

## · 专题研究 ·

烹调油烟中细颗粒物  $PM_{2.5}$  对 A-549 细胞存活率和 IL-10 水平的影响冯哲伟<sup>1</sup>, 梁春梅<sup>1</sup>, 操基玉<sup>1,2</sup>, 郭冬梅<sup>1</sup>, 王勇<sup>1</sup>, 王绩凯<sup>1</sup>

(1 安徽医科大学公共卫生学院, 安徽 合肥 230032 2 安庆医药高等专科学校, 安徽 安庆 246052)

**摘要:** 探讨烹调油烟中大气细颗粒物  $PM_{2.5}$  (FPCOF) 对人肺癌上皮细胞 (A-549 细胞) 抗炎因子 IL-10 分泌的影响。分别用不同浓度的 FPCOF 对细胞进行染毒, 于 12 h、24 h 和 36 h 后用 MTT 法测细胞存活率; 用酶联免疫吸附法测染毒 24 h 和 36 h 的细胞上清中 IL-10 的浓度。结果: (1) FPCOF 作用于 A-549 细胞 24 h 和 36 h 后, 细胞存活率随染毒浓度升高而降低,  $100 \mu\text{g/ml } PM_{2.5} + 10 \text{ mmol/L NAC}$  组存活率高于  $100 \mu\text{g/ml } PM_{2.5}$  染毒组。(2) FPCOF 对 A-549 细胞作用 24 h 后, 对抗炎因子 IL-10 的影响不明显; 作用 36 h 后均可见 IL-10 水平增高,  $100 \mu\text{g/ml } PM_{2.5} + 10 \text{ mmol/L NAC}$  组 IL-10 浓度低于  $100 \mu\text{g/ml } PM_{2.5}$  染毒组。提示 FPCOF 促进 A-549 细胞中抗炎因子 IL-10 分泌, 其表达要迟于 FPCOF 对细胞增殖的抑制作用, 抗氧化剂 NAC 对 A-549 细胞有一定的保护作用。

**关键词:** 烹调油烟; A-549 细胞; 抗炎因子; 白介素-10 (IL-10)

中图分类号: R122.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2011)02-0104-03

Effects of  $PM_{2.5}$  in cooking oil fume on cell survival and IL-10 levels in A-549 cells

FENG Zhewei<sup>1</sup>, LIANG Chunmei<sup>1</sup>, CAO Jiyu<sup>1,2</sup>, GUO Dongmei<sup>1</sup>, WANG Yong<sup>1</sup>, WANG Jikai<sup>1</sup>

(\*: School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

**Abstract:** Objective To explore fine particle in cooking oil fume (FPCOF,  $PM_{2.5}$ ) on the level of anti-inflammatory factor IL-10 in human lung adenocarcinoma epithelial cell (A-549 cells). Methods A-549 cells were exposed to different concentrations of FPCOF for 12 h, 24 h and 36 h respectively, then detecting the cell survival rate with MTT assay and IL-10 level in media supernatant by enzyme linked immunosorbent assay. Results (1) The survival rate of A-549 cells was reduced time- and dose-dependently, but the difference at 12 h among different doses was not significant, meanwhile the rate in  $100 \mu\text{g/ml } PM_{2.5} + 10 \text{ mmol/L NAC}$  group was significantly higher than that in  $100 \mu\text{g/ml } PM_{2.5}$  group after 24 h or 36 h exposure. (2) There was no obvious effect on IL-10 after 24 h exposure to FPCOF, the rise of IL-10 level was only seen in all the exposed groups after 36 h exposure to FPCOF, additionally, IL-10 level in  $100 \mu\text{g/ml } PM_{2.5} + 10 \text{ mmol/L NAC}$  group was significantly lower than that in  $100 \mu\text{g/ml } PM_{2.5}$  group. Conclusion FPCOF might promote the secretion of anti-inflammatory factor IL-10 in A-549 cells, but its expression was later than the inhibition of cell proliferation caused by FPCOF, and the antioxidant NAC might protect A-549 cells from the adverse effects induced by FPCOF.

