



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109839498 A

(43)申请公布日 2019.06.04

(21)申请号 201711202505.6

(22)申请日 2017.11.27

(71)申请人 中国科学院大连化学物理研究所

地址 116023 辽宁省大连市中山路457号

(72)发明人 宋肖垚 陈吉平 耿柠波 张海军
张亦弛

(74)专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司 21002

代理人 马驰

(51)Int.Cl.

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

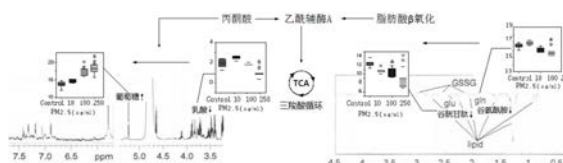
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种PM_{2.5}颗粒对人肺细胞内自由基代谢通路影响的评估方法

(57)摘要

本发明公开了一种PM_{2.5}全化学组分颗粒对细胞内自由基代谢影响的评估方法。通过PM_{2.5}全化学组分颗粒对人肺-支气管上皮细胞的暴露,利用液相色谱质谱(LC-MS)对细胞内小分子代谢产物进行能有效分析,结合生物学检测方法对酶活性进行快速分析,整合与胞内自由基代谢相关的小分子代谢产物的变化以及能量代谢中起关键作用的限速酶的活性变化,综上,基于分子生物学构建了一套评估细胞受外源性污染毒作用暴露后细胞内氧自由基代谢干扰的新方法。该方法能直观的分析污染物对细胞内自由基代谢路径的影响,同时本发明具有前处理方法简单,检测快速,重复性好,获得信息量全面等优点。



1. 一种PM_{2.5}全化学组分颗粒对人肺细胞内自由基代谢通路影响的评估方法,其特征在于以下步骤:

(a) 原代培养人肺上皮细胞接种于六孔板,接种密度为 1×10^5 个/mL六孔板内每孔加入培养液体积为3mL;在培养箱培养24-48h (37℃, 5%CO₂),待细胞进入对数生长期覆盖培养板80%后;用PM_{2.5}全化学组分颗粒对人肺细胞进行暴露,即移弃原培养液,每孔加入PM_{2.5}全化学组分颗粒的培养液3mL,以保证细胞生长营养需求,在原条件下培养24小时后收取细胞;

(b) 步骤a所得细胞样品提取细胞内小分子代谢产物;利用基于LC-MS的质谱方法对小分子代谢产物进行定量分析;

(c) 步骤a所得细胞样品,经超声破碎制得悬液,测定与能量代谢相关酶的活性;

所述加入含PM_{2.5}全化学组分颗粒的培养液为1~4mL,优选3mL,浓度为10μg/mL-250μg/mL。

2. 根据权利要求1所述的研究方法,其特征在于:步骤b)中提取细胞内小分子代谢产物的过程具体分为两步:

第一步,脂肪酸提取,移弃培养液,每孔加入1ml 18.2MΩ超纯水清洗,废液弃完全且无残留,每孔加满液氮淬灭细胞;待液氮挥发后,每孔加入0.5ml 18.2MΩ超纯水,超声破碎1~10min,优选5min,破碎后的悬液移出,尽量保证无细胞碎片残留,转移完全,,置于EP管中于-60~-30℃,优选-40℃冷冻干燥,冻干后加入10~20μL,优选20μL内标混合液(正亮氨酸浓度为200nmol/L,十一酸浓度为10mg/L,十九酸浓度为10mg/L,溶剂为乙腈),涡旋混匀;加入400μL MTBE涡旋提取20min,加入260μL水涡旋5min混匀,12000rpm/min、4℃下离心20min,取上清氮气吹干,乙腈定容,LC-MS分析游离脂肪酸;

第二步,氨基酸,葡萄糖,乳酸的提取,脂肪酸提取后剩余部分依次加入100μL MTBE和130μL甲醇,涡旋震荡20min,12000rpm/min、4℃下离心20min,取下层直接用于串联四极杆复合线性离子阱质谱分析。

