

本文引用:范威,王贵,安珍,等. 大气细颗粒物对胶原结构样巨噬细胞受体基因敲除小鼠呼吸和循环系统的影响[J]. 新乡医学院学报,2019,36(1):7-12. DOI:10.7683/xyxyxb.2019.01.002.

【基础研究】

大气细颗粒物对胶原结构样巨噬细胞受体基因敲除小鼠呼吸和循环系统的影响

范威,王贵,安珍,张艳格,姜静,姚三巧,吴卫东

(新乡医学院公共卫生学院,河南 新乡 453000)

摘要: **目的** 探讨大气细颗粒物(PM_{2.5})对胶原结构样巨噬细胞受体(MARCO)基因敲除小鼠呼吸和循环系统的作用。**方法** 将12只野生型C57BL/6小鼠随机分为野生型生理盐水组和野生型PM_{2.5}组,12只MARCO^{-/-}型C57BL/6小鼠随机分为MARCO^{-/-}型生理盐水组和MARCO^{-/-}型PM_{2.5}组,每组6只。野生型PM_{2.5}组和MARCO^{-/-}型PM_{2.5}组小鼠气管滴注PM_{2.5}混悬液4 mg·kg⁻¹,野生型生理盐水组和MARCO^{-/-}型生理盐水组小鼠给予等量无菌生理盐水,隔日1次,共6次。末次滴注24 h后检测各组小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)、乳酸脱氢酶(LDH)及血清中C-反应蛋白(CRP)、TNF-α和LDH水平;免疫组织化学法检测各组小鼠肺组织中磷酸化表皮生长因子受体(EGFR)表达情况。**结果** 野生型生理盐水组与MARCO^{-/-}型生理盐水组小鼠BALF中IL-6、TNF-α、LDH水平及血清中CRP、TNF-α、LDH水平比较差异均无统计学意义($t_{\text{BALF}} = -0.230、-0.964、1.263$, $t_{\text{血清}} = -0.944、-1.908、-0.392$, $P > 0.05$)。野生型PM_{2.5}组与野生型生理盐水组小鼠BALF中IL-6、TNF-α、LDH水平及血清中CRP、TNF-α、LDH水平比较差异无统计学意义($t_{\text{BALF}} = -0.583、-2.130、-1.016$, $t_{\text{血清}} = -0.890、-1.649、-0.885$, $P > 0.05$)。MARCO^{-/-}型PM_{2.5}组小鼠BALF中IL-6、TNF-α、LDH水平及血清中CRP、LDH水平显著高于MARCO^{-/-}型生理盐水组($t_{\text{BALF}} = 2.469、3.364、3.000$, $t_{\text{血清}} = 2.530、4.605$, $P < 0.05$),2组小鼠血清TNF-α水平比较差异无统计学意义($t = 1.911$, $P > 0.05$)。MARCO^{-/-}型PM_{2.5}组与野生型PM_{2.5}组小鼠BALF中IL-6、TNF-α、LDH水平及血清中CRP、TNF-α水平比较差异无统计学意义($t_{\text{BALF}} = 1.723、1.114、-0.324$, $t_{\text{血清}} = 1.643、1.311$, $P > 0.05$);MARCO^{-/-}型PM_{2.5}组小鼠血清LDH水平显著高于野生型PM_{2.5}组($t = 2.378$, $P < 0.05$)。免疫组织化学结果显示,野生型与MARCO^{-/-}型生理盐水组小鼠肺组织中均未见磷酸化EGFR表达,而野生型与MARCO^{-/-}型PM_{2.5}组小鼠肺组织均可见磷酸化EGFR表达,且MARCO^{-/-}型PM_{2.5}组小鼠肺组织中磷酸化EGFR水平高于野生型PM_{2.5}组。**结论** PM_{2.5}急性暴露可导致MARCO^{-/-}小鼠呼吸和循环系统发生炎症效应,MARCO可能在PM_{2.5}导致的小鼠急性呼吸和循环系统炎症中发挥重要作用。

关键词: 大气细颗粒物;胶原结构样巨噬细胞受体;呼吸系统;循环系统;炎症

中图分类号: R574 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2019)01-0007-06

Effect of fine particulate matter on respiratory and cardiovascular systems in mice with macrophage receptor with collagenous structure gene knockout

