

大气颗粒物对 A549 和 HUVEC 的 DNA 损伤机制

尚 羽, 张 玲, 范兰兰, 蒋玉婷

(上海大学 环境与化学工程学院, 环境污染与健康研究所, 上海 200444)

摘要: 采集北京市海淀区大气颗粒物粗颗粒 (PM_{10-2.5})、细颗粒 (PM_{2.5-0.1}) 和超细颗粒 (PM_{0.1}), 分析颗粒物对人肺上皮细胞 (human lung epithelial cell, A549) 和人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 的基因毒性及促进活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 生成的机制。彗星实验发现: PM_{10-2.5}, PM_{2.5-0.1} 和 PM_{0.1} 对 2 种细胞均有显著的基因毒性, 并呈剂量-效应关系; 细和超细颗粒造成的 DNA 损伤显著高于粗颗粒; HUVEC 细胞的 DNA 损伤程度大于 A549 细胞; PM_{2.5-0.1} 和 PM_{0.1} 可诱导 2 种细胞内 ROS 水平显著升高, 而 PM_{10-2.5} 不能。因此细胞内 DNA 损伤可能与 ROS 生成有一定联系。

关键词: 大气颗粒物; 人肺上皮细胞 (A549); 人脐静脉血管内皮细胞 (HUVEC); DNA 损伤; 活性氧自由基

中图分类号: R 994.6

文献标志码: A

文章编号: 1007-2861(2013)04-0411-06

Genotoxicity of Size-Fractionated Ambient Particulate Matter in A549 and HUVEC Cell Lines

SHANG Yu, ZHANG Ling, FAN Lan-lan, JIANG Yu-ting

(Institute of Environmental Pollution and Health, School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract: Ambient particulate matter has become one of the most harmful pollutants in the air. The genotoxic effects and generation mechanism of reactive oxygen species (ROS) were studied in A549 and HUVEC cells treated with three sizes of ambient particles, PM_{10-2.5}, PM_{2.5-0.1} and PM_{0.1}. The results from comet assay show that PM_{10-2.5}, PM_{2.5-0.1} and PM_{0.1} caused significant DNA damages in both A549 and HUVEC cells in a dose-dependent manner. In both types of cells, the DNA damage caused by PM_{2.5-0.1} and PM_{0.1} are significantly higher than that caused by PM_{10-2.5}, and PMs cause higher DNA damage in HUVEC cells than that in A549 cells. PM_{2.5-0.1} and PM_{0.1} can significantly increase the intracellular ROS level, but PM_{10-2.5} cannot. DNA damage in cells induced by particles may be related to the generation of ROS, which deserves further investigations.

Key words: ambient particulate matter; human umbilical vein endothelial cell (HUVEC); human lung epithelial cell (A549); DNA damage; ROS generation

颗粒物已成为我国城市重要的大气污染物之一。颗粒物污染不仅带来了能见度下降、气候变化等环境问题, 而且危害了人体健康^[1]。大气颗粒物按其空气动力学直径可分为 3 类: 可吸入颗粒物 (空气动力学直径 <10 μm, PM₁₀)、细颗粒物 (空气动力学直径 <2.5 μm, PM_{2.5}) 和超细颗粒物 (空气动力学直径 <0.1 μm, PM_{0.1})。颗粒物的来源包括天然源和人为源, 其中城市大气颗粒物最主要的人为源是燃煤和

机动车尾气排放^[1-2]。流行病学研究证实, 大气颗粒物浓度的上升会导致人心肺系统发病率和死亡率增加, 尤其是对已患有心肺系统疾病的人群^[3-5]。但到目前为止, 相关的致病机理的研究尚处于起步阶段, 提出的假设很多, 而确定的事实较少。关键的问题是颗粒物的化学组成、粒径分布及与健康效应的关系还不明确^[6]。毒理学的研究表明, 在相同材质和质量的情况下, 相比粗颗粒, PM_{2.5} 和 PM_{0.1} 更易诱发实验动物

收稿日期: 2013-04-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21107068); 环保部环保公益性行业科研专项基金资助项目(201009032)

通信作者: 尚 羽(1982—), 女, 博士, 研究方向为大气污染物的区域污染特征和健康影响。E-mail: yushang@shu.edu.cn

肺部的炎症^[7-9],产生这种结果的原因很可能是,单位质量的细和超细颗粒物可以产生更多的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)^[10-12].

