

纳米氧化锌诱发人心肌细胞 AC16 氧化应激损伤及转录组分析改变

鲁方梅^{1,2} 李宇杰² 郭家彬² 徐德祥¹ 刘超^{1,2}

摘要 目的 探讨纳米氧化锌(ZnO NPs)对人心肌细胞AC16的氧化应激损伤,并从转录组层面分析ZnO NPs作用机制。方法 利用动态光散射法(DLS)对ZnO NPs进行表征检测。将AC16细胞暴露于不同剂量、不同时间的ZnO NPs后,使用CCK-8法测定细胞存活率。将AC16细胞分为对照组、ZnO NPs(50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)暴露组,处理6 h后检测细胞线粒体膜电位(MMP)及活性氧自由基(ROS)。将AC16细胞分为对照组、50 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs组、200 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs组,暴露6 h后使用TRIzol提取细胞总RNA,进行转录组分析,并对差异表达基因进行基因本体(GO)、京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析。结果 DLS法结

果显示,流体动力学直径为(192.2 ± 1.63) nm,Zeta电位为(-23.26 ± 1.05) mV。CCK-8结果显示,随着ZnO NPs暴露的剂量与时间的增加,AC16细胞存活率下降。荧光定量法观察显示,随着ZnO NPs暴露剂量的增加,MMP在100 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs时下降($P < 0.05$),ROS在50 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs时升高($P < 0.05$)。转录组分析结果显示,50 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs组与对照组相比共富集到1 071个基因,其中上调基因561个,下调基因510个;200 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs组与对照组相比共富集到7 164个基因,其中上调基因4 098个,下调基因3 066个。GO与KEGG分析结果显示,差异基因主要富集于活性氧、抗氧化活性、线粒体细胞色素C的释放、凋亡等信号通路。结论 ZnO NPs可导致AC16细胞存活率下降,诱发细胞线粒体损伤和氧化应激,其中ROS介导的氧化应激与线粒体功能改变是ZnO NPs致AC16细胞毒性的重要毒作用机制。

关键词 纳米氧化锌; 心肌毒性; 转录组学; 氧化应激; 线粒体损伤

中图分类号 R 114.99

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0450-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.017

2023-02-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82003880)

作者单位: ¹ 安徽医科大学公共卫生学院卫生毒理学系,合肥 230032

² 中国人民解放军疾病预防控制中心,北京 100071

作者简介: 鲁方梅,女,硕士研究生;

徐德祥,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: xudex@126.com;

刘超,男,研究员,博士生导师,责任作者, E-mail: li-uchao9588@sina.com

ITGBL1 axis in the progression of colorectal cancer (CRC). **Methods** The differentially expressed genes in CRC were analyzed using the Gene Expression Omnibus(GEO) database. Expressions of LncRNA ESCCAL-1, miR-874 and ITGBL1 in CRC tissues and cell lines (SW480, SW620, HCT116 and HT29) and adjacent normal tissues and NCM460 cell lines were detected by qRT-PCR; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), clone formation and flow cytometry was used to detect cell proliferation, colony formation and apoptosis; dual luciferase reporter assays were used to verify the interaction between miR-874 and ESCCAL-1, ITGBL1; fluorescence in situ hybridization was used to determine the subcellular localization of LncRNA ESCCAL-1. Exosomes were isolated from serum using the Exosome extraction kit. **Results** The expressions of ESCCAL-1 and ITGBL1 in CRC tissues and cell lines were higher than those in adjacent normal tissues and NCM460 cell lines, while the opposite was true for miR-874 ($P < 0.05$). Knockdown of ESCCAL-1 can inhibit CRC cell proliferation and colony formation and promote apoptosis. There are specific binding sites for miR-874 and ESCCAL-1, and miR-874 inhibitor could partially reverse the effect of knockdown ESCCAL-1 in CRC ($P < 0.05$). ESCCAL-1 upregulates ITGBL1 by adsorbing miR-874. The serum levels of ESCCAL-1 and exo-ESCCAL-1 in CRC patients were higher than those in the control group. Serum exo-ESCCAL-1 may be a valuable diagnostic indicator for CRC treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** ESCCAL-1 promotes CRC progression by regulating the miR-874/ITGBL1 axis, and ESCCAL-1 may be an effective molecular target for CRC therapy.

