

沙尘暴细颗粒物致大鼠肺泡巨噬细胞 DNA 损伤

孟紫强, 张全喜, 耿红

摘要: [目的] 探讨沙尘暴和正常天气细颗粒物($PM_{2.5}$)及其水提取物和有机提取物对大鼠肺泡巨噬细胞的细胞毒性和DNA的损伤作用。[方法] 沙尘暴和正常天气 $PM_{2.5}$ 于2004年3月采集自甘肃省武威市和内蒙古自治区包头市。细胞毒性用四甲基偶氮唑盐(MTT)分析法观察, 细胞DNA损伤用单细胞凝胶电泳(SCGE)技术检测。[结果] 沙尘暴和正常天气 $PM_{2.5}$ 及其水提取物和有机提取物均对大鼠肺泡巨噬细胞产生一定的细胞毒性, 且随剂量的增大而增强; 然而, 沙尘暴与正常天气之间除了包头沙尘暴 $PM_{2.5}$ 有机提取物之外, 余差异均无显著性。正常天气 $PM_{2.5}$ 和沙尘暴 $PM_{2.5}$ 水提取物和有机提取物均可引起细胞DNA损伤, 且随剂量增加而损伤增大; 正常天气 $PM_{2.5}$ 比沙尘暴 $PM_{2.5}$ 水提取物和有机提取物对细胞DNA损伤作用更大。不论正常天气 $PM_{2.5}$ 还是沙尘暴 $PM_{2.5}$, 其有机提取物对DNA的损伤作用均比水提取物作用更强, 表明 $PM_{2.5}$ 中引起DNA损伤的主要化学物是有机化合物种类。武威与包头两城市工业水平不同, 大气污染程度不同, 但两地沙尘暴 $PM_{2.5}$ 及其水提取物和有机提取物对细胞DNA的损伤作用, 在两地之间并无明显差异。[结论] 正常天气 $PM_{2.5}$ 和沙尘暴 $PM_{2.5}$ 及其水提取物和有机提取物均可引起DNA损伤, 且正常天气 $PM_{2.5}$ 的损伤作用更强; 然而不同地方沙尘暴 $PM_{2.5}$ 毒性作用未见差异, 推测其所含遗传毒性化学物可能类似。

关键词: 沙尘暴; $PM_{2.5}$; 水提取物; 有机提取物; 肺泡巨噬细胞; DNA损伤; 单细胞凝胶电泳

Damage Effects of Fine Particles from Sandstorm on DNA of Alveolar Macrophages in Rats MENG Zi-qiang, ZHANG Quan-xi, GENG Hong (Institute of Environmental Medicine and Toxicology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: [Objective] To study the toxicological effects of fine particles($PM_{2.5}$), water extract and solvent-extractable organic compounds of $PM_{2.5}$ from sandstorm and normal weather on the viability and DNA of rat alveolar macrophages, respectively. [Methods] We collected these fine particulate matters in Wuwei city, Gansu Province, and Baotou city, Inner Mongolia Autonomous Region, in March, 2004. DNA damage of rat alveolar macrophages was detected with single cell gel electrophoresis technique and cytotoxicity was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) reduction assay. [Results] $PM_{2.5}$ water extract and solvent-extractable organic compounds from sandstorm and normal weather had cytotoxicity to alveolar macrophages and caused the cell viability decreased in a dose-response manner; however, no significant difference was observed between the sandstorm samples and the normal weather samples except for the Baotou sandstorm. $PM_{2.5}$ solvent-extractable organic compounds. The water extracts of both normal weather $PM_{2.5}$ and sandstorm $PM_{2.5}$ could lead to DNA damage in a dose-dependent manner; the water extract of normal weather $PM_{2.5}$ made higher DNA damage than that of sandstorm $PM_{2.5}$. The solvent-extractable organic compounds of both $PM_{2.5}$ could lead to DNA damage and the solvent-extractable organic compounds of normal weather $PM_{2.5}$ made higher DNA damage than that of sandstorm $PM_{2.5}$. The solvent-extractable organic compounds made higher DNA damage than the water extract of both $PM_{2.5}$. It was suggested that the organic compounds are the main contributor to make DNA damage. Though there is difference in air pollution between Baotou city and Wuwei city, no significant differences were observed in DNA damage of sandstorm $PM_{2.5}$ both for its water extract and solvent-extractable organic compounds between two cities. [Conclusion] Normal weather $PM_{2.5}$ and sandstorm $PM_{2.5}$ and their water extracts and solvent-extractable organic compounds all can lead to DNA damage in a dose-dependent manner; also our results suggest that the genotoxicity of sandstorm $PM_{2.5}$ from these two cities is similar.

