

文章编号: 0253-2468(2001)-06-0654-06 中图分类号: X513 文献标识码: A

气溶胶自由基毒理学机制的研究

童永彭¹, 倪新伯¹, 张元勋¹, 程 峰¹, 仇志军¹, 屠铁城¹, 姚思德¹, 张桂林¹, 叶舜华² (1. 中国科学院上海原子核研究所, 上海 201800; 2 上海医科大学, 上海 200032)

摘要:应用两级核孔滤膜的空气采样器采集了上海市区及郊区农村两点的粗颗粒($> 2.5 \mu\text{m}$)及细颗粒($\text{PM}_{2.5}$)气溶胶.用质子激发 X 荧光(PIXE)分析了其元素含量及其水溶后样品的元素含量.用 ESR 观察了颗粒物中的自由基;应用丙二醛(MDA)和四唑盐(MIT)方法比较了辐照前后粗颗粒的细胞毒性.结果显示市区气溶胶粒子中的 Fe、Cr 和 Mn 化合物比郊区粒子中的易溶于水,郊区细粒子中的 Fe 化合物比粗粒子中的易溶于水.ESR 谱显示颗粒物中含有自由基,毒理实验显示了辐照后的气溶胶颗粒与未辐照的相比具有更高的细胞毒性.结果提示了气溶胶主要的致细胞毒性之一是通过自由基机制.

关键词: $\text{PM}_{2.5}$; 毒理; 自由基; 过渡金属

The study on free radical toxicological mechanism of aerosols

TONG Yongpeng¹, NI Xinbo¹, ZHANG Yuanxun¹, CHENG Feng¹, QIU Zhijun¹, TU Tiecheng¹, YAO Side¹, ZHANG Guilin¹, YE Shunhua² (1. Shanghai Institute of Nuclear Research, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800; Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

Abstract: The coarse particulate samples ($> 2.5 \mu\text{m}$) and fine particulate samples ($\text{PM}_{2.5}$) were collected from one downtown area of Shanghai and one village place of suburb, by stacked filter air sampler. The element contents in aerosols and in their insoluble parts were analyzed by PIXE. The free radical signals in particulates were detected by ESR. The cytotoxicity of UV radiated particulates was evaluated by MDA and MIT methods. The results show that the compounds of transition metals Cr, Mn, and Fe from downtown dissolve in water than those from suburb both in coarse and fine particulates and Fe compounds in fine particulates ($\text{PM}_{2.5}$) from suburb dissolve in water more easily than those in coarse particulates ($> 2.5 \mu\text{m}$). As soluble Fe compounds can induce OH free radicals by decomposition of H_2O_2 , higher contents of soluble Fe and other transition elements in particulates would cause higher cytotoxicity. Furthermore, the free radical signal in particulates was observed by ESR, the cytotoxicity increased as they were irradiated by UV in these experiments. The results suggest that one of the main factors to cytotoxicity is free radicals.

Keywords: $\text{PM}_{2.5}$; toxicological mechanism; free radical; transition metal

越来越多的数据表明心肺疾病的发病率与污染空气中的颗粒物含量相关,尤其是可吸入的细粒子^[1].颗粒物的毒性除了与其排放源相关外,还与其在空气中的环境因素(酸化,辐射等)相关,如有机化合物有氧时在射线作用下能形成过氧化物而致细胞毒性^[2].颗粒物流行病学研究已经显示了呼吸系统疾病与 PM_{10} 之间有重大的关联^[1].在啮齿动物实验中发现气溶胶妨碍肺巨噬细胞的防御功能^[3],越小的气溶胶显示越大的毒性^[4,5],通过 $\text{PM}_{2.5}$ 对健康影响的评估可知,细粒子比粗粒子对死亡率和呼吸系统疾病的相关性更大,从而导致了对于 $\text{PM}_{2.5}$ 生物学效应研究的必要性^[6].

本文应用 PIXE 对颗粒物水溶性金属元素含量进行了分析,应用 ESR 观察了颗粒物中的

收稿日期: 2000-10-15; 修订日期: 2001-02-05

基金项目: 中科院重大基金项目(KJ95FA1409); 国家自然科学基金资助项目(19935020)

