

核因子- κ B 信号通路在自来水有机提取物致 L02 细胞炎性损伤中的作用

岑延利, 杨光红, 桂晓玲, 张爱华, 蒋涓

摘要: [目的] 观察自来水有机提取物致正常人肝细胞株(L02细胞)炎性损伤中核因子- κ B(NF- κ B)信号通路的激活情况及其调控作用。[方法] 采用固相萃取法提取自来水中的有机污染物。将L02细胞分别暴露于培养液(空白对照)、0.1%二甲亚砜(溶剂对照)和0.3125、0.6250、1.2500、2.5000、5.0000 L/mL自来水有机提取物中24、48、72 h。采用免疫印迹方法观察NF- κ B信号通路的激活情况;并使用ELISA法测定细胞培养液上清中白介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平。[结果] (1) L02细胞染毒24、48、72 h,细胞活力在各剂量组均明显降低($P<0.05$)。(2) L02细胞染毒24、48、72 h, NF- κ B抑制蛋白的表达水平在0.6250 L/mL以上剂量组均明显降低($P<0.05$); p65蛋白表达水平在染毒24、48 h时点,仅在1.2500 L/mL以上剂量组明显升高($P<0.05$),而在72 h时点,0.6250 L/mL以上剂量组即明显升高($P<0.05$)。(3) L02细胞染毒24、48 h后,0.6250 L/mL以上处理组的IL-8水平均明显升高($P<0.05$);而染毒72 h,低剂量组(0.3125 L/mL)的IL-8水平即可升高明显($P<0.05$);染毒24 h,1.2500 L/mL以上处理组的TNF- α 水平明显升高($P<0.05$);而染毒48、72 h, TNF- α 水平在0.6250 L/mL以上处理组即升高明显($P<0.05$)。与24 h染毒组比较,48、72 h各染毒组的IL-8与TNF- α 水平均明显升高($P<0.05$)。(4) IL-8、TNF- α 水平与NF- κ B抑制蛋白表达水平均呈负相关关系($r=-0.8510$ 、 -0.8180 , $P<0.05$),与p65蛋白表达水平呈正相关关系($r=0.8160$ 、 0.8650 , $P<0.05$)。[结论] 自来水有机提取物可剂量-依赖性及时间-依赖性地激活NF- κ B信号通路,诱导IL-8及TNF- α 的分泌,此可能为其诱发L02细胞炎性损伤的重要原因之一。

关键词: 自来水;有机提取物;正常人肝细胞(L02细胞);核因子- κ B;白介素-8;肿瘤坏死因子- α

Role of Nuclear Factor- κ B Signaling Pathway in Inflammatory Injury in L02 Cells Exposed to Organic Extracts from Tap Water CEN Yan-li, YANG Guang-hong, GUI Xiao-ling, ZHANG Ai-hua, JIANG Juan (School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China). Address correspondence to YANG Guang-hong, E-mail: 280446859@qq.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To observe the activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway and its inflammatory-regulating effects in human normal liver cells (L02 cells) exposed to organic extracts from tap water. [Methods] Organic pollutants in tap water samples were extracted by solid phase extraction method. L02 cells were divided into seven groups: blank control group (culture medium), solvent control group (0.1% dimethyl sulfoxide, DMSO), and organic pollutant groups (0.3125, 0.6250, 1.2500, 2.5000, and 5.0000 L/mL). Each group was treated for 24 h, 48 h, and 72 h. Western blot was used to observe the activation of NF- κ B signaling pathway. ELISA assay was used to detect interleukin 8 (IL-8) and tumor necrosis factor α (TNF- α) levels in supernatant. [Results] (1) The activity of L02 cells decreased obviously after treated with all designed dosages of organic extracts and at all designed exposure time blocks ($P<0.05$). (2) The protein expression levels of inhibitor of NF- κ B decreased obviously after exposure to the dosages at organic extracts of 0.6250 L/mL and above for all designed time blocks ($P<0.05$). The protein expression levels of p65 were remarkably higher after administered with the 1.2500 L/mL organic extracts and above at 24 h and 48 h or with the 0.6250 L/mL and above at 72 h ($P<0.05$). (3) After 24 h- and 48 h-exposure, the IL-8 level of L02 cells increased significantly in the 0.6250 L/mL and above groups ($P<0.05$); while after 72 h-exposure, the IL-8 level significantly increased in 0.3125 L/mL group ($P<0.05$). After 24 h-exposure, the TNF- α level of L02 cells increased significantly in the 1.2500 L/mL and above groups ($P<0.05$); while after 48 h- and 72 h-exposure, the TNF- α level increased significantly in the 0.6250 L/mL and above groups ($P<0.05$). Compared with 24 h-exposure, the IL-8 and TNF- α levels in all exposed groups with 48 h- and 72 h-exposure significantly increased ($P<$