3. 根据权利要求2所述的研究方法,其特征在于:在小分子代谢产物定量分析中,非极性组分分离脂肪酸的分离色谱柱为Ufavour C₈柱(waters,150mm×2.1mm,3.0μm),流动相A为H₂O,B为含1-5mM乙酸铵的乙腈,C为乙腈;流动相梯度为(时间,B和C的体积百分数,流速):0-5min,20%B,70%C,250μL/min;在1分钟内C由70%增加为80%;7-15min,20%B,80%C,250μL/min;16-20min,20%B,70%C,300μL/min;上述过程中流动相A与流动相B总流速始终为200μL/min,进样量为5μL;质谱扫描模式为ESI(-)MRM,整个分析过程在18min内完成。

4. 根据权利要求1所述的研究方法,其特征在于:在小分子代谢产物定量分析中,极性组分包括氨基酸,葡萄糖和乳酸,其分离色谱柱为AtlantisC₁₈高效液相色谱柱(waters,150mm×2.1mm,3.0μm);流动相A为含0.1-0.5%(体积百分比)甲酸的H₂O,流动相B为甲醇;流动相梯度为:0-2min,95%A and 5%B;然后在3min之内A减少为40%,B增加为60%,维持4min;在1分钟内A增加到95%,B减少为5%,维持8min;上述过程中流动相A与流动相B总流速始终为200μL/min,进样量为5μL;质谱扫描模式为ESI(+)MRM;整个分析过程在20min内完成。

5. 根据权利要求1所述的研究方法,其特征在于:步骤c的具体操作步骤为:弃细胞培养

液,确保无残留,用PBS清洗细胞3次,洗净残液,每孔加入0.2mL胰酶,消化1-3min,待细胞从壁上脱落,每孔加1mL胎牛血清终止消解;将所有液体转移至EP管,清洗细胞,加入1mL PBS,重悬细胞,4℃、2000rpm/min离心5min,弃上清;加入1.5mL PBS缓冲液重复上述操作1~3次;弃上清后,加入1mL PBS缓冲液,在冰水浴条件下进行超声破碎:超声10s,间歇10s,循环时间为5min,得到破碎悬液。

6.根据权利要求1或4所述的研究方法,其特征在于:运用酶联免疫吸附法,所述与能量代谢相关酶,即氧化损伤相关酶包括糖酵解过程中的限速酶;脂肪酸 β 氧化过程中关键酶;氨基酸代谢过程中关键酶;其中己糖激酶、磷酸果糖激酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化物酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽过氧化物酶和蛋白酪氨酸磷酸酶的测定采用酶联免疫标准作业程序吸附测定。

7.根据权利要求1所述的研究方法,其特征在于:所述培养液为肺上皮细胞专用培养液,其特殊性体现于,无血清,牛垂体提取物2ml/500ml,氢化可的松0.5ml/500ml、人表皮生长因子0.5ml/500ml、肾上腺素0.5ml/500ml、胰岛素0.5ml/500ml、转铁蛋白0.5ml/500ml、碘甲状腺原氨酸0.5ml/500ml、视黄酸0.5ml/500ml和庆大霉素/两性霉素-B 0.5m/500ml,以模拟该细胞的正常生长条件。

一种PM_{2.5}颗粒对人肺细胞内自由基代谢通路影响的评估 方法

技术领域

[0001] 本发明属于大气颗粒物毒性评价领域,涉及一种基于分子生物学及分析化学的评估方法,通过大气颗粒物对细胞能量代谢通路的改变来评估小剂量环境污染物的细胞毒性。

背景技术

[0002] 大气细颗粒物 (Atmospheric fine particles) 其组成复杂,空气动力学直径小于 2.5 μ m 颗粒物 (PM_{2.5}, 可入肺颗粒物) 是本专利权益的核心聚焦物质, 其具有远距离环境迁移的能力、环境持久性以及生物蓄积等特性。PM_{2.5} 颗粒组分是复杂的, 非均相混合物, 颗粒物本身属于类难溶颗粒, 在时间和空间上存在很大的可变因素, 其组分包含了许多不同的化学成分并具有相近的物理特性, PM_{2.5} 的化学成分包括硫酸盐, 硝酸盐, 铵等; 水溶性无机离子如钠, 钾, 钙, 镁和氯等; 有机和元素碳, 碳黑, 地壳物质, 颗粒结合水, 二氧化钛, 金属 (包括镉, 铜, 镍离子, 钒和锌) 和多环芳烃 (PAH) 等; 此外, 生物组分, 例如过敏原和微生物化合物存在其中。人类排放活动进一步结合地形和气象条件会导致更高的城市空气污染, 地中海地区的许多研究发现, 短期和长期暴露于环境可吸入肺颗粒物与呼吸系统疾病、肺癌、哮喘和心血管系统疾病发病率和死亡率的增加密切相关。以往毒理学研究表明, 颗粒物粒子的粒径越小, 其比表面积越大, 对空气中的重金属、多环芳烃等污染物的吸附能力越强, 这些吸附在颗粒上的组分是引起呼吸循环系统氧化损伤的主要成分。但是已有的毒理学研究都是基于高剂量动物实验, 与现实中人类低剂量的暴露环境存在剂量差异和物种差异, 针对以上存在的问题, 开展以人源细胞体外模型为受体的研究来评估长时间低剂量 PM_{2.5} 颗粒物全组分的毒性作用, 用以探索 PM_{2.5} 颗粒物全组分的毒性作用机制具有深远的意义。

