原创精选
Selected article

焦炉逸散物有机提取物致 HL-60 细胞 DNA 损伤及 NF-κB 蛋白表达改变

王婷，解秋艳，王艳华，张秀川，戴宇飞，段化伟

中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所，北京 100050

摘要：

[目的] 焦炉逸散物（COE）是主要的工业和环境污染物，其中含有大量致癌和致突变的多环芳烃（PAHs）。外源化学物经吸收后进入血液系统，有可能引起血细胞的损伤。但目前对于 COE 致血液系统损伤的研究尚不多见，其血液毒性机制亦尚不明了。因此，本研究拟探讨焦炉逸散物有机提取物（OE-COE）连续暴露对血液细胞的损伤效应及生物学机制。

[方法] 采集并提取焦炉炉顶颗粒物，制备 OE-COE 染毒液。取对数生长期 HL-60 细胞，用 0、2.5、5、10、20 mg/L 浓度的 OE-COE 连续染毒 4 d，建立细胞连续暴露模型。染毒结束后，CCK-8 法检测细胞存活率，流式细胞术检测细胞凋亡和坏死情况，彗星试验检测细胞 DNA 损伤情况，Western blot 法检测细胞核转录因子 κB（NF-κB）抑制蛋白（IκBα）、磷酸化 IκBα、NF-κB p65、磷酸化 NF-κB p65 蛋白表达水平。

[结果] 经 OE-COE 4 d 连续染毒处理后，随着剂量的增加，HL-60 细胞相对存活率下降（$P<0.001$），20 mg/L 组中 HL-60 细胞存活率下降至 38.63%。5、10、20 mg/L 组 HL-60 细胞的相对凋亡率分别是对照组的 1.22 倍（$P>0.05$）、2.51 倍（$P>0.05$）和 13.97 倍（$P<0.05$），细胞的相对坏死率分别是对照组的 1.23 倍（$P>0.05$）、1.16 倍（$P>0.05$）和 2.88 倍（$P<0.05$）。10、20 mg/L 组细胞尾部 DNA 相对百分含量分别上升至对照组的 2.05 倍（$P<0.05$）和 2.40 倍（$P<0.05$），且高于 2.5、5 mg/L 组（$P<0.05$）。5、10 mg/L 组细胞的 IκBα、磷酸化 IκBα 与 NF-κB p65、磷酸化 NF-κB p65 蛋白相对表达水平均高于对照组（$P<0.05$）。

[结论] OE-COE 连续暴露可致 HL-60 细胞 DNA 损伤，NF-κB 活化可能是 OE-COE 造成血液细胞 DNA 损伤的机制之一。

关键词：焦炉逸散物；多环芳烃；HL-60 细胞；DNA 损伤；细胞核转录因子 κB

DNA damage and changes in NF-κB protein expression in HL-60 cells treated with organic extracts of coke oven emissions

WANG Ting, XIE Qiu-yan, WANG Yan-hua, ZHANG Xiu-chuan, DAI Yu-fei, DUAN Hua-wei (*National Institute for Occupational Health and Poison Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing* 100050*, China*)

Abstract:

[Objective] Coke oven emissions (COE) are primary industrial and environmental pollutant, including large amounts of carcinogenic and mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Exogenous chemicals are absorbed into hematological system first, and may cause blood cell damage. However, few studies have reported the damage to hematological system induced by COE and related mechanism. This study is designed to investigate the damage and biological mechanism of hematological cells exposed to organic extracts of coke oven emissions (OE-COE).

[Methods] COE were collected at the top area of a coke oven and extracted to prepare OE-COE. HL-60 cells were collected in logarithmic growth phase and cultured with OE-COE for 4 days at concentrations of 0, 2.5, 5, 10, and 20 mg/L to establish continuous exposure models. After exposure, cell survival rate was detected by CCK-8, cell apoptosis and necrosis by flow cytometry, DNA damage by comet assay, and the expression levels of inhibitor of nuclear factor-kappa B (NF-κB) (IκBα), phosphorylation IκBα, NF-κB p65, and phosphorylation NF-κB p65 by Western blot.

[Results] After 4 days of continuous exposure, with the dosage increase of OE-COE, the relative survival rate of HL-60 cells was decreased significantly ($P<0.001$), especially the relative survival rate of the 20 mg/L group which was decreased to 38.63%. The relative apoptosis rates of HL-60

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18565

基金项目
国家自然科学基金（81573124，81172642）

作者简介
王婷（1993—），女，硕士生；
E-mail：wangting_cdc@163.com

通信作者
段化伟，E-mail：huaweiduan@126.com

利益冲突 无申报
收稿日期 2018-09-04
录用日期 2019-02-03

文章编号 2095-9982(2019)04-0369-07
中图分类号 R114
文献标志码 A

▸引用
王婷，解秋艳，王艳华，等. 焦炉逸散物有机提取物致 HL-60 细胞 DNA 损伤及 NF-κB 蛋白表达改变 [J]. 环境与职业医学，2019，36（4）：369-375.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18565

Funding
This study was funded.

