

# PM<sub>2.5</sub>气室注射染毒对鸡胚肝脏发育的毒性效应

石李梅<sup>1</sup>, 陈飞龙<sup>1</sup>, 张超<sup>1</sup>, 赵恩慧<sup>1</sup>, 马媛媛<sup>1</sup>, 李道传<sup>2</sup>, 姜启晓<sup>1</sup>, 郑玉新<sup>1</sup>, 崔莲花<sup>1</sup>

1. 青岛大学公共卫生学院, 山东 青岛 266000  
2. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510000

## 摘要:

**[背景]** 大气细颗粒物 (PM<sub>2.5</sub>) 暴露对胚胎发育的影响及其毒性效应备受关注, 其对肝脏发育毒性的机制研究尚不明确。

**[目的]** 探讨鸡胚暴露于不同剂量 PM<sub>2.5</sub> 对鸡胚肝脏发育的影响及潜在作用机制。

**[方法]** 将 60 只受精鸡蛋按照质量随机分为 4 组: 空白对照组 (0 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub>) 和 0.2、0.5、2.0 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> 染毒组。通过气室注射染毒建立鸡胚染毒模型, 随后放入孵化箱孵化 21 d, 幼鸡孵出后称重记录, 计算肝指数。断头处死后采用 HE 染色法观察孵化幼鸡的肝脏组织病理学变化, 采用全自动生化分析仪对孵化幼鸡的血清肝功能进行检测, 采用免疫组化法和 Western blotting 测定肝组织内核因子-κB (NF-κB) p65 与诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的蛋白表达情况。

**[结果]** HE 染色结果显示: 0.5 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> 暴露后, 孵化幼鸡的肝细胞排列紊乱, 出现少量炎症细胞浸润和轻微脂肪样变; 2.0 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> 暴露后, 肝小叶结构破坏严重, 出现大量炎症细胞浸润和肝细胞脂肪变性。肝功能血清学指标结果显示: 0.5、2.0 mg·kg<sup>-1</sup> 组谷丙转氨酶 (ALT) 活性, 0.2、0.5、2.0 mg·kg<sup>-1</sup> 组谷草转氨酶 (AST) 活性均较对照组升高 (均  $P < 0.05$ )。随着 PM<sub>2.5</sub> 剂量的增加, ALT 和 AST 活性相应升高 ( $r = 0.731$ 、 $0.720$ ,  $P < 0.05$ )。免疫组化结果显示: 0.5、2.0 mg·kg<sup>-1</sup> 组中的 NF-κB p65 表达量高于对照组和 0.2 mg·kg<sup>-1</sup> 组 ( $P < 0.05$ ); 2.0 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> 组 NF-κB p65 蛋白表达量高于 0.5 mg·kg<sup>-1</sup> 组 ( $P < 0.05$ )。Western blotting 检测结果显示: 0.5、2.0 mg·kg<sup>-1</sup> 组 iNOS 蛋白表达量较对照组升高 ( $P < 0.05$ )。

**[结论]** PM<sub>2.5</sub> 暴露可引起孵化幼鸡的肝脏脂肪样变和炎症损伤。随着 PM<sub>2.5</sub> 浓度的增加, NF-κB p65 和 iNOS 的蛋白表达也相应增加, 炎症反应可能为 PM<sub>2.5</sub> 暴露导致鸡胚肝脏发育毒性的机制之一。

**关键词:** PM<sub>2.5</sub>; 气室注射; 发育毒性; 肝脏损伤; 炎症反应

**Toxic effects of PM<sub>2.5</sub> injection in air chamber on development of chicken embryo liver** SHI Li-mei<sup>1</sup>, CHEN Fei-long<sup>1</sup>, ZHANG Chao<sup>1</sup>, ZHAO En-hui<sup>1</sup>, MA Yuan-yuan<sup>1</sup>, LI Dao-chuan<sup>2</sup>, JIANG Qi-xiao<sup>1</sup>, ZHENG Yu-xin<sup>1</sup>, CUI Lian-hua<sup>1</sup> (1.School of Public Health, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266000, China; 2.School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

## Abstract:

**[Background]** The impact of fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) exposure on embryonic development and its toxic effects have attracted much attention. The mechanism of PM<sub>2.5</sub> to liver development is not clear.

**[Objective]** This study is designed to investigate the toxic effects of different doses of PM<sub>2.5</sub> on the development of chicken embryo liver and the potential mechanism.

**[Methods]** Sixty fertilized eggs were randomly divided into four groups: blank control group (0 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub>) and 0.2, 0.5, and 2 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> groups with egg weight balanced. A chicken embryo exposure model was established by injecting different doses of PM<sub>2.5</sub> into the air chamber, and then moving the eggs into the incubator for 21 d. After hatching, the chicks were weighed, calculated for liver index, and measured for selected biochemical indicators of liver function. HE staining was prepared for observing pathological changes of liver samples. Immunohistochemistry and Western blotting were used to detect the expressions of nuclear factor-κB (NF-κB) p65 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in liver tissues.

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19738

## 基金项目

国家自然科学基金 (81872591); 国家自然科学基金重大研究计划重点支持项目 (91643203); 青岛大学大学生创新创业训练 (国家级创新训练项目) (201811065074); 青岛大学创新型教学实验室研究项目 (无编号)

## 作者简介

石李梅 (1993—), 女, 硕士生;  
E-mail: shilm1121@qq.com

## 通信作者

崔莲花, E-mail: qdlhcui@163.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-10-30

录用日期 2020-02-04

文章编号 2095-9982(2020)05-0440-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

## ► 引用

石李梅, 陈飞龙, 张超, 等. PM<sub>2.5</sub> 气室注射染毒对鸡胚肝脏发育的毒性效应 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (5): 440-446.

## ► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19738

## Funding

This study was funded.

## Correspondence to

CUI Lian-hua, E-mail: qdlhcui@163.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2019-10-30

Accepted 2020-02-04

## ► To cite

SHI Li-mei, CHEN Fei-long, ZHANG Chao, et al. Toxic effects of PM<sub>2.5</sub> injection in air chamber on development of chicken embryo liver[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(5): 440-446.

## ► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19738

**[Results]** The hatched chickens' liver samples with HE staining showed that the 0.5 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> exposure led to disordered hepatocytes, with a small amount of inflammatory cell infiltration and slight fatty changes; the 2.0 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> exposure resulted in severely damaged hepatic lobular structure, with a lot of inflammatory infiltration and hepatic cell steatosis. Regarding the biochemical indicators of liver function, compared with the control group, the activity of alanine aminotransferase (ALT) was increased in the 0.5 or 2.0 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> group ( $P < 0.05$ ), and the activity of aspartate aminotransferase (AST) was elevated in the 0.2, 0.5, or 2.0 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> group ( $P < 0.05$ ). The increase of PM<sub>2.5</sub> concentration was correlated with higher activities of ALT and AST ( $r = 0.731$  and  $0.720$ ,  $P < 0.05$ ). The immunohistochemistry results showed that the expression levels of NF- $\kappa$ B p65 in the 0.5 and 2.0 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> groups were significantly higher than those in the control group and the 0.2 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> group ( $P < 0.05$ ); and the expression level in the 2.0 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> group was higher than that in the 0.5 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> group ( $P < 0.05$ ). The Western blotting results showed that compared with the control group, the expression levels of iNOS protein in the 0.5 and 2.0 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> groups were increased ( $P < 0.05$ ).

**[Conclusion]** Chicken eggs exposed to PM<sub>2.5</sub> could cause liver steatosis and inflammatory injury in hatched chickens. The protein expression levels of NF- $\kappa$ B p65 and iNOS are increased with higher PM<sub>2.5</sub> doses, suggesting that inflammatory response may be one of the mechanisms of PM<sub>2.5</sub> induced developmental toxicity to chicken embryo liver.

**Keywords:** PM<sub>2.5</sub>; air chamber injection; developmental toxicity; liver injury; inflammatory response

大气细颗粒物 (fine particulate matter, PM<sub>2.5</sub>) 是指空气动力学当量直径  $\leq 2.5 \mu\text{m}$  的颗粒物, 其粒径小, 成分较为复杂, 主要包括水溶性离子、有机物和无机元素等<sup>[1]</sup>。大量研究表明, PM<sub>2.5</sub> 由肺泡毛细血管进入机体, 从而导致人体的内分泌、心血管、神经、消化及免疫等各个系统疾病的发生和发展<sup>[2-6]</sup>。动物实验研究表明, 随着孕期 PM<sub>2.5</sub> 暴露的增加, 孕鼠体重增加变缓, 主要脏器发生了病理改变<sup>[7]</sup>。

肝脏作为解毒器官, 对许多来自体内外的物质进行生物转化, 当侵入机体的有毒有害物质浓度过高, 超过肝脏的代偿限度时, 可能会对肝脏的结构和功能产生损害。流行病学调查结果表明, PM<sub>2.5</sub> 与非酒精性脂肪肝病风险呈正相关<sup>[8-9]</sup>。实验动物暴露于 PM<sub>2.5</sub> 后, 肝细胞内脂质和氧自由基含量增多, 肝细胞炎症因子表达上调, 从而发生肝纤维化, 并损害肝脏糖代谢<sup>[10-12]</sup>。PM<sub>2.5</sub> 对斑马鱼的肝脏发育毒性具有一定的诱导作用, 与肝脏代谢相关的基因 (*cyp1a*、*CYP1B1*、*cyp1c1*) 均发生了明显的上调<sup>[13]</sup>。此外, 发育期的小鼠暴露于 PM<sub>2.5</sub> 后, 小鼠的肝脏质量明显减轻, 小鼠肝脏组织的炎症因子表达上调<sup>[14]</sup>。然而, 关于 PM<sub>2.5</sub> 对肝脏发育毒性的机制尚不明确。

目前, 关于 PM<sub>2.5</sub> 暴露致胚胎发育毒性研究的动物模型主要有小鼠模型<sup>[15]</sup> 和斑马鱼模型<sup>[16]</sup>。鸡胚被用作发育模型已有 200 多年历史<sup>[17]</sup>, 其各阶段的形态和功能均被详细研究过, 因此很容易发现其形态功能上的改变; 并且鸡胚是一个相对独立且封闭的环境, 可以避免母体在实验过程中对胚胎的干扰, 易于精确控制染毒剂量。气室注射染毒属于成熟的实验方法, Jiang 等<sup>[18]</sup> 自 2012 年开始采用鸡胚气室注射染毒模型进行发育毒性研究来评估鸟类心脏发育过程中形态

和功能变化, 模型可靠。但是, 用鸡胚气室注射染毒模型作为实验对象进行 PM<sub>2.5</sub> 胚胎发育毒性研究较少。本研究采用 PM<sub>2.5</sub> 气室注射建立鸡胚染毒模型, 分析 PM<sub>2.5</sub> 对鸡胚肝脏发育的毒性效应, 不仅提供了一种新的 PM<sub>2.5</sub> 研究方法, 也可为 PM<sub>2.5</sub> 暴露对子代肝脏发育毒性的深入研究提供一定依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

