

臭氧暴露生物标志物研究探讨

杨辉^{1,2*}, 徐莉^{2#}, 肖雪³, 胡爱荣¹

¹中部战区总医院, 湖北 武汉

²防化学院, 北京

³武汉晴川学院, 湖北 武汉

收稿日期: 2022年9月8日; 录用日期: 2022年9月30日; 发布日期: 2022年10月11日

摘要

臭氧(O₃)暴露可引起呼吸、心血管循环等组织或器官的损伤, 且伴随O₃暴露浓度升高、时间延长, 细胞凋亡率升高, 组织毒性不断增强。然而目前O₃致生物损伤的潜在分子机制还未能被充分认识。生物分子标志物以其高灵敏性、特异性和预警性等特点, 已成为在分子毒理学、预防医学、环境医学中研究的重要工具。本文通过综述探讨O₃生物毒性评价的生物标志物的主要类型, 及其在机体中的作用机制及其应用现状。O₃暴露致机体损伤的分子标志物可分为三类: 1) 炎症反应生物标志物, 包括炎症细胞(如巨噬细胞、白细胞)和炎症因子(如IL-1 β 、IFN- γ 、TNF- α)。2) 氧化应激生物标志物, 包括脂质过氧化生物标志物(如MDA、4HNE、iNOS)、抗氧化防御系统生物标志物(如GSH、HSP、Nrf2)。3) 细胞信号通路因子(如Nrf2、NF- κ B、TLR、MAPK)。生物标志物的连续监测可预防O₃致生物损伤的进一步发展, 并为O₃致生物损伤机制提供新的研究思路。

关键词

臭氧, 生物标志物, 细胞通路

Research on Biomarkers of Ozone Exposure

Hui Yang^{1,2*}, Li Xu^{2#}, Xue Xiao³, Airong Hu¹

¹General Hospital of Central Theater Command, Wuhan Hubei

²The Institute of NBC Defense, Beijing

³Wuhan Qingchuan University, Wuhan Hubei

Received: Sep. 8th, 2022; accepted: Sep. 30th, 2022; published: Oct. 11th, 2022

Abstract

Ozone (O₃) exposure can cause damage to tissues or organs such as respiration and cardiovascular

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 杨辉, 徐莉, 肖雪, 胡爱荣. 臭氧暴露生物标志物研究探讨[J]. 生物医学, 2022, 12(4): 266-270.

DOI: 10.12677/hjbm.2022.124032

circulation, and with the increase of O_3 exposure concentration and time, the apoptosis rate increases, and the tissue toxicity continues to increase. However, the underlying molecular mechanism of O_3 -induced biological damage has not been fully understood. Biomarkers have become an important tool in molecular toxicology, preventive medicine and environmental medicine because of their high sensitivity, specificity and early warning. This paper discusses the main types of biomarkers for O_3 biotoxicity evaluation, their mechanism of action in the body and their application status through a review. The molecular markers of body damage caused by O_3 exposure can be divided into three categories: 1) Inflammatory biomarkers, including inflammatory cells (e.g., macrophages, leukocytes) and inflammatory factors (e.g., $IL-1\beta$, $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$). 2) Oxidative stress biomarkers, including lipid peroxidation biomarkers (such as MDA, 4HNE, iNOS), and antioxidant defense system biomarkers (such as GSH, HSP, Nrf2). 3) Cell signaling pathway factors (such as Nrf2, $NF-\kappa B$, TLR, MAPK). Continuous monitoring of biomarkers can prevent the further development of O_3 -induced biological damage and provide new research ideas for the mechanism of O_3 -induced biological damage.

