

# 铁死亡在交通相关 PM<sub>2.5</sub> 加重哮喘小鼠 气道炎症中的作用

张妍<sup>1,2,3</sup>, 牛泽宇<sup>1,2,3</sup>, 王彩红<sup>1,2,3</sup>, 赵利芳<sup>1,2,3</sup>, 田家瑜<sup>1,2,3</sup>, 刘楠楠<sup>1,2,3</sup>,  
关琳琳<sup>1,2,3</sup>, 宋露露<sup>1,2,3</sup>, 郑会秋<sup>1,2,3</sup>, 石东星<sup>1,2,3</sup>, 刘军霞<sup>1,2,3</sup>, 张志红<sup>1,2,3</sup>

1. 山西医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 山西 太原 030001; 2. 山西医科大学黄河流域生态公共  
卫生安全研究中心; 3. 煤炭环境致病与防治教育部重点实验室

**摘要:**目的 探讨铁死亡在交通相关 PM<sub>2.5</sub>加重哮喘小鼠气道炎症中的作用及其机制。方法 50 只 BALB/c 小鼠随机分为 5 组:生理盐水(NS)组、哮喘(卵清蛋白 OVA)组、OVA 联合交通源 PM<sub>2.5</sub>低、中、高暴露(分别为 1.8、3.6、7.2 mg/kg·bw)组。使用 ELISA 方法检测肺组织中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的水平;比色法评估肺组织匀浆上清中的还原性谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)以及 Fe<sup>2+</sup>的水平;用 western blot 法检测前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、酰辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 和肿瘤蛋白 p53 (p53)、磷酸化 p53 (p-p53)、亚精胺/精胺 N1-乙酰转移酶 1 (SAT1)、花生四烯酸 15-脂氧合酶 (ALOX15) 的蛋白表达,并通过 qRT-PCR 法检测以上除 p-p53 外其他指标的 mRNA 表达。采用单因素方差分析比较多组数据,用 Tukey 检验进一步多重比较。结果 PM<sub>2.5</sub>刺激明显增加了哮喘小鼠肺组织中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平,尤其在 PM<sub>2.5</sub>高暴露组 ( $F_{IL-6} = 17.910, P < 0.001$ ;  $F_{TNF-\alpha} = 5.414, P < 0.05$ )。所有 PM<sub>2.5</sub>暴露组的 GSH 均下降,其中 PM<sub>2.5</sub>高暴露组的 GSH 降低最显著 ( $F_{GSH} = 13.560, P < 0.001$ )。PM<sub>2.5</sub>中、高暴露组 MDA 和 Fe<sup>2+</sup>显著高于 OVA 组 ( $F_{MDA} = 55.230, P < 0.001$ ;  $F_{Fe^{2+}} = 17.660, P < 0.001$ )。PM<sub>2.5</sub>暴露后 PTGS2、ACSL4、ALOX15 的蛋白和 mRNA 表达增高,而 GPX4 的表达降低。p53、SAT1 和 ALOX15 的蛋白及 mRNA 表达水平随 PM<sub>2.5</sub>剂量增加而呈现明显的剂量效应,p-p53 与 p53 的蛋白表达趋势一致。结论 交通相关 PM<sub>2.5</sub>可能通过 p53/SAT1/ALOX15 通路诱导哮喘小鼠肺部铁死亡并加重哮喘炎症。

**关键词:**交通相关 PM<sub>2.5</sub>;铁死亡;哮喘;气道炎症

中图分类号:R562.2 文献标志码:A 文章编号:1003-8507(2024)06-998-07

DOI:10.20043/j.cnki.MPM.202312020

## Effects of ferroptosis induced by traffic-related PM<sub>2.5</sub> in exacerbating airway inflammation in asthmatic mice

ZHANG Yan\*, NIU Ze-yu, WANG Cai-hong, ZHAO Li-fang, TIAN Jia-yu, LIU Nan-nan,  
GUAN Lin-lin, SONG Lu-lu, ZHENG Hui-qiu, SHI Dong-xing, LIU Jun-xia, ZHANG Zhi-hong

\* Department of Environmental Hygiene, School of Public Health, Shanxi Medical University,  
Taiyuan, Shanxi 030001, China

**Abstract: Objective** To explore the role and mechanism of ferroptosis in exacerbating airway inflammation in asthmatic mice exposed to traffic-related PM<sub>2.5</sub>. **Methods** Fifty BALB/c mice were randomly divided into five groups: saline (NS), asthma (ovalbumin, OVA), and OVA combined with low, medium, and high exposure to traffic-derived PM<sub>2.5</sub> (1.8, 3.6, and 7.2 mg/kg·bw, respectively). The levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in lung tissue were measured using ELISA kits. The concentrations of reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and Fe<sup>2+</sup> in lung homogenate supernatants were assessed by colorimetry. Protein expressions of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), acyl-CoA synthetase long chain family member 4 (ACSL4), glutathione peroxidase 4 (GPX4), tumor protein p53 (p53), phospho-p53 (p-p53), spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 (SAT1), and arachidonate 15-lipoxygenase (ALOX15) were detected using western blot. mRNA expressions of PTGS2, ACSL4, GPX4, p53, SAT1, and ALOX15 were examined by qRT-PCR. One-way ANOVA was used for multi-group data comparison, followed by Tukey's HSD for further multiple comparisons. **Results**

**基金项目:**国家自然科学基金(82273595);中央引导地方科技发展资金(YDZJSX2021A028);山西省自然科学基金(202103021223229);中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所开放基金(2023-CKL-02)

