不同粒径二氧化硅对人永生化表皮细胞 抗氧化酶基因 mRNA 表达水平的影响

洪文旭,杨细飞,张兵,龚春梅,庄志雄,刘建军

(深圳市疾病预防控制中心/深圳市现代毒理学重点实验室,广东 深圳 518055)

摘要:目的 探讨经不同粒径二氧化硅染毒人永生化表皮(HaCaT)细胞后,细胞内氧化应激相关的过氧化氢 酶(CAT)、谷胱甘肽还原酶(GSR)和超氧化物歧化酶(SOD-4)的mRNA表达水平的变化。方法 对数生长期的 HaCaT细胞分别经不同浓度(5,10,15 mg/L)、不同直径(15、30、100nm)二氧化硅粉尘处理24h后,采用实时 荧光定量 PCR(RT-Q-PCR)检测CAT、GSR和SOD-4基因mRNA的表达水平。结果 与对照组相比,各粒径二氧化 硅染毒均能诱导 HaCaT细胞CAT、GSR和SOD-4基因的mRNA表达水平发生明显变化。其中,CAT的mRNA表达水 平在15 nm组和30 nm组随染毒浓度的增加明显下降;GSR的mRNA表达水平在各颗粒组中均随二氧化硅颗粒浓度的 增加呈现明显的下降趋势;SOD-4的mRNA表达水平随二氧化硅颗粒浓度的增加呈现波动趋势。结论 在一定剂量范 围内,不同粒径二氧化硅染毒可以诱导细胞内CAT、GSR和SOD-4基因mRNA表达水平改变,推测这些改变可能参 与二氧化硅的细胞毒性反应。

关键词:二氧化硅;细胞毒性;氧化应激;mRNA;纳米材料

中图分类号: R994 文献标识码: A 文章编号: 1002 - 221X(2012)03 - 0168 - 04

Effects of silicon dioxide dusts with different diameters on mRNA expression of antioxidant enzymes in HaCaT cells HONG Wen-xu, YANG Xi-fei, ZHANG Bing, GONG Chun-mei, ZHUANG Zhi-xiong, LIU Jian-jun

(Key Laboratory of Modern Toxicology of Shenzhen, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, 518055, China)

Abstract: Objective To explore the effect of different diameters SiO_2 particles on the mRNA expressions of three oxidationstress-related enzymes including catalase (CAT), glutathione reductase (GSR) and superoxide dismutase-1 (SOD-1) in HaCaT cells. **Methods** HaCaT cells were treated with different diameters (15, 30 and 100 nm) and different concentrations (5, 10 and 15 mg/L) SiO₂ particles for 24h, respectively, and the mRNA levels of CAT, GSR and SOD-1 were analyzed with RT-Q-PCR. **Results** The results showed that the mRNA levels of CAT and GSR were significantly down-regulated with the SiO₂ exposure, but the SOD-1 expression only showed some fluctuation. **Conclusion** The data indicated that the exposure of different diameter SiO₂ can induce the alternations of mRNA expression of some antioxidant enzymes, which may involve in the cyto-toxicity of SiO₂ particles on HaCaT cells.

Key words: silicon dioxide; cytotoxicity; oxidative stress; mRNA; nanomaterial

二氧化硅被国际癌症中心归类为确定的人类致癌物,是一种高毒性的颗粒材料。纳米二氧化硅(nm-SiO₂) 是纳米材料中的重要一员,是目前世界上产量最高的一种纳米粉体材料^[1]。目前认为,颗粒粒径是评价纳米颗粒生物学作用的重要参数之一,而氧化应激是纳米材料毒性效应的主要机制^[2]。本研究拟以人永生化表皮细胞(HaCaT)为模型进行体外研究,观察不同粒径二氧化硅对染毒 HaCaT 细胞内氧化应激相关过氧化氢酶(CAT)^[3]、谷胱甘肽还原酶

通讯作者: 刘建军, E-mail: bio-research@ hotmail. com。

(GSR)^[4] 和超氧化物歧化酶(SOD-1)^[5] 基因的 mRNA表达水平的变化,为深入了解二氧化硅的生物 学效应和生物安全性评估提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

主要有 HF safe-1200 A2 型生物安全柜,上海力 新仪器有限公司; 3111 型 CO₂ 恒温培养箱,美国 Thermo Forma 公司; GS-15R 台式冷冻离心机,美国 Beckman 公司; 5417R 型台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司; Mx4000 型实时荧光定量 PCR 仪,美 国 Shratagene 公司; 纯水仪,法国 Milliore 公司; 高 压灭菌器,日本 Hirayama 公司; 凝胶成像系统,英 国 UVI 公司; SM-F124 型颗粒制冰机,日本三洋 公司。

MEM 培养基,美国 Hyclone 公司;双抗(青霉

收稿日期:2011-10-18;修回日期:2012-03-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21102094); 广东省医学科 研基金资助项目 (B2011286); 深圳市重点实验室提升项目 (CXB201005260068A); 深圳市科技计划项目 (201102100)

作者简介:洪文旭(1977—),男,博士,副研究员,从事纳米 材料的细胞毒性机制研究。

素、链霉素)、胎牛血清(FBS)、非必需氨基酸、丙酮酸钠、胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司; 总 RNA 提取试剂盒、Trizol、SYBR Premix Ex Taq[™]逆转录试 剂盒均购自日本 TaKaRa 公司; 尿素(Urea)等其他 试剂均购自美国 Sigma 公司。

1.2 材料来源

不同粒径的二氧化硅溶液均购自杭州万景新纳米 材料有限公司,浓度为2%(m/V),标注的有效粒 径分别为15、30和100 nm;其中粒径为15、30 nm 的二氧化硅溶液为白色半透明溶液,100 nm 二氧化 硅溶液为乳白色溶液。用上述3种液体的溶剂将其配 置成2%(m/V)的储存液。

人永生化表皮细胞(HaCaT)购自中国典型培养物保藏中心(武汉大学保藏中心)。

1.3 方法

1.3.1 纳米材料表征鉴定 由国家纳米中心完成, 见表1。

表1 二氧化硅颗粒物理参数表征鉴定结果

标注粒径(nm)	晶型	检则粒径(nm)	化学纯度(%)	
15	无定型	13.0 ± 1.8	100.0	
30	无定型	20. 1 ± 3. 5 , 51. 3 ± 9. 2	50.5,49.5	
100	无定型	365. 1 ± 79. 5	100.0	

在化学纯度方面,粒径为15、30和100 nm的二 氧化硅化学纯度均高于99.9%,除了极少量钠元素 外,未检出任何重金属元素。粒径分布上,15 nm的 二氧化硅平均粒径为(13.0±1.8) nm的颗粒占 100%;30 nm的二氧化硅样品检测到两个尺寸范围 的颗粒分布,其中,平均粒径为(20.1±3.5) nm 的颗粒占50.5%,平均粒径为(51.3±9.2) nm的 颗粒占49.5%;100 nm的二氧化硅样品平均粒径为 (365.1±79.5) nm,超出纳米颗粒尺寸范围(纳米 材料是指在三维空间上至少有一维尺寸处于0.1~ 100 nm 范围的物质)。

1.3.2 细胞培养及处理 HaCaT 细胞以添加 10% 胎 牛血清 (V/V)、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉 素的 MEM 为培养基,在 $37 \degree C \gtrsim 5\% CO_2$ 培养箱中培 养,待细胞长至 70% ~ 80% 融合度,随机分为 15、 30 和 100 nm 组,另设一未处理的正常对照组。用 MEM 基础培养基将不同粒径二氧化硅溶液稀释到预 处理的浓度,再对细胞进行染毒处理 24 h,终浓度由 高到低依次为 15、10 和 5 mg/L,对照组不做暴露 处理。

1.3.3 SOD-4、CAT 和 GSR 基因 mRNA 表达水平的 实时荧光定量 PCR (real time quantity polymerase chain reaction, RT-Q-PCR) 测定 将上述经不同粒 径二氧化硅染毒 HaCaT 细胞组及对照组,每组设3 个平行样本,采用 Trizol 试剂提取总 RNA,利用试剂 盒将其反转录成 cDNA。根据 Genebank 数据库 SOD-4、CAT、GSR 和 GAPDH 基因序列,用 Primer 5.0软件设计基因特异性引物并送至上海生工生物工 程有限公司合成,各引物的稀释浓度为 10 μmol/L。 各基因引物具体序列见表2。

