·论 著·

复合营养素对$PM_{2.5}$所致大鼠急性肺部氧化应激和炎症损伤的影响

蔡君华[1],张波[1],劳文艳[2],任超[3],范子轩[3]
1. 南方医科大学公共卫生学院,广东 广州 510515;2. 北京联合大学生物化学工程学院;
3. 北京联合大学应用文理学院保健食品功能检测中心

【摘要】 目的 探讨某复合营养素对大气$PM_{2.5}$致大鼠急性肺部氧化应激和炎症损伤的预防作用。**方法** 将40只SD大鼠随机分为4组:空白组、$PM_{2.5}$模型组、低剂量营养素(150 mg/kg)+$PM_{2.5}$组、高剂量营养素(750 mg/kg)+$PM_{2.5}$组。营养素组连续预灌胃14 d营养素溶液,空白组、模型组灌胃生理盐水。第15天灌胃后除空白组外的各组大鼠气管滴注$PM_{2.5}$(9.0 mg/kg)混悬液染毒,每隔24 h 1次,共3次,空白组气管滴注生理盐水。末次染毒24 h后,收集血样、支气管肺泡灌洗液、肺组织匀浆和病理切片。分析测定血清丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平,肺泡灌洗液中乳酸脱氢酶(LDH)、酸性磷酸酶(ACP)水平;肺匀浆液中肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素1β(IL-1β)水平。**结果** 与空白组比较,$PM_{2.5}$模型组的大鼠MDA、ACP、LDH、TNF-α、IL-1β水平增加、SOD活力降低($P<0.05$或$P<0.01$);与$PM_{2.5}$模型组比较,高、低剂量营养素+$PM_{2.5}$组能降低MDA、TNF-α、IL-1β水平及升高SOD活力($P<0.05$或$P<0.01$),高剂量营养素+$PM_{2.5}$组能降低ACP、LDH水平($P<0.05$或$P<0.01$),并改善大鼠肺组织病理变化。**结论** 该复合营养素对$PM_{2.5}$致大鼠急性肺部氧化应激及炎症损伤具有保护作用。

【关键词】 复合营养素; 肺损伤; $PM_{2.5}$; 氧化应激; 炎症损伤
中图分类号:R114 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-5039(2022)08-0907-05

Effect of a composite nutrient supplement on acute lung oxidative stress and inflammatory injury induced by $PM_{2.5}$ exposure in rats

CAI Jun-hua[1], *ZHANG Bo*[1], *LAO Wen-yan*[2], *REN Chao*[3], *FAN Zi-xuan*[3]
1. *School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou* 510515, China; 2. *College of Biochemical Engineering, Beijing Union University*; 3. *Functional Inspection Center of Health Food, College of Applied Science and Humanities, Beijing Union University*

【Abstract】 Objective To investigate the preventive effect of a composite nutrient supplement on acute lung oxidative stress and inflammatory injury induced by $PM_{2.5}$ exposure in rats. **Methods** Forty SD rats were randomized into 4 groups: control group, $PM_{2.5}$ model group, low-dose supplement (150 mg/kg) + $PM_{2.5}$ group, and high-dose supplement (750 mg/kg) + $PM_{2.5}$ group. Rats in nutrient supplement groups were administrated continuous by supplement solution gavage for 14 days, while rats in control and model groups were given with saline gavage. On the 15th day, rats in all groups except control group were exposed to $PM_{2.5}$ (9.0 mg/kg) suspension by tracheal drip, once every 24 hours, for 3 times in total. Rats in control group was treated with saline as the same procedure. Twenty-four hours after the last exposure, blood samples, bronchoalveolar lavage fluid, lung tissue homogenate and pathological sections of rats were collected. The levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) in serum, the levels of lactate dehydrogenase (LDH) and acid phosphatase (ACP) in alveolar lavage fluid and the levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin 1β (IL-1β) in lung homogenates were measured. **Results** Compared with the control group, the levels of MDA, ACP, LDH, TNF-α, IL-1β in $PM_{2.5}$ model group were significantly higher and SOD activity was lower ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the $PM_{2.5}$ model group, the levels of MDA, TNF-α and IL-1β in nutrient supplement + $PM_{2.5}$ groups were significant-

