

纳米 ZnO 对人肺上皮细胞 BEAS-2B 细胞增殖和凋亡的影响*

陈津子¹, 李旭艳^{1, 2△}, 刘东梅¹, 龙舒婷¹, 李永媚¹, 陈泓冰¹

(1. 岭南师范学院生命科学与技术学院, 广东 湛江 524000; 2. 粤西特色生物医药工程技术研究中心, 广东 湛江 524000)

【摘要】 目的: 探讨纳米 ZnO 对人肺上皮细胞 BEAS-2B 细胞增殖、凋亡的影响及分子机制。**方法:** 用终浓度为 3、6、12 $\mu\text{g/ml}$ 的纳米 ZnO 处理 BEAS-2B 细胞 12 h 和 24 h, 对照组未加入纳米 ZnO, 各设 3 复孔, CCK-8 法检测细胞活力, 分析半致死浓度。筛选 3、6 $\mu\text{g/ml}$ 纳米 ZnO 处理 BEAS-2B 细胞 24 h, 各设 3 复孔, 倒置显微镜观察细胞形态, Hoechst33342 染色观察细胞核, AO 染色及扫描电镜观察细胞凋亡形态, 流式细胞术检测活性氧水平、细胞周期进程、细胞凋亡; Western blot 检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平。**结果:** 与对照组相比, 纳米 ZnO 处理组细胞活力显著下降 ($P < 0.01$), 处理 24 h 时 IC_{50} 为 6.13 $\mu\text{g/ml}$; 纳米 ZnO 处理细胞 24 h 后, 3 $\mu\text{g/ml}$ 和 6 $\mu\text{g/ml}$ 组的活性氧水平显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。6 $\mu\text{g/ml}$ 处理组细胞周期阻滞于 G2/M 期、染色质固缩凝集、出现凋亡小体、细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.01$)、Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)、Bax 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。**结论:** 纳米 ZnO 诱导 BEAS-2B 细胞活性氧积累, 阻滞细胞周期进程, 促进细胞凋亡。

【关键词】 纳米 ZnO; BEAS-2B 细胞; 细胞培养; 细胞增殖; 细胞凋亡; 活性氧

【中图分类号】 R332.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-059-005

【DOI】 10.12047/j.cjap.6336.2022.083

Effects of ZnO nanoparticles on proliferation and apoptosis of human lung epithelial BEAS-2B cells

CHEN Jin-zi¹, LI Xyu-yan^{1, 2△}, LIU Dong-mei¹, LONG Shu-ting¹, LI Yong-mei¹, CHEN Hong-bing¹

(1. School of Life Sciences and Technology, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524000; 2. Western Guangdong Characteristic Biology and Medicine Engineering and Research Center, Zhanjiang 524000, China)

【ABSTRACT】 Objective: To investigate the effects of ZnO nanoparticles (ZnO NPs) on proliferation and apoptosis of human lung epithelial cells BEAS-2B and its molecular mechanisms. **Methods:** BEAS-2B cells were treated with ZnO NPs at concentrations of 3, 6 and 12 $\mu\text{g/ml}$ for 12 h and 24 h, the control group was not treated with ZnO NPs, each with 3 replicate wells. Cell viability was detected by CCK-8 method, and the half lethal concentration (IC_{50}) was analyzed. Then, the BEAS-2B cells were treated with ZnO NPs at selected concentrations of 3 and 6 $\mu\text{g/ml}$ for 24 h respectively, each group was set with 3 replicate. Cell morphology was observed under inverted microscope. The morphology of cell nuclei was observed by Hoechst33342 staining. The morphology of apoptosis was observed by AO staining and scanning electron microscopy. Cell cycle progression, cell apoptosis rate and the level of reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry. Western blot was used to detect the expression levels of Bcl-2 and Bax protein. **Results:** Compared with the control group, the cell viability of cells treated with ZnO NPs were decreased significantly ($P < 0.01$), and the IC_{50} was 6.13 $\mu\text{g/ml}$ at 24 h of drug treatment. After the cells were treated with ZnO NPs for 24 h, the levels of ROS were increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in 3 $\mu\text{g/ml}$, 6 $\mu\text{g/ml}$ groups. The cell cycle was arrested at G2/M phase, chromatin condensation and apoptotic bodies were induced, apoptosis rate was increased significantly ($P < 0.01$) in 6 $\mu\text{g/ml}$ group. The expression of Bcl-2 was decreased ($P < 0.05$), and the expression of Bax was increased ($P < 0.05$) in cells treated with 6 $\mu\text{g/ml}$ ZnO NPs for 24 h. **Conclusion:** ZnO NPs induced ROS accumulation, blocked progress of cell cycle and induced cell apoptosis in BEAS-2B cells.

