

# PM<sub>2.5</sub>降尘对大鼠的急性肺损伤及复合维生素B的干预作用研究

唐兰兰<sup>1</sup>, 邓胤铭<sup>1</sup>, 付茜茜<sup>1</sup>, 扈正权<sup>3</sup>, 张青碧<sup>1</sup>, 霍婷婷<sup>2</sup>, 柏 珺<sup>1</sup>

(1. 西南医科大学 公共卫生学院, 四川 泸州 646000; 2. 西南科技大学 固体废物处理与资源化教育部重点实验室, 四川 绵阳 621000; 3. 泸州市环境监测中心站, 四川 泸州 646000)

**摘要:** 为探讨复合维生素B(叶酸、B<sub>6</sub>和B<sub>12</sub>)能否抑制PM<sub>2.5</sub>对大鼠的急性肺损伤作用,本研究将56只SD大鼠随机分成对照组、不同剂量(0.4、2.0、10.0 mg/mL)PM<sub>2.5</sub>染毒组和相应的复合维生素B干预组(0.02 mg/mL叶酸、1 mg/mL维生素B<sub>6</sub>、0.0025 mg/mL维生素B<sub>12</sub>),取肺组织进行HE染色观察组织病理学形态变化并进行病理学评分;收集支气管肺泡灌洗液(BALF)测定总蛋白(TP)、乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的含量。结果显示,PM<sub>2.5</sub>染毒能对大鼠肺组织造成不同程度的病理性损伤,复合维生素B能减缓此损伤;与对照组相比,低、中、高剂量的PM<sub>2.5</sub>染毒大鼠可引起BALF中LDH、AKP、ACP、TP和MDA含量显著升高( $P < 0.05$ ),而SOD和CAT活性显著降低( $P < 0.05$ ),且TP和MDA含量随染毒剂量的增加而升高( $P < 0.05$ ),CAT活性随染毒剂量的增加而降低;3个染毒剂量的复合维生素B干预组LDH、TP和MDA含量显著降低( $P < 0.05$ ),而SOD和CAT活性显著升高( $P < 0.05$ );PM<sub>2.5</sub>低、高剂量+复合维生素B组BALF中ACP含量显著降低( $P < 0.05$ );PM<sub>2.5</sub>中剂量+复合维生素B组BALF中ACP含量无显著改变;仅有PM<sub>2.5</sub>低剂量+复合维生素B组AKP含量降低( $P < 0.05$ ),其余干预组AKP含量无显著变化。因此认为,PM<sub>2.5</sub>降尘能打破机体的氧化-抗氧化平衡,造成大鼠急性肺损伤,而复合维生素B能减缓此损伤,对机体起到保护作用。

**关键词:** 复合维生素B; PM<sub>2.5</sub>降尘; 急性肺损伤; 干预

中图分类号: R135.2; P579

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2019)-0852-09

## Acute lung injury induced in rats by PM<sub>2.5</sub> dustfall exposure and its intervention effects by vitamin B complex

TANG Lan-lan<sup>1</sup>, DENG Yin-ming<sup>1</sup>, FU Qian-xi<sup>1</sup>, HU Zheng-quan<sup>3</sup>, ZHANG Qing-bi<sup>1</sup>, HUO Ting-ting<sup>2</sup> and BAI Jun<sup>1</sup>

(1. School of Public Health, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Key Laboratory of Solid Waste Treatment and Resource Recycle, Ministry of Education, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000, China; 3. Luzhou Environmental Monitoring Center Station, Luzhou 646000, China)

**Abstract:** To explore whether vitamin B complex (folic acid, B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub>) can inhibit the acute lung injury of PM<sub>2.5</sub> in rats, the authors randomly divided 56 SD rats into control group, different doses (0.4, 2.0, 10.0

收稿日期: 2019-07-02; 接受日期: 2019-10-10; 编辑: 郝艳丽

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(41831285); 泸州市-西南医科大学联合项目(2017LZXNYD-J24); 四川省教育厅科研项目(17ZA0431); 西南医科大学基金资助计划(2017-ZRQN-002); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201710632054, 201810632097)

作者简介: 唐兰兰(1993-), 女, 汉族, 硕士研究生, 研究方向: 劳动卫生与环境卫生, E-mail: 1219750486@qq.com; 通讯作者: 柏珺, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 环境污染健康效应研究, E-mail: baijunjill@gmail.com。

mg/mL) of PM<sub>2.5</sub> exposure groups and corresponding vitamin B complex intervention groups (0.02 mg/mL folic acid, 1 mg/mL vitamin B<sub>6</sub>, 0.002 5 mg/mL vitamin B<sub>12</sub>). The lung tissue of rats was taken for HE staining to observe histopathological changes and calculate pathological scores. The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected to determine the content of total protein (TP), lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (AKP), acid phosphatase (ACP), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and Catalase (CAT). The results showed that PM<sub>2.5</sub> exposure could cause different degrees of pathological damages of lung tissue in rats, and vitamin B complex could alleviate those damages. Compared with the control group, the content of LDH, AKP, ACP, TP and MDA in BALF of low, medium and high dose of PM<sub>2.5</sub> groups significantly increased ( $P < 0.05$ ), while the activity of SOD and CAT significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The content of TP and MDA increased with the increase of PM<sub>2.5</sub> doses ( $P < 0.05$ ). The content of LDH, TP and MDA significantly decreased in the intervention groups of three PM<sub>2.5</sub> doses ( $P < 0.05$ ), while SOD and CAT activity significantly increased ( $P < 0.05$ ). The content of ACP was significantly reduced in BALF in low and high dose of PM<sub>2.5</sub> + vitamin B complex groups ( $P < 0.05$ ). There was no significant change in ACP content in BALF in the medium dose of PM<sub>2.5</sub> + vitamin B complex group. Only the low dose of PM<sub>2.5</sub> + vitamin B complex group exhibited a decrease in AKP content ( $P < 0.05$ ), and the other intervention groups showed no significant change in AKP content. Therefore, it is held that PM<sub>2.5</sub> could break the pulmonary oxidation-antioxidant balance to cause acute lung injury in rats, while vitamin B complex could alleviate the damage to protect the body.