DOI:10.12183/j.scjpm.2022.0907
作者简介:蔡君华(1989—),女,硕士研究生,研究方向:营养与食品卫生学
通信作者:张波,E-mail:cnzhangbo@126.com;劳文艳,E-mail:laowenyan@buu.edu.cn

ly lower, and SOD activity was higher ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the $PM_{2.5}$ model group, the levels of ACP and LDH in high-dose supplement + $PM_{2.5}$ group were significantly lower ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the pathological injury of lung tissues were significantly less severe. **Conclusion** The composite nutrient supplement exerts protective effect on acute lung oxidative stress and inflammatory injury induced by $PM_{2.5}$ exposure in rats.

【**Keywords**】 Composite nutrient supplement; Lung injury; $PM_{2.5}$; Oxidative stress; Inflammatory injury

近年来多地大气$PM_{2.5}$浓度达到历史峰值[1]，$PM_{2.5}$污染已成为全球性环境问题，严重损害人类健康。流行病学研究表明，$PM_{2.5}$可影响人体呼吸系统、心血管系统、神经系统等多个系统，其中以呼吸系统毒性尤为明显[2]。研究显示，在拮抗$PM_{2.5}$对人体及大鼠的肺部损伤中，维生素C、维生素E和西兰花籽均能减轻肺部氧化损伤[3-5]；N-乙酰半胱氨酸能保护支气管上皮细胞[6]；柑橘能改善肺泡炎症[7]；牛初乳能减轻呼吸道炎症[8]。过往关于拮抗$PM_{2.5}$对肺部氧化应激和炎性损伤的研究，多用单一或双成分，而联合多种营养素对肺部是否有保护作用报道较少。本研究通过气管滴注$PM_{2.5}$悬液制备大鼠急性肺损伤模型，并用复合营养素（维生素C、维生素E、N-乙酰半胱氨酸、西兰花籽、柑橘及牛初乳提取物）进行干预处理，探索其对大鼠的肺部氧化应激水平、炎性因子的影响，为合理开发预防$PM_{2.5}$肺损伤的功能食品提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 选用体重在180～220 g的SPF级健康SD雄鼠40只，实验动物质量合格证为110322210100996787。购自北京华阜康生物科技股份有限公司，许可证号为SCXK（京）2019—0008（动物批号20210422）。在北京联合大学应用文理学院保健食品功能检测中心屏障级动物房饲养，动物使用许可证号为SYXK（京）2014-0031，该实验由北京联合大学实验动物伦理委员会批准（20210501）。

1.1.2 受试物 复合营养素胶囊（0.45 g/颗，每日3颗）由上海福奈尔生物科技有限公司提供，批号为20201104，功效成分含维生素C、牛初乳提取物、西兰花籽提取物、N-乙酰半胱氨酸、柑橘提取物及维生素E等。将胶囊内粉末取出，按照剂量（150 mg/kg、750 mg/kg）准确称量粉末及生理盐水，经2次超声处理充分混匀，以制备复合营养素低高灌胃剂量溶液。

1.1.3 实验试剂 白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）酶联免疫试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司；乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司；丙二醛（malondialdehyde，MDA）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、酸性磷酸酶（acid phosphatase，ACP）试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.1.4 仪器 TH-1000C大流量空气颗粒物采样器（天虹，中国），多功能酶标仪（Thermo，美国）；UV2600紫外可见分光光度计（岛津，日本）；生化分析仪（BECKMAN，美国）；MK360石英滤膜（Munktell，瑞典）；病理制片系统（Leica，德国），冷冻离心机（Sigma，德国）。

