

纳米二氧化硅对体外培养 HaCaT 细胞凋亡的影响

龚春梅¹, 杨淋清², 陶功华², 何浩伟², 刘庆成², 吴德生², 刘建军², 庄志雄^{2*} (1. 深圳市慢性病防治中心, 广东深圳 518020; 2. 深圳市疾病预防控制中心, 广东深圳 518055)

摘要 [目的] 比较不同粒径(15、30、100 nm)纳米二氧化硅(nano-SiO₂)和常规二氧化硅(Micro-SiO₂)对人皮肤表皮细胞(HaCaT)生长的抑制作用及凋亡的影响。[方法] 采用不同浓度(2.5、5、10 μg/ml)不同粒径(15、30、100 nm)的 nano-SiO₂ 和 10 μg/ml 的 Micro-SiO₂ (1~5 μm) 染毒体外培养的 HaCaT 细胞 24 h, 同时设溶剂对照组(nano-SiO₂ 和 Micro-SiO₂ 的分散液染毒组)。采用细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测 HaCaT 细胞暴露于不同浓度、不同粒径的 nano-SiO₂ 后的细胞活力, 用 Annexin V-PI 双染法和 Hoechst33342 染色法测定细胞凋亡情况; 使用 2', 7'-二乙酰二氯荧光素荧光探针检测细胞内活性氧(ROS)水平。[结果] 不同粒径的 nano-SiO₂ 纳米对 HaCaT 细胞的半数抑制浓度分别为(19.4 ± 1.3)、(27.7 ± 1.5)、(35.9 ± 1.6) μg/ml。当染毒浓度固定时, 随着 nano-SiO₂ 粒径的减小, 凋亡率逐渐增加。当粒径固定时, 胞内 ROS 的水平也随着 nano-SiO₂ 浓度的增大而增高。相关分析表明, 细胞存活率和凋亡率与胞内活性氧的水平的相关性分别为 -0.952 和 0.898 ($P < 0.01$)。[结论] nano-SiO₂ 能抑制 HaCaT 细胞生长并可诱导其凋亡, 这种现象的发生可能与胞内产生的活性氧水平有关。

关键词 纳米二氧化硅; 细胞增殖; 细胞凋亡; 活性氧

中图分类号 S185 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)11-04842-04

Effects of Silicon Dioxide Nanoparticles on Apoptosis of HaCaT Cells

GONG Chun-mei et al (Shenzhen Center for Chronic Disease Control, Shenzhen, Guangdong 518020)

Abstract [Objective] To investigate the effects of silicon dioxide nanoparticles (nano-SiO₂) of different particle size (15, 30, 100 nm) and standard SiO₂ particles (micro-SiO₂) on proliferation and apoptosis of HaCaT cells. [Method] HaCaT cells were treated by 15, 30, 100 nm nano-SiO₂ (2.5, 5, 10 μg/ml) particles and micro-SiO₂ (10 μg/ml) particles for 24 h, at the same time, the solvent control was set. The level of ROS and the effect of cell growth inhibition were assayed by 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) and cell counting kit (CCK-8) Kit respectively. Apoptosis were assayed by Annexin V-PI double staining and Hoechst 33342 staining method. [Method] HaCaT cells were treated by 15, 30, 100 nm nano-SiO₂ (2.5, 5, 10 μg/ml) particles and micro-SiO₂ (10 μg/ml) particles for 24 h, at the same time, the solvent control was set. The level of ROS and the effect of cell growth inhibition were assayed by 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) and cell counting kit (CCK-8) Kit respectively. Apoptosis were assayed by Annexin V-PI double staining and Hoechst 33342 staining method. [Result] As observed in the CCK-8 kit, exposure to nano-SiO₂ nanoparticles for 24 h, the IC₅₀ was 19.4 ± 1.3, 27.7 ± 1.5 and 35.9 ± 1.6 μg/ml for 15, 30 and 100 nm SiO₂ nanoparticles, respectively. Exposure to SiO₂ nanoparticles results in a concentration- and size-dependent cytotoxicity and increase in intracellular ROS level and apoptosis rate were also observed in SiO₂ nanoparticle-exposed HaCaT cells. Cytotoxicity and apoptosis in cultural HaCaT cells that is closely correlated to increased oxidative stress, the correlation coefficient was -0.952 and 0.898 respectively. [Conclusion] nano-SiO₂ may affect proliferation and apoptotic rates of HaCaT cells via stimulating the production of ROS in cells.

