

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897-20150213001

田冬冬, 苑晓燕, 周维, 等. 纳米碳黑与重金属对 BEAS-2B 细胞的联合毒性作用模式评价[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(3): 288-297

Tian D D, Yuan X Y, Zhou W, et al. Evaluation of combined effects of NPCB and heavy metals on BEAS-2B cells [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(3): 288-297 (in Chinese)

纳米碳黑与重金属对 BEAS-2B 细胞的联合毒性作用模式评价

田冬冬^{1,2}, 苑晓燕², 周维², 贾粟², 何俊², 张利军², 王以美², 赵君², 彭双清^{1,2,*}

1. 广西医科大学, 南宁 530021

2. 军事医学科学院 疾病预防控制中心毒理学评价研究中心, 北京 100071

收稿日期: 2015-02-13 录用日期: 2015-05-12

摘要: 通过研究空气颗粒物的代表性组分纳米碳黑(nano particle carbon black, NPCB)与重金属(Pb/Cr/Cd)联合染毒对 BEAS-2B 细胞存活率和 LDH 漏出率的影响, 旨在阐明 NPCB 与重金属对细胞毒性的联合作用模式。检测 NPCB 与重金属(Pb/Cr/Cd)联合染毒 24 h 后 BEAS-2B 细胞存活率(CCK-8 法)和 LDH 漏出率(LDH 活性比色法)的变化, 采用析因方差分析判断其是否存在联合毒性作用及联合作用模式。NPCB 与重金属(Pb/Cr/Cd)联合染毒在细胞存活率和 LDH 漏出方面存在联合作用; 与对照组和单独染毒组相比, 低剂量 Pb($125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与 NPCB 联合染毒对细胞存活率无交互作用, 对 LDH 漏出表现为拮抗作用; 高剂量 Pb($1\ 000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与 NPCB 联合染毒对细胞存活率表现为协同作用, 对 LDH 漏出无交互作用; Cr 和 Cd 与 NPCB 联合染毒在细胞存活率方面均表现为协同作用; 低剂量 Cr 和 Cd 与 NPCB 联合染毒在 LDH 漏出方面无交互作用, 高剂量时表现为协同作用。NPCB 与重金属存在联合作用, 金属不同、剂量不同以及评价指标不同, 其联合作用模式不尽相同。

关键词: 纳米碳黑; 重金属; 铅; 铬; 镉; 联合作用; 细胞毒性

文章编号: 1673-5897(2015)3-288-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Evaluation of Combined Effects of NPCB and Heavy Metals on BEAS-2B Cells

Tian Dongdong^{1,2}, Yuan Xiaoyan², Zhou Wei², Jia Li², He Jun², Zhang Lijun², Wang Yimei², Zhao Jun², Peng Shuangqing^{1,2,*}

1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

2. Evaluation and Research Center for Toxicology, Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Received 13 February 2015 accepted 12 May 2015

Abstract: NPCB and heavy metals are representative components of airborne particulate matter. In the present study, we investigated the combined effects of NPCB with Pb/Cr/Cd on the viability and LDH leakage of BEAS-2B Cells. After co-exposure to NPCB and heavy metals (Pb/Cr/Cd) for 24 h, cell viability and LDH leakage were detected by Cell Counting Kit-8(CCK-8) and LDH Cytotoxicity Assay Kit, respectively. The types of combined effects were determined by factorial design analysis of combined effects on cell viability and LDH leakage. Compared to the NPCB and heavy metals (Pb/Cr/Cd) had control group /NPCB group and the Pb group, co-exposure to low dose

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(2011CB503803); 毒理学北京市重点实验室 2014 开放课题 (2014HJDL01)

作者简介: 田冬冬(1988—), 女, 硕士, 研究方向: 环境毒理学, E-mail: tddwinter_1988@126.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: pengsq@hotmail.com

of Pb ($125 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and NPCB had no interaction on cell viability, but showed antagonistic joint action on LDH leakage; co-exposure to high dose of Pb ($1\ 000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and NPCB showed a synergistic effect on cell viability, but had no interaction on LDH leakage. Co-exposure to Cr/Cd and NPCB showed a synergistic effect on cell viability; whereas co-exposure to low dose of Cr/Cd and NPCB showed no interaction on LDH leakage, and co-exposure to high dose of Cr/Cd and NPCB showed a synergistic effect on LDH leakage. NPCB and heavy metals had combined effects on cytotoxicity. The modes of combined effects were different to different metals, different doses and different toxic endpoints.

