

多壁碳纳米管活化 A549 细胞核 转录因子 - B 的机制

叶社房¹, 温 雯¹, 王义芳¹, 林翠林¹, 吴艺晖¹, 张其清^{1, 2}

(1. 厦门大学材料学院, 生物医学工程研究中心, 生物材料系, 福建省生物医学工程重点实验室, 厦门市生物医学工程技术研究中心, 厦门 361005;

2. 中国医学科学院生物医学工程研究所, 天津市生物医学材料重点实验室, 天津 300192)

摘要 探讨多壁碳纳米管对人肺上皮细胞 A549 核转录因子 - B (NF- B) 活性的影响及其活化机制. 不同浓度的多壁碳纳米管作用于 A549 细胞后, 用活性氧 (ROS) 敏感探针 2, 7-二氯荧光素二乙酸酯结合流式细胞仪检测细胞内氧化应激状态; 用凝胶电泳迁移率改变这一分析技术检测 A549 细胞 NF- B DNA 结合活性; 用蛋白印迹检测 A549 细胞 NF- B p65 蛋白和 I B 蛋白表达; 用免疫荧光结合共聚焦显微镜观察 A549 细胞 NF- B p65 蛋白的核转位情况. 结果表明, 多壁碳纳米管诱导 A549 细胞内 ROS 过量产生和 NF- B DNA 结合活性; 同时伴有 p65 蛋白核移位和 I B 蛋白胞浆降解. 抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 可抑制多壁碳纳米管诱导的 A549 细胞内 ROS 产生、NF- B DNA 结合活性、p65 蛋白核移位以及 I B 蛋白降解. 结果表明, 多壁碳纳米管可以通过诱导 A549 细胞氧化应激机制从而活化核转录因子 NF- B 活性.

关键词 多壁碳纳米管; 氧化应激; 核转录因子 - B

中图分类号 O629.73; Q51; O613.71 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2010)03-0497-05

碳纳米管 (CNTs) 因具有独特的导电性、磁性、力学强度和柔韧性等优异性能, 使其在疾病诊断、药物传输以及生物材料等生物医药领域显示出潜在应用前景^[1,2]. 然而, 流行病学研究发现, 环境大气中的颗粒浓度和颗粒物尺寸与人肺或心血管疾病的发生率之间有密切联系, 且致病作用的主要成分是直径小于 100 nm 的纳米颗粒^[3]. 由于现今在生产和使用 CNTs 的同时对机体的防护措施还远未达到规范的要求, 因此, CNTs 的生产及其在生物医药领域的应用可能对环境及人体健康带来危害^[4,5].

CNTs 因小尺寸和大比表面积, 使其具有很强的表面活性, 可由此产生独特的生物毒理效应^[5]. 多壁碳纳米管 (MWCNTs) 能诱导肺慢性炎症、纤维化及多发性肉芽肿等^[6], 可促进肺巨噬细胞 TNF- α , IL-8 和 IL-1 等细胞因子释放^[6,7], 并能诱导人表皮纤维细胞^[8]及 T 细胞^[9]等的凋亡; 利用蛋白组学技术的研究^[7]发现, MWCNTs 可以导致细胞应激、周期调节及细胞代谢等基因的活化; Pacurari 等^[10]最近发现, MWCNTs 可激活肺间皮瘤产生相关的细胞外信号调节激酶 (ERK1/2) 及 p38 激酶.

研究表明, 纳米颗粒毒性效应存在氧化应激机制^[4,5]. 核转录因子 - B (NF- B) 是受氧化应激敏感调节的重要转录因子, 它参与调节炎症、免疫反应及细胞增殖和转化等基因转录^[11]. NF- B 通常以 p50/p65 和 I B 三聚体形式以非活性状态存在于细胞质中. 当受到细胞外信号刺激时, I B 蛋白发生磷酸化并降解, 从而释放 NF- B p50/p65 二聚体, 使其转位进入细胞核与靶基因序列结合, 诱导炎症相关基因的表达^[11,12]. 已有研究表明, 单壁碳纳米管 (SWCNTs) 诱导细胞毒性机制与氧化应激和 NF- B 活化有关^[13,14]. 根据已报道的 MWCNTs 毒性效应, 推测 MWCNTs 也可能存在 NF- B 活化机制. 为此, 本文探讨了 MWCNTs 对 NF- B 活性的影响, 并研究了氧化应激在 NF- B 活化中的作用.