作者简介: 童永彭(1963-),男,副研究员

自由基, 并应用丙二醛(MDA), 四唑盐(MTT) 检测法检测了辐照前后颗粒物对 CHL(中国仓鼠肺) 脂质过氧化及存活率的影响。

1 实验材料和方法

气溶胶收集: 30 个以上样品在嘉定上海原子核所(市郊农村) 及上海肇家浜路(上海市区) 附近, 用串联滤膜空气样品收集器 DK602(上海探伤机厂产品) 收集。两地之间距离是 45 km。样品收集器由两层核孔滤膜串联而成, 两层滤膜相距 2—3 cm。第一层滤膜是直径 35 mm, 孔径为 $2.5 \mu\text{m}$ (10^6 — 10^7 孔/ cm^2) 的滤膜, 第二层是孔径为 $0.45 \mu\text{m}$ 的相同的滤膜。气溶胶样品采集是在 15 L/min 的流量下离地面大约 6.5 m 处采集。为了保持细小颗粒($< 2.5 \mu\text{m}$) 不被第一层滤膜过滤, 所以当流量变化大于 5%, 我们随时更换第一层滤膜。全部气溶胶样品都在 2000 年 3—4 月间采集, 平均气温是 12°C 。

滤膜上的颗粒样品被温和地浸入去离子水中 15 min, 可溶部分被溶解, 剩下的不可溶部分用于 PIXE 分析。

PIXE 分析: PIXE 在 4 MV Van de Graff 质子加速器上进行, 其运行的束流强度和束斑分别为 10—100 nA 和 6 mm。靶室维持在低真空(约 10^{-2} Pa) 以避免电荷积累。PIXE 谱解谱程序应用 AXIL。实验可获得 S, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Zn 等元素含量^[7]。

ESR 分析: 在室温下将含有颗粒物的核孔滤膜及空白核孔滤膜卷成桶状, 置于 3 mm 内径的玻璃测试管中检测, 并检测在 100°C 、5 min 后, 冷却到室温下的含颗粒物的样品。测试条件: 美国 VARIAN-E112 型, 微波功率 1 mW, X 波段, 调制频率为 100 kHz, 调制幅度为 2.5 G, 扫描宽度 2.5 kG, 各信号 g 值由 DPPH 标定。

UV 辐照: (1) 790 μg 粗颗粒物在强度为 40 W 紫外灯距离 3 cm 处辐照 10 h, 而对照颗粒物只经蒸汽常规消毒 20 min。然后经处理过的样品加入细胞培养液中进行 MDA 及 MTT 胞毒实验。

(2) 经 40 W UV 辐照 6 h 后, 在离 40 W 的 UV 灯 3 cm 处, 让辐照过气体经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜进入细胞培养液染毒及用未辐照过的气体进行对照, 然后进行 MDA 及 MTT 胞毒实验。流量为 1—2 L/min, 随时补充消毒过的蒸馏水以维持原来的浓度。染毒 1—2 h。然后进行 MDA 及 MTT 胞毒实验。

细胞培养: 中国仓鼠肺(CHL) 细胞被常规地培养在 37°C ($5\% \text{CO}_2$) 的 DMEM(Dulbecco Eagle's minimum essential medium, 来自 Gibco 公司) 介质中(含 10% 热灭活的小牛血清, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素)。

胞毒实验: 在 60% 长满层的 CHL 分别培养瓶中加入含辐照过颗粒物的、未辐照过颗粒物的、及空白对照的 6 mL 细胞培养液, 染毒 2 d 后, 取 0.4 mL 培养液做 MDA 实验后, 加入 MTT 溶液培养 4 h 用于 MTT 实验。气体及小于 $0.22 \mu\text{m}$ 颗粒物的染毒也与上述相似, 在含 6 mL 细胞培养液, 60% 长满层的 CHL 培养瓶中分别通辐照过、未辐照过的经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜气体, 及用空白培养细胞对照, 染毒 2 d 后, 取 0.4 mL 培养液做 MDA 实验后, 加入 MTT 溶液培养 4 h 用于 MTT 实验。

MTT 方法: 将 250 mg MTT 置于 50 mL PBS 中搅拌, 30 min 溶解后, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤获取滤液。加入 0.4 mL 上述 MTT 滤液置于细胞培养液中, 经 4 h 后倾干培养液, 然后加 10 mL 二甲亚砜(DMSO) 溶解培养瓶中剩下的蓝色 Formazan 结晶。DMSO 溶液用 742 型分光光度计检测

490 nm 处的光吸收.

MDA 方法: 用丙二醛(MDA) 和 TBA(thiobarbituric acid) 一起起化学反应之后呈色(532 nm) 来检测脂质过氧化产物 MDA 的一种方法^[8]. MDA 试剂盒产品来源于南京金钟生物工程公司. 乙醇作为空白.

2 结果与讨论

2.1 市区与郊区颗粒物状态的比较

实验得出的市区及郊区粗、细气溶胶的含量以及可溶部分的百分比数据列于表 1.

表 1 空气中气溶胶的浓度及可溶部分的质量分数

Table 1 The concentrations of aerosols in air and soluble percentages of aerosols

样品	CS	CD	P	FS	FD	P
浓度, $\mu\text{g}/\text{m}^3$	59(4)	32(50)	0.024*	33(8)	55(18)	0.080
质量分数, %	52(2)	75(5)	0.020*	61(1)	60(3)	0.67

CS, FS 分别表示郊区粗、细颗粒, CD, FD 分别表示市区粗、细颗粒.

P 值为 T 检验. * 具有显著差异($P < 0.05$).

由它可知, 粗颗粒在市区的浓度是乡村地区的 5 倍. 这主要是由于上海市区的气溶胶的主要的贡献来源于土壤尘和建筑扬尘等^[9], 一般这些亲石性的颗粒扬尘粒径显得较大. 大量的机动车行驶、大面积的建筑工地施工和较小的绿化覆盖面积导致了高浓度的粗颗粒存在. 市区的细颗粒($\text{PM}_{2.5}$) 浓度比农村略高($P = 0.08$), 这说明细颗粒($\text{PM}_{2.5}$) 是较容易扩散, 且不像粗颗粒那样易受环境净化.

由 AXIL 计算 PIXE 能谱获得元素的含量. 元素含量及其可溶部分的元素含量百分比列于表 2.

表 2 气溶胶颗粒物中元素含量($\mu\text{g}/\text{mg}$) 及可溶部分的质量分数

Table 2 Total element contents($\mu\text{g}/\text{mg}$) and their soluble fractions(%) in particulates of aerosols

	CS, $\mu\text{g}/\text{mg}$	SCS, %	CD, $\mu\text{g}/\text{mg}$	SCD, %	FS, $\mu\text{g}/\text{mg}$	SFS, %	FD, $\mu\text{g}/\text{mg}$	SFD, %
S	2.70	90.0	1.8	80.0	4.00	62.0	3.60	30
K	3.80	67.0	5.6	67.0	3.60	71.0	1.90	72
Ca	27.00	38.0	29.0	6.7	23.00	37.0	58.00	16
Ti	0.54	18.0	1.6	79.0	0.17	5.9	0.06	11
Cr	0.13	46.0	0.05	84.0	0.10	50.0	0.06	91
Mn	0.14	7.1	0.13	85.0	0.02	10.0	0.08	90
Fe	6.40	8.4	13.0	76.0	1.70	56.0	3.20	79
Zn	0.24	8.3	0.16	60.0	0.37	76.0	0.06	63

CS, SCS 分别表示郊区粗颗粒及其可溶部分元素含量百分比. CD, SCD 分别表示市区粗颗粒及其可溶部分元素含量百分比. FS, SFS 分别表示郊区细颗粒及其可溶部分元素含量百分比. FD, SFD 分别表示市区细颗粒及其可溶部分元素含量百分比.

表 2 表明在市区的粗颗粒和细颗粒中的 Ca 比农村的粒子中 Ca 更难溶解, 相反, 市区粗、细颗粒中的 Cr, Mn 和 Fe 分别比农村粗、细颗粒的更易溶解. 另外 Cr, Mn 和 Fe 在细粒子中比相应的粗颗粒更易溶解.

尽管表 2 中显示市区的粗、细颗粒物中 S 浓度稍比郊外的低,但由于其市区空气中的颗粒浓度高(如表 1),所以 S 在市区空气中的浓度高得多。

2.2 颗粒物的自由基毒理

图 1 显示了颗粒物中在室温下所含的有机自由基(窄峰) $g = 2.0030$ 。图 2 显示了经 100°C 加热 5 min 后冷却至室温的自由基峰(窄峰)相对未处理的谱,它的强度明显减弱。宽峰为过渡金属峰($g = 2.1193$),它不随温度变化。这个现象典型地反映了颗粒物中存在自由基。普遍认为大气颗粒物中具有较大毒性的多环芳烃类的光降解也是通过自由基途径^[10],在这一过程中同时也能形成相应的过氧化物。因此在大气颗粒物在自然辐射的作用下必然产生一定量的具有细胞毒性的过氧化物。