Key words Silicon dioxide nanoparticles (nano-SiO₂); Proliferation; Apoptosis; ROS

纳米二氧化硅(nano-SiO₂)因为具有较好的稳定性、易分散性和融变性等特点被广泛应用于橡胶、涂料、医药和造纸等领域。微米级二氧化硅(Micro-SiO₂)被国际癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)归类为确定人类致癌物, 是一种高毒性的颗粒类型^[1]。因此, nano-SiO₂作为一种新型的纳米材料, 其对生物体的潜在影响也不容忽视, 有必要进行充分的毒性和环境方面的分析。近年来, 化学物导致机体功能紊乱的问题日益突出, 而目前关于纳米颗粒的生物效应研究多见于肺毒性作用, 而其对其他系统影响的报道则少见报道。因此, 笔者选取了不同粒径的 nano-SiO₂ (15、30、100 nm) 和 Micro-SiO₂ (1~5 μm) 作为试验材料, 以人永生表皮细胞 HaCaT 为研究对象, 比较暴露不同粒径的 SiO₂ 溶液对 HaCaT 细胞凋亡的影响, 以期探讨 nano-SiO₂ 作用的可能机制提供毒理学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

1.1.1 试验材料。 HaCaT 细胞, 购自中国典型培养物保藏中心; nano-SiO₂ 溶液(15、30 和 100 nm), 购自杭州万景新材料有限公司; Micro-SiO₂ 粉尘(购自美国 sigma 公司), 粒径为 1~5 μm; 细胞计数试剂盒, 购自上海同仁化学研究所; 凋亡检测试剂盒, 购自南京凯基生物工程研究所; DCFH-DA 和 Hoechst33342, 购自碧云天生物有限公司。胎牛血清、0.25% 胰酶、MEM 干粉培养基、丙酮酸钠、非必需氨基酸, 均购自美国 Gibco 公司。

1.1.2 仪器。 BD Calicar 流式细胞仪, 购自美国 BD 公司; Bio-tek 全自动酶标仪, 购自美国宝特公司; IX51 倒置荧光显微镜, 购自日本 OLYMPUS 公司。

1.2 细胞培养与分组 HaCaT 细胞在含 10% 胎牛血清的 MEM 完全培养基中传代培养, 待其融合度达到 80% 时, 用 MEM 基础培养基将 nano-SiO₂ 溶液稀释到预处理的浓度, 再对细胞进行暴露处理, nano-SiO₂ 终浓度由低至高依次为 5、10、20、40、50、60、80、100 μg/ml, 同时设立溶剂对照组。预试验用乳酸脱氢酶漏出试验(Lactic dehydrogenase, LDH)漏出试验和 CCK-8 同时检测发现 nano-SiO₂ 对 CCK-8 吸光度没

基金项目 国家自然科学基金(81202239, 30972505); 深圳市重点项目(20091017)。

作者简介 龚春梅(1982-), 女, 河南信阳人, 讲师, 博士, 从事分子毒理学研究。* 通讯作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事分子与生化毒理学研究, E-mail: zxzhuang2007@126.com。

收稿日期 2013-03-22

有明显影响,所以没有对纳米颗粒做特殊处理。

1.3 细胞增殖抑制能力 接种于 96 孔板的 HaCaT 细胞暴露于不同粒径的 nano-SiO₂ 作用 24 h 后;加入 10 μl CCK-8 试剂,在培养箱内培养 2.5 h;在酶标仪 450 nm 波长处测定吸光度值(*D*),参考波长为 630 nm;按照以下计算公式计算细胞增殖抑制率(Inhibition rate, IR): $IR = [(溶剂对照组 D 值 - 处理组 D 值) / (溶剂对照组 D 值 - 本底组 D 值)] \times 100\%$ 。

观察不同浓度 nano-SiO₂ 对 HaCaT 细胞增殖活力的影响及剂量-效应关系,计算半数抑制浓度(50% concentration of inhibition, IC₅₀),并确定后续暴露剂量。

1.4 细胞的凋亡率检测

1.4.1 Annexin V-PI 双染检测细胞的凋亡率。以约 1/3 ~ 1/5 IC₅₀ (2.5, 5, 10 μg/ml) 确定最终暴露浓度后,用该浓度处理 HaCaT 细胞 24 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化(3 min 左右)收集细胞(胰酶消化时间不宜过长,否则容易引起假阳性);用 PBS 洗涤细胞 2 次(2 000 r/min 离心 5 min)收集 1 × 10⁵ ~ 5 × 10⁵ 细胞;加入 500 μl Binding Buffer 悬浮细胞;加入 5 μl 磷脂结合蛋白 V(Annexin V)混匀后,再加入 5 μl 碘化丙啶(Propidium iodide, PI),混匀;室温下避光反应 5 ~ 15 min;1 h 内进行流式细胞仪检测。激发波长为 488 nm;发射波长为 530 nm。Annexin V 的绿色荧光通过 FITC 通道(FL1)检测;PI 红色荧光通过 PI 通道(FL3)检测。使用流式细胞仪进行检测时必须进行荧光补偿调节,使用未经凋亡诱导处理的正常细胞作为阴性对照,进行荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。