Correspondence to
DUAN Hua-wei, E-mail: huaweiduan@126.com

Competing interests None declared
Received 2018-09-04
Accepted 2019-02-03

▸To cite
WANG Ting, XIE Qiu-yan, WANG Yan-hua, et al. DNA damage and changes in NF-κB protein expression in HL-60 cells treated with organic extracts of coke oven emissions[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(4): 369-375.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18565

cells in the 5, 10, and 20 mg/L groups were 1.22 ($P>0.05$), 2.51 ($P>0.05$), and 13.97 ($P<0.05$) times higher than that of the control group; the relative necrosis rates of HL-60 cells in the 5, 10, and 20 mg/L groups were 1.23 ($P>0.05$), 1.16 ($P>0.05$), and 2.88 ($P<0.05$) times higher than that of the control group. The relative percentages of tail DNA of HL-60 cells in the 10 mg/L and 20 mg/L groups were 2.05 ($P<0.05$) and 2.40 ($P<0.05$) times higher than that of the control group, and were also higher than those of the 2.5 and 5 mg/L groups ($P<0.05$). The relative expression levels of IκBα, phosphorylation IκBα, NF-κB p65, and phosphorylation NF-κB p65 proteins in the 5 and 10 mg/L groups were higher than those of control group ($P<0.05$).

[Conclusion] OE-COE continuous exposure could induce DNA damage in HL-60 cells, and the activation of NF-κB might be one of the mechanisms of DNA damage after OE-COE exposure.

Keywords: coke oven emission; polycyclic aromatic hydrocarbon; HL-60 cell; DNA damage; nuclear factor-kappa B

焦炉逸散物（coke oven emissions，COE）是焦炭生产过程中，煤在高温缺氧的焦炉炭化室内干馏而产生的，成分复杂，其颗粒相有机污染物中包含多环芳烃（polycyclic aromatic hydrocarbons，PAHs）等多种致癌成分，是主要的工业和环境污染物[1]。COE中的PAHs可以经呼吸道、皮肤和消化道等多种途径接触吸收进入机体，诱发多种疾病甚至肿瘤的发生[2]。

外源性化学物质经机体吸收后首先进入血液并达到较高浓度，代谢过程中也必须依靠血液来运输，易引起外周血中各种血细胞损伤，继而出现血液毒性。杨柳等[3]通过对焦化作业人员血常规影响的调查分析，发现接触COE后的作业工人其血液中的红细胞、白细胞和血红蛋白均发生不同程度的改变，提示COE会对人体造血系统有一定影响。李霄等[4]研究发现焦炉作业工人在PAHs和苯的混合暴露下，会出现外周血血象异常改变和淋巴细胞的DNA损伤，且二者单独作用时均可引起接触人群某些血象指标的改变。但目前对于COE致血液系统损伤的研究尚不多见，其血液毒性机制亦尚不明了。

核转录因子κB（nuclear factor-kappa B，NF-κB）信号通路在氧化应激、炎症反应以及多种疾病的发生发展过程中都发挥着重要的作用[5]。NF-κB家族主要由p50/p105（NF-κB1）、p52/p100（NF-κB2）、c-Rel、p65（RelA）、RelB五种蛋白组成，p65是NF-κB家族中最主要的功能蛋白，p65磷酸化可以加强NF-κB的活化[6]。IκB是NF-κB的一个抑制性蛋白，静息状态下，细胞中的NF-κB会与IκB结合，形成p50-p65-IκB三聚体，抑制NF-κB活化，当机体受到外源化学物刺激时会引起细胞IκB磷酸化，从而导致NF-κB激活，进一步加重机体损伤[7-8]。NF-κB p65和IκBα在外界刺激作用下发生磷酸化，可以作为NF-κB活化的标志[9]。已有研究表明，血液系统疾病的发生与NF-κB信号通路失调有关[10-11]。因此，本研究建立COE有机提取物（organic extracts of coke oven emissions，OE-COE）连续染毒4 d的HL-60细胞损伤模型，观察OE-COE连续染毒对细胞DNA损伤以及NF-κB通路蛋白等的影响，探讨COE对血液细胞的损伤效应及生物学机制。

1 材料与方法

1.1 细胞

HL-60人白血病细胞株（中国北京协和细胞资源中心）。

1.2 主要仪器

TH-150C型总悬浮颗粒采样器（中国武汉天虹有限责任公司），Bransonic2210型超声振荡器（美国Branson公司），细胞培养箱（美国Thermo Scientific公司），生物安全柜（美国Labconco公司），酶标仪（美国BioTek公司），荧光显微镜（日本Nikon公司），Tanon 5200全自动化学发光成像分析系统（中国上海天能科技有限公司），LSR Ⅱ流式细胞仪（美国BD公司），XCell SureLock® Mini-Cell型电泳槽、水平电泳槽（美国Invitrogen公司），双稳电泳仪（美国Bio-Rad公司），4252-500-01型彗星玻片（美国Trevigen公司），全自动彗星扫描分析系统（法国Imstar公司）。

