

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.06.007

大气细颗粒物PM_{2.5}浓度及对肺上皮细胞炎性因子的影响

翟文慧¹ 黄志刚¹ 冯 聪² 李 蓓² 黎檀实^{2Δ}

(1 解放军 305 医院急诊科 北京 100017; 2 解放军总医院急救医学部 北京 100853)

摘要 目的:研究大气细颗粒物(PM_{2.5})浓度及对肺上皮细胞(A549 细胞)炎性因子的影响。**方法:**测定 2013 年 1 月至 2013 年 12 月北京市某城区 PM_{2.5} 浓度,比较不同 PM_{2.5} 浓度对 A549 细胞炎性因子 IL-6、TNF- α 表达水平的影响。**结果:**北京市细颗粒物 PM_{2.5} 日均值春季、夏季、秋季、冬季分别为 174.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、143.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、166.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、189.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 四季超标率差异无统计学意义($P>0.05$); 大气细颗粒物 PM_{2.5} 对肺上皮细胞 IL-6、TNF- α 的影响,春季、夏季、秋季、冬季四季之间差异无统计学意义($P>0.05$); 随着 PM_{2.5} 浓度升高 IL-6、TNF- α 表达水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$); 随着染毒时间延长 IL-6、TNF- α 表达水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**大气细颗粒物浓度升高会使肺上皮细胞炎性因子表达增强。

关键词:细颗粒物; 肺上皮细胞; IL-6; TNF- α

中图分类号:R122;R56 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)06-1028-04

Atmospheric Fine Particulate Pollutants Concentrations of PM_{2.5} and its Effects on Inflammatory Factors in Pulmonary Epithelial Cells

ZHAI Wen-hui¹, HUANG Zhi-gang¹, FENG Cong², LI Bei², LI Tan-shi^{2Δ}

(1 Department of Emergency, The 305 Hospital of PLA, Beijing, 100017, China;

2 Department of Emergency medicine, The General Hospital of PLA, Beijing, 100853, China)

ABSTRACT Objective: To explore the atmospheric fine particle pollution (PM_{2.5}) concentrations and its effects on inflammatory factors in pulmonary epithelial cells (A549 cells). **Methods:** PM_{2.5} concentration were tested from January 2013 to December 2013 in Beijing, compared expression level of inflammatory factors IL-6, TNF- α in A549 cells among different PM_{2.5} concentrations. **Results:** Daily average values of Beijing PM_{2.5} fine particulate pollutants in spring, summer, autumn and winter, were 174.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 143.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 166.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 189.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respectively. Exceed the standard rate had no significant difference among the four seasons ($P>0.05$); influence of atmospheric fine particles PM_{2.5} pollutants on pulmonary epithelial cells IL-6, TNF- α among spring, summer, autumn and winter were no significant differences ($P>0.05$); The IL-6, TNF- α expression levels increased with PM_{2.5} concentration increasing, the difference was statistically significant ($P<0.05$), the IL-6, TNF- α expression levels increased with the extension of exposure time, the difference statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** The increase of atmospheric fine particulate pollutant concentration can make expression of inflammatory cytokines make the lung epithelial cells and inflammatory factor expression enhance.

Key words: PM_{2.5}; Pulmonary epithelial cells; IL-6; TNF- α

Chinese Library Classification(CLC): R122; R56 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)06-1028-04

前言

颗粒物, 大气中的固体或液体颗粒状物质, 分为两类: PM₁₀(空气动力学直径小于 10 μm 的细颗粒)、PM_{2.5}(空气动力学直径小于 2.5 μm 的颗粒)^[1]。细颗粒物(PM_{2.5})能较长时间悬浮在大气中, 和其他直径较大的大气颗粒物相比, PM_{2.5} 粒径相对更小, 面积更大, 活性更强, 更容易附着有毒、有害物质(重金属、微生物等), 且在大气中的停留时间更长、输送距离更远, 对大气环境质量和人体健康造成的影响更大^[2,3]。细颗粒物直径更小, 因而进入呼吸道的部位更深, 10 μm 直径的颗粒

物通常沉积在上呼吸道, 而 2 μm 以下的可进入到细支气管和肺泡, 给人体带来更大的危害。颗粒物的致病机制之一是致使机体发生炎性损伤^[4,5]。研究表明大气颗粒物会造成呼吸道肥大细胞、淋巴细胞聚集, 中性粒细胞浸润等炎性反应^[6]。细胞炎性因子如 TNF- α 、IL-6 具有增强炎性介质和促进炎性细胞聚集的作用, 是反映机体早期炎性反应的敏感指标^[7]。本研究收集北京市细颗粒物标本, 研究不同季节、浓度和染毒时间对肺上皮细胞(A549 细胞)炎性因子 TNF- α 、IL-6 的影响, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

