

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.10.004

文章编号: 1005-8982(2017)10-0020-05

PM2.5 对支气管上皮细胞中 VEGF、ROS 的影响*

雷春霞¹, 杨敏², 刘彩霞²

(1. 湖北省武汉市儿童医院, 湖北 武汉 430016; 2. 湖北医药学院附属太和医院, 湖北 十堰 442000)

摘要:目的 探讨细颗粒物(PM2.5)对支气管上皮细胞中血管内皮生长因子(VEGF)、活性氧类(ROS)的影响。**方法** 培养支气管上皮细胞 16HBE, 分为 4 组:生理盐水对照组、25 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 组、50 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 组和 100 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 组, 测定各组细胞增殖活性、ROS 及 VEGF 表达水平。**结果** 50 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 组和 100 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 组细胞增殖活性分别为 $(89.80 \pm 5.85)\%$ 和 $(77.20 \pm 7.70)\%$, 低于生理盐水对照组 ($P < 0.05$); 50 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 组和 100 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 组染毒 12 和 24 h ROS 均高于生理盐水对照组 ($P < 0.05$), 其中 100 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 组染毒 12 和 24 h ROS 水平均最高, 分别为 (16.60 ± 0.40) 和 (24.01 ± 0.55) ; 50 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 组和 100 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 组 VEGF 蛋白表达高于生理盐水对照组 ($P < 0.05$), 其中 100 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 组 VEGF 蛋白表达水平最高 (0.892 ± 0.028) 。**结论** PM2.5 能对支气管上皮细胞造成氧化损伤, 上调 VEGF 蛋白表达。

关键词: PM2.5; 支气管; 上皮细胞; VEGF; ROS

中图分类号: R725.6

文献标识码: A

Effect of PM2.5 on VEGF and ROS in bronchial epithelial cells*

Chun-xia Lei¹, Min Yang², Cai-xia Liu²

(1. Wuhan Children's Hospital, Wuhan, Hubei 430016, China; 2. Taihe Hospital Affiliated to Hubei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of fine particulate matter (PM2.5) on vascular endothelial growth factor (VEGF) and reactive oxygen species (ROS) in bronchial epithelial cells. **Methods** Bronchial epithelial cells 16HBE were cultured and divided into saline control group, 25 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 group, 50 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 group and 100 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 group. Cell proliferation activity and expressions of ROS and VEGF were measured in each group. **Results** In the 50 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 group and the 100 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 group, cell proliferation activity was $(89.80 \pm 5.85)\%$ and $(77.20 \pm 7.70)\%$ respectively, which was significantly lower than that in the saline control group ($P < 0.05$); ROS level was higher than that in the saline control group after exposure for 12 and 24 h ($P < 0.05$), among which the 100 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 group had the highest ROS level after 12-h and 24-h exposure [(16.60 ± 0.40) and (24.01 ± 0.55) respectively]. In the 50 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 group and the 100 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 group, VEGF protein expression was higher than that of the saline control group ($P < 0.05$), among which VEGF protein expression level in the 100 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 group was the highest (0.892 ± 0.028) . **Conclusions** PM2.5 can cause oxidative damage to bronchial epithelial cells and up-regulate the expression of VEGF protein.

Keywords: PM2.5; bronchus; epithelial cell; VEGF; ROS

细颗粒物(particulate matter 2.5, PM2.5)是指大气中漂浮的颗粒物,一般其直径 $\leq 2.5 \mu\text{m}$,主要是由工业生产排放的污染物、汽车尾气排放的废气组成,其中含有重金属、重金属盐等多种有毒污染物。近年

来研究表明 PM2.5 会对呼吸系统造成严重的损害^[1]。目前认为 PM2.5 的作用机制主要是通过吸入肺部的颗粒物引发炎症和氧化应激等反应导致系统性炎症反应以及神经调节改变,因而引发呼吸系统、

收稿日期:2016-11-04

* 基金项目:武汉市科学技术计划项目(No:2015061701011632)

