

## 银纳米粒子对乏氧胶质瘤细胞的影响

谭泓叶, 张晓红, 张海黔

南京航空航天大学材料科学与技术学院, 江苏 南京 211100

**【摘要】目的:**使用乏氧装置培养乏氧人神经胶质细胞瘤 U251 细胞, 并研究乏氧情况下人神经胶质细胞瘤 U251 细胞的形态变化, 以及对银纳米粒子的摄取情况; 在未放疗/放疗情况下, 银纳米粒子对乏氧 U251 细胞周期的影响, 从而讨论银纳米粒子对乏氧人神经胶质细胞瘤 U251 细胞的影响。**方法:**对人神经胶质细胞瘤 U251 细胞做体外培养, 将乏氧培养的 U251 细胞与银纳米粒子共孵育, 通过观察细胞形态, 对银纳米粒子吸收及未放疗/放疗后细胞周期变化分析银纳米粒子对乏氧胶质瘤细胞的放疗增敏情况。**结果:**乏氧损伤可使人脑胶质瘤 U251 细胞形态变圆, 且乏氧 24 h 内, 细胞数量变化不大, 一旦乏氧时间超过 24 h, 数量下降很快。乏氧或常氧条件下培养的 U251 细胞, 可看到在两种条件下细胞对银纳米粒子的摄取情况不同。有氧状态下, U251 细胞对银纳米的吸收, 前 8 h 摄取稍慢, 8 h 后快; 而乏氧情况与有氧状态下相反, 即前 8 h 摄取得快, 8 h 后慢, 且乏氧细胞对银纳米的摄取更多。放疗后, 相比于空白组细胞, 银纳米粒子使乏氧 U251 细胞 G<sub>2</sub>/M 期增加, 细胞周期被阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期。**结论:**相对于有氧细胞, 银纳米粒子可较快进入到乏氧细胞中, 且放疗后, 银纳米粒子使乏氧细胞周期被阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期, 间接增加了乏氧 U251 细胞的辐射敏感性, 为治疗乏氧肿瘤细胞提供新的可能性。

**【关键词】**胶质瘤; 辐射; 银纳米粒子; 乏氧; 放射治疗

**【中图分类号】** R730.55

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1005-202X(2017)01-0089-06

## Effect of silver nanoparticles on radiosensitivity of hypoxic glioma cells *in vitro*

TAN Hongye, ZHANG Xiaohong, ZHANG Haiqian

College of Materials Science and Technology, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 211100, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of silver nanoparticles on the response of hypoxic human brain glioma U251 cells to radiotherapy *in vitro*. **Methods** U251 cells cultured *in vitro* were incubated with silver nanoparticles under normoxic or hypoxic condition. The changes in cell morphology, silver nanoparticle intakes by the cells and the changes of cell cycle after radiotherapy were observed to analyze the effect of silver nanoparticles in enhancing the radiosensitivity of the cells. **Results** Hypoxic U251 cells underwent morphological changes from a fusiform shape to a spherical shape, and the number of viable cells showed no significant variation within 24 h of hypoxia. A hypoxic exposure for over 24 h caused a rapid reduction in the viable cell number. Under normoxic conditions, U251 cells exhibited a slow rate of silver nanoparticle intake within the initial 8 h, and the rate become accelerated after 8 h; the cells exposed to hypoxic conditions showed a reverse pattern of silver nanoparticle intake, which was fast in the initial 8 h but slow after that. Hypoxic cells absorbed more silver nanoparticles than normoxic cells. Following radiotherapy, the cells treated with silver nanoparticles showed increased cell fraction in G<sub>2</sub>/M phase as compared to control cells with cell cycle arrest in G<sub>2</sub>/M phase. **Conclusion** Hypoxic exposure promotes the entry of silver nanoparticles into U251 cells. After irradiation, silver nanoparticles cause cell cycle arrest of the hypoxic cells in G<sub>2</sub>/M phase and enhance their radiosensitivity, which shed light on a new strategy for the treatment of hypoxic tumor cells.

