

沙尘暴 PM_{2.5} 水溶和有机成分对巨噬细胞的损伤

耿 红, 孟紫强*, 张全喜 (山西大学环境医学与毒理学研究所, 山西 太原 030006)

摘要: 用超纯水或二氯甲烷从甘肃省武威市和内蒙古包头市采集的沙尘暴细颗粒物(PM_{2.5})中提取水溶成分和有机成分,于体外处理大鼠肺泡巨噬细胞4h,测定细胞谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量、质膜ATP酶活性、膜表层和膜脂疏水区流动性、胞质内游离钙离子(Ca²⁺)浓度以及细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)和酸性磷酸酶(ACP)活性。结果表明,沙尘暴PM_{2.5}水溶成分可抑制质膜Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶、Na⁺-K⁺-ATP酶活性,降低质膜表层和膜脂疏水区流动性,增加胞质LDH外渗,并使细胞脂质过氧化作用增强、抗氧化能力减弱,但对ACP和Ca²⁺浓度影响不大;有机成分除引起胞质LDH泄漏、质膜Na⁺-K⁺-ATP酶活性下降外,对其它测定指标的影响无统计学意义。说明沙尘暴PM_{2.5}水溶和有机成分均可对肺泡巨噬细胞产生毒性,其中水溶成分的毒性作用大于有机成分。

关键词: 沙尘暴; 细颗粒物; 水溶成分; 有机成分; 肺泡巨噬细胞

中图分类号: X511,R994 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2006)01-0020-05

Damage of water-soluble and organic compositions of dust storm PM_{2.5} on macrophages. GENG Hong, MENG Ziqiang*, ZHANG Quan-xi (Institute of Environmental Medicine and Toxicology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China). *China Environmental Science*, 2006,26(1): 20~24

Abstract: The rat alveolar macrophages (AMs) were treated *in vitro* for 4h with the water-soluble and organic compositions which were extracted, using deionized water or dichloromethane, from the dust storm fine particulate matter (PM_{2.5}) collected in Wuwei City of Gansu Province and Baotou City of Inner Mongolia Autonomous Region. The water-soluble fractions of dust storm PM_{2.5} from the two cities could inhibit plasma membrane Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase, decrease plasma membrane fluidity, increase leakage of intracellular lactate dehydrogenase (LDH), deplete cellular antioxidant glutathione (GSH), and induce lipid peroxidation (LPO) in a dose-dependent manner, but didn't cause significant alterations on acid phosphatase (ACP) and cytosolic free Ca²⁺ levels; whereas the solvent-extractable organics from dust storm PM_{2.5} just decreased Na⁺-K⁺-ATPase activities and caused leakage of LDH, making no effects on the other measured indexes. It suggested that the water-soluble and organic fractions of dust storm PM_{2.5} could impair AMs, and water-soluble fractions exhibited greater toxicities to AMs than organic fractions.

Key words: dust storm; fine particulate matter; water-soluble composition; organic composition; alveolar macrophage

沙尘暴来临时,大气细颗粒物PM_{2.5}(粒径≤2.5μm)浓度急剧上升,由于PM_{2.5}可深入到下呼吸道,直接作用于肺泡巨噬细胞(AM),PM_{2.5}上附着的SO₄²⁻、NH₄⁺、NO₃⁻、K⁺、过渡金属元素、致病性微生物以及有机污染物(如多环芳烃类和苯并[a]芘)等大大增加了沙尘暴对人体健康的危害性,由沙尘暴导致的非职业性尘肺^[1]、呼吸系统疾病死亡率增加^[2]。动物实验也表明,沙尘暴PM_{2.5}可影响AM的吞噬功能,诱导AM分泌炎性因子^[3,4],还可对AM产生氧化损伤,使其存活率下降^[5];暴露于沙尘暴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^[6]。关于沙尘暴PM_{2.5}中水溶成分和有机提取物单独的毒理学实验的报道很少。

本研究以甘肃省武威市和内蒙古包头市沙尘暴PM_{2.5}中提取的水溶和有机成分为实验样品,通过体外实验观察它们对大鼠AM细胞膜通透性、膜脂流动性、胞质内游离Ca²⁺浓度以及脂质过氧化作用等的影响,为全面了解沙尘暴PM_{2.5}的毒性机理奠定基础。

收稿日期: 2005-06-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30230310)

* 责任作者, 教授, zqmeng@sxu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

二甲基亚砜(DMSO)、1-苯胺基-8-萘磺酸(ANS)、1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH)购自Sigma公司;RPMI1640培养基购自GIBCO;酸性磷酸酶(ACP)、LDH、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.溶液用水为Milli-Q超纯水.荧光测定用日立(HITACHI) F-4500型荧光分光光度计,比色测定用日立(HITACHI) U-3010分光光度计.

