

石英粉尘激活 TLR4 信号通路诱导气道炎症反应的机制研究

陈祥娃¹, 霍婷婷², 董发勤², 刘靳波¹, 邓建军^{1,3}

(1. 西南医科大学附属医院, 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 621010; 3. 四川绵阳四 O 四医院, 四川 绵阳 621000)

摘要: 为了探索大气颗粒物中石英粉尘诱导气道炎症反应的分子机制, 采用 XRD 对石英粉尘进行了物相分析, 并以支气管上皮细胞作为染毒对象, 将石英粉尘作用于细胞 24 h 后, CCK-8 检测细胞存活率, ELISA 检测培养上清液中的白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-8(IL-8)的浓度, Western Blot 检测 TLR4 的表达, 使用 Toll 样受体 4 特异性抑制剂 TAK 242 预处理后检测 IL-6、IL-8、TLR4 水平。实验结果显示, 石英粉尘的主要物相是石英, 并含部分方解石; 随着石英粉尘染毒浓度的增加, 细胞相对存活率下降; 与对照组相比, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组上清液中 IL-6 与 IL-8 浓度显著增加($P < 0.01$); 50、75 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的高水平 IL-6 和 IL-8 可被 TAK 242 拮抗, 使用 TAK 242 预处理后, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 IL-6、IL-8 浓度显著降低($P < 0.01$); TLR4 的表达量随石英粉尘浓度增加而升高, 且 TAK 242 的干预可以有效阻止 TLR4 通路的活化。研究结果表明, 石英粉尘可以刺激支气管上皮细胞分泌高浓度的炎症因子, 其机制可能是 TLR4 信号通路的活化。

关键词: 石英粉尘; 人支气管上皮(16HBE)细胞; 炎症反应; Toll 样受体 4(TLR4); TAK 242

中图分类号: P579

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2020)02-0211-07

Mechanism of TLR4 signaling pathway activated by quartz dust to induce airway inflammation

CHEN Xiang-wa¹, HUO Ting-ting², DONG Fa-qin², LIU Jin-bo¹ and DENG Jian-jun^{1,3}

(1. Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. School of Environment and Resource, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China; 3. Sichuan Mianyang 404 Hospital, Mianyang 621000, China)

Abstract: To explore the molecular mechanism of quartz dust in the atmospheric particulates exacerbating respiratory inflammatory response, the authors used XRD to analyze the phase of quartz dust, and utilized bronchial epithelial cells as the target. After the cells were treated by quartz dust for 24 h, CCK-8 was used to detect cell viability and the concentration of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 in the culture supernatant was detected by ELISA. Western Blot was used to detect the expression of TLR4. The levels of IL-6, IL-8 and TLR4 were detected after being pretreated with Toll like receptor 4 specific inhibitor TAK 242. According to the results, the main phase of quartz dust was quartz, including partial calcite; the relative cell survival ratio decreased with the increase of quartz

收稿日期: 2019-08-27; 接受日期: 2019-11-13; 编辑: 郝艳丽

基金项目: 国家自然科学基金项目(41472046;41602033);四川省科技计划项目(2016JY0045)

作者简介: 陈祥娃(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 大气环境毒理学, E-mail: 1003893977@qq.com; 通讯作者: 邓建军(1972-), E-mail: jianjundeng0801@163.com。

dust concentration; the concentration of IL-6 and IL-8 in the supernatant of the 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group was significantly increased compared with the control group ($P < 0.01$); high levels of IL-6 and IL-8 in the 50, 75, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ groups were antagonized by TAK 242; after being pretreated with TAK 242, IL-6 and IL-8 were significantly reduced in the 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group ($P < 0.01$); the expression of TLR4 increased with the increase of quartz dust concentration, and the intervention of TAK 242 could effectively prevent the activation of TLR4 pathway. In summary, it can be concluded that exposure to quartz dust can stimulate the secretion of high concentrations of inflammatory factors in bronchial epithelial cells, and the mechanism may be the activation of TLR4 signaling pathway.