**Keywords:** glioma; irradiation; silver nanoparticles; hypoxia; radiotherapy

**【收稿日期】** 2016-08-22

**【基金项目】** 国家自然科学基金(11575086, 81571805); 国家重点基础研究发展 973 项目(2013CB933904); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

**【作者简介】** 谭泓叶, 硕士研究生, E-mail: 15150506092@163.com

**【通信作者】** 张海黔, 教授, E-mail: zhanghq@nuaa.edu.cn

## 前言

肿瘤是世界上发病率较高且难以治愈的疾病之一,全世界每年死于癌症的人数占死亡总人数的14%,其中脑胶质瘤是一种恶性肿瘤,约占颅内肿瘤的46%,脑肿瘤中胶质细胞瘤发病率最高<sup>[1]</sup>。人类实体肿瘤生长在一个微环境中,肿瘤异常的血供系统容易导致中心细胞的氧气及养分供应不足,从而产生乏氧细胞。乏氧是肿瘤内普遍存在的现象,乏氧细胞抵抗放疗、化疗的效果,并成为肿瘤复发的根源<sup>[2-3]</sup>。目前治疗肿瘤的主要方法有放疗、化疗和手术<sup>[3-4]</sup>。近年来,纳米技术在医学方面的应用越来越广泛,为肿瘤治疗提供了新思路。银纳米作为医学领域应用最多的金属纳米材料之一,具有抗菌、抗病毒等特性<sup>[5]</sup>。已有研究表明银纳米对大肠杆菌、淋球菌等数十种微生物都有强烈抑制和杀灭作用,且不会产生耐药性<sup>[5-6]</sup>。由于银纳米的抗菌特性,已被广泛应用于生活中,其中婴儿产品、餐具和奶瓶中就有应用<sup>[6]</sup>。

近期,银纳米粒子对人脑胶质瘤细胞的影响情况在体外、体内实验都已证实,证明银纳米对治疗脑胶质瘤有较好的作用,且对其他疾病治疗也有一定潜力,因此银纳米成为纳米生物材料的研究热点<sup>[7]</sup>。然而,在体外实验中胶质瘤细胞受乏氧损伤后形态等变化、乏氧细胞对银纳米吸收情况、未放疗/放疗情况下,银纳米对乏氧胶质瘤细胞的影响等并不清楚。因此,在前人研究基础上,本研究以人胶质瘤U251细胞为研究对象,通过流式细胞术、荧光显微镜观察和共聚焦显微镜检测等技术,对乏氧细胞形态变化、乏氧细胞对银纳米的摄取情况及未放疗/放疗情况下,银纳米对乏氧细胞周期的影响进行研究,为进一步了解银纳米粒子对乏氧肿瘤细胞的放疗增敏机制做铺垫。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

银纳米颗粒(40  $\mu\text{g/mL}$ ,粒径大小30 nm)来自东南大学生物科学与医学工程学院,将银纳米稀释配成20  $\mu\text{g/mL}$ 溶液状,4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存待用;乏氧气体(94%  $\text{N}_2$ ,5%  $\text{CO}_2$ ,1%  $\text{O}_2$ )购买于南京上元气体公司;细胞周期试剂盒,碘化丙啶PI/RNase等所有试剂及细胞实验用品均购买于Beyotime生物技术研究所有或美国Sigma-Aldrich;TH4-200荧光显微镜(奥林巴斯,日本);流式细胞仪(BD生物科学,美国);FV1000共聚焦显微镜(奥林巴斯,日本);体外实验放射治疗

使用6 MeV直线加速器电子束(瓦里安医疗系统公司,美国)。

### 1.2 细胞培养

人神经胶质细胞瘤U251细胞来自东南大学生物科学与医学工程学院,细胞培养于RPMI1640培养液中,含10%热灭活胎牛血清、100 U/mL青霉素及100 U/mL链霉素。细胞被培养在37  $^{\circ}\text{C}$ 及饱和湿度的孵育箱,所充气体体积分数为5%  $\text{CO}_2$ 及95%空气。每3~4 d细胞被传代1次,取对数生长期细胞用于实验。其中,乏氧细胞培养通过物理方法实现,将细胞置于乏氧气体(94%  $\text{N}_2$ ,5%  $\text{CO}_2$ ,1%  $\text{O}_2$ )的环境中<sup>[8]</sup>。我们使用氧浓度控制器维持氧气浓度在1%~3%,并用氧气测量仪证实乏氧环境模拟成功。