PMI1640 细胞培养基(美国 Gibco 公司), 胎牛血清(天津市财慧生化制品厂), 胰蛋白酶(美国 Sigma 公司), 四甲基偶氮唑蓝(美国 Sigma 公司), 异丙醇(分析纯), 甲醇(色谱纯), 硝酸(超纯), 过氧化氢(优级纯), IL-6、TNF- α 酶联免疫试剂盒(美国

作者简介: 翟文慧(1979-), 女, 博士, 主治医师, 从事急诊医学的方面的研究, E-mail: Zwen-hui123@126.com

Δ 通讯作者: 黎檀实(1963-), 男, 博士, 主任医师, 从事急诊医学的方面的研究

(收稿日期: 2014-06-29 接受日期: 2014-07-25)

R&D 公司);G1200 型大流量采样器(美国 Andersen 公司),BS-110 型电子天平(北京赛多科斯天平有限公司),低温超速离心机(上海安亭科学仪器厂),Alpha2-4 冷冻干燥机(德国 Christ 公司),BIO-RAD-Model 550 型 ELISA 酶标仪。

1.2 方法

1.2.1 颗粒物样品的采集 采样时间为 2013 年 1 月至 2013 年 12 月,采样地点位于北京市某城区,采样器离地面高度约 10 m,使用 G1200 型大流量采样器进行 24 h 连续采样收集大气颗粒物,采样流量=1 m³/min,使用 QM-A 型石英纤维滤膜进行吸附颗粒物,采样完的滤膜用铝箔纸包好。以美国 EPA 1997 年公布的细颗粒物 PM_{2.5} 日均值 0.065 mg/m³ 作为超标的判断标准。

1.2.2 颗粒物的处理 将吸附有细颗粒物的石英纤维滤膜浸泡入去离子水中,超声振荡提取 20 min 洗脱出颗粒物,将颗粒物样品在低温下干燥 24 h,称重,加入磷酸盐缓冲液配制不同浓度的总颗粒物悬液,-20℃ 下避光保存备用。

1.2.3 细胞培养及染毒 用 0.25%胰蛋白酶消化对数生长期的 A549 细胞(中国医学科学院细胞中心),将浓度 10%胎牛血

清的 PMI1640 细胞培养液,调为细胞密度 2×10⁵/mL 后在 24 孔培养板上接种,每孔加 1 mL 细胞悬液,培养 24 h 后使用 PBS 溶液冲洗 2 次,加入样品悬液染毒 20 μL,使终浓度分别为 5、50、200 Lg/mL,空白对照加灭菌双蒸水,每组设 5 个平行样。37℃、5%CO₂ 培养。

1.2.4 炎症因子水平测定 吸取细胞培养上清液用于细胞炎症因子水平测定,严格按照试剂盒操作说明进行操作,采用酶标仪比色测定蛋白含量。

1.2.5 统计分析 采用 SPSS20.0 统计分析软件,计数资料组间比较采用 X² 检验;计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用析因设计重复测量资料的方差分析比较季节、PM_{2.5} 浓度的差异及染毒时间的作用。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 北京市大气细颗粒污染物 PM_{2.5} 污染状况

北京市细颗粒污染物 PM_{2.5} 日均值春季、夏季、秋季、冬季分别为 174.3 μg/m³、143.5 μg/m³、166.7 μg/m³、189.6 μg/m³,四季超标率差异无统计学意义(P>0.05),见表 1。

表 1 北京市细颗粒污染物 PM_{2.5} 污染状况
Table 1 Contamination of fine particle pollutants of PM_{2.5} in Beijing

季节 Season	采样天数 Sampling time	浓度范围(μg/m ³) Concentration range (μg/m ³)	日均值(μg/m ³) Daily average values (μg/m ³)	超标 Exceed the standard		
				天数 Number of days	率(%) Rate(%)	倍数 Multiple
春季 Spring	39	66.2~372.4	174.3	39	100.0	2.68(1.02~5.73)
夏季 Summer	41	22.7~312.9	143.5	38	92.7	2.21(0.35~4.81)
秋季 Autumn	42	65.1~398.9	166.7	42	100.0	2.56(1.00~6.14)
冬季 Winter	41	35.4~453.7	189.6	40	97.6	2.92(0.54~6.98)