FAN Wei, WANG Gui, AN Zhen, ZHANG Yan-ge, JIANG Jing, YAO San-qiao, WU Wei-dong

(School of Public Health, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of fine particulate matter (PM_{2.5}) on respiratory and cardiovascular systems in mice with macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) gene knockout. **Methods** Twelve wild-type C57BL/6 mice were randomly divided into wide-type normal saline group and wild-type PM_{2.5} group, with 6 mice in each group. Twelve MACRO^{-/-} C57BL/6 mice were randomly divided into MARCO^{-/-} normal saline group and MARCO^{-/-} PM_{2.5} group, with 6 mice in each group. The mice in the wild-type PM_{2.5} group and MARCO^{-/-} PM_{2.5} group were treated with PM_{2.5} suspension (4 mg·kg⁻¹) by intratracheal instillation, while the mice in the wide-type normal saline group and MARCO^{-/-} normal saline group were treated with equal volume of normal saline by intratracheal instillation, once every other day for six times. The levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), lactate dehydrogenase (LDH) in bronchoalveolar

DOI:10.7683/xyxyxb.2019.01.002

收稿日期:2018-09-03

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81573112);国家自然科学基金资助项目(编号:81703182);河南省高等学校重点科研计划项目(编号:17A330004)。

作者简介:范威(1992-),男,河南商丘人,硕士研究生在读,研究方向:环境污染与健康。

通信作者:安珍(1985-),女,河北怀安人,博士,讲师,研究方向:环境卫生;E-mail:anzhen0402@126.com。

lavage fluid (BALF) and the levels of serum C-reactive protein (CRP), TNF- α , LDH were detected at 24 hours after the last infusion. The expression of phosphorylated epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung tissues of mice in each group was determined by immunohistochemistry. **Results** There was no significant difference in the levels of IL-6, TNF- α , LDH in BALF and the levels of CRP, TNF- α , LDH in serum between the wild-type normal saline group and MARCO^{-/-} normal saline group ($t_{\text{BALF}} = -0.230, -0.964, 1.263; t_{\text{serum}} = -0.944, -1.908, -0.392; P > 0.05$). There was no significant difference in the levels of IL-6, TNF- α , LDH in BALF and the levels of CRP, TNF- α , LDH in serum between wide-type normal saline group and wild-type PM_{2.5} group ($t_{\text{BALF}} = -0.583, -2.130, -1.016; t_{\text{serum}} = -0.890, -1.649, -0.885; P > 0.05$). The levels of IL-6, TNF- α , LDH in BALF and the levels of CRP, LDH in serum of mice in the MARCO^{-/-} PM_{2.5} group were significantly higher than those in the MARCO^{-/-} normal saline group ($t_{\text{BALF}} = 2.469, 3.364, 3.000; t_{\text{serum}} = 2.530, 4.605; P < 0.05$). There was no significant difference in the level of serum TNF- α between the MARCO^{-/-} PM_{2.5} group and MARCO^{-/-} normal saline group ($t = 1.911, P > 0.05$). There was no significant difference in the levels of IL-6, TNF- α , LDH in BALF and the levels of CRP, TNF- α in serum between the MARCO^{-/-} PM_{2.5} group and wild-type PM_{2.5} group ($t_{\text{BALF}} = 1.723, 1.114, -0.324; t_{\text{serum}} = 1.643, 1.311; P > 0.05$). The level of serum LDH of mice in the MARCO^{-/-} PM_{2.5} group was significantly higher than that in the wild-type PM_{2.5} group ($t = 2.378, P < 0.05$). The immunohistochemical results showed that there was no the expression of phosphorylated EGFR in lung tissues of mice in the wide-type normal saline group and MARCO^{-/-} normal saline group, while the expression of phosphorylated EGFR was observed in lung tissues of mice in the wild type PM_{2.5} group and MARCO^{-/-} PM_{2.5} group, and the expression of phosphorylated EGFR in lung tissues of mice in the MARCO^{-/-} PM_{2.5} group was higher than that in the wild type PM_{2.5} group. **Conclusion** The inflammatory reaction of respiratory and cardiovascular systems caused by PM_{2.5} acute exposure in MARCO^{-/-} mice is more serious than that in wild type mice. MARCO may play an important role in the acute inflammatory reaction of respiratory and cardiovascular systems of mice caused by PM_{2.5}.