### 1.3 细胞形态观察

U251细胞以密度 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔接种于六孔板,细胞贴壁后长至50%,将细胞分别放置于氧气充足的孵育箱及乏氧培养箱孵育40 h,分别在0、4、16、20、24、40 h用荧光显微镜拍摄细胞形态并计数一个平面的细胞数量。

### 1.4 流式细胞仪侧向角散射光(SSC)值的分析

人神经胶质细胞瘤U251细胞被种在六孔板上,密度为 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔,放在37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱中培养。24 h后,将实验组U251细胞取出后,放入乏氧培养箱中培养,而空白对照组细胞继续放在有氧孵育箱中。随后,20  $\mu\text{g/mL}$ 的银纳米粒子加入到各组细胞中孵育。在0、4、8、12、24 h用流式细胞仪检测细胞对银纳米粒子的摄取情况,从细胞团图形上分析SSC并对其定量分析。同样的,也可用共聚焦显微镜拍摄细胞对银纳米粒子的吸收情况。

### 1.5 流式细胞仪检测细胞周期

碘化丙啶PI/RNase被用来染双链DNA,用流式细胞仪检测DNA的组成。细胞被种在六孔板上,密度 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔,有氧/乏氧细胞贴壁后加入20  $\mu\text{g/mL}$ 的银纳米粒子共孵育24 h。之后,用磷酸盐缓冲液PBS清洗细胞两次,并更换新的培养液。随即,实验组细胞接受X射线照射(6 MeV,200 cGy/min),受照同时,空白组细胞与实验组细胞一样,也被移动至相同环境。随后,U251细胞被胰酶消化,将离心机转速调至1 000 r/min,离心5 min收集细胞,之后用冰浴预冷的磷酸盐缓冲液PBS重悬清洗,随即用70%酒精固定12~24 h,在4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。最后,细胞被碘化丙啶PI/RNase避光染色30 min,随后立即上流式细胞仪检测细胞周期。

2 结果与讨论

2.1 荧光显微镜观察乏氧细胞形态

Wu 等<sup>[9]</sup>提到 U251 细胞是人神经胶质细胞瘤细胞,常氧状态下呈梭形,贴壁生长,并随着培养时间增加,常氧细胞呈对数增长。我们将细胞经过传代培养,接种于六孔板,细胞贴壁 12 h 后(图 1a),细胞生长至 40%~50%,再将其放入乏氧装置,通入乏氧气体继续培养。由图 1 可知,当乏氧培养 16 h 后,细胞

形态有明显变化,且随着乏氧时间的增加,形变程度越来越明显。图 1e 和图 1f 给出的是乏氧细胞平面形态图,可以从图中清晰看到乏氧 24 h 后,细胞极性明显减弱,呈圆形(图 1e);乏氧 24 h 内对细胞数量影响并不大,细胞停止了对数增长,但一旦乏氧超过 24 h,细胞数量下降很快(图 1f)。这可能是由于急性乏氧使培养的乏氧细胞受乏氧损伤,从而导致乏氧时间超过 24 h 数量就下降得很快。因此,我们选择将细胞乏氧 24 h 为后续实验研究。

