评述

纳米材料诱导内质网应激途径的研究进展

陈延东^①, 刘颖^②, 陈瑞^②, 常彦忠^{①*}, 陈春英^{②*}^① 河北师范大学生命科学学院铁代谢分子实验室, 石家庄 050024^② 国家纳米科学中心纳米生物效应与安全性重点实验室, 北京 100190

*通讯作者, E-mail: chang7676@163.com; chenchy@nanoctr.cn

收稿日期: 2015-11-11; 接受日期: 2015-12-30; 网络版发表日期: 2016-05-11

国家重点基础研究发展计划(编号: 2011CB933401)资助项目

摘要 随着纳米技术的蓬勃发展, 纳米材料已被广泛用于化妆品、医药卫生、国防科技等领域. 由于纳米材料的特殊物理化学性质, 在其生产、加工、运输以及应用的过程中增加了人类的暴露风险及潜在的健康危害. 研究显示, 纳米材料能够在动物、细胞、分子及基因水平对生物体造成毒性损害, 而活性氧的生成和氧化应激的产生则是这种毒性损害的重要机制. 内质网作为细胞内蛋白质合成、加工及储存 Ca^{2+} 的重要场所, 对细胞内稳态的变化十分敏感, 细胞的氧化应激损伤及细胞内 Ca^{2+} 平衡的紊乱都会诱发内质网应激, 继而通过内质网应激途径导致细胞凋亡. 本文对纳米材料与内质网应激及相关细胞功能的影响进行了综述.

关键词 内质网应激, 细胞凋亡, 纳米颗粒

1 引言

纳米材料是指运用纳米技术制造出来的具有纳米尺度特性的物质^[1], 具有表面效应、小尺度效应、量子尺寸效应、宏观量子隧道效应等一般材料不具备的性质, 已被广泛应用于化工、计算机、航空、军事、化妆品、机械、生物成像、癌症治疗、环境保护和医药卫生等领域. 越来越多的纳米材料进入生态环境, 人们接触纳米材料的机会显著增加, 纳米材料可通过呼吸、皮肤吸收以及摄食等多种方式进入人体并通过血液循环到达身体各个器官, 因此, 纳米材料给生活带来便利的同时也需要考虑其可能产生的负面效应^[2]. 早在 2003 年, *Science*^[3]和 *Nature*^[4]就发表文章开始讨论纳米材料对环境和健康影响的生物安全性

问题. 流行病学和病理学研究也已证明超细颗粒物暴露水平与人体发病率和死亡率有显著相关性, 长期暴露在超细颗粒物环境中的人群会引发肺损伤^[5,6]. 不同种类的纳米材料, 如氧化锌纳米颗粒(Zinc oxide nanoparticles, ZnO NPs)、纳米二氧化硅(Silica nanoparticles, SiO_2 NPs)、二氧化钛纳米颗粒(Titanium dioxide nanoparticles, TiO_2 NPs)等均能产生活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)^[7-11], 产生氧化应激进而引发生物体的细胞和组织损伤^[12].

2 氧化应激与内质网应激

正常生理状态下, 机体产生的少量 ROS 很容易被机体抗氧化系统如谷胱甘肽(glutathione, GSH)和

引用格式: 陈延东, 刘颖, 陈瑞, 常彦忠, 陈春英. 纳米材料诱导内质网应激途径的研究进展. 中国科学: 化学, 2016, 46: 656-664
Chen YD, Liu Y, Chen R, Chang YZ, Chen CY. Overview of the endoplasmic reticulum stress pathway induced by nanomaterials. *Sci Sin Chim*, 2016, 46: 656-664, doi: 10.1360/N032015-00226

抗氧化酶等清除,但是当抗氧化系统不能够清除机体产生的过量 ROS 时,则会产生氧化应激. 纳米颗粒表面的电子供体和受体活性部位与分子氧相互作用生成超氧阴离子^[13],并经过歧化反应产生过量 ROS,继而可引起蛋白质、酶、脂类和 DNA 等生物分子的氧化损伤,导致细胞凋亡或坏死^[13].

内质网是真核细胞中重要的细胞器,不仅是蛋白质合成、修饰与加工、组装与转运的场所,也是细胞内 Ca^{2+} 的储存库,与固醇类激素的合成、血糖浓度的调节及脂类的代谢密切相关. 研究表明内质网对氧化损伤十分敏感^[14],并且在氧化应激诱导的损伤反应中起重要作用^[15,16]. 细胞的氧化应激损伤、未折叠蛋白的堆积以及细胞内 Ca^{2+} 平衡的紊乱都会诱发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ER stress),继而激活从内质网到细胞核的信号传导通路的反应,即未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),以此提高细胞的生存能力,当 UPR 不能及时使细胞恢复稳态时,则会通过某些方式促使细胞的凋亡.

UPR 信号通路有 3 种跨膜感受蛋白,分别为 IRE-1 (肌醇依赖酶 1)、ATF-6 (活化转录因子 6)、PERK (RNA 依赖的蛋白激酶样 ER 激酶)^[17]. 如图 1(a) 所示^[18],正常情况下,内质网分子伴侣 BIP/GRP78 与 3 种跨膜蛋白结合以维持内质网稳态. 当细胞受到缺氧、钙失衡、自由基和药物等物理或化学因素刺激时,内质网稳态被打破,具有高亲和力的未折叠蛋白含量大量增加,使得 BIP/GRP78 与 3 种跨膜蛋白解偶联,激活了 UPR 的 3 条信号传导通路. 活化后的 IRE-1 具有核酸内切酶的活性,将胞质中的 XBP-1 剪切,之后有活性的部分进入细胞核并调节下游基因的表达;活化后的 PERK 会使 eIF2 α 磷酸化,阻断蛋白合成,促进 ATF4 的翻译,促使内质网恢复稳态;ATF6 与 GRP78 分离后转移至高尔基体,先后被 site1 和 site2 蛋白酶水解激活,转入细胞核,促进基因表达^[19,20].