[0003] 自由基与氧化损伤是指在有害刺激因素作用下, 活性氧自由基产生过多或发生代谢障碍, 细胞体内氧化及抗氧化体系失衡, 诱发基因突变、蛋白质变性和脂质过氧化, 进而损伤细胞溶酶体、线粒体等细胞器, 导致细胞的生理生化及代谢功能发生障碍致细胞死亡的一系列生物化学变化。。PM_{2.5} 颗粒本身具有环境稳定性的自由基, 大量附着在 PM_{2.5} 颗粒表面的有机化合物被代谢激活成为亲电反应代谢物, 导致细胞内活性氧 (ROS) 的产生增多或因其代谢障碍而在胞内增多; 其次, PM_{2.5} 释放的挥发性有机物和多环芳烃等物质, 可以通过激活芳香烃受体引起细胞色素 P₄₅₀ 酶等的基因表达增强, 对细胞造成毒性作用损害; 再次, 存在于 PM_{2.5} 颗粒上过渡金属元素如 Fe、Cu 和 Zn 等, 可直接诱导细胞内自由基的生成。但长久以来, 研究人员很少能通过代谢通路来研究氧化损伤, 在细胞氧化损伤通路中, 糖酵解能够为迅速增殖的细胞提供能量, 以及所需要的各种物质, 除了葡萄糖之外, 谷氨酰胺代谢能够为细胞的增殖提供氮源并参与三羧酸循环, 也是重要途径之一。还有研究表明脂类物质氧化, 如脂肪酸 β 氧化的终产物乙酰辅酶 A 可以进入三羧酸循环参与自由基代谢。因此葡萄糖、脂肪酸、氨基酸转运和代谢对细胞内自由基代谢至关重要。除了参与细胞内能量代谢的

小分子代谢产物外,调控各个能量代谢通路的酶也表现出重要作用,PM_{2.5}暴露产生的自由基作为功能性信号分子,触发核转录因子易位到细胞核,从而导致抗氧化酶系统转录异常,引起调控糖酵解的关键酶包括己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶;过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶表达改变并降低其活性,也可引起过氧化物酶和血红素氧化酶活动异常及谷胱甘肽代谢酶如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽过氧化物酶和蛋白酪氨酸磷酸酶等活性显著降低。综合以上分析,本发明基于分子生物学构建了一种细胞受外源性污染物暴露后自由基氧化损伤代谢受到影响的评估方法。该方法利用小分子代谢产物构建了细胞的自由基氧化损伤代谢通路。并通过测定代谢中起关键调控作用的酶,全面直观的分析了PM_{2.5}颗粒物全组分对细胞自由基代谢路径的影响,是一种理想的评价手段。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种评估外源污染物对细胞自由基代谢干扰的方法。首先利用LC-MS对胞内小分子代谢产物进行有效的分析,其次利用生物学检测方法对酶活性进行快速分析,基于分子生物学构建了细胞能量代谢通路,用于评估外源污染物暴露对细胞自由基代谢的干扰。该方法具有前处理方法简单,检测快速,重复性好,获得信息量全面等优点。是一套直观全面分析污染物对细胞自由基代谢路径影响实用性技术方法。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案为:

[0006] 一种PM_{2.5}全化学组分颗粒对人肺细胞内自由基代谢通路影响的评估方法,其特征在于以下步骤:

[0007] (a) 原代培养人肺上皮细胞接种于六孔板,接种密度为 1×10^5 个/mL六孔板内每孔加入培养液体积为3mL;在培养箱培养24-48h (37℃, 5% CO₂),待细胞进入对数生长期覆盖培养板80%后;用PM_{2.5}全化学组分颗粒对人肺细胞进行暴露,即移弃原培养液,每孔加入PM_{2.5}全化学组分颗粒的培养液3mL,以保证细胞生长营养需求,在原条件下培养24小时后收取细胞;

[0008] (b) 步骤a所得细胞样品提取细胞内小分子代谢产物;利用基于LC-MS的质谱方法对小分子代谢产物进行定量分析;

[0009] (c) 步骤a所得细胞样品,经超声破碎制得悬液,测定与能量代谢相关酶的活性;

[0010] 所述加入含PM_{2.5}全化学组分颗粒的培养液为1~4mL,优选3mL,浓度为10μg/mL-250μg/mL。

[0011] 步骤b) 中提取细胞内小分子代谢产物的过程具体分为两步:

[0012] 第一步,脂肪酸提取,移弃培养液,每孔加入1ml 18.2MΩ超纯水清洗,废液弃完全且无残留,每孔加满液氮淬灭细胞;待液氮挥发后,每孔加入0.5ml 18.2MΩ超纯水,超声破碎1~10min,优选5min,破碎后的悬液移出,尽量保证无细胞碎片残留,转移完全,,置于EP管中于-60~-30℃,优选-40℃冷冻干燥,冻干后加入10~20μL,优选20μL内标混合液(正亮氨酸浓度为200nmol/L,十一酸浓度为10mg/L,十九酸浓度为10mg/L,溶剂为乙腈),涡旋混匀;加入400μL MTBE涡旋提取20min,加入260 μL水涡旋5min混匀,12000rpm/min、4℃下离心20min,取上清氮气吹干,乙腈定容,LC-MS分析游离脂肪酸;

[0013] 第二步,氨基酸,葡萄糖,乳酸的提取,脂肪酸提取后剩余部分依次加入100μL

MTBE和130 μ L甲醇,涡旋震荡20min,12000rpm/min、4℃下离心20min,取下层直接用于串联四极杆复合线性离子阱质谱分析。

[0014] 在小分子代谢产物定量分析中,非极性组分游离脂肪酸的分离色谱柱为Ufavour C₈柱(waters,150mm $\times$ 2.1mm,3.0 μ m),流动相A为H₂O,B 为含1-5mM乙酸铵的乙腈,C为乙腈;流动相梯度为(时间,B和C的体积百分数,流速):0-5min,20%B,70%C,250 μ L/min;在1分钟内C 由70%增加为80%;7-15min,20%B,80%C,250 μ L/min;16-20min,20% B,70%C,300 μ L/min;上述过程中流动相A与流动相B总流速始终为 200 μ L/min,进样量为5 μ L;质谱扫描模式为ESI(-)MRM,整个分析过程在18min内完成。

[0015] 在小分子代谢产物定量分析中,极性组分包括氨基酸,葡萄糖和乳酸,其分离色谱柱为Atlantis C₁₈高效液相色谱柱(waters,150mm $\times$ 2.1mm,3.0 μ m);流动相A为含0.1-0.5%(体积百分比)甲酸的H₂O,流动相B为甲醇;流动相梯度为:0-2min,95%Aand 5%B;然后在3min之内A减少为40%,B增加为60%,维持4min;在1分钟内A增加到95%,B减少为5%,维持8min;上述过程中流动相A与流动相B总流速始终为 200 μ L/min,进样量为5 μ L;质谱扫描模式为ESI(+)MRM;整个分析过程在20min内完成。

[0016] 步骤c的具体操作步骤为:弃细胞培养液,确保无残留,用PBS清洗细胞3次,洗净残液,每孔加入0.2mL胰酶,消化1-3min,待细胞从壁上脱落,每孔加1mL胎牛血清终止消解;将所有液体转移至EP管,清洗细胞,加入1mL PBS,重悬细胞,4℃、2000rpm/min离心5min,弃上清;加入1.5mL PBS缓冲液重复上述操作1~3次;弃上清后,加入1mL PBS 缓冲液,在冰水浴条件下进行超声破碎:超声10s,间歇10s,循环时间为5min,得到破碎悬液。