【KEY WORDS】 ZnO NPs; BEAS-2B cells; cell culture; cell proliferation; cell apoptosis; ROS

随着纳米技术的飞速发展, 纳米材料在人们生活中的应用越来越广泛。纳米 ZnO (ZnO nanoparti-

cles, ZnO NPs) 作为一种新型多功能无机材料, 广泛应用于建筑材料、食品添加剂、生物医药、化妆品、饲料、化工等多个领域^[1]。由于纳米 ZnO 具有抗紫外线功能, 被用于油漆、涂料、石膏、玻璃等的生产, 也是化妆品防晒霜、保湿霜的重要成分; 因其具有抗炎、抗菌作用, 被用于制作软膏、洗涤剂、漱口水、食品包装袋、人类和牲畜的膳食补充剂; 利用其催化功能, 制作分解汽车尾气和水中有害物质分解的催化

*【基金项目】 广东省教育厅粤西特色生物医药工程技术研究中心开放课题(2022-K13); 广东省教育厅南药高值化开发利用创新团队(2021KCXTD039); 湛江市海洋青年人才专项(2021E05024)、大学生创新创业项目(94)

【收稿日期】 2022-07-05 【修回日期】 2022-09-28

△【通讯作者】 Tel: 14767306890; E-mail: lxy0702@126.com

剂^[2]。纳米 ZnO 的广泛应用,使职业人员和消费者的皮肤暴露和呼吸道暴露风险增加。

吸入纳米 ZnO 颗粒可以引发呼吸系统不适反应。啮齿动物实验表明,豚鼠暴露于 5 mg/m³ 纳米 ZnO(50 nm)空气中 3 h 后,引发肺部功能下降^[3],大鼠暴露于含 2 mg/m³ 纳米 ZnO 颗粒空气中 4 周(每日 6 h),引发肺炎^[4]。受试志愿者暴露于含 0.5 mg/m³ 纳米 ZnO 空气中 4 h,可诱发气道炎症,痰液中 IL-6、IL-8 蛋白水平、中性粒细胞数量增加,暴露于含 5 mg/m³ 纳米 ZnO 空气中 2 h,即出现发烧、炎症因子增高的症状^[5,6]。因此,探究纳米 ZnO 对肺细胞的损伤及其机理有实际意义,为指导纳米氧化锌的安全使用提供理论基础。本研究以人肺上皮 BEAS-2B 细胞为研究对象,探究纳米 ZnO 对 BEAS-2B 细胞增殖和凋亡的影响,以期评价纳米 ZnO 暴露的生物危害性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺上皮 BEAS-2B 细胞购自广东医科大学;纳米 ZnO(30±10)nm 购自上海麦克林生化科技有限公司;RPMI 1640 培养液、胰蛋白酶、青霉素-链霉素购自 Hyclone 公司;胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司;Cell counting kit-8 (CCK-8)试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒、活性氧检测试剂盒购自碧云天生物技术研究;吖啶橙(acridine Orange, AO)染色液购自上海源叶生物科技有限公司;肌动蛋白(β -actin)一抗、辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京全式金生物技术有限公司;B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma /Leukemia-2, Bcl-2)抗体购自博奥森生物技术有限公司;Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体购自 Cell signaling technology 公司。

1.2 细胞培养及药物处理

BEAS-2B 细胞采用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养,于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。采用 3 μ g/ml、6 μ g/ml、12 μ g/ml 纳米 ZnO 溶液处理细胞 12 h、24 h,对照组未加入纳米 ZnO,各设 3 个复孔,用于 CCK-8 检测,分析细胞活力和半数致死浓度。选择低于 24 h 半数致死浓度的纳米 ZnO 处理细胞用于后续实验,作用细胞 24 h 后,进行 Hoechst33342 染色、AO 染色、扫描电镜观察,检测活性氧水平、细胞周期进程、细胞凋亡率、凋亡蛋白表达情况。

