



SiO₂NPs 通过诱导氧化应激激活 Fas/FasL 通路促进 TM4 细胞凋亡*

王旭莹^{2,3)} 郭志义^{1,2,3)} 郝会宇¹⁾ 孙凡丽¹⁾ 张品正^{2,3)} 孟芳宇¹⁾陈紫云¹⁾ 李金泽¹⁾ 尚璇^{1)**}⁽¹⁾ 华北理工大学公共卫生学院, 唐山 063210; ⁽²⁾ 华北理工大学基础医学院, 唐山 063210;⁽³⁾ 河北省慢性疾病基础医学重点实验室, 唐山 063210)

摘要 目的 探讨纳米二氧化硅 (silicon dioxide nanoparticles, SiO₂NPs) 对小鼠睾丸支持细胞 (TM4) 的毒性作用及其分子机制。方法 将 TM4 细胞暴露于不同浓度的 SiO₂NPs (0、1、10、100 mg/L) 培养液 24 h, 处理结束后, 采用光学显微镜和 CCK-8 法检测小鼠睾丸支持细胞的形态和活性。利用荧光探针 DCFH-DA 检测细胞内活性氧 (ROS) 水平, MDA 和 SOD 试剂盒检测细胞内的丙二醛 (MDA) 含量和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性。利用 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒分析 TM4 细胞的凋亡水平, 免疫印迹法检测 Fas、FasL、Caspase-8、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 等细胞凋亡信号分子的蛋白质表达水平。结果 研究发现, SiO₂NPs 呈剂量依赖性地抑制 TM4 细胞增殖, 降低细胞存活率和数量, 并影响细胞的形态结构。此外, SiO₂NPs 诱导 TM4 细胞产生过量 ROS, 引起脂质过氧化产物 MDA 含量以及抗氧化酶 SOD 活性增加导致氧化应激。进一步研究显示, SiO₂NPs 显著增加 TM4 细胞凋亡水平, 并激活 Fas/FasL 死亡受体介导的细胞凋亡信号通路。有意思的是, 抗氧化剂 NAC 可以通过降低氧化应激水平有效缓解 SiO₂NPs 引起的 TM4 细胞损伤和细胞凋亡。结论 综上, SiO₂NPs 通过诱导氧化应激激活 Fas/FasL 信号通路促进 TM4 细胞凋亡。

关键词 纳米二氧化硅 (SiO₂NPs), 生殖毒性, TM4 细胞, 氧化应激, 细胞凋亡

中图分类号 Q7, R3

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0404

纳米材料是指至少在一个维度测量不到 100 nm, 并表现出结构特征与生物、物理和化学相关的无机材料。由于纳米材料的尺寸接近电子的相干长度和光的波长, 使得纳米材料表现出不同于其在宏观尺寸或整体状态时所展现的物理化学性质, 如导电、光学和磁性等。纳米材料独特的性质使其在工农业生产和生活等领域有着相当大的应用潜力^[1]。纳米硅 (silica nanoparticles, SiNPs) 作为全球生产最多、应用最广的纳米材料之一, 其优良的物理化学性质和高度可调的生物相容性使其被广泛应用于食品工业^[2]、美妆护肤和医疗领域, 如生物分析、医学成像、生物标记和药物靶向输送^[3-5]。研究表明, SiNPs 可以通过消化道、呼吸道、皮肤等多种途径进入机体, 并通过血液或淋巴循环系统到达潜在的敏感靶点。尽管每日暴露水平很低, 但 SiNPs 在体内的清除非常缓慢, 长期可导

致在组织累积。而且, 当材料的粒径达到纳米级时, 理论上可进入机体并穿过体内的生物屏障到达微米材料所不能到达的区域。因此, 原本无毒或低毒的材料当粒径达到纳米级时, 毒性显著增强^[4], 产生一系列致病作用^[6]。生殖系统担负着将遗传信息传递给后代的重要使命, 对外源性有害物质高度敏感。已有研究表明, 纳米二氧化硅在体内暴露会影响雄性生殖系统, 导致精子质量和数量下降^[7]。然而, 到目前为止, 人们对纳米材料在生

* 河北省自然科学基金 (C2021209004), 河北省高等学校科学研究基金 (JQN2020002), 河北省卫生科教卫健委基金 (20210049), 唐山市科技计划 (20130212b) 和华北理工大学大学生创新创业计划 (X2020085, X2021062) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0315-8805566, E-mail: shangx@ncst.edu.cn

收稿日期: 2021-12-28, 接受日期: 2022-02-17

殖系统的毒性作用机制尚不清楚。

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是一种高活性氧化自由基, 包括超氧阴离子 (O₂⁻)、过氧化氢 (H₂O₂)、过氧化基 (ROO⁻) 和羟基自由基 (OH⁻) 等^[8]。在生理条件下, 活性氧是细胞正常代谢的产物, 参与多种信号通路的调控^[9]。然而, 当细胞内的抗氧化剂清除系统被过量的ROS消耗, 导致氧化与抗氧化失衡, 此时细胞发生氧化应激^[10]。研究表明, 纳米颗粒诱导的过量ROS可以引发DNA损伤、炎症、蛋白质变性和脂质过氧化, 从而对细胞产生毒性作用。ROS的快速生成能激活肿瘤坏死因子受体超家族成员Fas受体^[11-14]。Fas受体与死亡配体FasL结合后发生三聚化, 进而被激活, 使得Fas与其下游接头蛋白FADD结合形成蛋白质复合物作用于凋亡启动蛋白酶 (Caspase-8), 并进一步激活凋亡执行蛋白酶 (Caspase-3, -6, -7), 从而使细胞发生凋亡过程的级联反应^[15]。据报道, 约20%~88%的男性不育症患者精液ROS水平显著升高^[16-18]。因此, 纳米材料对生殖系统的毒性作用被认为可能与其诱导的氧化应激相关。N-乙酰基-L半胱氨酸 (NAC) 是一种含有巯基 (-SH) 的还原性物质, 具有抗炎和抗氧化应激的药理效应, 被广泛应用于临床呼吸系统、消化系统和心血管系统等疾病的治疗^[19]。然而, NAC对纳米材料引起的氧化应激及生殖系统功能的影响尚不清楚。