受精鸡蛋 60 只 (山东济宁林文商贸有限公司), 食用葵花籽油 (山东济南永信食品饮料有限公司), 无水乙醇和二甲苯 (上海国药集团化学试剂有限公司), 放射免疫沉淀法裂解液和苯甲基磺酰氟 (碧云天生物技术有限公司), 二喹啉甲酸 (bicin chonic acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒及增强型二氨基联苯胺 (3, 3'-diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒 (上海索莱宝生物科技有限公司), 苏木精-伊红染色 (hematoxylin and eosin staining, HE 染色) 试剂盒 (碧云天生物技术有限公司), 兔 SP 试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司), 聚丙烯酰胺凝胶制备试剂盒 (10%) (上海雅酶生物科技有限公司), 核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) p65 抗体 (英国 Abcam), 诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司), Omni-ECL<sup>TM</sup> 超灵敏化学发光检测试剂盒 (上海雅酶生物技术有限公司)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 PM<sub>2.5</sub> 来源** 在 2016 年 11 月—2017 年 10 月, 于

北京市区使用高容量空气采样器(美国 Thermo Fisher Scientific™)在聚四氟乙烯过滤器上以  $1.05 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$  的流速采集 24 h  $\text{PM}_{2.5}$  样品。 $\text{PM}_{2.5}$  样品在甲醇中超声提取 1 h, 在去离子水中提取 2 次, 样本通过多次过滤, 去除碎片和粗颗粒。 $\text{PM}_{2.5}$  样品的组分、处理方式详见参考文献 [19]。

**1.2.2 实验试剂配置** Jiang 等 [18] 的实验研究表明, 采用食用葵花籽油作为对照油溶剂进行气室注射, 与未注射油溶剂的鸡胚同时连续孵化 21 d 后, 食用葵花籽油并未对鸡胚的器官发育产生影响。在电子天平上称取  $\text{PM}_{2.5}$  样品 0.002 g, 加入溶剂葵花籽油 0.1 mL, 制得  $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )  $\text{PM}_{2.5}$  溶液。用同样的方法配制  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 和  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )  $\text{PM}_{2.5}$  溶液。

**1.2.3 实验分组及染毒**  $\text{PM}_{2.5}$  对禽类的研究尚无报道。2015 年采暖季北京地区  $\text{PM}_{2.5}$  个体暴露水平中位数在  $47.71 \sim 62.11 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$  [20]; 2005—2016 年中国各地  $\text{PM}_{2.5}$  平均暴露水平为  $60.64 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$  [21]; 结合  $\text{PM}_{2.5}$  对啮齿类动物发育毒性的研究 [22] 以及 2016 年泰安市 6 个养鸡场鸡舍内  $\text{PM}_{2.5}$  质量浓度在  $114 \sim 230 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$  之间 [23], 本实验的  $\text{PM}_{2.5}$  剂量设置参考上述研究而设定。简单而言, 以中国 2005—2016 年平均暴露水平  $60 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$  为准, 本次实验颗粒物染毒的最大剂量  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (鸡蛋平均质量为 50 g, 颗粒物质量约为 0.1 mg) 大约相当于  $1.667 \text{ m}^3$  空气所含颗粒物重量, 即成年鸡呼吸 1 d 左右的暴露量 (芦花鸡通气量为  $337 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ), 低于啮齿类研究通常所采用的剂量 [22]。将 60 只受精鸡蛋进行称重、编号后, 根据蛋重将鸡蛋随机分成 4 组, 分别为对照组 (油溶剂)、 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  组、 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  组、 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  组。在发育第 0 天, 使用 20% 碘伏溶液清洗鸡蛋后用纸巾小心蘸干, 然后在暗室使用集束光源照蛋, 找出气室, 并用铅笔标出。用 75% 乙醇消毒后, 用探针在铅笔标出的气室轮廓中央钻孔, 进行气室注射, 注射方法详见文献 [24], 注射量为每 10 g 蛋重注射  $1 \mu\text{L}$  油溶剂, 用液态石蜡封口放入孵化箱, 孵化 21 d。鸡胚发育模型是一种常规模型, 而鸡胚气室注射染毒模型在目前还没有广泛应用, 由于本次研究为第一次使用  $\text{PM}_{2.5}$  油溶剂进行气室注射, 是一次探究性实验, 还没有建模成功的标准, 需在鸡胚孵化过程中以及幼鸡孵化后进一步观察是否建模成功。本研究合理使用动物进行研究, 所有动物实验均经过青岛大学动物伦理委员会批准。

**1.2.4 孵化后处理** 幼鸡孵化后, 在 24 h 内称重并记录, 腹腔注射  $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的戊巴比妥钠 ( $33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 溶液进行麻醉。对幼鸡进行断头处死取血, 离心  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 5 min, 留取血清; 取卵黄、肝脏称重并记录, 摘取左叶用 4% 甲醛固定液固定, 右叶  $-80^\circ\text{C}$  冻存。

**1.2.5 肝功能检测** 采用 CS-600B 全自动生化分析仪 (中国迪瑞医疗) 检测幼鸡肝功能血清学指标谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、白蛋白 (albumin, Alb) 和血清总胆红素 (total bilirubin, TBil)。