1.2 方 法

1.2.1 $PM_{2.5}$收集和染毒悬液制备 在北京三环四环之间某高校六楼楼顶通过大容量空气总悬浮物采集器（配$PM_{2.5}$切割器）、石英滤膜采集大气细颗粒物，流量为1.05 m^3/min，采集时间为2020年10月至2021年2月，每日连续采集22 h，间隔2 h。采集完成后将石英膜剪切成1 cm×3 cm，低温超声振荡6次，每次超声25 min，洗脱颗粒物。振荡液经8层纱布过滤，真空冷冻干燥成粉，用无菌生理盐水配制成$PM_{2.5}$悬液。

1.2.2 实验分组与染毒 将40只SD大鼠随机分为4组：空白组、$PM_{2.5}$模型组、低剂量营养素+$PM_{2.5}$组（人体每日推荐量同比大鼠剂量为150 mg/kg）、高剂量营养素+$PM_{2.5}$组（5倍人体每日推荐量同比大鼠剂量为750 mg/kg），每组10只。

低、高剂量营养素+$PM_{2.5}$组于染毒前连续灌胃营养素溶液14 d，空白组和$PM_{2.5}$模型组灌胃无菌生理盐水。灌胃时间为上午9点左右，灌胃容量均为10 mL/kg。于灌胃第15天开始，在照常灌胃后2 h内用4%戊巴比妥钠麻醉大鼠，按3 mL/kg容量进行气管滴注，$PM_{2.5}$模型组和营养素+$PM_{2.5}$组按9.0 mg/kg气管滴注$PM_{2.5}$悬液，连续染毒3次，每次间隔24 h；空白组气管滴注无菌生理盐水。

1.2.3 动物处理、样本采集及测定各样本指标

1.2.3.1 血清 末次染毒24 h后，用戊巴比妥钠麻醉大鼠，股动脉取血，离心分离血液上清液，检测

MDA、SOD水平。

1.2.3.2　肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)处死大鼠后,以止血钳夹闭左主支气管,往气管插入肺灌洗针头,结扎固定。向肺部缓慢注入3 mL冷磷酸缓冲液,轻按揉肺部,缓慢抽出灌洗液,反复操作3次。将肺泡灌洗液经2次离心取上清,检测LDH、ACP水平。

1.2.3.3　肺组织匀浆　称取未经灌洗的肺叶约0.3 g,剪碎后加入冰无菌生理盐水,低温下充分匀浆,离心后取上清测量TNF-α、IL-1β水平。

1.2.3.4　肺组织病理学观察　取未经灌洗部分肺叶,经固定,取中段肺组织进行切片,苏木精-伊红(HE)染色,由高年资的影像学老师进行盲法阅片,光镜下观察肺组织的病理学改变。

以上涉及试剂盒的操作均严格按照试剂盒说明书执行。

1.3　统计分析　数据采用SPSS 20.0软件分析,计量资料以$\bar{x} \pm s$表示。均数比较采用单因素方差分析;MDA、SOD、ACP、TNF-α、IL-1β的组间均数两两比较采用*LSD*检验,LDH的数据由于方差不齐采用Dunnett's T3检验,检验水准$\alpha = 0.05$(双侧)。

2　结　果

2.1　一般体征　$PM_{2.5}$模型组大鼠染毒后活动减少,营养素组大鼠活动状态增加。所有组别的大鼠体重及增重无差异。

2.2　肺组织形态学改变　各组大鼠肺组织病理形态如图1所示。空白组:肺泡结构完整,肺泡间隔正常,未见出血、炎性浸润;$PM_{2.5}$模型组:肺泡结构严重破坏,肺泡间隔增厚,可见大量坏死组织碎片、炎性细胞、细颗粒物及充血。低剂量营养素+$PM_{2.5}$组:肺泡间隔较厚,小部分肺泡结构可以识别,可见少量坏死组织碎片、炎性细胞和细颗粒物。高剂量营养素+ $PM_{2.5}$组:肺泡间隔轻微增厚,肺泡结构可以识别,无坏死脱落的组织碎片,少量炎性细胞浸润及充血。