**作者简介:**张妍(1997—),女,硕士在读,研究方向:大气污染的健康效应研究

**通信作者:**张志红, E-mail: zzh1973@sxmu.edu.cn

PM<sub>2.5</sub> exposure significantly increased IL-6 and TNF- $\alpha$  levels in asthmatic mouse lung tissues, especially in the high PM<sub>2.5</sub> exposure group ( $F_{IL-6} = 17.910, P < 0.001$ ;  $F_{TNF-\alpha} = 5.414, P < 0.05$ ). All PM<sub>2.5</sub> exposure groups showed a reduction in GSH, most notably in the high exposure group ( $F_{GSH} = 13.560, P < 0.001$ ). MDA and Fe<sup>2+</sup> levels were significantly higher in the medium and high PM<sub>2.5</sub> groups compared to the OVA group ( $F_{MDA} = 55.230, P < 0.001$ ;  $F_{Fe} = 17.660, P < 0.001$ ). PM<sub>2.5</sub> exposure also elevated the protein and mRNA expressions of PTGS2, ACSL4, and ALOX15, while reducing GPX4 expression. The protein and mRNA expression levels of p53, SAT1, and ALOX15 showed a clear dose-response to PM<sub>2.5</sub>, with p-p53 following a similar trend as p53 protein expression. **Conclusion** Traffic-related PM<sub>2.5</sub> may induce ferroptosis in the lungs of asthmatic mice and exacerbate asthma inflammation through the p53/SAT1/ALOX15 pathway.

**Keywords:** Traffic-related PM<sub>2.5</sub>; Ferroptosis; Asthma; Airway inflammatory

哮喘是以气道炎症为主的复杂多表型疾病,与空气污染、过敏原及微生物密切相关。全球约超过 3.3 亿人受到哮喘的困扰,过敏性哮喘是哮喘最常见的类型,我国过敏性哮喘占成年哮喘的 50% 以上<sup>[1]</sup>。因此,从哮喘加重的角度探索针对性的防控措施,对提升患者生活品质至关重要。

PM<sub>2.5</sub>来源广泛,与人类健康风险密切相关。交通排放是城市 PM<sub>2.5</sub>的主要来源,流行病学研究显示,PM<sub>2.5</sub>浓度上升与哮喘就诊率增加相关<sup>[2]</sup>。Schultz 等人的研究表明与工业来源相比,道路交通来源的 PM<sub>2.5</sub>与哮喘的关联更加显著<sup>[3]</sup>。实验研究表明 PM<sub>2.5</sub>暴露可以加剧小鼠肺部炎症,导致促炎因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平显著升高<sup>[4]</sup>。课题组前期发现,交通来源的 PM<sub>2.5</sub>可引起哮喘大鼠脾脏的炎症反应,导致免疫功能损伤<sup>[5]</sup>。以上表明交通来源的 PM<sub>2.5</sub>与哮喘的发生发展关系密切。

研究发现 PM<sub>2.5</sub>暴露导致人支气管上皮(BEAS-2B)细胞铁积累和脂质过氧化,引发与铁死亡相关的变化<sup>[6]</sup>,提示 PM<sub>2.5</sub>暴露可诱发铁死亡。然而铁死亡在交通源 PM<sub>2.5</sub>诱导哮喘加重中的角色尚不明确。最新研究发现哮喘小鼠模型中出现铁死亡现象,抑制铁死亡可以缓解小鼠气道炎症反应从而改善哮喘,表明铁死亡在哮喘的发展中可能发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。铁死亡的调控途径包括 XC-/GSH/GPX4、p62/Keap1/Nrf2、p53/SAT1/ALOX15 等<sup>[8]</sup>。p53 是铁死亡的核心调控基因,在诱导细胞脂质过氧化和铁死亡中发挥重要作用。近期研究发现 p53 可以通过调控精脒/精胺 N1-乙酰基转移酶 1(SAT1)的转录,引起脂氧合酶 15(ALOX15)依赖性的脂质过氧化进而导致铁死亡<sup>[9]</sup>。但目前关于 p53/SAT1/ALOX15 介导的铁死亡通路在 PM<sub>2.5</sub>加重哮喘中的具体作用仍待阐明。

因此,本研究以小鼠为研究对象,通过构建哮喘小鼠模型,探讨铁死亡在 PM<sub>2.5</sub>诱导哮喘加重中的潜在作用,并探究 p53/SAT1/ALOX15 通路介导的铁死亡在哮喘发展过程中的调控作用,为探究大气污染引起哮喘加重的机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 本研究选用 50 只 6~8 周龄的 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠,体重在 18~22 g 之间,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2021-0006。实验材料包括增强型 RIPA 裂解液、BCA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);ECL 发光液(大连美仑生物公司);微量还原型谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);丙二醛(MDA)含量检测试剂盒(北京金克隆生物技术有限公司);亚铁离子含量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);小鼠白介素 6(IL-6)和肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技公司);谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)鼠单克隆抗体、前列腺素内过氧化物合酶 2(PTGS2)兔多克隆抗体、亚精胺/精胺 N1-乙酰转移酶 1(SAT1)兔多克隆抗体、p53 鼠单克隆抗体和 p-p53 兔多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);花生四烯酸 15-脂氧合酶(ALOX15)兔单克隆抗体和长链脂酰辅酶 A 合成酶 4(ACSL4)兔单克隆抗体(英国 Abcam 公司); $\beta$ -actin 鼠单克隆抗体(美国 SAB 公司);羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 PM<sub>2.5</sub>的采集与制备** 2020 年 11 月至 2021 年 1 月,在山西太原市某交通路口利用 TH-1000CII 型智能空气采样器搭载 PM<sub>2.5</sub> 切割器,距离地面 1.6 m,流量为 1 m<sup>3</sup>/min,每日 12 h(8:00 至 20:00)采样。采样完毕滤膜干燥 24 h 后裁为 1 cm<sup>2</sup> 块状,用超纯水超声清洗三次,冷冻干燥后存贮于 -20℃ 备用。

**1.2.2 动物分组及处理** 将 50 只 BALB/c 鼠随机分为 5 组,每组 10 只,分别为生理盐水(NS)组、哮喘(卵清蛋白 OVA)组、OVA 联合交通源 PM<sub>2.5</sub> 低、中、高暴露(分别为 1.8、3.6、7.2 mg/kg·bw)组。本研究已获得山西省肿瘤医院动物实验伦理审查委员会的批准(2022026)。