**Key words:** vitamin B complex; PM<sub>2.5</sub> dustfall; acute lung injury; intervention effects

**Found support:** National Natural Science Foundation of China (41831285); Collaborative Fund of Luzhou Government and Southwest Medical University (2017LZXNYD-J24); Research Project of Education Department of Sichuan Province (17ZA0431); Fund Project of Southwest Medical University (2017-ZRQN-002); National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (201710632054, 201810632097)

大气颗粒物 PM<sub>2.5</sub> 由于具有粒径小、比表面积大和易吸附空气中有毒有害物质的特点,会对人体造成严重危害。大量研究结果显示,空气中 PM<sub>2.5</sub> 的浓度与呼吸系统疾病、哮喘和冠状动脉粥样硬化等的发病率、死亡率有紧密的联系 (Anderson *et al.*, 2012; Gehring *et al.*, 2015; Jacquemin *et al.*, 2015)。PM<sub>2.5</sub> 能深入肺部细支气管和肺泡,从而刺激机体肺部或全身发生炎症和氧化应激 (Brook *et al.*, 2010; 章如新等, 2017; 鹿奎奎等, 2017), 造成肺部损伤。由此可见, PM<sub>2.5</sub> 对人健康的影响非常严重, 应受到广泛关注。但仅靠环境污染治理难以在短时间内有所成效, 因此, 寻找合理有效的抗 PM<sub>2.5</sub> 损伤的物质就很有必要。现今, 已有维生素 E (李莉珊等, 2016)、红景天 (刘平安等, 2015)、富硒酵母 (刘洁等, 2017) 和阿胶 (Liu *et al.*, 2018) 等具有抗炎、抗氧化物质引入了干预 PM<sub>2.5</sub> 损伤的研究中。有研究表明, PM<sub>2.5</sub> 暴露能使 DNA 的甲基化发生改变, 而这些改变被认为可能是 PM<sub>2.5</sub> 诱导机体炎症和氧化应激的基础 (Baccarelli *et al.*, 2009; Panni *et al.*, 2016)。而 DNA 甲基化依赖于能够提供甲基的营养

素 (如 B 族维生素的叶酸、B<sub>6</sub>、B<sub>12</sub>、蛋氨酸等氨基酸) (Ramchandani *et al.*, 1999; Dolinoy *et al.*, 2006; Cropley *et al.*, 2007)。因此, 如果能防止异常的 DNA 甲基化或许能够抑制 PM<sub>2.5</sub> 暴露导致的肺部损伤。B 族维生素已用在许多肺部疾病的治疗中, 但用于干预 PM<sub>2.5</sub> 暴露对机体损伤的研究还很少。Zhong 等 (2017) 对人群的研究结果显示复合维生素 B 的补充能够阻止 PM<sub>2.5</sub> 暴露导致的线粒体 DNA 甲基化的改变, 但维生素 B 能否最终减缓 PM<sub>2.5</sub> 导致的急性肺损伤还需进一步研究。

本研究拟用 PM<sub>2.5</sub> 降尘对 SD 大鼠进行多次非暴露式气管滴注染毒, 给予复合维生素 B (叶酸、B<sub>6</sub> 和 B<sub>12</sub>) 灌胃干预, 观察大鼠肺部病理变化, 收集支气管肺泡灌洗液测定总蛋白 (TP)、乳酸脱氢酶 (LDH)、酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 等指标, 从而进一步观察大鼠肺损伤程度的变化, 分析复合维生素 B 对 PM<sub>2.5</sub> 所致大鼠肺损伤的保护作用及可能机制, 为 B 族维生素应用于预防 PM<sub>2.5</sub> 对健康造成影响提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要仪器与试剂

主要仪器有7200型分光光度计(优尼柯上海仪器有限公司, FJ7200)、酶标仪(Thermo Multiskan Spectrum)、5810R冷冻离心机(Eppendorf, 5810R)、数字切片扫描系统(3D Hiestech, Panoramic 250), 试剂包括总蛋白(TP)、乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

#### 1.1.2 实验动物

选用8~10周龄的雄性SD大鼠56只, 体重180~200 g, 购自西南医科大学实验动物中心[许可证号: SYXK(川)2018-065]。饲养于西南医科大学实验动物中心SPF级动物实验室, 自由饮食饮水, 饲养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 相对湿度 $50 \pm 5\%$ , 昼夜节律为12 h昼夜交替, 适应性饲养1周以上。所有的动物研究经西南医科大学动物保护与实验伦理委员会批准。

#### 1.1.3 $\text{PM}_{2.5}$ 降尘的采集与悬液制备

$\text{PM}_{2.5}$ 降尘样本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。将收集到的 $\text{PM}_{2.5}$ 降尘使用卧式行星球磨机(转速40 Hz)于乙醇中研磨8 h后, 采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, 结果显示大部分粉尘粒径 $\leq 2.5 \mu\text{m}$ , 符合本实验要求粒度。采用X射线衍射仪对样本的物相分析结果显示降尘中主要物相为石英(杨洁等, 2017)。将收集到的 $\text{PM}_{2.5}$ 降尘与无菌生理盐水混合配制成浓度为0.4、2.0、10.0 mg/mL的 $\text{PM}_{2.5}$ 悬液, 低温避光保存, 使用前超声30 min混匀后使用。

#### 1.1.4 复合维生素B的配制

干预组复合维生素B的浓度参考Zhong等(2017)的研究。每片复合维生素B(Webber Naturals, 加拿大产)含1 mg叶酸、50 mg维生素 $\text{B}_6$ 、125  $\mu\text{g}$ 维生素 $\text{B}_{12}$ , 溶于50 mL纯净水, 配得维生素B干预浓度为0.02 mg/mL叶酸、1 mg/mL维生素 $\text{B}_6$ 、0.0025 mg/mL维生素 $\text{B}_{12}$ 。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大鼠分组与染毒

