

## 研究论文

# 新型纳米材料CeO<sub>2</sub>NPs通过促进炎症反应和细胞凋亡损害卵巢功能

尹鑫 高茹菲 何俊琳 穆欣艺 陈俊 陈雪梅 刘学庆 王应雄 耿艳清\*

(重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学实验室/教育部生殖与发育国际合作联合实验室, 重庆 400016)

**摘要** 虽然二氧化铈纳米颗粒(CeO<sub>2</sub>NPs)应用广泛,但其生物安全性尚存争议。该文主要探讨CeO<sub>2</sub>NPs暴露对大鼠卵巢功能的影响及其机制。H&E染色和免疫组织化学结果发现, CeO<sub>2</sub>NPs暴露未引起卵巢卵泡和黄体发生显著变化。ELISA检测显示, CeO<sub>2</sub>NPs暴露后大鼠血清雌孕激素水平显著增加( $P < 0.05$ ); 激素合成关键酶的mRNA在CeO<sub>2</sub>NPs暴露组中显著增加( $P < 0.05$ )。免疫组织化学和Western blot结果显示, FSHR和LHR在CeO<sub>2</sub>NPs暴露组中的表达明显降低。进一步研究发现, 炎症相关因子TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 在CeO<sub>2</sub>NPs暴露组中的表达较对照组显著增加, 抗炎因子IL-10的蛋白表达量减少。此外, CeO<sub>2</sub>NPs暴露导致卵巢组织中Caspase3及cleaved-Caspase3蛋白表达水平上调, TUNEL染色阳性信号显著增加。研究结果提示, CeO<sub>2</sub>NPs可通过诱发炎症反应和细胞凋亡导致卵巢内分泌功能紊乱。

**关键词** CeO<sub>2</sub>NPs; 卵巢; 雌孕激素; 炎症; 细胞凋亡

## Novel Nanomaterial CeO<sub>2</sub>NPs can Damage Ovarian Function by Inducing Cell Inflammation and Apoptosis

Yin Xin, Gao Rufeifei, He Junlin, Mu Xinyi, Chen Jun, Chen Xuemei, Liu Xueqing, Wang Yingxiong, Geng Yanqing\*

(Laboratory of the Reproductive Biology, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University/  
Joint International Research Laboratory of Reproduction & Development, Chongqing 400016, China)

**Abstract** CeO<sub>2</sub>NPs, a novel nanomaterial, has been widely applied in many fields, but its biosecurity is unknown. This study focused on the effect of CeO<sub>2</sub>NPs on the structure and function of ovary in rat. H&E staining and IHC showed that there were no obviously changes in ovary visceral index and ovarian structure between control group and CeO<sub>2</sub>NPs groups. According to the results of ELISA and Real-time PCR, the level of the key enzymes which regulate the synthesis of hormone were significantly increased in a dose dependent manner in response to CeO<sub>2</sub>NPs ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the expression of FSHR and LHR were considerably decreased in the rat ovaries of CeO<sub>2</sub>NPs groups ( $P < 0.05$ ). Further study showed that the expression of inflam-

收稿日期: 2019-01-18 接受日期: 2019-03-19

重庆市基础科学与前沿技术研究项目(批准号: cstc2017jcyjAX0287)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13996490232, E-mail: 102813@cqmu.edu.cn

Received: January 18, 2019 Accepted: March 19, 2019

This work was supported by the Natural Science Foundation Project of Chongqing Science and Technology Commission (Grant No.cstc2017jcyjAX0287)

\*Corresponding author. Tel: +86-13996490232, E-mail: 102813@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-07-16 16:15:07

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190716.1614.016.html>

mation related genes *TNF- $\alpha$* , *IL-6*, *IL-1 $\beta$*  were remarkably increased ( $P<0.05$ ) and anti-inflammation related protein IL-10 was significantly declined in rat ovaries of CeO<sub>2</sub>NPs groups ( $P<0.05$ ). Furthermore, the expression of apoptosis related proteins caspase 3 and cleaved-caspase 3 in the rat ovaries were obviously increased ( $P<0.05$ ), and the positive signal of TUNEL was stronger after CeO<sub>2</sub>NPs exposure. This study demonstrated that ovarian endocrine function might be damaged by CeO<sub>2</sub>NPs by inducing cell inflammation and apoptosis.

**Keywords** CeO<sub>2</sub>NPs; ovary; estradiol and progesterone; inflammation; apoptosis

纳米颗粒(nanoparticles, NPs)被誉为“21世纪的新材料”。纳米稀土可以和活细胞、蛋白兼容,具有较高载药量、易于穿透血管、免受酶的降解、局部聚集浓度高等特点,被推荐用于疾病的诊断和靶向治疗<sup>[1]</sup>。二氧化铈纳米颗粒(cerium dioxide nanoparticles, CeO<sub>2</sub>NPs)兼具纳米材料和稀土的特性,在功能陶瓷、紫外线吸收剂、化妆品添加剂、食品抗氧化剂及肿瘤靶向治疗等方面存在极大应用价值<sup>[2]</sup>。作为新型纳米材料,CeO<sub>2</sub>NPs的生物作用相关研究极其有限。齐雪松等<sup>[3]</sup>研究发现,CeO<sub>2</sub>NPs可显著提高小鼠胸腺淋巴细胞的抗辐射能力,亦有部分研究证实,CeO<sub>2</sub>NPs存在肺脏毒性<sup>[4]</sup>。其生物安全性争议颇大,对雌性生殖系统的生物作用及潜在机制报道甚少。

卵巢作为影响雌性生殖能力的重要器官,主要发挥两个功能:一是产生可与精子结合形成受精卵的成熟卵母细胞,以繁衍后代;二是合成并分泌雌二醇(estradiol, E<sub>2</sub>)和孕酮(progesterone, P<sub>4</sub>)。E<sub>2</sub>、P<sub>4</sub>彼此协调以调控雌性生殖系统的发育和维持妊娠的正常进程<sup>[5-6]</sup>。Perrin等<sup>[7]</sup>发现,含低浓度CeO<sub>2</sub>NPs(0.01 mg/L)的培养基会导致体外受精成功率显著下降,他在精子、卵母细胞或胚胎的细胞质中未发现任何纳米颗粒,但彗星实验结果显示,小鼠精子和卵母细胞存在显著的DNA损伤。本研究首次在体外实验中证实,CeO<sub>2</sub>NPs存在卵母细胞毒性,但缺乏体内实验证据且分子机制尚不明确。CeO<sub>2</sub>NPs应用日益广泛,并被视为药物载体的首选材料,其对哺乳动物卵巢功能的生物作用及相关机制亟待阐明。