PM_{2.5}和PM_{0.1}具有粒径小、比表面积大、数浓度高以及在肺部沉积效率高、沉积部位深等特点^[13-14],且PM_{0.1}可直接进入血液循环从而分布全身^[15],会对人体健康产生严重的损害,因而成为环境健康领域的研究重点. 流行病学的研究发现,大气颗粒物对人体呼吸和心血管系统都有影响,颗粒物的健康危害具有全身性^[3-5]. 目前,国内外关于颗粒物对健康影响的研究重点已经由早期的PM₁₀转移到了PM_{2.5}和PM_{0.1},其中多数研究探讨PM_{2.5}对呼吸系统的影响,而PM_{2.5}和PM_{0.1}对心血管系统影响的研究则相对较少^[16]. 因此,本研究采用体外培养人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)和人肺上皮细胞(human lung epithelial cell, A549)分别暴露于3种不同粒径段的颗粒物(PM_{10-2.5}, PM_{2.5-0.1}和PM_{0.1}),从DNA损伤和ROS生成两方面来探讨不同粒径颗粒物对细胞的损伤,并且比较血管内皮细胞和肺上皮细胞对于颗粒物暴露的敏感程度.

1 材料与仪器

1.1 主要材料和试剂

胎牛血清(PAA, Laboratories GmbH公司,奥地利), RPMI-1640培养基(南京凯基生物科技发展有限公司), HAM'S/F-12培养基(赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司), 四甲基偶氮唑盐(MTT, Life Science公司, 美国), 琼脂糖(Sigma-Aldrich公司, 美国), 6孔培养板、35 mm培养皿以及75 cm²培养瓶(Corning公司, 美国), 其他试剂(分析纯)均购自上海国药集团化学试剂公司.

1.2 主要仪器

CO₂恒温细胞培养箱(Lingde公司, 德国), Alpha2-4冷冻干燥机(Christ公司, 德国), iMark-680型酶联免疫检测仪(Bio-Rad公司, 美国), 超声仪(德洋意邦仪器有限公司, 中国), 正置荧光显微镜(BX51型, Olympus公司, 日本).

2 实验方法

2.1 颗粒样品采集和处理

大气颗粒物PM_{10-2.5}, PM_{2.5-0.1}和PM_{0.1}采集于北京市海淀区西四环北京大学校园(由北京大学环境科学与工程学院朱彤教授课题组提供). 将载有颗粒物的石英纤维滤膜剪成3 cm×3 cm大小, 加入少量70%的乙醇润湿后, 浸入灭菌过的去离子水中超声

振荡; 加入冰块, 保持超声水温不高于25℃; 每次超声30 min, 重复3次将石英膜上的颗粒物充分洗脱; 使用镊子取出采样膜后真空冷冻干燥, 称重; 用无菌的PBS溶液重新悬浮(终浓度20 mg/mL), 置于冰箱-20℃保存备用. 染毒时, 用含2%血清的培养基稀释至所需浓度, 超声振荡使颗粒物混匀.

2.2 细胞培养和染毒

A549购自上海市中国科学院细胞库, HUVEC购自南京凯基生物科技发展有限公司. HUVEC为原代培养的细胞株, 购买时为第3代细胞, 本实验中使用10代以内的细胞. 细胞在5% CO₂, 37℃恒温恒湿条件下培养. 当细胞生长2~3 d, 单层细胞达到80%以上时, 按1:3的比例传代培养. HUVEC和A549分别使用含10%胎牛血清的RPMI-1640和HAM'S/F-12培养基培养.