小鼠一周适应性饲养后,于 1、8、15 天对小鼠进行致敏,NS 组腹腔注射 PBS,其他组腹腔注射等体积

的 OVA 和氢氧化铝的 PBS 混悬液。从第 21 天开始对小鼠进行 OVA 雾化激发。NS 组用无菌 PBS 雾化,其他各组用 2% OVA 雾化激发,每次持续 30 min。从第 20 天开始,对小鼠进行鼻腔滴注不同浓度的 PM<sub>2.5</sub> 染毒液。OVA 雾化和 PM<sub>2.5</sub> 染毒交替进行,分别进行 10 次。

实验观察到哮喘小鼠血浆中 OVA 特异性 IgE 水平升高,气管及肺组织的 HE 染色和 PAS 染色显示明显的炎性细胞浸润,杯状细胞化生和黏液分泌增加,验证了哮喘模型的成功构建。

**1.2.3 ELISA 法检测组织匀浆上清中的 IL-6、TNF- $\alpha$  水平** 使用上海酶联生物科技公司提供的小鼠 ELISA 试剂盒,依照说明书操作,测定肺组织匀浆中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的浓度。

**1.2.4 蛋白质印迹技术(western blot)** 取适量肺组织加入 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂

超声处理。离心后上清用于蛋白定量,以确定上样量。电泳分离蛋白样品后转移到 PVDF 膜上,室温下使用 5% 脱脂奶粉孵育 3 h,加入相应的一抗过夜孵育,抗体浓度如下: ACSL4 (1:15 000), PTGS2 (1:4 000), GPX4 (1:2 500), ALOX15 (1:1 000), p53 (1:2 500), p-p53 (1:2 500), SAT1 (1:500),  $\beta$ -actin (1:4 000)。次日洗涤三次,用二抗 (1:5 000) 孵育 1 h 后, ECL 系统显影,用凝胶成像系统捕获图像并用 Image J 1.8.0 软件进行定量。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)** 提取肺组织的总 RNA,通过 Prime Script™ RT 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,使用 TB Green Premix Ex Taq™ II 和引物对目的基因进行体外扩增,CT 值确定 mRNA 含量,并以  $\beta$ -actin 为参照基因,计算相对表达倍数变化。实时荧光定量 PCR 的引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 的引物序列

Table 1 The primer sequences for qRT-PCR

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
M-ACSL4	TGGCTCATGTGCTGGAACCTGAC	CAATCACCCCTTGCTTCCCTTCTTG
M-GPX4	CGCGATGATTGGCGCT	CACACGAAACCCCTGTACTTATCC
M-PTGS2	CTGCGCCTTTTCAAGGATGG	GGGATACACCTCTCCACCA
M-p53	ATTGAGGCCCTCATCTCTCT	CCATGGCAGTCATCCAGTCT
M-SAT1	GGCTAAATTTAAGATCCGTCGA	CATGTATTCATATTTAGCCAGTTCCTT
M-ALOX15	GCAACTGGAAGGATGGCACAATC	TCGCTGGTCTACAGGGAGGTC

**1.2.6 亚铁离子(Fe<sup>2+</sup>)含量检测** 取适量肺组织制备上清液,于 4℃、10 000 g 离心 10 min。根据说明书设置测定孔和标准孔,于 593 nm 读取吸光度。

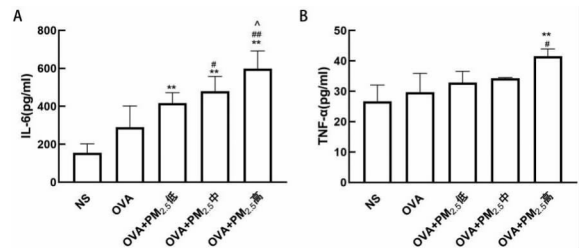
**1.2.7 GSH 和 MDA 含量检测** 称取适量组织样本,制备组织匀浆,4℃、5 000 r/min 离心 10 min 取上清,按说明书步骤测量并分析 GSH (405 nm 吸光度) 和 MDA (532 nm 及 600 nm 吸光度差值) 含量。

**1.3 统计学处理** 实验数据采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析和图表绘制,结果使用  $\bar{x} \pm s$  表示,单因素方差分析用于多组间显著性差异的比较,多重比较采用 Tukey 检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 交通相关 PM<sub>2.5</sub> 对哮喘小鼠肺组织中炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  水平的影响** 结果如图 1,各组间 IL-6、TNF- $\alpha$  水平的差异有统计学意义 ( $F_{IL-6} = 17.910, P < 0.001$ ;  $F_{TNF-\alpha} = 5.414, P < 0.05$ )。与 NS 组相比,PM<sub>2.5</sub> 暴露后 IL-6 水平均显著升高。与 OVA 组比较,PM<sub>2.5</sub> 中、高暴露组的 IL-6 水平显著增加 ( $q_{中} = 4.675, P < 0.05$ ;  $q_{高} = 7.621, P < 0.01$ )。随着 PM<sub>2.5</sub> 暴露浓度增加,IL-6 水平呈升高趋势。与

NS 组 ( $q = 6.165, P < 0.01$ ) 和 OVA 组 ( $q = 4.946, P < 0.05$ ) 相比,PM<sub>2.5</sub> 高暴露组的 TNF- $\alpha$  水平显著提高。