Key words: quartz dust; 16HBE cell; inflammatory reactions; toll like receptor4 (TLR4); TAK 242

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

近年来频发的区域性雾霾天气主要与高浓度的细颗粒物 $2.5(\text{PM}_{2.5})$ 相关。有研究表明矿物粉尘是大气颗粒物的主要成分之一,如硅质矿物石英、硫酸盐矿物石膏及芒硝等(徐宗泽等, 2019)。杨洁等(2017)利用X射线衍射光谱仪检测到可吸入细颗粒物 $\text{PM}_{2.5}$ 中主要矿物成分为石英,并证实其能抑制细胞增殖,使细胞周期G2/M期阻滞。有研究报道,空气污染物与心血管疾病的发病率和死亡率有关(Newby *et al.*, 2015; Cai *et al.*, 2016)。鼻咽喉、气道和肺是大气中石英粉尘攻击人体的直接靶器官,流行病学研究已经表明,大气污染与呼吸道炎症发病率的增加和肺功能下降密切相关(Zhao *et al.*, 2019)。体内外实验也证实,大气颗粒物的急性暴露可诱导支气管高反应性(bronchial hyper reactivity, BHR)、气道炎症的发生,释放IL-6与IL-8等炎症因子,发挥其促进细胞增殖、诱导发热反应等生理学功能(Guo *et al.*, 2017; Ogino *et al.*, 2018)。目前,大气颗粒物的细胞毒理效应所涉及的机制主要有氧化应激、炎症信号传导途径活化、DNA损伤和表观遗传学改变等(Liu *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019),其中炎症信号转导途径的活化会诱导细胞产生高水平的炎症因子,使组织发生渗出、增生、变质、肉芽肿等病理变化,进而发展为肺部纤维化、自发性气胸、慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)。Toll样受体4(toll like receptor, TLR4)信号途径在调控炎症反应、先天性免疫应答上起关键作用,其可被各种病原/危险相关分子模式激活,参与了各种炎症因子的产生过程。TLR4受体多分布在巨噬细胞、淋巴细胞等免疫细胞膜表面,但其在石英粉尘致人支气管上皮细胞(16 human bronchial epithelial cells, 16HBE)炎症反应中的作用少有报道,故本研究采用16HBE

细胞作为石英粉尘染毒对象,探讨石英粉尘对16HBE细胞炎症反应的机制,以期在分子生物学层面对其致气道炎症机制进行更深入的研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

主要试剂有Dulbecco's改良Eagle's培养基(DMEM, 含4mM L-谷氨酰胺)(Hyclone)、胰酶消化液、青链霉素双抗溶液(碧云天)、胎牛血清(Gibco)、CCK-8(cell counting kit-WST8)、Human IL-6 ELISA Kit、Human IL-8 ELISA Kit(BOSTER)、TAK-242(MCE)、全蛋白抽提试剂盒(凯基)和抗TLR4抗体(CST)。

主要仪器有X射线衍射光谱仪(X'pert PRO, PANalytical)、倒置相差荧光显微镜(Axio ObserverA1, Zeiss)、全波长酶标仪(PowerWave XS2, BioTek)、蛋白电泳仪(Power Supplies Basic, Bio-rad)、凝胶成像系统(BOXChemiXR5, SYNGENE G)。

1.2 实验方法

1.2.1 石英粉尘物相分析

石英粉尘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,经卧式行星磨研磨、烘干后得到粒径 $\leq 2.5 \mu\text{m}$ 的石英粉尘样本。采用X射线衍射光谱仪,利用Cu Ka辐射($k = 1.54178 \text{ \AA}$)对样本进行物相鉴别。

石英粉尘样本经高压蒸汽灭菌处理后,溶解于DMEM基础培养基,超声震荡30 min配制成1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液,并依次稀释至实验所需浓度。

1.2.2 细胞培养

人支气管上皮细胞来源于广州呼吸系统疾病研究所,细胞所用完全培养基含有90% DMEM,并添加10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和1%青链

霉素双抗溶液(含 100 U/mL 的青霉素、0.1 mg/mL 的链霉素)。将细胞培养于 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度环境中。待细胞贴壁密度达 80%~90%, 消化细胞以 1:2 的比例传代于 T25 cm² 培养瓶中。每次实验之前, 要求细胞的贴壁密度达 80% 左右。

