

• 实验研究 •

烹调油烟中细颗粒物对胎鼠肺泡 II 型上皮细胞的遗传毒性

Study on genotoxicity of fine particulates from cooking fumes in AEC II cells

汪磊¹, 王勇¹, 操基玉^{1,2}, 梁春梅¹, 冯哲伟¹WANG Lei¹, WANG Yong¹, CAO Ji-yu^{1,2}, LIANG Chun-mei¹, FENG Zhe-wei¹

(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: 探讨烹调油烟细颗粒物对胎鼠肺泡 II 型上皮细胞 (AECII) 存活率的影响及其遗传毒性。用不同浓度 PM_{2.5} 对细胞染毒 12 h、24 h、48 h, MTT 法测细胞存活率; 彗星实验检测细胞尾长、尾部 DNA 百分比、尾矩和 Olive 尾矩; ELISA 试剂盒检测细胞内 PAH-DNA 加合物的含量。结果显示: (1) PM_{2.5} 作用于 AEC II 12 h、24 h、48 h 后, 产生明显细胞毒性, 呈剂量-反应和时间-反应关系; (2) 染毒 24 h, 与低浓度组相比, 高浓度组的尾长、尾部 DNA 百分比、尾矩和 Olive 尾矩有明显增加 ($P < 0.001$); 与低浓度染毒组相比, 高浓度染毒组的 PAH-DNA 加合物明显的增加 ($P < 0.05$)。提示 PM_{2.5} 对 AEC II 具有明显的遗传毒性, 并呈一定的剂量-反应关系。

关键词: PM_{2.5}; 肺泡 II 型上皮细胞; 遗传毒性

中图分类号: R994.6 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2012)03-0210-03

近年来我国肺癌的发病率和死亡率增长迅速, 吸烟和大气污染已被公认是肺癌发生的危险因素。随着经济水平的大幅增长, 大气中细颗粒物 PM_{2.5} 的污染也越来越严重。PM_{2.5} 可以穿透人体呼吸道的防御毛发状结构, 进入支气管, 干扰肺部的气体交换引发人体整个范围的疾病, 包括哮喘、支气管炎和心血管病等疾病。PM_{2.5} 还可以通过支气管进入肺部或肺泡, 并能溶解在血液中通往全身, 由于其本身的毒性或携带有毒物质, 因而对人体健康造成极大危害。Hornberg^[1] 等发现 PM_{2.5} 引起 BEAS-2B 细胞 SCE 的产生, 提示 PM_{2.5} 具有遗传毒性作用, 同样的结论在肺上皮细胞 (A549) 也得到了证实。

流行病学研究显示, 烹调油烟中的细颗粒物可引起脂质过氧化使肺功能和人体免疫功能发生改变, 引起染色体损伤, 使患肺癌的危险性增加。本课题组在前期工作中对细颗粒物可以通过诱发氧化应激而诱导肺肿瘤进行了实验证明, 本次研究采用彗星实验和 PAH-DNA 加合物 ELISA 试剂盒检测细颗粒物 PM_{2.5} 对肺泡 II 型上皮细胞 (AEC II) 的遗传毒性。

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备及试剂

收稿日期: 2011-09-05

基金项目: 安徽省自然科学基金 (090413265X); 安徽省教育厅自然科学基金 (2006KJ311B)

作者简介: 汪磊 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 环境毒理学。

通讯作者: 操基玉, 教授, E-mail: qshq@163.com。

PM_{2.5} 细颗粒物采样器 (山东淄博耐普电子仪器有限公司), 恒温 CO₂ 培养箱 (美国 Shellab 公司), 恒温水浴锅 (南通金石实验仪器有限公司), 全自动酶标仪 (瑞士 Tecan 公司), -80 °C 超低温冰箱 (日本三洋公司), SCGE-T 水平电泳槽 (南宁市拜康生物技术有限公司), DYY-III 8A 稳压稳流电泳仪 (北京六一仪器厂), DEME 培养基 (美国 Gibco 公司), 新生牛血清 (美国 Hyclone 公司), 脱氧核糖核酸酶、胰蛋白酶、IV 型胶原酶、正常溶点琼脂糖和低溶点琼脂糖 (美国 Sigma 公司), PAH-DNA 加合物 ELISA 试剂盒 (R&D 生物有限公司)。