**1.2.6 肝组织病理切片制备及 HE 染色** 4% 甲醛固定液固定 24 h 后, 将肝组织修剪成  $1.0 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$  大小, 放入包埋盒, 流水冲洗、梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋, 冷却凝结成块状后, 切成厚度为  $0.6 \mu\text{m}$  的切片 [21]。按照 HE 染色试剂盒说明书步骤处理切片。在镜下观察肝组织切片, 并分析肝组织的形态学变化。

**1.2.7 免疫组化** 按照免疫组化试剂盒说明书中步骤对幼鸡肝组织石蜡切片进行处理, DAB 显色液显色和苏木素染液复染、冲洗, 梯度乙醇脱水至二甲苯透明, 树脂封片并晾干镜检。

**1.2.8 蛋白质免疫印迹实验 (Western blotting)** 提取幼鸡肝组织蛋白, 采用 BCA 法进行蛋白浓度测定, 采用聚丙烯酰胺凝胶制备试剂盒 (10%) 进行制胶, 然后进行电泳和转膜。5% 奶粉封闭后, 依次进行一抗、二抗的孵育。对聚偏二氟乙烯膜进行曝光、显影后, 用 Image J 软件对条带进行半定量分析。

### 1.3 统计学方法

应用 SPSS 21.0 统计软件, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验方法。计数资料采用卡方分析。剂量-效应分析采用 Spearman 等级相关分析。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 孵化幼鸡的一般资料

$\text{PM}_{2.5}$  不同剂量组孵化幼鸡的孵化率与总体生存率如表 1 所示。与对照组 ( $0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组) 相比, 各  $\text{PM}_{2.5}$  剂量组幼鸡的孵化率和总体生存率差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

### 2.2 孵化幼鸡的肝指数

$\text{PM}_{2.5}$  不同剂量组孵化幼鸡的肝指数如图 1 所示。与对照组 ( $0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组) 相比,  $\text{PM}_{2.5}$  不同剂量组孵化幼鸡的肝指数差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

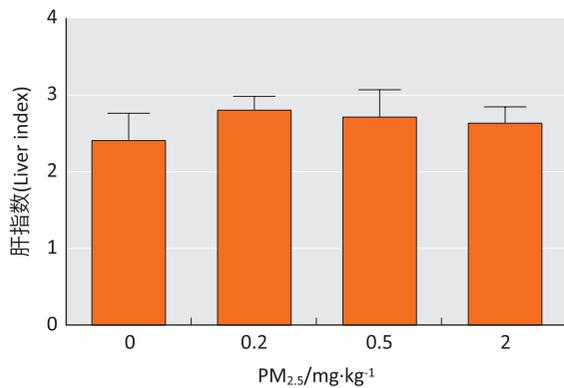
表 1 各 PM<sub>2.5</sub> 组鸡胚孵育的一般参数

Table 1 General parameters of chicken embryo hatching in different PM<sub>2.5</sub> groups

PM <sub>2.5</sub> 浓度 /mg·kg <sup>-1</sup> PM <sub>2.5</sub> concentration	孵化率 /% Hatchability	总体生存率 /% Overall survival rate
0	0.78	0.60
0.2	0.90	0.67
0.5	0.60	0.20
2	0.80	0.27

[注] 孵化率 = 成功孵化数 / 19 d 时活胚数；总体生存率 = 成功孵化数 / 总蛋数。

[Note] Hatchability = the number of successful hatching / the number of live embryos after 19 d; overall survival rate = the number of successful hatching / total number of eggs.



[注] 净体重 = 幼鸡重 - 卵黄重；肝指数 = 肝脏质量 / 净体重。

[Note] Net body weight = body weight - yolk weight; liver index = liver weight / net body weight.

图 1 胚胎期 PM<sub>2.5</sub> 暴露后孵化幼鸡的肝指数 (n=4)

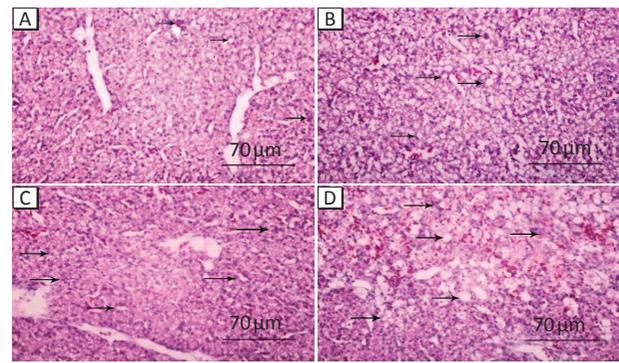
Figure 1 Liver index of hatched chickens after embryonic PM<sub>2.5</sub> exposure (n=4)

### 2.3 孵化幼鸡的肝脏病理学观察

孵化幼鸡肝脏 HE 染色的结果如图 2 所示。对照组肝小叶结构完整，肝细胞排列整齐。0.5 mg·kg<sup>-1</sup> 组肝细胞排列紊乱，出现少量炎症细胞浸润和轻微脂肪样变；2 mg·kg<sup>-1</sup> 组肝小叶结构破坏严重，出现大量炎症细胞浸润和肝细胞脂肪变性。各组分别对 3 个独立样品进行检验，发现每个样品中均存在相应改变，反应相对均一，而 0.2 mg·kg<sup>-1</sup> 组变化不大。