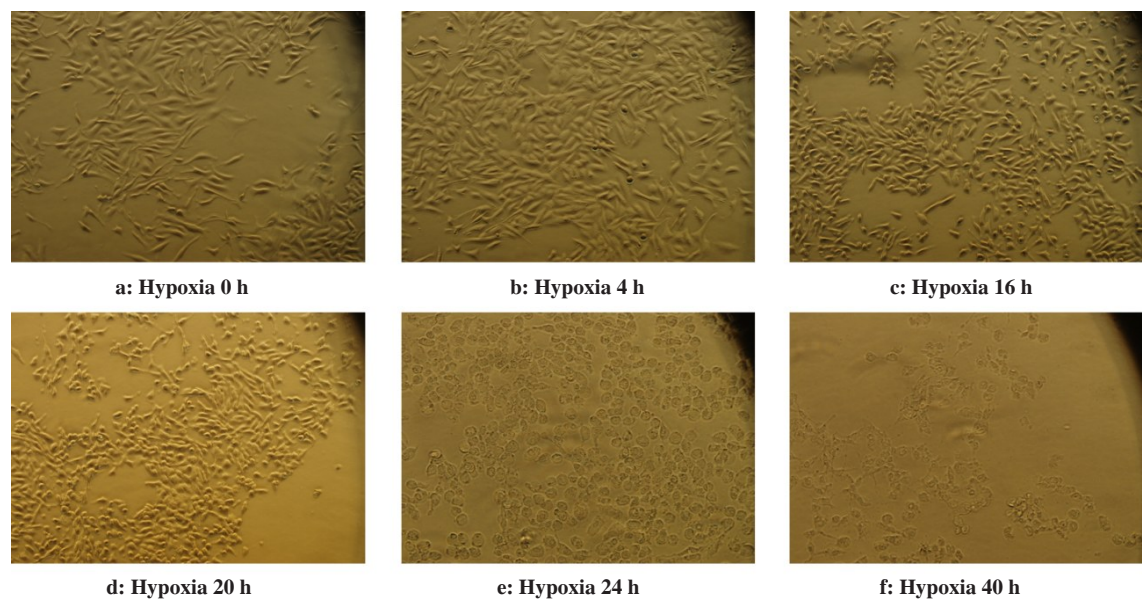


图1 分别乏氧处理4、16、20、24、40 h后荧光显微镜下U251细胞  
Fig.1 Fluorescence microscopy of U251 cells exposed to hypoxia for 4, 16, 20, 24, 40 h

2.2 U251 细胞对银纳米粒子的吸收情况

细胞吸收对于纳米材料的生物学应用是一个非常重要的过程,并且对纳米粒子功能实现起到至关重要的作用<sup>[10]</sup>。Wu 等<sup>[9]</sup>研究结果中提到,常氧状态下细胞对不同尺寸银纳米的吸收存在时间依赖性,并且单个细胞对银纳米的吸收呈上升趋势,吸收速度是先慢后快,跟本实验结果中常氧细胞吸收银纳米趋势类似。常氧细胞对银纳米(30 nm)吸收情况是前 8 h 速度稍慢,8 h 后摄取较快。

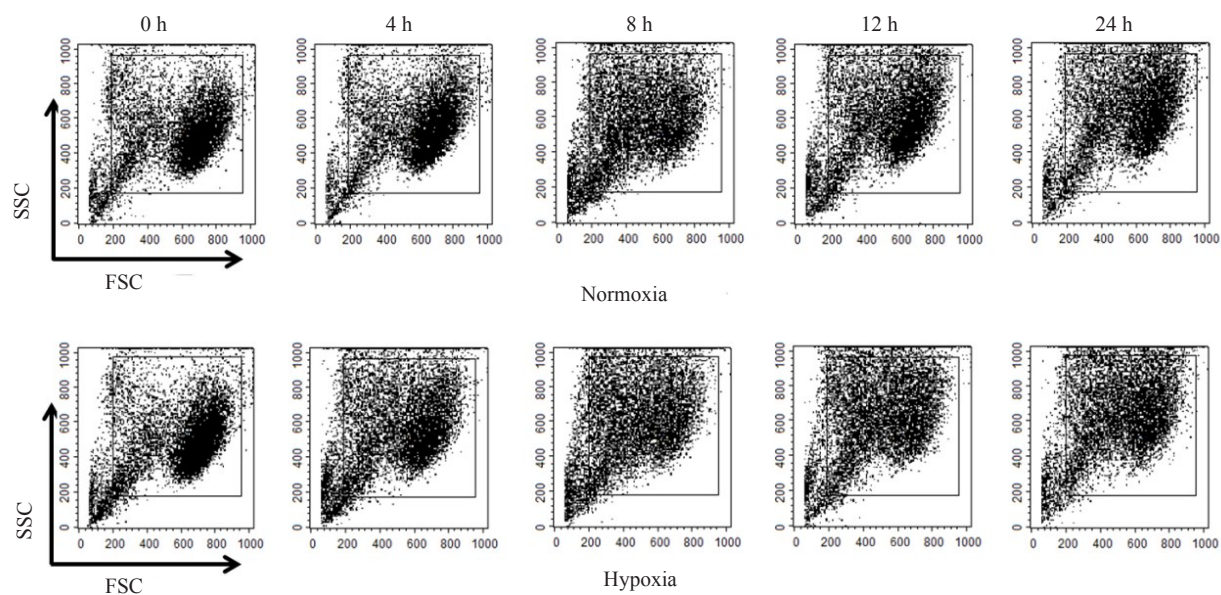
流式细胞术测量中,常用两种散射方向的散射光测量:前向角散射光(FSC)和 SSC。FSC 强度与细胞大小有关,对同种细胞群体随着细胞截面积的增大而增大;SSC 是指与激光束正交 90°方向的散射信号,主要用来获取有关细胞内部精细结构的颗粒性质有关信息<sup>[11-12]</sup>。它对细胞膜、胞质、核膜的折射率很敏感,能对细胞质内较大颗粒给出灵敏反映<sup>[13]</sup>。不同细胞大小和粒度不同,用这两个参数可以分选

