

纳米二氧化硅体内与体外氧化应激及细胞毒性实验研究

史宏博¹, 王 尊¹, 于宏升², 刘 魁¹, 岳 霞¹, 郑茹茹¹, 邹宝波¹, 赵进顺^{1*}

(1. 宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波大学 医学院附属医院, 浙江 宁波 315020)

摘要: 研究了纳米二氧化硅(SiO_2)体内及体外氧化应激损伤及细胞毒性作用及机制. 体内实验采用 ICR 小鼠, 纳米 SiO_2 经口灌胃染毒 3 次, 检测肺组织中 MDA(丙二醛)和 SOD(超氧化物歧化酶)含量, 观察纳米 SiO_2 对小鼠肺的氧化应激毒性. 采用体外培养的小鼠上皮细胞(JB6 细胞), 观察不同质量浓度纳米 SiO_2 染毒后的细胞形态改变, 通过蛋白免疫印迹实验检测纳米 SiO_2 是否通过 FAS 信号途径引起细胞凋亡. 研究结果表明: 纳米 SiO_2 经口染毒后对小鼠肺具有氧化应激损伤作用, 表现为随染毒剂量的升高, 肺组织中 MDA 产生量增加, 呈一定的剂量-反应关系. 同时, 肺组织内 SOD 水平总体趋势降低, 但是差别未见统计学意义. 体外培养细胞实验中, 纳米 SiO_2 染毒后可引起细胞出现凋亡并呈空泡样变. 蛋白免疫印迹实验中, 纳米 SiO_2 可引起 FAS 信号蛋白表达量明显上升, 但是 FADD 表达水平并不升高.

关键词: 纳米二氧化硅; 小鼠; JB6 细胞; 氧化应激; 细胞凋亡; FAS

中图分类号: R318

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2013) 01-0127-06

纳米二氧化硅(SiO_2)是一种重要的高科技超微细无机新材料, 其粒径小, 比表面积大, 表面吸附力强, 化学纯度高、分散性能好、热阻、电阻等方面具有独特的性能, 在许多学科及很多领域都有着不可替代的作用. 纳米 SiO_2 可以作为添加剂、催化剂载体、石油化工脱色和消光剂、橡胶补强剂、塑料充填剂、油墨增稠剂、金属软性磨光剂、绝缘绝热填充剂、高级日用化妆品填料等, 也可以应用于喷涂材料、医药、环保等. 纳米 SiO_2 是应用较早的纳米材料之一. 纳米 SiO_2 无定型白色粉末, 是一种无毒、无味的非金属材料^[1-2].

近年来, 随着应用的广泛, 对纳米 SiO_2 的生物效应的研究也逐渐重视. 体外毒理学实验表明, 纳米 SiO_2 具有显著的细胞毒性^[2]. 纳米 SiO_2 通过呼吸系统进入机体可引起更为严重的炎症反应, 而这可能是由于体内 ROS(活性氧)的产生导致的^[3]. 纳米 SiO_2 对大鼠的收缩压、舒张压、血栓形成以及血小板聚集率有显著影响^[2]. 纳米 SiO_2 也能通过

血液循环系统分布全身各组织器官. 小鼠腹腔注射纳米 SiO_2 包被的磁性纳米颗粒, 4 周后, 可见脑、肝、心、肺、脾、肾、前列腺和子宫组织中有该颗粒存在^[4]. 研究不同纳米颗粒对胚胎的毒性时发现, 气管滴注纳米 SiO_2 颗粒后雌性大鼠妊娠率明显下降^[5]. 同时, 纳米 SiO_2 也可影响雄性大鼠生殖功能. 有资料显示, 纳米 SiO_2 通过诱导大鼠睾丸产生脂质过氧化作用, 破坏体内活性氧与抗氧化物质的动态平衡, 对生精功能造成损伤^[6]. 在对 Wistar 大鼠的研究中发现, 纳米 SiO_2 同样可诱导炎症刺激的发生. Park 等^[3,7]发现纳米 SiO_2 能够导致鼠源性巨噬细胞系发生氧化应激反应和促炎症反应. 纳米 SiO_2 对人胚肾细胞液具有毒性作用, 能够通过诱导细胞产生 ROS, 改变细胞内谷胱甘肽(GSH)的水平^[8]. 纳米 SiO_2 作用于 A549 细胞可破坏细胞膜的完整性, 促使乳酸脱氢酶(LDH)释放^[9]. 纳米 SiO_2 也可引起细胞周期异常. 有研究发现, 高质量浓度纳米 SiO_2 可导致细胞 DNA 氧化损伤. 线粒体

收稿日期: 2012-07-01.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://nbdxlg.paperopen.com/>

基金项目: 国家自然科学基金(81273111); 宁波市自然科学基金(2012A610185); 宁波大学新苗计划(2011R405035).

