

氧化锌纳米颗粒在体内和体外对角膜的毒性评估

侯晓璐¹, 崔冬梅¹, 牛灵芝¹, 孙晓彤¹, 于涛¹, 赵宇航², 宋爱萍¹, 李玮²

引用:侯晓璐,崔冬梅,牛灵芝,等.氧化锌纳米颗粒在体内和体外对角膜的毒性评估.国际眼科杂志 2023;23(7):1080-1086

基金项目:国家重点研发计划“政府间国际科技创新合作”重点专项立项项目(No.2019YFE0117800);国家自然科学基金资助项目(No.22176115)

作者单位:¹(250014)中国山东省济南市,山东第一医科大学第一附属医院 山东省千佛山医院;²(250014)中国山东省济南市,山东大学控制科学与工程学院 山东大学智能医学工程研究中心

作者简介:侯晓璐,女,山东第一医科大学在读硕士研究生,研究方向:青光眼、环境毒理与眼健康。

通讯作者:宋爱萍,毕业于山东大学,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:青光眼、环境毒理与眼健康.13793164931@163.com;李玮,毕业于山东大学,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:医学成像与图像处理、环境毒理与健康、动态学习.cindy@sdu.edu.cn

收稿日期:2022-08-16 修回日期:2023-06-09

摘要

目的:通过构建体内和体外染毒模型,观察氧化锌纳米颗粒(ZnO NPs)对角膜的毒性影响。

方法:体外培养原代人角膜上皮细胞(HCEpiC),暴露于0.5、5、12.5、25、50、100、250 μg/mL氧化锌纳米颗粒24h,设不含纳米溶液的细胞培养液为空白对照组。采用MTT比色法评估细胞的活性。三种不同浓度(25、50和100 μg/mL)的氧化锌纳米颗粒分散液暴露于麻醉后小鼠结膜囊内,磷酸盐平衡缓冲液(PBS)点眼为PBS对照组,每天3次,连续7d,第1、3、5、7d观察角膜形态,第8d取出眼球,观察角膜病理改变和炎症因子(TNF-α, IL-6)表达水平情况。

结果:不同浓度的氧化锌纳米颗粒处理原代人角膜上皮细胞24h后,MTT结果显示,与空白对照组相比,氧化锌纳米颗粒在0.5 μg/mL即对细胞有损伤作用,细胞存活率约80% ($P < 0.05$),5 μg/mL剂量时可致半数细胞死亡,在5~250 μg/mL浓度范围对细胞的损伤作用具有浓度依赖性 ($P < 0.0001$)。不同浓度的氧化锌纳米颗粒暴露小鼠结膜囊,点眼7d后,25 μg/mL和50 μg/mL氧化锌纳米颗粒组可见部分角膜上荧光素的点状着染,100 μg/mL氧化锌纳米颗粒组角膜见局部圆形荧光素着染区。HE染色结果显示,25 μg/mL和50 μg/mL氧化锌纳米颗粒组的角膜上皮层、基质层厚度、基质层免疫细胞数目无明显改变(均 $P > 0.05$),而100 μg/mL氧化锌纳米颗粒组角膜上皮层变薄、角膜基质层变厚、基质层免疫细胞明显增多(均 $P < 0.05$)。免疫组织化学染色结果显示,100 μg/mL氧化锌纳米颗粒组产生TNF-α、IL-6的角膜基质免疫细胞数及TNF-α、IL-6的平均光密度(IOD)值均明显高于PBS对照组 ($P < 0.05$),且炎症反应程度具有浓度依赖性,

25 μg/mL氧化锌纳米颗粒和50 μg/mL氧化锌纳米颗粒组免疫细胞数和IOD值与PBS对照组相比均无明显增高 ($P > 0.05$)。

结论:氧化锌纳米颗粒在体外和体内均对角膜具有毒性损伤作用,为氧化锌纳米颗粒眼部安全性评价提供了一定的理论依据。

关键词:氧化锌纳米颗粒;角膜上皮细胞;小鼠
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.7.05

Toxicity evaluation of zinc oxide nanoparticles *in vitro* and *in vivo* on cornea

Xiao-Lu Hou¹, Dong-Mei Cui¹, Ling-Zhi Niu¹, Xiao-Tong Sun¹, Tao Yu¹, Yu-Hang Zhao², Ai-Ping Song¹, Wei Li²

Foundation items: National Key R&D Plan “Intergovernmental International Science and Technology Innovation Cooperation” Key Special Project Approval (No.2019YFE0117800); National Natural Science Foundation of China (No.22176115)

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University (Shandong Provincial Qianfoshan Hospital), Jinan 250014, Shandong Province, China; ²School of Control Science and Engineering, Shandong University; Intelligent Medical Engineering Research Center, Shandong University, Jinan 250014, Shandong Province, China

Correspondence to: Ai-Ping Song. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University (Shandong Provincial Qianfoshan Hospital), Jinan 250014, Shandong Province, China. 13793164931@163.com; Wei Li. School of Control Science and Engineering, Shandong University; Intelligent Medical Engineering Research Center, Shandong University, Jinan 250014, Shandong Province, China. cindy@sdu.edu.cn

Received:2022-08-16 Accepted:2023-06-09

Abstract

• AIM: To observe the toxic effects of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) on cornea by constructing intoxicated model *in vivo* and *in vitro*.

• METHODS: Human corneal epithelial cells (HCEpiC) were cultured *in vitro* and exposed to different concentrations (0.5, 5, 12.5, 25, 50, 100, 250 μg/mL) of ZnO NPs for 24h. The cell culture medium without nano-solution was used as the blank control group. The viability of the cells was assessed by MTT assay. Three different concentrations (25, 50 and 100 μg/mL) of ZnONPs dispersions were exposed to the conjunctival sac of anesthetized mice three times a day for 7d consecutively.

