

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002153

氧化铜纳米颗粒经 p38 和 ERK 信号通路诱导巨噬细胞自噬性损伤

吴琼¹, 何会¹, 于超¹, 张军²

(1. 重庆医科大学药学院药理学教研室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学生命科学研究院医学实验技术教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:分析氧化铜纳米颗粒(copper oxide nanoparticles, CuONPs)对 Raw264.7 巨噬细胞自噬的影响,并探讨调节自噬的相关信号通路。**方法:**用透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)观察 CuONPs 的形态特征;利用 Raw264.7 巨噬细胞进行体外实验;不同浓度梯度的 CuONPs 处理巨噬细胞 24 h,用 MTS 法检测细胞活力;TEM 观察自噬小体的形成情况;自噬小体报告质粒 GFP-LC3 瞬时转染细胞,激光共聚焦显微镜观察 CuONPs 处理前后 Raw264.7 细胞胞质中 GFP-LC3 蛋白绿色点状聚集情况;利用 Western blot 检测细胞中自噬相关蛋白 LC3-II/I 的表达情况及相关的 p38 和 ERK 信号通路磷酸化水平。**结果:**CuONPs 可显著抑制 Raw264.7 细胞活力,并呈一定的剂量依赖关系($F=35.987, P=0.000$);TEM 结果显示, CuONPs 颗粒沉积于自噬体;激光共聚焦结果表明 GFP-LC3 转染细胞后, CuONPs 处理组 GFP-LC3 点状聚集明显多于对照组,此外 Western blot 结果显示 LC3-II/I 表达水平明显呈剂量依赖性上升($F=156.585, P=0.000$),上述结果说明 CuONPs 能促进巨噬细胞中自噬小体的生成;而且 Western blot 结果表明 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 CuONPs 处理细胞,能明显上调 p-p38、p-ERK 蛋白水平,并呈现时间依赖性升高(p-p38: $F=72.899, P=0.000$; p-ERK: $F=123.300, P=0.000$)。**结论:**CuONPs 能抑制细胞活力,并诱导巨噬细胞自噬活化,并且 p38 和 ERK 通路可能参与了自噬的分子调控。

【关键词】纳米氧化铜;巨噬细胞;细胞自噬;p38 和 ERK 信号通路**【中图分类号】**R114**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-01-08

Copper oxide nanoparticles induce autophagic injury in macrophages via the p38 and ERK signaling pathways

Wu Qiong¹, He Hui¹, Yu Chao¹, Zhang Jun²

(1. Teaching and Research Section of Pharmacology, College of Pharmacy, Chongqing Medical University;

2. Teaching and Research Section of Medical Experimental Technique, Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of copper oxide nanoparticles (CuONPs) on autophagy of Raw264.7 macrophages and related signaling pathways involved in the regulation of autophagy. **Methods:** Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the morphological characteristics of CuONPs. Raw264.7 macrophages were used for in vitro experiment. Raw264.7 macrophages were exposed to different concentrations of CuONPs for 24 hours, and then MTS assay was used to measure cell viability. TEM was used to observe the formation of autophagosome. After transient transfection of macrophages with green fluorescent protein-light chain 3 (GFP-LC3) plasmid, a laser scanning confocal microscope was used to observe GFP-LC3 green fluorescent puncta in the cytoplasm of Raw264.7 macrophages before and after CuONPs treatment. Western blot was used to measure the expression of the autophagy-related protein microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3-II/I) and the level of phosphorylation of the p38 and ERK signaling pathways in macrophages. **Results:** CuONPs significantly inhibited the viability of Raw264.7 macrophages in a dose-dependent manner ($F=35.987, P=0.000$). TEM images showed the deposition of CuONPs in autophagosome. The laser scanning confocal microscope

showed that after the macrophages were transfected with GFP-LC3, the CuONPs treatment group had a significantly higher number of GFP-LC3 green fluorescence puncta than the control group. In addition, Western blot showed a significant dose-dependent increase in LC3-II/I after CuONPs treatment ($F=156.585, P=0.000$). The above results indicated that CuONPs promoted the formation of autophagosome in macrophages.

