

**科技部補助**  
**大專學生研究計畫研究成果報告**

計 畫 名 稱	： 探討Quercetin與Curcumin抑制Fine Particulate Matter (PM2.5) 所引發之炎症反應及機轉
------------	---

執行計畫學生：邱敬絜

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-035-B

研究期間：107年07月01日至108年02月28日止，計8個月

指導教授：張元衍

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學系微生物及免疫學科

中華民國 108年03月31日

## 中文摘要

許多研究指出，空氣污染與呼吸系統及心血管疾病的發生和致死有關，其中空氣污染物中的懸浮微粒污染影響最為嚴重，亦是一個最廣為研究的題材。許多研究皆已證實，高度空氣污染的都市，不但心血管疾病、呼吸道疾病的住院率及死亡率皆高，這將造成醫療資源耗用，久之則會拖累經濟成長。天然物是個自然寶藏，孕藏無數具有生物活性的分子，包括抗氧化、抗發炎、抗感染等。因此，從天然物找尋開發有效預防治療 PM2.5 誘發炎症反應的新化合物及策略，為當前熱門的研究課題之一。Quercetin 存在於蔬菜、水果和茶葉等植物中的黃酮類化合物，Curcumin 為薑黃裡頭的一種成分，此兩種天然物之成分皆具有抗氧化、抗發炎、抗癌等等的功效。本研究動機為以利用天然物來預防暴露於 PM2.5 環境下所誘發的炎症反應，因此本實驗先分別以 Quercetin (2、1 與 0.5  $\mu\text{M}$ ) 與 Curcumin (1、0.5 與 0.25  $\mu\text{M}$ ) 處理 MH-S 細胞 1.5 小時後，再處理 PM2.5 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 反應 24 小時後，收集細胞及上清液，以 ELISA 來分析炎症相關的細胞激素及西方點墨法來分析相關炎症路徑。

本實驗結果顯示，處理 Quercetin 或 Curcumin 皆可抑制 PM2.5 誘導細胞釋放發炎相關細胞激素如 IL-6 與 TNF- $\alpha$ 、MCP-1 與 Rantes，使產生炎症反應的降低。由西方點墨法之結果得知，Quercetin 與 Curcumin 能使炎症發炎因子指標 iNOS、COX2 與 NF $\kappa$ B 的表現量下降，透過抑制 pSTAT-1 與 pSTAT-3 表現，其表現量有劑量關係。同時也發現 Quercetin 與 Curcumin 可調控 HO-1 和 Nrf 2 蛋白表現，會隨著其兩者的濃度增加而有增加的趨勢，這表示 Quercetin 與 Curcumin 可經由活化 Nrf 2 進而增加 HO-1 表現量來達到抗發炎的作用。

綜合以上研究成果，我們發現 Quercetin 與 Curcumin 皆可透過 JAK-STAT 路徑來調控抑制炎症反應，進而減少炎症指標蛋白 iNOS 和 COX2 的表現；此外，Quercetin 與 Curcumin 還能藉由 Nrf2/HO-1 路徑，增加 HO-1 之表現量，達到抗發炎的作用。未來期待能夠混合此兩種天然物，提升抗發炎之能力。

## 壹、文獻回顧

### 1.1. 暴露在懸浮微粒環境中與基因對發炎疾病之衝擊

懸浮微粒可依產生的方式不同來分為原生性與衍生性微粒兩種，原生性微粒主要為大自然產生之微粒與人為的車輛排放、道路揚塵及工廠所排放的煙塵等；衍生性微粒主要為物質在大氣中經由化學反應所生成的微粒(Marc, 2016)。

懸浮微粒又可分為 PM10 (氣動粒徑小於10  $\mu\text{m}$ ，可進入呼吸道系統) 與 PM2.5 (氣動粒徑小於2.5  $\mu\text{m}$ ，其直徑只有頭髮的1/28，比 PM10 更容易進入肺部氣體交換的區域) 兩大類，PM2.5 因容易進入人體肺部，所以易引起肺部的發炎反應、心血管病變、氣喘等症狀，若微粒本身沾附著其他的污染物，例如過渡金屬 (如鐵、鎳和銅)，或是多環芳香烴化合物等物質，這些成分物質亦會影響微粒物質的毒性 (Huang et al., 2017)。目前的研究已證實，此種污染物可以深入喉部、氣管、細支氣管和肺泡的肺部區域。亦有研究指出 PM2.5 可深入肺部並累積於體內，與血栓的形成和發炎反應有高度相關性 (Meldrum et al., 2017)。

許多的報導及文獻指出，PM2.5 造成的傷害不僅僅只在肺部，對心血管疾病亦會造成影響，當 PM2.5 經由肺部進入人體後，會隨著血液流至身體各處，導致許多疾病產生。文獻指出若接觸 PM2.5，會使得前驅上皮細胞的量減少，抑制血管中的促血管生成細胞激素與生長激素，和增加抗血管生成之分子，亦會使促血管生成幹細胞的增生與生成缺陷，導致心血管疾病之產生 (Haberzettl et al., 2018)；前人研究亦指出，若小鼠長期暴露在含有 PM2.5 的環境中，會使得自主交感神經不正常活化，進而導致急性血壓升高；也有研究指出，心臟疾病可能與長期暴露在 PM2.5 環境中有關，經由 PM2.5 處理過的小鼠之大動脈細胞會活化 COX-2/mPGES-1/PGE2 此路徑，引發細胞發炎與凋亡 (Yin et al., 2017)。在腦部研究中也有發現，PM2.5 減少 tight junction 蛋白、增加單層上皮細胞之通透性，使 PM2.5 可穿過血腦屏障 BBB 進入腦部，亦可引起直接性之神經毒素或透過間接性之 Macrophage-mediated excitotoxicity，使神經受到傷害，PM2.5 導致巨噬細胞與微膠細胞 (microglia) 產生 glutamate，而 glutamate 會造成神經受到損傷 (Liu et al., 2015)，可能導致許多神經上的疾病產生。近期研究指出，NF $\kappa$ B 為環境中的污染物質 ambient air pollution (AAP) 引起炎症反應的主因，巨噬細胞與上皮細胞被 AAP 刺激後，藉由活化 NF $\kappa$ B 導致 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及其他促發炎激素產生，AAP 中含有 particulate matter (PM)，NF $\kappa$ B 亦會受到 PM 之刺激導致活化，受到 PM 刺激活化之 NF $\kappa$ B，能在幾小時過後活化 Nrf2。NF $\kappa$ B 受 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激而活化，Nrf2 能調控 GSH、thioredoxin 和 NADPH，來消除細胞內的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，而 NF $\kappa$ B 活化亦使 Nrf2 表現增加 (Forman and Finch., 2018)。

## 1.2. JAK/STAT 訊息路徑與炎症之關係

JAK-STAT 路徑為許多 cytokine 和生長因子的基本傳遞路徑，它使得細胞外的化學信號能跨越細胞膜並將信息傳送到細胞核內 DNA 上的基因啟動子上，最終引起細胞中 DNA 轉錄與活性發生改變，進而調控相關機的表現，這過程需先激活了 JAK 的激酶功能，導致對其自身的磷酸化；接下來 STAT 蛋白結合到被磷酸化的受體上，在此 STAT 被 JAK 磷酸化；被磷酸化的 STAT 蛋白結合到另一個被磷酸化的 STAT 蛋白上（二聚化）並易位到細胞核中；在細胞核中，它結合到 DNA 上它們的目標基因並誘發表現。JAK 家族包括 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2；STAT 家族包括 STAT1、STAT2、STAT3、STAT5A/B、STAT6 (Nabavi, Ahmed et al., 2019)。

先前的研究指出，JAK-STAT pathway 主要被探討腫瘤與癌症的產生，但 JAK-STAT pathway 的活化也參與調控炎症反應，JAK-STAT pathway 由三個部分組成包括受體 (receptor; gp130)、JAK 以及 STAT (signal transducers and activators of transcription) (Aaronson et al., 2002)。JAK 與 STAT 是許多細胞因子受體的組成部分，可以調節細胞生長、細胞存活、細胞分化以及對病原體的對抗。JAK kinase (janus kinases) 是一個酪胺酸家族，包含四個主要成員 JAK 1、JAK2、JAK 3 及 Tyk2。外來生長分化訊息，如：細胞激素 IL-6 與細胞表面的接受器結合後，會活化在接受器上的 JAK kinase 而進行磷酸化，磷酸化的 JAK kinase 會繼續磷酸化下游的 STAT，活化的 STAT 能進入細胞核並與一些目標基因的特異性增強子 (Enhancer) 進行結合，因此調節基因序列的轉錄作用 (Rawlings et al., 2004; Nabavi, Ahmed et al., 2019)。JAK-STAT pathway 可經由 IL-6 與 gp130 結合而誘導活化，異常活化的 IL-6 信號表現可能造成自身免疫性疾病、炎症反應或癌症的產生，如前列腺癌、多發性骨髓瘤 (Akeson & Malemud, 2017)。因此，有學者研究證實，透過抑制 IL-6 誘導的 JAK-STAT pathway 活化，確實可以降低一些慢性炎症疾病的產生 (Malemud, 2009)。因此本研究將探討 Quercetin 與 Curcumin 是否可調控 JAK-STAT pathway 相關蛋白的表現，來抑制 PM2.5 誘發炎症反應。

