

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.22.002

PM2.5 对人角膜上皮细胞屏障功能、氧化应激反应以及自噬的影响*

刘莹^{1#} 张婕^{2#} 刘小毛³ 陈宁宁³ 刘甜³ 解辽琦³ 赵吉飞^{3Δ}

(1 咸阳市第一人民医院眼底内科 陕西 咸阳 712000; 2 空军军医大学第二附属医院眼科 陕西 西安 710032;

3 咸阳市第一人民医院眼底外一科 陕西 咸阳 712000)

摘要 目的:探讨 PM2.5 对人角膜上皮细胞屏障功能、氧化应激反应以及自噬的影响及其分子机制。**方法:**以不同浓度 PM2.5 处理人角膜上皮细胞(HCEC)24 h,采用 CCK8 检测细胞增殖,荧光标记法检测细胞内活性氧(ROS)水平,ELISA 试剂盒检测 IL-6、IL-8 和 TNF- α 的含量;采用跨膜电阻实验 (TEER) 检测细胞的 TEER 变化,Western blot 检测 Beclin1、LC3 II/I、Claudin1、Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平。再将 HCEC 细胞分为对照组、PM2.5 组、NAC 组和 PM2.5+NAC 组,所有组细胞培养 24 h,后续进行细胞增殖水平、ROS、炎症因子、跨膜电阻值和 Western blot 检测。**结果:**与 0 $\mu\text{g/mL}$ 比较,40 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 、160 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 PM2.5 处理的 HCEC 细胞相对增殖水平、TEER 值和 Claudin1、ZO-1 和 Occludin 水平均降低 ($P<0.05$),上清液中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平均升高 ($P<0.05$),HCEC 细胞内 ROS 水平、Beclin-1 和 LC3 II/I 蛋白水平均升高 ($P<0.05$)。与 PM2.5 组比较,PM2.5+NAC 组 HCEC 细胞相对增殖水平、TEER 值和 Claudin1、ZO-1 和 Occludin 水平均升高 ($P<0.05$),上清液中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平均降低 ($P<0.05$),HCEC 细胞内 ROS 水平、Beclin-1 和 LC3 II/I 蛋白水平均降低 ($P<0.05$)。与 NAC 组比较,PM2.5+NAC 组 HCEC 细胞相对增殖水平、TEER 值和 Claudin1、ZO-1 和 Occludin 水平均降低 ($P<0.05$),上清液中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平均升高 ($P<0.05$),HCEC 细胞内 ROS 相对水平、Beclin-1 和 LC3 II/I 蛋白水平均升高 ($P<0.05$)。**结论:**PM2.5 通过诱导炎症和氧化应激反应的产生,破坏人角膜上皮细胞的屏障功能,并促进细胞自噬。

关键词:PM2.5;人角膜上皮细胞;屏障功能;氧化应激反应;细胞自噬

中图分类号:R772.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)22-4207-07

Effects of PM2.5 on Barrier Function, Oxidative Stress Response and Autophagy of Human Corneal Epithelial Cell*

LIU Xuan^{1#}, ZHANG Jie^{2#}, LIU Xiao-mao³, CHEN Ning-ning³, LIU Tian³, XIE Liao-qi³, ZHAO Ji-fei^{3Δ}

(1 Department of Ophthalmofundus Medicine, The First People's Hospital of Xianyang, Xianyang, Shaanxi, 712000, China;

2 Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 Department of fundus surgery, The First People's Hospital of Xianyang, Xianyang, Shaanxi, 712000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of PM2.5 on barrier function, oxidative stress response and autophagy of human corneal epithelial cell and its molecular mechanism. **Methods:** Human corneal epithelial cells (HCEC) were treated with different concentrations of PM2.5 for 24 h. The cell proliferation level was detected by CCK8. Intracellular reactive oxygen species (ROS) were detected by fluorescent labeling. The levels of IL-6, IL-8 and TNF- α were detected by ELISA kit. The changes of TEER in HCEC cells were detected by transmembrane resistance assay (TEER). The protein expression levels of Beclin1, LC3 II/I, Claudin1, Occludin and ZO-1 were detected by Western blot. Then HCEC cells were divided into control group, PM2.5 group, NAC group and PM2.5+NAC group, and the cells of all groups were cultured for 24 h. Cell proliferation level, ROS, inflammatory factors, transmembrane resistance and Western blot were subsequently detected. **Results:** Compared with 0 $\mu\text{g/mL}$, the relative proliferation level, TEER value, and the levels of Claudin1, ZO-1 and Occludin protein of HCEC cells treated with 40 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, 160 $\mu\text{g/mL}$ and 200 $\mu\text{g/mL}$ PM2.5 were decreased ($P<0.05$), and the levels of IL-6, IL-8 and TNF- α in supernatant were increased ($P<0.05$). The level of ROS and the protein levels of Beclin-1 and LC3 II/I in HCEC cells were increased ($P<0.05$). Compared with the PM2.5 group, the relative proliferation level, TEER value, and the levels of Claudin1, ZO-1 and Occludin protein of HCEC cells in PM2.5+NAC group was increased ($P<0.05$), the levels of IL-6, IL-8 and TNF- α in supernatant were decreased ($P<0.05$), and the level of ROS and the protein levels of Beclin-1 and LC3 II/I in HCEC cells were decreased ($P<0.05$). Compared with the NAC group, the relative proliferation level, TEER value, and the lev-

* 基金项目:陕西省重点研发计划-国际科技合作计划项目(2022kw-43);咸阳市重点研发计划(L2022ZDYFSF038)

为共同第一作者

作者简介:刘莹,女,硕士,副院长,副主任医师,E-mail: DrFuhui@163.com

张婕,女,博士,副主任医师,副教授,硕士研究生导师,E-mail: jessicazhangjie@hotmail.com

Δ 通讯作者:赵吉飞,男,硕士,副主任医师,E-mail: 75558613@qq.com

(收稿日期:2024-04-22 接受日期:2024-05-16)

els of Claudin1, ZO-1 and Occludin protein of HCEC cells in PM2.5+NAC group was decreased ($P<0.05$), the levels of IL-6, IL-8 and TNF- α in supernatant were increased ($P<0.05$), and the level of ROS and the protein levels of Beclin-1 and LC3 II / I in HCEC cells were increased ($P<0.05$). **Conclusions:** PM2.5 damages the barrier function of human corneal epithelial cells and promotes autophagy by inducing inflammation and oxidative stress responses.