取对数生长期的细胞, 每孔5×10⁴个细胞分别接种于6孔培养板和35 mm培养皿中供彗星试验和ROS测定使用; 接种后于5% CO₂, 37℃恒温恒湿条件下培养12 h, 令其贴壁生长; 细胞贴壁后, 弃培养基, 使用D-hanks清洗2次, 使用不同浓度颗粒物染毒24 h.

2.3 彗星实验(Comet assay)

彗星实验, 又称单细胞凝胶电泳分析(single cell gel electrophoresis, SCGE), 是一种快速检测单细胞DNA损伤的技术. 其原理为: 如果细胞内DNA未受损伤, 电泳中核DNA因其分子量大而停留在核基质中, 经荧光染色后呈现圆形的荧光团, 无拖尾现象; 若细胞DNA受损, 在电泳时DNA断链或碎片将向阳极迁移, 形成拖尾. 细胞核DNA损伤愈重, 产生的断链或碱易变性片段就愈多, 其断链或短片也就愈小, 在电场作用下迁移的DNA量多, 迁移的距离长, 表现为尾长增加和尾部荧光强度增强. 因此, 通过测定DNA迁移部分的光密度或迁移长度就可定量测定单个细胞DNA的损伤程度. 本研究采用Tice等^[17]提出的彗星方法, 其具体步骤为: ①铺胶. 取100 μL保温于56℃水浴中的1%正常溶点琼脂糖胶均匀涂在磨砂载玻片上, 迅速用盖玻片压平胶面, 冰箱4℃放置8 min, 为第一层胶; 轻轻移开盖玻片, 取15 μL 3×10⁵个/mL细胞悬液与70 μL低溶点琼脂糖胶混匀并迅速滴在第一层胶上, 盖上盖玻片, 冰箱4℃放置15 min, 为第二层胶. ②裂解. 移去盖玻片, 加入适量裂解液, 置于冰箱4℃裂解60 min, 用PBS清洗2次, 5 min/次. ③电泳. 载玻片置于水平电泳槽中, 倒入碱性电泳缓冲液约600 mL, 碱性解旋40 min, 以便DNA双链在碱性条件下解旋成单链, 4℃下电泳20 min(25 V, 300 mA左右), 电泳结束后, PBS清洗2次, 5 min/次. ④中和. 将

载玻片浸没在中和液中, 中和 15 min. ⑤ 染色. 在每块胶板上滴加 50 μL 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PI, 染色 15 min. ⑥ 拍照. 荧光显微镜以绿色激发光激发, 观察并拍照. 使用分析软件 CASP 进行彗星数据分析, 记录尾长 (tail length)、头部 (head) 和尾部 (tail) DNA 的荧光强度, 本研究使用尾部 DNA 含量 (尾部 DNA 荧光强度 / (尾部 DNA 荧光强度 + 头部 DNA 荧光强度) $\times 100\%$, 即 tail DNA%) 作为衡量 DNA 拖尾的定量指标^[18]. 每个样本分析不少于 80 个细胞, 取其中位值, 再取 3~4 个平行样本的平均值.

2.4 ROS 测定

本研究中选用 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichloro fluorescein diacetate, DCFH-DA) 作为荧光探针, 检测细胞内生成的 ROS. 其原理是: DCFH-DA 本身没有荧光, 并可自由穿过细胞膜, 进入细胞内后, 被细胞内的酯酶水解生成 DCFH, 而 DCFH 不能通透细胞膜, 从而被装载到细胞内. 细胞内的 ROS 可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF. 因此, 通过 DCF 的荧光强度可指示细胞内活性氧的水平. 具体步骤如下: ① 加探针. 染毒结束后, 去除培养液, 用 D-Hanks 清洗 2 次, 加入用无血清的培养液稀释的 DCFH-DA (终浓度 10 μM), 1 mL/皿, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中孵育 30 min. ② 弃上清液, 用 D-Hanks 清洗 3 次, 按照 1 mL/皿, 加入 D-Hanks 缓冲液. ③ 使用荧光显微镜观察并拍照. 每个平行样选取 5~10 张照片, 使用 Image-pro plus 6.0 分析荧光强度, 取其平均值, 上述步骤都需要避光操作. 本实验中检测的 ROS 水平用光密度值来表示, 将所得结果与对照组做归一化处理.

