ABSTRACT

Occurrence of air pollution in Chiang Mai has reached crisis during the past few years, causing public worry and concern on the health impact among residents in the Chiang Mai-Lamphun valley. Acute effects of this crisis correlated prominently to an increased number of patients with respiratory diseases. However, chronic effects, especially genotoxic ones, after human exposure to fine particulate matter (PM) of 0.5, 1.0 or 2.5 microns in Chiang Mai, have not been reported. Therefore, the aim of this study was to investigate whether exposure to fine PM caused DNA damage and induced formation of 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine (8-OHdG), a by product of DNA damage resulting from hydroxyl radical production.

A high volume cascade impactor was installed in front of Saraphi Hospital in Chiang Mai to collect fine PM for 4 months from August to November, 2007. The PM was weighed and calculated for concentrations in five PM sizes before being extracted with ultrapure water and methanol for 60 minutes, and lyophilized to dryness. PM solution was prepared at each concentration before the A549 human lung epithelial cells were given a genotoxicity test. Comet assay was used to evaluate DNA strand break analysis and the enzyme immunoassay was used to quantitate 8-OHdG.

The results showed that concentrations of PM≥10, PM10-2.5, PM2.5-1.0, PM1.0-0.5 and PM≤0.5 were 283, 467, 280, 227 and 139 $\mu g/m^3$, respectively, in which PM10-2.5 had the highest proportion of total PM (33.4%). In addition, the amount of PM≥10, PM2.5-1.0, PM1.0-0.5 and PM≤0.5 was 20.3%, 20.1%, 16.2% and 10.0%, respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

DNA strand break analysis on the A549 human lung epithelial cells demonstrated that PM10-2.5 could significantly induce DNA damage at concentrations of 150, 300, 600, 1,200 and 2,400 μg/ml ($p \leq 0.001$). In addition, PM2.5-1.0, PM1.0-0.5 and PM≤0.5 could also induce DNA damage at concentrations of 75, 150, 300 and 600 μg/ml ($p \leq 0.001$), except for PM2.5-1.0 at the concentration of 75 μg/ml. When concentrations of PM1.0-0.5 and PM≤0.5 were decreased, in order to find the lowest one that could induce DNA damage, it was found that concentrations of 10, 20, 40 and 80 μg/ml could induce DNA damage significantly ($p \leq 0.001$). However, PM1.0-0.5 at the concentration of 10 μg/ml could not. Thus, the results showed that PM2.5-1.0, PM1.0-0.5 and PM≤0.5 at concentrations of 150, 20 and 10 μg/ml, respectively, were the lowest concentrations of each PM that could induce DNA damage on A549 human lung epithelial cells. These low concentrations of PM were approximately the same as those that could be inhaled and accumulate in the human alveoli.

Aphidicolin (APC), a DNA repair inhibitor, was used at concentrations of 1.0 and 2.0 μg/ml, with PM2.5-1.0 at concentrations of 75 and 150 μg/ml in the comet assay. The results showed that the A549 human lung epithelial cells had greater DNA damage after treatment with PM2.5-1.0 and either concentration of APC than after experiments without APC. This meant that at a PM2.5-1.0 concentration of 75 μg/ml, which could not induce DNA damage, the cells may be protected by a repair mechanism within them.

Quantitation of 8-OHdG on the DNA of A549 human lung epithelial cells showed that only PM2.5-1.0 at concentrations of 75, 300 and 600 μg/ml, and PM≤0.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

at concentrations of 150 and 600 μg/ml could significantly elevate the 8-OHdG levels ($p \leq 0.05$). In contrast, PM1.0-0.5 at concentrations of 75, 150, 300 and 600 μg/ml could induce 8-OHdG formation on the A549 human lung epithelial cells ($p \leq 0.05$) at all concentrations.