2.2 大气细颗粒污染物 PM_{2.5} 对肺上皮细胞 IL-6 的影响

大气细颗粒污染物 PM_{2.5} 对肺上皮细胞 IL-6 的影响,春季、夏季、秋季、冬季四季之间差异无统计学意义(P>0.05),不同 PM_{2.5} 浓度之间差异有统计学意义(P<0.05),随着 PM_{2.5} 浓度升高 IL-6 表达水平升高,不同染毒时间之间差异有统计学意义(P<0.05),随着染毒时间延长 IL-6 表达水平升高,见表 2。

2.3 大气细颗粒污染物 PM_{2.5} 对肺上皮细胞 TNF-α 的影响

大气细颗粒污染物 PM_{2.5} 对肺上皮细胞 TNF-α 的影响,春季、夏季、秋季、冬季四季之间差异无统计学意义(P>0.05),不同 PM_{2.5} 浓度之间差异有统计学意义(P<0.05),随着 PM_{2.5} 浓度升高 TNF-α 表达水平升高,不同染毒时间之间差异有统计学意义(P<0.05),随着染毒时间延长 TNF-α 表达水平升高,见表 3。

3 讨论

PM_{2.5} 是指空气动力学当量直径≤2.5 μm 的颗粒物(可悬浮于空气中的固态和/或液态的微粒),PM_{2.5} 富含大量的有毒、有害物质,而且在大气中的滞留时间长、传送距离远,会对人体健康以及大气环境质量造成更大的影响^[8]。人体吸入 PM_{2.5}

后可以直接进入支气管,影响机体肺部的气体交换,从而导致哮喘、心血管疾病和支气管炎等疾病,PM_{2.5} 主要造成呼吸系统和心血管系统的损伤,如咳嗽、呼吸道受刺激、肺功能降低、慢性支气管炎、呼吸困难、哮喘加剧、心律失常、非致命性的心脏病、心肺病患者的过早死亡等^[9,10]。老人、小孩以及心肺疾病患者,是 PM_{2.5} 污染的易感人群^[11]。颗粒物的致病机制之一是致使机体发生炎症损伤,研究表明大气颗粒物会造成呼吸道肥大细胞、淋巴细胞聚集,中性粒细胞浸润等炎症反应^[12,13]。IL-6 是机体损伤和修复过程中产生的一种急性期反应介质,会使中性粒细胞释放弹力蛋白酶能力增加,从而导致细胞毒性作用增强,IL-6 水平升高常见于急性期蛋白的出现,IL-6 是一种炎症反应的早期指标,细菌、病毒感染均可导致体内 IL-6 表达增加^[14]。TNF-α 是机体最早分泌的细胞因子,是炎症介质连锁反应中最早启动的因子,也是很多炎症反应的中心介质,TNF-α 刺激中性粒细胞产生超氧化物、弹力蛋白酶、PAF、PLA₂ 等参与全身炎症反应^[15]。因此,研究 PM_{2.5} 对肺上皮细胞 IL-6、TNF-α 的影响,可以推断 PM_{2.5} 污染对机体肺泡炎症反应的机制。

本研究结果发现,北京市细颗粒污染物 PM_{2.5} 日均值春

表 2 大气细颗粒污染物 PM2.5 对肺上皮细胞 IL-6 的影响($\bar{x} \pm s, n=5, \text{pg/mL}$)

Table 2 The effects of the atmospheric fine particle pollution of PM2.5 on pulmonary epithelial cells IL-6 ($\bar{x} \pm s, n=5, \text{pg/mL}$)