1.3 CCK-8 检测细胞活力

将 BEAS-2B 细胞以 3×10^3 cells/well 的密度接种于 96 孔板,3 μ g/ml、6 μ g/ml、12 μ g/ml 纳米 ZnO 处理 12 h、24 h,每孔加入 10 μ l CCK-8 孵育 2 h,酶标仪测定 450 nm 吸光值 A,每组 3 个复孔。计算细胞活力,GraphPad Prism 拟合细胞存活曲线,分析半数致死浓度 IC₅₀。

细胞活力% = [A(加药组) - A(空白组)] / [A(对照组) - A(空白组)] × 100%。

1.4 流式细胞术检测活性氧

对数生长期 BEAS-2B 细胞接种于 6 孔板,密度为 1.2×10^5 cells/well,收集 3 μ g/ml、6 μ g/ml 纳米 ZnO 处理 24 h 的 BEAS-2B 细胞,用含有 10 μ mol/L DCFH-DA 探针的 RPMI 1640 培养液重悬,37℃ 避光孵育 30 min, PBS 洗 3 次,流式细胞仪检测细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平。

1.5 倒置显微镜观察细胞生长状态

将 BEAS-2B 细胞以 1.2×10^5 cells/well 的密度接种于 6 孔板,3 μ g/ml、6 μ g/ml 纳米 ZnO 处理 24 h 后,倒置显微镜观察细胞生长状态并拍照。

1.6 流式细胞术检测细胞周期

对数生长期的 BEAS-2B 细胞接种于 6 孔板,密度为 1.2×10^5 cells/well,收集 3 μ g/ml、6 μ g/ml 纳米 ZnO 处理 24 h 的细胞,预冷 PBS 洗涤 2 次,70% 乙醇 4℃ 固定过夜, PBS 洗涤, PI 染色液重悬细胞,37℃ 避光孵育 30 min,流式细胞仪检测细胞周期。

1.7 Hoechst 33342 染色观察细胞核

细胞爬片置于 24 孔板内, BEAS-2B 细胞以 5.5×10^4 cells/well 的密度接种,3 μ g/ml、6 μ g/ml 纳米 ZnO 处理细胞 24 h 后,4% PFA 固定 30 min,1% Hoechst 33342 染色液室温避光孵育 5 min, PBST 洗 3 次,倒置荧光显微镜观察细胞核。

1.8 AO 染色观察细胞凋亡形态

BEAS-2B 细胞接种于 24 孔板的细胞爬片上,接种密度为 5.5×10^4 cells/well,3 μ g/ml、6 μ g/ml 纳米 ZnO 处理细胞 24 h,4% PFA 固定 30 min,0.1% AO 染色液室温避光孵育 10 min, PBST 洗 4 次,倒置荧光显微镜观察细胞形态。

1.9 扫描电镜观察细胞凋亡形态

BEAS-2B 细胞接种于 6 cm 细胞培养皿,接种密度 3×10^5 cells/well,3 μ g/ml、6 μ g/ml 纳米 ZnO 处理细胞 24 h,收集细胞,2.5% 戊二醛 4℃ 固定过夜,乙醇梯度脱水,丙酮置换两次,自然干燥后镀膜,扫描电镜观察拍照。

1.10 流式细胞术检测细胞凋亡

将 BEAS-2B 细胞以 1.2×10^5 cells/well 密度接种于 6 孔板, $3 \mu\text{g/ml}$ 、 $6 \mu\text{g/ml}$ 纳米 ZnO 处理 24 h, 收集细胞, 加入 $195 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC 结合液重悬细胞, 加入 $5 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC、 $10 \mu\text{l}$ PI 染色液混匀, 室温避光孵育 20 min 后置于冰浴, 流式细胞仪检测。

1.11 Western blot 检测凋亡相关基因蛋白表达

细胞以 1.2×10^5 cells/well 密度接种于 6 孔板, $3 \mu\text{g/ml}$ 、 $6 \mu\text{g/ml}$ 纳米 ZnO 处理细胞 24 h 后, RIPA 裂解液裂解细胞, 提取总蛋白, SDS-PAGE 电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, β -actin、Bcl-2、Bax 一抗 4°C 孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h, ECL 显色曝光, Image J 软件分析灰度值。

