Агаарын PM2.5 нарийн ширхэгт тоосонцор элэгний хавдрын шугаман эсэд үзүүлэх нөлөөг *in vitro* орчинд судалсан дүн

Д.Юндэндаш[1,2], Л.Сугар[2], Э.Билгүүн[2], Н.Ням-Эрдэнэ[2], Э.Есүхэй[2], Т.Одончимэг[2], Б.Батчимэг[1,2], Б.Мөнхцэцэг[2], Ж.Сарантуяа[1,3], С.Мөнхбаяр[2]

[1]АШУҮИС, Био-АС, Молекул биологи-Удамзүйн тэнхим
[2]АШУҮИС, Анагаах Ухааны Хүрээлэн
[3]АШУҮИС, Био-Анагаахын хүрээлэн
Цахим шуудан: yundendash.ims@mnums.edu.mn, Утас: 88096789

Түлхүүр үг:

HepG2
Агаарын бохирдол
Particulate matter
Нүүн шилжилт

Товч утга:

Үндэслэл: Агаарын нарийн ширхэгт тоосонцор PM2.5 нь 2.5 микрометрийн аэродинамик голчтой ба тээврийн хэрэгсэл, үйлдвэрийн болон ахуйн гаралтай түлшний шатах процессын үед ялгардаг олон төрлийн химийн бодис бүхий холимог төлөвтэй нэгдэл юм. *Ruyi Li* нарын судалгаагаар агаарын PM2.5 нарийн ширхэгт тоосонцор Matrix metalloproteinases (MMPs) уургуудын нийлэгжилд нөлөөлөх замаар хавдрын нүүн шилжилт, эмгэг жамд оролцдог байж болзошгүй талаар өгүүлсэн байна. *Qian zhang* нарын судалгаанд элэгний эст өмөнгийн эсийн үржил, нэвчилт, нүүн шилжилтэд PM2.5 тоосонцор (PM-Particulate matter) нөлөөлж буйг дурджээ. **Зорилго:** Агаарын PM2.5 нарийн ширхэгт тоосонцрын элэгний хавдрын эсэд (HepG2) үзүүлэх нөлөөг *in vitro* орчинд судлан тогтоох. **Арга, аргачлал:** Анагаах Ухааны Хүрээлэн (АУХ)-ийн Эрдэм шинжилгээний төв лабораторийн эсийн банкинд хадгалагдаж буй элэгний эст өмөнгийн HepG2 шугаман эсийг ашиглаж дулбеккогийн эсийн тэжээлт орчинд 10% ургийн үхрийн ийлдэс, 1%-ийн антибиотикийн холимог нэмэн 5%-ийн CO_2-ийн агууламжтай 37^0C-ийн орчинд өсгөвөрлөж, 4-5 удаагийн сэлгэн зорчуулалт хийсний дараа туршилтад ашигласан. Элэгний хавдрын HepG2 шугаман эсийн өсгөврийг Улаанбаатар хотын Бөхийн өргөө орчмоос 2019 оны 03 сард цуглуулсан PM2.5 тоосонцрын тодорхой тунгаар үйлчилж, МТТ шинжилгээний аргаар эсийн амьдрах чадварыг тодорхойлон сонгосон тунг дараагийн туршилтуудад ашиглав. HepG2 эсийн нүүн шилжилт, хавдрын эсийн үсэрхийлэлд оролцдог MMP1, MMP9 уургуудын нийлэгжилтийг *wound healing* болон иммуноцитохимийн аргуудаар тус тус тодорхойлж, хяналтын бүлэгтэй харьцуулав. Микроскопын тусламжтай зураг авч Image J программыг ашиглан үр дүнг боловсруулав. Үр дүнгийн статистик боловсруулалтыг Microsoft Excel 2010 программаар, графикийг Graphpad Prism 8 программыг ашиглан хийж гүйцэтгэв. Бүлгүүдийн хоорондын ялгааг Стюдентийн Т тестээр үр дүнг тооцоолон боловсруулсан ба p утгыг <0.05 байх үед ач холбогдолтой гэж үзэв. **Үр, дүн:** МТТ шинжилгээний үр дүнд PM2.5 тоосонцрын 5, 15 мкг/мл тунгууд эсийн амьдрах чадварыг нэмэгдүүлж (103.2, 108.1%) байсан бол 25 мкг/мл-ээс дээш тун хамааралтайгаар эсийн амьдрах чадварыг дарангуйлж байв. МТТ шинжилгээний үр дүнгээр сонгон авсан PM2.5 тоосонцрын 5, 15, 25 мкг/мл тунгаар HepG2 эсэд үйлчилснээс 24 болон 48 цагийн дараа *wound healing* шинжилгээгээр хяналтын бүлгийн эсүүд зурвасын 49%, 68%-ийг бүрхэн ургасан бол 5мкг/мл тун зурвасын 53%, 76%-ийг, 15 мкг/мл тун зурвасын 64%, 86%-ийг, 25 мкг/мл PM2.5 тоосонцрын тунгаар үйлчилсэн HepG2 эс зурвасын 49%, 66%-ийг тус тус бүрхэн ургасан байна. Улмаар PM2.5 тоосонцрын 15мкг/мл тунгаар HepG2 эсийг 24 цаг үйлчилсний дараа MMP1, MMP9 уургуудын нийлэгжилтийг иммуноцитохимийн шинжилгээний аргаар хяналтын бүлэгтэй харьцуулан үнэлэхэд хяналтын бүлэгт харах талбайн нийт эсийн 7.86% (3.35-11.57%)-д MMP1, 12.03% (7.44-18.28%)-д MMP9 уураг эерэг илэрцтэй байсан бол PM2.5 тоосонцроор үйлчилсэн бүлэгт 23.83% (13.40-34.04%)-д MMP1, 31.22% (26.72-35.97%)-д MMP9 уураг тус тус эерэг илэрцтэй байсан нь статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай байлаа ($p<0.001$), ($p<0.001$). **Дүгнэлт:** Улаанбаатар хотын Бөхийн өргөө орчмоос цуглуулсан PM2.5 тоосонцрын 25 мкг/мл-ээс дээш тунгууд *in vitro* орчинд HepG2 эсийн амьдрах чадварыг дарангуйлж байна. Мөн PM2.5 тоосонцор нь *in vitro* орчинд HepG2 шугаман эсийн нүүн шилжилтийг нэмэгдүүлсэн төдийгүй, нүүн шилжилтэд оролцдог MMP1, MMP9 уургуудын нийлэгжилтийг ихэсгэж байна.