本研究通过构建SD大鼠CeO<sub>2</sub>NPs亚急性暴露模型,首次初探CeO<sub>2</sub>NPs暴露对卵巢功能的影响机制,补充完善CeO<sub>2</sub>NPs的生物安全性研究,为新型纳米材料的应用规范提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

健康成年清洁级SD大鼠(2~2.5月龄,250~300 g)

购于重庆医科大学实验动物中心(动物许可证号:SCXK[渝]2012-0001)。饲养环境为IVC级动物寄养室,饲养温度为(22±2) °C,相对湿度为(55±10)%, 12 h光照,自由饮水进食。所有动物实验均通过重庆医科大学伦理委员会批准。

### 1.2 实验试剂

CeO<sub>2</sub>NPs(粒径<25 nm)购于Sigma;多聚甲醛购于科隆化学品有限公司;H&E染液试剂盒购于建成科技有限公司;HRP标记山羊抗兔抗体、HRP标记山羊抗小鼠抗体均购于中杉金桥生物技术有限公司;ELISA试剂盒购于奥怡生物技术有限公司;TRIzol、逆转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒均购于宝生物工程公司;引物StAR、P450scc、3 $\beta$ -HSD、P450arom、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、 $\beta$ -actin均购于生工生物工程(上海)有限公司;RIPA蛋白质裂解液、PMSF蛋白酶抑制剂、BCA蛋白质浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、5 $\times$ SDSPAGE蛋白质上样缓冲液均购于碧云天生物技术有限公司;兔多克隆IL-1 $\beta$ 抗体、兔多克隆IL-10抗体均购于万类生物科技有限公司;兔多克隆FSHR抗体、兔多克隆LHR抗体均购于LifeSpan BioSciences公司;兔多克隆Caspase抗体、兔单克隆Cleaved-caspase3抗体均购于Cell Signaling公司;小鼠单克隆 $\beta$ -actin抗体购于Cell Signaling公司;ECL显色试剂盒购于Millipore公司;TUNEL试剂盒购于罗氏公司。

### 1.3 方法

1.3.1 动物模型构建及取材 成年SD大鼠随机分为四组(15只/组),参考已有报道<sup>[8]</sup>,将CeO<sub>2</sub>NPs溶于无菌蒸馏水中制备不同浓度的悬液,即CeO<sub>2</sub>NPs低剂量组(30 mg/kg,即Low组)、CeO<sub>2</sub>NPs中剂量组(300 mg/kg,即Mid组)和CeO<sub>2</sub>NPs高剂量组(600 mg/kg,即High组)溶剂对照组(即Con组),蒸馏水作为溶剂对照,每天上午9点灌胃,连续灌胃28天。第29日上午9点称取大鼠体重,乙醚麻醉后心脏取血,脱颈处死后收集卵巢组织。

1.3.2 苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining,

H&E) 将收取的卵巢组织经甲醛固定、石蜡包埋后, 进行切片(厚5 μm)。切片经二甲苯脱蜡、梯度酒精水化后, 苏木精染色2 min, 伊红染色10 s, 梯度酒精脱水, 中性树胶封片保存。

1.3.3 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC) 石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度酒精水化, 以枸橼酸盐为修复液在微波炉中进行抗原热修复。冷却至室温后, PBS洗3次, 孵一抗4 °C过夜; 次日室温复温后PBS洗3次, 37 °C水浴孵育二抗30 min; PBS洗3次后37 °C水浴孵育辣根过氧化物酶标记的三抗30 min; PBS洗3次, DAB显色, 自来水终止后苏木精复染; 再经梯度酒精脱水后中性树胶封片保存。利用ImageJ和SPSS 20.0软件对结果进行统计分析。

1.3.4 酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 全血经低温离心4 000 r/min、10 min, 取上层血清; 在相应ELISA试剂盒中加入标准品和血清样本, 37 °C避光孵育1 h, 在每孔中加入底物A液和B液, 并在37 °C下避光孵育15 min; 每孔加入终止剂, 在波长450 nm处测定D值, 绘制标准曲线。

1.3.5 实时荧光定量PCR(Real-time PCR) 采用TRIzol试剂抽提卵巢组织总RNA, 异丙醇沉淀浓缩RNA, 测定总RNA的浓度和纯度后逆转录为cDNA。

按照说明书操作流程冰上加样, 25 μL反应体系包括: SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II(12.5 μL)、正反向引物(10 μm)各1 μL、cDNA(2 μL)、ddH<sub>2</sub>O(8.5 μL)。离心后采用CFX96实时荧光定量PCR仪(Bio-Rad)检测。引物序列如表1所示。

1.3.6 蛋白免疫印迹(Western blot) 取约30 mg卵巢组织于组织匀浆器中, 加入300 μL裂解液和50 μL PMSE, 于冰上充分研磨后静置30 min, 4 °C离心12 000 r/min、15 min, 吸取上清液, BCA蛋白定量法测定总蛋白浓度。蛋白质样品按照1:4与5×SDS-PAGE上样缓冲液混匀, 沸水浴10 min。配置聚丙烯酰胺凝胶, 60 V恒压预电泳20 min后上样; 80 V恒压电泳, 250 mA将蛋白转至PVDF膜上后5%脱脂奶粉或5% BSA封闭70 min, 孵育一抗4 °C过夜; PBST清洗3次后37 °C孵育二抗70 min, PBST清洗3次; 化学发光法显影。用Quantity one软件分析显影条带的灰度值, 对灰度值进行统计分析。