### 2.4 孵化幼鸡的肝功能

孵化幼鸡血清肝功能检测结果如表 2 所示。与对照组 (0 mg·kg<sup>-1</sup> 组) 相比，0.5 mg·kg<sup>-1</sup> 组和 2 mg·kg<sup>-1</sup> 组血清中 ALT 活性升高，0.2 mg·kg<sup>-1</sup> 组、0.5 mg·kg<sup>-1</sup> 组、2 mg·kg<sup>-1</sup> 组血清中 AST 活性升高 (P<0.05)。两两比较结果表明，3 个剂量组间差异无统计学意义 (P>0.05)。如表 3 所示，Spearman 等级相关分析发现随着 PM<sub>2.5</sub> 剂量的增加，ALT 和 AST 活性相应升高 (r=0.731、0.720, P<0.05)。



[注] A : 对照组；B : 0.2 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> 组；C : 0.5 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> 组；D : 2 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> 组。箭头指示处为炎症细胞浸润以及脂肪样变。

[Note] A: Control group; B: 0.2 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> group; C: 0.5 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> group; D: 2 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> group. The arrows indicate inflammatory cell infiltration and lipid degeneration.

图 2 胚胎期 PM<sub>2.5</sub> 暴露后孵化幼鸡肝组织病理学表现 (HE 染色)

Figure 2 Liver histopathological presentation of hatched chickens after embryonic PM<sub>2.5</sub> exposure (HE staining)

表 2 胚胎期 PM<sub>2.5</sub> 暴露后孵化幼鸡的血清肝功能检测结果 (x̄±s, n=4)

Table 2 Serum liver function indicators of hatched chickens after embryonic PM<sub>2.5</sub> exposure (x̄±s, n=4)

PM <sub>2.5</sub> 浓度 /mg·kg <sup>-1</sup> PM <sub>2.5</sub> concentration	ALT /U·L <sup>-1</sup>	AST /U·L <sup>-1</sup>	Alb /g·L <sup>-1</sup>	TBil /μmol·L <sup>-1</sup>
0	2.67±0.52	157.60±11.19	6.58±1.10	66.50±19.99
0.2	3.00±0.00	202.40±12.86*	6.58±1.11	71.55±22.52
0.5	4.00±1.73*	223.17±42.15*	6.58±1.22	85.53±17.35
2	4.40±1.14*	228.00±24.00*	6.76±0.79	76.38±27.59

[注] \* : 与对照组相比, P<0.05。

[Note] \*: Compared with the control group, P<0.05.

表 3 PM<sub>2.5</sub> 剂量与孵化幼鸡血清肝功能的相关性 (r)

Table 3 Correlation between PM<sub>2.5</sub> concentration and serum liver function indicators of hatched chickens (r)

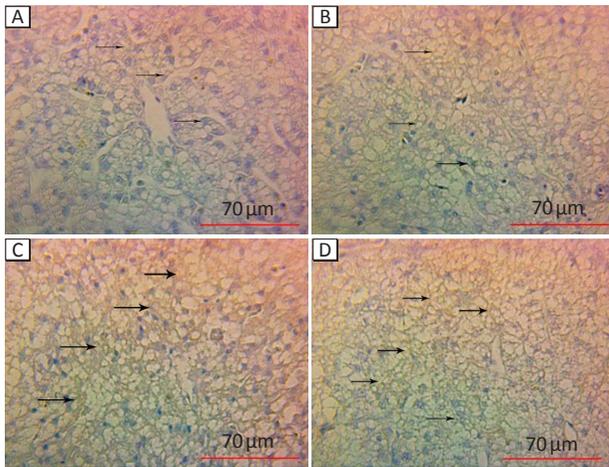
指标 (Index)	PM <sub>2.5</sub>	AST	ALT
PM <sub>2.5</sub>	1.000		
AST	0.731*	1.000	
ALT	0.720*	0.634*	1.000

[注 (Note)] \* : P<0.05。

### 2.5 孵化幼鸡的肝组织免疫组化结果

各组孵化幼鸡免疫组化结果如图 3 所示。对照组 (0 mg·kg<sup>-1</sup> 组) 肝小叶结构完整，肝细胞排列正常，颜色无明显变化。但随着 PM<sub>2.5</sub> 暴露剂量的增加，肝组织中出现棕褐色染色沉积。对免疫组化结果进行量化分析的结果如图 4 所示，随着 PM<sub>2.5</sub> 暴露剂量的增加，NF-κB p65 蛋白表达增高，0.5 mg·kg<sup>-1</sup> 组和 2 mg·kg<sup>-1</sup> 组孵化幼鸡肝组织中的 NF-κB p65 蛋白表达量高于对照组和 0.2 mg·kg<sup>-1</sup> 组 (P<0.05)；2 mg·kg<sup>-1</sup> 组孵化幼鸡肝

组织中的NF- $\kappa$ B p65蛋白表达量高于0.5 mg·kg<sup>-1</sup>组 ( $P < 0.05$ )。

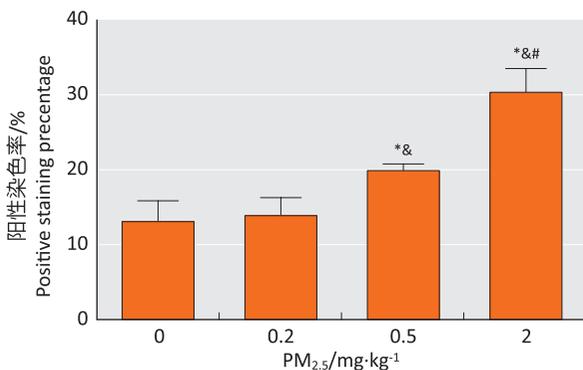


[注] A: 对照组; B: 0.2 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub>组; C: 0.5 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub>组; D: 2 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub>组。箭头指示处为NF- $\kappa$ B p65阳性染色区。

[Note] A: Control group; B: 0.2 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> group; C: 0.5 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> group; D: 2 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> group. The arrows indicate the positive staining areas of NF- $\kappa$ B p65.