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.15603

[基金项目] 贵州省科技厅基金(编号:黔科合LH字[2014]7102);贵阳市科学技术计划项目(编号:筑科合同[2013103]19号)

[作者简介] 岑延利(1988—),女,硕士生;研究方向:职业毒理学;E-mail: 674265108@qq.com

[通信作者] 杨光红, E-mail: 280446859@qq.com

[作者单位] 贵州医科大学公共卫生学院, 贵州 贵阳 550025

0.05). (4) The IL-8 and TNF- α levels were negatively associated with the protein expression level of inhibitor of NF- κ B ($r=-0.8510$, -0.8180 , $P<0.05$), and positively associated with the protein expressions level of p65 ($r=0.8160$, 0.8650 , $P<0.05$). [Conclusion] The study findings suggest that organic pollutants from tap water could dose-dependently and time-dependently activate NF- κ B signaling pathway and induce secretion of IL-8 and TNF- α , which might result in inflammatory injury in L02 cells.

Key Words: tap water; organic extract; human normal liver cell (L02); nuclear factor κ B; interleukin 8; tumor necrosis factor α

炎症是机体的一种自我保护机制,是抵御外来病原体、促进伤口愈合的主要手段,表现为短适应性反应。当炎症反应不受控制,发展为慢性反应,即可导致包括癌症在内的多种疾病的发生。饮用水污染是严重的环境问题^[1],有机物作为饮用水污染物之一,其远期危害的存在使其备受重视。本课题组前期研究发现,自来水有机提取物可致正常人肝细胞(L02细胞)损伤,其机制与炎性调控失衡及细胞凋亡有关。目前,自来水有机提取物致肝细胞炎性调控失衡的机制,特别是炎症信号涉及的受体分子以及信号转导途径,至今仍未阐明。核因子- κ B(NF- κ B)作为炎症反应中一个主要的活化因子,其家族成员主要包括RelA(p65), RelB, c-Rel, NF κ B1(p50)和NF κ B2(p52),各成员可形成同型或异型二聚体而存在。当机体受到外环境因素刺激时,通过NF- κ B抑制蛋白(I κ B)激酶(I κ B kinase, IKK)依赖性途径活化I κ B,促使I κ B降解,导致p65解除束缚,随后进入细胞核,进行靶基因转录^[2],从而共同募集免疫细胞到炎症部位,调控炎症反应^[3-4]。

自来水有机提取物诱导炎性因子的产生可能与此有关,即通过激活IKK,活化I κ B,促使胞浆蛋白I κ B降解、p65进入细胞核,诱导白介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等靶基因的转录,刺激相应受体进一步活化NF- κ B,从而共同募集免疫细胞到炎症部位,调控炎症反应。本研究通过萃取自来水有机污染物,建立L02细胞染毒模型,观察有机污染物致肝细胞炎症反应及炎性损伤中NF- κ B的激活作用,从NF- κ B信号分子途径探讨其炎性分泌的调控机制,旨在为自来水有机提取物的肝细胞毒性机制的阐明提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

