

灰霾天气细颗粒物对人支气管上皮细胞凋亡的影响

覃辉艳¹, 彭晓武², 蒙智娟¹, 黄炯丽¹, 李琴¹, 韦小敏¹, 邹云锋¹

摘要: [目的] 探讨灰霾天气细颗粒物(PM_{2.5})对人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cells, 16-HBE)凋亡的影响。[方法] 分别以8、16、32、64、128 μg/mL浓度的PM_{2.5}作用于16-HBE 24、48、72 h, 检测PM_{2.5}对16-HBE细胞存活率及凋亡率的影响。[结果] 染毒24、48、72 h后, 64、128 μg/mL组细胞存活率均明显低于对照组($P < 0.05$), 细胞凋亡率均明显高于对照组($P < 0.05$); 72 h各浓度组细胞存活率均低于24 h相应处理组($P < 0.05$), 当染毒浓度大于8 μg/mL时, 72 h各浓度组细胞总凋亡率与24 h相比均明显增加($P < 0.05$)。[结论] 灰霾天气细颗粒物PM_{2.5}对16-HBE具有细胞毒性, 能诱导其凋亡, 且具有剂量和时间反应关系。

关键词: 灰霾天气; 细颗粒物; 人支气管上皮细胞; 细胞凋亡

Effects of Haze Fine Particulate Matter on Apoptosis of Human Bronchial Epithelial Cells QIN Hui-yan¹, PENG Xiao-wu², MENG Zhi-juan¹, HUANG Jiong-li¹, LI Qin¹, WEI Xiao-min¹, ZOU Yun-feng¹ (1.School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2.South China Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Guangzhou, Guangdong 510655, China). Address correspondence to WEI Xiao-min, E-mail: xiaominw20011@yahoo.com.cn; ZOU Yun-feng, E-mail: email_zyf@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore the effect of haze particulate matter PM_{2.5} on apoptosis of human bronchial epithelial cells (16-HBE). [Methods] Groups of cultured 16-HBE cells were exposed to 8, 16, 32, 64 and 128 μg/mL PM_{2.5} respectively for 24, 48 and 72 h of incubation to detect the cell survival and apoptosis rates. [Results] After 24, 48 and 72 h of interference, compared with the negative control group, the cell survival rates of 64 and 128 μg/mL groups decreased significantly ($P < 0.05$), and the cell total apoptosis rates increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the corresponding 24 h groups, the cell survival rates of 72 h groups decreased significantly ($P < 0.05$), and the apoptosis rates increased significantly except when treated with 8 μg/mL ($P < 0.05$). [Conclusion] Haze particulate matter PM_{2.5} possess cytotoxic effect on 16-HBE to induce apoptosis in a dose- and time-dependent manner.

Key Words: haze weather; fine particulate matter; human bronchial epithelial cell; cell apoptosis

灰霾是指大量极细微的干尘粒等均匀地浮游在空中, 使水平能见度小于10 km的空气普遍混浊现象。近年来, 随着我国大陆社会经济的快速发展, 工业化、城市化进程不断加快, 造成污染物排放量不断增加, 空气污染日趋严重。目前, 4个灰霾严重地区是: 黄淮海地区、长江河谷、四川盆地和珠江三角洲。广州作为经济发展最快的珠江三角洲地区经济文化中心, 其空气污染问题更为严重, 据调查, 2002—2006年广州市灰霾天气出现率均达20%以上, 而2005年更是高达29.7%^[1-2]。灰霾因融入了大量的工业废气、挥发性化学物质、机动车尾气等有毒有害粒子^[3], 对人体的健康构成极大威胁。流行病学研究