作者介绍: 吴琼, Email: 553055259@qq.com,

研究方向: 心血管疾病发生机制。

通信作者: 张军, Email: zhangjun@cqmu.edu.cn。**基金项目:** 重庆市科学技术委员会资助项目(编号: cstc2018jcyjAX0355、cstc2015jcyjBX0053)。**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190510.1534.072.html> (2019-05-13)

Western blot also showed that CuONPs at a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ significantly upregulated the protein levels of p-p38 and p-ERK in a time-dependent manner (p-p38: $F=72.899$, $P=0.000$; p-ERK: $F=123.300$, $P=0.000$). **Conclusion:** CuONPs can reduce cell viability and induce the activation of autophagy in macrophages, and the p38 and ERK signaling pathways may be involved in the molecular regulation of autophagy

【Key words】copper oxide nanoparticle; macrophage; autophagy; p38 and ERK signaling pathways

流行病学资料显示,纳米颗粒暴露会诱发或者加重多种疾病,如呼吸道阻塞、心血管疾病、肺癌等。大量研究表明,纳米颗粒对细胞的毒性作用主要包括氧化胁迫、细胞器损伤、基因毒性等。氧化铜纳米颗粒(copper oxide nanoparticles, CuONPs)因其独特的物理化学性质而广泛应用于多种领域^[1],但是其在生产和使用过程中不可避免进入空气对人体造成危害,且相对于其他纳米材料 CuONPs 显示出较大的毒性^[2]。研究表明,在体内, CuONPs 可对动物的肝脏、肾脏、脾脏等重要器官产生毒性作用^[3-4];在体外, CuONPs 能对多种细胞如肺上皮细胞、呼吸道上皮细胞等产生毒性作用^[5-6]。自噬是真核细胞利用溶酶体降解细胞内受损的细胞器及蛋白等大分子物质的过程,以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新,是细胞重要的生存机制。当自噬功能发生紊乱时,细胞功能会受损,进而导致某些疾病的发生。近年来研究证实自噬功能紊乱可能是纳米材料诱发细胞毒性的一种重要机制^[7]。巨噬细胞是机体防御功能的重要组成部分,广泛参与机体的免疫反应,并且被证实与动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)等心血管疾病的发生发展密切相关。目前 CuONPs 对巨噬细胞的影响目前还不明确,因此本课题着重研究 CuONPs 对 Raw264.7 巨噬细胞的影响,并探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

主要材料及来源:纳米氧化铜(CuONPs)(美国 Sigma 公司);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(BI 公司);胰蛋白酶(美国 AB Sciex 公司);小鼠 Raw 264.7 巨噬细胞(美国 ATCC);质粒小量快速抽提试剂盒(中国美基生物);X-tremeGENE HP DNA 转染试剂(罗氏公司);MTS(美国 Promega 公司); β -actin 抗体(中国博奥森公司);LC3 抗体(美国 CST 公司);p62/SQSTM1 抗体(英国 Abcam 公司);p-p38(美国 CST 公司);p-ERK 抗体(美国 CST 公司);辣根过氧化物酶标记

的山羊抗兔抗体(中国碧云天生物);增强 ECL 发光液(中国凯基生物);CO₂ 培养箱(美国 Thermo Scientific 公司);透射电子显微镜(TEM, 日本 JEOL 公司);酶标仪(美国 BIO Tek 公司);激光共聚焦显微镜(日本尼康公司);电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);ChampChemi610 凝胶成像系统(北京赛智创业科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 CuONPs 微观形态观察和粒径测量 用去离子水配制 10 $\mu\text{g/mL}$ 的纳米 CuONPs 悬液,室温超声 2 h,使颗粒分散均匀。将悬液滴在的铜网上,室温使其晾干,用透射电子显微镜观察颗粒的形态和分散性。

1.2.2 细胞培养 Raw264.7 巨噬细胞接种于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂、饱和湿度培养箱中常规传代培养,2~3 d 传代 1 次。细胞贴壁生长良好,取生长较好的细胞进行实验。