图3 胚胎期PM<sub>2.5</sub>暴露后孵化幼鸡肝组织免疫组化结果

Figure 3 Immunohistochemistry results for NF- $\kappa$ B p65 in liver tissues of hatched chickens after embryonic PM<sub>2.5</sub> exposure



[注] \*: 与对照组相比,  $P < 0.05$ ; & : 与0.2 mg·kg<sup>-1</sup>组相比,  $P < 0.05$ ; #: 与0.5 mg·kg<sup>-1</sup>组相比,  $P < 0.05$ 。

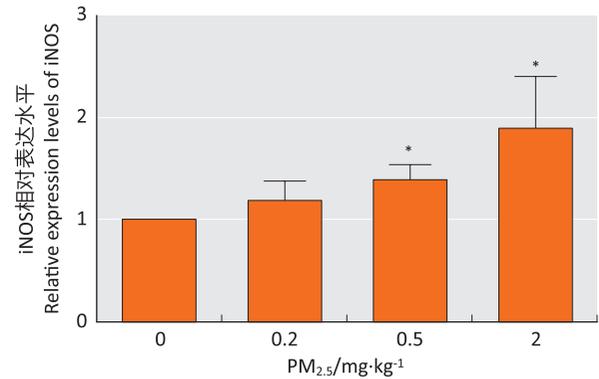
[Note] \*: Compared with the control group,  $P < 0.05$ ; &: Compared with the 0.2 mg·kg<sup>-1</sup> group,  $P < 0.05$ ; #: Compared with the 0.5 mg·kg<sup>-1</sup> group,  $P < 0.05$ .

图4 胚胎期PM<sub>2.5</sub>暴露后孵化幼鸡肝组织NF- $\kappa$ B p65免疫组化量化分析 ( $n=3$ )

Figure 4 Quantitative immunohistochemistry analysis for NF- $\kappa$ B p65 in liver tissues of hatched chickens after embryonic PM<sub>2.5</sub> exposure ( $n=3$ )

## 2.6 孵化幼鸡的肝组织iNOS蛋白表达结果

Western blotting 检测结果显示0.5 mg·kg<sup>-1</sup>组和2 mg·kg<sup>-1</sup>组iNOS表达水平高于对照组(0 mg·kg<sup>-1</sup>组) ( $P < 0.05$ ), 3个剂量组间两两比较结果差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图5。



[注] \*: 与对照组相比,  $P < 0.05$ 。

[Note] \*: Compared with the control group,  $P < 0.05$ .

图5 胚胎期PM<sub>2.5</sub>暴露后孵化幼鸡肝组织中iNOS表达的Western blotting 检验结果 ( $n=4$ )

Figure 5 Western blotting results for iNOS in liver tissues of hatched chickens after embryonic PM<sub>2.5</sub> exposure ( $n=4$ )

## 3 讨论

研究表明, PM<sub>2.5</sub>可通过呼吸系统进入血液循环, 经胎盘直接影响孕妇和胎儿<sup>[25]</sup>。胎儿期是生长发育的关键时期, 对外界有害物质的作用极为敏感, 妊娠期高浓度PM<sub>2.5</sub>暴露可以影响婴儿的生长发育, 对新生儿产生不良影响<sup>[26]</sup>。PM<sub>2.5</sub>能够引起细胞DNA损伤, 而生殖细胞的DNA损伤可遗传至子代<sup>[27]</sup>。因此, 研究PM<sub>2.5</sub>对胚胎发育的影响机制十分重要。目前PM<sub>2.5</sub>暴露致发育毒性的机制的研究多为小鼠模型和斑马鱼模型<sup>[28]</sup>, 而鸡胚发育模型是一个非常成熟的发育模型<sup>[17-18, 24]</sup>。本研究以鸡胚气室注射染毒为模型, 模拟PM<sub>2.5</sub>经胎盘进入胎儿的过程, 能较精准地控制实际染毒浓度, 而不会受到母体的影响, 直接且准确地反映PM<sub>2.5</sub>对胚胎肝脏发育的影响。通过对幼鸡肝脏进行形态学、组织学的研究, 结合炎症反应相关分子的表达情况, 本研究初步探索PM<sub>2.5</sub>对肝脏发育影响的潜在分子机制。各PM<sub>2.5</sub>组孵化幼鸡肝指数差异没有统计学意义, 说明该剂量下PM<sub>2.5</sub>未造成鸡胚肝脏质量的明显变化。通过对孵化幼鸡肝脏进行HE染色, 结果表明, 与对照组相比, 0.5 mg·kg<sup>-1</sup>组和2 mg·kg<sup>-1</sup>组的肝组织出现脂肪变性和炎症细胞浸润, 说明PM<sub>2.5</sub>对肝组织炎症反应的影响具有剂量依赖性, 提示PM<sub>2.5</sub>暴露对鸡胚具有发育毒性, 可导致幼鸡肝细胞发生炎症反应及脂肪样变。

AST、ALT、Alb和TBil是反映肝脏损伤的敏感指标<sup>[29-31]</sup>, 当肝脏发生明显损伤时, 血清AST和ALT活性升高, 导致肝功能低下<sup>[32]</sup>。孵化幼鸡血清肝功能分析结果表明, 与对照组相比, 0.5 mg·kg<sup>-1</sup>组和2 mg·kg<sup>-1</sup>