Keywords: NPCB; heavy metals; Pb; Cd; Cr; combined toxicity effects; cytotoxicity

空气颗粒物(particulate matter, PM)是危害我国居民健康的主要环境因素之一,其健康效应及潜在毒性机制越来越受到人们关注。PM由粒径不同的颗粒状物质和其吸附的多种化学物质组成^[1],它对机体的损害作用一方面是物理刺激作用(如碳颗粒的刺激作用),另一方面是化学损害作用(如重金属、有机物的毒性作用等)^[2]。现有研究表明,不同地区、不同季节PM的组分差异较大^[3],因此,往往造成毒理学研究结果的可比性较低,难以充分了解PM的毒性效应及潜在机制^[4]。而且目前对于PM毒性效应的研究多是针对PM整体或针对其单一组分(如金属或有机成分等)^[1],很少考虑其主要组分的联合毒性作用,选择PM中代表性组分进行联合毒性的研究,对于阐明PM颗粒物毒性作用机制和比较不同来源颗粒物的毒性差异具有重要的理论意义,对开展PM健康危害评估具有重要的应用价值。

PM中常见的颗粒状物质包括碳颗粒、飞灰颗粒和矿物颗粒^[5]等,其中碳颗粒作为PM的惰性吸附核,具有较大的比表面积以及很强的吸附能力,更易载带吸附重金属、酸性氧化物、有机污染物、细菌、病毒等有害成分^[6]。为此,我们选择纳米碳黑(nano Particle Carbon Black, NPCB)模拟大气细颗粒物的惰性核,选择铅(Pb)、铬(Cr)、镉(Cd)作为颗粒物中重金属的代表^[7],进行NPCB与重金属的联合毒性研究,旨在阐明PM主成分的联合作用模式,为PM的风险评估提供理论依据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 材料

1.1.1 实验细胞株:

人支气管上皮细胞 BEAS-2B (本实验室保存),置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 (v/v)和饱和湿度条件下培养。

1.1.2 实验试剂:

纳米碳黑(NPCB, $\leq 50\text{ nm}$)、醋酸铅(PbAc)、氯化

镉(CdCl_2)、重铬酸钾($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$)购自 Sigma 公司(纯度 $\geq 99.99\%$); DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存;胎牛血清购自杭州四季青公司, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 灭活后使用;胰蛋白酶(0.25% Trypsin-EDTA)购自 Sigma 公司, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存;细胞毒性检测试剂盒(cell counting kit- 8, CCK-8)购自日本同仁化学研究所;乳酸脱氢酶试剂盒(LDH Cytotoxicity Assay Kit)购自杭州碧云天生物技术研究所以;其他试剂均为分析纯。

1.1.3 实验仪器:

MCo-15AIC CO_2 培养箱购自日本 Sanyo 公司;马尔文激光粒度分析仪购自德国 Malvern 公司;H-7650 透射电子显微镜购自日本 HITACHI 公司;MULTISKAN MK3 多功能酶标仪购自 Thermo 公司; 25 cm^2 细胞培养瓶、96 孔细胞培养板购自 CORNING 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养:

将 BEAS-2B 细胞接种于 25 cm^2 培养瓶中,加入 5 mL 含有 10% (v/v)胎牛血清、 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的青霉素和链霉素的 DMEM 培养基,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 (v/v)和饱和湿度的培养箱内培养。观察细胞生长情况,每 2~3 d 按 1:3 比例传代 1 次。

1.2.2 对 NPCB 染毒液的表征:

本实验选用含有 5% FBS 的 DMEM 培养基作为 NPCB 的分散介质,将配制好的 NPCB 染毒液超声处理 30 min 使其均匀分布,用马尔文粒度分析仪测定 NPCB 染毒液的粒径分布和 Zeta 电位,每个样品重复三次。取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 超声处理后的 NPCB 染毒液滴加到铜网上,自然风干后电镜观察 NPCB 颗粒的形态特征。

1.2.3 实验分组及剂量选择:

按照 2×2 析因设计设立空白对照组、NPCB 单独染毒组、重金属单独染毒组及联合染毒组,每组设

置 3 个平行孔和这 3 个给药本底对照孔。观察 NPCB 和重金属(Pb/Cd/Cr)单独染毒 24 h 后的细胞存活率,根据细胞存活率结果,选择无毒性作用剂量作为联合作用研究中 NPCB 的剂量,与无明显毒性作用剂量或具有一定毒性作用剂量的重金属(Pb/Cd/Cr)进行联合染毒。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞存活率:

选取生长状态良好的对数期细胞,消化制成单细胞悬液并计数,以细胞浓度 5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、每孔 100 μL 接种于 96 孔板中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 进行染毒。染毒 24 h 后,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,继续孵育 4 h,采用酶标仪于 450 nm 波长处检测吸光度(OD)值。细胞活力(%) = $(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{本底对照}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{本底对照}}) \times 100\%$ 。

1.2.5 LDH 漏出率检测:

按乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司)提供的步骤进行。细胞外活性孔吸光度检测:至预定时间后,将 96 孔板用多孔板离心机 400 g 离心 5 min,分别取各孔的上清液 60 μL 加入另一新的 96 孔板中,分别加入 30 μL LDH 检测工作液,混匀后室温避光孵育 30 min,然后在 490 nm 波长处测定 OD 胞外值。细胞内活性孔吸光度:尽量吸除剩余 96 孔板中的上清,加入 150 μL 用 PBS 稀释了 10 倍的 LDH 释放试剂,振荡混匀,继续在细胞培养箱中孵育 1 h,随后将细胞培养板用多孔板离心机 400 g 离心 5 min,分别取各孔的上清液 60 μL ,加入到新的 96 孔板中,随即在 490 nm 波长处测定 OD 胞内值。计算细胞 LDH 漏出率,即细胞 LDH 漏

出率(%) = $(OD_{\text{胞外}} - OD_{\text{对照}}) / [(OD_{\text{胞内}} - OD_{\text{对照}}) + (OD_{\text{胞外}} - OD_{\text{对照}})] \times 100\%$ 。

1.2.6 统计学方法:

采用 SPSS 统计软件对实验数据进行统计分析,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)对组间的显著性差异进行检验, $P < 0.05$ 表示有显著性差异;用析因设计的方差分析^[8]进行比较,采以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准, $\alpha < 0.05$ 表示存在交互作用,判断联合作用类型时,应根据方差分析结果,若存在交互作用则通过二者交互作用的均值图判断其联合作用的类型;交互作用的均值图法是指:若曲线相互平行,则表示不存在交互作用;若曲线随着染毒剂量的增大而相互远离,可判定联合作用为协同作用;若曲线随剂量增大而相互靠近,则判定为拮抗^[9]。

2 结果(Results)

2.1 NPCB 染毒液的粒度分布、Zeta 电位及电镜下形态特征:

粒径检测结果显示,在 5% FBS 的 DMEM 中 NPCB 粒径分布在 100 nm 以下,峰形及分布范围狭窄,表明 NPCB 在该体系中分散性较好;Zeta 电位结果表明, NPCB 带有负电荷,其电位值为 -8.55 mV。用电子显微镜观察 NPCB 颗粒的形态特征,可见 NPCB 颗粒呈不规则颗粒状,分散较为均匀,其粒径范围多在 20~50 nm,仅有少量聚集情况,与激光粒度分析仪检测结果基本吻合。所以本研究选用含 5% FBS 的 DMEM 培养基作为 NPCB 颗粒的分散介质进行实验。