2.5 数据处理

数据的处理及计算由 Microsoft Office Excel 2007 进行, 数据以平均值 \pm 标准差 ($X \pm SD$) 表示, 各指标组间差异采用 t 检验法进行统计.

3 结果和讨论

3.1 3 种粒径颗粒物对细胞 DNA 损伤的影响

3.1.1 对 A549 的 DNA 损伤的影响

选择染毒剂量分别为 1, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 正常培养细胞为对照组, 100 μM 的 tBHP (染毒 1 h) 作为阳性对照组. 彗星实验中 DNA 拖尾现象如图 1 所示, 详细的数据参见表 1.

由表 1 可见, 3 种颗粒物均可对 A549 的 DNA 造成损伤, 并且随着染毒剂量的增大, 尾部 DNA 含量 (Tail DNA%) 不断上升, 呈显著的剂量-效应关系 ($p < 0.01$). $\text{PM}_{10-2.5}$ 和 $\text{PM}_{2.5-0.1}$ 染毒的对照组 Tail DNA% 分别为 5.2% 和 5.1%, 在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后出现显

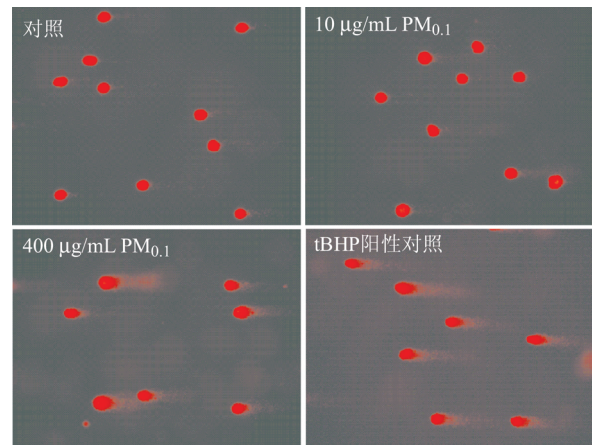


图 1 彗星实验图片

Fig. 1 Pictures from Comet assay

著性升高 ($p < 0.05$), 在最大剂量 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 分别增至 7.4% 和 10.1%; $\text{PM}_{0.1}$ 染毒的对照组 Tail DNA% 为 5.1%, 在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后出现显著升高 ($p < 0.05$), 在最大染毒剂量 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, Tail DNA% 为 12.4%. 同一质量浓度下, $\text{PM}_{0.1}$ 染毒的 Tail DNA% 最大, 在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时约为对照组的 2.4 倍; 其次是 $\text{PM}_{2.5-0.1}$ 和 $\text{PM}_{10-2.5}$, 分别为对照组的 2 和 1.4 倍. 这说明 $\text{PM}_{0.1}$ 对 A549 造成的 DNA 损伤高于 $\text{PM}_{2.5-0.1}$, 而 $\text{PM}_{2.5-0.1}$ 高于 $\text{PM}_{10-2.5}$ ($p < 0.05$).

表 1 $\text{PM}_{10-2.5}$, $\text{PM}_{2.5-0.1}$ 和 $\text{PM}_{0.1}$ 对 A549 DNA 损伤的影响

Table 1 DNA damage in A549 induced by $\text{PM}_{10-2.5}$, $\text{PM}_{2.5-0.1}$, and $\text{PM}_{0.1}$

PMs 浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Tail DNA% \pm 偏差		
	$\text{PM}_{10-2.5}$	$\text{PM}_{2.5-0.1}$	$\text{PM}_{0.1}$
对照组	5.2 \pm 0.1	5.1 \pm 0.6	5.1 \pm 0.6
1	5.2 \pm 0.2	5.3 \pm 0.2	5.7 \pm 0.4
10	6.1 \pm 0.3*	6.0 \pm 0.4*	6.9 \pm 0.6
50	6.6 \pm 0.3**	7.1 \pm 0.4**	8.3 \pm 0.8*
100	6.8 \pm 0.3**	8.1 \pm 0.3***	9.6 \pm 0.3*
200	7.4 \pm 0.4**	10.1 \pm 0.3***	12.4 \pm 0.5**
tBHP	52.9 \pm 0.7***	53.8 \pm 1.8***	50.1 \pm 1.8***

