

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20120521001

路阳, 卢春风, 苑晓燕, 等. 铅与纳米 SiO₂ 联合染毒对 A549 细胞氧化损伤的影响[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(4): 549-553

Lu Y, Lu C F, Yuan X Y, et al. Effects of Combined Exposure to Lead and Nano-SiO₂ on the Oxidative Damage of A549 Cells [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(4): 549-553 (in Chinese)

铅与纳米 SiO₂ 联合染毒对 A549 细胞氧化损伤的影响

路阳^{1,2}, 卢春风^{1,2,#}, 苑晓燕¹, 李利忠¹, 王以美¹, 赵君¹, 彭双清^{1,*}

1. 军事医学科学院 疾病预防控制所毒理学评价研究中心, 北京 100071

2. 佳木斯大学, 佳木斯 154007

摘要: 为了研究铅与纳米 SiO₂ 联合染毒所致的细胞损伤特征, 并从氧化应激方面探讨其可能的作用机制。用铅和 SiO₂ 处理 A549 细胞, 采用四唑盐 (MTT) 比色法检测细胞存活率, 评价铅和 SiO₂ 联合染毒所致的细胞损伤特征; 采用硫代巴比妥酸 (TBA) 比色法检测细胞内丙二醛 (MDA) 含量, 评价铅与 SiO₂ 联合染毒所致细胞的氧化应激状态; 检测了细胞内抗氧化物还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量以及细胞内抗氧化酶的活性, 以评价铅与 SiO₂ 联合染毒对细胞抗氧化系统的影响。将实验数据进行 ANOVA 分析。结果表明, 铅、SiO₂ 单独染毒组各指标没有明显改变; 而联合染毒能造成细胞氧化损伤, 表现为细胞存活率、GSH 水平、超氧化物歧化酶 (SOD) 及谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性显著低于对照组及 2 个单独染毒组 ($P < 0.05$), 细胞内 MDA 含量显著高于对照组及各单独染毒组 ($P < 0.05$)。可见, 联合染毒可引起明显的细胞毒性, 氧化损伤可能是铅与 SiO₂ 联合染毒致肺细胞毒性损伤的作用机制之一。

关键词: 铅; 纳米 SiO₂; 氧化损伤; 联合染毒

文章编号: 1673-5897(2013)4-549-05 **中图分类号:** X171.5 **文献标识码:** A

Effects of Combined Exposure to Lead and Nano-SiO₂ on the Oxidative Damage of A549 Cells

Lu Yang^{1,2}, Lu Chunfeng^{1,2,#}, Yuan Xiaoyan¹, Li Lizhong¹, Wang Yimei¹, Zhao Jun¹, Peng Shuangqing^{1,*}

1. Evaluation and Research Center for Toxicology, Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

2. Jiamusi University, Jiamusi 154007, China

Received 21 May 2009 **accepted** 29 August 2012

Abstract: To investigate the possible mechanism and characteristics of the damage effects on A549 cells induced by lead and nano-SiO₂ from oxidative stress. A549 cells were alone or combinedly exposed to lead and nano-SiO₂. In order to investigate the possible characteristics of combined cytotoxicity of lead and SiO₂, the survival rates were detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. The level of malondialdehyde (MDA) was measured by 2-thiobarbituric acid (TBA) colorimetric method to assess the extent of oxidative stress. To evaluate the lead and SiO₂ jointly treated cells to the influence of the antioxi-

收稿日期: 2012-05-21 录用日期: 2012-08-29

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2011CB503803)

作者简介: 路阳 (1979-), 女, 硕士, 研究方向为环境毒理学, E-mail: luyangjiayo@163.com;

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: pengsq@hotmail.com;

共同通讯作者 (Co-corresponding author), E-mail: luchunfengchen@126.com

dant defense system, the content of glutathione (GSH) and activities of antioxidant enzymes were detected. The results of ANOVA test showed that all indexes of single exposure group did not obviously change. However, lead and SiO₂ combined treatment can induce cell oxidative stress. After combined exposure to lead and SiO₂, cell survival rate, glutathione level, activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were decreased significantly ($P < 0.05$); malonaldehyde concentration increased remarkably ($P < 0.05$). Therefore, it is deduced that combined exposure produce apparent cytotoxic effects. Oxidative damage may be one possible damage mechanism of cells after combined exposure to lead and SiO₂.

