

锌-金属硫蛋白对PM_{2.5}致运动大鼠氧化-免疫损伤的拮抗作用

李峰

摘要: [目的] 探讨锌-金属硫蛋白(Zn-MT)对PM_{2.5}暴露致运动大鼠肺组织氧化损伤及部分免疫功能下降的拮抗作用。[方法] 选取雄性SD大鼠32只,随机分为运动对照组、PM_{2.5}染毒组、PM_{2.5}+运动组、Zn-MT+PM_{2.5}+运动组,在一次递增负荷跑台训练后即刻处死,取肺组织制成匀浆后测定氧化应激指标[丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、还原型谷胱甘肽(GSH)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)]和免疫指标[白细胞介素-2(IL-2)、IL-6、IL-8及单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)]。[结果] 与运动对照组相比,PM_{2.5}染毒组IL-6、IL-8、MCP-1均升高,GSH活性下降($P<0.05$);与PM_{2.5}染毒组相比,PM_{2.5}+运动组大鼠肺组织GSH-Px下降($P<0.01$),MDA、IL-2、IL-6上升;补充Zn-MT后,与PM_{2.5}+运动组比较,CAT、GSH呈回升趋势,IL-6、IL-8有所下降。[结论] PM_{2.5}暴露在一定程度上可以造成机体抗氧化稳态紊乱和免疫力的破坏,Zn-MT在一定程度上可拮抗由于PM_{2.5}暴露导致的肺抗氧化损伤和免疫系统损伤。

关键词: PM_{2.5}; 锌-金属硫蛋白; 抗氧化; 免疫损伤; 拮抗

Antagonism Effect of Zinc-Metallothionein to Antioxidation-Immune Damage Induced by PM_{2.5} in Exercising Rats LI Feng (Department of Physical Education, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an, Shaanxi 710055, China). Address correspondence to LI Feng, E-mail: lifengmuyu@163.com • The author declares he has no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To examine the antagonism effect of zinc-metlothionein (Zn-MT) on the antioxidation-immune damage in exercising rats exposed to fine particulate matters (PM_{2.5}). [Methods] Thirty-two male SD rats were randomly assigned into exercise control group, PM_{2.5} exposed group, PM_{2.5}+exercise group, and Zn-MT+PM_{2.5}+exercise group. All rats were immediately executed after one-time treadmill training with increasing loads and collected lung tissue homogenate samples for measuring oxidative stress indicators including malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), glutathione (GSH) and glutathione peroxidase (GSH-Px), and immunity indicators including interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). [Results] The levels of IL-6, IL-8, and MCP-1 increased but the activities of GSH declined in the PM_{2.5} exposed group, compared with the exercise control group ($P<0.05$). The activities of GSH-Px decreased ($P<0.01$) but the levels of MDA, IL-2, and IL-6 increased in the PM_{2.5}+exercise group compared with the PM_{2.5} exposed group. After adding Zn-MT, compared to the PM_{2.5}+exercise group, CAT and GSH showed a rising trend but IL-6 and IL-8 declined. [Conclusion] Zn-MT could antagonize the antioxidant and immune injury due to PM_{2.5} exposure in exercising rats.

Key Words: PM_{2.5}; zinc-metlothionein; antioxidant; immune injury; antagonism

由于PM_{2.5}对有机物和重金属等物质有较强的吸附能力,可诱发运动者呼吸道阻力增加、肺功能下降,引起氧化应激,造成机体特异性和非特异性的免疫损伤^[1-4]。吸入机体的颗粒物水平与运动强度呈正相关,颗粒物水平越高,对机体健康的危害也越大^[5]。氧化-抗氧化-免疫网络是机体在运动应激状态下维持内稳态系

统的一个途径。锌-金属硫蛋白(Zn-Metallothionein, Zn-MT)作为一种非金属硫蛋白,具有预测生物体受重金属暴露的状况和重金属的污染压力^[6]、重金属解毒^[7]、增强机体的应激能力^[8]等功能。体育馆空气中颗粒物不论是在形成过程还是在扬尘过程,颗粒物所经历的一系列物理、化学过程,都会改变颗粒物的化学组成、物理特性以及浓度水平,不同发生过程中颗粒物的分布规律有所不同,但基本都接近正态分布。本实验颗粒物采集选择某大学综合体育馆,在实验动物运动的基础上,暴露PM_{2.5},同时补充Zn-MT,观察肺组织部分氧化应激指标及免疫指标的变化,旨在研究可吸入颗粒物污染与机体健康效应之间的暴露-反应

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.16311

[基金项目] 陕西省人才科技基金(编号: RC1619); 人文社科研究基金(编号: RW1605)

[作者简介] 李峰(1982—),男,博士,讲师;研究方向: 体育环境生态学; E-mail: lifengmuyu@163.com

[作者单位] 西安建筑科技大学体育系, 陕西 西安 710055

关系,对暴露的健康风险评估提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 PM_{2.5}的采样及悬液制备

在某校综合体育馆内用颗粒物智能采样器采集PM_{2.5},采样时保证采样点周围无堆积物以防遮挡空气流通。按照仪器操作规则,使采气流量保持定值,同时考虑到人体呼吸带的高度,使采样时高度保持为1.5 m,每天24 h连续采样,持续30 d,根据采样前、后滤膜质量差和采样体积得出颗粒物的质量浓度。采样完毕后将PM_{2.5}收集在玻璃纤维滤膜上,然后将滤膜裁剪为小块后浸入去离子水中,经超声振荡30 min×4次后用去离子水洗脱颗粒物,然后将滤液在4℃离心20 min(1 000 r/min,离心半径59 mm),真空干燥后称重,-20℃保存。染毒前用0.9%生理盐水配制成需要的浓度,使用前超声振荡混匀,灭菌备用。

1.2 动物分组与运动方案

实验动物选用7周龄健康成年雄性SD大鼠(SPF级)32只(由西安交通大学医学院动物饲养中心提供),体重180~220 g。动物购回后在常规饲养笼内适应性喂养7 d,饲养室内温度(20~26)℃、湿度为44%~70%,自由进食和饮水,饲料购自西安交通大学医学院动物房,照明随同光照自然变化。所有动物均依照《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求进行处置^[9]。训练前将大鼠随机分为PM_{2.5}染毒组、运动对照组、PM_{2.5}+运动组、Zn-MT+PM_{2.5}+运动组,每组8只,根据大鼠体重/摄氧量回归方程建立递增负荷运动模型,正式训练前除PM_{2.5}暴露组外将所有实验大鼠先进行2 d的适应性训练,速度和时间分别以10 m/min、5 min/d进行,训练方式为跑台;然后所有动物进行1 d的训练前恢复,随后按照15 m/min,15 min(相当于45%最大摄氧能力);18 m/min,20 min(相当于50%最大摄氧能力);21 m/min,30 min(相当于65%最大摄氧能力);24 m/min,40 min(相当于70%最大摄氧能力);27 m/min,50 min(相当于76%最大摄氧能力)的递增负荷形式进行。

1.3 Zn-MT给药方法

Zn-MT(湖南麓谷生物技术有限公司,中国)中MT含量大于95%,Zn含量大于4.5%,巯基(-SH)含量大于9.0%。研究结果显示,MT的半致死剂量大于10 g/kg体重,在参考其他研究的基础上,结合本实验的预实验,确定大鼠Zn-MT的补充剂量为1.0 mg/10 kg体重^[10-11],大鼠在PM_{2.5}滴注后15 min采用腹腔注射的给药方法。

1.4 染毒方法

首先将PM_{2.5}悬液预热到37℃,然后将实验大鼠乙醚麻醉后进行气管滴注,滴注剂量按照15 mg/kg体重进行,滴注体积为3 mL/kg体重^[12],对照组按照同样的剂量滴注生理盐水。

1.5 样品制备与指标测试

1.5.1 肺组织样品制备 实验大鼠在运动结束后即刻处死,取肺组织,用干燥的滤纸吸干血液及组织液,然后按 $m(g):V(mL)=1:9$ 的比例称取肺组织,研磨后加入0.9%的生理盐水。根据不同测试指标的要求用低温冷冻离心机离心10 min,转速为3 000~4 000 r/min,然后制备10%的匀浆液在1~4℃的冰箱保存待测。

1.5.2 指标测试 采用硫代巴比妥酸比色法测定丙二醛(MDA),采用分光光度法测定过氧化氢酶(CAT),采用5,5'-二硫代硝基苯甲酸比色法测定谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),采用双抗体夹心法测定还原型谷胱甘肽(GSH)水平。白细胞介素IL-2、IL-6、IL-8采用ELISA测定,单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)应用双抗体夹心法测定。MDA及CAT、GSH、GSH-Px试剂盒均购自南京建成生物有限公司,ELISA试剂盒购自上海雅吉生化试剂六厂,实验操作按照试剂盒说明书进行。

1.6 统计学分析

数据用SPSS 13.0软件处理,结果用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,采用单因素方差分析法分析组间差异,两两比较采用LSD法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 氧化应激指标变化

表1显示,与运动对照组比较,PM_{2.5}染毒组GSH降低($P<0.05$),PM_{2.5}+运动组MDA升高;与PM_{2.5}染毒组比较,PM_{2.5}+运动组GSH-Px降低($P<0.01$),MDA升高($P<0.05$);与PM_{2.5}+运动组比较,Zn-MT+PM_{2.5}+运动组CAT、GSH有所回升,而MDA明显下降(均 $P<0.05$)。

表1 各组大鼠肺组织氧化应激指标的变化(n=8)

组别	MDA (nmol/mg prot)	CAT (U/mL)	GSH (mg/L)	GSH-Px (U/mL)
运动对照组	145.05 ± 13.41	4.20 ± 0.48	124.27 ± 16.88	475.29 ± 30.46
PM _{2.5} 染毒组	160.24 ± 15.92	3.98 ± 1.02	106.31 ± 8.73*	488.15 ± 22.71
PM _{2.5} +运动组	176.78 ± 14.21▲*	3.77 ± 0.32	117.19 ± 13.23	443.52 ± 53.29▲▲
Zn-MT+PM _{2.5} +运动组	122.11 ± 9.11△	3.90 ± 0.28△	122.91 ± 14.28△	458.39 ± 24.88

[注]*:与运动对照组比较, $P<0.05$;与PM_{2.5}染毒组比较,▲: $P<0.05$,▲▲: $P<0.01$;△:与PM_{2.5}+运动组比较, $P<0.05$ 。

2.2 免疫指标变化

表2显示,与运动对照组相比,PM_{2.5}染毒组IL-6、IL-8、MCP-1均升高($P<0.05$),PM_{2.5}+运动组只有IL-8升高($P<0.05$);与PM_{2.5}染毒组比较,PM_{2.5}+运动组IL-2、IL-6、IL-8均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);给予Zn-MT后,IL-6、IL-8有所下降($P<0.05$)。

表2 大鼠肺组织免疫指标的变化($n=8$)

组别	IL-2 (ng/L)	IL-6 (ng/L)	IL-8 (ng/L)	MCP-1 (μg/g)
运动对照组	4.63 ± 0.21	311.23 ± 67.31	86.52 ± 7.18	3.09 ± 0.02
PM _{2.5} 染毒组	5.26 ± 0.33	372.43 ± 33.14*	93.75 ± 10.21*	4.71 ± 0.91*
PM _{2.5} +运动组	6.76 ± 0.25▲	574.57 ± 91.86▲▲	113.36 ± 9.98▲*	3.98 ± 0.53
Zn-MT+PM _{2.5} +运动组	5.54 ± 0.69	494.36 ± 128.55△	95.53 ± 7.62△	2.74 ± 0.31

[注]*: 与运动对照组比较, $P<0.05$; 与PM_{2.5}染毒组比较, ▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$; △: 与PM_{2.5}+运动组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

研究证实,急性运动可使机体产生大量自由基,而机体在正常状态下通过各种抗氧化酶来减轻自由基的损伤^[13]。本实验中运动大鼠均需要在155 min的总时间内进行递增式运动,因此总的运动强度和运动量使机体所产生的自由基在短时间内难以消除;GSH-Px、CAT是体内主要的抗氧化酶,GSH由于含有巯基(-SH),参与体内三羧酸循环及糖代谢,帮助保持正常的免疫系统功能,并具有抗氧化作用和整合解毒作用。MDA作为生物体内自由基作用于脂质过氧化反应的终产物,可以在一定程度上代表氧化损伤的程度。和运动对照组相比,单纯PM_{2.5}染毒组GSH含量下降更为明显,而本实验中MDA的升高恰好与抗氧化酶的下降关联,这也说明了机体抗氧化防御系统的失衡。在之前的研究中,我们也证明PM_{2.5}可以增加活性氧含量,增强机体的氧化损伤^[14]。其具体机制为:(1)PM_{2.5}本身具有自由基活性,通过其表面吸附的过渡金属元素、有机有毒成分,进入呼吸道内,在作用于肺泡上皮细胞及巨噬细胞的同时,诱导细胞内活性氧含量升高,导致细胞膜脂质过氧化损伤,影响膜的流动性与通透性^[15];(2)PM_{2.5}中的铁、铜可直接参与氧化还原反应,消耗谷胱甘肽和含巯基的酶,通过强化脂质过氧化反应、改变细胞内钙稳态等环节造成细胞氧化损伤^[16]。

IL-2、IL-6、IL-8及MCP-1趋化因子超家族是一类重要的免疫应答调节因子,参与机体的多种机能活动。和运动对照组相比,单纯PM_{2.5}染毒组IL-2、IL-6、

IL-8以及MCP-1均升高,表明一定剂量浓度的PM_{2.5}暴露可对肺组织的免疫调节产生不利影响。在PM_{2.5}的暴露环境下,其所携带的各种有害成分会部分附着于呼吸道并削弱呼吸道黏膜对有害物质的防御能力,导致内膜壁发生炎症反应,因而引起各免疫因子指标的变化。

与运动对照组相比,单纯PM_{2.5}染毒组IL-6、IL-8、MCP-1升高,可能机制为:(1)由于本运动方案为长时间递增负荷运动,无论是机体的抗氧化系统,还是免疫系统,包括神经调节、内稳态的控制水平在运动后均会暂时处于较高水平,为机体运动后的代偿反应;同时,此刻是免疫系统的“开窗效应”阶段,各免疫细胞因子的反应也处于持续性高发态势,此时机体防御系统对各种外来应激源的反应处于弱防御状态,因而PM_{2.5}所含的各种有害物质才会对组织细胞的GSH、GSH-Px、CAT及IL-2、IL-6、IL-8以及MCP-1造成损伤。(2)MCP-1的变化主要体现了机体对外来应激感染的急性防御反应,PM_{2.5}暴露运动后即刻MCP-1的升高则表明这与PM_{2.5}通过氧化应激反应相关转录因子刺激前炎性细胞素的释放所引发的炎症反应失衡有关^[17]。(3)PM_{2.5}对肺部损害作用主要通过干扰肺泡的吸附作用而降低肺泡对有毒物质的防御能力,改变炎性细胞因子的表达水平和引发机体的异常免疫反应^[18]。(4)在运动过程中,随着呼吸量的加大,PM_{2.5}的摄取量也逐渐累积,刺激肺组织释放前炎性细胞因子,而此因子释放的介质主要依靠氧化应激反应转录因子协助,当此转录因子过量释放时,必然会损害机体的自由基清除系统;另外,当肺组织中PM_{2.5}的沉积量超过肺巨噬细胞的吞噬能力时,会导致肺上皮细胞产生毒性累积效应,导致免疫防御能力减弱。

Zn-MT是一种富含半胱氨酸的金属结合蛋白,具有消除自由基的功能^[19],因此具有保护细胞免受离子辐射^[20]和抵御抗氧化物损伤^[21]的作用。本实验结果显示,补充Zn-MT后可升高CAT、GSH、GSH-Px活性,降低MDA的含量,表明Zn-MT对机体的抗氧化防御能力有一定的提升作用。机体在重金属污染环境中将会出现感染/炎症等现象,此时免疫细胞因子在外界应激压力下升高,而实验中数据显示,补充Zn-MT后,IL-2、IL-6、IL-8、MCP-1较染毒组有所下降,表明Zn-MT可抑制局部促炎介质过度产生,调节机体的免疫功能。这主要是因为Zn-MT对暴露于环境中的重金属具有高度的生物化学响应,可减轻由于PM_{2.5}通过

破坏组织屏障、损伤免疫细胞、调节细胞因子分泌等方式对免疫系统功能所造成的损伤。

本研究结果提示,一次性递增负荷运动应激可以引起机体抗氧化系统的破坏,导致自身肺组织的非特异性免疫功能降低。补充Zn-MT后,大鼠的肺组织抗氧化酶及免疫因子呈现恢复,表明Zn-MT可以减缓PM_{2.5}暴露运动带来的抗氧化及免疫系统的损伤。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] Lü J, Liang L, Feng Y, et al. Air pollution exposure and physical activity in china: current knowledge, public health implications, and future research needs[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2015, 12(11): 14887-14897.
- [2] Gauderman W J, Gilliland G F, Vora H, et al. Association between air pollution and lung function growth in southern California Children: results from a second cohort[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166(1): 76-84.
- [3] Gomes E C, Stone V, Florida-James G. Impact of heat and pollution on oxidative stress and CC16 secretion after 8 km run[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2011, 111(9): 2089-2097.
- [4] Bartra J, Mullol J, del Cuvillo A, et al. Air pollution and allergens[J]. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2007, 17(Suppl 2): 3-8.
- [5] Rundell K W, Anderson S D, Sue-Chu M, et al. Air quality and temperature effects on exercise-induced bronchoconstriction[J]. *Compr Physiol*, 2015, 5(2): 579-610.
- [6] 陈春,周启星.金属硫蛋白作为重金属污染生物标志物的研究进展[J]. *农业环境科学学报*, 2009, 28(3): 425-432.
- [7] Romero-Isart N, Vasák M. Advances in the structure and chemistry of Metallothioneins[J]. *J Inorg Biochem*, 2002, 88(3/4): 388-396.
- [8] Křížková S, Masařík M, Eckschlag T, et al. Effects of redox conditions and zinc(II) ions on metallothionein aggregation revealed by chip capillary electrophoresis[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(51): 7966-7971.
- [9] 科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见(国科发财字[2006]398号)[S].北京:科学技术部,2006.
- [10] 将与刚,郭长江,杨继军,等.锌和金属硫蛋白对肝脏缺血/再灌注损伤保护作用的比较[J]. *营养学报*, 2001, 23(4): 365-366.
- [11] 蓝荣培.金属硫蛋白保护肾脏缺血-再灌注损伤及对免疫系统的影响[D].上海:复旦大学,2004: 52-56.
- [12] 邓芙蓉,郭新彪,胡婧,等.气管滴注大气细颗粒物对大鼠心脏的急性毒性及其机制研究[J]. *生态毒理学报*, 2009, 4(1): 57-62.
- [13] 刘硕,周启星.抗氧化酶诊断环境污染研究进展[J]. *生态学杂志*, 2008, 27(10): 1791-1798.
- [14] 李峰,石辉. PM_{2.5}暴露对大鼠行为学及器官的急性毒理作用[J]. *生态毒理学报*, 2014, 9(1): 127-132.
- [15] Ranft U, Schikowski T, Sugiri D, et al. Long-term exposure to traffic-related particulate matter impairs cognitive function in the elderly[J]. *Environ Res*, 2009, 109(8): 1004-1011.
- [16] 陶燕.兰州市大气颗粒物理化特性及其对人群健康的影响[D].兰州:兰州大学,2009: 21-24.
- [17] 张文丽,崔九思,徐东群,等.大气中细颗粒物的污染特征及其生物效应[J]. *中国环境卫生*, 2003, 6(1/2/3): 90-102.
- [18] Vallyathan V, Castranova V, Pack D, et al. Freshly fractured quartz inhalation leads to enhanced lung injury and inflammation potential role of free radicals[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 152(3): 1003-1009.
- [19] Podhorska-Okołów M, Dziegiel P, Dolińska-Krajewska B, et al. Expression of metallothionein in renal tubules of rats exposed to acute and endurance exercise[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2006, 44(3): 195-200.
- [20] 陈春,周启星.金属硫蛋白作为重金属污染生物标志物的研究进展[J]. *农业环境科学学报*, 2009, 28(3): 425-432.
- [21] Cavaletto M, Ghezzi A, Burlando B, et al. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2002, 131(4): 447-455.

(收稿日期: 2016-04-11)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 王晓宇)