Key words LncRNA ESCCAL-1; miR-874; ITGBL1; colorectal cancer

纳米氧化锌(zinc oxide nanoparticles ZnO NPs) 是一种新型多功能无机化合物^[1], 由于其突出的量子尺寸与表面效应等, 在工业材料、生物医学领域得到广泛应用, 但也增加了环境污染和人类暴露的潜在风险^[2]。目前 ZnO NPs 毒性研究靶器官主要聚焦在肝脏、肾脏与肺脏^[3]。近期文献提示, ZnO NPs 可以跨越生物体内的大多数生物屏障, 对心血管系统产生毒性^[4-5]。现有研究^[6-7]表明, 线粒体功能损伤与氧化应激是 ZnO NPs 致心肌毒性的一个重要表象, 但其具体毒性作用机制尚不清晰。目前, 转录组高通量测序技术已成为观察和测量工程纳米材料转录本水平变化的首选方法^[8], 但尚未见 ZnO NPs 致心肌毒性的转录组测序研究报道。该研究以人心肌细胞 AC16 为模型, 从细胞、线粒体和转录组层面观察 ZnO NPs 的毒性效应, 检测相关差异基因的转录表达, 以期对 ZnO NPs 致心肌毒性的潜在靶点提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 ZnO NPs(货号: 677450) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; BCA 定量试剂盒(货号: P0012)、蛋白酶磷酸酶抑制剂(货号: P1045) 均购自上海碧云天公司; RIPA 裂解液(货号: ab156034) 购自英国 Abcam 公司; CCK-8 试剂盒(货号: CK04)、活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒(货号: R252)、膜电位检测试剂盒(货号: MT09) 均购自日本同仁公司; TRIzol(货号: 15596018)、QubitTM RNA IQ 测定试剂盒(货号: Q33222) 均购自美国 Invitrogen 公司; NEBNext[®] Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina[®](货号: E7530L) 购自美国 NEB 公司; AMPure XP system(货号: A63882) 购自美国 Beckman Coulter 公司。

1.2 主要仪器 Nano Brook 90PlusZeta 购自美国布鲁克海文仪器公司; 超净工作台购自北京亚泰科隆公司; 恒温培养振荡器购自上海智城公司; KQ-300E 超声波清洗器购自昆山舒美公司; 细胞计数板购自上海求精公司; 倒置显微镜购自日本 Olympus 公司; CO₂ 培养箱、多功能酶标仪购自美国 Thermo Scientific 公司; SPECTRAMAX 多功能酶标仪购自美国 Molecular Device 公司; 涡旋振荡器购自海门其林贝尔公司; 台式冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司; 电子天平购自北京赛多利斯公司; DK-8D 水浴锅购

自上海合恒公司; Agilent 2100 生物芯片扫描仪购自美国 Agilent Technologies 公司; novaseq 6000 测序平台购自美国 illumina 平台; ABI2720 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.3 ZnO NPs 的表征 配制 1 mmol/L ZnO NPs 去离子水悬液, 进行冰浴超声 20 min, 采用动态散射法(dynamic light scattering, DLS) 测定流体力学直径和表面电荷(Zeta 电位)。

1.4 细胞培养 人心肌细胞 AC16 购自美国 ATCC 公司, 细胞在含有 10% 胎牛血清、100 IU/ml 链霉素和 100 IU/ml 青霉素的 DMEM 培养基中, 置于 5% CO₂、37 °C 恒温加湿培养箱中培养。细胞密度至 90% 左右进行传代, 并及时更换培养基。

1.5 细胞存活率检测 将处于生长对数期的 AC16 细胞制备成细胞悬液, 细胞按照 8 000 个/孔接种于 96 孔板, 贴壁 24 h 后加入 0、31.25、62.5、125、250、500 μmol/L 的 ZnO NPs 培养 24 h; 分别加入 100、400 μmol/L 的 ZnO NPs 培养 0、1、3、6、12、24 h。到达给药时间后, 弃去培养基, 按照每孔 100 μl 体积, 加入 CCK-8 工作液和培养基(1 : 9 的比例) 的混合液, 37 °C 下孵育 45 min, 随后用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A) 值。细胞存活率(%) = $(A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白对照组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$ 。

1.6 细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP) 检测 将细胞按照 8 000 个/孔接种于 96 孔避光板中, 待细胞密度至 90% 时进行给药, 加入 0、50、100、200 μmol/L ZnO NPs 培养 6 h。按照每孔 100 μl 体积, 加入 2 μmol/L 的 JC-1 工作液, 37 °C 避光孵育 30 min, 随后在多功能酶标仪下分别测量红荧光和绿荧光的强度变化, 作为检测线粒体状态的指标。

1.7 全细胞自由基种类(reactive oxygen species, ROS) 检测 根据 ROS 测定试剂盒将 AC16 细胞接种到含有 10% 胎牛血清的 DMEM 的 96 孔避光板中, 并在 37 °C 下培养 24 h。更换为含有 0、50、100、200 μmol/L ZnO NPs 的培养基, 并在 37 °C 下继续培养 6 h。除去上清液, 加入高灵敏度的 DCFH-DA 工作液, 在 37 °C 下避光孵育 30 min。使用多功能酶标仪检测 ROS 水平的变化。

