

煤焦沥青烟提取物对人支气管上皮细胞的脂质过氧化作用

洪丽娟, 李娟, 杨维超, 刘文佳, 姚武, 燕贞

摘要: [目的] 研究煤焦沥青烟提取物 (CTPE) 刺激人支气管上皮细胞 (BEAS-2B) 的脂质过氧化作用。[方法] 用不同浓度 (0、1、3 $\mu\text{g/mL}$) 的 CTPE 刺激 BEAS-2B 细胞 4 h 后, 流式细胞仪检测细胞活性氧 (ROS) 水平。刺激 BEAS-2B 细胞 8 h 后, 用丙二醛 (MDA) 试剂盒和超氧化物歧化酶 (SOD) 活力测定试剂盒分别检测细胞裂解液中的 MDA 含量和 SOD 活力。[结果] 与对照组相比, CTPE (1、3 $\mu\text{g/mL}$) 作用细胞 4 h 后, ROS 含量均显著升高 ($P < 0.05$)。1、3 $\mu\text{g/mL}$ CTPE 刺激细胞 8 h 后, MDA 含量均升高, SOD 活力均明显降低 ($P < 0.05$); MDA/SOD 值升高 ($P < 0.05$)。[结论] 煤焦沥青烟提取物刺激 BEAS-2B 细胞后 ROS 水平和 MDA 含量增高, SOD 活力降低, 发生了脂质过氧化作用。

关键词: 煤焦沥青烟提取物; 脂质过氧化; 活性氧; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 人支气管上皮细胞

Lipid Peroxidation Induced by Coal Tar Pitch Smoke Extract in Human Bronchial Epithelial Cells
HONG Li-juan, LI Juan, YANG Wei-chao, LIU Wen-jia, YAO Wu, YAN Zhen (College of Public Health, Zhengzhou University, Henan 450001, China). Address correspondence to YAN Zhen, E-mail: yanzhen@zzu.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore whether coal tar pitch smoke extract (CTPE) could induce lipid peroxidation in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) [Methods] BEAS-2B cells were exposed to different concentrations (0, 1, and 3 $\mu\text{g/mL}$) of CTPE for four hours and measured for the levels of reactive oxygen species (ROS) by flow cytometry. The amount of malondialdehyde (MDA) and activity of superoxide dismutase (SOD) in the cells exposed to CTPE for eight hours were analyzed using MDA and SOD assay kits, respectively. [Results] The levels of ROS in the BEAS-2B cells treated with CTPE (1 and 3 $\mu\text{g/mL}$) for four hours were higher than that in the control group. After eight hours exposure, the activity of SOD in the CTPE groups (1 and 3 $\mu\text{g/mL}$) was significantly decreased compared with that in the control group; similarly, the amount of MDA and the ratio of MDA/SOD were also significantly higher than those in the control group. [Conclusion] CTPE can elevate levels of ROS and MDA, while decrease SOD activity. These results indicate that CTPE might induce lipid peroxidation in BEAS-2B cells.

Key Words: coal tar pitch smoke extract; lipid peroxidation; reactive oxygen species; malondialdehyde; superoxide dismutase; human bronchial epithelial cells

煤焦沥青 (coal tar pitch) 是炼焦工业产生的副产物, 其烟气主要通过呼吸道和皮肤对机体造成毒性反应^[1], 流行病学调查和动物实验均已证实煤焦沥青具有致癌性, 职业接触煤焦沥青能增加肺癌和其他癌症的患病危险^[2]。国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 通过大量的队列研究已经证实煤焦沥青职业接触与多种肿瘤的发生有关^[3]。脂质过氧化作用 (lipid peroxidation) 是强氧化剂 (如 H_2O_2) 或超氧化物使油脂的不饱和脂肪酸经非酶性氧化生成氢过氧化物的过程。脂质过氧化可能是毒物介导所致病理损伤乃至肿瘤的基础^[4], 其可通过一系列复杂的分子机制, 在机体某些疾病的病理过程如肿瘤、化学中毒、感染、炎症反应等发挥着重要作用。

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2014.0054

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81001240)

[作者简介] 洪丽娟 (1989—), 女, 硕士生; 研究方向: 流行病与卫生统计学; E-mail: dongtianlenma@163.com

[通信作者] 燕贞, E-mail: yanzhen@zzu.edu.cn

[作者单位] 郑州大学公共卫生学院, 河南 450001

已有学者从人群和动物实验方面对煤焦沥青的脂质过氧化作用进行研究^[4-5], 但煤焦沥青脂质过氧化作用的体外研究很少。呼吸道上皮细胞是煤焦沥青烟提取物 (coal tar pitch smoke extract, CTPE) 进入呼吸道后接触的主要细胞之一, 其发生的变化至关重要。煤焦沥青烟吸入是现场作业工人接触煤焦沥青的主要方式, 故本研究拟选择用 CTPE 作为研究对象, 刺激永生生化人支气管上皮细胞 (BEAS-2B), 测定其对 BEAS-2B 的脂质过氧化作用。

1 材料与方法

1.1 实验对象与受试物

BEAS-2B 细胞购自美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection); 受试物: 中温煤焦沥青采样于上街铝厂 (中国铝业股份有限公司河南分公司), 获得后研磨成粉, 将其在 400 $^{\circ}\text{C}$ 加热, 收集其挥发烟气, 二甲基亚砜 (DMSO) 溶解后常温保存备用^[6]。

1.2 主要试剂与仪器

羧基-2',7'-二氯荧光素 (carboxyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein,

carboxy-H2DCFDA) 探针(美国 Invitrogen 公司); RPMI(Roswell Park Memorial Institute)1640 培养液、胰蛋白酶-乙二胺四乙酸消化液、磷酸盐缓冲剂(PBS)粉剂(北京索莱宝公司); 标准胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); 丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、BCA(bicinchoninic acid)蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司); IX71 倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司); Millipore 台式高速冷冻离心机(德国 Heraeus 公司); iMark680 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); Accuri C6 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 细胞培养

BEAS-2B 细胞常规培养于 RPMI-1640 培养液(含体积分数为 10% 的胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素)中, 胰酶消化传代, 培养条件为电恒温培养箱, 37℃, 5%CO₂ 及饱和湿度, 2d 换液 1 次, 3~4d 传代 1 次。

1.4 活性氧(reactive oxygen species, ROS)的测定

待生长在 6 孔板上的 BEAS-2B 进入对数生长期后移去培养液, 加入含 10 μmol/L carboxy-H2DCFDA 荧光探针的培养液孵育 1 h 后, 加入不同浓度的 CTPE (0、1、3 μg/mL) 刺激细胞 4 h, 温 PBS 洗 3 遍, 胰酶消化收集所有细胞, 放入离心管, 离心后弃上清, PBS 重悬细胞置于冰上, 用流式细胞仪检测荧光强度。H2DCFDA 本身没有荧光, 可以自由穿过细胞膜, 进入细胞后, 可以被细胞内的酯酶水解生成二氯荧光素 DCFH (2', 7'-二氢-二氯荧光黄)。细胞内的 ROS 可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的荧光物质 DCF (2', 7'-二氯荧光黄), 因此可用探针的平均荧光强度反映细胞的 ROS 水平^[7]。

1.5 MDA 含量和 SOD 活性的测定

将 BEAS-2B 密度调整至 $(2\sim3) \times 10^5$ 接种于 6 孔板, 培养细胞进入对数生长期后分别加入浓度为 1 μg/mL 及 3 μg/mL CTPE, 在 37℃、5%CO₂ 培养箱内温育 8 h 后每孔加 150 μL 细胞裂解液裂解细胞并收集细胞裂解液。4℃, 12000 × g 离心 10 min, 取上清用 BCA 测定试剂盒测定蛋白浓度。按 SOD 活性检测试剂盒和 MDA 检测试剂盒说明书步骤操作, 计算细胞裂解液中 MDA 含量及 SOD 活性。

1.6 统计学分析

数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 12.0 统计软件进行数据整理和分析。多组数据比较运用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

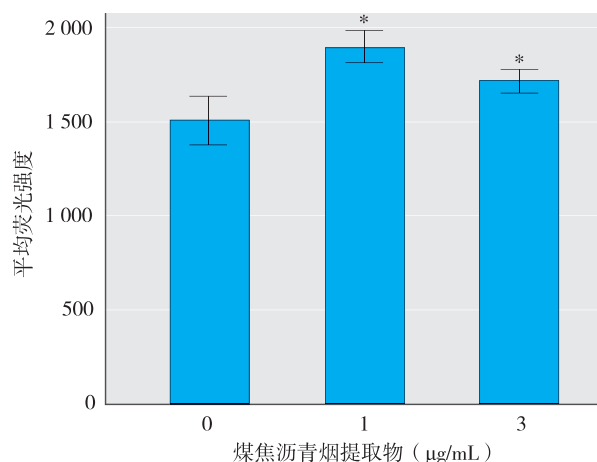
2.1 ROS 水平

结果显示(图 1), 染毒 4 h 时各组荧光强度的差异有统计学意义($P<0.05$)。LSD 检验结果显示, 1、3 μg/mL 染毒组与对照组相比平均荧光强度增强, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 MDA 含量和 SOD 活性