据报道, SiO₂NPs可以突破生殖屏障, 分布在生精小管内的支持细胞和精母细胞中^[20]。小鼠睾丸支持细胞在靠近生精小管基底部分形成紧密连接复合体 (tight junctions, TJs), 将生精上皮分为基底小室 (basal compartment) 和近腔小室 (abluminal compartment), 各级生精细胞按照分化程度不同从基底小室向近腔小室依次有序排列。由于生精上皮内无毛细血管, 近腔小室的各级生精细胞无法直接从血液获取营养物质, 而是生活在支持细胞侧面胞质陷凹内, 通过细胞间缝隙从支持细胞中获得激素和营养物质^[21-22]。因此, 深入探究外界有害因素对睾丸支持细胞的影响, 对于更好地理解环境因素对男性生育力危害十分必要。TM4细胞来源于小鼠睾丸支持细胞, 对药物非常敏感, 可以间接反映环境毒物对精子发生的潜在毒性作用^[23]。本研究以TM4细胞作为模型探讨SiO₂NPs对小鼠睾丸支持细胞的毒性作用及其分子机制, 旨在从细胞和分子水平探讨纳米材料对雄性生育力的影响, 从而为避

免生殖毒性、扩大纳米材料应用范围提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

TM4专用培养基 (武汉普诺赛, CM-0456); 0.25%胰蛋白酶 (Hyclone, J2000-48); 纳米二氧化硅粉末 (纯度为99.5%, 分子粒径为5~20 nm, Sigma-Aldrich Chemical, 637246); 抗氧化剂NAC (碧云天, ST1546); CCK-8细胞增殖与活性检测试剂盒 (北京聚合美, MF128-1); ROS检测试剂盒 (碧云天, S0033S); 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测定试剂盒 (南京建成, A001-3); 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 测定试剂盒 (南京建成, A003-1); Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒 (美仑, MA0220); FasL抗体 (WL02999) 购自万类生物; Fas抗体 (AF5342)、Caspase-8抗体 (AF6442)、Caspase-3抗体 (AF6311)、Bax抗体 (AF0120)、Bcl-2抗体 (AF6139) 和β-Actin抗体 (AF7018) 均为Affinity公司产品; 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔IgG (A0208) 或山羊抗鼠IgG (A0216) 均购自碧云天公司; 超敏ECL化学发光检测试剂盒 (北京庄盟, ZD310A)。

1.2 方法

1.2.1 纳米二氧化硅电镜分析

透射电镜能够清晰地观察到纳米二氧化硅的形态和结构, 而且直接简便地测量纳米颗粒的大小。将购买的商品化纳米二氧化硅溶于TM4专用培养基后使用超声波清洗机 (新芝, SB4200D) 超声, 以使其分散均匀。在透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) (JEOL, JEM-2800) 下观察纳米二氧化硅的形态结构和粒径大小。

1.2.2 纳米二氧化硅的粒径分布及Zeta电位测定

将购买的商品化纳米二氧化硅用TM4专用培养基稀释为100 ng/L纳米二氧化硅悬液, 使用超声波清洗机超声, 以使其分散均匀。使用激光粒度仪/ZETA电位和纳米粒度分析仪 (Malvern, Mastersizer2000/Zetasizer Mano zs90) 检测纳米颗粒的粒径分布和Zeta电位。

1.2.3 细胞培养

小鼠睾丸支持细胞 TM4 购于武汉普诺赛公司, 常规培养于 TM4 细胞专用培养基中。细胞培养在 37°C、5% CO₂ 和饱和湿度条件下。每 2 d 根据细胞状态和密度进行换液或传代, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2.4 细胞增殖实验

将 TM4 细胞按密度为 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 置培养箱中培养 24 h, 待细胞贴壁后弃掉培养基, 依次以终浓度为 0、1、10、100 ng/L SiO₂NPs 培养液加入 96 孔板的各孔内, 每个浓度设置 3 个平行。继续培养 24 h 后, 弃掉培养基, 加入含有 CCK-8 的培养基 (10 μ l CCK-8 和 90 μ l 培养基), 培养箱内孵育 2 h, 然后每孔吸出 100 μ l 培养液至新的 96 孔板内, 在酶标仪上于 490 nm 处测定每孔的光密度值 A_{490} 。通过下列公式计算细胞存活率: 细胞存活率 = $[(\text{对照孔 } A_{490} - \text{实验孔 } A_{490}) / (\text{对照孔 } A_{490} - \text{空白孔 } A_{490})] \times 100\%$ 。实验重复 3 次取平均值。

1.2.5 活性氧测定

TM4 细胞处理同上, 在 SiO₂NPs 处理 24 h 后, 弃掉培养基, 加入含有终浓度 10 μ mol/L 的分子探针 2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (6-carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA), 培养箱内孵育 30 min。弃掉培养基, 用无血清培养基反复吹打并将细胞悬液转移至 1.5 ml 离心管中。用 PBS 清洗 2 次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。1 000 r/min 离心 5 min, 加入 100 μ l PBS 重悬细胞。在 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长的条件下, 使用荧光酶标仪 (BioTek Instruments Synergy™ Mx, 美国) 进行检测。实验结果以荧光值表示。

1.2.6 MDA 及 SOD 测定

TM4 细胞处理同上, 在 SiO₂NPs 处理 24 h 后, 弃掉培养基, 加入预冷的 PBS 反复吹打并将细胞悬液收集到 1.5 ml EP 管中。每管内加入 200 μ l PBS 重悬细胞, 在冰上用电动组织研磨器研磨 3~5 min。细胞悬液在 12 000 r/min 转速下离心 10 min, 将上清转移至新的 1.5 ml 离心管内作为蛋白质抽提液, 蛋白质浓度采用 BCA 法测定。细胞内 MDA 含量和 SOD 活性测定按试剂盒说明书进行。MDA 含量测定主要步骤如下: 取 100 μ l 待测样本加入到含有 100 μ l 试剂一、1.5 ml 试剂二应用液和 1.5 ml 试剂三应用液的 15 ml 离心管内, 95°C 水浴 40 min, 取