[0017] 运用酶联免疫吸附法,所述与能量代谢相关酶,即氧化损伤相关酶包括糖酵解过程中的限速酶;脂肪酸 β 氧化过程中关键酶;氨基酸代谢过程中关键酶;其中己糖激酶、磷酸果糖激酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化物酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽过氧化物酶和蛋白酪氨酸磷酸酶的测定采用酶联免疫标准作业程序吸附测定。

[0018] 所述培养液为肺上皮细胞专用培养液,其特殊性体现于,无血清,牛垂体提取物2ml/500ml,氢化可的松0.5ml/500ml、人表皮生长因子 0.5ml/500ml、肾上腺素0.5ml/500ml、胰岛素0.5ml/500ml、转铁蛋白 0.5ml/500ml、碘甲状腺原氨酸0.5ml/500ml、视黄酸0.5ml/500ml和庆大霉素/两性霉素-B 0.5m/500ml,以模拟该细胞的正常生长条件。本发明的有益效果如下:

[0019] (1) 本发明以能量代谢通路做为评价指标,比其它毒性评价指标更加灵敏,用于小剂量污染物或亚慢性毒性污染物暴露能够更加真实反映环境真实情况。采用能量代谢通路的整体方案来研究污染物毒性作用,还具有获得信息直观,全面的优点。

[0020] (2) 本发明以人源细胞体外模型来研究污染物的毒性作用,能够减小常规毒性评估外推到人时由于物种不同带来的差异。用以探索污染物的毒性作用机制具有深远的意义。

[0021] (3) 本发明所需样本量小,基于质谱的数据获得方式具有简单快速、灵敏度高、特异性好、重复性好等优点。

附图说明

[0022] 图1为本发明基于小分子代谢产物构建的细胞内自由基代谢干扰通路。

[0023] 图2为自由基代谢过程中起主要调控作用的酶的作用通路。

具体实施方式

[0024] 本实施例中所述PM_{2.5}颗粒取自大连市市区。

[0025] 实施例:PM_{2.5}全化学组分颗粒暴露影响对人肺上皮细胞自由基代谢的影响

[0026] 首先对人肺上皮细胞进行培养与暴露,步骤如下:

[0027] 将人肺上皮细胞接种于六孔板上,接种密度为 1×10^5 个/mL,六孔板内每孔培养液体积为3mL,培养液无血清,且添加:牛垂体提取物2mL/500mL,氢化可的松0.5mL/500mL人表皮生长因子0.5mL/500mL、肾上腺素 0.5mL/500mL、胰岛素0.5mL/500mL、转铁蛋白0.5mL/500mL、碘甲状腺原氨酸0.5mL/500mL、视黄酸0.5mL/500mL和庆大霉素/两性霉素-B 0.5mL/500mL,模拟细胞的正常生长条件。在培养箱培养24h (37℃,5%CO₂),待细胞进入对数生长期铺满孔底80%,分为四个剂量组进行PM_{2.5}全化学组分颗粒暴露。具体步骤为移弃原培养液,每孔加入含PM_{2.5}全化学组分颗粒的培养液(浓度为10μg/mL,50μg/mL,100μg/mL 250μg/mL) 3mL,在原条件下培养 24h后收取细胞样品,每个浓度平行样个数为6个。

[0028] 细胞内小分子代谢产物的提取与分析

[0029] (1) 24h暴露后,吸弃细胞培养液,确保无残留,每孔用1mL 18.2MΩ 超纯水快速水洗,在每板中加满液氮淬灭,每孔加入0.5mL 18.2MΩ 超纯水超声破碎5min,经破碎后的悬液移出置于1.5mL EP离心管中,-40℃冷冻干燥。冻干后加入10μL内标混合液(正亮氨酸200nmol/L,十一酸10mg/L,十九酸10mg/L,溶剂为乙腈),涡旋15min至混匀。

[0030] (2) 第一步脂肪酸提取,加入MTBE量为400μL,涡旋振荡20min,加入超纯水260μL,4℃下离心12000rpm×20min,取上清氮气吹干后用乙腈定容至400μL,用LC-MS对细胞内20种脂肪酸组分进行分析。分离色谱柱为Ufavour C₈柱(150mm×2.1mm,3.0μm),流动相A为H₂O,B为5mM乙酸铵的乙腈,C为乙腈;流动相梯度为(时间,B和C的体积百分数,流速):0-5min,20%B,70%C,250μL/min;确保在1分钟内C由70%增加为80%;7-15min,20%B,80%C,250μL/min;16-20min,20%B,70%C,300μL/min;上述过程中流动相A与流动相B总流速始终为200μL/min,进样量为5μL。质谱扫描模式为ESI(-)MRM,整个分析过程在18min内完成。