1.3.7 末端脱氧核苷酸转移酶介导dUTP缺口末端标记测定法(TUNEL) 石蜡切片经二甲苯中浸洗、梯度酒精脱水, PBS漂洗后用蛋白酶K工作液室温孵育约8 min, PBS漂洗后加TUNEL反应混合液(阴性对照组仅加50 μL荧光素标记的dUTP液)于标本上, 暗湿盒中37 °C反应60 min, DAPI复染后经PBS洗涤,

表1 实时荧光定量PCR引物序列(5'→3')

Table 1 Primer sequences of Real-time PCR (5'→3')

Gene name 基因	Primer sequence (5'→3') 引物序列(5'→3')
<i>StAR</i>	F: CAC CAC CTT ACT TAG CAC TTC ATC T R: GCC TTG GGC ATA CTCA ACA AC
<i>P450scc</i>	F: GCA GAG TCA TGG AGG TCG TGT R: GCC TGG GAT GTG ATT TTC AGT
<i>3β-HSD</i>	F: AAT GTG ACT ATG TGG CGG TTG R: CAG ATG GAG CTT TCC TTT ATC C
<i>P450arom</i>	F: GGA CAC TTC TAA CAC GCT CTT C R: TCC ATA CAG TCT TCC AGT TTC TC
<i>IL-1β</i>	F: AGG AGA GAC AAG CAA CGA CA R: CTT TTC CAT CTT CTT TGG GTA T
<i>TNF-α</i>	F: GCG TGT TCA TCC GTT CTC TAC C R: TAC TTC AGC GTC TCG TGT GTT TCT
<i>IL-6</i>	F: AGT TGC CTT CTT GGG ACT GAT GT R: GGT CTG TTG TGG GTG GTA TCC TC
<i>β-actin</i>	F: CCT AGA CTT CGA GCA AGA GA R: GGA AGG AAG GCT GGA AGA

荧光显微镜(Olympus B×50)下观察凋亡细胞,玻片干后加50  $\mu\text{L}$  3号液(converter-POD)于标本上,暗湿盒中37  $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min。PBS漂洗3次后DAB显色,再用苏木素复染。然后梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂封片。用光学显微镜观察凋亡细胞并采集图像。

**1.3.8 统计分析** 所有数据均采用SPSS 20.0进行统计分析,数据均以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ S.D.)表示,使用 $t$ 检验检验两组之间的统计学差异,单因素方差分析和Bonferroni's方法检测三组及与上组之间的差异,以 $P<0.05$ 为有统计学差异。所有实验至少重复3次以上。

## 2 结果

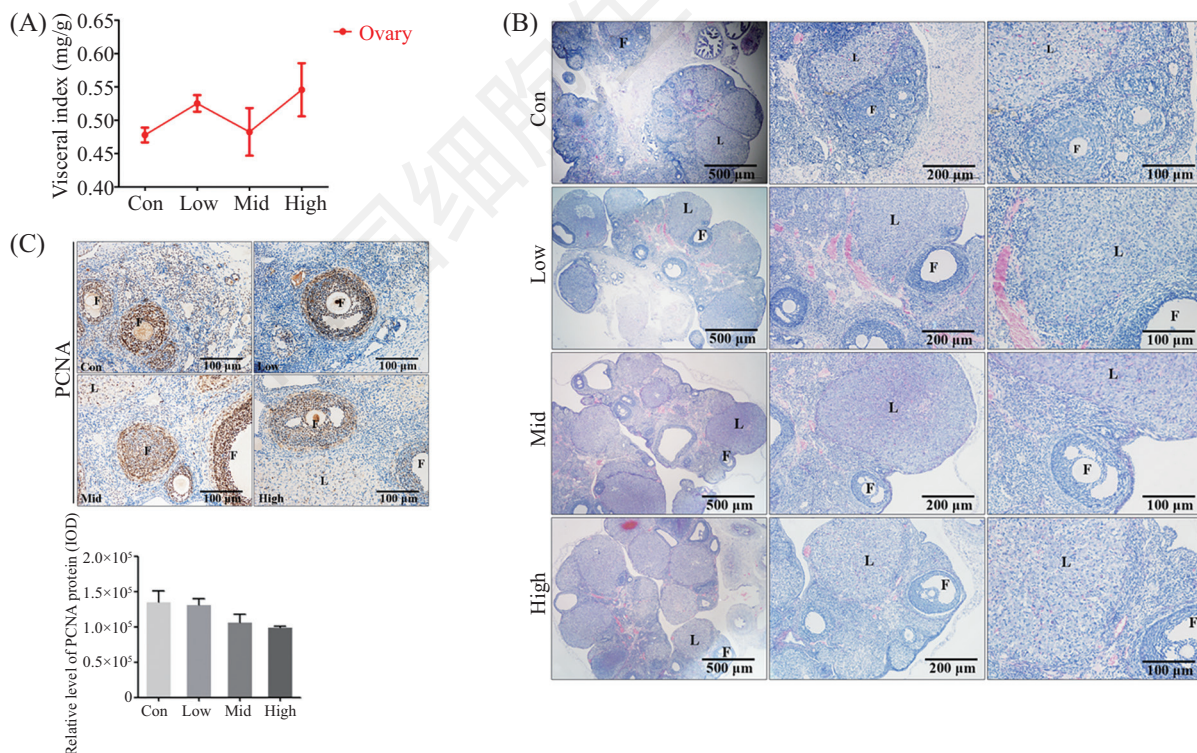
### 2.1 $\text{CeO}_2\text{NPs}$ 暴露不影响卵巢组织的形态结构

连续灌胃28天以后,各组之间大鼠的卵巢脏器指数无显著变化( $P>0.05$ ,图1A)。H&E染色结果显示,各组大鼠卵巢组织中均可见卵泡、黄体,其形态在各组之间均无显著差异(图1B)。PCNA作为卵泡活化生长的指标,能较好地反映卵泡的生长状态。

免疫组化的结果显示,PCNA阳性信号见于颗粒细胞及卵母细胞细胞核,且各组之间无显著差异( $P>0.05$ ,图1C)。提示 $\text{CeO}_2\text{NPs}$ 暴露对卵巢的形态结构无明显影响。