Key words: fine particulate matter; macrophage receptor with collagenous structure; respiratory system; cardiovascular system; inflammation

大气细颗粒物 (fine particulate matter, PM_{2.5}) 粒径小, 在大气中滞留时间长, 可随呼吸进入人体, 直达肺泡甚至穿过气血屏障进入血液循环系统。研究表明, PM_{2.5} 可引起急性呼吸道和心血管系统炎症^[1-2]。肺泡巨噬细胞作为呼吸系统重要的免疫防御细胞, 能够通过识别、吞噬作用清除进入体内的 PM_{2.5}, 从而发挥保护机体的作用。然而, 暴露于 PM_{2.5} 也可能引起巨噬细胞发生一系列生理、生物化学改变, 如氧化应激和肺组织炎症反应, 继而引发全身性炎症反应^[3]。胶原结构样巨噬细胞受体 (macrophage receptor with collagenous structure, MARCO) 是 A 类清道夫受体家族的一种亚型, 主要存在于肺泡巨噬细胞表面, 是重要的识别、结合颗粒物的受体^[4-5]。PM_{2.5} 进入呼吸道后, 肺泡巨噬细胞通过表面受体识别并吞噬颗粒物形成尘细胞, 由呼吸道上皮细胞分泌的黏液包裹形成痰液, 通过纤毛的摆动作用排出体外^[6-7]。在此过程中, 肺泡巨噬细胞可以释放以炎症因子为主的大量生物活性物质, 包括白细胞介素 (interleukin, IL)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等。这些炎症因子不仅与呼吸系统受损伤程度直接相关, 还参与了肺组织内的免疫反应过程, 调节肺内其他免疫细胞的活性,

同时, 这些炎症因子还可能进入血液循环系统而影响全身^[8-9]。未被肺泡巨噬细胞清除的 PM_{2.5} 会直接刺激肺上皮细胞发生免疫反应, 引起表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 磷酸化表达增加^[10]。研究发现, MARCO 参与肺泡巨噬细胞对矽尘的识别和吞噬过程, 并在肺部炎症发生中发挥重要作用^[11-12]。目前, PM_{2.5} 诱发急性呼吸和循环系统炎症的机制尚未阐明, 探讨清道夫受体 MARCO 是否参与 PM_{2.5} 致急性呼吸及循环系统炎症的过程具有重要意义, 本研究旨在为采取有效措施预防 PM_{2.5} 的健康危害提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 12 周龄野生型 C57BL/6 小鼠和 MARCO^{-/-} 型 C57BL/6 小鼠各 12 只, 雌雄不拘, 体重 18 ~ 30 g, 均由新乡医学院免疫模式动物实验室梁银明教授馈赠。12 只野生型 C57BL/6 小鼠随机分为野生型生理盐水组和野生型 PM_{2.5} 组, 12 只 MARCO^{-/-} 型 C57BL/6 小鼠随机分为 MARCO^{-/-} 型生理盐水组和 MARCO^{-/-} 型 PM_{2.5} 组, 每组 6 只; 分笼饲养, 12 h/12 h 昼夜交替, 温度控制在 23 ~ 26 °C, 相对湿度控制在 40% ~ 70%, 自由进食、饮

水,适应性喂养1周。

1.2 主要试剂与仪器 C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、TNF- α 、IL-6 酶联免疫吸附试验试剂盒(武汉华美生物工程有限公司),乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所),EGFR 抗体(丹麦 DAKO 公司),磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)(北京索莱宝科技有限公司),乌拉坦(中国医药集团有限公司);Tisch Environmental TE-6070 PM_{2.5}大流量采样器(美国 Tisch 公司),Christ 真空冷冻干燥机(德国 Christ 公司),超声波清洗机(郑州生元仪器有限公司),ICP/MS 离子色谱联用系统(德国 Thermo 公司),OHAUS 电子天平[奥豪斯仪器(常州)有限公司],微量移液器、低速台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),JW-1042R 低速冷冻离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司),斡旋仪(海门其林贝尔仪器制造有限公司),超纯水器(北京普析通用仪器有限责任公司),双功能气浴恒温振荡器(金坛市杰瑞尔电器有限公司),Enspire 多标志微孔板检测仪(美国 Perkin Elmer 公司)。

1.3 PM_{2.5}混悬液的制备 2017年11月至2018年1月,采用美国 Tisch Environmental TE-6070 PM_{2.5}大流量采样器收集 PM_{2.5},采集地点周围无建筑物遮挡,为非工业区。采样膜为玻璃纤维滤膜,采样结束后用锡箔纸包裹滤膜避免污染,4℃冰箱保存。使用前将滤膜裁剪成2 cm×3 cm 方片浸入超纯水,超声震荡20 min,共3次,洗脱液经真空冷冻干燥后收集 PM_{2.5}粉末,-20℃保存。使用时用生理盐水配成相应浓度的 PM_{2.5}混悬液,超声振荡混匀备用。