1.2.3 MTS 检测细胞活力 细胞以 1.0×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μL 细胞液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养过夜,待细胞贴壁后,加入不同浓度 CuONPs (0、5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$),于培养箱中培养 24 h,每孔加入 10 μL MTS,培养箱中继续孵育 2 h 后,终止培养,酶标仪分别检测 490 nm 和 630 nm 波长各孔的吸光度值。每个浓度设 3 个复孔,以不加 CuONPs 组为对照组,加入不同浓度 CuONPs 的处理组为实验组,计算各组的细胞活力。

1.2.4 细胞的透射电镜样品制备 Raw264.7 巨噬细胞按照不同条件处理后,用 0.25%胰酶消化 3 min,1 000 r/min 离心 5 min,倒掉上清,加 1.5 mL PBS 悬浮,于 1 000 r/min 离心 10 min,倒掉上清,用 4%戊二醛固定,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBS 洗后用 1%锇酸固定,用梯度乙醇、无水丙酮脱水,然后用 Epon 816 树脂包埋。超薄切片用醋酸双氧铀-枸橼酸铅双重染色。JEM-1400Plus 透射电子显微镜观察自噬体形态和结构。

1.2.5 GFP-LC3 质粒转化 从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出感受态细胞 (150 μL),迅速放置于冰上解冻(使成冰水混合物最佳);将 GFP-LC3 质粒 (2 μL) (课题组保存)加入到装有感受态细胞的 EP 管中,轻轻旋转几次混匀,冰浴 30 min;将 EP 管放入 42 $^{\circ}\text{C}$ 的金属浴,静置 60 s;快速将 EP 管转移到冰浴中,使细胞冷却 3 min;向 EP 管中加入 200 μL 无抗性的 LB 培养基,将管放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的摇床,孵育 1 h (220 r/min);从 EP 管中取 20 μL 菌,转移到含 10 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基上,用

涂布珠将细菌涂抹均匀,平板倒置,于 37 °C 培养箱中培养 12~16 h,观察是否生长出肉眼可见的单菌落;挑取 1 个单菌落接种到 10 mL 含 10 µg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,于 37 °C,220 r/min 振荡培养 16 h;最后用 Magen 质粒小量快速抽提试剂盒(改良型)提取细菌中的 GFP-LC3 质粒,测定质粒的浓度,做好标记,存放于 -20 °C 冰箱,备用。

1.2.6 GFP-LC3 质粒瞬时转染实验 将细胞按每孔 1×10^5 个细胞接种于 24 孔板中,过夜待细胞融合至 60% 左右时使用 X-tremeGENE HP DNA 转染试剂(罗氏公司),按照说明书方法瞬时转染重组质粒 GFP-LC3(-20 °C 冰箱保存)。在 1.5 mL EP 管中加入 150 µL Opti-MEM 和 3 µg GFP-LC3 质粒,混匀制成 DNA 稀释液;在另一个 EP 管中加入 150 µL Opti-MEM 和 6 µL 转染试剂,混匀,室温静置 5 min。将 DNA 稀释液和 DNA 转染试剂稀释液混匀,室温静置 25 min,用枪头均匀逐滴加入 4 个孔中(每孔约加 75 µL 混合液),轻轻摇晃培养板,使混合液在细胞中均匀分散。转染后的细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 6 h 后更换新鲜培养基,继续培养过夜,显微镜下观察转染后的细胞中绿色荧光表达情况。将转染质粒后的细胞分为对照组和实验组,对照组不做任何处理,实验组用 10 µg/mL CuONPs 处理 24 h。4% 多聚甲醛固定细胞,甘油封片。激光共聚焦显微镜观察两组细胞中 GFP-LC3 绿色点状荧光的表达情况。

1.2.7 Western blot 检测相关蛋白表达 不同浓度的 CuONPs(0, 1, 3, 10, 20 µg/mL)处理细胞,培养 24 h 后,吸出培养基,细胞中加入适量 RIPA 裂解液,于冰上裂解 20 min,收集到 1.5 mL EP 管,100 °C 煮沸 8 min,于 -20 °C 保存样本蛋白。样品于 8%、10% 或 15% 的 SDS-PAGE 进行细胞蛋白电泳(120 V),蛋白转移至 PVDF 膜上(300 mA, 2 h),用 0.4% Gelatin 室温封闭 2 h,裁取目的条带,分别加入相应的 LC3、p62/SQSTM1、p-p38、p-ERK 和 β-actin 一抗于 4 °C 摇床孵育过夜,TBST 洗 3 次,再加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗,于室温摇床孵育 2 h,TBST 洗 3 次,ECL 发光试剂显影,用凝胶成像系统进行拍照。所得免疫印迹的定量用 ImageJ 进行灰度分析。分别计算各蛋白和内参 β-actin 比值,评价自噬体的形成及相关信号通路激活情况。