收稿日期: 2009-06-01.

基金项目: 国家重大科学研究计划项目 (批准号: 2006CB933300)、国家自然科学基金 (批准号: 30901175) 和福建省青年人才项目 (批准号: 2008F3097) 资助.

联系人简介: 叶社房, 男, 博士, 副教授, 从事纳米生物效应研究. E-mail: yeshefang@xmu.edu.cn

张其清, 男, 博士, 教授, 从事生物医学工程领域的研究. E-mail: zhangqiq@xmu.edu.cn

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

MWCNTs购自深圳纳米巷. 参照文献 [15, 16] 方法对 MWCNTs进行纯化, 其纯度和理化性质均已表征明确^[16, 17]. 人肺上皮细胞 A549购自中国科学院上海生命科学研究院; Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)培养基购自 Gibco公司; 胎牛血清 (FBS)、2, 7-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA)、 $[\text{}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 标记和 Sephadex G-25购自 Invitrogen公司; 抗 p65抗体、抗 I κ B 抗体、抗 β -actin抗体、抗 PARP抗体和 Alexa fluor 488-IgG二抗购自 Santa Cruz公司; *N*-Acetylcysteine (NAC)购自 Sigma公司; Enhanced chemiluminescence (ECL)试剂盒购自 Pierce公司.

美国 Bio-Rad 680酶标仪; Axiovert 200荧光倒置显微镜 (Carl Zeiss公司); Coulter Epics XL流式细胞仪 (Beckman公司); Tcs SP5激光共聚焦显微镜 (Leica公司).

1.2 实验过程

1.2.1 细胞培养及细胞内活性氧 (ROS)的检测 将 A549细胞培养于 10%胎牛血清、100 U/mL 氨苄青霉素及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、湿化的 5% CO_2 孵箱中培养. 待 A549细胞生长至 80%~90%汇合状态时, 加入不同浓度的 MWCNTs分散液处理. MWCNTs分散液参照文献 [17] 的方法用超声分散法制备. MWCNT分散液每次实验前新鲜配制, 超声 5 min, 充分混均后使用. 参照文献 [13] 方法, 用荧光探针 DCFH-DA 结合流式细胞术测定细胞内 ROS水平. DCFH-DA 进入细胞后, 经酯酶作用脱去二酯生成 2, 7-二氯氢化荧光素 (DCFH), DCFH 被超氧阴离子和过氧化氢等氧化, 生成发荧光的 2, 7-二氯荧光素 (DCF), 测得的 DCF 荧光强度即可反映细胞 ROS水平.

1.2.2 凝胶电泳迁移率实验 (EMSA) 参照文献 [12] 方法制备细胞核提取物. NF- κ B 同序双链寡核苷酸探针序列为 5'-AGTTGAGGGGACTTCCCAAGGC-3', 5'端以 $[\text{}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 标记, 用 Sephadex G-25 纯化标记的寡核苷酸. 参照文献 [14] 方法, 再用 EMSA 法测定 NF- κ B DNA 的结合活性. 同时在反应体系中加入 100倍未标记的 NF- κ B 寡核苷酸探针进行特异性竞争试验.

1.2.3 细胞免疫荧光检测 用 4%多聚甲醛对细胞爬片进行固定后, 以 5% BSA/0.15% Triton X-100 封闭液室温下处理 30 min. 加抗 p65抗体 (体积比 1:1000), 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 加 Alexa fluor 488 标记的二抗 (体积比 1:400), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h; 然后用碘化丙啶复染细胞核, 经漂洗, 干燥, 封片后, 用激光共聚焦显微镜观察和照相.

1.2.4 蛋白印迹分析 参照文献 [12] 方法, 提取 MWCNTs处理后的 A549细胞总蛋白并进行定量; 取 50 μg 蛋白样品经 12%的 SDS-PAGE电泳、PVDF膜电转移及膜封闭后, 与抗 p65抗体、抗 I κ B 抗体、抗 β -actin抗体及抗 PARP抗体于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 然后与相应的二抗室温孵育 2 h; 最后在暗室中用 ECL 试剂盒进行化学发光法显影.