结果表明, 空气污染细颗粒物(PM_{2.5})与呼吸系统疾病的发病率和死亡率相关^[4]。国外YADAV等^[5]调查发现灰霾期间人群可出现急性呼吸道感染、哮喘、感冒等呼吸系统症状。国内李宁等^[6]研究表明, 灰霾天时居民呼吸系统疾病的日门诊量增加。目前, 灰霾颗粒物对机体健康的影响研究多为定性化阶段的成分分析和流行病学研究, 国内外对其作用机制探讨的体外实验研究还较少^[3-7], 而灰霾颗粒物中PM_{2.5}因其颗粒小、比表面积大, 吸附的重金属和有毒物质较多, 且在呼吸系统中易于溶解吸收, 对人体健康危害更为严重^[8]。因此本研究拟采集广州灰霾天气颗粒物PM_{2.5}, 探讨其对培养的人支气管上皮细胞凋亡的影响, 初步探索灰霾天气颗粒物PM_{2.5}对机体呼吸系统影响可能的作用机制。

[基金项目] 2007年国家环保公益性行业科研专项项目(编号: 200709004)

[作者简介] 覃辉艳(1981—), 女, 硕士生; 研究方向: 环境毒理学; E-mail: qinhuiyan123@sina.com

[通信作者] 韦小敏教授, E-mail: xiaominw20011@yahoo.com.cn; 邹云锋副教授, E-mail: email_zyf@163.com

[作者单位] 1.广西医科大学公共卫生学院, 广西 南宁 530021; 2.环境保护部华南环境科学研究所, 广东 广州 510655

1 材料与方法

1.1 灰霾天气颗粒物PM_{2.5}样品采集和处理

本实验使用的样品为广州灰霾天气颗粒物PM_{2.5}, 由环境保护部华南环境科学研究所采集提供。在2008年7月(夏季)和12月(冬季)选择当天符合灰霾天气定义(当日气象条件满

足肉眼大气能见度低于 10km, 同时空气湿度低于 90%) 的天气进行采样, 采样点位于广州市天河区员村西街七号大院的华南环境科学研究所综合大楼 14 楼楼顶, 用大流量 PM_{2.5} 环境采样器(Thermo 公司, 美国)20cm × 20cm 玻璃纤维滤膜(Whatman 公司, 美国)采集大气 PM_{2.5}, 采样时空气流速为 1.13 m³/min。采集后将灰霾天气 PM_{2.5} 的采样滤膜剪碎成 1cm × 4cm 大小, 完全浸入 50mL 三蒸水中, 小型超声清洗仪超声处理 60min。用洁净光滑钝器单向反复轻轻刮擦滤膜表面至滤膜由黑色转变为浅白色, 制备成颗粒物悬液。将悬液分装放置于 -80℃ 低温冰箱中过夜, 后置于真空冷冻干燥处理器进行除水处理 12h, 所得干燥灰色絮状颗粒物低温冰箱保存备用。

1.2 主要仪器与试剂

ELx800 酶标仪(美国 Biotech 公司), FACS 流式细胞仪(美国 BD 公司), 二氧化碳培养箱(英国 Galaxy 公司), 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); MEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司), 胰蛋白酶、四甲基偶氮唑盐(MTT)(美国 Amresco 公司), Hank's 液、青链霉素混合液(北京 Solarbio 公司), Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒(杭州联科生物技术有限公司)。

1.3 染毒浓度设计与配制

染毒终浓度设为 8、16、32、64、128 μg/mL。配制时称取灰霾天气颗粒物 PM_{2.5} 0.025 6g, 加灭菌磷酸盐缓冲液(PBS)至 3.2mL, 配成 8g/L 母液, 用微量移液器充分混匀, 将母液移入洁净离心管内, 分装 640 μL/管, 置于 -80℃ 冰箱中保存, 染毒前将母液解冻后置于超声细胞粉碎仪中超声处理 3 次, 每次 20s(功率 70W), 染毒时用灭菌 PBS 将母液稀释成所需浓度。

1.4 细胞培养

本实验所使用的人支气管上皮细胞(16-HBE)由首都医科大学劳动卫生与环境卫生学教研室惠赠。采用单层贴壁培养法, 用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 MEM 培养液, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.5 MTT 法测细胞存活率