出不同的细胞群<sup>[13]</sup>。

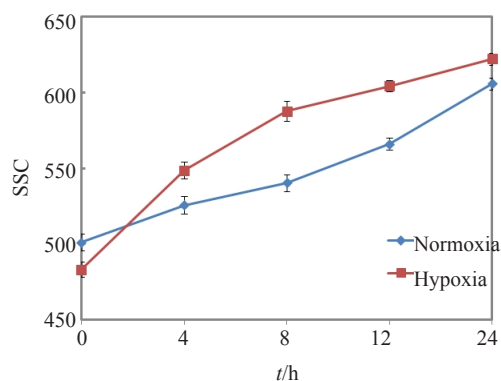
我们通过比较 SSC 值分析细胞对银纳米的吸收。从图 2a 可以直观看到,银纳米粒子还未进入细胞前,不论常氧/乏氧细胞,细胞团聚集在偏右下方的位置,即 FSC 大,SSC 小;并随着时间的增加,细胞团位置有向上偏移的趋势,且分布更均匀,即 SSC 增加了,银纳米粒子被常氧/乏氧细胞所吸收;再将乏氧细胞与常氧细胞对比,可以发现乏氧细胞团纵向位置比常氧低,且细胞较聚集,即 SSC 较常氧细胞低;但将银纳米粒子与乏氧细胞共孵育 24 h 后,可以清晰看到乏氧细胞较常氧细胞而言,细胞团分布更均匀,且整体上移。图 2b 是对图 2a 做了 SSC 值的定量分析,从图 2b 可以看到,共孵育的前 8 h,乏氧 SSC 值从  $483.260 \pm 5.156$  升高到  $587.730 \pm 6.635$ ;常氧 SSC 值从  $501.170 \pm 5.659$  升高到  $540.530 \pm 5.613$ 。因此,可看出前 8 h,乏氧细胞对银纳米粒子的吸收较常氧细胞更快;8~24 h 常氧细胞加快了对银的吸收,常氧 SSC 值

从  $540.530 \pm 5.613$  增加到  $605.920 \pm 3.981$ ; 而乏氧细胞吸收速度放慢, 从  $587.730 \pm 6.635$  增加到  $622.440 \pm 3.962$ 。总的来说, 与银共孵育 24 h 后, 进入乏氧细胞内的银纳米粒子比常氧细胞多。所以, 可以得到乏氧 U251 细胞对银纳米粒子的吸收存在时间效应, 在

孵育后的前 8 h 吸收速度较常氧细胞快, 且最终进入细胞内的银纳米粒子比常氧细胞多。之后我们还用共聚焦显微镜对细胞进行了暗场拍摄 (数据未列出), 也能看到进入乏氧细胞的黑色点状聚集物更多, 也验证了图 2b 的结果。



a: Cells were incubated with silver nanoparticles (AgNPs) for 0, 4, 8, 12, 24 h, and the side scatter (SSC) of normoxic or hypoxic cells was analyzed using flow cytometry



b: Quantitative analysis of SSC-H

图2 常氧/乏氧细胞与银纳米共孵育0、4、8、12、24 h后SSC值的分析

Fig.2 Changes of SSC in normoxic or hypoxic cells incubated with AgNPs for 0, 4, 8, 12, and 24 h

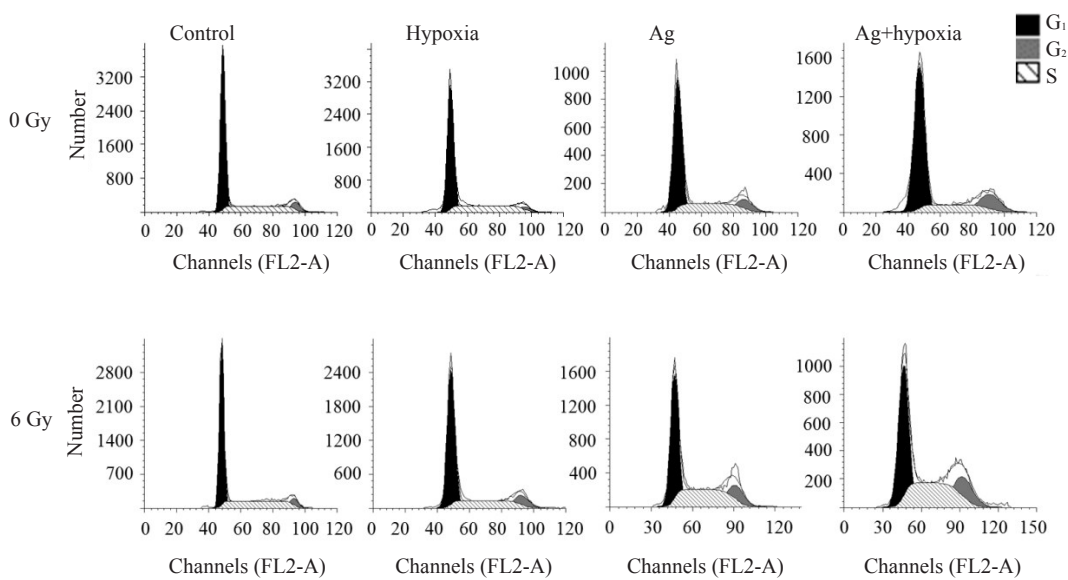
2.3 银纳米粒子使乏氧细胞 G<sub>2</sub>/M 期增加并阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期

细胞周期是生命活动中一个重要的过程, 肿瘤是一类渐进性细胞周期调控机制破坏的疾病, 因此对细胞周期调控机制的研究对临床诊断与治疗有十分重要的意义<sup>[14-15]</sup>。为了进一步解放疗后银纳米粒子对乏氧细胞的影响, 了解银纳米粒子是否增加乏氧细胞放射敏感性, 我们通过 X 射线与银纳米联合治疗, 用流式细胞仪检测细胞周期来实现。细胞周期是指正常连续分裂的细胞从前一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成所经历的连续动态过程, 可分为 5 期: 静息期 (G<sub>0</sub> 期)、DNA 合成前期 (G<sub>1</sub> 期)、

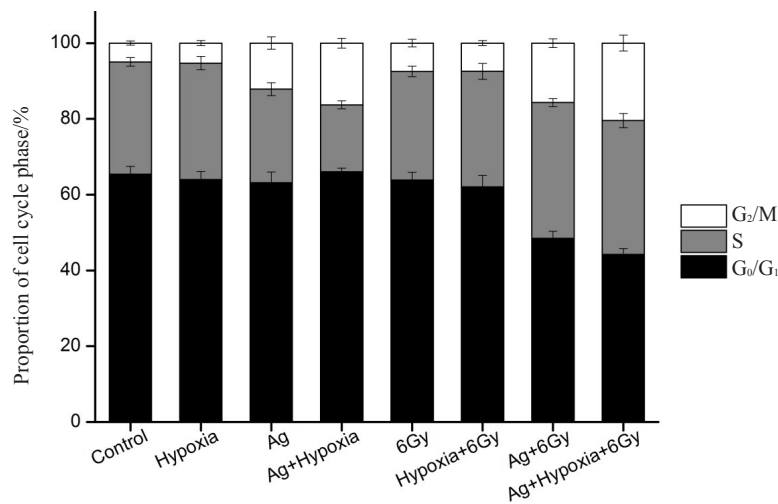
DNA 合成期 (S 期) 与 DNA 合成后期 (G<sub>2</sub> 期) 和有丝分裂期 (M 期), 其中 G<sub>2</sub> 期及 M 期细胞对辐射较敏感<sup>[15]</sup>。Chen 等<sup>[16]</sup>指出加纳米粒子放疗后 24 h, 使得常氧细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期缩短, G<sub>2</sub>/M 期增加, 细胞不再进行到分裂期, 这与我们常氧实验组细胞周期变化相同 (图 3a)。之后将测得的细胞周期进行定量分析 (图 3b), 发现将银纳米与辐照联合治疗时, 乏氧细胞周期变化与常氧类似, 但变化幅度较常氧细胞更大, 使得 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期明显缩短, G<sub>2</sub>/M 期显著增加。例如, 空白组细胞有 (4.960 ± 0.563)% 在 G<sub>2</sub>/M 期, 有 (65.400 ± 2.065)% 在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期; 单独银纳米粒子 (20 μg/mL) 治疗后的乏氧细胞, G<sub>2</sub>/M 期增加到 (16.270 ± 1.289)%; 当银纳米与