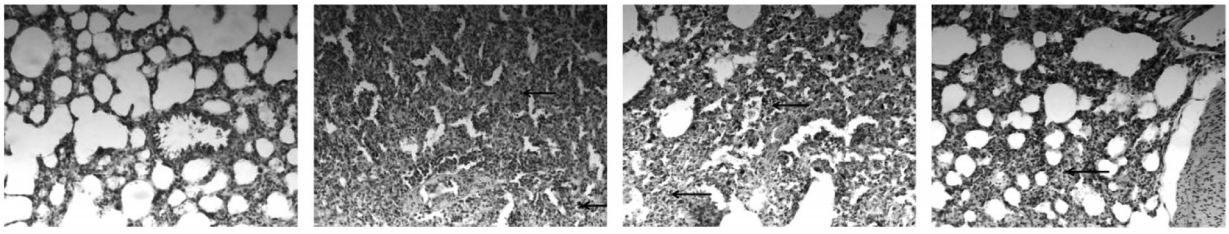
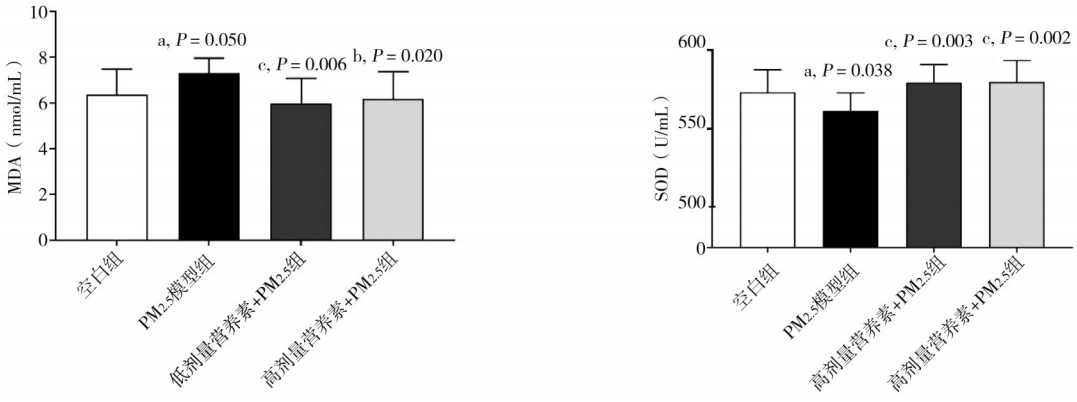


图1　各组大鼠肺组织病理形态学改变(×200)

2.3　对肺损伤大鼠氧化应激损伤指标的影响　4组大鼠血清中MDA($F = 3.294$)、SOD($F = 4.705$)组间均数比较差异均有统计学意义($P < 0.05$或$P < 0.01$)。与空白组比较,$PM_{2.5}$模型组的MDA含量增加、SOD活力降低(均$P < 0.05$)。与$PM_{2.5}$模型组比较,低、高剂量营养素+$PM_{2.5}$组MDA含量降低($P < 0.01$或$P < 0.05$)、SOD活力升高(均$P < 0.01$)。见图2。