表 1 显示, 染毒 8 h 时各组 MDA 含量的差异有统计学意义($P<0.05$)。LSD 检验结果显示, 与对照组相比, 1、3 μg/mL 染毒组 MDA 值均升高, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。各组细胞的 SOD 活性差异有统计学意义($P<0.05$)。LSD 检验结果显示,

1、3 μg/mL 组分别与对照组相比, SOD 活性均降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。



[注] 与对照组比较, *: $P<0.05$ 。

图 1 不同浓度煤焦沥青烟提取物刺激对 ROS 水平的影响

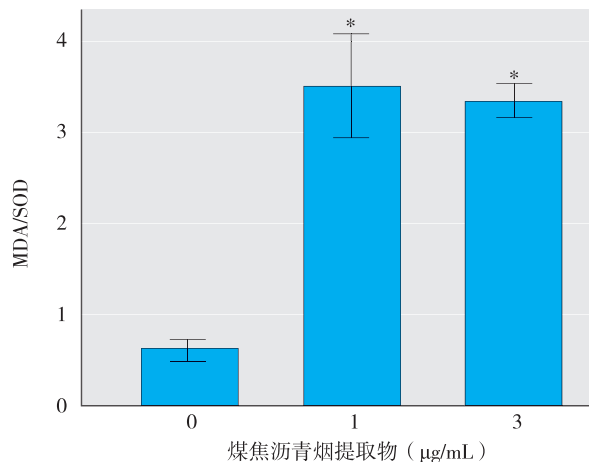
表 1 不同浓度煤焦沥青烟提取物刺激对丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

染毒浓度(μg/mL)	MDA 含量(μmol/mg)	SOD 活性(U/mg)
0	98.19 ± 23.32	158.86 ± 12.18
1	286.10 ± 25.72*	81.97 ± 4.52*
3	263.12 ± 15.43*	78.53 ± 4.38*
F	65.503	98.78
P	<0.001	<0.001

[注] 与对照组比较, *: $P<0.05$ 。

2.3 MDA/SOD 值

计算各组 MDA/SOD 值并应用单因素方差分析(图 2), 结果显示各组 MDA/SOD 值差异有统计学意义($P<0.05$)。经 LSD 检验结果显示, 染毒组(1、3 μg/mL)与对照组相比, MDA/SOD 值均升高, 差异有统计学意义($P<0.05$)。



[注] 与对照组比较, *: $P<0.05$ 。

图 2 煤焦沥青烟提取物刺激后丙二醛(MDA)/超氧化物歧化酶(SOD)值的变化

3 讨论

多环芳烃类化合物(PAHs)是煤焦沥青烟提取物的主要成分,PAHs作用于机体,可产生大量的ROS自由基,不可逆地损伤体内DNA、蛋白质等生物大分子,产生细胞毒性、遗传毒性、免疫毒性、致畸性和致癌性等毒性反应^[8-10]。正常情况下机体内自由基的产生与消除处于动态平衡,当机体自由基产生过多或自由基消除过慢,造成自由基在体内蓄积,机体的氧化平衡系统失衡,引起脂质过氧化。当机体发生氧化损伤时,自身的抗氧化酶系统将启动,清除自由基,阻断脂质过氧化,保护细胞的生理和结构功能^[11]。