1.3 主要试剂

二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO，美国Sigma公司），二氯甲烷（德国Dr.Ehrenstorfer公司），RPMI-1640培养基与PBS磷酸盐缓冲液（美国HyClone公司），胎牛血清和双抗（美国Gibco公司），CCK-8试剂盒（中国北京碧云天生物技术研究所），Annexin V-FITC试剂盒（中国北京欣博盛生物科技公司），蛋白裂解液（中国北京康为世纪生物科技有限公司），NuPAGE聚丙烯酰胺预制胶（美国Invitrogen公司），蛋白标记物（美国Singulex公司），NF-κB p65抗体（美国Santa Cruz公司），磷酸化NF-κB p65（p-NF-κB p65）抗体、IκBα抗体和磷酸化IκBα（p-IκBα）抗体（美国Cell Signaling公司），PAHs标准品（德国Dr.Ehrenstorfer公司）。

1.4 OE-COE 样品采集与制备

选择山东省某焦化厂炉顶作业区，采集焦炉炉顶颗粒物，提取有机提取物制备 OE-COE 染毒液，采集与制备参考本课题组前期研究方法[12]。提前将玻璃纤维滤膜干燥后称重，并做好记录。随后，选择某焦化厂炉顶作业区放置装有 $PM_{2.5}$ 切割器的总悬浮颗粒采样器，每张滤膜以 20 L/min 的流量采样 10~15 min，结束后干燥至恒重并置于 -20℃保存。进行 OE-COE 染毒液制备时，先将滤膜剪碎至约 1 cm×1 cm 大小，放入 50 mL 离心管，随后加入 30 mL 二氯甲烷，超声提取 20 min，重复 3 次至提取液无明显颜色，收集滤液，过滤后氮气吹干，称重，充分溶解于 DMSO 至终浓度为 10 g/L，作为储备液置于 -20℃避光保存。随后，采用毛细管柱气相色谱 - 质谱法对提取的有机物中 PAHs 成分进行检测。

1.5 细胞培养及染毒

使用 RPMI-1640 培养基（含 20% 胎牛血清，1% 双抗），37℃、5%CO_2 培养箱培养 HL-60 细胞。待细胞生长至适宜密度后，将处于对数生长期的细胞离心重悬后进行染毒处理。染毒剂量的确定参照本课题组前期研究基础[13]。将 OE-COE 储备液经细胞培养基中稀释后，终质量浓度分别为 2.5、5、10、20 mg/L，1% DMSO 为对照组。染毒培养基为含 5% 胎牛血清，1 % 双抗的 RPMI-1640 培养基。连续染毒 4 d，每 24 h 更换新鲜染毒培养基。

1.6 CCK-8 法检测细胞存活率

细胞接种于 96 孔板中，培养液体积为 100 μL，保证每孔细胞数约为 2×10^4 个，每个浓度设置 3 个复孔，培养 24 h 后，按照预先设定方案染毒 4 d 后，每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，培养箱内孵育 1 h 后，于酶标仪 450 nm 波长处检测光密度（D）。以对照组细胞存活率为 100%，实验组细胞相对存活率 = （$D_{实验组}/D_{对照组}$）×100%。

1.7 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡及坏死

按照预先设定方案进行染毒，染毒结束后细胞用预冷的 PBS 洗涤两次，用稀释后的 1× 结合缓冲液重悬细胞，使细胞浓度在 3×10^5 mL^{-1} 左右。随后，用移液器吸取 195 μL 细胞悬液置于流式管中，加入 5 μL Annexin V-FITC，用移液器轻轻吹打混匀，静置 3 min，加入 10 μL 碘化丙啶（20 mg/L），轻轻吹打混匀后室温避光孵育 10 min，最后加入 300 μL 1× 结合缓冲液，轻轻吹打混匀后用流式细胞仪进行检测分析。

1.8 彗星试验检测细胞 DNA 损伤

将染毒后的细胞接种于 6 孔板中，每孔细胞数约为 1×10^5 个，每个剂量组设置 3 个重复。染毒结束后，PBS 洗涤细胞 2 次，用 1 mL pH=7.4 的 PBS 重悬细胞。配置 1% 低熔点琼脂糖凝胶，置于 37℃水浴锅，随后取 100 μL 低熔点凝胶和 20 μL 细胞悬液混合均匀，立即铺片，4℃避光放置 30 min。将制好的胶板放入预冷的裂解液中，4℃避光裂解 1 h，用 PBS 轻轻漂洗 2 次，置于预冷的碱性电泳缓冲液中，4℃避光解旋 40 min。解旋结束后的胶片置于电泳槽中，4℃避光电泳 30 min（21 V，300 mA，1.25 V/cm）。电泳结束后，将胶板置于中和缓冲液中，中和两次，每次 15 min，再加入无水乙醇脱水 10 min，结束后吸取胶片上的乙醇，避光自然晾干。待其干燥后，用 SYBR® Green I 染色液进行染色，室温避光孵育 20 min，染色结束用超纯水洗片，室温避光晾干，采用 Imstar 全自动彗星扫描分析系统进行彗星图形扫描采集分析。