### 2.2 $\text{CeO}_2\text{NPs}$ 暴露导致卵巢激素分泌异常

利用ELISA对大鼠血清中 $\text{E}_2$ 、 $\text{P}_4$ 的水平进行检测。结果显示,与对照组相比,中剂量和高剂量 $\text{CeO}_2\text{NPs}$ 组 $\text{E}_2$ 和 $\text{P}_4$ 水平均明显升高,而低剂量组无明显变化; $\text{P}_4$ 在高剂量组升高更为显著( $P<0.05$ ,图2A)。为了探究引起 $\text{E}_2$ 和 $\text{P}_4$ 变化的潜在原因,利用Real-time PCR对 $\text{E}_2$ 、 $\text{P}_4$ 合成的4个关键分子进行检测。结果显示,与对照组相比, $P450\text{scc}$ 、 $3\beta\text{-HSD}$ 和 $P450\text{arom}$ 在中剂量和高剂量 $\text{CeO}_2\text{NPs}$ 暴露组均显著升高( $P<0.05$ ), $3\beta\text{-HSD}$ 在 $\text{CeO}_2\text{NPs}$ 各暴露组均明显升高( $P<0.05$ ), $\text{StAR}$ 在各组之间并无显著性差异( $P>0.05$ ,图2B)。由于卵巢 $\text{E}_2$ 、 $\text{P}_4$ 的分泌受到下丘脑-垂体-性腺轴中卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)和黄体生成素(corpus luteum, LH)的调控,故而测定了其受体(follicle-stimulating hormone receptor, FSHR)和(corpus



A: 卵巢脏器指数(双侧卵巢重量/大鼠体重); B: H&E染色观察 $\text{CeO}_2\text{NPs}$ 对卵巢形态的影响; C: IHC观察PCNA在各组之间的表达,棕黄色为阳性结果。 $n=3$ , L: 黄体; F: 卵泡。

A: the ovary visceral index (ovaries weight/body weight); B: H&E staining of rat ovaries; C: IHC staining of PCNA in rat ovaries, brown represents positive signal.  $n=3$ , L: luteum; F: follicle.

图1  $\text{CeO}_2\text{NPs}$ 对卵巢形态的影响

Fig.1 The effect of  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  on the ovarian morphology

luteum receptor, LHR)在卵巢组织中的表达。免疫组织化学结果显示, FSHR广泛表达于颗粒细胞、黄体细胞的细胞质, LHR广泛表达于黄体细胞和间质细胞的细胞质, CeO<sub>2</sub>NPs暴露组卵巢组织中的阳性信号较对照组减弱。Western blot结果显示, FSHR和LHR在各剂量CeO<sub>2</sub>NPs暴露组中的表达均较对照组显著降低( $P<0.05$ , 图2C和图2D)。以上结果提示, CeO<sub>2</sub>NPs暴露会造成卵巢对促性腺激素的反应降低, E<sub>2</sub>、P<sub>4</sub>分泌紊乱。

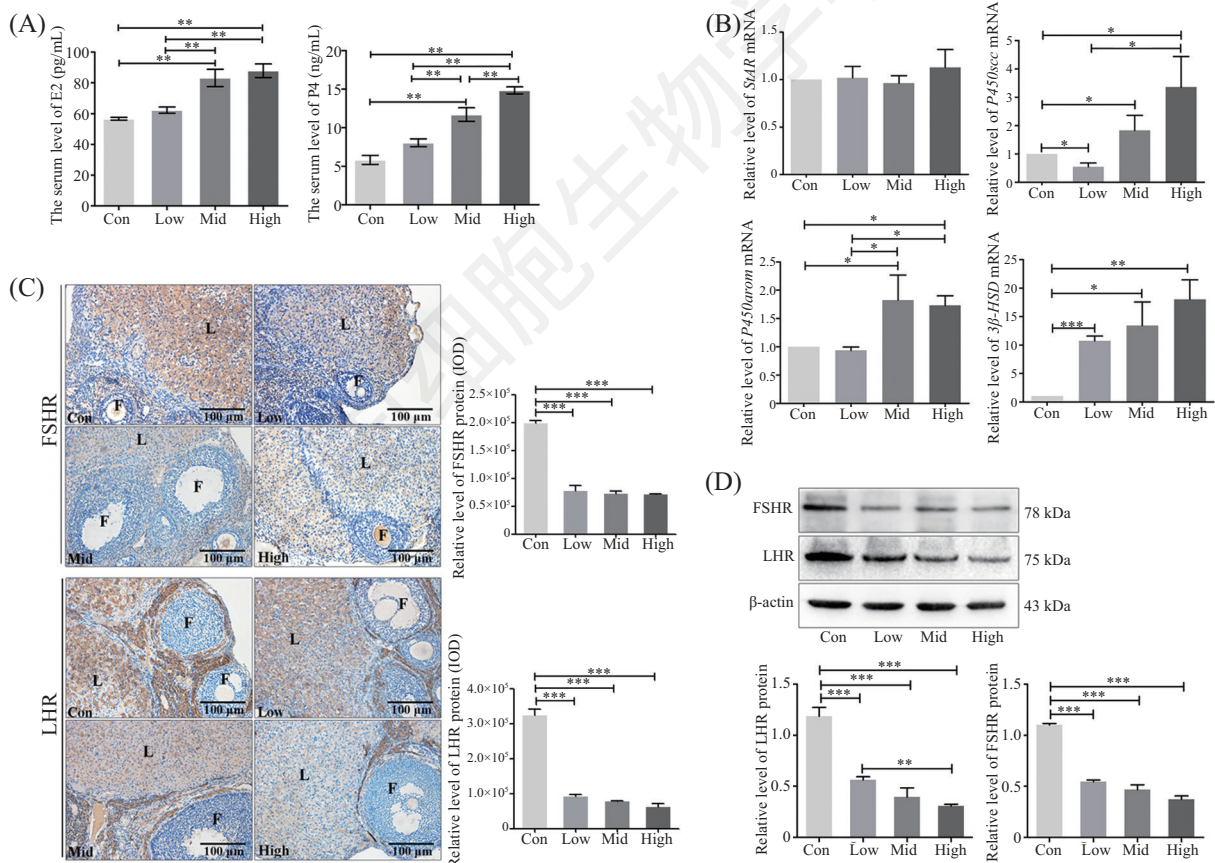
### 2.3 CeO<sub>2</sub>NPs暴露促进卵巢炎症反应

定量PCR结果显示, 与对照组相比, *TNF- $\alpha$* 的mRNA水平在CeO<sub>2</sub>NPs暴露组显著升高( $P<0.05$ ); *IL-6*的mRNA水平在中剂量组较对照组降低( $P<0.05$ ), 而在高剂量组升高( $P<0.05$ ); *IL-1 $\beta$* 的mRNA水平在低、

