

沙尘暴细颗粒物对大鼠肺泡巨噬细胞膜损伤*

耿红, 孟紫强, 张全喜

摘要:目的 探讨扬沙和沙尘暴细颗粒物(PM_{2.5})对肺泡巨噬细胞(AM)的毒作用机制。方法 于2004年3月采集甘肃省武威市和内蒙古包头市正常天气、扬沙天气和沙尘暴天气中大气PM_{2.5},并测定其质量浓度。以PM_{2.5}悬液体外处理大鼠肺泡巨噬细胞4h,通过四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞存活率、定磷法检测质膜ATP酶活性、2,4-二硝基苯胺法和4-氨基安替比林法检测细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活性和酸性磷酸酶(ACP)活性,并以荧光探针1-苯胺基-8-萘磺酸(ANS)和1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH)为标记物检测细胞膜的流动性。结果 与对照(生理盐水组)相比,扬沙和沙尘暴PM_{2.5}样品可剂量依赖性地降低细胞存活率和质膜Ca²⁺Mg²⁺-ATP酶、Na⁺K⁺-ATP酶活性、增大细胞膜表层流动性,并使细胞质内LDH和ACP外渗;与正常天气样品相比,对上述指标的影响差异无统计学意义。结论 扬沙和沙尘暴PM_{2.5}可影响AM膜通透性和流动性,导致细胞死亡。由于沙尘天气时大气PM_{2.5}质量浓度大大高于正常天气,其对健康危害作用也相应增大。

关键词:沙尘暴;细颗粒物;肺泡巨噬细胞;膜通透性;膜流动性

Impairment of dust storm fine particles on plasma membranes of rat alveolar macrophages GENG Hong, MENG Ziqiang, ZHANG Quanxi. Research Center of Environmental Science and Engineering, Shanxi University (Taiyuan 030006, China)

Abstract: Objective To investigate the hazards of blowing sand and dust storm fine particulate matter (PM_{2.5}) on rat alveolar macrophage membranes. **Methods** The ambient PM_{2.5} samples were collected on normal, blowing sand and dust storm days in Wuwei city, Gansu province and Baotou city, Inner Mongolia Autonomous region. After rat alveolar macrophages (AM) were treated 4 h with particle suspensions of the samples, cytotoxicity was assessed using methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) reduction assay. Also, activities of plasma membrane Ca²⁺Mg²⁺-ATPase and Na⁺K⁺-ATPase, activities of lactate dehydrogenase (LDH) and acid phosphatase (ACP) in culture medium, and plasma membrane fluidity were examined. **Results** Both the blowing sand and dust storm PM_{2.5} could decrease cell viability, inhibit plasma membrane Ca²⁺Mg²⁺-ATPase and Na⁺K⁺-ATPase, increase leakage of cytosolic LDH and ACP, and elevate surface fluidity of plasma membranes in a dose-dependent manner as compared with the control saline. And the two-way ANOVA showed there was no significant difference on alterations of the measured indices between normal, blowing sand and dust storm groups. **Conclusion** Blowing sand and dust storm PM_{2.5} could make adverse effects on AM by increasing plasma membrane permeability and fluidity, leading to cytotoxicity. It suggested that appropriate attention should be focused on their toxicities.

Key words: dust storm; fine particulate matter; alveolar macrophage; membrane permeability; membrane fluidity

沙尘天气分为浮尘、扬沙、沙尘暴、强沙尘暴4类,主要发生在干旱、半干旱及土地沙漠化较严重的地区。扬沙或沙尘暴来临时大气细颗粒物(PM_{2.5},即粒径≤2.5μm的颗粒)浓度急剧上升^[1],可增加支气管炎、支气管哮喘、肺气肿等疾病的发病率^[2],对人类健康造成很大威胁。毒理学研究表明^[3-5],沙尘暴PM_{2.5}可影响肺泡巨噬细胞(AM)的吞噬功能,诱导AM分泌一氧化氮(NO)、白介素-8(IL-8)及肿瘤坏死因子α(TNF-α);暴露于沙尘暴颗粒物之下的大鼠肺泡灌洗液(BALF)中蛋白质、乳酸脱氢酶(LDH)及白介素-6(IL-6)含量增加,但有关扬沙或沙尘暴PM_{2.5}对AM膜的影响报道较少。本文以正常天气、扬沙天气及沙尘暴天气中采集的大气PM_{2.5}为实验样品,通过体外实验观察其对大鼠AM的细胞毒性以及对质膜通透性和流动性的影响,旨在揭示扬沙或沙尘暴细颗粒物对AM细胞的毒害机制。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器 四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砷