正常人肝细胞株(L02)来源于中科院昆明细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

XAD-2大孔树脂(20~60目, Sigma公司, 美国),

RE-3000旋转蒸发仪(上海亚英生化仪器有限公司, 中国), MTT细胞增殖检测试剂盒(北京Solarbio公司, 中国), TNF- α 、IL-8的ELISA检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司, 中国), 细胞核蛋白与浆蛋白抽提试剂盒、二喹啉甲酸蛋白测定试剂盒(上海碧云天公司, 中国), 兔抗人I κ B单克隆抗体、兔抗人p65单克隆抗体、组蛋白H3、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔多克隆抗体(武汉三鹰生物公司, 中国), 辣根酶标记山羊抗兔IgG(北京中杉金桥生物公司, 中国), Max200超级酶标仪(Bio-Tek, 美国), 电泳仪、转膜仪、凝胶成像分析系统(Bio-Rad, 美国)。

1.3 水样采集与处理

采集某地管网末梢水,采用固相萃取法^[5]富集水中有机污染物,萃取剂为XAD-2树脂,水样过柱流速为40 mL/min,过柱后依次使用二氯甲烷和甲醇洗柱,流速为1 mL/min,洗脱液经旋转蒸发仪25℃减压蒸馏挥干,浓缩提取物用二甲亚砜(DMSO)定容,-20℃冰箱保存备用。

1.4 细胞培养

人肝L02细胞置于37℃、体积分数为5%CO₂培养箱中培养,培养基采用含体积分数10%的DMEM培养基并加入终浓度分别为100 U/mL和100 μ g/mL的青霉素和链霉素。

1.5 细胞染毒

取对数生长期的细胞,移去培养瓶中的旧培养液,用PBS缓冲液漂洗2~3次,加入胰蛋白酶消化后,用新鲜培养液重悬接种于6孔细胞培养板,在37℃、体积分数为5%CO₂培养箱内贴壁培养24 h。根据参考文献[6]及预实验结果中的细胞抑制率,最高染毒剂量为5.000 0 L/mL,向下2倍设置4个染毒剂量组,分别为2.500 0、1.250 0、0.625 0、0.312 5 L/mL。另设溶剂对照组(体积分数0.1%的DMSO)和空白对照组(培养液)。每孔加入染毒培养基2 mL,每组设3个复孔,处理时点为24、48和72 h。

1.6 MTT法检测细胞的增殖情况

取对数期生长细胞,消化,弃消化液后用新鲜

培养液重悬,细胞计数后接种于细胞培养板,置于37℃、体积分数为5%CO₂培养箱内贴壁培养24h。每孔加入染毒培养基100μL,每组设6个复孔,处理时点为24、48和72h。细胞染毒结束后小心吸掉上清,每孔中加入50μL MTT溶液(5mg/mL),继续培养4h。弃上清液,每孔加入150μL DMSO,室温下平板摇床上摇晃10min,测定光密度D₄₉₀值,并计算存活率,同时设置调零孔。细胞存活率=[(D_{实验组}-D_{调零孔})/(D_{对照组}-D_{调零孔})]×100%。重复实验3次。

1.7 IkB和p65的蛋白表达检测

细胞染毒结束后,用蛋白抽提试剂盒提取细胞浆蛋白和核蛋白,测定蛋白浓度。根据蛋白浓度,加入适量5×蛋白上样缓冲液,将样品蛋白浓度调节一致。95℃,煮沸5min,分装,-20℃保存备用。根据测定的蛋白质浓度计算确定20μg的等量上样蛋白样品后,采用Western blot方法检测样品IkB、p65、GAPDH和组蛋白H3的蛋白表达水平。采用质量分数10%十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭,加入一抗(1:2000稀释),于4℃过夜;加入对应二抗(1:2500稀释),室温孵育2h,电化学发光显影液显色。用Image Lab软件计算蛋白表达量。

1.8 细胞因子TNF-α、IL-8的测定

细胞染毒结束后,取上清备用。取出ELISA试剂盒,将浓缩洗涤液用双蒸水稀释;加样,37℃孵育90min;弃去液体,加入生物素化抗体工作液,37℃温育1h;洗板3次;加酶结合物工作液,37℃温育30min;洗板5次;加底物溶液,37℃避光孵育15min;取出酶标板,加终止液,以空白孔调零,采用酶标仪,在450nm波长处测量光密度值。