1.2 样品的采集和制备

细颗粒物的采集和制备参考文献 [2], 用电炉加热 200 ml 的鲁花花生油, 温度控制在 (280 ± 5) °C, 采样点设在电炉周围 1 m 范围内, 高度距油面 50 cm, 流速 10 ~ 12 L/min。将采集有油烟的超细玻璃纤维滤膜剪碎后加适量丙酮, 超声波抽提, 过滤, 烘干、称重后加 DMSO 溶解, 调整浓度为 200 mg/ml, -80 °C 保存。

1.3 实验动物

健康成年 ICR 小鼠由安徽省动物中心提供, 正常饮食喂养。

1.4 AEC II 细胞的培养及染毒

选用孕 18 d ICR 胎鼠, 腹腔麻醉, 75% 乙醇浸泡, 剖腹取出胎鼠, 将胎鼠移至无菌 HBSS 中, 取胎鼠肺组织, 用 HBSS 润洗 3 遍, 然后用无菌剪刀将肺组织剪成 1 mm³ 的小块, HBSS 洗去混浊液。以每只胎鼠约 0.2 ml 加入 2 g/L 胰蛋白酶 2 ml 和 2 g/L DNase 2 ml 消化组织块 20 min, 每隔 5 min 震荡 1 次, 加入同体积 DMEM (含 10% FBS) 终止消化, 过滤, 1 200 r/min 离心, 弃上清液。加入 2 mg/L 的 IV 型胶原酶消化 15 min, 重复上述过程, 弃上清液, 加入含 10% FBS 的 DMEM 制成细胞悬液, 接种于培养皿, 2 h 后换皿, 重复 3 次, 调整细胞浓度为 1 × 10⁶, 接种于 96 孔板 (每孔 200 μl) 置温箱培养, 待长成单层后, 弃上清, 加等量细颗粒物悬液, 使染毒终浓度为 25、50、100 和 200 μg/ml。

1.5 AEC II 细胞存活率 MTT 的测定

MTT 的测定参考文献 [2], 设染毒对照孔, 分别检测染毒 12 h、24 h 和 48 h 细胞的存活率。染毒结束前 3 h, 弃培养液上清, PBS 洗 3 次, 每孔加 DMSO 100 μl, 震荡 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 (A) 值。细胞存活率 (%) = (各剂量组 A 均值 - 对照孔 A 均值) / 对照孔 A 均值 × 100%。每种浓度设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

1.6 彗星实验和 PAH-DNA 加合物的测定

彗星实验步骤: 细胞用冰冷 PBS 洗 1~2 次, 离心收集, 调整密度为 1×10^5 个/ml; 铺胶 (各浓度琼脂糖凝胶均用 PBS 配制): ①第一层凝胶: 微波炉加热溶解正常熔点琼脂糖, 冷至 45~60 °C, 取适量铺于载玻片, 盖上盖玻片 4 °C 下凝固至少 30 min; ②第二层凝胶: 微波炉加热低熔点琼脂糖, 冷至 37 °C; 将 20 μ l 细胞悬液和 75 μ l 的 LMA 混合液滴到第一层琼脂糖上, 盖上盖玻片, 置 4 °C 凝固 30 min; ③细胞裂解, 移去盖玻片, 将载玻片置于平皿, 轻轻加入新鲜配制的预冷细胞裂解混合液; 4 °C 下 1~3 h 过夜, 取出用蒸馏水轻轻漂洗 2 次; ④DNA 碱解旋; ⑤细胞电泳 (稳压 25 V, 稳流 300 mA, 20~30 min) 后, 加入 0.4 mmol/L 缓冲液或双蒸水漂洗 2 次, 每次 5~15 min, 弃液, 用 PBS 洗干净, 滤纸吸干; ⑥每张载玻片加 2~3 滴染色剂 (常用 30 μ g/ml) 避光染色; ⑦荧光显微镜 515~560 (红光) 波长激发光观察、拍照、分析。

PAH-DNA 加合物的测定采用抗体夹心酶联免疫吸附法测定样品中小鼠 PAH-DNA 加合物的水平。具体操作步骤按试剂盒要求进行。

1.7 统计数据分析

采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析, 多组间采用单因素方差分析和方差齐性检验, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 $PM_{2.5}$ 对 AEC II 细胞存活率的影响