Key Words: sandstorm; $PM_{2.5}$; water extract; solvent-extractable organic compound; alveolar macrophage; DNA damage; the single cell gel electrophoresis technique

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30230310、20477023)及山西省自然科学基金资助项目(编号: 20031092)

作者简介: 孟紫强(1939-), 男, 教授、博导, 研究方向: 环境医学与毒理学, E-mail: zqmeng@sxu.edu.cn

作者单位: 山西大学环境医学与毒理学研究所, 山西 太原 030006

万方数据

沙尘暴是指强风把地表沙尘卷入空中,使空气特别混浊,水平能见度低于1 km的天气现象。它的出现是强劲的风力、丰富的沙尘源和不稳定的空气状态等多种因素相互作用的结果,主要发生在土地沙漠化比较严重的地区^[1]。近年来我国的西北地区春季几乎每年都会发生沙尘暴天气^[2]。沙尘暴发生时,沙源地和影响区大气中的可吸入颗粒物浓度迅速增加,大气污染急速加剧。我国及亚洲其他地区的沙尘暴带来的PM_{2.5}可以被输送到北太平洋,甚至穿过太平洋到达美国的中部和北极圈,对全球的气候产生影响^[3,4]。近年来研究表明,沙尘暴与风湿病、黑热病,尤其与肺炎有关^[5],居民的日死亡率也与沙尘暴天气的发生有关,而其中的细颗粒物是导致死亡率增加的主要因素^[6]。因此,沙尘暴PM_{2.5}毒理效应的研究日益受到重视。

近年来,有众多文献报道城市大气PM_{2.5}对肺泡巨噬细胞(AM)的毒理效应,如引起膜损伤、氧化应激、免疫功能下降等^[7],但有关沙尘暴PM_{2.5}及其水提取物和有机提取物对AM的DNA的影响尚未见文献报道。本文以2004年3月采集的包头和武威沙尘暴和正常天气PM_{2.5}为实验样品,通过体外实验观察它们对大鼠AM的DNA损伤和细胞毒性,旨在为揭示沙尘暴PM_{2.5}对人体和动物的毒害机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、正常熔点琼脂糖(NMA)、低熔点琼脂糖(LMA)、肌氨酸钠、Triton X-100及溴化乙锭(EB)等购自Sigma公司,其余试剂为国产分析纯。溶液用水均为Milli-Q超纯水。

1.2 沙尘暴与正常天气PM_{2.5}样品采集

采样地点位于甘肃省武威市和内蒙古自治区包头市,采样仪器离地面约10 m,周围无高大建筑物阻挡,也无重大污染源。采样时间为2004年3月1日至31日。采集的样品全部由北京大学环境学院胡敏教授提供。采用Thermo Andersen PM_{2.5}大流量大气采样器24 h连续采样,以石英纤维滤膜收集颗粒物,采好颗粒物的滤膜用铝箔纸包好、编号。

根据当地气象部门和环保监测站资料,结合国家《环境空气质量标准》(GB3095-1996),样品分为两类,分别采自正常良好天气(晴朗天气且PM₁₀、SO₂、氮氧化物均未超标)和沙尘暴天气,故采集的PM_{2.5}样品分为4种,A为包头正常天气样品,B为包头沙尘暴天气样品,C为武威正常天气样品,D为武威沙尘暴天气样品。

1.3 沙尘暴和正常天气PM_{2.5}及其水提取物和有机提取物的制备

1.3.1 PM_{2.5}的制备 将载有PM_{2.5}的石英纤维滤膜称重、剪碎后加入Milli-Q超纯水超声振荡以洗脱颗粒物,收集悬浮液并真空冷冻干燥。

1.3.2 水提取物的制备 将上述颗粒物悬液用0.45 μm的滤膜过滤,收集过滤液并真空冷冻干燥。

1.3.3 有机提取物的制备 将载有PM_{2.5}的石英纤维滤膜称重、剪碎后加入二氯甲烷超声振荡以洗脱颗粒物中的有机物,收集上清液并干燥。

实验前用0.9%生理盐水将PM_{2.5}制成悬液,将水提取物制

成溶液,用二甲基亚砜将有机提取物制成所需浓度的溶液,涡旋5 min使其充分混匀、备用。PM_{2.5}及其水提取物和有机提取物的平均提取率分别为60.8%、10.4%和3.2%。