Үндэслэл: Нарийн ширхэгт тоосонцор (PM-Particulate matter) нь идэвхгүй нүүрстөрөгчийн цөмөөс бүрдэх олон төрлийн химийн бодисоор бүрхэгдсэн хатуу, шингэн, холимог төлөвтэй бодисуудын нэгдэл юм[1,2]. Тээврийн хэрэгсэл, үйлдвэрийн болон ахуйн гаралтай түлшний шатах процессын үед ялгарсан агаар дахь хийн бохирдуулагчид 0.05 мкм хэмжээтэй цөмийг тойрон хэсэг хугацааны дараа бөөгнөрдөг. Уг бөөгнөрсөн хийн бохирдуулагчид биежиж агаар мандлын физик химийн процессын үр дүнд янз бүрийн хэлбэр, хэмжээтэй нарийн ширхэгт тоосонцруудыг үүсгэдэг[3,4]. Аэродинамик диаметр нь 2.5 микрометрээс бага тоосонцор (PM2.5) нь альвеолд нэвчиж агаар цусны хоригийг нэвтрэн цусны эргэлтэд орсноор[5] амьсгалын зам төдийгүй элэг, зүрх судас, бодисын солилцооны алдагдал гэх мэт олон эрхтний эмгэгт нөлөөлдөг[6]. Эпидемиологийн хэд хэдэн судалгаагаар агаарт агуулагдах PM2.5-ын концентраци өндөр (>35 мкг/м^3) байх нь хорт хавдар үүсэх эрсдэлийг нэмэгдүүлдэг болохыг дурдсан[7] бөгөөд олон улсын хорт хавдрын судалгааны агентлагаас хавдар үүсгэгчийн 1 дүгээр бүлэгт багтдаг[8,9].