[0031] (3) 第二步为氨基酸,葡萄糖,乳酸的提取,脂肪酸提取后剩余部分再依次加入100μL MTBE,130μL甲醇,涡旋震荡20min,4℃高速离心(12000 rpm×20min),取下层直接用于LC-MS分析,其分离色谱柱为Atlantis C₁₈高效液相色谱柱(waters,150mm×2.1mm,3.0μm);流动相A为含0.1%(体积百分比)甲酸的H₂O,流动相B为甲醇;流动相梯度为:0-2min,95%Aand 5%B;然后在3min之内A减少为40%,B增加为60%,维持4min;在1分钟内A增加到95%,B减少为5%,维持8min;上述过程中流动相A与流动相B总流速始终为200μL/min,进样量为5 μL。质谱扫描模式为ESI(+)MRM。整个分析过程在20min内完成。细胞内自由基代谢相关酶的提取与分析:

[0032] (1) 经24h暴露后,吸弃细胞培养液,用PBS清洗细胞3次,洗净残液,每孔加入0.2mL胰酶消解,消化3min,待细胞从壁上脱落,加1mL胎牛血清终止消解,转移至1.5mLEP离心管,清洗细胞,加入1ml PBS,重悬细胞,4℃下,2000rpm×5min离心,弃上清,加入1.5ml PBS缓冲液重复上述操作一次,最终获得细胞沉淀;弃上清后加入1mL PBS 在冰水浴条件超声破

碎,超声破碎方式为:超声10s,间歇10s,总时间为5min,得到破碎细胞悬液。

[0033] (2) 自由基代谢相关酶己糖激酶、磷酸果糖激酶、ATP酶等多种酶,采用酶联免疫吸附测定。取细胞破碎悬液100 μ L,8 $^{\circ}$ C下12000rpm $\times$ 20min 离心,取上清10 μ L,按照酶联免疫吸附标准作业程序,依次进行加样,温育,洗涤,加酶,温育,洗涤,显色,终止等操作,利用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度值。

[0034] (3) 丙酮酸激酶依循测定原理:在二磷酸腺苷存在的条件下,丙酮酸激酶催化磷酸烯醇丙酮酸转化成丙酮酸,在荧光标记还原型辅酶I (NADH) 存在情况下,丙酮酸被乳酸脱氢酶转化为乳酸,有荧光的NADH变为无荧光的NAD。细胞破碎悬液可直接使用,利用酶标仪在340nm波长下测定吸光度值。

[0035] 结果表明,PM_{2.5}全化学组分颗粒可以导致人肺/支气管上皮细胞发生氧化应激反应,通过代谢组学的方法,发现,PM_{2.5}全化学组分颗粒影响细胞内自由基代谢,细胞内活性氧、ATP酶和丙二醛含量随着暴露剂量的增加而增加,细胞内一氧化氮、己糖激酶、磷酸果糖激酶以及丙酮酸激酶的含量随着暴露剂量的增加而下降,表明PM_{2.5}全化学组分颗粒通过改变细胞内与氧自由基反应和脂质过氧化反应促进了细胞内氧化应激的发生。

[0036] 本发明以细胞自由基代谢通路中小分子代谢产物和起关键调控作用的酶做为评价指标,用于小剂量外源化合物或亚慢性毒性污染物体外毒性评价方法,不仅比其它毒性评价指标更加灵敏,还具有获得信息全面直观的优点,能够更加确切地反映环境真实情况。本发明以人源肺上皮细胞作为体外模型来研究PM_{2.5}全化学组分颗粒的毒性作用,能够减小常规毒性评估外推到人时由于物种不同带来的差异,在探索污染物的毒性作用机制方面具有深远的意义。