The phosphate buffered saline (PBS) eye group was the PBS control group. Corneal morphology was observed on 1, 3, 5 and 7d, and the eyes were removed on 8d for various laboratory examinations, including corneal pathological changes and expression levels of inflammatory factors (TNF- α , IL-6).

• **RESULTS:** After treatment of HCEpiC cells with different concentrations of ZnO NPs for 24h, the MTT results showed that ZnO NPs cause damage to cells at 0.5 $\mu\text{g/mL}$, and the cell survival rate was about 80% ($P < 0.05$). Half of the cells were killed at a dose of 5 $\mu\text{g/mL}$, the damaging effect on cells in the concentration range of 5~250 $\mu\text{g/mL}$ was concentration - dependent ($P < 0.0001$). After 7d of conjunctival capsule spotting in mice, dot-like staining of fluorescein was seen in the 25 $\mu\text{g/mL}$ ZnO NPs and 50 $\mu\text{g/mL}$ ZnO NPs groups. Localized circular fluorescein stained areas were seen in the corneas of the 100 $\mu\text{g/mL}$ ZnO NPs group. HE staining showed that the corneal epithelial layer, stromal layer thickness and stromal layer immune cell number did not change significantly in the 25 $\mu\text{g/mL}$ and 50 $\mu\text{g/mL}$ ZnO NPs groups (all $P > 0.05$), while the corneal epithelial layer thinned, the corneal stromal layer thickened and the stromal layer immune cells increased significantly in the 100 $\mu\text{g/mL}$ ZnO NPs group (all $P < 0.05$). Immunohistochemical staining showed that the number of corneal stromal immune cells producing TNF- α and IL-6 and the mean integral optical density (IOD) values of TNF- α and IL-6 were significantly higher in the 100 $\mu\text{g/mL}$ ZnO NPs group than in the PBS control group ($P < 0.05$), and the degree of inflammation response was concentration - dependent. Compared with the PBS control group, no significant increase in immune cell count and IOD values in the 25 $\mu\text{g/mL}$ ZnO NPs and 50 $\mu\text{g/mL}$ ZnO NPs groups ($P > 0.05$).

• **CONCLUSION:** The toxic damaging effect of ZnO NPs on the cornea was confirmed from both *in vitro* and *in vivo*, which provided a theoretical basis for the ocular safety evaluation of ZnO NPs.

• **KEYWORDS:** zinc oxide nanoparticles; corneal epithelial cells; mice

Citation: Hou XL, Cui DM, Niu LZ, *et al.* Toxicity evaluation of zinc oxide nanoparticles *in vitro* and *in vivo* on cornea. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(7):1080-1086

0 引言

氧化锌纳米颗粒(zinc oxide nanoparticles, ZnO NPs)属金属氧化物产品,是一种多功能性的新型无机材料,颗粒大小约1~100nm。由于晶粒的细微化,氧化锌纳米颗粒表面电子结构和晶体结构发生变化,因此,具有普通氧化锌无法比较的特殊性质,在眼科领域得到广泛的应用。作为新兴的药物载体,氧化锌纳米颗粒有使药物作用时间延长、到达眼后部等优点,改变了传统的眼部用药方式^[1]。黄啸等^[2]将氧化锌纳米颗粒表面修饰成药物载体,把具有抗氧化作用的锌和褪黑素运送到视网膜,实现对视网膜色素上皮层的联合抗氧化作用。Agban等^[3]将氧化锌纳米颗粒作为药物载体,将毛果芸香碱在眼内持续作用时

间延长至14d,提高了青光眼患者的依从性和临床治疗效果。

随着纳米材料在眼科疾病诊治等领域的广泛应用,纳米材料的眼健康问题成为近年来的研究热点^[4]。氧化锌纳米颗粒对紫外线UV-A和UV-B均具有良好的防护效果^[5],因而被广泛应用于防晒霜和化妆品中。防晒霜和化妆品常应用于靠近眼睛的地方,从而增加了氧化锌纳米颗粒眼部暴露的可能性。氧化锌纳米颗粒可以有效地减少和抑制革兰氏阳性和革兰氏阴性微生物的生长,因此,氧化锌纳米颗粒已用于隐形眼镜的护理液中^[6]。角膜直接与外界环境接触,最容易受到破坏,并发炎症引起眼部损伤^[7]。眼睛尤其是角膜,与皮肤和气道一样暴露于空气中。由于角膜的免疫赦免状态和对透明度的特殊要求,角膜对暴露可能做出不同于其他组织和器官的独特方式反应。目前大多数文献的内容都集中在纳米材料眼科治疗应用方面的研究,有关角膜毒性及机制的研究较少。因此纳米材料与眼睛的生物相容性和对人类的健康影响亟待系统的科学研究进行评估。本研究选择与眼科密切相关的新型纳米材料——氧化锌纳米颗粒,通过构建体内和体外染毒模型,观察氧化锌纳米颗粒对角膜的毒性影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 氧化锌纳米颗粒分散液及粉体(50~100nm)购于杭州万景新材料有限公司。原代人角膜上皮细胞(human corneal epithelial cells, HCEpiC)购于上海弘顺生物科技有限公司。DMEM高糖培养液(Gibco, C11995500BT),胎牛血清(Gibco, 10270106),胰酶消化液(兰杰柯科技有限公司, BL512A),青霉素-链霉素溶液(兰杰柯科技有限公司, BL505A),磷酸盐缓冲溶液(PBS)(Servicebio, G4202-500ML),MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(Gibco, C0009S),5%水合氯醛溶液(麦克林, C804539),荧光素钠(麦克林, F809553)、苏木精染液(Servicebio, G1004-100ML),伊红染液(Servicebio, G1001-100ML),TNF- α 一抗(Servicebio, GB11188),IL-6一抗(Servicebio, GB11117),HRP标记山羊抗兔二抗(Servicebio, GB23303)。超声波细胞破碎仪(宁波新芝, JY88-IIIN)、超声波清洗器(昆山, KQ-500VDE)。石蜡切片(德国徕卡, RM2235)、显微镜(OLYMPUS, BX51T)。