当 UPR 反应不能使细胞恢复稳态时,可能会诱发细胞凋亡,由 ER stress 诱导的细胞凋亡一般有 3 种途径^[21],PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP、JNK 的激活通路、ER stress 特异性相关蛋白 caspases 家族的 caspase-12 的激活,如图 1(b)所示^[18].

3 纳米材料与内质网应激相关研究现状

随着纳米技术的快速发展,纳米材料已被广泛

图 1 ER stress 诱导的主要信号通路^[18]. (a) 内质网应激诱导的 UPR 的主要信号通路; (b) 内质网应激诱导细胞凋亡的主要信号通路(网络版彩图)

用于化妆品、食品添加剂、医药卫生以及电子设备等领域. 纳米材料的广泛应用大大增加了人类接触的机会,其带来的潜在毒性效应备受瞩目. 已有研究证明,纳米材料经皮肤、呼吸道及胃肠道等途径进入身体后,主要在肝脏、胰腺、肾脏、心脏、脾脏和肺中积累^[2,22-29],并且能够诱导哺乳动物细胞、鼠及斑马鱼体内器官等的氧化应激、ROS 产生、DNA 损伤、细胞周期停滞、线粒体损伤、细胞色素酶 C 的释放以及细胞凋亡或坏死等^[8,11,24,30-48]. 另外,纳米颗粒还可以引起炎症反应,刺激 TNF- α 、VEGF、IL-1、IL-6、IL-8 等炎症因子的分泌^[49-54].

由纳米颗粒或者其表面解离的离子诱导的细胞凋亡可能与线粒体损伤和内质网应激诱导的细胞凋亡路径一致,所以内质网可能在应对纳米颗粒诱导

的氧化应激损伤反应中起重要作用^[15,16,55-58]。此外, 纳米颗粒毒性引起的细胞效应具有时间、浓度、粒径大小、表面包被以及细胞类型的依赖性^[55,59,60]。表 1 总结了影响内质网应激的纳米材料及其作用机制。

3.1 ZnO NPs 与内质网应激及相关细胞效应

ZnO NPs 是由极细晶粒组成的白色超细粉末。研究表明^[61,62], ZnO NPs 可以诱导内质网应激, 激活 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP/GADD34 和 IRE1/XBP-1 信号通路以及内质网应激相关的凋亡蛋白 Caspase-12 (图 2)。此外, ZnO NPs 还能够促进内质网应激相关凋亡蛋白 caspase-3、caspase-9、磷酸化 JNK、促凋亡基因 Bax 水平的升高并抑制抗凋亡基因 Bcl-2 的表达, 使其激活了除 caspase-12 和 CHOP 凋亡外的其他通路, 包括依赖线粒体的细胞凋亡和 JNK 凋亡途径, 并能够引起肝组织细胞内质网肿胀、谷胱甘肽含量下降^[62]。

3.2 纳米 Ag (silver nanoparticles, Ag NPs)与内质网应激及相关细胞效应

内质网是细胞内 Ca^{2+} 的储存库, 已有研究证明^[63], Ag NPs 能够引发 ER 钙的释放, 继而引起内质

网应激, 激活 PERK、IRE1、ATF6 分子并促进内质网分子伴侣 GRP78/BIP 的释放, 诱导凋亡蛋白 CHOP 的表达, 导致人肝癌细胞(HepG2)的凋亡。Ag NPs 处理斑马鱼细胞诱导的内质网应激激活了 PERK 与 IRE1 通路并引发了线粒体依赖的细胞凋亡通路, 而斑马鱼胚胎实验则表明仅内质网应激标志物 BIP 和 Synv 在斑马鱼早期的生活阶段表达上升。另外, 内质网应激激活了 NF κ B 通路, 促进了 TNF- α 的分泌, 激活了 Jak-STAT 路径导致抗病毒反应^[64]。Simard 等^[65]实验表明, 浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 15 nm 的银纳米颗粒 (Ag NPs) 处理人的单核细胞 THP-1, 在 caspase-4 的调节下诱导了 ATF-6 的降解, 并引起了与细胞凋亡相关的 NLRP-3 炎性体的活化, 而 PERK 路径则是在 Ag NPs 浓度为 1~10 $\mu\text{g/mL}$ 时被强烈激活。此外, Ag NPs 还可以上调热休克蛋白家族基因诱导内质网应激^[66]。

人单核细胞 THP-1 实验表明 ATF-6 可能是炎性体激活的分子开关, 因为只有当 Ag NPs 浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时 ATF-6 发生降解。而 HSP-70 的降解与 ATF-6 的降解现象类似, 在刺激的 1 h 后恢复到相对稳定的状态。此外, 低浓度下 Ag NPs 诱导 HSP-70 的合成, ATF-6 没有变化。数据还表明诱导细胞死亡和激活 NLRP-3 炎性体与 caspase-1 活性的增加、IL-1 β 的分泌以及 ASC 细胞凋亡体的形成有关。

