doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2017.17.0272

·基础研究·

大气细颗粒物$PM_{2.5}$致Wistar大鼠肺部病变的研究

巨英超[1]，刘亮[2]，贺宇彤[2]，单保恩[2,3]

Pulmonary Lesions of Wistar Rats Induced by Atmospheric Particulate $PM_{2.5}$

JU Yingchao[1], LIU Liang[2], HE Yutong[2], SHAN Baoen[2,3]

1. Experimental Animal Center, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 2. Tumor Institute, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 3. Research Center, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

Corresponding Author: SHAN Baoen, E-mail: baoenshan@hbydsy.com

Abstract: Objective To investigate the mechanism of lung lesions caused by fine particulate matter $PM_{2.5}$. **Methods** Real-time $PM_{2.5}$ collector was used to collect $PM_{2.5}$. Wistar rats were fed on the systemic exposure system of $PM_{2.5}$. Wistar rats were exposed to 4 hours daily for 9 months. $PM_{2.5}$ experimental group and control group were set up. General structure of lung tissue and HE staining result were observed. T cell immune function, lung cell apoptosis, cell cycle and DNA index in Wistar rats were detected by flow cytometry. The expression levels of CEA, CA125 and SccAg in serum and lung lavage fluid of Wistar rats were detected by ELISA. **Results** Lung tissues of experimental group were radiated from the periphery of the bronchus with dark, visible white spots and bubble like protrusions with irregular white ridges. HE staining results showed that lung tissues of experimental group were fibrotic, severe consolidation of lung, alveolar hyperemia and massive inflammaroty reactive hyperplasia. CD4/CD8 ratio in experimental group was significantly higher than that in control group(P<0.05). The expression of CA125 in serum and lung lavage fluid was significantly higher than that in control group(P<0.05). The apoptosis rate of lung tissues in experimental group was significantly lower than that in control group, but DNA index was significantly higher (P<0.05). **Conclusion** Long-term exposure to $PM_{2.5}$ results in different degrees of nodules and a large range of inflammatory reaction in lung tissues.

Key words: Fine particulate matter; Smog; Pulmonary lesions; DNA index; Cell proliferation

摘　要：目的　探讨大气细颗粒物（particulate matter, PM）$PM_{2.5}$致肺部病变机制。**方法**　采用实时$PM_{2.5}$采集器进行$PM_{2.5}$收集，Wistar大鼠饲养于$PM_{2.5}$的全身暴露染毒系统，Wistar大鼠每日染毒4小时，共染毒9月，设立实验组及对照组；观察肺组织大体结构及HE染色观察；流式细胞术检测Wistar大鼠T细胞免疫功能、肺组织细胞凋亡、细胞周期及DNA指数；ELISA实验检测Wistar大鼠血清及肺灌洗液中CEA、CA125及SccAg表达水平。**结果**　实验组肺组织以支气管向外周辐射状颜色发暗、偏黑，多处可见白色斑点和泡状凸起，边缘不规则白色隆起；HE染色结果，实验组肺组织纤维化，肺实变严重，肺泡充血，见大量炎性反应增生；实验组CD4/CD8比值显著高于对照组（P<0.05），血清及肺灌洗液中CA125的表达显著高于对照组（P<0.05），实验组肺组织细胞凋亡率显著低于对照组，而DNA指数显著增高（均P<0.05）。**结论**　长期接触$PM_{2.5}$会造成肺组织出现不同程度结节，肺组织出现大范围炎性反应病变。

关键词：细颗粒物；雾霾；肺病变；DNA指数；细胞增殖

中图分类号：R730　　**文献标识码：**A

收稿日期：2017-03-14；**修回日期：**2017-05-24

基金项目：河北省财政厅冀财([2016]361006)

作者单位：1. 050011 石家庄，河北医科大学第四医院实验动物中心；2. 050011 石家庄，河北医科大学第四医院肿瘤研究所；3. 050011 石家庄，河北医科大学第四医院科研中心

通信作者：单保恩，E-mail: baoenshan@hbydsy.com

作者简介：巨英超（1985-），男，硕士，助理研究员，主要从事肿瘤动物实验的研究

0　引言

随着我国近年来工农业、交通运输业等大力发展以及煤炭石油等能源的大规模开发利用，造成环境污染问题日益严峻。雾霾是空气污染和气象因素共同作用的结果，雾霾天气，大气能见度下降，大气中颗粒物（particulate matter, PM）特别是细颗粒物（$PM_{2.5}$）是导致能见度降低的主要

因素[1]。PM粒径≤2.5 μm的称为细颗粒物，即$PM_{2.5}$。因$PM_{2.5}$粒径细小，相对表面积较大，在大气中停留时间较长，可吸附大量对身体有害的物质，并直接深入细支气管和肺泡形成沉积，对身体造成多种病变，多引起心血管及肺部病变等[2-4]。大量$PM_{2.5}$在肺部沉积造成肺部不同病变，$PM_{2.5}$上携带的多环芳烃和重金属成分等具有致细胞突变和致癌性[5]。本实验对石家庄市空气中$PM_{2.5}$致Wistar大鼠肺部病变进行研究，探讨石家庄市空气中$PM_{2.5}$是否具有致肺部癌变作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