1.9 Western blot 检测 NF-κB 相关蛋白表达

细胞接种于 6 孔板中，按照预先设定方案染毒 4 d 后，收集细胞悬液，离心后用 PBS 洗涤一遍。每 5×10^6 个细胞加入 200 μL 裂解液，吹打均匀，置于 4℃充分裂解。将裂解后的细胞离心取上清，二喹啉甲酸二钠盐（BCA）法测定上清蛋白浓度。采用商品化的聚丙烯酰胺预制凝胶进行电泳，硝酸纤维素膜进行转膜，5% 脱脂奶粉封闭 2 h。在封闭过程中，用 5% 的脱脂奶粉将相应蛋白的一抗按照 1∶500~1∶1 000 稀释，封闭结束后，将封闭好的硝酸纤维素膜放在配制好的一抗中，置于水平摇床上 4℃孵育过夜。经 1×TBST 洗涤三次后，将洗涤后的硝酸纤维素膜放在配置好的二抗（1∶1 000 的比例稀释）中，室温孵育 2 h，1×TBST 洗涤三次后，加入蛋白显色发光试剂进行显影，化学发光成像分析系统扫描结果。

1.10 统计学分析

采用 SPSS19.0 软件进行统计分析。实验所得结果为计量资料，经正态性检验后，符合正态分布或近似正态分布，使用 $\bar{x}\pm s$ 进行描述。多组间均数比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-t 检验。所有检验均为双侧检验，检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 OE-COE 中 PAHs 定量分析

该有机提取物主要成分为 PAHs。如表 1 所示，其中主要包含萘、苊、芴、菲、蒽、荧蒽、芘、苯并 [a] 蒽、䓛、苯并 [b] 荧蒽、苯并 [k] 荧蒽、苯并 [a] 芘等物质。

表1 OE-COE中PAHs成分含量

Table 1 Concentrations of PAHs components in OE-COE

PAHs成分（PAHs component）	质量浓度（Concentration，mg/L）
苯并［*a*］蒽（Benzo[*a*]anthracene）	88.162
苯并［*a*］芘（Benzo[*a*]pyrene）	35.079
苯并［*b*］荧蒽（Benzo[*b*]fluoranthene）	67.398
苯并［*g*，*h*，*i*］苝（Benzo[*g*，*h*，*i*]perylene）	28.936
苯并［*k*］荧蒽（Benzo[*k*]fluoranthene）	26.740
苊（Acenaphthene）	2.419
蒽（Anthracene）	13.454
二苯并［*a*，*h*］荧蒽（Dibenzo[*a*，*h*]fluoranthene）	47.541
菲（Phenanthrene）	57.826
萘（Naphthalene）	1.509
芘（Pyrene）	43.302
䓛（Chrysene）	99.137
芴（Fluorene）	10.117
荧蒽（Fluoranthene）	71.209

2.2 OE-COE致细胞相对存活率改变

如表2所示，在细胞连续染毒OE-COE 4 d后发现，随着染毒剂量的增加，HL-60细胞相对存活率下降，且差异具有统计学意义（$P<0.001$）。与对照组相比，10、20 mg/L组下降趋势更为明显，特别是20 mg/L组，其细胞相对存活率下降至38.63%。

表2 OE-COE连续染毒4 d对HL-60细胞相对存活率的影响

Table 2 Effects of 4-day continuous OE-COE exposure on relative survival rate of HL-60 cells

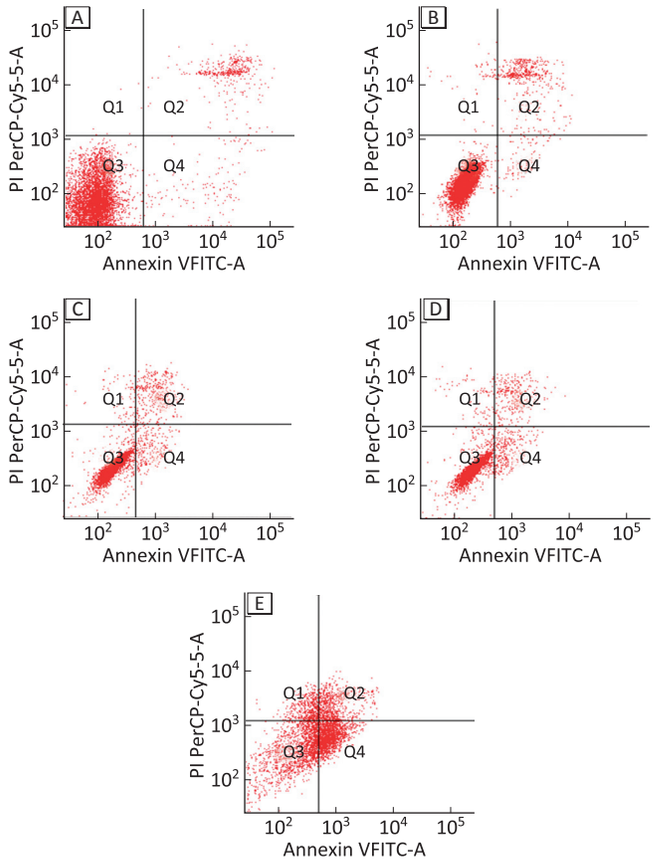
分组（Group）	样品数（*n*）	细胞相对存活率（Relative survival rate，$\bar{x}\pm s$，%）
对照（Control）	6	100.00
2.5 mg/L OE-COE	6	96.61±3.35
5 mg/L OE-COE	6	87.54±12.60[a]
10 mg/L OE-COE	6	73.51±13.42[abc]
20 mg/L OE-COE	6	38.63±3.63[abcd]
F		51.297
P		<0.001