## 1.3. Curcumin 與 Quercetin 之介紹

Curcumin (薑黃色素/薑黃素) 為薑科植物薑黃 *Curcuma longa* Linn 其乾燥根狀經純化後的萃取物。薑黃為多年生草本，薑黃素為其主要的薑黃色素，大約佔 70%，其他的薑黃色素約 10~20% 為脫甲氧基薑黃素、10% 脫二甲氧基薑黃素、六氫薑黃素。薑黃素在印度和許多的亞洲國家中已有上千年的使用歷史，其最初用來當作染色劑使用，後來漸漸發現其有許多特殊的效果，廣泛的被運用在治療創傷、寄生蟲感染、皮膚疾病等方面。近來研究指出，Curcumin 具有

降血脂、抗發炎、抗動脈粥樣硬化、抗氧化 ( Akbik et al., 2014 ; Abdollahi, Momtazi et al., 2018 )、抑制 HIV-1 藉由促進 Tat 蛋白的降解 ( Ali et al., 2016 )、抗癌 ( Mukherjee et al., 2016 ; Abdollahi, Momtazi et al., 2018 ) 等功能。Curcumin 具有調控活化 T 細胞、B 細胞、巨噬細胞、中性單核球細胞、自然殺手細胞、樹突細胞與釋放細胞激素的能力。文獻表示，Curcumin 可減緩 Lipopolysaccharide ( LPS ) 的炎症反應，降低 MIP2、IL-1b、keratinocyte chemoattractant ( KC )、IL-8 和 MIP-1a 的表現量，並藉由抑制單核球細胞和巨噬細胞的 NF $\kappa$ B 路徑，減少 iNOs、IFN- $\gamma$  和 IL-12 的表現量 ( Abdollahi, Momtazi et al., 2018 )。

Quercetin ( 槲皮素/槲黃素 )，存在於蔬菜、水果和茶葉等植物中的黃酮類化合物，其抗氧化能力為維他命 E 的 50 倍、維他命 C 的 20 倍，分子結構小、水溶性，易吸收及代謝。Quercetin 可抗脂肪生成 ( Dong et al., 2014 )、抗發炎 ( Dong et al., 2014 )、抗氧化、抗癌 ( Park, Lim et al. 2019, Srivastava and Srivastava 2019 ) 等功能。文獻表示，Quercetin 也可用來治療 NSCLC ( non-small-cell lung cancer )，在 A549 肺癌細胞中，Quercetin 透過抑制 IL-6/STAT3 訊號路徑，而 IL-6 表現量下降也造成 p-STAT3 表現量下降，並使 Bcl2/Bax 比例失衡，造成細胞凋亡 ( Mukherjee and Khuda-Bukhsh., 2015 )。

在目前的研究皆指出天然物中異黃酮和多酚類物質不僅活化 Nrf2，也可以通過 NF- $\kappa$ B 來對抗氧化反應或抗發炎來調節血管疾病和癌症等疾病 ( Scapagnini et al., 2011; Sun, Li et al., 2019 )。一些抗癌物質如 Quercetin、Curcumin、Baicalein 與 Sulforaphane 等能透過活化 HO-1 基因而降低細胞癌化與抑制腫瘤生長 ( Son et al., 2013 )。其中 Quercetin 與 Curcumin 誘導 HO-1 表現而抑制炎症反應的文獻非常的多，如 2011 年證實 Quercetin 誘導 HO-1 來抑制 oxidized LDL 誘導的炎症反應 ( Bhaskar et al., 2011 )；2013 年 Youn 等人以 TNF- $\alpha$  誘導 HaCaT 細胞發炎反應中，也證實了 Curcumin 可誘導 HO-1 的表現來抑制 TNF- $\alpha$  所誘導 ICAM-1，進而抑制炎症反應。2012 年 Heeba 等人將 carrageenan 注射大鼠後腳掌來誘發水腫 ( edema ) 與炎症反應的實驗中也指出，預先口服 Curcumin ( 50 mg/kg )，Quercetin ( 50 mg/kg )，可藉由誘導 HO-1 的表現來降低經氧化傷害 ( oxidative stress ) 引起的炎症反應。最新文獻指出，受 Quercetin 結合 DHA 處理之 BV-2 microglia 細胞，可提升奇 Nrf2、HO-1 之表現量，並抑制 LPS 所誘導產生之 NO、TNF- $\alpha$  等發炎物質 ( Sun, Li et al., 2019 )。因此本研究將探討 Quercetin 與 Curcumin 是否可經活化 Nrf2 與 HO-1 之表現量，來抑制 PM2.5 誘發炎症反應。

## 貳、研究動機

衛生福利部在2016年公告國人十大死因，死亡率依序為（1）惡性腫瘤（2）心臟疾病（3）肺炎（4）腦血管疾病（5）糖尿病（6）事故傷害（7）慢性下呼吸道疾病（8）高血壓性疾病（9）腎炎、腎病症候群及腎病變（10）慢性肝病及肝硬化。有報導指出上述所提及的這些疾病皆與PM2.5有關，若能有效控制感染及發炎反應，則可降低此些疾病發生，而天然的植物蘊藏無數具有生物活性的分子，包括抗氧化、抗發炎、抗感染等。因此，從植物中找尋並開發出有效預防或治療此些懸浮微粒所誘發的炎症反應之新化合物及方法，為目前熱門的研究課題之一。

康健雜誌197期中寫道「一般人聽到空汙，馬上聯想到氣喘、過敏、肺癌，其實心血管疾病才是大宗。」，PM2.5從肺泡侵入進到血液後，會導致心血管疾病，例如血管慢性發炎、動脈硬化、冠心病、心絞痛、心肌梗塞、中風（Thurston et al., 2017）。其他的器官也會受到影響，並提高心血管疾病的風險。在自律神經系統中，PM2.5會使得交感神經不正常活躍，副交感神經活性降低，導致血管內發炎和氧化壓力提高；在肝臟中，PM2.5會使其釋放出凝血因子，容易使血管中產生血栓，導致心肌梗塞或者中風；在脂肪組織中，PM2.5會使其分泌抵抗素(resistin)等賀爾蒙，使得血管發炎與罹患肥胖、糖尿病的風險提高（Jain et al., 2009; Rao et al., 2015; Haberzettl et al., 2016）。

依據前人的研究發現，空氣污染粒子包括粒徑小於10微米（PM10）及2.5微米（PM2.5）之粒子可藉由呼吸道進入我們人體循環系統，導致全身性傷害，並顯示懸浮微粒會造成許多肺部傷害，其中更包括了發炎反應的發生（He et al., 2016）。如果長期暴露於高濃度的懸浮微粒會增加罹患肺癌、呼吸道疾病和動脈硬化的風險；而在短期部分可能會引起一些支氣管炎和氣喘等呼吸道疾病等。隨著工業發展日漸蓬勃，空氣汙染也日漸嚴重，霾害、廢氣、懸浮微粒充滿著現今的生活，許多的報導指出PM2.5進入人體後，除了在肺部沉積外，還能進入血管中，隨著血液循環至全身，腦部、心臟等器官都會受到影響（Yin et al., 2017）。研究也指出將健康和哮喘的受測者，暴露於PM中，可以誘導或加重呼吸氣道的炎症反應（Alexis et al., 2014; Wang et al., 2017）。此外，以小鼠暴露PM2.5的實驗也指出，其可導致肺部炎症和纖維化（Farina et al., 2011; Ogino et al., 2014; Jin et al., 2017; Su et al., 2017）。同時許多研究皆已證實，高度空氣汙染的都市，不但心血管疾病、呼吸道疾病的住院率及死亡率高，這將造成醫療資源耗用，久之將拖累經濟成長。因此，從天然物找尋開發有效預防治療PM2.5誘發炎症反應的新化合物及策略，為當前熱門的研究課題之一。