出流水冲洗冷却, 然后 3 500 r/min 转速下离心 10 min, 取 200 μ l 上清, 在酶标仪上于 532 nm 处测定每孔的光密度值 A_{532} 。SOD 活性测定主要步骤如下: 取 20 μ l 待测样本加入到含有 20 μ l 酶工作液和 200 μ l 底物应用液的 1.5 ml 离心管内, 37°C 温度孵育 20 min 后, 在酶标仪上于 455 nm 处测定每孔的光密度值 A_{455} 。通过下列公式计算 SOD 抑制率和活力: SOD 抑制率 = $[(\text{对照组 } A_{455} - \text{对照空白组 } A_{455}) - (\text{试验组 } A_{455} - \text{试验空白组 } A_{455})] / (\text{对照组 } A_{455} - \text{对照空白组 } A_{455}) \times 100\%$ 。SOD 活力 = SOD 抑制率 / 50% \times (反应体系 / 稀释倍数) / 待测样本蛋白质浓度。实验重复 3 次取平均值。

1.2.7 Annexin V /PI 凋亡测定

TM4 细胞处理同上, 在 SiO₂NPs 处理 24 h 后, 弃掉培养基, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化并将细胞转移至 1.5 ml 离心管内。用预冷的 PBS 清洗细胞 2 次, 1 000 r/min 转速下离心 5 min, 加入含有 5 μ l PI 和 5 μ l Annexin V-FITC 的 500 μ l 染色缓冲液重悬细胞, 室温避光孵育 15 min。使用 FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司) 在 488 nm 激发波长, 530 nm 发射波长条件下进行检测, 每组样本共收集 30 000 个细胞。数据使用 BD CELLQuest Pro 软件 (美国 BD 公司) 进行分析。试验结果分为 4 个部分: UL (左上), Annexin V 阴性而 PI 阳性的细胞群, 代表细胞碎片; UR (右上), Annexin V 和 PI 双阳性的细胞群, 代表晚期凋亡细胞; LL (左下), Annexin V 和 PI 双阴性的细胞群, 代表活细胞; LR (右下), Annexin V 阳性而 PI 阴性的细胞群, 代表早期凋亡细胞。

1.2.8 免疫印迹 (Western blot)

收集 TM4 细胞至 1.5 ml 离心管后, 预冷 PBS 洗涤 3 遍, 1 000 r/min 转速下离心 5 min。加入 200 μ l 含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 在冰上用电动组织研磨器研磨 3~5 min 后静置 30 min。细胞悬液在 12 000 r/min 转速下 4°C 离心 20 min, 转移上清至新的离心管内作为蛋白质抽提液。使用 BCA 法进行蛋白质浓度测定。在等量蛋白中 (20 μ g) 加入蛋白质上样缓冲液, 100°C 温度下煮沸 5 min 使蛋白质变性。变性后的蛋白质经 SDS-PAGE 电泳 (5% 浓缩胶, 10% 分离胶) 分离后, 湿转 90 min 至 PVDF 膜上。PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后, 在 4°C 条件下孵育一抗 (1 : 1 000) 过夜。用

PBST漂洗3次后,与山羊抗兔或抗鼠IgG二抗(1:10 000)室温孵育1 h。用PBST漂洗3次,每次10 min。配置ECL化学发光试剂,混匀后滴在PVDF膜上,使用化学发光成像系统(ChemiScope 6100 EXP)拍照。

1.2.9 统计学分析

使用SPSS 19.0软件,采用单因素方差分析和 t 检验等方法分析数据,计量资料以均数±标准差表示。实验至少重复3次, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

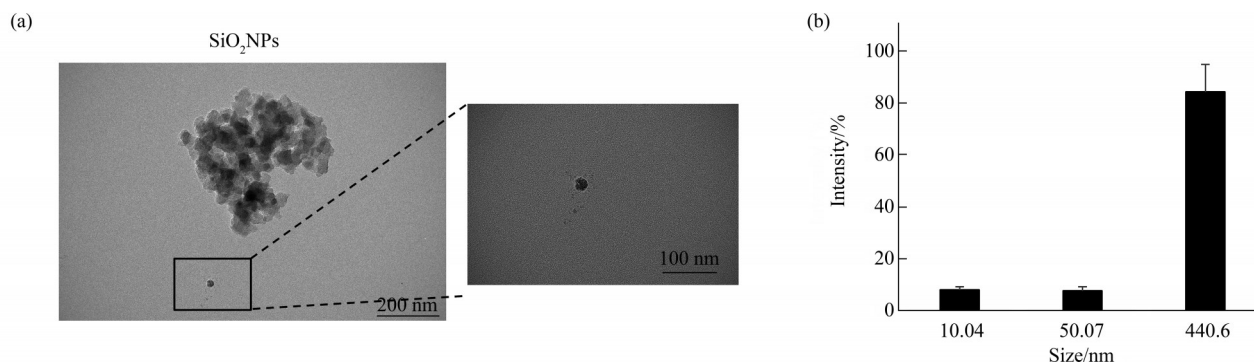


Fig. 1 The characterization of SiO₂NPs

(a) A transmission electron microscopy image of SiO₂NPs showed that the SiO₂NPs displayed spherical shapes and were prone to forming agglomerates. (b) The hydrodynamic size (pH=7.0) of SiO₂NPs in medium.

Table 1 Zeta potential (pH=7.0) of SiO₂NPs in medium

Run	Zeta potential /mV	Zeta deviation /mV	Conductivity /(mS·cm ⁻¹)
1	-27.3	8.57	2.38
2	-24.9	8.68	3.72
3	-25	8.81	3.96
Average	-25.7	-	-
SD	1.35	-	-

2.2 SiO₂NPs显著抑制TM4细胞的生长和增殖

光学显微镜下(40×)可见,对照组TM4细胞呈上皮样贴壁状况良好,形态呈梭形或多角形,细胞核明显。而在SiO₂NPs(1、10、100 mg/L)处理24 h后,TM4细胞数量下降,胞体变小、变圆,细胞间连接结构显著减少,在100 mg/L组可见少量细胞碎片(图2a)。为进一步明确SiO₂NPs对TM4细胞活性的影响,利用CCK-8法测定不同浓