表2 CAT、GSR、SOD-1 和 GAPDH 基因的引物序列

基因名称	引物类别	引物序列	产物序列(bp)
CAT	上游	5´-GCCAACTACCAGCGTGAC-3´	187
	下游	5´-ATGCCCGCACCTGAGTAA-3´	
GSR	上游	5´-TCCAAGTTGTGAGGGTAAAT-3´	276
	下游	5´-CCATCGCTGGTTATTCCT-3´	
SOD-4	上游	5´-GGTCCTCACTTTAATCCTCT-3´	217
	下游	5´-CTTCATTTCCACCTTTGC-3´	
GAPDH	上游	5´-CCACCACCCTGTTGCTGT-3´	163
	下游	5´-GGCATCCTGGGCTACACT-3´	

在对各目的基因进行相对定量之前,先梯度稀释 cDNA 模板进行标准曲线和溶解曲线分析,以确定荧 光定量 PCR 的最佳反应条件及反应体系,然后采用 比较阈值法(threshold cycles, Ct),以看家基因 GAPDH 为内参照,相对定量处理组样品内各目的基 因的表达水平。反应体系为 2 × SYBR Green QPCR master mix 12.5 µl, Forward primer (10 µmol/L) 0.5 μ l Reverse primer (10 μ mol/L) 0.5 μ l cDNA 1 μ l ddH₂O 10.5 μl, 总体积为 25 μl。扩增产物的反应程 序: 95 ℃预变性 30 s, 1 个循环; 95 ℃ 变性 10 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 共 40 个循环。每个 样品的 CAT、GSR、SOD-1 和 GAPDH 基因分管并于 相同条件下扩增,每次反应均设无模板对照(no template control, NTC),以排除 DNA 污染的可能。 反应结束后,以荧光定量 PCR 仪所附带的 Mx 4000 软件自动计算并分析结果。

1.3.4 Q-PCR 产物电泳验证 用含有溴化乙啶的 2% 琼脂凝胶检测 CAT、GSR、SOD-1 和 GAPDH 基因 的 PCR 扩增产物,通过凝胶成像系统进行灰度扫描。

1.4 统计学方法

实验数据均以x ± s 表示,采用 SPSS13.0 软件对 SOD-1、CAT 和 GSR 基因 mRNA 表达的相对量进行 单因素方差分析,组间比较选择 Dunnett 法,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 的纯度、标准曲线及溶解曲线分析

总 RNA 经紫外分光光度计测定其 OD260/OD280 的比值在 1.80~2.00 之间,说明制备的 RNA 较纯, 无蛋白质污染。琼脂糖凝胶电泳显示,28 S 和 18 S 条带清晰可见,并且 28S 条带亮度约为 18S 的 2 倍, 说明所提取的总 RNA 无明显降解,完整性良好。

通过标准曲线分析可知, GAPDH、CAT、GSR



和 SOD-4 基因的扩增效率均介于 90% ~110% 之间, 相关系数均大于 0.99,提示整个 PCR 扩增系统工作 良好,可以开展后续的相对定量分析。图 1 可见, GAPDH、CAT、GSR 和 SOD-4 基因扩增产物的溶解 曲线峰均为第一峰形,未见其他峰值,并且峰的形状 也较为锐利,提示各基因的溶解温度均一,扩增产物 特异性好,以此为基础进行定量是可靠的。



图 1 CAT、GSR、SOD-I 和 GAPDH 基因的溶解曲线分析

2.2 不同粒径二氧化硅染毒对 HaCaT 细胞过氧化氢 酶 (CAT) 基因 mRNA 表达水平的影响

RT-Q-PCR 结果显示(表3),与对照组相比,各 粒径组二氧化硅处理 HaCaT 细胞后 CAT 基因在 mRNA水平均出现明显下降,其中15 nm 组和30 nm 组随染毒浓度的增加呈现明显的下降趋势。而100 nm 组随浓度的增加呈现波动趋势。