1.4 染毒浓度配制

在PM_{2.5}和水提取物染毒组中,每个培养瓶中首先加入1.6 ml无血清RPMI1640培养液(含2.4×10⁶个大鼠肺泡巨噬细胞)和200 μl生理盐水(对照组)或用生理盐水配制的不同浓度的PM_{2.5}悬液(终浓度分别为33.3、100、300 μg/ml)或水提取物溶液(终浓度分别为75、150、300 μg/ml);在有机提取物染毒组中,如上每个培养瓶中首先加入1.6 ml含细胞的无血清RPMI1640培养液,对照组每瓶加入30 μl的二甲基亚砜,实验组每瓶加入二甲基亚砜配制的不同浓度的有机提取物溶液(终浓度分别为25、50、100 μg/ml)。

1.5 大鼠肺泡巨噬细胞的分离

将体重220~250 g的健康雄性Wistar大鼠麻醉,腹主动脉放血致死,收集肺泡灌洗液、离心收集细胞,并用含10%小牛血清的RPMI1640培养液洗涤。用台盼蓝拒染法计数并将细胞分装于细胞培养瓶中(每瓶约含2.4×10⁶个细胞),置37 °C、5%CO₂培养箱孵育2 h后小心移去原培养液,用0.9%生理盐水洗涤以去除非贴壁细胞和原培养液成分。贴壁的肺泡巨噬细胞纯度>95%。

1.6 细胞毒性的测定

采用MTT分析法,参照Mosmann的方法,略有改动^[8]。PM_{2.5}和水提取物的细胞毒性:在96孔细胞培养板(每孔约含2×10⁵个细胞)中加入不含血清的RPMI1640培养液和不同浓度的颗粒物处理液(对照用生理盐水)各100 μl,每6孔为一组平行。有机提取物的细胞毒性:在96孔细胞培养板(每孔约含2×10⁵个细胞)中加入不含血清的RPMI1640培养液190 μl和有机提取物处理液(对照用二甲基亚砜)10 μl,每6孔为一组平行。培养20 h后加入5 mg/ml的MTT溶液(20 μl/孔)继续培养4 h,小心弃上清。以PBS洗涤一次后加入200 μl二甲基亚砜,室温下放置15 min。转移其中的100 μl二甲基亚砜至新的96孔细胞培养板,在BIO-RAD Model 550型酶标仪上测值。计算细胞的相对存活率(处理组吸光值占对照组吸光值的百分率)。

1.7 细胞DNA损伤的测定

各组孵育4 h后收集细胞,并用单细胞凝胶电泳技术检测DNA的损伤。损伤指标采用Olive尾矩(OTM)。OTM观察主要根据Singh等^[9,10]的报道,并结合本实验室建立的方法进行SCGE^[11]。每个样本随机选择50个细胞,用Leica图象分析仪观察并保存图象,用Casp软件自动测量肺泡巨噬细胞DNA迁移的OTM。每个样品重复6次,共选取300个细胞。

1.8 统计方法

数据以平均值(\bar{x})±标准差(s)表示。统计学分析采用SPSS1.0软件进行,各组间差异采用方差分析(ANOVA)进行显著性检验,均数间多重比较用最小极差法(LSD)或Tamhane's t-test法。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 沙尘暴PM_{2.5}及其水提取物和有机提取物的细胞毒性

包头和武威不同天气下 $PM_{2.5}$ 及其水提取物和有机提取物处理大鼠肺泡巨噬细胞 24 h 后的细胞毒性, 见图 1。

从图 1①可知: 随着 $PM_{2.5}$ 悬液浓度增大, 细胞存活率逐渐降低。在处理细胞 24 h 后, 包头正常及沙尘暴天气与武威正常及沙尘暴天气样品在高浓度 (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 下细胞存活率分别为 72.48%、75.84%、70.89% 及 76.49%, 与对照组相比, 差异均有显著性。

从图 1②可知: 随着 $PM_{2.5}$ 水提取物溶液浓度增大, 细胞存活率也逐渐降低。在处理细胞 24 h 后, 包头正常及沙尘暴天气与武威正常及沙尘暴天气样品在高浓度 (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 下细胞存活率分别为 76.52%、85.74%、84.52% 及 81.92%, 与对照组相比差异均有显著性。

