

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20170929002

陈业文, 胡元灏, 程龙, 等. 过敏症状儿童室内 PM_{2.5} 对小鼠巨噬细胞的氧化损伤及 VE 的抗氧化保护作用研究[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(2): 120-127

Chen Y W, Hu Y H, Cheng L, et al. Vitamin E mitigates indoor PM_{2.5}-induced oxidative stress in mouse peritoneal macrophages: Implication in children living with allergy [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(2): 120-127 (in Chinese)

过敏症状儿童室内 PM_{2.5} 对小鼠巨噬细胞的氧化损伤及 VE 的抗氧化保护作用研究

陈业文, 胡元灏, 程龙, 刘俏, 晏彪*, 吴喆#

湖北科技学院基础医学研究中心, 咸宁 437100

收稿日期: 2017-09-29 录用日期: 2017-11-07

摘要: 越来越多的研究提示, 主要空气污染物 PM_{2.5} 暴露浓度的升高与儿童过敏性疾病的发病率有着密切的关系, 然而 PM_{2.5} 暴露与过敏性疾病之间的关联尚未完全阐明。为探究患有过敏症状儿童的室内 PM_{2.5} 对小鼠巨噬细胞的氧化损伤作用以及维生素 E (vitamin E, VE) 的抗氧化保护作用, 从 5 户患有 1 种或 1 种以上的过敏性症状 (如过敏性鼻炎、哮喘) 儿童的室内采集 PM_{2.5}, 分别考察了不同剂量 PM_{2.5} 暴露 24 h 后如何影响小鼠巨噬细胞的氧化应激水平, 指标包括活性氧 (ROS), 还原型谷胱甘肽 (GSH), 丙二醛 (MDA), 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OH-dG), 以及炎症因子水平, 指标包括肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 白介素 8 β (IL-8 β) 的影响。结果表明, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PM_{2.5} 暴露组与对照组比较, 细胞内 ROS 积累, 出现脂质过氧化以及 DNA 损伤, 并伴有炎症反应的发生, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); VE (50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) + 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PM_{2.5} 组的 ROS、MDA、8-OH-dG、TNF- α 、IL-8 β 含量低于 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PM_{2.5} 组, GSH 含量高于 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PM_{2.5} 组。较高剂量 (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) PM_{2.5} 可诱导小鼠腹腔巨噬细胞出现氧化损伤, VE 在该应激过程中起着一定的保护作用。

关键词: 室内 PM_{2.5}; 巨噬细胞; 氧化损伤; 炎症因子; 维生素 E

文章编号: 1673-5897(2018)2-120-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Vitamin E Mitigates Indoor PM_{2.5}-induced Oxidative Stress in Mouse Peritoneal Macrophages: Implication in Children Living with Allergy

Chen Yewen, Hu Yuanhao, Cheng Long, Liu Qiao, Yan Biao*, Wu Zhe#

Research Center of Basic Medical Sciences, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China

Received 29 September 2017 accepted 7 November 2017

Abstract: Inhalable fine aerosol particles, namely atmospheric particulate matter with a diameter of 2.5 μm or less (PM_{2.5}), are well recognized as one of the major air pollutants that are harmful to human health. Previous studies have demonstrated that increased concentration of PM_{2.5} is closely related to the incidence of allergic diseases in children. However, the mechanisms by which PM_{2.5} exposure is associated to allergic diseases remain elusive. To study the role of oxidative stress and macrophages in PM_{2.5}-induced damage in children living with allergy, we first sampled PM_{2.5} from five apartments, each housing one child or more who is manifested with at least one allergic

基金项目: 湖北科技学院校级资助项目 (2016-18X026)

作者简介: 陈业文 (1964-), 女, 实验师, 研究方向为环境毒理学, E-mail: 1191675866@qq.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: e21yanbiao@sina.cn; 5416142@qq.com

symptom like allergic rhinitis or asthma. Mouse peritoneal macrophages were exposed to the collected PM_{2.5} (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 24 h, with or without the addition of Vitamin E in the medium. Treated macrophages were subjected to detection of the levels of reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) as oxidative markers, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-8 β (IL-8 β) as inflammatory mediators. The results showed significant increase in intracellular ROS accumulation, lipid peroxidation, DNA damage and inflammatory response in macrophages exposed to 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PM_{2.5} as compared to control air exposure ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Interestingly, the levels of ROS, MDA, 8-OH-dG, TNF- α and IL-8 in PM_{2.5}-exposed macrophages were significantly lower, whereas that of GSH higher, in the presence than the absence of 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Vitamin E. These results indicate that a higher dose (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of PM_{2.5} leads to oxidative damage in mouse macrophages, and Vitamin E could mitigate the PM_{2.5}-induced cellular oxidative stress, exhibiting implication in therapeutic treatment of allergy in children.