设对照组、 $\text{PM}_{2.5}$ 低剂量组(0.4 mg/mL)、 $\text{PM}_{2.5}$ 中剂量组(2.0 mg/mL)、 $\text{PM}_{2.5}$ 高剂量组(10.0 mg/

mL)、 $\text{PM}_{2.5}$ 低剂量+复合维生素B组、 $\text{PM}_{2.5}$ 中剂量+复合维生素B组和 $\text{PM}_{2.5}$ 高剂量+复合维生素B组, 每组大鼠8只, 共56只。干预组和 $\text{PM}_{2.5}$ 组分别以0.01 mL/g的量对大鼠灌胃复合维生素B和纯净水28天后, 腹腔注射2%戊巴比妥钠0.25 mL/100 g麻醉大鼠, 采用非暴露式气管滴注(柏珺等, 2017)进行 $\text{PM}_{2.5}$ 染毒, 共3次, 每次0.5 mL, 每次间隔24 h, 染毒期间继续使用复合维生素B或纯净水灌胃。空白对照组用无菌生理盐水滴注和纯净水灌胃。

#### 1.2.2 样本采集及处理

末次染毒后24 h将大鼠麻醉仰卧固定, 打开胸腔, 暴露气管, 灌洗左肺收集支气管肺泡灌洗液(BALF)(柏珺等, 2017), 1 000 r/min离心10 min, 收集上清液于塑料离心管中, 分装标记置于 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。取右侧肺叶支气管周围肺组织, 经生理盐水反复冲洗后, 置于福尔马林缓冲液固定, 石蜡包埋后切片, 经HE(苏木素-伊红)染色, 用数字切片扫描系统(Panoramic 250)观察肺组织损伤和炎性细胞浸润情况。

为进一步明确各处理组大鼠肺损伤的病理分级, 根据Szarka等(1997)建立的病理学分级标准, 将肺损伤状况分为0~V级, 分级标准如表1所示。

表1 急性肺损伤病理学评分标准

Table 1 Pathological scoring criteria for acute lung injury

分级	评分依据
0	肺泡壁完好, 无增厚, 无炎性浸润, 无充血
I	肺泡壁轻微弥漫性炎性细胞浸润(中性粒细胞), 肺泡壁未见增厚
II	明显和广泛的炎性细胞浸润, 肺泡壁轻微增厚(1~2倍)
III	严重的炎性细胞浸润, 个别区域肺泡壁增厚(2~3倍)
IV	严重的炎性细胞浸润, 肺泡壁明显增厚, >25%肺组织实化
V	严重的炎性细胞浸润, 肺泡壁明显增厚, >50%肺组织实化

每个剂量组选取8张病理切片, 每片镜下分别截取2张200倍彩图照片, 基于炎性细胞浸润程度以及肺泡壁增厚程度等病理指标进行评分, 评分过程中严格采用双盲法进行病理分级。

#### 1.2.3 BALF中TP、LDH、AKP、ACP、MDA、SOD和CAT的测定

用考马斯亮蓝法、2,4-二硝基苯肼比色法、分光光度法、硫代巴比妥酸法、黄嘌呤氧化酶法和钼酸铵法分别测定BALF中的TP、LDH、AKP、ACP、MDA、SOD和CAT的含量。测试按试剂盒说明书操作(南京建成生物工程研究所)。

### 1.3 数据处理与分析

采用 SPSS 20.0 进行数据统计分析, 定量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 染毒组与干预组的均数差异用 *t* 检验, 各染毒组间均数的差异用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间两两比较方差齐者采用 LSD 检验法, 方差不齐者用 Dunnett T3 检验。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肺组织病理学形态改变

不同剂量的 PM<sub>2.5</sub> 对肺组织形态学的改变和复合维生素 B 干预 PM<sub>2.5</sub> 所致肺损伤的结果见图 1。对

照组结构清晰, 形态正常 (图 1a); PM<sub>2.5</sub> 各剂量组有炎性细胞浸润、肺间隔增宽, 部分肺泡塌陷、融合等不同程度病理性改变, 且随染毒剂量的增加而逐渐加重 (图 1b、1d、1f 箭头所示); 而 PM<sub>2.5</sub> 各剂量对应的复合维生素 B 干预组中炎性细胞浸润均有所减少, 肺间隔及肺泡塌陷、融合等病理改变有不同程度的减轻 (图 1c、1e、1g 箭头所示)。

### 2.2 大鼠肺组织病理分级

各处理大鼠肺组织病理分级结果见表 2, 秩和检验结果显示总体差异有统计学意义。与空白对照组相比, PM<sub>2.5</sub> 各剂量染毒组的秩均值均升高, 且随染毒剂量的增加而逐渐升高 ( $P < 0.05$ ); PM<sub>2.5</sub> 中、高剂量 + 复合维生素 B 组与其对应的染毒组相比, 秩均值