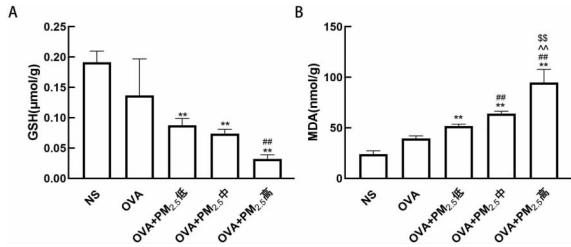
注: ELISA 检测各组肺组织匀浆上清中 IL-6 (pg/ml) 含量 (A) 和 TNF- $\alpha$  (pg/ml) 含量 (B) 的改变; \* \*: 与 NS 组相比,  $P < 0.01$ ; #: 与 OVA 组相比,  $P < 0.05$ ; ##: 与 OVA 组相比,  $P < 0.01$ ; ^: 与 OVA + PM<sub>2.5</sub> 低组相比,  $P < 0.05$ 。

图 1 小鼠肺组织匀浆上清液中炎症因子的改变

**Fig. 1** The changes of inflammatory factors in the supernatant of mouse lung tissue homogenate

**2.2 交通相关 PM<sub>2.5</sub> 对哮喘小鼠肺组织中氧化还原平衡的影响** 结果如图 2,各组间 GSH 和 MDA 含量的差异均有统计学意义 ( $F_{GSH} = 13.560, P < 0.001$ ;  $F_{MDA} = 55.230, P < 0.001$ )。与对照组相比,OVA 组的 GSH ( $q$

= 3.277,  $P > 0.05$ ) 表达降低, MDA ( $q = 4.285, P > 0.05$ ) 升高, 但差异均不显著, PM<sub>2.5</sub> 暴露组的 GSH 水平均显著降低, MDA 水平均显著升高。与 OVA 组相比, PM<sub>2.5</sub> 高暴露组的 GSH 水平明显下降 ( $q = 6.277, P < 0.01$ ), PM<sub>2.5</sub> 中、高暴露组的 MDA 水平明显上升 ( $q_{中} = 6.830, P < 0.01; q_{高} = 15.320, P < 0.01$ )。另外, MDA 水平随着 PM<sub>2.5</sub> 浓度增高而逐渐升高。

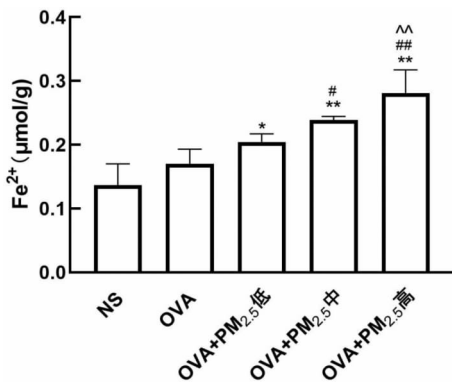


注: 比色法检测各组 GSH (μmol/g) 含量(A) 和 MDA (mmol/g) 含量(B) 的改变; \* \*: 与 NS 组相比,  $P < 0.01$ ; ##: 与 OVA 组相比,  $P < 0.01$ ; ^: 与 OVA + PM<sub>2.5</sub> 低组相比,  $P < 0.01$ ; \$ \$: 与 OVA + PM<sub>2.5</sub> 中组相比,  $P < 0.01$ 。

图 2 小鼠肺组织中氧化还原平衡的改变

Fig. 2 The alteration of redox balance in mouse lung tissue

**2.3 交通相关 PM<sub>2.5</sub> 对哮喘小鼠肺组织中 Fe<sup>2+</sup> 水平的影响** 结果如图 3, 各组间 Fe<sup>2+</sup> 水平的差异显著 ( $F = 17.660, P < 0.001$ )。NS 组的 Fe<sup>2+</sup> 水平最低, PM<sub>2.5</sub> 暴露组的 Fe<sup>2+</sup> 水平均显著升高。相较于哮喘组, PM<sub>2.5</sub> 中、高暴露组的 Fe<sup>2+</sup> 水平显著增长 ( $q_{中} = 5.022, P < 0.05; q_{高} = 8.759, P < 0.01$ )。随着 PM<sub>2.5</sub> 暴露浓度的增加, 小鼠肺部的 Fe<sup>2+</sup> 水平逐步上升, PM<sub>2.5</sub> 高暴露组的 Fe<sup>2+</sup> 水平显著高于低暴露组 ( $q = 6.050, P < 0.01$ )。

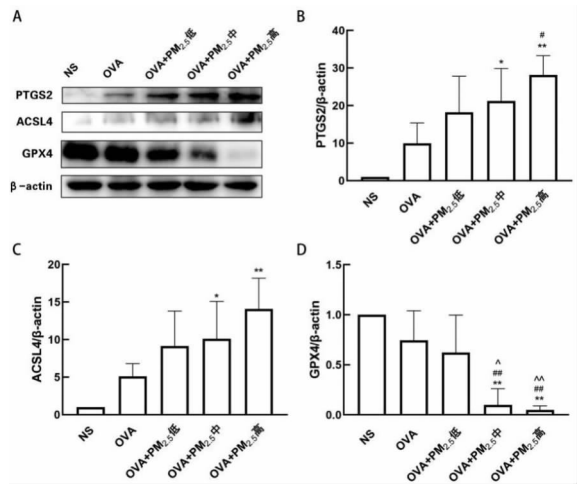


注: \* \*: 与 NS 组相比,  $P < 0.05$ ; \* \*: 与 NS 组相比,  $P < 0.01$ ; #: 与 OVA 组相比,  $P < 0.05$ ; ##: 与 OVA 组相比,  $P < 0.01$ ; ^: 与 OVA + PM<sub>2.5</sub> 低组相比,  $P < 0.01$ 。