Keywords: indoor PM_{2.5}; macrophages; oxidative damage; inflammatory factors; Vitamin E

可吸入细颗粒物(PM_{2.5},空气动力学直径 $\leq 2.5\ \mu\text{m}$)对人体的不利影响主要取决于粒径、成分和浓度,并随季节变化^[1],其浓度的升高与过敏性疾病的发病率有着密切的关系^[2-3]。Zhang等^[4]对我国4个城市(广州、武汉、兰州、重庆)8 000余名小学生的调查表明,PM_{2.5}浓度每升高39 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$,儿童哮喘的发病率就会增加1.22%;Chen等^[5]应用多重Logistic回归模型分析了我国6个城市(上海、南京、重庆、长沙、乌鲁木齐、太原)30 759名学龄前儿童的过敏症状个体水平,其结果发现,PM_{2.5}年平均浓度每升高10 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$,过敏性鼻炎(OR=1.2,95%可信区间为1.11~1.29)、哮喘(OR=1.1,95%可信区间1.03~1.18)的患病率呈正相关。大量研究表明,PM_{2.5}暴露对儿童过敏性疾病具有重要影响^[2-5],然而PM_{2.5}与过敏性疾病的关联尚未完全阐明。

已有研究表明,PM_{2.5}能使巨噬细胞功能失调,并最终诱发哮喘和其他过敏性疾病^[6]。PM_{2.5}主要通过呼吸道进入体内,那些粒径小于0.1 μm 的PM_{2.5}还能直接穿透肺泡进入血液循环系统。巨噬细胞是该系统中重要的一类靶细胞,有研究指出,PM_{2.5}暴露会使肺泡巨噬细胞出现DNA损伤^[7],诱导肺巨噬细胞发生炎症反应^[8];但由于PM_{2.5}的成分复杂,含多种有害物质,加之其暴露毒性可能受多种因素影响,因而其致病机理目前尚无定论^[9]。当前,提出的PM_{2.5}的毒性机制较多^[10],主要包括氧化应激,炎症反应以及先天和后天免疫反应,其中氧化应激可能是公认的机制之一,其他机制均与氧化应激相关^[11]。PM_{2.5}由于不规则以及多棱角,首先进入体内后,会对呼吸道上皮细胞、肺泡细胞、血管内皮细胞均有直接的机械损伤^[12],在此过程中,PM_{2.5}与细胞作用会

诱导机体释放活性氧(ROS),而ROS的过量产生与呼吸、循环系统的损伤密切相关^[13]。

黄虹等^[14]利用人体肺部PM浓度模型定量评估了广州市夏、冬季抽样人群PM_{2.5}的日均暴露量发现,冬季的暴露量大于夏季,未成年人接触PM_{2.5}的量要比老年人、成年人高。一些研究也指出,未成年人在室内所处的时间较室外长^[15],而且室内PM_{2.5}的浓度有可能高于室外^[16],因而,室内PM_{2.5}对未成年人尤其是那些患有过敏症状儿童的影响值得关注。本研究从武汉市洪山区的5户患有过敏症状儿童的室内采集PM_{2.5},通过检测不同剂量PM_{2.5}暴露下小鼠腹腔巨噬细胞的氧化应激水平(ROS、GSH、8-OH-dG),炎症因子水平(TNF- α 、IL-8 β),并同时联合VE进行阻断,以探究其对小鼠巨噬细胞的氧化损伤作用以及VE在此过程中的抗氧化保护作用。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

1.1.1 主要仪器与试剂

仪器:AirChek XR5000 PM_{2.5}环境采样器(美国SKC),QMA石英膜(美国Whatman),Centrivap[®]真空离心浓缩仪(美国Labconco),Power wave XS酶标仪(美国Bio-Tek),FLX800荧光酶标仪(美国Bio-Tek),SW-CJ-2D超净工作台(中国苏州净化),TE2000-S倒置显微镜(日本Nikon)。

试剂:RPMI 1640培养基,胎牛血清(Gibco),二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯(DCFH-DA, >99.9%,美国Sigma),硫代巴比妥酸(TBA,分析纯),还原型谷胱甘肽试剂盒(南京建成生物工程研究所),小鼠8-OH-dG、TNF- α 和IL-8 β 酶联免疫试剂盒(美国

eBioscience),其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.2 实验动物

选用湖北省疾病预防控制中心实验动物中心提供的 SPF 级雌性昆明小鼠(6 周龄,合格证号:42000600003915),标准环境(12 h:12 h 光照-黑暗循环,50%~70% 湿度,温度为 20~25 °C)饲养 1 周后取材实验。

1.2 实验方法

1.2.1 PM_{2.5}的采集

本研究先对 100 余户家庭中 10~12 岁的儿童进行问卷调查,满足以下条件:儿童居住时间>3 年,且儿童患有 1 种或 1 种以上的过敏性症状(如过敏性鼻炎、哮喘),筛选出 5 户家庭作为 PM_{2.5} 采样点。用 AirChek XR5000 PM_{2.5} 采样器采集,所设置的吸气流量为 1.5 L·min⁻¹,2016 年 10 月至 12 月期间每日白天不间断采样 8 h,采样当时监测的室内 PM_{2.5} 浓度为 200~500 μg·m⁻³,相对湿度范围为 55%~70%,室内温度变化范围为 17~22 °C。采集样品在 QMA 石英膜(直径 46.2 mm)上。

1.2.2 PM_{2.5}悬液制备

QMA 石英膜经干燥处理后,将滤膜剪成 1~2 cm²的小块,用三蒸水超声振荡 20 min,去除滤膜。滤液混匀,再经真空离心浓缩仪处理,称重后,用 PBS 配成所需浓度,混匀并灭菌,4 °C 保存。实验时超声震荡 15 min 混匀使用。

1.2.3 巨噬细胞的分离和培养

雌性 SPF 级 KM 小鼠实验前 3 d,腹腔注射 1 mL 6% 可溶性淀粉(可刺激小鼠腹腔产生更多的巨噬细胞)后,按李海涛等^[17]的操作步骤获得巨噬细胞,经 HE 染色鉴定为巨噬细胞,同时用 0.4% 台盼蓝(Trypan blue,实验室常用活体染色剂)染色巨噬细胞 5 min,分别 3 次计数视野内 100 个细胞中出现蓝色细胞的比例,取平均值,巨噬细胞的存活率=1-(4+5+5)/(100×3)=95.3%。经鉴定后分离出的细胞先铺板于 6 孔板 2 h 后,洗去未贴壁细胞,待细胞计数后调整细胞密度为 1×10⁹个·L⁻¹,移入 96 孔板中,每孔 180 μL,混匀后置于培养箱中待染毒。

1.2.4 PM_{2.5}暴露浓度的选择与分组

PM_{2.5}与巨噬细胞共培养 24 h。PM_{2.5}浓度参考先前的研究^[18]选择为 0(对照),10 μg·mL⁻¹(低剂量),200 μg·mL⁻¹(高剂量);50 mg·mL⁻¹的 VE 作为非酶抗氧化剂。实验分组如下:(A) 对照组(control, saline),(B) 患过过敏症状儿童的室内(indoor allergic)10

μg·mL⁻¹ PM_{2.5},(C) 患过过敏症状儿童的室内(indoor allergic)200 μg·mL⁻¹ PM_{2.5};(D) VE(50 mg·mL⁻¹);(E) VE(50 mg·mL⁻¹)+患过过敏症状儿童的室内(indoor allergic)200 μg·mL⁻¹ PM_{2.5}。

1.2.5 指标测定

(1)ROS 测定:2',7'-二氯荧光素二乙酸(DCF)被广泛用于检测活性氧的生成,用以评估整个氧化应激的潜在毒性^[19]。DCFH-DA 能穿透细胞膜并被细胞内的水解酯酶分解产生非荧光的 DCFH。ROS 含量通过监测这种荧光变化来衡量,具体方法参考文献^[20]。最终的反应混合物置于黑暗环境下 5 min,然后选择激发波长 485 nm 和发射波长 520 nm,用 FLx800 荧光酶标仪检测。

(2)GSH 测定:谷胱甘肽可以在黑暗中与二硫代二硝基苯甲酸(DTNB)反应形成黄色化合物,GSH 试剂盒可用来检测这种颜色变化。然后用酶标仪检测 412 nm 波长下吸光值,根据标准曲线,计算 GSH 含量(μmol·mL⁻¹)= OD₄₁₂/0.0023, R²=0.997。

(3)MDA 测定:MDA 可与 TBA 反应形成稳定的发色团,实验方法简言之,2 mL 0.6% TBA 溶解液(10% TCA 助溶)与 0.5 mL 细胞悬液混合,沸水浴 15 min,会有粉红色混合物沉淀生成。随后快速冷却,10 000 g 离心 5 min,收集的上清液,用酶标仪检测 450、532、600 nm 波长下吸光值,MDA 含量(μmol·mL⁻¹)=6.45×(OD₅₃₂-OD₆₀₀)-0.56×OD₄₅₀。

(4)DNA 损伤分析:暴露后的细胞上清液中所含的 8-OH-dG 含量使用 ELISA 试剂盒测定,试剂盒灵敏度为 0.5 ng·mL⁻¹。

(5)TNF-α 和 IL-8β 的检测:本实验中巨噬细胞上清液中 TNF-α 和 IL-8β 的含量通过 ELISA 试剂盒检测,TNF-α、IL-8β 试剂盒灵敏度都为 8.0 pg·mL⁻¹。

1.2.6 统计学分析

数据采用平均值(mean)±标准差(SEM)。组间的差异分析通过单向方差分析(ANOVA)结合 *t* 检验(Tukey test)确定,*P*<0.05、*P*<0.01 为差异显著。统计图表使用 GraphPad Prism 5.0 软件绘图。

2 结果(Results)

2.1 PM_{2.5}影响小鼠腹腔巨噬细胞的形态

图 1 显示 PM_{2.5}暴露 24 h 后小鼠腹腔巨噬细胞的形态变化,对照组的巨噬细胞呈圆型或椭圆(图 1A),有伪足状突起,而 PM_{2.5}暴露组的巨噬细胞伪足