Элэгний хорт хавдар (HCC) нь дэлхий даяар хорт хавдартай холбоотой нас баралтын зонхилох шалтгаануудын нэг юм[10]. *Zhang X* (2016) нарын судалгаанд элэгний эст өмөнгийн эсийн үржил, нэвчилт, нүүн шилжилтэд PM2.5 тоосонцор нөлөөлж буйг дурджээ[11]. *Li R* (2018) нарын судалгаагаар агаарын PM2.5 нарийн ширхэгт тоосонцор Matrix metalloproteinases (MMPs) уургуудын нийлэгжилд нөлөөлөх замаар хавдрын нүүн шилжилт, эмгэг жамд оролцдог байж болзошгүй талаар дурдсан байна[12]. PM2.5 тоосонцор элэгний хавдрын шугаман эсүүдэд хийгдсэн судалгаа ховор байгаа нь тус судалгааг хийх үндэслэл болж байна.

Зорилго: Агаарын PM2.5 нарийн ширхэгт тоосонцрын элэгний хавдрын эсэд (HepG2) үзүүлэх нөлөөг *in vitro* орчинд судлан тогтоох

Арга, аргачлал:

Агаарын PM2.5 нарийн ширхэгт тоосонцрын сорьц: Энэхүү судалгаанд АУХ-ийн Эрдэм шинжилгээний төв лабораторид 2018-2020 онд хийж гүйцэтгэсэн "Хавдрын эсийн идэвхжлийг өдөөх PM2.5 тоосонцрын нөлөөг эдийн маркер ашиглан судалсан дүн" сэдэвт суурь судалгааны төслийн хүрээнд SIBATA брендийн HV-500F аппарат ашиглан цуглуулсан PM2.5 тоосонцрын сорьцыг ашиглав.

Эсийн өсгөвөр: АУХ-ийн Эрдэм шинжилгээний төв лабораторийн эсийн банкинд хадгалагдаж буй элэгний эст өмөнгийн HepG2 шугаман эсийг дулбеккогийн эсийн тэжээлт орчинд 10% ургийн үхрийн ийлдэс нэмэн, 5%-ийн CO_2-ийн агууламжтай 37^{0}C-ийн орчинд өсгөвөрлөж, 4-5 удаагийн сэлгэн зорчуулалт хийсний дараа туршилтад ашигласан.

Эсийн амьдрах чадвар тогтоох MTT шинжилгээ: 96 үүрт бичил хавтанд эсийг өсгөвөрлөн PM2.5 нарийн ширхэгт тоосонцрын 5, 15, 25, 50, 75, 100, 125 мкг/мл тунгаар үйлчилж, MTT шинжилгээний аргаар эсийн амьдрах чадварыг тодорхойлов.

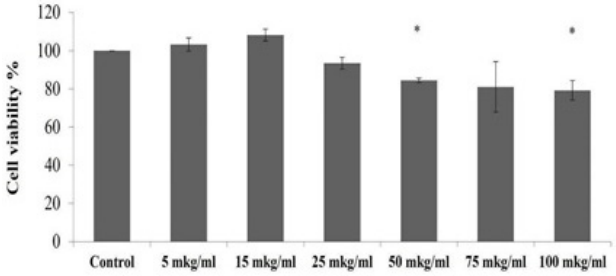
Wound healing шинжилгээний: HepG2 шугаман эсийг 2*10^6 эс байхаар тооцож 6 нүхт well-д эсийн дүүрэлт 80-90% болох хүртэл өсгөвөрлөнө. Эсийн өсгөвөрт 200 мкл-ийн пипетканы хошуугаар зурвас татаж MTT шинжилгээний үр дүнд үндэслэн 5, 15, 25 мкг/мл тунг сонгон авч эсэд үйлчилсэн бөгөөд 0, 24 болон 48 цагуудад зураг авч эсийн нүүн шилжилтийг хяналтын бүлэгтэй харьцуулан тодорхойлж, Image J программыг ашиглан үр дүнг боловсруулав.

Иммуноцитохимийн шинжилгээ: HepG2 шугаман эсийг 2*10^6 эс байхаар тооцож урьдчилан бэлтгэж ариутгасан 2.5х2.5 см хэмжээтэй бүрхүүл шилийг 35 мм-ийн эсийн өсгөврийн тавганд байрлуулан, эсийн дүүрэлт 80-90% болох хүртэл өсгөвөрлөв. Цаашид MTT шинжилгээний үр дүнгээр тодорхойлсон PM2.5 тоосонцрын тохирох тунгаар үйлчилж, иммуноцитохимийн шинжилгээг өнгө үзүүлэгч бодис (AEC) ашиглан протоколын дагуу туршилтыг хийж гүйцэтгэсэн. Өнгөний эрчим, эсийн будагдалтын хувийг Olympus CKX41 микроскопоор харж х100, х200, х400 өсгөлтөөр зургийг авч баталгаажуулан, Image J программыг ашиглан үр дүнг боловсруулав.