1.9 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行数据分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,先进行正态分布及方差齐性检验。若方差齐,用Dunnet *t*检验;反之,用Games-Howell检验;相关性分析采用Spearman秩相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞活力变化

表1可见,各染毒组L02细胞活力均受到不同程度的抑制。各染毒时间随染毒剂量的增加,细胞活力均逐渐降低($r_{24h}=0.9320$, $r_{48h}=0.9790$, $r_{72h}=0.9830$,均 $P<0.01$)。各处理组的细胞活力均明显低于溶剂对照

组($P<0.05$)。染毒48、72h后,细胞活力较24h明显降低($P<0.05$)。

表1 自来水有机提取物染毒L02细胞的细胞活力
($\bar{x} \pm s$, $n=3$, %)

Table 1 The activity of L02 cells exposed to organic extracts from tap water			
组别(Group)	24h	48h	72h
空白对照(Blank control)	99.55 ± 0.66	100.99 ± 1.09	100.25 ± 1.47
溶剂对照(Solvent control)	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
有机提取物(Organic extracts)			
0.3125 L/mL	96.46 ± 0.83*	92.20 ± 1.29**	86.87 ± 1.79**
0.6250 L/mL	95.09 ± 1.33*	83.46 ± 1.73**	80.58 ± 1.97**
1.2500 L/mL	92.72 ± 1.35*	81.25 ± 0.94**	63.07 ± 1.67**
2.5000 L/mL	90.96 ± 1.33*	71.11 ± 0.75**	51.12 ± 2.91**
5.0000 L/mL	90.89 ± 1.75*	65.26 ± 2.49**	36.50 ± 1.22**
F	31.60	294.24	578.07
P	0.00	0.00	0.00

[注]*: 与溶剂对照组比较, $P<0.05$ 。#: 与24h比较, $P<0.05$ 。
[Note]*: Compared with the solvent control group, $P<0.05$. #: Compared with the 24h-exposure group, $P<0.05$.

2.2 IkB和p65蛋白表达水平

表2可见,随着有机提取物染毒浓度的增加,IkB蛋白表达水平逐渐降低($r_{24h}=0.9160$, $r_{48h}=0.9740$, $r_{72h}=0.9520$,均 $P<0.01$)。在染毒24、48和72h后,0.6250L/mL以上染毒组的IkB蛋白表达水平均明显低于溶剂对照组($P<0.05$)。

表2 自来水有机提取物染毒L02细胞的IkB蛋白表达水平
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Protein expression levels of IkB in L02 cells exposed to organic extracts from tap water			
组别(Group)	24h	48h	72h
空白对照(Blank control)	1.27 ± 0.06	1.12 ± 0.09	0.46 ± 0.02
溶剂对照(Solvent control)	1.27 ± 0.10	1.08 ± 0.11	0.44 ± 0.03
有机提取物(Organic extracts)			
0.3125 L/mL	1.23 ± 0.04	0.98 ± 0.06	0.39 ± 0.02
0.6250 L/mL	1.02 ± 0.09*	0.68 ± 0.06*	0.34 ± 0.02*
1.2500 L/mL	0.89 ± 0.04*	0.50 ± 0.02*	0.33 ± 0.03*
2.5000 L/mL	0.88 ± 0.03*	0.46 ± 0.02*	0.31 ± 0.02*
5.0000 L/mL	0.78 ± 0.06*	0.38 ± 0.03*	0.23 ± 0.02*
F	31.02	72.44	42.45
P	0.00	0.00	0.00

[注]*: 与溶剂对照组比较, $P<0.05$ 。
[Note]*: Compared with the solvent control group, $P<0.05$.