Wistar大鼠：购于河北省实验动物中心，生产许可证编号：SCXK（冀）2010-1-003；饲养于河北医科大学第四医院实验动物中心清洁环境，温度：22℃~24℃；湿度：30%~70%；换气次数：15次/小时。

动物分组：实验组：$PM_{2.5}$采集器，按抽气量50 L/min，完全$PM_{2.5}$富集量，理论$PM_{2.5}$浓度为外部空气中$PM_{2.5}$浓度的10倍；对照组：正常饲养，大鼠饲养于$PM_{2.5}$<35 μg/m^{3}的洁净环境中。染毒动物每日染毒4 h，一周染毒5次。每组Wistar大鼠20只，共染毒9月，其余时间与对照组饲养于同一环境中。每日观察大鼠饮食及饮水情况，每周测量大鼠体重。

1.2 主要试剂及仪器

$PM_{2.5}$采集器及全身暴露染毒系统（北京慧荣和科技有限公司）；FC500型流式细胞仪（美国Beckman Coulter公司）；DNA染液（美国BD公司）；大鼠癌胚抗原（CEA）、卵巢癌抗原（CA125）及鳞状细胞癌相关抗原（SccAg）均用ELISA试剂盒检测（北京冬歌生物公司）。

1.3 动物全身$PM_{2.5}$暴露系统设备连接及气体流向，见图1。

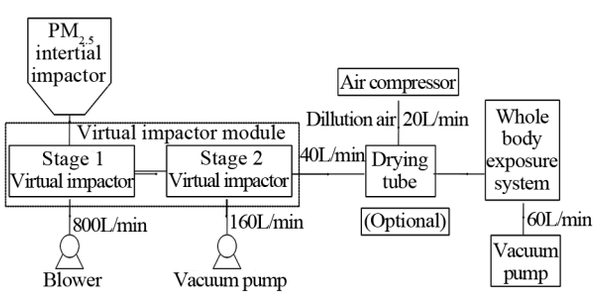


图1 动物全身$PM_{2.5}$暴露系统

Figure1 $PM_{2.5}$ exposure system of animal's whole body

1.4 肺组织HE染色

将福尔马林固定的肺组织，常规石蜡包埋，4 μm切片后将组织切片置80℃烤箱1 h，冷却后入二甲苯Ⅰ及Ⅱ各10 min，过梯度酒精后苏木精对比染色3 min，取出后自来水冲洗，盐酸酒精分化，氨水返蓝，伊红染色，过梯度酒精及二甲苯后，中性树胶封片。显微镜下观察。

1.5 Wistar大鼠静脉血CD3、CD4、CD8表达水平

实验结束后，取大鼠静脉血0.5 ml，抗凝，分别取0.1 ml抗凝静脉血加入两个流式样品管中，其中一管加入10 μl CD4-FITC及10 μl CD8-PE抗体，另一管中加入10 μl CD3-FITC抗体，同时设置同型对照组，室温避光放置30 min后裂解红细胞，流式细胞仪检测。

1.6 ELISA实验检测Wistar大鼠血清及肺灌洗液中CEA、CA125及SccAg表达水平

Wistar大鼠血清收集：抽取Wistar大鼠静脉血，促凝后室温放置1 h，以3 000 r/min离心15 min，取上层血清至无菌EP管中，–20℃保存备用。

肺灌洗液收集：将肺完整剥离时带2~3 cm气管，置于冰上的无菌玻璃皿中，注射器抽取5 ml 0.9%氯化钠溶液，将针头插入气管中，用镊子夹闭后将0.9%氯化钠溶液灌入肺中，反复抽吸3次，将抽出灌洗液装入无菌EP管中，–20℃保存备用。

ELISA实验步骤：按试剂盒说明书操作，分别设空白孔、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液40 μl，然后再加待测样品10 μl。将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀；每孔加入酶标试剂100 μl，用封板膜封板后置37℃温育60 min。将20倍浓缩洗涤液用蒸馏水20倍稀释后备用；小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置30 s后弃去，如此重复洗涤5次，拍干。每孔先加入显色剂A 50 μl，再加入显色剂B 50 μl，轻轻振荡混匀，37℃避光显色15 min。每孔加终止液50 μl，终止反应。以空白孔调零，450 nm波长依序测量各孔的吸光度（*OD*值）。测定应在加终止液后15 min内进行。用标准物的浓度与*OD*值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的*OD*值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

1.7 网挫法制备肺组织单细胞悬液

将70%乙醇固定的肺组织，用冷0.9%氯化钠溶液冲洗一次，利用网挫法制备单细胞悬液，调整细胞浓度为1×10^7个/毫升。

1.8 流式细胞术检测Wistar大鼠肺组织细胞凋亡、细胞周期及DNA指数

取制备好的单细胞悬液100 μl，加入0.5 ml