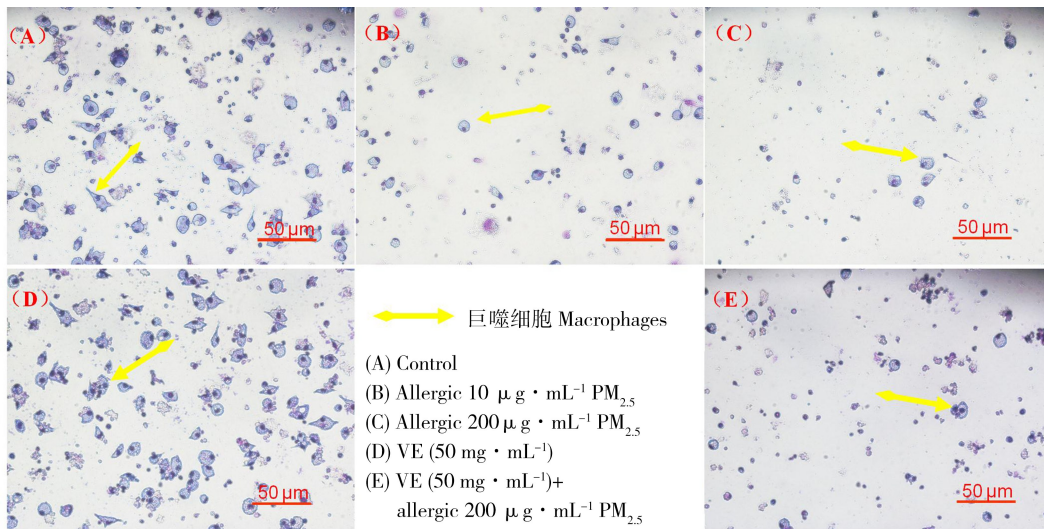


图 1 PM_{2.5} 暴露 24 h 后巨噬细胞的形态图 (Giemsa 染色, ×20)

注:(A)对照组(control, saline), (B)患过敏症状儿童的室内(indoor allergic)10 μg·mL⁻¹ PM_{2.5}, (C)患过敏症状儿童的室内(indoor allergic)200 μg·mL⁻¹ PM_{2.5}; (D)VE(50 mg·mL⁻¹); (E)VE(50 mg·mL⁻¹)+患过敏症状儿童的室内(indoor allergic)200 μg·mL⁻¹ PM_{2.5}。

Fig. 1 Morphology of macrophages after exposure to PM_{2.5} for 24 h (stained with Giemsa, ×20 magnification)

Note: (A) Control (saline); (B) allergic 10 μg·mL⁻¹ PM_{2.5}; (C) allergic 200 μg·mL⁻¹ PM_{2.5}; (D) VE (50 mg·mL⁻¹);

(E) VE (50 mg·mL⁻¹) + allergic 200 μg·mL⁻¹ PM_{2.5}.

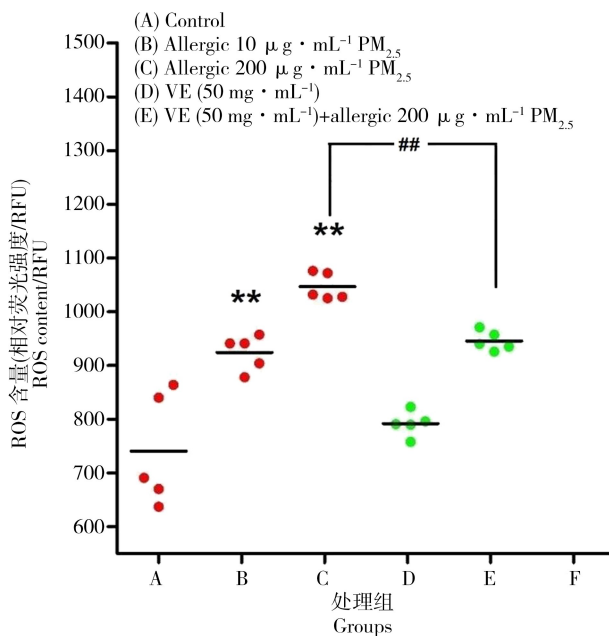


图 2 PM_{2.5} 对小鼠巨噬细胞 ROS 的影响 (n = 5)

注与对照组比较, * $P < 0.01$; 与混合组(PM_{2.5} + VE)比较, ## $P < 0.01$ 。

Fig. 2 ROS level of macrophages induced by different concentrations of PM_{2.5} after 24 h (n=5)

Note: * $P < 0.01$, compared with control; ## $P < 0.01$,

VE (50 mg·mL⁻¹) + 200 μg·mL⁻¹ PM_{2.5}

group compared with 200 μg·mL⁻¹ PM_{2.5} group.

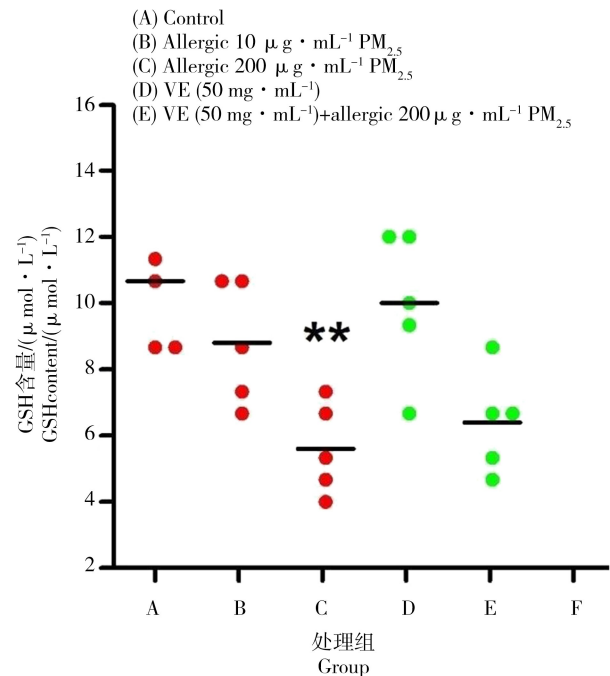


图 3 PM_{2.5} 对小鼠巨噬细胞 GSH 的影响 (n = 5)

注:与对照组相比, * $P < 0.01$ 。

Fig. 3 GSH level of macrophages induced by different concentrations of PM_{2.5} after 24 h (n=5)

Note: * $P < 0.01$, compared with control.

