒型肺泡細胞（granulapneumocytes）所吞食，使這些細胞排放出環層體（lamellar bodies）和相連之脂質到空隙中，造成局部的肺泡內脂蛋白堆積現象（alveolar lipoproteinosis），如果被破壞的顆粒型肺泡細胞為數極多，即可能產生全面的肺泡脂蛋白堆積症（alveolar lipoproteinosis），此為急性的矽肺病（acute silicosis）的特徵<sup>19</sup>。但若中長期暴露於較低劑量的粉塵則會演變為慢性矽肺病（chronic silicosis）。因此，肺泡巨噬細胞在可呼吸性顆粒導致肺部發炎及病變過程中扮演著重要角色。肺泡巨噬細胞產生的發炎中媒介物質包含 NO、PGE2、IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  等，IL-6 曾經被稱為 B 細胞分化因子，或是肝臟細胞刺激因子，在肝臟中也會造成急性期蛋白的製造。而 TNF- $\alpha$  是多功能的細胞激素，能誘導細胞進行細胞凋亡，激發發炎反應清除病原，也能活化轉錄因子 nuclear factor- $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B) 以刺激組織再生<sup>20</sup>。另外，在肺部發炎疾病狀態下，一氧化氮是一個重要的調節及作用的分子。當發炎反應進行時，巨噬細胞可藉由誘導型一氧化氮合成酶（inducible nitric oxide synthase: iNOS）將精胺酸催化成瓜胺酸並產生大量的一氧化氮，所以一氧化氮也屬於一種促發炎分子，且生物體內過度的發炎反應最後會引起發燒、敗血性休克、甚至器官衰竭等症狀。根據近年來的報告指出，一氧化氮與上述發炎有關的細胞激素如 TNF- $\alpha$  和 IL-6，在 LPS 致毒性動物中的許多細胞功能上，扮演一個重要調節者的角色<sup>16, 21</sup>。同時，過量的一氧化氮生成，也被認為與一些慢性發炎性疾病及某些癌症有關<sup>22</sup>。因此量測肺泡巨噬細胞一氧化氮及其他發炎媒介物在奈米粉體刺激下分泌量的變化，對肺部發炎來說是一個重要的指標<sup>23-24</sup>。我們將在下一階段進行奈米粉體刺激下肺泡巨噬細胞 NO 分泌及 iNOS 的表現量的研究評估，以期提供更完整的奈米粉體的毒性生理資料。



## 參考文獻

1. Jenny H., "How Safe is Nanotech?," Special Report on Nano Pollution, *New Scientist*, Vol. 177, 2003, pp. 2388-2414.
2. Peter H., Abderrahim N. and Benoit N., "Health Impact of Nanomaterials?," *Nature Biotechnology*, Vol. 22, No. 1, 2004, pp. 19-20.
3. Vladimir T, Valery R. and Lorenzo T., "Dichlorodiphenyltrichloroethane: Ubiquity, Persistence, and Risks - DDT," *Environ Health Perspect*, Vol. 110, No. 2, 2002, pp. 125-128.
4. 工研院材料所奈米知識網 <http://mrlnano.itri.org.tw/> °
5. 奈米國家型科技計畫網站 <http://nano-taiwan.sinica.edu.tw/> °
6. David B. W., "Nanoparticles: Health Impacts? *Materials Today*," Vol. 2, 2004, pp. 32-35.
7. Dreher K. L., "Health and Environmental Impact of Nanotechnology: Toxicological Assessment of Manufactured Nanoparticles," *Toxicological Sciences*, Vol. 77, No. 1, 2004, pp. 3-5.
8. Bergamaschi E., Bussolati O., Magrini A., Bottini M., Migliore L., Bellucci S., Iavicoli I., and Bergamaschi A., "Nanomaterials and Lung Toxicity: Interactions with Airways Cells and Relevance for Occupational Health Risk Assessment," *Int J Immunopathol Pharmacol*, Vol. 19, No. 4, Suppl, 2006, pp. 3-10.
9. Dunford R., Salinaro A., Cai L., Serpone N., Horikoshi S., Hidaka H., and Knowland J., "Chemical Oxidation and DNA Damage Catalysed by Inorganic Sunscreen Ingredients," *FEBS Letters*, Vol. 24, No. 1-2, 1997, pp. 87-90.
10. Wang J, Jin Y. H., Liu B., Yu Q. L., Wang K., and Zhao C. X., "Comparative Study on the Acute Toxicity of Pulmonary Caused by Nanosized and Microsized Powders of Silicon Dioxide," *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, Vol. 42, No. 1, 2008, pp. 30-35.
11. Mark T. and Sampson, "Type of Buckyball Shown to Cause Brain Damage in Fish," EurekaAlert. Available on the Internet, [www.eurekaalert.org](http://www.eurekaalert.org), 2004.
12. Oberdorster E. Manufactured Nanomaterials (fullerenes, C60) "Induce Oxidative Stress in the Brain of Juvenile Largemouth Bass," *Environmental Health Perspectives*, Vol. 112, No. 10, 2004, pp. 1058-1062.
13. Mosmann T., "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays," *Journal of Immunology Methods*, Vol. 65, No. 1-2, 1983, pp. 55-63.
14. Oberdorster G., "Pulmonary Effects of Inhaled Ultrafine Particles," *International Archives of Occupational & Environmental Health*, Vol. 74, No. 1, 2001, pp. 1-8.
15. Mühlfeld C., Rothen-Rutishauser B., Blank F., Vanhecke D., Ochs M., and Gehr P., "Interactions of Nanoparticles with Pulmonary Structures and Cellular Responses," *Am J*



