

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00465

## 硒化镉量子点对人黑素瘤细胞和正常表皮细胞的毒性

宋方茗, 郑红, 娄子洋\*

第二军医大学药学院药物分析测试中心, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 通过 cell counting kit-8(CCK-8)检测不同粒径硒化镉(CdSe/ZnS)量子点对人恶性黑素瘤细胞 A375、A375.s2 以及正常人表皮细胞 HaCaT 的细胞毒性, 研究硒化镉量子点对黑素瘤细胞生长的影响。**方法** 分别取处于对数生长期的 A375、A375.s2 以及 HaCaT 细胞铺入 96 孔板内, 次日分别向铺有细胞的孔内加入浓度为 162、81、54、40.5、27、10.125、4.05、2.025、1.0125 nmol/L 水溶性量子点(QDs)-605 与 QDs-545 进行孵育, 24 h 后每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8, 测定 2 种硒化镉量子点对 A375、A375.s2 及 HaCaT 细胞增殖的影响。**结果** CCK-8 法显示, 随着 QDs-605 与 QDs-545 浓度的增加, A375 和 A375.s2 细胞存活率随之下降。不同浓度的 QDs-605 与 QDs-545 作用于 A375、A375.s2 细胞, 24 h 后其细胞存活率均低于对照组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 但是对 HaCaT 细胞没有抑制作用。**结论** 硒化镉量子点对 A375、A375.s2 人黑素瘤细胞有一定的抑制作用, 而对 HaCaT 正常人表皮细胞抑制作用不明显。

**[关键词]** 硒化镉量子点; 黑素瘤; 表皮细胞; 细胞增殖; 细胞毒性

**[中图分类号]** R 979.19

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2010)05-0465-03

### Cytotoxic effect of CdSe/ZnS quantum dots on melanoma cells and normal human epidermal cells

SONG Fang-ming, ZHENG Hong, LOU Zi-yang\*

Center of Drug Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To study the cytotoxic effect of the CdSe/ZnS quantum dots of different diameters on human malignant melanoma cell line A375, A375.s2 and normal human epidermal cell line HaCaT using cell counting kit-8(CCK-8), so as to study the influence of CdSe/ZnS quantum dots on growth of melanoma cells. **Methods** Log phase A375, A375.s2 and HaCaT cells were plated into 96-well plates. After a 24 h incubation, the prepared QDs-605 and QDs-545 solutions of different concentrations (162, 81, 54, 40.5, 27, 10.125, 4.05, 2.025, and 1.0125 nmol/L) were added into the wells. After another 24 h incubation, CCK-8 was added into the well (10  $\mu$ l/well). Then the cytotoxicities of CdSe/ZnS quantum dots on the proliferation of A375, A375.s2 and HaCaT cells were determined by MTT assay. **Results** We found that with the increase of QDs-605 and QDs-545 concentrations, the survival rates of A375, A375.s2 cells were decreased. A day after A375, A375.s2 cells were treated with different concentrations of QDs-605 and QDs-545, the cell survival rate was significantly lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); however, different concentrations of QDs-605 and QDs-545 did not inhibit the proliferation of HaCaT cells. **Conclusion** CdSe/ZnS quantum dots have inhibitory effect on the growth of human malignant melanoma cell line A375, A375.s2, and have no noticeable effect on normal human epidermal cell line HaCaT.