第一作者: 史宏博(1988—), 女, 内蒙古呼伦贝尔人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 职业与环境流行病学. E-mail: 583179597@qq.com

*通信作者: 赵进顺(1960—), 男, 山东海阳人, 教授, 主要研究方向: 预防医学、职业与环境医学. E-mail: zhaojinshun@nbu.edu.cn

是对外源性物质损伤最为敏感的细胞器之一,有研究显示,纳米 SiO_2 能够引起线粒体肿胀,线粒体膜损伤^[10]。此外,研究发现纳米 SiO_2 可诱导细胞凋亡^[11]。纳米 SiO_2 对红细胞也有一定的损伤作用,有研究采用20 nm与60 nm两种粒径的 SiO_2 和微米染毒,结果表明,在一定质量浓度范围内两种粒径纳米 SiO_2 引起红细胞溶血的程度均较微米强^[12]。

由于纳米 SiO_2 具有很强的吸附性,而漂浮在空气中的纳米 SiO_2 颗粒很可能通过各种途径(如食入、吸入等)进入人体,因而对人体健康造成一定的危害。

总之,纳米 SiO_2 目前的毒性研究已引起了广泛关注,经口染毒后纳米 SiO_2 对动物肺的氧化应激毒性研究尚未见报道,体外细胞毒性中细胞凋亡的确切信号通路目前也还不清楚。笔者主要针对纳米 SiO_2 经口染毒后产生的肺氧化应激毒性以及体外诱导小鼠上皮细胞凋亡的分子信号机制进行了研究。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

1.1.1 主要仪器

离心机(5415R型,德国Eppendorf公司)、分光光度计(722型,中国上海光谱)、 CO_2 培养箱(3111型,美国Thermo公司)、倒置显微镜(CKX41,日本Olympus公司)、净化工作台(SW-CJ-2FD型,苏州生化净化设备厂)、荧光显微镜及照相机(IX5,日本Olympus公司)、多功能酶标仪(ST-36型,中国上海智华医学精密仪器有限公司)、低温高速离心机(5415R型,德国Eppendorf公司)、蛋白免疫印迹电泳仪和转膜槽(170-3930型和170-3935型,美国Bio-rad公司)。

1.1.2 试剂配制

纳米 SiO_2 , 粒径10~20 nm; MDA试剂盒; PBS磷酸盐缓冲液: 称取NaCl 8.00 g, KCl 0.20 g, Na_2HPO_4 1.56 g, H_2PO_4 0.20 g, 加入双蒸水至1 L, 调节pH 7.2~7.4之间, 高压蒸汽灭菌后, 于4℃保存; 胰蛋白酶-EDTA溶液(Gibco); DMEM培养液(Gibco): 取1 L规格培养基粉末加双蒸水至900 mL, 再加入 NaHCO_3 3.70 g, 充分溶解, 调节pH 7.1~7.2之间, 将体积定容至1 L, 0.2 μm 微孔滤膜过滤; 小

牛血清(杭州四季青公司): 56℃灭活30 min, 分装待用; Hoechst染料(Invitrogen); YO-PRO-1(Probes); 荧光色素酶试剂盒(Progen), NP40裂解液和BCA试剂盒(碧云天), FAS抗体和FADD抗体(Santa-Cruz Biotechnology)。

1.2 实验动物和细胞

选用宁波大学实验动物中心提供的清洁级雄性ICR小鼠15只, 体重25 g左右。体外细胞实验采用稳定转染AP-1基因指示系统后的小鼠上皮JB6细胞(由美国国立职业安全与卫生研究院赠送), 取生长状态良好的对数生长期细胞进行实验。