1.4 各组小鼠处理方式 采用吸入式气管滴注法染毒各组小鼠^[13]:将小鼠放入乙醚麻醉缸内,迅速封住缸口,小鼠倒下不动、呼吸深慢视为麻醉成功,然后将小鼠上门齿悬挂于支架上,用镊子将其舌头拉出体外;将移液枪缓慢垂直插入小鼠口中至有轻微抵触感,野生型 PM_{2.5}组和 MARCO^{-/-}型 PM_{2.5}组小鼠按4 mg·kg⁻¹^[14]的剂量气管内注入2 g·L⁻¹ PM_{2.5}混悬液,野生型生理盐水组和 MARCO^{-/-}型生理盐水组小鼠给予等体积无菌生理盐水,捏住鼻腔10 s,取下小鼠,平放于手心轻轻摇晃,听到明显肺部湿啰音提示滴注成功,隔日1次,共6次。

1.5 各组小鼠血清中 TNF- α 、CRP、LDH 及支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中 IL-6、TNF- α 、LDH 水平检测 各组小鼠末次气

管滴注24 h后,按1.2 mg·kg⁻¹的剂量腹腔注射200 g·L⁻¹的乌拉坦溶液进行麻醉,固定小鼠,经腹主动脉取血,于4℃静置30 min,3 000 r·min⁻¹离心20 min,收集血清;取血完成后,结扎右侧肺叶,将0.5 mL生理盐水缓慢灌入左肺内,1 min后将生理盐水回收,连续进行3次,收集BALF,4℃1 500 r·min⁻¹离心20 min,收集上清液。采用酶联免疫吸附试验检测血清中 TNF- α 、CRP 水平及 BALF 中 IL-6、TNF- α 水平,采用微板法测定血清及 BALF 中 LDH 水平,操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.6 免疫组织化学法检测小鼠肺组织中磷酸化 EGFR 表达 取各组小鼠未经灌洗的右肺,用生理盐水冲洗干净,取适量右下肺组织浸入体积分数4%中性甲醛中,固定24 h,石蜡包埋,切片。石蜡切片脱蜡至水,柠檬酸抗原修复缓冲液进行抗原修复,PBS 洗涤3次,每次5 min;体积分数3%过氧化氢溶液洗涤3次,每次5 min;体积分数3%牛血清白蛋白室温封闭30 min;滴加一抗,4℃孵育过夜,PBS 洗涤3次,每次5 min;滴加二抗,室温孵育50 min;PBS 洗涤3次,每次5 min;二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色数分钟,自来水冲洗终止显色;苏木精复染3 min,自来水冲洗,体积分数1%盐酸乙醇分化数秒,自来水冲洗,氨水返蓝,流水冲洗;切片脱水透明,中性树胶封片,显微镜下观察。苏木精将细胞核染为蓝色,肺组织中磷酸化 EGFR 经 DAB 染色后阳性表达为棕黄色。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组小鼠 BALF 中 IL-6、TNF- α 及 LDH 水平比较 结果见表1。野生型生理盐水组与 MARCO^{-/-}型生理盐水组小鼠 BALF 中 IL-6、TNF- α 、LDH 水平比较差异无统计学意义($t = -0.230$ 、 -0.964 、 1.263 , $P > 0.05$)。野生型 PM_{2.5}组小鼠 BALF 中 IL-6、TNF- α 和 LDH 水平与野生型生理盐水组比较有所上升,但差异无统计学意义($t = -0.583$ 、 -2.130 、 -1.016 , $P > 0.05$)。MARCO^{-/-}型 PM_{2.5}组小鼠 BALF 中 IL-6、TNF- α 和 LDH 水平显著高于 MARCO^{-/-}型生理盐水组,差异有统计学意义($t = 2.469$ 、 3.364 、 3.000 , $P < 0.05$)。MARCO^{-/-}型 PM_{2.5}组小鼠 BALF 中 IL-6、TNF- α 和

LDH 水平与野生型 PM_{2.5} 组小鼠比较差异无统计学

意义($t = 1.723、1.114、-0.324, P > 0.05$)。

表 1 4 组小鼠 BALF 中 IL-6、TNF-α 及 LDH 水平比较

Tab.1 Comparison of the levels of IL-6, TNF-α and LDH in BALF of mice in the four groups