**[Key words]** CdSe/ZnS quantum dots; melanoma; epidermal cell; cell proliferation; cytotoxicity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(5):465-467]

生命体系中化学和生物信息是当前生物医学研究迫切需要解决的关键问题之一, 发展相关的新技术与新方法至关重要。半导体纳米材料具有独特的光学性质, 尤其是半导体量子点, 它的物理尺寸小于激子的波尔半径, 从而导致了一种量子限制效应, 使量子点具有独特的光学和电学性质<sup>[1]</sup>。近年来, 量

子点因其特殊光学的特性, 使其在分子生物学、细胞生物学、基因组学、药物筛选、生物大分子相互作用等研究中取得了重大进展<sup>[2-6]</sup>。随着半导体量子点合成技术的进步, 已经可以获得较高质量的产品, 荧光量子产率也有很大的提高, 这使得半导体量子点作为荧光探针应用于生物医学领域的前景逐渐展现

**[收稿日期]** 2010-01-27 **[接受日期]** 2010-03-12

**[基金项目]** 上海市科委纳米技术专项基金(0852nm04200). Supported by the Nano-technology Foundation of Shanghai Science and Technology Committee (0852nm04200).

**[作者简介]** 宋方茗, 硕士生. E-mail: fangmingsong109@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871335, E-mail: louziyang@126.com

出来。恶性黑素瘤(malignant melanoma,MM)是一类起源于神经嵴的黑素细胞恶性肿瘤。黑素瘤具有高度恶性、进展迅速等特点,且容易广泛转移,对常规放、化疗不敏感,治疗非常棘手,预后较差。黑素瘤已成为长期困扰临床医师们的难题。近期文献<sup>[7]</sup>报道半导体纳米微晶体(即量子点)作为一种新型的荧光标记物可对黑素瘤细胞进行标记,这对黑素瘤细胞的早期诊断具有重要意义。然而不同粒径量子点对黑素瘤细胞的毒性缺少相关验证。本研究以 cell counting kit-8(CCK-8)法测定不同粒径硒化镉(CdSe/ZnS)量子点对人体恶性黑素瘤细胞 A375、A375. s2 以及人体正常表皮细胞 HaCaT 增殖的影响,为其进一步应用于生物医学领域提供依据。

### 1 材料和方法

1.1 试剂、生物材料与仪器 A375 细胞,中国科学院上海细胞所; A375. s2 细胞,沈阳药科大学; HaCaT 细胞,第二军医大学长海医院。胎牛血清(Biochrom);新生牛血清(Gibco);高糖 DMEM 培养液、PBS、RPMI 1640(Hyclone); CCK-8(日本同仁化学研究所);0.25%胰蛋白酶(Gibco);水溶性量子点 QDs-545(初浓度 8.55 μmol/L)、QDs-605(初浓度 8.07 μmol/L),武汉珈源量子点技术开发有限公司。酶联免疫检测仪(Thermo)。

1.2 细胞培养 将 A375 细胞培养于高糖 DMEM 培养液(含 10%胎牛血清),A375. s2 细胞培养于 RPMI 1640 培养液(含 10%胎牛血清),HaCaT 培养于 RPMI 1640 培养液(含 10%新生牛血清)中,置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养,1~2 d 换 1 次培养液。当细胞生长至对数期分别添加不同粒径水溶性量子点处理。

1.3 CCK-8 测定水溶性量子点对 A375、A375. s2、HaCaT 细胞的毒性 分别取 3 种处于对数生长期的细胞用 0.25%胰蛋白酶消化并制成细胞悬液,按每孔 9 000~10 000 个细胞接种于 96 孔板,每孔 100 μl,共接种 3 块 96 孔培养板。将 96 孔板置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。24 h 后,每块培养板分别以梯度浓度的量子点(分别为初浓度的 1:50,1:100,1:150,1:200,1:300,1:800,1:2 000,1:4 000,1:8 000,即 162、81、54、40.5、27、10.125、4.05、2.025、1.012 5 nmol/L)以及完全培养液培养的细胞作为实验组和对照组,不含细胞和水溶性量子点的培养液作为空白对照,每组设 3 个复孔,将 3 块培养板移入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。24 h 后,弃培养液,PBS 洗板 2 次,加入 CCK-8 10 μl。继续在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 2~4 h,酶