Keywords: lead; nano-SiO₂; oxidative damage; combined exposure

铅与纳米 SiO₂ 是空气颗粒物 (particulate matters, PMs) 中的主要化学组分, 由于它们广泛分布并共存于环境中, 具有可生物蓄积、难以降解等特性, 已成为环境毒理学研究的热点。PMs 是我国广泛存在、危害效应十分严重的大气污染物^[1-4], 存在于大气中的污染多具有伴发性而形成复合污染^[5-6], 因此, 空气污染物联合暴露给公众健康带来的危害引起了广泛关注。但近年来研究铅、纳米 SiO₂ 对细胞的单独毒性作用较多, 而对其联合毒性作用的研究较少。肺上皮细胞是空气污染物的主要靶细胞之一^[7], 而 A549 细胞来源于人肺泡细胞癌, 它既具有肺癌恶性肿瘤细胞的特性, 同时又具有肺泡 II 型上皮细胞的特性和表型, 因此, 研究 PMs 对肺上皮细胞的形态和功能的影响, 对预测 PMs 的肺毒性十分重要^[8-10]。本研究在体外培养的 A549 细胞模型的基础上, 研究了没有引起明显毒性效应的剂量下, 铅与纳米 SiO₂ 联合染毒的细胞毒性效应, 旨在初步探讨铅与 SiO₂ 联合染毒的复合细胞毒性效应特征及作用机制, 为进一步开展 PMs 健康危害评估和作用机制的研究提供基础数据和实验依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 主要试剂

醋酸铅、纳米 SiO₂ 均购自美国 Sigma 公司; 1640 干粉购自 Gibco 公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 均购自 Amresco 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自 Hyclone 公司; 超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; BCA 蛋白定量试剂盒, 购自杭州碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

A549 细胞进行常规细胞培养, 传代。培养液为含体积分数为 10% 的胎牛血清和青链霉素双抗的 1640 培养液。

1.2.2 实验分组及染毒

按 2×2 析因设计将细胞随机分为 4 组: 对照组

(给予等体积的无血清培养基); 硅单独染毒组 (10 μg·mL⁻¹ 纳米 SiO₂); 铅单独染毒组 (50 μmol·L⁻¹ Pb(AC)₂); 联合染毒组 (10 μg·mL⁻¹ 纳米 SiO₂ + 50 μmol·L⁻¹ Pb(AC)₂)。将生长良好的指数生长期的细胞接种于 96 孔培养板或培养瓶, 置 37°C, 5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后, 弃上清液, 用 PBS 液洗 3 次, 加入含双抗不含血清的培养基按上述分组进行染毒, 每组设 3 个平行孔, 培养 24 h, 取细胞进行检测。

1.2.3 测定指标及方法

应用 MTT 比色法检测细胞存活率; 采用 TBA 比色法及 Beutler 改良法检测细胞内丙二醛 (MDA) 的含量和谷胱甘肽 (GSH) 的水平; 参照 SOD 和 GSH-Px 测定试剂盒说明测定 SOD、GSH-Px 活性; 采用 BCA 法测定细胞样品的蛋白浓度。

1.3 统计学分析

实验数据以平均值 ± 标准差表示, 采用 SAS 8.2 统计软件进行析因方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。析因分析结果判定如下: 根据 $F_{A \times B}$ 值和 P 值来判定是否具有交互作用, 当 $F_{A \times B} > 5$, $P < 0.05$ 时, 二者之间有交互作用; 当 $F_{A \times B} < 5$, $P > 0.05$ 时, 二者之间无交互作用。如果有交互作用, 再根据具体效应判断交互作用模式, 即: $A \times B$ 效应 $> A$ 效应 + B 效应, 则判定为协同作用; $A \times B$ 效应 $< A$ 效应 + B 效应, 则判定为拮抗作用。若无交互作用, $A \times B$ 效应 $> A$ 效应 + B 效应, 则判定为相加作用。