1.8 转录组测序分析 将 0、50、200 μmol/L ZnO NPs 暴露于 AC16 细胞 6 h, 使用 TRIzol 收集 100 万个细胞至 RNase-free 的 EP 管中进行 RNA 提取。

1.8.1 mRNA 建库测序 使用 Agilent 2100 bioanalyzer 对总 RNA 的完整性进行质控分析。通过 Oligo (dT) 磁珠富集带有 polyA 尾的 mRNA, 将 Fragmentation Buffer 中用二价阳离子得到的 mRNA 转化为 cDNA 第一条链, 以 dNTPs 为原料合成 cDNA 第二条链。对其纯化后的双链 cDNA 进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头。通过 AMPure XP beads 筛选片段, 对 PCR 产物进行扩增纯化, 获得文库。文库构建完成后, 先使用 Qubit 2.0 Fluorometer 进行初步定量, 随后使用 Agilent 2100 bioanalyzer 进行文库检测。库检合格后, 使用 Illumina NovaSeq 6000 进行测序并扩增, 最终获得待测片段的序列信息。

1.8.2 数量质控与序列比对 测序片段被高通量测序仪测得的图像数据经 CASAVA 碱基识别转化为序列数, 过滤掉原始数据中包含少量带有测序接头或测序质量较低的序列数, 得出最后的过滤后的序列数, 进行 Q20、Q30 计算。从基因组网站下载参考基因组和基因模型注释文件, 并使用 HISAT2 (v2.0.5) 作为比对工具。

1.8.3 差异分析 使用 featureCounts (1.5.0-p3) 计算映射到每个基因的读数, 得出 FPKM 值, 用于评估基因表达水平。使用 DESeq2 软件 (1.20.0) 进行两个比较组合之间的差异表达分析。使用 Benjamini 和 Hochberg 的方法来调整所得 P 值 (p_{adj}) 以控制错误发现率。

1.8.4 富集分析 对差异表达基因通过 clusterProfiler (3.8.1) 软件对基因本体 (Gene Ontology, GO) 小于 0.05 的校正的 P 值的 GO 通路通过差异表达基因显著富集, 以及对京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路中差异表达基因进行统计, Reactome 数据库以

小于 0.05 的校正的 P 值作为显著性富集的阈值, 选取最显著的 20 个 KEGG 通路绘制柱状图进行展示。柱状图在 Novomagic 平台制作。

1.9 统计学处理 使用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较时, 若方差齐, 采用 LSD 检验; 若方差不齐, 采用 Tamhane's T2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用 GraphPad Prism 8 进行作图。

2 结果

2.1 ZnO NPs 的表征 为了研究 ZnO NPs 的物理特性, 采用 DLS 法观察其流体动力学直径和表面电荷 (Zeta 电位), 如图 1A 所示, 测得 ZnO NPs 去离子水悬液的流体动力学直径为 (192.20 ± 1.63) nm; 如图 1B 所示, Zeta 电位为 (-23.26 ± 1.05) mV。以上结果提示 ZnO NPs 有易聚集的特性。

2.2 ZnO NPs 对 AC16 细胞存活率的影响 将 AC16 细胞暴露于不同浓度 ZnO NPs 24 h 后, 使用倒置显微镜下观察细胞形态。正常细胞生长状态良好, 轮廓清晰, 形态饱满呈多角形或长梭型, $62.5 \mu\text{mol/L}$ 时, 细胞形态未发生明显改变, 细胞轻微收缩; $250 \mu\text{mol/L}$ 时, 细胞皱缩明显, 漂浮死细胞增多。将细胞暴露不同浓度 ZnO NPs 24 h 后, 细胞存活率呈剂量依赖性下降, 与对照组相比, 在 $125 \mu\text{mol/L}$ ZnO NPs 时开始差异有统计学意义 ($F = 539.1$, $P < 0.05$); 将细胞暴露于 100 、 $400 \mu\text{mol/L}$ ZnO NPs 不同时间后, 随着暴露时间的延长, 细胞存活率呈时间依赖性下降, 与 0 剂量组相比, 分别在 12 h 和 3 h 开始差异有统计学意义 ($F = 180.2$, $P < 0.05$)。