## 參、 實驗材料與方法

使用體外 PM2.5 處理老鼠肺泡巨嗜細胞株 (MH-S) 之細胞模式，評估 Curcumin 與 Quercetin 是否經由活化 Nrf2 與調控 JAK-STAT 路徑來調控 PM2.5 所誘發的炎症反應。

### 3.1. PM2.5 收集

PM2.5 樣品於 2016 年在台中市市區收集 (此部分由中山醫大賴全裕 老師提供)。以定流量抽引空氣進入特定形狀之採樣器進氣口，經慣性微粒分徑器，將氣動粒徑小於或等於 2.5 微米 ( $\mu\text{m}$ ) 之細小懸浮微粒 (PM2.5) 收集於硝酸纖維素濾膜 (直徑=47mm, Pall Life Sciences, NY, USA) 上。而此濾膜於採樣前、後均需於特定溫度與濕度環境中利用高精度微量天平 (Mettler Toledo, AG258, OH, USA) 稱重，決定所收集之 PM2.5 樣品的淨重，再除以 24 小時之採樣總體積即可得 PM2.5 微粒在 24 小時內的質量濃度。

根據 Imrich 等人的方法將硝酸纖維素濾膜上的 PM2.5 樣品浸泡於去離子水並利用超音波震盪器處理 30 分鐘，便可由濾膜中萃取出 PM2.5 的樣品，再將樣品以 100 度煮沸 30 分鐘來殺死微生物。將萃取出的 PM2.5 樣品儲存在  $-80^{\circ}\text{C}$ 。空白樣品 (未暴露的過濾器) 與 PM2.5 樣品同時處理，並在所有實驗中當成對照組。為了確定與調整 PM2.5 樣品的濃度，將 100  $\mu\text{l}$  等分的 PM2.5 樣品置於過濾器上風乾。將樣品和過濾器在微量天平 (Mettler Toledo, Switzerland) 上稱重，並以去離子水調整成 10 mg / ml 製備，並在使用前以超音波震盪器處理 1 分鐘。

### 3.2. 細胞培養

MH-S 巨嗜細胞細胞株，購自食工所，培養於 RPMI 培養液，含有 10% 胎牛血清、2mM L-glutamate、100  $\mu\text{M}$  非必須胺基酸及抗生素 (100units/ml of penicillin, 100g/ml streptomycin and 0.25 $\mu\text{g}$ /ml of fungizone) 的 Waymouth 752/1 培養基中。每 3-4 天繼代，並放置於具有  $37^{\circ}\text{C}$  恆溫和 5%  $\text{CO}_2$  之培養箱中進行培養，當細胞生長至八分滿時即可進行處理與分析。

### 3.3. Cell viability assay (MTT assay)

將 $6 \times 10^5$  MH-S 細胞株培養於24孔的培養盤中，先處理各種濃度之藥物，1.5小時後再以加或不加 PM2.5處理，並於含有5% CO<sub>2</sub>之37°C恆溫培養箱中培養24小時，以顯微鏡觀察其細胞型態後，收集上清液進行 MTT 分析。在每一個 well 中加入10 $\mu$ l Cell Counting Kit-8試劑後，放回恆溫培養箱中，培養至其變色（約1-3小時）。最後以 ELISA Reader 測其在450/595 nm 波長下之吸光值。Cell Counting Kit-8試劑可簡易方便與精準的用於檢測細胞增殖及毒性，可用來分析加藥物以後對細胞抑制或增生的能力。

### 3.4. Lactate dehydrogenase (LDH) assay

當細胞膜受損或破裂時，會釋放出 LDH (Lactate Dehydrase)，加入呈色受質後就可定量因毒害而受損的細胞。將上述樣本的上清液，取出100 $\mu$ l 後加入50 $\mu$ l 的 LDH 試劑 (Sigma. St.Louis, MO) 提供其呈色受質，反應後以 ELISA Reader 測其在波長490 nm 下之吸光質。來分析加與不加入 PM2.5及各種藥物對細胞是否具有細胞毒性。

### 3.5. 細胞外 NO 含量偵測

將上述收集的樣本之細胞培養上清液，取出100 $\mu$ l 後加入100 $\mu$ l 之 Griess 試劑 (1% sulfanilamide、0.1% N- (1-naphtyl) -ethylenediamine dihydrochloride 及2% phosphoric acid)，利用 nitrite 與 Griess 試劑反應呈現藍紫色，以 spectrophotometer (BMG Labtechnologies, Germany) 測定595nm 下之吸光值。細胞培養液的 nitrite 濃度以 sodium nitrite 之標準曲線定量。

### 3.6. ELISA (IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、Rantes)

使用 coating buffer 將細胞激素 (cytokines) 的 capture Antibody 稀釋250倍後，在96孔盤中的每孔加入100 $\mu$ l，於4°C靜置一夜。接著以 wash buffer (1X PBS+0.05% Tween-20) 清洗3次 (250 $\mu$ l/well) 去除多餘的 capture Antibody，再加入 assay diluent reagent 於室溫下反應1小時，再以 wash buffer 清洗3次，接著再加入待測的上述收集的細胞培養上清液、檢體及各 cytokines 的標準稀釋品 (100 $\mu$ l/well) 至盤中指定位置，於室溫下反應2小時，再以 wash buffer 清洗3次，然後加入100 $\mu$ l/well 的 Avidin-HRP，於室溫下反應15分鐘，接著以 wash buffer 清洗3~5次，最後加入100 $\mu$ l/well 的 substrate solution (1X TMB) 於室溫下作用5-10分鐘，再以80 $\mu$ l/well stop solution (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 終止其反應。最後，



以全波長酵素分析儀以波長450 /595nm 測定其 OD 值，並以標準品推算待測樣品的濃度。

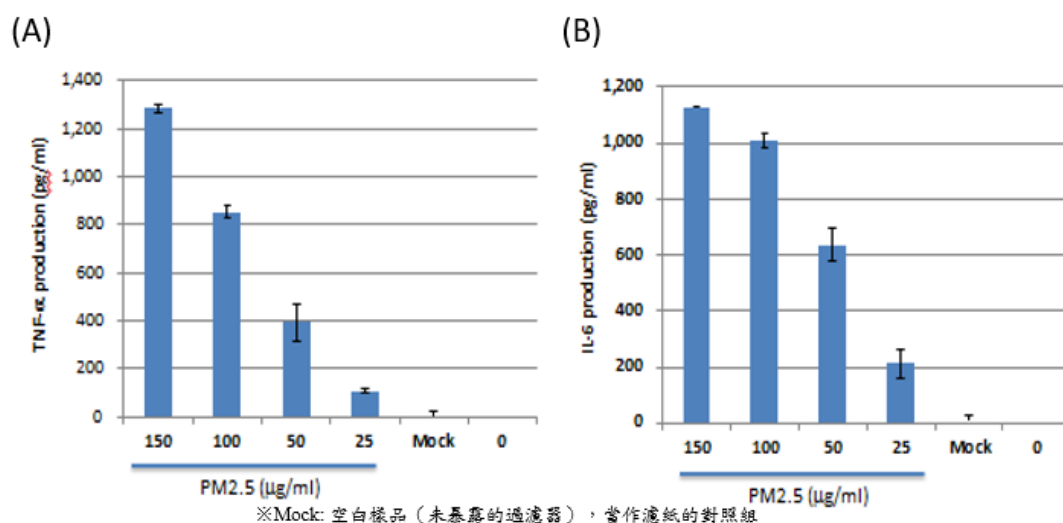
### 3.7. Western blotting

將已處理過的 MH-S 細胞收集起來，用 PBS 沖洗離心後，移除上清液加入 cell lysis reagent (10mM Tris-HCl pH7.5、10mM KCl、5mM MgCl<sub>2</sub>)，使用1000 $\mu$ l pipette 吸放大約20次，於4°C、18000  $\times$  g 離心20分鐘後吸取部分上清液以 Bradford 蛋白質分析試劑套組 (Amresco, 定量蛋白質之濃度，其餘則加入等體積的 sample buffer (100 mM DTT, 2 % SDS, 50 mM Tris, 10 % glycerol, 0.1 % Bromophenol blue) 將細胞混勻收至1.5 eppendorf tube 中，並在乾浴器以95°C加熱5分鐘，立即放置於冰上，儲存於-20°C備用。製備好的細胞萃取液，以每孔加入等量的蛋白質含量進行10% SDS-PAGE 垂直式電泳分離。電泳結束後將膠片取下以濕式轉漬器將膠片上之蛋白質轉印製 PVDF 膜。轉漬完成後，以含有5%脫脂奶粉的 PBST (1XPBS 含0.1%Tween 20) Blocking 大約1-2小時，減少非專一性鍵結，再加入一級抗體於4°C反應，反應24小時後，以 PBST 洗去未與蛋白鍵結的一級抗體(3次, 15分鐘/次)，接著再用 HRP-conjugated anti-mouse/rabbit antibody 反應1-2小時，再重複以 PBST 洗去未與一級抗體鍵結的抗體 (3次, 15分鐘/次)，最後加入 Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus 反應後，將 PVDF 膜放置於 LAS-1000 plus system 影像分析並定量之。