1.2.3 细胞相对存活率检测

使用 DMEM 完全培养基调整 16HBE 细胞悬液浓度为 1.0×10^5 /mL, 以 100 μ L/孔的体积接种于 96 微孔板中, 培养至细胞贴壁密度为 80% 左右, 依次加入终浓度为 0(对照)、25、50、75、100、125、150、175、200 和 250 μ g/mL 的石英粉尘悬液, 每个浓度设置 3 个复孔。为消除颗粒物背景对于光密度(OD 值)的影响, 每个浓度都设置其对应的背景孔(仅含相应浓度的石英粉尘悬液)。染毒 24 h 后, 每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液, 避光孵育 1.5 h 后于 450 nm 处测定每个孔的 OD 值, 并按以下公式计算细胞相对存活率: 细胞相对存活率(%) = $(OD_{\text{实验孔}} - OD_{\text{对应背景孔}}) / (OD_{\text{对照孔}} - OD_{\text{对应背景孔}}) \times 100\%$ 。

1.2.4 ELISA 法检测染毒后细胞上清液中 IL-6、IL-8 浓度

调整细胞悬液浓度为 1.0×10^5 /mL, 接种于 6 孔板中, 培养至细胞贴壁密度为 80% 左右。依次加入终浓度为 0(对照)、25、50、75、100 μ g/mL 的石英粉尘悬液, 每个浓度做 3 个复孔。染毒 24 h 后取上清液, 3 000 r/min、4℃ 离心 5 min 后收集上清液, 1:2 稀释。按照试剂盒说明书进行实验。

1.2.5 Western Blot 检测染毒后细胞裂解液中 TLR4 的表达情况

使用全蛋白抽提试剂盒提取各浓度石英粉尘悬液处理后的 16HBE 细胞裂解液中的总蛋白质, 以 15 μ L/孔的上样量加入 10% 的分离胶上进行蛋白质分离, 然后转移到硝酸纤维素薄膜(NC 膜)上。将膜在 5% 脱脂奶粉中封闭 1.5 h, 尔后把膜置于含抗 TLR4 抗体(1:1 000 稀释)的平皿中, 4℃ 摇床振荡孵育过夜。之后吸取一抗, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 用 5% 脱脂奶粉封闭液稀释二抗, 室温摇床振荡反应 1.5 h, 滴加 ECL 发光工作液, 并使用 G:BOX chemiXR5 系统获得蛋白条带图像, Gel-Pro32 软件测量条带灰度值。

1.2.6 TLR4 抑制剂预处理后细胞上清液中 IL-6、IL-8 的浓度检测

为了验证 TLR4 在气道炎症中的作用, 将 TAK 242(1 μ g/mL, 每孔 2 mL)对细胞进行 1 h 的预处理, 再依次加入终浓度为 0、25、50、75、100 μ g/mL 的

石英粉尘悬液, 后续操作同 1.2.4。

1.2.7 统计学分析

定量数据以“均数 \pm 标准差”的形式表示, 联合 Excel 和 SPSS17.0 对其进行计算和差异性比较, 在数据满足正态分布且方差齐的前提下, 两组间样本均数的比较采用单因素方差分析, 否则采用校正 t 检验(*t'* 检验)。P < 0.05 表示差异有统计学意义; P < 0.01 表示差异有显著统计学意义。所有图形使用 GraphPad Prism 8.0 和 Origin 8.2.0 进行绘制。