1.12 统计学处理

数据采用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, GraphPad Prism 5 软件对数据进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 纳米 ZnO 对 BEAS-2B 细胞活力的影响

$3 \mu\text{g/ml}$ 、 $6 \mu\text{g/ml}$ 、 $12 \mu\text{g/ml}$ 纳米 ZnO 处理 BEAS-2B 细胞 12 h、24 h, CCK-8 检测细胞活力, 结果如图 1 所示, 与对照组相比, 纳米 ZnO 处理组细胞活力显著下降 ($P < 0.01$), 呈浓度、时间依赖性, 纳米 ZnO 处理细胞 12 h、24 h 的 IC_{50} 值为 $10.72 \mu\text{g/ml}$ 、 $6.13 \mu\text{g/ml}$, 后续实验选择 24 h 为毒性处理时间, 纳米 ZnO 处理浓度选择 $3 \mu\text{g/ml}$ 、 $6 \mu\text{g/ml}$ 。

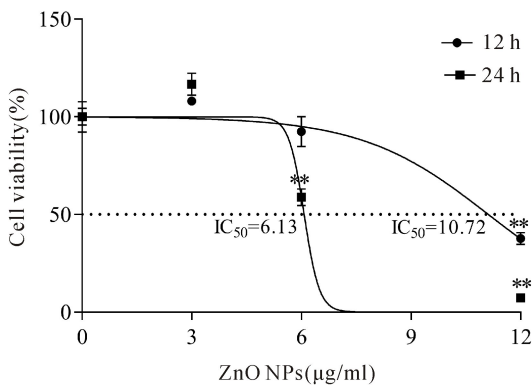


Fig. 1 The effects of ZnO NPs on the cell activity of BEAS-2B cells

** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ concentration

2.2 纳米 ZnO 对 BEAS-2B 细胞活性氧水平的影响

细胞经 DCFH-DA 探针标记后, 流式细胞术检测, 如图 2 所示, 与对照组 (150.00 ± 3.00) 比较, 3

$\mu\text{g/ml}$ 、 $6 \mu\text{g/ml}$ 处理组细胞的荧光强度 (192.34 ± 2.52 、 344.00 ± 20.07) 显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。表明, 纳米氧化锌诱导 BEAS-2B 细胞 ROS 积累, 细胞发生氧化应激。

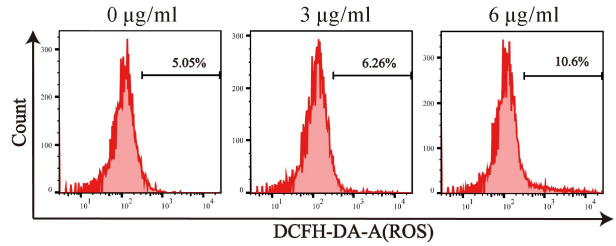


Fig. 2 The effects of ZnO NPs on the level of ROS in BEAS-2B cells

2.3 纳米 ZnO 对 BEAS-2B 细胞增殖的影响

$3 \mu\text{g/ml}$ 、 $6 \mu\text{g/ml}$ 纳米 ZnO 处理细胞 24 h 后, 对照组细胞贴壁生长、呈长梭形, 纳米 ZnO 处理组细胞皱缩变圆, $6 \mu\text{g/ml}$ 纳米 ZnO 处理组细胞密度下降 (图 3)。经流式细胞术检测细胞周期分布, 如图 4、表 1 所示, 与对照组相比, $6 \mu\text{g/ml}$ 纳米 ZnO 处理组 G2/M 期细胞所占比例显著升高 ($P < 0.05$)。结果表明, 纳米 ZnO 阻滞细胞周期进程, 抑制细胞增殖。