Статистик боловсруулалт: Үр дүнгийн статистик боловсруулалтыг Microsoft Excel 2010 программаар, графикийг Graphpad Prism 8 программыг ашиглан хийж гүйцэтгэв. Бүлгүүдийн хоорондын ялгааг Стюдентийн Т тестээр үр дүнг тооцоолон боловсруулсан ба p утгыг <0.05 байх үед ач холбогдолтой гэж үзнэ.

Үр дүн:

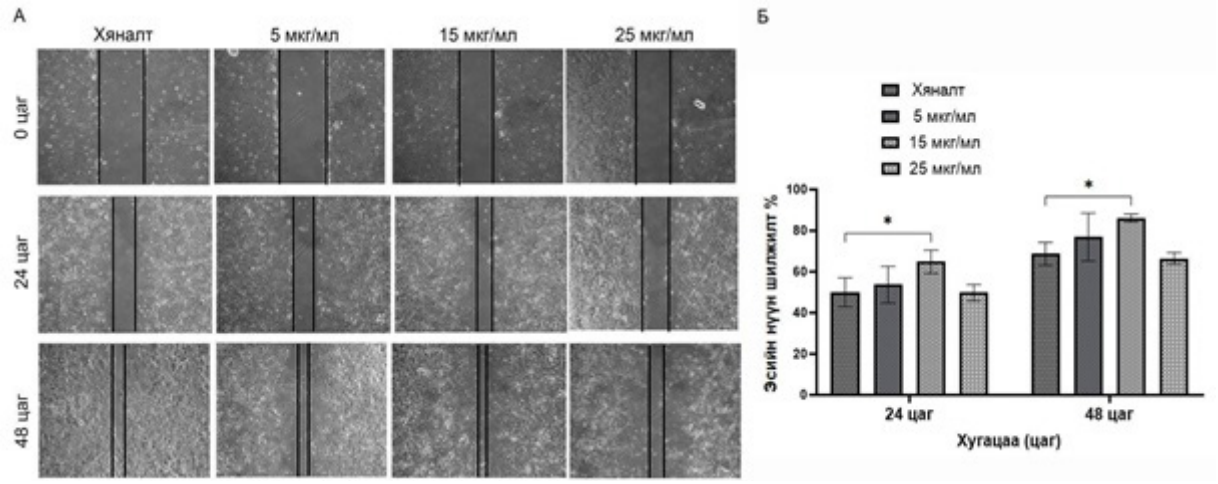
MTT шинжилгээний үр дүн: HepG2 эсийн өсгөврийг Улаанбаатар хотын Бөхийн өргөө орчмоос 2019 оны 03 сард цуглуулсан PM2.5 тоосонцрын 0, 5, 15, 25, 50, 75, 100 мкг/мл тунгаар 24 цагийн турш үйлчилж эсийн амьдрах чадварыг MTT шинжилгээгээр тодорхойлов. PM2.5 тоосонцрын 5, 15 мкг/мл тунгууд эсийн амьдрах чадварыг нэмэгдүүлж (103.2, 108.1%) байсан бол 25 мкг/мл-ээс дээш тун хамааралтайгаар эсийн амьдрах чадварыг дарангуйлж байна (Зураг 1).