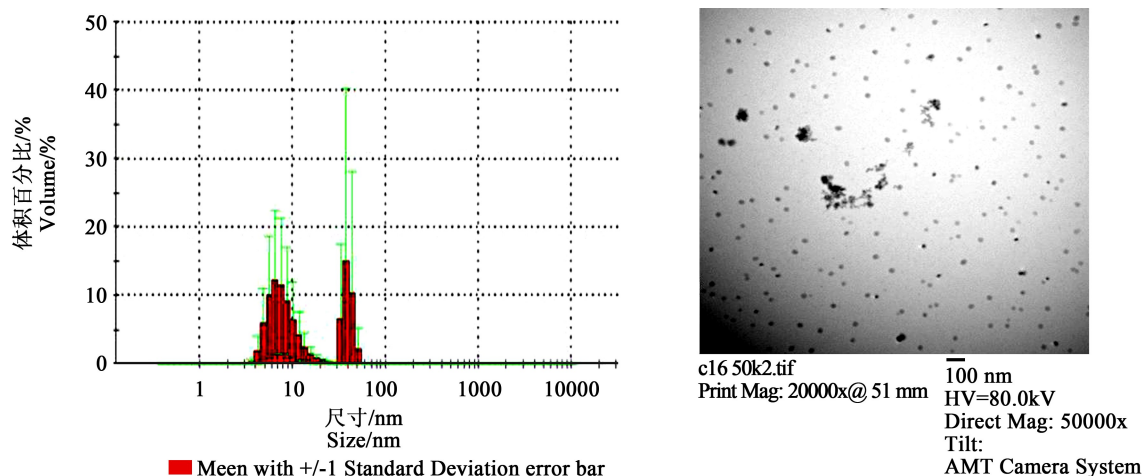


图 1 NPCB 在含有 5%FBS 的 DMEM 培养基中粒径分布与电镜下形态

Fig. 1 Particle size distribution and morphology by the TEM of NPCB in DMEM medium containing 5% FBS

2.2 NPCB 和重金属(Pb/Cd/Cr)单独染毒 24 h 后的细胞存活率检测结果

为了选择合适的 NPCB 与重金属的剂量进行联合作用研究,采用 CCK-8 法对 NPCB、PbAc、CdCl₂、K₂Cr₂O₄单独染毒 24 h 的细胞存活率进行了检测,实验结果表明,NPCB 和三种重金属的细胞存活率均呈现出明显的剂量—反应关系,随着染毒剂量的增加,存活率逐渐降低(图 2)。与空白对照相比,NPCB 在 32 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 时产生毒性($P<0.05$),PbAc 在 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时产生毒性($P<0.05$),CdCl₂在 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时产生毒性($P<0.05$),K₂Cr₂O₄在 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时产生毒性($P<0.05$)。根据细胞存活率结果,选择 NPCB: 8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (无毒性作用剂量),PbAc: 125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,CdCl₂: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,K₂Cr₂O₄: 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (即 Cr: 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)进行联合染毒。

2.3 NPCB 和重金属(Pb/Cd/Cr)联合染毒 24h 后的细胞存活率检测结果

与对照组和 PbAc 单独染毒组相比,125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PbAc 与 NPCB 联合染毒对细胞存活率无明显影响($P>0.05$)(图 3A);1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PbAc 与 NPCB 联合染毒明显降低了细胞存活率($P<0.05$)(图 3C)。与对照组和金属单独染毒组相比,K₂Cr₂O₄或 CdCl₂与 NPCB 联合染毒明显降低了细胞存活率($P<0.05$)

(图 4A、图 4C、图 5A、图 5C)。析因设计方差分析结果显示,低剂量 Pb 与 NPCB 联合染毒对细胞存活率无交互作用;高剂量 Pb 与 NPCB 存在联合作用,由二者交互作用的均值图可以看出,高剂量 Pb 与 NPCB 联合染毒对细胞存活率表现为协同作用(图 3B、图 3D);低剂量和高剂量的 Cd 或 Cr 与 NPCB 联合染毒在细胞存活率方面均存在交互作用,其联合作用模式均为协同作用(图 4B、图 4D、图 5B、图 5D)。

2.4 细胞 LDH 漏出率检测结果

与对照组和 PbAc 单独染毒组相比,125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PbAc 与 NPCB 联合染毒明显降低了 LDH 漏出率($P<0.05$)(图 6A);1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PbAc 与 NPCB 联合染毒对细胞 LDH 漏出率无明显影响($P>0.05$)(图 6C)。与对照组和金属单独染毒组相比,CdCl₂与 NPCB 联合染毒明显增加 LDH 漏出率($P<0.05$)(图 7A、图 7C);0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 K₂Cr₂O₄与 NPCB 联合染毒对 LDH 漏出率无明显影响(图 8A),2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 K₂Cr₂O₄与 NPCB 联合染毒明显增加了 LDH 漏出率($P<0.05$)(图 8C)。析因设计方差分析结果显示,低剂量 Pb 与 NPCB 联合染毒对细胞 LDH 漏出率存在交互作用,交互作用均值图显示二者表现为拮抗作用(图 6B);高剂量时二者无交互作用(图 6D);低剂量 Cd 或 Cr 与 NPCB 不存在交互作用,高剂量时均存在交互作用,其联合作用模式表现为协同作用(图 7B、图 7D、图 8B、图 8D)。