1.1.2 实验动物 昆明系(KM)雌性小鼠36只,4周龄,22~24g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于山东第一医科大学第一附属医院医学研究中心。将小鼠分笼饲养(5只/笼),温度 $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度恒定 $50\% \pm 10\%$ 、12h光照/12h暗循环交替照明,自由摄食和水,实验在小鼠适应新环境7d后进行。本研究的实验动物的使用严格遵循《实验动物管理条例》的规定。本研究通过山东第一医科大学第一附属医院动物伦理委员会批准{No.SYDWLS[2022]004号}。

1.2 方法

1.2.1 体外染毒实验方法

1.2.1.1 氧化锌纳米颗粒表征及配制 使用X射线衍射仪(X-ray diffractometer, XRD)检测氧化锌纳米颗粒的物理化学特性,使用纳米粒度仪检测纳米溶液分散指数。用细胞

培养液将氧化锌纳米颗粒分散液配制成本实验所需浓度,每次细胞实验操作前,纳米分散液现配现用,使用前在超声波清洗器水浴池里超声震荡 10min,超声分散结束,氧化锌纳米颗粒分散液用紫外线照射法灭菌。

1.2.1.2 细胞培养和形态及活性检测 原代人角膜上皮细胞在含有 10%的胎牛血清、1%青霉素-链霉素、89%高糖 DMEM 培养液,37℃,5%CO₂,湿度 100%的恒温培养箱中培养,取对数生长期的原代人角膜上皮细胞稀释为 7×10⁴/mL,每孔 100μL 接种于 96 孔板,将培养板置于 37℃,5% CO₂培养箱中培养 24h 后,分为空白对照组(除换液外不做任何处理)、氧化锌纳米颗粒实验组(在正常换液时加入经超声分散后 0.5、5、12.5、25、50、100、250μg/mL分散液),各组均设置 6 个复孔,于同样条件培养箱中培养 24h 后于倒置显微镜下观察细胞形态变化,拍照记录。每孔加入 10μL MTT 溶液(5mg/mL, 0.5% MTT)继续培养 4h,每孔加入 100mL DMSO,低速匀速摇晃 20min,待结晶完全溶解,使用酶联免疫检测仪检测 490nm 处的 OD 值,实验重复 3 次以上。细胞存活率=氧化锌纳米颗粒实验组 OD 值/空白对照组细胞 OD 值×100%。

1.2.2 体内染毒实验方法

1.2.2.1 小鼠眼球染毒模型建立 存在于化妆品中的氧化锌纳米颗粒暴露于皮肤的浓度为 60~120μg/mL,故在此范围内设定氧化锌纳米颗粒溶液浓度。每次实验将 12 只小鼠分为 4 组:对照组(PBS 溶液点眼),25、50 和 100μg/mL氧化锌纳米颗粒实验组,每组 3 只小鼠。实验重复 3 次,共计 36 只小鼠。每次动物实验操作前,纳米分散液现配现用,使用前在超声波清洗器水浴池里超声震荡 10min,利用与细胞等渗、具有盐平衡作用的 PBS 溶液,制备浓度为 25、50 和 100μg/mL 的氧化锌纳米颗粒悬液,配制好的氧化锌纳米颗粒悬液再置于涡旋混合器混匀 3min,然后取 10μL 直接暴露于麻醉后的小鼠右眼眼表(结膜囊内),每天 3 次,暴露 7d。

1.2.2.2 分析角膜完整性 称取 2g 荧光素钠粉末,溶于 100mL PBS 溶液中,配制成 2%荧光素钠溶液。吸取少量 2%荧光素钠溶液滴入活体小鼠右眼结膜囊,在裂隙灯荧光激发系统光的照射下,将各小组的眼表形态进行拍照及保存。

1.2.2.3 角膜组织学观察 暴露 7d 后进行角膜取材。5%水合氯醛溶液对小鼠腹腔注射进行麻醉,麻醉剂量:0.1mL/10mg。处死小鼠后小心取出眼球,置于 40g/L 多聚甲醛中于 4℃固定 24h,石蜡包埋,组织切片,厚度为 4μm。将切好的石蜡切片于二甲苯中进行脱蜡,HE 染色,中性树胶封片,镜检及拍照。利用 Image J 软件对各组小鼠角膜上皮层厚度、基质层厚度、每高倍镜下基质层免疫细胞数进行测量(相同角膜位置、同等放大倍率下拍照,计算免疫细胞数目)。

1.2.2.4 免疫组织化学染色观察 TNF-α 和 IL-6 的表达 暴露 7d 后取眼球石蜡切片,进行免疫组织化学染色。脱蜡、梯度脱水,充分水洗。滴入 3%过氧化氢溶液,室温孵育 25min,PBS 清洗 3min;用 5%BSA 覆盖眼球组织,室温封闭 1h。轻轻甩掉封闭液,滴加 TNF-α 和 IL-6 一抗(TNF-α 抗体稀释比 1:200,IL-6 抗体稀释比 1:800),湿

盒内 4°过夜孵育。PBS 洗涤 3 次每次 5min,加 HRP 标记山羊抗兔二抗 2 滴,常温孵育 60min。采用 DAB 显色,梯度酒精脱水,二甲苯使切片透明化 5min;中性树胶封片。用 Image J 软件计算各组角膜基质中表达 TNF-α 阳性的免疫细胞数量、IL-6 阳性的免疫细胞数量、TNF-α 相应区域的平均光密度值(IOD 值)以及 IL-6 相应区域的 IOD 值后进行统计分析。