中、高剂量组卵巢组织中的表达均较对照组升高( $P<0.05$ , 图3A)。Western blot结果显示, IL-1 $\beta$ 蛋白在CeO<sub>2</sub>NPs暴露组卵巢中的表达显著增加( $P<0.05$ , 图3B)。免疫组织化学结果显示, 抗炎因子IL-10的蛋白水平在CeO<sub>2</sub>NPs暴露组有所下降(图3C)。以上结果提示, CeO<sub>2</sub>NPs暴露可诱发卵巢组织的炎症反应。

### 2.4 CeO<sub>2</sub>NPs暴露诱导卵巢细胞凋亡

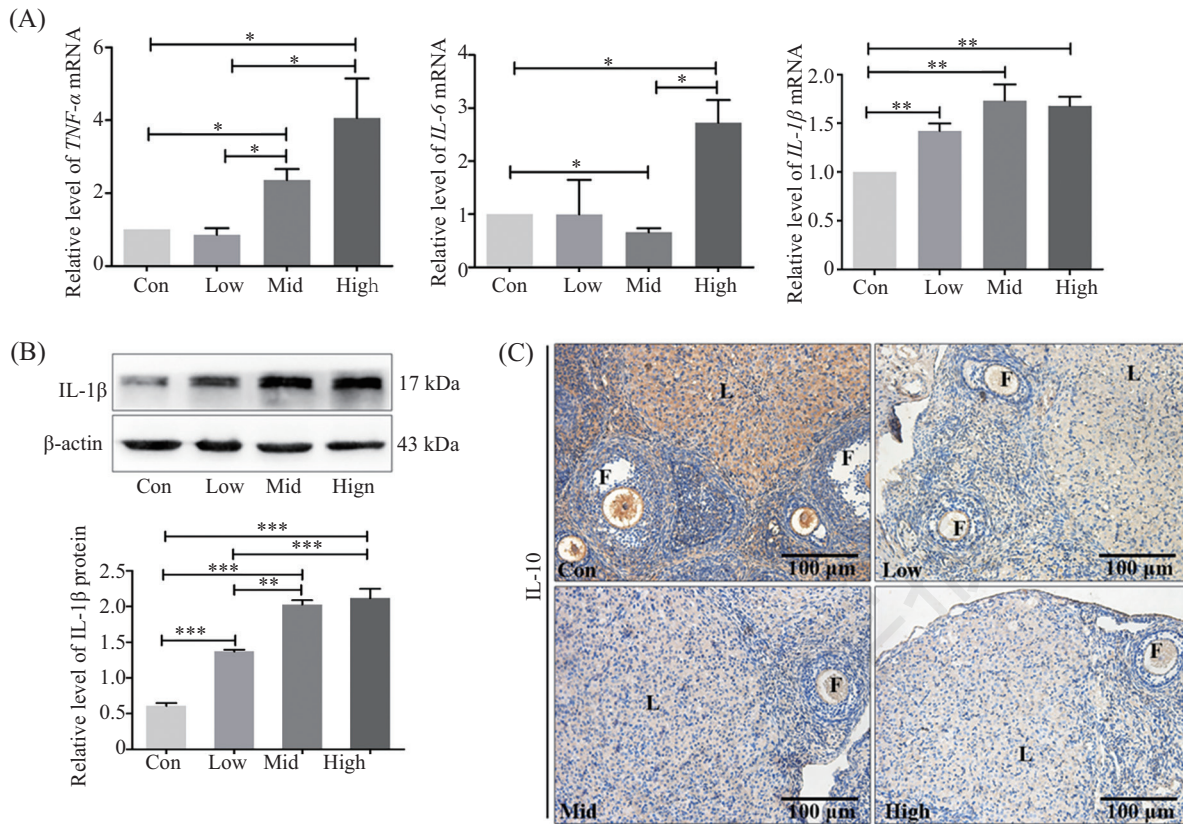
Western blot结果显示, 线粒体凋亡途径相关蛋白Bax蛋白水平在各组之间无显著差异, 而Bcl-2的蛋白水平在CeO<sub>2</sub>NPs暴露组显著降低; 凋亡效应分子caspase3和cleaved-caspase3在各个CeO<sub>2</sub>NPs暴露组卵巢组织中的表达明显增加(图4A)。免疫组织化学结果显示, 凋亡效应分子caspase3和cleaved-caspase3



A: ELISA测定大鼠血清E<sub>2</sub>、P<sub>4</sub>水平; B: Real-time PCR检测合成E<sub>2</sub>、P<sub>4</sub>的关键分子在大鼠卵巢组织中的mRNA水平; C: IHC染色观察FSHR和LHR在大鼠卵巢中的表达, 棕黄色为阳性结果; D: Western blot检测FSHR和LHR在大鼠卵巢中的蛋白水平。n=3, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。L: 黄体; F: 卵泡。

A: the level of E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> were measured by ELISA in rat ovaries; B: the expression of the key enzymes related E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> production by Real-time PCR in rat ovaries; C: IHC staining of FSHR and LHR in rat ovaries; D: FSHR and LHR protein level by Western blot in rat ovaries, brown represents positive signal. n=3, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ . L: luteum; F: follicle.