3.3 金纳米颗粒(gold nanoparticles, Au NPs)与内质网应激及相关细胞效应

利用基因芯片和系统生物学分析的方法分析 Au NPs 处理 K562 细胞后的生物效应表明^[67], Au NPs 激活了 IRE1- α 和 ATF6, 下调了钙联接蛋白, HSP90B 和 BIP/GRP78 以促进错误折叠蛋白的正确折叠。另外, Au NPs 处理细胞 6 h 后, BIP 的上调也表明其激活了与自救反应相关的 IRE1- α 和 ATF6 路径。然而, 下调内质网分子伴侣蛋白 HSP90B 和 BIP, 表明在延长 Au NPs 处理细胞时间时全蛋白折叠反应不充足, 因此, PERK 路径也被激活。当这些反应不足以缓解内质网应激时, 则促进了与凋亡相关基因 CHOP 和 cleaved caspase-3 的表达。也有研究表明^[68], 包含金纳米颗粒的聚乙二醇纳米凝胶(GNG)会在细胞质积累, 上调 SCCV II 细胞中 IRE1 α 和 p-PERK 的表达, 促进 A549 细胞中除 IRE1 α 之外的 BIP/GRP78、钙联接蛋白和 Ero-1 α 的表达。此外, GNG 还可以介导内质

图 2 ZnO NPs 的表征及其诱导的内质网应激^[61]。(a) 透射电子显微镜(TEM)的表征; (b) 240 μM ZnO NPs 处理细胞的蛋白质印迹图; (c) ZnO NPs 诱导内质网应激的主要信号通路(网络版彩图)

表 1 影响内质网应激的纳米材料及其作用机制

纳米材料	理化特征(粒径、形状等)	Zeta 电位(mV)	内质网应激相关基因及蛋白	后续细胞反应	文献
ZnO NPs	水合粒径为 111±44 nm	-6.14	120 μ M (9.77 mg/mL)、240 μ M (19.53 mg/mL) 释放的 Zn^{2+} 促进了基因 xbp-1s、chop、caspase-12 以及 BIP、GADD34、p-PERK、p-eIF2 α 、cleaved Caspase-12、HERPUD1 蛋白的表达	Caspase-12 通路激活, 引发细胞凋亡	[61]
ZnO NPs	表面光滑的多边形 水合粒径为 223.8 nm	-17.6	200 和 400 mg/kg 基因 grp78、grp94、pdi-3 以及 xbp-1 的 mRNA 表达水平上升; p-PERK、p-eIF2 α 、caspase-3、caspase-9、caspase-12、磷酸化 JNK、Bax 水平升高、抗凋亡蛋白 Bcl-2 下调	caspase-12、JNK 和 CHOP 以及依赖线粒体的细胞凋亡通路激活	[62]
Ag NPs	MQ 水中水合粒径为 70±2、47±5、67±4、115±6 nm; 培养基中水合粒径为 148.7±6、174.7±6.8、214.0±9.2、232.7±5.5 nm	/	5.25 μ g/mL 热休克蛋白家族基因 HSPA6、HSPA1A、HSPH1、HSP90AA1、HSPA4L 以及 STARD4、DNAJB4、DNAJB1 上调	线粒体损伤引起细胞凋亡	[66]
Ag NPs	培养基中水合粒径 28~35 nm	<30	人张氏肝细胞: 4 μ g/mL 中国仓鼠肺成纤维细胞: 3 μ g/mL p-PERK、p-eIF2 α 、p-IRE1、XBP-1s、ATF6、GRP78 和 CHOP 水平升高	CHOP 通路的细胞凋亡	[63]
Ag NPs	圆形纳米颗粒 比表面积 1.5757±0.0073 m ² /g 超纯水中水合粒径 120 nm 水和培养基混合物中水合粒径 321 nm	-30.6	ZFL 细胞: 500 μ g/mL、50 μ g/mL BIP、ATF-6、XBP-1s 表达上升 斑马鱼胚胎: 0.1 mg/L、5 mg/L BIP 和 Synv 显著上调	内质网应激激活了线粒体依赖的细胞凋亡以及经 NF κ B 路径诱导的炎症反应、抗病毒反应和细胞凋亡	[64]
Ag NPs	培养基中不同的颗粒浓度有不同的水合粒径, 见表 2	-8.4±0.4~ 9.5±1.0	Ag NPs 浓度为 1~10 μ g/mL 时 PERK 路径被强烈激活, HSP-70 被诱导合成. 而 Ag NPs 为 25 μ g/mL, ATF-6 和 HSP-90 以及 HSP-70 发生降解, 且在刺激的 1 h 后恢复到相对稳定的状态	caspase-1 活性增加、分泌 IL-1 β 、ASC 细胞凋亡体形成、NLRP-3 炎性体激活及细胞凋亡	[65]
Au NPs	1.0±0.1 nm (AuNPs-S), 6.4±1.4 nm (AuNPs-M), 29.1±5.4 (71%) 和 149.4±53.6 nm (29%) (AuNPs-L)	/	0.1~10 μ g/mL 钙联接蛋白下调、HSP90B 下调、BIP/GRP78 上调/下调; IRE1- α 、ATF6、p-PERK 被激活; 基因 CHOP 和 cleaved caspase-3 表达上升	活性氧的增加、线粒体细胞色素 c 释放、线粒体损伤和细胞凋亡	[67]
GNG	106±2.68 nm		20 和 50 g/mL GNG 上调 SCCV II 细胞中 IRE1 α 和 p-PERK 的表达. 在 A549 细胞中, GNG 促进 BIP/GRP78、钙联接蛋白和 Ero-1 α 的表达	促进细胞凋亡	[68]
无定形二氧化硅纳米颗粒 (aSNPs)	超纯水、PBS 和 RPMI1640 培养中 NexSil20 和 Ludox TM-40 两种纳米颗粒的水合粒径约为 33 nm	两种纳米颗粒在 3 种介质中的 Zeta 电位分别为-51、-18.2、19.8 和 -57.3、-20、-26.6 mV	600 g/mL 对氧磷酶 2 (PON2) 及凋亡蛋白的上调	aSNPs 可以激活 p53, 促进 Bad、Bax、Bcl-2、Bcl-x、HIF-1 α 的表达及细胞色素 c 的释放, 抑制 caspase-3、caspase-7 以及 caspase-9 的表达且可以释放炎症因子	[69]
SiO ₂ NPs SiO ₂ -1% Ag-NPs	表面多孔 在水中的水合粒径 SiO ₂ NPs: <100 nm (50%), 100~200 nm (40%), >200 nm (10%) SiO ₂ -1% Ag-NPs: 90% 为 50~400 nm、10% 为 400 nm~1 μ m	SiO ₂ : -12.7+/-0.4 SiO ₂ -1%Ag: -17.9+/-0.68	0.05 mg/mL (50 μ g/mL) SiO ₂ NPs 和 SiO ₂ -1% Ag-NPs 暴露 24 h 以及 500 μ g/mL SiO ₂ -1% Ag-NPs 暴露 4 h: BIP 上调 0.125、0.25 和 0.5 mg/mL (125 μ g/mL、250 μ g/mL、500 μ g/mL) SiO ₂ -1% Ag-NPs 暴露 24 h: BIP 下调 0.05、0.5 mg/mL (50、500 μ g/mL) 的 SiO ₂ -1% Ag-NPs 和 SiO ₂ NPs 暴露 24 h: XBP-1s 表达	启动细胞的修复或引起细胞毒性, 包括凋亡	[70]
CeO ₂ NPs	平均直径 7 nm	/	0.15 mM (25.82 μ g/mL) CeO ₂ NPs 处理小鼠, 抑制 GRP78、PDI 和 HSP25、HSP40、HSP70	细胞凋亡减弱	[74]