［注］a：与对照组相比；b：与2.5 mg/L组比较；c：与5 mg/L组比较；d：与10 mg/L组比较，$P<0.05$。

［Note］a: Compared with the control group; b: Compared with the 2.5 mg/L group; c: Compared with the 5 mg/L group; d: Compared with the 10 mg/L group, $P<0.05$.

2.3 OE-COE致细胞凋亡及坏死情况

如图1和表3所示，5、10、20 mg/L组细胞的相对凋亡率分别上升至对照组的1.22倍（$P>0.05$）、2.51倍（$P>0.05$）和13.97倍（$P<0.05$），5、10、20 mg/L组细胞的相对坏死率上升至对照组的1.23倍（$P>0.05$）、1.16倍（$P>0.05$）和2.88倍（$P<0.05$），且20 mg/L组细胞相对凋亡率和相对坏死率与其他剂量组相比，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。



［注］A：对照组；B：2.5 mg/L OE-COE组；C：5 mg/L OE-COE组；D：10 mg/L OE-COE组；E：20 mg/L OE-COE组。

［Note］A: Control group; B: 2.5 mg/L OE-COE group; C: 5 mg/L OE-COE group; D: 10 mg/L OE-COE group; E: 20 mg/L OE-COE group.

图1 OE-COE连续染毒4 d致HL-60细胞凋亡和坏死情况

Figure 1 Cell apoptosis and necrosis of HL-60 cells after OE-COE exposure for continuous 4 days

表3 OE-COE连续染毒4 d对HL-60细胞相对凋亡率和相对坏死率的影响

Table 3 Effects of 4-day continuous OE-COE exposure on relative apoptosis rate and relative necrosis rate of HL-60 cells

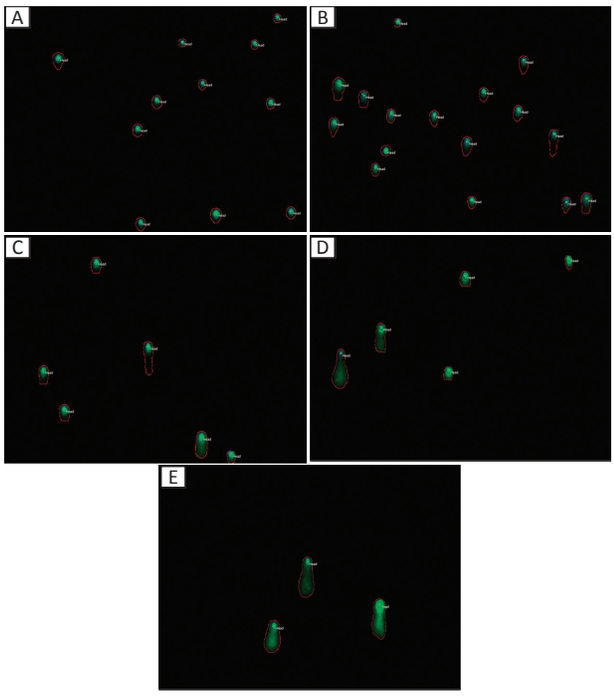
分组 Group	样品数 *n*	相对凋亡率（$\bar{x}\pm s$） Relative apoptosis rate	相对坏死率（$\bar{x}\pm s$） Relative necrosis rate
对照（Control）	6	1.00	1.00
2.5 mg/L OE-COE	6	0.88 ± 0.51	1.06 ± 0.24
5 mg/L OE-COE	6	1.22 ± 0.36	1.23 ± 0.27
10 mg/L OE-COE	6	2.51 ± 0.61	1.16 ± 0.42
20 mg/L OE-COE	6	13.97 ± 9.24[abcd]	2.88 ± 1.26[abcd]
F		11.165	9.986
P		<0.001	<0.001

［注］a：与对照组相比；b：与2.5 mg/L组比较；c：与5 mg/L组比较；d：与10 mg/L组比较，$P<0.05$。

［Note］a: Compared with the control group; b: Compared with the 2.5 mg/L group; c: Compared with the 5 mg/L group; d: Compared with the 10 mg/L group, $P<0.05$.