2 结 果

2.1 SiO₂NPs的分子表征

利用TEM观察可见,纳米二氧化硅单粒形态呈球形,分子粒径约10 nm,但易聚集成团(图1a)。进一步利用Zetasizer仪器分析了纳米二氧化硅在细胞培养基中的分散性和Zeta电位,结果表明纳米二氧化硅的粒径分布包括10.04、50.07和439.6 nm(图1b),Zeta电位平均值为-25.7 mV(表1),提示纳米二氧化硅在细胞培养基中稳定性较差,易发生聚集。

度SiO₂NPs处理后TM4细胞的存活率。如图2b所示,1、10和100 mg/L SiO₂NPs处理对TM4细胞存活率的抑制作用与对照组相比均有显著差异($P<0.05$),分别下降至84.8%、88.5%和61.4%。结果表明,随处理剂量的增加, SiO₂NPs可明显抑制TM4细胞的生长和增殖,并造成细胞结构损伤。

2.3 SiO₂NPs诱导TM4细胞发生氧化应激

为研究纳米二氧化硅影响TM4细胞活性的作用机制,利用反映氧化应激状态的标志分子(ROS、MDA和SOD)试剂盒检测了SiO₂NPs暴露24 h后TM4细胞中的氧化应激水平。如图3所示,随着SiO₂NPs处理剂量的增加, TM4细胞中ROS和MDA含量以及SOD活性显著升高。这些结果表明,纳米二氧化硅可以诱导ROS产生,使TM4细胞内氧化还原系统失衡,进而引起氧化应激。

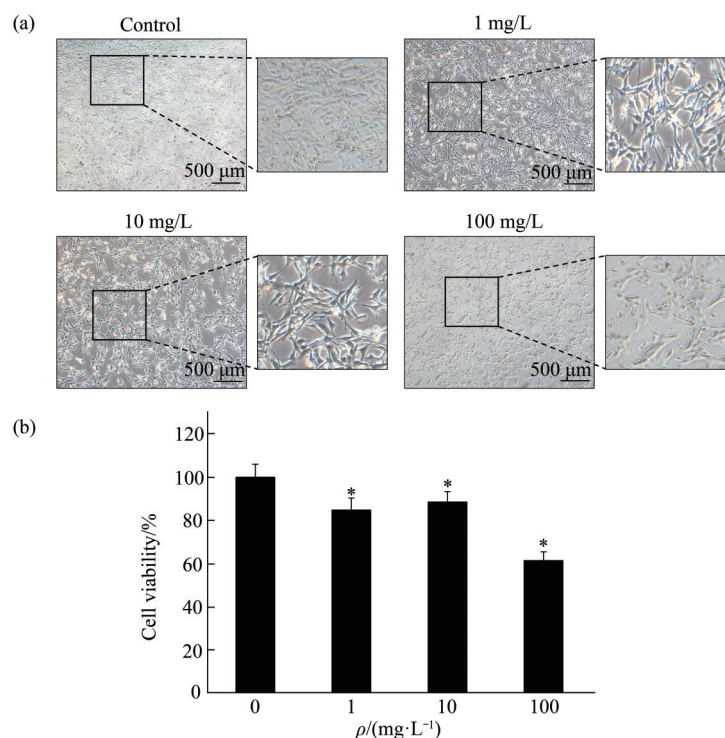


Fig. 2 Cytotoxicity induced by SiO₂NPs on TM4 cells

(a) Morphology changes of TM4 cells after exposure to SiO₂NPs with various concentrations for 24 h. (b) Dose-dependent cell viability decline in TM4 cells measured by CCK-8 assay after 24 h exposure of SiO₂NPs. **P*<0.05 compared to control group.

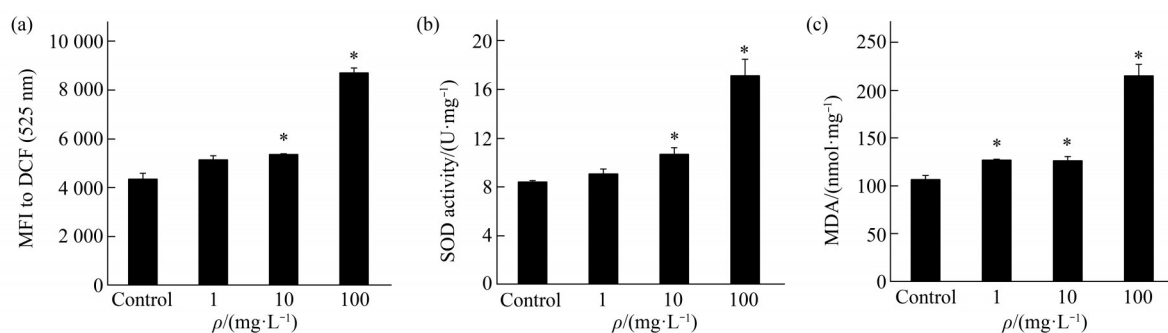


Fig. 3 Oxidative stress induced by SiO₂NPs in TM4 cells

(a) The intracellular levels of ROS were significantly increased in a dose-dependent manner, and so was the activity of SOD (b) and production of MDA(c) increased after exposure to various concentrations of SiO₂NPs for 24 h. **P*<0.05 compared to control.

2.4 SiO₂NPs激活TM4细胞内Fas/FasL介导的凋亡信号通路

过度氧化应激可以引发细胞凋亡。利用 Annexin V-FITC 和 PI 对不同浓度 SiO₂NPs 处理的 TM4 细胞进行染色后, 通过流式细胞仪分析。结果表明, SiO₂NPs 可以显著增加凋亡细胞的比例, 表现为剂量依赖性 (图 4a, b)。此外, 利用

Western blot 检测 Fas/FasL 介导的凋亡信号通路相关分子在不同处理组 TM4 细胞的蛋白质表达情况, 结果显示, SiO₂NPs 处理显著上调 Fas/FasL 调控的促凋亡相关分子蛋白质表达水平 (Fas、FasL、Caspase-8、Caspase-3 和 Bax), 并降低抗凋亡分子 Bcl-2 蛋白水平 (图 4c, d)。