续表 1

纳米材料	理化特征(粒径、形状等)	Zeta 电位(mV)	内质网应激相关基因及蛋白	后续细胞反应	文献
CeO ₂ NPs	/	/	300 nM (51.63 μg/mL) CeO ₂ NPs, PDI 和 GRP78 蛋白下调	减轻细胞自噬、凋亡	[76]
CeO ₂ NPs	比表面积: 8~15 m ² /g 50~105 nm (TEM)	/	10 ⁻² 或 10 ⁻⁴ g/L (0.1 μg/mL、10 μg/mL) HSC70 和 GRP78 表达下调	细胞免于组织损伤引起的死亡	[75]
Fe ₃ O ₄ NPs	比表面积: 40 m ² /g 20~30 nm (TEM)	/	0.1、10 μg/mL HSC70 和 GRP78 表达下调		[75]
SnO ₂ NPs	比表面积: 14.2 m ² /g 61 nm (TEM)	/	HSC70 和 GRP78 表达下调		[75]
M-FeNPs	球形 培养基中水合粒径: 26.3±0.35 nm	-6.03±0.64	6.25、12.5、25、50 μg/mL Bcl-2、p62、LC3、IRE1α、p-IRE1α、CHOP 和 SOD2 蛋白以剂量依赖的方式增加, Beclin1 和 BAX 蛋白下降, BIM 上调(50 μg/mL)	细胞自噬 细胞凋亡	[77]
ITO	不均匀的多边形 两种培养基中水合粒径 50~300 nm 比表面积: 19.5 m ² /g	斑马鱼细胞培养基中: -15.2 mV; 斑马鱼培养基中: 6.0 mV	7.93 μg/L 处理受精 48 或 96 h 后的斑马鱼卵 BIP 和 ATF6 表达上升 体外, 70、100 μg/L noxa 和 caspase-9 上调		[78]
PEG-PE	/	/	35 μM, 48 或 96 h IRE1α、PERK 和 eIF2α 磷酸化水平升高, ATF6、sXBP1、ATF4、CHOP 和 caspase-12	上调脂质合成并引起 脂滴的形成; 细胞调 亡	[79]
SF-LY NPs	球形, 单分散 含血清的 PBS 中的水合粒径 98.9±2.64 nm	/	0.25 μM 处理 H460 和 H1650 细胞, 0.5 μM 处理 H157, 5 μM 处理 AS2 细胞 CHOP、p-JNK 和 GRP78 上调	细胞凋亡	[80]