表3可见,自来水有机提取物处理L02细胞24h和48h后,1.2500L/mL以上染毒组p65蛋白表达水平明显高于对照组($P<0.05$);而在处理72h后,0.6250L/mL以上剂量组即明显升高($P<0.05$)。

表3 自来水有机提取物染毒L02细胞的p65蛋白表达水平
($\bar{x} \pm s, n=3$)

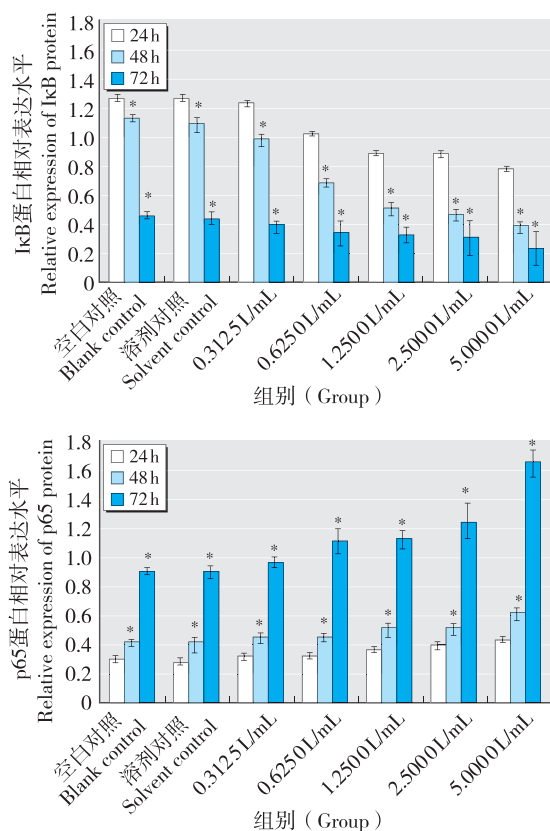
Table 3 Protein expression levels of p65 in L02 cells exposed to organic extracts from tap water

组别 (Group)	24h	48h	72h
空白对照 (Blank control)	0.30 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.92 ± 0.02
溶剂对照 (Solvent control)	0.29 ± 0.02	0.41 ± 0.05	0.91 ± 0.04
有机提取物 (Organic extracts)			
0.3125 L/mL	0.32 ± 0.02	0.45 ± 0.04	0.97 ± 0.04
0.6250 L/mL	0.32 ± 0.01	0.46 ± 0.03	1.12 ± 0.08*
1.2500 L/mL	0.37 ± 0.01*	0.51 ± 0.05*	1.13 ± 0.06*
2.5000 L/mL	0.40 ± 0.02*	0.52 ± 0.04*	1.26 ± 0.12*
5.0000 L/mL	0.45 ± 0.01*	0.62 ± 0.04*	1.67 ± 0.11*
F	60.01	10.28	38.31
P	0.00	0.00	0.00

[注]*: 与溶剂对照组比较, $P<0.05$ 。

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

图1可见,随着染毒时间的延长,各染毒组IκB蛋白表达水平亦呈降低趋势:与24h组比较,48h及72h染毒组的降低均有统计学意义($P<0.05$);而各染毒组p65蛋白表达水平则呈升高趋势,与24h组比较,48h及72h染毒组的升高均有统计学意义($P<0.05$)。



[注]*: 与24h比较, $P<0.05$ 。

[Note]*: Compared with the 24h-exposure group, $P<0.05$.

图1 自来水有机提取物染毒不同时间L02细胞的IκB、p65蛋白表达水平

Figure 1 Protein expression levels of IκB and p65 in L02 cells exposed to organic extracts from tap water after different exposure time

2.3 IL-8及TNF-α水平

表4可见,有机提取物染毒L02细胞24h和48h后,0.6250 L/mL以上剂量组的IL-8水平均明显升高($P<0.05$);而在72h,低剂量组(0.3125 L/mL)的IL-8水平即已明显升高($P<0.05$)。

表4 自来水有机提取物染毒L02细胞的IL-8水平
($\bar{x} \pm s, n=3, \text{ng/L}$)