## 肆、結果

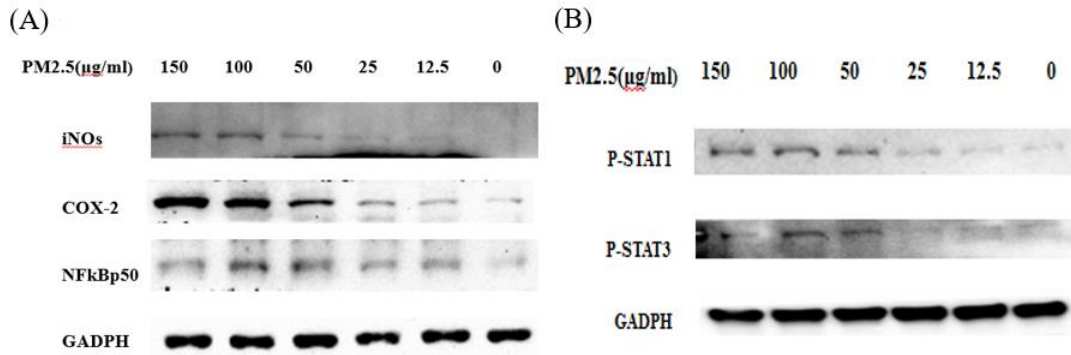
### 4.1. PM2.5可誘發 MH-S 細胞產生炎症反應

長期暴露於 PM2.5 之環境當中，可能使身體產生慢性的炎症反應。在本次的實驗中，我們利用不同濃度之 PM2.5 處理肺部巨噬細胞株 (MH-S)，反應 24 小時後，取其上清液與細胞分別以 ELISA 與西方點墨法分析，結果顯示，處理 25~150  $\mu\text{g/ml}$  的 PM2.5，會誘導細胞釋發出發炎相關細胞激素 IL-6 與 TNF- $\alpha$  得分泌量增加，因此可知此次所收集之 PM2.5 確實可誘發細胞產生炎症反應 (表一)。而發炎相關蛋白表現如 iNOS、COX2 及 NF $\kappa$ B 其表現量隨著 PM2.5 處理濃度的增加有遞增的情況產生 (圖一 A)，表示 PM2.5 的確會使得 MH-S 細胞產生炎症反應；在 JAK-STAT 訊息路徑的分子機轉上，我們亦發現 PM2.5 可能會經由活化 pJAK 與 pSTAT3 來誘發炎症反應 (圖一 B)，顯示 PM2.5 會經由 JAK-STAT 路徑來導致炎症反應產生。在此次的實驗中，我們看到使用 100  $\mu\text{g/ml}$  的 PM2.5 的劑量以足夠誘發顯著的炎症反應，因此在未來的研究都將以此劑量來進行後續的實驗。



(表一) 以 EILSA 分析不同濃度劑量 (150~25 $\mu\text{g/ml}$ ) PM2.5 處理的 MH-S 細胞其 TNF- $\alpha$ 、IL-6 之表現量

經過不同濃度劑量 (150、100、50、25、0  $\mu\text{g/ml}$ ) 的 PM2.5 處理過之肺部巨噬細胞株 (MH-S)，反應 24 小時後，收集各自之上清液並測其 TNF- $\alpha$ 、IL-6 之表現量。(A) TNF- $\alpha$ ；(B) IL-6。



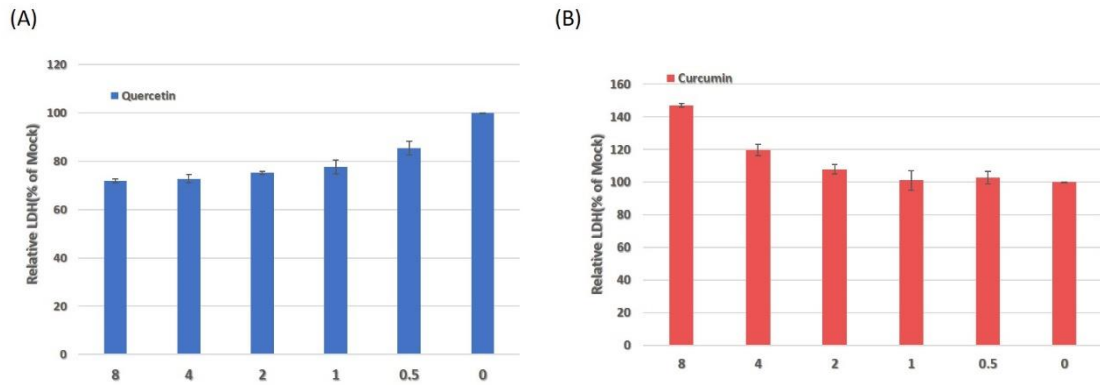
(圖一) 以西方墨點法來分析經由不同濃度 PM2.5 處理 24 小時後之 MH-S 細胞株 (A) 發炎相關蛋白 iNOS、COX2 及 NFκBp50；(B) p-STAT1 與 p-STAT3 之表現量。

經過不同濃度劑量 (150、100、50、25、0 μg/ml) 的 PM2.5 處理過之肺部巨噬細胞株 (MH-S)，反應 24 小時後，取其細胞以西方點墨法分析發炎相關蛋白 iNOS、COX2 及 NFκBp50 的表現量及其上游轉錄因子 pSTAT-1、pSTAT-3 的表現量 (A) iNOS、COX2、NFκB p50；(B) pSTAT-1、pSTAT-3。

#### 4.2. Quercetin 與 Curcumin 可抑制 PM2.5 所誘發的炎症反應

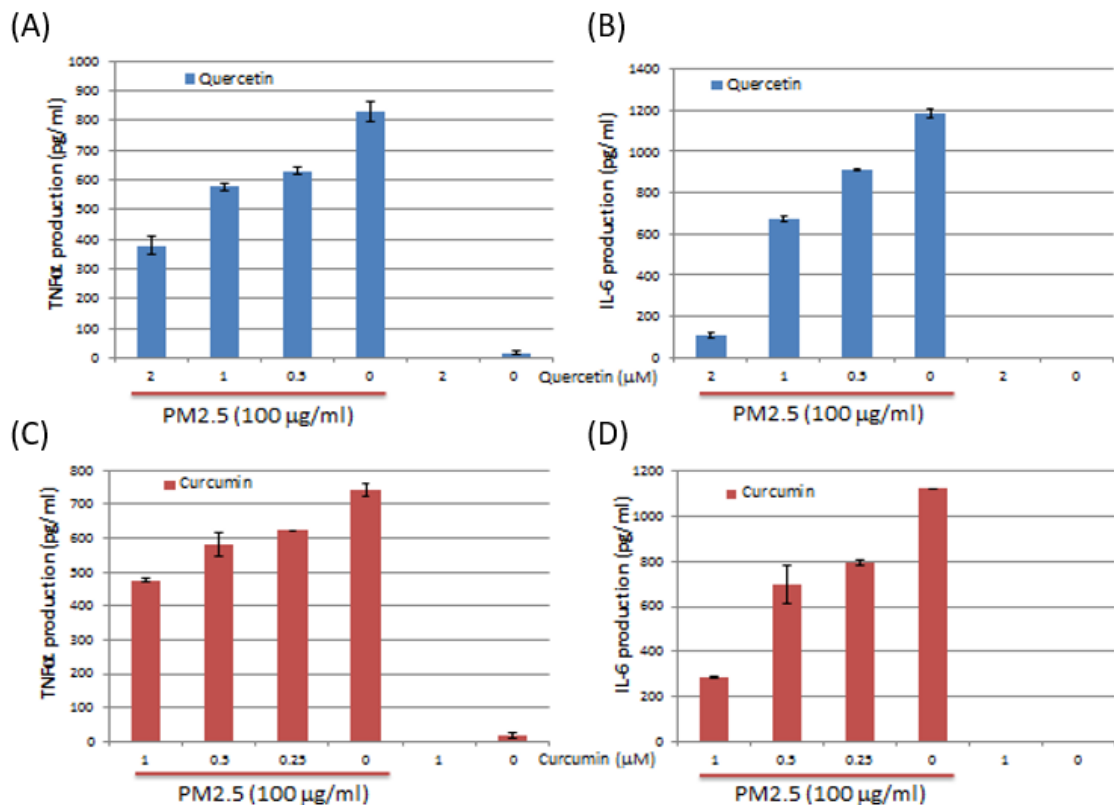
先前的實驗已利用不同濃度 (8~0.5 μM) 之 Curcumin 與 Quercetin 處理 MH-S 細胞，反應 24 小時後，以 LDH 來分析此兩種天然物的最佳劑量，結果顯示經 Quercetin 8~0.5 μM 處理過的 MH-S 細胞並無受到 Quercetin 濃度劑量太大影響，其數值皆比未受處理的 MH-S 細胞還來得低 (表二 A)，推測 Quercetin 可能會抑制 MH-S 細胞的生長，因 Quercetin 此天然物其溶解度之考量，我們最終選定 Quercetin 2 μM 來當作此實驗之最高濃度；而 Curcumin 經由 8、4、2 μM 處理過 MH-S 細胞與未受處理的 MH-S 細胞相比有明顯的毒性產生 (表二 B)，於是我們決定 Curcumin 的最高劑量為 1 μM。最終在本實驗中分別以 Quercetin (2、1 與 0.5 μM) 與 Curcumin (1、0.5 與 0.25 μM) 先處理 MH-S 細胞 1.5 小時後，再處理 PM2.5 (100 μg/ml) 反應 24 小時後，收集細胞及上清液，以 ELISA 來分析炎症相關的細胞激素及西方點墨法來分析相關炎症路徑。結果顯示，處理 Quercetin 或 Curcumin 皆可抑制 PM2.5 誘導細胞釋出發炎相關細胞激素 IL-6、TNF-α 的能力 (表三 A~D)，Quercetin 可抑制細胞釋發出細胞趨化因子 MCP-1 與 Rantes，使產生炎症反應的機率降低 (表三 E、F)，Curcumin 只能抑制 MCP-1 的產生，在 Rantes 此細胞趨化因子無太大的差異 (表三 G、H)。在相關炎症反應的指標蛋白分析上，由 (圖一 A) 的結果得知，PM2.5 可使 MH-S 細胞的 iNOS、COX-2 的表現量顯著的上升；而先預處理 Quercetin 或 Curcumin，再經 PM2.5 處理的 MH-S 細胞，其 iNOS、COX-2 的表現量隨著 Quercetin 或 Curcumin 處理濃度增加而有下降的趨勢，此結果證實 Quercetin 與 Curcumin 有抑制 PM2.5 誘導