如图 1 所示, 与对照组相比, 不同浓度 $PM_{2.5}$ 染毒 12 h、24 h、48 h 均对 AEC II 细胞产生了明显的细胞毒性, 各剂量组细胞存活率均显著降低 ($P < 0.05$), 随着染毒浓度和染毒时间的增加, 呈现一定的剂量-反应关系和时间-反应关系。

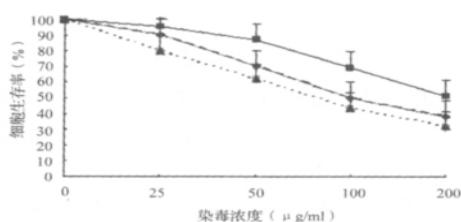


图 1 $PM_{2.5}$ 对 AEC II 细胞存活率的影响 ($n = 3$)

2.2 彗星实验结果

2.2.1 不同浓度 $PM_{2.5}$ 染毒 随着染毒浓度的增加, AEC II 细胞彗星尾部长度也逐渐增加, 提示 DNA 损伤 (见封三图 2)。

2.2.2 $PM_{2.5}$ 染毒对 Olive 尾矩的影响 如表 1 所示, AEC II 细胞用不同浓度的 $PM_{2.5}$ 染毒 24 h 以后, 随着染毒浓度的增高, Olive 尾矩、尾矩、尾长、尾部 DNA 含量均有不同程度增加, 呈剂量-反应关系。细胞染毒组 Olive 尾矩各染毒浓度组与溶剂对照组比较, $P < 0.001$; 50 μ g/ml 组与 12.5 μ g/ml 组、25 μ g/ml 组比较, $P < 0.001$ 。细胞染毒组尾矩各染毒浓度组与溶剂对照组比较, $P < 0.001$; 50 μ g/ml 组与 12.5 μ g/ml 组、25 μ g/ml 组比较, $P < 0.001$ 。细胞染毒组尾长各染毒浓度组与溶剂对照组比较, $P < 0.001$; 50 μ g/ml 组与 12.5 μ g/ml 组、25 μ g/ml 组比较, $P < 0.001$ 。细胞染毒组尾部

DNA 含量各浓度组与溶剂对照组比较, $P < 0.001$; 25 μ g/ml 组与 12.5 μ g/ml 组比较, $P < 0.001$; 50 μ g/ml 组与 12.5 μ g/ml 组、25 μ g/ml 组比较, $P < 0.001$ 。

表 1 彗星实验中 $PM_{2.5}$ 染毒 24 h 对胎鼠 AEC II 各指标的影响 ($n = 50$)

浓度 (μ g/ml)	Olive 尾矩	尾矩	尾长	尾部 DNA
0	0.47 $\pm$ 0.08	0.34 $\pm$ 0.10	5.53 $\pm$ 0.76	4.53 $\pm$ 1.06
12.5	6.64 $\pm$ 0.89 ^a	9.56 $\pm$ 1.91 ^a	38.26 $\pm$ 2.02 ^a	23.47 $\pm$ 1.39 ^a
25	8.08 $\pm$ 0.49 ^a	11.99 $\pm$ 1.57 ^a	39.88 $\pm$ 1.44 ^a	26.54 $\pm$ 1.24 ^{ab}
50	13.60 $\pm$ 2.24 ^{abc}	21.44 $\pm$ 3.99 ^{abc}	55.40 $\pm$ 4.18 ^{abc}	35.50 $\pm$ 2.49 ^{abc}

注: 与溶剂对照 (0 μ g/ml) 组比较, a, $P < 0.05$; 与 12.5 μ g/ml 组比较, b, $P < 0.05$; 与 25 μ g/ml 组比较, c, $P < 0.05$ 。

2.3 PAH-DNA 加合物的测定结果

AEC II 细胞染毒不同浓度 $PM_{2.5}$ 6 h、12 h、24 h 后, 随着染毒浓度的增加, AEC II DNA 加合物含量有不同程度增加, 呈剂量-反应关系。在不同染毒时间、不同染毒浓度与溶剂对照组比较, $P < 0.05$; 6 h, 25 μ g/ml 组和 50 μ g/ml 组与 12.5 μ g/ml 组相比, $P < 0.05$; 12 h, 50 μ g/ml 组与 12.5 μ g/ml、25 μ g/ml 组相比, $P < 0.05$ (表 2)。

表 2 AEC II 细胞 $PM_{2.5}$ 染毒后 DNA 加合物含量的表达 ($n = 50$)