标仪 550 nm 处测各孔光密度(D 值)。肿瘤细胞存活率(%)=[(实验孔 D 值-空白孔 D 值)/(对照孔 D 值-空白孔 D 值)]×100%。

通过与对照组细胞比较计算细胞活性。对照组细胞活性设为 100%。结果通过 3 次独立实验计算标准偏差。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析,所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析进行比较, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 QDs-605 对 A375、A375. s2、HaCaT 细胞活性的影响 通过 CCK-8 法观察细胞活性,结果发现:随着 QDs-605 浓度的增加,A375、A375. s2 细胞存活率随之下降;不同浓度的 QDs-605 作用于 A375、A375. s2 细胞,24 h 后其细胞存活率均低于对照组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),而不同浓度的 QDs-605 作用于 HaCaT 细胞 24 h,只有 QDs-605 浓度为 162、81、54、2.025、1.012 5 nmol/L 时差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),其他浓度差异无统计学意义(表 1)。A375 细胞活性从 91.7% 一直降至 7.2%,A375. s2 细胞活性从 70.6% 一直降至 10.3%,尤其是 QDs-605 浓度为 54 nmol/L 时,A375 和 A375. s2 活性出现较大幅度的骤降,而 HaCaT 活性变化幅度不大。

表 1 不同浓度 QDs-605 对 A375、A375. s2 和 HaCaT 细胞活性的影响

Tab 1 Cell viability of A375, A375. s2, and HaCaT cells after treatment with CdSe/ZnS QDs-605 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ , %)

Group	Cell		
	A375	A375. s2	HaCaT
QDs-605 c <sub>B</sub> /(nmol · L <sup>-1</sup> )			
162	7.2±7.5**	10.3±8.4**	49.9±3.8**
81	19.8±5.9**	40.2±17.6**	72.2±1.4**
54	55.1±6.0**	62.0±12.1**	77.0±1.7**
40.5	71.6±2.1**	70.6±13.0*	101.4±3.5
27	74.2±3.1**	70.1±13.5*	104.6±5.6
10.125	76.4±4.1**	64.4±7.0*	98.2±3.7
4.05	84.6±12.4*	60.2±7.9**	98.2±0.7
2.025	90.2±7.9*	61.6±6.6**	91.5±6.0*
1.012 5	91.7±5.9*	70.9±3.1**	87.9±7.0**
Control	100	100	100

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group

2.2 QDs-545 对 A375、A375. s2、HaCaT 细胞活性的影响 不同浓度的 QDs-545 作用于 A375、A375. s2 细胞,24 h 后其细胞存活率均低于对照组

( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而不同浓度的 QDs-545 作用 HaCaT 细胞 24 h, 只有 QDs-545 浓度为 162、54 nmol/L 时差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而其他浓度均差异无统计学意义 (表 2)。A375 细胞活性从 76.2% 一直降至 24.0%, A375.s2 细胞活性从 82.7% 一直降至 16.2%, 尤其是 QDs-545 浓度为 54 nmol/L 时, A375 和 A375.s2 活性出现较大幅度的骤降, 而 HaCaT 活性变化幅度不大。

表 2 不同浓度 QDs-545 对 A375、A375.s2 和 HaCaT 细胞活性的影响

Tab 2 Cell viability of A375, A375.s2, and HaCaT cells after treatment with CdSe/ZnS QDs-545

( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

Group	Cell		
	A375	A375.s2	HaCaT
QDs-545 $c_B / (\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$			
162	24.0 ± 4.2**	16.2 ± 10.3**	89.6 ± 11.1**
81	59.3 ± 8.9**	28.9 ± 7.3**	94.6 ± 10.9
54	68.7 ± 11.8**	70.2 ± 4.9**	92.6 ± 4.5*
40.5	75.4 ± 15.8**	71.7 ± 16.9*	94.2 ± 7.3
27	75.9 ± 13.7**	71.5 ± 13.1**	94.1 ± 3.2
10.125	76.2 ± 13.1**	79.6 ± 7.5*	95.5 ± 5.8
4.05	75.6 ± 14.4**	80.4 ± 17.8*	95.5 ± 2.9
2.025	71.9 ± 8.2**	75.0 ± 18.3**	94.3 ± 5.4
1.0125	70.2 ± 13.8**	82.7 ± 11.2*	100.5 ± 0.7
Control	100	100	100