注: 与对照组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.1.2 对 HUVEC 的 DNA 损伤的影响

表 2 为 3 种颗粒物对 HUVEC 细胞 DNA 的损伤情况. 可以看出, 3 种颗粒物均对 HUVEC 细胞有明显的 DNA 毒性, 造成 Tail DNA% 显著升高, 即随着染毒剂量的增大, 呈剂量-效应关系 ($p < 0.01$). $\text{PM}_{10-2.5}$ 和 $\text{PM}_{2.5-0.1}$ 染毒的对照组 Tail DNA% 分别为 4.3% 和 4.6%, 在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时均出现显著性升高 ($p < 0.05$), 在最大剂量 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时分别增至 17.2%

和 17.1%; $PM_{0.1}$ 染毒的对照组 Tail DNA% 为 4.9%, 在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时出现显著升高 ($p < 0.05$), 在最大剂量 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为 22.3%. 3 种粒径的颗粒物染毒 24 h 后, 同一质量浓度下, $PM_{0.1}$ 引起的 Tail DNA% 最大, 在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为对照组的 4.6 倍; $PM_{2.5-0.1}$ 和 $PM_{10-2.5}$ 组的 Tail DNA% 没有明显差别 ($p > 0.05$). 这说明 $PM_{0.1}$ 对 HUVEC 造成的 DNA 损伤要高于 $PM_{2.5-0.1}$ 和 $PM_{10-2.5}$ ($p < 0.05$).

表 2 $PM_{10-2.5}$, $PM_{2.5-0.1}$ 和 $PM_{0.1}$ 对 HUVEC DNA 损伤的影响

Table 2 DNA damage in HUVEC induced by $PM_{10-2.5}$, $PM_{2.5-0.1}$, and $PM_{0.1}$

PMs 浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Tail DNA% \pm 偏差		
	$PM_{10-2.5}$	$PM_{2.5-0.1}$	$PM_{0.1}$
对照组	4.3 \pm 0.4	4.6 \pm 0.9	4.9 \pm 0.4
1	4.7 \pm 0.4	4.4 \pm 0.3	5.3 \pm 0.5
10	5.5 \pm 0.9	6.6 \pm 1.0	6.9 \pm 1.0*
50	9.8 \pm 0.6**	9.4 \pm 0.4**	14.1 \pm 0.7***
100	12.0 \pm 1.3***	13.2 \pm 2.1**	16.6 \pm 0.6***
200	17.2 \pm 1.7***	17.1 \pm 0.7***	22.3 \pm 1.8***
tBHP	64.2 \pm 3.5***	62.9 \pm 2.5***	61.2 \pm 4.6***

注: 与对照组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

对比表 1 和 2 可知, 颗粒物对 A549 和 HUVEC 均能造成明显的 DNA 损伤, 并呈剂量-响应关系. 在浓度大于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 同一种粒径的颗粒物对 HUVEC 造成的 DNA 损伤要略大于 A549.

3.2 3 种粒径颗粒物对细胞 ROS 水平的影响

3.2.1 对 A549 ROS 的影响

图 2(a) 表示不同浓度的 $PM_{10-2.5}$, $PM_{2.5-0.1}$ 和 $PM_{0.1}$ 分别作用于 A549 24 h 后的细胞内 ROS 水平. 3 种情况下 A549 的 ROS 水平均随着颗粒物浓度的增大而不同程度地升高, 但与对照组比较, $PM_{10-2.5}$ 染毒组细胞内 ROS 没有明显的升高 ($p > 0.05$); $PM_{2.5-0.1}$ 组在最大浓度 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时出现显著性升高 ($p < 0.01$), 约为对照组的 2.5 倍; $PM_{0.1}$ 组在浓度达到 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后出现明显的升高 ($p < 0.05$), 在最大浓度 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 约为对照组的 2.0 倍 ($p < 0.01$). 相同浓度下, 比较 3 种粒径的颗粒物对 A549 ROS 水平的影响, $PM_{2.5-0.1}$ 和 $PM_{0.1}$ 组均高于 $PM_{10-2.5}$ ($p < 0.05$), 但 $PM_{2.5-0.1}$ 和 $PM_{0.1}$ 之间并没有明显的差异.