统计学分析:采用 SPSS 25 软件进行数据分析。符合正态分布且方差不齐数据使用 $\bar{x} \pm s$ 描述,组间比较采用 Welch 检验,两两比较采用 Tamhane 法,非正态分布数据使用 $M(P_{25}, P_{75})$ 描述,采用 Kruskal-Wallis H 检验,两两比较采用 Bonferroni 法(检验水准为 $\alpha = 0.05$), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳米溶液颗粒表征 氧化锌纳米颗粒的 XRD 图显示氧化锌纳米颗粒 2θ 值中出现 7 个明显的波峰,分别是 31.7°、34.4°、36.2°、47.5°、56.6°、62.8°、68.0°,证实氧化锌纳米颗粒晶体的特质。纳米溶液分散指数 PDI:0.467,见图 1。

2.2 氧化锌纳米颗粒对细胞形态的影响 正常培养的人角膜上皮细胞形态呈不规则梭形,伪足纤长,随着细胞的生长,伪足部分相互连接呈膜状,同时细胞逐渐伸展,显现成不规则的多边形并聚集成蜂巢样,细胞边界清晰、胞浆丰富。随着细胞密度的增加,伪足逐渐收缩,细胞间膜性连接不明显,细胞排列越来越紧密,细胞呈不规则的多边形,排列整齐,最后融合成清晰的磨玻璃样外观铺满培养瓶瓶底,见图 2A。氧化锌纳米颗粒组细胞失去正常多边形形态,细胞膜破裂,细胞呈现圆形,随着处理浓度的升高,氧化锌纳米颗粒穿透细胞膜进入细胞内在细胞内沉积,致细胞死亡,见图 2B。

2.3 MTT 法检测角膜上皮细胞活性 Welch 检验结果表明各组人角膜上皮细胞活性比较差异有统计学意义($F = 448.3, P < 0.0001$)。两两比较结果表明,各组细胞活性与空白对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。0.5μg/mL 氧化锌纳米颗粒组细胞存活率约为 80%,5μg/mL 氧化锌纳米颗粒组细胞存活率下降至约 50%,细胞活力降低具有浓度依赖性,见图 3。

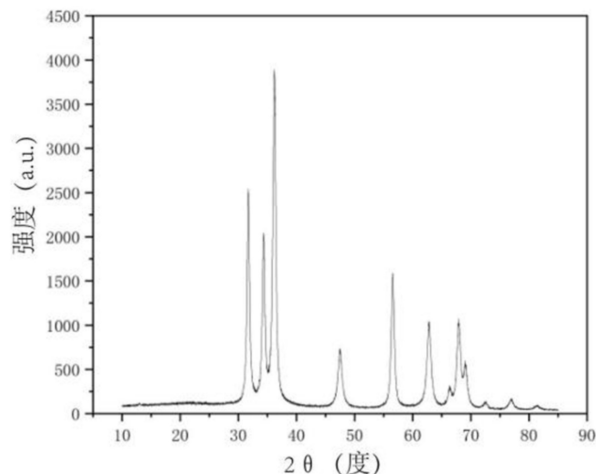


图 1 氧化锌纳米颗粒的 XRD 图。

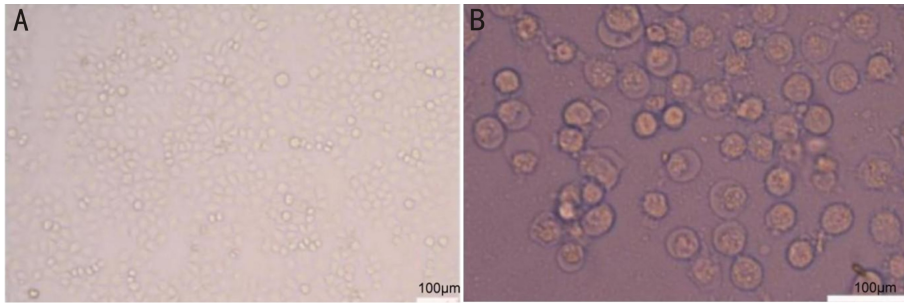


图2 氧化锌纳米颗粒对人角膜上皮细胞形态的影响 A:正常角膜上皮细胞;B:人角膜上皮细胞暴露于0.5μg/mL氧化锌纳米颗粒24h的形态结构。

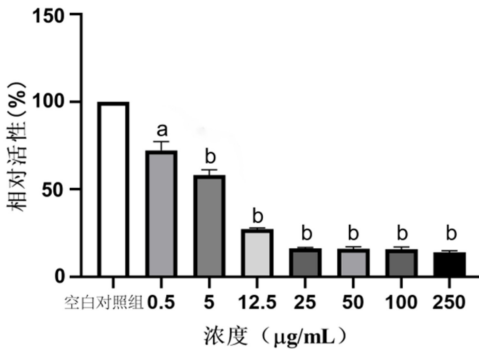


图3 MTT法检测不同浓度氧化锌纳米颗粒对人角膜上皮细胞活性的作用 ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 空白对照组。

2.4 角膜荧光染色情况 25μg/mL和50μg/mL氧化锌纳米颗粒组可见点状荧光素着染,100μg/mL氧化锌纳米颗粒组角膜中央的圆形混浊区见片状着染,见图4。

2.5 角膜组织 HE 染色情况 与PBS对照组相比,100μg/mL氧化锌纳米颗粒组角膜出现明显的病理特征,表现为角膜上皮层明显变薄,上皮细胞层数明显减少、上皮细胞数目明显减少,基底部上皮细胞排列紊乱、分布不规则,细胞间出现海绵状水肿;角膜基质疏松、水肿,基质层成纤维细胞肥大、增生,纤维母细胞增殖;炎症细胞(嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、单核/巨噬细胞、淋巴细胞)分布在角膜基质层、角膜内皮层及角膜缘,多聚集在角膜缘附近和角膜中央病变区的角膜基质层和内皮层。25μg/mL、50μg/mL氧化锌纳米颗粒组可见基质水肿、成纤维细胞肥大,未见其他明显病理改变,见图5。

利用Image J软件对各组小鼠的角膜上皮层厚度、角膜基质层厚度、每高倍镜下基质层免疫细胞数目进行测量(由于角膜前弹力层、后弹力层及角膜内皮层太薄,故在此未统计其厚度)。各组角膜上皮层厚度比较差异有统计学意义($H=10.9, P<0.05$)。100μg/mL氧化锌纳米颗粒组角膜上皮层厚度与PBS对照组相比明显变薄,差异有统计学意义($P<0.05$)。各组角膜基质层厚度比较差异有统计学意义($H=12.8, P<0.01$)。100μg/mL氧化锌纳米颗粒组角膜基质层与PBS对照组相比明显增厚,差异有统计学意义($P<0.01$)。各组角膜基质层免疫细胞数目比较差异有统计学意义($H=10.7, P<0.05$)。100μg/mL氧化锌纳米颗粒组基质层免疫细胞数显著增多,与PBS对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$),见图6。

2.6 各组免疫组织化学染色情况 阳性细胞主要在细胞

膜和胞浆内着色,呈棕褐色颗粒。各氧化锌纳米颗粒处理组产生TNF-α、IL-6的角膜基质免疫细胞数及角膜基质TNF-α、IL-6的IOD值比较差异均有统计学意义(均为 $H=8.2, P<0.05$)。100μg/mL氧化锌纳米颗粒组产生TNF-α、IL-6的角膜基质免疫细胞数及角膜基质TNF-α、IL-6的IOD值均明显高于PBS对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。25μg/mL和50μg/mL氧化锌纳米颗粒组免疫细胞数和IOD值与PBS对照组相比均无明显增高,差异无统计学意义($P>0.05$),见图7、8。

3 讨论

角膜是兼具屈光功能和屏障功能的透明组织。眼表的解剖、生理及物理屏障使药物不易进入眼内,生物利用度往往低于5%^[8]。纳米材料体积小,表面积大,能够跨越生物屏障^[9-10]。纳米制剂被广泛应用于眼科药物运送载体^[11]。纳米颗粒也广泛应用于化妆品领域,并存在于空气污染物^[12-13]中,这些都增加了眼部尤其是角膜暴露的风险。目前,纳米材料对眼睛组织结构的影响仍然知之甚少。因此,本研究选择与眼科密切相关的氧化锌纳米颗粒,从体外和体内两方面评估纳米颗粒的角膜安全性。

目前,有关氧化锌纳米颗粒眼部安全性的体外实验局限于视网膜和晶状体。Guo等^[14]采用大鼠视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGC)与不同浓度的氧化锌纳米颗粒溶液作用。实验表明5μg/mL氧化锌纳米颗粒作用24h显著降低RGC-5细胞活力,2.5μg/mL氧化锌纳米颗粒作用48h显著降低RGC-5细胞活力,呈现浓度和时间依赖性特征。小鼠光感受器细胞(661W细胞系)暴露于不同浓度氧化锌纳米颗粒,结果发现31.25μmol/L作用24h降低细胞活力^[15]。Wang等^[16]采用人晶状体上皮细胞,与不同浓度氧化锌纳米颗粒溶液相作用,实验显示5μg/mL氧化锌纳米颗粒作用24h显著降低细胞活力。角膜上皮是抵御病原微生物侵袭角膜的第一道屏障^[17],角膜上皮的正常结构和功能对维持角膜的透明性和发挥屏障功能至关重要。因此,本研究选择体外培养人角膜上皮细胞作为研究对象,观察体外状态下氧化锌纳米颗粒的安全性。通过本研究中发现体外培养人角膜上皮细胞暴露于0.5μg/mL的氧化锌纳米颗粒24h,与空白对照组相比,细胞活力明显下降。本研究证实了短期暴露于较低浓度氧化锌纳米颗粒,可对人角膜上皮细胞产生毒性作用,并具有浓度依赖性的特征。通过体外实验,证明了氧化锌纳

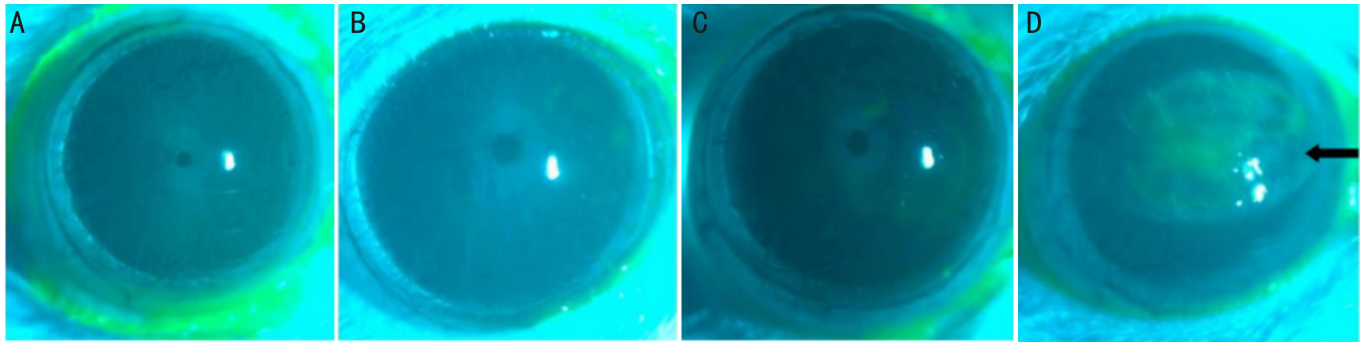


图4 角膜荧光素钠染色情况 A:PBS对照组;B:25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化锌纳米颗粒组;C:50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化锌纳米颗粒组;D:100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化锌纳米颗粒组,箭头示角膜中央混浊伴荧光素染色。

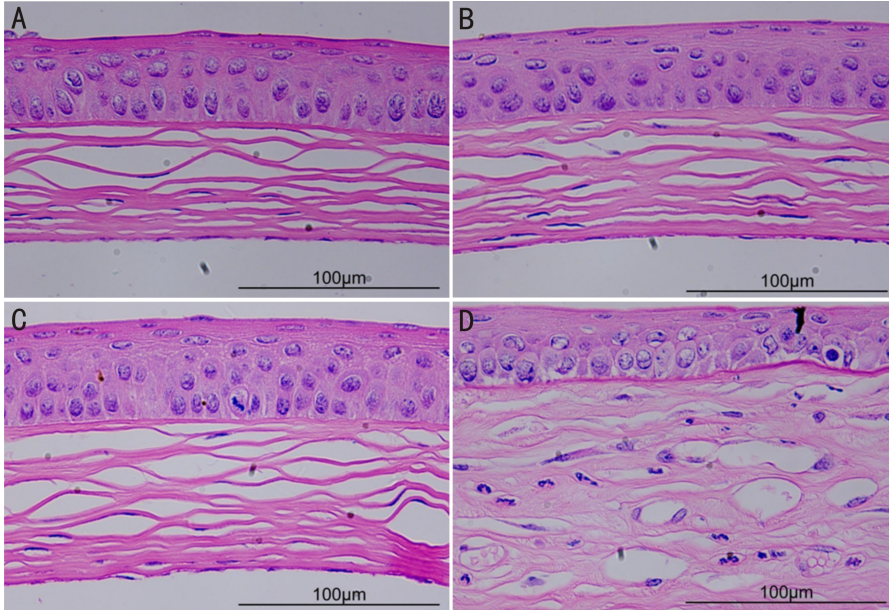


图5 角膜组织 HE 染色情况 A:PBS对照组;B:25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化锌纳米颗粒组;C:50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化锌纳米颗粒组;D:100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化锌纳米颗粒组。

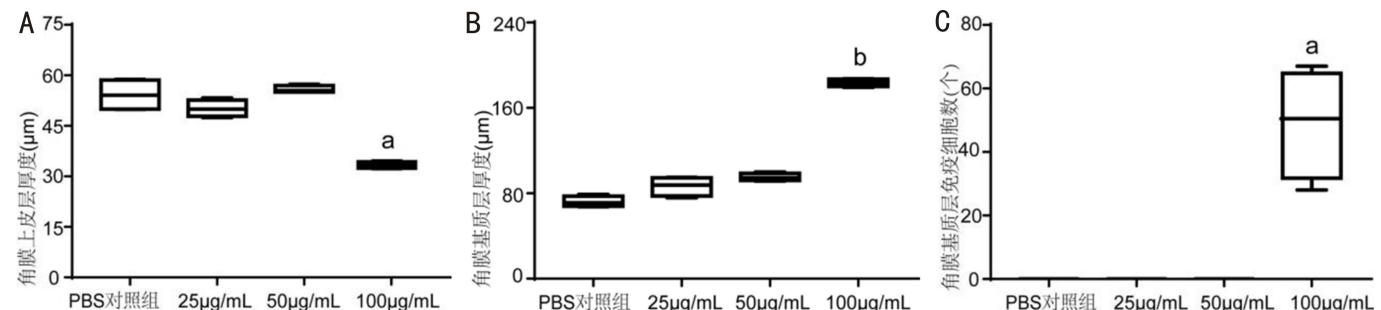


图6 各组角膜上皮厚度、角膜基质厚度及基质内免疫细胞计数结果 A:角膜上皮厚度;B:角膜基质厚度;C:角膜基质免疫细胞计数 ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs PBS 对照组。