中枢神经系统和心血管系统的损伤^[2]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是能与肝素特异性结合的血管内皮细胞生长因子,具有诱导体内血管新生的功能,其在组织中的表达能力反映了该组织的血管生成活性^[3-4]。有研究表明^[5]PM2.5对 VEGF 和活性氧类(reactive oxygen species, ROS)能产生一定的影响。本研究通过培养支气管上皮细胞 16HBE,将 PM2.5 配制成不同的浓度分组,测定各组细胞增殖活性、ROS 及 VEGF 表达水平,探讨细 PM2.5 对 VEGF、ROS 的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 α -MEM 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(美国 Abgent 公司),青、链霉素,血管内皮生长因子检测试剂盒(VEGF-KIT)(北京健平金星生物科技有限公司),VEGF 蛋白定量试剂盒(DVE00)(美国 R&D 公司),MTT 检测试剂盒(武汉博士德公司)。

1.1.2 仪器 空气总悬浮颗粒物采样器(武汉市天虹仪器有限责任公司),DCFH-DA 探针(美国 Sigma 公司),全自动立式高压灭菌锅 G154TW(美国 Zealway),超净工作台(北京西城设备厂),二氧化碳 CO₂ 培养箱 Galaxy170S(德国 New Brunswick eppendorf),Allegra64R 台式高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司),高分辨倒置显微镜(日本 Olympus 公司),-80℃冰箱(中国中科美菱公司),小型离心机(中国其林贝尔公司),酶联分光光度计(美国哈希 HACH 公司)。

1.2 空气颗粒制备

实验所用 PM2.5 为空气总悬浮颗粒物采样器采集的,并将收集好的 PM2.5 用生理盐水配制成所需浓度后置于超声波清洗仪(200W, 40 kHz)中超声振荡 15 min,混匀灭菌,2℃保存,使用前充分振荡混匀。

1.3 细胞培养及增殖活性检测

1.3.1 细胞培养 将人的支气管上皮细胞 16HBE(细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)培养于含 100 u/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素和 10%胎牛血清的 MEM 培养基中,采用单层贴壁培养法^[6],将其放置在 37℃、5%CO₂ 的恒温培养箱中。观察细胞生长状况,每周换液 3、4 次,在显微镜下观察细胞的生长融合情况,当观察到其融合达

到 70%~80%时按 1:2 的比例进行细胞传代^[7]。

1.3.2 增殖活性检测 将对数生长期的细胞制成细胞浓度为 5 \times 10⁵ 个/ml 单细胞悬液;将细胞悬液接种于 96 孔板中,0.2 ml/孔,培养 24 h;待细胞贴壁,调整 PM2.5 终浓度为 25、50、100 μ g/ml,每组设 5 个复孔,另设生理盐水对照组和调零孔;按照 MTT 试剂盒操作说明书进行实验。

1.4 实验分组

取对数生长期细胞消化后以 5 \times 10⁵ 个/ml 接种于培养板,待细胞贴壁后对细胞进行染毒处理,分为 4 组:生理盐水对照组、25 μ g/ml PM2.5 组、50 μ g/ml PM2.5 组和 100 μ g/ml PM2.5 组。

1.5 ROS 检测

在细胞染毒 12 和 24 h 后,将培养液弃去;用 1 \times PBS 洗细胞 2 次,加入终浓度为 10 μ mol/L 的 DCFH-DA 探针^[8],于 5%CO₂、37℃条件下继续培养;在培养 4 h 后再用 1 \times PBS 洗细胞 3 次,洗掉不被结合的 DCFH-DA 探针以减小背景值;用胰酶消化细胞,收集细胞后用流式细胞仪对细胞内的 ROS 进行检测^[9]。

1.6 VEGF 蛋白检测

细胞中的 VEGF 蛋白检测采用酶联免疫吸附法(ELISA)进行^[10]。反应结束后用酶联分光光度计测定波长在 540 nm 处的 A 值,换算 VEGF 蛋白的含量。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS19.0 统计软件,计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较使用方差分析,两两比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖活性比较

生理盐水对照组和 25 μ g/ml PM2.5 组细胞增殖活性比较差异无统计学意义($P > 0.05$);50 μ g/ml PM2.5 组和 100 μ g/ml PM2.5 组细胞增殖活性分别为(89.80 \pm 5.85)%和(77.20 \pm 7.70)%,低于生理盐水对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组 ROS 水平比较

生理盐水对照组和 25 μ g/ml PM2.5 组染毒 12 和 24 h ROS 比较差异无统计学意义($P > 0.05$);50 μ g/ml PM2.5 组和 100 μ g/ml PM2.5 组染毒 12 和 24 h ROS 均高于生理盐水对照组($P < 0.05$),其中 100 μ g/ml PM2.5 组染毒 12 和 24 h ROS 水平均最高,