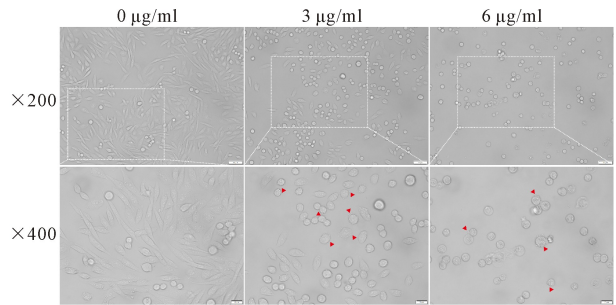


Fig. 3 Cell morphology of BEAS-2B cells treated with ZnO NPs for 24 h (Scale bars = 50 μm and 20 μm)

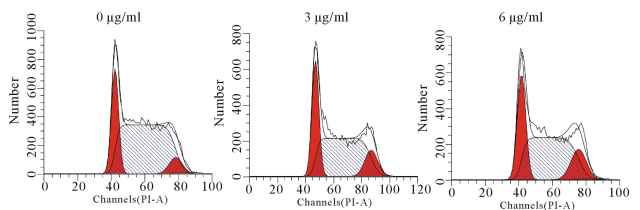


Fig. 4 The effects of ZnO NPs on the cell cycle progression of BEAS-2B cells

Tab. 1 Effects of ZnO NPs on the proportion of cells in the cell cycle (% , $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	G0/G1	S	G2/M
0	29.08 ± 8.60	61.82 ± 13.31	9.10 ± 4.81
3	32.39 ± 5.76	54.76 ± 7.56	12.87 ± 1.80
6	33.42 ± 11.10	49.09 ± 16.30	17.49 ± 5.21 *

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ concentration

2.4 纳米 ZnO 对 BEAS-2B 细胞凋亡的影响

3 $\mu\text{g/ml}$ 、6 $\mu\text{g/ml}$ 纳米 ZnO 处理细胞 24 h, 经 Hoechst 33342 染色后, 荧光显微镜观察到对照组细胞核染色质较均匀分布; 纳米 ZnO 处理组部分细胞发生核浓缩、染色质凝集(图 5A)。细胞经 AO 染色, 荧光显微镜下观察到对照组细胞呈长纤维形、胞膜完整, 纳米 ZnO 处理组细胞出现凋亡小体(图 5B); 扫描电镜下观察到对照组细胞表面有丰富细密的微绒毛, 纳米 ZnO 处理组细胞表面较为光滑, 且泡状突起的凋亡小体数量增多(图 5C)。经流式细胞术检测, 与对照组相比 [(8.93 \pm 4.31)%], 3 $\mu\text{g/ml}$ 、6 $\mu\text{g/ml}$ 纳米 ZnO 处理组细胞凋亡率 [(32.60 \pm 5.69)%、(55.83 \pm 4.05)%](图 5D) 显著提高 ($P < 0.01$)。结果表明, 纳米 ZnO 诱导 BEAS-2B 细胞凋亡。