组的血清ALT和AST活性升高,提示幼鸡的肝细胞受损,可能与鸡胚PM<sub>2.5</sub>暴露后导致幼鸡肝脏发生炎症反应有关。此外,随着PM<sub>2.5</sub>染毒剂量的升高,血清AST和ALT活性增加,提示肝脏损伤程度与PM<sub>2.5</sub>暴露存在剂量-反应关系。

NF-κB是一类具有多向性转录调节作用的核蛋白因子,几乎存在于所有的动物细胞内<sup>[33]</sup>。NF-κB具有p60和p65 2个亚基,其中p65具有转录活性,p65的检测能够间接反映NF-κB信号通路的激活和表达<sup>[34]</sup>。研究表明,NF-κB对肝细胞具有双重调节:一方面,NF-κB可以抑制肝细胞凋亡,促进肝细胞再生;另一方面,NF-κB可以通过激活肝星状细胞、库普弗(kupffer)细胞以及肝脏内的巨噬细胞和中性粒细胞参与肝脏炎症反应<sup>[35]</sup>。本研究幼鸡肝脏的免疫组化结果表明,发育鸡胚暴露于PM<sub>2.5</sub>后,NF-κB p65蛋白表达上调,NF-κB信号通路被激活,从而引起机体产生一系列反应。

iNOS是一种重要的促炎介质,但在正常的生理情况下不表达或低表达,iNOS启动子和增强子就位于NF-κB所调控的区域内,NF-κB的活化在iNOS的表达调控中起重要作用<sup>[36]</sup>。当机体受到炎症、细胞因子、病毒等刺激时,iNOS的主要作用是催化精氨酸产生一氧化氮(nitric oxide, NO),NO是一种新型免疫分子和炎性介质,生化性质活跃,在炎症损伤中发挥重要作用。在炎症反应中,NO可直接介导细胞毒作用,抑制DNA限速酶的活性,影响DNA的合成;此外,NO对嘧啶和嘌呤碱基有脱氨基作用,可直接损伤DNA,导致细胞凋亡<sup>[37-38]</sup>。本研究中,孵化幼鸡肝脏免疫组化和Western blotting结果表明,PM<sub>2.5</sub>暴露后,幼鸡肝脏的NF-κB p65和iNOS的表达水平明显增高,可能与PM<sub>2.5</sub>暴露后,肝细胞内NF-κB p65被激活,iNOS表达上调,产生过量的NO,导致肝脏的炎症损伤密切相关。该结果在分子水平进一步阐明了发育鸡胚在PM<sub>2.5</sub>暴露后对孵化幼鸡肝脏的发育毒性。

综上,鸡胚暴露于PM<sub>2.5</sub>后可能会激活NF-κB p65,NF-κB p65蛋白表达上调,NF-κB p65活化后可介导iNOS,使iNOS的蛋白表达水平升高,提示PM<sub>2.5</sub>暴露可能会导致鸡胚肝脏发生炎症损伤。

## 参考文献

[1] 陈熙劼,张皓旻,顾万清,等.我国PM<sub>2.5</sub>主要成分及对人体健康危害研究进展[J].中华保健医学杂志,2019,21

(1):83-85.

- [2] 覃辉艳.大气污染颗粒物PM<sub>2.5</sub>诱导人支气管上皮细胞凋亡及其机制探讨[D].南宁:广西医科大学,2012.
- [3] 游燕,白志鹏.大气颗粒物暴露与健康效应研究进展[J].生态毒理学报,2012,7(2):123-132.
- [4] 常旭红,张钰,吴建茹,等.大气颗粒物暴露与人体心血管疾病急性效应关系研究的系统评价[J].东南大学学报(医学版),2012,31(1):1-8.
- [5] 薄以匀.德国细微颗粒物与人体健康研究方法进展[J].环境卫生学杂志,2011,1(6):36-40,46.
- [6] 邱勇,张志红.大气细颗粒物免疫毒性研究进展[J].环境与健康杂志,2011,28(12):1117-1120.
- [7] 赵会,谭金峰,刘德文,等.妊娠期大气细颗粒物暴露损伤孕鼠多种器官并抑制妊娠及胎儿发育[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2016,25(1):42-48.
- [8] XU MX, GE CX, QIN YT, et al. Prolonged PM<sub>2.5</sub> exposure elevates risk of oxidative stress-driven nonalcoholic fatty liver disease by triggering increase of dyslipidemia[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 130: 542-556.
- [9] CARVALHO DF, GUIMARÃES MT, RIBEIRO TS, et al. Prevalence of liver diseases as referred by people living in the Santos and São Vicente Estuary[J]. Environm Sci Pollut Res, 2015, 22(19):14579-14588.
- [10] DING S, YU L, AN B, et al. Combination effects of airborne particulate matter exposure and high-fat diet on hepatic fibrosis through regulating the ROS-endoplasmic reticulum stress-TGFβ/SMADs axis in mice[J]. Chemosphere, 2018, 199: 538-545.
- [11] 刘晓莉,宋宪强,孟紫强.PM<sub>2.5</sub>对大鼠肝、脾、肾组织的氧化损伤效应[J].环境与健康杂志,2005,22(5):326-328.
- [12] ZHENG Z, XU X, ZHANG X, et al. Exposure to ambient particulate matter induces a NASH-like phenotype and impairs hepatic glucose metabolism in an animal model[J]. J Hepatol, 2013, 58(1):148-154.
- [13] DUAN J, HU H, ZHANG Y, et al. Multi-organ toxicity induced by fine particulate matter PM<sub>2.5</sub> in zebrafish (*Danio rerio*) model[J]. Chemosphere, 2017, 180: 24-32.
- [14] 苏瑞军,晋小婷,安全,等.太原市冬季大气PM<sub>2.5</sub>暴露对小鼠脏器及炎症因子的影响研究[J].环境与健康杂志,2015,32(8):677-679.
- [15] BOLTON JL, HUFF NC, SMITH SH, et al. Maternal stress and effects of prenatal air pollution on offspring mental health