Зураг 1. Эсийн амьдрах чадварыг үнэлсэн MTT шинжилгээний үр дүн

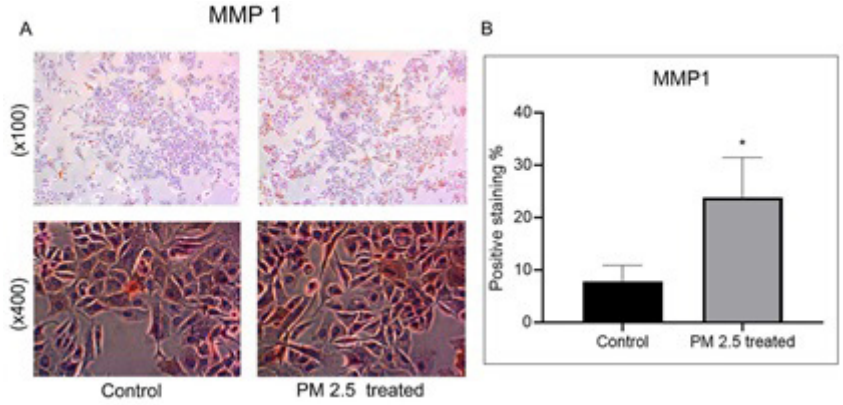
PM2.5 тоосонцрын эсийн нүүн шилжилтэд үзүүлэх нөлөөг тодорхойлсон дүн: HepG2 шугаман эсийн өсгөвөрт 200 мкл-ийн пипетканы хошуугаар зурвас татаж MTT шинжилгээний үр дүнд үндэслэн 5, 15, 25 мкг/мл тунг сонгон авч эсэд үйлчилсэн бөгөөд 24 болон 48 цагийн дараа эсийн нүүн шилжилтийг хяналтын бүлэгтэй харьцуулан тодорхойлов. PM2.5 тоосонцрын сорьцыг HepG2 эсэд үйлчилснээс 24, 48 цагийн дараа

хяналтын бүлгийн эсүүд зурвасын 49%, 68%-ийг бүрхэн ургасан бол 5мкг/мл тун зурвасын 53%, 76%-ийг, 15 мкг/мл тун зурвасын 64%, 86%-ийг, 25 мкг/мл PM2.5 тоосонцрын тунгаар үйлчилсэн HepG2 эс зурвасын 49%, 66%-ийг тус тус бүрхэн ургасан байна (Зураг 2).



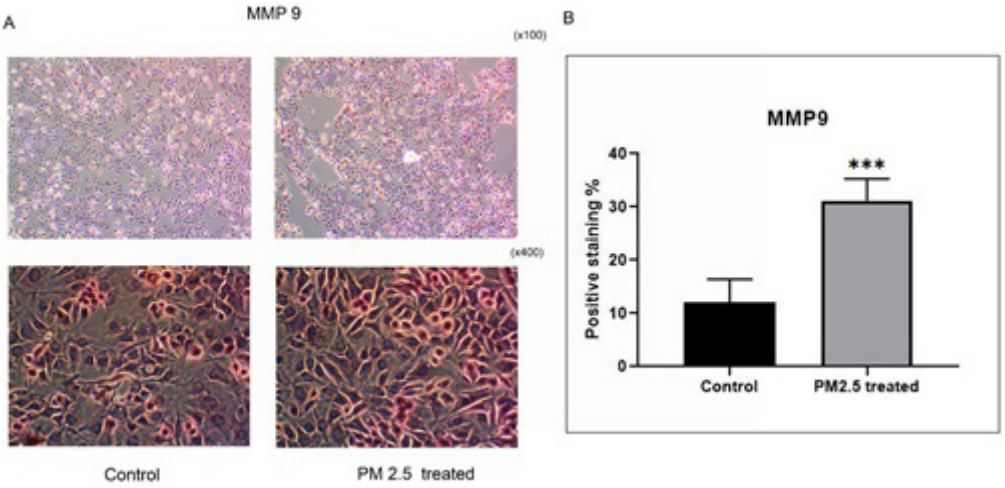
Зураг 2. PM2.5 тоосонцор HepG2 эсийн нүүн шилжилтэд нөлөөлсөн байдал.
А: HepG2 эсэд нүүн шилжилт тодорхойлсон дүн, өсгөлт x100,
Б: Хяналтын бүлгийн HepG2 эс болон PM2.5-аар үйлчилсэн HepG2 эсийн нүүн шилжилтийн хэмжээг ImageJ программ ашиглан тооцоолж хувиар илэрхийлсэн байдал.

MMP1 уургийн нийлэгжлийг AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole) будагч бодисын тусламжтайгаар иммуноцитохимийн шинжилгээ хийж үнэлсэн дүн: MTT шинжилгээний үр дүнгээр сонгон авсан PM2.5 тоосонцрын 15 мкг/мл тунгаар HepG2 эсийг 24 цаг үйлчилсний дараа MMP1 уургийн нийлэгжлийг AEC будагч бодисын тусламжтайгаар илрүүлэн үнэлэв. Хяналтын бүлэгт харах талбайн нийт эсийн 7.86% (3.35-11.57%), PM2.5 тоосонцроор үйлчилсэн бүлэгт 23.83% (13.40-34.04%)-д MMP1 уураг эерэг илэрцтэй буюу статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай байлаа (p=0.001) (Зураг 3).