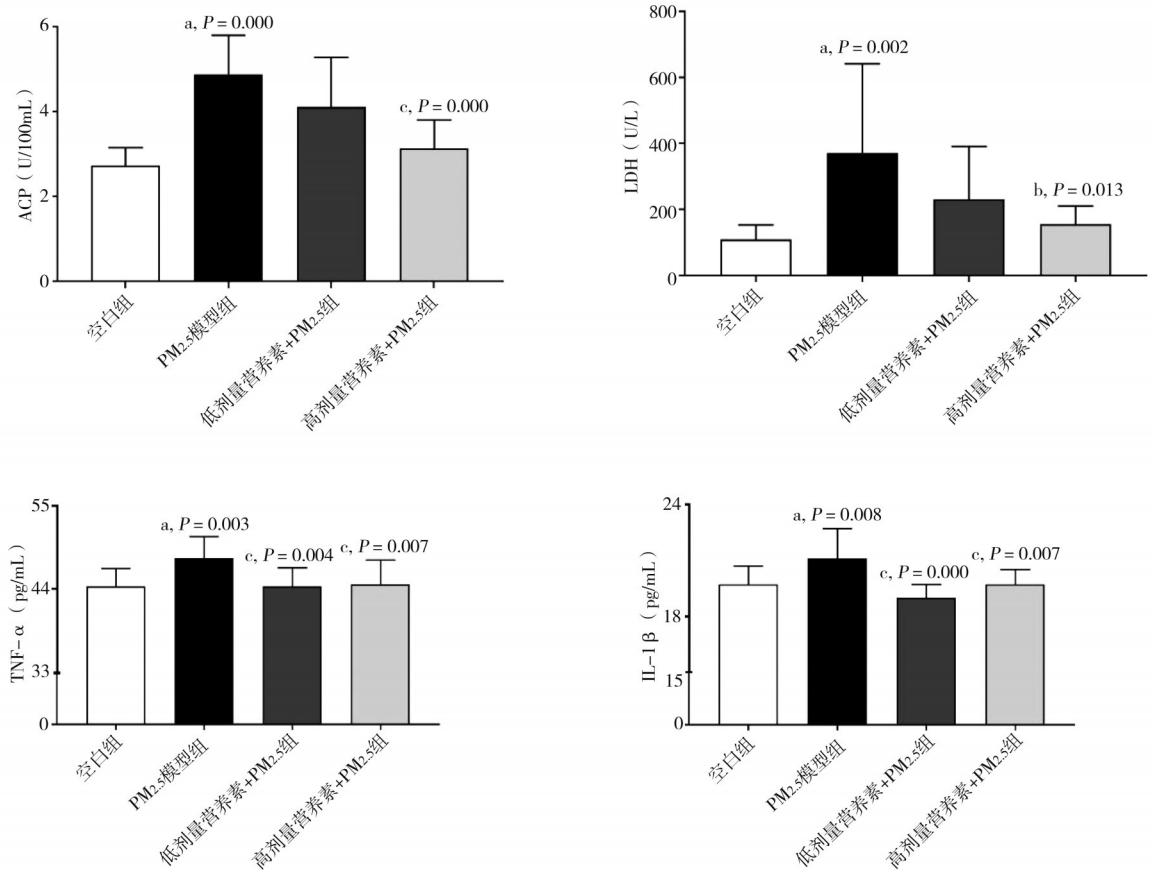


注:[a]与空白组比较;[b,c]与$PM_{2.5}$模型组比较。

图2　各组大鼠血清MDA、SOD水平($\bar{x} \pm s$)

2.4　对肺损伤大鼠炎性损伤指标的影响　4组大鼠BALF中ACP（$F = 12.766$）和LDH（$F = 5.072$）组间均数比较差异均有统计学意义（均$P < 0.01$）。与空白组比较，$PM_{2.5}$模型组的ACP、LDH水平提高（均$P < 0.01$）。与$PM_{2.5}$模型组比较，高剂量营养素+$PM_{2.5}$组的ACP（$P < 0.01$）、LDH（$P < 0.05$）水平均降低，低剂量营养素+$PM_{2.5}$组的ACP、LDH水平差异无统计学意义（均$P > 0.05$）。见图3。

4组大鼠肺组织匀浆中TNF-α（$F = 4.649$）和IL-1β（$F = 6.161$）组间均数比较差异均有统计学意义（均$P < 0.01$）：与空白组比较，$PM_{2.5}$模型组的TNF-α、IL-1β含量提高（均$P < 0.01$）。与$PM_{2.5}$模型组比较，低、高剂量营养素+$PM_{2.5}$组的TNF-α、IL-1β含量降低（均$P < 0.01$），见图3。



注：[a]与空白组比较，[b,c]与$PM_{2.5}$模型组比较。

图3　各组大鼠肺泡灌洗液LDH和ACP肺组织TNF-α、IL-1β水平（$\bar{x} \pm s$）

3　讨　论

$PM_{2.5}$急性暴露与各种呼吸系统疾病的发病及死亡密切相关，可诱发或加重肺炎、肺纤维化、支气管炎、慢阻肺、肺癌等肺部疾病[9]。因此理清$PM_{2.5}$的呼吸系统损伤机制，并找到明确能干预肺损伤的营养素具有重要意义。

