

PM_{2.5} 降尘对 A549 细胞线粒体氧化损伤的影响

宋小芳¹, 杨洁¹, 霍婷婷³, 马骥¹, 董发勤³, 马杰³, 王玉琳², 邓建军¹

(1. 四川绵阳四〇四医院, 四川 绵阳 621000; 2. 西南医科大学, 四川 泸州 646000; 3. 西南科技大学, 四川 绵阳 621010)

摘要: 将不同浓度 PM_{2.5} 降尘作用于 A549 细胞后, 利用 MTT 法检测其存活率, W-G 染色观察细胞形态, 荧光探针法检测细胞 ROS 和 MMP 相对水平, 以探讨 PM_{2.5} 降尘对 A549 细胞线粒体氧化损伤的影响及作用机制。结果显示, 经 12.5 μg/mL 的 PM_{2.5} 降尘作用 A549 细胞 3 h 后, 细胞存活率为 (81.77 ± 6.15)% , 并随作用浓度及时间增加呈递减趋势。PM_{2.5} 染毒后可观察到细胞形态不规则, 胞膜溶解破坏, 细胞微核出现。PM_{2.5} 降尘作用于细胞 24 h 后, 胞内 ROS 相对含量随暴露浓度增加呈递增趋势, 细胞 MMP 相对水平随染毒浓度增加而降低, 且胞内 ROS 和 MMP 两者间存在显著相关关系 ($R^2 = 0.878$)。提示 PM_{2.5} 降尘处理 A549 细胞后可通过刺激 ROS 的产生, 诱导细胞 MMP 下降, 造成细胞线粒体氧化损伤。

关键词: PM_{2.5} 降尘; A549 细胞; ROS; MMP; 氧化损伤

中图分类号: P579

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2018)06-0985-08

Mitochondrial oxidative damage in A549 cells induced by PM_{2.5} dust-fall

SONG Xiao-fang¹, YANG Jie¹, HUO Ting-ting³, MA Ji¹, DONG Fa-qin³, MA Jie³, WANG Yu-lin² and DENG Jian-jun¹

(1. Sichuan Mianyang 404 Hospital, Mianyang 621000, China; 2. Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 3. Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621003, China)

Abstract: In this study, A549 cells were exposed to PM_{2.5} dustfall of different concentrations, respectively. MTT assay was used to evaluate cell viability. Cell morphology was observed through microscope after W-G staining. Fluorescence probe DCFH-DA and JC-1 were applied to label A549 cells after being treated by PM_{2.5} to detect intracellular level of ROS and change of MMP, with the purpose of investigating the mitochondrial oxidative damage in A549 cells induced by PM_{2.5} dust-fall. The results showed that, compared with the control group, A549 cell viability was (81.77 ± 6.15)% after being exposed to PM_{2.5} at 12.5 μg/mL for 3 h, and was declined in a dose-dependent manner and time-dependent effect. It was observed that cell morphology was changed, cell membrane was dissolved and cell micro-nucleus appeared after being treated with PM_{2.5}. In addition, the ROS levels were significantly higher than those of the control group; with the increase of PM_{2.5} concentration, the fluorescence intensity showed an increasing tendency gradually. Simultaneously, the MMP levels were declined in a dose-dependent manner after being treated with PM_{2.5}. And there was a negative correlation between the ROS level and MMP ($R^2 = 0.878$). It is inferred that PM_{2.5} may stimulate the production of ROS and induce the declining of MMP, resulting in A549 cell mitochondrial oxidative damage.

收稿日期: 2017-09-01; 接受日期: 2018-05-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41472046, 41602033); 四川省科技计划资助项目(2016JY0045)

作者简介: 宋小芳(1972-), 女, 主治医师; 通讯作者: 邓建军(1972-), E-mail: jianjundeng0801@163.com。

Key words: dustfall ($PM_{2.5}$); A549 cell; ROS; MMP; oxidative damage

Fund support: National Natural Fund Project of China (41472046, 41602033); Science and Technology Project of Sichuan Province (2016JY0045)

$PM_{2.5}$ 是空气动力学直径 $\leq 2.5 \mu m$ 的细颗粒物,由于其粒径小、比表面积较大,容易吸附有害物质(如重金属、多环芳烃等),并能长时间悬浮于空气中,随呼吸进入气管和支气管,甚至进入肺泡,影响肺通气及换气功能,诱发急性支气管炎、急性肺炎、肺纤维化和肺部肿瘤等疾病(Kroll *et al.*, 2013; Hamra *et al.*, 2014)。空气中 $PM_{2.5}$ 浓度每升高 $10 \mu g/m^3$,我国居民呼吸系统疾病每日死亡率上升 1.0%,肺癌病死率增加 15% ~ 21% (Chen *et al.*, 2011),可见 $PM_{2.5}$ 与人体健康息息相关。研究表明, $PM_{2.5}$ 对不同靶细胞的体外毒性作用相似,可引起细胞存活率降低、炎症反应、免疫毒性及氧化损伤等(Rodríguez-Cotto *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015)。然而现阶段 $PM_{2.5}$ 诱导细胞损伤的毒理学机制仍未明确,有报道可能与活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生所介导的氧化应激有关,进而攻击细胞,引起细胞氧化损伤(Jia *et al.*, 2017)。本课题组前期研究结果显示,多种矿尘 $PM_{2.5}$ (如石英、方解石、蒙脱石、钠长石及绢云母等)均可不同程度地抑制 A549 细胞增殖和破坏细胞形态,导致细胞膜碎裂溶解及微核数量增加,并诱导染色体 DNA 氧化损伤(霍婷婷, 2013; Zeng *et al.*, 2016)。因此,本实验进一步以降尘 $PM_{2.5}$ 为研究对象,探讨 $PM_{2.5}$ 对 A549 细胞的氧化损伤机制,以期为进一步研究大气污染物的健康危害机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