3.2.2 对 HUVEC ROS 的影响

将不同浓度的 $PM_{10-2.5}$, $PM_{2.5-0.1}$ 和 $PM_{0.1}$ 分别作用于 HUVEC 24 h, 其对细胞 ROS 水平的影响如图 2(b) 所示. 与对 A549 ROS 的影响类似, HUVEC ROS

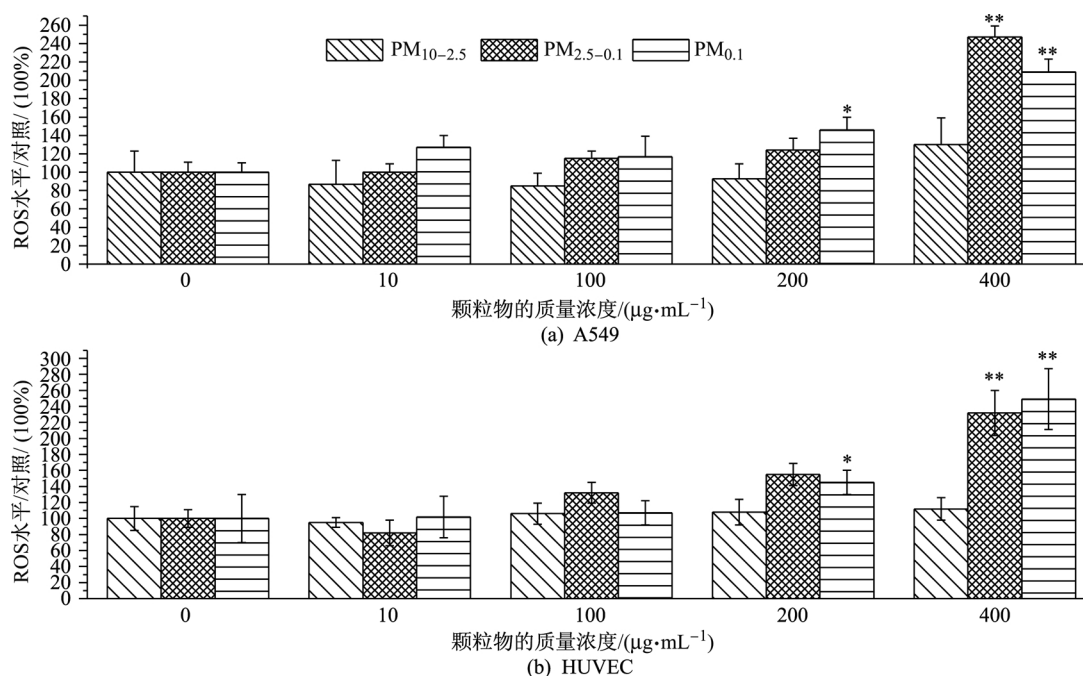


图 2 $PM_{10-2.5}$, $PM_{2.5-0.1}$ 和 $PM_{0.1}$ 对 A549 和 HUVEC ROS 水平的影响

Fig. 2 ROS levels in A549 and HUVEC induced by $PM_{10-2.5}$, $PM_{2.5-0.1}$ and $PM_{0.1}$

的水平也随着颗粒物浓度的增大而不同程度地升高。PM_{10-2.5}组各浓度下的ROS水平没有显著升高($p > 0.05$); PM_{2.5-0.1}组在200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时出现明显升高,约为对照组的1.6倍($p < 0.05$),400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时约为对照组2.4倍;而PM_{0.1}组仅在最大浓度400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时出现显著性升高,约为对照组的2.5倍($p < 0.01$)。相同浓度下,比较3种颗粒物对HUVEC ROS水平的影响,同颗粒物对A549影响的结果相似,即PM_{2.5-0.1}和PM_{0.1}组均高于PM_{10-2.5}($p < 0.05$),但PM_{2.5-0.1}和PM_{0.1}之间并没有明显差异。