Table 4 IL-8 levels in L02 cells exposed to organic extracts from tap water

组别 (Group)	24h	48h	72h
空白对照 (Blank control)	67.33 ± 1.74	118.62 ± 3.75	130.18 ± 3.63
溶剂对照 (Solvent control)	68.64 ± 1.07	115.15 ± 4.70	125.08 ± 2.87
有机提取物 (Organic extracts)			
0.3125 L/mL	72.21 ± 1.72	126.04 ± 1.87	146.30 ± 5.48*
0.6250 L/mL	83.29 ± 1.26*	127.09 ± 3.15*	148.02 ± 2.91*
1.2500 L/mL	93.64 ± 1.16*	127.10 ± 4.91*	160.08 ± 1.04*
2.5000 L/mL	97.03 ± 2.41*	153.20 ± 1.66*	178.22 ± 3.51*
5.0000 L/mL	100.27 ± 1.29*	158.30 ± 2.39*	192.09 ± 2.01*
F	234.81	71.83	161.60
P	0.00	0.00	0.00

[注]*: 与溶剂对照组比较, $P<0.05$ 。

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

表5可见,有机提取物处理L02细胞24h后,1.2500 L/mL以上剂量组的TNF-α水平明显升高($P<0.05$);而染毒48h和72h后,TNF-α水平在0.6250 L/mL以上剂量组即显著升高($P<0.05$)。

表5 自来水有机提取物染毒L02细胞的TNF-α水平
($\bar{x} \pm s, n=3, \text{ng/L}$)

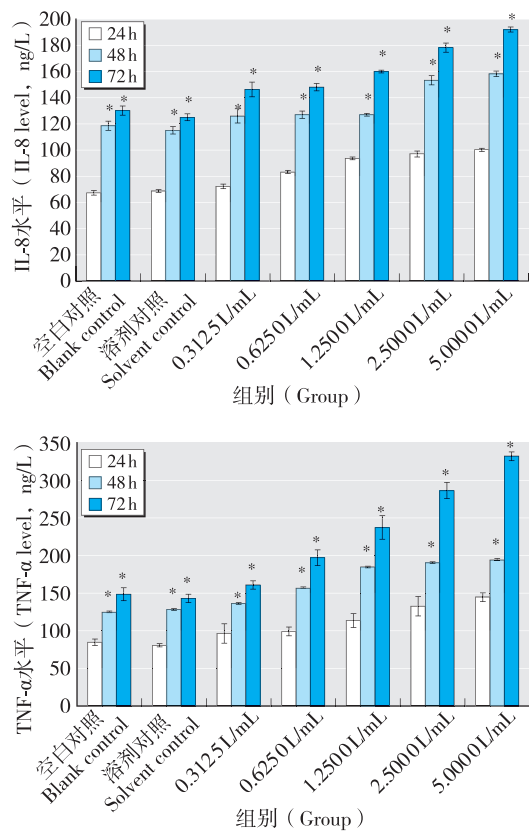
Table 5 TNF-α levels in L02 cells exposed to organic extracts from tap water

组别 (Group)	24h	48h	72h
空白对照 (Blank control)	84.66 ± 6.73	124.53 ± 4.43	148.65 ± 8.69
溶剂对照 (Solvent control)	80.72 ± 14.02	128.57 ± 2.39	143.30 ± 5.55
有机提取物 (Organic extracts)			
0.3125 L/mL	96.46 ± 11.18	136.20 ± 12.79	160.69 ± 5.58
0.6250 L/mL	99.11 ± 10.25	156.66 ± 6.03*	197.08 ± 10.25*
1.2500 L/mL	113.64 ± 8.81*	184.90 ± 8.99*	237.22 ± 15.54*
2.5000 L/mL	132.64 ± 8.12*	190.28 ± 13.05*	286.35 ± 10.80*
5.0000 L/mL	144.64 ± 8.15*	193.92 ± 5.64*	332.12 ± 5.88*
F	17.86	37.94	176.93
P	0.00	0.00	0.00

[注]*: 与溶剂对照组比较, $P<0.05$ 。

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

图2可见,与24h染毒组比较,48、72h各剂量组的IL-8与TNF-α水平均明显升高($P<0.05$)。



[注]*: 与24h比较, $P < 0.05$ 。
[Note]*: Compared with the 24h-exposure group, $P < 0.05$.