($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | IL-6/(ng · L ⁻¹) | TNF-α/(ng · L ⁻¹) | LDH/(U · L ⁻¹) |
|--|---|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| 野生型生理盐水组 | 6 | 3.256 ± 2.109 | 1 014.936 ± 268.519 | 38.551 ± 31.658 |
| 野生型 PM _{2.5} 组 | 6 | 4.367 ± 3.358 | 1 661.281 ± 557.164 | 67.826 ± 48.182 |
| MARCO ^{-/-} 型生理盐水组 | 6 | 3.524 ± 1.597 | 1 137.548 ± 137.344 | 15.768 ± 9.512 |
| MARCO ^{-/-} 型 PM _{2.5} 组 | 6 | 7.984 ± 4.953 ^a | 2 051.062 ± 650.919 ^a | 58.667 ± 36.916 ^a |

注:与 MARCO^{-/-} 型生理盐水组小鼠比较^a $P < 0.05$ 。

2.2 4 组小鼠血清 CRP、TNF-α、LDH 水平比较

结果见表 2。野生型生理盐水组与 MARCO^{-/-} 型生理盐水组小鼠血清 CRP、TNF-α 和 LDH 水平比较差异无统计学意义($t = -0.944、-1.908、-0.392, P > 0.05$)。野生型 PM_{2.5} 组小鼠血清 CRP、TNF-α 和 LDH 水平均较野生型生理盐水组升高,但差异无统计学意义($t = -0.890、-1.649、-0.885, P > 0.05$)。MARCO^{-/-} 型 PM_{2.5} 组小鼠血清 CRP、LDH 水平显著高于 MARCO^{-/-} 型生理盐水组,差异有统

计学意义($t = 2.530、4.605, P < 0.05$) ; MARCO^{-/-} 型 PM_{2.5} 组与 MARCO^{-/-} 型生理盐水组小鼠血清 TNF-α 水平比较差异无统计学意义($t = 1.911, P > 0.05$)。MARCO^{-/-} 型 PM_{2.5} 组与野生型 PM_{2.5} 组小鼠血清中 CRP 和 TNF-α 水平比较差异无统计学意义($t = 1.643、1.311, P > 0.05$)。MARCO^{-/-} 型 PM_{2.5} 组小鼠血清 LDH 水平显著高于野生型 PM_{2.5} 组,差异有统计学意义($t = 2.378, P < 0.05$)。

表 2 4 组小鼠血清 CRP、TNF-α、LDH 水平比较

Tab.2 Comparison of the levels of serum CRP, TNF-α and LDH of mice in the four groups

($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | CRP/(μg · L ⁻¹) | TNF-α/(ng · L ⁻¹) | LDH/(U · L ⁻¹) |
|--|---|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 野生型生理盐水组 | 6 | 649.362 ± 554.200 | 1 100.695 ± 102.179 | 1 695.906 ± 258.239 |
| 野生型 PM _{2.5} 组 | 6 | 1 061.124 ± 752.832 | 1 278.316 ± 204.717 | 1 956.725 ± 536.525 |
| MARCO ^{-/-} 型生理盐水组 | 6 | 914.277 ± 343.463 | 1 214.364 ± 85.777 | 1 751.462 ± 192.495 |
| MARCO ^{-/-} 型 PM _{2.5} 组 | 6 | 1 664.401 ± 639.806 ^a | 1 499.927 ± 376.253 | 2 677.193 ± 413.748 ^{ab} |

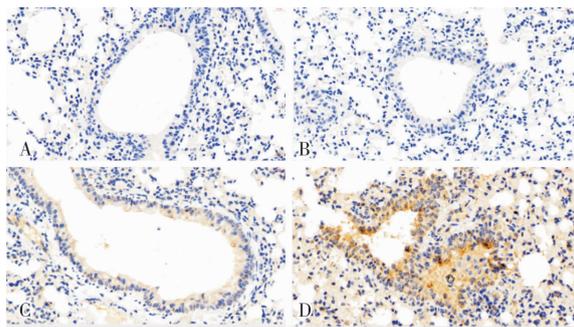
注:与 MARCO^{-/-} 型生理盐水组小鼠比较^a $P < 0.05$;与野生型 PM_{2.5} 组比较^b $P < 0.05$ 。

2.3 4 组小鼠肺组织中磷酸化 EGFR 的表达

结果见图 1。野生型与 MARCO^{-/-} 型生理盐水组小鼠肺组织中均未见磷酸化 EGFR 表达,而野生型和 MARCO^{-/-} 型 PM_{2.5} 组小鼠肺组织中均可见磷酸化 EGFR 表达,且 MARCO^{-/-} 型 PM_{2.5} 组小鼠磷酸化 EGFR 水平高于野生型 PM_{2.5} 组。