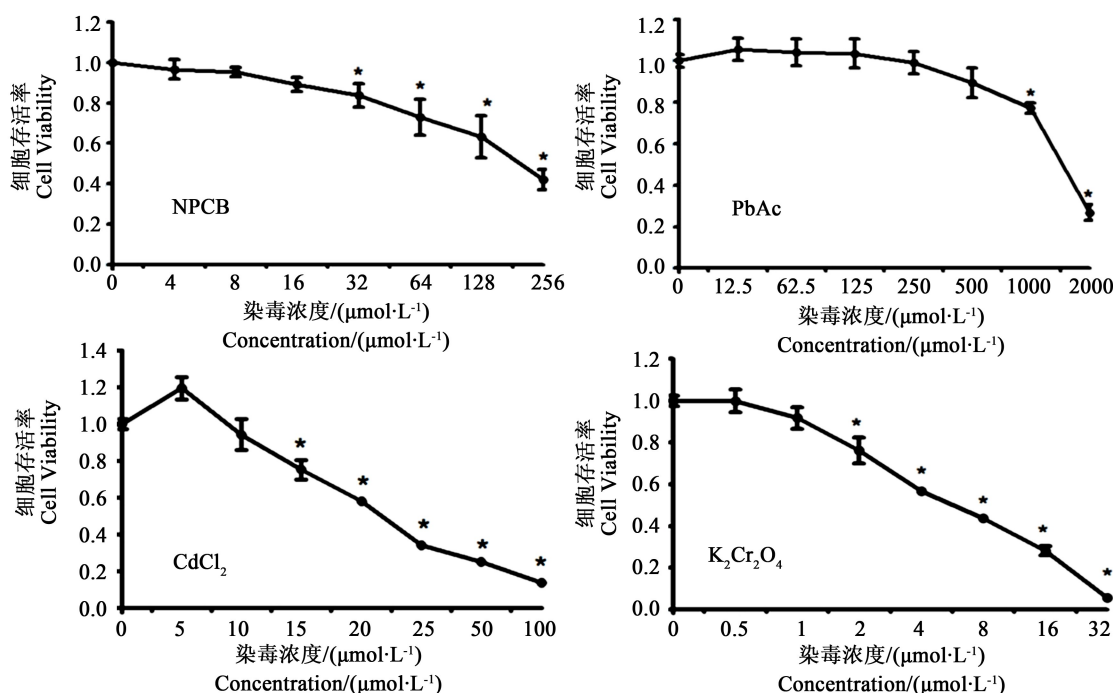


图2 NPCB 与重金属 (Pb/Cd/Cr)单独染毒 24h 单独染毒细胞存活率

Fig. 2 Effects of exposure to NPCB and metals on cell viability Values are shown as mean $\pm$ SD ($n=3$). * Different from control, $P<0.05$.