多项研究表明氧化应激和炎症损伤是$PM_{2.5}$急性肺损伤的核心机制[10]。$PM_{2.5}$能刺激细胞产生大量活性氧，干扰SOD表达并引起脂质过氧化的代谢终产物MDA增加[11]。本研究发现，与空白组相比，$PM_{2.5}$模型组中血清SOD活力降低，MDA含量增加，说明气管滴注$PM_{2.5}$成功引起了大鼠急性氧化应激损伤。营养素干预后，大鼠SOD活力升高、MDA含量降低，推测该复合营养素能抗氧化并减轻$PM_{2.5}$导致的氧化损伤。

$PM_{2.5}$破坏呼吸系统气道粘膜纤毛屏障，沉积并刺激血管内皮细胞、支气管和肺泡上皮细胞、巨噬细胞释放大量炎性因子如TNF-α、IL-1β[12]。当$PM_{2.5}$损伤肺部细胞膜并改变肺通透性，ACP和LDH会大量溢出胞外。ACP水平升高提示巨噬细胞参与肺免疫防御，LDH是细胞膜损伤的早期敏感指标，是细胞毒性标志物[13]。本研究发现，与空白组相比，$PM_{2.5}$模型组大鼠肺匀浆中TNF-α、IL-1β和BALF中ACP、LDH水平均升高，表明$PM_{2.5}$引起大鼠急性肺部炎症及毒性作用。经营养素干预后，营养

素组的TNF-α、IL-1β含量均降低，高剂量营养素组ACP、LDH水平均降低。低剂量营养素组ACP、LDH无显著差异。此结果提示，减轻$PM_{2.5}$所致急性肺部炎性损伤的效果大小与剂量有关，高剂量营养素效果更显著。肺病理形态学结果同样显示高剂量营养素干预对$PM_{2.5}$诱发的肺泡间隔增厚、肺泡结构破损、炎性细胞浸润等有减轻作用。

随着大众健康保健意识逐渐提升，找到能预防和减轻$PM_{2.5}$肺损伤的营养素引起学者的广泛关注。某复合营养素主要成分为维生素C、维生素E、N-乙酰半胱氨酸、西兰花籽、柑橘及牛初乳提取物，以上成分均有相关文献支持能改善肺损伤。韩书芝等[14]发现维生素C能通过下调$PM_{2.5}$染毒大鼠肺组织的Nrf2/HO-1信号通路，减轻氧化损伤。李莉珊等[15]发现维生素E能改善$PM_{2.5}$所致呼吸道上皮屏障功能障碍，减少IL-1β、TNF-α等炎性因子。Fen等[16]发现N-乙酰半胱氨酸可拮抗$PM_{2.5}$致大鼠肺MAPK通路蛋白活化并保护支气管上皮细胞。Zhou等[17]发现柑橘提取物含黄酮类化合物和花青素，可改善肺泡炎症和肺纤维化程度，并抑制博莱霉素（bleomycin，BLM）诱导的基质TIMP-1（matrix-metalloproteinase inhibitor）的表达。Abdull等[18]发现西蓝花籽中硫代葡萄糖苷可以调节大鼠致肺癌代谢酶系统活性，产生持续的长效抗氧化作用。Xu等[19]发现牛初乳能抑制人呼吸道合胞病毒，增强$CD8^+$T细胞应答，降低病毒载量。

本研究先用复合营养素灌胃大鼠14 d，从第15天起，照常灌胃后用$PM_{2.5}$进行气管滴注染毒，探索复合营养素对于大鼠急性肺部氧化应激和炎性损伤的干预效果。结果表明该复合营养素通过减轻氧化应激和炎症损伤，对$PM_{2.5}$所致大鼠肺损伤具有一定的保护作用。考虑复合营养素功效成分较多，各种成分之间的相互影响机制及成分配比有待进一步研究，为未来开发预防$PM_{2.5}$肺损伤的功能食品提供更多理论依据。

参考文献

[1] Lim CH, Ryu J, Choi Y, et al. Understanding global $PM_{2.5}$ concentrations and their drivers in recent decades (1998-2016)[J]. Environ Int, 2020,144:106011.