状突起消失或并不明显(图 1B、1C);且随着 $\text{PM}_{2.5}$ 浓度的增大,核质比明显增大(图 1B、1C)。从图 1E 可以看出,与 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ 组比较,VE ($50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) + $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ 组虽有一定程度的皱缩,但巨噬细胞的数量明显较多。

2.2 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导 ROS 生成和 GSH 衰减

ROS 是氧化应激最重要的生物标志物,而 GSH 是氧化应激过程中的清除剂,可以清除活性氧分子(如·OH 等),防止氧化,但自身也会随之被消耗。细胞内 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导 ROS 生成的结果如图 2 所示,ROS 水平在 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露 24 h 后增加非常显著($P < 0.01$)。与 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ 组比较,VE ($50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) + allergic $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ 组 ROS 含量下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。从图 3 可以看出,与对照组比较, $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ 组 GSH 含量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ 组比较,VE ($50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) + $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ 组 GSH 含量升高。

2.3 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导脂质过氧化

ROS 过量诱导的另一个主要结果是会导致脂质过氧化反应,而脂质过氧化会进一步损伤细胞。MDA 是脂质过氧化的终产物,因而 MDA 浓度的变化可以指示脂质过氧化的损伤程度。从图 4 可以看出, $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ 组的 MDA 水平增加显著($P < 0.01$)。与 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ 组比较,VE ($50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) + $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ 组 MDA 含量下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导 DNA 损伤

8-OH-dG 作为 DNA 氧化损伤的敏感指标,可以用来反映 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导 DNA 损伤的程度。如图 5 所示,与对照组比较, $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ 组的 8-OH-dG 水平增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导炎症因子释放

TNF- α 和 IL-8 β ,是 2 种非常重要的炎症因子,通过检测它们含量的变化可以间接评估 $\text{PM}_{2.5}$ 对巨噬细胞炎症反应的影响。TNF- α 的结果如图 6 所示,与对照组比较, $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ 组的有显著差异($P < 0.01$),与 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ 组比较,VE ($50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) + $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ 组 TNF- α 水平有降低的趋势。IL-8 β 的结果如图 7 所示,该结果显示的趋势与 TNF- α 的相同,即与对照组相比, $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ 组的发生显著变化($P < 0.05$)。

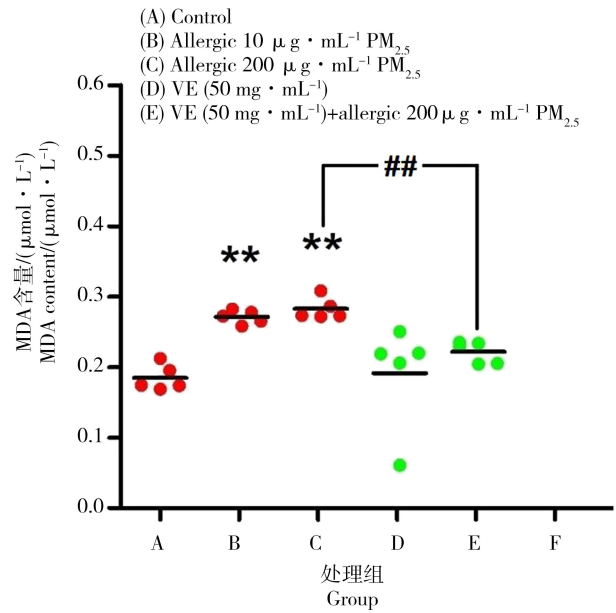


图 4 $\text{PM}_{2.5}$ 对巨噬细胞 MDA 的影响 ($n = 5$)

注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与混合组($\text{PM}_{2.5}$ + VE)比较,** $P < 0.01$ 。

Fig. 4 MDA level of macrophages induced by different concentrations of $\text{PM}_{2.5}$ after 24 h ($n = 5$)

Note: ** $P < 0.01$, compared with control; ** $P < 0.01$, VE ($50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) + $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ group compared with $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{PM}_{2.5}$ group.