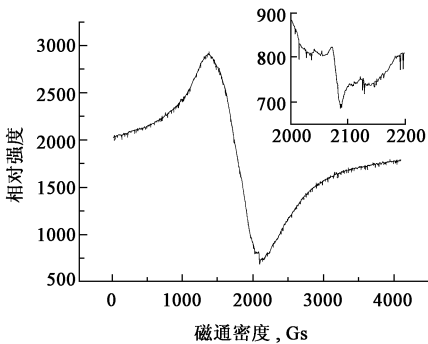


图 1 晴天收集的粗颗粒气溶胶室温下 ESR 谱
(窄峰 $g = 2.0030$, 宽峰 $g = 2.1193$)

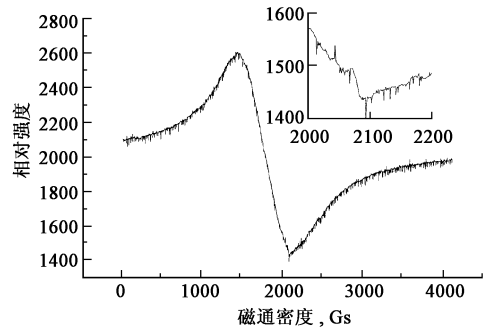


图 2 收集的粗颗粒气溶胶样品经 100°C 5 min 处理后室温下的 ESR 谱

Fig. 1 The room temperature ESR spectrum of particulates of coarse aerosol sample collected from clear day
(Narrow peak: $g = 2.0030$, Wide peak: $g = 2.1193$)

Fig. 2 The room temperature ESR spectrum of particulates of coarse aerosol sample after treated at 100°C for 5 min

大气颗粒物在辐射的作用下产生过氧化物是否是导致其致细胞毒性的增加的主要原因之一呢? 以下实验结果也许说明了这一点。经辐照过及未辐照过市区粗颗粒染毒的培养细胞 MDA 检验及 MTT 检验数据列于表 3。

表 3 辐照过及未辐照过市区粗颗粒染毒的培养细胞 MDA 检验中 MDA 浓度及 MTT 检验中 490 nm 处吸收值

Table 3 The concentration of MDA and the absorbance at 490 nm of MTT on culture cells incubated with irradiated and un-irradiated aerosols of coarse particulates ($> 2.5 \mu\text{m}$) from the downtown

样品	辐照过	未辐照过	P	标样	空白
MDA 含量, nmol/mL	11.60 ± 0.06	9.92 ± 0.10	0.01^{**}	10	0
MTT 490 nm 吸收值	1.28 ± 0.07	1.61 ± 0.04	0.025^*		

含量为培养细胞介质 MDA 浓度

P 值为 T 检验, ** 具有显著差异 ($P < 0.01$), * 具有显著差异 ($P < 0.05$). 样品数 $n = 6$

从表 3 的结果显示,经 UV 辐照后的粗颗粒样品的脂质过氧化产物丙二醛具有显著增高 ($P = 0.01$) 其对应的活细胞也显著降低 ($P = 0.025$). 这说明 UV 辐照后的粗颗粒样品具有更高的细胞毒性,同样经辐照过及未辐照过空气(含 $< 0.22 \mu\text{m}$ 细颗粒)染毒的培养细胞的 MDA 及

MTT 检验数据列于表 4.

表 4 经辐照过及未辐照过空气(含 $< 0.22 \mu\text{m}$ 细颗粒)染毒的培养细胞中 MDA 浓度及 MTT 检验中 490 nm 处吸收值

Table 4 The concentration of MDA and the absorbance at 490 nm of MTT on culture cells incubated with irradiated and un-irradiated air(containing $< 0.22 \mu\text{m}$ fine particulates) from the downtown

样品	辐照过	未辐照过	<i>P</i>	标样	空白
MDA 浓度, nmol/mL	2.26±0.22	1.09±0.08	$< 0.01^{**}$	10	0
MTT 490nm 吸收值	1.85±0.02	1.97±0.03	$< 0.01^{**}$		

含量为培养细胞介质 MDA 浓度, *P* 值为 *T* 检验, ** 具有显著差异($P < 0.01$)