取指数生长期的 16-HBE 细胞, 用培养液调整细胞浓度为 1 × 10⁵ 个/mL, 接种于无菌 96 孔板中, 每孔 100 μL, 细胞铺好后, 将 96 孔板置于 5%CO₂、37℃ 培养箱中培养 24h, 然后分别加入各浓度 PM_{2.5}, 加入后终浓度为 8、16、32、64、128 μg/mL, 对照孔加入等体积的灭菌 PBS, 每个浓度均设 5 个复孔。染毒 24、48、72h 后, 吸弃上清, 用灭菌 PBS 洗涤 3 次后, 每孔加入 100 μL 2% 胎牛血清培养基, 再加入 10 μL 新鲜配制的 MTT 试剂(PBS 配制, 浓度为 5g/L), 置于 5%CO₂、37℃ 培养箱中继续培养 4h。培养结束后小心吸弃上清, 每孔加入 100 μL 二甲基亚砷(DMSO), 振荡器振荡 10min, 使紫色结晶完全溶解, 酶标仪 490nm 波长检测光密度(D₄₉₀)。细胞存活率(%)=(样品孔 D₄₉₀-空白孔 D₄₉₀)/(对照孔 D₄₉₀-空白孔 D₄₉₀) × 100。

1.6 Annexin V/PI 双染色法测细胞凋亡

将指数生长期细胞按 3 × 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中, 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养 24h 后染毒方法同“1.5”。染毒 24、48、72h 后, 收集细胞, 用 4℃ 预冷的 PBS 液洗 2 次后, 将细胞重悬于 500 μL Binding Buffer, 每个待测样本分别加入 5 μL Annexin V 和 10 μL PI, 避光反应 5 min 后用流式细胞仪进行检测, 通过二

维点图以双参数显示结果。获得的细胞散点图由 4 个象限组成, 散点图左下象限代表活细胞, 右上象限代表晚期凋亡细胞, 右下象限代表早期凋亡, 细胞总凋亡率=早期凋亡率+晚期凋亡率。

1.7 数据统计分析

实验结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 采用单因素方差分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞存活率检测

由表 1 可见, 分别以 8、16、32、64、128 μg/mL 浓度的灰霾天气颗粒物 PM_{2.5} 对 16-HBE 细胞进行染毒 24、48、72h, 细胞存活率随染毒浓度增加而下降, 各时间点 64、128 μg/mL 染毒组细胞存活率均明显低于对照组($P<0.05$)。且细胞存活率随着染毒时间延长而下降, 与染毒 24h 相比, 72h 各浓度组细胞存活率均明显下降($P<0.05$)。

表 1 灰霾天气颗粒物 PM_{2.5} 对 16-HBE 存活率的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of haze particulate matter PM_{2.5} on cell survival rate of 16-HBE cells

染毒浓度 Exposure concentration (μg/mL)	不同染毒时间的细胞存活率(%) Cell survival rate under different exposure time		
	24h	48h	72h
0	100.0	100.0	100.0
8	90.3 ± 5.7	89.9 ± 1.9	80.8 ± 2.8*▲
16	89.3 ± 6.6	89.0 ± 3.8	74.8 ± 1.8*▲
32	86.4 ± 5.7	85.8 ± 2.1*	72.4 ± 2.7*▲
64	77.6 ± 4.3*	75.5 ± 3.4*	68.3 ± 2.6*▲
128	71.5 ± 6.0*	68.9 ± 3.0*	63.5 ± 5.4*▲

[注] *: 与阴性对照组比较(Compared with the negative control group), $P<0.05$; ▲: 与染毒 24h 组相比(Compared with the 24h group), $P<0.05$ 。

2.2 细胞凋亡检测

由表 2 可见, 分别以 8、16、32、64、128 μg/mL 浓度的灰霾天气颗粒物 PM_{2.5} 对 16-HBE 进行染毒 24、48、72h, 细胞总凋亡率随着染毒浓度增加而升高, 染毒 24h 后 64、128 μg/mL 浓度组细胞总凋亡率比对照组明显增加($P<0.05$), 48、72h 后的 32、64、