图2 CeO<sub>2</sub>NPs对卵巢分泌功能的影响  
Fig.2 The effect of CeO<sub>2</sub>NPs on the ovarian endocrine



A: Real-time PCR检测炎症相关因子在大鼠卵巢中的mRNA水平; B: Western blot 检测IL-1 $\beta$ 在大鼠卵巢中的蛋白水平; C: IHC染色观察IL-10在大鼠卵巢中的表达, 棕黄色为阳性结果。n=3, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001。L: 黄体; F: 卵泡。

A: the expression of the inflammation related gene by Real-time PCR in rat ovaries; B: IL-1 $\beta$  protein level by Western blot in rat ovaries; C: IHC staining of IL-1 $\beta$  in rat ovaries, brown represents positive signal. n=3, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001。L: luteum; F: follicle.

图3 CeO<sub>2</sub>NPs对卵巢组织炎症的影响

Fig.3 The effect of CeO<sub>2</sub>NPs on the ovarian inflammation reaction

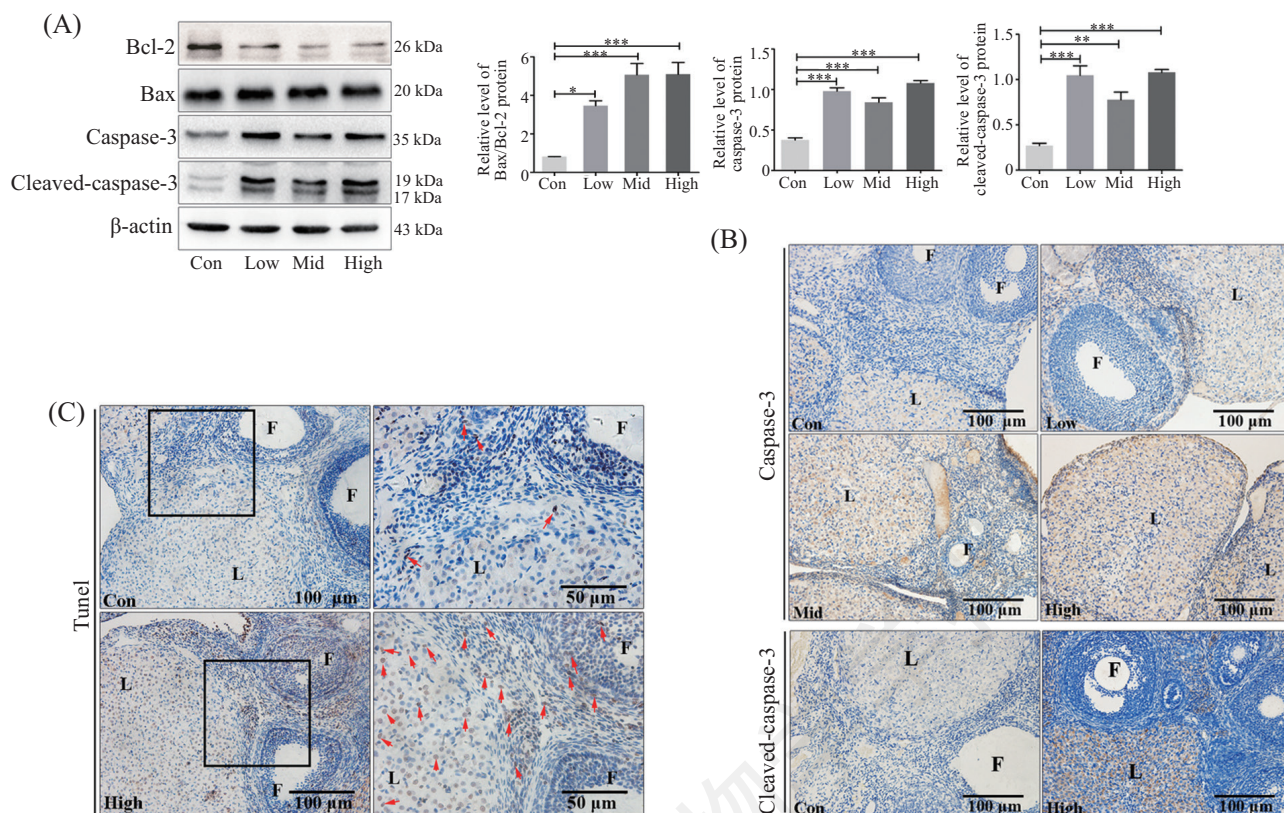
在高剂量CeO<sub>2</sub>NPs暴露组中的表达明显增强(图4B)。TUNEL实验结果显示, 高剂量CeO<sub>2</sub>NPs暴露组中的TUNEL阳性信号较对照组显著增加(图4C)。以上结果提示, CeO<sub>2</sub>NPs暴露可通过线粒体途径诱发卵巢组织的凋亡。

### 3 讨论

CeO<sub>2</sub>NPs被应用于功能陶瓷、化妆品、食品抗氧化剂、生物医药领域等, 其广泛使用使人群接触CeO<sub>2</sub>NPs的机会大大增加。Lopez-Moreno等<sup>[9]</sup>证实, 环境中的二氧化铈纳米粒子可被苜蓿、玉米、番茄和黄瓜等植物吸收, 提示CeO<sub>2</sub>NPs可能进入生产食物链中被人体吸收。人们服用用于诊断或作为药物载体的纳米二氧化铈等也可能通过消化道吸收。故而消化道吸收是CeO<sub>2</sub>NPs的潜在入侵途径。因此, 本研究采用灌胃的方式构建动物模型。研究表明<sup>[10]</sup>, CeO<sub>2</sub>NPs具有催化分解自由基的作用, 可以

提高线粒体膜电位, 防止促凋亡因子对线粒体功能的损害。Hosseini等<sup>[11]</sup>发现, CeO<sub>2</sub>NPs和钇的纳米氧化物对急性铅中毒引起的大鼠海马神经元损伤有保护作用, 可以清除铅暴露产生的ROS, 减少脂质过氧化, 起到抗氧化效果。然而, 雄性SD大鼠经气管滴注CeO<sub>2</sub>NPs后可诱导大鼠肺纤维化损伤<sup>[12]</sup>, CeO<sub>2</sub>NPs消化道暴露可引起雄性小鼠肝肾功能损伤<sup>[13]</sup>。可见CeO<sub>2</sub>NPs的生物安全性颇具争议, 鉴于CeO<sub>2</sub>NPs对卵巢功能影响的研究空白, 本研究通过构建大鼠CeO<sub>2</sub>NPs亚急性暴露模型, 首次对CeO<sub>2</sub>NPs是否影响卵巢功能及相关机制进行探讨。