**Key words:** cooking oil fume; A-549 cell; anti-inflammatory factor; interleukin-10 (IL-10)

近年来已有流行病学研究发现, 大气中细颗粒物  $PM_{2.5}$  污染与人群呼吸和心血管等系统疾病的死亡率和患病率增加呈现出显著相关性<sup>[1,2]</sup>。由于  $PM_{2.5}$  粒径小, 可以到达终末支气管甚至肺泡, 其表面吸附的大量有毒有害物质可以通过气血屏障进入血液循环, 引起机体呼吸、心血管、免疫等系统的损害。另外  $PM_{2.5}$  有机成分中的多环芳烃类有机物具有潜在的致突变性, 可能与肿瘤发生有关。不同来源的  $PM_{2.5}$  成分不同, 确切的作用机制尚不完全清楚。已有研究发现大气细颗粒物能促进 A-549 细胞炎症因子的分泌<sup>[3,4]</sup>。IL-10 是一个重要的抗炎因子, 几乎抑制所有的促炎性细胞因子的合成与释

放, 具有重要的抗炎作用。

本课题组在前期工作中已对本次染毒物质 FPCOF 中的有害成分进行测定<sup>[5]</sup>, 本研究主要测定 FPCOF 以及加入抗氧化剂 NAC 的 FPCOF 对 A-549 细胞存活率和 IL-10 水平的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司), 新生牛血清 (杭州四季青公司), Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), ELISA 试剂盒 (上海森雄生物制品公司)。

恒温  $CO_2$  培养箱 (美国 SHELLAB 公司),  $PM_{2.5}$  细颗粒物采样器 (山东淄博耐普电子仪器有限公司), CKX41 型生物倒置显微镜, 日本奥林巴斯 (OLYMPUS) 公司, 全自动酶标仪 (瑞士 TECAN 公司),  $-80^\circ\text{C}$  超低温冰箱 (日本三洋公司)。

### 1.2 样品的采集和制备

FPCOF 的采集和制备参照文献 [5], 用电炉加热 200 ml 花生油, 油温控制在  $200 \sim 220^\circ\text{C}$ , 采样点设在电炉周围 1 m

收稿日期: 2010-09-06

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金 (2006KJ11B); 安徽省自然科学基金 (090413265X)

作者简介: 冯哲伟 (1986-) 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 环境毒理学。

通讯作者: 操基玉, 教授, E-mail: qshq@163.com

范围内，采样高度为 1.5 m，流速 10~12 L/min。将采集完的滤膜剪碎后置于适量丙酮中，超声波抽提，过滤、烘干、称重后加 DMSO 溶解，将浓度均调整为 200 mg/ml，置 -80℃ 保存。

### 1.3 细胞培养及染毒

人肺腺癌上皮细胞（A-549）由安徽医科大学微生物学教研室惠赠。用 0.25% 胰酶消化对数生长期细胞，用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液将细胞密度调为  $4\times 10^5$  个/ml~ $5\times 10^4$  个/ml 分别接种于 24 孔培养板（每孔 1 ml）、96 孔培养板（每孔 200  $\mu$ l，培养 24 h 后用 PBS 冲洗 2 次，加等量颗粒物悬液，使染毒终浓度分别为 0、25、50、100  $\mu$ g/ml、100  $\mu$ g/ml  $PM_{2.5}$ +10 mmol/L NAC。

### 1.4 MTT 法测定 A-549 细胞的存活率

根据 MTT 法检测 FPCOF 染毒液对 A-549 细胞的毒性作用。设染毒液对照孔，分别检测染毒 12 h、24 h、36 h 后各剂量组 A-549 细胞的存活率，染毒结束前 3 h 弃培养液上清，每孔加入含 5 g/L MTT 的 DMEM 培养液 20  $\mu$ l，置 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 3 h 后，弃上清，PBS 洗 3 次，每孔加 DMSO 200  $\mu$ l，振荡 5 min，待结晶完全溶解后，置酶标仪上测定 570 nm 波长处的吸光度值（A 值）。细胞存活率（%）=（各剂量组 A 均值—对照孔 A 均值）/（对照组 A 均值—对照孔 A 均值） $\times$ 100%。每组设 6 个复孔。

### 1.5 IL-10 的检测

采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测 24 孔板中 A-549 细胞培养上清液中的 IL-10。具体操作按试剂盒要求进行，酶标仪比色测定 IL-10 的含量。