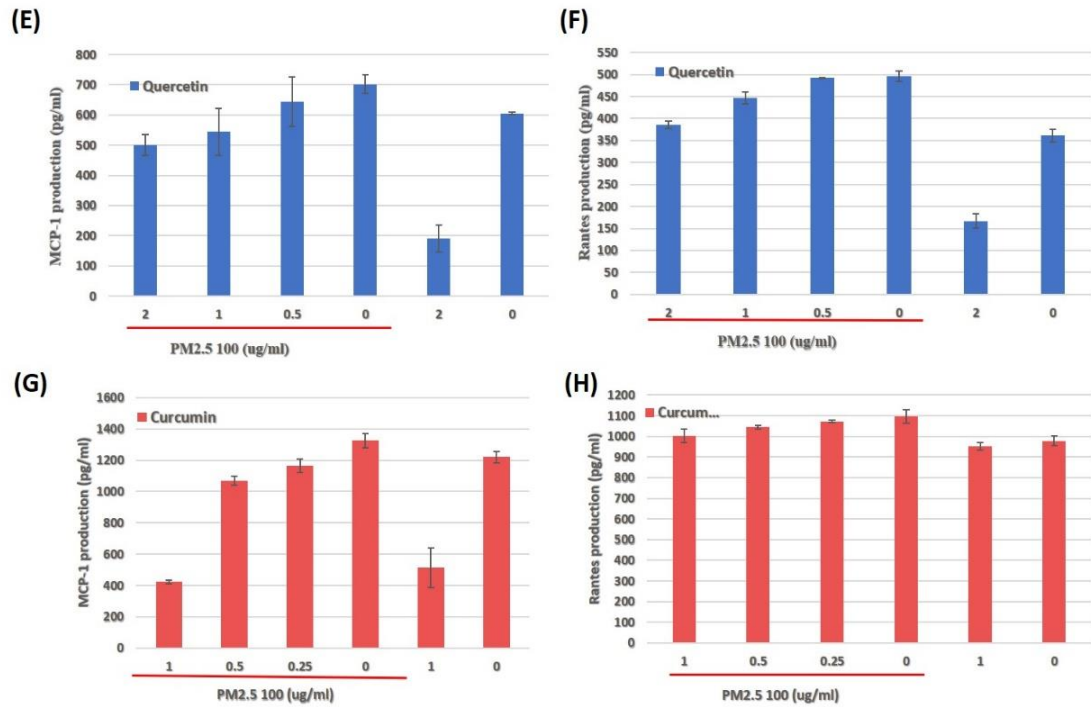
iNOS、COX-2的表現能力（圖二）。在 NFkB 的調控上也有相同的結果，PM2.5 可使 NFkB p50表現量增加，而經由 Quercetin 或 Curcumin 預處理的樣品，其 NF-kB p50的表現量亦隨著 Quercetin 或 Curcumin 濃度增加而有下降的趨勢（圖二）。



(表二) 以 LDH 分析不同 Quercetin 與 Curcumin 濃度劑量 (8~0.5 μM) 之細胞死亡率

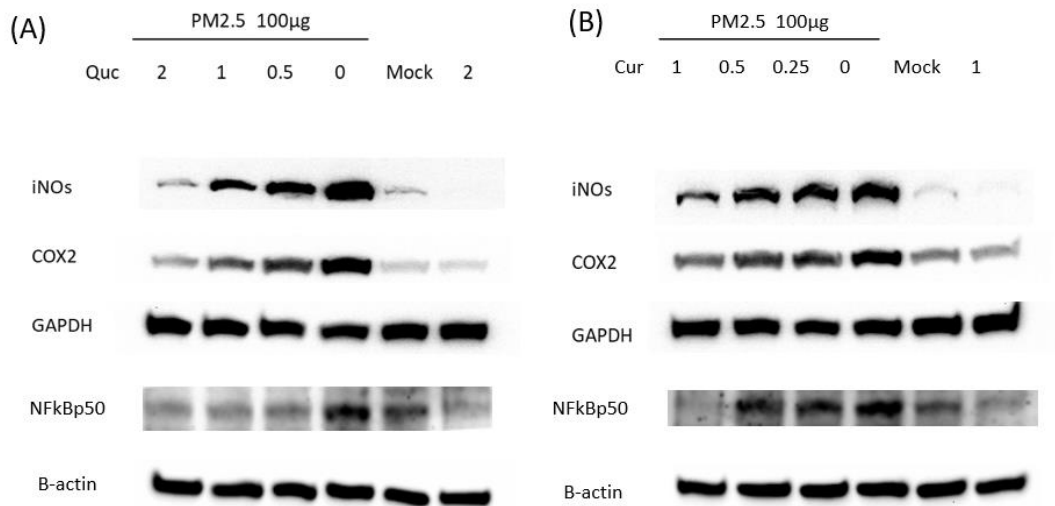
(A) 以不同濃度劑量 (8、4、2、1、0.5、0 μM) 的 Quercetin 處理過之肺部巨噬細胞株 (MH-S)，反應24小時後，收集各自之上清液並測其 LDH 的表現量。(B) 以不同濃度劑量 (8、4、2、1、0.5、0 μM) 的 Curcumin 處理過之肺部巨噬細胞株 (MH-S)，反應24小時後，收集各自之上清液並測其 LDH 的表現量。





(表三) 以 ELISA 來分析先經由 Quercetin 或 Curcumin 處理過的 MH-S 細胞其受 PM2.5 處理後, IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 與 Rantes 之表現量

先以 Quercetin (2、1 與 0.5  $\mu$ M) 處理 MH-S 細胞 1.5 小時後, 再以 100  $\mu$ g/ml PM2.5 處理, 反應 24 小時後, 收集其上清液, 以 ELISA 來分析 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 與 Rantes 的表現量 (A) TNF- $\alpha$ ; (B) IL-6; (E) MCP-1; (F) Rantes。先以 Curcumin (1、0.5 與 0.25  $\mu$ M) 處理 MH-S 細胞 1.5 小時後, 再以 100  $\mu$ g/ml PM2.5 處理, 反應 24 小時後, 收集其上清液, 以 ELISA 來分析 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 與 Rantes 的表現量。(C) TNF- $\alpha$ ; (D) IL-6; (G) MCP-1; (H) Rantes。