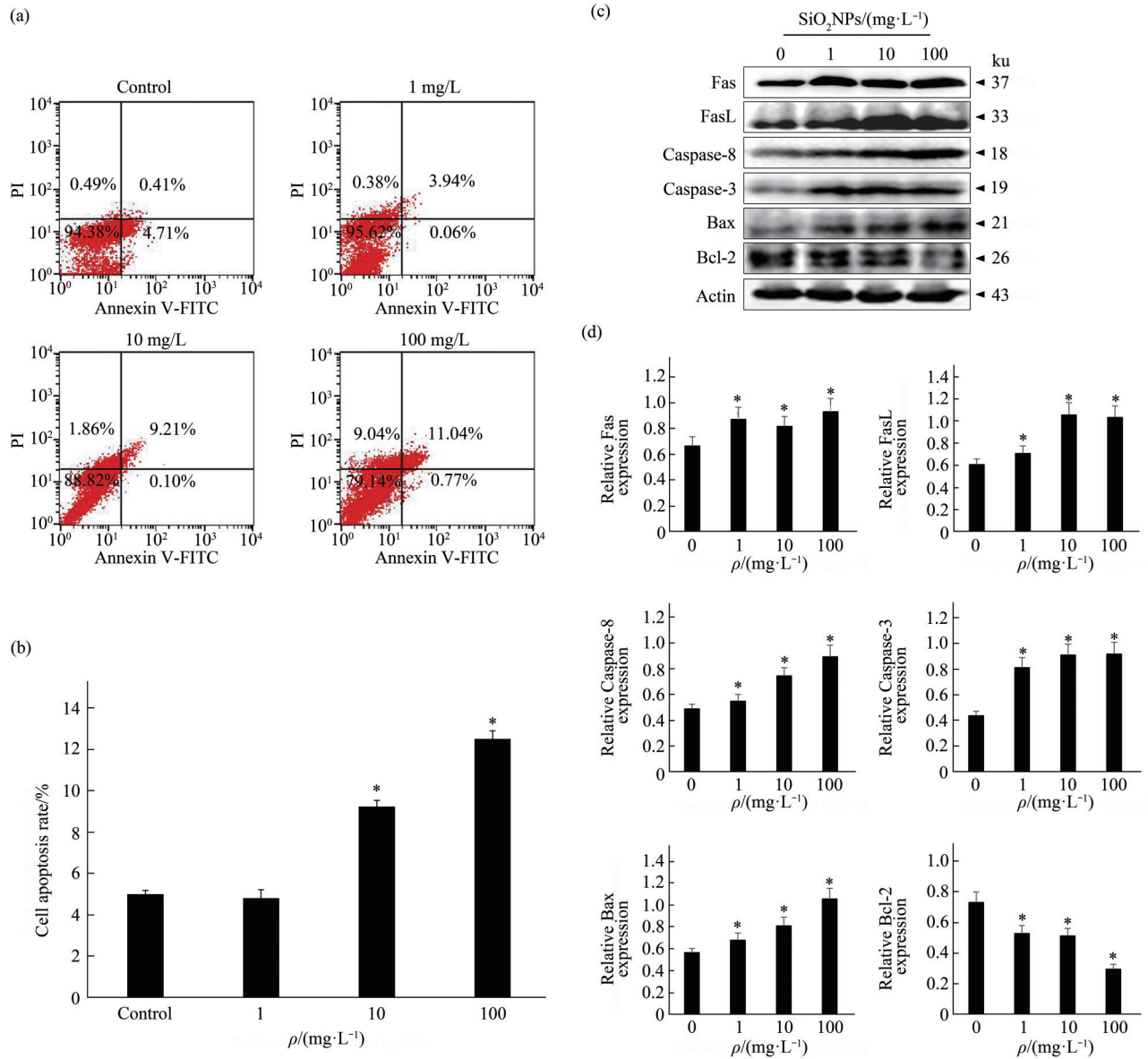


Fig. 4 Effects of SiO₂NPs on cell apoptosis in TM4 cells

(a, b) Apoptosis rates of TM4 cells were significantly increased in a dose-dependent manner after treated with SiO₂NPs for 24 h. (c) The expressions of Fas, FasL, Bax, Bcl-2, Caspase-8 and Caspase-3 in TM4 cells. (d) Densitometric analysis about those protein bands, actin was internal control protein. **P*<0.05 compared to control.

2.5 抗氧化剂NAC缓解SiO₂NPs诱导的细胞内氧化应激水平

为进一步明确氧化应激与SiO₂NPs引起的细胞毒性的关系, 利用抗氧化剂NAC与100 mg/L SiO₂NPs联合处理TM4细胞。结果表明, NAC可以有效抑制SiO₂NPs引起的氧化应激, 表现为ROS和MDA含量以及SOD活性的下降(图5)。

2.6 抗氧化剂缓解SiO₂NPs诱导的细胞损伤和细胞凋亡

光学显微镜下可见, 抗氧化剂NAC和100 mg/L SiO₂NPs联合处理组与单一处理100 mg/L SiO₂NPs组相比, 细胞数量和细胞间连接结构显著增多, 细胞形态恢复上皮样结构(图6a)。进一步研究发现, NAC和SiO₂NPs联合处理可以显著缓解SiO₂NPs诱导的细胞凋亡(图6b, c)。