图2 自来水有机提取物染毒不同时间 L02 细胞的 IL-8 和 TNF-α 水平

Figure 2 IL-8 and TNF-α level in L02 cells exposed to organic extracts from tap water after different exposure time

2.4 IkB 和 p65 蛋白表达水平与 IL-8 和 TNF-α 水平的相关性

表6可见, IL-8及TNF-α水平与IkB蛋白表达水平均呈负相关($P < 0.01$), 相关系数分别为-0.8510、-0.8180; 而与p65蛋白表达水平均呈正相关($P < 0.01$), 相关系数分别为0.8160、0.8650。

表6 IkB、p65与IL-8、TNF-α之间的相关性分析

Table 6 Correlational analysis between IkB & p65 and IL-8 & TNF-α			
变量1 (Variate 1)	变量2 (Variate 2)	相关系数 (Correlation coefficient)	P
IkB	IL-8	-0.8510	0.000
IkB	TNF-α	-0.8180	0.000
p65	IL-8	0.8160	0.000
p65	TNF-α	0.8650	0.000

3 讨论

作为常见的自来水污染物之一, 有机污染物的健康危害受到广泛的关注。多项研究证实, 饮用水有机污染物可对机体产生多种不良影响, 具有遗传毒性、

细胞毒性、生殖内分泌毒性等, 与人类多器官损伤及肿瘤的发生有一定的关系^[7-9]。本研究发现不同浓度饮用水有机提取物处理 L02 细胞 24、48 和 72 h 后, 细胞活力均随染毒剂量的增大而降低, 存在剂量依赖性 ($P < 0.05$)。而时效关系的结果表明: 与染毒 24 h 相比较, 48、72 h 的染毒可致 L02 细胞的活力明显降低 ($P < 0.05$)。

研究发现, 自来水有机提取物作用于 L02 细胞后, 可诱导其分泌 IL-1、IL-6 等细胞因子。既往研究提示, 编码 IL-6 表达的基因是由核因子 (NF-κB) 调控的^[10]。此外 NF-κB 调控的靶基因还包括免疫相关受体、细胞因子 (如 TNF-α)、炎症因子 (如 IL-8)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 和急性期蛋白 [如血清淀粉样蛋白 A (SAA)] 等^[2]。静息状态下, p65 与 p50 结合形成异源二聚体, IkB 与此二聚体结合形成三聚体, 保持三聚体存在于细胞质中从而抑制激活。当机体受到刺激时, IkB 磷酸化而被降解, 暴露出 p50 亚基上的易位信号和 p65 亚基上的 DNA 结合位点, p65/p50 二聚体借助 p50 从细胞质中进入细胞核, 借助 p65 与 κB 基序相结合, 从而发挥转录调控作用。由此可见, IkB 的降解和 p65 的转位入核是不可或缺的部分。因此, 本研究选取了胞浆蛋白 IkB 和胞核蛋白 p65 作为检测指标, 以反映 NF-κB 的激活情况。结果发现, L02 细胞暴露于自来水有机提取物后, 随染毒剂量的增加, 胞浆蛋白 IkB 水平逐渐降低, 尤以 0.625 0 L/mL 以上剂量组的降低明显 ($P < 0.05$); 胞核蛋白 p65 表达水平在 24 h 及 48 h 时点, 1.2500 L/mL 以上剂量组升高, 在 72 h 时点、则在 0.625 0 L/mL 以上剂量组即可明显升高 ($P < 0.05$)。提示, 自来水有机提取物可剂量-依赖性地诱导及激活 NF-κB 信号通路。为进一步探明其对 NF-κB 信号通路的激活作用是否受时相的影响, 本研究对 L02 细胞的染毒作用分为 24、48、72 h 进行, 结果发现: 染毒 48、72 h 后, 各剂量组的 IkB 蛋白表达水平均明显低于 24 h 染毒组 ($P < 0.05$), 而 48、72 h 染毒组的 p65 蛋白表达水平则明显高于 24 h 染毒组 ($P < 0.05$), 表明自来水有机提取物对 NF-κB 通路的激活作用亦具时间-依赖性。