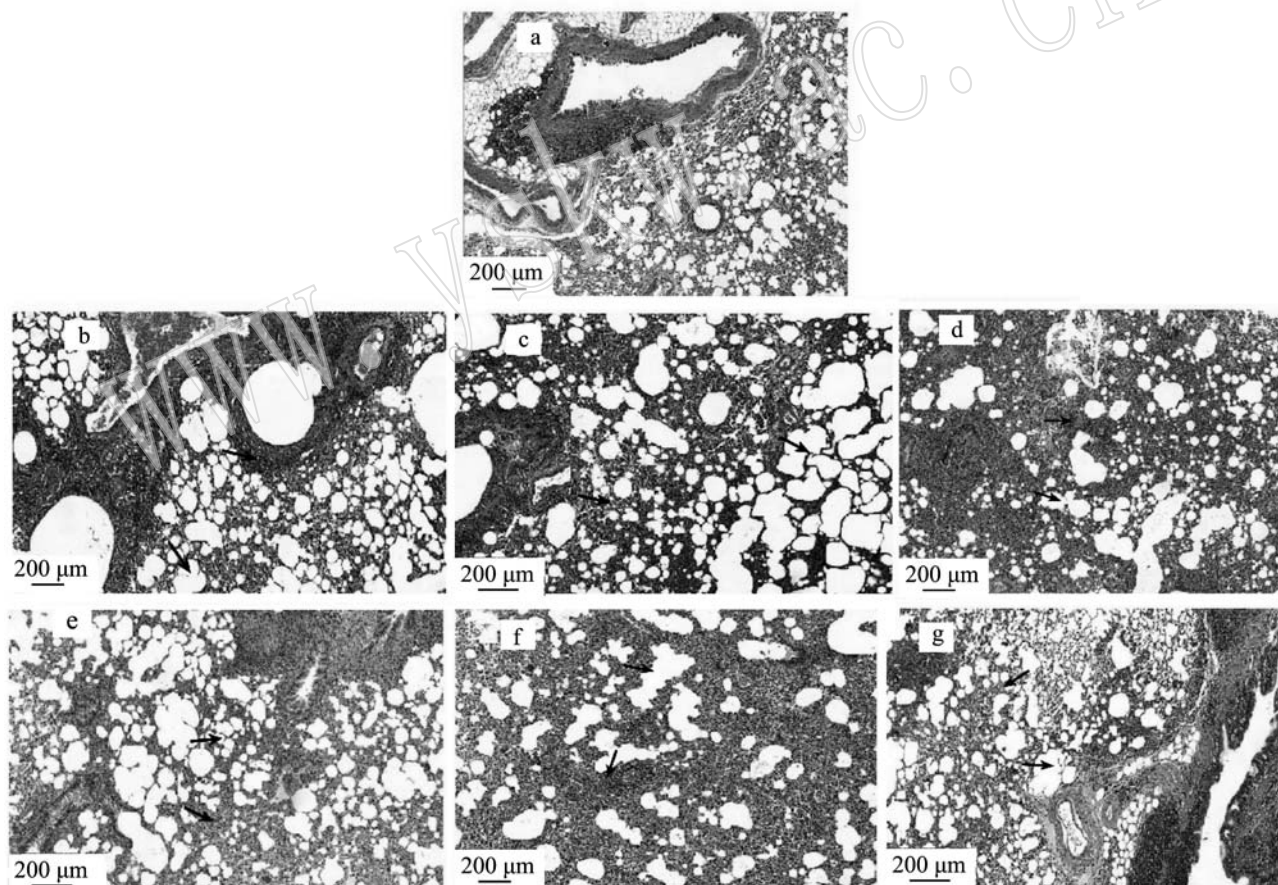


图 1 大鼠肺组织病理学形态改变

Fig. 1 The histopathologic change of rats' lung tissues

a—空白对照组; b—PM<sub>2.5</sub> 低剂量组; c—PM<sub>2.5</sub> 低剂量 + 复合维生素 B 组; d—PM<sub>2.5</sub> 中剂量组; e—PM<sub>2.5</sub> 中剂量 + 复合维生素 B 组;  
f—PM<sub>2.5</sub> 高剂量组; g—PM<sub>2.5</sub> 高剂量 + 复合维生素 B 组  
a—control group; b—low dose of PM<sub>2.5</sub> group; c—low dose of PM<sub>2.5</sub> + vitamin B complex group; d—medium dose of PM<sub>2.5</sub> group; e—medium  
dose of PM<sub>2.5</sub> + vitamin B complex group; f—high dose of PM<sub>2.5</sub> group; g—high dose of PM<sub>2.5</sub> + vitamin B complex group

表2 大鼠急性肺损伤的组织病理分级

Table 2 Histopathological grading of acute lung injury in rats

分组	病理分级						秩均值
	0	I	II	III	IV	V	
空白对照组	4	4	0	0	0	0	8.5
PM <sub>2.5</sub> 低剂量组(0.4 mg/mL)	0	3	4	1	0	0	26.94*
PM <sub>2.5</sub> 低剂量+复合维生素B组	0	5	3	0	0	0	21.06
PM <sub>2.5</sub> 中剂量组(2 mg/mL)	0	1	2	3	2	0	39.19*#
PM <sub>2.5</sub> 中剂量+复合维生素B组	0	4	3	1	0	0	24.75&
PM <sub>2.5</sub> 高剂量组(10.0 mg/mL)	0	0	1	1	4	2	49.13*#&
PM <sub>2.5</sub> 高剂量+复合维生素B组	0	3	2	3	0	0	29.94\$

\*—与空白对照组相比有显著差异; #—与PM<sub>2.5</sub>低剂量组相比有显著差异; &—与PM<sub>2.5</sub>中剂量组相比有显著差异; \$—与PM<sub>2.5</sub>高剂量组相比有显著差异( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ )。

显著降低( $P < 0.05$ ), 而PM<sub>2.5</sub>低剂量+复合维生素B组与其对应的染毒组相比, 秩均值无显著差异。

### 2.3 大鼠BALF中TP、LDH、ACP和AKP的含量变化

不同剂量的PM<sub>2.5</sub>及其对应的复合维生素B处理对大鼠BALF中TP、LDH、ACP和AKP含量变化的影响如图2所示。与对照组相比, 低、中、高剂量的PM<sub>2.5</sub>暴露可引起大鼠BALF中LDH、AKP、ACP

和TP含量显著升高( $P < 0.05$ ), 且TP含量随染毒剂量的增加而升高( $P < 0.05$ ); PM<sub>2.5</sub>低、中、高剂量+复合维生素B组的LDH和TP含量显著降低( $P < 0.05$ ); PM<sub>2.5</sub>低、高剂量+复合维生素B组BALF中ACP含量显著降低( $P < 0.05$ ); PM<sub>2.5</sub>中剂量+复合维生素B组BALF中ACP含量无显著改变; 仅有PM<sub>2.5</sub>低剂量+复合维生素B组AKP含量降低( $P < 0.05$ ), 其余干预组AKP含量无显著变化。