2.4 OE-COE致DNA损伤情况

如图2和表4所示，随着OE-COE染毒剂量的增加，细胞尾部DNA相对百分含量上升。10、20 mg/L组细胞尾部DNA相对百分含量分别上升至对照组的2.05倍（$P<0.05$）和2.40倍（$P<0.05$），也高于2.5、5 mg/L OE-COE组（$P<0.05$）。



［注］A：对照组；B：2.5 mg/L组；C：5 mg/L组；D：10 mg/L组；E：20 mg/L组。

［Note］A: Control group; B: 2.5 mg/L OE-COE group; C: 5 mg/L OE-COE group; D; 10 mg/L OE-COE group; E: 20 mg/L OE-COE group.

图2 OE-COE连续染毒4 d致HL-60细胞DNA损伤

Figure 2 DNA damage in HL-60 cells after OE-COE exposure for continuous 4 days

表4 OE-COE连续染毒4 d对HL-60细胞DNA的损伤

Table 4 Effects of 4-day continuous OE-COE exposure on DNA damage of HL-60 cells

分组 Group	样品数 *n*	细胞尾部DNA相对百分含量（$\bar{x}\pm s$） Relative percentage of tail DNA
对照（Control）	6	1.00
2.5 mg/L OE-COE	6	1.12±0.53
5 mg/L OE-COE	6	1.29±0.46
10 mg/L OE-COE	6	2.05±0.78 [abc]
20 mg/L OE-COE	6	2.40±0.62 [abcd]
F		7.683
P		<0.001

［注］a：与对照组相比；b：与2.5 mg/L组比较；c：与5 mg/L组比较；d：与10 mg/L组比较，$P<0.05$。

［Note］a: Compared with the control group; b: Compared with the 2.5 mg/L group; c: Compared with the 5 mg/L group; d: Compared with the 10 mg/L group, $P<0.05$.

2.5 OE-COE致NF-κB通路蛋白表达改变

由于20 mg/L OE-COE组细胞相对存活率为38.63%，低于50%，故不检测20 mg/L组细胞NF-κB通路蛋白表达情况。如图3所示，各剂量组细胞均表达IκBα、p-IκBα、NF-κB p65、p-NF-κB p65蛋白，且与对照组相比存在不同程度的改变。如图4A、4B和4C所示，与对照组相比，OE-COE染毒4 d后，IκBα、p-IκBα与NF-κB p65蛋白的表达呈上升趋势，在5、10 mg/L组中该三种蛋白的表达水平均高于对照组（$P<0.05$）。与2.5 mg/L组相比，5、10 mg/L组的IκBα蛋白表达水平升高（$P<0.05$），p-IκBα与NF-κB p65蛋白表达水平仅在10 mg/L组中升高（$P<0.05$）。此外，与对照组或者2.5 mg/L组相比，5、10 mg/L组的p-NF-κB p65蛋白表达水平均升高（$P<0.05$），但10 mg/L组p-NF-κB p65蛋白表达较5 mg/L组出现了下降（图4D）。

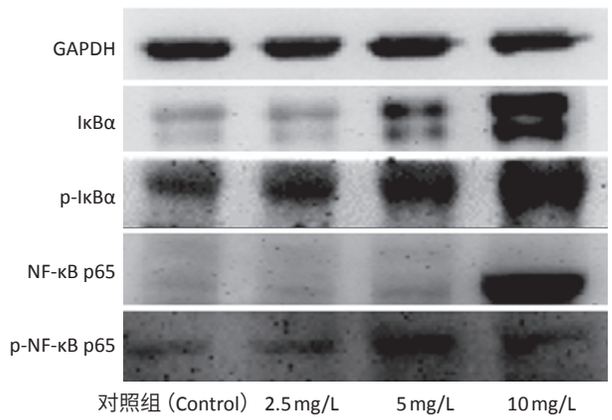
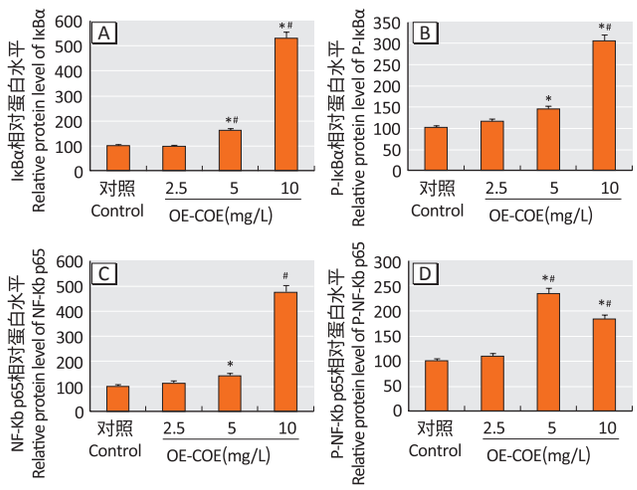


图3 OE-COE连续染毒4 d致HL-60细胞NF-κB通路蛋白的改变

Figure 3 Changes in NF-κB pathway proteins in HL-60 cells after OE-COE exposure for continuous 4 days



［注］*：与对照组相比；#：与2.5 mg/L组相比，$P<0.05$。

［Note］*: Compared with the control group; #: Compared with the 2.5 mg/L group, $P<0.05$.