同时发现: 炎症因子 TNF-α 和 IL-8 的水平亦随染毒剂量的增加、染毒时间的延长逐渐增高, 与 p65 的表达变化趋势一致。进一步的相关性分析发现, IL-8、TNF-α 水平与 IkB 蛋白表达水平呈负相关关系 ($r = -0.8510$ 、 -0.8180 , $P < 0.05$), 与 p65 蛋白表达水平

呈正相关关系($r=0.8160$ 、 0.8650 , $P<0.05$)。提示在自来水有机提取物致肝细胞损伤过程中, NF- κ B 信号通路的激活受作用浓度及作用时间的影响。NF- κ B 信号通路一旦被激活, 可调控细胞因子、炎症因子等炎症介质的分泌表达, 从而促进 L02 肝细胞的损伤。

不容忽视的是, NF- κ B 是 TNF- α 最有力的转录因子, 而 TNF- α 可活化 NF- κ B, 二者可相互促进、进一步的放大炎症反应, 从而加重肝细胞的损伤。因此, 我们应对自来水有机污染物暴露所致的肝细胞炎症损伤及其调控予以重视, 并进行动态监测, 为自来水有机污染物的健康风险评估及暴露人群的健康保护提供支撑。

· 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] 李莎. 城镇饮用水水质现状分析及对策[J]. 山东工业技术, 2015(13): 256.
- [2] Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle[J]. Cell, 2002, 109(Suppl): S81-96.
- [3] O'Neil LA. The IL-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense[J]. Immunol Today, 2000, 21(5): 206-209.
- [4] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2001, 1(2): 135-145.
- [5] 杨光红, 桂晓玲, 岑延利, 等. 饮用水有机提取物致大鼠肝脏损伤中 GSTs 活性及其编码基因表达的变化[J]. 环境与职业医学, 2015, 32(3): 206-210.
- [6] 陈曦. P53 非依赖性信号通路在邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯致体外培养人肝细胞毒性中的调控作用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [7] 杨光红, 王士然, 张爱华, 等. G 市某区管网末梢水中有机提取物对雄性大鼠生殖激素分泌水平的影响[J]. 环境与职业医学, 2013, 30(5): 342-345.
- [8] 杨光红, 张爱华, 王士然, 等. 常规处理工艺对地表水有机提取物遗传毒性的影响[J]. 环境与健康杂志, 2013, 30(9): 799-801.
- [9] 赵淑华, 隋春生, 王春华, 等. 饮用水有机提取物对正常人肝 HL-7702 细胞的毒性[J]. 环境与健康杂志, 2011, 28(11): 984-986.
- [10] Kim S, Takahashi H, Lin W W, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis[J]. Nature, 2009, 457(7225): 102-106.

(收稿日期: 2015-10-13)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 王晓宇)

【告知栏】

《环境与职业医学》杂志免收审稿费的通知

本着竭诚为广大作者和读者服务的宗旨, 《环境与职业医学》杂志从 2016 年 1 月 1 日起免收审稿费。

《环境与职业医学》唯一投稿方式是在线投稿, 官方网址为 <http://jeom.scdc.sh.cn:8081>。广大作者投稿时, 请注意阅读网站主页公布的“作者指南”, 认真检查稿件的研究内容是否符合《环境与职业医学》刊载范畴, 写作格式是否符合本刊的要求。网上投稿时务必填写必要项目, 并按照本刊要求提供所需的投稿材料, 以免延误送审时间。

欢迎业内新老作者踊跃投稿, 继续关注和支持本刊的发展。

《环境与职业医学》杂志编辑部