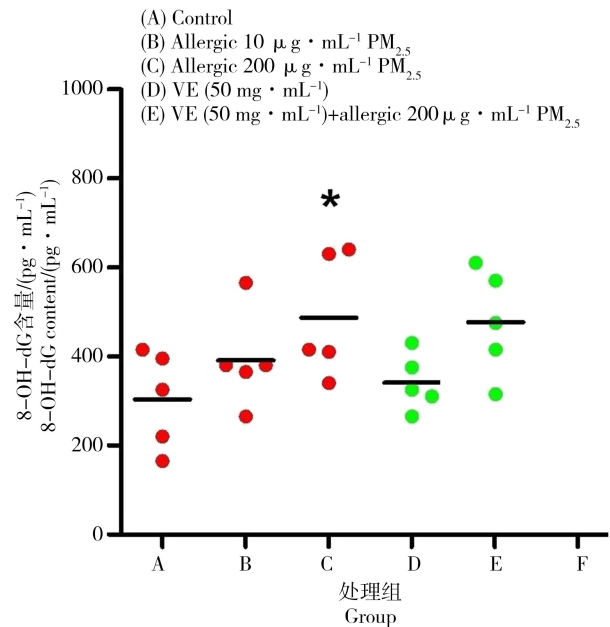


图 5 $\text{PM}_{2.5}$ 对巨噬细胞 8-OH-dG 的影响 ($n = 5$)

注:与对照组相比,* $P < 0.05$ 。

Fig. 5 8-OH-dG level of macrophages induced by different concentrations of $\text{PM}_{2.5}$ after 24 h ($n = 5$)

Note: * $P < 0.05$, compared with control.

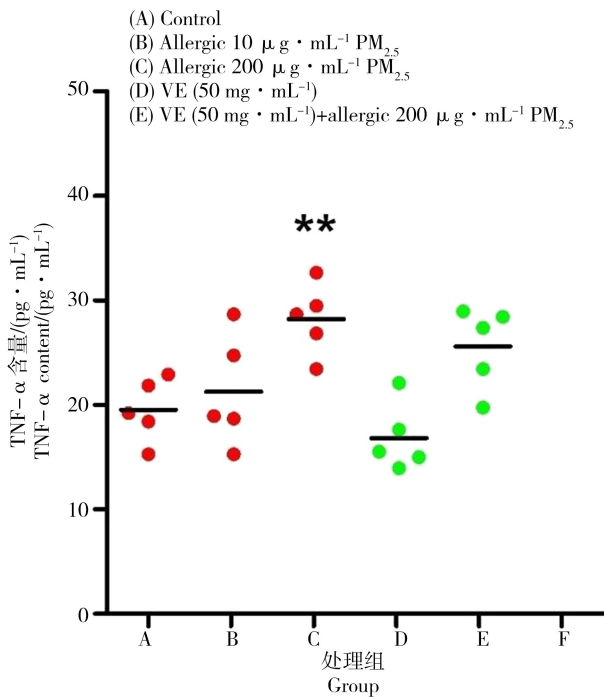


图 6 PM_{2.5}对巨噬细胞 TNF- α 的影响 ($n = 5$)

注:与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

Fig. 6 TNF- α level of macrophages induced by different concentrations of PM_{2.5} after 24 h ($n = 5$)

Note: ** $P < 0.01$, compared with control.

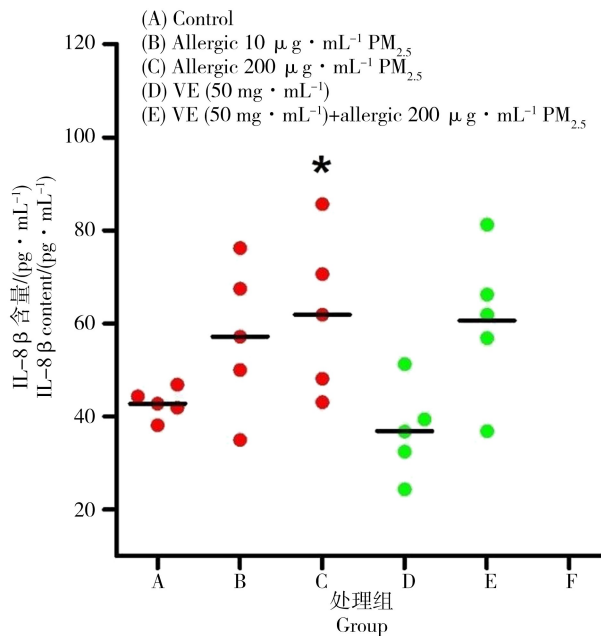


图 7 PM_{2.5}对巨噬细胞 IL-8 β 的影响 ($n = 5$)

注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

Fig. 7 IL-8 β level of macrophages induced by different concentrations of PM_{2.5} after 24 h ($n = 5$)

Note: * $P < 0.05$, compared with control.

3 讨论 (Discussion)

近些年国外的权威研究调查表明^[21],主要空气污染物包括 PM_{2.5} 与儿童过敏性疾病之间存在着一定的联系:过敏性症状与 PM_{2.5} 的暴露程度有关^[22]。Rojasbracho 等^[23]的研究表明,室内 PM_{2.5} 浓度与个人行为显著相关,更高的污染风险可能对个体健康产生较为严重的影响。根据本实验结果,暴露于更高水平的室内 PM_{2.5} 有可能会增加细胞损伤的风险。细胞形态学结果显示,小鼠腹腔巨噬细胞的数量会随着 PM_{2.5} 暴露浓度的增加而降低,其多伪足状突起的形态特征逐渐消失。PM_{2.5} 暴露剂量由 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 增加到 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,反映氧化应激和炎症反应的指标也均表现出一定的剂量依赖关系,随着 ROS 含量的累积,还原性 GSH 的含量相应地损耗,脂质过氧化产物 MDA 含量增加,8-OH-dG 水平增加,IL-8、TNF- α 的表达量增加。