为(16.60 ± 0.40)和(24.01 ± 0.55),见表 2。

2.3 各组 VEGF 表达比较

生理盐水对照组和 25 μg/ml PM2.5 组 VEGF 蛋白表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$);50 μg/ml PM2.5 组和 100 μg/ml PM2.5 组 VEGF 蛋白表达高于生理盐水对照组($P < 0.05$),其中 100 μg/ml PM2.5 组 VEGF 蛋白表达水平最高(0.892 ± 0.028)。见表 3,附图。

表 1 各组细胞存活率比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

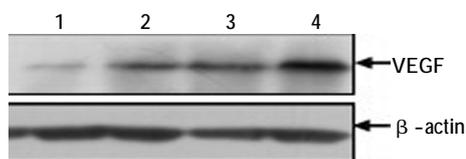
组别	细胞存活率/%	F 值	P 值
生理盐水对照组	100.00 ± 6.73		
25 μg/ml PM2.5 组	97.20 ± 4.50	20.514	0.000
50 μg/ml PM2.5 组	89.80 ± 5.85		
100 μg/ml PM2.5 组	77.20 ± 7.70		

表 2 各组染毒 12 和 24 h ROS 水平比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	12 h	24 h
生理盐水对照组	13.50 ± 1.20	13.74 ± 0.91
25 μg/ml PM2.5 组	14.40 ± 1.08	14.51 ± 0.67
50 μg/ml PM2.5 组	15.55 ± 0.62	20.46 ± 0.61
100 μg/ml PM2.5 组	16.60 ± 0.40	24.01 ± 0.55
F 值	17.422	24.108
P 值	0.001	0.000

表 3 各组 VEGF 蛋白表达比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	VEGF 蛋白表达	F 值	P 值
生理盐水对照组	0.107 ± 0.010		
25 μg/ml PM2.5 组	0.143 ± 0.022	32.107	0.000
50 μg/ml PM2.5 组	0.544 ± 0.031		
100 μg/ml PM2.5 组	0.892 ± 0.028		



1: 生理盐水对照组; 2: 25 μg/ml PM2.5 组; 3: 50 μg/ml PM2.5 组; 4: 100 μg/ml PM2.5 组

附图 VEGF 蛋白表达

3 讨论

近年来我国的 PM2.5 污染程度逐年增加,在冬季许多城市都会出现雾霾现象并危害人的呼吸系统、中枢神经系统以及心血管系统等^[1],严重影响人们的出行安全。有研究显示^[12-13],在急性染毒的实验中发现吸入体内的细颗粒物暴露时能刺激肺泡上皮

细胞、支气管上皮细胞及巨噬细胞释放大量的趋化因子、促炎因子及氧自由基等,从而促进介导炎症的中性粒细胞不断聚集,从而导致肺部病理损伤。ROS 包括含氧自由基、氧离子、过氧化物等,是生物有氧代谢过程中副产物的一种,体内的活性氧类若产生过多将破坏体内的基因结构^[14]。活性氧包含氧离子和过氧化氢,是含氧的化学活性分子,在活性氧的核外存在未配对电子,因而具有极强的反应活性^[15-16]。在人体正常情况下,ROS 作为人体正常代谢的产物,在维持机体稳定性、协助细胞信号传导方面起了关键作用^[17]。但当外界环境发生改变时,比如碰到热源、紫外线照射皮肤等,体内会产生大量的 ROS,产生原因可能是细胞结构遭到破坏,一般将这种情况称为氧化应激反应^[18]。

3.1 细胞增殖活性比较

PM2.5 是一种主要由人类活动产生的、含多种成分的复合物,其上吸附有细菌、病毒、酸性氧化物、有毒重金属及有机污染物等多种物质,吸入人体会对身体造成伤害^[19-20]。本研究比较细胞增殖活性,结果显示:生理盐水对照组和 25 μg/ml PM2.5 组细胞增殖活性比较差异无统计学意义;50 μg/ml PM2.5 组和 100 μg/ml PM2.5 组细胞增殖活性低于生理盐水对照组,差异有统计学意义。结果表明 PM2.5 能对细胞造成伤害,阻遏细胞的增殖,从而显示 PM2.5 的危害性。

3.2 各组 ROS 水平比较

近年来越来越多的研究表明 PM2.5 引起病变的主要原因是 ROS 的参与^[21]。PM2.5 具有自由基活性,PM2.5 中含有的有机成分和金属成分会刺激肺泡中的巨噬细胞产生自由基,破坏组织细胞^[22]。有研究表明^[23-24]PM2.5 中含有的有机碳成分能引起支气管上皮细胞的脂质过氧化损伤,同时也能引起细胞的氧化损伤。PM2.5 通过血气屏障到达肺部,通过刺激 ROS 和炎症因子诱导支气管上皮细胞和巨噬细胞产生细胞毒性,导致肺部发炎^[25]。本研究比较各组 ROS 水平结果显示:50 μg/ml PM2.5 组和 100 μg/ml PM2.5 组染毒 12 和 24 h ROS 均高于生理盐水对照组,其中 100 μg/ml PM2.5 组染毒 12 和 24 h ROS 水平均最高。结果表明经过 PM2.5 处理的支气管上皮细胞 16HBE 内 ROS 的水平升高,且 PM2.5 的浓度越高,ROS 的水平越高,这也表明了 PM2.5 的浓度越高,刺激机体产生氧化应激反应越强烈。PM2.5 浓度越高,对人体的伤害越大。

3.3 各组 VEGF 表达比较

根据美国 FOLKMAN 博士提出的 FOLKMAN 理论^[26-27], VEGF 的临床应用基础是肿瘤组织通过新生的血管来维持营养物质和足够的氧气供应来保证肿瘤的生长,所以 VEGF 对肿瘤的研究提供了很好的研究方向。VEGF 的主要生物学功能包括:①微血管的通透性提高,致使体液和蛋白渗出^[28];②促进趋化作用和有丝分裂,在体内诱导血管生成,在体外促进内皮细胞生长^[29]。

本研究比较各组 VEGF 结果显示:50 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 组和 100 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 组 VEGF 蛋白表达高于生理盐水对照组,其中 100 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 组 VEGF 蛋白表达水平最高。结果表明 PM2.5 能刺激细胞诱导表达 VEGF,可以认为 PM2.5 诱发支气管上皮损伤炎症反应中 VEGF 参与其中。

综上所述,PM2.5 能对支气管上皮细胞造成氧化损伤,上调 VEGF 蛋白表达。

参 考 文 献:

- [1] MENG J, LIU J, XU Y, et al. Tracing Primary PM2.5 emissions via Chinese supply chains [J]. *Environmental Research Letters*, 2015, 10(5): 1-12.
- [2] CUI M, CHEN Y, TIAN C, et al. Chemical composition of PM2.5 from two tunnels with different vehicular fleet characteristics [J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 550(7): 123-132.
- [3] 李尚师,李素芝,高钰琪,等.高原心脏病研究对象血液中促血管内皮生长因子及平滑肌细胞生长因子的表达及意义[J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36(12): 1331-1334.
- [4] MORERA Y, GONZÁLEZ R, LAMDAN H, et al. Vaccination with a mutated variant of human vascular endothelial growth factor (VEGF) blocks VEGF-induced retinal neovascularization in a rabbit experimental model[J]. *Experimental Eye Research*, 2014, 122(5): 102-109.
- [5] KHANNA N, ZHOU N, KE J, et al. Evaluation of the contribution of the building sector to PM2.5 emissions in China[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 87(3): 767-784.
- [6] ROTHBAUER M, ERTL P, THEILER B A, et al. Biointerfaces: anisotropic crystalline protein nanolayers as multi-functional biointerface for patterned co-cultures of adherent and non-adherent cells in microfluidic devices(Adv. Mater. Interfaces 1/2015)[J]. *Advanced Materials Interfaces*, 2015, 2(1): 4557-4558.
- [7] RADRIZZANI M, CICERO V L, SONCIN S, et al. Bone marrow-derived cells for cardiovascular cell therapy: an optimized GMP method based on low-density gradient improves cell purity and function[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2014, 12(1): 276-276.
- [8] COTORAS M, VIVANCO H, MELO R, et al. In vitro and in vivo evaluation of the antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds obtained from grape (*Vitis vinifera*) pomace[J]. *Molecules*, 2014, 19(12): 21154-21167.
- [9] JEONG S C, SHIN C Y, SONG M K, et al. Gene expression profiling of human alveolar epithelial cells (A549 cells) exposed to atmospheric particulate matter 2.5 (PM2.5) collected from Seoul, Korea [J]. *Molecular & Cellular Toxicology*, 2015, 10(4): 361-368.
- [10] SENGUPTA P P, RUDRAMURTHY G R, LIGI M, et al. Sero-diagnosis of surra exploiting recombinant VSG antigen based ELISA for surveillance [J]. *Veterinary Parasitology*, 2014, 205(3-4): 490-498.
- [11] QIAO L, CAI J, WANG H, et al. PM2.5 constituents and hospital emergency-room visits in Shanghai, China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(17): 10406-10414.
- [12] 宋仁生,李涛,吴柱国.线粒体活性氧类及其对心血管系统影响的研究进展[J]. *医学综述*, 2015, 21(19): 3475-3477.
- [13] BELKAID Y, HAND T. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation[J]. *Cell*, 2014, 157(1): 121-141.
- [14] 尤晓颜,李兆周,郑华军,等.喜温嗜酸硫杆菌 SM-1 的 ROS 防护机制[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(2): 243-250.
- [15] ZOROV D B, JUHASZOVA M, SOLLLOTT S J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release[J]. *Physiological Reviews*, 2014, 94(3): 909-950.
- [16] GILROY S, SUZUKI N, MILLER G, et al. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling[J]. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(10): 623-630.
- [17] 谢飞,何延政,刘勇.活性氧簇对创口愈合过程中血管新生的影响[J]. *华西医学*, 2014, 29(10): 1979-1982.
- [18] 张月霞,冯燕,杨振华,等.粉笔 PM2.5/PM10 诱导大鼠巨噬细胞产生活性氧和活性氮机理[J]. *山西大学学报(自然科学版)*, 2015, 38(02): 361-366.
- [19] HE M, ICHINOSE T, REN Y, et al. PM2.5-rich dust collected from the air in Fukuoka, Kyushu, Japan, can exacerbate murine lung eosinophilia [J]. *Inhalation Toxicology*, 2015, 27 (6): 287-299.
- [20] LIU X, YU X, ZHANG Z. PM2.5 concentration differences between various forest types and its correlation with forest structure[J]. *Atmosphere*, 2015, 6(11): 1801-1815.
- [21] HAMAD S H, SCHAUER J J, ANTKIEWICZ D S, et al. ROS production and gene expression in alveolar macrophages exposed to PM2.5 from Baghdad, Iraq: Seasonal trends and impact of chemical composition[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 543(Pt A): 739-745.
- [22] VERMA V, FANG T, XU L, et al. Organic aerosols associated with the generation of reactive oxygen species (ROS) by Water-soluble PM2.5[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(7): 4646-4656.
- [23] 赵亚光,禹蒙蒙,刘禹初,等.有机金属配合物控制的活性自由基聚合研究进展[J]. *中国科学:化学*, 2014, 44(2): 236-253.
- [24] 滕博,王贺彬,汪雅芳,等.细颗粒物(PM2.5)与呼吸系统疾病的

- 关系及机制[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(2): 334-338.
- [25] TSENG C Y, CHUNG M C, WANG J S, et al. Potent in vitro protection against PM2.5-Caused ROS Generation and vascular permeability by long-term pretreatment with ganoderma tsugae[J]. American Journal of Chinese Medicine, 2016, 44(2): 355-376.
- [26] JAMES B, BLUM W, DAZZI C. Bread and soil in ancient rome: a vision of abundance and an ideal of order based on wheat, grapes, and olives[J]. Dreaming, 2014, 12(4): 171-183.
- [27] 胡建荣, 许华俊, 李庆云, 等. PM(2.5)对被动吸烟大鼠慢性气道炎症及氧化应激反应的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2014, 34(5): 619-625.
- [28] 黄榕权, 谢燕清, 张雅洁. MMP-2、MMP-9 和VEGF-D 在乳腺癌中的表达及其与肿瘤淋巴管新生的关系 [J]. 广东医学, 2014, 35(13): 2072-2074.
- [29] 闫乐艳, 施振旦. VEGF 在雌性哺乳动物生殖过程中作用的研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(3): 443-453.

(张蕾 编辑)