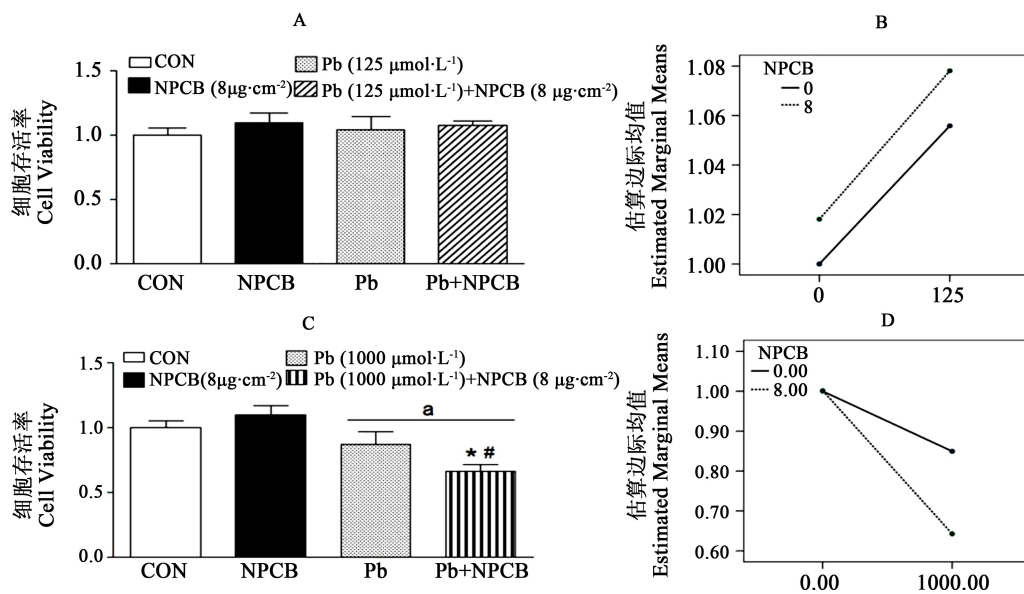


图 3 Pb 与 NPCB 联合染毒存活率与联合作用模式图

A: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)和 Pb(125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 单独及联合染毒 24 h 细胞存活率 B: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) 和 Pb (125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的细胞存活率联合作用模式图
C: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)和 Pb (1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 单独及联合染毒 24 h 细胞存活率 D: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) 和 Pb (1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的细胞存活率联合作用模式图

Fig. 3 Effects of combined exposure to NPCB and Pb on cell viability

A: Cell viability of Beas-2B cells exposed to NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), Pb (125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and their mixture(125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 24h. B: Interaction profile plots of NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and Pb (125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on Cell viability. C: Cell viability of Beas-2B cells exposed to NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), Pb (1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and their mixture(1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 24h. D: Interaction profile plots of NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and Pb (1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on Cell viability.

Values are shown as mean $\pm$ SD (n=3).

* Different from control, # different from NPCB group, a different from metal group, $P<0.05$

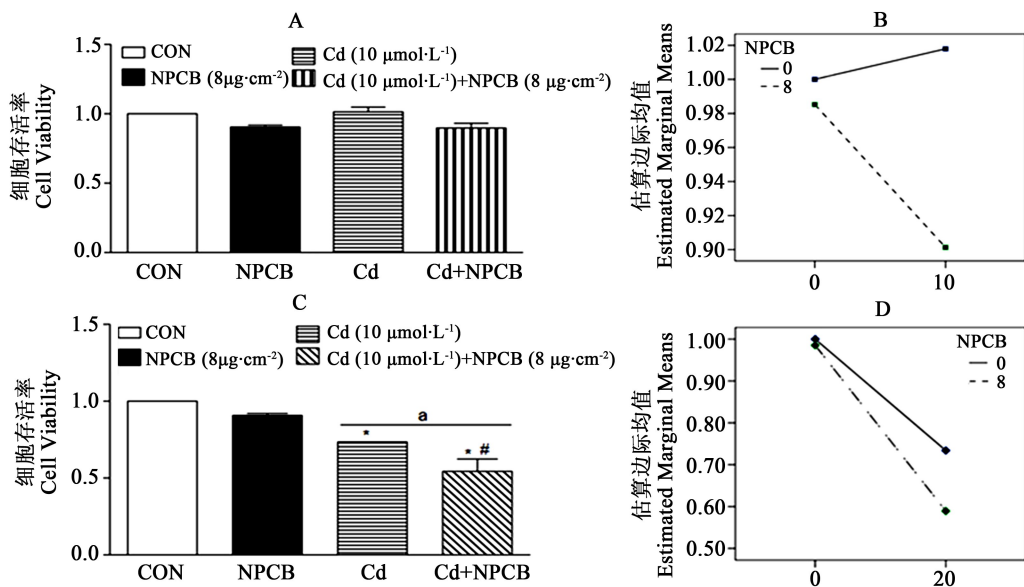


图 4 Cd 与 NPCB 联合染毒存活率与联合作用模式图

A: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)和 Cd (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 单独及联合染毒 24 h 细胞存活率 B: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) 和 Cd (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的细胞存活率联合作用模式图
C: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)和 Cd (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 单独及联合染毒 24 h 细胞存活率 D: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) 和 Cd (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的细胞存活率联合作用模式图

Fig. 4 Effects of combined exposure to NPCB and Cd on cell viability

A: Cell viability of Beas-2B cells exposed to NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), Cd (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and their mixture (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 24 h. B: Interaction profile plots of NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and Cd (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on Cell viability. C: Cell viability of Beas-2B cells exposed to NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), Cd (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and their mixture (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 24 h. D: Interaction profile plots of NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and Cd (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on Cell viability.

Values are shown as mean $\pm$ SD (n=3).

* Different from control, # different from NPCB group, a different from metal group, $P<0.05$

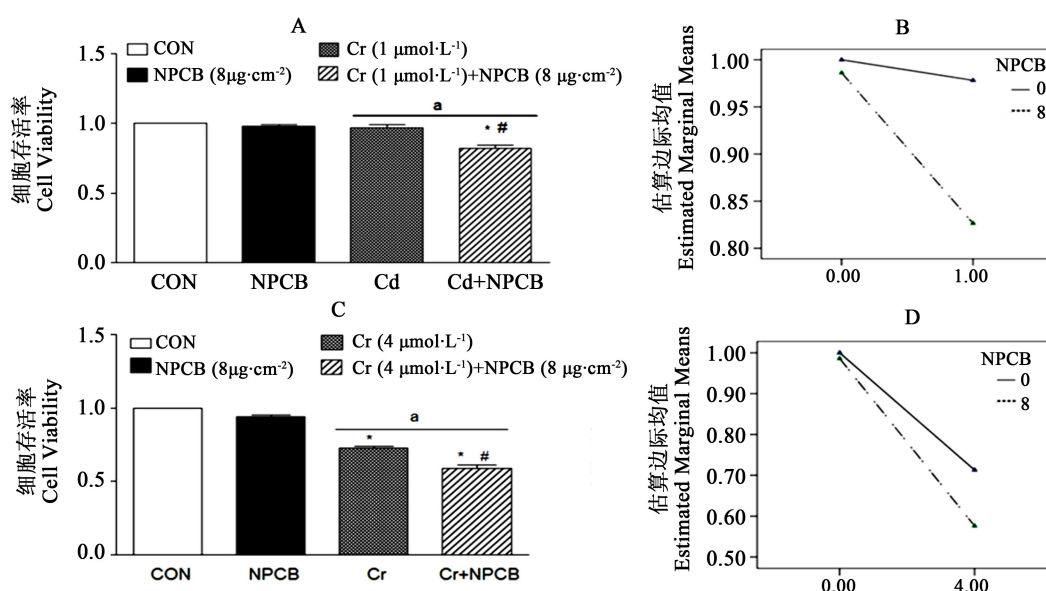


图5 Cr与NPCB联合染毒存活率与联合作用模式

A: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)和Cr(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)单独及联合染毒24 h细胞存活率 B: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)和Cr(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的细胞存活率联合作用模式图C: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)和Cr(4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)单独及联合染毒24 h细胞存活率 D: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)和Cr(4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的细胞存活率联合作用模式图

Fig. 5 Effects of combined exposure to NPCB and Cr on cell viability

A: Cell viability of Beas-2B cells exposed to NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), Cr(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and their mixture(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 24h. B: Interaction profile plots of NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and Cr(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on Cell viability. C: Cell viability of Beas-2B cells exposed to NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), Cr(4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and their mixture(4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 24h. D: Interaction profile plots of NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and Cr(4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on Cell viability.

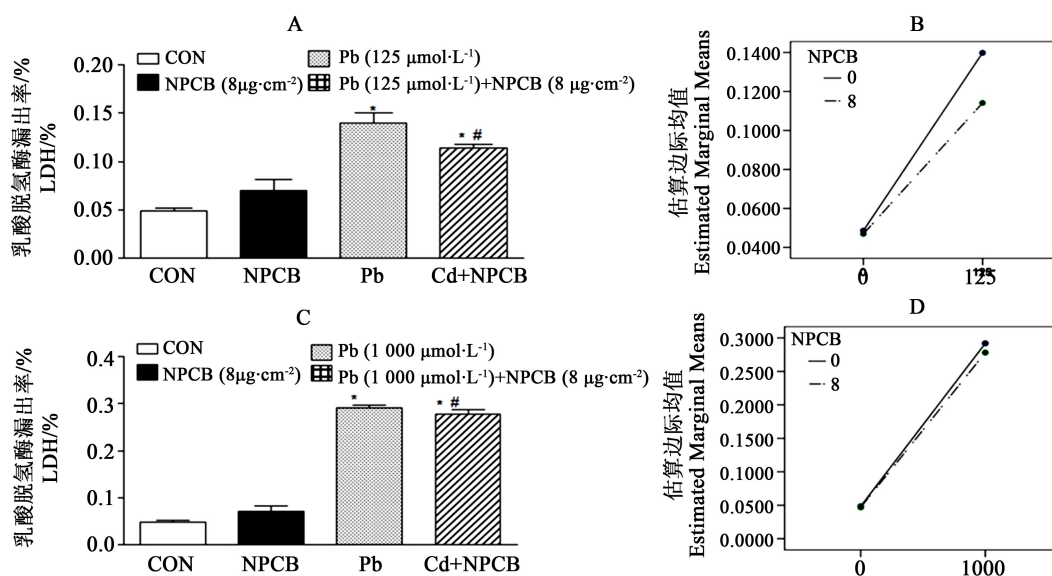
Values are shown as mean $\pm$ SD (n=3).* Different from control, # different from NPCB group, a different from metal group, $P < 0.05$ 