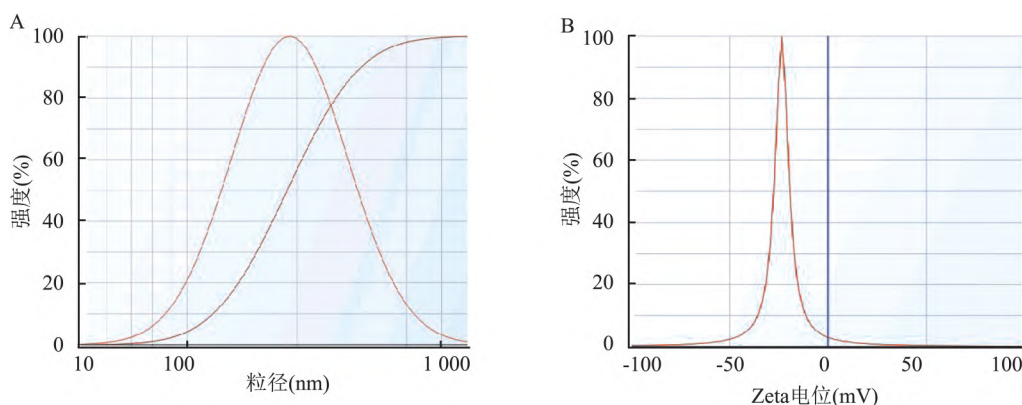


图1 ZnO NPs 表征

A: 流体动力学直径; B: ZnO NPs 的 Zeta 电位

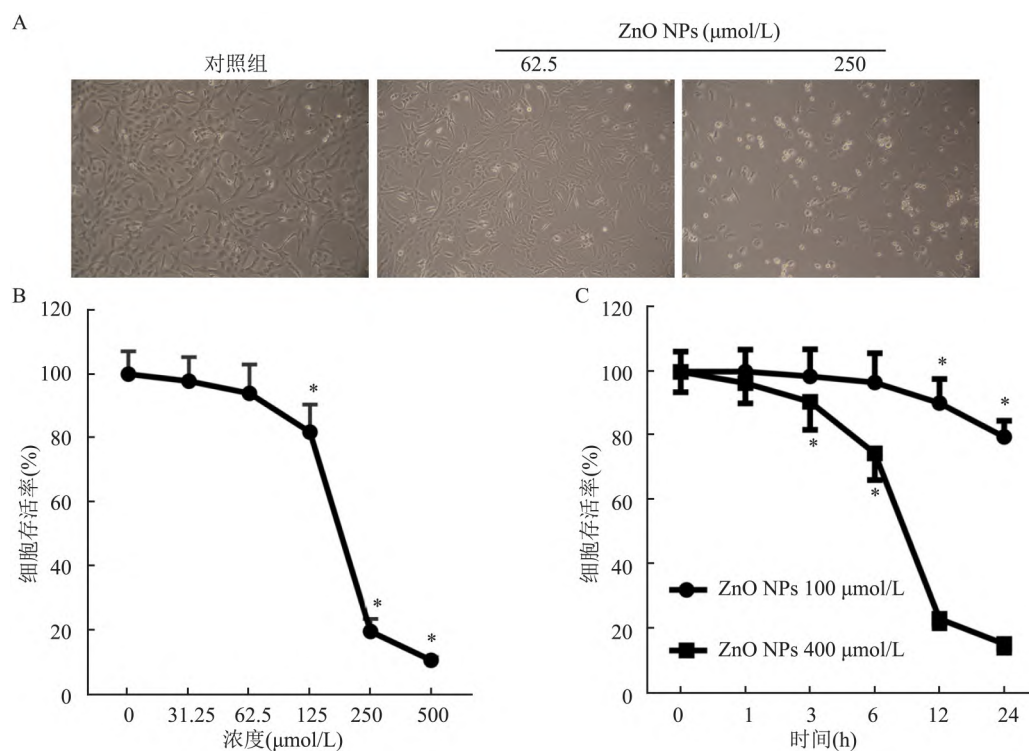


图2 ZnO NPs 诱导的细胞毒性

A: 暴露 ZnO NPs 24 h 后细胞形态变化 $\times 10$; B: ZnO NPs 处理 24 h 对细胞存活率的影响; C: 100 与 400 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs 处理不同时间对细胞存活率的影响; 与对照组比较: * $P < 0.05$

2.3 ZnO NPs 对 AC16 细胞线粒体膜电位及 ROS 的影响 将 AC16 细胞暴露于不同浓度 ZnO NPs 6 h 后, 使用 JC-1 探针检测 MMP。如图 3A 所示, 与对照组相比, AC16 细胞在 100、200 $\mu\text{mol/L}$ 剂量下 MMP 均降低 ($P < 0.05$, $F = 28.91$), 提示线粒体功能损伤。使用多功能酶标仪检测全细胞 ROS 含量, 如图 3B 所示, 暴露组 ROS 呈剂量依赖性升高, 与对照组相比, 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 剂量下 ROS 均增加 ($P < 0.05$, $F = 83.77$), 提示 ZnO NPs 可导致 AC16 细胞 ROS 蓄积, 诱发氧化应激。

2.4 各组细胞差异基因表达情况 将 AC16 细胞暴露于 0、50、200 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs 6 h 后, 进行转录组分析, 将标准化处理后的基因表达量进行两组间比较, 筛选出差异基因。将 0 与 200 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs 组进行比较, 共有 7 164 个差异表达基因, 其中上调基因 4 098 个, 下调基因 3 066 个; 将 0 与 50 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs 组进行比较, 共有 1 071 个差异表达基因, 其中上调基因 561 个, 下调基因 510 个。

2.5 线粒体与氧化应激相关差异表达基因 GO 富集分析 为了探究线粒体与氧化应激相关差异基因表达变化, 按照细胞组分、生物过程和分子功能 3 大功能类别对其进行 GO 富集分析。如图 4A 所示, 线

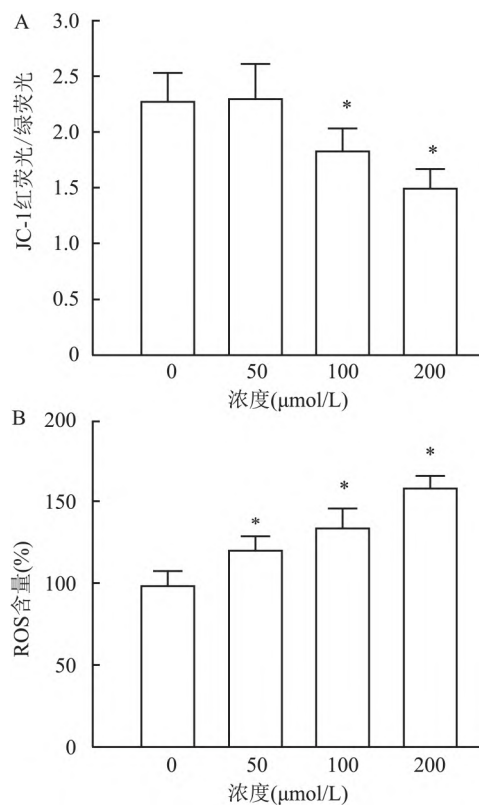


图3 ZnO NPs 对 AC16 细胞线粒体膜电位及氧化应激的影响

A: 线粒体膜电位水平; B: 全细胞 ROS 含量; 与对照组比较: * $P < 0.05$

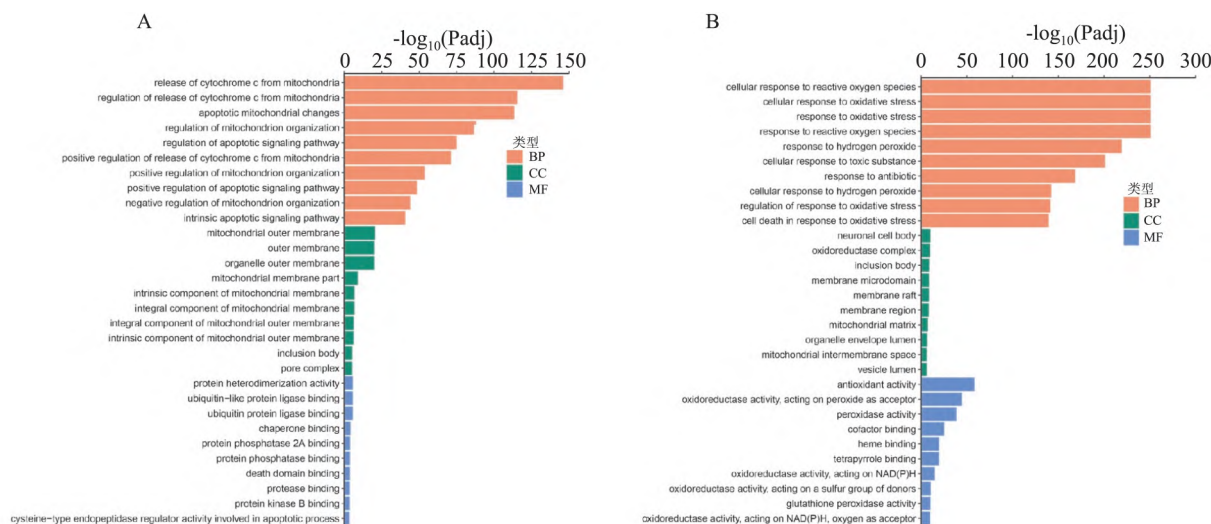


图4 线粒体与氧化应激相关的差异表达基因 GO 富集分析

A: 线粒体相关的差异表达基因 GO 富集分析; B: 氧化应激相关的差异表达基因 GO 富集分析

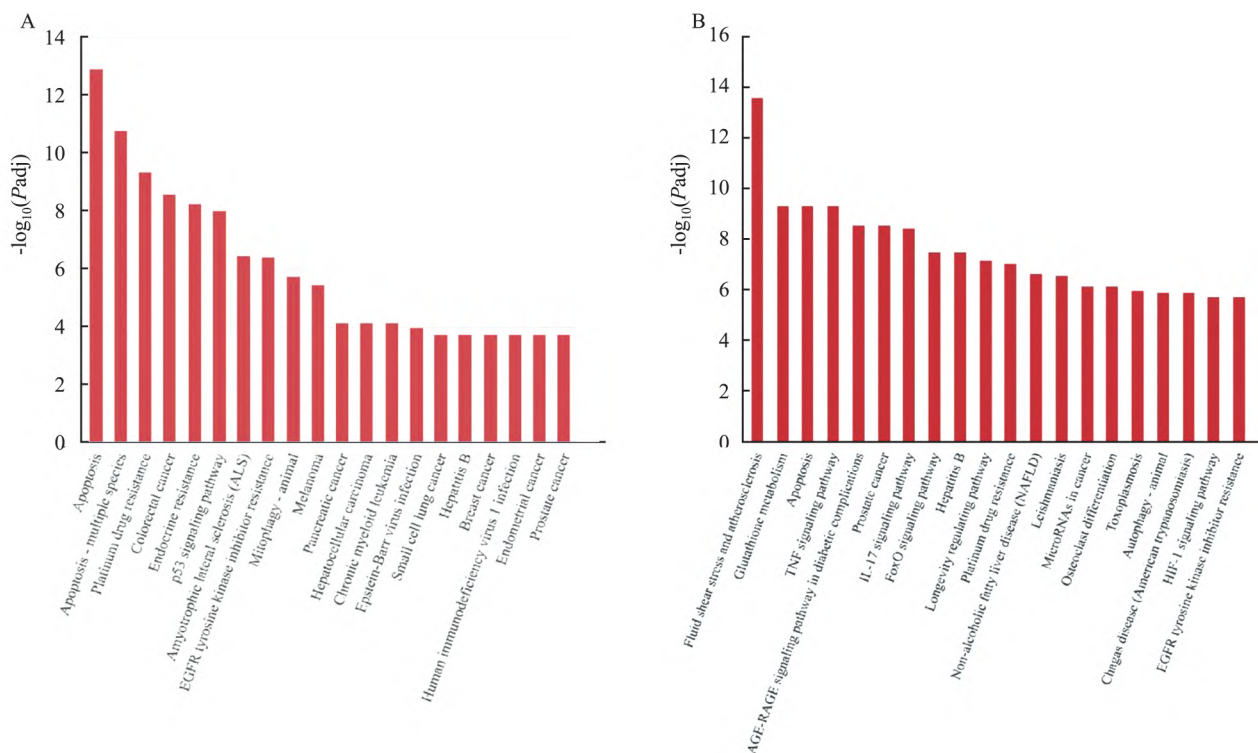


图5 线粒体与氧化应激相关的差异表达基因 KEGG 富集分析

A: 线粒体相关的差异表达基因 KEGG 富集分析; B: 氧化应激相关的差异表达基因 KEGG 富集分析

粒体相关的差异基因 GO 富集分析,其中生物过程富集基因变化最大,其次是细胞组成与分子功能;在生物过程部分中,变化最大的是线粒体细胞色素 C 的释放、调节线粒体释放细胞色素 C、凋亡信号通路的调控等。在细胞组成部分中,变化最大的是线粒体外膜、细胞器外膜等;在分子功能部分变化最大的是泛素蛋白连接酶结合、蛋白异源二聚体活性等。

如图 4B 所示,氧化应激相关的差异基因 GO 富集结果中,生物过程富集基因变化最大,其次是分子功能与细胞组成;在生物过程部分中,变化最大的是对 ROS 的响应、细胞对氧化应激的反应、对过氧化氢的响应等;在分子功能部分中,变化最大的是抗氧化活性、氧化还原酶活性,作用于过氧化物作为受体、过氧化物酶活性等;在细胞组成部分中,变化最大的

神经元细胞体、氧化还原酶复合物等。上述结果表明 ZnO NPs 产生的心肌毒性与生物过程密切相关, 其中与线粒体细胞色素 C 的释放、ROS 的响应、凋亡信号通路的调控关系最紧密。

2.6 线粒体与氧化应激相关差异表达基因 KEGG 富集分析 如图 5A 所示, 线粒体相关的差异基因进行 KEGG 富集分析, 涉及的信号通路包括凋亡信号通路、化学致癌信号通路、p53 信号通路等。如图 5B 所示, 氧化应激相关的差异基因涉及的信号通路包括动脉粥样硬化、谷胱甘肽代谢、细胞凋亡等。

3 讨论

本研究采用 DLS 法观察 ZnO NPs 在水中的物理特性, 发现 ZnO NPs 流体动力学直径为 (192.2 ± 1.63) nm, 有轻微聚团现象, 与文献^[9]报道一致。Zeta 电位为 (-23.26 ± 1.05) mV, 绝对值 <30 mV, 提示其有易聚集的特性。ZnO NPs 诱导的细胞毒性与粒径、浓度和暴露时间密切相关^[10]。