2 实验结果与数据分析

2.1 石英粉尘的 XRD 图谱

由石英粉尘的 X 射线衍射图谱(图 1)可知, 本次研究的大气颗粒物中主要物相为石英, 并含有少量方解石。

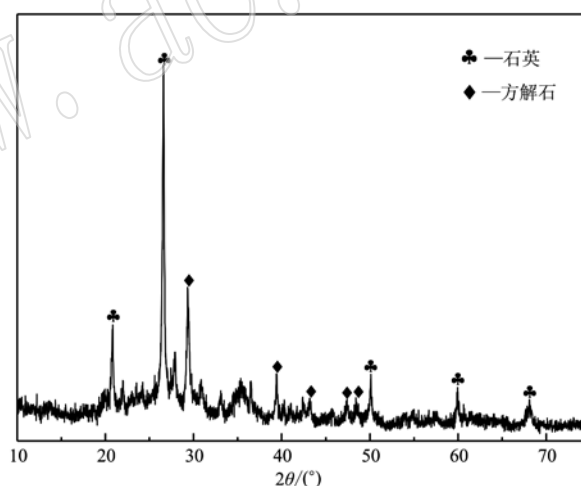


图 1 石英粉尘的 XRD 衍射图
Fig. 1 XRD diffraction diagram of quartz dust

2.2 石英粉尘染毒后 16HBE 细胞存活率

不同浓度的石英粉尘悬液染毒 16HBE 细胞 24 h 后, 细胞相对存活率的变化如图 2 所示。图中, * 表示与对照组相比, P < 0.05; ** 表示与对照组相比, P < 0.01。与对照组相比, 各个浓度的石英粉尘悬液都降低了细胞存活率。当浓度介于 0~100 μ g/mL 时, 细胞存活率维持在 60% 以上。浓度为 200 与 250 μ g/mL 时, 细胞存活率显著降低, 分别为 $(52.43 \pm 3.99)\%$ 和 $(48.81 \pm 7.87)\%$ 。

2.3 石英粉尘及抑制剂处理后细胞 IL-6 与 IL-8 表达水平

与对照组相比, 使用 1 μ g/mL 的 TAK 242 处理 16HBE 细胞 24 h 未对细胞存活率造成影响(图 3)。

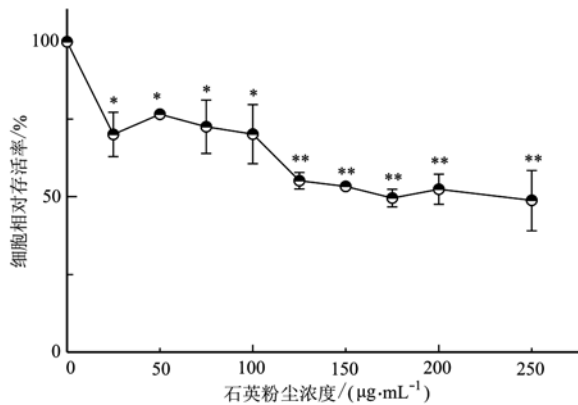


图2 石英粉尘对16HBE细胞相对存活率的影响

Fig. 2 Effects of quartz dust on 16HBE cell relative survival ratio

如图4所示,随着石英粉尘悬液浓度增加,细胞因子IL-6与IL-8的表达呈现递增趋势,当石英粉尘悬液浓度为100 μg/mL时,与对照组相比,IL-6浓度显著增加,为348.47 ± 20.49 pg/mL(表1)。当悬液浓度为50、75、100 μg/mL时,IL-8浓度显著增加,分别为667.81 ± 69.56、677.17 ± 31.85和844.63 ± 37.32 pg/mL。此外,用抑制剂TAK 242预处理1 h

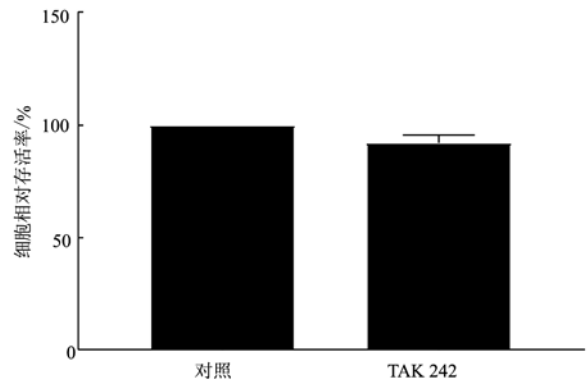


图3 抑制剂对16HBE细胞相对存活率的影响

Fig. 3 Effects of inhibitor on 16HBE cell relative survival ratio

后,50、75、100 μg/mL浓度组的细胞因子IL-6与IL-8表达降低。图4中,TAK 242(-)表示未使用该物质预处理细胞,仅使用了石英粉尘处理;TAK 242(+)表示使用1 μg/mL的TAK 242预处理细胞1 h再进行染毒实验; *表示与对照组相比, P < 0.05; **表示与对照组相比, P < 0.01; #表示与未使用抑制剂的不同石英粉尘浓度组相比, P < 0.05; ##表示与未使用抑制剂的不同石英粉尘浓度组