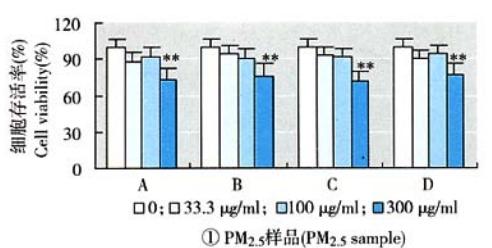
从图 1③可知: 随着 $PM_{2.5}$ 有机提取物溶液浓度增大, 细胞存活率逐渐降低。在处理细胞 24 h 后, 包头正常及沙尘暴天气与武威正常及沙尘暴天气样品在高浓度 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 下细胞存活率分别为 70.83%、91.38%、72.95% 及 73.38%, 与对照组相比差异均有显著性。

著降低, 同一地区沙尘暴与正常天气 $PM_{2.5}$ 及其水提取物和有机提取物样品之间、包头与武威正常天气样品之间以及包头与武威沙尘暴天气样品之间, 对细胞的毒性差异均无显著性。

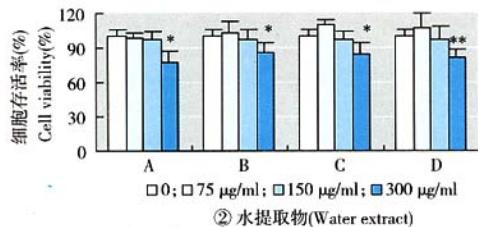
2.2 沙尘暴 $PM_{2.5}$ 及其水提取物和有机提取物对细胞 DNA 的损伤作用

运用 SCGE 技术分别检测包头和武威不同天气下 $PM_{2.5}$ 及其水提取物和有机提取物样品对大鼠肺泡巨噬细胞 DNA 的损伤作用, 损伤参数采用近年国际上常用的 OTM 表示, 见图 2。

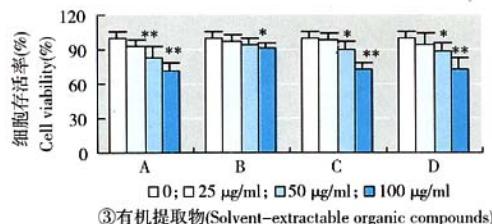
从图 2①可知: 随着 $PM_{2.5}$ 处理浓度增大, 包头、武威正常和沙尘暴天气 4 种 $PM_{2.5}$ 浓度都有使细胞 DNA 损伤程度增加的趋势, 即使用低浓度 (33.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) $PM_{2.5}$ 处理细胞, DNA 损伤的程度也显著升高。在各种浓度下, 包头沙尘暴比包头正常天气样品对 DNA 损伤作用显著降低; 在高浓度下, 武威沙尘暴比武威正常天气样品对 DNA 损伤作用也显著降低。但包头与武威正常天气样品、包头与武威沙尘暴天气样品对细胞 DNA 的损伤差异均未见显著性。



① PM_{2.5} 样品(PM_{2.5} sample)



② 水提取物(Water extract)



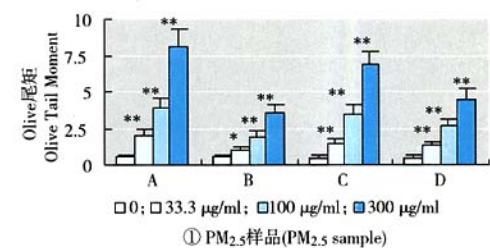
③ 有机提取物(Solvent-extractable organic compounds)

*: 与对照组相比 (Compared with the control), $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

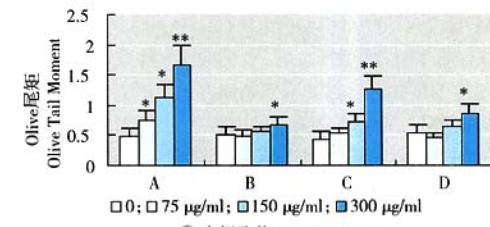
图 1 不同城市沙尘暴和正常天气 $PM_{2.5}$ 及其水提取物和有机提取物对大鼠肺泡巨噬细胞的毒性

Figure 1 Cytotoxicity of fine particles, water extract and solvent-extractable organic compounds from sandstorms and normal weather of different cities on rat alveolar macrophages, respectively