辐照联合治疗时,乏氧细胞 G<sub>2</sub>/M 期增加到 (20.410±2.106)%, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期减少到 (44.230±1.563)%。这个结果表明银纳米粒子与辐照同时治疗乏氧细胞,使得细胞周期通过 G<sub>1</sub> 期,并阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期。细胞周期的变化也说明银纳米粒子使得乏氧细胞放疗增敏可通

过调节细胞周期而达到。Lee 等<sup>[17-18]</sup>提到细胞周期阻滞在 G<sub>2</sub> 期,细胞则会对损伤的 DNA 进行修复,若修复失败,则发生凋亡。所以,从理论上细胞周期阻滞能够导致细胞凋亡,从而使得放射敏感性增加。



a: Cells were pretreated with AgNPs for 24 h before exposure to 0 or 6 Gy irradiation, and the fraction of cells in each phase of the cell cycle was analyzed using flow cytometry



b: Quantitative analysis of cell cycle distribution

图3 6 Gy 辐照后纳米银对有氧/乏氧 U251 细胞周期分布的影响

Fig.3 Cell cycle distribution in normoxic and hypoxic U251 cells incubated with AgNPs after 6 Gy irradiation

**3 结 论**

本研究选择人脑神经胶质细胞瘤 U251 细胞为研究对象,在常氧和乏氧下培养,研究乏氧情况下细胞的变化。在前人研究的基础上,本实验使用乏氧气体成功培养乏氧 U251 细胞,且将 U251 常氧/乏氧细胞与银纳米粒子共孵育,发现乏氧 U251 细胞对银

纳米的吸收存在时间效应,在孵育后的 8 h 内吸收速度较常氧细胞快,且最终进入细胞内的银纳米粒子比常氧细胞多,可见在乏氧条件下,对 30 nm 的银纳米吸收更好。进一步实验研究发现,银纳米粒子与辐照同时治疗乏氧细胞,使得 G<sub>2</sub>/M 期明显增加,即细胞周期通过 G<sub>1</sub> 期,并阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期,而 G<sub>2</sub>/M 期细胞相对于其余细胞周期的细胞对射线更敏感。故本结

果显示,银纳米与辐射的协同作用阻滞了细胞周期的进行,不利于细胞的增殖,从而间接增加了乏氧U251细胞的放射敏感性,也说明银纳米粒子与辐射协同作用使得乏氧细胞放疗增敏可通过调节细胞周期而达到,并为之后研究银纳米使得乏氧细胞放疗增敏及其增敏机制做铺垫,但之后银纳米对乏氧细胞放疗增敏效果还需通过更直接的实验做深入研究。总而言之,银纳米粒子对乏氧人神经胶质细胞瘤U251细胞的治疗具有潜在的临床价值,尤其是当银纳米与辐射协同治疗时,肿瘤治疗效果更佳,也为恶性脑胶质瘤的治疗开辟了新的方向,具有一定的应用前景。