3 讨论

空气污染尤其是 PM_{2.5} 对人体健康的危害已受到普遍关注。PM_{2.5} 被认为是大气中的首要污染物,可通过呼吸进入人体而引起多种呼吸系统疾病,也可穿过肺间质进入血液中,从而对心血管系统造成危害^[15-16]。流行病学调查表明,PM_{2.5} 与呼吸、循环系统疾病的发病率和病死率密切相关^[17-18],急性炎症是 PM_{2.5} 引起呼吸、循环系统损伤的重要机制之一^[19]。有研究认为,机体受到 PM_{2.5} 刺激后,炎症细胞聚集及炎症因子和黏附因子的分泌是由大气颗粒物刺激肺泡巨噬细胞,使其释放部分细胞因子和前炎症因子所引起^[20-21]。而肺泡巨噬细胞作为肺的第 1 道防线,在机体免疫防御、清除肺部大气颗粒物的过程中不可或缺^[22]。JALAVA 等^[23] 研究表明,PM_{2.5} 可以导致小鼠巨噬细胞活力下降,而 TNF-α 的表达随颗粒物浓度的增加而升高。有研究证明,颗粒物可导致大鼠巨噬细胞活力降低、吞噬功能下降^[24-25]。以上研究均表明,PM_{2.5} 刺激对巨噬细胞活



A:野生型生理盐水组;B: MARCO^{-/-} 型生理盐水组;C: 野生型 PM_{2.5} 组;D: MARCO^{-/-} 型 PM_{2.5} 组。

图 1 4 组小鼠肺组织中磷酸化 EGFR 表达情况(免疫组织化学染色, ×400)

Fig.1 Expression of phosphorylated EGFR in lung tissues of mice in the four groups(immunohistochemistry, ×400)

性及功能有着潜在的影响。

本研究应用敲除 MARCO 基因的小鼠来探讨巨噬细胞表面颗粒物识别受体 MARCO 在 PM_{2.5} 急性暴露过程中的作用,发现 MARCO^{-/-} 小鼠对 PM_{2.5} 急性暴露较野生型小鼠更加易感。IL-6、TNF-α 在炎症反应中起着重要作用,作为炎症反应早期释放的促炎性因子,其不仅可以直接反映炎症损伤程度,还可以间接诱导多种细胞因子参与并加重机体炎症^[26]。本研究发现,野生型生理盐水组与 MARCO^{-/-} 型生理盐水组小鼠 BALF 中 IL-6、TNF-α 水平比较差异无统计学意义;野生型 PM_{2.5} 组小鼠 BALF 中 IL-6、TNF-α 水平与野生型生理盐水组比较有所上升,但差异无统计学意义;而 MARCO^{-/-} 型 PM_{2.5} 组小鼠 BALF 中 IL-6、TNF-α 水平显著高于 MARCO^{-/-} 型生理盐水组。结果提示,PM_{2.5} 急性暴露可引起 MARCO^{-/-} 型小鼠呼吸系统炎症性损伤。

LDH 是反映毒物毒性效应的早期检测指标,也是细胞受损的重要标志物之一^[27]。本研究结果显示, MARCO^{-/-} 型生理盐水组与野生型生理盐水组小鼠 BALF 及血清 LDH 水平比较差异均无统计学意义;在同等剂量 PM_{2.5} 暴露后,野生型 PM_{2.5} 组与野生型生理盐水组小鼠 BALF 及血清 LDH 水平比较差异无统计学意义,而 MARCO^{-/-} 型 PM_{2.5} 组小鼠 BALF 及血清 LDH 水平显著高于 MARCO^{-/-} 型生理盐水组,且 MARCO^{-/-} 型 PM_{2.5} 组小鼠血清 LDH 水平显著高于野生型 PM_{2.5} 组。该结果提示,PM_{2.5} 急性暴露对 MARCO^{-/-} 型小鼠呼吸系统及心血管系统的损伤效应较野生型小鼠明显。