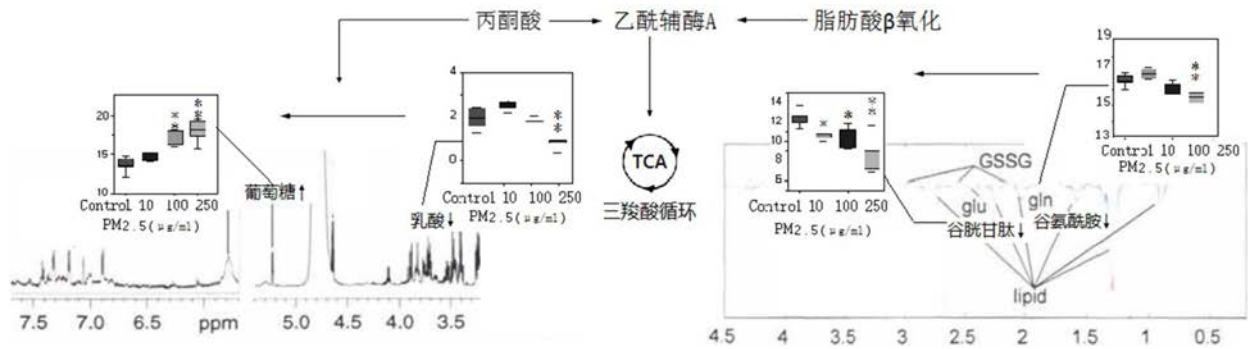
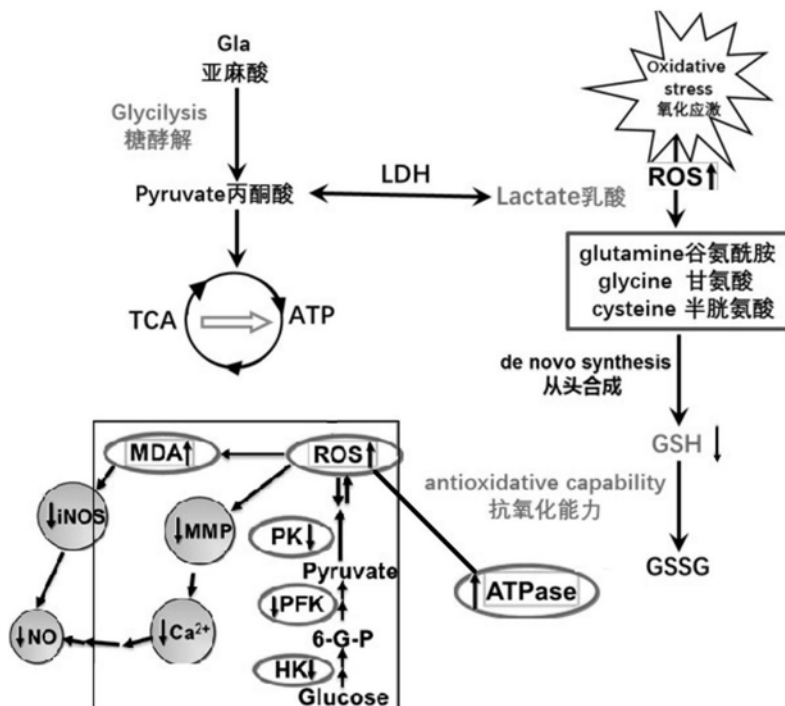


图1



PK: 丙酮酸激酶
 PFK: 磷酸果糖激酶
 HK: 己糖激酶
 ATPase: ATP 酶

图2

专利名称(译)	一种PM2.5颗粒对人肺细胞内自由基代谢通路影响的评估方法		
公开(公告)号	CN109839498A	公开(公告)日	2019-06-04
申请号	CN201711202505.6	申请日	2017-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
[标]发明人	陈吉平 耿柠波 张海军 张亦弛		
发明人	宋肖焱 陈吉平 耿柠波 张海军 张亦弛		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53		
代理人(译)	马驰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种PM2.5全化学组分颗粒对细胞内自由基代谢影响的评估方法。通过PM2.5全化学组分颗粒对人肺-支气管上皮细胞的暴露，利用液相色谱质谱(LC-MS)对细胞内小分子代谢产物进行能有效分析，结合生物学检测方法对酶活性进行快速分析，整合与胞内自由基代谢相关的小分子代谢产物的变化以及能量代谢中起关键作用的限速酶的活性变化，综上，基于分子生物学构建了一套评估细胞受外源性污染毒作用暴露后细胞内氧自由基代谢干扰的新方法。该方法能直观的分析污染物对细胞内自由基代谢路径的影响，同时本发明具有前处理方法简单，检测快速，重复性好，获得信息量全面等优点。