表 2 不同的颗粒浓度有不同的水合粒径^{[65] a)}

Concentration (μg/mL)	Size (intensity) (nm)			Zeta potential (mV)	PdI ^{b)}
1	66.8±37.5 (69.8%±4.4)	10.0±0.5 (26.7%±3.2)	1629.0±2236.0 (3.5%±5.3)	-8.4±0.3	0.4±0.3
5	86.6±38.8 (79.7%±2.0)	10.5±2.2 (18.0%±2.9)	2108.0±2372.0 (2.4%±2.7)	-9.5±1.0	0.4±0.3
10	54.0±3.2 (85.7%±0.7)	9.1±0.5 (14.3%±0.7)		-8.7±1.2	0.2±0.1
25	64.4±7.3 (93.6%±4.0)	641.8±1782.0 (5.5%±2.8)	1121.0±2225.0 (0.9%±1.7)	-0.9±0.7	0.3±0.1

a) 实验结果为 3~6 次独立重复实验的平均数±SD; b) PdI: 多分散系数

网应激引起的细胞凋亡、下调 DNA 修复相关蛋白。

3.4 纳米 SiO₂ 与内质网应激及相关细胞效应

纳米硅的广泛应用不仅涉及工程材料方面还深入到化妆品的领域。人们接触到的几率也大大增加, 其生物安全性有待评估。有研究指出^[69], aSNPs (无定形二氧化硅纳米颗粒)可以诱导内质网应激并能够激活 p53, 促进 p53 凋亡通路相关蛋白 Bad、Bax、Bcl-2、Bcl-x 的表达并刺激细胞色素 c 的释放, 而对氧磷酶的上调或许是引起内质网应激并起始细胞凋亡过程的诱因。另有研究表明^[70], SiO₂ NPs 和 SiO₂-1% Ag NPs 能诱导人的肝细胞(Huh7)产生内质网应激, 促进内质网应激标志物 BIP 和 XBP1s 的表达, 并产生 ROS, 其中 SiO₂-1% Ag NPs 产生的毒性主要通过银离子释放。研究指出, 无论是在纳米颗粒有毒还是无

毒浓度条件下, 内质网都是其重要的靶标, 而内质网应激会导致钙平衡的变化, 由此导致细胞的修复(细胞功能的修复和移除 UPR 蛋白)或者引起细胞毒性, 包括细胞凋亡。有意义的是内质网应激的产生不直接与 ROS 的形成相关, 因为与内质网应激相比, ROS 的产生只是出现在高浓度纳米颗粒的条件下。

3.5 纳米 CeO₂ 与内质网应激及相关细胞效应

不同于其他几种纳米材料, CeO₂ NPs 细胞毒性存在一定的争议, 较多的研究主要体现出 CeO₂ NPs 的抗氧化作用。Ce⁴⁺和 Ce³⁺的转换使 CeO₂ NPs 具有氧化还原的性质, 用于清除生物系统中氧化应激产生的自由基^[71]。研究发现, CeO₂ NPs 可以拯救氧化应激诱导的细胞凋亡并且可以保护正常的人乳腺细胞免于辐射诱导的细胞凋亡^[72,73]。

研究表明, CeO_2 NPs 可以替代抗氧化剂, 减弱 ROS 的产生, 并通过抑制葡萄糖调节蛋白 78 (Grp78)、蛋白二硫化物异构酶(PDI)、热休克蛋白 (HSP25、HSP40、HSP70) 的表达以及 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 和 IL-6 等炎症因子的分泌减弱氧化应激、ERs、炎症反应、自噬和细胞死亡^[74-76]。

3.6 其他几种无机纳米材料与内质网应激及相关细胞现象

研究表明, Fe_3O_4 和 SnO_2 纳米颗粒可以下调内质网应激 marker HSC70 和 GRP78^[75], M-FeNPs (磁性氧化铁纳米粒子) 可以上调与 DNA 损伤和生长停滞相关的 Trp53inp1、Ddit3、Gadd45b、Ddit4 以及生长停滞特定基因 6 的基因水平和内质网中 S 期细胞周期蛋白。此外, Bcl-2、p62、LC3、IRE1 α 、p-IRE1 α 、CHOP 和 SOD2 蛋白以剂量依赖的方式增加, Beclin1 和 Bax 蛋白下降, 抗氧化基因 HO-1 以及促凋亡蛋白 BIM 上调, 并且可以在内质网看到自噬体。结果显示, 在 RAW264.7 细胞中, 磁性氧化铁纳米粒子通过线粒体损伤和内质网应激诱导的自噬先于凋亡发生, 阻止自噬小体的形成或许会促进凋亡细胞的死亡^[77]。

斑马鱼的体内外实验表明^[78], $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ 和 ITO 诱导了 ROS 的产生、 $\text{TNF-}\alpha$ 的转录、ATF6 基因以及与内质网应激相关的凋亡基因 CHOP、BIP 的表达。此外, 数据也显示 $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ 处理细胞后诱导了线粒体内的 apaf-1 和 caspase-9 的转录, 因此也可以通过线粒体途径诱导细胞凋亡。

3.7 有机纳米材料与内质网应激及相关细胞现象

被广泛应用于载药系统的聚乙二醇磷脂(PEG-

PE)处理的 A549 癌症细胞激活了与内质网应激相关的 3 种 UPR 信号通路, 使得 IRE1 α 、PERK 和 eIF2 α 磷酸化水平升高, ATF6、XBP-1s、ATF4 和 CHOP 表达增加, 并促进了依赖凋亡的 caspase-3/7、caspase-12、cleaved caspase-9、细胞色素 c 蛋白表达以及 caspase 抑制子 Z-VAD-FMK 活性的上升^[79]。因此, PEG-PE 诱导的细胞凋亡是通过 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP、ATF6-CHOP 和 Caspase-12 通路而不依赖 JNK 路径, 也有可能激活了 Caspase-9 参与的线粒体凋亡通路。而作为运载体的聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (poly-(lactic-co-glycolic acid), PLGA) 纳米颗粒将 PI3K 抑制剂有效负载运到内质网并引发特殊的细胞反应, 其在 4 种癌细胞中 (AS2, PTEN-null; H157, PIK3CA mutation TEN-null; H460, PIK3CA mutation; H1650, EGFR Δ E747-A750 mutation PTEN-null) 诱导的 CHOP、p-JNK 和 GRP78 的表达量均有上升, 并显著增加了 caspase-3/7 的活性, 表明其诱导了内质网应激并主要通过内源性途径促进细胞凋亡^[80]。

此外, 不同于无机纳米材料的发现, PEG-PE 在癌细胞诱导的内质网应激会上调脂质的合成并引起脂滴的形成。研究发现, PEG-PE 诱导的 A549 癌细胞中 UPR 的激活早于内质网膜的损伤和 ROS 的产生, ROS 在促进细胞凋亡的过程中起到了很小的作用, 因此 ROS 或许只是内质网氧化应激的一个副产品^[79]。

4 总结

综上所述, 目前对纳米材料引起的生物效应研究, 主要集中在纳米材料引起的氧化应激、ROS 的产

图3 (a) UPR 反应的信号通路; (b) 内质网应激诱导的细胞凋亡机制(网络版彩图)

生、DNA 损伤以及细胞凋亡。其中内质网应激是细胞凋亡的一个重要途径, 图 3 总结了纳米颗粒对细胞内质网应激及相关细胞效应的信号通路^[81]。当细胞受到纳米颗粒刺激时, 内质网稳态被打破, 具有高亲和力的未折叠蛋白含量大量增加, 使得 BIP/GRP78 与 3 种跨膜蛋白解偶联, 激活了 UPR 的 3 条信号传导通路。活化后的 IRE-1 具有核酸内切酶的活性, 将胞质中的 XBP-1 剪切, 剪切后的 XBP-1, 即 XBP1s 进入细胞核并调节下游基因的表达; 活化后的 PERK 会使 eIF2 α 磷酸化, 阻断蛋白合成, 激活 ATF4, 促使内质网恢复稳态; ATF6 激活后与 GRP78 分离转移至

高尔基体, 与高尔基体上的 S1P/S2P 结合, 激活启动子区与 ERs 相关基因的转录, 促使蛋白正确折叠。当 UPR 反应不能使细胞恢复稳态时, 可能会诱发细胞凋亡, 由 ER stress 诱导的细胞凋亡一般有 3 种途径, 即 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP、JNK 的激活通路、ER stress 特异性相关凋亡蛋白 caspase-12 的激活。

此外, 内质网应激可以激活 IRE1-NF- κ B 途径, 诱导炎症因子 TNF- α 、炎性体 NLRP-3、Bax/Bak、p53 等的表达上升。如何更好地阐释纳米材料干扰细胞的内稳态, 激活 ER stress 反应以及引起细胞凋亡等仍然需要进一步深入研究。

参考文献

- Hannah W, Thompson PB. *J Environ Monitor*, 2008, 10: 291–300
- Ahamed M, AlSalhi MS, Siddiqui M. *Clin Chim Acta*, 2010, 411: 1841–1848
- Service RF. *Science*, 2003, 300: 243
- Brumfiel G. *Nature*, 2003, 424: 246–248
- Song Y, Li X, Du X. *Eur Respir J*, 2009, 34: 559–567
- Ibald-Mulli A, Wichmann HE, Kreyling W, Peters A. *J Aerosol Med*, 2002, 15: 189–201
- Wahab R, Dwivedi S, Umar A, Singh S, Hwang IH, Shin HS, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, Kim YS. *J Biomed Nanotechnol*, 2013, 9: 441–449
- Zhao X, Wang S, Wu Y, You H, Lv L. *Aquat Toxicol*, 2013, 136: 49–59
- Wamer WG, Yin JJ, Wei RR. *Free Radical Bio Med*, 1997, 23: 851–858
- Long TC, Saleh N, Tilton RD, Lowry GV, Veronesi B. *Environ Sci Technol*, 2006, 40: 4346–4352
- Chen Q, Xue Y, Sun J. *Int J Nanomed*, 2013, 8: 1129–1140
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. *Science*, 2006, 311: 622–627
- Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. *J Appl Toxicol*, 2009, 29: 69–78
- Wang X, Wang B, Fan Z, Shi X, Ke ZJ, Luo J. *Neuroscience*, 2007, 144: 1045–1056
- Walter L, Hajnóczky G. *J Bioenerg Biomembr*, 2005, 37: 191–206
- Sanges D, Marigo V. *Apoptosis*, 2006, 11: 1629–1641
- Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Shokat K, LaVail MM, Walter P. *Science*, 2007, 318: 944–949
- Kitamura M. *Clin Exp Nephrol*, 2008, 12: 317–325
- Cribb AE, Peyrou M, Muruganandan S, Schneider L. *Drug Metab Rev*, 2005, 37: 405–442
- Stacchiotti A, Favero G, Rezzani R. *Evolution*, 2013, 20: 23–54
- Rasheva VI, Domingos PM. *Apoptosis*, 2009, 14: 996–1007
- Kashiwada S. *Environ Health Perspect*, 2006: 1697–1702
- Yeo MK, Yoon JW. *Mol Cell Toxicol*, 2009, 5: 23–31
- Choi JE, Kim S, Ahn JH, Youn P, Kang SJ, Park K, Yi J, Ryu DY. *Aquat Toxicol*, 2010, 100: 151–159
- Gaiser BK, Fernandes TF, Jepson M, Lead JR, Tyler CR, Stone V. *Environ Health*, 2009, 8: S2
- Laban G, Nies LF, Turco RF, Bickham JW, Sepúlveda MS. *Ecotoxicology*, 2010, 19: 185–195
- Lankveld D, Oomen A, Krystek P, Neigh A, Jong AT, Noorlander C, Eijkeren JV, Geertsma R, Jong WD. *Biomaterials*, 2010, 31: 8350–8361
- Xie G, Sun J, Zhong G, Shi L, Zhang D. *Arch Toxicol*, 2010, 84: 183–190
- Chuang HC, Juan HT, Chang CN, Yan YH, Yuan TH, Wang JS, Chen HC, Hwang YH, Lee CH, Cheng TJ. *Nanotoxicology*, 2014, 8: 593–604

- 30 Fukui H, Horie M, Endoh S, Kato H, Fujita K, Nishio K, Komaba LK, Maru J, Miyauhi A, Nakamura A, Kinugasa S, Yoshida Y, Hagihara Y, Iwahashi H. *Chem-Biol Interact*, 2012, 198: 29–37
- 31 Eom HJ, Choi J. *Toxicol in Vitro*, 2009, 23: 1326–1332
- 32 Xu Z, Chou L, Sun J. *J Appl Toxicol*, 2012, 32: 358–364
- 33 Liu T, Li L, Teng X, Huang X, Liu H, Chen D, Ren J, He J, Tang F. *Biomaterials*, 2011, 32: 1657–1668
- 34 Chang MY, Shiau AL, Chen YH, Chang CJ, Chen HH, Wu CL. *Cancer Sci*, 2008, 99: 1479–1484
- 35 Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Schmid G, Brandau W, Simon U, Jahn-Dechent W. *Small*, 2009, 5: 2067–2076
- 36 Roa W, Zhang X, Guo L, Shaw A, Hu X, Xiong Y, Gulavita S, Patel S, Sun X, Chen J, Moore R, Xing JZ. *Nanotechnology*, 2009, 20: 375101
- 37 Wijnhoven SW, Peijnenburg WJ, Herberths CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EH, Roszek B, Bisschops J, Gosens I, Meent DVD, Dekkers S, Jong WD, Zijverden MV, Sips AJ, MSc RG. *Nanotoxicology*, 2009, 3: 109–138
- 38 Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. *Toxicol Lett*, 2008, 179: 130–139
- 39 Eom HJ, Choi J. *Environ Sci Technol*, 2010, 44: 8337–8342
- 40 Nowrouzi A, Meghrai K, Golmohammadi T, Golestani A, Ahmadian S, Shafieezadeh M, Shajary Z, Khaghani S, Amiri AN. *Iran Biomed J*, 2010, 14: 23–32
- 41 Huang CC, Aronstam RS, Chen DR, Huang YW. *Toxicol in Vitro*, 2010, 24: 45–55
- 42 Sharma V, Anderson D, Dhawan A. *Apoptosis*, 2012, 17: 852–870
- 43 Sharma V, Singh P, Pandey AK, Dhawan A. *Mutat Res, Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2012, 745: 84–91
- 44 Scown TM, Santos EM, Johnston BD, Gaiser B, Baalousha M, Mitov S, Lead JR, Stone V, Fernandes TF, Jepson M, Aerle RV, Tyler CR. *Toxicol Sci*, 2010, 115: 521–534
- 45 Ahamed M, Posgai R, Gorey TJ, Nielsen M, Hussain SM, Rowe JJ. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 242: 263–269
- 46 Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H. *Toxicol Lett*, 2009, 190: 156–162
- 47 Lison D, Laloy J, Corazzari I, Muller J, Rabolli V, Panin N, Huaux F, Fenoglio I, Fubini B. *Toxicol Sci*, 2009, 108: 472–481
- 48 Zurita JL, Jos A, del Peso A, Salguero M, Cameán AM, López-Artíguez M, Repetto G. *Sci Total Environ*, 2007, 387: 155–165
- 49 Jeng HA, Swanson J. *J Environ Sci Heal A*, 2006, 41: 2699–2711
- 50 Gojova A, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy LM, Barakat AI. *Environ Health Perspect*, 2007, 115: 403–409
- 51 Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. *Inhal Toxicol*, 2004, 16: 437–445
- 52 Yen HJ, Hsu SH, Tsai CL. *Small*, 2009, 5: 1553–1561
- 53 Waters KM, Masiello LM, Zangar RC, Tarasevich BJ, Karin NJ, Quesenberry RD, Bandyopadhyay S, Teeguarden J, Pounds J, Thrall BD. *Toxicol Sci*, 2009, 107: 553–569
- 54 Lison D, Thomassen LC, Rabolli V, Gonzalez L, Napierska D, Seo WJ, Kirsch-Volders M, Hoet P, Kirschhock CE, Martens JA. *Toxicol Sci*, 2008, 104: 155–162
- 55 Tolosa L, Pinto S, Donato MT, Lahoz A, Castell JV, O'Connor JE, Gómez-Lechón MJ. *Toxicol Sci*, 2012: kfs083
- 56 Yang ST, Liu JH, Wang J, Yuan Y, Cao A, Wang H, Liu Y, Zhao Y. *J Nanosci Nanotechnol*, 2010, 10: 8638–8645
- 57 Xia T, Zhao Y, Sager T, George S, Pokhrel S, Li N, Schoenfeld D, Meng H, Lin S, Wang X, Wang M, Ji Z, Zink JJ, Mädler L, Castranova V, Lin S, Nel AE. *ACS Nano*, 2011, 5: 1223–1235
- 58 Gwinn WM, Qu W, Shines CJ, Bousquet RW, Taylor GJ, Waalkes MP, Morgan DL. *Toxicol Sci*, 2013: kft154
- 59 Napierska D, Thomassen L, Lison D, Martens JA, Hoet PH. *Part Fibre Toxicol*, 2010, 7: 39
- 60 Ariano P, Zamburlin P, Gilardino A, Mortera R, Onida B, Tomatis M, Ghiazza M, Fubini B, Lovisolio D. *Small*, 2011, 7: 766–774
- 61 Chen R, Huo L, Shi X, Bai R, Zhang Z, Zhao Y, Chang Y, Chen C. *ACS Nano*, 2014, 8: 2562–2574
- 62 Yang X, Shao H, Liu W, Gu W, Shu X, Mo Y, Chen X, Zhang Q, Jiang M. *Toxicol Lett*, 2015, 234: 40–49
- 63 Zhang R, Piao MJ, Kim KC, Kim AD, Choi JY, Choi J, Hyun JW. *Int J Biochem Cell B*, 2012, 44: 224–232
- 64 Christen V, Capelle M, Fent K. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272: 519–528
- 65 Simard JC, Vallières F, de Liz R, Lavastre V, Girard D. *J Biol Chem*, 2015, 290: 5926–5939
- 66 Bouwmeester H, Poortman J, Peters RJ, Wijma E, Kramer E, Makama S, Puspitaninganindita K, Marvin HJ, Peijnenburg AA, Hendriksen PJ. *ACS Nano*, 2011, 5: 4091–4103
- 67 Tsai YY, Huang YH, Chao YL, Hu KY, Chin LT, Chou SH, Hour AL, Yao YD, Tu CS, Liang YJ, Tsai CY, Wu HY, Tan SW, Chen HM. *ACS Nano*, 2011, 5: 9354–9369
- 68 Yasui H, Takeuchi R, Nagane M, Meike S, Nakamura Y, Yamamori T, Ikenaka Y, Kon Y, Murotani H, Oishi M, Nagasaki Y, Inanami O.

- Cancer Lett*, 2014, 347: 151–158
- 69 Kasper J, Hermanns MI, Bantz C, Maskos M, Stauber R, Pohl C, Unger RE, Kirkpatrick JC. *Part Fibre Toxicol*, 2011, 8: 6
- 70 Christen V, Fent K. *Chemosphere*, 2012, 87: 423–434
- 71 Xia T, Kovochich M, Liong M, Mädler L, Gilbert B, Shi H, Yeh JI, Zink JI, Nel AE. *ACS Nano*, 2008, 2: 2121–2134
- 72 Tarnuzzer RW, Colon J, Patil S, Seal S. *Nano Lett*, 2005, 5: 2573–2577
- 73 Schubert D, Dargusch R, Raitano J, Chan SW. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342: 86–91
- 74 Niu J, Azfer A, Rogers LM, Wang X, Kolattukudy PE. *Cardiovasc Res*, 2007, 73: 549–559
- 75 Falugi C, Aluigi M, Chiantore M, Privitera D, Ramoino P, Gatti M, Fabrizi A, Pinsino A, Matranga V. *Mar Environ Res*, 2012, 76: 114–121
- 76 Younce CW, Wang K, Kolattukudy PE. *Cardiovasc Res*, 2010, 87: 665–674
- 77 Park EJ, Choi DH, Kim Y, Lee EW, Song J, Cho MH, Kim JH, Kim SW. *Toxicol in Vitro*, 2014, 28: 1402–1412
- 78 Brun NR, Christen V, Furrer G, Fent K. *Environ Sci Technol*, 2014, 48: 11679–11687
- 79 Wang J, Fang X, Liang W. *ACS Nano*, 2012, 6: 5018–5030
- 80 Hou CC, Tsai TL, Su WP, Hsieh HP, Yeh CS, Shieh DB, Su WC. *Int J Nanomed*, 2013, 8: 2689–2707
- 81 Malhotra JD, Kaufman RJ. *Semin Cell Dev Biol*, 2007, 18: 716–731

Overview of the endoplasmic reticulum stress pathway induced by nanomaterials

Yandong Chen¹, Ying Liu², Rui Chen², Yanzhong Chang^{1*}, Chunying Chen^{2*}

¹ Laboratory of Molecular Iron Metabolism; College of Life Science; Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China

² CAS Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials and Nanosafety; National Center for Nanoscience & Technology of China, Beijing 100090, China

*Corresponding authors (email: chang7676@163.com; chenchy@nanoctr.cn)

Abstract: With the rapid development of nanotechnology, nanomaterials have been widely used in cosmetics, medicine and health, national defense-related science and so on. Because of the special physical and chemical properties, nanomaterials show increased exposure and potential health hazards to human during the process of production, transportation and application. Generation of reactive oxygen species and oxidative stress are the important mechanism of toxicity caused by nanomaterials. The endoplasmic reticulum, as an important place for protein synthesis, processing and storage of Ca²⁺, is sensitive to the cellular homeostasis changes. Oxidative stress and imbalance of Ca²⁺ induce endoplasmic reticulum stress and cell apoptosis. In this paper, we reviewed the endoplasmic reticulum stress pathway induced by nanomaterials.

Keywords: endoplasmic reticulum stress, cell apoptosis, nanoparticle

doi: 10.1360/N032015-00226