1.3 统计学处理

所有数据采用 Graphpad Prism 6.0 统计分析软件进行分析处理,实验数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组计量资料比较采用单因素方差分析,随后采用 LSD-*t* 法进行组间两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 CuONPs 的基本形态特性

透射电子显微镜结果显示,CuONPs 平均粒径大小为

52 nm,颗粒大多呈现球形或近球形,均一性较好,然而分散性一般并且出现一定的聚合(图 1)。

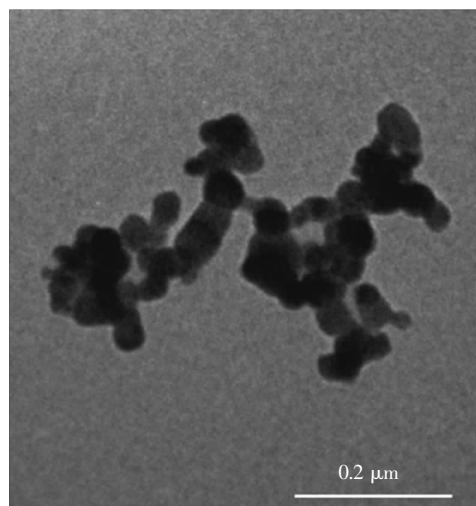
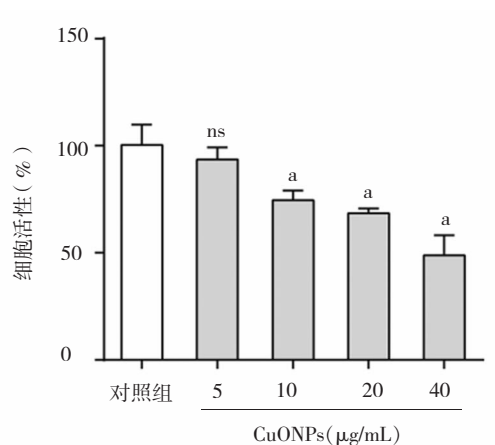


图 1 CuONPs 的透射电镜照片

2.2 不同浓度 CuONPs 对小鼠 Raw264.7 巨噬细胞活力的影响

MTS 结果显示,不同浓度的 CuONPs(5、10、20、40 µg/mL)处理小鼠 Raw264.7 细胞 24 h,细胞活力呈一定的剂量依赖性下降趋势。将对照组的细胞活力设为 100%,不同浓度 CuONPs 处理后细胞活力相对值分别为 0.937 ± 0.056 、 0.746 ± 0.045 、 0.685 ± 0.022 、 0.488 ± 0.094 ,统计结果显示结果有统计学意义($F=35.987$, $P=0.000$)。结果表明 CuONPs 处理会对巨噬细胞产生细胞毒性作用(图 2)。

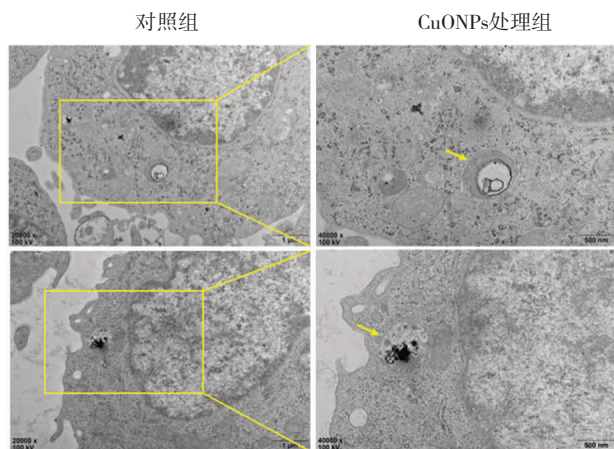


ns: 与对照组相比,没有统计学差异 ($P>0.05$, $n=3$); a: 与对照组相比,有统计学差异 ($P<0.05$, $n=3$)