ZnO NPs 的广泛应用增加其暴露风险, 越来越多的研究^[5]证明 ZnO NPs 可能对心血管产生毒性。将 SD 大鼠进行灌胃 14 d 后心脏病理出现炎症细胞浸润^[11]。Liang et al^[12]使用人主动脉内皮细胞暴露 ZnO NPs 24 h, 从 $192 \mu\text{mol/L}$ 开始出现细胞毒性。另有研究^[10]使用 6 种金属氧化物纳米颗粒评估对人心脏微血管内皮细胞(HCMECs)的细胞毒性, 结果显示, ZnO NPs、CuO NPs 处理 24 h 后自 $128 \mu\text{mol/L}$ 开始以浓度依赖性产生细胞毒性。本研究中 ZnO NPs 自 $125 \mu\text{mol/L}$ 开始呈现剂量依赖性细胞毒性, IC_{50} 在 $168.9 \mu\text{mol/L}$ 与文献^[12]报道一致。

有研究^[13]证明 ZnO NPs 诱导的心血管损伤与线粒体和氧化应激有关, 有学者使用 H9c2 心肌细胞、人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和主动脉平滑肌细胞(HASMC)暴露 $128 \sim 512 \mu\text{mol/L}$ ZnO NPs 后, 发现其上调了细胞内 ROS、脂质过氧化含量, 引起细胞氧化应激。AC16 细胞暴露于 $0 \sim 640 \mu\text{mol/L}$ SiNPs 后, 超微结构出现线粒体损伤及 ROS 呈现剂量依赖性升高^[14]。本实验中在 $100 \sim 200 \mu\text{mol/L}$ ZnO NPs 暴露下会导致线粒体损伤, 在 $50 \sim 200 \mu\text{mol/L}$ ZnO NPs 暴露下产生 ROS 蓄积。

目前针对 ZnO NPs 所致的心血管毒性的机制研究较少, 现有研究^[2]认为 ZnO NPs 可以诱导细胞氧化应激、炎症反应、线粒体功能障碍、内质网应激等, ROS 介导的氧化应激在其中发挥关键作用^[15]。本实验采用高通量测序的方法, 旨在探明 AC16 细

胞暴露于 ZnO NPs 后转录组学层面的改变。GO 及 KEGG 富集分析提示, 差异表达基因涉及多条通路, 如 ROS、抗氧化活性、细胞色素 C 的释放、凋亡等。Liang et al^[12]发现, ZnO NPs 暴露 HAECs 后, 通过 ROS 触发线粒体途径导致多基因调控的细胞凋亡, 表现为 ROS 蓄积、MMP 下降、Cyt-C 的释放和 Bax/Bcl-2 比率的增加, 但给予抗氧化剂可以缓解。因此 ROS 调控与线粒体功能可能在 ZnO NPs 所致心肌损伤中发挥重要机制。

综上所述, ZnO NPs 可以剂量和时间依赖性引起 AC16 细胞毒性和氧化应激损伤, 同时转录组学也提示差异基因主要体现在抗氧化和呼吸链为主的相关通路。鉴于线粒体在维持心肌细胞氧化应激稳态、能量代谢中发挥着重要作用, 接下来可以进一步从线粒体功能调节和氧化应激稳态方面深入探讨其具体毒性机制。

参考文献

- [1] Faddah L M, Baky N A A, Mohamed A M, et al. Protective effect of quercetin and/or l-arginine against nano-zinc oxide-induced cardiotoxicity in rats[J]. *J Nanopart Res*, 2013, 15: 1520.
- [2] Liu J, Feng X, Wei L, et al. The toxicology of ion-shedding zinc oxide nanoparticles[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2016, 46(4): 348 - 84.
- [3] Esmaeillou M, Moharamnejad M, Hsankhani R, et al. Toxicity of ZnO nanoparticles in healthy adult mice [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013, 35(1): 67 - 71.
- [4] Kielbik P, Kaszewski J, Rosowska J, et al. Biodegradation of the ZnO: Eu nanoparticles in the tissues of adult mouse after alimentary application[J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(3): 843 - 52.
- [5] Cao Y, Gong Y, Liao W, et al. A review of cardiovascular toxicity of TiO₂, ZnO and Ag nanoparticles (NPs) [J]. *Biometals*, 2018, 31(4): 457 - 76.
- [6] Li Y, Li F, Zhang L, et al. Zinc Oxide nanoparticles induce mitochondrial biogenesis impairment and cardiac dysfunction in human iPSC-derived cardiomyocytes[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 2669 - 83.
- [7] Wang Y, Wu Y, Quadri F, et al. Cytotoxicity of ZnO nanowire arrays on excitable cells [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2017, 7(4): 80.
- [8] Horstmann C, Davenport V, Zhang M, et al. Transcriptome profile alterations with carbon nanotubes, quantum dots, and silver nanoparticles: a review[J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(6): 794.
- [9] Liu Z, Wang C, Hou J, et al. Aggregation, sedimentation, and dissolution of CuO and ZnO nanoparticles in five waters[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 25(31): 31240 - 9.
- [10] Sun J, Wang S, Zhao D, et al. Cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles in human cardiac micro-vascular endothelial cells: cytotoxicity, permeability, and inflam-