图 3 各组小鼠肺组织中 Fe<sup>2+</sup> 的改变

Fig. 3 Changes of Fe<sup>2+</sup> in lung tissue of different groups of mice

**2.4 交通相关 PM<sub>2.5</sub> 对哮喘小鼠中铁死亡相关蛋白表达的影响** 结果如图 4, 各组间 PTGS2、ACSL4 和 GPX4 蛋白表达水平的差异均有统计学意义 ( $F_{PTGS2} = 7.456, P < 0.01; F_{ACSL4} = 5.715, P < 0.05; F_{GPX4} = 16.900, P < 0.001$ )。NS 组的 PTGS2 和 ACSL4 蛋白表达最低, PM<sub>2.5</sub> 中、高暴露组的 PTGS2 和 ACSL4 蛋白表达显著增加。与 OVA 组相比, PM<sub>2.5</sub> 干预后, PTGS2 和 ACSL4 蛋白表达进一步升高, 其中 PM<sub>2.5</sub> 高暴露组的 PTGS2 蛋白表达最高 ( $q = 4.729, P < 0.05$ )。与 NS 组相比, PM<sub>2.5</sub> 高暴露组的 GPX4 蛋白表达明显降低 ( $q = 9.421, P < 0.01$ )。与 OVA 组相比, PM<sub>2.5</sub> 中、高浓度暴露组的 GPX4 蛋白表达显著降低 ( $q_{中} = 6.404, P < 0.05; q_{高} = 6.910, P < 0.01$ )。



注: (A) PTGS2、ACSL4 和 GPX4 的蛋白条带; (B) PTGS2 的蛋白相对表达; (C) ACSL4 的蛋白相对表达; (D) GPX4 的蛋白相对表达。\* \*: 与 NS 组相比,  $P < 0.05$ ; \* \*: 与 NS 组相比,  $P < 0.01$ ; #: 与 OVA 组相比,  $P < 0.05$ ; ##: 与 OVA 组相比,  $P < 0.01$ ; ^: 与 OVA + PM<sub>2.5</sub> 低组相比,  $P < 0.05$ ; ^: 与 OVA + PM<sub>2.5</sub> 低组相比,  $P < 0.01$ 。

图 4 小鼠肺组织中 PTGS2、ACSL4、GPX4 蛋白的相对表达水平

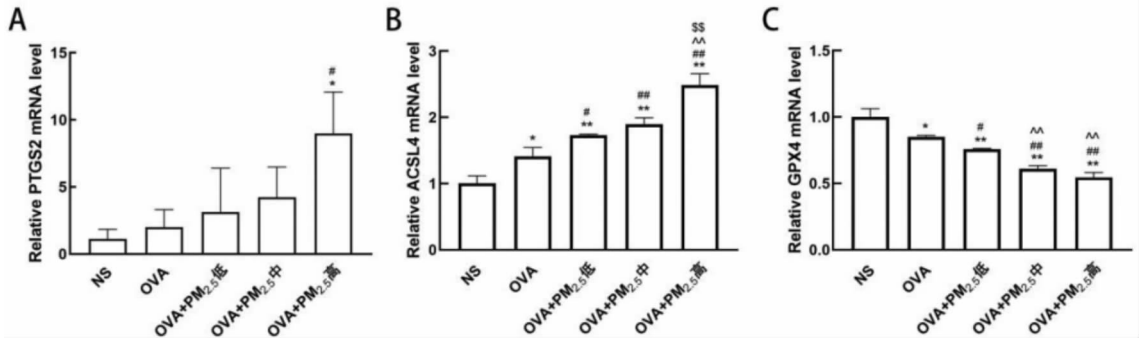
Fig. 4 The relative expression levels of PTGS2, ACSL4, GPX4 proteins in mouse lung tissue

**2.5 交通相关 PM<sub>2.5</sub> 对哮喘小鼠肺组织中 Fe 死亡相关基因表达的影响** 结果如图 5, 各组间 PTGS2、ACSL4 和 GPX4 基因表达的差异均有统计学意义 ( $F_{PTGS2} = 5.106, P < 0.05; F_{ACSL4} = 66.810, P < 0.001; F_{GPX4} = 90.260, P < 0.001$ )。NS 组的 PTGS2 和 ACSL4 的 mRNA 表达最低。与 NS 组相比, OVA 组和各 PM<sub>2.5</sub> 暴露组的 PTGS2 和 ACSL4 的 mRNA 表达均有上升趋势, 其中 PM<sub>2.5</sub> 高暴露组的生长最为显著 ( $q_{PTGS2} = 5.766, P < 0.05; q_{ACSL4} = 21.900, P < 0.01$ )。ACSL4 的 mRNA 表达随 PM<sub>2.5</sub> 浓度增长而提升。反之, GPX4 的 mRNA 表达在所有 PM<sub>2.5</sub> 暴露组均呈现

降低趋势,并随 PM<sub>2.5</sub>浓度升高进一步下调。

## 2.6 交通相关 PM<sub>2.5</sub>对哮喘小鼠肺组织中 p53/SAT1/ALOX15 通路蛋白表达的影响 结果如图 6 所

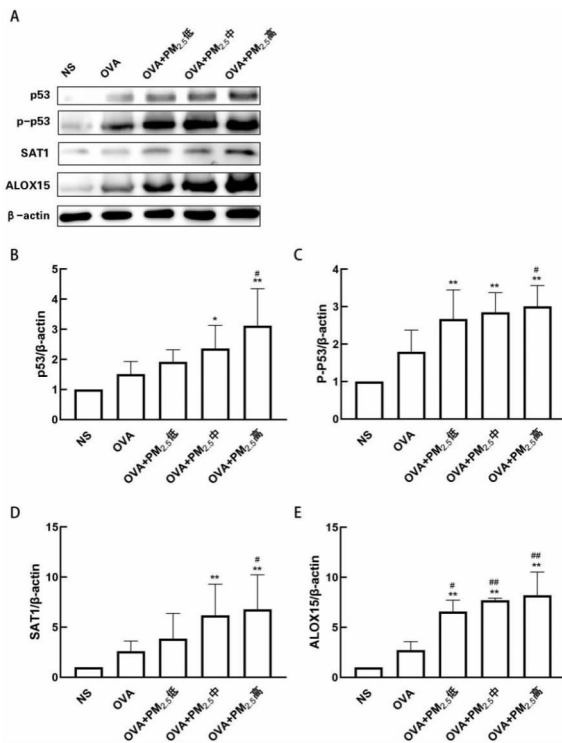
示,各组间 p53、p-p53、SAT1 和 ALOX15 蛋白表达水平的差异均有统计学意义( $F_{p53} = 6.793, P < 0.01$ ;