图 2 MTS 检测不同浓度 CuONPs 对 Raw 264.7 细胞活力的影响

2.3 CuONPs 对 Raw 264.7 巨噬细胞自噬水平的影响

透射电镜结果显示,10 µg/mL CuONPs 处理细胞 24 h 后,细胞中出现包裹 CuONPs 颗粒的自噬体(图 3 箭头所示)。结果表明,加入培养基中的 CuONPs 能被巨噬细胞所吞噬,进入细胞的纳米颗粒可能影响其功能(图 3)。



注:黄色箭头标记的是吞噬了 CuONPs 的自噬小体

图 3 透射电镜显示细胞中自噬体的形成

2.4 激光共聚焦显微镜观察 GFP-LC3 融合蛋白的荧光斑点情况

为了验证 CuONPs 对 Raw 264.7 巨噬细胞的自噬体形成的影响,用 GFP-LC3 融合质粒转染细胞,使细胞短时间内表达 GFP-LC3 绿色蛋白。激光共聚焦结果显示,CuONPs 处理细胞后,细胞中 GFP-LC3 融合蛋白出现特有的绿色点状聚集自噬小体,而在对照组细胞中,GFP-LC3 融合蛋白弥散在胞浆中,很少形成代表自噬体的荧光斑点。由此说明,CuONPs 诱导细胞产生自噬小体(图 4)。

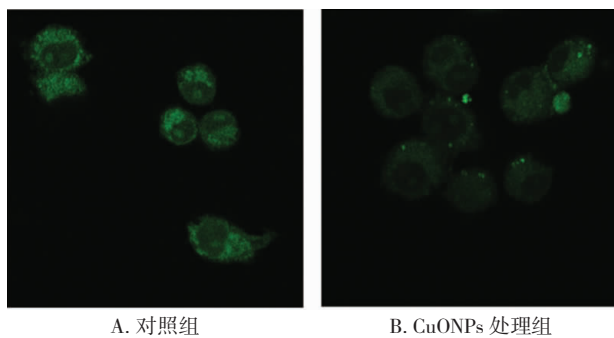
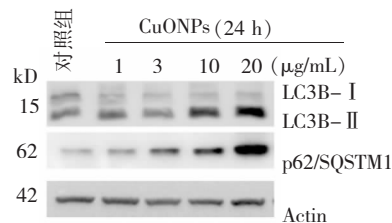


图 4 激光共聚焦显微镜观察 GFP-LC3 绿色荧光点状物的形成

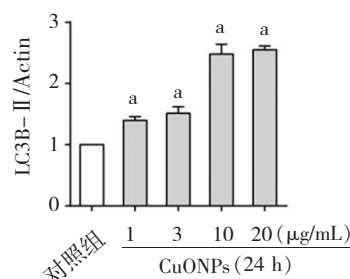
2.5 CuONPs 对 Raw 264.7 细胞 LC3B-II 蛋白、p62/SQSTM1 蛋白表达的影响

CuONPs 处理 Raw 264.7 巨噬细胞 24 h,Western blot 检测细胞自噬体形成的相关蛋白 LC3B 和 p62/SQSTM1 的表达情况。将对照组的结果设为 1,不同浓度 CuONPs (5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$) 处理组中 LC3B-II 相对表达值分别为 1.398 ± 0.061 , 1.513 ± 0.108 , 2.482 ± 0.162 和 2.551 ± 0.065 ,结果表明随着 CuONPs 作用浓度的增加,LC3B-II/I 表达水平显著升高($F=156.600, P=0.000$);其中 CuONPs (1、3、10、20 $\mu\text{g/mL}$) 处理组与对照组相比有统计学差异($P<0.05$)(图 5A、B)。同时结果显示自噬体形成的另一蛋白 p62/SQSTM1 也明显上调($F=$