1.2 样品采集

沙尘暴PM_{2.5}样品由北京大学环境学院胡敏教授提供.采样地点位于甘肃省武威市和内蒙古自治区包头市.采用PM_{2.5}大流量大气采样器(Thermo Andersen)24h连续采样,采样仪器离地面约15m,流量为1.13m³/min.采样时间为2004年3月1日~5月31日.根据当地气象局和环保监测站资料,区分沙尘暴PM_{2.5}样品与正常天气大气PM_{2.5}样品.

1.3 水溶成分和有机成分的提取

参照文献[7]中的方法.

1.4 大鼠肺泡巨噬细胞的提取与培养

每个测量设2个实验平行样,每项指标重复实验4次,每次实验使用5只动物.

将体重220~250g的清洁级健康雄性Wistar大鼠麻醉,腹主动脉放血致死,收集BALF,提取AM细胞^[5],分装于细胞培养瓶中(每瓶约含2×10⁶个细胞),随机分组,每瓶加1.6mL无血清RPMI1640培养液和终浓度分别为75,150,300μg/mL的沙尘暴PM_{2.5}水溶成分(对照用灭菌消毒的生理盐水)或终浓度分别为25,50,100μg/mL的沙尘暴PM_{2.5}有机成分(对照用DMSO),继续培养4h后收集细胞及细胞培养液进行各指标的测定.

1.5 各指标的测定方法

1.5.1 蛋白质测定 采用考马斯亮蓝法^[8],以牛血清白蛋白作标准.

1.5.2 ACP、LDH、ATP酶活性测定 按试剂
万方数据

盒说明进行.

1.5.3 丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)的测定 参见文献[5]中的方法.

1.5.4 细胞膜表层流动性的测定 采用ANS作探针进行荧光检测^[9],ANS荧光强度值越大表示膜流动性越小.

1.5.5 细胞膜脂疏水区流动性的测定 采用DPH荧光偏振法^[10],计算微黏度h(h值与膜脂流动性成反比).

1.5.6 Ca²⁺浓度的测定 参照文献[5]中的方法.

1.6 统计分析

数据以平均值(\bar{x})±标准差(s)表示.用SPSS11.0软件通过单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间差异的显著性检验,均数间多重比较用LSD或Tamhane's t-test法. $P \leq 0.05$ 表示差异有显著性(有统计学意义).

2 结果

2.1 沙尘暴 PM_{2.5}水溶成分和有机成分的提取率

沙尘暴 PM_{2.5} 中水溶成分的提取率是有机成分提取率的3.3倍左右(表1),据此估计相同沙尘暴 PM_{2.5} 中水溶物质含量与有机成分含量的比约为3:1.

表 1 沙尘暴 PM_{2.5} 水溶成分和有机成分的提取率

Table 1 The extraction ratios of water-soluble and organic fractions of dust storm PM_{2.5}

采样点	样品重量(g)	水溶成分重量(g)	水溶成分提取率(%)	有机成分重量(g)	有机成分提取率(%)
武威	0.4473	0.0424	9.48	0.0104	3.07
	0.3384				
包头	0.2053	0.0231	11.25	0.0061	3.12
	0.1956				
均值				10.36	3.10

2.2 对细胞培养液中 LDH 和 ACP 的影响

与各自对照相比,沙尘暴 PM_{2.5} 水溶成分和有机成分均可使细胞培养液中 LDH 活力显著增加,且具有明确的剂量-效应关系(图 1),但各种浓度的处理对细胞培养液中 ACP 活力没有影响(图 2).