(DMSO)、辅酶I、1-苯胺基-8-萘磺酸(ANS)、1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH)购自美国Sigma公司;RPMI1640培养基购自GIBCORL;酸性磷酸酶(ACP)、ATP酶测试盒购自南京建成生物工程公司,其余试剂为国产分析纯。溶液用水均为Milli-Q超纯水。荧光测定用HITACHI F-4500型荧光分光光度计,比色测定用HITACHI U-3010分光光度计。

1.2 样品采集与分类 采样地点位于甘肃省武威市和内蒙古包头市,采用PM_{2.5}大流量大气采样器(Thermo Andersen公司)24h连续采样。采样时间为2004年3月1日至31日。样品由北京大学环境学院胡敏教授提供。根据当地气象和环境监测资料,样品分为3类:正常PM_{2.5}样品、扬沙PM_{2.5}样品、沙尘暴PM_{2.5}样品,分别采自正常良好天气[天气晴朗且PM₁₀、SO₂、氮氧化物均未超过《环境空气质量标准》(GB3095-1996)二类标准]、局地扬沙天气(本地或附近沙尘被风吹起,水平能见度在1~10km的天气)、沙尘暴天气(强风把地表沙尘卷入空中,水平能见度低于1km的天气)。

1.3 样品处理 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,低温保存。实验时以0.9%生理盐水配成所需浓度的颗粒物悬液,涡旋5min使其充分混匀。

* 基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30230310);山西省自然科学基金项目

作者单位: 山西大学环境科学与工程研究中心,太原 030006

作者简介: 耿红(1969-),男,山西太原人,讲师,博士,主要从事环境医学与毒理学研究。

通讯作者: 孟紫强

1.4 大鼠肺泡巨噬细胞的提取与培养 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 BALF、分离 AM⁽⁶⁾。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 2.4×10^6 个细胞), 每瓶加入 1.6 ml 无血清 RPMI 1640 培养液和 300 μ l 灭菌消毒的生理盐水或用此生理盐水配制的 PM_{2.5} 悬液, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 4 h 后收集细胞及细胞培养液进行各指标的测定。

1.5 细胞毒性的测定 采用 MTT 法⁽⁷⁾。在 BIO-RAD Model 550 型酶标仪上测值, 计算细胞存活率(处理组吸光度值占对照组吸光度值的百分率)。

1.6 各生化指标的测定方法 蛋白质测定采用考马斯亮蓝法, 以牛血清白蛋白作标准⁽⁸⁾。LDH 测定采用 2, 4-二硝基苯法⁽⁹⁾, 以 1000 ml 细胞培养液 37 $^{\circ}$ C 作用 15 min 产生 1 μ mol 丙酮酸为 1 个酶活力单位。质膜 Ca²⁺Mg²⁺-ATP 酶、Na⁺K⁺-ATP 酶的测定采用定磷法, 按试剂盒说明进行, 以每小时每毫克蛋白分解 ATP 产生 1 μ mol 无机磷的量为 1 个 ATP 酶活力单位。细胞膜层流动性以 ANS 作探针进行荧光检测⁽¹⁰⁾, ANS 荧光强度越大表示流动性越小。膜脂疏水区流动性的测定采用荧光偏振法⁽¹¹⁾, 计算以 DPH 作探针的荧光偏振度 r(r 值与膜脂流动性成反比), $r = (I_{0,0} - G \times I_{90,0}) / (I_{0,0} + G \times I_{90,0})$, 其中仪器校正因子 $G = I_{90,0} / I_{0,90}$; I_{0,0}、I_{90,90}、I_{0,90}、I_{90,0} 分别为起偏器与检偏器光轴与测量杯高度方向垂直、起偏器与检偏器光轴与测量杯高度方向平行、起偏器光轴垂直于测量杯高度方向而检偏器光轴与之平行、起偏器光轴平行于测量杯高度方向而检偏器光轴与之垂直的荧光值。

1.7 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 10.0 软件通过双因素方差分析进行组间差异的显著性检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PM_{2.5} 的细胞毒性(表 1) 表 1 显示, 细胞存活率随样品浓度升高而降低, 存在一定的剂量-效应关系。

表 1 不同剂量 PM_{2.5} 对大鼠肺泡巨噬细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$)

处理剂量 (μ g/ml, 2×10^5 细胞)	细胞存活率(%)			
	武威正常组	武威扬沙组	包头正常组	包头沙尘暴组
0(对照)	100.0 \pm 5.8	100.0 \pm 5.8	100.0 \pm 5.8	100.0 \pm 5.8
18.8	102.2 \pm 6.2	99.6 \pm 6.3	103.6 \pm 6.8	101.3 \pm 5.9
37.5	95.4 \pm 8.5	94.7 \pm 7.8	96.3 \pm 7.0	99.0 \pm 6.5
75	94.7 \pm 6.4	91.0 \pm 9.2	94.1 \pm 8.9	96.7 \pm 8.6
150	82.0 \pm 7.4**	85.8 \pm 8.5**	83.7 \pm 7.7**	85.4 \pm 7.9**
300	75.4 \pm 8.6**	77.9 \pm 8.8**	78.7 \pm 8.0**	72.8 \pm 9.4**
600	45.2 \pm 10.0**	48.0 \pm 9.2**	43.6 \pm 9.9**	49.1 \pm 9.7**

注: 处理时间 8 h, n=4; 与对照组相比, ** P<0.01

2.2 PM_{2.5} 对细胞膜通透性的影响(表 2) 以细胞培养液中 ACP、LDH 活性及质膜 ATP 酶活性的改变表示细胞膜通透性的变化。随着处理剂量增大, 培养液中 LDH、ACP 活性增加, 当样品浓度达到 300 μ g/ml 时, LDH 和 ACP 活性显著上升($P < 0.05$)。质膜 Na⁺K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺Mg²⁺-ATP 酶活性随处理剂量的升高而下降, 当处理浓度为 100 μ g/ml 时, 正常天气组的 ATP 酶活性即显著降低; 当处理浓度为 300 μ g/ml 时, 除包头沙尘暴天气组 Ca²⁺Mg²⁺-ATP 酶活性降

低未达到显著性水平外, 其余各组 Na⁺K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺Mg²⁺-ATP 酶活性均有显著下降($P < 0.05$)。以上结果说明质膜 Na⁺K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺Mg²⁺-ATP 酶活性受到不同程度的抑制、且胞质 ACP、LDH 发生渗漏, 提示 PM_{2.5} 使 AM 细胞膜受到损伤、通透性增加。双因素方差分析显示, 各组样品之间引起上述指标的变化仅与处理剂量有关, 而与样品来自何组无关。

表 2 不同种类 PM_{2.5} 对大鼠肺泡巨噬细胞膜 ATP 酶及培养液中 LDH、ACP 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (μ g/ml)	Na ⁺ K ⁺ -ATP 酶 (μ mol 磷/mg pro)	Ca ²⁺ Mg ²⁺ -ATP 酶 (μ mol 磷/mg pro)	LDH (U/L)	ACP(U/L)
武威正常组	0	9.77 \pm 2.01	4.89 \pm 0.47	34.96 \pm 6.16	0.652 \pm 0.099
	33	8.58 \pm 1.83	4.43 \pm 0.81	33.94 \pm 11.16	0.867 \pm 0.292
	100	7.33 \pm 1.03*	3.47 \pm 0.50**	56.94 \pm 17.58	0.900 \pm 0.335
	300	5.68 \pm 0.88**	2.95 \pm 0.68**	166.52 \pm 42.11*	1.117 \pm 0.342*
武威扬沙组	0	9.77 \pm 2.01	4.89 \pm 0.47	34.96 \pm 6.16	0.652 \pm 0.099
	33	9.42 \pm 1.74	4.86 \pm 0.95	37.64 \pm 12.02	0.860 \pm 0.310
	100	8.42 \pm 1.03	4.30 \pm 0.45	57.76 \pm 11.28	0.867 \pm 0.290
	300	6.62 \pm 1.88**	3.38 \pm 0.84**	130.92 \pm 26.45**	1.068 \pm 0.367*
包头正常组	0	9.77 \pm 2.01	4.89 \pm 0.47	34.96 \pm 6.16	0.652 \pm 0.099
	33	9.13 \pm 1.56	4.14 \pm 0.59	33.62 \pm 12.41	0.764 \pm 0.903
	100	7.49 \pm 1.83*	3.74 \pm 0.71*	61.28 \pm 24.39	0.780 \pm 0.137
	300	6.38 \pm 2.25**	3.37 \pm 1.32**	164.4 \pm 13.69**	1.062 \pm 0.447**
包头沙尘暴组	0	9.77 \pm 2.01	4.89 \pm 0.47	34.96 \pm 6.16	0.652 \pm 0.099
	33	9.54 \pm 1.89	4.74 \pm 0.69	41.58 \pm 15.15	0.692 \pm 0.088
	100	8.39 \pm 2.66	4.56 \pm 0.52	60.49 \pm 25.26	0.766 \pm 0.155
	300	7.46 \pm 2.01*	4.19 \pm 1.12	140.08 \pm 23.41**	1.116 \pm 0.231*

注: n=4~6; 与对照组相比, * P<0.05, ** P<0.01

2.3 PM_{2.5} 对细胞膜流动性的影响(表 3) 表 3 所示, 随着

表 3 不同种类 PM_{2.5} 对大鼠肺泡巨噬细胞膜流动性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/ml)	n	ANS 荧光 强度 F	DPH 荧光 偏振度 r
武威正常组	0	6	11.18 \pm 0.58	0.153 \pm 0.029
	33	6	10.60 \pm 0.57	0.153 \pm 0.049
	100	6	9.73 \pm 0.60	0.125 \pm 0.022
	300	6	8.77 \pm 0.45**	0.098 \pm 0.022*
武威扬沙组	0	5	11.18 \pm 0.58	0.153 \pm 0.029
	33	5	10.66 \pm 0.83	0.132 \pm 0.053
	100	5	9.71 \pm 0.54	0.134 \pm 0.043
	300	5	8.96 \pm 1.16**	0.142 \pm 0.055
包头正常组	0	5	11.18 \pm 0.58	0.153 \pm 0.029
	33	5	10.51 \pm 0.70	0.127 \pm 0.033
	100	5	9.32 \pm 0.64	0.148 \pm 0.070
	300	5	8.84 \pm 0.96**	0.095 \pm 0.022*
包头沙尘暴组	0	5	11.18 \pm 0.58	0.153 \pm 0.029
	33	5	10.79 \pm 0.50	0.145 \pm 0.028
	100	5	10.39 \pm 0.70	0.143 \pm 0.023
	300	5	9.11 \pm 0.80*	0.113 \pm 0.058

注: 与对照组相比, * P<0.05, ** P<0.01

颗粒物样品浓度增大,代表细胞膜表层(膜脂极性基区)流动性的 ANS 荧光强度 F 和代表膜脂疏水区流动性的 DPH 荧光偏振度 r 呈现降低趋势,当样品浓度达到 $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时,各组 F 值与对照相比均显著下降($P < 0.05$);而 r 值仅在武威和包头正常天气组中显著下降。以上结果说明正常组 $\text{PM}_{2.5}$ 样品可同时增大 AM 膜表层和膜脂疏水区流动性,而扬沙和沙尘暴 $\text{PM}_{2.5}$ 仅使膜表层流动性增大,提示正常大气 $\text{PM}_{2.5}$ 对细胞膜流动性的影响可能大于沙尘 $\text{PM}_{2.5}$ 。

3 讨论

本实验中,在扬沙和沙尘暴 $\text{PM}_{2.5}$ 样品作用下,质膜 $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活力下降,膜表层流动性增加,且细胞质中 LDH 和 ACP 发生外渗,说明 AM 细胞膜受到损伤,可能导致细胞膜对 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{Ca}^{2+}$ 等阳离子通透性增加,引起胞质内 K^+ 含量减少、 Ca^{2+} 浓度上升^[6],产生一系列不良后果^[12],最终使细胞存活率下降。

推测扬沙或沙尘暴 $\text{PM}_{2.5}$ 对 AM 的毒性与其复杂的成分密切相关,既可能是附着其上的 SO_4^{2-} 、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 K^+ 、过渡金属元素(如 Fe、Zn)以及有机污染物如多环芳烃类和苯并[a]芘等的作用,也可能是不溶成分或吸附其上的一些致病性微生物的作用,或者是多种成分综合作用的结果,其原因有待进一步研究。

值得注意的是,尽管在相同处理剂量下,两城市扬沙或沙尘暴 $\text{PM}_{2.5}$ 样品与正常天气 $\text{PM}_{2.5}$ 相比,它们对 AM 细胞毒性、LDH 和 ACP 外渗、质膜 ATP 酶活性等引起的改变上差异无统计学意义,但由于扬沙或沙尘暴来临时,大气 $\text{PM}_{2.5}$ 质量浓度急剧升高(经测定:采样期间武威扬沙天气时大气 $\text{PM}_{2.5}$ 质量浓度平均为 $152.47 \mu\text{g}/\text{m}^3$,而正常天气时平均为 $61.94 \mu\text{g}/\text{m}^3$;包头沙尘暴天气时大气 $\text{PM}_{2.5}$ 质量浓度为 $252.56 \mu\text{g}/$

m^3 ,正常天气时平均为 $77.18 \mu\text{g}/\text{m}^3$),因而扬沙或沙尘暴期间大气 $\text{PM}_{2.5}$ 对健康的危害效应将会大大增加。

参考文献

- [1] Claiborn CS, Finn D, Larson TV, et al. Windblown dust contributes to high $\text{PM}_{2.5}$ concentrations[J]. J Air Waste Manag Assoc, 2000, 50(8):1440-1445.
- [2] 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.
- [3] 黄雪莲,金星,郭新彪,等.沙尘暴 $\text{PM}_{2.5}$ 、 PM_{10} 对大鼠肺泡巨噬细胞吞噬功能的影响[J].卫生研究,2004,33(2):154-157.
- [4] 黄雪莲,金星,郭新彪,等.沙尘暴 $\text{PM}_{2.5}$ 、 PM_{10} 对大鼠肺泡巨噬细胞炎症因子分泌的影响[J].环境与健康杂志,2004,21(1):38-40.
- [5] Lei YC, Chan CC, Wang PY, et al. Effects of Asian dust event particles on inflammation markers in peripheral blood and bronchoalveolar lavage in pulmonary hypertensive rats[J]. Environ Res, 2004, 95(1):71-76.
- [6] 耿红,孟紫强,张全喜.沙尘暴细颗粒物对大鼠肺泡巨噬细胞、钙水平和脂质过氧化的影响[J].环境科学学报,2005,25(6):845-850.
- [7] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65:55-63.
- [8] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72:248-254.
- [9] 朱勇忠.实用医学检验学[M].北京:人民军医出版社,1997:329-332.
- [10] Lenaz G. Lipid Protein interactions in mitochondria[J]. Arch Biochem Biophys, 1976, 1:278-288.
- [11] Roth LG, Chen CH. Thermodynamic elucidation of solute-induced lipid interdigitation phase: lipid interactions with hydrophobic versus amphiphilic species[J]. Arch Biochem Biophys, 1992, 296:207-213.
- [12] 王心如.毒理学基础[M].第4版.北京:人民卫生出版社,2003:76-83.

收稿日期:2005-06-17

(宋艳萍编校)

文章编号:1001-0580(2006)02-0146-01

中图分类号:R 155

文献标识码:B

【基层公共卫生】

沈阳市铁西区餐饮业餐具卫生状况调查

王新丽

为了解餐饮业餐具卫生状况,减少肠道传染病的传播和流行,铁西区疾病预防控制中心于2004年1~3月随机抽取了铁西区56家不同类型饭店餐具样品,并对其消毒效果进行检测。现报告如下。

对象与方法 (1)对象:按就餐座位将餐饮店分为大、中、小型三类。大型:100个座位以上;中型:50~100个座位;小型:50个座位以下。随机抽取大型餐饮店15户,中型25户,小型16户,共采集餐具400份,其中盘198份,碗144份,盆58份。(2)方法:采用纸片法将大肠菌群快速检测纸片用无菌生理盐水润湿后,立即贴于餐具内侧表面,每份2片,30s后取下置于无菌塑料袋内,37℃培养16~18h,同时作空白对照实验。若纸片保持紫色不变为大菌群阴性,纸片变黄色并在黄色背景下呈现红色斑点或片状红晕为阳性。大肠菌群

快速检测纸片为沈阳卫星实业公司生产。(3)判定标准:大肠菌群阴性为合格,阳性为不合格。

结果 (1)不同规模餐饮业餐具大肠菌群合格率情况:大、中、小型餐饮店餐具大肠菌合格率分别为80.0%、72.0%、56.2%,总合格率为69.6%,可见我区饭店餐具消毒合格率较低,其中大型餐饮店合格率要好于中、小型餐饮店。(2)不同餐具检测合格情况:碗、盘、盆合格率分别为59.0%、62.6%、93.1%,总合格率为65.8%。

讨论 针对我区餐饮业餐具消毒现状,并根据《餐饮业食品卫生管理办法》规定,应加强餐饮业从业人员卫生观念,定期做好健康检查和卫生知识培训工作;加工场所应当保持内外环境整洁;食品加工、贮存、销售、陈列的各种设施、设备及其运送食品的用具应当定期维护;消毒后的餐具必须贮存在专用保洁柜内备用。

作者单位:沈阳市铁西区疾病预防控制中心,110023

作者简介:王新丽(1974-),女,满族,大连人,主管检验师,学士,主要从事学校与环境卫生监测及管理工作。

万方数据

收稿日期:2005-06-16

(宋艳萍编校)