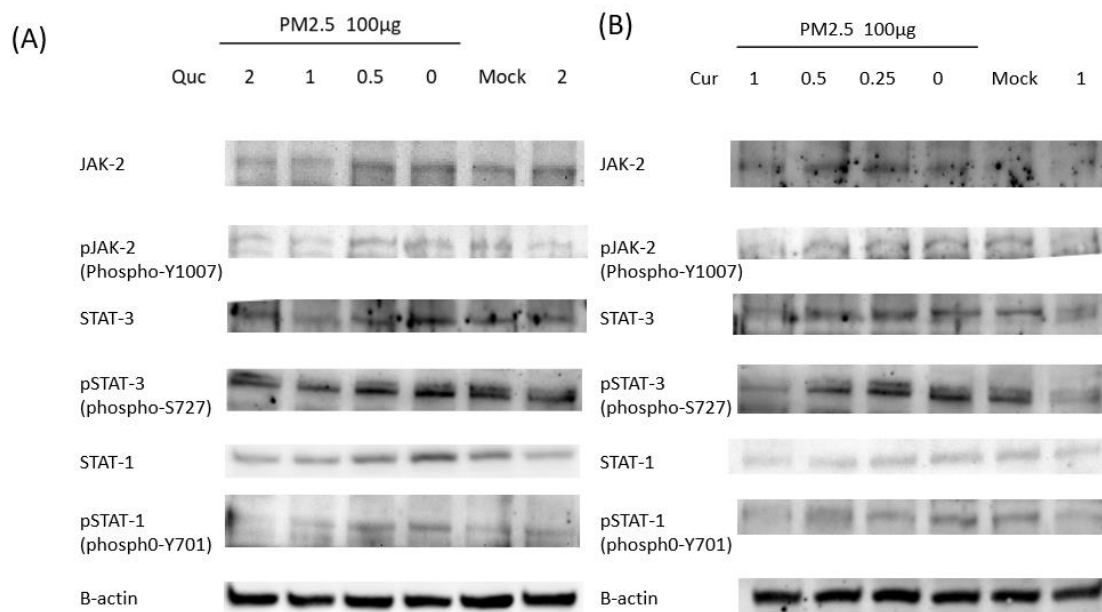
(圖二) 以西方點墨法來分析其發炎相關蛋白表現量 (iNOS、COX2、NFκBp50)

(A) 先以 Quercetin (2、1 與 0.5  $\mu$ M) 處理 MH-S 細胞 1.5 小時後, 再以 100  $\mu$ g/ml PM2.5 處理, 反應 24 小時後, 收集其細胞, 以西方點墨法來分析發炎相關蛋白 iNOS、COX2 與 NFκBp50 的表

現量。(B) 先以 Curcumin (1、0.5與0.25  $\mu\text{M}$ ) 處理 MH-S 細胞1.5小時後，再以100  $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 處理，反應24小時後，收集其細胞，以西方點墨法來分析發炎相關蛋白 iNOS、COX2與 NF $\kappa$ Bp50 的表現量。

#### 4.3. Quercetin 與 Curcumin 可抑制 PM2.5所活化的 JAK-STAT 訊號路徑

JAK-STAT pathway 可經由 IL-6與 gp130結合而誘導活化，異常活化的 IL-6信號表現可能造成炎症反應。因此，本次的研究中我們主要著重在此路徑是否會經 PM2.5的刺激而產生炎症反應。由(圖一 B)的結果得知，單獨處理 PM2.5 確實可促使 pSTAT-1與 pSTAT-3表現量增加，而導致炎症反應，然先預處理 Quercetin 或 Curcumin 的實驗組，其 JAK-2、pJAK-2、STAT-1、STAT-3、pSTAT-1與 pSTAT-3蛋白表現量，也隨著 Quercetin 或 Curcumin 處理濃度增加有下降的趨勢(圖三)。表示 Quercetin 或 Curcumin 的確可透過 JAK-STAT 訊號路徑來去抑制 PM2.5所誘發的炎症反應。

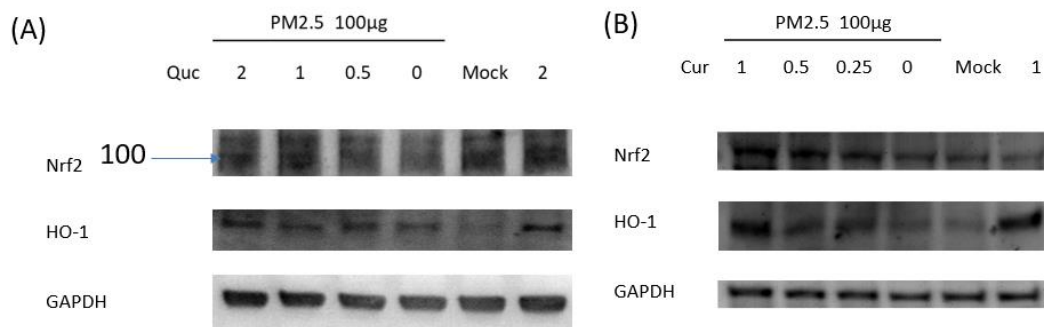


(圖三) 以西方點墨法來分析 JAK-STAT 路徑蛋白表現量 (JAK、pJAK-2、STAT-3、pSTAT-3、STAT-1、pSTAT-1)

(A) 先以 Quercetin (2、1 與0.5  $\mu\text{M}$ ) 處理 MH-S 細胞1.5小時後，再以100  $\mu\text{g/ml}$  PM2.5處理，反應24小時後，收集其細胞，以西方點墨法來分析 JAK-STAT 路徑蛋白 JAK、pJAK-2、STAT-3、pSTAT-3、STAT-1、pSTAT-1表現量。(B) 先以 Curcumin (1、0.5與0.25  $\mu\text{M}$ ) 處理 MH-S 細胞1.5小時後，再以100  $\mu\text{g/ml}$ PM2.5處理，反應24小時後，收集其細胞，以西方點墨法來分析 JAK-STAT 路徑蛋白 JAK、pJAK-2、STAT-3、pSTAT-3、STAT-1、pSTAT-1表現量。

#### 4.4. Quercetin 與 Curcumin 可活化 Nrf2 訊號路徑達到抗氧化的作用

Nrf 2 為調控 HO-1 表現之一的轉錄因子，HO-1 為許多天然植物抗發炎指標 (Dai et al., 2019)。由 (圖四) 可得知，我們發現處理 PM2.5 的實驗組會抑制 HO-1 和 Nrf2 的表現，經由 Quercetin 或 Curcumin 預處理的實驗組，其 HO-1 和 Nrf 2 蛋白表現量皆隨著其兩者的濃度增加而有增加的趨勢，而單純只有 Quercetin (2  $\mu$ M) 或 Curcumin (1  $\mu$ M) 處理之樣品與未受任何處理之樣品 (Mock) 相比，其 HO-1 有相當明顯的表現量。表示 Quercetin 與 Curcumin 可經由活化 Nrf 2 進而增加 HO-1 表現量來達到抗發炎的作用。



(圖四) 以西方點墨法來分析抗氧化蛋白表現量 (Nrf2、HO-1)

(A) 先以 Quercetin (2、1 與 0.5  $\mu$ M) 處理 MH-S 細胞 1.5 小時後，再以 100  $\mu$ g/ml PM2.5 處理，反應 24 小時後，收集其細胞，以西方點墨法來分析抗發炎蛋白 Nrf2、HO-1 表現量。(B) 先以 Curcumin (1、0.5 與 0.25  $\mu$ M) 處理 MH-S 細胞 1.5 小時後，再以 100  $\mu$ g/ml PM2.5 處理，反應 24 小時後，收集其細胞，以西方點墨法來分析抗發炎蛋白 Nrf2、HO-1 表現量。

## 伍、 討論

炎症反應是人體中的保護機制，可使我們保護身體不受外在威脅，但過度的炎症反應對於人體是有害的，甚至會導致疾病產生。若是我們能適當地抑制 pro-inflammatory 的因子，便能使炎症反應減緩，既可以適當的保護人體不受到病原侵襲，也可降低炎症反應過度而受到的傷害。而目前環境的空氣污染嚴重，PM2.5 含量日趨增加，導致許多呼吸道相關之疾病產生，並且 PM2.5 中會附著一些重金屬，例如鎳、鎘等等，並且有文獻指出，鎘會導致一些肺部疾病，其中包括肺癌和慢性阻塞性肺病（Whyand, Hurst, Beckles, & Caplin, 2018）。