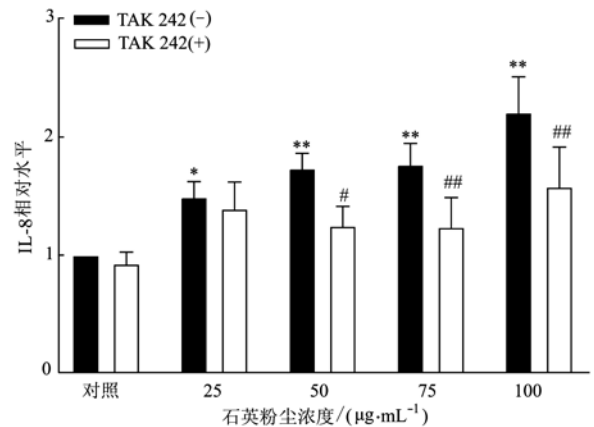
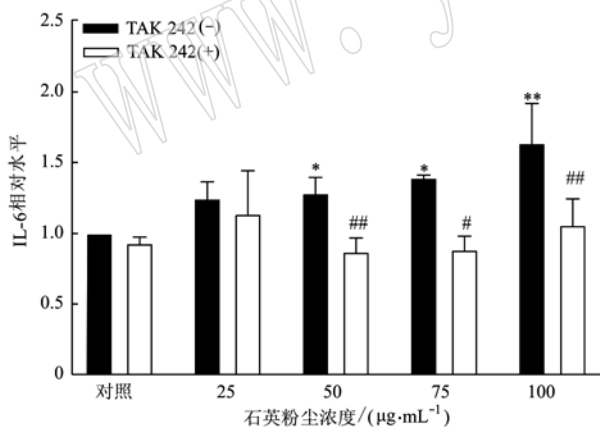


图4 石英粉尘及抑制剂处理后16HBE细胞IL-6与IL-8的相对表达

Fig. 4 Relative expression of IL-6 and IL-8 in 16HBE cells treated with quartz dust and inhibitor

表1 石英粉尘和抑制剂对16HBE细胞IL-6和IL-8表达的影响

Table 1 Effects of quartz dust and inhibitor on the expression of IL-6 and IL-8 in 16HBE cells

石英粉尘浓度/ (μg · mL ⁻¹)	IL-6 浓度/(pg · mL ⁻¹)		IL-8 浓度/(pg · mL ⁻¹)	
	TAK 242(-)	TAK 242(+)	TAK 242(-)	TAK 242(+)
对照	215.69 ± 25.99	200.14 ± 13.50	387.65 ± 60.60	355.75 ± 10.18
25	266.25 ± 8.21	241.25 ± 49.08	570.98 ± 42.86 *	259.56 ± 19.31
50	274.86 ± 11.31 *	185.97 ± 0.96 ##	667.81 ± 69.56 **	477.97 ± 7.76 #
75	300.69 ± 41.97 *	189.58 ± 3.63 #	677.17 ± 31.85 **	470.67 ± 28.46 ##
100	348.47 ± 20.49 **	226.53 ± 30.69 ##	844.63 ± 37.32 **	597.81 ± 42.72 ##

相比, $P < 0.01$ 。

2.4 石英粉尘处理后细胞 TLR4 表达水平

如图 5 所示, TLR4 的表达量随石英粉尘悬液浓度增加而上调。相同浓度的石英粉尘染毒条件下, 使用 TAK 242 预处理组较未使用组的 TLR4 表达量

降低。经内参蛋白 GAPDH 校正后, 与对照组相比, 50 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组的 TLR4 表达明显增加 ($P < 0.01$), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的 TLR4 表达为对照组的 11.45 倍, 差异具有统计学意义。

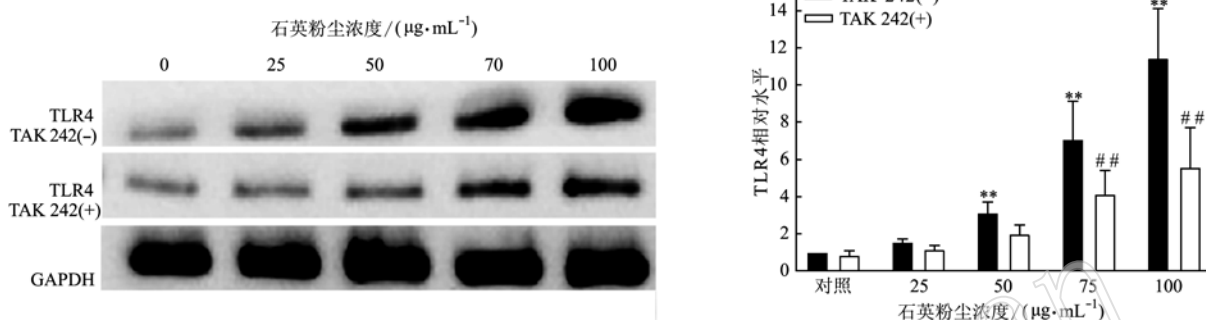


图 5 石英粉尘和 TAK 242 对 16HBE 细胞 TLR4 表达的影响

Fig. 5 Effects of quartz dust and TAK 242 on the expression of TLR4 in 16HBE cells

3 讨论

大气细颗粒物污染除造成雾霾天气、降低空气能见度外, 已成为我国的一个重大公共卫生问题。经济发展过程中, 建筑施工、渣土运输、工业化采矿、水泥(粉煤灰)制砖等都会造成大气细颗粒物浓度上升, 当这些固体物质分散并悬浮在气体介质中便形成气溶胶, 并可通过呼吸系统进入机体。大气细颗粒物因直径极小, 吸入后易沉积在肺组织, 甚至可以通过气-血屏障扩散进入血液, 导致气道炎症和系统性炎症的发生。Huang 等人搜集的流行病学数据表明, 当大气颗粒物浓度大于 38.98 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 时, 非吸烟健康人群对 COPD 的易感性增加 (Huang *et al.*, 2019)。大量体内外实验证实, 暴露于高浓度的大气颗粒物环境下, 会导致肺功能下降以及诱导变应性气道疾病、急性气道炎症、哮喘等疾病的发生 (Zhou *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2018)。

炎症反应被认为是大气细颗粒物引发肺部损伤的基本病理过程。暴露于雾霾环境下可能导致健康人发生鼻腔炎症和超敏反应, 鼻腔分泌物中 NO、IL-5、IL-8、P 物质、神经生长因子和血管活性肠肽的水平显著增加 (Xian *et al.*, 2019)。矿物是大气颗粒物的主要成分之一, 本次实验结果显示, 微米级石英粉尘颗粒染毒后会引引起 16HBE 细胞上清液中 IL-6 与 IL-8 水平显著增加。IL-6 已被确定为关键的免疫

调节多肽类细胞因子, 有促进细胞增殖、诱导发热反应的作用, 是 COPD 患者的预后生物标志物 (Wu *et al.*, 2017), 其还被证明为上皮间充质转化的触发因素 (Browning *et al.*, 2018)。IL-8 属于趋化因子家族的一员, 主要功能为募集白细胞到炎症发生部位, 并诱导其释放一系列生物活性产物引起组织损伤。研究发现, 大气颗粒物染毒后的肺组织中有丰富的巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和淋巴细胞浸润 (Ogino *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019), 本次研究检测到的高 IL-8 表达与此实验结果相符合。

高浓度炎症因子的表达与分泌由 TLR4 信号途径进行调控。TLR4 属于 I 型跨膜蛋白受体, 当配体与髓样分化蛋白-2 (myeloid differentiation-2, MD-2) 结合, 会导致 TLR4 二聚化, 胞内区形成 Toll 白介 1 受体 (toll interleukin 1 receptor, TIR) 结构域 (Gay *et al.*, 2007)。TAK 242 可特异性地与 TIR 结构域结合, 阻止其活化下游的衔接蛋白。本次研究表明, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TAK 242 处理 16HBE 细胞 24 h 后不会影响细胞的存活率, 故可采用其作为研究 TLR4 信号通路的抑制剂。本研究证实 TAK 242 可以有效降低细胞上清液中 IL-6 与 IL-8 的浓度, 推测 TLR4 转导途径的活化可能是石英粉尘致支气管炎症反应的潜在分子机制。Xu 等 (2018) 使用 TAK 242 预处理小鼠巨噬细胞 (RAW264.7) 后, 大气细颗粒物刺激产生的高浓度 IL-1 β 现象被抑制, 此外, 免疫调节关键核因子- κB (nuclear factor kappa-B, NF- κB) 的表达也