1.3 染毒方法

1.3.1 动物实验

用无菌生理盐水将纳米 SiO_2 分别配置成质量浓度为15、30 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的颗粒悬浮液, 在121℃下高压灭菌30 min, 染毒前超声处理30 min。将15只小鼠随机分成3组, 每组5只。1组为生理盐水对照组, 另外2组为纳米 SiO_2 染毒组。采用灌胃法进行多次染毒。对照小鼠每次灌胃1 mL无菌生理盐水, 各染毒组分别注入相应浓度颗粒悬浮液1 mL, 染毒剂量分别为每只15、30 mg, 染毒时间均为2 $\text{d}\cdot\text{次}^{-1}$, 共3次。

1.3.2 细胞实验

用DMEM培养基, 将纳米 SiO_2 配成终质量浓度为1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的悬液。染毒前超声处理20 min, 使粒子分散均匀。实验中染毒剂量按照0, 1, 5, 10, 20, 15 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 设置。

1.4 组织匀浆制备

染毒结束后, 颈椎脱臼法处死小鼠, 立即提取肺组织, 分别在冰冷的生理盐水中漂洗, 以去掉表面的血迹, 滤纸拭干, 称重, 加入一定量预冷的生理盐水, 用玻璃匀浆器在0~4℃下制成浓度为10%的组织匀浆, 将匀浆以4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速离心15 min, 取上清备用。

1.5 实验方法

1.5.1 体内氧化应激实验

MDA(丙二醛)和SOD(超氧化物歧化酶)含量测定: 严格按照试剂盒操作规程进行。

1.5.2 细胞形态学观察

光镜观察: 将高压灭菌的盖玻片置于6孔培养板中, 调整细胞密度为 1.0×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 均匀接种

于6孔板, 37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h后, 以0.1%小牛血清的培养基饥饿过夜, 次日以1, 5, 10, 20和25 μg·cm⁻²的纳米SiO₂染毒细胞, 设完全培养液为阴性对照组, 24 h后终止培养, PBS(磷酸盐缓冲液)轻轻冲洗2次, 然后将细胞爬片放置于干净载玻片上, 显微镜下观察并拍摄光镜下的细胞形态照片。

荧光显微镜观察: 细胞接种及染毒处理同上。染毒24 h后, PBS洗2遍, 95%乙醇固定30 min, 取出细胞爬片, 加入Hoechst染料, 染色30 min; 加入质量浓度为0.1 mg·mL⁻¹的YO-PRO-1染液应用液, 室温染色2 min, PBS冲洗2次, 细胞爬片固定于灭菌后的载玻片上, 荧光显微镜下观察并拍摄荧光染色后细胞形态照片。

1.5.3 蛋白免疫印迹检测

采用聚丙烯酰胺电泳法检测不同质量浓度染毒后细胞中FAS蛋白以及FADD蛋白的表达含量, β-actin做为内参蛋白。细胞经过染毒24 h后, PBS冲洗2次, 采用NP40裂解液(加入蛋白酶抑制剂)冰上裂解, 用刮刀将细胞从瓶底刮下, 收集在裂解

液中, 冰上裂解40~60 min。以12 000 r·min⁻¹的转速4℃离心5 min, 取上清液。BCA法定量蛋白, 以每孔50 μg的蛋白作为上样量, 进行电泳。

1.6 结果分析

实验数据采用SAS 9.3.1分析, 两样本比较采用 t 检验, 多组比较采用方差分析。

2 结果与分析

2.1 小鼠肺组织中MDA检测结果

MDA是机体在清除自由基过程中发生脂质氧化的最终产物。结果显示: 随着纳米SiO₂质量浓度的增加, 肺内MDA含量增加, 检验水准 $\alpha=0.05$ 的水平下, 最高剂量组(30 mg·mL⁻¹)与对照组相比差别有统计学意义($P<0.05$)。从图1可看出, 随着纳米SiO₂染毒剂量的增加, 小鼠肺组织中的氧化应激损伤增大。