CRP 是机体受到感染、炎症损伤及创伤后分泌的一种急性时相反应蛋白,是反映机体炎症状况的重要指标^[28]。一项关于 PM_{2.5} 暴露对人体心血管系统损伤的队列研究发现,暴露于 PM_{2.5} 后导致血清 CRP 水平显著升高^[29]。本研究结果显示,野生型生理盐水组与 MARCO^{-/-} 型生理盐水组小鼠血清 CRP 水平比较差异无统计学意义;PM_{2.5} 急性暴露后,野生型 PM_{2.5} 组小鼠血清 CRP 水平较野生型生理盐水组有所升高,但差异无统计学意义; MARCO^{-/-} 型 PM_{2.5} 组与野生型 PM_{2.5} 组小鼠血清 CRP 水平比较差异无统计学意义;而 MARCO^{-/-} 型 PM_{2.5} 组小鼠血清 CRP 水平较 MARCO^{-/-} 型生理盐水组小鼠显著升高,提示 PM_{2.5} 急性暴露可以引起 MARCO^{-/-} 型小鼠产生心血管系统炎症反应。

EGFR 作为一种具有内在酪氨酸激酶活性的跨膜蛋白,参与炎症发生中多条信号通路调控作用^[30]。研究证实,EGFR 信号通路参与大气颗粒物介导的呼吸系统炎症的发生^[31-32],PM_{2.5} 暴露可直接或间接激活 EGFR 信号传导通路,使 EGFR 磷酸化,因此,磷酸化 EGFR 表达水平升高可以作为气管上皮细胞损伤的标志^[15]。为进一步探讨 MARCO 在 PM_{2.5} 致呼吸系统急性炎症中的作用机制,本研究检测了肺组织中 EGFR 磷酸化水平,结果发现,未经 PM_{2.5} 暴露的野生型与 MARCO^{-/-} 型小鼠肺组织中均未见磷酸化 EGFR 表达,而 PM_{2.5} 急性暴露后野生型与 MARCO^{-/-} 型小鼠肺组织中均检测到磷酸化 EGFR 表达,且 MARCO^{-/-} 型小鼠较野生型小鼠肺组织中磷酸化 EGFR 表达更明显。本研究结果提示, MARCO 可能参与 PM_{2.5} 诱导的肺组织 EGFR 磷酸化,进而引起呼吸系统炎症,这一结果也进一步支持了 MARCO^{-/-} 型小鼠对 PM_{2.5} 急性暴露更加易感。

综上所述,在受试剂量范围内,PM_{2.5} 急性暴露导致的 MARCO^{-/-} 小鼠呼吸及循环系统炎症效应较野生型小鼠严重, MARCO 可能在 PM_{2.5} 导致的小鼠急性呼吸及循环系统炎症中发挥重要作用,更加深入的机制有待后续研究。

参考文献:

- [1] ZHOU M, HE G, FAN M, *et al.* Smog episodes, fine particulate pollution and mortality in China[J]. *Environ Res*, 2015, 136:396-404.
- [2] LU F, XU D, CHENG Y, *et al.* Systematic review and meta-analysis of the adverse health effects of ambient PM_{2.5} and PM₁₀ pollution in the Chinese population[J]. *Environ Res*, 2015, 136:196-204.
- [3] 熊琪,茹琴,陈琳,等. PM_{2.5} 对肺泡巨噬细胞功能影响的研究进展[J]. *环境与健康杂志*, 2013, 30(12):1128-1130.
- [4] GILBERTI R M, KNECHT D A. Macrophages phagocytose nonopsonized silica particles using a unique microtubule-dependent pathway[J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26(3):518-529.
- [5] NOVAKOWSKI K E, HUYNH A, HAN S J, *et al.* A naturally occurring transcript variant of MARCO reveals the srcr domain is critical for function[J]. *Immunol Cell Biol*, 2016, 94(7):646-655.
- [6] SOUKUP J M, BECKER S. Human alveolar macrophage responses to air pollution particulates are associated with insoluble components of coarse material, including particulate endotoxin[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, 171(1):20-26.
- [7] POZZI R, BERARDIS B D, PAOLETTI L, *et al.* Inflammatory