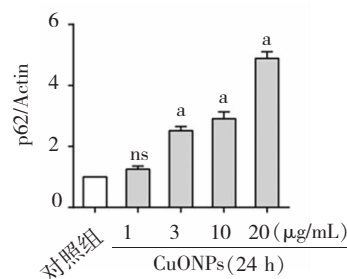
$285.800, P=0.000$);其中,CuONPs (3、10、20 $\mu\text{g/mL}$) 处理组与对照组相比有统计学差异($P<0.05$)(图 5A、C)。



A. LC3B 和 p62/SQSTM1 蛋白的 Western blot 结果图



B. LC3B-II 蛋白表达的柱状图



C. p62/SQSTM1 蛋白表达的柱状图

ns: 与对照组相比,没有统计学差异 ($P>0.05, n=3$);

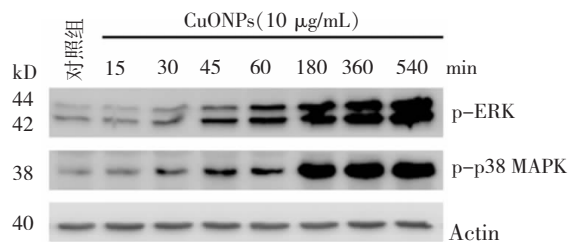
a: 与对照组相比,有统计学差异 ($P<0.05, n=3$)

图 5 Western blot 检测 CuONPs 对自噬相关蛋白 LC3B-II、p62/SQSTM1 的影响

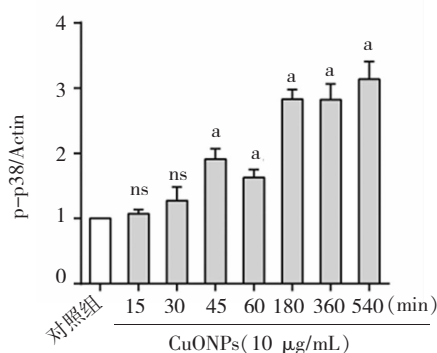
2.6 CuONPs 对 Raw 264.7 细胞 p38 和 ERK 磷酸化的影响

CuONPs (10 $\mu\text{g/mL}$) 处理 Raw 264.7 细胞不同时间点 (15、30、45、60、180、360、540 min) 后,Western blot 检测细胞内 p38、ERK 磷酸化水平。将对照组的结果设为 1,不同浓度 CuONPs 处理组中 p-p38 相对表达值分别为 1.073 ± 0.064 , 1.274 ± 0.211 , 1.913 ± 0.155 , 1.629 ± 0.122 , 2.829 ± 0.151 , 2.822 ± 0.238 和 3.133 ± 0.275 ;而不同浓度 CuONPs 处理组中 p-ERK 相对表达值分别为 0.993 ± 0.018 , 1.272 ± 0.164 , 1.680 ± 0.137 , 2.114 ± 0.299 , 2.682 ± 0.196 , 3.166 ± 0.070 和 3.625 ± 0.137 。结果显示,10 $\mu\text{g/mL}$ 的 CuONPs 处理 Raw 264.7 细胞,随着作用时间的延,p-p38、p-ERK 的蛋白水平出现时间依赖性的上调趋势(p-p38: $F=72.900, P=0.000$;p-ERK: $F=123.300, P=0.000$)

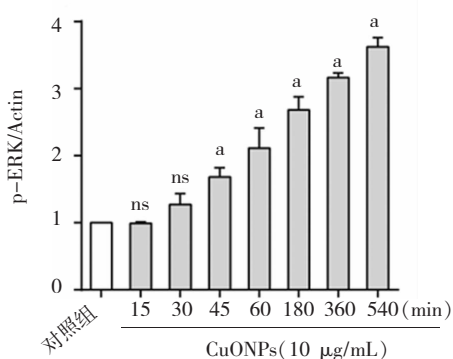
(图 6A)。p-p38 和 p-ERK 分别从 45 min 和 30 min 开始明显上升,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)(图 6B、C)。研究表明 p38/ERK 信号通路可能参与 CuONPs 诱导 Raw 264.7 细胞产生自噬活化。



A. p-p38 和 p-ERK 的 Western blot 结果图



B. p-p38 蛋白表达的柱状图



C. p-ERK 蛋白表达的柱状图

ns: 与对照组相比,差异没有统计学意义 ($P>0.05$, $n=3$);

a: 与对照组相比,差异有统计学意义 ($P<0.05$, $n=3$)