浓度($\mu\text{g/mL}$) Concentration($\mu\text{g/mL}$)		2 h	12 h	24 h
春季 Spring	0	25.43 $\pm$ 4.23	43.74 $\pm$ 4.49	75.31 $\pm$ 4.26
	5	27.74 $\pm$ 3.84	56.42 $\pm$ 5.36	115.20 $\pm$ 12.31
	50	29.43 $\pm$ 5.01	96.21 $\pm$ 5.99	163.48 $\pm$ 21.22
	200	31.56 $\pm$ 4.41	120.65 $\pm$ 9.89	238.46 $\pm$ 21.78
夏季 Summer	0	26.02 $\pm$ 4.17	44.12 $\pm$ 4.51	75.78 $\pm$ 4.24
	5	28.65 $\pm$ 4.03	57.24 $\pm$ 5.49	114.97 $\pm$ 12.18
	50	29.63 $\pm$ 5.28	95.29 $\pm$ 5.76	163.98 $\pm$ 21.76
	200	32.54 $\pm$ 4.64	123.78 $\pm$ 9.24	234.42 $\pm$ 21.96
秋季 Autumn	0	23.49 $\pm$ 4.26	46.74 $\pm$ 4.83	77.84 $\pm$ 4.96
	5	29.48 $\pm$ 4.12	54.36 $\pm$ 5.48	112.96 $\pm$ 13.51
	50	30.24 $\pm$ 5.35	94.32 $\pm$ 5.96	161.86 $\pm$ 21.34
	200	31.99 $\pm$ 4.52	121.26 $\pm$ 9.42	235.21 $\pm$ 22.34
冬季 Winter	0	27.38 $\pm$ 4.68	44.68 $\pm$ 4.98	73.96 $\pm$ 4.58
	5	28.74 $\pm$ 3.89	56.97 $\pm$ 5.44	115.77 $\pm$ 12.29
	50	30.13 $\pm$ 5.42	96.87 $\pm$ 5.46	163.76 $\pm$ 21.38
	200	32.48 $\pm$ 4.78	120.97 $\pm$ 9.42	236.71 $\pm$ 22.26

表 3 大气细颗粒污染物 PM2.5 对肺上皮细胞 TNF- α 影响($\bar{x} \pm s, n=5, \text{pg/mL}$)

Table 3 The effects of the atmospheric fine particle pollution of PM2.5 on pulmonary epithelial cells TNF- α ($\bar{x} \pm s, n=5, \text{pg/mL}$)

浓度($\mu\text{g/mL}$) Concentration($\mu\text{g/mL}$)		2h	12h	24h
春季 Spring	0	47.48 $\pm$ 6.97	107.29 $\pm$ 14.84	136.84 $\pm$ 17.32
	5	48.24 $\pm$ 4.59	138.64 $\pm$ 20.89	195.33 $\pm$ 21.47
	50	51.21 $\pm$ 5.42	254.27 $\pm$ 23.74	364.18 $\pm$ 21.38
	200	53.10 $\pm$ 6.87	442.48 $\pm$ 24.79	596.41 $\pm$ 20.75
夏季 Summer	0	48.53 $\pm$ 6.75	109.01 $\pm$ 14.75	135.47 $\pm$ 17.78
	5	49.25 $\pm$ 4.41	136.77 $\pm$ 20.96	195.47 $\pm$ 21.74
	50	52.03 $\pm$ 5.57	254.89 $\pm$ 24.58	363.87 $\pm$ 21.85
	200	53.86 $\pm$ 6.79	437.53 $\pm$ 24.91	597.47 $\pm$ 20.94
秋季 Autumn	0	48.44 $\pm$ 6.74	106.94 $\pm$ 14.15	137.83 $\pm$ 16.93
	5	49.27 $\pm$ 4.62	139.74 $\pm$ 21.03	194.86 $\pm$ 21.72
	50	53.52 $\pm$ 5.18	257.29 $\pm$ 24.37	369.41 $\pm$ 21.49
	200	54.21 $\pm$ 6.99	446.47 $\pm$ 24.42	591.12 $\pm$ 20.18
冬季 Winter	0	46.74 $\pm$ 6.65	107.88 $\pm$ 14.47	131.81 $\pm$ 18.21
	5	48.74 $\pm$ 4.84	138.29 $\pm$ 20.34	191.34 $\pm$ 21.48
	50	50.92 $\pm$ 5.73	259.34 $\pm$ 23.86	369.13 $\pm$ 21.43
	200	53.28 $\pm$ 6.78	445.15 $\pm$ 25.63	592.61 $\pm$ 21.96

季、夏季、秋季、冬季分别为 $174.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、 $143.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、 $166.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、 $189.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 超标率均达 90% 以上。该结果说明, 北京市 PM2.5 污染严重。这和之前的研究结果相类似^[16-18]。此外, 本研究表明, 大气细颗粒污染物 PM2.5 对肺上皮细胞 IL-6、TNF- α 的影响, 春季、夏季、秋季、冬季四季之间差异无统计学意义, 随着 PM2.5 浓度升高 IL-6、TNF- α 表达水平升高, 差异有统计学意义, 随着染毒时间延长 IL-6、TNF- α 表达水平升高, 差异有统计学意义, 该结果说明 PM2.5 浓度升高及暴露时间延长可能导致机体炎症反应增强, 从而造成机体损害。该结果和之前的研究结果相似^[19-21]。

综上所述, PM2.5 会导致机体炎症反应增强, 应做好个体防护工作及环境治理改善工作, 从而从源头上治理 PM2.5 污染问题。

参考文献(References)

- [1] Amato F, Rivas I, Viana M, et al. Sources of indoor and outdoor PM2.5 concentrations in primary schools [J]. *Sci Total Environ*, 2014, 490C: 757-765
- [2] Alexeeff S E, Schwartz J, Kloog I, et al. Consequences of kriging and land use regression for PM2.5 predictions in epidemiologic analyses: insights into spatial variability using high-resolution satellite data[J]. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 2014[Epub ahead of print]
- [3] Semple S, Latif N. How Long Does Secondhand Smoke Remain in Household Air: Analysis of PM2.5 Data From Smokers' Homes[J]. *Nicotine Tob Res*, 2014, 16(10): 1365-1370
- [4] Zanobetti A, Dominici F, Wang Y, et al. A national case-crossover analysis of the short-term effect of PM2.5 on hospitalizations and mortality in subjects with diabetes and neurological disorders [J]. *Environ Health*, 2014, 13(1): 38
- [5] Grahame T J. PM2.5 Species: Importance of Accurate Measurement[J]. *Epidemiology*, 2014, 25(4): 615
- [6] Wagner J G, Kamal A S, Morishita M, et al. PM2.5-induced cardiovascular dysregulation in rats is associated with elemental carbon and temperature-resolved carbon subfractions [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2014, 11(1): 25
- [7] Christiansen J G, Jensen H E, Jensen L K, et al. Systemic inflammatory response and local cytokine expression in porcine models of endocarditis[J]. *APMIS*, 2014, 122(4): 292-300
- [8] Buczynska A J, Krata A, Van Grieken R, et al. Composition of PM2.5 and PM1 on high and low pollution event days and its relation to indoor air quality in a home for the elderly [J]. *Sci Total Environ*, 2014, 490C: 134-143
- [9] Ostro B, Malig B, Broadwin R, et al. Chronic PM2.5 exposure and inflammation: Determining sensitive subgroups in mid-life women[J]. *Environ Res*, 2014, 132: 168-175
- [10] Zhao Y, Lin Z, Jia R, et al. Transgenerational effects of traffic-related fine particulate matter (PM2.5) on nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Hazard Mater*, 2014, 274: 106-114
- [11] Lippmann M. Toxicological and epidemiological studies of cardiovascular effects of ambient air fine particulate matter (PM2.5) and its chemical components: coherence and public health implications[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2014, 44(4): 299-347
- [12] Fan J, Qin X, Xue X, et al. Effects of carbon components of fine particulate matter (PM2.5) on atherogenic index of plasma [J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2014, 48(1): 33-37
- [13] Atkinson R W, Kang S, Anderson H R, et al. Epidemiological time series studies of PM2.5 and daily mortality and hospital admissions: a systematic review and meta-analysis[J]. *Thorax*, 2014, 69(7): 660-665
- [14] Azuma M M, Samuel R O, Gomes-Filho J E, et al. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review [J]. *Int Endod J*, 2014, 47(7): 615-621
- [15] Stidham R W, Lee T C, Higgins P D, et al. Systematic review with network meta-analysis: the efficacy of anti-TNF agents for the treatment of Crohn's disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014, 39(12): 1349-1362
- [16] Shen X, Yao Z, Huo H, et al. PM2.5 emissions from light-duty gasoline vehicles in Beijing, China [J]. *Sci Total Environ*, 2014, 487: 521-527
- [17] Sun F, Yin Z, Lun X, et al. Deposition Velocity of PM2.5 in the Winter and Spring above Deciduous and Coniferous Forests in Beijing, China[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97723
- [18] Zhang A, Qi Q, Jiang L, et al. Population exposure to PM2.5 in the urban area of Beijing[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63486
- [19] Gioda A, Fuentes-Mattei E, Jimenez-Velez B. Evaluation of cytokine expression in BEAS cells exposed to fine particulate matter (PM2.5) from specialized indoor environments [J]. *Int J Environ Health Res*, 2011, 21(2): 106-119
- [20] Bourgeois B, Owens J W. The influence of Hurricanes Katrina and Rita on the inflammatory cytokine response and protein expression in A549 cells exposed to PM2.5 collected in the Baton Rouge-Port Allen industrial corridor of Southeastern Louisiana in 2005 [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2014, 24(3): 220-242
- [21] Ferguson M D, Migliaccio C, Ward T. Comparison of how ambient PMc and PM2.5 influence the inflammatory potential [J]. *Inhal Toxicol*, 2013, 25(14): 766-773