比较颗粒物对A549和HUVEC ROS水平的影响,由图2可见,不同的颗粒物对2种细胞内ROS水平的影响趋势基本相似。PM_{10-2.5}对A549和HUVEC ROS水平没有明显影响,其余各组均随着颗粒物浓度的增大而增大。对于同一粒径颗粒物,A549和HUVEC细胞间ROS水平无显著差异。

4 结束语

本工作探讨了3种粒径的大气颗粒物对A549和HUVEC DNA损伤的影响,并分析了颗粒物诱导细胞产生ROS的能力。通过实验的结果可以看出,3种粒径段的颗粒物可以对2种细胞DNA造成损伤,Tail DNA%均随着颗粒物浓度的增大而增大,并呈剂量-效应关系。PM_{2.5-0.1}和PM_{0.1}造成的DNA损伤要高于PM_{10-2.5},并且PMs对HUVEC细胞的DNA损伤要高于A549细胞。一定程度上说明,细和超细颗粒物的毒性效应要强于粗颗粒物,并且心血管细胞对颗粒物的暴露比肺上皮细胞更为敏感。其次,本研究还发现PM_{0.1}和PM_{2.5-0.1}可以造成A549和HUVEC细胞内ROS水平升高,并且随着颗粒物浓度的增大而增大,但仅在高剂量(200~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时存在显著性差异。对于同一种细胞,PM_{2.5-0.1}和PM_{0.1}诱导细胞产生ROS的能力强于PM_{10-2.5}。

在不考虑个体差异的情况下,大气颗粒物对人体健康损害程度由以下3个主要因素决定:①颗粒物在大气中的浓度;②颗粒物的化学组分(由来源及大气中的化学反应决定);③颗粒物粒径大小。颗粒的粒径决定其在呼吸道的沉积部位,粒径越小的颗粒沉积部位越深,健康影响也越大。细和超细颗粒可沉积到肺泡区,直接影响气体交换。另一方面,粒径越小的颗粒比表面积越大,表面吸附的有毒有害物质也越多。Lv等^[19]对上海市城区粗、细和超细颗粒的理化性质及其对A549的细胞毒性进行了研究,通过细胞增殖实验发现,细和超细颗粒物的细胞毒性要大于粗颗粒。Hsiao等^[20]的研究结果显示,PM_{2.5}的细胞毒性大于PM₁₀,且PM_{2.5}造成的DNA损伤强于PM₁₀。

Wessele等^[21]研究了英国3个城市地区不同粒径段的大气颗粒物对A549的细胞毒性,研究结果显示,粒径在1.5~3.0 μm 范围内的颗粒物的细胞毒性要大于粒径大于3.0 μm 的颗粒物的毒性。

“氧化应激”指机体的促氧化与抗氧化之间的不平衡状态,表现为:以促氧化效应为主、抗氧化剂被消耗,中间会产生大量的ROS,通常会致生物大分子损伤。颗粒物会引起机体发生氧化应激、诱导ROS生成,这已经在实验室和人体实验中得到了很好的证实^[8]。近年来,不少研究者相继用氧化应激理论来探讨颗粒物的致病作用,检测颗粒物介导产生的ROS,并通过体内体外实验发现了ROS生成在颗粒物致病过程中发挥着重要作用。研究发现,粒径越小的颗粒,其诱导ROS生成的能力越强,造成的氧化损伤和炎症反应也越强^[22],这与本研究结果基本一致。本研究观察到颗粒物对A549和HUVEC的DNA氧化损伤和促进细胞内ROS的生成,并且细和超细颗粒物的效应要强于粗颗粒。因此,推测DNA损伤与细胞氧化应激水平有一定关系,但其具体机理有待进一步研究。