Key words: Particulate matter 2.5 (PM2.5); Human corneal epithelial cells (HCEC); Barrier function; Oxidative stress response; Autophagy

Chinese Library Classification(CLC): R772.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)22-4207-07

前言

大气颗粒物(Particulate matter, PM)中直径小于或等于 2.5 μm 的细颗粒物称为 PM2.5, 是空气中对人体健康危害最大的一类污染物^[1]。PM2.5 因其体积小, 特别容易穿过人体的防御系统, 直接损伤机体的组织和细胞^[2]。随着工业的发展, 大气中 PM2.5 含量日益增高, 已经严重危害人类健康, 特别是心血管、呼吸道和肺部疾病, 以及眼部相关疾病^[3-5]。

眼角膜上皮层直接与外界接触, 易受到损伤和感染^[6], 角膜上皮细胞在阻止病原体 and 微生物入侵中具有重要的作用^[7]。研究表明, 角膜上皮屏障功能异常是眼科疾病发生发展的基础^[8]。紧密连接蛋白是角膜上皮细胞屏障功能维持的重要分子, 其中封闭蛋白-1(Claudin-1)、闭合蛋白(Occludin)和闭锁小带蛋白(Zonula occludens protein 1, ZO-1)是细胞紧密连接功能的重要成员, 研究显示 Claudin-1、Occludin 和 ZO-1 的表达水平直接反映细胞的屏障功能^[9-11]。角膜受损通常会引发炎症并伴随氧化应激反应的发生, 而细胞内活性氧(Reactive oxygen species, ROS)水平的异常增高被认为是眼表疾病发生和发展的关键因素^[12]。最新研究显示细胞自噬可能与细胞紧密连接和屏障功能有关, 自噬通路相关蛋白 Beclin1 和 LC3 II / I 能够调节上皮紧密连接和屏障功能^[13]。PM2.5 作为诱发眼表疾病最主要的环境因子之一, 已被发现会诱导产生结膜充血和结膜水肿等眼表损伤^[14]。一项基于小鼠模型的研究证明 PM2.5 与小鼠角膜炎症和溃疡的发生密切相关^[15]; 也有研究表明 PM2.5 与角膜中抗氧化酶的增加和系统抗氧化活性的激活密切相关^[16]; 且 PM2.5 诱导的角膜上皮细胞损伤中被发现存在高水平的细胞自噬^[17], 但是具体的分子作用机制仍没有完全解析。本研究旨在探讨 PM2.5 对人角膜上皮细胞屏障功能、氧化应激反应以及自噬的影响, 并探讨可能的分子机制, 以期为临床眼科疾病的防治提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

人角膜上皮细胞系 HCEC(陕西省眼科医院眼底病研究所提供), 细颗粒物(PM2.5, ERM-CZ110)购自东莞市百顺生物科技有限公司。DMEM 培养液(美国 Sigma 公司), CCK-8 试剂盒(C0038, 上海碧云天生物技术股份有限公司), N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC, S0077, 上海碧云天生物技术股份有限公司), 活性氧检测试剂盒(ROS, S0033S, 上海碧云天生物技术股份有限公司), Artemis 阻抗谱/TEER 分析仪(美国 Loc-sense 公司), 一抗 Beclin1 (3738S)、LC3 II / I (4108S)、

Claudin1 (4933S)、Occludin (91131S) 和 ZO-1 (5406S)(美国 CST 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组及处理 人角膜上皮细胞(HCEC)采用含10%胎牛血清的 DMEM 培养液培养, 气相和温度培养条件 5% CO₂ 和 37℃。结合前期预实验结果, 本研究选择 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PM2.5 溶液浓度, 当细胞融合至 80%时, 分别加入终浓度为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PM2.5 溶液(每个浓度 3 个复孔), 于 5% CO₂ 和 37℃ 下培养 24 h 后检测细胞活力和活性氧水平。

PM2.5 浓度选择实验中发现 PM2.5 浓度为 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时适合诱导细胞损伤。将 HCEC 细胞分为 4 组: 对照组、PM2.5 组、NAC 组和 PM2.5+NAC 组, 其中 PM2.5 组细胞培养基中加入终浓度为 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PM2.5 溶液, NAC 组细胞培养基中加入终浓度为 5 $\mu\text{mmol}/\text{mL}$ 的抗氧化剂 NAC, PM2.5+NAC 组细胞先加入终浓度为 5 $\mu\text{mmol}/\text{mL}$ 的抗氧化剂 NAC 培养 1 h 后再加入终浓度为 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PM2.5 溶液, 对照组细胞培养基加入等体积 PBS 溶液, 所有组细胞于 5% CO₂ 和 37℃ 下培养 24 h, 后续进行细胞增殖水平、ROS、炎症因子、跨膜电阻值和 Western blot 检测。

1.2.2 CCK8 检测细胞增殖水平 如方法 1.2 所述给予相应处理 HCEC 细胞后继续培养 24 h, 然后每孔加入 10 μL 的 CCK8 工作液于细胞培养箱继续培养 2 h, 于酶标仪 450 nm 处测定吸光度(A450), 以 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PM2.5 或对照组的 A450 值为参照归一化处理各组 A450 值, 表示为相对细胞增殖水平。

1.2.3 荧光标记法检测细胞内活性氧水平 如方法 1.2 所述处理和培养后, 分别采用 0.25%胰酶消化离心收集细胞, PBS 漂洗 2 次, 加入终浓度为 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 DCFH-DA, 于 37℃ 下孵育处理 30 min, PBS 漂洗和再次重悬细胞, 采用激光共聚焦显微镜观察, 并采用荧光分光光度计检测 DCF 平均荧光强度, 以 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PM2.5 或对照组的荧光强度为参照归一化处理各组荧光强度, 表示为细胞内 ROS 相对水平。

1.2.4 ELISA 检测炎症因子水平 如方法 1.2 所述处理和培养后, 收集细胞培养液上清液, 通过离心后取上清, 采用 ELISA 试剂盒分别检测上清中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 的含量。

1.2.5 细胞跨膜电阻的测定 将处于对数生长期的 HECE 细胞按 4×10^5 个细胞/孔的密度接种于 Transwell 小室(孔径 0.4 μm), 已不接种细胞的 Transwell 小室作为空白对照。如方法 1.2 所述处理和培养细胞 24 h 后, 采用 Artemis 阻抗谱/TEER 分析仪测定各组细胞跨膜电阻值(Trans epithelial electrical resistance,

TEER),以空白对照 TEER 值为参照,按照公式计算细胞 TEER, $TEER = (\text{细胞组 TEER} - \text{空白对照 TEER}) \times \text{Transwell 小室面积}$ 。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达 收集如方法 1.2 所述处理和培养后的细胞,加入细胞裂解液处理并离心后收集细胞蛋白上清,使用 BCA 蛋白测定试剂盒对总蛋白进行蛋白定量,取蛋白(20 μg)加入电泳上样缓冲液,煮沸 5 min 后于 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,然后将蛋白转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入 1:1000 稀释的一抗 Beclin1、LC3 II / I、Claudin1、Occludin 和 ZO-1,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。第二天用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入 1:5000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG,室温孵育 1 h,洗涤后加入发光液显色,用 Bio-rad 凝胶成像系统拍照,用 Image J 软件进行蛋白灰度值分析,以 β -actin 作为参考蛋白。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,结果表示为平均值 \pm SD(标准偏差)。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),进一步两两比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PM_{2.5} 对 HCEC 细胞增殖的影响