研究表明,通过氧化应激介导的炎症反应可能是 PM_{2.5} 潜在毒性的致病机制之一^[11]。有研究指出,PM_{2.5} 自身含有大量的半醌类自由基,且这些自由基通过激活 ROS 聚集对 DNA 造成损伤^[24]。ROS 可以由细胞接触 PM_{2.5} 后直接通过氧化还原生成,也可以间接通过细胞与 PM_{2.5} 交互作用生成^[11]。细胞受到外来异物 PM_{2.5} 刺激后,伴随 ROS 的积累,细胞会出现不同程度的损伤,机体随之会作出即时的反应,激活免疫细胞(如巨噬细胞)释放出大量的促炎症细胞因子,如 IL-8、TNF- α ^[25]。这些细胞因子的及时分泌对机体免受 PM_{2.5} 伤害是有利的,然而,长期的炎症反应则相当不利,如:低浓度 TNF- α 对机体的自我平衡功能(如组织修复、启动凋亡)是重要的,而其整体水平随炎症的增强而增强,TNF- α 的过剩则可能会导致严重的组织损伤^[26]。许多呼吸道疾病(哮喘、慢性阻塞性肺病)可以追溯到炎症相关细胞因子高水平的活化^[27],氧化应激过程通过协同作用能有效激活促炎症因子(如 IL-8、TNF- α 等)的表达,涉及的信号通路主要有激活氧化还原致敏因子的蛋白激酶(MAPK)途径和核转录因子(nuclear factor- κ B, NF- κ B)途径^[28]。如:在呼吸系统疾病(如慢性呼吸疾病和哮喘)中,PM_{2.5} 能通过核转录因子依赖(NF- κ B-dependent)途径、核转录因子抑制(I κ B-independent)途径促进 IL-8 的释放^[11]。

目前的研究表明,氧化应激的形成是由于组织或细胞内 ROS 的过量产生打破了原有的氧化与还原平衡,很大程度上是由 ROS 水平的增加和 GSH

水平的耗竭所致。在 PM_{2.5} 介导的氧化损伤过程中, 氧自由基清除剂(如 GSH)、抗氧化剂(如 VE)能对氧化损伤起到保护作用^[28]。机体内的 ROS 包括自由基如·OH、离子如·O₂⁻, 分子如 H₂O₂ 等, GSH 可以清除·OH 等自由基, 防止氧化, 但自身也会随之被消耗。ROS 的过量产生与炎症反应中各种核转录因子诱导物(如 TNF-α)含量的升高有着显著关联^[30], ROS 能活化 MAPK 途径介导 TNF-α 的高水平表达; VE 作为非酶抗氧化剂, 可以阻止这个激活过程^[28], 以达到在某种程度上清除氧自由基保护细胞免受氧化损伤。

本研究显示, 较高剂量(≥200 μg·mL⁻¹)PM_{2.5} 暴露后的小鼠巨噬细胞出现氧化损伤, 并伴有炎症反应; VE 在该应激过程中起着一定的保护作用。虽然实验小鼠与人体存在差异, 但结果仍有一定参考价值; 由于 PM_{2.5} 的复杂性, 其造成损伤的机制有待进一步研究。

通讯作者简介: 晏彪(1988-), 男, 硕士, 助教, 主要从事环境医学和环境毒理学方面的研究。

共同通讯作者简介: 吴喆(1983-), 女, 硕士, 讲师, 主要研究方向为基础医学。

参考文献 (References):