图4 OE-COE连续染毒4 d对HL-60细胞NF-κB通路蛋白相对表达水平的影响

Figure 4 Effects of 4-day continuous OE-COE exposure on expressions of NF-κB pathway proteins in HL-60 cells

3 讨论

焦炭生产中所产生的COE，是环境污染的重要来源之一，其中焦炉炉顶作业区是焦化厂作业污染最严重的区域[14]。在本次研究中，我们通过采集焦炉炉顶颗粒物，提取COE中的有机提取物，建立OE-COE连续染毒4 d的HL-60细胞模型，观察染毒后HL-60细胞凋亡、坏死、DNA损伤以及NF-κB通路蛋白等一系列损伤作用的改变，发现随着染毒剂量的增加，细胞存活率降低，细胞凋亡率和坏死率升高，DNA损伤程度逐渐加重，NF-κB信号通路活化增加。

HL-60细胞是来源于人的白血病细胞株，与分裂的原代淋巴细胞相比，该细胞具备连续增殖能力，可以分化成不同的细胞类型，因此常被作为粒细胞-巨噬细胞祖细胞的替代物[15-16]。其在血液毒物鉴定和血液毒性机制研究中应用广泛，如苯致白血病的作用模式和机制研究[17-19]。有大量研究将HL-60细胞暴露于苯或苯的代谢物来研究苯致白血病的机制，例如Nishikawa等[20]通过苯的代谢物1，2，4-苯三醇染毒HL-60细胞建立细胞模型，发现由1，2，4-苯三醇所引起的DNA卤化是苯致白血病的一个重要生物学改变。本研究结果表明，在不同浓度的OE-COE连续染毒4 d后，HL-60细胞相对存活率下降，20 mg/L组细胞相对存活率下降至38.63%。提示HL-60细胞在OE-COE作用下，出现了细胞损伤。此外，随着染毒剂量的增加，HL-60细胞的凋亡率和坏死率均上升，也进一步说明OE-COE对血液细胞的损伤作用。

DNA损伤是肿瘤发生过程中的一个关键事件，特定基因组位点的DNA损伤可以导致核苷酸序列的改变，引起基因突变和其他细胞反应[21]。Zhai等[13]通过OE-COE成功诱导16HBE细胞损伤，发现其与DNA损伤存在明显的剂量-效应关系。Xin等[22]发现OE-COE可导致HepG2细胞DNA链断裂，Olive尾矩增加，炉顶采集的OE-COE引起的DNA损伤明显高于炉底和炉侧。此外，本课题组前期的人群研究同样发现长期暴露于PAHs的焦炉作业工人DNA损伤水平随着暴露时间的增加逐渐增加[23]。在本次实验中，随着染毒剂量的增加，HL-60细胞的细胞尾部DNA百分含量增加，细胞的DNA损伤程度逐渐加重。以往人群和细胞的研究结果一致表明COE暴露可引起正常细胞或癌细胞的DNA损伤，也表明COE暴露可导致血液细胞DNA损伤。

已有研究发现，DNA损伤可以诱导NF-κB通路活化[24-25]。Huang等[26]发现喜树碱诱导细胞DNA损伤会引起NF-κB信号的持续性激活。Xu等[24]在使用电离辐射诱导人胶质母细胞瘤细胞DNA损伤的过程中，发现NF-κB信号通路发生活化，IκBα、p-IκBα与NF-κB p65、p-NF-κB p65蛋白的表达上升。在本研究中，我们发现OE-COE连续染毒4 d后，与对照组相比，各剂量组细胞的IκBα、p-IκBα与NF-κB p65、p-NF-κB p65蛋白的表达上升，提示OE-COE可致HL-60细胞NF-κB信号通路活化。但DNA损伤诱导NF-κB通路活化的机制还需要进一步研究。

综上所述，本次研究通过使用OE-COE染毒HL-60细胞建立细胞模型，并采用4 d连续染毒，模拟机体连续暴露状态，结果提示NF-κB通路活化可能是OE-COE造成血液细胞DNA损伤的主要机制之一。但本研究仅在体外细胞模型中对COE颗粒相有机污染物的血液毒性进行了定量分析，后续将在大鼠等动物模型中进行OE-COE对骨髓造血功能影响的实验研究，确定PAHs等毒物的血液损害效应和相关机制。

参考文献

[1] GUAN W J，ZHENG X Y，ZHONG N S. Industrial pollutant emission and the major smog in China：from debates to action [J]. Lancet Planet Health，2017，1 (2)：e57.

[2] LI X，FENG Y，DENG H，et al. The dose-response decrease in heart rate variability：any association with the metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in coke oven workers? [J]. PLoS One，2012，7 (9)：e44562.