1.2.5 统计学分析 采用 SPSS 10.0 统计软件对各组数据进行 ANOVA 单因素方差分析, 采用 Student's Newman-Keuls方法对多组数据进行比较, 将 $p < 0.05$ 定义为有显著性差异.

2 结果与讨论

2.1 MWCNTs诱导 A549细胞内活性氧 (ROS)产生

富勒烯 C_{60} 、SWCNTs、量子点和超细颗粒物等能够诱导细胞产生 ROS, 影响机体抗氧化剂防御机制^[3, 4, 18]. 细胞 ROS的产生被认为是纳米生物毒性效应的重要机制之一. CNTs可以引起细胞的凋亡、周期改变、黏附力下降及肉芽肿形成等多种损伤, 其机制可能与 CNTs诱导细胞氧化应激有关^[15]. 为证实 MWCNTs对 A549细胞的氧化应激诱导效应, 我们采用荧光探针 DCFH-DA 染料检测细胞 ROS的变化. 结果表明, 当 DCFH-DA 进入细胞后, 经酯酶作用脱去二酯生成 2, 7-二氯氢化荧光素 (DCFH), DCFH 被超氧阴离子和过氧化氢等 ROS氧化, 生成发绿色荧光的 2, 7-二氯荧光素 (DCF), 检测 DCF 荧光的强弱即可反映细胞 ROS水平^[13].

通过流式细胞仪 (图 1) 和共聚焦显微镜 (图 2) 测定 A549细胞内 DCF 的荧光强弱, 结果显示,

MWCNTs在 0 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量范围内作用 6 h 后, A549 细胞 ROS 产生剂量依赖效应; 用抗氧化剂 NAC 或 GSH 预处理细胞则可显著抑制 MWCNTs 诱导 A549 细胞 ROS 的产生 (图 3), 这些结果与 MWCNTs 作用于肺间皮细胞^[10]、巨噬细胞^[19] 和鼠胚胎干细胞^[15] 等观察到的氧化应激效应一致. 研究表明, MWCNTs 与细胞接触后能快速进入细胞^[20], 并可直接靶向损伤线粒体, 诱导线粒体膜电位去极化^[16,19], 这可能是 MWCNTs 致细胞过量产生 ROS 的重要机制.

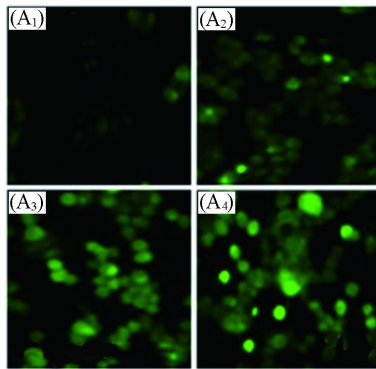


Fig 2 Fluorescence microscopy (A₁—A₄) with DCF staining (B)

(A₁) Control; (A₂) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs; (A₃) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs; (A₄) H₂O₂. (B) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs untreated control (MWCNTs) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$): a 0; b 50; c 100. d H₂O₂.

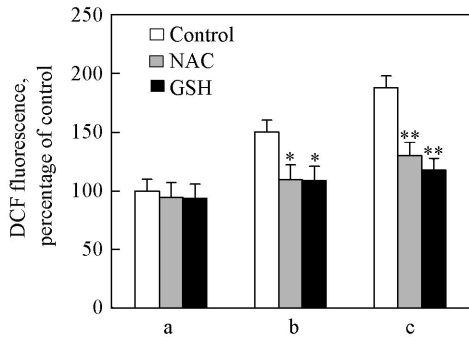


Fig 3 Effects of NAC and GSH on MWCNTs-induced ROS generation in A549 cells

(MWCNTs) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$): a 0; b 50; c 100.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs untreated control

2.2 MWCNTs 诱导 A549 细胞 NF- β DNA 结合活性

纳米颗粒经呼吸道进入体内后, 通常先引起肺组织发生氧化应激反应, 并诱导前炎症基因表达, 促进炎症因子和趋化因子分泌增加, 进而引发炎症反应, 导致肺组织损伤^[3,4]. MWCNTs 可诱导肺组织炎症反应, 促进细胞 TNF- α 、IL-1 等细胞因子释放^[6,7]. NF- β 是一种参与调节炎症、免疫反应相关基因转录的重要的转录因子^[11,12]. 为此, 本实验探讨 MWCNTs 对 A549 细胞 NF- β 活性的影响. 用不同剂量 MWCNTs 处理 A549 细胞 2 h 后, EMSA 结果 (图 4) 显示, MWCNTs 诱导 A549 细胞中 NF- β DNA 结合活性, 效应呈剂量依赖性. 在竞争抑制试验中, 加入 100 倍未标记同源探针显著抑制 MWCNTs 诱导的 NF- β DNA 结合活性, 证实 NF- β DNA 的结合具有高度特异性. 蛋白印迹结果显示, 随着 MWCNTs 剂量的增加, A549 细胞核 NF- β p65 蛋白表达逐渐增强 [图 5(A)]; 而 A549 细胞浆 I κ B 蛋白则随着 MWCNTs 剂量的增加逐渐降解 [图 5(B)]. 这些结果与 SWCNTs 作用于上皮细胞系 HaCaT

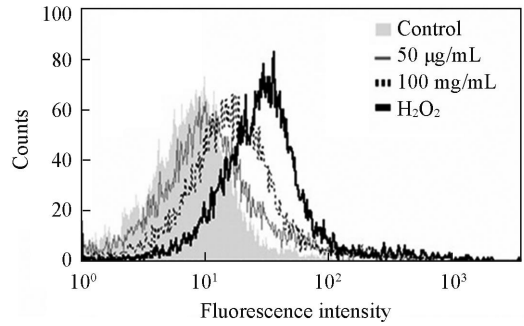


Fig 1 ROS generation in A549 cells exposed to MWCNTs measured by flow cytometry

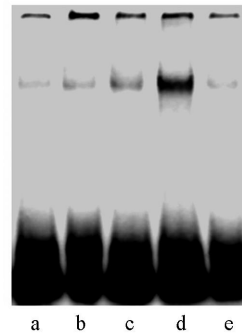
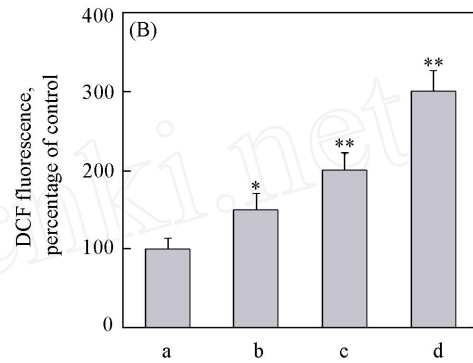


Fig 4 Effects of MWCNTs on NF- β activation in A549 cells assessed by EMSA

(MWCNTs) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$): a 0; b 50; c 100.

d LPS; e competitor

后活化 NF- κ B 的研究结果相似^[14]. 结合已报道的结果^[6,7], 推测 MWCNTs 活化 NF- κ B 途径可能是诱导炎症反应的重要信号机制.

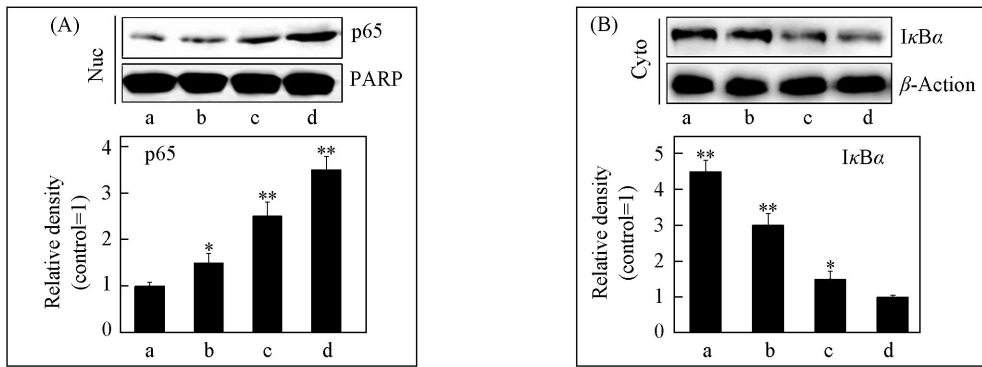


Fig 5 Effects of MWCNTs on the levels of nuclear p65 (A) and cytoplasmic I κ B (B) determined by Western blotting

(MWCNTs) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$): a 0; b 50; c 100; d LPS

2.3 ROS在 MWCNTs 诱导 NF- κ B 活性中的作用

在胞外刺激信号如细胞因子和脂多糖等作用下, 细胞内过量产生的 ROS 可作为重要的信号分子参与 NF- κ B, AP-1 和 MAPK 激酶等信号转导通路活化, 激活转录因子调节基因表达, 从而促进细胞增殖、分化以及炎症反应等^[11,12]. 结果表明, MWCNTs 可诱导 A549 细胞氧化应激和 NF- κ B 活性. 为了进一步明确 ROS 在 MWCNTs 诱导 A549 细胞 NF- κ B 活性中的作用, 以抗氧化剂 NAC 预处理 A549 细胞 30 min, 用 EMSA 检测 A549 细胞 NF- κ B DNA 结合活性状态.

从图 6 可以看出, NAC 能明显抑制 MWCNTs 对 A549 细胞 NF- κ B DNA 的结合活性; 通过共聚焦结果观察到 NAC 抑制 Alexa fluor 488 荧光标记的 NF- κ B 的活性亚单位 p65 发生核转移 [图 7 (A)], 进一步证实了图 6 的结果. 蛋白印迹结果 [图 7 (B)] 表明, 经 NAC 预处理后的 A549 细胞, MWCNTs 诱导 NF- κ B p65 蛋白的核转移以及细胞浆 I κ B 蛋白的降解均被抑制. 以上结果提示, MWCNTs 诱导 A549 细胞 NF- κ B 的活化存在氧化应激依赖机制, 与大气纳米颗粒^[4]和 SWCNTs^[14]等激活 NF- κ B 的机制相似. ROS 激活 NF- κ B 的机制尚不清楚, 可能与 ROS 对 I κ B 的化学修饰有关, 或是通过对其它的转录辅助因子的调节作用来影响 NF- κ B 的活性^[21]. MWCNTs 通过氧化应激机制激活 NF- κ B, 为阐明其纳米毒理效应机制提供了新视角.

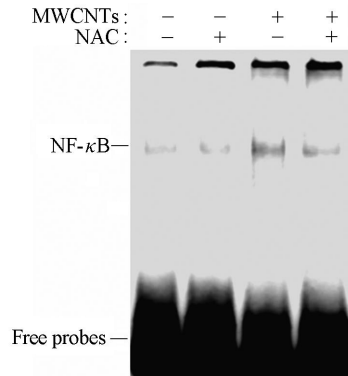


Fig 6 Inhibitory effects of NAC on MWCNTs-induced NF- κ B activation measured by EMSA

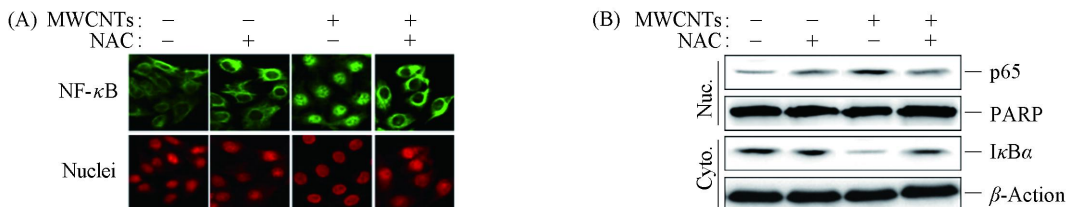


Fig 7 Effects of NAC on translocation of p65 into the nucleus examined by immunofluorescence confocal microscopy (A) and on the levels of nuclear p65 and cytoplasmic I κ B determined by Western blotting (B)

参 考 文 献

- [1] Baughman R. H., Zakhidov A. A., Heer D. A. Science[J], 2002, 297(5582): 787—792
 [2] MENG Jie (孟洁), SONG Li (宋礼), MENG Jie (孟洁), et al. Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2007,

28(3): 476—480

- [3] Donaldson K , Li X. Y. , MacNee W. . J. Aerosol Sci [J], 1998, **29**(5/6): 553—560
- [4] Nel A. , Xia T. , Madler L. , *et al.* Science[J], 2006, **311**(5761): 622—627
- [5] Helland A. , Wick P. , Koehler A. , *et al.* Environ Health Perspect [J], 2007, **115**(8): 1125—1131
- [6] Mitchell L. A. , Gao J. , Wal R. V. , *et al.* Toxicol Sci [J], 2007, **100**(1): 203—214
- [7] Witzmann F. A. , Monteiro-Riviere N. A. . Nanomedicine[J], 2006, **2**(3): 158—168
- [8] Patblla A. , Tchounwou P. . Environ Mol Mutagen [J], 2007, **48**(7): 563
- [9] Bottini M. , Bruckner S. , Nika K. , *et al.* Toxicol Lett [J], 2006, **160**(2): 121—126
- [10] Pacurari M. , Yin X. J. , Ding M. , *et al.* Nanotoxicology[J], 2008, **2**(3): 155—170
- [11] Ghosh S. , May M. J. , Kopp E. B. . Annu Rev Immunol [J], 1998, **16**: 225—260
- [12] Anand P. , Kunnumakkara A. B. , Harikumar K. B. , *et al.* Cancer Res [J], 2008, **68**(21): 8861—8870
- [13] Shama C. S. , Sarkar S. , Periyakaruppan A. , *et al.* J. Nanosci Nanotechnol [J], 2007, **7**(7): 2466—2472
- [14] Manna S. K. , Sarkar S. , Barr J. , *et al.* Nano Lett [J], 2005, **5**(9): 1676—1684
- [15] Zhu L. , Chang D. W. , Dai L. , *et al.* Nano Lett [J], 2007, **7**(12): 3592—3597
- [16] YE She-Fang(叶社房) , ZHONG Li-Ming(钟李明) , WU Yi-Fei(吴艺飞) , *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2009, **30**(3): 497—501
- [17] Ye S. F. , Wu Y. H. , Hou Z. Q. , *et al.* Biochem Biophys Res Commun [J], 2009, **379**(2): 643—648
- [18] Usenko C. Y. , Harper S. L. , Tanguay R. L. . Toxicol Appl Pharmacol [J], 2008, **229**(1): 44—55
- [19] Schrand A. M. , Dai L. , Schlager J. J. , *et al.* Diamond Relat Mater [J], 2007, **16**(21): 2118—2123
- [20] Simon-Deckers A. , Gouget B. , Mayne-Lemite M. , *et al.* Toxicology[J], 2008, **253**(1—3): 137—146
- [21] Bubici C. , Papa S. , Dean K. , *et al.* Oncogene[J], 2006, **25**(51): 6731—6748

Multi-walled Carbon Nanotubes Induces Nuclear Factor- B Activation in A549 Cells

YE She-Fang^{1*} , WEN Wen¹ , WANG Yi-Fang¹ , LI N Cui-Lin¹ , WU Yi-Hui¹ , ZHANG Qi-Qing^{1, 2*}

(1. *Research Center of Biomedical Engineering & Department of Biomedical Key Laboratory of Biomedical Engineering of Fujian Province, Research Center of Biomedical Engineering Technology of Xiamen City, College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, China;*

2. *Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Key Laboratory of Biomedical Materials of Tianjin, Tianjin, 391002, China)*

Abstract The present study was undertaken to examine the effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) on nuclear factor(NF) - B activation in human A549 lung epithelial cells. Cultured A549 cells were stimulated with various concentrations of MWCNTs in the presence or absence of antioxidants. The intracellular generation of reactive oxygen species(ROS) was detected by means of flow cytometry analysis with a redox-sensitive fluorescent probe 2, 7 -dichlorofluorescein-diacetate. NF- B activity was measured by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The protein levels of p65 and I B were assessed by Western blot analysis. Translocation of p65 into the nucleus was examined by immunofluorescence confocal microscopy. The results showed increased ROS and NF- B activity in response to treatment of A549 cells with MWCNTs. MWCNTs stimulated nuclear translocation of the p65 subunit of NF- B, I B phosphorylation in A549 cells. Treatment of A549 cells with antioxidants prior to adding MWCNTs resulted in a significant reduction in ROS generation, NF- B activity, p65 translocation and I B phosphorylation in A549 cells. These results indicate that MWCNTs are able to induce NF- B activation in A549 cells mediated by oxidative stress.

Keywords Multi-walled carbon nanotube; Oxidative stress; Nuclear factor- B

(Ed : H, J, Z)