In conclusion, fine PM (0.5, 1.0 and 2.5 microns) collected at Saraphi Hospital in Chiang Mai could induce DNA damage and increase 8-OHdG formation. The mechanism of DNA damage is possibly involved with the generation of hydroxyl radicals caused by fine PM itself, or chemical constituents that are adsorbed onto the PM and attack the guanine base on the DNA strand. The elevation of 8-OHdG might be implicated in the progression of lung cancer. Long term exposure to fine PM may be responsible for chronic adverse effects among Chiang Mai's inhabitants, who are reported to have the highest incidence of lung cancer in Thailand.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อ

การเกิดวิกฤตมลภาวะทางอากาศในจังหวัดเชียงใหม่ ในระยะ 2-3 ปีที่ผ่านมาเป็นเหตุให้เกิดความวิตกกังวลกับผลกระทบต่อสุขภาพของประชากรที่อาศัยในแอ่งจังหวัดเชียงใหม่-ลำพูนมาก ผลกระทบแบบเฉียบพลันทำให้มีจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคระบบทางเดินหายใจสูงขึ้นชัดเจน แต่ผลกระทบแบบเรื้อรังโดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อยีนหรือดีเอ็นเอหลังการสัมผัสอนุภาคฝุ่นละเอียดมากถึง 0.5, 1.0 หรือ 2.5 ไมครอนในจังหวัดเชียงใหม่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน จึงเป็นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ที่ต้องการศึกษาว่า อนุภาคฝุ่นละเอียดเหล่านี้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ และเหนี่ยวนำให้เกิด 8-ไฮดรอกซี-2′-ดีออกซีกวาโนซีน (8-OHdG) ซึ่งเป็น by product ของการเกิดดีเอ็นเอบาดเจ็บ เนื่องจาก hydroxyl radical ที่เกิดขึ้นจากการได้รับอนุภาคฝุ่นขนาดเล็กหรือไม่

งานวิจัยนี้ได้ใช้ เครื่อง high volume cascade impactor ในการเก็บอนุภาคฝุ่นละเอียดต่าง ๆ โดยทำการติดตั้งที่บริเวณหน้าโรงพยาบาลสารภี ในจังหวัดเชียงใหม่ ในช่วงเวลา 4 เดือน คือ สิงหาคม กันยายน ตุลาคม และพฤศจิกายน 2550 และนำมาชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของอนุภาคฝุ่นที่เก็บได้ 5 ขนาด จากนั้นนำมาสกัดด้วยน้ำและเมทานอล เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปทำให้แห้งเพื่อเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้นของอนุภาคฝุ่นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อยีนในเซลล์เยื่อบุผิวของปอดคนชนิด A549 การวิเคราะห์การแตกหักของดีเอ็นเอใช้วิธีโคเมทแอสเสย์ และหาปริมาณ 8-OHdG ใช้วิธีเอนไซม์อิมมิวโนแอสเสย์

ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของอนุภาคฝุ่นขนาดใหญ่ 10 ไมครอน, 10-2.5, 2.5-1.0, 1.0-0.5 และเล็กกว่า 0.5 ไมครอนมีปริมาณ 283, 467, 280, 227 และ 139 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ตามลำดับ โดยอนุภาคฝุ่นขนาด 10-2.5 ไมครอนมีสัดส่วนทั้งหมดของฝุ่นมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 33.4 ของฝุ่นทั้งหมด และปริมาณอนุภาคฝุ่นขนาดมากกว่า 10 ไมครอน, 2.5-1.0, 1.0-0.5 และน้อยกว่า 0.5 ไมครอนร้อยละ 20.3, 20.1, 16.2 และ 10.0 ตามลำดับ