CCK8 结果显示,不同浓度 PM_{2.5} 处理后相对细胞增殖水平差异具有统计学意义($F=193.43, P < 0.001$)(见图 1)。与 0 $\mu\text{g/mL}$ 比较,40 $\mu\text{g/mL}$ ($t=10.32, P < 0.0001$),80 $\mu\text{g/mL}$ ($t=13.10, P < 0.0001$),160 $\mu\text{g/mL}$ ($t=36.71, P < 0.0001$) 和 200 $\mu\text{g/mL}$ ($t=44.53, P < 0.0001$) 的 PM_{2.5} 处理的 HCEC 细胞相对增殖水

平均降低($P < 0.05$)。160 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 PM_{2.5} 处理的 HCEC 细胞相对增殖水平无显著性差异,后期实验均选择 160 $\mu\text{g/mL}$ 的 PM_{2.5} 浓度。

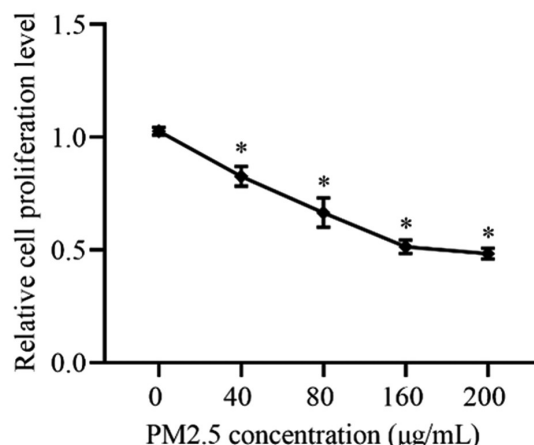


图 1 CCK8 检测 HCEC 细胞增殖水平

Fig.1 The proliferation level of HCEC cells was detected by CCK8

Note: Compared 0 $\mu\text{g/mL}$, * $P < 0.05$.

2.2 PM_{2.5} 对 HCEC 细胞炎症反应变化的影响

细胞上清液炎症因子检测结果显示,不同浓度 PM_{2.5} 处理后上清液中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平差异具有统计学意义($F=270.15, F=337.16, F=142.17, P < 0.0001$)。与 0 $\mu\text{g/mL}$ 比较,40 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 、160 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 PM_{2.5} 处理 HCEC 细胞后上清液中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平均升高($P < 0.05$)。见图 2。

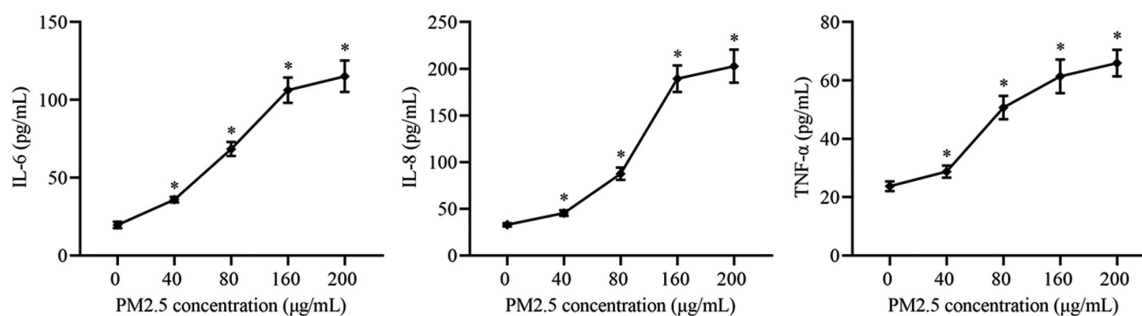


图 2 PM_{2.5} 对细胞炎症因子表达的影响

Fig.2 Effect of PM_{2.5} on the expression of cellular inflammatory factors

Note: Compared 0 $\mu\text{g/mL}$, * $P < 0.05$.

2.3 PM_{2.5} 对 HCEC 细胞内活性氧水平的影响

细胞内 ROS 检测结果显示,不同浓度 PM_{2.5} 处理后细胞内 ROS 相对水平差异具有统计学意义($F=423.10, P < 0.0001$)。与 0 $\mu\text{g/mL}$ 比较,40 $\mu\text{g/mL}$ ($t=17.00, P < 0.0001$),80 $\mu\text{g/mL}$ ($t=26.69, P < 0.0001$),160 $\mu\text{g/mL}$ ($t=28.69, P < 0.0001$) 和 200 $\mu\text{g/mL}$ ($t=33.56, P < 0.0001$) 的 PM_{2.5} 处理 HCEC 细胞内 ROS 相对水平均升高($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 PM_{2.5} 对 HCEC 细胞自噬蛋白表达的影响

不同浓度 PM_{2.5} 处理后,与 0 $\mu\text{g/mL}$ 比较,40 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 、160 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 PM_{2.5} 处理的 HCEC 细胞中

Beclin-1 和 LC3 II / I 蛋白相对表达量均升高($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 PM_{2.5} 对 HCEC 细胞屏障功能的影响

不同浓度 PM_{2.5} 处理后,与 0 $\mu\text{g/mL}$ 比较,40 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 、160 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 PM_{2.5} 处理的 HCEC 细胞中 Claudin1、ZO-1 和 Occludin 蛋白相对表达量均降低($P < 0.05$),HCEC 细胞 TEER 值均降低($P < 0.05$)。见图 5 和图 6。

2.6 NAC 对 PM_{2.5} 诱导的 HCEC 细胞增殖的影响

与对照组比较,PM_{2.5} 组 HCEC 细胞相对增殖水平降低($t=33.66, P < 0.05$);与 PM_{2.5} 组比较,PM_{2.5}+NAC 组 HCEC 细

胞相对增殖水平升高($t=10.02, P<0.05$);与 NAC 组比较,PM2.5+NAC 组 HCEC 细胞相对增殖水平降低($t=4.35, P<0.05$)。见图 7。