实验用 $PM_{2.5}$ 降尘采自宁夏永宁地区,由西南科技大学固体废物处理与资源化教育部重点实验室提供。

人肺上皮细胞株(A549 细胞)购自中国科学院上海生命科学研究院。细胞接种于 $25 cm^2$ 培养瓶,添加含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(含 100 U/mL 青霉素, 100 $\mu g/mL$ 链霉素),于 $37^\circ C$ 、5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养,待细胞贴壁长至约 85%,按 1:2 比例传代。

主要试剂:改良型 RPMI 1640 培养基、胎牛血清(美国 Hyclone)、Wright-Giemsa 染液(中国 Baso)、

MTT(Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide)、活性氧检测试剂盒(Reactive Oxygen Species Assay Kit)、线粒体膜电位检测试剂盒(Mitochondrial membrane potential assay kit, JC-1)(中国碧云天)。

主要仪器:卧式行星球磨机(QM-3SP4J, 南京大学仪器厂)、激光粒度分析仪(LS 13320, 美国 Beckman Coulter)、X 射线衍射仪(XRD, X'pert PRO, 荷兰 PANalytical B V)、倒置相差荧光显微镜(Axio Observer A1, 德国 Zeiss)、微孔板分光光度计(PowerWave XS2, 美国 BioTek)、荧光分光光度计(F-7000, 日本 Hitachi)、激光共聚焦显微镜(TCS Sp8, 德国 Leica)。

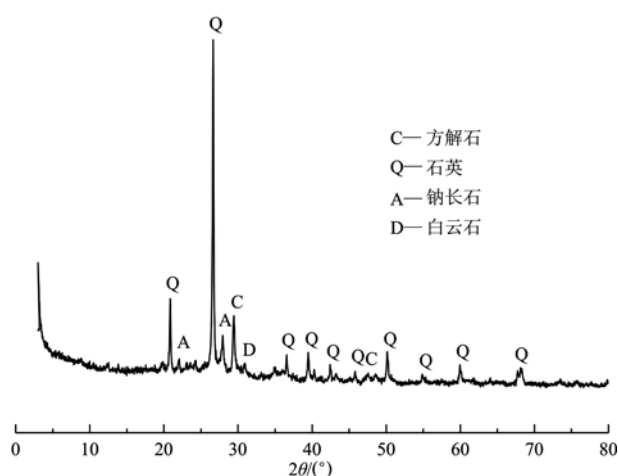
1.2 实验方法

1.2.1 $PM_{2.5}$ 粉尘样品及悬液的制备

降尘样本过 200 目筛,确定研磨球料比 5:1,浆料浓度 40%,使用卧式行星球磨机(转速 40 Hz)于乙醇中研磨 8 h,洗出,抽滤,烘干。烘干样品再次研磨,400 目筛过滤,封装待用。激光粒度分析仪测定研磨后样品在水溶液中的分散粒度,结果如表 1。由表可知,经研磨后,93.56% 的粉尘颗粒粒径 $< 2.5 \mu m$,基本符合本实验要求粒度。粉尘样品 D10 值(颗粒的累积粒度分布数达到 10% 所对应的粒径值)为 $0.496 \mu m$, D50 值为 $1.047 \mu m$, D90 值为 $2.011 \mu m$ 。采用 XRD 对样本的主要物相进行分析,使用 X'pert Highscore plus 进行数据整理及寻峰,结果如图 1 所示。 $PM_{2.5}$ 降尘中除主相石英外,还掺杂方解石、钠长石和白云石等。

表 1 $PM_{2.5}$ 粒径分布的相对百分比及累积百分比
Table 1 Size distribution of $PM_{2.5}$, as depicted as relative frequency and cumulative frequency

粒径/ μm	相对百分比/%	累积百分比/%
0.3 ~ 0.5	17.68	17.68 (~0.5)
0.5 ~ 1.0	37.71	55.39 (~1.0)
1.0 ~ 1.5	23.98	79.37 (~1.5)
1.5 ~ 2.0	9.85	89.22 (~2.0)
2.0 ~ 2.5	4.34	93.56 (~2.5)
2.5 ~ 5.0	6.04	99.6 (~5.0)
5.0 ~ 6.5	0.40	100.00 (~6.5)

图1 宁夏地区降尘 PM_{2.5}的 XRD 谱图Fig. 1 XRD spectrum of PM_{2.5} dust-fall collected in Ningxia

称取 10 mg PM_{2.5} 粉尘至无菌 15 mL 离心管中, 高温高压蒸汽灭菌后加入 10 mL RPMI 1640 培养液, 配制成终浓度为 1 000 μg/mL 的粉尘母液。实验前超声震荡 30 min, 使 PM_{2.5} 颗粒充分分散, 并用无血清 RPMI 1640 培养液稀释为目标浓度的 PM_{2.5} 粉尘悬液。

1.2.2 MTT 检测细胞存活率

取处于指数生长期的 A549 细胞, 调整计数为 2×10^5 个/mL 的细胞悬液, 接种于 96 孔培养板中。待细胞贴壁长至 85% 时, 分别加入 0、12.5、25.0、50.0、100.0 和 200.0 μg/mL 共 6 个浓度梯度的 PM_{2.5} 悬液各 200 μL, 培养箱中共培养 3、12、24 和 48 h。细胞暴露相应时间后, 向每孔中加入 10 μL MTT 溶液, 继续孵育 4 h 至 MTT 反应显色。随后轻轻弃去反应上清液, 加入二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解反应生成的甲瓩。使用微孔板分光光度计在 490 nm 波长处测量吸光度值(A)。为消除粉尘对吸光度的影响, 实验设置空白对照组(仅加培养基)、细胞对照组(加细胞悬液和培养基)、粉尘对照组(加 PM_{2.5} 悬液和培养基)和实验组(加 PM_{2.5} 悬液、细胞悬液和培养基)。细胞相对存活率(%) = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{粉尘对照组}}) / (A_{\text{细胞对照组}} - A_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$, 根据上式计算细胞相对存活率, 并绘制 PM_{2.5} 染毒的存活率-浓度-时间曲线。

1.2.3 W-G 染色观察细胞形态

将 A549 细胞以 2×10^5 个/mL 的浓度接种于内置灭菌爬片的 12 孔板中, 培养 24 h 后以每孔 2 mL 加入 100 μg/mL 的 PM_{2.5} 粉尘悬液, 同时设定细胞对

照组。染尘培养 24 h 后取出细胞爬片, PBS 冲洗晾干, 70% 乙醇固定 30 min, W-G 染液染色, 倒置相差荧光显微镜观察细胞形态。

1.2.4 ROS 水平检测

将 A549 细胞接种于 12 孔板中, 待细胞贴壁长至 85% 时, 分别加入 0、12.5、25.0、50.0、100.0 和 200.0 μg/mL 的 PM_{2.5} 悬液各 2 mL, 共培养 24 h 后收集细胞。收集到的细胞用 500 μL 10 μmol/L 的 DCFH-DA(2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate) 重悬, 37°C 避光孵育 30 min。无血清培养液洗涤细胞 3 次, 充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA, 磷酸盐缓冲溶液再次洗涤细胞 2 次后重悬, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 荧光分光光度计(激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm) 检测平均荧光强度。此外, 将 A549 细胞接种于共聚焦培养皿中, PM_{2.5} 悬液处理细胞后 DCFH-DA 标记细胞, 激光共聚焦显微镜(设置检测参数一致) 观察并拍摄图片。

1.2.5 MMP 水平检测

根据 1.2.4 步骤处理收集细胞, 用 500 μL 荧光探针 JC-1(1X) 重悬细胞, 37°C 避光孵育 30 min, JC-1 缓冲液洗涤细胞 3 次后再次重悬, 荧光分光光度计(激发波长 490 nm, 发射波长 530 nm) 检测平均荧光强度。

1.3 统计学分析

使用 EXCEL 进行数据计算及整理, 利用统计学软件 SPSS19.0 进行统计学分析, 实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。采用单因素 ANOVA 分析进行显著性检验, 多组间的两两比较使用 LSD 检验, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义; $p < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。通过绘图软件 Origin 8.0 进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 PM_{2.5} 对 A549 细胞存活率的影响

不同浓度 PM_{2.5} 处理 A549 细胞 3、12、24 和 48 h 后, 结果如图 2(与对照组相比, $** p < 0.01$; 与同一染毒浓度不同染毒时间相比, $^{\#} p < 0.05$, $^{\#\#} p < 0.01$) 所示, 细胞存活率随染毒浓度增加而递减, 差异有统计学意义, 且存在线性相关关系。染毒 3 h 时细胞存活率与 PM_{2.5} 浓度的相关性 $R^2 = 0.968$, 染毒 12 h 时 $R^2 = 0.942$, 染毒 24 h 时 $R^2 = 0.935$, 染毒 48 h 时 $R^2 = 0.868$ ($p < 0.05$)。相同处理浓度下, 细胞存活率随暴露时间增长而呈现递减趋势, 当暴露浓度达 200

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 、处理时间为 48 h 时,细胞存活率降至 $(46.22 \pm 1.85)\%$,此时细胞活力下降最明显。

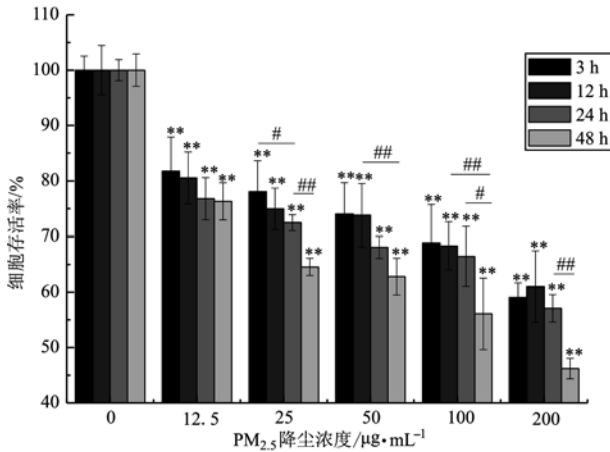


图2 PM_{2.5}对 A549 细胞存活率的影响

Fig. 2 The effect of PM_{2.5} exposure on cell viability

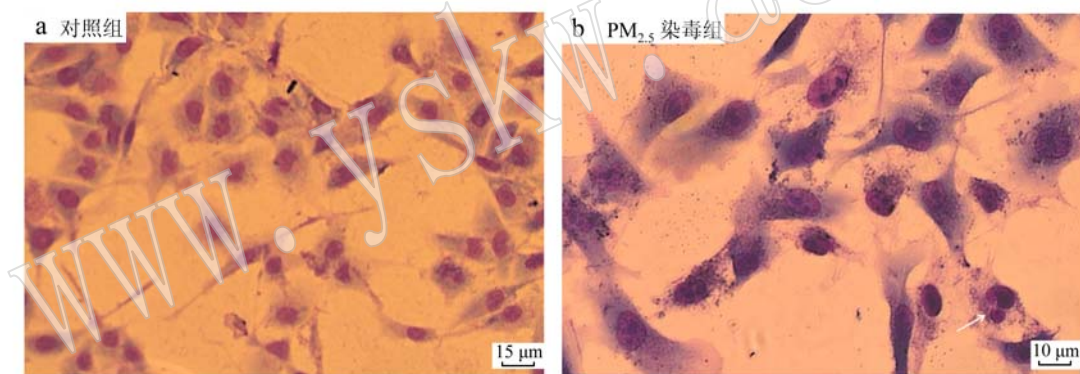


图3 PM_{2.5}对 A549 细胞形态的影响

Fig. 3 The effect of PM_{2.5} exposure on cell morphology

可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF, 检测 DCF 的荧光即为细胞内 ROS 的水平。通过激光共聚焦显微镜观察, 结果如图 4 所示。与对照组低荧光强度的细胞相比, 低浓度 PM_{2.5} 染毒组细胞形态基本完好, 部分细胞收缩呈类圆形, 受损细胞荧光强度明显增高。并且随 PM_{2.5} 浓度增加, 细胞形态破坏, 边缘逐渐变钝, 荧光强度呈升高趋势。200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组可见细胞形态被破坏, 细胞呈现皱缩坏死, 荧光强度相对于对照组约为 1.99 ± 0.10 , 此时荧光强度最高。

不同浓度 PM_{2.5} 作用 A549 细胞 24 h, 荧光分光光度计检测结果如图 5 所示(与对照组相比 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$; 与同一染毒浓度不同染毒时

2.2 PM_{2.5}对细胞形态的影响

根据细胞毒性试验, 选取细胞存活率约为 60% 的作用浓度(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)开展暴露实验, 进行细胞形态观察。粉尘作用于 A549 细胞 24 h, 经 W-G 染色后倒置显微镜下观察细胞形态, 结果如图 3 所示。对照组可见细胞生长状态良好, 细胞大小正常, 细胞形态轮廓清晰, 多呈梭型平铺排列。PM_{2.5} 染毒组可见细胞形态异常, 轮廓消失, 部分细胞胞膜溶解破坏, 遗留细胞裸核。此外, 细胞微核出现, 如图 3 中箭头所示, 其形状规则、着色与主核一致, 且与主核分界清晰。

2.3 PM_{2.5}诱导胞内 ROS 改变

不同浓度 PM_{2.5} 处理 A549 细胞 24 h, 采用 DCFH-DA 荧光标记细胞, DCFH-DA 可穿过细胞膜进入细胞, 在胞内水解生成 DCFH, 而 DCFH 不能透过细胞膜, 从而将探针装载到细胞内。细胞内的 ROS

间相比 $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$)。在 PM_{2.5} 作用浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 胞内 ROS 水平增加具有统计学意义, 代表胞内 ROS 水平的 DCF 相对荧光强度在 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为 1.37 ± 0.08 , 高于对照组(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 1.00 ± 0.08 ($p < 0.05$), 在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 DCF 相对荧光强度为 1.44 ± 0.19 , 差异具有显著意义 ($p < 0.01$)。由此可见, 随染毒浓度增加, 胞内 ROS 水平呈递增趋势, 且存在剂量依赖性关系。此外, 对胞内 ROS 水平和细胞活力进行相关性分析, 结果提示胞内 ROS 水平增加程度与细胞活力下降程度存在显著相关性 ($R^2 = 0.793$, 图 6)。

2.4 PM_{2.5}诱导细胞膜电位改变

不同浓度 PM_{2.5} (0、12.5、25.0、50.0、100.0 和

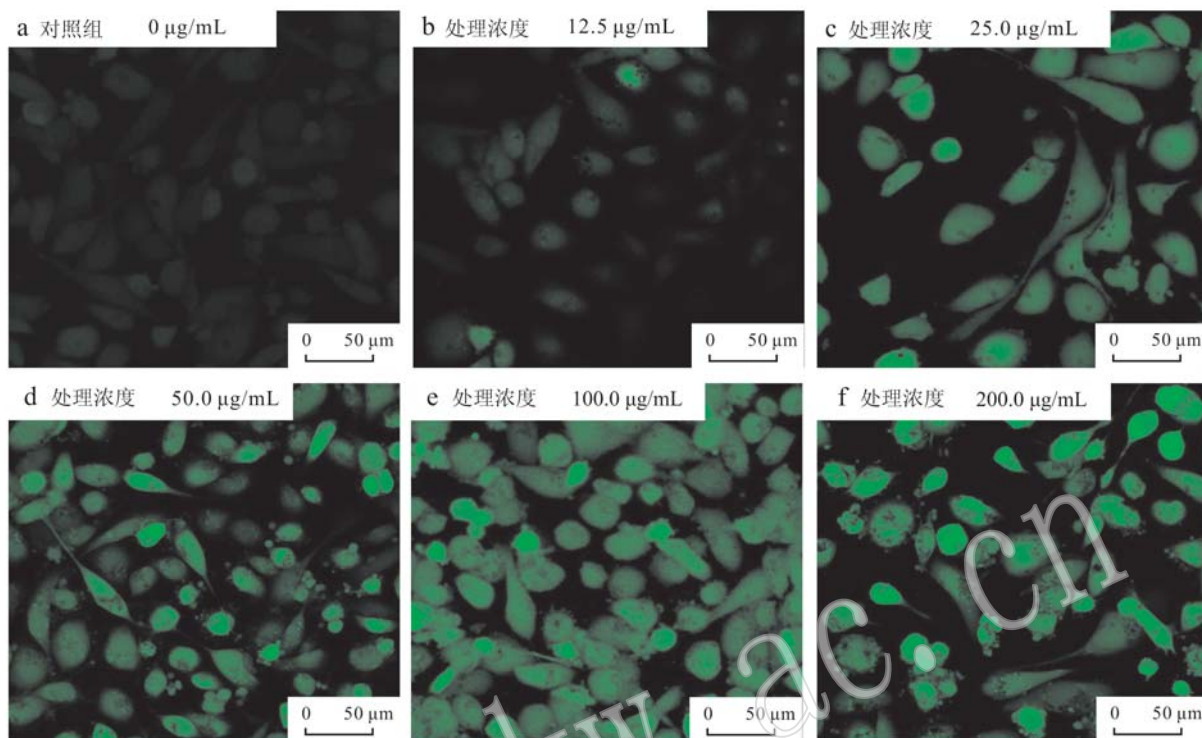


图 4 PM_{2.5}对 A549 细胞内 ROS 水平的影响

Fig. 4 PM_{2.5} inducing ROS generation in A549 cells

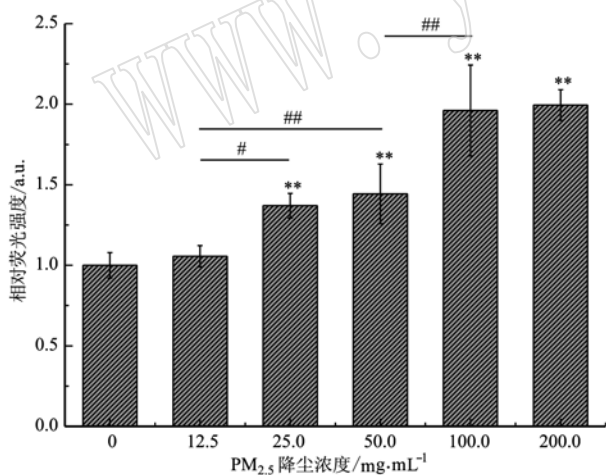


图 5 PM_{2.5}处理 A549 细胞后胞内 ROS 水平变化

Fig. 5 The changes of ROS release of A549 cells exposed to PM_{2.5}

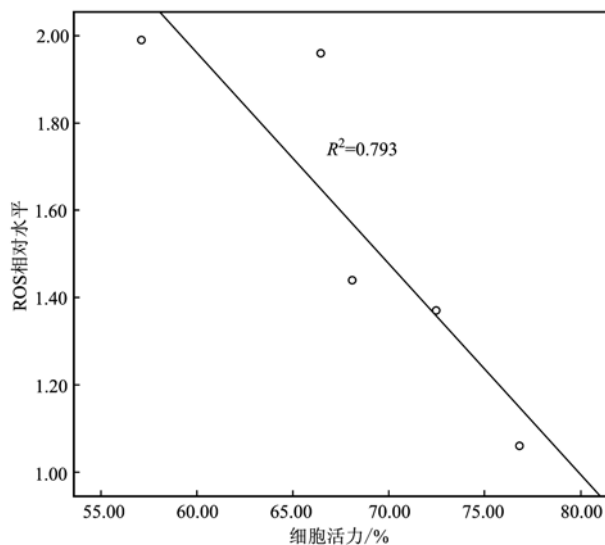


图 6 不同浓度 PM_{2.5}作用于 A549 细胞 24 h 后细胞活力与 ROS 水平间的线性关系

Fig. 6 The linear relationship between A549 cell viability and ROS level after being exposed to different concentrations of PM_{2.5} for 24 h

200.0 μg/mL) 作用于 A549 细胞, 利用荧光探针 JC-1 标记 A549 细胞, 出现红色荧光说明线粒体膜电位正常, 细胞状态正常; 出现绿色荧光说明线粒体膜电位下降, 细胞功能受损。荧光分光光度计检测红/绿荧光, 计算红/绿荧光比可反映细胞MMP改变情况,

结果如图 7(参比对照组 ** $p < 0.01$; 参比同一染毒时间不同染毒浓度# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$) 所示。与

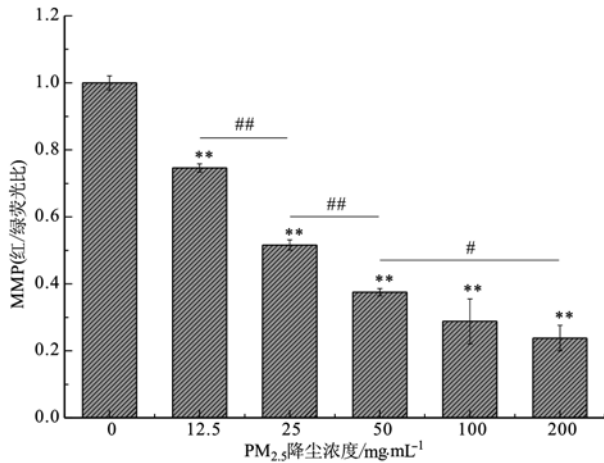


图7 PM_{2.5}处理 A549 细胞 24 h 后 MMP 水平变化
Fig. 7 MMP level of A549 cell after being incubated with PM_{2.5} for 24 h

对照组相比,PM_{2.5}作用浓度为 12.5 μg/mL 时,细胞线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP)水平为 0.75 ± 0.012,并随 PM_{2.5}浓度增加而呈递减趋势,且存在剂量依赖性关系。对细胞 MMP 水平和细胞活力进行相关性分析,结果提示 MMP 水平降低程度与细胞活力下降程度存在显著相关性 ($R^2 = 0.821$,图 8)。此外,对本实验获得的 ROS 和 MMP 水平进行相关性统计学分析,两者间存在显著的负相关关系,相关系数 $R^2 = 0.878$ (图 9)。

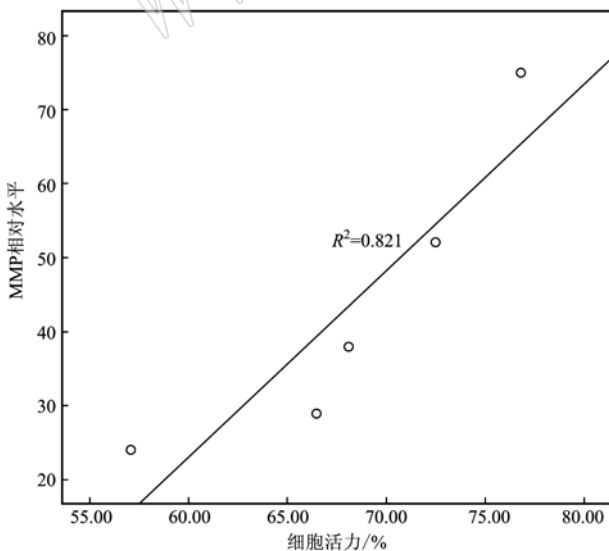


图8 不同浓度 PM_{2.5}作用于 A549 细胞 24 h 后细胞活力与 MMP 水平间的线性关系
Fig. 8 The linear relationship between A549 cell viability and MMP level after being exposed to different concentrations of PM_{2.5} for 24 h

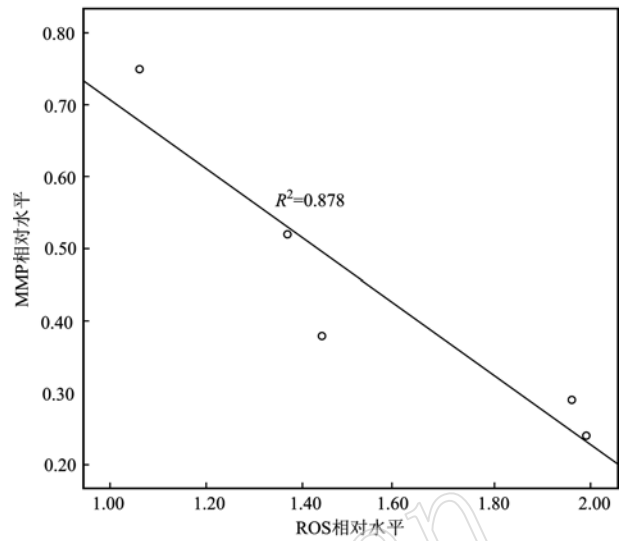


图9 不同浓度 PM_{2.5}作用于 A549 细胞 24 h 后细胞 ROS 水平与 MMP 水平间的线性关系
Fig. 9 The linear relationship between ROS and MMP level after exposure of A549 cells to different concentrations of PM_{2.5} for 24 h