การวิเคราะห์การแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์เยื่อบุผิวของปอดคน พบว่าอนุภาคฝุ่นขนาด 10-2.5 ไมครอนที่ความเข้มข้น 150, 300, 600, 1,200 และ 2,400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มคก./มล.) ทำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอทุกความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.001$) นอกจากนี้อนุภาคฝุ่นขนาด 2.5-1.0, 1.0-0.5 และน้อยกว่า 0.5 ไมครอนที่ความเข้มข้น 75, 150, 300 และ 600 มคก./มล. สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอได้ ($p \leq 0.001$) ยกเว้นอนุภาคฝุ่นขนาด 2.5-1.0 ไมครอนที่ความเข้มข้น 75 มคก./มล. เมื่อลดความเข้มข้นของอนุภาคฝุ่นขนาด 1.0-0.5 และน้อยกว่า 0.5 ไมครอนลง เพื่อหาความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอพบว่าความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มคก./มล. ทำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอได้ ($p \leq 0.001$) ยกเว้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อนุภาคฝุ่นขนาด 1.0-0.5 ไมครอนที่ความเข้มข้น 10 มคก./มล. จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของอนุภาคฝุ่น 150, 20 และ 10 มคก./มล. เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของอนุภาคฝุ่นขนาด 2.5-1.0, 1.0-0.5 และน้อยกว่า 0.5 ไมครอน ตามลำดับ ที่สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแตกหักของดีเอ็นเอ และปริมาณอนุภาคฝุ่นที่ต่ำนี้เทียบได้กับปริมาณอนุภาคฝุ่นขนาดเล็กที่สามารถหายใจเข้าสู่ร่างกาย ไปสะสมในถุงลมปอดได้

ได้ทดลองให้ aphidicolin (APC) ซึ่งเป็นสารยับยั้งกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 มคก./มล. ร่วมกับอนุภาคฝุ่นขนาด 2.5-1.0 ไมครอน ความเข้มข้น 75 และ 150 มคก./มล. ในการทดสอบโคเมทแอสเสย์กับเซลล์เยื่อบุผิวของปอดคน พบว่าเซลล์ที่ได้รับอนุภาคฝุ่นขนาด 2.5-1.0 ไมครอนและ APC ทั้งสองความเข้มข้นสามารถเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่ไม่เติม APC แสดงให้เห็นว่าอนุภาคฝุ่นความเข้มข้น 75 มคก./มล. ที่ไม่เห็นผลการแตกหักของดีเอ็นเออาจเนื่องมาจากมีกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอภายในเซลล์ช่วยป้องกันไว้

ผลการทดลองหาปริมาณ 8-OHdG ในดีเอ็นเอของเซลล์เยื่อบุผิวของปอดคนที่สัมผัสอนุภาคฝุ่นขนาดต่าง ๆ พบว่า เซลล์ที่สัมผัสอนุภาคฝุ่นขนาด 2.5-1.0 ไมครอนความเข้มข้น 75, 300 และ 600 มคก./มล. และอนุภาคฝุ่นขนาดน้อยกว่า 0.5 ไมครอนความเข้มข้น 150 และ 600 มคก./มล. ทำให้ปริมาณของ 8-OHdG เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในทางตรงข้ามอนุภาคฝุ่นขนาด 1.0-0.5 ไมครอนที่ความเข้มข้น 75, 150, 300 และ 600 มคก./มล. สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด 8-OHdG ในเซลล์เยื่อบุผิวของปอดคนได้ ($p \leq 0.05$) ทุกความเข้มข้น

สรุปผลการศึกษาครั้งนี้ได้ว่า อนุภาคฝุ่นละเอียดที่เก็บจากบริเวณหน้าโรงพยาบาลสารภี จังหวัดเชียงใหม่ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอและเพิ่มการสร้าง 8-OHdG โดยกลไกที่ทำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเออาจเนื่องมาจากการกระตุ้นให้เกิด hydroxyl radical โดยอนุภาคฝุ่นเองหรือโดยสารที่ติดบนอนุภาคฝุ่นขนาดเล็กเข้าไปเกาะบนเบสกวานีนบนสายดีเอ็นเอ การเพิ่มขึ้นของระดับ 8-OHdG อาจเกี่ยวพันกับพัฒนาการของการเกิดโรคมะเร็งปอด การสัมผัสอนุภาคฝุ่นละเอียดเป็นระยะเวลานานอาจมีส่วนทำให้เกิดปัญหาสุขภาพแบบเรื้อรังของประชากรในจังหวัดเชียงใหม่ ที่มีรายงานว่ามีผู้ป่วยมะเร็งปอดเป็นอันดับหนึ่งของประเทศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved