文章编号：2095-9982(2016)12-1202-07

【EHP 专栏】

TNFα和IL-6体外对颗粒物的反应：随颗粒物大小、季节、多环芳烃和土壤含量的变化

Natalia Manzano-León[1]，Jesús Serrano-Lomelin[2]，Brisa N. Sánchez[3,4]，Raúl Quintana-Belmares[1]，Elizabeth Vega[5,6]，Inés Vázquez-López[1]，Leonora Rojas-Bracho[7]，Maria Tania López-Villegas[7]，Felipe Vadillo-Ortega[8]，Andrea De Vizcaya-Ruiz[9]，Irma Rosas Perez[10]，Marie S. O'Neill[3]，Alvaro R. Osornio-Vargas[1,11]

摘要：［背景］颗粒物（PM）与人类健康之间的关联随着季节变化而不同，这种现象可能与颗粒物的成分以及毒性相关的季节性交互作用有关。［目的］检测PM成分的季节性变化，并使用多个PM样本评估PM的体外促炎症可能性。［方法］以5个污染源不同的城市地区为采集地点，每周采集样本，在多雨温暖季节和干燥寒冷季节累积采集90份PM_{10}和$PM_{2.5}$样本。对其中检测到的元素、多环芳烃（PAHs）和内毒素进行主成分分析（PCA）。在人单核细胞（THP-1）中检测PM诱导肿瘤坏死因子α（TNFα）和白介素6（IL-6）分泌的可能性，并用组分评分建立促炎症反应的模型。［结果］PM的成分随其大小和季节而变化。PCA确定了PM中两种随季节变化的主要组分。燃烧相关的成分（如钒、苯并（a）芘、苯并（a）蒽）组成组分1（C_1），土壤相关的成分（如内毒素、硅、铝）组成组分2（C_2）。多雨温暖季节采集的PM中C_2含量较高，而干燥寒冷季节采集的PM（尤其是$PM_{2.5}$）中C_1含量较高。细胞因子生成水平与PM_{10}和C_2（多雨温暖季节）正相关，但与$PM_{2.5}$和C_1（干燥寒冷季节）负相关。C_2含量较高的PM暴露水平越高，TNFα分泌越多；样本含有≥0.1%的C_1相关PAHs时，无论样本中C_2含量高低，暴露于该样本后TNFα对PM的反应性分泌都会降低。IL-6检测结果提示PM成分和颗粒大小之间存在复杂的交互作用。［结论］TNFα分泌具有季节性并与PM大小相关，PM中的土壤含量及PAH含量的变化是其根本原因。这些结果提示，流行病学研究中一些健康结局与PM之间关联的季节性差异能用PM组分的混合物来解释。

1　前言

颗粒物（PM）暴露与心肺疾病、不良出生结局等终点相关（Pope和Dockery，2006；Shah和Balkhair，2011；Zanobetti等，2014）。PM是有若干种成分的复杂混合物，包括碳、金属、有机化合物、离子及生物元素（Pope和Dockery，2006）。已有研究报道PM化学成分的季节性变化：a）美国一项研究在187个郡历时5年收集的样本中的有机碳、硝酸盐及硫酸盐含量（Bell等，2007）；b）意大利都灵研究中的内毒素（Traversi等，2010）；c）意大利威尼斯的镍（Ni）、铜（Cu）、锌（Zn）、铅（Pb）（Toscano等，2011）；d）加利福尼亚洛杉矶地区夏季粗颗粒物中水溶性有机碳及硝酸盐的增多（Cheung等，2011）。

也有证据显示，PM水平和化学成分的季节性变化与健康结局之间存在关联。美国两个大城市地区一氧化碳（CO）、二氧化硫（SO_2）、PM水平与增长的死亡率之间的关联随季节变化（Moolgavkar，2003）。亚利桑那州春夏月份的死亡率较高与PM的特性相关（Smith等，2000）；在美国东北部城市的夏季也可观察到类似的PM相关死亡率的季节性增高（Peng等，2005）。

同时评价不同季节收集的PM样本的化学成分

[作者单位] 1.Departamento de Investigación Básica，Instituto Nacional de Cancerología，México，DF，México；2.School of Public Health，University of Alberta，Edmonton，Alberta，Canada；3.Department of Environmental Health Sciences；4.Department of Epidemiology，School of Public Health，University of Michigan，Ann Arbor，Michigan，USA；5.Dirección de Investigación y Posgrado，Instituto Mexicano del Petróleo，México，DF，México；6.Gerencia de Ciencias Ambientales，Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares，La Marquesa，Ocoyoacac，Estado de México，México；7.Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático，México，DF，México；8.National Autonomous University of Mexico（UNAM）at the National Institute of Genomic Medicine，México，DF，México；9.Departamento de Toxicología，Cinvestav，México，DF，México；10.Centro de Ciencias de la Atmósfera，UNAM，México，DF，México；11.Department of Paediatrics，University of Alberta，Edmonton，Alberta，Canada

[通信作者] A.R. Osornio-Vargas，Department of Paediatrics，University of Alberta，3-591 ECHA，11405 87th Ave.，Edmonton，T6G1C9，Canada. Telephone（780）492-7092，E-mail：osornio@ualberta.ca

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

有助于阐明PM特定成分与生物效应之间的关系。Becher等（2005）报道过北卡罗琳娜州秋季收集的PM样本比其他季节收集的样本中铁（Fe）、硅（Si）、铬（Cr）水平更高且致炎症能力更高。另一项研究表明PM_{10}（平均空气动力学直径≤10 μm的颗粒物）水平升高与撒哈拉沙漠尘含量及死亡率升高有关，通常是在春秋季之间（Díaz等，2012）。Mugica等（2010）发现墨西哥城PM_{10}中多环芳烃（PAHs）含量的季节性变化与毒性的差异有关。

本研究在温暖多雨的季节（夏季）和干燥寒冷（冬季）的季节于墨西哥城5个有不同城市活动的地区采集样本，用以分析PM_{10}和$PM_{2.5}$（平均空气动力学直径≤2.5 μm的颗粒物）的季节特异性成分及体外促炎症反应的能力。我们使用多元分析及回归模型评估90份样本的成分及细胞反应的变化，该方法在毒理学研究中应用较少。本研究是正在墨西哥城进行的一项有关孕期妇女空气污染暴露及出生结局流行病学研究的一部分（O'Neill等，2013）。

2 方法

2.1 PM采样

使用高通量空气采样器和硝酸纤维素膜（Manzano-León等，2013）在墨西哥城5个采样点采集PM_{10}和$PM_{2.5}$。于2009年5—8月（对应多雨温暖季节）和2010年11月—2011年3月（对应干燥寒冷季节）每周进行采样。采样点邻近墨西哥城的官方空气监测网络点，采样点所在的区域主要代表了工业区、商业区和居住区。被选中的居住区在交通相关污染情况、人口统计学特征、城市基础设施方面不尽相同[环境和自然资源部国家生态研究所（INE-SEMARNAT），2011]。

从膜上回收PM（Alfaro-Moreno等，2009），每周采集的PM样本按照采集月份、采样点、PM大小进行合并，最终获得40份多雨温暖季节的样本及50份干燥寒冷季节的样本。我们检测了每份样本的化学成分（元素、PAHs、内毒素）及促炎症反应的能力[肿瘤坏死因子α（TNFα）和白介素6（IL-6）的生成]。

2.2 化学分析

2.2.1 元素 使用电感耦合等离子体质谱法（ICP-MS；Agilent 7500a）识别并定量33种元素。PM样本（~1 mg）溶于3 mL去离子水（18.2 MΩ/cm）。分析前使用尼龙膜（0.2 μm；Millipore GNWP）过滤样本。分析采用的氩气流速为1.0 L/min，入射功率为1.39 kW，射频为1.76 V，甄别阈为9.5 mV。原子序数在3~82之间的元素[锂（Li）至铅（Pb）]在32通道的条件下作3次全波段扫描，每次对对应的正离子扫100次。所有样本都采用干扰方程进行校正（详见Vega等，2011）。

2.2.2 多环芳烃（PAHs） 选择既往研究（Camatini等，2012；Dergham等，2012）中较常检测的16种PAHs，采用高效液相色谱法（HPLC；Agilent HP，1100 series），使用Nucleosil柱（Macherey-Nagel，265 mm，100-5C18PAH）、自动进样器及荧光检测器进行检测。在微波炉（CEM，model MarsX）中用30 mL二氯甲烷对PM样本（~1 mg）进行提取。用硝基蒸发器制备超纯氮，以轻柔的超纯氮气流将提取物浓缩至1.0 mL。将提取物加入4.0 mL乙腈，用高纯氮浓缩至0.5 mL。验证方法的参数包括线性度（R^2>0.98）、准确度/精确度[相对标准偏差（RSD）<3%]及检出限（0.004 μg/mL）。不同化合物的定量限和回收率分别为0.01~0.03 μg/mL及60.2%~94.2%。

2.2.3 内毒素 使用50 mmol/L的Tris缓冲液（Lonza）从PM样本（1 mg/mL）中提取内毒素。将样本于22℃超声1 h，涡旋15 min。从每份提取物中分出500 μL备制梯度稀释液（1∶5），用以确定最佳的稀释度。处理样本所用的玻璃试管和塑料器材均不含内毒素。使用动态显色法鲎试剂（LAL）内毒素检测试剂盒、Kinetic-QCL仪及软件（Lonza Kinetic-QCL）按照厂商说明书于96孔板中对样本进行内毒素分析，每个样本分析两次。使用大肠埃希菌O55∶B5内毒素作为标准品（10 EU/ng）检测内毒素浓度，内毒素的单位为ng/mg颗粒物。此内毒素水平代表样本中可能存在的各种内毒素的总体活性。

2.3 促炎性细胞因子（TNFα和IL-6）

已知TNFα和IL-6作为急性反应因子参与PM介导的促炎症反应（Hiraiwa和van Eeden，2013），因此我们重点关注这两种细胞因子。我们使用美国菌种保藏中心的THP-1细胞（一种人单核细胞系）评估体外细胞因子反应。该细胞在含有青霉素（50 U/mL）和链霉素（50 μg/mL）的10%胎牛血清-RPMI（编号A10491，Sigma）中培养，维持温度37℃，CO_2浓度5%。

将细胞密度为550 000个/mL的上清液暴露于80 μg/mL的PM_{10}或$PM_{2.5}$，染毒24 h后检测该上清液中的TNFα和IL-6。整个染毒过程在24孔板中操作，保持PM的质量浓度相当于80 μg/mL至40 μg/cm^2。我们在研究设计中设置了一个固定的PM质量浓度，使

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PM成分的浓度能够引导浓度依赖性反应。我们预期PM成分的浓度会根据PM的大小、采集点、采集季节的不同而变化。之前的研究中发现80 μg/mL是PM诱导细胞因子生成而细胞活性降低最少（达10%）的至适浓度（Manzano-León等，2013）。在用PM染毒前24 h，细胞保存于无血清的培养基。每次染毒前都会将新分装出的PM（1 mg/mL）混匀并超声，随后用ELISA（Invitrogen）法检测上清液中TNFα和IL-6的水平。对于每个PM样本我们都进行三次独立的试验，每次试验都代表了各副本的平均浓度。未经染毒的细胞用作阴性对照，将其基础细胞因子水平（TNFα为3.225 pg/mL，IL-6平均值为1.135 pg/mL）从试验值中减去。将10 μg/mL脂多糖（LPS）染毒的细胞用作阳性对照。结果以pg/mL表示。

2.4 统计学分析

仅将所有样本中都检测到的成分纳入统计。计算不同大小的PM及不同组别的成分（内毒素、PAHs、元素）的中位数、平均值及95%置信区间（*CIs*），使用Mann-Whitney检验比较不同季节的中位数。计算PM_{10}及$PM_{2.5}$中各成分的中位数、平均值及百分比，使用Mann-Whitney检验比较不同季节的中位数。所有成分水平均经自然对数转换，根据成分之间的相关性使用主成分分析（PCA）将多种PM成分分组。用碎石图标准来选择保留组分的数量（Afifi等，2004）。计算组分评分，并根据PM大小用方差分析（ANOVA）比较不同季节之间的组分评分，使用不同的标志绘制组分评分的散点图，形象展现PM_{10}及$PM_{2.5}$成分的季节性规律。

用同样的方法计算获得不同季节、不同PM大小的TNFα和IL-6水平的中位数、平均数及95%*CI*。

主成分和ln（细胞因子）之间的关联用偏相关系数（*r*）表示，将PM大小作为控制变量。用C_1中的PAHs（C_1相关PAHs）在C_1、C_2所有成分含量（C_1+C_2含量）中所占的百分比表示C_1相关PAHs在不同大小的PM及在不同季节的相对参与度。使用回归模型评估C_1相关PAHs的百分比和ln（细胞因子生成）之间的关联，PM大小及C_1+C_2含量为校正因素。对C_1+C_2含量按四分位分组：低、中低、中高、高。所有统计分析用SPSS（v20；IBM）及Stata（v10；StataCorp LP）完成。

3 结果

3.1 季节特征

5个采样点寒冷干燥季节的各项特征指标的平均值如下：温度（14.8 ± 0.98）℃；相对湿度（39.42 ± 2.92）%；累积雨量（22 ± 5）mm；1 h最大臭氧浓度（0.073 ± 0.026）ppm；PM_{10}（67.8 ± 14.02）μg/m^3；$PM_{2.5}$（31.2 ± 2.59）μg/m^3。多雨温暖季节的各项特征指标的平均值如下：温度（18.6 ± 0.89）℃；相对湿度（57 ± 2）%；累积雨量（660 ± 78）mm；1 h最大臭氧浓度（0.086 ± 0.027）ppm；PM_{10}（42.6 ± 7.09）μg/m^3；$PM_{2.5}$（21 ± 2）μg/m^3［联邦区政府环境部（SEDEMA），2015］。

3.2 PM化学成分

总体而言，有32种PM成分（22种元素、9种PAHs、内毒素）在所有样本中都可检测到（见补充材料，表S1和S2），总结见表1。不能在所有样本中都检测到因而不纳入统计的成分见补充材料，表S3。检测到的成分的总质量占PM_{10}质量的百分比在干燥寒冷季节为6.8%（68.45 μg/mg），多雨温暖季节为12.6%（126.25 μg/mg）；检测到的成分的总质量占$PM_{2.5}$质量的百分比在干燥寒冷季节为4.7%（46.60 μg/mg），多雨温暖季节为2.8%（27.69 μg/mg）。

各PM成分水平随PM大小和季节而变化（见补充材料，表S1何表S2）。PM_{10}中元素成分在多雨温暖季节的平均浓度（126 206 ng/mg）高于在干燥寒冷季节的平均浓度（68 391 ng/mg）。在两个季节，钙（Ca）、硫（S）、钾（K）、钠（Na）、镁（Mg）、Si、Fe、铝（Al）、锌（Zn）均占PM_{10}中总元素浓度的98%，其中7种元素（Ca、S、K、Na、Si、Fe、Al）的浓度在两个季节之间差异有统计学意义（$P<0.05$）（见补充材料，表S1）。PM_{10}中PAHs浓度的中位数在干燥寒冷季节略高（P=0.052）（表1）。PM_{10}中内毒素的平均浓度在两个季节之间无差异（P=0.584）。

$PM_{2.5}$中元素成分在干燥寒冷季节的平均浓度（46 529 ng/mg）高于在多雨温暖季节的平均浓度（27 657 ng/mg）。干燥寒冷季节S、Ca、K、Na、Zn、Mg、Fe、铜（Cu）、钒（V）、Al、Si含量占$PM_{2.5}$样本中总元素浓度的98%，多雨温暖季节Ca、S、Na、K、Zn、Mg、Si、Cu占$PM_{2.5}$样本中总元素浓度的98%（见补充材料，表S2）。$PM_{2.5}$中PAHs浓度的中位数在干燥寒冷季节（56.7 ng/mg）高于多雨温暖季节（24.2 ng/mg）（P=0.001）（表1）。$PM_{2.5}$中内毒素的浓度在干燥寒冷季节（2.1 ng/mg）显著高于多雨温暖季节（0.5 ng/mg）（P=0.001）。

PM中元素的质量在所有检测到的PM成分总质

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

量中所占比例最大，为≤99.7%。尽管PAHs在PM质量中所占比例<1%，但合并不同粒径的PM样本后，寒冷干燥季节PAHs的质量（0.11%）几乎是多雨温暖季节（0.04%）的3倍。总体而言PM_{10}中内毒素含量高于$PM_{2.5}$中内毒素含量，但只有$PM_{2.5}$中的内毒素含量显示出季节差异（P=0.001）（表1）。在多雨温暖季节，PM_{10}中所有检测到的PM成分的平均浓度（126 250 ng/mg）是$PM_{2.5}$中（27 690 ng/mg）的4.6倍，而在干燥寒冷季节PM_{10}中所有检测到的PM成分的平均浓度（68 450 ng/mg）是$PM_{2.5}$中（46 602 ng/mg）的1.5倍（见补充材料，表S1和S2）。

表1 不同种类（内毒素、PAHs、元素）、不同季节、不同PM大小的PM成分水平汇总

成分[a]	PM_{10}		$PM_{2.5}$	
	中位数	平均数（95%*CI*）	中位数	平均数（95%*CI*）
内毒素				
干燥寒冷季节	4.6	5.2（4.5，5.8）	2.1*	2.3（1.6，3.0）
多雨温暖季节	4.1	6.6（4.1，9.2）	0.5*	1.0（0.4，1.5）
PAHs				
干燥寒冷季节	47.9	53.4（42.2，64.7）	56.7*	71.1（57.3，84.8）
多雨温暖季节	41.7	37.1（31.4，42.8）	24.2*	30.7（23.0，38.5）
元素				
干燥寒冷季节	71 183.4*	68 391.6（64，978，71，805）	45 683.7*	46 529.1（39870，53，188）
多雨温暖季节	119 909.3*	126 206.4（105，260，147，153）	20 376.5*	27 657.9（17820，37，496）

［注］*CI*：置信区间；PM：颗粒物；PAH：多环芳烃。a：ng/mg PM。*：相同大小的PM中成分的水平在不同季节差异具有统计学意义（P<0.05；Mann-Whitney检验）。

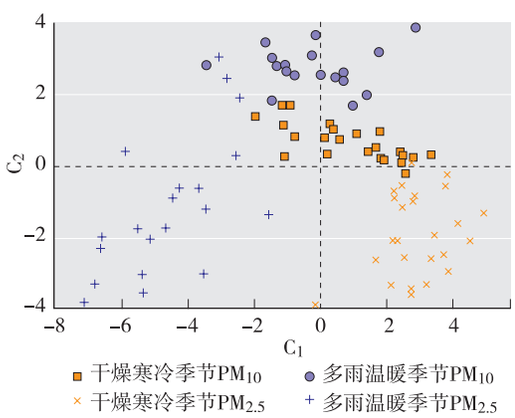
3.3 主成分分析

将内毒素、PAHs（苊烯、苯并［*a*］蒽、苯并［*a*］芘、苯并［*b*］萤蒽、苯并［*ghi*］苝、苯并［*k*］萤蒽、屈、萤蒽、芘）、总量占所有元素浓度98%的多个元素（S、Ca、K、Na、Zn、Mg、Fe、Cu、V、Al、Si）纳入PCA，从而减少解释变量的数量并最大化样本/变量比（n≥变量的数量）（Legendre和Legendre，2012）。

最终提取出3个主成分，这3个主成分能解释74.3%的总变异（见补充材料，表S4）。组分1（C_1）解释了43.4%的总变异，主要由K、V、S、苯并［*a*］芘、苯并［*a*］蒽、荧蒽、屈、苯并［*k*］萤蒽、苯并［*ghi*］苝、Fe、Zn、苯并［*b*］荧蒽组成（按载荷降序排列）。组分2（C_2）解释了21.5%的总变异，主要由Ca、Mg、内毒素、Si、Al、Na组成（按载荷降序排列）。组分3（C_3）主要由芘和苊烯组成（按载荷降序排列），解释了9.4%的总变异。

根据PM的大小来评估组分评分的季节性差异。与干燥寒冷季节相比，多雨温暖季节的PM_{10}样本C_2、C_3水平更高（P<0.05），C_1水平更低（P<0.05）。$PM_{2.5}$样本中只有C_1显示出季节差异，干燥寒冷季节的C_1水平高于多雨温暖季节（P≤0.05）（见补充材料，表S1）。

90份PM样本中，不同PM大小和不同季节的C_1、C_2展现出4种明显的规律：a）多雨温暖季节的$PM_{2.5}$中C_1和C_2含量较低；b）干燥寒冷季节的PM_{10}中C_1含量接近于平均值，C_2含量略高于平均值；c）多雨温暖季节的PM_{10}中C_1含量接近平均值，C_2含量较高；d）干燥寒冷季节的$PM_{2.5}$中C_2含量较低，C_1含量较高（图1）。



［注］不同季节及不同PM大小（组）的样本中（n=90）C_1和C_2含量具有较大差异。多雨温暖季节PM_{10}中C_2浓度较高，C_1浓度中等；干燥寒冷季节的PM_{10}中含有中等浓度的C_1，中高等浓度的C_2；多雨温暖季节的$PM_{2.5}$中C_1、C_2浓度总体较低；干燥寒冷季节的$PM_{2.5}$中C_1浓度较高，C_2浓度较低。两条轴上的0都相当于所有样本的平均数，整数值是基于观察到的组分含量及原始变量的标化值，累加所有变量。

图1 不同PM大小及不同季节的C_1、C_2组分评分图。

3.4 PM_{10}及$PM_{2.5}$诱导的TNFα和IL-6水平

90份PM_{10}和$PM_{2.5}$样本的细胞因子反应在不同季节及不同大小的PM中差异具有统计学意义（P<0.05）（表2）。在多雨温暖季节，PM_{10}和$PM_{2.5}$样本引起的平均细胞反应（TNFα和IL-6）均比干燥寒冷季节强烈。经不同PM染毒后TNFα分泌比IL-6高很多，变异程度比IL-6小（不同季节、不同大小PM染毒后，TNFα的变异系数范围为22.5%~125.4%；不同季节、不同大小PM染毒后，IL-6的变异系数范围为59.4%~243.8%）（见表2）。在两个季节，PM_{10}诱导的TNFα反应和IL-6反应均比$PM_{2.5}$强。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

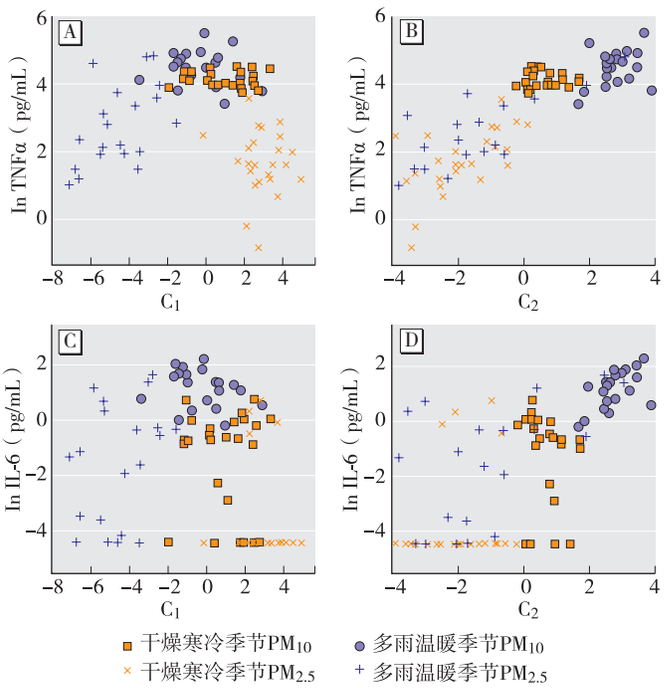
表2　不同大小、不同季节的PM染毒后生成的细胞因子水平

细胞因子[a]	PM_{10} 中位数	PM_{10} 平均数（95%*CI*）	PM_{10} CV（%）	$PM_{2.5}$ 中位数	$PM_{2.5}$ 平均数（95%*CI*）	$PM_{2.5}$ CV（%）
TNFα						
干燥寒冷季节	60.52*	65.08（59.03，71.12）	22.50	5.22*	8.42（5.23，11.62）	91.80
多雨温暖季节	98.60*	105.63（79.90，131.35）	52.02	14.01*	32.24（13.31，51.17）	125.40
IL-6						
干燥寒冷季节	0.51*	0.62（0.37，0.87）	96.93	0.01*	0.22（−0.001，0.44）	243.80
多雨温暖季节	3.67*	3.89（2.81，4.97）	59.41	0.31*	1.01（0.29，1.72）	151.20

［注］*CI*：置信区间；CV：变异系数；IL-6：白介素6；PM：颗粒物；TNFα：肿瘤坏死因子-α。a：单位pg/mL，减去未染毒对照组细胞生成的细胞因子水平。*：相同大小的PM中同一细胞因子的水平在不同季节之间差异有统计学意义（$P<0.05$；Mann-Whitney检验）。

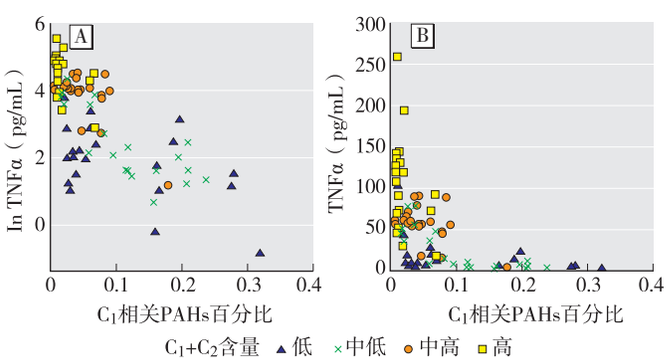
主成分和细胞因子水平的自然对数之间的偏相关系数表明，C_1与TNFα（$r=-0.32$；$P=0.002$）和IL-6（$r=-0.36$；$P<0.001$）呈显著负相关，而C_2与TNFα（$r=0.65$；$P<0.001$）和IL-6（$r=0.5$；$P<0.001$）呈显著正相关。但C_1和TNFα的散点图呈一个倒U型曲线，表明当C_1含量处在分布中间水平时PM染毒后TNFα的反应性分泌水平最高；当C_1含量非常低或非常高时PM染毒后TNFα的反应性分泌水平最低（图2A）。这些极值对应多雨温暖季节和干燥寒冷季节的$PM_{2.5}$样本。与之相反的是，C_2和TNFα之间的散点图和线性回归显示二者显著正相关（$r=0.65$；$P<0.001$）（图2B）。IL-6与C_1和C_2的关联类似于TNFα与C_1和C_2的关联，但没有那么明显，因为数据更为分散（图2C、2D）。C_3与任何一种细胞因子均无关联（TNFα，$P=0.407$；IL-6，$P=0.257$），因此没有进行进一步的分析（数据未展示）。

TNFα与C_1相关PAHs呈负相关（图3A、3B）。另外，根据经PM大小和C_1+C_2含量校正的回归模型，PAHs在C_1中所占百分比（C_1相关PAHs）与PM染毒后TNFα生成量的自然对数呈负相关（C_1相关PAHs百分比的回归系数：−8.21；95%*CI*：−10.7，−5.7）（见补充材料，表S5）。此外，PM大小（$PM_{10}>PM_{2.5}$）和C_1+C_2含量（浓度相关的）与PM染毒后的TNFα反应性生成水平显著正相关。当C_1相关PAHs的比例>0.1%时，无论C_1+C_2含量高低，PM诱导的TNFα水平均较低；此现象在未经对数转换的TNFα值中更明显（图3B）。IL-6的结果没有统计学意义（数据未展示），可能是由于数据较为分散且IL-6浓度值极低的样本数较多的缘故（图2C）。



［注］TNFα与C_1和C_2相关联。A：C_1非常低或非常高时PM诱导的TNFα分泌水平较低，这两种极端情况分别出现在多雨温暖季节的$PM_{2.5}$样本及干燥寒冷季节的$PM_{2.5}$样本中。C_1与TNFα总体呈负相关（$r=-0.32$；$P=0.002$）。B：C_2和TNFα水平呈显著正相关（$r=0.65$；$P<0.001$）。C，D：IL-6与C_1（$r=-0.36$；$P=0.000$）和C_2（$r=0.50$；$P=0.000$）的数据较分散，关联度较低。呈现的细胞因子水平已减去未染毒对照组细胞生成的细胞因子水平。X轴上的0代表所有样本的平均数，整数值是基于观察到的组分含量及原始变量的标化值，累加所有变量。C_1：组分1；C_2：组分2；IL-6：白介素6；TNFα：肿瘤坏死因子-α。

图2　细胞因子反应的自然对数和PM C_1和C_2组分评分的散点图



［注］A：TNFα的自然对数与PM中C_1相关PAHs呈负相关（校正$R^2=0.75$；概率>$F=0.000$）。B：未经对数转换的数据显示当C_1相关PAHs>~0.1%或C_1+C_2含量较低时，TNFα生成量显著降低。以PM C_1+C_2含量的四分位点来表示数据点。C_1：组分1；C_2：组分2；PAH：多环芳烃；TNFα：肿瘤坏死因子-α。

图3　PM诱导TNFα水平与PM中C_1相关PAHs百分比的散点图

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

4 讨论

我们描述了多雨温暖季节及干燥寒冷季节墨西哥城5个采样点采集的PM样本的炎症效应，并阐明PM成分的季节性变化与PM诱导细胞分泌TNFα及IL-6的潜能具有较强的关联。尽管已有其他研究发现PM相关效应与PM构成的季节性变化有关（Bell等，2007；Cheung等，2011；Toscano等，2011；Traversi等，2010），但本研究的大样本量有助于识别引起细胞反应变化的PM成分的季节性改变。

已有流行病学研究报道PM浓度的季节性增高与包括死亡在内的不良健康结局相关（Moolgavkar，2003；Smith等，2000）。PM水平升高并不是影响其潜在毒性的唯一决定因素，PM的化学成分（Dergham等，2012；Totlandsdal等，2014）及其季节性改变无疑也起到了根本的作用（Laden等，2000）。其他流行病学研究（Son等，2012）和实验研究已经表明，季节性生物效应影响PM的化学成分（Becker等，2005；Camatini等，2012；Perrone等，2010）。尤其是在意大利的2个城市收集的PM样本，用其对细胞进行染毒后发现夏季采集的PM样本造成细胞活性降低程度高于冬季采集的PM样本，夏季的PM样本中硫酸盐、Al、砷（As）、Cr、Cu、Zn的含量更高（Perrone等，2010）。相类似的是，另一项意大利的研究用PM_{10}样本对细胞进行染毒后发现，相比冬季的PM_{10}样本，夏季的PM_{10}样本中矿尘元素、Fe、内毒素水平更高，且具有更强的细胞毒性及促炎作用（Camatini等，2012）。

我们还观察到PM_{10}和$PM_{2.5}$的化学成分具有季节性差异。相对于夏季（多雨温暖季节），冬季（干燥寒冷季节）的PM样本中与人类活动相关的组分（C_1，富含V和PAHs）浓度更高（$PM_{2.5}$>PM_{10}）。而第二个被识别的组分（C_2，包含内毒素及土壤元素如Si、Al）显示出了相反的季节性差异（夏季更高，冬季更低），此现象主要出现在PM_{10}中。

已有墨西哥城的几项研究观察到干燥寒冷季节PM中PAH含量升高（Mugica等，2010；Vega等，2011）。然而目前尚无相关研究描述墨西哥城内PM相关PAH含量的季节性差异。有其他城市的研究表明在该地区最冷的季节PAHs水平更高（Perrone等，2010）。目前，墨西哥城开展的描述PM化学成分季节性改变的其他研究大多局限于冬季及早春时节（Vega等，2011）。

化学成分的季节性差异可能与气象条件[如气体分配比（受温度和湿度影响）、风沙、逆温、大气混合层深度]及人类活动的改变（如交通模式）相关（Mugica等，2010；Pandolfi等，2014；Vega等，2011）。此外，实验证据表明大气中臭氧和木材烟尘颗粒的共存能减少PAH的含量及颗粒的生物活性（Nordin等，2015）。在我们研究期间，我们发现在多雨温暖季节臭氧水平与PM相关PAH的含量呈负相关（数据未展示），但还需更进一步的研究来评估大气氧化反应对PM相关的季节性毒性的影响。

PM样本的促炎症反应具有季节性变化。多雨温暖季节的PM样本诱导的炎症反应比干燥寒冷季节更强烈，PM_{10}诱导的炎症反应强于$PM_{2.5}$。细胞促炎反应可能与土壤成分较多的组分（C_2）呈正相关。其他研究者报道了在欧洲收集的PM样本的促炎症反应能力与其中内毒素、Fe、Cu含量的关系（Guastadisegni等，2010），还有研究报道了在荷兰收集的PM样本的促炎症反应能力与其中内毒素和碳含量的关系（Steenhof等，2011）。然而这两项研究都没有分析季节性变异。

C_1和TNFα水平有非线性的关联。TNFα对C_1的反应呈倒U型的剂量反应曲线。C_1含量较低或较高的样本诱导TNFα分泌的水平较低，而C_1含量中等的样本可诱导较高水平的TNFα分泌。总的来说$PM_{2.5}$中C_1含量较高，尤其是干燥寒冷季节的$PM_{2.5}$。

有证据显示细胞反应的季节性改变与PM中PAHs含量相关。Aung等（2011）发现，在加州夏季收集的PM样本（富含碳、硫酸盐、Cu）刺激炎症相关基因的表达增高，而在冬季收集的PM样本（PAHs含量更高）诱导的炎症基因应答降低。与之类似的是，Camatini等（2012）报道在意大利收集的PM样本中冬季的PAHs含量是夏季的10倍，且冬季的PM样本诱导的促炎症细胞反应水平低于夏季。但与本研究不同，这些研究未描述PM组分间交互作用或PM粒径引起的效应。

我们的分析显示，校正PM大小及C_1+C_2含量后，PM诱导的TNFα生成量与C_1中的PAHs含量呈显著负相关。当C_1中的PAHs在C_1+C_2含量中比例≥0.1%时，PM诱导的TNFα分泌水平下降。据我们所知，本研究属首次使用真实的颗粒物样本来分析不同大小的PM中各组PM成分的相对参与度及细胞诱导的季节相关TNFα分泌。多雨温暖季节的PM_{10}中的土壤成分的含量与细胞因子生成量呈正相关，而干燥寒冷季节$PM_{2.5}$及PM_{10}样本中的PAHs含量与TNFα生成量呈负相关。与PM_{10}相比，$PM_{2.5}$中PAHs含量较高时细胞因子生成

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

量相对较低。

有其他研究支持颗粒介导的细胞效应与颗粒成分之间的交互作用（可改变PM的理化性质）相关。颗粒物中PAHs的生物利用度下降可能是影响细胞因子生成的刺激作用的机制（Goulaouic等，2008）。其他研究者在体外实验中观察到，将PAHs混合物加入后，其诱导的细胞DNA损伤信号比将PAHs单独检测更强，且混合物含高分子量PAHs时反应更为稳固（Jarvis等，2013）。斑马鱼研究显示，真实的富含PAHs的PM样本比富含矿物质的样本具有更强的胚胎毒性及类二噁英活性（Mesquita等，2014）。这些结果都与本研究中观察到的对PM的PAHs相关应答及土壤相关应答一致。

本研究提示PM刺激后介导TNFα和IL-6生成的机制是不同的。比起TNFα，IL-6的生成量更低、更分散。此外，IL-6与土壤含量的线性关系更弱，且与PAHs含量的相关性不够明确。这些特征提示，PM组分之间存在复杂交互作用，可对IL-6生成进行调节，并且TNFα和IL-6之间存在调节性交互作用，如Raspé等（2013）的结果一致。Raspé等发现用脂多糖刺激单核细胞后，暴露于不同的免疫调节氨基酸组合会改变TNFα和IL-6的表达。另有其他研究描述了将颗粒物中PAHs的混合物作用于单核细胞时不同的白介素应答模式（Goulaouic等，2008）。

未来还需进一步研究来揭示PM成分如何影响信号和细胞通路，从而导致与季节性PM成分相关的不同健康结局。对PM成分和细胞反应进行综合评估有助于增加我们对相关机制的理解（Dergham等，2012；Totlandsdal等，2014）。本研究聚焦于PM构成的复杂性。目前我们发现了常在PM中检测到的两组主要化学组分，但未试图分离特定成分（如Na、内毒素）或组内成分之间的交互作用。我们依旧缺乏PM成分引起特定生物效应的相关信息，比如PM相关的PAHs与不同细胞结局（如炎症、生物转化、DNA损伤潜能）的同步效应相关信息就相当有限（Ovrevik等，2010；Teixeira等，2012）。正如之前的假设，PM诱导的细胞反应是由PM混合物成分之间的复杂交互作用引起的（Osornio-Vargas等，2011）。本研究为未来更大规模的生物效应及PM成分的机制研究提供了基础。明晰细胞和PM成分之间的交互作用是整合毒理学研究和流行病学研究的重要一步。我们的研究结果支持PM构成的季节性改变影响对PM生物反应的假说。我们正在进行的队列流行病学研究将进一步阐明空气污染暴露的季节性改变在孕期的作用及对出生结局的潜在不良影响（O'Neill等，2013）。

5 结论

PM的成分及体外促炎效应具有季节性变化，土壤源相关成分在其中起到重要的驱动作用。但是干燥寒冷季节收集的PAHs含量更高的样本中的土壤相关元素并没有引发促炎症反应。当PM中PAHs含量≥0.1%时，PM染毒没有诱导TNFα的分泌；但IL-6的生成并不遵循这个规律，而更像是PM成分、PM大小和/或细胞因子之间的复杂交互作用的结果。未来开展有关PM成分和有害作用之间关联的毒理学研究及流行病学研究应将此类交互作用纳入考虑。

翻译：季麟；审校：金泰廙

参考文献（略）

本文原文刊登于*EHP*杂志，需要者务必引用英文原文，详见Manzano-León N，Serrano-Lomelin J，Sánchez BN，et al. TNFα and IL-6 responses to particulate matter *in vitro*：variation according to PM size，season，and polycyclic aromatic hydrocarbon and soil content. Environ Health Perspect 124（4）：406-412.

本文原文及参考文献请浏览http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1409287

（编辑：汪源；校对：汪源）

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net