Keywords

Ozone, Biomarkers, Cellular Pathways

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

O_3 是大气污染中主要的二次污染物成分,也是光化学污染的主要组分,环境中的氮氧化物(nitrogen oxide, NO_x)和挥发性有机物(Volatile organic compounds, VOCs)在日光紫外线的作用下时,经过一系列光化学反应生成一种具有特殊臭味的呈淡蓝色的气体。自 2013 年我国实施《大气污染防治行动计划》以来,已经制定了一系列严格的污染物排放标准和污染的控制措施。以 $PM_{2.5}$ 为首要污染物的环境污染超标天数比例逐渐降低,空气重污染天数明显减少,蓝天天数明显增加[1]。然而,空气质量优良天数的比例却没有增长,甚至出现下降[2]。近年来我国空气环境的 O_3 污染问题凸显[3]。急性 O_3 暴露早期可诱发生物机体发生强烈氧化应激,引起细胞炎症反应和组织损伤。 O_3 对机体的危害最终是通过其与机体内各种生物分子相互作用实现的。因此,对与之相关的生物标记物的研究是完善 O_3 污染对机体损伤情况评价的一种简便、有效的方法。生物标志物不仅能够反映机体的状态,并且可以提供机体损伤的早期预警信号,可作为监测的重要方向,连续监测可做到早防早治,防止损伤的进一步发展。为探求新的疗法、新的药物筛选奠定基础,并为 O_3 致生物损伤的机制研究提供参考。本文对环境 O_3 毒性评价的生物标志物:炎症因子、氧化应激反应因子及细胞通路因子进行综述。

2. 炎症标志物

O_3 通过呼吸道进入肺循环后,使肺泡巨噬细胞积聚并激活,刺激组织产生一系列与炎症相关的因子,主要包括存在于肺泡灌洗液(BALF)和血液中的白细胞、中性粒细胞、嗜酸细胞、嗜碱细胞、白介素(IL)- 1β 、 IL -6、肿瘤坏死因子 α ($TNF-\alpha$)、干扰素 γ ($INF-\gamma$)、巨噬细胞炎症蛋白 1α ($MIP-1\alpha$)等,最后导致肺和机体的炎症损伤[4]。已有大量的实验将炎症细胞和炎症因子作为生物标志物对 O_3 的生物损伤机制和危害效应进行研究。

2.1. 炎症细胞

O₃ 能对气道上皮产生明显的氧化损伤作用, 促使上皮细胞合成和分泌大量的炎症细胞及炎症因子。陈庆梓[5] O₃ 暴露小鼠检查肺泡灌洗液(BALF)中白细胞总数、巨噬细胞数、淋巴细胞数和中性粒细胞数较对照组小鼠均显著增多。O₃ 暴露导致支气管哮喘大鼠肺功能下降, 同时 BALF 中炎症细胞增多[5]。有研究者认为, BALF 中的白细胞总数是反映炎症损伤程度的标志[6], Wagner [7]等人也证实了 O₃ 引起肺的损伤更多的是中性粒细胞炎症。

由于血液标本的获取更加便利以及血常规检测的普及, 炎症细胞作为 O₃ 氧化应激标志物已经有了一定的实用意义, 所以炎症细胞检测在医疗中的作用广泛。但炎症细胞的表达对组织、器官的敏感性、特异性较低, 而且炎症细胞在低浓度 O₃ 暴露和 O₃ 暴露早期不能够反映机体的损伤情况。

2.2. 炎症因子

在 O₃ 暴露后, 多种炎症因子的含量发生明显的变化, 如 IL-1、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、INF 等, 提示这些炎症因子参与 O₃ 暴露损伤发生过程。这些炎症因子在 O₃ 急性期明显增多, 加重炎症反应, 通过激活细胞凋亡和抑制细胞再生, 进而导致机体各种代谢异常和功能损害。梁婷婷[8]将大鼠暴露 O₃ 后, 血浆中的炎症因子 IL-6、CRP、可溶性细胞间粘附因子-1 (sICAM-1)、TNF- α 升高。Backus [9]等将小鼠暴露于 O₃ 气体, 可引起小鼠的 BALF 内的 TNF α 、IL-1 β 、IL-6 和 MIP-1 α 等炎症因子含量升高。Hu [10] 低剂量 O₃ 暴露对 53 名志愿者进行暴露研究, 在不同场景和暴露时间发现, 血液中炎症因子 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-17A、IFN- γ 和 TNF- α 含量发生显著改变, 且具有统计学意义。