表 2 灰霾天气细颗粒物对 16-HBE 凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of haze fine particulate matter on apoptosis of 16-HBE cells

染毒浓度 Exposure concentration (μg/mL)	不同染毒时间的细胞总凋亡率(%) Total apoptosis rate under different exposure time		
	24h	48h	72h
0	21.31 ± 1.31	22.82 ± 1.34	22.95 ± 2.32
8	23.35 ± 2.08	24.30 ± 0.95	24.61 ± 1.70
16	23.23 ± 1.73	26.82 ± 1.50	28.51 ± 0.48▲
32	24.86 ± 2.55	31.52 ± 0.60*	33.58 ± 2.45*▲
64	29.98 ± 0.75*	33.65 ± 3.35*	38.15 ± 1.01*▲
128	30.11 ± 1.75*	36.23 ± 0.62*	38.45 ± 3.13*▲

[注] *: 与阴性对照组比较(Compared with the negative control group), $P<0.05$; ▲: 与染毒 24h 组相比(Compared with the 24h group), $P<0.05$ 。

128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组细胞总凋亡率比对照组明显增加 ($P < 0.05$)。且细胞总凋亡率随着染毒时间延长而升高, 与染毒 24 h 相比, 48、72 h 的各浓度组细胞总凋亡率均明显大于 24 h, 且 72 h 除 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组外, 其余染毒组与 24 h 相比均有明显增加 ($P < 0.05$)。

3 讨论

凋亡是指细胞程序性死亡, 很多内源和外源信号刺激都可诱导细胞发生凋亡。正常生理情况下, 细胞凋亡在生物体的进化、内环境的稳定以及多个系统的发育中起着重要的作用, 保证机体的正常发展, 但当细胞凋亡出现异常, 细胞群体平衡失调时则易导致疾病的发生。近年来, 越来越多的证据表明细胞凋亡参与呼吸系统疾病发病过程, 病理学研究表明慢性阻塞性肺病患者存在着肺内细胞增殖和细胞死亡的平衡失调^[9], 肺内细胞凋亡异常是慢性阻塞性肺疾病重要的发病机制之一^[10]。在肺癌的发病学上细胞凋亡异常也占有重要地位^[11]。

本实验结果显示, 染毒 24、48、72 h 后, 64、128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞凋亡率均明显高于对照组; 当染毒浓度大于 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 染毒 72 h 各组细胞总凋亡率均比 24 h 的明显增加, 表明当灰霾天气颗粒物 $\text{PM}_{2.5}$ 作用达一定浓度和时间时可诱导人支气管上皮细胞凋亡, 且细胞总凋亡率随染毒浓度的增加和染毒时间的延长而升高。此外长时间暴露于低浓度的灰霾天气颗粒物 $\text{PM}_{2.5}$ 也可诱导细胞凋亡, 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 延长染毒时间至 48、72 h 时细胞总凋亡率均明显高于对照组 ($P < 0.05$), 这表明灰霾天气颗粒物 $\text{PM}_{2.5}$ 对机体的损伤可能为长时间低剂量累积造成的。KATANODA 等^[12]在日本对 3 个州 6 个地区的 63 520 人进行的队列研究表明, 在平衡了吸烟和其他混杂因素后, 长期暴露于空气污染与肺癌、呼吸系统疾病特别是肺炎相关。而短时间高浓度的暴露亦可对机体造成损伤, 64、128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组染毒 24 h 细胞凋亡率均明显高于对照组。SPIRA-COHEN 等^[13]的研究发现短时间暴露于含机动车尾气的 $\text{PM}_{2.5}$ 与儿童哮喘急性发作有关。MTT 结果亦显示同样趋势, 从本次实验细胞存活率和细胞总凋亡率结果来看, 灰霾天气颗粒物 $\text{PM}_{2.5}$ 对细胞的毒性具有剂量和时间反应关系, 且短时间高剂量暴露或长时间低剂量累积都可诱导细胞凋亡, 抑制细胞增殖, 导致细胞平衡失调, 对机体造成急性或慢性损伤。