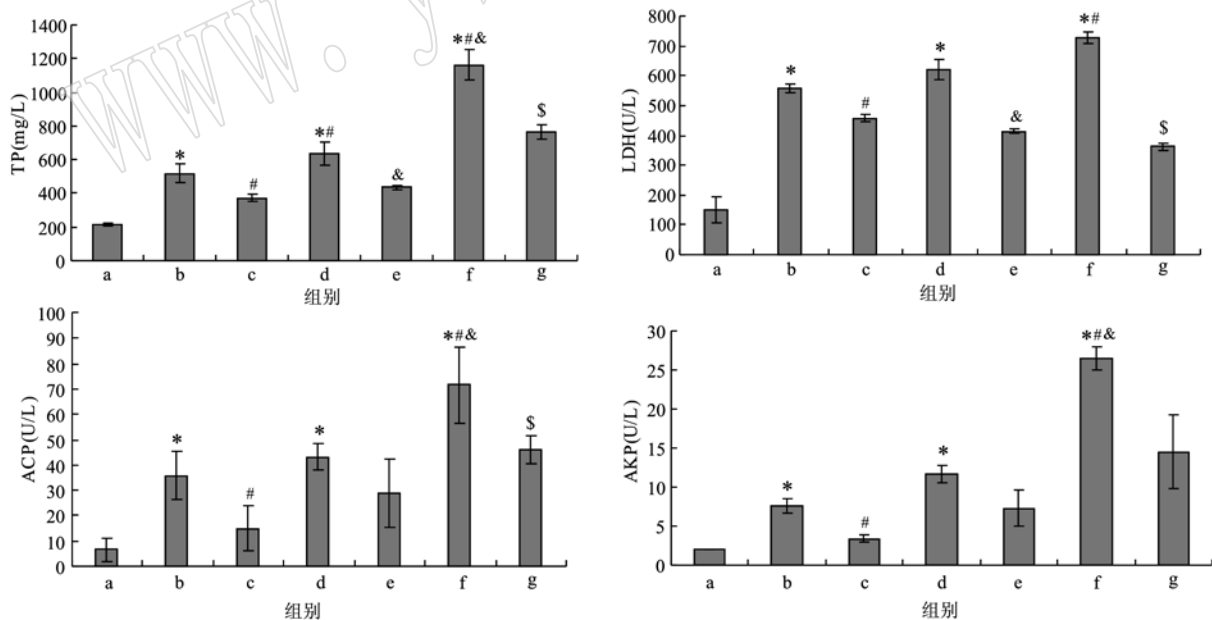


图2 大鼠BALF中TP、LDH、ACP和AKP的含量

Fig. 2 The content of TP, LDH, ACP and AKP in BALF

\*—与空白对照组相比有显著差异; #—与PM<sub>2.5</sub>低剂量组相比有显著差异; &—与PM<sub>2.5</sub>中剂量组相比有显著差异; \$—与PM<sub>2.5</sub>高剂量组相比有显著差异( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ )

\*—significant difference compared with the control group; #—significant difference compared with the low dose of PM<sub>2.5</sub> group; &—significant difference compared with the medium dose of PM<sub>2.5</sub> group; \$—significant difference compared with the high dose of PM<sub>2.5</sub> group ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ )

## 2.4 大鼠 BALF 中 SOD、MDA 和 CAT 的含量变化

不同剂量的 PM<sub>2.5</sub> 及其对应的复合维生素 B 处理对大鼠 BALF 中 MDA、SOD 和 CAT 的含量变化的影响如图 3 所示。与对照组相比,低、中、高剂量的 PM<sub>2.5</sub> 染毒可引起大鼠 BALF 中 MDA 含量显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而 SOD 和 CAT 活性显著降低

( $P < 0.05$ ), 且 MDA 含量随染毒剂量的增加而升高 ( $P < 0.05$ ), CAT 活性随染毒剂量的增加而降低 ( $P < 0.05$ ); PM<sub>2.5</sub> 低、中、高剂量 + 复合维生素 B 组中 MDA 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而 SOD 和 CAT 活性显著升高 ( $P < 0.05$ )。

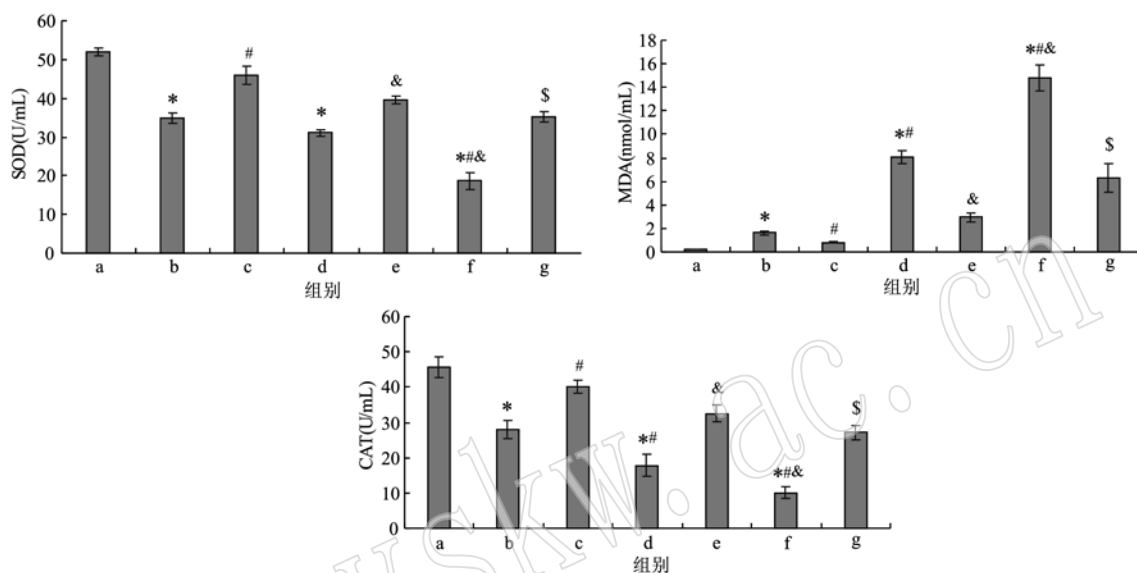


图3 BALF 中 SOD、MDA 和 CAT 的含量

Fig. 3 The content of SOD, MDA and CAT in BALF

\*—与空白对照组相比有显著差异; #—与 PM<sub>2.5</sub> 低剂量组相比有显著差异; &—与 PM<sub>2.5</sub> 中剂量组相比有显著差异;