> 表3 不同粒径二氧化硅染毒对 HaCaT 细胞 CAT 基因 mRNA 表达水平的影响 $(n=3, \bar{x} \pm s)$

粒径(nm)	0 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	15 mg/L
15	1.00 ± 0.00	0.83 ± 0.36	0.81 ± 0.24	$0.48 \pm 0.15^*$
30	1.00 ± 0.00	0.83 ± 0.32	$0.59 \pm 0.21^{*}$	$0.39 \pm 0.10^*$
100	1.00 ± 0.00	0.75 ± 0.32	0.82 ± 0.30	0.82 ± 0.30

注: 与对照组比较,*P < 0.05。

2.3 不同粒径二氧化硅染毒对 HaCaT 细胞谷胱甘肽 还原酶 (GSR) 基因 mRNA 表达水平的影响

表4可见,与对照组相比,不同粒径二氧化硅处 理 HaCaT 细胞后,细胞内 GSR 基因的 mRNA 表达水 平出现明显改变。其中,各纳米粒径组随染毒浓度的 增加均呈现明显的下降趋势,且各组在5 mg/L 和 10 mg/L 浓度时 mRNA 表达水平均较对照组升高,但是 在 15 mg/L 浓度时则较对照组下降。

表4 不同粒径二氧化硅染毒对 HaCaT 细胞 GSR 基因 mRNA 表达水平的影响 $(n = 3, \bar{x} \pm s)$

粒径(nm)	0 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	15 mg/L
15	1.00 ± 0.00	1.30 ± 0.31	1.15 ± 0.29	$0.82 \pm 0.32^*$
30	1.00 ± 0.00	$1.71 \pm 0.42^{*}$	1.18 ± 0.25	$0.86 \pm 0.29^*$
100	1.00 ± 0.00	1.40 ± 0.34	1.38 ± 0.22	0.85 ± 0.25

注: 与对照组比较,*P<0.05。

2.4 不同粒径二氧化硅染毒对 HaCaT 细胞超氧化物 歧化酶 (SOD-1) 基因 mRNA 表达水平的影响

表 5 可见,与对照组相比,不同粒径二氧化硅处 理 HaCaT 细胞后,细胞内 SOD-1 基因的 mRNA 表达 水平出现明显改变,其中,30 nm 组和 100 nm 组 SOD-1 表达水平明显低于对照组,而15 nm 组随二氧 化硅颗粒浓度的增加呈现波动的趋势。

表5 不同粒径二氧化硅染毒对 HaCaT 细胞 SOD-I 基因 mRNA 表达水平的影响 $(n=3, \bar{x} \pm s)$

粒径(nm)	0 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	15 mg/L
15	1.00 ± 0.00	0.81 ± 0.27	$1.44 \pm 0.49^*$	$0.67 \pm 0.21^*$
30	1.00 ± 0.00	$0.66 \pm 0.17^*$	$0.59 \pm 0.11^*$	$0.52 \pm 0.08^*$
100	1.00 ± 0.00	0.74 ± 0.16	0.85 ± 0.39	0.88 ± 0.14

注: 与对照组比较,*P<0.05。

2.5 CAT、SOD-I和 GSR 基因的 PCR 扩增产物电泳

验证

通过电泳图(图 2)可见,荧光定量 PCR 产物 的琼脂糖凝胶电泳鉴定结果显示,GAPDH、SOD-1、 CAT 和 GSR 的基因扩增片段依次在 163 bp(条带 1)、217 bp(条带 2,3)、187 bp(条带 4,5)和 276 bp(条带 6,7)的位置上,所有样品均在预期 的位置上出现相应的条带,并未见非特异性条带,说 明引物特异性合理。



注: Marker——100 bp 的 DNA 分子量标记; 1——GAPDH 基因 PCR 扩增 产物,163 bp; 2,3——SOD-I 基因 PCR 扩增产物,217 bp; 4,5——CAT 基因 PCR 扩增产物,187 bp; 6,7—GSR 基因 PCR 扩增产物,276 bp。