浓度 (μ g/ml)	6 h	12 h	24 h
0	21.21 $\pm$ 0.66	22.00 $\pm$ 0.19	21.73 $\pm$ 1.61
12.5	87.73 $\pm$ 2.59 ^a	88.39 $\pm$ 2.85 ^a	91.97 $\pm$ 2.99 ^a
25	96.24 $\pm$ 3.51 ^{ab}	94.00 $\pm$ 1.67 ^a	99.12 $\pm$ 2.65 ^a
50	96.67 $\pm$ 0.87 ^{ab}	101.85 $\pm$ 4.63 ^{abc}	102.18 $\pm$ 7.24 ^a

注: 与溶剂对照 (0 μ g/ml) 组比较, a, $P < 0.05$; 与 12.5 μ g/ml 组比较, b, $P < 0.05$; 与 25 μ g/ml 组比较, c, $P < 0.05$ 。

3 讨论

本实验研究显示, 烹调油烟中的细颗粒物对胎鼠 AEC II 细胞增殖具有明显的抑制作用。随着染毒时间和染毒剂量的增加, 细胞存活率逐渐下降, 呈时间-反应关系和剂量-反应关系。该结果与 Wu She-Ching 等^[3]的研究结果一致。

烹调油烟 (COF) 是含有包括苯并 (a) 芘 [B(a)P]、二苯并 (a,h) 芘 [DB(a,h)P]、苯并 (a) 蒽 [B(a)A] 等多环芳烃在内的 300 多种化合物的混合物^[4]。大量研究资料表明, COF 具有遗传毒性、潜在致癌性^[5]。彗星实验不同浓度 $PM_{2.5}$ 染毒 24 h 对 AEC II 细胞 DNA 有损伤, 随着浓度的增加, 损伤越明显。说明低浓度 $PM_{2.5}$ 即可引起 AEC II 细胞 DNA 损伤, 且浓度越大, 损伤越明显, 可能由于 $PM_{2.5}$ 吸附性强, 可携带重金属、硫酸盐、有机物、病毒等进入呼吸道和肺部, 从而引起一系列的细胞损伤。

不少研究证实在细颗粒物的有机提取物中, 含有硝基 PAH 的弱极性成分, 具有最强的致突变、致癌作用, 是主要的遗传作用物之一^[6]。贾鸿宁等^[7]对 PAH 与细胞 DNA 损伤关系的研究表明, PAHs 进入人体后, 大部分经混合功能氧化酶代谢生成各种中间产物和终产物, 其中一些代谢产物可与 DNA 共价结合形成 PAH-DNA 加合物, 引起 DNA 损伤, 诱导

基因突变,甚至诱发肿瘤形成。PAH 引起 DNA 损伤的机制可能为 PAH 进入体内后,大部分在肝、肺细胞微粒体中细胞色素 P-450 酶系(如 CYP1A1)的氧化作用下形成环氧化物,然后经环氧化物水化酶(EH)水解成二羟基化合物,再由 P-450 酶系二次环氧化生成二羟基环氧化物,此为终致癌物,可与靶细胞 DNA 结合,形成 DNA 加合物,引起 DNA 损伤,启动致突变/致癌过程^[8,9]。本次实验研究显示,随着细颗粒物染毒浓度的增加,PAH-DNA 加合物的含量明显增加,呈现一定的剂量-反应关系。实验结果证实 PM_{2.5} 对肺泡 II 型上皮细胞产生了明显的细胞遗传毒性。

参考文献:

- [1] Hornberg C, Maciuleiciute L, Seemayer N H, *et al.* Induction of sister chromatid exchanges (SCE) in human tracheal epithelial cells by the fractions PM10 and PM2.5 of airborne particulates [J]. *Toxicol Lett*, 1998, 96-97: 215-220.
- [2] 王勇,操基玉,郭冬梅,等. 油烟中细颗粒物致胎鼠肺泡 II 型上皮细胞氧化应激指标的影响 [J]. *环境与健康杂志*, 2010, 27 (10): 872-875.
- [3] Wu She-Ching, Yen Gow-Chin. Effects of cooking oil fumes on the genotoxicity and oxidative stress in human lung carcinoma (A-549) cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 2004, 18 (5): 571-580.
- [4] 王凯雄,朱杏冬. 烹调油烟气的成分及其分析方法 [J]. *上海环境科学*, 1999, 18 (11): 526-528.
- [5] 宿飞,谭佑铭,周少琴. 烹调油烟致大鼠肺组织癌前病变激励探讨 [J]. *上海预防医学*, 2001, 13 (7): 326-327.
- [5] Massolo L, Muller A, Tueros M, *et al.* Assessment of mutagenicity and toxicity of different-size fractions of air particulates from La Plata, Argentina and Leipzig, Germany [J]. *Environ Toxicol*, 2002, 17 (3): 219-231.
- [7] 贾鸿宁,戴红. 多环芳烃的致癌性及其机制研究进展 [J]. *大连医科大学学报*, 2009, 31 (5): 604-607.
- [8] Tretyakova N, Matter B, Jones R, *et al.* Formation of benzo [a] pyrene diol epoxide-DNA adducts at specific guanines within K-ras and p53 gene sequences: stable isotope-labeling mass spectrometry approach [J]. *Biochemistry*, 2002, 41 (30): 9535-9544.
- [9] Nesnow S, Davis C, Nelson G B, *et al.* Comparison of the genotoxic activities of the K-region dihydrodiol of benzo [a] pyrene with benzo [a] pyrene in mammalian cells: morphological cell transformation; DNA damage and stable covalent DNA adducts [J]. *Mutat Res*, 2002, 521 (1-2): 91-102.

TGF- β -800G/A 基因多态性与尘肺的相关性

Relationship between genetic polymorphism of transforming growth factor- β -800G/A and pneumoconiosis susceptibility

李娟, 范雪云, 刘亚楠, 郝小惠, 朱丽华

LI Juan, FAN Xue-yun, LIU Ya-nan, HAO Xiao-hui, ZHU Li-hua

(河北联合大学, 河北 唐山 063000)

摘要: 采用 1:1 配对的病例对照研究方法, 病例组为确诊的 117 例 I 期尘肺病人, 对照组与尘肺组同性别、同民族、同一工作车间或相同采掘工作面, 年龄差 <5 岁, 开始接尘时间和累积接尘工龄差 <2 年的接尘工人。应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术对 TGF- β 启动区的 -800G/A 位点的基因多态性进行检测。尘肺组 TGF- β 启动区的 -800G/A 位点等位基因和基因型频率与对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。说明 TGF- β -800G/A 基因多态性在尘肺的易感性中不起主要作用。

关键词: 尘肺; 转化生长因子- β (TGF- β); 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术 (PCR-RFLP); 基因多态性

中图分类号: R135.2 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2012)03-0212-02

转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 是个多功能的细胞因子, 在纤维化中起着重要的作用已得到了肯定。它可以调控肺成纤维细胞分裂、增殖及胶原蛋白的合

成与降解, 并且在纤维化性疾病中表达水平增高^[1]。近年遗传因素在疾病发病中的作用备受关注。调查发现, 尘肺病存在着很大的个体差异。基因多态性在阐明人体对疾病的易感性、疾病临床表现的多样性以及对治疗的反应性上都起着重要作用。TGF- β -800G/A 基因多态位点位于基因启动区上游, 可能参与了 TGF- β 基因转录的调节^[2], 我们在严格控制粉尘因素的情况下, 采用 1:1 配对病例对照研究方法, 探讨 TGF- β 基因多态性与尘肺的关系, 揭示其在尘肺发生发展中遗传易感性的作用, 为进一步防治尘肺奠定理论基础。

1 对象与方法

1.1 对象

本次研究是在对唐山钢铁集团公司某耐火材料厂 575 名粉尘作业工人和开滦 (集团) 有限责任公司下属某煤矿 800 名接尘工人进行健康检查基础上进行的。详细核实每名工人的职业史, 调查其接尘性质及累积接尘工龄, 全部拍摄前后位胸大片, 由尘肺诊断组按《尘肺病诊断标准》(GBZ70—2009) 做出尘肺诊断。以确诊的尘肺病人为研究对象。从受检工人中选择与病例年龄差 <5 岁、同性别、同民族, 开始接尘时间及累积接尘工龄差 <2 年、在同一车间或同一采掘工作面工作的非尘肺接尘工人作为对照组, 与尘肺组进行 1:1 配

收稿日期: 2011-07-06; 修回日期: 2011-09-26
基金项目: 唐山市科技局资助 (10140201A-11)
作者简介: 李娟 (1978—), 女, 硕士, 讲师。