目前有天然物被指出，可抑制 pro-inflammatory 因子（NO、PGE2），因此其認為具有抗發炎的作用，在2019年的文獻中提到，Quercetin 可抑制 STAT 磷酸化，藉由降低 pro-apoptotic 基因 Bax 表現和提升 anti-apoptotic 基因 Bcl-2 表現，使 dopaminergic 細胞避免細胞凋亡（Nabavi et al., 2019）。另外，Whyand 研究團隊在2018年的文獻中提到，Curcumin 對於鎘造成的毒性具有預防性，在動物的慢性阻塞性肺病實驗中，Curcumin 可透過刺激抑制型細胞激素因子（SOCS）-3 / JAK2 / STAT 路徑，來改善平均肺動脈壓和右心室心肌梗塞（RVMI）的情形（Whyand, Hurst, Beckles, & Caplin, 2018）。

根據上述的文獻，我們在本次的研究使用 Quercetin 及 Curcumin 來抑制 PM2.5 所誘導的炎症反應。結果顯示，這兩者皆可經由 JAK-STAT 路徑來抑制進入核內進行轉錄作用的 NFkBp50 蛋白表現量，進而降低 iNOS、COX-2、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、Rantes 蛋白的表現量，使 PM2.5 在 MH-S 細胞所誘發的炎症反應減弱。由（表三、圖二）結果得知，先經過 Quercetin 或 Curcumin 處理後再加入 PM2.5 誘導的 MH-S 細胞，其 iNOS、COX、NFkBp50、JAK、pJAK、STAT1/3、pSTAT1/3 蛋白的表現量都隨藥物的濃度增加而有遞減的趨勢（圖二、圖三）。此結果表示 Quercetin 及 Curcumin 的確會透過 JAK-STAT 訊號路徑來抑制 PM2.5 所誘發的炎症反應。

先前的研究已證明 HO-1 可抑制 NO、IL-6、TNF- $\alpha$ ，而 Nrf2 為 HO-1 蛋白的主要轉錄因子，若是 Nrf2 進入核內則可刺激 HO-1 之表現量增加（Choo et al., 2015; Dai et al., 2019）。在正常的情況下，Nrf2 會被 Kelch-like ECH-associated protein 1（Keap1）蛋白結合並被抑制在細胞質中，當細胞受到 ROS 刺激時，可將 Keap1 與 Nrf2 分離，使 Nrf2 進入核內並產生 HO-1 蛋白（Dai et al., 2019）。HO-1 蛋白具有抗氧化、抗細胞凋亡、抗發炎之能力，有文獻指出 HO-1 蛋白許多的炎症相關疾病的發病機制有關，包含骨關節炎、癌症、急性肺損傷等等（Cai et al., 2019;）



Chakraborty et al., 2019; Chang et al., 2018; Chiang, Chen, & Chang., 2019)。由先前的文獻得知，NFκB 亦會導致 Nrf2 表現量增加 (Forman and Finch., 2018)，(圖四) 結果表示經由 Quercetin 或 Curcumin 預處理再經 PM2.5 誘導之樣品，其 HO-1 和 Nrf 2 蛋白表現量皆隨著其兩者的劑量增加而有遞增的趨勢，而單純只有 Quercetin (2 μM) 或 Curcumin (1 μM) 處理之樣品與未受任何處理之樣品 (Mock) 相比，其 HO-1 有相當明顯的表現量，而在 (圖二) 結果圖中，NFκB 表現量則是受到藥物劑量增加而遞減。因此我們認為 Quercetin 與 Curcumin 可促進 Nrf2 蛋白經活化進入核內進行轉錄，相對提升 HO-1 蛋白表現量，而非透過活化 NFκB 路徑使 HO-1 表現量增加，此結果更加證實 Quercetin 與 Curcumin 在 MH-S 細胞中是藉由 Nrf2/HO-1 路徑達到抗發炎的效果。

## 陸、 結論

Quercetin 與 Curcumin 此兩種天然物的成分有抑制 PM2.5 在 MH-S 細胞中所誘發的炎症反應的能力，其兩者皆為經由抑制 JAK2-STAT1/3 此路徑的活化來去進一步地減少 NFκB p50 蛋白表現量，最終影響 iNOS、COX2 發炎相關蛋白之產生，來達到抑制炎症反應。其兩種天然物亦能藉由 Nrf2/HO-1 路徑，增加 HO-1 蛋白之表現量，達到抗發炎的效果。

## 柒、 參考文獻

1. 中華民國行政院衛生福利部，2016。
2. 懸浮微粒之健康危害及預防.高小萍、陳佩安、劉志青(輻射及操作安全組)。
3. 邱宜君 (2015,03) <全台折壽！空污正毒害你的心臟> 。康健雜誌197期。
4. M. Guevara (2016): Emissions of Primary Particulate Matter. UK, Royal Society of Chemistry.
5. Akbik D, Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanzadeh R. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sci.* 2014 Oct ; 116 ( 1 ) :1-7.
6. Amjad Ali, Akhil C. Banerjee. Curcumin inhibits HIV-1 by promoting Tat protein degradation. *Sci Rep.* 2016 Jun ; ( 6 ) : 27539.
7. Avinaba Mukherjee, Anisur Rahman Khuda-Bukhsh. Quercetin Down-regulates IL-6/STAT-3 Signals to Induce Mitochondrial-mediated Apoptosis in a Non-small-cell Lung-cancer Cell Line, A549. *J Pharmacopuncture.* 2015 Mar; 18 ( 1 ) : 19–26.
8. Abdollahi, E., A. A. Momtazi, T. P. Johnston and A. Sahebkar. Therapeutic effects of curcumin in inflammatory and immune-mediated diseases: A nature-made jack-of-all-trades? *Journal of Cellular Physiology.* 2018 Feb; 233 ( 2 ) : 830-848.
9. Bhaskar S, Shalini V, Helen A. Quercetin regulates oxidized LDL induced inflammatory changes in human PBMCs by modulating the TLR-NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Immunobiology.* 2011 Mar; 216 ( 3 ) :367-73.
10. Charles J Malemud. Recent advances in neutralizing the IL-6 pathway in arthritis. *Open Access Rheumatol.* 2009; ( 1 ) : 133–150.
11. Cai, D., Huff, T. W., Liu, J., Yuan, T., Wei, Z., & Qin, J. (2019) . Alleviation of cartilage destruction by sinapic acid in experimental osteoarthritis. *BioMed Research International*, 2019 Feb; 2019.
12. Chakraborty, S., Balan, M., Flynn, E., Zurakowski, D., Choueiri, T. K., & Pal, S. Activation of c-Met in cancer cells mediates growth-promoting signals against oxidative stress through Nrf2-HO-1. *Oncogenesis*, 2019 Jan; 8 ( 2 ) .
13. Chang, J. S., Lin, H. J., Deng, J. S., Wu, W. T., Huang, S. S., & Huang, G. J. Preventive Effects of Velvet Antler ( *Cervus elaphus* ) against Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice by Inhibiting MAPK/NF-B Activation and Inducing AMPK/Nrf2 Pathways. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* 2018 Jan; 2018.
14. Chiang, S. K., Chen, S. E., & Chang, L. C. A dual role of heme oxygenase-1 in cancer cells. *International journal of molecular sciences*, 2018 Dec; 20 ( 1 ) .
15. Choo, Y.-Y., Lee, S., Hung Nguyen, P., Lee, W., Woo, M.-H., Min, B.-S., & Lee, J.-H. Caffeoylglycolic acid methyl ester, a major constituent of sorghum, exhibits