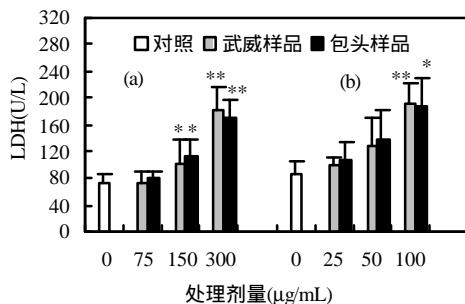


图 1 沙尘暴 PM_{2.5} 水溶成分和有机成分对肺泡巨噬细胞培养液中 LDH 活性的影响

Fig.1 Effects of dust storm PM_{2.5} water-soluble and organic fractions on activities of LDH in medium
图中柱状部分为 $\bar{x} \pm s$;实验次数 $n=4$;与对照相比, * $P \leq 0.05$,

** $P \leq 0.01$

(a)水溶成分,(b)有机成分

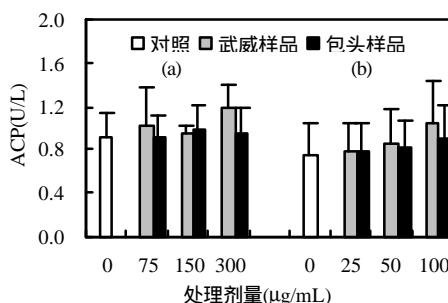


图 2 沙尘暴 PM_{2.5} 水溶成分和有机成分对肺泡巨噬细胞培养液中 ACP 活性的影响

Fig.2 Effects of dust storm PM_{2.5} water-soluble and organic fractions on activities of ACP in medium

注同图 1

2.3 对细胞膜 Na⁺K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺Mg²⁺-ATP 酶活性的影响

由图 3,图 4 可见,沙尘暴 PM_{2.5} 水溶成分和有机成分均可抑制细胞质膜 ATP 酶,当水溶成分的处理浓度为 300 μg/mL 时,武威样品使 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性显著下降,而包头样品仅使 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性显著降低;当有机成分的处理浓度达到 100 μg/mL 时,2 种样品均使 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性显著降低,但对 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性影响不大.

2.4 对细胞膜流动性的影响

万方数据

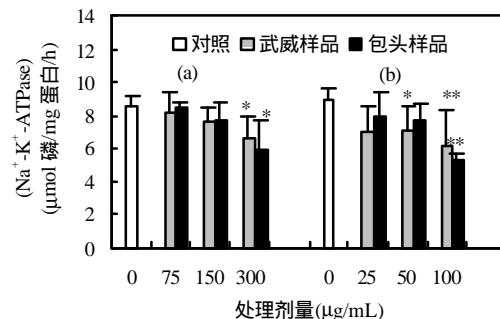


图 3 沙尘暴 PM_{2.5} 水溶成分和有机成分对肺泡巨噬细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的影响

Fig.3 Effects of dust storm PM_{2.5} water-soluble and organic fractions on activities of plasma membrane Na⁺-K⁺-ATPase

注同图 1

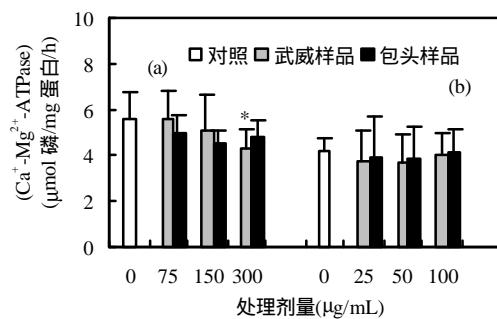


图 4 沙尘暴 PM_{2.5} 水溶成分和有机成分对肺泡巨噬细胞膜 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性的影响

Fig.4 Effects of dust storm PM_{2.5} water-soluble and organic fractions on activities of plasma membrane Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase

注同图 1

图 5,图 6 显示两地水溶样品均可显著增加 ANS 荧光强度和膜脂微黏度,即降低细胞膜表层流动性和膜脂疏水区流动性,且呈现一定的剂量依赖关系;但两地有机样品对细胞膜表层和膜脂疏水区流动性的影响都不大.