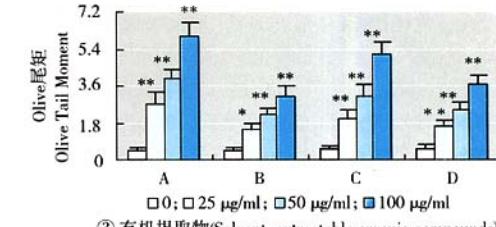
除了在高浓度外, 在同一浓度下, 包头沙尘暴 $PM_{2.5}$ 有机提取物样品比包头正常 $PM_{2.5}$ 有机提取物样品对细胞的毒性显著降低。



① PM_{2.5} 样品(PM_{2.5} sample)



② 水提取物(Water extract)



*: 与对照组相比 (Compared with the control), $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

图 2 不同城市沙尘暴和正常天气 $PM_{2.5}$ 及其水提取物和有机提取物对大鼠肺泡巨噬细胞 DNA 的损伤作用

Figure 2 Damaging effects of fine particles, water extract and solvent-extractable organic compounds from sandstorm and normal weather in different cities on DNA in rat alveolar macrophages

从图 2②可知: 随着 $PM_{2.5}$ 水提取物处理浓度增大, 包头正常及沙尘暴天气与武威正常及沙尘暴天气 4 种样品水提取物

均有使细胞DNA损伤程度增加的趋势。从图2②还可以看到,包头和武威正常天气PM_{2.5}水提取物比各自沙尘暴PM_{2.5}水提取物对DNA损伤作用更大,且环境污染较严重的包头市正常天气PM_{2.5}水提取物在低浓度(75 μg/ml)下就可引起DNA损伤。

从图2③可知:随着PM_{2.5}有机提取物处理浓度增大,包头、武威正常和沙尘暴天气4种样品有机提取物均有使细胞DNA损伤程度增加的趋势,即使在低浓度(25 μg/ml)下,细胞DNA受损伤的程度也均显著升高。在各种浓度下,包头正常天气样品对DNA损伤比包头沙尘暴天气样品均明显增强;在高浓度下,武威正常天气比武威沙尘暴天气样品,对DNA损伤显著增强。从图2③可知,武威与包头正常天气PM_{2.5}之间、两地沙尘暴PM_{2.5}之间,其有机提取物对DNA损伤差异未见显著性。然而两地均显示正常天气PM_{2.5}有机提取物比沙尘暴天气PM_{2.5}有机提取物对DNA的损伤更强。

3 讨论

流行病学资料表明,沙尘暴可吸入颗粒物浓度上升与人群呼吸系统疾病的发病率相关^[12, 13]。文献报道,城市大气总悬浮物(TSP)、可吸入颗粒物(PM₁₀)、细颗粒物(PM_{2.5})和超细颗粒物(PM_{0.1})对肺灌洗液(BALF)或AM具有多种毒理效应,如引起膜损伤、DNA损伤、氧化应激、免疫功能下降等,但有关沙尘暴PM_{2.5}及其水提取物和有机提取物的毒性作用或毒理机制却研究很少。本研究结果表明,在无明显细胞毒性的范围内,包头和武威正常天气和沙尘暴PM_{2.5}及其水提取物和有机提取物均能对肺泡巨噬细胞的DNA造成损伤,且具有剂量依赖关系。其机制可能为:摄入体内的沙尘暴PM_{2.5}到达肺组织后,一方面与巨噬细胞作用后释放活性氧,攻击细胞生物大分子DNA;另一方面沙尘暴PM_{2.5}激活肺泡巨噬细胞上的一氧化氮合酶,产生NO,NO又与活性氧中极不稳定的O₂⁻形成稳定的ONOO⁻,而ONOO⁻也可直接攻击细胞生物大分子DNA^[14]。PM_{2.5}中的有机提取物(如有机多环芳烃类、有机酸组分和极性化合物组分)与水提取物(如重金属Ni、Cd、Cr等)可直接或间接作用于DNA,引起DNA断裂或加合物形成。除此之外,PM_{2.5}也可通过直接产生活性自由基而作用于DNA,诱导DNA链断裂。