1.4.2 Hoechst33342 细胞核染色。取普通洁净盖玻片于 75% 乙醇中浸泡 5 min 以上,无菌超净台内吹干,再用细胞培养液洗涤 1 遍。将盖玻片置于 6 孔板内,接种细胞过夜;约 80% 融合后,不同浓度的 SiO₂ 溶液处理 24 h,弃培养基,用 PBS 缓冲液冲洗细胞 3 次;然后加入 1 ml Hoechst 33342,37 °C 避光染色 30 min;弃染色液,用 PBS 缓冲液冲洗细胞 3 次;最后滴 1 滴抗淬灭剂于载玻片上,盖上贴有细胞的盖玻片,尽量避免气泡(使细胞接触封片液,切勿弄反);于荧光显微镜下检测呈蓝色的细胞核。

1.5 胞内 ROS 水平的检测 原位装载探针:6 孔板中制作细胞爬片,过程同“1.4.2”。暴露结束后,按照 1:1 000 的比例用无血清培养液稀释 DCFH-DA,终浓度为 10 μmol/L。吸去细胞液,加入适当体积 1 ml 稀释好的 DCFH-DA。于 37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。对于原位装载探针的样品可以用荧光显微镜直接观察。

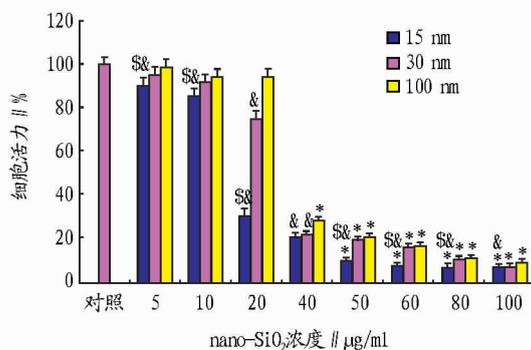
流式细胞仪检测的样品采用收集细胞后装载探针。具体步骤如下:按照 1:1 000 的比例用无血清培养液稀释 DCFH-DA,终浓度为 10 μmol/L。在细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中,细胞浓度为 1 × 10⁶ ~ 20 × 10⁶ 个/ml,37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min。每隔 3 ~ 5 min 颠倒混匀 1 次,使探针和细胞充分接触。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,以充分去除

未进入细胞内的 DCFH-DA。流式检测的参数设置如下:使用 488 nm 激发波长,使用 525 nm 波长发射波长。

1.6 数据统计与方法 使用 Excel 软件建立数据库,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,然后用 SPSS 16.0 统计软件对各指标的试验数据进行 ANOVA 分析,重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 细胞增殖抑制能力 从图 1 可以看出,15、30 和 100 nm SiO₂ 染毒细胞 24 h 后,随着染毒剂量的增加,3 种粒径 nano-SiO₂ 对细胞活力的抑制作用逐渐增强。使用 SPSS 16.0 软件对上述抑制率和剂量数据进行概率单位模型分析,计算出不同粒径(15、30 和 100 nm) nano-SiO₂ 对 HaCaT 细胞的 IC₅₀ 分别为(19.4 ± 1.3)、(27.7 ± 1.4)和(35.9 ± 1.6) μg/ml。在相同剂量下不同粒径 nano-SiO₂ 处理组的细胞活力存在差异。总体来看,粒径愈小,抑制细胞活力作用愈大。采用 10 μg/ml 作为 nano-SiO₂ 的最高作用剂量,并最终取 2.5、5 和 10 μg/ml 3 个剂量作为后续试验浓度。同时用纳米组的最高浓度 10 μg/ml 作为 Micro-SiO₂ 组的暴露浓度,观察染毒细胞形态及其他指标的变化。

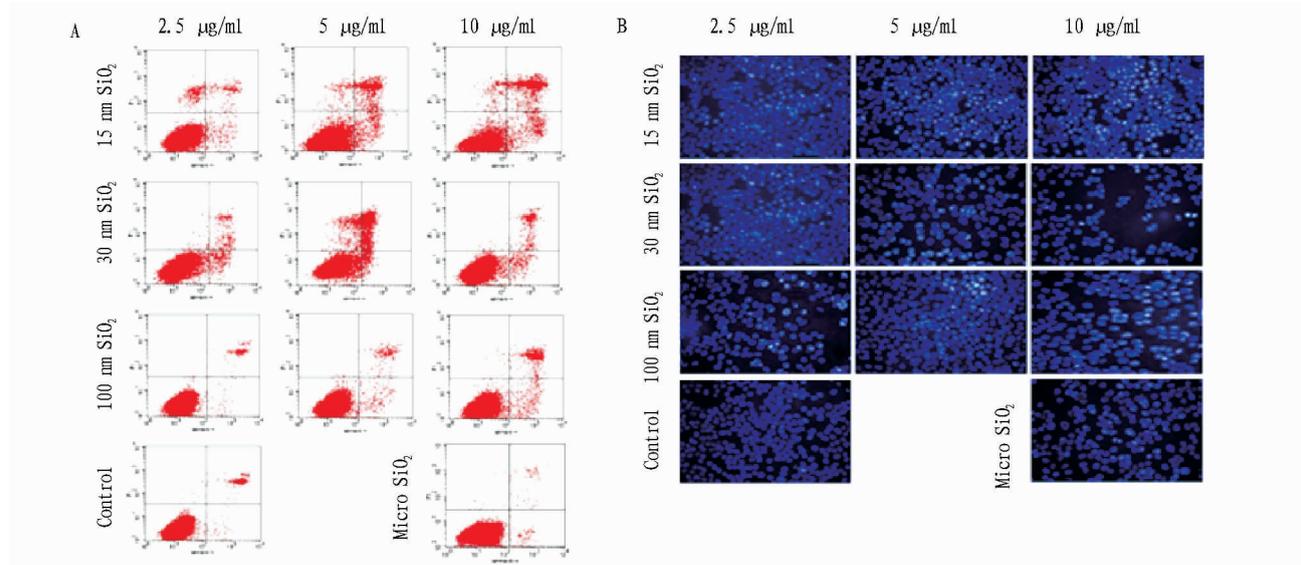


注: * 表示与对照组差异显著($P < 0.05$); \$ 表示与 30 nm 同剂量处理组差异显著($P < 0.05$); & 表示与 100 nm 同剂量处理组差异显著($P < 0.05$)。

图 1 不同粒径和不同浓度 nano-SiO₂ 对 HaCaT 的细胞抑制率

2.2 细胞凋亡分析 使用 Annexin V-PI 双染流式检测凋亡发现,与溶剂对照组相比,浓度 5 和 10 μg/ml 的 15、30 和 100 nm SiO₂ 组的细胞凋亡率显著增加($P < 0.05$),而且随着 nano SiO₂ - 粒径的减小,凋亡率有递增的趋势。3 种不同粒径的 nano-SiO₂ 均能不同程度诱导 HaCaT 细胞凋亡。与 Micro-SiO₂ 组相比,15 nm nano-SiO₂ 2.5、5 和 10 μg/ml 剂量组均能明显诱导细胞凋亡($P < 0.05$);此外,相同剂量下不同粒径的 3 种 nano-SiO₂ 引起的细胞凋亡率存在差异,其中粒径为 15 nm 的 nano-SiO₂ 所引起的细胞凋亡率比粒径 30 和 100 nm 的 nano-SiO₂ 均显著增加($P < 0.05$)。在相同中、高剂量下,nano-SiO₂ 粒径愈小,诱导的细胞凋亡率愈大(图 2A、图 3)。同时细胞爬片后,用 Hoechst33342 染色也证实了这一结果,Hoechst33342 染色后,正常细胞核染成蓝色或紫蓝色,色泽比较均一。nano-SiO₂ 处理组,可见核深染、固缩、边集等现象并有染色致密的凋亡小体形成(图 2B)。

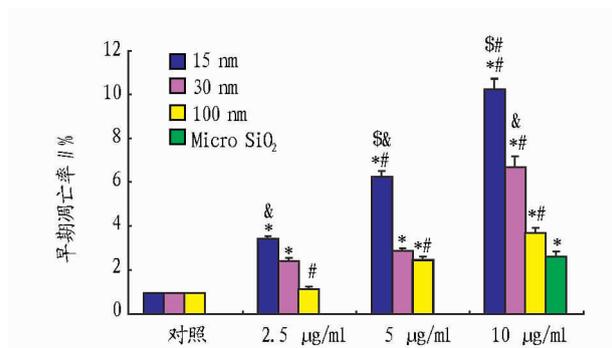
2.3 胞内活性氧(ROS)的水平 从图 3 可以看出,与溶剂



注: A. 未染色的 HaCaT 细胞流式检测凋亡图,其中左下图为正常细胞;左上图为坏死细胞;右下图为早期凋亡细胞;右上图为晚期凋亡细胞。

B. Hoechst33342 染色的 HaCaT 细胞凋亡图。

图2 HaCaT 细胞凋亡情况



注: *表示与对照组差异显著($P < 0.05$);#表示处理组与 Micro-SiO₂ 组差异显著($P < 0.05$);\$表示与 30 nm 同剂量处理组差异显著($P < 0.05$);&表示与 100 nm 同剂量处理组差异显著($P < 0.05$)。

图3 不同粒径 nano-SiO₂ 对 HaCaT 细胞凋亡的影响

对照组相比,15、30 和 100 nm SiO₂ 染毒细胞 24 h 后,当浓度为 2.5、5、10 µg/ml 时,随着浓度的升高,细胞内活性氧水平均升高,存在剂量-效应关系($P < 0.05$);在同等剂量条件下,粒径为 15 nm 组的 ROS 含量水平最高。

2.4 相关性分析 为了进一步探讨 nano-SiO₂ 引起细胞存活率下降和凋亡发生的可能原因,对细胞的存活率和早期凋亡率与细胞内的活性氧的水平进行了相关分析,结果表明细胞存活率和早期凋亡率强度与胞内活性氧水平有很大的相关性(r 分别为 -0.952 和 0.898 , $P < 0.01$)。这表明 nano-SiO₂ 对 HaCaT 细胞损伤效应的发生可能与胞内的活性氧有关。

3 讨论

nano-SiO₂ 被广泛应用于生物医药工程、材料、化妆品等领域,尤其在生物医药领域,人们接触的机会明显增加,但是其进入人体的方式、产生的生物效应及作用机制仍然无法明确。因此,nano-SiO₂ 的生物安全性研究备受关注。nano-SiO₂

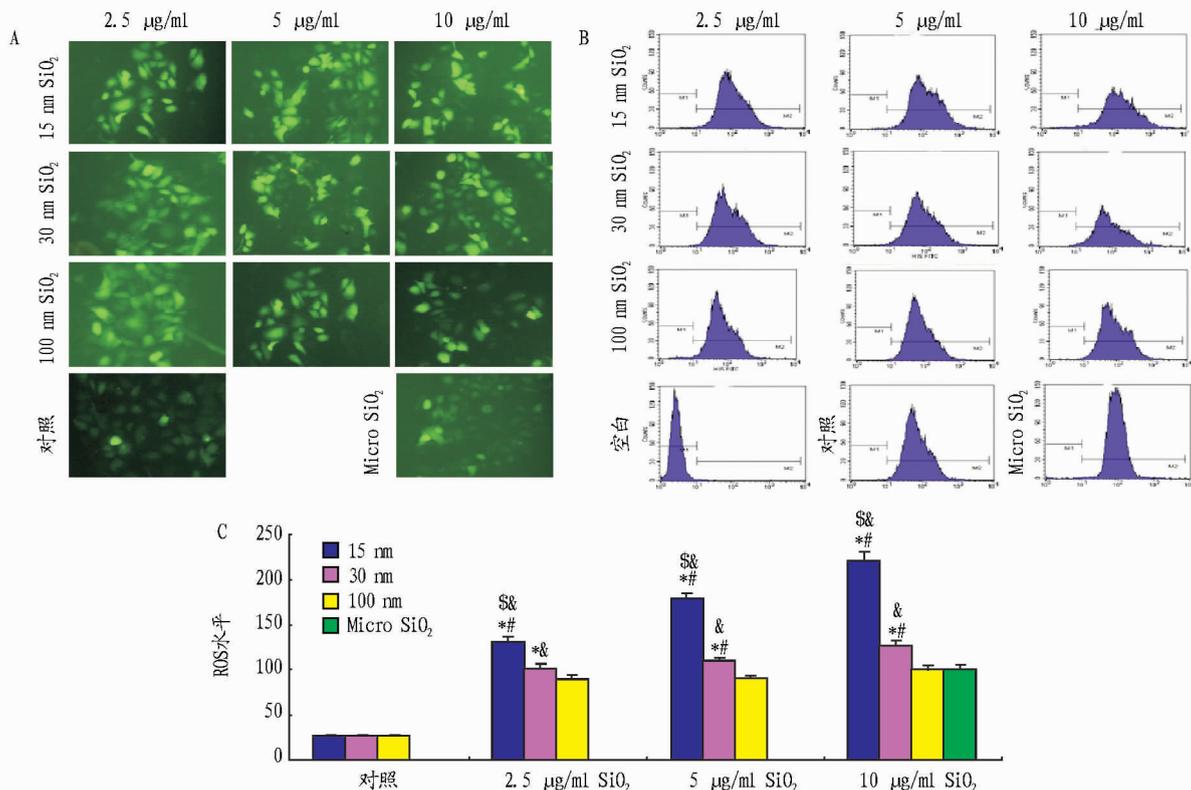
对人类的暴露途径主要为呼吸道、皮肤及注射。因此,笔者采用 HaCaT 细胞暴露于不同粒径及不同浓度的 nano-SiO₂ 溶液,探讨 nano-SiO₂ 暴露对 HaCaT 细胞增殖及细胞凋亡的影响及其与 ROS 的关系,为 nano-SiO₂ 皮肤暴露的安全性评价提供了依据。

纳米材料的粒径是决定纳米材料其他一切特性的基础,因此在对纳米材料进行毒理学研究前首先要确定所用纳米材料的粒径。目前,国际上已经使用和正在研究的粒径检测方法非常多,其中电子显微镜是对纳米材料的形态及粒径进行观察检测最为常用和直观的方法之一。纳米材料由于离子强度的增加和表面张力的影响,水溶性样品易发生粒子聚集^[2],影响纳米材料在溶剂中分散度的因素包括纳米材料的形状、粒径、表面修饰、溶剂等。因此,在应用及检测前,纳米材料的充分分散是重要前提,通常采用改变分散相及分散介质的性质、超声分散、选用合适分散介质或添加某些分散剂等措施进行分散。该试验所使用的 nano-SiO₂ 是已经分散好的 20 mg/ml 原液, Micro-SiO₂ 粉末是使用公司提供的溶剂进行分散的。该试验所使用纳米材料的表征结果见已发表^[3]。

细胞凋亡 (Apoptosis) 是细胞在一定的生理性或病理性刺激下引起的一种受基因调控的有序的死亡^[4]。Annexin-V/PI 双染法可以同时区分活细胞及早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞或坏死细胞并确定其比例。用 Annexin-V 可简单而直接地检测到磷脂酰丝氨酸外翻这个细胞凋亡的重要特征。ROS 是外源性氧化剂或细胞内氧化代谢过程中产生的具有很高生物活性的含氧化合物的总称,包括超氧化物、过氧化氢和羟基自由基,其可作为第二信使参与信号转导,启动多种细胞生物学效应。但是当各种外源或内源性因素引起的 ROS 超过体内的清除能力时,则会导致细胞内的一些生物大分子 (脂质、蛋白质、DNA 等) 受到损伤。ROS 可直接作用于氨基酸的肽键,也可对氨基酸进行修饰,最终导致蛋白质特

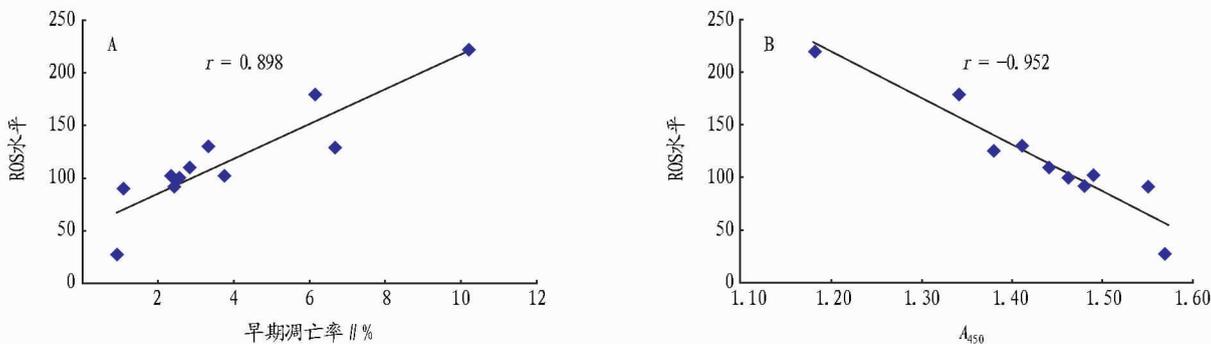
别是酶蛋白丧失活性,从而诱导细胞凋亡的发生。Macho 等^[5]在研究胸腺细胞凋亡机制中发现,早期凋亡细胞出现胞

内 GSH 下降和 ROS 含量轻度升高,后者进一步引起 NADH 和 NADPH 下降,产生大量超氧阴离子自由基。



注:A. 细胞荧光分析;B. 流式柱状图;C. 流式定量分析; * 表示处理组与对照组差异显著 ($P < 0.05$); # 表示处理组与 Micro-SiO₂ 组差异显著 ($P < 0.05$); \$ 表示与 30 nm 同剂量处理组差异显著 ($P < 0.05$); & 表示与 100 nm 同剂量处理组差异显著 ($P < 0.05$)。

图 4 不同粒径的 SiO₂ 对胞内 ROS 产生的影响



注:A. 早期凋亡率与胞内 ROS 水平的相关性;B. SiO₂ 暴露后细胞的存活率与胞内 ROS 水平的相关性。

图 5 nano-SiO₂ 暴露后细胞的存活率和凋亡率与胞内 ROS 水平的相关性

该研究结果表明,各试验组 nano-SiO₂ 均可引起 HaCaT 细胞的凋亡,与对照组差异显著 ($P < 0.05$);2.5、5、10 µg/ml 组随着作用浓度升高细胞凋亡率有上升的趋势,并在 10 µg/ml 达到最高,同时相同浓度的 nano-SiO₂ 暴露时,不同粒径的纳米颗粒的凋亡率也存在显著差异 ($P < 0.05$),15 nm SiO₂ 的凋亡率最高, Micro-SiO₂ 组最低。徐东菁等^[6]研究证实羟基磷灰石纳米颗粒可以诱导巨噬细胞凋亡,凋亡率较对照组明显增高,并且凋亡的程度呈浓度依赖性,与该试验结果相一致。检测 nano-SiO₂ 和 Micro-SiO₂ 暴露 HaCaT 细胞后凋亡发生的同时,对细胞内的 ROS 水平进行检测,结果表明

胞内 ROS 的水平与 HaCaT 细胞早期凋亡率的发生具有一致性 ($r = 0.898, P < 0.05$);同时发现胞内 ROS 的水平与 HaCaT 细胞的生存率呈负相关 ($r = -0.959, P < 0.05$)。此结果与 Nabeshil 的研究结果相一致,nano-SiO₂ 诱导的 DNA 损伤及凋亡与胞内产生的活性氧有关^[7]。从活性氧水平测定和早期凋亡的发生结果来看,ROS 的升高与凋亡率的增加相一致,说明 ROS 在 nano-SiO₂ 致 HaCaT 细胞凋亡中发挥了重要作用。

ROS 是活体细胞有氧代谢的产物。ROS 可介导细胞信

但是目前只有少量的乡土树种被开发利用,而其他丰富的种质资源未能转变成良种优势和经济优势。因此,做好优良珍贵的乡土树种开发利用和繁殖培育工作迫在眉睫。加大乡土树种培植力度主要应从4个方面入手:①迅速开展乡土造林树种的种质资源普查,摸清家底,划定树种的种质资源保护区,制定区域发展远景规划;②制定乡土树种开发利用和繁殖培育标准,建立种质资源保存、评价、利用体系及发展利用责任制,加大保护力度,切实防止种质资源的流失;③采取种繁培育中心或良种基地,苗圃+公司+科研单位等形式,研发乡土树种的繁育技术并大力推广;④建立优良珍贵乡土树种繁育和推广的补偿机制,为城市绿化、美好环境提供数量充足、物美价廉的乡土树种,把乡土树种的种质资源优势转变成区域的经济优势。

4.4 重点培植龙头企业,加速林木种苗产业发展 通过对国有苗圃,特别是对定点育苗基地和保障性苗圃进行管理体制改革和经营机制转换,发挥其设施、技术、品种等优势,使其成为苗木生产供应的主力军;引进重点企业和战略合作伙伴,采取“公司+基地+农户”、“公司+农民专业合作社+农户”等模式,扶持和支持有实力的企业发展,加大林木种苗产业发展资金投入。加大对外开放和招商引资力度,在政策允许的前提下,尽量整合重点工程建设项目资金,培植林木种苗的龙头企业,对龙头企业要实行重点扶持:①制定优惠政策和建立保护机制;②加大资金扶持力度,在财政、贴息等方面予以重点倾斜;③帮助完善现代企业制度,切实解决实际问题,发挥龙头企业的牵动、示范作用;④建立林木种苗专业协会或行业协会,培育市场主体,加强技术信息交流服务,组织技术培训,开展技术服务,强化行业自律,促使林木种苗生产走上产业化经营之路^[4]。

(上接第4845页)