卵巢不仅能够产生成熟的卵母细胞, 还能够分泌雌孕激素, 调节雌性机体多个生理过程。本研究发现, CeO<sub>2</sub>NPs暴露并未导致卵泡及黄体的形态异常, 但出现激素水平紊乱。卵巢激素E<sub>2</sub>和P<sub>4</sub>的合成依赖于胆固醇和几个关键分子, 首先细胞质中的胆固醇在StAR的作用下进入线粒体, 然后在酶P450scc



A: Western blot检测Bcl2、Bax、caspase3和cleaved-caspase3在大鼠卵巢中的蛋白水平; B: IHC染色观察caspase3和cleaved-caspase3在大鼠卵巢中的表达情况, 棕黄色为阳性结果; C: TUNEL检测大鼠卵巢中的凋亡信号, 棕黄色为阳性信号, 红色箭头指示阳性细胞, 黑色方框内容是右侧放大部分。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 3$ 。L: 黄体; F: 卵泡。

A: Bcl2, Bax, caspase3 and cleaved-caspase3 protein levels by Western blot in rat ovaries; B: IHC staining of caspase3 and cleaved-caspase3 in rat ovaries; C: the level of apoptosis by TUNEL in rat ovaries, brown represents positive signal, red arrows indicate apoptosis cells, the black box content is the enlarged part on the right. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .  $n = 3$ , L: luteum; F: follicle.

图4 CeO<sub>2</sub>NPs对卵巢细胞凋亡的影响

Fig.4 The effect of CeO<sub>2</sub>NPs on the ovarian apoptosis

的作用下线粒体中的胆固醇转变为孕烯醇酮, 它是雌孕激素的前体物质, 接着孕烯醇酮一方面在3β-HSD的作用下转变成孕酮, 另一方面在一系列P450arom的作用下芳香化形成雌激素<sup>[14]</sup>。本研究中, CeO<sub>2</sub>NPs暴露后*StAR*的mRNA水平并未发生显著改变, 而雌孕激素合成的其他3个关键酶的mRNA显著上调, 说明CeO<sub>2</sub>NPs暴露对胆固醇进入线粒体这一过程无明显影响, 但能够促进胆固醇的后续代谢过程, 从而促进E<sub>2</sub>、P<sub>4</sub>的产生。此外, 卵巢激素的分泌受到垂体促性腺激素FSH和LH的调控。LH通过激活膜细胞上的LHR启动信号级联反应, 产生雄激素。FSH通过激活卵巢颗粒细胞上的FSHR, 可诱导卵巢芳香化酶释放, 雄激素在此基础上转化为雌激素<sup>[15]</sup>。FSHR和LHR在各剂量CeO<sub>2</sub>NPs暴露组卵巢组织中的表达都明显下降, E<sub>2</sub>和P<sub>4</sub>的增加可负反馈调节促性

腺激素释放激素的mRNA水平, 从而抑制垂体促性腺激素的分泌, 进而导致FSHR和LHR的表达下调<sup>[16-17]</sup>。提示CeO<sub>2</sub>NPs暴露可能导致卵巢对促性腺激素的反应性降低。尽管本研究显示, CeO<sub>2</sub>NPs短期暴露未出现卵泡和黄体形态异常, 但激素水平的紊乱随时间积累, 可能最终导致卵泡黄体发育障碍及靶器官的异常, 对生殖能力造成损害。

Gojova等<sup>[18]</sup>用不同浓度的CeO<sub>2</sub>NPs(0.001~50 mg/mL)培养HAECs细胞4 h, 炎症标志物IL-8和MCP-1增加且在一定程度上呈现浓度依赖性。本研究发现, CeO<sub>2</sub>NPs暴露导致卵巢炎症分子表达增加, 证实CeO<sub>2</sub>NPs可引起细胞炎症因子的分泌。研究表明, 雌性小鼠经气管滴注暴露于硅纳米颗粒之后, 能够引起卵巢细胞发生凋亡, 并造成卵巢激素分泌紊乱<sup>[19]</sup>。与硅纳米颗粒类似, 我们发现, CeO<sub>2</sub>NPs暴露导致卵巢组织

中凋亡效应分子caspase3和活化的caspase3表达上调,且TUNEL阳性信号增强,即促进卵巢组织的细胞凋亡,同时线粒体凋亡相关蛋白Bax和Bcl2的比值显著增加,提示线粒体凋亡途径可能参与CeO<sub>2</sub>NPs诱发的卵巢组织细胞凋亡。Billig等<sup>[20]</sup>发现,摘除未成年大鼠的垂体后,体外注射高剂量雌激素能够有效抑制卵巢颗粒细胞的凋亡。孕酮能够抑制由糖皮质激素导致的小鼠胸腺细胞的凋亡<sup>[21]</sup>。这提示,E<sub>2</sub>、P<sub>4</sub>能够有效抑制细胞凋亡。本研究中,可能由于CeO<sub>2</sub>NPs引起卵巢细胞的凋亡,从而使E<sub>2</sub>、P<sub>4</sub>应激性增加以抑制细胞凋亡,维持卵巢组织中微环境的平衡。此外,CeO<sub>2</sub>NPs暴露对大鼠外周血中E<sub>2</sub>和P<sub>4</sub>的水平及其合成的关键分子、炎症分子TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的影响呈现出一定的剂量效应关系;然而CeO<sub>2</sub>NPs暴露对凋亡相关分子caspase3和cleaved-caspase3的影响中却未表现出剂量效应关系,这可能与E<sub>2</sub>和P<sub>4</sub>抑制细胞凋亡以及CeO<sub>2</sub>NPs暴露的时间等综合效应有关。CeO<sub>2</sub>NPs有不同的吸收、组织分布和清除方式,研究过程中确定其粒径、形状、聚集状态、孔隙度、表面积、表面电荷等特征将有助于获得更具可比性的研究资料。目前,CeO<sub>2</sub>NPs的毒理学研究尚处于初步阶段,相关毒代动力学数据极少。研究焦点集中在组织细胞的炎症反应、氧化应激、凋亡等,具体的作用机制尚不明确。CeO<sub>2</sub>NPs可通过MAPK信号通路以调节肝癌细胞的凋亡和稳态<sup>[22]</sup>,因此我们猜想,MAPK信号通路在CeO<sub>2</sub>NPs暴露诱导的卵巢细胞凋亡中可能也发挥重要作用。