- mation of metal oxide nanoparticles [J]. *Cell Biol Toxicol* ,2011 , 27(5) : 333 –42.
- [11] Pasupuleti S , Alapati S , Ganapathy S , et al. Toxicity of zinc oxide nanoparticles through oral route [J]. *Toxicol Ind Health* , 2012 , 28(8) : 675 –86.
- [12] Liang S , Sun K , Wang Y , et al. Role of Cyt-C/caspases-9 , Bax/Bcl-2 and the FAS death receptor pathway in apoptosis induced by zinc oxide nanoparticles in human aortic endothelial cells and the protective effect by alpha-lipoic acid [J]. *Chem Biol Interact* ,2016 , 258: 40 –51.
- [13] Nagarajan M , Maadurshni G B , Tharani G K , et al. Exposure to zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) induces cardiovascular toxicity and exacerbates pathogenesis – Role of oxidative stress and MAPK signaling [J]. *Chem Biol Interact* ,2021 , 351: 109719.
- [14] Feng L , Ning R , Liu J , et al. Silica nanoparticles induce JNK-mediated inflammation and myocardial contractile dysfunction [J]. *J Hazard Mater* ,2020 , 391: 122206.
- [15] Cui G , Zhang H , Guo Q , et al. Oxidative stress-mediated mitochondrial pathway-dependent apoptosis is induced by silica nanoparticles in H9c2 cardiomyocytes [J]. *Toxicol Mech Methods* , 2020 , 30(9) : 646 –55.

Oxidative stress injury and transcriptome analysis of human myocardial AC16 cells induced by zinc oxide nanoparticles

Lu Fangmei^{1,2} , Li Yujie² , Guo Jiabin² , Xu Dexiang¹ , Liu Chao^{1,2}

(¹Dept of Health Toxicology , School of Public Health , Anhui Medical University Hefei 230032;

²Chinese People's Liberation Army Center for Disease Control and Prevention Beijing 100071)

Abstract Objective To investigate the oxidative stress injury of nano zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) on human myocardial cells (AC16) , and to analyze the mechanism of ZnO NPs from the transcriptome level. **Methods** Dynamic light scattering (DLS) was used to characterize and detect ZnO NPs. After AC16 cells were exposed to ZnO NPs at different doses and at different times , the cell survival rate was determined by CCK-8 method. AC16 cells were divided into control group , ZnO NPs (50 , 100 , 200 $\mu\text{mol/L}$) , after 6 h treatment , the mitochondrial membrane potential (MMP) and reactive oxygen species (ROS) were measured. AC16 cells were divided into control group , 50 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs group and 200 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs group. After 6 h exposure , total RNA was extracted by TRIzol for transcriptome analysis , and the differentially expressed genes were enriched by gene body (GO) , Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) . **Results** The results of DLS showed that the hydrodynamic diameter was (192.2 ± 1.63) nm and the Zeta potential was (-23.26 ± 1.05) mV. CCK-8 results showed that the survival rate of AC16 cells decreased with the increase of dose and time of exposure to ZnO NPs. Fluorescence quantification showed that with the increase of ZnO NPs exposure dose , MMP significantly decreased at 100 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs ($P < 0.05$) , and ROS significantly increased at 50 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs ($P < 0.05$) . Using the multifunctional microplate reader , it was observed that MMP and ROS were statistically significant at 100 and 50 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs , respectively , showing a decrease in MMP and an increase in ROS. Transcriptome analysis showed that 1 071 genes were enriched in the 50 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs group compared with the control group , including 561 up-regulated genes and 510 down-regulated genes. Compared with the control group , 7 164 genes were enriched in 200 $\mu\text{mol/L}$ ZnO NPs group , including 4 098 up-regulated genes and 3 066 down-regulated genes. GO and KEGG analysis showed that the differential genes were mainly concentrated in ROS , antioxidant activity , mitochondrial cytochrome C release , apoptosis and other signaling pathways. **Conclusion** ZnO NPs can decrease the survival rate of AC16 cells and induce mitochondrial damage and oxidative stress , among which ROS-mediated oxidative stress and mitochondrial function changes are important toxic mechanisms of ZnO NPs induced AC16 cytotoxicity.

Key words zinc oxide nanoparticles; cardiotoxicity; transcriptomics; oxidative stress; mitochondrial damage