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group

### 3 讨论

本研究利用新型细胞检测 MTT 法改良试剂 CCK-8 进行毒性分析, 其原理是在电子载体 1-甲氧基-5-甲基吩嗪 硫酸二甲酯的作用下被细胞中脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲 染料, 生成的甲 数量与活细胞数量成正比, 此方法重现性好, 操作简便, 且还原后的甲 染料是水溶性的, 不需要溶解, 可用于检测量子点对 A375、A375.s2 人体恶性黑色素瘤细胞以及 HaCaT 人体正常表皮细胞增殖的影响。

本实验结果表明, 肿瘤存活率存在明显的剂量-效应关系, 不同浓度的量子点能够不同程度地影响细胞的增殖。这可能是量子点核中的 Cd、Se 等元素 (尤其是 Cd) 对于细胞具有毒性, 修饰后的量子点在生物体内经过长期氧化降解或是光解作用后, 造成

壳层脱落而形成裸核结构, 从而引起 Cd 离子的释放, 这样可对细胞产生急性或慢性毒性作用<sup>[8]</sup>, 因此在做细胞标记等一系列研究工作时, 选择量子点浓度要尽可能在较低剂量范围中选择, 避免引起肿瘤细胞的凋亡, 而失去研究意义。实验发现, QDs-605 较 QDs-545 更容易引起细胞存活率下降, 结果表明粒径大的量子点有可能更易脱落表面保护层, 形成裸核结构, 从而对细胞有一定的毒性。

同时, 本实验用人正常表皮细胞 HaCaT 作对照, 发现随着 2 种量子点浓度变化, 并没有对 HaCaT 细胞有较大毒性, 甚至高剂量 (162 nmol/L) 时, HaCaT 细胞存活率仍能保持 49.9% (QDs-605), 以及 89.6% (QDs-545), 说明量子点对人正常表皮细胞没有较大影响。这一发现提示既可通过改良量子点的制备, 减少对肿瘤细胞毒性, 有效地对肿瘤细胞进行标记, 又可利用量子点对正常细胞不具有较大影响的特性, 设想把量子点作为一种新的治疗手段, 有效地杀死肿瘤细胞, 即其在肿瘤诊断和治疗方面均具有重要意义, 值得深入研究。

### [参考文献]

- [1] Alivisatos A P. Semiconductor cluster, nanocrystals, and quantum dots[J]. Science, 1996, 271: 933-937.
- [2] Alivisatos A P. The use of nanocrystals in biological detection [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22: 47-52.
- [3] Alivisatos A P, Gu W W, Larabell C A. Quantum dots as cellular probes [J]. Annu Rev Biomed Eng, 2005, 7: 55-76.
- [4] Hotz C Z. Applications of quantum dots in biology: an overview [J]. Methods Mol Biol, 2005, 303: 1-17.
- [5] Pinaud F, Michalet X, Bentolila L A, Tsay J M, Doose S, Li J J, et al. Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes[J]. Biomaterials, 2006, 27: 1679-1687.
- [6] Smith A M, Ruan G, Rhyner M N, Nie S. Engineering luminescent quantum dots for *in vivo* molecular and cellular imaging [J]. Ann Biomed Eng, 2006, 34: 3-14.
- [7] Voura E B, Jaiswal J K, Mattoussi H, Simon S M. Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy [J]. Nat Med, 2004, 10: 993-998.
- [8] Kirchner C, Liedl T, Kudera S, Pellegrino T, Javier A M, Gaub H E, et al. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles [J]. Nano Lett, 2005, 5: 331-338.

[本文编辑] 尹 茶