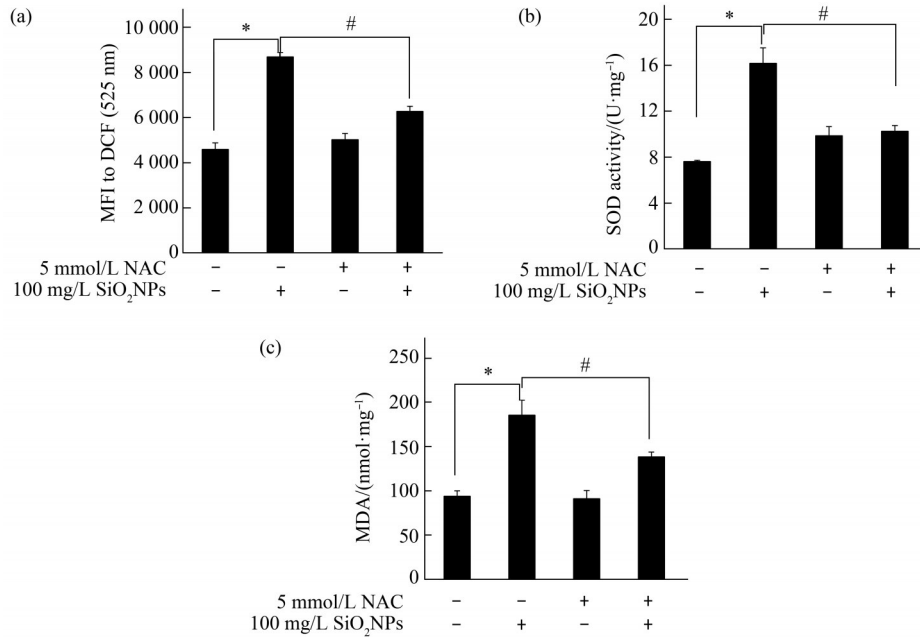


Fig. 5 Oxidative stress induced by SiO₂NPs can be alleviated by NAC

(a) Inhibition of NAC on SiO₂NPs-induced production of ROS in TM4 cells. (b) NAC abolished the increased activity of SOD and content of MDA (c) caused by SiO₂NPs in TM4 cells. **P*<0.05 compared to the control group, #*P*<0.05 compared to the 100 mg/L SiO₂NPs treated group.

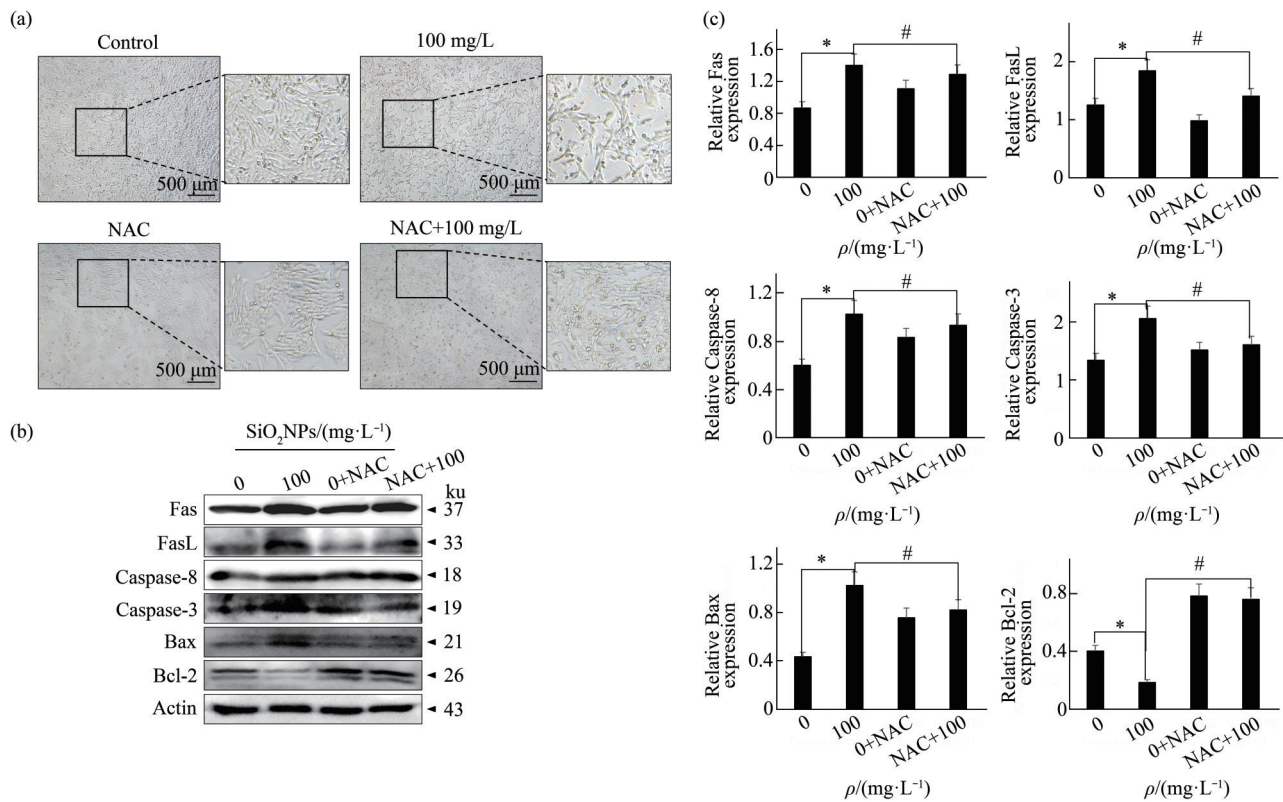


Fig. 6 Oxidative stress is involved in SiO₂NPs-induced cell injure and apoptosis of TM4 cells

(a) The morphology changes and cell concentration reduction induced by SiO₂NPs were rescued by NAC in TM4 cells. (b) ROS scavenger abolished the increased expression of Fas, FasL, Bax, Caspase-8 and Caspase-3 caused by SiO₂NPs in TM4 cells. (c) The relative protein levels were quantified by densitometry. **P*<0.05 compared to the control group, #*P*<0.05 as compared to the 100 mg/L SiO₂NPs treated group.

3 讨 论

睾丸支持细胞参与精子发生过程的启动和维持, 支持细胞的异常变化与精子发生障碍和男性不育密切相关^[22, 24]。基于实施难度和伦理道德等多方面综合考虑, 在过去的几十年中, 毒理学的研究重点已经逐渐从基于动物的实验转变为体外研究。在诸多研究环境因素与男性生育力关系的模型中, TM4细胞系是应用最为广泛的体外模型。TM4细胞在体外培养时持续表达睾丸支持细胞特有的一些标志分子, 例如分泌转铁蛋白和纤溶酶原激活物, 同时表达雄激素和雌激素受体, 对卵泡刺激素也有一定反应^[25]。因此, 本研究以TM4细胞为模型, 研究纳米材料对雄性生殖系统的毒性作用及其机制。