\$—与 PM<sub>2.5</sub> 高剂量组相比有显著差异 ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ )

\*—significant difference compared with the control group; #—significant difference compared with the low dose of PM<sub>2.5</sub> group; &—significant difference compared with the medium dose of PM<sub>2.5</sub> group; \$—significant difference compared with the high dose of PM<sub>2.5</sub> group ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ )

## 3 讨论

PM<sub>2.5</sub> 粒径小,比表面积大,易于富集空气中的有毒有害物质,通过呼吸道进入肺泡并沉积,通过肺泡入血,随血液流经全身,引起肺部和全身发生炎症反应和氧化应激。急性肺损伤(刘平安等, 2015)是各种直接或间接因素导致肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞损伤,主要特征为弥漫性肺间质和肺泡水肿,严重时可导致急性呼吸窘迫综合征,至今仍缺乏有效治疗方法。因此,寻找合理有效的抗 PM<sub>2.5</sub> 损伤的物质就很有必要。本研究采用 PM<sub>2.5</sub> 降尘对 SD 大鼠进行多次非暴露式气管滴注染毒,并给予复合维生素 B(叶酸、B<sub>6</sub> 和 B<sub>12</sub>)灌胃干预,探讨复合维生素 B 能否对 PM<sub>2.5</sub> 所致大鼠急性肺损伤起到保护作用。

TP 主要来源于血浆渗出,是一种渗透性标志

物,它的水平能够反映肺部血管通透性的破坏程度,TP 的升高提示肺泡上皮-毛细血管屏障的完整性受到损伤(钱春燕等, 2011),血浆中的总蛋白、白蛋白大量释放。LDH 和 AKP 是细胞毒性标志物,LDH 属于胞浆酶,它的升高是反映细胞膜损伤的早期敏感指标;AKP 是由肺泡 II 型细胞产生,被认为是肺泡 II 型细胞损伤或增生的一个特异性的生物标志,当细胞膜损伤或者细胞死亡溶解后,体内的生物酶 LDH、AKP 会大量释放(杨凌, 2014)。ACP 是一种溶酶体酶,主要存在于巨噬细胞中,参与肺部的防御反应,当外界异物侵入肺部时,肺巨噬细胞因发挥吞噬作用而崩解,大量的 ACP 就会进入肺泡灌洗液(钱春燕等, 2011)。本研究结果显示,PM<sub>2.5</sub> 染毒后,BALF 中 ACP、AKP、LDH 和 TP 的含量明显增加,肺部出现炎性细胞浸润、肺间隔增宽,部分肺泡塌陷、融合等病理改变,10.0 mg/mL 的 PM<sub>2.5</sub> 染毒造成的肺组织



病理学形态改变最为严重。在取材过程中还发现各组肺组织均有不同程度水肿,病理等级也随染毒剂量的增加呈逐渐加重的趋势,说明  $PM_{2.5}$  进入肺部后改变肺泡 II 型细胞和巨噬细胞细胞膜通透性或使细胞死亡,导致各种细胞酶渗出增加,还能破坏肺泡上皮-毛细血管屏障,造成肺水肿 (Matthay *et al.*, 2002),甚至使肺泡结构被破坏,最终导致急性肺损伤发生。而复合维生素 B 的干预使各染毒剂量的大鼠 BALF 中的 ACP、AKP、LDH 和 TP 的含量均呈现降低的趋势,肺组织水肿和病理损伤均有所缓解,降低肺组织病理学评分,减缓肺损伤。

上述反应可以在一定程度上造成肺损伤,氧化应激同样也是介导肺损伤的重要途径。当机体受到氧化损伤时,会刺激机体内的抗氧化防御系统,使机体氧化/抗氧化处于平衡状态。有研究表明,当给大鼠肺部滴注  $PM_{2.5}$  悬液后,由于  $PM_{2.5}$  成分中含有大量的重金属元素,可以使机体产生过量的自由基,当机体清除自由基的能力无法代偿时,就会产生氧化损伤,使肺泡上皮和血管内皮细胞产生 MDA 和 NO 等,同时相关的抗氧化酶如 SOD 和 CAT 的含量或活力降低,加速脂质过氧化 (Gomes and Negrato, 2014),造成氧化应激,导致机体损伤 (Geng *et al.*, 2013; 张岳, 2016)。MDA 是脂质过氧化过程中的重要中间产物,是反映机体氧化损伤严重程度的常用指标,SOD 和 CAT 是反映机体清除氧自由基能力的指标,这 3 个指标常常配合用来反映机体的氧化应激水平 (舒琴, 2013; 杨一兵, 2018)。本研究结果显示,不同浓度的  $PM_{2.5}$  染毒可以使肺泡灌洗液中 MDA 含量显著升高,且随染毒剂量的增加而升高,SOD 和 CAT 活性显著降低,且 CAT 活性随染毒剂量的增加而降低。此结果与之前的研究结果一致 (Maciejczyk *et al.*, 2010; Gomes and Negrato, 2014; 李莉珊等, 2016; 周艳丽等, 2017; 戚子云等, 2019)。这表明当大鼠吸入  $PM_{2.5}$  后,肺部氧化和抗氧化平衡被打破,肺泡上皮细胞和血管内皮细胞受到损伤,细胞膜通透性增加,最终引起肺损伤。而复合维生素 B 的干预能在一定程度上逆转此氧化应激,使 MDA 的含量呈降低的趋势,SOD 和 CAT 的活力也明显升高。B 族维生素是所有人体组织必不可少的水溶性维生素,人体无法自行制造合成,必须额外补充,广泛存在于各种食物中。有研究表明,B 族维生素中的叶酸可以通过调控甲基转移酶的活性,刺激 DNMTs 的 mRNA 和蛋白表达,提高 DNA 总甲基化水