表 4 的结果显示同样的趋势, 即经 UV 辐照后的大气(含细颗粒 $< 0.22 \mu\text{m}$)比未辐照的具有更高的细胞毒性. 这是由于颗粒物中含有各种有机和无机化合物, 在空气中经 UV 辐照后颗粒物中的化合物将形成自由基, 继而与氧作用形成过氧化物. 强的辐照必然诱导在空气中高的自由基, 这一点在晴天与阴天的大气 OH 的对比实验中已被潘循 等人所证实^[11]. 另外经辐照后某些自由基能存在颗粒物囚笼中, 我们的 ESR 实验(图 1, 图 2)及 Donaldson PM₁₀ 中存在自由基活性的结果^[12]都证实了这一点. 经辐照后大气及颗粒物中将形成更多自由基继而形成更多的过氧化物, 在一定条件下氧化分解, 导致更高的细胞毒性. 尽管具有遗传毒性物质能在 UV 辐射下降解, 但光辐射可诱导多环芳烃类对植物更高的毒性^[13], 这也许是辐射后产生的多环芳烃类降解产物(过氧化物)比其本身的致细胞毒性大得多的缘故. 同时, 许多结果显示细胞毒性主要与其中水溶性过渡金属元素含量相关^[6, 14], 急性细胞毒性又往往表现为活性氧的爆发^[15], 而水溶性过渡金属元素可诱导过氧化物产生自由基, 活性氧. 本实验结果也显示辐照后颗粒物含有较高过氧化物和自由基, 表现较高的细胞毒性. 这说明颗粒物主要通过自由基产生细胞急性致毒效应.

3 结论

1) 酸化较重的市区大气气溶胶粗颗粒及细粒子中的 Ca 比农村的气溶胶中的 Ca 更难溶解. 相反, 市区的粗颗粒及细粒子中的 Cr, Mn 和 Fe 比郊外农村粒子中的更易溶解, 这主要是由于市区大气中具有较高浓度的 SO_x, NO_x 等酸性气体.

2) 辐照后的气溶胶颗粒比未辐照过的显示了更高的细胞毒性. 这主要是由于辐照后的气溶胶颗粒物中含有较高的过氧化物.

3) 大气气溶胶中的可溶性过渡金属盐及过氧化物是诱导细胞自由基毒性的两因素.

参考文献:

- [1] Schwartz J. Air pollution and hospital admissions for respiratory disease[J]. *Epidemiology*, 1996, 7: 20—28
- [2] Hindo J, Hanville C, Remita S, *et al.* Evidence of the formation of different hydroperoxides in irradiated gamma-linolenate solution [J]. *Radiat Res*, 2000, 153: 201—207
- [3] Kodavanti U P, Jaskot R H, Su W Y, *et al.* Genetic variability in combustion particle-induced chronic lung injury [J]. *Am J Physiol*, 1997, 272: L521—L532
- [4] Chen L C, Fine J M, Qu Q S, *et al.* Effects of fine and ultrafine sulfuric acid aerosols in guinea pigs: Alterations in alveolar mac-

- rophage functions and intracellular pH[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1992, 113: 109—117
- [5] Dreher K, Jaskot R, Kodavanti U, *et al.* Soluble transition metals mediate the acute pulmonary injury and airway hyperactivity induced by residual oil fly ash particles[J]. *Chest*, 1966 109: 33S—34S
- [6] Schwartz J, Dockery D W, Neas L M. Is daily mortality associated specifically with fine particles[J]? *J Air Waste Manage Assoc*, 1996, 46: 927—937
- [7] Li M, Zhang Y, Tong Y, *et al.* Application of Nuclear analysis techniques in study of environmental pollution in the vicinity of Shanghai[J]. *Nuclear Sci & Techn*, 1993, 4(2): 91—94
- [8] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction[J]. *Anal Biochem*, 1979, 95(2): 351—358
- [9] J Wang, P Guo, X Li, *et al.* Source Identification of lead pollution in the atmosphere of Shanghai city analyzing single aerosol particles[J]. *Environ Sci Technol*, 2000, 34: 1900—1905
- [10] Laveme J A. OH radicals and oxidizing products in the γ radiolysis of water[J]. *Radiat Res*, 2000, 153: 196—200
- [11] 潘循, 陈士明, 严小敏, 等. 顺磁共振法测定气相 OH 自由基的研究[J]. *环境科学*, 1999, 20(6): 30—33
- [12] Donaldson K, Brown D M, Mitchell C, *et al.* Free radical activity of PM₁₀: Iron-mediated generation of hydroxyl radicals[J]. *Environ Health Perspectives*, 1997, 105(supplement) 5: 1285—1289
- [13] Boese B L, Ozretich R J, Lamberson J O, *et al.* Toxicity and phototoxicity of mixtures of highly lipophilic compounds in marine sediment: Can PAH model be extrapolated[J]? *Arch Environ Contam Toxicol*, 1999, 36: 270—280
- [14] Ian Y R. Adamson heather prieditis and renaud vincent; Pulmonary toxicity of an atmospheric particulate sample is due to the soluble fraction[J]. *Applied Pharmacology*, 1999, 157: 43—50
- [15] Becker S, Soukup J M, Gilmour M I, *et al.* Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates. Effects on oxidant radical generation and cytokine production[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 141: 637—648