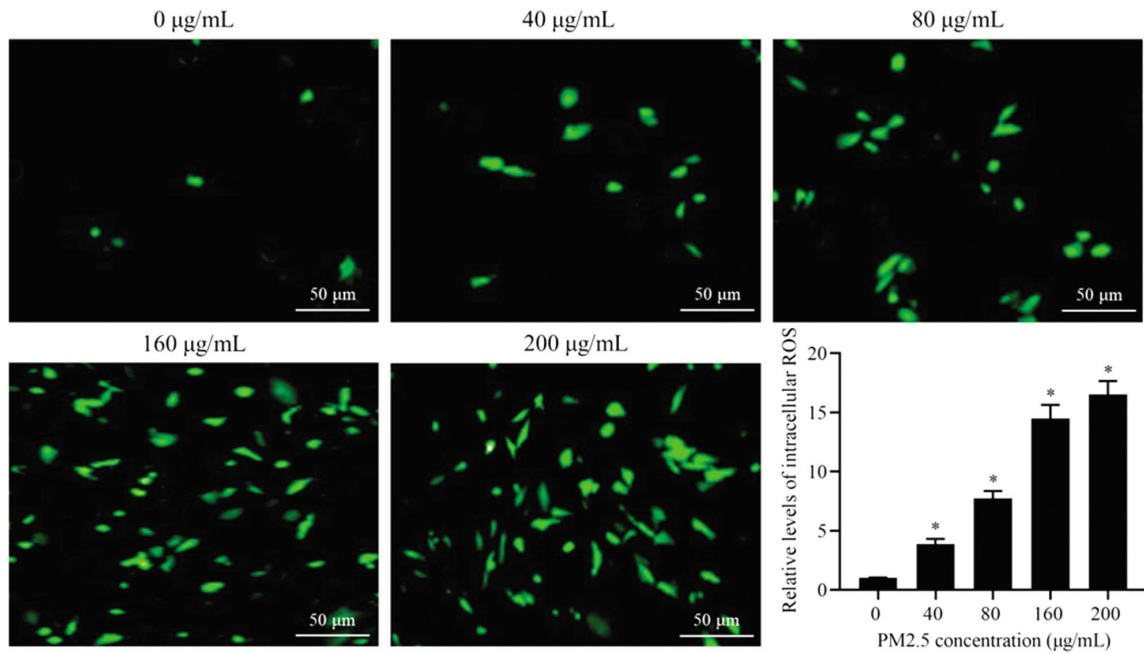


图 3 PM2.5 诱导对细胞内 ROS 生成的影响

Fig.3 Effect of PM2.5 induction on intracellular ROS production

Note: Compared 0 µg/mL, * $P<0.05$.

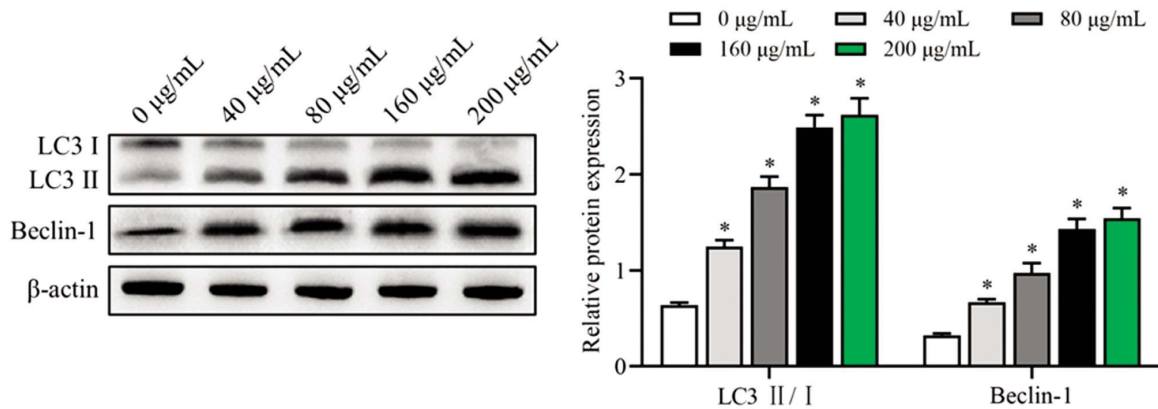


图 4 PM2.5 对细胞自噬蛋白(Beclin-1 和 LC3 II/I)表达的影响

Fig.4 Effect of PM2.5 on the expression of autophagy proteins (Beclin-1 and LC3 II/I)

Note: Compared 0 µg/mL, * $P<0.05$.

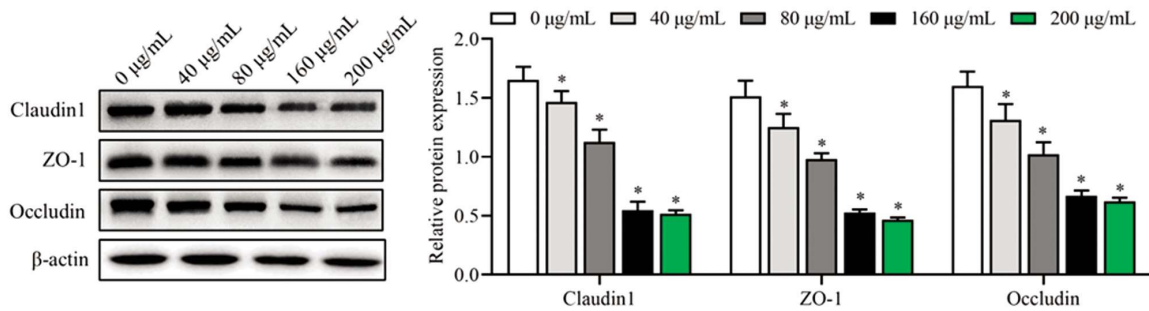


图 5 PM2.5 对细胞屏障标志蛋白(Claudin1、ZO-1 和 Occludin)表达的影响

Fig.5 Effect of PM2.5 on the expression of cell barrier marker proteins (Claudin1, ZO-1 and Occludin)

Note: Compared 0 µg/mL, * $P<0.05$.

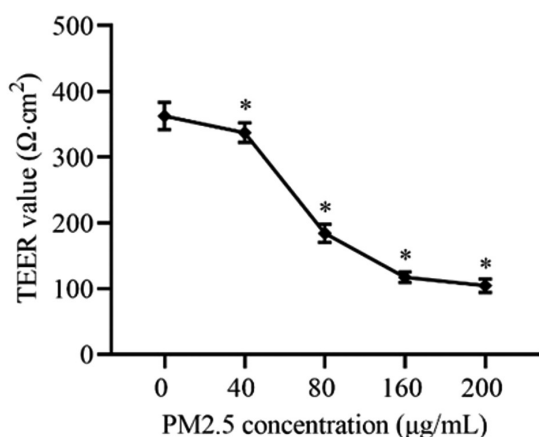


图6 PM2.5对HCEC细胞跨膜电阻值(TEER)的影响

Fig.6 Effect of PM2.5 on the TEER of HCEC cells

Note: Compared 0 μg/mL, **P*<0.05.

2.7 NAC对PM2.5诱导的HCEC细胞炎症反应变化的影响

与对照组比较,PM2.5组HCEC细胞上清液中IL-6、IL-8和TNF-α水平均升高(*P*<0.05);与PM2.5组比较,PM2.5+NAC组HCEC细胞上清液中IL-6、IL-8和TNF-α水平均降低(*P*<0.05);与NAC组比较,PM2.5+NAC组HCEC细胞上清液

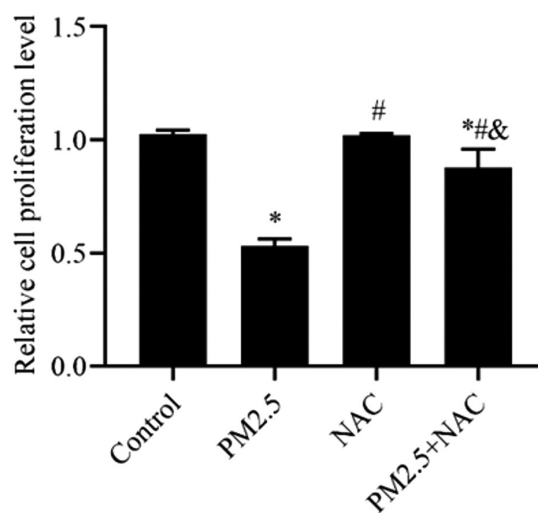


图7 CCK8检测HCEC细胞增殖水平

Fig.7 The proliferation level of HCEC cells was detected by CCK8

Note: Compared control group, **P*<0.05;

Compared PM2.5 group, #*P*<0.05; Compared NAC group, &*P*<0.05.

中IL-6、IL-8和TNF-α水平均升高(*P*<0.05)。见图8。

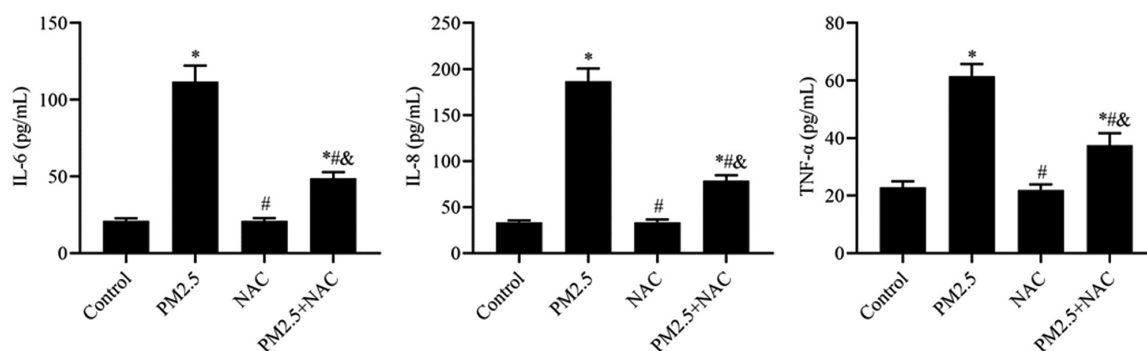


图8 NAC对PM2.5诱导的HCEC细胞炎症因子(IL-6、IL-8和TNF-α)表达的影响

Fig.8 Effect of NAC on the expression of PM2.5-induced inflammatory cytokines (IL-6, IL-8 and TNF-α) in HCEC cells

Note: Compared control group, **P*<0.05; Compared PM2.5 group, #*P*<0.05; Compared NAC group, &*P*<0.05.

2.8 NAC对PM2.5诱导的HCEC细胞内活性氧水平的影响

与对照组比较,PM2.5组HCEC细胞内ROS相对水平升高(*t*=29.56, *P*<0.05);与PM2.5组比较,PM2.5+NAC组HCEC

细胞内ROS相对水平降低(*t*=17.64, *P*<0.05);与NAC组比较,PM2.5+NAC组HCEC细胞内ROS相对水平升高(*t*=34.89, *P*<0.05)。见图9。

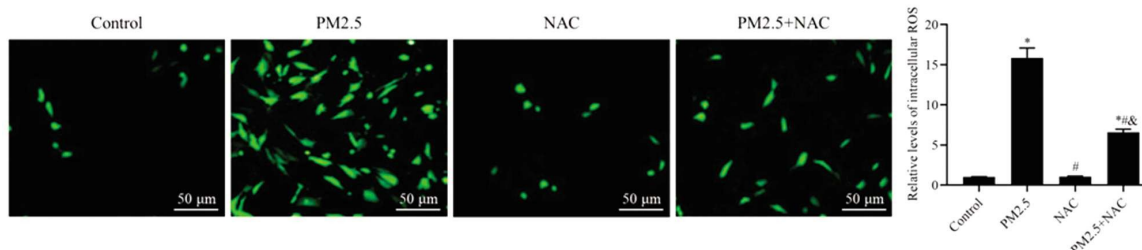


图9 NAC对PM2.5诱导的HCEC细胞内ROS生成的影响

Fig.9 Effect of NAC on HCEC intracellular ROS production induced by PM2.5

Note: Compared control group, **P*<0.05; Compared PM2.5 group, #*P*<0.05; Compared NAC group, &*P*<0.05.

2.9 NAC对PM2.5诱导的HCEC细胞自噬蛋白表达的影响

与对照组比较,PM2.5组HCEC细胞中Beclin-1和LC3 II/I蛋白相对表达量均升高(*P*<0.05);与PM2.5组比较,PM2.

5+NAC组HCEC细胞中Beclin-1和LC3 II/I蛋白相对表达量均降低(*P*<0.05);与NAC组比较,PM2.5+NAC组HCEC细胞中Beclin-1和LC3 II/I蛋白相对表达量均升高(*P*<0.05)。见图10。

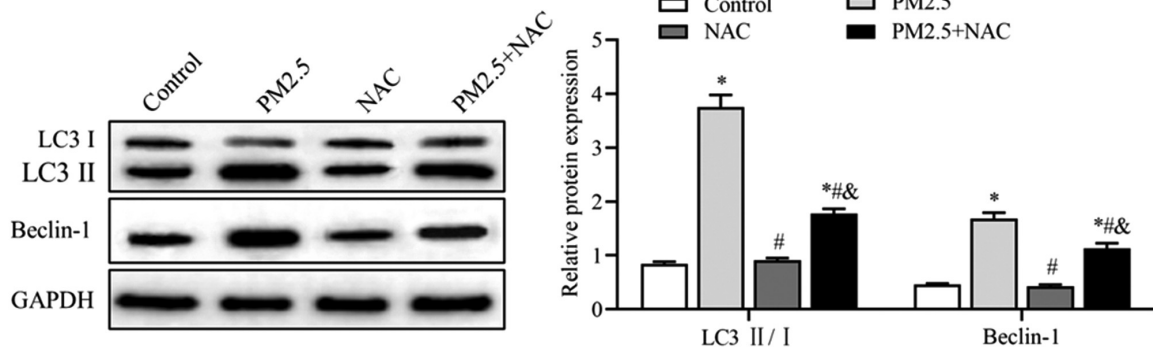


图 10 NAC 对 PM2.5 诱导的 HCEC 细胞自噬蛋白(Beclin-1 和 LC3 II/I)表达的影响

Fig.10 Effect of NAC on the expression of autophagy proteins (Beclin-1 and LC3 II/I) in HCEC cells induced by PM2.5

Note: Compared control group, * $P<0.05$; Compared PM2.5 group, # $P<0.05$; Compared NAC group, & $P<0.05$.

2.10 NAC 对 PM2.5 诱导的 HCEC 细胞屏障功能的影响

与对照组比较,PM2.5 组 HCEC 细胞中 Claudin1、ZO-1 和 Occludin 蛋白相对表达量均降低 ($P<0.05$),HCEC 细胞 TEER 值均降低 ($P<0.05$); 与 PM2.5 组比较,PM2.5+NAC 组 HCEC 细胞中 Claudin1、ZO-1 和 Occludin 蛋白相对表达量均升高

($P<0.05$),HCEC 细胞 TEER 值均升高($P<0.05$);与 NAC 组比较,PM2.5+NAC 组 HCEC 细胞中 Claudin1、ZO-1 和 Occludin 蛋白相对表达量均降低($P<0.05$),HCEC 细胞 TEER 值均降低 ($P<0.05$)。见图 11 和图 12。

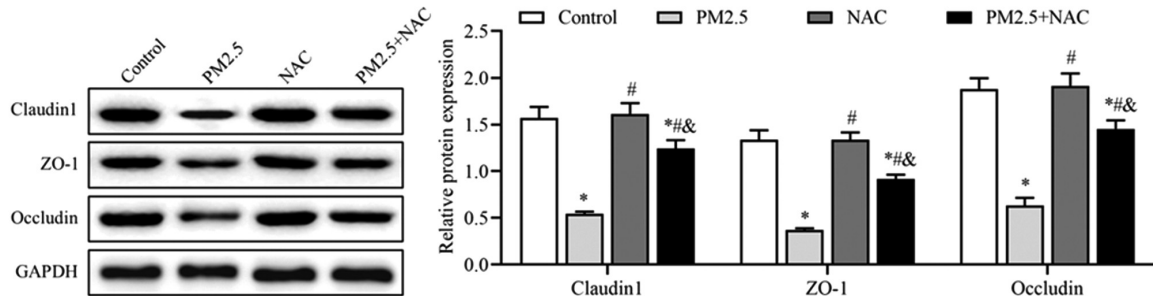


图 11 NAC 对 PM2.5 诱导的 HCEC 细胞屏障标志蛋白(Claudin1、ZO-1 和 Occludin)表达的影响

Fig.11 Effect of NAC on the expression of barrier marker proteins (Claudin1, ZO-1 and Occludin) in HCEC cells induced by PM2.5

Note: Compared control group, * $P<0.05$; Compared PM2.5 group, # $P<0.05$; Compared NAC group, & $P<0.05$.

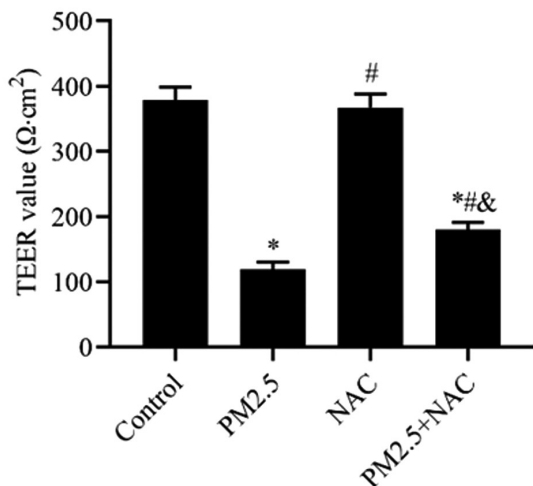


图 12 NAC 对 PM2.5 诱导的 HCEC 细胞跨膜电阻值(TEER)的影响

Fig.12 Effect of PM2.5 on the TEER of HCEC cells induced by PM2.5

Note: Compared control group, * $P<0.05$;

Compared PM2.5 group, # $P<0.05$; Compared NAC group, & $P<0.05$.

3 讨论

随着城市发展和机动车的增加,大气污染日益严重,PM2.5

指数作为空气质量最重要的指标已经在全国各大城市实行了实时监测。大量研究表明,PM2.5 与呼吸系统疾病的发生发展存在密切相关性^[15]。眼睛是长期暴露在环境中的器官,也时刻遭受着环境中 PM2.5 的损害^[16]。

多环芳烃和过度金属是 PM2.5 中两大类重要的成分,对 PM2.5 毒性起决定性作用^[17]。有研究表明 PM2.5 能够诱导细胞氧化应激和炎症反应,影响细胞正常的生理功能,其中细胞 ROS 的生成和 PM2.5 的成分与细胞损伤程度高度相关^[18,19]。研究表明,ROS 能诱导 DNA 损伤和细胞膜通透性的改变,与细胞屏障功能损伤相关,Wang 等^[20]研究发现和厚朴酚通过抑制炎症和氧化应激改善结肠上皮细胞屏障功能;Anupama 等^[21]研究发现,阻断氧化应激反应可防止屏障功能丧失,有助于内皮性角膜营养不良的治疗。本研究采用不同浓度的 PM2.5 处理 HCEC 细胞,结果显示 HCEC 细胞内 ROS 生成量与 PM2.5 呈现浓度依赖性增高,且细胞增殖活性随着 PM2.5 浓度的升高而降低;通过对 PM2.5 处理的 HCEC 细胞再加入抗氧化剂 NAC 处理,结果显示 HCEC 细胞内 ROS 生成量相较于单一 PM2.5 处理显著降低,且细胞增殖活性恢复。该结果表明 PM2.5 可能诱导了 HCEC 细胞氧化应激反应的产生,并抑制细胞增殖活性。

角膜上皮细胞间以紧密连接是角膜上皮屏障功能的基础,

Claudin1、ZO-1 和 Occludin 是上皮细胞紧密连接相关的重要基因,其表达水平与上皮极化和屏障形成有关^[22]。有研究显示,Claudin-1 是皮肤正常屏障功能所必需的,它能够通过表皮中的紧密连接来调节调节上皮细胞渗透性,Zhang 等^[23]研究显示抗炎细胞因子 IL-37 通过促进 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 蛋白表达来防止高渗应激下角膜上皮屏障的破坏。ZO-1 是一种重要的支架蛋白,其将紧密连接跨膜蛋白 Claudin1 和 Occludin 连接至肌动蛋白细胞骨架^[23]。本研究采用不同浓度的 PM2.5 处理 HCEC 细胞,结果显示随着 PM2.5 处理浓度的升高,HCEC 细胞中 Claudin1、ZO-1 和 Occludin 蛋白表达量呈剂量依赖性降低,表明 PM2.5 可损伤 HCEC 的细胞紧密连接功能,进而破坏细胞屏障功能。而再给予 NAC 处理后,HCEC 细胞中 Claudin1、ZO-1 和 Occludin 蛋白表达量均升高,该结果表明 PM2.5 对 HCEC 细胞紧密连接功能的抑制作用可能与细胞内 ROS 的大量生成有关,但具体分子机制还需要进一步研究。

细胞跨膜电阻 (TEER) 是指针对细胞屏障功能进行电学跨膜电阻的监测,研究显示,TEER 能够间接的反映细胞屏障功能,如血脑屏障、消化道屏障和视网膜屏障等^[24,25],TEER 值降低则表示屏障功能遭受破坏^[26,27]。本研究通过检测 PM2.5 处理后的 HCEC 细胞的 TEER 值,结果显示,随着 PM2.5 处理浓度的升高 HCEC 细胞的 TEER 值呈剂量依赖性降低,表明 PM2.5 一定程度上损伤了细胞屏障功能。当再给予 NAC 处理后,HCEC 细胞的 TEER 值随之升高,该结果表明 PM2.5 对 HCEC 细胞 TEER 值的影响作用可能与细胞内 ROS 的生成有关。本研究还探究了 PM2.5 对细胞自噬的影响,自噬是溶酶体介导的细胞内分解代谢机制,而细胞自噬也被认为是细胞功能受损的病理学变化^[28]。Guan 等^[29]发现 PM2.5 及其水溶性成分可通过 NLRP3 炎性小体诱导细胞自噬和炎症反应引发脾脏损伤;Chu 等^[30]研究表明 α -MSH 通过上调 EGFR 表达降低 HCEC 细胞的自噬水平,进而改善病变,恢复眼表功能。本研究结果显示,PM2.5 能够促进 HCEC 细胞中 Beclin1 和 LC3 II/I 的蛋白表达水平,表明 PM2.5 诱导了细胞自噬水平升高;NAC 处理后,HCEC 细胞中 Beclin1 和 LC3 II/I 的蛋白表达水平降低,表明 NAC 处理能够抑制 PM2.5 诱导的细胞自噬水平,该结果也表明 PM2.5 对 HCEC 细胞自噬的影响可能与细胞内 ROS 的生成有关,但该作用是否还涉及其他的分子调控仍需未来进一步的研究。

综上所述,本研究证实了 PM2.5 对 HCEC 细胞屏障功能的损伤作用,并促进炎症反应和细胞自噬,该作用可能与 PM2.5 诱导 HCEC 细胞产生氧化应激反应有关。

参考文献(References)

[1] Xu Z, Li Z, Liao Z, et al. PM2.5 induced pulmonary fibrosis in vivo and in vitro[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 171: 112-21.

[2] Ji X, Yue H, Ku T, et al. Histone modification in the lung injury and recovery of mice in response to PM2.5 exposure [J]. *Chemosphere*, 2019, 220: 127-36.

[3] Xue H, Liu G, Zhang H, et al. Similarities and differences in PM10 and PM2.5 concentrations, chemical compositions and sources in Hefei City, China[J]. *Chemosphere*, 2019, 220: 760-765.

[4] Wang Q, Liu S. The Effects and Pathogenesis of PM2.5 and its

components on chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2023, 18: 493-506.

[5] Kelly FJ, Li G. Long-term exposure to multiple ambient air pollutants and association with incident depression and anxiety [J]. *JAMA Psychiatry*, 80(4): 305-313.

[6] Xiang P, Jia Y, Wang K, et al. Water extract of indoor dust induces tight junction disruption in normal human corneal epithelial cells[J]. *Environ Pollut*, 2018, 243(Pt A): 301-307.

[7] Ruan Y, Jiang S, Musayeva A, et al. Corneal epithelial stem cells-physiology, pathophysiology and therapeutic options [J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2302-2331.

[8] 陈英华, 张琳, 薛雪, 等. Cdc42 在小鼠角膜上皮屏障维持中的作用及机制探讨[J]. *解剖学杂志*, 2021, 44(1): 164-165.

[9] Zhang Y, Li JM, Lu R, et al. Imbalanced IL-37/TNF- α /CTSS signaling disrupts corneal epithelial barrier in a dry eye model in vitro [J]. *Ocul Surf*, 2022, 26: 234-243.

[10] Chen TC, Chang SW. Moxifloxacin induces random migration in human corneal fibroblasts via the protein kinase C epsilon/zonula occludens-1 signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 910: 174414.

[11] 郭佳俊. 真实环境中的 PM_{2.5} 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路致角膜上皮屏障损伤的机制研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2022: 21-22.

[12] 朱琳, 韩瑞芳, 王培红, 等. 白藜芦醇对人角膜上皮细胞炎症和氧化应激损伤的保护作用 [J]. *国际眼科杂志*, 2021, 21(12): 2038-2043.

[13] Wong M, Ganapathy AS, Suchanec E, et al. Intestinal epithelial tight junction barrier regulation by autophagy-related protein ATG6/beclin 1[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316(5): 753-765.

[14] Song F, Hao S, Gu Y, et al. Research advances in pathogenic mechanisms underlying air pollution-induced ocular surface diseases [J]. *Adv Ophthalmol Pract Res*, 2021, 1(1): 100001.

[15] Yang Q, Li K, Li D, et al. Effects of fine particulate matter on the ocular surface: An in vitro and in vivo study [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109177.

[16] Farhat Z, Browne RW, Bonner MR, et al. How do glutathione antioxidant enzymes and total antioxidant status respond to air pollution exposure?[J]. *Environ Int*, 2018, 112: 287-293.

[17] Kashiwagi K, Iizuka Y. Effect and underlying mechanisms of airborne particulate matter 2.5 (PM2.5) on cultured human corneal epithelial cells[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 19516.

[18] Liang B, Li XL, Ma K, et al. Pollution characteristics of metal pollutants in PM2.5 and comparison of risk on human health in heating and non-heating seasons in Baoding, China [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 170: 166-71.

[19] Grant A, Leung G, Aubin MJ, et al. Fine particulate matter and age-related eye disease: the canadian longitudinal study on aging[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2021, 62(10): 7-13.

[20] Thepnuan D, Chantara S, Lee CT, et al. Molecular markers for biomass burning associated with the characterization of PM2.5 and component sources during dry season haze episodes in Upper South East Asia[J]. *Sci Total Environ*, 2019, 658: 708-22.

[21] Qiu YN, Wang GH, Zhou F, et al. PM2.5 induces liver fibrosis via triggering ROS-mediated mitophagy [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 167: 178-87.