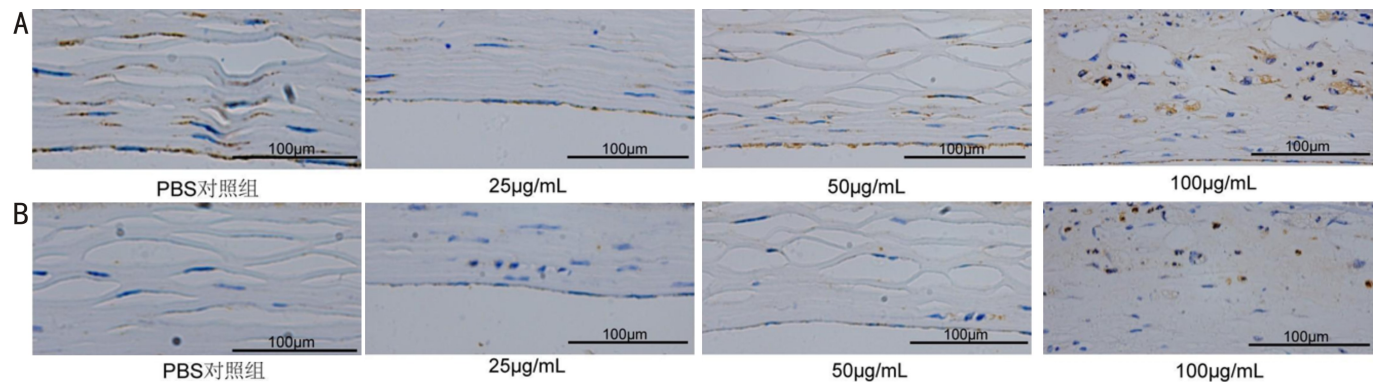


图7 各组角膜免疫组织化学染色情况 A:角膜基质内表达 TNF- α 免疫组织化学染色图;B:角膜基质内表达 IL-6 免疫组织化学染色图。

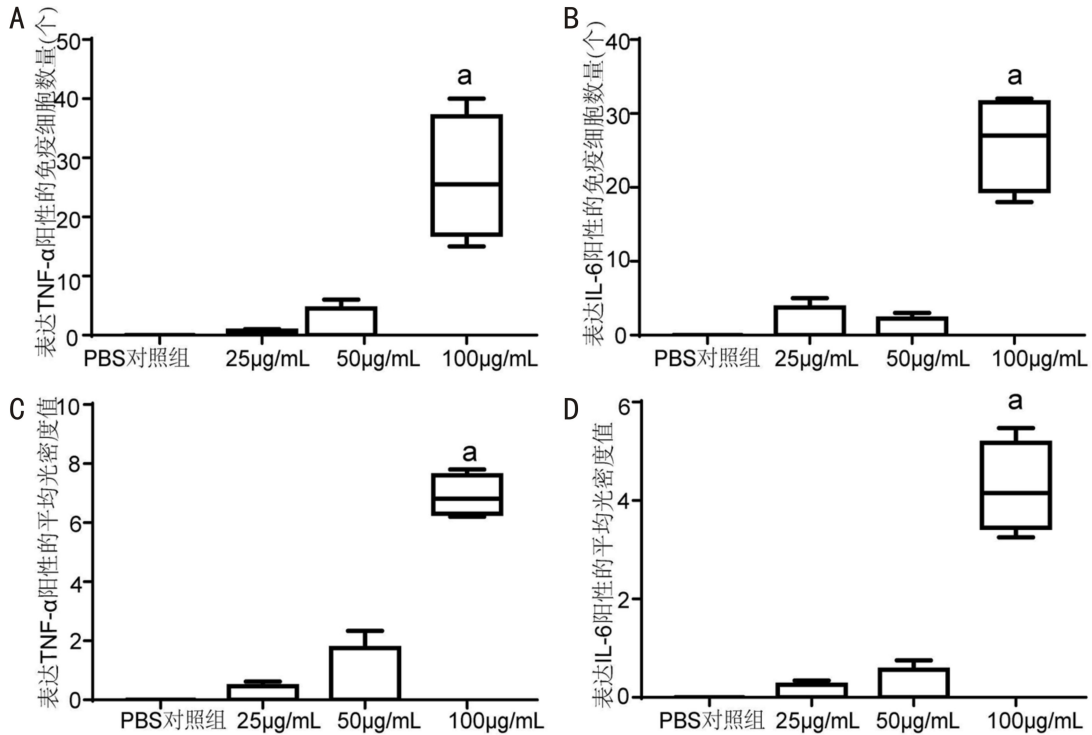


图8 角膜基质内表达 TNF- α 和 IL-6 阳性的免疫细胞数量和平均光密度值 A:表达 TNF- α 阳性的免疫细胞数量;B:表达 IL-6 阳性的免疫细胞数量;C:表达 TNF- α 阳性的平均光密度值;D:表达 IL-6 阳性的平均光密度值;^a $P < 0.05$ vs PBS 对照组。

米颗粒对角膜上皮细胞的高度毒性作用,并为体内实验提供依据。

体内实验浓度选择是基于体外最小损伤浓度的 100 倍,原因是泪膜作为眼表的第一个功能屏障,当外源性物质进入眼内,会在 30s 内通过反射性流泪、眨眼和泪道引流的方式被稀释^[18]。商用防晒霜产品含有高达 25% w/w (通常为 10%~20% w/w) 的氧化锌纳米颗粒。单次应用于人体皮肤后相当于暴露于 60~120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氧化锌纳米颗粒^[19]。因此,本研究中体内实验的浓度与氧化锌纳米颗粒在眼表的潜在生理暴露量一致。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化锌纳米颗粒点眼 5d,角膜见点片状荧光素着染;25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化锌纳米颗粒点眼 7d,角膜可见荧光素的点状着染。研究结果说明氧化锌纳米颗粒会造成角膜屏障功能破坏,引起小鼠角膜上皮损伤,呈时间依赖性和浓度依赖性。HE 染色结果显示,与 PBS 对照组相比,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化锌纳米颗粒组的角膜上皮层厚度、基质层厚度、基质层免疫细胞数目无明显改变 ($P > 0.05$),而 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化锌纳米颗粒组角膜上皮层变薄、角膜基质层变厚、基质层免疫细胞明显增多 (均 $P < 0.05$),100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化锌纳米颗粒组角膜基质层显著增厚、水肿,基质纤维增生,并出现大量免疫细胞。Kim 等^[20] 将不同浓度的氧化锌纳米颗粒暴露于兔眼的结膜囊,结果发现泪膜无明显改变,但未对角膜进行综合评估。氧化锌纳米颗粒可通过角膜上皮细胞的跨细胞转运途径进入角膜深层^[21]。与角膜上皮相比,角膜基质对纳米颗粒的屏障作用更为强大。角膜基质由紧密堆叠的网状结构组成,类似于分子筛的功能,筛孔的直径只有 20~40nm^[22],本研究中氧化锌纳米颗粒直径 50~100nm,超过了角膜基质多重网状结构的筛孔直径,可能是毒性影响局限在角膜的主要原因。

已有研究表明,氧化锌纳米颗粒可在身体其他系统中诱发炎症^[23]。诱导炎症反应是纳米颗粒在化妆品和防晒霜中的潜在毒性问题^[20]。本次实验表明,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化锌纳米颗粒组角膜基质层含有 TNF- α 、IL-6 的免疫细胞显著增多且 TNF- α 和 IL-6 的 IOD 明显高于对照组 (均 $P < 0.05$),25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氧化锌纳米颗粒的 TNF- α 、IL-6 表达未见明显增高 (均 $P > 0.05$),证明一定浓度的氧化锌纳米颗粒会引起小鼠眼球发生炎症反应且具有炎症反应程度具有浓度依赖性。Senapati 等^[24] 认为 JNK、ERK1/2 和 p38 为构成 MAPK 级联反应,在氧化锌 NPs 的炎症反应中起关键作用。他们的实验表明,氧化锌纳米颗粒通过内吞作用或吞噬作用进入人单核细胞,诱导该细胞产生氧化应激,激活 NF- κB 信号通路,增加 IL-1 β 和 TNF- α 等炎症细胞因子产生,这些炎症细胞因子进一步激活 JNK、ERK1/2 和 p38 在内的 MAPK 信号通路,诱导炎症基因的转录增强,引发促炎反应和基因毒性。