- outcomes in mice [J]. *Environ Health Perspect*, 2013, 121 (9) : 1075-1082.
- [16] 乐聪. 大气 PM<sub>2.5</sub>对斑马鱼胚胎的心脏发育毒性及叶酸的保护机制 [D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- [17] VERGARA MN, CANTO-SOLER MV. Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development [J]. *Neural Dev*, 2012, 7 : 22.
- [18] JIANG Q, LUST RM, STRYNAR MJ, et al. Perfluorooctanoic acid induces developmental cardiotoxicity in chicken embryos and hatchlings [J]. *Toxicology*, 2012, 293 (1/2/3) : 97-106.
- [19] CHEN S, LI D, ZHANG H, et al. The development of a cell-based model for the assessment of carcinogenic potential upon long-term PM<sub>2.5</sub> exposure [J]. *Environ Int*, 2019, 131 : 104943.
- [20] 张潇尹, 闫伟奇, 曹军. 北京地区 PM<sub>2.5</sub>个体暴露水平模拟 [J]. *环境与健康杂志*, 2015, 32 (6) : 471-476.
- [21] HE M Z, ZENG X, ZHANG K, et al. Fine particulate matter concentrations in urban Chinese cities, 2005-2016 : a systematic review [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14 (2) : 191.
- [22] WANG Z, GAO S, XIE J, et al. Identification of multiple dysregulated metabolic pathways by GC-MS-based profiling of lung tissue in mice with PM<sub>2.5</sub>-induced asthma [J]. *Chemosphere*, 2019, 220 : 1-10.
- [23] 杨文浩. 鸡舍环境气载微生物和 PM<sub>2.5</sub>的检测及成分分析 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.
- [24] LV N, ZHAO M, HAN Y, et al. The roles of bone morphogenetic protein 2 in perfluorooctanoic acid induced developmental cardiotoxicity and L-carnitine mediated protection [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 352 : 68-76.
- [25] 巩艳, 李文燕, 郑昕蕊, 等. 妊娠期大气细颗粒物暴露对新生小鼠肝脏发育的影响 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2016, 25 (5) : 406-410.
- [26] SCHELL LM, DENHAM M, STARK AD, et al. Growth of infants' length, weight, head and arm circumferences in relation to low levels of blood lead measured serially [J]. *Am J Hum Biol*, 2009, 21 (2) : 180-187.
- [27] SAMET JM, DEMARINI DM, MALLING H V. Biomedicine. Do airborne particles induce heritable mutations? [J]. *Science*, 2004, 304 (5673) : 971-972.
- [28] 任云杰, 施焯闻, 王广鹤. 大气细颗粒物暴露致发育毒性研究进展 [J]. *上海交通大学学报 (医学版)*, 2019, 39 (5) : 550-556.
- [29] HAKKARAINEN A, PUUSTINEN L, KIVISAARI R, et al. Metabolic profile of liver damage in non-cirrhotic virus C and autoimmune hepatitis : A proton decoupled 31P-MRS study [J]. *Eur J Radiol*, 2017, 90 : 205-211.
- [30] 黄乐升, 雷秀霞, 龙幼敏, 等. RBP、HBV DNA 和 ALB 联合检测在监测慢性乙肝患者肝损害的应用意义 [J]. *临床医学工程*, 2014, 21 (8) : 965-966, 969.
- [31] 刘波, 张惠琴, 邹荣莉. 血清 DBIL, TBIL, DBIL/TBIL 检测在药物性肝损伤诊断中的应用 [J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32 (6) : 151-153, 159.
- [32] LI R, ZHANG M, WANG Y, et al. Effects of sub-chronic exposure to atmospheric PM<sub>2.5</sub> on fibrosis, inflammation, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the livers of rats [J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2018, 7 (2) : 271-282.
- [33] 赵婧. 新生儿窒息后血清诱导 HK-2 细胞凋亡的胞内信号传导机制研究 [D]. 泸州: 泸州医学院, 2008.
- [34] DUTTA J, FAN Y, GUPTA N, et al. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-κB [J]. *Oncogene*, 2006, 25 (51) : 6800-6816.
- [35] 周莉, 陈立艳, 马英骥, 等. 核因子 κB 亚基 65 及细胞色素 C 氧化酶 - II 在大鼠急性肝衰竭模型中的变化及意义 [J]. *传染病信息*, 2011, 24 (3) : 136-139, 155.
- [36] 金伯泉. 细胞和分子免疫学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2001 : 197-198.
- [37] ZOUKHRI D, HODGES RR, DARTT DA. Lacrimal gland innervation is not altered with the onset and progression of disease in a murine Model of Sjögren's syndrome [J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1998, 89 (2) : 126-133.
- [38] ZHONG J, COLICINO E, LIN X, et al. Cardiac autonomic dysfunction : particulate air pollution effects are modulated by epigenetic immunoregulation of *toll-like* receptor 2 and dietary flavonoid intake [J]. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4 (1) : e001423.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 王晓宇)