图 2 GAPDH、SOD-1、CAT 和 GSR 基因 Q-PCR 产物的凝胶电泳 3 讨论

HaCaT 细胞株是发生了自身转化的人类角质形成 永生细胞,是研究皮肤细胞毒性的理想模型^[6]。前 期研究发现,不同粒径二氧化硅对 HaCaT 细胞具有 明显的细胞毒性,且能诱导 HaCaT 细胞细胞周期、 周亡程度、总体蛋白和 DNA 的甲基化水平发生明显 改变^[7 8],其中,15、30和100 nm 二氧化硅致 HaCaT 细胞的半数抑制浓度(IC_{so}) 分别是 23.0、 27.3 和 34.8 mg/L^[7]。为了进一步探讨不同粒径二氧 化硅致 HaCaT 氧化应激反应相关的生物学效应,本 文又观察了不同浓度的 15、30 和 100 nm 二氧化硅颗 粒对 HaCaT 细胞内氧化应激相关的三个抗氧化酶 CAT、GSR 和 SOD-1 基因的 mRNA 水平的影响情况。 目前认为,活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的生成是纳米颗粒产生细胞毒性的主要原因之一^[2]; 而正常的组织细胞有自身抗氧化系统,它们能有效地 清除过多的 ROS 以保持细胞内环境稳定^[9],如 CAT 是过氧化物酶体的标志酶,约占过氧化物酶体酶总量 的40%,其作用是催化过氧化氢转化为水和氧气的 反应^[3]; GSR 是一种将氧化型谷胱甘肽还原成为硫 醇型谷胱甘肽的酶,而谷胱甘肽是一种重要的细胞抗 氧化剂^[4]; 含铜与锌超氧化物歧化酶(Cu-Zn SOD) 称为 SOD-1,是一种能够催化超氧化物通过歧化反应 转化为氧气和过氧化氢的酶^[5],它广泛存在于各类 动物、植物、微生物中,是组织细胞内主要的抗氧化 酶。CAT、GSR 和 SOD-1 是生物体内抗氧化体系的重 要组成部分,这些抗氧化酶的 mRNA 水平可以间接 反映细胞的氧化应激情况。

本实验结果发现,经不同浓度 15、30 和 100 nm 二氧化硅染毒,HaCaT 细胞内 CAT、GSR 和 SOD-1 基因的 mRNA 表达水平均出现明显改变,原因可能 是纳米材料自身结构的特征,使进入细胞内后能引起 细胞 ROS 水平变化,进而诱导抗氧化酶基因mRNA水 平发生改变。各种抗氧化酶变化规律的不同,提示可 能存在其他复杂的生物学效应(如毒物兴奋效应 等)^[10]。本实验结果提示,不同粒径、不同浓度的二 氧化硅颗粒染毒可以诱导 HaCaT 细胞抗氧化基因 mRNA 表达水平的改变,推测这些改变可能参与二氧 化硅颗粒的细胞毒性反应。

参考文献:

- Lin W , Huang Y , Zhou X , *et al.* In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol , 2006 , 217: 252.
- [2] Nei A , Xia T , Madler L , et al. Toxic potential of materials at the nanolevel [J]. Science , 2006 , 311: 622-627.
- [3] Murthy M R , Reid T J , Sicignano A , et al. Structure of beef liver catalase [J]. J Mol Biol , 1981 , 152: 465-499.
- [4] Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification [J].
 J Biol Chem , 1988 , 263 (33): 17205-17208
- [5] McCord J M , Fridovich I. Superoxide dismutase. An Enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein) [J]. J Biol Chem , 1969 , 244: 6049-6055.
- [6] Boukamp P , Petrussevska R T , Breitkreutz D , et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line [J]. J Cell Biol , 1988 , 106: 761–771.
- [7] Yang X , Liu J , He H , et al. SiO_2 nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells [J]. Part Fibre Toxicol , 2010 , 7: 1-12.
- [8] Gong C , Tao G , Yang L , et al. SiO₂ nanoparticles induce global genomic hypomethylation in HaCaT cells [J]. Biochem Biophys Res Commun , 2010 , 97: 397-400.
- [9] Mate J M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology [J]. Toxicology , 153: 83-104
- [10] Calabrese E J. Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment [J]. Hum Exp Toxicol, 2010, 29 (4): 249-261.