本研究仍存在局限性。纳米颗粒的性质、大小、表面修饰等因素都有可能影响眼毒性作用,未来将进一步细化纳米颗粒。纳米颗粒对细胞损伤相关的机制如炎症反应、氧化应激、细胞凋亡、DNA 损伤、细胞自噬、离子通道改变和物理损伤等,这些机制是否参与了氧化锌纳米颗粒的眼毒性,下一步将继续研究。

综上所述,通过体外和体内的研究,证实了氧化锌纳米颗粒对角膜具有毒性损伤作用。该研究丰富了氧化锌纳米颗粒眼毒性的数据,提醒在纳米材料广泛应用的同时应警惕毒性作用,为氧化锌纳米颗粒眼部安全性评价提供了一定的理论依据。

参考文献

1 李醒, 郑文笛, 邹宏密, 等. 叶酸-磁双靶向多功能纳米分子探针

用于视网膜母细胞瘤体外多模态成像的研究.国际眼科杂志 2022;22(12):1948-195

2 黄啸, 郑曦, 易彩霞, 等. 一种眼部给药递释系统氧化锌纳米粒的制备方法及其使用方法和应用.中国专利:CN202110511177.8,2021-05-11

3 Agban Y, Lian JX, Prabakar S, et al. Nanoparticle cross-linked collagen shields for sustained delivery of pilocarpine hydrochloride. *Int J Pharm* 2016;501(1-2):96-101

4 Kamaledin MA. Nano - ophthalmology: applications and considerations. *Nanomedicine* 2017;13(4):1459-1472

5 Lee CC, Lin YH, Hou WC, et al. Exposure to ZnO/TiO₂ nanoparticles affects health outcomes in cosmetics salesclerks. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17(17):6088

6 Shayani Rad M, Sabeti Z, Ahmad Mohajeri S, et al. Preparation, characterization, and evaluation of zinc oxide nanoparticles suspension as an antimicrobial media for daily use soft contact lenses. *Curr Eye Res* 2020;45(8):931-939

7 Kamboj A, Spiller HA, Casavant MJ, et al. Ocular exposures reported to United States poison control centers. *Ophthalmic Epidemiol* 2019;26(2):84-94

8 Chhonker YS, Prasad YD, Chandasana H, et al. Amphotericin - B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application. *Int J Biol Macromol* 2015;72:1451-1458

9 Larsen ST, Roursgaard M, Jensen KA, et al. Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010;106(2):114-117

10 Bello D, Martin J, Santeufemio C, et al. Physicochemical and morphological characterisation of nanoparticles from photocopiers: implications for environmental health. *Nanotoxicology* 2013; 7(5):989-1003

11 Borandeh S, Alimardani V, Abolmaali SS, et al. Graphene Family Nanomaterials in Ocular Applications: Physicochemical Properties and Toxicity. *Chem Res Toxicol* 2021;34(6):1386-1402

12 Li XZ, Kang B, Eom Y, et al. The protective effect of a topical mucin secretagogue on ocular surface damage induced by airborne carbon black exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019;60(1):255

13 Mo Z, Fu Q, Lyu D, et al. Impacts of air pollution on dry eye disease

among residents in Hangzhou, China: A case-crossover study. *Environ Pollut* 2019;246:183-189

14 Guo DD, Bi HS, Wu QX, et al. Zinc oxide nanoparticles induce rat retinal ganglion cell damage through bcl-2, caspase-9 and caspase-12 pathways. *J Nanosci Nanotechnol* 2013;13(6):3769-3777

15 Guo DD, Li Q, Tang HY, et al. Zinc oxide nanoparticles inhibit expression of Manganese superoxide dismutase via amplification of oxidative stress, in murine photoreceptor cells. *Cell Prolif* 2016;49(3):386-394

16 Wang D, Guo D, Bi H, et al. Zinc oxide nanoparticles inhibit Ca²⁺-ATPase expression in human lens epithelial cells under UVB irradiation. *Toxicol In Vitro* 2013; 27(8):2117-2126

17 陈姝颖, 傅秋黎, 姚克. 纳米材料应用于眼科治疗的研究进展. 中华眼科杂志 2022;58(10):831-838

18 Cosert KM, Kim S, Jalilian I, et al. Metallic engineered nanomaterials and ocular toxicity: a current perspective. *Pharmaceutics* 2022;14(5):981

19 Surekha P, Kishore AS, Srinivas A, et al. Repeated dose dermal toxicity study of nano zinc oxide with Sprague-Dawley rats. *Cutan Ocular Toxicol* 2012;31(1):26-32

20 Kim S, Gates BL, Leonard BC, et al. Engineered metal oxide nanomaterials inhibit corneal epithelial wound healing *in vitro* and *in vivo*. *NanoImpact* 2020;17:100198

21 Lu Y, Park K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. *Int J Pharm* 2013;453(1):198-214

22 周天洋, 夏慧芸, 何继军, 等. 盐酸特比萘芬纳米乳剂点眼经角膜途径的吸收及分布特征. 中华实验眼科杂志 2015; 33(10):910-914

23 Fallahi P, Foddiss R, Elia G, et al. Induction of Th1 chemokine secretion in dermal fibroblasts by vanadium pentoxide. *Mol Med Report* 2018; 17(5):6914-6918

24 Senapati VA, Kumar A, Gupta GS, et al. ZnO nanoparticles induced inflammatory response and genotoxicity in human blood cells: A mechanistic approach. *Food Chem Toxicol* 2015;85:61-70