2.2 小鼠肺组织中SOD结果

SOD可清除氧化过程中产生的超氧负离子自由基。图2显示随着染毒剂量增加SOD水平降低, 不过差别无统计学意义($\alpha=0.05$, $P>0.05$)。

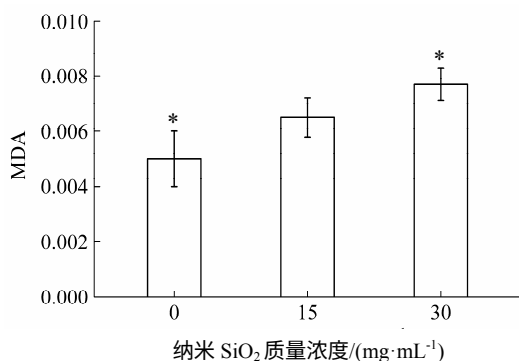


图1 不同质量浓度纳米SiO₂染毒后小鼠肺组织中MDA含量

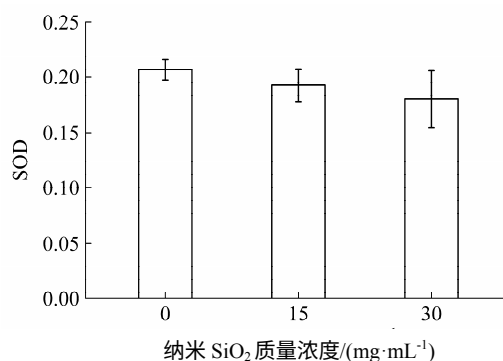


图2 不同质量浓度纳米SiO₂染毒后小鼠肺组织中SOD含量

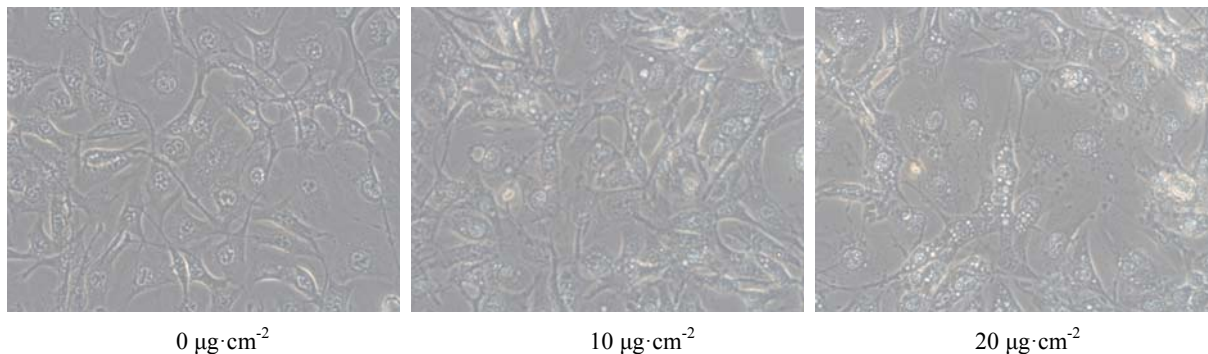


图3 纳米SiO₂染毒后JB6细胞光镜下的形态变化

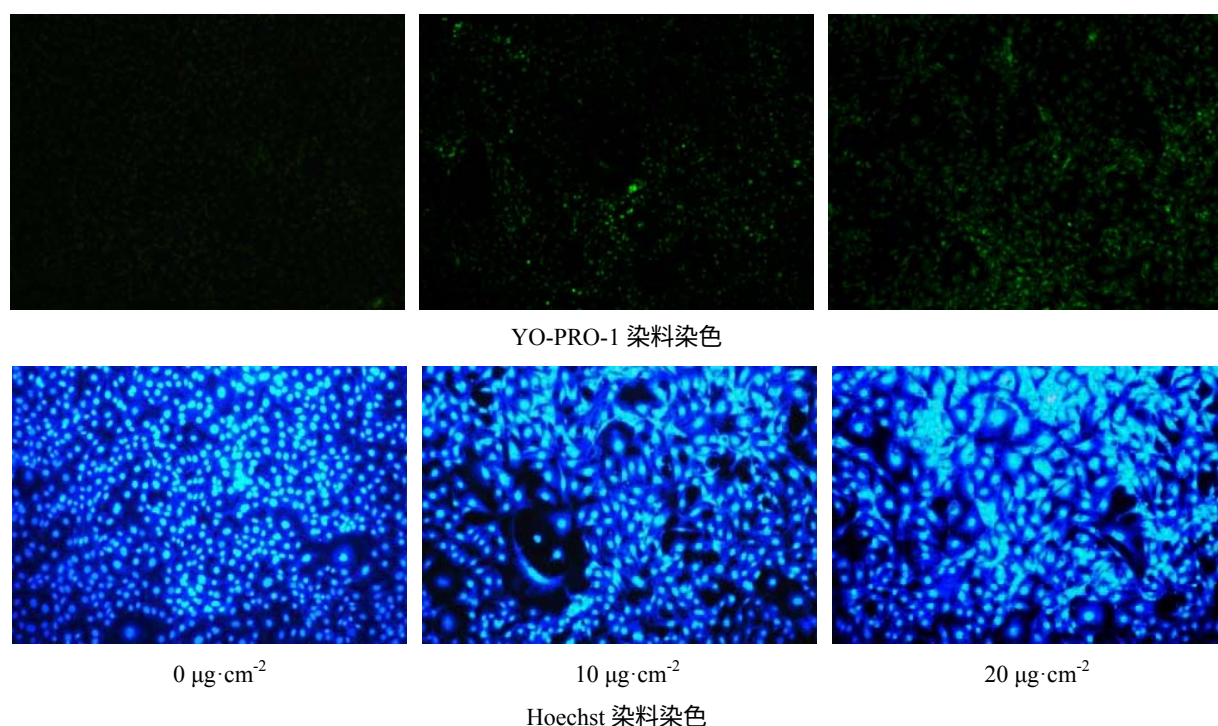


图4 纳米 SiO₂ 染毒后 JB6 细胞经过 YO-PRO-1 和 Hoechst 染料染色结果

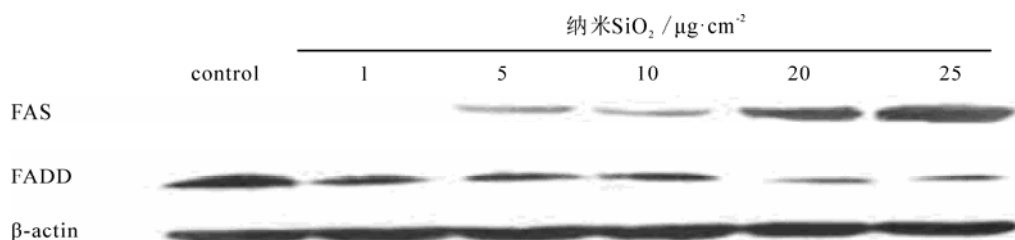


图5 JB6 细胞染毒后细胞凋亡信号蛋白免疫印迹实验结果

2.3 细胞形态学改变

通过光镜可以观察到正常细胞均匀生长且状态良好。随着纳米 SiO₂ 染毒剂量的升高, 胞浆内出现大量的空泡, 空泡形成对细胞生长造成了严重的损害(图 3)。