### 1.6 统计学处理

数据以均数  $\pm$  标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析，采用 SPSS 13.0 软件包。

## 2 结果

### 2.1 FPCOF 对 A-549 细胞存活率的影响

未染毒组各时间点吸光度值差别无统计学意义（ $P>0.05$ ），将其细胞存活率定为 100%，计算出各时间点不同剂量组细胞存活率。如图 1 所示，12 h 染毒组与对照组相比，染毒组细胞存活率的变化不明显（ $P>0.05$ ）。在 24 h 和 36 h 染毒中，随着染毒时间的延长，FPCOF 抑制 A-549 细胞增殖，且随着染毒剂量的增加，细胞存活率呈下降趋势（ $P<0.05$ ），NAC 组与非 NAC 组比较细胞存活率明显升高（ $P<0.05$ ）；在同一染毒剂量，染毒 36 h 细胞存活率比染毒 24 h 低（ $P<0.05$ ）；24 h、36 h 的 100  $\mu$ g/ml FPCOF 染毒组中，NAC 组与非 NAC 组间比较细胞存活率明显升高（ $P<0.05$ ）。

### 2.2 FPCOF 对 A-549 细胞 IL-10 表达的影响

表 1 可见，24 h 和 36 h 对照组培养上清液中有少量 IL-10 的表达，两个时点 IL-10 表达差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）；不同浓度 FPCOF 作用于 A-549 细胞 24 h 后与对照组比较 IL-10 表达无明显变化（ $P>0.05$ ）；不同浓度 FPCOF 作用于 A-549 细胞 36 h 后与对照组比较 IL-10 表达升高，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），且随着染毒剂量的增加，IL-10 表达呈上升趋势

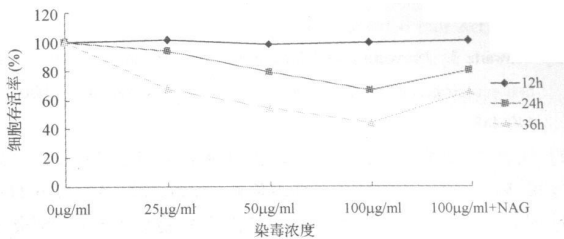


图 1 FPCOF 对 A-549 细胞存活率的影响（n=15）

（ $P<0.05$ ）；在 36 h 时间点 100  $\mu$ g/ml FPCOF 染毒组中 NAC 组与非 NAC 组比较 IL-10 表达下降，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）；同一染毒浓度对 A-549 细胞作用 36 h 与 24 h 比较 IL-10 的表达明显升高，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。

表 1 FPCOF 对 A-549 细胞作用 24 h 和 36 h

|                    |    | 后 IL-10 的表达（ $\bar{x}\pm s$ ） |                                      | ng/L |
|--------------------|----|-------------------------------|--------------------------------------|------|
| FPCOF 浓度           | n  | 24 h                          | 36 h                                 |      |
| 0 $\mu$ g/ml       | 15 | 45.287 $\pm$ 3.761            | 46.849 $\pm$ 7.943                   |      |
| 25 $\mu$ g/ml      | 15 | 47.582 $\pm$ 3.637            | 98.497 $\pm$ 48.856 <sup>abc</sup>   |      |
| 50 $\mu$ g/ml      | 15 | 51.562 $\pm$ 7.328            | 270.654 $\pm$ 70.675 <sup>abc</sup>  |      |
| 100 $\mu$ g/ml     | 15 | 52.436 $\pm$ 5.092            | 378.305 $\pm$ 74.979 <sup>abc</sup>  |      |
| 100 $\mu$ g/ml+NAC | 15 | 55.038 $\pm$ 4.674            | 158.987 $\pm$ 30.479 <sup>abcd</sup> |      |

注：同一染毒时点，与对照组比较，<sup>a</sup> $P<0.05$ ；同一染毒时点，与相邻前一染毒剂量组比较，<sup>b</sup> $P<0.05$ ；同一染毒浓度，与 24 h 实验组比较，<sup>c</sup> $P<0.05$ ；同一染毒时点，与 100  $\mu$ g/ml  $PM_{2.5}$  非 NAC 组比较，<sup>d</sup> $P<0.05$ 。