2.5 对细胞内 LPO 和 GSH 的影响

随着处理浓度增大,沙尘暴 PM_{2.5} 水溶成分使细胞 GSH 含量减少、MDA 含量增加(图 7 和图 8),表明细胞脂质过氧化作用增加而抗氧化能力削弱,当处理浓度达到 300 μg/mL 时,与对照相比,GSH 水平显著降低、MDA 含量显著升高($P < 0.05$).但是,两地沙尘暴 PM_{2.5} 有机成分对细

胞内 GSH 和 MDA 含量的影响未出现显著变化。

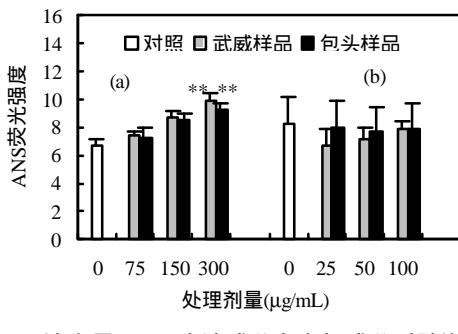


图 5 沙尘暴 PM_{2.5} 水溶成分和有机成分对肺泡巨噬细胞膜表层流动性的影响

Fig.5 Effects of dust storm PM_{2.5} water-soluble and organic fractions on surface fluidity of AM plasma membrane
注同图 1

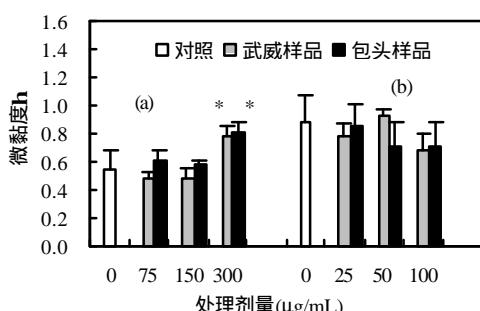


图 6 沙尘暴 PM_{2.5} 水溶成分和有机成分对肺泡巨噬细胞膜脂疏水区流动性的影响

Fig.6 Effects of dust storm PM_{2.5} water-soluble and organic fractions on lipid bilayer hydrophobic region fluidity of AM plasma membrane
注同图 1

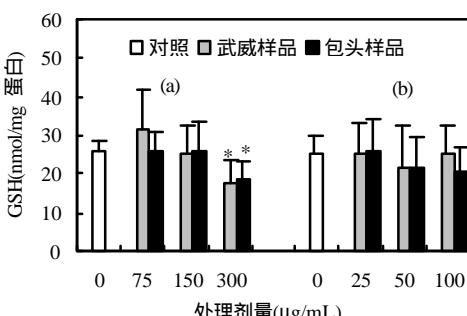


图 7 沙尘暴 PM_{2.5} 水溶成分和有机成分对肺泡巨噬细胞 GSH 含量的影响

Fig.7 Effects of dust storm PM_{2.5} water-soluble and organic fractions on cellular GSH levels
注同图 1

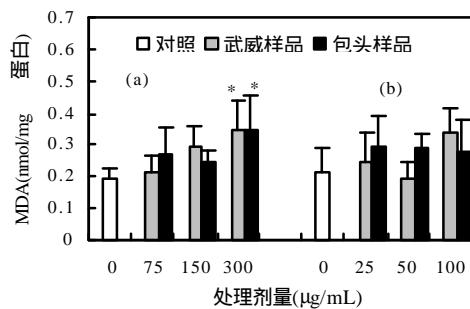


图 8 沙尘暴 PM_{2.5} 水溶成分和有机成分对肺泡巨噬细胞 MDA 含量的影响

Fig.8 Effects of dust storm PM_{2.5} water-soluble and organic fractions on cellular MDA levels

注同图 1

2.6 对胞质内游离 Ca^{2+} 浓度的影响

由图 9 可见, 不论是武威样品还是包头样品, 不论是水溶成分还是有机成分, 各剂量的处理均未使胞质内游离 Ca^{2+} 浓度显著增加或减少, 说明它们对 Ca^{2+} 浓度变化影响甚微.

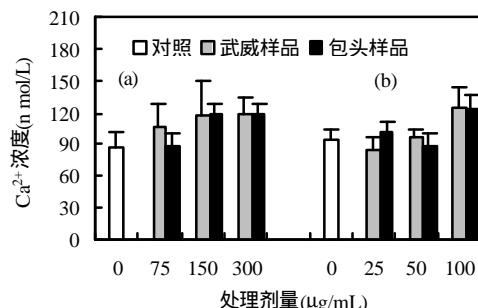


图 9 沙尘暴 PM_{2.5} 水溶成分和有机成分对肺泡巨噬细胞胞质游离 Ca^{2+} 浓度的影响

Fig.9 Effects of dust storm PM_{2.5} water-soluble and organic fractions on cytosolic free Ca^{2+} concentrations

注同图 1

3 讨论

沙尘暴 PM_{2.5} 成分复杂, 附着于 PM_{2.5} 上的无机离子和有机污染物可随颗粒物一同进入体内, 与不溶成分共同发挥毒害作用. 本实验发现, 沙尘暴 PM_{2.5} 水溶成分导致大鼠 AM 脂质过氧化作用增强, 抗氧化能力减弱, 细胞膜表层和膜脂疏水

区流动性降低,质膜 $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATP 酶和 $\text{Ca}^{2+} \text{-} \text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性被抑制,且使胞质内 LDH 渗漏到细胞外,但对 ACP 和游离 Ca^{2+} 浓度影响不大;沙尘暴 $\text{PM}_{2.5}$ 有机成分除引起质膜 $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATP 酶活性降低和胞质内 LDH 渗漏外,对 AM 细胞氧化和抗氧化水平、细胞膜流动性、质膜 $\text{Ca}^{2+} \text{-} \text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶以及胞质游离 Ca^{2+} 浓度等均无影响,说明沙尘暴 $\text{PM}_{2.5}$ 水溶成分对 AM 的影响大于有机成分.一方面可能是由于水溶成分中含有的过渡金属离子促进细胞内 Fenton 反应发生,加剧细胞氧化损伤,导致细胞膜受损、膜通透性和流动性发生改变;另一方面,由于武威市和包头市位于我国较大的几个沙漠附近,容易遭受沙尘暴的侵袭,沙尘暴 $\text{PM}_{2.5}$ 在短途迁移过程中吸附有机成分的量远小于水溶成分,因而水溶成分给 AM 细胞施加的剂量可能多于有机成分,对细胞造成的损伤相应增大.

沙尘暴 $\text{PM}_{2.5}$ 水溶和有机成分对胞质内游离 Ca^{2+} 浓度未产生显著影响,这可能与作用时间较短、损伤信号未传递到 Ca^{2+} 储存库(内质网、线粒体等)有关.它们损伤 AM 不是通过影响 Ca^{2+} 而是通过其它途径.另外,沙尘暴 $\text{PM}_{2.5}$ 总颗粒悬液使 AM 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度显著升高、细胞存活率显著降低^[5],表现出对 AM 的损伤效应大于单独水溶成分或有机成分,提示可能沙尘暴 $\text{PM}_{2.5}$ 中的不溶部分在起作用^[9].

4 结语

不仅沙尘暴 $\text{PM}_{2.5}$ 总颗粒悬液可引起 AM 的损伤,而且沙尘暴 $\text{PM}_{2.5}$ 上单独的水溶成分或有机成分也可对 AM 产生一定影响,由于武威和包头沙尘暴 $\text{PM}_{2.5}$ 上吸附的有机成分比水溶成分少得多,因此,水溶成分对 AM 脂质过氧化作用及质膜通透性、流动性的影响大于有机成分.

参考文献:

- [1] Saiyed H N, Sharma Y K, Sadhu H G, et al. Non-occupational pneumoconiosis at high altitude villages in central Ladakh [J]. Br. J. Ind. Med., 1991,48(12):825-829.

- [2] Chen Y S, Sheen P C, Chen E R, et al. Effects of Asian dust storm events on daily mortality in Taipei, Taiwan [J]. Environ. Res., 2004,95(2):151-155.
- [3] 黄雪莲,金 昱,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 昱,郭新彪,等.沙尘暴 $\text{PM}_{2.5}$ 、 PM_{10} 对大鼠肺泡巨噬细胞炎性因子分泌的影响 [J]. 环境与健康杂志, 2004,21(1):38-40.
- [5] 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.
- [6] Lei Y C, Chan C C, Wang P Y, 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.
- [7] 张 昱,付娟玲,王 芸,等.北京市大气细颗粒物的遗传和非遗传毒性研究 [J]. 中国环境科学, 2003,23(4):337-340.
- [8] Bradford M M. 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] Imrich A, Ning Y, Kobzik L. Insoluble components of concentrated air particles mediate alveolar macrophage responses in vitro [J]. Toxicol. Appl. Pharmacol., 2000,167(2):140-150.

作者简介: 耿 红(1969-),男,山西太原人,讲师,山西大学环境医学与毒理学研究所博士研究生,主要从事大气污染物的环境毒理学研究,发表论文 10 余篇.