灰霾天气颗粒物 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导细胞凋亡的详细作用机制, 目前还不是十分清楚, 国外有研究表明可能是由炎症因子和活性氧自由基介导的^[14-15]。由于 $\text{PM}_{2.5}$ 的成分与人类活动和气象条件密切相关, 在不同时期不同地点采集的 $\text{PM}_{2.5}$, 其物理、化学以及生物成分也会有所差别, 其对机体造成的损伤程度及机制也会有所不同, 本实验采用的是广州灰霾天气颗粒物 $\text{PM}_{2.5}$, 对其诱导细胞凋亡的具体分子机制尚有待于今后进一步的研究予以揭示。

· 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] 吴兑. 关于霾与雾的区别和灰霾天气预警的讨论[J]. 气象, 2005, 31(4): 3-7.
- [2] 彭晓武, 马小玲, 许振成, 等. 广州市灰霾天气及其对人群健康影响的初步调查[C]//中国环境科学学会 2009 年学术年会论文集. 北京: 中国环境科学学会, 2009: 901-907.
- [3] 白志鹏, 蔡斌彬, 董海燕, 等. 灰霾的健康效应[J]. 环境污染与防治, 2006, 28(3): 198-201.
- [4] BRUNEKREEF B, HOLGATE ST. Air pollution and health[J]. Lancet, 2002, 360(9341): 1233-1242.
- [5] YADAV AK, KUMAR K, SINGH MP, et al. Visibility and Incidence of Respiratory Disease During the 1998 Haze Episode in Brunei Darussalam[J]. Pure Appl Geophys, 2003, 160(1-2): 265-277.
- [6] 李宁, 彭晓武, 张本延, 等. 大气污染与呼吸系统疾病日门诊量的时间序列分析[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(12): 1077-1080.
- [7] 余锡刚, 吴建, 郇颖, 等. 灰霾天气与大气颗粒物的相关性研究综述[J]. 环境污染与防治, 2010, 32(2): 86-88.
- [8] 贾海红, 王祖武, 张瑞荣. 关于 $\text{PM}_{2.5}$ 的综述[J]. 污染防治技术, 2003, 16(4): 135-138.
- [9] KUWANO K. Epithelial cell apoptosis and lung remodeling[J]. Cell Mol Immunol, 2007, 4(6): 419-429.
- [10] 曾小康, 汪伟民. COPD 与细胞凋亡[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(4): 523-525.
- [11] 丁耀忠, 刘永生, 张杰. 几种肺癌相关的细胞凋亡因子[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(2): 213-215.
- [12] KATANODA K, SOBUE T, SATOH H, et al. An association between long-term exposure to ambient air pollution and mortality from lung cancer and respiratory diseases in Japan[J]. J Epidemiol, 2011, 21(2): 132-143.
- [13] SPIRA-COHEN A, CHEN LC, KENDALL M, et al. Personal exposures to traffic-related air pollution and acute respiratory health among Bronx schoolchildren with asthma[J]. Environ Health Perspect, 2011, 119(4): 559-655.
- [14] HETLAND RB, CASSEE FR, REFSNES M, et al. Release of inflammatory cytokines, cell toxicity and apoptosis in epithelial lung cells after exposure to ambient air particles of different size fractions[J]. Toxicol In Vitro, 2004, 18(2): 203-212.
- [15] DAGHER Z, GARCON G, BILLET S, et al. Activation of different pathways of apoptosis by air pollution particulate matter ($\text{PM}_{2.5}$) in human epithelial lung cells (L132) in culture[J]. Toxicology, 2006, 225(1): 12-24.

(收稿日期: 2011-07-29)

(英文编审: 薛寿征; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 徐新春)