## 3 讨论

本研究显示 FPCOF 能够抑制 A-549 细胞增殖，且呈现剂量-时间效应关系。在染毒浓度为 100  $\mu$ g/ml 时 A-549 细胞存活率为 58.58%，与曹强<sup>[6]</sup>等室外  $PM_{2.5}$  混悬液浓度为 100  $\mu$ g/ml 时细胞存活率为 81% 不同，可能是因 FPCOF 与室外  $PM_{2.5}$  吸附的有害物质成分不同导致。在染毒 24 h、36 h 后的 100  $\mu$ g/ml FPCOF 组中，NAC 组较非 NAC 组 A-549 细胞存活率升高。Dung C H 等<sup>[7]</sup>研究发现烹调油烟通过氧化应激途径损伤 A-549 细胞，由此说明抗氧化剂 NAC 通过减少 FPCOF 对细胞的氧化损伤来保护 A-549 细胞。

有研究结果显示<sup>[3]</sup>， $PM_{2.5}$  作用 24 h 即可刺激 A-549 细胞合成释放 IL-6、IL-8 促炎因子。炎症反应时，体内存在抗炎因子与促炎因子之间的平衡作用，初期以促炎因子表达为主，如 IL-6、IL-8 等；随着炎症进展，抗炎因子表达逐步升高，抑制机体过激的炎症反应，抗炎因子达到峰值的时间要迟于促炎因子<sup>[3]</sup>。本研究中 24 h 未观察到 IL-10 表达明显变化，可能此时细胞内尚处于炎症反应初期，抗炎因子的抗炎作用尚未启动，而 36 h 时观察到 IL-10 表达增加，说明抗炎因子 IL-10 参与 A-549 细胞的炎症反应，且表达时间较促炎因子迟缓。在 100  $\mu$ g/ml FPCOF 组中 NAC 组较非 NAC 组 IL-10 表达降低，说明 NAC 可以在一定程度上减轻炎症反应程度，是一种有效的保护剂，具体机制有待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Schwartz J. Harvesting and long term exposure effects in the relation between air pollution and mortality [J]. Am J Epidemiol 2000 15: 440-448.
- [2] 钱学琳, 阚海东, 宋伟民. 大气细颗粒污染与居民每日死亡关系的 Meta分析 [J]. 环境与健康杂志, 2005 22 (4): 246-248.
- [3] 陈威, 郭新彪, 邓芙蓉, 等. 大气细颗粒物对 A-549 细胞炎症因子分泌影响 [J]. 中国公共卫生, 2009 23 (9): 1080-1081.
- [4] 张文丽, 戚其平, 徐东群, 等. 我国两城市空气细颗粒物 PM<sub>2.5</sub> 污染及对肺上皮细胞炎症因子的影响 [J]. 环境与职业医学, 2003 20 (5): 325-330.
- [5] 郭冬梅, 操基玉, 王勇, 等. 厨房空气中烹调油烟有害成分的测定和分析 [J]. 中国疾病控制杂志, 2010 14 (2): 142-145.
- [6] 曹强. 大气细颗粒物致肺损伤的易感性研究 [D]. 复旦大学劳动卫生与环境学博士学位论文, 2007 28.
- [7] Dung C H. Genotoxicity and oxidative stress of the mutagenic compounds formed in fumes of heated soybean oil, sunflower oil and lard [J]. Toxicology in Vitro 2006 (20): 439-447.

## AcSDKP 经由 PDGF 介导的细胞外信号调节激酶 1/2 的调节通路在大鼠矽肺纤维化形成中的作用

罗玲<sup>1</sup>, 杨奕<sup>2</sup>, 徐洪<sup>1</sup>, 李倩<sup>1</sup>, 张丽娟<sup>1</sup>, 魏中秋<sup>3</sup>, 杨方<sup>1,3</sup>

(1. 华北煤炭医学院实验中心; 2. 华北煤炭医学院教务处; 3. 华北煤炭医学院病理学教研室, 河北 唐山 063000)

**摘要:** 探讨抗纤维化短肽 N-乙酰基-丝氨酸-天门冬酰-赖氨酸-脯氨酸 (AcSDKP) 经由血小板源性生长因子 (PDGF) 介导的细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 的调节通路在矽肺纤维化形成中的作用。采用一次性支气管内灌注二氧化硅 (SiO<sub>2</sub>) 粉尘制作矽肺大鼠模型, 将其分为对照组 (4周组和 8周组)、矽肺模型组 (4周和 8周组)、AcSDKP 治疗组 (抗纤维化治疗组和预防治疗组)。采用贴块法进行肺成纤维细胞的原代和传代培养。HE 染色观察肺组织形态学变化, Western blot 法检测肺组织、肺成纤维组织 I 型、III 型胶原蛋白和 ERK1/2 及磷酸化-ERK1/2 蛋白的表达以及肺组织 PDGF 及其受体蛋白的表达。与对照比较, 矽肺大鼠肺内 PDGF 及其受体蛋白、I 型和 III 型胶原蛋白以及磷酸化-ERK1/2 蛋白表达均增强, 而 AcSDKP 治疗组则见上述蛋白表达减弱; 在培养的肺成纤维细胞, PDGF 能够刺激其 I 型、III 型胶原蛋白表达增加, 同时上调磷酸化-ERK1/2 蛋白的表达, 而 AcSDKP 则显示出与 PD98059 (细胞外信号调节激酶通路特异性抑制剂) 相同的作用, 即能够抑制 PDGF 刺激成纤维细胞 I 型、III 型胶原蛋白表达和上调磷酸化-ERK1/2 蛋白表达。提示 AcSDKP 可能通过阻断 PDGF 介导的 ERK1/2 信号转导通路抑制矽肺纤维化的形成与发展。

**关键词:** N-乙酰基-丝氨酸-天门冬酰-赖氨酸-脯氨酸 (AcSDKP); 血小板源性生长因子 (PDGF); 肺成纤维细胞; 细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2); 矽肺

中图分类号: R135.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2011)02-0106-05

### Antagonistic effect of AcSDKP on pulmonary fibrosis of silicosis through regulating PDGF-ERK1/2 pathway in rats

LUO Ling\*, YANG Yi, XU Hong, LI Qian, ZHANG Lijuan, WEI Zhongqiu, YANG Fang

(\*: North China Coal Medical University, Tangshan 063000, China)

**Abstract:** Objective To investigate the effect of an anti-fibrotic tetrapeptide AcSDKP on pulmonary fibrosis of silicosis by regulating ERK1/2 activity through PDGF. Methods Rats administered with silica dust intratracheally were divided into 4 week and 8 week control groups, 4 week and 8 week silicosis groups and AcSDKP pretreated and treated groups. Culturing pulmonary fibroblasts of the rats from all the experimental groups, observing pulmonary morphological change under microscope by hematoxylin-eosin staining, detecting the expressions of type I and type III collagen proteins, of phospho-ERK1/2 and ERK1/2 proteins, of PDGF and its receptor proteins in lung or cultured fibroblasts by Western blot. Results Compared with control group, the protein expressions of PDGF and its receptor, type I and type III collagen and phospho-ERK1/2 were all increased in silicosis groups, and the expression of the proteins mentioned above showed reduced in AcSDKP treated groups. Meanwhile in cultured rat pulmonary fibroblasts, PDGF showed some stimulating effect on the protein expressions of type I and type III collagen and up-regulated the expression of phospho-ERK1/2, while AcSDKP showed the same effect as PD98059, the specific inhibitor of extracellular signal-regulated pathway, that inhibited the expressions of type I and type III collagen.

收稿日期: 2010-10-09 修回日期: 2011-03-06

基金项目: 《AcSDKP 防治矽(尘)性肺纤维化的实验研究》河北省自然科学基金项目 (C2005000807), 人事部留学人员科技活动项目 (国人厅发 [2006] 164 号); 《抗纤维化短肽对 PDGF 及其受体介导的 PI3/Akt 信号转导途径的调节》唐山市卫生临床技术 research 计划 (10150204-A-25)。

作者简介: 罗玲 (1957-), 女, 实验师, 研究方向: 矽肺发病机制与防治研究。

通讯作者: 杨方, 男, 教授, 博士生导师, E-mail: fangyanf2@yahoo.com.cn