- anti-inflammatory activity via the Nrf2/heme oxygenase-1 pathway. 2015 Feb; 5 ( 23 )
16. C. Lee and C. M. Greenlief ( 2019 ) . "Quercetin Potentiates Docosahexaenoic Acid to Suppress Lipopolysaccharide-induced Oxidative/Inflammatory Responses, Alter Lipid Peroxidation Products, and Enhance the Adaptive Stress Pathways in BV-2 Microglial Cells. *International journal of molecular sciences*. 2019 Feb; 20 ( 4 ) .
  17. Bo Dai, Dan Wei, Ning-ning Zheng, Zhi-hong Chi, Na Xin, Ting-xian Ma, Lanyan Zheng, Ryo Sumi, Luning Sun. *Coccomyxa gloeobotrydiformis* polysaccharide inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018 Dec; 51 ( 6 ) , 2523-2535.
  18. Fang Liu, Yunlong Huang, Fang Zhang, Qiang Chen, Beiqing Wu, Wei Rui, Jialin C. Zheng and Wenjun Ding. Macrophages treated with particulate matter PM2.5 induce selective neurotoxicity through glutaminase-mediated glutamate generation. *Journal of neurochemistry*. 2015 July; 134 ( 2 ) : 315-326.
  19. Farina F, Sancini G, Mantecca P, Gallinotti D, Camatini M, Palestini P. The acute toxic effects of particulate matter in mouse lung are related to size and season of collection. *Toxicol Lett*. 2011 May ;202 ( 3 ) :209-17.
  20. Forman, H. J. and C. E. Finch . A critical review of assays for hazardous components of air pollution. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018 Mar; 117: 202-217.
  21. George D. Thurston, Howard Kipen, Isabella Annesi-Maesano, John Balmes, Robert D. Brook, Kevin Cromar, Sara De Matteis, Francesco Forastiere, Bertil Forsberg, Mark W. Frampton, Jonathan Grigg, Dick Heederik, Frank J. Kelly, Nino Kuenzli, Robert Laumbach, Annette Peters, Sanjay T. Rajagopalan, David Rich, Beate Ritz, Jonathan M. Samet, Thomas Sandstrom, Torben Sigsgaard, Jordi Sunyer, and Bert Brunekreef. A joint ERS/ATS policy statement: what constitutes an adverse health effect of air pollution? An analytical framework. *Eur Respir J*. 2017 Jan ;49 ( 1 ) .
  22. Graham Akeson and Charles J. Malemud. A Role for Soluble IL-6 Receptor in Osteoarthritis. *J Funct Morphol Kinesiol*. 2017 Aug; 2 ( 3 ) .27
  23. Hao Yin, Massimo Pizzol, Linyu Xu. External costs of PM2.5 pollution in Beijing, China: Uncertainty analysis of multiple health impacts and costs. *Environ Pollut*. 2017 Jul;226:356-369.
  24. Hetong Wang, Laiyu Song, Wenhui Ju, Xuguang Wang, Lu Dong, Yining Zhang, Ping Ya, Chun Yang & Fasheng Li. The acute airway inflammation induced by PM2.5 exposure and the treatment of essential oils in Balb/c mice. *Sci Rep*. 2017 Mar 9; ( 7 ) :44256.

25. Jain SH, Massaro JM, Hoffmann U, Rosito GA, Vasan RS, Raji A, O'Donnell CJ, Meigs JB, Fox CS. Cross-sectional associations between abdominal and thoracic adipose tissue compartments and adiponectin and resistin in the Framingham Heart Study. *Diabetes Care*. 2009 May;32 ( 5 ) :903-8.
26. Jie Yin, Weiwei Xia, Yuanyuan Li, Chuchu Guo, Yue Zhang<sup>1</sup>, Songming Huang, Zhanjun Jia Aihua Zhang. COX-2 mediates PM2.5-induced apoptosis and inflammation in vascular endothelial cells. *Am J Transl Res*. 2017 Sep 15;9 ( 9 ) :3967-3976.
27. Jing Dong, Xian Zhang, Lei Zhang, Hui-Xi Bian, Na Xu, Bin Bao, and Jian Liu. Quercetin reduces obesity-associated ATM infiltration and inflammation in mice: a mechanism including AMPK $\alpha$ 1/SIRT1. *J Lipid Res*. 2014 Mar; 55 ( 3 ) : 363–374.
28. Kirsty Meldrum, Chang Guo, Emma L. Marczylo, Timothy W. Gant, Rachel Smith, and Martin O. Leonard. Mechanistic insight into the impact of nanomaterials on asthma and allergic airway disease. *Part Fibre Toxicol*. 2017 Nov 21;14 ( 1 ) :45.
29. Li Jin, Zhe Hao Piao, Simei Sun, Bin Liu, Yuhee Ryu, Sin Young Choi, Gwi Ran Kim, Hyung-Seok Kim, Hae Jin Kee, Myung Ho Jeong. Gallic acid attenuates pulmonary fibrosis in a mouse model of transverse aortic contraction-induced heart failure. 2017 Dec; ( 99 ) :74-82
30. Miao He, Takamichi Ichinose, Makoto Kobayashi, Keiichi Arashidani, Seiichi Yoshida, Masataka Nishikawa, Hirohisa Takano, Guifan Sun, Takayuki Shibamoto. Differences in allergic inflammatory responses between urban PM2.5 and fine particle derived from desert-dust in murine lungs. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016 Apr 15;297:41-55.
31. Mukherjee S, Baidoo J, Fried A, Atwi D, Dolai S, Boockvar J, Symons M, Ruggieri R, Raja K, Banerjee P. Curcumin changes the polarity of tumor-associated microglia and eliminates glioblastoma. *Int J Cancer*. 2016 Dec 15;139 ( 12 ) :2838-2849.
32. Neil E. Alexis, Yuh Chin T. Huang, Ana G. Rappold, Howard Kehrl, Robert Devlin, Ph and David B. Peden. Patients with Asthma Demonstrate Airway Inflammation after Exposure to Concentrated Ambient Particulate Matter. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Jul; 190 ( 2 ) : 235–237.
33. Nabavi, S. M., Ahmed, T., Nawaz, M., Devi, K. P., Balan, D. J., Pittalà, V., Shirooie, S. Targeting STATs in neuroinflammation: The road less traveled! *Pharmacological Research*. 2019 Mar;141:73-84
34. Ogino K, Zhang R, Takahashi H, Takemoto K, Kubo M, Murakami I, Wang DH, Fujikura Y. Allergic airway inflammation by nasal inoculation of particulate matter (PM2.5) in NC/Nga mice. *PLoS One*. 2014 Mar;9 ( 3 )
35. Petra Haberzettl, Daniel J. Conklin, Wesley T. Abplanalp, Aruni Bhatnagar,

- Timothy E. O'Toole. Inhalation of Fine Particulate Matter Impairs Endothelial Progenitor Cell Function Via Pulmonary Oxidative Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018 Jan;38 ( 1 ) :131-142.
36. Petra Haberzettl, Timothy E. O'Toole, Aruni Bhatnagar, and Daniel J. Conklin. Exposure to Fine Particulate Air Pollution Causes Vascular Insulin Resistance by Inducing Pulmonary Oxidative Stress. *Environ Health Perspect. Environ Health Perspect.* 2016 Dec;124 ( 12 ) :1830-1839.
  37. Park, S., W. Lim, F. W. Bazer, K. Y. Whang and G. Song .Quercetin inhibits proliferation of endometriosis regulating cyclin D1 and its target microRNAs in vitro and in vivo. *Journal of Nutritional Biochemistry.*2019 Jan; 63: 87-100.
  38. Qiansheng Huang, Yulang Chi, Junjun Deng, Yiyao Liu, Yanyang Lu, Jinsheng Chen & Sijun Dong. Fine particulate matter 2.5 exerted its toxicological effect by regulating a new layer, long non-coding RNA. *Scientific Reports.* 2017 Aug; ( 7 ) : 9392.
  39. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* 2004 Mar;117 ( 8 ) :1281-3.
  40. Scapagnini G, Vasto S, Abraham NG, Caruso C, Zella D, Fabio G. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol.* 2011 Oct;44 ( 2 ) :192-201.
  41. Srivastava, N. S. and R. A. K. Srivastava .Curcumin and quercetin synergistically inhibit cancer cell proliferation in multiple cancer cells and modulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and apoptotic pathways in A375 cells. *Phytomedicine.* 2019 Jan; 52: 117-128
  42. Sun, G. Y., R. Li, B. Yang, K. L. Fritsche, D. Q. Beversdorf, D. B. Lubahn, X. Geng, J. C. Lee and C. M. Greenlief. Quercetin Potentiates Docosahexaenoic Acid to Suppress Lipopolysaccharide-induced Oxidative/Inflammatory Responses, Alter Lipid Peroxidation Products, and Enhance the Adaptive Stress Pathways in BV-2 Microglial Cells. *International journal of molecular sciences.*2019 Feb; 20 ( 4 )
  43. Whyand, T., Hurst, J. R., Beckles, M., & Caplin, M. E. Pollution and respiratory disease: Can diet or supplements help? A review. *Respiratory Research.* 2018 Dec;19 ( 1 ) .
  44. Xiaoquan Rao, Priti Patel, Robin Puett, and Sanjay Rajagopalan. Air Pollution as a Risk Factor for Type 2 Diabetes. *Toxicological Sciences.* 2015 Feb;143( 2 ):231–241.
  45. Yong Son, Ju Hwan Lee, Yong-Kwan Cheong, Hun-Taeg Chung, and Hyun-Ock Pae. Antidiabetic Potential of the Heme Oxygenase-1 Inducer Curcumin Analogues. *Biomed Res Int.* 2013 Sep; 918039.