图 6 Western blot 显示 CuONPs 对 p-p38 和 p-ERK 信号通路的影响

3 讨论

纳米材料是指在三维空间中至少有一维处于纳米尺寸(1~100 nm)的材料,因为它在光、电、磁和热等方面的物理特性而广泛运用于医学检验诊

断、药物递送、基因治疗等生物医药领域。随着纳米材料的广泛运用,其毒性作用已受到人们的普遍关注^[8]。近年来研究表明,纳米材料暴露与心血管疾病的发生发展密切相关^[9]。纳米材料颗粒经肺部组织进入血液循环系统的可通过引发内皮细胞损伤诱发炎症,加速动脉粥样硬化等心血管疾病的发生与发展^[10-12]。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性血管病变,是目前对人类健康危害最严重且最常见的慢性病之一,其发病机制非常复杂。动脉粥样硬化发生发展的核心环节是形成以泡沫细胞为主要细胞成分的粥样斑块。已有研究表明巨噬细胞是形成泡沫细胞的重要来源,其在 AS 发生发展过程中具有重要作用。血管内皮炎症性损伤后,血液中的单核细胞会穿透血管内皮,在血管内膜层转化为巨噬细胞,巨噬细胞吞噬过量的氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)进而形成泡沫细胞,过多的泡沫细胞堆积形成脂质条纹,最终在血管内膜下形成粥样斑块。

自噬广泛存在于真核细胞中,是细胞对内部结构降解及重复利用的过程,是细胞进行自我保护的一种重要机制,在脂质的降解过程中起重要作用^[13]。大量研究证据表明,自噬可以调节巨噬源性泡沫细胞形成,参与并影响动脉粥样硬化的发生和发展进程^[14-15]。本研究利用 CuONPs 处理小鼠巨噬细胞 Raw 264.7,结果显示 CuONPs 可显著抑制 Raw 264.7 细胞活力,并呈一定的剂量依赖关系。TEM 结果显示, CuONPs 颗粒沉积于自噬体中;激光共聚焦结果表明 GFP-LC3 转染细胞后, CuONPs 处理组 GFP-LC3 点状聚集明显多于对照组; Western blot 结果显示 LC3-II/I 表达水平明显呈剂量依赖性上升。以上结果共同说明 CuONPs 能促进巨噬细胞中自噬活化,进而诱导巨噬细胞死亡。基于巨噬源性泡沫细胞在动脉粥样硬化过程中的作用,本研究推测 CuONPs 诱导巨噬细胞自噬性死亡可能其加剧动脉粥样硬化发展的主要原因。

为探讨 CuONPs 诱导巨噬细胞自噬活化的机制,本研究检测了自噬上游信号通路。Western blot 结果表明 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 CuONPs 处理细胞,能显著上调 p-p38、p-ERK 蛋白水平。p38 信号通路作为 MAPK 信号通路里的一个亚型,是炎症反应中的一

个重要参与者,当机体受到感染、组织损伤等信号刺激时,p38MAPK 通路会活化并发挥重要调节作用^[16]。p38 MAPK 在调控自噬中也发挥重要作用。有研究认为 p38 MAPK 信号通路的激活与细胞的自噬和细胞凋亡密切相关,其机制是通过抑制 mTOR 依赖性途径,激活细胞的自噬^[17]。当细胞处于饥饿条件时,MAPK 下游的激酶 MAPKAPK2/MAPKAPK3 能通过激活 Beclin1,上调细胞的自噬水平^[18]。ERK 是一类丝/苏氨酸蛋白激酶,也是 MAPK 家族重要成员之一,包括 ERK1 和 ERK2。当 ERK 激活时,自噬被激活,进而诱导细胞的凋亡^[19]。有关 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路调控自噬的作用机制至今还未阐明。目前有研究表明,Raf/MEK/ERK 信号通路在应激条件下能够活化 ERK,可直接促进自噬标志性蛋白 LC3 与 p62 的上调表达,激活细胞的自噬^[20]。

综上所述,本研究首次发现 CuONPs 能诱导小鼠 Raw264.7 巨噬细胞发生自噬,并促进细胞死亡,同时还能显著上调 p38 和 ERK 的磷酸化水平。本研究结果表明,CuONPs 导致了细胞自噬失衡,并进一步造成细胞毒性。p38 和 ERK 两条通路可能在 CuONPs 导致细胞自噬失衡中起到重要作用。

参 考 文 献

[1] Din MI, Arshad F, Hussain Z, et al. Green adeptness in the synthesis and stabilization of copper nanoparticles; catalytic, antibacterial, cytotoxicity, and antioxidant activities[J]. *Nanoscale Research Letters*, 2017, 12(1): 638.