YO-PRO-1 与 DNA 结合发绿色荧光, 该染料不能透过完整的细胞膜和核膜, 但是在凋亡或坏死细胞中, 由于细胞膜和核膜通透性改变或破坏, YO-PRO-1 可以透过细胞膜和核膜与 DNA 结合, 呈现绿色或黄绿色均匀的荧光。从实验结果(图 4)可以看出, 随着纳米 SiO₂ 染毒质量浓度的增高, 凋亡细胞比例增大, 呈剂量-反应关系, 说明纳米 SiO₂ 可以诱导细胞凋亡。Hoechst 是一种可以穿透细胞膜与 DNA 结合显示蓝色的荧光染料。经过

Hoechst 染料染色后显示, 纳米 SiO₂ 染毒后的细胞核出现了固缩。

2.4 蛋白免疫印迹检测

蛋白免疫印迹实验(图 5)表明, 随着纳米 SiO₂ 染毒质量浓度的增高, FAS 表达量也随之上升, FADD 表达量下降。

3 讨论

MDA 是机体在清除自由基过程中发生脂质过氧化的最终产物, 是反映机体组织细胞受损伤程度的指标。在纳米 SiO₂ 对小鼠器官的急性氧化损伤效应的研究中, 有研究表明纳米 SiO₂ 经尾静脉染毒后, 肝脏组织最容易发生氧化损伤, 其中不同剂量染毒 SiO₂ 的小鼠脏器组织中的 MDA 含量差