注:(A)PTGS2 的基因相对表达;(B)ACSL4 的基因相对表达;(C)GPX4 的基因相对表达。\*:与 NS 组相比, $P < 0.05$ ; \*\*:与 NS 组相比, $P < 0.01$ ;#:与 OVA 组相比, $P < 0.05$ ;##:与 OVA 组相比, $P < 0.01$ ;^:与 OVA + PM<sub>2.5</sub> 低组相比, $P < 0.01$ ;\$ \$:与 OVA + PM<sub>2.5</sub> 中组相比, $P < 0.01$ 。

图 5 小鼠肺组织中 PTGS2、ACSL4、GPX4 基因的相对表达水平

Fig. 5 The relative expression levels of PTGS2, ACSL4, GPX4 genes in mouse lung tissue



注:(A)p53、p-p53、SAT1 和 ALOX15 的蛋白条带;(B)p53 的蛋白相对表达;(C)p-p53 的蛋白相对表达;(D)SAT1 的蛋白相对表达;(E)ALOX15 的蛋白相对表达。\*:与 NS 组相比, $P < 0.05$ ; \*\*:与 NS 组相比, $P < 0.01$ ;#:与 OVA 组相比, $P < 0.05$ ;##:与 OVA 组相比, $P < 0.01$ 。

图 6 小鼠肺组织中 p53、p-p53、SAT1、ALOX15 蛋白的相对表达水平

Fig. 6 The relative expression levels of p53, p-p53, SAT1, ALOX15 proteins in mouse lung tissue

$F_{p-p53} = 9.457, P < 0.001$ ;  $F_{SAT1} = 6.108, P < 0.01$ ;  $F_{ALOX15} = 20.940, P < 0.001$ )。与 NS 组相比,所有 PM<sub>2.5</sub>染毒组中 p-p53 和 ALOX15 的蛋白表达明显增加,p53( $q = 6.816, P < 0.01$ )和 SAT1( $q = 5.904, P < 0.01$ )在 PM<sub>2.5</sub>高暴露组中的蛋白表达升高最显著。与 OVA 组比较,ALOX15 蛋白表达在 PM<sub>2.5</sub>染毒后均明显增加,p53( $q = 5.178, P < 0.05$ )、p-p53( $q = 4.392, P < 0.05$ )和 SAT1( $q = 4.284, P < 0.05$ )的蛋白表达在 PM<sub>2.5</sub>高暴露组中显著增加。

## 2.7 交通相关 PM<sub>2.5</sub>对哮喘小鼠肺组织中 p53/SAT1/ALOX15 通路基因表达的改变 结果如图 7,各

组间 p53、SAT1 和 ALOX15 基因表达的差异均有统计学意义( $F_{p53} = 22.770, P < 0.001$ ;  $F_{SAT1} = 4.167, P < 0.05$ ;  $F_{ALOX15} = 32.520, P < 0.001$ )与 NS 组相比,OVA 组和 PM<sub>2.5</sub>染毒组中各项指标均有不同程度的升高,p53 的 mRNA 表达在各组均显著升高,SAT1 的 mRNA 表达在 PM<sub>2.5</sub>高暴露组中显著增加( $q = 5.219, P < 0.05$ ),ALOX15 的 mRNA 表达在 PM<sub>2.5</sub>中、高暴露组中显著增加( $q_{中} = 6.847, P < 0.05$ ;  $q_{高} = 14.230, P < 0.01$ )。与 OVA 组相比,p53( $q = 7.669, P < 0.01$ )和 ALOX15( $q = 12.180, P < 0.01$ )的 mRNA 表达在 PM<sub>2.5</sub>高暴露组中显著增加。随着 PM<sub>2.5</sub>染毒浓度的提高,p53、SAT1 和 ALOX15 的 mRNA 表达也呈增高趋势,这种趋势在 ALOX15 的 mRNA 表达上最为显著。

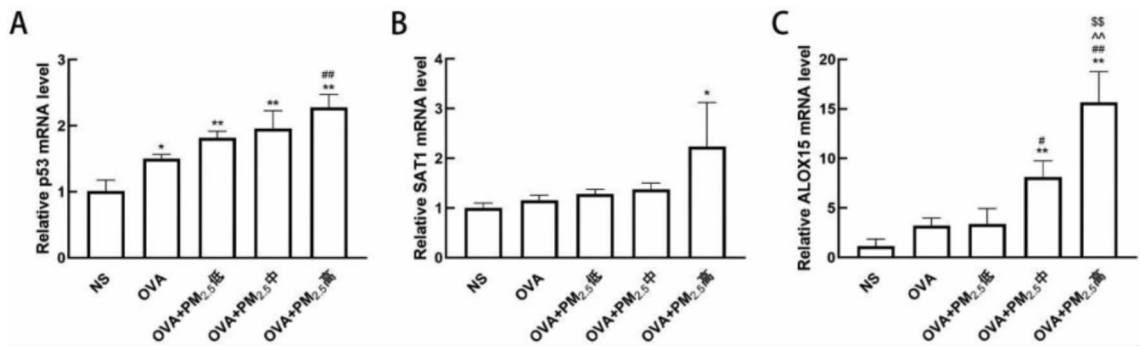
## 3 讨论

PM<sub>2.5</sub>引发的炎症是肺部疾病的主要致病机制。

课题组前期研究发现,交通相关 PM<sub>2.5</sub> 可以诱导哮喘大鼠的 Th17/Treg 失衡,IL-17、IL-23、TGF-β1 分泌增加进而加重哮喘<sup>[10-11]</sup>。IL-17 可促进 TNF-α、IL-1β、IL-6 等促炎因子的分泌,增强组织内中性粒细胞的募集和炎症。另外,Wang Y 等人的研究发现 PM<sub>2.5</sub> 暴露后健康小鼠肺组织和人支气管上皮 BEAS

-2B 细胞中 IL-6、IL-8 和 TNF-α 水平显著增高<sup>[12]</sup>。

铁死亡是以脂质过氧化为核心的新型细胞死亡调控形式,其特点是铁积累、致命性的脂质过氧化及核心还原酶 GPX4 不能及时清除脂质过氧化产物<sup>[13]</sup>。



注:(A)p53 的基因相对表达;(B)SAT1 的基因相对表达;(C)ALOX15 的基因相对表达。\*:与 NS 组相比, $P < 0.05$ ; \*\*:与 NS 组相比, $P < 0.01$ ; #:与 OVA 组相比, $P < 0.05$ ; ##:与 OVA 组相比, $P < 0.01$ ; ^:与 OVA + PM<sub>2.5</sub> 低组相比, $P < 0.01$ ; \$\$\$:与 OVA + PM<sub>2.5</sub> 中组相比, $P < 0.01$ 。

图 7 小鼠肺组织中 p53、SAT1、ALOX15 基因的相对表达水平

Fig. 7 The relative expression levels of p53, SAT1, ALOX15 genes in mouse lung tissue

脂质过氧化是所有铁死亡调控途径的最终步骤,酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ASCL4) 和溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3 (LPCAT3) 参与脂质合成与重塑,在脂氧合酶的作用下形成大量活性氧 (ROS)、自由基和氧化终产物丙二醛 (MDA) 等<sup>[14]</sup>。Park 等人发现 PM<sub>2.5</sub> 可以通过促进铁蓄积和脂质过氧化导致细胞死亡<sup>[15]</sup>。本研究观察到哮喘小鼠在 PM<sub>2.5</sub> 高浓度暴露下显示出 Fe<sup>2+</sup> 含量增加、脂质过氧化指标上升,以及 GPX4 抗氧化作用下降等铁死亡特征。随着 PM<sub>2.5</sub> 暴露浓度的增加,铁死亡标志性指标进一步改变,提示 PM<sub>2.5</sub> 暴露与铁死亡之间存在剂量-反应关系。

p53 是一个关键的细胞代谢调节基因,与铁死亡所涉及的关键代谢途径 (包括铁代谢、脂质代谢和氨基酸代谢) 都密切相关<sup>[16]</sup>。p53 可以通过转录抑制 SLC7A11 (胱氨酸-谷氨酸逆转运蛋白的关键组成部分) 直接诱导铁死亡或转录促进 SAT1 调控 ALOX15 依赖的铁死亡<sup>[13]</sup>。研究表明氧化锌纳米颗粒诱导的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 铁死亡模型中 p53、SAT1 和 ALOX15 均升高,敲除 p53 后 SAT1 显著降低,ALOX15 与 SAT1 的表达趋势一致<sup>[17]</sup>。本研究显示,PM<sub>2.5</sub> 暴露后 p53、SAT1 和 ALOX15 的表达明显升高,p-p53 的表达明显升高,提示 p53 可能通过磷酸化修饰增加其对下游的转录激活作用。值得注意的是,SAT1 是一种调节多胺代谢分解途径的关键酶,本研究首次发现 PM<sub>2.5</sub> 可以调控肺中 SAT1 的表达,提示

了 PM<sub>2.5</sub> 可能对多胺代谢过程产生影响。

研究发现,铁死亡导致细胞膜破裂,将损伤相关分子模式 (DAMPs) 释放到细胞外,激活 AGER (晚期糖基化终产物特异性受体) 介导的炎症信号通路并引起小鼠和细胞促炎因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 显著增加以及抗炎因子 IL-10 的下降<sup>[18]</sup>。Shou 等人发现铁死亡可以使 Th17/Treg 免疫反应失衡,TNF-α、IL-6、IL-1α、IL-1β、IL-17、IL-22 和 IL-23 水平显著增加,而在 Fer-1 处理后降低<sup>[19]</sup>。以上证据提示铁死亡可参与并放大炎症反应。

本研究发现,交通源 PM<sub>2.5</sub> 加重了哮喘的气道炎症和脂质过氧化,同时导致肺部铁沉积明显。综上所述,我们认为交通相关 PM<sub>2.5</sub> 可诱导铁死亡并加重哮喘炎症,p53/SAT1/ALOX15 通路可能参与这种调控作用,提示铁死亡可能是过敏性哮喘防治策略的新靶标。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

#### 参考文献

- [1] Papadopoulos NG, Miligkos M, Xepapadaki P. A current perspective of allergic asthma: from mechanisms to management [J]. Handbook of Experimental Pharmacology, 2022, 268: 69-93.
- [2] Lu P, Zhang YM, Lin JT, et al. Multi-city study on air pollution and hospital outpatient visits for asthma in China [J]. Environmental Pollution, 2020, 257: 113638.
- [3] Schultz AA, Schauer JJ, Malecki KM. Allergic disease associations

- with regional and localized estimates of air pollution [ J ]. *Environmental Research*, 2017, 155: 77 - 85.
- [ 4 ] Park SM, Jung CJ, Lee DG, et al. *Adenophora stricta* root extract protects lung injury from exposure to particulate matter 2.5 in mice [ J ]. *Antioxidants*, 2022, 11(7): 1376.
- [ 5 ] 石浩, 吴红燕, 王欣, 等. 交通相关 PM2.5 及其水溶性成分诱导哮喘大鼠脾脏自噬及 NLRP3 炎症小体活化的机制研究 [ J ]. *现代预防医学*, 2022, 49(4): 621 - 626.
- Shi H, Wu HY, Wang X, et al. Mechanism of splenautophagy and NLRP3 inflammatory corpuscle activation induced by traffic related PM2.5 and its water - soluble components in asthmatic rats [ J ]. *Modern Preventive Medicine*, 2022, 49(4): 621 - 626.
- [ 6 ] Yan K, Hou TH, Zhu LY, et al. PM2.5 inhibits system Xc - activity to induce ferroptosis by activating the AMPK - Beclin1 pathway in acute lung injury [ J ]. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 2022, 245: 114083.
- [ 7 ] Bao C, Liu C, Liu Q, et al. Liproxstatin - 1 alleviates LPS/IL - 13 - induced bronchial epithelial cell injury and neutrophilic asthma in mice by inhibiting ferroptosis [ J ]. *International Immunopharmacology*, 2022, 109: 108770.
- [ 8 ] Yang YS, Jiang YF, Qian DY, et al. Prevention and treatment of osteoporosis with natural products: Regulatory mechanism based on cell ferroptosis [ J ]. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2023, 18(1): 951.
- [ 9 ] Liu YQ, Gu W. p53 in ferroptosis regulation: the new weapon for the old Guardian [ J ]. *Cell Death and Differentiation*, 2022, 29(5): 895 - 910.
- [ 10 ] 王静, 赵会超, 吴红燕, 等. 交通相关 PM2.5 不同组分对哮喘大鼠肺部炎症及外周血中 Treg 细胞比例的影响 [ J ]. *环境与健康杂志*, 2019, 36(4): 283 - 287, 封 3.
- Wang J, Zhao HC, Wu HY, et al. Effects of different components of traffic - related PM2.5 on lung inflammation and Treg cells ratio in peripheral blood of rats with asthma [ J ]. *Journal of Environment and Health*, 2019, 36(4): 283 - 287, seal 3.
- [ 11 ] 赵会超, 王静, 吴红燕, 等. 交通相关 PM2.5 及其不同成分对哮喘大鼠 Th17 细胞和相关细胞因子的影响 [ J ]. *环境与职业医学*, 2019, 36(5): 438 - 444.
- Zhao HC, Wang J, Wu HY, et al. Effects of traffic related PM2.5 and its components on Th17 cells and related cytokines in asthmatic rats [ J ]. *Journal of Environmental & Occupational Medicine*, 2019, 36(5): 438 - 444.
- [ 12 ] Wang Y, Liao S, Pan ZH, et al. Hydrogen sulfide alleviates particulate matter - induced emphysema and airway inflammation by suppressing ferroptosis [ J ]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2022, 186: 1 - 16.
- [ 13 ] Tang DL, Chen X, Kang R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications [ J ]. *Cell Research*, 2021, 31(2): 107 - 125.
- [ 14 ] Pope LE, Dixon SJ. Regulation of ferroptosis by lipid metabolism [ J ]. *Trends in Cell Biology*, 2023, 33(12): 1077 - 1087.
- [ 15 ] Park M, Cho YL, Choi Y, et al. Particulate matter induces ferroptosis by accumulating Iron and dysregulating the antioxidant system [ J ]. *BMB Reports*, 2023, 56(2): 96 - 101.
- [ 16 ] Liu YQ, Gu W. The complexity of p53 - mediated metabolic regulation in tumor suppression [ J ]. *Seminars in Cancer Biology*, 2022, 85: 4 - 32.
- [ 17 ] Zhang CP, Liu ZX, Zhang YH, et al. " Iron free " Zinc oxide nanoparticles with ion - leaking properties disrupt intracellular ROS and Iron homeostasis to induce ferroptosis [ J ]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11(3): 183.
- [ 18 ] Hong HH, Lin XQ, Xu YD, et al. Cadmium induces ferroptosis mediated inflammation by activating Gpx4/Ager/p65 axis in pancreatic  $\beta$  - cells [ J ]. *Science of the Total Environment*, 2022, 849: 157819.
- [ 19 ] Shou YH, Yang L, Yang YS, et al. Inhibition of keratinocyte ferroptosis suppresses psoriatic inflammation [ J ]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12(11): 1009.

收稿日期: 2023-12-02

## (上接第 997 页)

- [ 7 ] 曾光. 现代流行病学方法与应用 [ M ]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1994.
- Zeng G. *Modern epidemiological methods and applications* [ M ]. Beijing: Beijing Medical University China Union Medical University Joint Publishing House, 1994.
- [ 8 ] 杨嘉文. 探究晚期恶性肿瘤患者接受替吉奥胶囊姑息治疗的生存情况 [ J ]. *黑龙江医学*, 2021, 45(3): 276 - 277, 280.
- Yang JW. To explore the survival of patients with advanced malignant tumor receiving palliative treatment of Tegafur Gimeracil Oteracil Potassium capsule [ J ]. *Heilongjiang Medical Journal*, 2021, 45(3): 276 - 277, 280.
- [ 9 ] 张利娜, 曹亚军, 王翠霞, 等. 社区安宁疗护应用姑息预后指数对患者生存分析的研究 [ J ]. *山西医药杂志*, 2023, 52(13): 988 - 992.
- Zhang LN, Cao YJ, Wang CX, et al. Study on the application of palliative prognosis index in community palliative care for patient survival analysis [ J ]. *Shanxi Medical Journal*, 2023, 52(13): 988 - 992.
- [ 10 ] 陶誉鹭, 冯校, 何淑玲. 肺癌患者姑息照护的研究进展 [ J ]. *黑龙江医学*, 2023, 47(11): 1406 - 1408.
- Tao YL, Feng J, He SL. Research progress of palliative care for patients with lung cancer [ J ]. *Heilongjiang Medical Journal*, 2023, 47(11): 1406 - 1408.
- [ 11 ] 唐莺莺, 徐夏燕. 基于姑息预后指数的晚期非小细胞肺癌患者的生存分析 [ J ]. *中国卫生统计*, 2022, 39(6): 932 - 934, 939.
- Tang YY, Xu XY. Survival analysis of advanced non - small cell lung cancer patients based on palliative prognosis index [ J ]. *Chinese Journal of Health Statistics*, 2022, 39(6): 932 - 934, 939.

收稿日期: 2023-11-22