- mediators induced by coarse ($PM_{2.5-10}$) and fine ($PM_{2.5}$) urban air particles in RAW 264.7 cells[J]. *Toxicology*,2003,183(1/2/3):243-254.
- [8] BECKER S, SOUKUP J M, SIOUTAS C, *et al.* Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles[J]. *Exp Lung Res*,2003,29(1):29-44.
- [9] 姜智海,宋伟民,周晓瑜,等. $PM_{2.5}$ 对小鼠肺急性损伤的试验研究[J]. *卫生研究*,2004,33(3):264-266.
- [10] YAN Z, JIN Y, AN Z, *et al.* Inflammatory cell signaling following exposures to particulate matter and ozone[J]. *Biochim Biophys Acta*,2016,1860(12):2826-2834.
- [11] ARREDOUANI M S, YANG Z, IMRICH A, *et al.* The macrophage scavenger receptor SR-A/II and lung defense against pneumococci and particles[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*,2012,35(4):474-478.
- [12] JR H R, THAKUR S A, MAYFAIR J K, *et al.* MARCO mediates silica uptake and toxicity in alveolar macrophages from C57BL/6 mice[J]. *J Biol Chem*,2006,281(45):34218-34226.
- [13] 晋乐飞,吴卫东,张巧,等. 吸入式气管滴注法的建立[J]. *郑州大学学报(医学版)*,2015,50(1):75-78.
- [14] JIN Y, WU W, ZHANG W, *et al.* Involvement of EGF receptor signaling and NLRP12 inflammasome in fine particulate matter - induced lung inflammation in mice[J]. *Environ Toxicol*,2017,32(4):1121-1134.
- [15] 高丽云,张学军,汪涛,等. 环境中细颗粒物 $PM_{2.5}$ 对呼吸系统的作用机制[J]. *新乡医学院学报*,2017,34(3):163-165.
- [16] 高丽云,聂林坤,李潇,等. 大气细颗粒物 $PM_{2.5}$ 对心血管疾病损害机制的研究进展[J]. *新乡医学院学报*,2018,35(7):551-553.
- [17] LI G, XUE M, ZENG Q, *et al.* Association between fine ambient particulate matter and daily total mortality: an analysis from 160 communities of China [J]. *Sci Total Environ*,2017,599:108-113.
- [18] YORIFUJI T, KASHIMA S, DOI H. Acute exposure to fine and coarse particulate matter and infant mortality in Tokyo, Japan (2002-2013)[J]. *Sci Total Environ*,2016,551:66-72.
- [19] POPE C A. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk [J]. *Environ Health Perspect*,2000,108(Suppl 4):713-723.
- [20] SIBILLE Y, REYNOLDS H Y. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury[J]. *Am Rev Respir Dis*,1990,141(2):471-501.
- [21] GHIO A J, KENNEDY T P, SCHAPIRA R M, *et al.* Hypothesis: is lung disease after silicate inhalation caused by oxidant generation [J]. *Lancet*,1990,336(8721):967-969.
- [22] ISHII H, FUJII T, HOGG J C, *et al.* Contribution of IL-1 β and TNF- α to the initiation of the peripheral lung response to atmospheric particulates (PM_{10}) [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,2004,287(1):L176-L183.
- [23] JALAVA P I, SALONEN R O, PENNANEN A S, *et al.* Heterogeneities in inflammatory and cytotoxic responses of RAW 264.7 macrophage cell line to urban air coarse, fine, and ultrafine particles from six European sampling campaigns [J]. *Inhal Toxicol*,2007,19(3):213-225.
- [24] HUANG N H, WANG Q, XU D Q, *et al.* Immunological effect of $PM_{2.5}$ on cytokine production in female Wistar rats [J]. *Biomed Environ Sci*,2008,21(1):63-68.
- [25] MIYATA R, VAN EEDEN S F. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2011,257(2):209-226.
- [26] LI R, KOU X, XIE L, *et al.* Effects of ambient $PM_{2.5}$ on pathological injury, inflammation, oxidative stress, metabolic enzyme activity, and expression of c-fos and c-jun in lungs of rats [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*,2015,22(24):1-10.
- [27] SHVEDOVA A A, KISIN E, MURRAY A R, *et al.* Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,2008,295(4):L552-L565.
- [28] BACKES J M, HOWARD P A, MORIARTY P M. Role of C-reactive protein in cardiovascular disease [J]. *Rev Colomb De Cardio*,2011,18(5):273-278.
- [29] RD P C, HANSEN M L, LONG R W, *et al.* Ambient particulate air pollution, heart rate variability, and blood markers of inflammation in a panel of elderly subjects [J]. *Environ Health Perspect*,2004,112(3):339-345.
- [30] HACKEL P O, ZWICK E, PRENZEL N, *et al.* Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways [J]. *Curr Opin Cell Biol*,1999,11(2):184-189.
- [31] OVREVIK J, REFSNES M, TOTLANDSDAL A I, *et al.* TACE/TGF- α /EGFR regulates CXCL8 in bronchial epithelial cells exposed to particulate matter components [J]. *Eur Respir J*,2011,38(5):1189-1199.
- [32] WU W, SAMET J M, GHIO A J, *et al.* Activation of the EGF receptor signaling pathway in airway epithelial cells exposed to Utah Valley PM [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,2001,281(2):L483-L489.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)