[3] 杨柳. 焦炉逸散物对焦化作业人员血常规影响的调查分析 [J]. 四川冶金，2014，36 (3)：80-82.

[4] 李霄，郑丹雪，高晨，等. 多环芳烃与苯对焦炉作业工人周围血血象和淋巴细胞DNA损伤影响 [J]. 中国职业医学，2015，42 (6)：607-614.

[5] XIA Y，SHEN S，VERMA I M. NF-κB，an active player in human cancers [J]. Cancer Immunol Res，2014，2 (9)：823-830.

[6] VIATOUR P，MERVILLE M P，BOURS V，et al. Phosphorylation of NF-κB and IκB proteins：implications in cancer and inflammation [J]. Trends Biochem Sci，2005，30 (1)：43-52.

[7] STORZ P，TOKER A. NF-κB signaling：an alternate pathway for oxidate stress responses [J]. Cell Cycle，2003，2 (1)：9-10.

[8] IMBERT V，RUPEC R A，LIVOLSI A，et al. Tyrosine phosphorylation of I κB-α activates NF-κB without proteolytic degradation

of I κB-α [J]. Cell，1996，86 (5)：787-798.

[9] CHRISTIAN F，SMITH E L，CARMODY R J. The regulation of NF-κB subunits by phosphorylation [J]. Cells，2016，5 (1)：12.

[10] IMBERT V，PEYRON J F. NF-κB in hematological malignancies [J]. Biomedicines，2017，5 (2)：27.

[11] ROZOVSKI U，HARRIS D M，LI P，et al. Activation of the B-cell receptor successively activates NF-κB and STAT3 in chronic lymphocytic leukemia cells [J]. Int J Cancer，2017，141 (10)：2076-2081.

[12] 马俊香，段化伟，黄传峰，等. 焦炉逸散物诱导人支气管上皮细胞 O^6- 甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶基因高甲基化 [J]. 中华预防医学杂志，2011，45 (5)：399-403.

[13] ZHAI Q，DUAN H，WANG Y，et al. Genetic damage induced by organic extract of coke oven emissions on human bronchial epithelial cells [J]. Toxicol *in Vitro*，2012，26 (5)：752-758.

[14] 解秋艳，赵红伟，鱼涛，等. 焦炉炉顶作业区逸散颗粒物粒径分布特征分析 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志，2015，33 (3)：161-165.

[15] COLLINS S J. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line：proliferation，differentiation，and cellular oncogene expression [J]. Blood，1987，70 (5)：1233-1244.

[16] GALLAGHER R，COLLINS S，TRUJILLO J，et al. Characterization of the continuous，differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia [J]. Blood，1979，54 (3)：713-733.

[17] HEDLI C C，RAO N R，REUHL K R，et al. Effects of benzene metabolite treatment on granulocytic differentiation and DNA adduct formation in HL-60 cells [J]. Arch Toxicol，1996，70 (3/4)：135-144.

[18] HO T Y，WITZ G. Increased gene expression in human promyeloid leukemia cells exposed to trans，trans-muconaldehyde，a hematotoxic benzene metabolite [J]. Carcinogenesis，1997，18 (4)：739-744.

[19] SUN S，ZHANG C，GAO J，et al. Benzoquinone induces ROS-dependent mitochondria-mediated apoptosis in HL-60 cells [J]. Toxicol Ind Health，2018，34 (4)：270-281.

[20] NISHIKAWA T，MIYAHARA E，HORIUCHI M，et al. Benzene metabolite 1，2，4-benzenetriol induces halogenated DNA and tyrosines representing halogenative stress in the HL-60 human myeloid cell line [J]. Environ Health Perspect，2012，120 (1)：62-67.

[21] LORD C J，ASHWORTH A. The DNA damage response and cancer therapy [J]. Nature，2012，481 (7381)：287-294.

[22] XIN L，WANG J，GUO S，et al. Organic extracts of coke oven emissions can induce genetic damage in metabolically competent HepG2 cells [J]. Environ Toxicol Pharmacol，2014，37 (3)：946-953.

[23] 冷曙光，郑玉新，牛勇，等. 焦炉作业工人多环芳烃暴露与外周血淋巴细胞 DNA 损伤的关系 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志，2004，22 (4)：250-253.

[24] XU R X，LIU R Y，WU C M，et al. DNA damage-induced NF-κB activation in human glioblastoma cells promotes miR-181b expression and cell proliferation [J]. Cell Physiol Biochem，2015，35 (3)：913-925.

[25] WANG W，MANI A M，WU Z H. DNA damage-induced nuclear factor-kappa B activation and its roles in cancer progression [J]. J Cancer Metastasis Treat，2017，3 (3)：45-59.

[26] HUANG T T，WUERZBERGER-DAVIS S M，SEUFZER B J，et al. NF-κB activation by camptothecin：a linkage between nuclear DNA damage and cytoplasmic signaling events [J]. J Biol Chem，2000，275 (13)：9501-9509.

（英文编辑：汪源；编辑：汪源；校对：童玲）