平,进而影响疾病的发生发展 (Wen *et al.*, 2015)。叶酸也可在体内经一碳循环转化为 SAM。SAM 是体内活性甲基的主要供体,直接参与 DNA 甲基化反应,进而参与调控相关基因表达。维生素  $B_6$  和  $B_{12}$  是这一代谢中必要的辅酶因子,其中任意一个的缺乏都会使代谢循环发生紊乱,进而影响 DNA 甲基化。有研究表明,异常的 DNA 甲基化与许多疾病的发生发展有关 (Husni *et al.*, 2016)。因此,此 3 种 B 族维生素联合使用也许可以阻止  $PM_{2.5}$  暴露导致的 DNA 甲基化的改变,从而减少  $PM_{2.5}$  暴露对机体的损伤作用,但有关作用机制有待进一步研究。

## 4 结论

(1)  $PM_{2.5}$  降尘能够破坏肺泡上皮-毛细血管屏障和肺泡上皮细胞,刺激机体产生过量的自由基,打破机体氧化和抗氧化平衡体系,造成大鼠急性肺损伤。

(2) 复合维生素 B 能够减轻  $PM_{2.5}$  暴露造成的急性肺损伤,对机体起到一定保护作用。

## References

- Anderson J O, Thundiyil J G, Stolbach A, *et al.* 2012. Clearing the air: A review of the effects of particulate matter air pollution on human health[J]. *Journal of Medical Toxicology*, 8(2): 166 ~ 175.
- Bai Jun, Cui Yan, Zhang Qingbi, *et al.* 2017. The lung injury induced by chrysotile asbestos in rats based on the multiple non-exposed intratrache[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 36(6): 916 ~ 924 (in Chinese with English abstract).
- Baccarelli A, Wright R O, Bollati V, *et al.* 2009. Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(7): 572 ~ 578.
- Brook R D, Rajagopalan S, Pope C A, *et al.* 2010. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease[J]. *Circulation*, 121(21): 2331 ~ 2378.
- Cropley J E, Suter C M, Martin D I K, *et al.* 2007. Methyl donors change the germline epigenetic state of the Avy allele[J]. *Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(12): 3021 ~ 3022.
- Dolinoy D C, Weidman J R, Waterland R A, *et al.* 2006. Maternal genistein alters coat color and protects avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome[J]. *Environmental Health Per-*

- spectives, 114(4): 567 ~ 572.
- Gehring U, Beelen R, Eeftens M, *et al.* 2015. Particulate matter composition and respiratory health: The PIAMA birth cohort study[J]. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 26(3): 300 ~ 309.
- Geng N, Wang J, Xu Y, *et al.* 2013. PM<sub>2.5</sub> in an industrial district of Zhengzhou, China: Chemical composition and source apportionment [J]. *Particology*, 11(1): 99 ~ 109.
- Gomes M B and Negrato C A. 2014. Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases[J]. *Diabetol Metab Syndr*, 6(1): 80.
- Husni R E, Shiba-Ishii A, Iiyama S, *et al.* 2016. DNMT 3a expression pattern and its prognostic value in lung adenocarcinoma[J]. *Lung Cancer*, 97: 59 ~ 65.
- Li Lishan, Ma Qiongjin, Yang Ling, *et al.* 2016. Effects of vitamin E on lung injury caused by PM<sub>2.5</sub> acute exposure in rats[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 38(3): 256 ~ 258 (in Chinese with English abstract).
- Liu Jie, Zeng Xuejiao, Yang Yingying, *et al.* 2017. Intervention effects of selenium yeast on fine particulate matters-induced lung injury in rats[J]. *Journal of Hygiene Research*, 46(2): 219 ~ 224, 231 (in Chinese with English abstract).
- Liu Ping'an, Mo Yang, Zhang Guomin, *et al.* 2015. Study of effects of rhodiola rosea on rats of acute lung injury induced by fine particles PM<sub>2.5</sub>[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine University of Hunan*, 35(7): 5 ~ 7 (in Chinese with English abstract).
- Liu T, Zhang P, Ling Y, *et al.* 2018. Protective effect of colla corii asini against lung injuries induced by intratracheal instillation of artificial fine particles in rats[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1): 55.
- Lu Kuikui, Ling Min, Bian Qian, *et al.* 2017. Atmospheric fine particles induce oxidative stress and inflammatory reaction in respiratory systems[J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 31(6): 682 ~ 688 (in Chinese with English abstract).
- Jacquemin B, Siroux V, Sanchez M, *et al.* 2015. Ambient air pollution and adult asthma incidence in six European cohorts (ESCAPE)[J]. *Environmental Health Perspectives*, 123(6): 613 ~ 621.
- Maciejczyk P, Zhong M, Lippmann M, *et al.* 2010. Oxidant generation capacity of source-apportioned PM<sub>2.5</sub>[J]. *Inhal. Toxicol*, 22(Suppl. 2): 29 ~ 36.
- Matthay M, Folkesson H, Clerici C, *et al.* 2002. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema[J]. *Physiological Reviews*, 82(3): 569 ~ 600.
- Panni T, Mehta A, Schwartz J, *et al.* 2016. A genome-wide analysis of DNA methylation and fine particulate matter air pollution in three study populations: KORA F3, KORA F4, and the Normative Aging Study[J]. *Environmental Health Perspectives*, 124(7): 983 ~ 990.
- Qi Ziyun, Wei Aisheng, Zhang Shuchang, *et al.* 2019. Effect of modified shashen maidong decoction on insulin resistance, inflammatory reaction and oxidat[J]. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*, (5): 724 ~ 728 (in Chinese with English abstract).
- Qian Chunyan, Li li, Gao Zhiyi, *et al.* 2011. Pneumotoxicity and hematotoxicity of airborne fine particles and lead compounds on rats[J]. *Journal of Environmental and Occupational Medicine*, 28(1): 20 ~ 24 (in Chinese with English abstract).
- Ramchandani S, Bhattacharya S, Cervoni N, *et al.* 1999. DNA methylation is a reversible biological signal[J]. *PNAS*, 96(11): 6 107 ~ 6 112.
- Shu Qin. 2013. Effects of konjac powder on serum and MDA, SOD in the liver of rats with hyperlipidemia[J]. *Henan Traditional Chinese Medicine*, 33(9): 1 433 ~ 1 434 (in Chinese with English abstract).
- Szarka R J, Wang N, Gordon L, *et al.* 1997. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation [J]. *The Journal of Immunology*, 202: 49 ~ 57.
- Wen L, Mingyue J, Shijing Z, *et al.* 2015. Folic acid inhibits amyloid  $\beta$ -peptide production through modulating DNA methyltransferase activity in N2a-APP cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10): 25 002 ~ 25 013.
- Yang Jie, Huo Tingting, Wang Yulin, *et al.* 2017. Mechanism of G2/M phase arrest in A549 cells induced by PM<sub>2.5</sub> dust-fall[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 36(6): 894 ~ 902 (in Chinese with English abstract).
- Yang Ling. 2014. Study on Effects and Immune Mechanism of Acute and Sub-chronic Exposure of PM<sub>2.5</sub> on Lung in Mice[D]. Fudan University (in Chinese with English abstract).
- Yang Yibing. 2018. Study on the Association between PM<sub>2.5</sub> Exposure and JAK/STAT Signaling Pathway Activation and Related Inflammatory Cytokines Expression in Patients with Allergic Rhinitis[D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention (in Chinese with English abstract).
- Zhang Ruxin and Guo Zhiqiang. 2017. The relationship between PM<sub>2.5</sub> and allergic rhinitis[J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology-skull Base Surgery*, 23(1): 1 ~ 4 (in Chinese with English abstract).
- Zhang Yue. 2016. Protective effect of tanreqing injection on acute lung