- Physiol Lung Cell Mol Physiol*, Vol. 294, No. 5, 2008, pp. 817-829.
16. Skerrett S. J., Liggitt H. D., Hajjar A. M., Ernst R. K., Miller S. I., and Wilson C. B., "Respiratory Epithelial Cells Regulate Lung Inflammation in Response to Inhaled Endotoxin," *American Journal of Physiology-Lung Cellular & Molecular Physiology*, Vol. 287, No. 1, 2004, pp. 143-152.
  17. Losa Garcia J. E., Rodriguez F. M., Martin de Cabo M. R., Garcia Salgado M. J., Losada J. P., Villaron L. G., Lopez A. J., and Arellano J. L., "Evaluation of Inflammatory Cytokine Secretion by Human Alveolar Macrophages," *Mediators of Inflammation*, Vol. 8, No. 1, 1999, pp. 43-51.
  18. Zeidler P., Hubbs A., Battelli L. and Castranova V., "Role of Inducible Nitric Oxide Synthase-derived Nitric Oxide in Silica-induced Pulmonary Inflammation and Fibrosis," *Journal of Toxicology & Environmental Health*, Vol. 67, No. 13, 2004, pp. 1001-1026.
  19. Evelyn G., Luis A., Ortiz, Xiaoyan Z., Matthew E., Joseph A. L. and Mitchell F., "Silica-Induced Apoptosis in Murine Macrophage," *Journal Respiratory Cell Molecule Biology*, Vol. 27, No. 1, 2002, pp. 91-98.
  20. Chen F. and Shi X. NF-kappa B, "A Pivotal Transcription Factor in Silica-induced Diseases," *Molecular & Cellular Biochemistry*, Vol. 234-235, No. 1-2, 2002, pp. 169-176.
  21. Porter D., W. Ye J., Ma J., Barger M., Robinson V. A., Ramsey D., McLaurin J., Khan A., Landsittel D., Teass A. and Castranova V., "Time Course of Pulmonary Response of Rats to Inhalation of Crystalline Silica: NF-kappa B Activation, Inflammation, Cytokine Production, and Damage," *Inhalation Toxicology*, Vol. 14, No. 4, 2002, pp. 349-367.
  22. Veranth J. M., Kaser E. G., Veranth M. M., Koch M. and Yost G. S., "Cytokine Responses of Human Lung Cells (BEAS-2B) Treated with Micron-sized and Nanoparticles of Metal Oxides Compared to Soil Dusts," *Part Fibre Toxicol*, Vol. 27, 2007, pp. 4:2.
  23. Pietropaoli A. P., Frampton M. W., Hyde R. W., Morrow P. E., Oberdorster G., Cox C., Speers D. M., Frasier L. M., Chalupa D. C., Huang L. S. and Utell M. J., "Pulmonary Function, Diffusing Capacity, and Inflammation in Healthy and Asthmatic Subjects Exposed to Ultrafine particles," *Inhalation Toxicology*, Vol. 16 ( Suppl 1), 2004, pp. 59-72.
  24. Luiking Y. C., Engelen M. P. and Deutz N. E., "Regulation of Nitric Oxide Production in Health and Disease," *Adv Exp Med Biol*, Vol. 636, 2010, pp. 92-114.