2 结果 (Results)

2.1 铅与 SiO₂ 联合染毒对细胞存活率影响

铅与 SiO₂ 联合染毒对细胞存活率的影响如图 1 所示。与对照组比较, 铅、SiO₂ 单独染毒组细胞的相对存活率仍能分别维持在 95.5% 和 97.8%, 差异无统计学意义; 而联合染毒组细胞的相对存活率下降至 80.4% ($P < 0.05$), 且与 2 个单独染毒组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。这表明, 铅与 SiO₂ 联合染毒

能降低细胞存活率,表现出明显的细胞毒性。析因分析结果表明,复合毒性效应作用模式为相加作用。

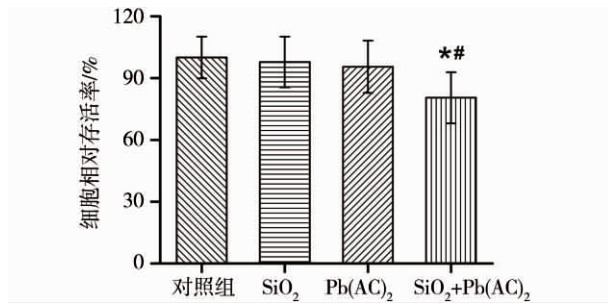


图 1 铅与 SiO₂ 联合染毒对细胞存活率的影响

: * 与对照组相比, $P < 0.05$; # 与单独染毒组相比, $P < 0.05$, 下同。

Fig. 1 Effects of combined exposure to lead and SiO₂ on the survival rate of cells

2.2 铅与 SiO₂ 联合染毒对细胞 MDA 和 GSH 含量影响

铅与 SiO₂ 联合染毒对细胞 MDA 和 GSH 含量的影响如图 2 所示。与对照组比较,单独染毒对细胞 MDA 和 GSH 含量无明显影响。联合染毒组细胞 MDA 含量相比于对照组明显增加 ($P < 0.05$),且与单独染毒组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);而 GSH 含量相比于对照组明显减少 ($P < 0.05$)。这表明,铅与 SiO₂ 联合染毒可使细胞的抗氧化物 GSH 减少,抗氧化能力降低,使细胞膜发生脂质过氧化反应。析因分析结果表明,复合毒性效应作用模式为相加作用。

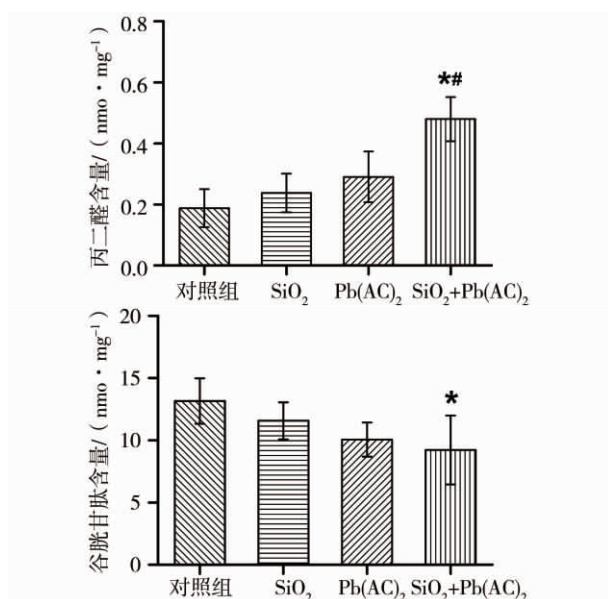


图 2 铅与 SiO₂ 联合染毒对细胞丙二醛和谷胱甘肽含量的影响

Fig. 2 Effects of combined exposure to lead and SiO₂ on the contents of MDA and GSH