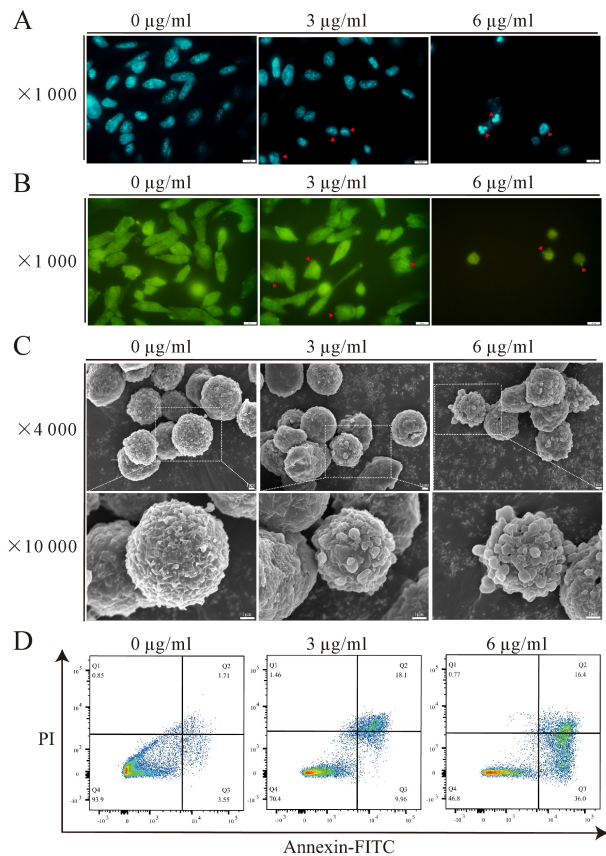


Fig. 5 The effects of ZnO NPs on the cell apoptosis of BEAS-2B cells

A: The fluorescent micrographs of BEAS-2B cells stained Hoechst33342. Red arrows represented chromatin condensation (Scale bars = 10 μm); B: The fluorescent micrographs of BEAS-2B cells stained with AO. Red arrows represented apoptotic bodies (Scale bars = 10 μm); C: Scanning electron microscopy images of BEAS-2B cells treated with ZnO NPs for 24 hours (Scale bars = 1 μm); D: Cell apoptosis was detected by flow cytometry

2.5 纳米 ZnO 对 BEAS-2B 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

3 $\mu\text{g/ml}$ 、6 $\mu\text{g/ml}$ 纳米 ZnO 处理细胞 24 h, Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达, 如图 6、表 2 所示, 与对照组相比, 6 $\mu\text{g/ml}$ 纳米 ZnO 处理组细胞的 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 3 $\mu\text{g/ml}$ 、6 $\mu\text{g/ml}$ 纳米 ZnO 处理细胞的 Bax 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结果表明, 纳米 ZnO 可下调 Bcl2 蛋白的表达, 上调 Bax 蛋白的表达。

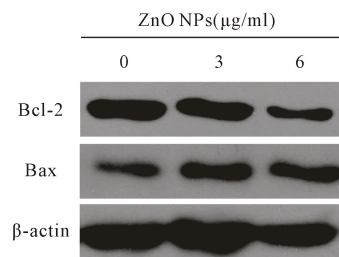


Fig. 6 The effects of ZnO NPs on the expressions of apoptotic related proteins in BEAS-2B cells

Tab. 2 Effects of ZnO NPs on the expression levels of apoptotic related proteins in BEAS-2B cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Bcl2/ β -actin	Bax/ β -actin
0	0.78 \pm 0.13	0.40 \pm 0.08
3	0.61 \pm 0.15	0.82 \pm 0.09**
6	0.41 \pm 0.11*	0.68 \pm 0.07*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ concentration

3 讨论

随着纳米技术的快速发展, 纳米 ZnO 对机体的不良影响引起人们关注。纳米 ZnO 具有细胞毒和基因毒效应, 影响皮肤、生殖系统、肝脏等活力, 诱导组织细胞发生凋亡、增殖抑制、自噬等^[7,8]。纳米 ZnO 通过多种途径发挥细胞毒效应, 包括诱导活性氧产生、持续释放锌离子、调控自噬相关蛋白、干扰离子通道功能等^[9]。本研究采用纳米 ZnO 处理 BEAS-2B 细胞后, 细胞活力降低, 细胞内 ROS 水平显著升高, 提示纳米 ZnO 诱导细胞发生氧化损伤。纳米 ZnO 颗粒直径小, 比表面积大, 与细胞膜或线粒体结合后释放锌离子, 诱发活性氧产生, 在果蝇卵、人角质细胞、人肺成纤维细胞的纳米 ZnO 暴露实验中, 纳米 ZnO 刺激活性氧产生后, 使线粒体活性降低, 脂质过氧化水平升高、DNA 损伤, 凋亡相关基因、内质网应激相关基因表达升高^[10,11]。为了明确纳米氧化锌诱导 BEAS-2B 细胞活性氧积累对细胞增殖和凋亡的影响, 进行流式细胞检测, 纳米 ZnO