[2] Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, et al. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes[J]. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21(9): 1726–1732.

[3] Chen Z, Meng H, Xing G, et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*[J]. *Toxicology Letters*, 2006, 163(2): 109–120.

[4] Lei R, Wu C, Yang B, et al. Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: a rapid *in vivo* screening method for nanotoxicity[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 232(2): 292–301.

[5] Akhtar MJ, Kumar S, Alhadlaq HA, et al. Dose-dependent genotoxicity of copper oxide nanoparticles stimulated by reactive oxygen species in human lung epithelial cells[J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2013, 32(5): 809–821.

[6] Fahmy B, Cormier SA. Copper oxide nanoparticles induce oxida-

tive stress and cytotoxicity in airway epithelial cells[J]. *Toxicology In Vitro*, 2009, 23(7): 1365–1371.

[7] Stern ST, Adisheshaiah PP, Crist RM. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity[J]. *Particle & Fibre Toxicology*, 2012, 9: 20.

[8] 丁玲, 刘鹏, 李世迁. 纳米材料毒性和安全性研究进展[J]. *材料导报*, 2010, 24(3): 29–32.

[9] 周维, 李艳博, 郭彩霞. 纳米颗粒物对心血管系统的影响及其作用机制研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(2): 294–298.

[10] Quan C, Sun Q, Lippmann M, et al. Comparative effects of inhaled diesel exhaust and ambient fine particles on inflammation, atherosclerosis, and vascular dysfunction[J]. *Inhalation Toxicology*, 2010, 22(9): 738–753.

[11] Helfenstein M, Miragoli M, Rohr S, et al. Effects of combustion-derived ultrafine particles and manufactured nanoparticles on heart cells *in vitro*[J]. *Toxicology*, 2008, 253(1–3): 70–78.

[12] Møller P, Mikkelsen L, Vesterdal LK, et al. Hazard identification of particulate matter on vasomotor dysfunction and progression of atherosclerosis[J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2011, 41(4): 339–368.

[13] Cingolani F, Czaja MJ. Regulation and functions of autophagic lipolysis[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2016, 27(10): 696–705.

[14] Shao BZ, Han BZ, Zeng YX, et al. The roles of macrophage autophagy in atherosclerosis[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2016, 37(2): 150–156.

[15] Vindis C. Autophagy: an emerging therapeutic target in vascular diseases[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2015, 172(9): 2167–2178.

[16] Hsu WY, Chao YW, Tsai YL, et al. Resistin induces monocyte-endothelial cell adhesion by increasing ICAM-1 and VCAM-1 expression in endothelial cells via p38MAPK-dependent pathway[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2011, 226(8): 2181–2188.

[17] Jiao GE, Yan L, Qiang LI, et al. Resveratrol induces apoptosis and autophagy in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by inhibiting Akt/mTOR and activating p38-MAPK[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2013, 26(11): 902–911.

[18] Yongjie W, Zhenyi A, Zhongju Z, et al. The stress-responsive kinases MAPKAPK2/MAPKAPK3 activate starvation-induced autophagy through Beclin 1 phosphorylation[J]. *Elife*, 2015, 4: e05289.

[19] Li T, Xu XH, Tang ZH, et al. Platycodin D induces apoptosis and triggers ERK- and JNK-mediated autophagy in human hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2015, 36(12): 1503–1513.

[20] Kim JH, Hong SK, Wu PK, et al. Raf/MEK/ERK can regulate cellular levels of LC3B and SQSTM1/p62 at expression levels[J]. *Experimental Cell Research*, 2014, 327(2): 340–352.

(责任编辑: 冉明会)