升高可能表明炎症反应强烈^[9]。在 ATAAD 手术中,强烈的炎症反应可能导致肺部炎症和肺水肿,进而影响肺部的气体交换功能,引发低氧血症^[10]。hs-CRP 是一种炎症反应的标志物,hs-CRP 水平升高可能表明存在动脉粥样硬化或心血管疾病^[12,13]。在 ATAAD 手术中,如果存在动脉粥样硬化或心血管疾病,可能影响手术效果和术后恢复。

ROC 结果显示,BMI、白细胞、ALT、IL-6、hs-CRP 及列线图预测模型的 AUC 分别为 0.800、0.867、0.661、0.639、0.829、0.974。AUC 值越接近 1,表明模型的预测能力越强,由此看出列线图预测模型的预测能力最强,而在 Bootstrap 法(B=1000)的内部验证中也发现该模型具有较好的预测能力。此外,该模型的决策曲线净收益高于两条无效线,这表明该模型具有较好的风险与收益比。

综上所述,高 BMI、白细胞、ALT、IL-6、hs-CRP 水平是导致 ATAAD 术后发生低氧血症的独立危险因素,并且通过这些因素构建的列线图预测模型,可以有效地预测患者术后发生低氧血症的风险。

参考文献(References)

- [1] 李峰,张瑞成,乔博,等.急性 Stanford A 型主动脉夹层合并肠系膜灌注不良综合征的治疗策略 [J]. 心肺血管病杂志, 2023, 42(8): 829-833.
- [2] 刘海渊,高晴云,李艳丽,等. Stanford A 型主动脉夹层围术期低氧血症的研究进展[J]. 中国体外循环杂志, 2023, 21(1): 56-60.
- [3] 费忠化,蔡腾,张毅,等.急性 Stanford A 型主动脉夹层患者围术期并发症及术后死亡的危险因素 [J]. 中国医师杂志, 2022, 24(7): 1042-1046.
- [4] ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition [J]. JAMA, 2012, 307(23): 2526-2533.
- [5] Zhou J, Pan J, Yu Y, et al. Independent risk factors of hypoxemia in patients after surgery with acute type A aortic dissection [J]. Ann Palliat Med, 2021, 10(7): 7388-7397.
- [6] Song XC, Nie S, Xiao JL, et al. Risk factors and long-term prognosis for postoperative hypoxemia in patients with acute type A aortic dissection: A retrospective observational study [J]. Medicine (Baltimore), 2022, 101(50): e32337.
- [7] 王登峰,张超,韩冬,等. Stanford A 型急性主动脉夹层孙氏手术后低氧血症危险因素探讨 [J]. 心肺血管病杂志, 2021, 40 (1): 53-55, 63.
- [8] 王晶. 血清 ALT、AST 和 GGT 水平检测在肝脏疾病诊断中的应用分析[J]. 医药论坛杂志, 2018, 39(10): 176,封 3.
- [9] 张洪叶,张彰,梁百闯,等. Stanford A 型主动脉夹层孙氏手术患者术后血流感染的影响因素及术前 PCT、IL-6、D-D 的预测价值研究 [J]. 现代生物医学进展, 2023, 23(1): 122-126.
- [10] 宋先荣,张子涵,李金红,等. 影响 Stanford A 型主动脉夹层术后加速康复的危险因素分析 [J]. 心肺血管病杂志, 2021, 40(10): 1046-1049.
- [11] Luo YX, Matniyaz Y, Tang YX, et al. Postoperative hyper-inflammation as a predictor of poor outcomes in patients with acute type A aortic dissection (ATAAD) undergoing surgical repair [J]. J Cardiothorac Surg, 2024, 19(1): 138.
- [12] 柴凤霞,唐丽华,王磊. Lp-PLA2 和 hs-CRP 在动脉粥样硬化评估中的应用[J]. 检验医学, 2022, 37(8): 798-799.
- [13] 李必昭. 外周大动脉弹性、胰岛素抵抗、血清 Hcy 和 hs-CRP 对心血管疾病筛查的临床意义 [J]. 中南医学科学杂志, 2022, 50(5): 750-753.
- [14] inserts[J]. Eur J Pharm Sci, 2023, 188: 106511.
- [15] Nazari H, Shrestha J, Naei VY, et al. Advances in TEER measurements of biological barriers in microphysiological systems[J]. Biosens Bioelectron, 2023, 234: 115355.
- [16] Wang M, Li H, Wang F. Roles of transepithelial electrical resistance in mechanisms of retinal pigment epithelial barrier and retinal disorders[J]. Discov Med, 2022, 34(171): 19-24.
- [17] Bossink EGBM, Zakharova M, et al. Measuring barrier function in organ-on-chips with cleanroom-free integration of multiplexable electrodes[J]. Lab Chip, 2021, 21(10): 2040-2049.
- [18] 陈晓娟,曹鑫,薛理丹,等. 高迁移率族蛋白 B1 对高糖诱导的晶状体上皮细胞凋亡和自噬的影响[J]. 眼科新进展, 2023, 43(1): 13-18.
- [19] Guan L, Shi H, Tian J, et al. PM2.5 induces the inflammatory response in rat spleen lymphocytes through autophagy activation of NLRP3 inflammasome[J]. Mol Immunol, 2023, 161: 74-81.
- [20] Chu C, Huang Y, Ru Y, et al. α -MSH ameliorates corneal surface dysfunction in scopolamine-induced dry eye rats and human corneal epithelial cells via enhancing EGFR expression [J]. Exp Eye Res, 2021, 210: 108685.
- [21] (上接第 4213 页)
- [22] 黎昌江,李秋慧,洪娟,等. 黄芪甲苷对蓝光诱导损伤的视网膜色素上皮细胞的保护作用及其机制 [J]. 眼科新进展, 2021, 41(11): 1006-1011.
- [23] Wang L, Wang J. Honokiol Ameliorates DSS-induced mouse colitis by inhibiting inflammation and oxidative stress and improving the intestinal barrier[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 1755608.
- [24] Anupama C, Shettar A, Ranganath SH, et al. Experimental oxidative stress breaks down the barrier function of the corneal endothelium[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2023, 39(1): 70-79.
- [25] Yu M, Wang Q, Ma Y, et al. Aryl hydrocarbon receptor activation modulates intestinal epithelial barrier function by maintaining tight junction integrity[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(1): 69-77.
- [26] Wei SC, Yang-Yen HF, Tsao PN, et al. SHANK3 regulates intestinal barrier function through modulating ZO-1 expression through the PKCepsilon-dependent pathway [J]. Inflamm Bowel Dis, 2017, 23 (10): 1730-1740.
- [27] Karakocak BB, Keshavan S, Gunasingam G, et al. Rethinking of TEER measurement reporting for epithelial cells grown on permeable