异显著^[13]。有研究显示, 大白鼠通过气管内滴入和全身吸入 2 种方式染毒纳米 SiO₂, 总蛋白、弹性蛋白酶和 MDA 水平都有显著升高^[14]。而采用气管滴注法将大鼠染毒纳米 SiO₂, 支气管肺泡灌洗液中 LDH 活力、MDA 质量浓度升高, 差别有统计学意义。因此, 通过支气管灌注法可以证明纳米 SiO₂ 对大鼠的肺组织可以造成毒性损伤, 引起炎症反应和氧化损伤^[15]。在本实验中, 随着纳米 SiO₂ 质量浓度增加, 对小鼠的肺细胞活性损伤越大。说明通过灌胃染毒纳米 SiO₂ 后, 对小鼠的肺组织损伤能力随着剂量增高而增大。SOD 是生物体内抗氧化作用的主要酶之一, 能够清除氧化过程中产生的超氧负离子自由基, 如果 SOD 活性下降, 超氧负离子自由基就不能正常清除, 就会对组织中细胞的细胞膜产生脂质过氧化作用从而损坏细胞, 进而导致纳米 SiO₂ 对组织正常生理功能的破坏。结果表明, 随着纳米 SiO₂ 尾静脉染毒的质量浓度增加, SOD 水平有所下降, 但并没有体现显著差异。

在纳米粒子诱导的细胞毒作用及其机制的影响的研究中, 有报道纳米 SiO₂ 粒子染毒后的细胞中也观察到细胞内 ROS 水平增加和 GSH 含量减少。流式细胞仪分析表明, 纳米 SiO₂ 可以引起的 G2/M 期阻滞, 延长细胞的亚 G1 期, 并且呈剂量依赖性^[8]。本研究中, 通过普通光镜下我们可以看到高剂量染毒纳米 SiO₂ 后胞浆内出现了空泡样变, 与正常细胞相比出现了明显的形态学改变, 同时, YO-PRO-1 染色中也证明了高剂量组的凋亡细胞数量比对照组明显增多。说明纳米 SiO₂ 可以诱导细胞凋亡。凋亡主要有 3 种途径: 线粒体途径、死亡受体途径以及近年来发现的内质网途径。死亡受体途径主要通过一系列死亡受体的激活, 典型的比如 FAS/CD95, 一旦细胞凋亡信号被激活, CD95 通过与其特异性配体 CD95L(FASL)结合而在细胞膜表面发生聚合, 引起调节蛋白 FADD 的活性恢复, 活化 Caspase8 酶, 引起其酶级联反应^[16]。有人报道, 在纳米 SiO₂ 对 L-02 细胞体外毒性试验中, 纳米 SiO₂ 引起的细胞毒性是与粒径、时间和剂量呈依赖一反应, 纳米 SiO₂ 可以引起氧化应激并诱导细胞凋亡, 诱导 p53 和 Bax 表达上升, 从而诱导 L-02 细胞凋亡^[17]。本研究结果表明, 纳米 SiO₂ 可以显著激活 FAS 信号蛋白, FADD 蛋白表达量的