3. 氧化应激生物标志物

3.1. 脂质过氧化生物标志物

O₃ 通过呼吸道吸入和皮肤接触进入等方式进入生物体内, 诱发机体发生氧化应激(ROS 或 RNS 的过量表达), ROS 与生物膜的磷脂、膜受体相关的多不饱和脂肪酸的侧链及核酸等大分子物质, 发生脂质过氧化反应形成脂质过氧化产物如丙二醛(MDA)和 4-羟基壬烯酸(4-HNE)等, 从而使细胞膜的流动性和通透性发生改变, 最终导致细胞结构和功能的改变。MDA 被认为是反映机体脂质过氧化的生物标志物, 可间接反映细胞受自由基损伤的程度, 因此可通过测定其了解膜脂质过氧化的程度, 以间接测定膜系统受损程度。MDA 作为脂质过氧化的稳定产物, O₃ 通过降低 GSH 和增加 MDA 来加剧氧化损伤, 已被普遍用作全体的生物标志物。Li [11]等人将 8~10 周 C57BL/6 鼠 2.5 ppm 浓度 O₃ 暴露 3 h, 实验结果为, O₃ 暴露组小鼠肺组织匀浆 MDA 水平明显升高, 谷胱甘肽/谷胱甘肽水平降低。肺组织 MDA 含量的上升、GSH 含量的下降, 表明小鼠肺部氧化还原平衡被打破, 造成了明显的氧化损伤。Perepu [12]将缺血再灌注模型的大鼠暴露于 0.8 ppm O₃ 中, 暴露 O₃ 的缺血再灌注心肌中 MDA 水平明显增加, 引起心肌细胞的凋亡。4-HNE 被认为是氧化应激的标志物, 在介导各种信号通路中发挥重要作用[13]。4-HNE 水平过高的后果是包括蛋白质和 DNA 加合物的形成, 导致 DNA 损伤、线粒体功能障碍和细胞凋亡。而 4-HNE 蛋白加合物被认为是脂质过氧化和蛋白质氧化损伤的标志。Pecorelli [14]将人表皮细胞暴露在 0.4 ppm O₃ 中, 暴露上皮细胞中 4-HNE 加合物显著高于对照组。Connor [15]将 C3H/HeOuJ 小鼠急性暴露于 O₃ (0.8 ppm, 3 h) 后, FBAL 中的 4-羟基壬烯醛修饰蛋白水平升高。

3.2. 抗氧化损伤生物标志物

自由基将刺激机体产生一系列抗氧化的酶类物质, 如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢酶(CAT)等, 从而抵御 O₃ 引起的氧化损伤, 维护组织和器官正常功能。王科霖[16]将人呼吸道上皮

细胞暴露于 O₃ 实验中,发现与对照组(无菌空气)相比 O₃ 暴露组的呼吸道上皮细胞内 GSH/GSSG 值降低,而 SOD 活力升高,表明 O₃ 能对呼吸道上皮细胞造成氧化损伤,改变细胞内的氧化还原状态。热休克蛋白(HSP)通常被认为是细胞内的蛋白质,具有抵御感染和细胞应激的保护功能,作为分子伴侣促进蛋白质折叠。这些分子伴侣可调节细胞内稳态,促进细胞存活,并影响细胞凋亡。本实验组已得出低浓度 O₃ 对酵母细胞线粒体损伤早于细胞核, HSP60、HSP70 的表达量与 O₃ 暴露浓度呈现出时间累积效应。

4. 细胞信号通路因子

细胞信号通路因子包括膜受体、细胞内激酶和磷酸酶,以及调节炎症基因的转录因子等。机体有着复杂而且严密的信号通路机制,在细胞周期、生长、凋亡和细胞应激等多种生理和病理过程中起重要作用,维持机体的稳定。在 O₃ 暴露损伤中能够作为生物标志的信号通路因子有 Toll 受体(TLR)、促分裂素原活化蛋白激酶(MAPK)、核因子- κ B (NF- κ B)信号通路、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)等。Rivas [17]在 O₃ 暴露大鼠实验中, NF- κ B 因子在 30 天时血清检测达到最高。Connor 等[15]使用 TLR4 突变的 C3H/HeJ 小鼠进行 O₃ 暴露研究,实验结果表明功能性 TLR4 有助于 O₃ 诱导的无菌炎症和巨噬细胞的激活,并在 C3H/HeOuJ 对照组小鼠的肺泡巨噬细胞中,观察到吸入 O₃ 后 NF- κ B 活性随时间的增加。O₃ 暴露可以激活正常小鼠气道平滑肌中的 p38MAPK 活性,Church [18]等将雄性,10~14 周龄 MKP-1^{-/-}小鼠,暴露在 3 ppm 浓度 O₃,实验发现,抑制 p38MAPK 信号通路的活化可以减少 IL-6 的分泌,减轻甚至逆转肺血管重塑。在 p38MAPK 激活之后是 MAPK 激活蛋白激酶-2 (MK2)的下游激活,这反过来导致热休克蛋白(HSP)27 的磷酸化。p38MAPK 被炎症细胞因子和细胞应激(包括氧化应激)激活,参与细胞增殖、凋亡和炎症等细胞过程,并引起气道平滑肌(ASM)收缩反应。已有报道,p38MAPK 通路参与 O₃ 诱导的正常小鼠 AHR 和肺部炎症,对哮喘恶化的影响起着重要作用[19]。

5. 展望

O₃ 毒性作用机制中,主要通过诱导细胞产生氧化应激和炎症反应、信号通路改变等途径来致病,涉及多种分子机制。虽然,已经证明暴露于高浓度 O₃ 中可以引起氧化应激和炎症反应,但是具体的致病机制及病因并不完全明确。特别是细胞信号通路作为细胞对外界刺激的感受器、信号接收器,并激活细胞内一系列的生物化学反应,长时间过度刺激后导致炎症和氧化应激,最终导致细胞凋亡或遗传毒性[20]。目前研究通常停留在 O₃ 暴露导致的有害因子的异常,某单一细胞信号通路途径所致,很少涉及多个信号通路的协调关系。今后的研究把明确各炎症因子与相关多个信号通路的调控机制相结合,为进一步深入探究 O₃ 与疾病的发生途径以及分子机制。有助于预防和控制 O₃ 污染的防范及相关疾病的发生和恶化。

基金项目

国家重点研发计划项目(2017YC021280402)。

参考文献

- [1] 生态环境部. 中国空气质量改善报告(2013-2018 年) [R]. 北京: 生态环境部, 2019: 1-5.
- [2] Qu, Y.W., Wang, T.J., Cai, Y.F., Wang, S.K., Chen, P.L., *et al.* (2018) Influence of Atmospheric Particulate Matter on Ozone in Nanjing, China: Observational Study and Mechanistic Analysis. *Advances in Atmospheric Sciences*, **35**, 1381-1395. <https://doi.org/10.1007/s00376-018-8027-4>
- [3] Li, K., Jacob, D.J., Liao, H., Shen, L., Zhang, Q. and Bates, K.H. (2018) Anthropogenic Drivers of 2013-2017 Trends in Summer Surface Ozone in China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **116**, 422-427. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812168116>
- [4] Alexis, N.E., Lay, J.C., Hazucha, M., Hazucha, M., Harris, B., Hernandez, M.L., *et al.* (2010) Low-Level Ozone Exposure Induces Airways Inflammation and Modifies Cell Surface Phenotypes in Healthy Humans. *Inhalation Toxicol-*