Зураг 3. MMP1 уургийн нийлэгжлийг AEC будагч бодисын тусламжтайгаар илрүүлсэн иммуноцитохимийн шинжилгээний үр дүн.
Тайлбар: А. 1-р баганад улаан өнгө (AEC)-өөр хяналтын бүлгийн HepG2 эс дэх MMP1 уургийн будагдсан байдал, 2-р баганад улаан өнгө (AEC)-өөр PM2.5-аар үйлчилсэн HepG2 эс дэх MMP1 уургийн будагдсан байдал. MMP1 иммуноцитохими, өсгөлт x100, x400. В. Хяналтын бүлгийн HepG2 эс болон PM2.5-аар үйлчилсэн HepG2 эсэд агуулагдах MMP1 уургийн хэмжээг ImageJ программ ашиглан тооцоолж хувиар илэрхийлсэн байдал.

MMP9 уургийн нийлэгжлийг AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole) будагч бодисын тусламжтайгаар иммуноцитохимийн шинжилгээ хийж үнэлсэн дүн: MTT шинжилгээний үр дүнгээр сонгон авсан PM2.5 тоосонцрын 15 мкг/мл тунгаар HepG2 эсийг 24 цаг үйлчилсний дараа MMP9 уургийн нийлэгжлийг AEC будагч бодисын тусламжтайгаар илрүүлэн үнэлэв. Хяналтын бүлэгт харах талбайн нийт эсийн 12.03% (7.44-18.28%), PM2.5 тоосонцроор үйлчилсэн бүлэгт 31.22% (26.72-35.97%)-д MMP9 уураг эерэг илэрцтэй буюу статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай байлаа (p<0.001) (Зураг 4).



Зураг 4. MMP9 уургийн нийлэгжлийг AEC будагч бодисын тусламжтайгаар илрүүлсэн иммуноцитохимийн шинжилгээний үр дүн.

Тайлбар: А. 1-р баганад улаан өнгө (AEC)-өөр хяналтын бүлгийн HepG2 эс дэх MMP9 уургийн будагдсан байдал, 2-р баганад улаан өнгө (AEC)-өөр PM2.5-аар үйлчилсэн HepG2 эс дэх MMP9 уургийн будагдсан байдал. MMP9 иммуноцитохими, өсгөлт x100, x400. В. Хяналтын бүлгийн HepG2 эс болон PM2.5-аар үйлчилсэн HepG2 эсэд агуулагдах MMP9 уургийн хэмжээг ImageJ программ ашиглан тооцоолж хувиар илэрхийлсэн байдал.

Хэлцэмж: Энэхүү судалгааны зорилго нь PM2.5 тоосонцрын элэгний хавдрын эсийн үржил, нүүн шилжилт, дохио дамжилтад үзүүлэх нөлөөг судлах явдал байв. *Yang B* (2016) нарын судалгаанд PM2.5 тоосонцрын нөлөөгөөр MMP1 уураг идэвхжиж A549, H1299 эсүүдийн үржил, нүүн шилжилтийг нэмэгдүүлж байжээ[13]. *Wei H* (2017) нарын судалгаанд PM2.5 тоосонцроор өдөөгдсөн уушгины A549 эсэд MMP-2 ба MMP-9 уургууд идэвхжснээр эсийн гаднах матриксийн уургуудад нөлөөлж, эпителимезенхимийн шилжилт (EMT) явагдаж буйг дурдсан байна[14]. *Zhang Q* (2017) нарын судалгаанд тээврийн хэрэгсэл, үйлдвэрийн болон ахуйн гаралтай түлшний шатах процессын үед ялгардаг агаарын нарийн ширхэгт тоосонцор буюу PM2.5 элэгний эст өмөнгийн шугаман эсийн загварт тунгаас хамаарч эсийн нэвчилт, нүүн шилжилтийг нэмэгдүүлдэг болохыг тогтоожээ[15]. Улмаар иммуноцитохимийн шинжилгээгээр MMP1 MMP9 уургийн хэмжээ нэмэгдсэн байгаа нь агаарын бохирдлын зэрэглэл тогтоох PM2.5 нарийн ширхэгт тоосонцор элэгний хавдрын нүүн шилжилтэд оролцдог уургуудын нийлэгжлийг нэмэгдүүлдэг болохыг харуулж байгаа бөгөөд цаашид дохио дамжилтын механизм, харилцан үйлчлэлийг нарийвчлан судлах шаардлагатай байна.