下降则很可能是其被磷酸化, 也有可能是被剪切为活性更强的活化片段。因此, 纳米 SiO₂ 通过死亡受体通路引起细胞凋亡的详细机制仍需要进一步研究。

总之, 本研究结果表明纳米 SiO₂ 经口染毒后可以引起小鼠肺氧化应激损伤, 体外细胞培养中纳米 SiO₂ 有诱导细胞凋亡作用, 与细胞凋亡有关的 FAS 信号蛋白被显著激活, FADD 的下降是否被磷酸化还是被剪切为活性更强的片段, 还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李曦, 刘连利, 王莉莉. 纳米二氧化硅的研究现状与进展[J]. 渤海大学学报, 2006, 27(4):304-308.
- [2] 张一平. 纳米材料安全性与纳米二氧化硅毒性研究进展[J]. 浙江教育学院学报, 2009, 4:85-90.
- [3] Park E J, Park K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro[J]. Toxicology Letters, 2009, 184(1):18-25.
- [4] Kim J S, Yoon T J, Yu K N, et al. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice[J]. Toxicological Sciences, 2006, 89:338-347.
- [5] 赵翠霞, 金一和, 张颖花, 等. 纳米级与微米级二氧化硅粉尘对小鼠胚胎毒性的比较研究[J]. 卫生研究, 2007, 36(4):414-416.
- [6] 林本成, 裘著革, 张英鸽, 等. 应用流式细胞分析技术研究微纳尺度 SiO₂ 对雄性大鼠睾丸生精细胞的毒性作用[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(3):322-326.
- [7] Park E J, Choi J, Park Y K, et al. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells [J]. Toxicology, 2008, 245(1):90-100.
- [8] Wang F, Gao F, Lan M, et al. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells[J]. Toxicology in Vitro, 2009, 23(5):808-815.
- [9] Lin W, Huang Y, Zhou X D, et al. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2006, 217(3): 252-259.
- [10] Lebkova N, Baranov V. Intracellular changes in rat hepatocytes after intratracheal administration of highly dispersed silicon dioxide and uridine effects on these changes[J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2006, 141(5):653-656.
- [11] Yang X, Liu J, He H, et al. SiO₂ nanoparticles induce

- cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells[J]. Part Fibre Toxicol, 2010, 7(1):1.
- [12] 吴秋云, 杨红, 唐萌, 等. 纳米氧化硅对红细胞的毒性作用[J]. 环境与职业医学, 2009, 26(1):53-56.
- [13] 杨莎莎, 林匡飞, 张卫, 等. 多尺度纳米 SiO_2 对小鼠肝、肾和脾的急性氧化损伤[J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2009, 35(6):834-838.
- [14] Prasad P, Lall S B, Lall S, et al. Effect of intra-tracheal instillation and inhalation of silicon dioxide on some biochemical variables in broncho-alveolar lavage fluid and lung histopathology in rats[J]. Drug and Chemical Toxicology, 2000, 23(3):459-475.
- [15] 马力, 裘著革, 张英鸽, 等. 三种典型纳米材料非暴露式气管滴注染毒对大鼠肺的毒性效应[J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(10):847-850.
- [16] Ashkenazi A D V. Death receptors: Signaling and modulation[J]. Science, 1998, 281(28):1305-1308.
- [17] Ye Y, Liu J, Xu J, et al. Nano- SiO_2 induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line[J]. Toxicology in Vitro, 2010, 24(3):751-758.

In Vitro and in Vivo Oxidative Stress and Cytotoxicity Induced by Nano-silica

SHI Hong-bo¹, WANG Zun¹, YU Hong-sheng², LIU Kui¹, YUE Xia¹, ZHENG Ru-ru¹,
ZOU Bao-bo¹, ZHAO Jin-shun^{1*}

(1. Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Affiliated Hospital of Medical College of Ningbo University, Ningbo University, Ningbo 315020, China)

Abstract: To elucidate the mechanisms of nano-silica induced cytotoxicity and oxidative stress in vivo and in vitro. ICR mice were contaminated using nano-silica three times by oral gavage. The level of MDA (malondialdehyde) and SOD (superoxide dismutase) in the lung tissue were detected as in vivo toxicity endpoints for nano-silica induced oxidative stress. In vitro, mouse epithelial cells (JB6 cells) were cultured, and observed for morphologic changes after treatment with different concentrations of nano-silica. Induction of apoptosis by nano-silica via the FAS signaling pathway was examined by western-blot assay. The result shows that nano-silica induced oxidative stress in mice after oral exposure which is indicated by a significant increase of MDA in lung tissue in a dose-response manner. The SOD levels in lung tissue were decreased. Nano-silica caused oxidative damage in JB6 cells exposed to certain dose ranges. Cell apoptosis were also observed in cells stained with YO-PRO-1 dye. Western blot shows a significant increase in the expression of FAS signaling protein induced by nano-silica. However the level of FADD expression was decreased.

Key words: nano-silica; mice; JB6 cells; oxidative stress; cell apoptosis; FAS

(责任编辑 史小丽)