2.3 铅与 SiO₂ 联合染毒对细胞 SOD 和 GSH-Px 活性影响

铅与 SiO₂ 联合染毒对细胞 SOD 和 GSH-Px 活性的影响如图 3 所示。单独染毒使细胞 SOD 和 GSH-Px 活性有所改变,但与对照组比较差异无统计学意义;联合染毒可使 SOD 和 GSH-Px 活性明显降低

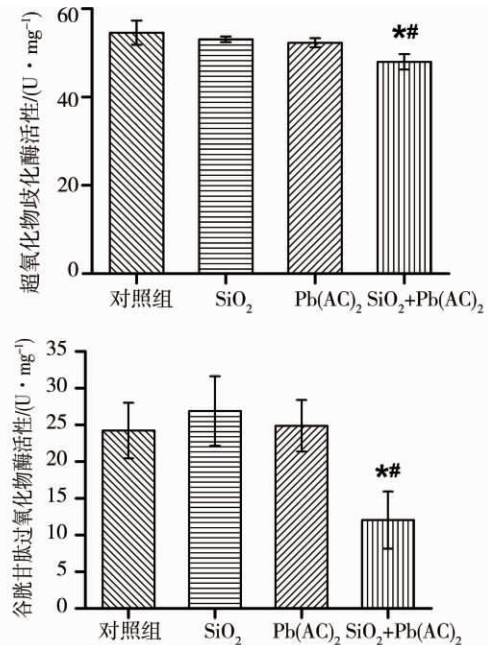


图 3 铅与 SiO₂ 联合染毒对细胞超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响

Fig. 3 Effects of combined exposure to lead and SiO₂ on the activities of SOD and GSH-Px

($P < 0.05$),且与单独染毒组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。这表明,铅与 SiO₂ 联合染毒能降低细胞的抗氧化能力。析因分析结果表明,复合毒性效应作用模式为相加(SOD 指标)和协同作用(GSH-Px 指标)。

3 讨论 (Discussion)

铅与 SiO₂ 是 PMs 中的主要化学组分,笔者通过在体外细胞水平上观察铅与 SiO₂ 单独及联合染毒对 A549 细胞的毒性作用特征,主要考察了细胞存活率与氧化损伤指标,以探讨氧化损伤在铅与 SiO₂ 联合染毒所致的复合细胞毒性效应中的作用,初步阐明了 PMs 主要组分联合暴露的复合细胞毒性效应作用特征及其作用机制。

研究表明,纳米 SiO₂ 有较强的表面活性,经呼吸暴露可能对人体健康产生直接影响,导致多方面的疾病^[11-13]。铅是一种古老的工业毒物 and 环境污染,大量的研究已证实铅毒性可涉及到人体全身,累及多个系统^[14-15]。MTT 检测结果表明,铅与

SiO₂单独染毒对细胞存活率没有明显影响,而铅与SiO₂联合染毒能显著降低细胞存活率,表现出明显的细胞毒性,说明联合染毒的复合毒性效应显著。

正常情况下,细胞内自由基的产生和清除处于动态平衡状态。过量的自由基可以攻击包括DNA在内的几乎所有的生物分子。研究表明,大量产生氧自由基在铅毒性机制中发挥着重要作用,并可能是铅致毒的主要机制,最终导致机体广泛的损害作用^[16-17]。通过测定铅与SiO₂联合染毒对细胞氧化应激的影响,发现MDA是细胞膜发生脂质过氧化反应的终产物,是目前反映机体氧化损伤最具代表性的指标之一,其含量高低可反映机体内脂质过氧化的程度;GSH是细胞内主要的抗氧化物,其量的多少是衡量机体抗氧化能力大小的重要因素;SOD和GSH-Px是抗氧化体系中较为关键的酶,其酶活性的高低间接反映了机体抗氧化能力。结果显示,铅与SiO₂单独染毒组各指标没有明显改变;而联合染毒组MDA含量明显增高;而GSH水平、SOD及GSH-Px活性明显降低。析因分析结果表明,复合毒性效应作用模式为相加和协同作用。这说明,联合染毒可使细胞内抗氧化物含量减少,抗氧化酶活性下降,产生脂质过氧化,使细胞膜结构受到损伤,从而引起细胞损伤和功能障碍。可见,联合染毒能造成细胞氧化损伤。铅与SiO₂联合染毒的复合毒性效应机制可能是通过抑制抗氧化酶的活性,降低细胞的抗氧化防御能力,提高了生物大分子受氧化攻击的易感性。Chen等^[16]研究结果也表明,铅能促进活性氧(ROS)的产生,使机体处于氧化应激状态。还有研究表明,纳米SiO₂对人体肺部的危害主要通过改变肺部细胞内外的氧化还原环境,造成氧化性损伤,进而促进细胞内炎症效应的产生^[18-20]。

那么为什么铅单独染毒不能引起明显的细胞毒性,而与SiO₂联合染毒却能引起明显的细胞毒性呢?研究表明,SiO₂一方面可以通过对细胞膜的物理性破坏导致细胞死亡,也可以通过诱发细胞内的氧化性损伤使细胞活度降低^[21-22]。暴露于包括纳米氧化钛、纳米氧化硅、多壁碳纳米管等在内的多种纳米材料可能导致肺部不同部位细胞内ROS增加已在很多研究中得到确认^[23-25]。越来越多证据表明,纳米颗粒物可通过胞吞方式进入细胞内部,引起细胞内复杂的免疫反应,从而导致细胞内ROS的增加^[26-27]。这表明,纳米颗粒物可能通过刺激细胞内ROS的释放进

一步增加铅的细胞毒性。Nel等^[21]认为由于纳米颗粒本身固有的特性使其更容易与细胞相互作用,进而进入细胞内增加铅的细胞毒性,但其具体作用机制还有待于进一步研究。综上所述,铅与SiO₂联合染毒可引起明显的细胞毒性,氧化损伤可能是其联合染毒致肺细胞毒性损伤的主要机制之一。在对PMs等环境污染物进行危险性评价及制定卫生标准时,应充分考虑PMs中多种组分共存的复合毒性效应。

通讯作者简介:彭双清(1962—),男,博士,研究员,博士生导师,主要研究方向为环境毒理学。

卢春风(1969—),女,博士,教授,硕士生导师,主要研究方向为环境毒理学。

参考文献:

- [1] Karakatsani A, Kapitsimadis F, Pipikou M, et al. Ambient air pollution and respiratory health effects in mail carriers [J]. *Environmental Research*, 2010, 110(3): 278-285
- [2] Chen R, Pan G, Zhang Y, et al. Ambient carbon monoxide and daily mortality in three Chinese cities: The China Air Pollution and Health Effects Study (CAPES) [J]. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(23): 4923-4928
- [3] Shih R A, Griffin B A, Salkowski N, et al. Ambient particulate matter air pollution and venous thromboembolism in the Women's Health Initiative Hormone Therapy trials [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2011, 119(3): 326-331
- [4] Eckel S P, Louis T A, Chaves P H M, et al. Modification of the association between ambient air pollution and lung function by frailty status among older adults in the cardiovascular health study [J]. *American Journal of Epidemiology*, 2012, 176(3): 214-223
- [5] Cambra-Lopez M, Aarnink A J, Zhao Y, et al. Airborne particulate matter from livestock production systems: A review of an air pollution problem [J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(1): 1-17
- [6] Lippmann M. Targeting the components most responsible for airborne particulate matter health risks [J]. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 2010, 20(2): 117-118
- [7] Hsiao I L, Huang Y J. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells [J]. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(7): 1219-1228
- [8] Jeon Y M, Son B S, Lee M Y. Proteomic identification of the differentially expressed proteins in human lung epithelial cells by airborne particulate matter [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2011, 31(1): 45-52
- [9] Konczol M, Ebeling S, Goldenberg E, et al. Cyto-

- toxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: Role of ROS, JNK, and NF- κ B[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2011, 24(9): 1460-1475
- [10] Oh S M, Kim H R, Park Y J, et al. Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells) [J]. *Mutation Research*, 2011, 723(2): 142-151
- [11] Chen Z, Meng H, Xing G, et al. Age-related differences in pulmonary and cardiovascular responses to SiO₂ nanoparticle inhalation: Nanotoxicity has susceptible population [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(23): 8985-8992
- [12] Madl A K, Pinkerton K E. Health effects of inhaled engineered and incidental nanoparticles [J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2009, 39(8): 629-658
- [13] Song Y, Li X, Du X. Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma [J]. *European Respiratory Journal*, 2009, 34(3): 559-567
- [14] Ahmed Khan D, Qayyum S, Saleem S, et al. Lead exposure and its adverse health effects among occupational worker's children [J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2010, 26(8): 497-504
- [15] Bhatti P, Stewart P A, Linet M S, et al. Comparison of occupational exposure assessment methods in a case-control study of lead, genetic susceptibility and risk of adult brain tumors [J]. *Occupational and Environmental Medicine*, 2011, 68: 4-9
- [16] Chen L, Yang X, Jiao H, et al. Tea catechins protect against lead-induced ROS formation, mitochondrial dysfunction, and calcium dysregulation in PC12 cells [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2003, 16(9): 1155-1161
- [17] Wu Q, Liu P, Li Y, et al. Inhibition of ROS elevation and damage to mitochondrial function prevents lead-induced neurotoxic effects on structures and functions of AFD neurons in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Environmental Sciences*, 2012, 24(4): 733-742
- [18] Sayes C M, Reed K L, Warheit D B. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: Comparing *in vitro* measurements to *in vivo* pulmonary toxicity profiles [J]. *Toxicological Sciences*, 2007, 97(1): 163-180
- [19] Jordan J A, Verhoff A M, Morgan J E, et al. Assessing the *in vitro* toxicity of the lunar dust environment using respiratory cells exposed to Al₂O₃ or SiO₂ fine dust particles [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, 2009, 45(10): 602-613
- [20] Xu Z, Chou L, Sun J. Effects of SiO₂ nanoparticles on HFL-I activating ROS-mediated apoptosis via p53 pathway [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2012, 32(5): 358-364
- [21] NeläA, Xia T, M dler L, et al. Toxic potential of materials at the nanolevel [J]. *Science*, 2006, 311(5761): 622-627
- [22] Takanabe K, Iglesia E. Rate and selectivity enhancements mediated by OH radicals in the oxidative coupling of methane catalyzed by Mn/Na₂WO₄/SiO₂ [J]. *Angewandte Chemie International ed. in English*, 2008, 47(40): 7689-7693
- [23] Ye Y, Liu J, Xu J, et al. Nano-SiO₂ induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line [J]. *Toxicology in Vitro*, 2010, 24(3): 751-758
- [24] Jugan M L, Barillet S, Simon-Deckers A, et al. Cytotoxic and genotoxic impact of TiO₂ nanoparticles on A549 cells [J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2011, 7(1): 22-23
- [25] Sayes C M, Reed K L, Warheit D B. Nanoparticle toxicology: Measurements of pulmonary hazard effects following exposures to nanoparticles [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 726: 313-324
- [26] Lim D H, Jang J, Kim S, et al. The effects of sub-lethal concentrations of silver nanoparticles on inflammatory and stress genes in human macrophages using cDNA microarray analysis [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(18): 4690-4699
- [27] Zhang J Y, Song W H, Guo J, et al. Cytotoxicity of different sized TiO₂ nanoparticles in mouse macrophages [J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2013, 29(6): 523-533
- ◆