号转导并激活转录因子,促进基因表达,调控细胞生长、生存和凋亡,发挥重要生物学效应^[8-9],各种凋亡信号均可以引起细胞内源性或外源性 ROS 升高或氧化还原平衡改变,这可能作为信号触发凋亡信号转导途径。当凋亡启动后,ROS 进一步升高可速凋亡的发生。ROS 还可通过诱发体内代谢变化诱导细胞的凋亡,如 *Fos* 和 *Jun* 基因家族在与 DNA 的结合区均含有一个保守的半胱氨酸残基,该残基的巯基易被 ROS 氧化,使它们与 DNA 结合能力大大降低,从而影响核内基因表达,最终诱发细胞凋亡的发生^[10], nano-SiO₂ 诱导 HaCaT 细胞的凋亡是否存在其他途径以及 ROS 的信使作用是否还激活其他一些信号转导通路,引起凋亡,则有待进一步研究。

参考文献

[1] IRAC Monographs on the evaluation of chemicals to humans[R]. Lyon, IRAC, 1996.

4.5 搭建种苗信息服务平台,规范林木种苗行业管理 充分利用全州现有林业科研、科技推广、种苗管理、良种基地等单位的基础设施和技术条件,以种苗管理机构为主导,以科研教学单位为技术支撑,以林木良种基地为平台,形成科研-生产-管理相结合的良好选育工作体系,规范种苗行业管理。并以此为基础建立政府种苗管理机构的公共服务与林木种苗专业合作社等社会团体的社会化服务相结合的州、县种苗服务网络,在技术支持、信息咨询、市场开拓、人才培养等领域为林木种苗生产经营者提供全方位的服务,实现种苗行政许可业务网络办公,种苗法规政策、生产技术信息公开,种苗科技专家便民坐诊,种子、苗木和资材网上交易,建立种苗信息数据库,使种苗社会化服务效率明显提升。这种自下而上的林木种苗信息网络可有效形成州、县二级种苗信息网络体系,及时、准确发布种苗供求、林木良种、种苗科技和种苗政务、种苗市场交易网等信息,引导和指导种苗生产供应,促使林木种苗产业持续健康良性发展。

参考文献

[1] 刘红,胡春姿,陈英歌,等.我国林木种苗发展形势、问题与对策[J].绿色中国,2002(6):24-25.
 [2] 高捍东.我国林木种苗产业化现状与对策[J].林业科技开发,2005,19(1):7-9.
 [3] 董云生.楚雄州油茶资源现状与产业发展对策[J].林业调查规划,2010,35(5):77-79.
 [4] 郑勇平.植物种苗的产业化发展与市场化运作[J].绿色中国:理论版,2004(14):51-54.
 [5] 殷小慧,程晓福,兰菊梅,等.对林木种苗产业发展的思考——以六盘山林业局为例[J].内蒙古农业科技,2012(4):13-14.
 [6] 朱丽萍.淮安市种苗发展现状及对策研究[J].宁夏农林科技,2012,53(4):35-36,81.

[2] CLINTON F,李焱,金义光,等.纳米材料毒性的体外评价[J].国际药学研究杂志,2010,37(1):67-72.
 [3] GONG C,TAO G,YANG L,et al. The role of reactive oxygen species in silicon dioxide nanoparticle-induced cytotoxicity and DNA damage in HaCaT cells[J]. Mol Biol Rep,2012,39(4):4915-4925.
 [4] CHEN Y,CHEN J,DONG J,et al. Comparing study of the effect of nanosized silicon dioxide and microsized silicon dioxide on fibrogenesis in rats[J]. Toxicol Ind Health,2004,20(15):21-27.
 [5] MACHOA,H IRSCH T,MARZO I,et al. Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis [J]. J Immunol,1997,158(10):4612-4619.
 [6] 徐东青,张稷,孙皎,等.羟基磷灰石纳米颗粒诱导巨噬细胞凋亡及其与 HSP70 相互关系的研究[J].功能材料,2007,38(9):1533-1536.
 [7] NABESHIL H,YOSHIKAWAI T,MATSUYAMAI K. Amorphous nanosilica induce endocytosis dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes[J]. Part Fibre Toxicol,2011,8:1.
 [8] DJORDJEVIC V B. Free radicals in cell biology [J]. Int Rev Cytol,2004,237(1):57-89.
 [9] CLOSA D,FOLCH-PUY. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response [J]. IUBMB Life,2004,56(4):185-191.
 [10] 于爱平.活性氧与细胞凋亡[J].前卫医药杂志,1999,16(4):254-255.