3 讨论

近年来,随着全球经济和工业的快速发展,空气质量恶化情况备受关注,相关健康问题已成为时下研究热点之一。环境空气污染与 PM_{2.5}的浓度紧密相关,国际癌症研究机构已将 PM_{2.5}列为肺部致癌物,PM_{2.5}引起肺癌等一系列病理改变的确切机制尚不清楚,但可能与 ROS 产生所介导的细胞线粒体氧化损伤有关(Ghio *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015)。因此,基于本课题组前期研究结果,本次实验重点研究 PM_{2.5}对体外培养 A549 细胞线粒体的氧化损伤作用。

ROS 是细胞呼吸过程中产生的代谢产物及衍生物中的含氧物质的总称,通过测定 ROS 水平可反映细胞氧化应激效应。研究发现,PM_{2.5}作用于 A549 细胞后,胞内 ROS 产生过多超过机体可调控范围,诱导细胞核内激活态的转录因子(nuclear factor-kappa B, NF-κB)含量升高,通过促进炎症介质肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)聚集等途径可引起细胞氧化损伤(Guerra *et al.*, 2013)。本实验观察经 PM_{2.5}作用于 A549 细胞后,细胞形态被破坏,细胞增殖明显受抑,胞内 ROS 相对水平随暴露浓度增加而呈递增趋势,且胞内 ROS 水平增加程度

与细胞活力下降程度的具有显著相关性。提示当 PM_{2.5} 作用于 A549 细胞后, 可通过刺激胞内 ROS 产生, 造成细胞内氧化还原系统的启动, 直接干扰氧化及抗氧化系统的平衡, 抗氧化物质含量消耗或活性降低, 自由基清除系统功能下降, 使 ROS 在胞内聚集进一步诱导细胞发生氧化应激反应(Deng *et al.*, 2014)。

此外, 本实验 XRD 测试表明降尘 PM_{2.5} 主要物相为石英(SiO₂), SiO₂ 颗粒表面活性高, 可以产生 Si· 和 SiO·, 与表面吸附的金属离子等作用产生反应极性强的自由基。一方面, PM_{2.5} 可激活肺泡上皮细胞的一氧化氮合酶, 产生的一氧化氮(NO)与 ROS 中极不稳定的 O²⁻· 形成稳定的 ONOO⁻, 直接攻击富含不饱和脂肪酸的细胞膜及线粒体膜, 造成细胞膜选择透过性改变及线粒体膜通透性增加, 导致细胞线粒体损伤。另一方面, 自由基反应可刺激胞内 ROS 增加, 过多的 ROS 在线粒体中沉积, 细胞 MMP 水平降低, 膜势能改变, 进而破坏线粒体膜的完整性及稳定性, 造成并加重损害性氧化应激反应, 通过氧依赖杀伤途径诱导线粒体氧化损伤, 最终破坏细胞结构及功能(Diabaté *et al.*, 2011; 杨洁等, 2016)。

线粒体是 ROS 产生和氧化还原反应的主要细胞器。MMP 是由线粒体内膜两侧离子的分布差异造成的, 当 PM_{2.5} 作用于细胞时, 刺激产生的 ROS 可以诱导细胞线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)开放, 线粒体膜通透性增高或线粒体膜破裂, 一些大分子及离子进入线粒体, 导致线粒体肿胀, 线粒体 MMP 下降。本实验利用 PM_{2.5} 染毒 A549 细胞, JC-1 在线粒体基质聚集形成的聚合物解离, 以单体形式存在, 检测到红色荧光强度减弱, 绿色荧光强度增加, 计算红/绿荧光比表明出现了 MMP 降低(Lin *et al.*, 2012)。细胞 MMP 相对水平随染毒浓度增加而降低, 并且 MMP 水平降低程度与细胞活力下降程度相关性为 $R^2 = 0.821$, ROS 和 MMP 水平相关性 $R^2 = 0.878$ 。这与 Hu 等研究结果相符, 提示降尘 PM_{2.5} 作用于 A549 细胞后可能通过刺激 ROS 的产生, ROS 是促发 MPTP 开放的重要效应分子, 同时 MPTP 开放也进一步诱导 ROS 的产生, 这种类似正反馈的调节机制使 MMP 发生不可逆的下降, 造成细胞线粒体氧化损伤(曲秋莲等, 2010; Hu *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2015)。此外, MMP 水平降低是线粒体受损、细胞代谢及能量转换障碍的表现, 一方面诱导线粒体基质释放细

胞色素酶 C 等, 另一方面诱导内环境中 Ca²⁺ 稳态失衡, 线粒体内 Ca²⁺ 聚集沉积, 胞内 ROS、氧自由基及氧化合物等产生增多, 最终导致细胞及线粒体发生氧化损伤(Deng *et al.*, 2013)。

鉴于 ROS 和 MMP 的变化趋势, 提示随着 PM_{2.5} 作用浓度增加, 刺激 A549 细胞 ROS 产生增多, 不断消耗胞内抗氧化酶, 削弱细胞的抗氧化能力, A549 细胞氧化损伤越严重。同时线粒体 MMP 生成量增加, 导致线粒体膜氧化进程加快, 进而引起 A549 细胞的毒性损伤, 造成细胞存活力越低。细胞线粒体氧化应激促进 A549 细胞进一步损伤, 宏观表现为呼吸系统功能紊乱一系列呼吸系统疾病。