- ogy, **22**, 593-600. <https://doi.org/10.3109/08958371003596587>
- [5] 陈庆梓, 扶招弟, 周玉波, 周丽芬, 杨春涛, 李建华. N-乙酰半胱氨酸减轻 O₃ 所致的小鼠肺部炎症反应[J]. 生理学报, 2016, 68(6): 767-774.
- [6] Servais, S., Boussouar, A., Molnar, A., Douki, T., Pequignot, J.M. and Favier, R. (2005) Age-Related Sensitivity to Lung Oxidative Stress during Ozone Exposure. *Free Radical Research*, **39**, 305-316. <https://doi.org/10.1080/10715760400011098>
- [7] Wagner, J.G., Harkema, J.R., Jiang, Q., Illek, B., Ames, B.N. and Peden, D.B. (2009) γ -Tocopherol Attenuates Ozone-induced Exacerbation of Allergic Rhinosinusitis in Rats. *Toxicologic Pathology*, **37**, 481-491. <https://doi.org/10.1177/0192623309335630>
- [8] 梁婷婷, 牛静萍, 张书余, 周骥. 高温热浪与 O₃ 交互作用对高血压大鼠影响的实验研究[J]. 科学技术与工程, 2018, 18(24): 44-51.
- [9] Backus, G.S., Howden, R., Fostel, J., Bauer, A.K., Cho, H.Y., Marzec, J., et al. (2010) Protective Role of Interleukin -10 in Ozone Induced Pulmonary Inflammation. *Environmental Health Perspectives*, **118**, 1721-1727. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002182>
- [10] Hu, X.Y., He, L.C., Zhang, J.F., Qiu, X.H., Zhang, Y.P., Mo, J.H., et al. (2020) Inflammatory and Oxidative Stress Responses of Healthy Adults to Change in Personal Air Pollutant Exposure. *Environmental Pollution*, **263**, Article ID: 114503. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114503>
- [11] Li, C.F., Zhang, H., Wei, L.Y., Liu, Q., Xie, M.Q., Weng, J.L., et al. (2022) Role of TRPA1/TRPV1 in Acute Ozone Exposure Induced Murine Model of Airway Inflammation and Bronchial Hyperresponsiveness. *Journal of Thoracic Disease*, **14**, 2698-2711. <https://doi.org/10.21037/jtd-22-315>
- [12] Perepu, R.S.P., Garcia, C., Dostal, D. and Sethi, R. (2010) Enhanced Death Signaling in Ozone-Exposed Ischemic-Reperfused Hearts. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **336**, 55-64. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0265-4>
- [13] Aquilano, K., Baldelli, S. and Ciriolo, M.R. (2014) Glutathione: New Roles in Redox Signaling for an Old Antioxidant. *Frontiers in Pharmacology*, **5**, Article No. 196. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00196>
- [14] Pecorelli, A., McDaniel, D.H., Wortzman, M. and Nelson, D.B. (2020) Protective Effects of a Comprehensive Topical Antioxidant against Ozone-Induced Damage in a Reconstructed Human Skin Model. *Archives of Dermatological Research*, **313**, 139-146. <https://doi.org/10.1007/s00403-020-02083-0>
- [15] Connor, A.J., Laskin, J.D. and Laskin, D.L. (2012) Ozone-Induced Lung Injury and Sterile Inflammation. Role of Toll-Like Receptor 4. *Experimental and Molecular Pathology*, **92**, 229-235. <https://doi.org/10.1016/j.vexmp.2012.01.004>
- [16] 王科霖, 管东波, 宋宏. 呼吸上皮细胞在臭氧气液界面暴露后的氧化损伤效应研究[J]. 环境与健康杂志, 2011, 28(5): 397-400+471.
- [17] Rivas-Arancibia, S., Zimbron, L.F.H., Rodriguez-Martinez, E., Maldonado, P.D., Perez, G.B. and Sepulveda-Parada, M. (2015) Oxidative Stress-Dependent Changes in Immune Responses and Cell Death in the Substantia Nigra after Ozone Exposure in Rat. *Frontiers in Aging Neuroscience*, **7**, Article No. 65. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00065>
- [18] Church, A.C., Martin, D.H., Wadsworth, R., Bryson, G., Fisher, A.J., Welsh, D.J. and Peacock, A.J. (2015) The Reversal of Pulmonary Vascular Remodeling through Inhibition of p38 MAPK-Alpha: A Potential Novel Anti-Inflammatory Strategy in Pulmonary Hypertension. *American Journal of Physiology—Lung Cellular and Molecular Physiology*, **309**, L333-L347. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00038.2015>
- [19] Li, F., Zhang, M., Hussain, F., Triantaphyllopoulos, K., Clark, A.R., Bhavsar, P.K., et al. (2011) Inhibition of p38 MAPK-Dependent Bronchial Contraction after Ozone by Corticosteroids. *European Respiratory Journal*, **3**, 933-942. <https://doi.org/10.1183/09031936.00021110>
- [20] Longhin, E., Holme, J.A., Gutzkow, K.B., Arlt, V.M., Kucab, J.E., Camatini, M. and Gualtieri, M. (2013) Cell Cycle Alterations Induced by Urban PM_{2.5} in Bronchial Epithelial Cells: Characterization of the Process and Possible Mechanisms Involved. *Particle and Fibre Toxicology*, **10**, Article No. 63. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-63>