- [1] Wang B Q, Liu J F, Liu B W, et al. Personal exposure to PM_{2.5} associated with heavy metals in four travel modes of Tianjin during the summer season [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(7): 6667-6678
- [2] Franklin M, Zeka A, Schwartz J. Association between PM_{2.5} and all-cause and specific-cause mortality in 27 US communities [J]. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 2007, 17(3): 279-287
- [3] Loftus C, Yost M, Sampson P, et al. Regional PM_{2.5} and asthma morbidity in an agricultural community: A panel study [J]. *Environmental Research*, 2015, 136: 505-512
- [4] Zhang J, Hu W, Wei F, et al. Children's respiratory morbidity prevalence in relation to air pollution in four Chinese cities [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2002, 110(9): 961-967
- [5] Chen F, Lin Z, Chen R, et al. The effects of PM_{2.5} on asthmatic and allergic diseases or symptoms in preschool children of six Chinese cities, based on China, Children, Homes and Health (CCHH) project [J]. *Environmental Pollution*, 2018, 232: 329-337
- [6] Lee J Y, Lee S, Bae G. A review of the association between air pollutant exposure and allergic diseases in children [J]. *Atmospheric Pollution Research*, 2014, 5 (4): 616-629
- [7] Meng Z, Zhang Q. Damage effects of dust storm PM_{2.5} on DNA in alveolar macrophages and lung cells of rats [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45(8): 1368-1374
- [8] Hiraiwa K, van Eeden S F. Contribution of lung macrophages to the inflammatory responses induced by exposure to air pollutants [J]. *Mediators of Inflammation*, 2013, 2013: 619523-619533
- [9] 赵厚银, 邵龙义, 时宗波. 室内空气 PM_{2.5} 研究现状及发展趋势 [J]. *环境与健康杂志*, 2003, 20(5): 310-312
Zhao H Y, Shao L Y, Shi Z B. Research status and prospect of indoor air PM_{2.5} [J]. *Journal of Environmental Health*, 2003, 20(5): 310-312 (in Chinese)
- [10] Bu C M, Wang L P, Huang L Q, et al. Evaluation of health effects of fine particulate PM_{2.5}: A review [J]. *Advanced Materials Research*, 2013, 790: 441-444
- [11] Ristovski Z D, Miljevic B, Surawski N C, et al. Respiratory health effects of diesel particulate matter [J]. *Respirology*, 2012, 17(2): 201-212
- [12] Deng X, Zhang F, Rui W, et al. PM_{2.5}-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 2013, 27(6): 1762-1770
- [13] Sørensen M, Schins R P F, Hertel O, et al. Transition metals in personal samples of PM_{2.5} and oxidative stress in human volunteers [J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 2005, 14(5): 1340-1343
- [14] 黄虹, 李顺诚, 曹军骥, 等. 利用人体肺部 PM 浓度模型定量评估广州市夏、冬季抽样人群 PM_{2.5} 的暴露 [J]. *生态毒理学报*, 2006, 1(4): 375-378
Huang H, Li S C, Cao J J, et al. PM_{2.5} exposure assessment of investigation-involved persons in Guangzhou City by using human lung particulate concentration model [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2006, 1(4): 375-378 (in Chinese)
- [15] Taylor J, Shrubsole C, Davies M, et al. The modifying effect of the building envelope on population exposure to PM_{2.5} from outdoor sources [J]. *Indoor Air*, 2014, 24: 639-651
- [16] Geller M D, Chang M C, Sioutas C, et al. Indoor/outdoor relationship and chemical composition of fine and coarse particles in the southern California deserts [J]. *Atmospheric Environment*, 2002, 36: 1099-1110
- [17] 李海涛, 肖丹, 屈学民, 等. 小鼠腹腔巨噬细胞的分离与培养 [J]. *现代生物医学进展*, 2008, 8(4): 638-639
Li X T, Xiao D, Qu X M, et al. Separation and cultivation of mouse peritoneal macrophages [J]. *Progress in Modern*

- Biomedicine, 2008, 8(4): 638-639 (in Chinese)
- [18] Sun Q, Hong X, Wold L E. Cardiovascular effects of ambient particulate air pollution exposure [J]. *Circulation*, 2010, 121(25): 2755-2765
- [19] Deng X, Rui W, Zhang F, et al. PM_{2.5} induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells [J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2013, 29(3): 143-157
- [20] Crow J P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species [J]. *Nitric Oxide*, 1997, 1(2): 145-157
- [21] Atkinson R W, Anderson H R, Sunyer J, et al. Acute effects of particulate air pollution on respiratory admissions: Results from APHEA 2 project. *Air Pollution and Health: A European Approach* [J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2001, 164(10): 1860-1866
- [22] Lee J Y, Lee S, Bae G. A review of the association between air pollutant exposure and allergic diseases in children [J]. *Atmospheric Pollution Research*, 2014, 5(4): 616-629
- [23] Rojasbracho L, Suh H H, Koutrakis P. Relationships among personal, indoor, and outdoor fine and coarse particle concentrations for individuals with COPD [J]. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 2000, 10(3): 294-306
- [24] Dellinger B, Pryor W A, Cueto R, et al. Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2001, 14(10): 1371-1377
- [25] 史云洁, 王沛, 马姗姗, 等. 大气细颗粒物对实验动物氧化应激及炎症反应研究进展 [J]. *中国公共卫生*, 2017, 33(1): 35-38
- Shi J Y, Wang P, Ma S J, et al. Research progress in atmospheric fine particles (PM_{2.5}) induced oxidative stress and inflammatory reaction in experimental animals [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2017, 33(1): 35-38 (in Chinese)
- [26] Sharma S, Bose M. Role of cytokines in immune response to pulmonary tuberculosis [J]. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 2001, 19(3): 213-219
- [27] Dagher Z, Garçon G, Billet S, et al. Role of nuclear factor-kappa B activation in the adverse effects induced by air pollution particulate matter (PM_{2.5}) in human epithelial lung cells (L132) in culture [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2007, 27(3): 284-290
- [28] Cindrovadavies T, Spasicboskovic O, Jauniaux E, et al. Nuclear factor-kappa B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: Effects of antioxidant vitamins [J]. *American Journal of Pathology*, 2007, 170(5): 1511-1520
- [29] Møller P, Jacobsen N R, Folkmann J K, et al. Role of oxidative damage in toxicity of particulates [J]. *Free Radical Research*, 2010, 44(1): 1-46
- [30] Haddad J J, Land S C. Redox/ROS regulation of lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation and MAPK-mediated TNF- α biosynthesis [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2002, 135(2): 520-536 ◆