[2] 樊乃根. $PM_{2.5}$对人体健康影响的研究进展[J]. 中国城乡企业卫生, 2018,33(3):55-56.

[3] 吕静，陶文沂，程景才，等. 十字花科蔬菜提取物抗肿瘤作用的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2007(4):105-109.

[4] 韩书芝，李海月，张凤蕊，等. 维生素C对$PM_{2.5}$染毒大鼠肺组织氧化损伤的影响[J]. 中国老年学杂志, 2021,41(19):4373-4377.

[5] 李航. $PM_{2.5}$对大鼠肺脏的毒性效应及鱼油和维生素E的干预作用[D]. 新乡：新乡医学院, 2017.

[6] 郭淼，闫鹏，韩国鑫，等. N-乙酰半胱氨酸对$PM_{2.5}$致支气管上皮细胞损伤的保护作用体外实验[J]. 解放军医学院学报, 2021,42(1):99-103.

[7] Wang Z, Feng F, He H, et al. Citrus alkaline extracts prevent endoplasmic reticulum stress in type II alveolar epithelial cells to ameliorate pulmonary fibrosis via the ATF3/PINK1 pathway[J]. Phytomedicine, 2021,89:153599.

[8] Jones AW, March DS, Curtis F, et al. Bovine colostrum supplementation and upper respiratory symptoms during exercise training: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials[J]. BMC Sports Sci Med Rehabil, 2016,8(1):21.

[9] Sese L, Jeny F, Uzunhan Y, et al. The effect of air pollution in diffuse interstitial lung disease[J]. Revue Des Maladies Respiratoires, 2020,37(5):389-398.

[10] 邓翔，张星亮，张玲莉，等. $PM_{2.5}$及其对肺组织损伤的研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019,34(23):1828-1830.

[11] 段肖肖，刘思秀. $PM_{2.5}$致病机制的研究进展[J]. 复旦学报(医学版), 2020,47(4):605-614.

[12] 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):20167-20176.

[13] Shan X, Liu L, Li G, et al. $PM_{2.5}$ and the typical components cause organelle damage, apoptosis and necrosis: Role of reactive oxygen species[J]. Sci Total Environ, 2021,782:146785.

[14] 韩书芝，李海月，尹航，等. $PM_{2.5}$对大鼠肺组织Nrf2/HO-1通路的影响及维生素C的干预作用[J]. 国际呼吸杂志, 2020,40(21):1631-1635.

[15] 李莉珊，马琼锦，杨凌，等. 维生素E对$PM_{2.5}$急性染毒引起大鼠肺损伤的影响[J]. 营养学报，2016,38(3):256-260.

[16] Fen P, Qin C, Hua L, et al. Antagonistic effects of N-acetylcysteine on mitogen-activated protein kinase pathway activation, oxidative stress and inflammatory responses in rats with $PM_{2.5}$ induced lung [J]. Chin Med Sci J, 2019,34(4):270-276.

[17] Zhou XM, Huang MM, He CC, et al. Inhibitory effects of citrus extracts on the experimental pulmonary fibrosis[J]. J Ethnopharmacology, 2009,126(1):143-148.

[18] Abdull RA, Bagatta M, De Nicola GR, et al. Up-regulation of cytochrome P450 and phase II enzyme systems in rat precision-cut rat lung slices by the intact glucosinolates, glucoraphanin and glucoerucin[J]. Lung Cancer, 2011,71(3):298-305.

[19] Xu ML, Kim HJ, Wi GR, et al. The effect of dietary bovine colostrum on respiratory syncytial virus infection and immune responses following the infection in the mouse [J]. J Microbiol, 2015,53(9):661-666.

（收稿日期：2021-10-26）
（本文编辑：万东华，江金女）