本次样品采集地点武威市和包头市分别位于腾格里沙漠边缘和库布齐沙漠边缘,沙尘暴天气的PM_{2.5}样品可能都与这些沙漠中的沙尘有关。包头和武威沙尘暴天气PM_{2.5}及其有机提取物与正常天气的PM_{2.5}及其有机提取物一样,在低浓度就对大鼠肺泡巨噬细胞DNA有显著损伤作用;然而颗粒物中水提取物引起的损伤较小,各种样品在高浓度(300 μg/ml)时才对大鼠肺泡巨噬细胞DNA有显著损伤。以上结果表明,PM_{2.5}对细胞DNA的损伤作用主要是由颗粒物中的有机提取物引起的,水提取物对细胞DNA的损伤作用较小。包头沙尘暴天气比包头正常天气,不论是PM_{2.5},还是水提取物或有机提取物样品,对肺泡巨噬细胞DNA的损伤均显著降低,这可能是因为包头是一个大气污染较严重的重工业城市,其正常天气PM_{2.5}比沙尘暴PM_{2.5}所含有毒污染物较多有关,包头与武威沙尘暴PM_{2.5}及其水提取物、有机提取物样品相比,它们之间差异没有显著性。推测两地沙尘暴的化学组分可能相似,对此正在研究中。包头正常天气比武威正常天气的

PM_{2.5}及其水提取物和有机提取物样品引起的损伤较大,虽然它们之间差异并没有显著性,这可能与包头的重工业比武威发达,环境污染较严重,吸附在PM_{2.5}上有毒的化学污染物较多有关。

尽管在相同处理剂量下沙尘暴样品比正常天气样品,对DNA损伤显著降低,但由于沙尘暴来临时,大气PM_{2.5}质量浓度急剧升高,如采样期间武威沙尘暴天气时PM_{2.5}质量浓度为正常天气的2.46倍(采样期间武威正常天气平均为61.94 μg/m³,武威沙尘暴天气平均为152.47 μg/m³)、包头沙尘暴天气时PM_{2.5}质量浓度为正常天气的3.27倍(采样期间包头正常天气平均为77.18 μg/m³,包头沙尘暴天气平均为252.56 μg/m³)。如果考虑PM_{2.5}浓度因素的影响,则沙尘暴样品的毒性效应将会大为增强。总之,对于沙尘暴PM_{2.5}的毒理作用需要与其物理化学成分分析相结合进行探讨,对此目前本实验室研究正在进行中。

参考文献:

- [1] Feng Q, Endo KN, Cheng GD. Dust storms in China: a case study of dust storm variation and dust characteristics [J]. Bull Eng Geol Env, 2002, 61(6): 253-261.
- [2] Chainani-Wu CN. Diet and oral, pharyngeal, and esophageal cancer [J]. Nutr Cancer, 2002, 44(2): 104-126.
- [3] Rodler I, Zajkas G. Healthy nutrition and the prevention of cancer [J]. Orv Hetil, 2003, 144(9): 413-418.
- [4] Yu SG, Anderlini PJ, Elson CE. Efficacy of β-ionone in the chemoprevention of rat mammary carcinogenesis [J]. Agric Food Chem, 1995, 8(3): 2144-2147.
- [5] 孟紫强,胡敏,郭新彪,等.沙尘暴对人体健康影响的研究现状 [J].中国公共卫生,2003,19(4): 471-472.
- [6] Chen YS, Shen PC, Chen ER, et al. Effects of Asian dust storm events on daily mortality in Taipei, Taiwan [J]. Environ Res, 2004, 95(2): 151-155.
- [7] 童永彭,张桂林,叶舜华.大气颗粒物致毒效应的研究进展 [J].环境与职业医学,2003,20(3): 246-248.
- [8] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1-2): 55-63.
- [9] Singh NP. Technical report modification of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage [J]. Int Radiat Biol, 1994, 66(1): 23-28.
- [10] Singh NP, McCoy MT, Schneider E L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. Exp Cell Res, 1988, 175(1): 184-191.
- [11] 孟紫强,张全喜.大气细颗粒物致大鼠肺泡巨噬细胞DNA损伤 [J].中国环境科学,2005,25(1): 15-17.
- [12] Hefflin BJ, Jalaludin B, Icclure E, et al. Surveillance for dust storms and respiratory diseases in Washington State [J]. Arch Environ Health, 1994, 49(3): 170-174.
- [13] Bener A, Abdulrazzaq YM, Al-Mutawwa J, et al. Genetic and environmental factors associated with asthma [J]. Hum Biol, 1996, 68(3): 405-414.
- [14] Penning T. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic hydrocarbon activation: Generation of reactive and redox active α-quinones [J]. Chem Res Toxicol, 1999, 12(1): 1-18.

(收稿日期:2005-10-21)

(英文编辑:顾祖维;校对:刘卓宝)