综上,CeO<sub>2</sub>NPs亚急性暴露不影响卵巢的形态结构,但引起卵巢组织发生炎症反应,同时促进卵巢细胞凋亡,使卵巢细胞对促性腺激素反应性降低,造成卵巢激素分泌紊乱,从而导致卵巢功能异常。本研究首次揭示了CeO<sub>2</sub>NPs对卵巢功能的影响,虽然补充完善了一些CeO<sub>2</sub>NPs的生物安全性的实验数据,但具体作用分子机制仍需要深入研究。

### 参考文献 (References)

- Zhu D, Xu A, Liang J. Effect of morphology of dispersed nano-CeO<sub>2</sub> on far infrared emission property of natural tourmaline. *J Nanosci Nanotechnol* 2011; 11(11): 9594-9.
- Hirst SM, Karakoti A, Singh S, Self W, Tyler R, Seal S, *et al.* Bio-distribution and *in vivo* antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice. *Environ Toxicol* 2013; 28(2): 107-18.
- 王春燕, 李宁, 佟鹏, 苟巧, 田梅, 邵帅, 等. 纳米氧化铈对小鼠辐射损伤防护作用的研究. *中国辐射卫生*(Wang Chunyan, Li Ning, Tong Peng, Gou Qiao, Tian Mei, Shao Shuai, *et al.* Protective effect of cerium oxide nanoparticles on mice induced by  $\gamma$ -rays. *Chin J Radiol Health*) 2016; 25(3): 273-6.
- Lin W, Huang YW, Zhou XD, Ma Y. Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. *Int J Toxicol* 2006; 25(6): 451-7.
- Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest* 2010; 120(4): 963-72.
- Oktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127(1): 1-9.
- Preaubert L, Courbiere B, Achard V, Tassistro V, Greco F, Orsiere T, *et al.* Cerium dioxide nanoparticles affect *in vitro* fertilization in mice. *Nanotoxicology* 2016; 10(1): 111-7.
- Kumari M, Kumari SI, Grover P. Genotoxicity analysis of cerium oxide micro and nanoparticles in Wistar rats after 28 days of repeated oral administration. *Mutagenesis* 2014; 29(6): 467-79.
- Lopez-Moreno ML, de la Rosa G, Hernandez-Viezas JA, Peralta-Videa JR, Jose R, Gardea-Torresdey JZ, *et al.* XAS corroboration of the uptake and storage of CeO<sub>2</sub> nanoparticles and assessment of their differential toxicity in four edible plant species. *J Agric Food Chem* 2010; 58(6): 3689-93.
- Uguz AC, Cig B, Espino J, Bejarano I, Naziroglu M, Rodriguez AB, *et al.* Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. *J Pineal Res* 2012; 53(1): 91-8.
- Hosseini A, Sharifi AM, Abdollahi M, Najafi R, Baeri M, Rayegan S, *et al.* Cerium and yttrium oxide nanoparticles against lead-induced oxidative stress and apoptosis in rat hippocampus. *Biol Trace Elem Res* 2015; 164(1): 80-9.
- Ma JY, Mercer RR, Barger M, Schwegler-Berry D, Scabilloni J, Ma JK, *et al.* Induction of pulmonary fibrosis by cerium oxide nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 262(3): 255-64.
- 焦欢, 冯昶, 范广勤, 陈陵. 纳米氧化铈对小鼠肝肾功能的慢性影响. *中国工业医学杂志*(Jiao Huan, Feng Chang, Fan Guanqin, Chen Ling. Survey of chronic effect of nano cerium oxide on hepatic and renal functions in mice. *Chinese J Ind Med*) 2013; 26(1): 39-41.
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 2002; 346(5): 340-52.
- Bukovsky A, Indrapichate K, Fujiwara H, Cekanova M, Ayala ME, Dominguez R, *et al.* Multiple luteinizing hormone receptor (LHR) protein variants, interspecies reactivity of anti-LHR mAb clone 3B5, subcellular localization of LHR in human placenta, pelvic floor and brain, and possible role for LHR in the development of abnormal pregnancy, pelvic floor disorders and Alzheimer's disease. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 46.
- Spratt DP, Herbison AE. Regulation of preoptic area gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) mRNA expression by gonadal steroids in the long-term gonadectomized male rat. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 47(1/2): 125-33.
- Sarkar DK, Fink G. Luteinizing hormone releasing factor in pituitary stalk plasma from long-term ovariectomized rats: effects of steroids. *J Endocrinol* 1980; 86(3): 511-24.
- Gojova AI, Lee JT, Jung HS, Guo B, Barakat AI, Kennedy IM. Effect of cerium oxide nanoparticles on inflammation in vascular endothelial cells. *Inhal Toxicol* 2009; 21(1): 123-30.



- 19 Liu J, Yang M, Jing L, Ren L, Wei J, Zhang J, *et al.* Silica nanoparticle exposure inducing granulosa cell apoptosis and follicular atresia in female Balb/c mice. *Environ Sci Pollut Res Int* 2018; 25(4): 3423-34.
- 20 Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 1993; 133(5): 2204-12.
- 21 McMurray RW, Wilson JG, Bigler L, Xiang L, Lagoo A. Progesterone inhibits glucocorticoid-induced murine thymocyte apoptosis. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22(11): 955-65.
- 22 Cheng G, Guo W, Han L, Chen E, Kong L, Wang L, *et al.* Cerium oxide nanoparticles induce cytotoxicity in human hepatoma SMMC-7721 cells via oxidative stress and the activation of MAPK signaling pathways. *Toxicol In Vitro* 2013; 27(3): 1082-8.

中国细胞生物学学报