在 TAK 242 预处理后明显下调,证明 TLR4 信号通路与 NF- κ B 信号通路间存在交叉,形成信号调节网络以维持机体响应大气细颗粒物刺激的免疫反应发生。

NF- κ B 是一种转录因子,可与炎症因子基因的启动子区结合从而上调其表达,如图 6 所示,除 NF- κ B 外,TLR4 通路还包含了很多信号分子。在本次研究中,仅对细胞膜上的“信号开关”TLR4 蛋白进行了检测,观察到 TLR4 的表达随石英粉尘悬液浓度增加而上调,然而却未对 TLR4 信号轴下游的蛋白,如髓样分化蛋白 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)、 β -干扰素 TIR 结构域衔接蛋白 (TIR domain containing adaptor inducing interferon- β , TRIF) 与石英粉尘之间的关系进行探索。此外,XRD 分析显示本次实验所用的大气颗粒物主要物相为石英,研究表明 (Rathinam *et al.*, 2013) TLR4 的主要配体为细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS),本实验将颗粒物置于 103.4 kPa、121.3 $^{\circ}$ C 的条件下进行 30 min 的灭菌处理,不会造成 LPS 的丢失,因此需要进一步研究 TLR4 的激活是与 LPS 还是石英有关。深入了解 TLR4 及其上下游分子对炎症介质释放的影响,可以针对性地研制出大气中石英粉尘所致肺部疾病的治疗干预措施,这将是我们的下一步的研究内容。

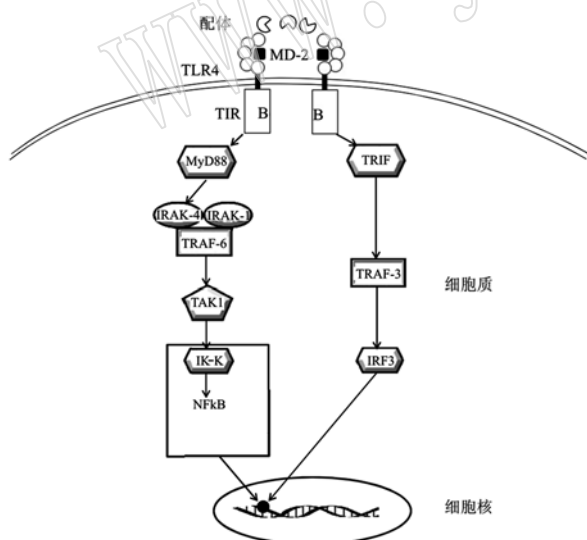


图 6 TLR4 信号通路活化模式图

Fig. 6 Activation pattern diagram of TLR4 signal pathway

4 结论

(1) 石英粉尘作用于 16HBE 细胞后,会刺激其分泌高浓度的 IL-6 与 IL-8。

(2) TLR4 特异性抑制剂 TAK 242 可以拮抗石英粉尘引发的高水平炎症因子和 TLR4。

(3) 石英粉尘可激活 16HBE 细胞的 TLR4 信号通路,诱导气道炎症反应的发生。

References

- Browning L, Patel M R, Horvath E B, *et al.* 2018. IL-6 and ovarian cancer: Inflammatory cytokines in promotion of metastasis[J]. *Cancer Manag. Res.*, 10: 6 685 ~6 693.
- Cai X L, Li Z H, Scott E M, *et al.* 2016. Short-term effects of atmospheric particulate matter on myocardial infarction: A cumulative meta-analysis[J]. *Environ Sci. Pollut. Res. Int.*, 23: 6 139 ~6 148.
- Gay N J and Gangloff M. 2007. Structure and function of toll receptors and their ligands [J]. *Annu. Rev. Biochem.*, 76(1): 141 ~165.
- Guo Z Q, Hong Z C, Dong W Y, *et al.* 2017. PM_{2.5}-induced oxidative stress and mitochondrial damage in the nasal mucosa of rats[J]. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 14(2): 134.
- Huang H C, Lin F C, Wu M F, *et al.* 2019. Association between chronic obstructive pulmonary disease and PM_{2.5} in Taiwanese nonsmokers [J]. *Int. J. Hyg. Environ Health*, 222(5): 884 ~888.
- Li Z, Li N, Guo C, *et al.* 2019. Genomic DNA methylation signatures in different tissues after ambient air particulate matter exposure[J]. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 179: 175 ~181.
- Liu C W, Lee T L, Chen Y C, *et al.* 2018. PM_{2.5}-induced oxidative stress increases intercellular adhesion molecule-1 expression in lung epithelial cells through the IL-6/AKT/STAT3/NF- κ B-dependent pathway[J]. *Part Fibre Toxicol*, 15(1): 4.
- Newby D E, Mannucci P M, Tell G S, *et al.* 2015. Expert position paper on air pollution and cardiovascular disease [J]. *Eur. Heart J.*, 36 (2): 83 ~93.
- Ogino K, Nagaoka K, Ito T, *et al.* 2018. Involvement of PM_{2.5}-bound protein and metals in PM_{2.5}-induced allergic airway inflammation in mice[J]. *Inhal Toxicol*, 30(13 ~14): 498 ~508.
- Ogino K, Nagaoka K, Okuda T, *et al.* 2017. PM_{2.5}-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in NC/Nga mice [J]. *Environ Toxicol*, 32(3): 1 047 ~1 054.
- Rathinam V A and Fitzgerald K A. 2013. Immunology: Lipopolysaccharide sensing on the inside[J]. *Nature*, 501(7 466): 173 ~175.
- Shen Y, Zhang Z H, Hu D, *et al.* 2018. The airway inflammation induced by nasal inoculation of PM_{2.5} and the treatment of bacterial lysates in rats[J]. *Sci. Rep.*, 8(1): 9 816.

- Wang G, Zheng X, Duan H, *et al.* 2019. High-content analysis of particulate matters-induced oxidative stress and organelle dysfunction in vitro[J]. *Toxicol in Vitro*, 59: 263 ~ 274.
- Wu Y P, Cao C, Wu Y F, *et al.* 2017. Activating transcription factor 3 represses cigarette smoke-induced IL6 and IL8 expression via suppressing NF- κ B activation[J]. *Toxicol Lett.*, 270: 17 ~ 24.
- Xian M, Wang K J, Lou H F, *et al.* 2019. Short-term haze exposure predisposes healthy volunteers to nasal inflammation[J]. *Allergy Asthma Immunol Res.*, 11(5): 632 ~ 643.
- Xu F, Qiu X, Hu X, *et al.* 2018. Effects on IL-1 β signaling activation induced by water and organic extracts of fine particulate matter (PM_{2.5}) in vitro[J]. *Environ. Pollut.*, 237: 592 ~ 600.
- Xu M M, Li F, Wang M Y, *et al.* 2019. Protective effects of VGX-1 027 in PM_{2.5}-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness[J]. *Eur. J. Pharmacol.*, 842: 373 ~ 383.
- Xu Zongze, Dai Qunwei, Wang Yan, *et al.* 2019. Micromorphology and mineral composition of atmospheric particulates[J]. *Industrial Minerals & Processing*, 48(9): 55 ~ 58(in Chinese).
- Yang J, Huo T T, Zhang X, *et al.* 2018. Oxidative stress and cell cycle arrest induced by short-term exposure to dustfall PM_{2.5} in A549 cells [J]. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 25(23): 22 408 ~ 22 419.
- Yang Jie, Huo Tingting, Wang Yulin, *et al.* 2017. Mechanism of G2/M phase arrest in A549 cells induced by PM_{2.5} dust- fall[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 36(6): 894 ~ 902(in Chinese with English abstract).
- Zhao J, Li M, Wang Z, *et al.* 2019. Role of PM_{2.5} in the development and progression of COPD and its mechanisms[J]. *Respir. Res.*, 20(1): 120.
- Zhou Y, Liu Y, Song Y, *et al.* 2016. Short-term effects of outdoor air pollution on lung function among female non-smokers in China[J]. *Sci. Rep.*, 6: 34 947.

附中文参考文献

- 徐宗泽, 代群威, 王 岩, 等. 2019. 大气颗粒物中颗粒微观形貌特征及其矿物组成分析[J]. *化工矿物与加工*, 48(9): 55 ~ 58.
- 杨 洁, 霍婷婷, 王玉琳, 等. 2017. PM_{2.5}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.