- injury tats induced by lipopolysaccharide[J]. *Clinical Journal of Traditional Chinese Medicine*, 28(1): 102 ~ 104 (in Chinese with English abstract).
- Zhou Yanli, Lao Wenyan, Ruan Yanshuo, *et al.* 2017. Protective effect of ferulic acid on lung injury induced by PM<sub>2.5</sub> in rats[J]. *Food Science*, 37(1): 244 ~ 246 (in Chinese with English abstract).
- Zhong J, Karlsson O, Wang G, *et al.* 2017. B vitamins attenuate the epigenetic effects of ambient fine particles in a pilot human intervention trial[J]. *PNAS*, 114(13): 3 503 ~ 3 508.
- ### 附中文参考文献
- 柏 珺, 崔 琰, 张青碧, 等. 2017. 基于多次非暴露式气管滴注的染毒法研究温石棉致大鼠肺损伤的作用[J]. *岩石矿物学杂志*, 36(6): 916 ~ 924.
- 李莉珊, 马琼锦, 杨 凌, 等. 2016. 维生素 E 对 PM<sub>2.5</sub> 急性染毒引起的大鼠肺损伤的影响[J]. *营养学报*, 38(3): 256 ~ 258.
- 刘 洁, 曾雪娇, 杨莹莹, 等. 2017. 富硒酵母对大气细颗粒物致大鼠肺损伤的干预作用[J]. *卫生研究*, 46(2): 219 ~ 224, 231.
- 刘平安, 莫 阳, 张国民, 等. 2015. 红景天对细颗粒物 PM<sub>2.5</sub> 所致急性肺损伤大鼠干预作用的研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 35(7): 5 ~ 7.
- 鹿奎奎, 凌 敏, 卞 倩. 2017. 大气细颗粒物致呼吸系统氧化应激和炎症反应损伤机制研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 31(6): 682 ~ 688.
- 戚子云, 魏爱生, 张树昌, 等. 2019. 沙参麦冬汤加味对糖尿病大鼠胰岛素抵抗、炎症反应和氧化应激反应的影响[J]. *广州中医药大学学报*, (5): 724 ~ 728.
- 钱春燕, 李 丽, 高知义, 等. 2011. 大气细颗粒物及铅化合物对大鼠肺及血液的毒性[J]. *环境与职业医学*, 28(1): 20 ~ 24.
- 舒 琴. 2013. 魔芋精粉对高脂血症大鼠血清及肝脏内 MDA、SOD 的影响[J]. *河南中医*, 33(9): 1 433 ~ 1 434.
- 杨 洁, 霍婷婷, 王玉琳, 等. 2017. PM<sub>2.5</sub> 降尘诱导 A549 细胞 G2/M 期阻滞的机制研究[J]. *岩石矿物学杂志*, 36(6): 894 ~ 902.
- 杨 凌. 2014. 大气细颗粒物急性、亚慢性染毒对小鼠肺损伤及其免疫机制的研究[D]. 复旦大学.
- 杨一兵. 2018. PM<sub>2.5</sub> 暴露与过敏性鼻炎患者 JAK/STAT 通路活化及相关炎症因子表达水平的关联性研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心.
- 章如新, 郭志强. 2017. PM<sub>2.5</sub> 与变应性鼻炎[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 23(1): 1 ~ 4.
- 张 岳. 2016. 痰热清注射液对脂多糖诱导大鼠急性肺损伤的保护作用[J]. *中医药临床杂志*, 28(1): 102 ~ 104.
- 周艳丽, 劳文艳, 阮研硕, 等. 2017. 阿魏酸拮抗大鼠 PM<sub>2.5</sub> 对大鼠肺的损伤作用[J]. *食品科学*, 37(1): 244 ~ 246.