### 【参考文献】

- [1] ZHAO D H, NAJBAUER J, GARCIA E, et al. Neural stem cell tropism to glioma: critical role of tumor hypoxia[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(12): 1819-1829.
- [2] LIU P D, HUANG Z H, CHEN Z W, et al. Silver nanoparticles: a novel radiation sensitizer for glioma? [J]. *Nanoscale*, 2013, 5(23): 11829-11836.
- [3] HU Y L, DELAY M, JAHANGIRI A, et al. Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(7): 1773-1783.
- [4] BACHE M, ZSCHORNAK M P, PASSIN S, et al. Increased betulinic acid induced cytotoxicity and radiosensitivity in glioma cells under hypoxic conditions[J]. *Radiat Oncol*, 2011, 6(1): 111.
- [5] HUANG Z H, JIANG X L, GUO D W, et al. Controllable synthesis and biomedical applications of silver nanomaterials[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2011, 11(11): 9395-9408.
- [6] KIM T H, KIM M, PARK H S, et al. Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles[J]. *J Biomed Mater Res*, 2012, 100(4): 1033-1043.
- [7] LIN J, HUANG Z H, WU H, et al. Inhibition of autophagy enhances the anticancer activity of silver nanoparticles [J]. *Autophagy*, 2014, 10(11): 2006-2020.
- [8] DING F G, LI Y P, LIU J, et al. Overendocytosis of gold nanoparticles increases autophagy and apoptosis in hypoxic human renal proximal tubular cells[J]. *Int J Nanomed*, 2014, 9(6): 4317-4330.
- [9] WU H, LIN J, LIU P D, et al. Is the autophagy a friend or foe in the silver nanoparticles associated radiotherapy for glioma? [J]. *Biomaterials*, 2015, 62: 47-57.
- [10] ZHAO F, ZHAO Y, LIU Y, et al. Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials [J]. *Small*, 2011, 7(10): 1322-1337.
- [11] 王季, 孙新臣, 徐睿智, 等. 关于银纳米颗粒增强脑胶质瘤细胞放射敏感性的研究[J]. *东南大学学报*, 2010, 29(4): 391-394.  
MA J, SUN X C, XU R Z, et al. Study of silver nanoparticles on the effect of enhancing radiosensitivity of glioma cells[J]. *Journal of Southeast University*, 2010, 29(4): 391-394.
- [12] VERONICA S L, VIRTUDES V L, ELENA A O, et al. High correlation between 2 flow cytometry platforms in the micro-particles analysis using a new calibrated beads strategy [J]. *Transl Res*, 2015, 166(6): 733-739.
- [13] YIP E C, WONG J T. Fluorescence activated cell-sorting of haemocytes in Penaeid prawns[J]. *Aquaculture*, 2002, 204(1-2): 25-31.
- [14] 金成, 吴红, 刘军叶, 等. 紫杉醇纳米粒对乏氧MCF-7细胞的辐射增敏作用[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2008, 28(1): 43-46.  
JIN C, WU H, LIU J Y, et al. Radiosensitization of paclitaxel-loaded nanoparticles on hypoxic MCF-7 cells[J]. *China Journal of Radiological Medicine and Protection*, 2008, 28(1): 43-46.
- [15] SU J K, LEE Y L, LEE E K, et al. Silver nanoparticles-mediated G<sub>2</sub>/M cycle arrest of renal epithelial cells is associated with NRF2-GSH signaling[J]. *Toxicol Lett*, 2012, 211(3): 334-341.
- [16] CHEN F, ZHANG X H, HU X D, et al. Enhancement of radiotherapy by ceria nanoparticles modified with neogambogic acid in breast cancer cells[J]. *Int J Nanomed*, 2015, 10: 4957-4969.
- [17] LEE Y S, KIM D W, LEE Y H, et al. Silver nanoparticles induce apoptosis and G<sub>2</sub>/M arrest via PKC $\zeta$ -dependent signaling in A549 lung cells[J]. *Arch Toxicol*, 2011, 85(12): 1529-1540.
- [18] 李贤, 周长忍, 赵名艳, 等. 壳寡糖通过降低线粒体膜电位促进A549细胞凋亡[J]. *功能材料*, 2011, 42(4): 635-638.  
LI X, ZHOU C R, ZHAO M Y, et al. Chitooligosaccharides induces apoptosis of A549 cells through decline of mitochondrial membrane potential[J]. *Function Materials*, 2011, 42(4): 635-638.

(编辑:陈丽霞)