在本研究中, 细胞增殖实验显示TM4细胞存活率随SiO₂NPs浓度增高而逐渐下降, 表明SiO₂NPs对TM4细胞生长和增殖有显著抑制作用。显微镜视野下处理组TM4细胞数量下降, 形态皱缩以及细胞间连接结构的减少进一步证实SiO₂NPs可以引起TM4细胞损伤。已有研究表明, 由于活性表面存在抗氧化剂功能基团, 纳米材料可以直接诱导ROS和自由基的产生, 当细胞内的氧化还原状态失衡会导致氧化应激。为明确TM4引起细胞损伤的机制, 本文检测了ROS、SOD和MDA等直接或间接反映细胞内氧化还原状态的分子指标。ROS是机体内产生的含氧并且性质活泼的物质的总称, 生理条件下主要来自于线粒体呼吸过程中生物氧化的副产物。正常情况下, 细胞内的抗氧化系统还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和抗氧化酶类 (GSH-PX, SOD) 可清除ROS, 保护细胞免受损伤。当体内ROS的产生与细胞内抗氧化防御

系统失衡时, 就会发生氧化应激^[26]。MDA是ROS攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA), 引发脂质过氧化作用而形成的脂质过氧化产物。检测MDA的含量可以反映细胞内脂质过氧化程度, 间接地反映细胞损伤的程度。本研究发现, SiO₂NPs可以显著增加TM4细胞中ROS和MDA的含量以及抗氧化酶SOD的活性。结果提示, 纳米二氧化硅可能通过破坏ROS和抗氧化防御系统的动态平衡而诱导小鼠TM4细胞发生氧化应激。

持续的氧化应激导致DNA损伤, 当DNA损伤严重到无法修复时会启动细胞凋亡或衰老等信号通路^[27]。据报道, 纳米材料可以通过多种途径介导细胞凋亡。在冠心病细胞中, SiNPs通过调控miR-22小分子RNA的表达激活Wnt-1信号通路介导细胞凋亡^[28]。在肺泡巨噬细胞中, SiNPs通过激活PI3K/Akt信号通路介导细胞凋亡^[29]。本研究发现, SiO₂NPs可以显著增加TM4细胞凋亡率并激活Fas/FasL介导的细胞凋亡信号通路^[30-31]。多项研究表明, 纳米材料的细胞毒性作用可能与其诱导产生的ROS和氧化应激密切相关。为进一步阐明纳米材料在TM4细胞产生毒性作用的分子机制, 使用抗氧化剂NAC对SiO₂NPs处理细胞进行了挽救治疗。NAC是一种抗氧化剂和自由基清除剂, 被广泛应用于临床疾病的治疗, 然而其对生殖系统的保护作用目前尚未有报道。在本研究中, 将NAC和SiO₂NPs联合处理后可以显著缓解SiO₂NPs造成的细胞损伤、氧化应激和细胞凋亡。这些结果表明, SiO₂NPs通过诱导氧化应激激活Fas/FasL信号通路促进TM4细胞凋亡, 而该过程可以被抗氧化剂NAC阻断 (图7)。

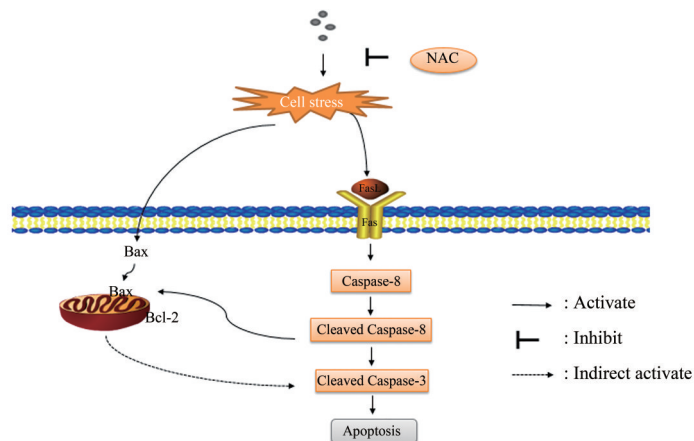


Fig. 7 SiO₂NPs induced cell apoptosis via oxidative stress and activation of Fas/FasL signaling pathway

4 结 论

综上所述, 本文以 TM4 细胞为模型, 研究了纳米二氧化硅对小鼠睾丸支持细胞的毒性作用及分子机制, 并利用 NAC 挽救模型对该机制进行了验证。这些发现为纳米材料在生物体内的生殖毒性作用分子机制提供了新的证据, 加深了我们对纳米材料在生物医药和其他等领域安全应用的理解。