Дүгнэлт: Улаанбаатар хотын Бөхийн өргөө орчмоос цуглуулсан PM2.5 тоосонцрын 25 мкг/мл-ээс дээш тунгууд *in vitro* орчинд HepG2 эсийн амьдрах чадварыг дарангуйлж байна. Мөн PM2.5 тоосонцор нь *in vitro* орчинд HepG2 шугаман эсийн нүүн шилжилтийг нэмэгдүүлсэн төдийгүй, нүүн шилжилтэд оролцдог MMP1, MMP9 уургуудын нийлэгжилтийг ихэсгэж байна.

Ном зүй:

1. *Yuan Cheng, Ke-bin He, Zhen-yu Du, Mei Zheng, Feng-kui Duan, Yong-liang Ma, Humidity plays an important role in the PM2.5 pollution in Beijing, Environmental Pollution, Volume 197, 2015, Pages 68-75, ISSN 0269-7491, https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.11.028.*
2. *Guoyuan Hu, Yangmei Zhang, Junying Sun, Leiming Zhang, Xiaojing Shen, Weili Lin, Yun Yang, Variability, formation and acidity of water-soluble ions in PM2.5 in Beijing based on the semi-continuous observations, Atmospheric Research, Volumes 145–146, 2014, Pages 1-11, ISSN 0169-8095, https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2014.03.014.*
3. *Singh N, Murari V, Kumar M, Barman SC, Banerjee T. Fine particulates over South Asia: Review and meta-analysis of $PM_{2.5}$ source apportionment through receptor model. Environ Pollut. 2017 Apr;223:121-136. doi: 10.1016/j.envpol.2016.12.071. Epub 2017 Jan 4. PMID: 28063711.*
4. *Dominici F, Wang Y, Correia AW, Ezzati M, Pope CA, 3rd, Dockery DW. Chemical Composition of Fine Particulate Matter and Life Expectancy: In 95 US Counties Between 2002 and 2007. Epidemiology (Cambridge, Mass.). Jul 2015;26(4):556-564.*
5. *Eze IC, Schaffner E, Fischer E, Schikowski T, Adam M, Imboden M, Tsai M, Carballo D, von Eckardstein A, Künzli N, et al: Long-term air pollution exposure and diabetes in a population-based Swiss cohort. Environ Int 70: 95-105, 2014.*
6. *Fongsodsri K, Chamnanchanunt S, Desakorn V, Thanachartwet V, Sahassananda D, Rojnuckarin P, Umemura T. Particulate Matter 2.5 and Hematological Disorders From Dust to Diseases: A Systematic Review of Available Evidence. Front Med (Lausanne). 2021 Jul 14;8:692008. doi: 10.3389/fmed.2021.692008. PMID: 34336895; PMCID: PMC8316685.*
7. *Chow JC: Health effects of fine particulate air pollution: Lines that connect. J Air Waste Manag Assoc 56: 707-708, 2006.*
8. *Hou X, Strickland MJ, and Liao KJ: Contributions of regional air pollutant emissions to ozone and fine particulate matter-related mortalities in eastern U.S. urban areas. Environ Res 137: 475-484, 2015*
9. *Eze IC, Schaffner E, Fischer E, Schikowski T, Adam M, Imboden M, Tsai M, Carballo D, von Eckardstein A, Künzli N, et al: Long-term air pollution exposure and diabetes in a population-based Swiss cohort. Environ Int 70: 95-105, 2014.*
10. *Tang D, Sun B, Yu H, Yang Z, and Zhu L: Tumor-suppressing effect of miR-4458 on human hepatocellular carcinoma. Cell Physiol Biochem 35: 1797-1807, 2015.*
11. *Zhang X, Ng HL, Lu A, Lin C, Zhou L, Lin G, Zhang Y, Yang Z, and Zhang H: Drug delivery system targeting advanced hepatocellular carcinoma: Current and future. Nanomedicine 12: 853-869, 2016.,*
12. *Li R, Zhou R, Zhang J. Function of PM2.5 in the pathogenesis of lung cancer and chronic airway inflammatory diseases. Oncol Lett. 2018 May;15(5):7506-7514. doi: 10.3892/ol.2018.8355. Epub 2018 Mar 26. PMID: 29725457; PMCID: PMC5920433.*
13. *Yang B, Chen D, Hui Z, Xiao C. The effects for PM2.5 exposure*

on non-small-cell lung cancer induced motility and proliferation. Springerplus. 2016;5:2059. doi: 10.1186/s40064-016-3734-8.