参考文献:

- [1] PÖSCHL U. Atmospheric aerosols: composition, transformation, climate and health effects [J]. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2005, 44(46): 7520-7540.
- [2] 范兰兰,尚羽,张玲. 大气颗粒物对A549和HUVECs细胞的毒性作用 [J]. *环境科学研究*, 2012, 25(10): 101-107.
- [3] SCHWARTZ J, LADEN F, ZANOBETTI A. The concentration-response relation between PM_{2.5} and daily deaths [J]. *Environmental Health and Perspectives*, 2002, 110(10): 1025-1029.
- [4] POPE 3rd C A, BURNETT R T, THUN M J, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution [J]. *Journal of American Medical Association*, 2002, 287(9): 1132-1141.
- [5] SHANG Y, SUN Z, CAO J, et al. Systematic review of Chinese studies of short-term exposure to air pollution and daily mortality [J]. *Environment International*, 2013, 54: 100-111.
- [6] SCHWARZE P E, OVREVIK J, LAG M, et al. Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies [J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2006, 25(10): 559-579.

- [7] BROWN D W, WILSON M R, MACNEE W, et al. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafine particles [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2001, 175(3): 191-199.
- [8] MAIER K L, ALESSANDRINI F, BECK-SPEIER I, et al. Health effects of ambient particulate matter-Biological mechanisms and inflammatory responses to in vitro and In vivo particle exposures [J]. *Inhalation Toxicology*, 2008, 20(3): 319-337.
- [9] STOEGER T, REINHARD C, TAKENAKA S, et al. Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice [J]. *Environmental Health and Perspectives*, 2006, 114(3): 328-333.
- [10] RAHMAN Q, NORWOOD J, HATCH G. Evidence that exposure of particulate air pollutants to human and rat alveolar macrophages leads to differential oxidative response [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 240(3): 669-672.
- [11] OBERDÖRSTER G, FERIN J, LEHNER B E. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury [J]. *Environmental Health and Perspectives*, 1994, 102(S5): 173-179.
- [12] SHANG Y, ZHU T, LI Y, et al. Size-dependent hydroxyl radicals generation induced by SiO₂ ultra-fine particles: The role of surface iron [J]. *Science in China Series B: Chemistry*, 2009, 52(7): 1033-1041.
- [13] CHALUPA D C, MORROW P E, OBERDÖRSTER G, et al. Ultrafine particle deposition in subjects with asthma [J]. *Environmental Health and Perspectives*, 2004, 112(8): 879-882.
- [14] SCHWARTZ J, NEAS L M. Fine particles are more strongly associated than coarse particles with acute respiratory health effects in school children [J]. *Epidemiology*, 2000, 11(1): 6-10.
- [15] NEMMAR A, VANBILLOEN H, HOYLAERTS M F, et al. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster [J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2001, 164(9): 1665-1668.
- [16] 陈威, 郭新彪. 大气颗粒物对心血管系统影响的研究进展 [J]. *环境与健康杂志*, 2005, 22(6): 89-91.
- [17] TICE R R, AGURELL E, ANDERSON D, et al. Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing [J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2000, 35(3): 206-221.
- [18] COLLINS A R. The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations [J]. *Molecular Biotechnology*, 2004, 26(3): 249-261.
- [19] LV S, FENG M, YAO Z, et al. Physicochemical characterization and cytotoxicity of ambient coarse, fine, and ultrafine particulate matters in Shanghai atmosphere [J]. *Atmospheric Environment*, 2011, 45(3): 736-744.
- [20] HSIAO W L W, MO Z Y, FANG M, et al. Cytotoxicity of PM_{2.5} and PM_{2.5-10} ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays [J]. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2000, 471(1/2): 45-55.
- [21] WESSELS A, BIRMILI W, ALBRECHT C, et al. Oxidant generation and toxicity of size-fractionated ambient particles in human lung epithelial cells [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(9): 3539-3545.
- [22] LI N, TIAN X, NEL A E. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2008, 44(9): 1689-1699.