参 考 文 献

- [1] Salata O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology*, 2004, **2**(1): 3
- [2] Augustin MA, Sanguansri P. Nanostructured materials in the food industry. *Adv Food Nutr Res*, 2009, **58**: 183-213
- [3] Winkler H C, Suter M, Naegeli H. Critical review of the safety assessment of nano-structured silica additives in food. *J Nanobiotechnology*, 2016, **14**(1): 44
- [4] Knopp D, Tang D, Niessner R. Review: bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles. *Anal Chim Acta*, 2009, **647**(1): 14-30
- [5] Hill E K, Li J. Current and future prospects for nanotechnology in animal production. *J Anim Sci Biotechnol*, 2017, **8**: 26
- [6] Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 2005, **113**(7): 823-839
- [7] Xu Y, Wang N, Yu Y, *et al.* Exposure to silica nanoparticles causes reversible damage of the spermatogenic process in mice. *PLoS One*, 2014, **9**(7): e101572
- [8] Aitken R J, Buckingham D W, West K M. Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J Cell Physiol*, 1992, **151**(3): 466-477
- [9] Aitken R J, Curry B J. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal*, 2011, **14**(3): 367-381
- [10] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, **39**(1): 44-84
- [11] Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, *et al.* Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med*, 1998, **188**(5): 919-930
- [12] Gulbins E, Brenner B, Schlottmann K, *et al.* Fas-induced programmed cell death is mediated by a Ras-regulated O₂⁻ synthesis. *Immunology*, 1996, **89**(2): 205-212
- [13] Sato T, Machida T, Takahashi S, *et al.* Fas-mediated apoptosome formation is dependent on reactive oxygen species derived from mitochondrial permeability transition in Jurkat cells. *J Immunol*, 2004, **173**(1): 285-296
- [14] Medan D, Wang L, Toledo D, *et al.* Regulation of Fas (CD95)-induced apoptotic and necrotic cell death by reactive oxygen species in macrophages. *J Cell Physiol*, 2005, **203**(1): 78-84
- [15] Xu Y R, Dong H S, Yang W X. Regulators in the apoptotic pathway during spermatogenesis: killers or guards?. *Gene*, 2016, **582**(2): 97-111
- [16] Aitken R J, Baker M A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, **250**(1-2): 66-69
- [17] Agarwal A, Virk G, Ong C, *et al.* Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*, 2014, **32**(1): 1-17
- [18] Venkatesh S, Shamsi M B, Deka D, *et al.* Clinical implications of oxidative stress & sperm DNA damage in normozoospermic infertile men. *Indian J Med Res*, 2011, **134**(3): 396-398
- [19] 王振花, 李潮生, 李晓丽. N-乙酰半胱氨酸在各系统疾病防治中的研究进展. *医学综述*, 2019, **25**(11): 2138-2142
Wang Z H, Li C S, Li X L. Medical Recapitulate, 2019, **25**(11): 2138-2142
- [20] Morishita Y, Yoshioka Y, Satoh H, *et al.* Distribution and histologic effects of intravenously administered amorphous nanosilica particles in the testes of mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, **420**(2): 297-301
- [21] Alves M G, Rato L, Carvalho R A, *et al.* Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 2013, **70**(5): 777-793
- [22] Griswold M D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Bio*, 1998, **9**(4): 411-416
- [23] Reis M M, Moreira A C, Sousa M, *et al.* Sertoli cell as a model in male reproductive toxicology: advantages and disadvantages. *J Appl Toxicol*, 2015, **35**(8): 870-883
- [24] Mather J P. Establishment and characterization of two distinct mouse testicular epithelial cell lines. *Biol Reprod*, 1980, **23**(1): 243-252
- [25] Jenkins R R, Goldfarb A. Introduction: oxidant stress, aging, and exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 1993, **25**(2): 210-212
- [26] Ye Y, Liu J, Xu J, *et al.* Nano-SiO₂ induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line. *Toxicol In Vitro*, 2010, **24**(3): 751-758
- [27] Sun Y, Shen J, Zeng L, *et al.* Role of autophagy in di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)-induced apoptosis in mouse Leydig cells. *Environ Pollut*, 2018, **243**(PtA): 563-572
- [28] Wei F, Ren B, Han W, *et al.* Investigate the effect of miR-22 on the apoptosis of coronary heart disease cells through the Wnt-1 pathway based on nano-silica-induced rat models. *J Nanosci Nanotechnol*, 2021, **21**(2): 1338-1344
- [29] 李宁, 陈祥娃, 霍婷婷, 等. 纳米二氧化硅通过 PI3K/Akt 信号通路影响肺泡巨噬细胞凋亡的研究. *四川大学学报(医学版)*, 2020, **51**(4): 488-493
Li N, Chen X W, Huo T T, *et al.* *J Sichuan Univ (Med Sci)*, 2020, **51**(4): 488-493
- [30] Guo C, Yang M, Jing L, *et al.* Amorphous silica nanoparticles trigger vascular endothelial cell injury through apoptosis and autophagy via reactive oxygen species-mediated MAPK/Bcl-2 and PI3K/Akt/mTOR signaling. *Int J Nanomedicine*, 2016, **11**: 5257-5276
- [31] Yang D, Zhang M, Gan Y, *et al.* Involvement of oxidative stress in ZnO NPs-induced apoptosis and autophagy of mouse GC-1 spg cells. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, **202**: 110960

SiO₂NPs Induce TM4 Cells Apoptosis Through Oxidative Stress and Activation of Fas/FasL Signaling Pathway*

WANG Xu-Ying^{2,3}, GUO Zhi-Yi^{1,2,3}, HAO Hui-Yu¹, SUN Fan-Li¹, ZHANG Pin-Zheng^{2,3},
MENG Fang-Yu¹, CHEN Zi-Yun¹, LI Jin-Ze¹, SHANG Xuan^{3)**}

¹School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China;

²School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China;

³Hebei Key Laboratory for Chronic Diseases, Tangshan 063210, China)

Abstract Objective To investigate the toxic effect and molecular mechanism of silicon dioxide nanoparticles (SiO₂NPs) on mouse Sertoli cells (TM4), TM4 cells were exposed to medium containing various concentrations of SiO₂NPs (0, 1, 10, 100 mg/L) for 24 h. **Methods** After treatment, the morphology and viability of TM4 cells were detected by optical microscope and cell counting kit (CCK-8). The level of intracellular reactive oxygen species (ROS) was measured by fluorescent probe DCFH-DA, and the content of malondialdehyde (MDA) and activity of superoxide dismutase (SOD) were detected by kits according to the manufacturers' protocol. The percentage of apoptotic cells in TM4 cells was detected by Annexin V-FITC/PI kit, and the expression levels of apoptotic molecules including Fas, FasL, Caspase-8, Caspase-3, Bax and Bcl-2 were detected by Western blot. **Results** The results showed that SiO₂NPs inhibited the cell survival rates, decreased cell concentrations and changed cell morphology of TM4 cells in a dose-dependent manner. In addition, the level of ROS in TM4 cells was significantly up-regulated after exposure, followed by an increase in the content of MDA and the activity of SOD. Further study found that SiO₂NPs increased cell apoptosis rate and activated the pro-apoptotic signaling pathway mediated by Fas/FasL. Interestingly, inhibition of oxidative stress by NAC in TM4 cells can alleviate the cell injury and apoptosis induced by SiO₂NPs. **Conclusion** In summary, SiO₂NPs induce TM4 cells apoptosis through oxidative stress and activation of Fas/FasL signaling pathway.

Key words silicon dioxide nanoparticles (SiO₂NPs), reproductive toxicity, TM4 cells, oxidative stress, apoptosis

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0404

* This work was supported by grants from the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2021209004), the Science and Technology Project of Hebei Education Department (JQN2020002), the Health Department of Hebei Province (20210049), the Tangshan Science and Technology Bureau (20130212b), and the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Project of North China University of Science and Technology (X2020085, X2021062).

** Corresponding author.

Tel: 86-315-8805566, E-mail: shangx@ncst.edu.cn

Received: December 28, 2021 Accepted: February 17, 2022