14. *Wei H, Liang F, Cheng W, et al. The mechanisms for lung cancer risk of PM2.5: Induction of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in human non-small cell lung cancer cells. Environ Toxicol. 2017;32(11):2341-2351. doi:10.1002/tox.22437*
15. *Zhang Q, Luo Q, Yuan X, et al. Atmospheric particulate matter2.5 promotes the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. Oncol Lett. 2017;13(5):3445-3450. doi:10.3892/ol.2017.5947*

Evaluation of GPC3 expression in PM2.5-treated hepatocellular carcinoma cell line by immunocytochemistry

Yundendash D[1,2], Sugar L[2], Bilguun E[2], Nyam-Erdene N[2], Yesukhei E[2]
Odonchimeg T[2], Batchimeg B[1,2], Munkhtsetseg B[2], Sarantuya J[1,3], Munkhbayar S[2]

[1]Department of Molecular Biology and Genetics, School of Biomedicine, MNUMS
[2]Institute of Medical Sciences, MNUMS
[3]Institute of Biomedical Sciences, MNUMS
E-mail: yundendash.ims@mnums.edu.mn, Tel: +976-88096789

Background: PM2.5 is a mixture of various chemical substances released during the combustion of vehicles, industrial processes, and household fuels. It penetrates into the alveoli and enters the bloodstream. Ruyi Li et al. reported that PM2.5 fine particles in the air enhance the synthesis of Matrix metalloproteinases (MMPs) proteins and may be involved in migration and pathogenesis. In the study by Qian Zhang et al., PM2.5 particles had an effect on the proliferation, invasion, and migration of HCC.

Aim: In vitro study of the effect of PM2.5 fine particles on hepatocellular carcinoma (HepG2)

Materials and Methods: A human liver cancer cell line (HepG2) was obtained from the Central Scientific Research Laboratory at the Institute of Medical Sciences. HepG2 cells were seeded at a concentration of $1*10^5$ cells/mL in a culture flask and cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS, and 1% antibiotic mix (penicillin, streptomycin) in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37 °C. The cytotoxic effect of PM 2.5 in HepG2 cells was evaluated using an MTT assay. After the MTT assay, HepG2 cells were seeded on cell culture dishes with prepared cover glasses and treated with the selected PM 2.5 dosage. The expression of MMP1 and MMP9 proteins, which are involved in HepG2 cell migration and tumor cell metastasis, was determined using wound healing and immunocytochemical methods, respectively, and compared with the control group. Images were captured under a microscope, and the results were processed using Image J software. Statistical analysis of the results was performed using Microsoft Excel 2010, and graphics were generated using Graphpad Prism 8 software. Differences between groups were calculated by Student's t test, and significance was considered when the p value was <0.05.

Results: By MTT assay, PM2.5 doses of 5 and 15 μg/ml increased cell viability (103.2 and 108.1%), while doses above 25 μg/ml decreased cell viability. In the HepG2 cell line, doses of 5, 15, 25μg/ml of PM2.5 particles were selected based on MTT analysis after 24 and 48 hours of treatment. The percentages of gap closure were 49% and 68% in control group, 53% and 76 % in 5 μg/ml group, 64% and 86% in 15 μg/ml group, 49% and 66% in the 25 μg/ml group at 12 and 24 hours, respectively.

The HepG2 cell group treated with 15μg/ml of PM2.5 particles was compared with the control group to evaluate MMP1, MMP9 protein synthesis. By Immunocytochemistry assay, MMP9 protein staining intensity was 12.03% (7.44-18.28%), while MMP1 was 7.86% (3.35-11.57%) in control group, whereas MMP9 protein staining intensity was 31.22% (26.72-35.97%), MMP1 was 23.83% (13.40-34.04%) in PM2.5 treated group, which is statistically significant ($p<0.001$), ($p<0.001$).

Conclusions: Doses of PM2.5 particles collected from the Bokhiin Urgoo area of Ulaanbaatar city, above 25 μg/ml, inhibit the viability of HepG2 cells in vitro. In addition, PM2.5 particles not only increased the migration of the HepG2 cell line in vitro but also enhanced the synthesis of MMP1 and MMP9 proteins, which are involved in migration.

Keywords: HepG2, Air pollution, Particulate matter, Migration