诱导 BEAS-2B 细胞周期阻滞在 G2/M 期,细胞凋亡比率明显增加,染色质发生凝集、核固缩、凋亡小体生成。

细胞凋亡是由一系列信号分子精密调控的程序性死亡过程,由外源性死亡受体信号途径和内源性线粒体信号途径起始。B 细胞淋巴瘤 2(B cell lymphoma-2, Bcl-2) 家族基因是内源性凋亡途径的关键调控和执行分子,包括抗凋亡基因 Bcl-2、Bcl-XL (Bcl2-like 1)、Bcl-W (Bcl2 like 2)、Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1)、Bcl2A1 (Bcl2 related protein A1), 促凋亡基因 Bax、Bak (Bcl2 antagonist/killer 1), 抗凋亡蛋白通过结合促凋亡分子的保守功能结构域,抑制促凋亡蛋白的激活,阻止细胞凋亡发生^[12]。Bcl-2 是代表性的抗凋亡蛋白,可通过与 Bax 结合形成异源二聚体,阻止 Bax 在线粒体表面形成聚合物和细胞色素 C 释放,Bcl-2 与 Bax 的平衡是调控细胞增殖和凋亡的关键,也是多种物质的调控靶点,如脱氧鬼臼毒素衍生物、亚硝酸钠、四逆散等^[13-15]。为了进一步确认纳米 ZnO 调控 BEAS-2B 细胞凋亡的机制,检测了 Bcl-2、Bax 表达水平,纳米 ZnO 降低 BEAS-2B 细胞 Bcl-2 蛋白水平,上调 Bax 蛋白水平,说明纳米 ZnO 通过调控 Bcl-2、Bax 平衡诱导 BEAS-2B 细胞凋亡。

综上所述,纳米 ZnO 诱导 BEAS-2B 细胞活性氧积累,使细胞周期阻滞于 G2/M 期,促使凋亡相关蛋白表达发生变化,诱导 BEAS-2B 细胞发生细胞凋亡。本研究为评价纳米 ZnO 暴露的生物危害性提供理论依据。

【参考文献】

- [1] 孔子浩,王振宇,陈妮,等. 纳米氧化锌在食品中的应用及毒理学研究进展[J]. 保鲜与加工, 2019, 19(2): 174-178.
- [2] Cho WS, Duffin R, Howie SE, et al. Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2011, 8; 27: 1-16.
- [3] Lam HF, Conner MW, Rogers AE, et al. Functional and morphologic changes in the lungs of guinea pigs exposed to freshly generated ultrafine zinc oxide[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1985, 78(1): 29-38.
- [4] Morimoto Y, Izumi H, Yoshiura Y, et al. Evaluation of pulmonary toxicity of zinc oxide nanoparticles following inhalation and intratracheal instillation [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8): 1241.
- [5] Monsé C, Raulf M, Hagemeyer O, et al. Airway inflammation after inhalation of nano-sized zinc oxide particles in human volunteers [J]. *BMC Pulm Med*, 2019, 19(1): 266.
- [6] Fine JM, Gordon T, Chen LC, et al. Metal fume fever: characterization of clinical and plasma IL-6 responses in controlled human exposures to zinc oxide fume at and below the threshold limit value[J]. *J Occup Environ Med*, 1997, 39(8): 722-726.
- [7] 韩洁,田蕾,刘子怡,等. 纳米氧化锌经口染毒对 C57BL/6J 小鼠外周脏器的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2019, 35(6): 555-559.
- [8] Yang D, Zhang MJ, Gan Y, et al. Involvement of oxidative stress in ZnO NPs-induced apoptosis and autophagy of mouse GC-1 spg cells [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 202: 110960.
- [9] 杨霞,江米足. 纳米氧化锌的毒性作用及机制研究进展[J]. 浙江大学学报(医学版), 2014, 43(2): 218-226.
- [10] Ng CT, Yong LQ, Hande MP, et al. Zinc oxide nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in human lung fibroblasts and *Drosophila melanogaster* [J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12: 1621-1637.
- [11] Kocbek P, Teskac K, Kreft ME, et al. Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO₂ nanoparticles [J]. *Small*, 2010, 6(17): 1908-1917.
- [12] Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(3): 175-193.
- [13] Li YN, Ning N, Song L, et al. Derivatives of deoxypodophyllotoxin induce apoptosis through Bcl-2/Bax proteins expression[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2021, 21(5): 611-620.
- [14] Ran SS, Gao X, Ma MX, et al. NaAsO₂ decreases GSH synthesis by inhibiting GCLC and induces apoptosis through HeLa cell mitochondrial damage, mediating the activation of the NF-κB/miR-21 signaling pathway [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 234: 113380.
- [15] 赵家荣,冯雪松,李宏,等. 四逆散对人肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响及其机制[J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(5): 489-493.