4 结论

(1) PM_{2.5} 降尘作用于 A549 细胞可抑制细胞增殖, 破坏细胞形态, 并存在剂量及时间依赖性关系。

(2) PM_{2.5} 降尘作用于 A549 细胞可通过刺激胞内 ROS 生成增多, 引起线粒体损伤及细胞 MMP 降低, 诱导细胞线粒体氧化损伤。

References

- Chen H, Goldberg M S and Villeneuve P J. 2011. A systematic review of the relation between long-term exposure to ambient air pollution and chronic diseases[J]. *Rev. Environ Health*, 23(4): 243 ~ 297.
- Deng X, Zhang F, Rui W, *et al.* 2013. PM_{2.5}-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 27(6): 1 762 ~ 1 770.
- Deng X, Zhang F, Wang L, *et al.* 2014. Airborne fine particulate matter induces multiple cell death pathways in human lung epithelial cells [J]. *Apoptosis*, 19(7): 1 099 ~ 1 112.
- Diabaté S, Bergfeldt B, Plaumann D, *et al.* 2011. Anti-oxidative and inflammatory responses induced by fly ash particles and carbon black in lung epithelial cells[J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 401(10): 3 197 ~ 3 212.
- Ghio A J, Carraway M S and Madden M C. 2012. Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells, tissues, and living systems[J]. *J. Toxicol Environ Health Part B.*, 15(1): 1 ~ 21.
- Guerra R, Vera-Aguilar E, Uribe -Ramirez M, *et al.* 2013. Exposure to inhaled particulate matter activates early markers of oxidative stress, inflammation and unfolded protein response in rat striatum[J]. *Tox-*

- icol Lett. , 222: 146 ~ 154.
- Hamra G B, Guha N, Cohen A, *et al.* 2014. Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. *Environ Health Perspect.* , 122(9): 906 ~ 911.
- Hu X, Zhang Z, Liu T, *et al.* 2015. Polypeptide Fraction from *Arca subrenata* Induces Apoptosis and G2/M Phase Arrest in HeLa Cells via ROS-Mediated MAPKs Pathways[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015: 1 ~ 12.
- Huo Tingting. 2013. Toxicity of A549 Cells in Typical Superfine Mineral Powders[D]. Southwest University of Science and Technology (in Chinese with English abstract).
- Jia Y Y, Wang Q and Liu T. 2017. Toxicity Research of PM_{2.5} Compositions in vitro[J]. *Int. J. Environ Res Public Health*, 14(3): 232 ~ 248.
- Kroll A, Gietl J K, Wiesmuller G A, *et al.* 2013. In vitro toxicology of ambient particulate matter: Correlation of cellular effects with particle size and components[J]. *Environ Toxicol*, 28(2): 76 ~ 86.
- Lin C J, Huang H C, Liu W J, *et al.* 2012. Biomedical imaging and visualization model of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in alzheimer disease[J]. *Appl. Mech. Mater.* , 138 ~ 139: 1 179 ~ 1 182.
- Liu Y, Chen Y Y, Cao J Y, *et al.* 2015. Oxidative stress, apoptosis, and cell cycle arrest are induced in primary fetal alveolar type II epithelial cells exposed to fine particulate matter from cooking oil fumes [J]. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* , 22(13): 9 728 ~ 9 741.
- Qu Qiulian and Zhang Yingge. 2010. Effects of three kinds of nano-particles on the mitochondrial membrane potential and level of reactive oxygen species in human gastric carcinoma cell line BGC-823[J]. *Bull. Acad. Mil. Med. Sci.* , 34(4): 306 ~ 308 (in Chinese with English abstract).
- Rodríguez-Cotto R I, Ortiz-Martínez M G, Rivera-Ramírez E, *et al.* 2013. African dust storms reaching puerto rican coast stimulate the secretion of IL-6 and IL-8 and cause cytotoxicity to human bronchial epithelial Cells (BEAS-2B)[J]. *Health*, 5(10B): 14 ~ 28.
- Yang Jie, Deng Jianjun, Liu Jinbo, *et al.* 2016. Research progress on lung toxicity mechanism of fine particulate matters[J]. *J. Environ. Occup. Med.* , 33(6): 615 ~ 619 (in Chinese with English abstract).
- Yuan X, Wang Y, Li L, *et al.* 2015. PM_{2.5} induces embryonic growth retardation: Potential involvement of ROS-MAPKs-apoptosis and G0/G1 arrest pathways[J]. *Environ. Toxicol.* , 31(12): 2 018 ~ 2 044.
- Zeng Y, Deng J, Huo T, *et al.* 2016. Assessment of genetic toxicity with major inhalable mineral granules in A549, cells[J]. *Appl. Clay Sci.* , 119: 175 ~ 182.

附中文参考文献

- 霍婷婷. 2013. 典型超细矿物粉体的 A549 细胞毒性作用研究[D]. 西南科技大学.
- 曲秋莲, 张英鸽. 2010. 3 种纳米颗粒对 BGC-823 细胞线粒体膜电位及细胞内活性氧水平的影响[J]. *军事医学*, 34(4): 306 ~ 308.
- 杨洁, 邓建军, 刘靳波, 等. 2016. PM_{2.5} 的肺毒性机制研究进展[J]. *环境与职业医学*, 33(6): 615 ~ 619.