常用的脂质过氧化指标包括ROS水平、抗氧化酶活性及脂质过氧化产物如MDA等。ROS系需氧生物细胞正常代谢的副产品,产生的ROS多数不断地被机体抗氧化系统清除,微量ROS可作为信号分子参与细胞内信号传导和转录调控^[12];而过量ROS则可引起细胞脂质过氧化,损伤DNA分子,或诱导细胞凋亡。机体内的ROS含量越多时其对机体的损伤作用越强,因此测定ROS的水平对预测其损伤效应具有至关重要的意义^[13-14]。MDA是脂质过氧化作用的终产物,既能反映体内氧化反应,也能作为机体损伤因子,是判断脂质过氧化反应程度的特征性指标。SOD是体内具有直接清除自由基功能的抗氧化酶,使细胞免受过氧自由基的氧化损伤,是抵抗ROS的第一道防线^[15]。SOD活性在一定程度上反映着机体清除氧自由基的能力,即抗氧化能力。MDA和SOD均为反映体内活性氧水平的重要指标,也是一对互相影响的指标,常将MDA的含量测定与SOD的测定互相配合,来反映机体脂质过氧化水平和抗脂质过氧化的能力。ROS是氧化应激的主要来源,产生的大量ROS可攻击细胞膜等细胞结构,使细胞发生脂质过氧化产生脂质过氧化产物MDA,机体发生脂质过氧化的同时启动抗氧化系统,抗氧化酶清除过多的羟自由基,SOD水平下降。脂质过氧化的产物又可以分解形成更多的自由基,引起自由基产生的连锁放大反应。

实验结果显示,CTPE(1、3 μg/mL)刺激BEAS-2B后,ROS水平和MDA含量升高,SOD活性降低,MDA/SOD值升高,提示CTPE可诱导增强机体的脂质过氧化作用。其机制可能是体内的ROS水平升高,自由基失去平衡,CTPE抑制了BEAS-2B细胞的抗氧化能力,导致SOD活力下降,引起MDA大量产生,从而发生脂质过氧化。

综上所述,CTPE作用于BEAS-2B可产生大量的ROS,发生氧化应激反应,但其脂质过氧化作用与肿瘤之间的关系和作用机制有待进一步研究。

•作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

[1] LI Z, WU Y, ZHAO Y, et al. Analysis of coal tar pitch and smoke

extract components and their cytotoxicity on human bronchial epithelial cells[J]. J Hazard Mater, 2011, 186(2/3): 1277-1282.

[2] FRIESEN MC, DEMERS PA, SPINELLI JJ, et al. Chronic and acute effects of coal tar pitch exposure and cardiopulmonary mortality among aluminum smelter workers[J]. Am J Epidemiol, 2010, 172(7): 790-799.

[3] CLAPP RW, HOWE GK, JACOBS MM. Environmental and occupational causes of cancer: a call to act on what we know[J]. Biomed Pharmacother, 2007, 61(10): 631-639.

[4] 孟新生, 邹先清, 冯淑华, 等. 煤焦沥青对大鼠的脂质过氧化作用[J]. 中国工业医学杂志, 2000, 13(3): 185-186.

[5] 张俊平, 张巧, 周舫, 等. 煤焦沥青接触者血清SOD、MDA及唾液酸检测[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2006, 41(2): 374-375.

[6] 秦利娟, 王威, 郝艳红, 等. 煤焦沥青提取物对BEAS-2B细胞Nrf2-Keap1/ARE通路的影响[J]. 环境与职业医学, 2010, 27(12): 727-730.

[7] WU W, PEDEN DB, MCCONNELL R, et al. Glutathione-S-transferase M1 regulation of diesel exhaust particle-induced pro-inflammatory mediator expression in normal human bronchial epithelial cells[J]. Part Fibre Toxicol, 2012, 9: 31.

[8] TOYOOKA T, IBUKI Y. DNA damage induced by coexposure to PAHs and light[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2007, 23(2): 256-263.

[9] GOETZ ME, LUCH A. Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens[J]. Cancer Lett, 2008, 266(1): 73-83.

[10] MAHLER BJ, METRE PC, CRANE JL, et al. Coal-tar-based pavement sealcoat and PAHs: implications for the environment, human health, and stormwater management[J]. Environ Sci Technol, 2012, 46(6): 3039-3045.

[11] NIKI E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(5): 469-484.

[12] XIA Q, CHIANG HM, YIN JJ, et al. UVA photoirradiation of benzo[a]pyrene metabolites: induction of cytotoxicity, reactive oxygen species, and lipid peroxidation[J]. Toxicol Ind Health, 2013.

[13] 李曙光, 何新星, 吴大蔚, 等. 苯对模拟失重大鼠肝功能及脂质过氧化水平的影响[J]. 载人航天, 2012, 18(6): 87-90.

[14] 陈文婕, 戴红, 陈敏, 等. 邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP)对小白鼠肝脏毒性及脂质过氧化损伤[J]. 生态毒理学报, 2012, 7(1): 93-98.

[15] APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. Annu Rev Plant Biol, 2004, 55: 373-399.

(收稿日期: 2013-09-02)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 洪琪)