图6 Pb与NPCB联合染毒LDH漏出率与联合作用模式图

A: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)和Pb(125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)单独及联合染毒24 h细胞LDH漏出率 B: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)和Pb (125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的细胞LDH漏出率联合作用模式图C: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)和Pb (1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)单独及联合染毒24 h细胞LDH漏出率 D: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)和Pb (1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的细胞LDH漏出率联合作用模式图

Fig. 6 Effects of combined exposure to NPCB and Pb on LDH

A: LDH leakage of Beas-2B cells exposed to NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), Pb (125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and their mixture(125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 24h. B: Interaction profile plots of NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and Pb (125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on LDH leakage. C: LDH leakage of Beas-2B cells exposed to NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), Pb (1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and their mixture (1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 24h. D: Interaction profile plots of NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and Pb (1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on LDH leakage.

Values are shown as mean $\pm$ SD (n=3).* Different from control, # different from NPCB group, $P < 0.05$

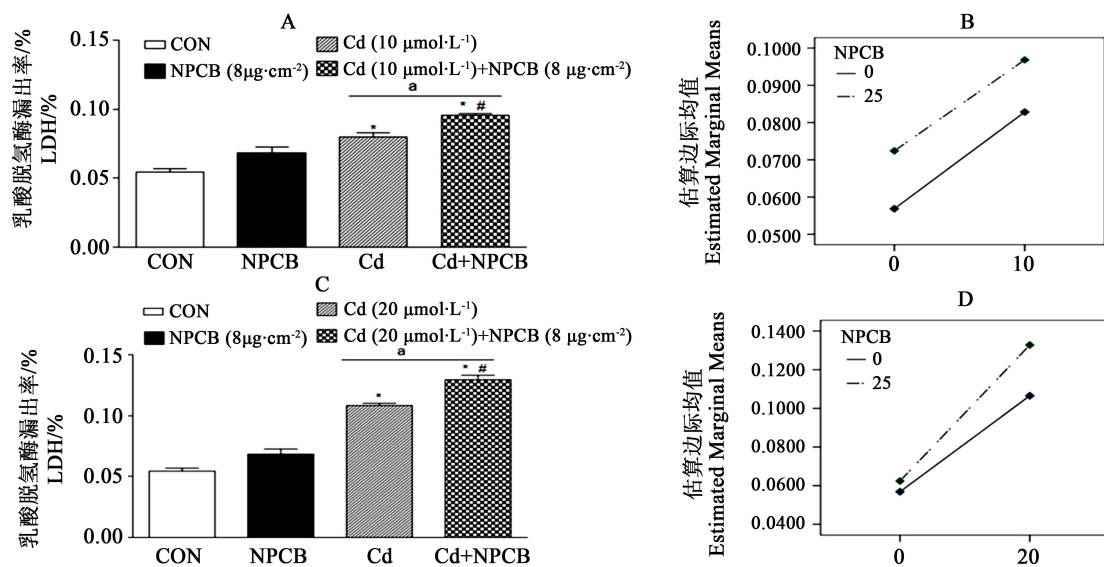


图 7 Cd 与 NPCB 联合染毒 LDH 漏出率与联合作用模式图

A: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)和 Cd (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 单独及联合染毒 24 h 细胞 LDH 漏出率 B: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) 和 Cd (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的细胞 LDH 漏出率联合作用模式图 C: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)和 Cd (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 单独及联合染毒 24 h 细胞 LDH 漏出率 D: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) 和 Cd (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的细胞 LDH 漏出率联合作用模式图

Fig. 7 Effects of combined exposure to NPCB and Cd on LDH

A: LDH leakage of Beas-2B cells exposed to NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), Cd (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and their mixture (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 24h. B: Interaction profile plots of NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and Cd (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on LDH leakage. C: LDH leakage of Beas-2B cells exposed to NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), Cd (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and their mixture (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 24h. D: Interaction profile plots of NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and Cd (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on LDH leakage.

Values are shown as mean $\pm$ SD (n=3).

* Different from control, # different from NPCB group, a different from metal group, $P<0.05$

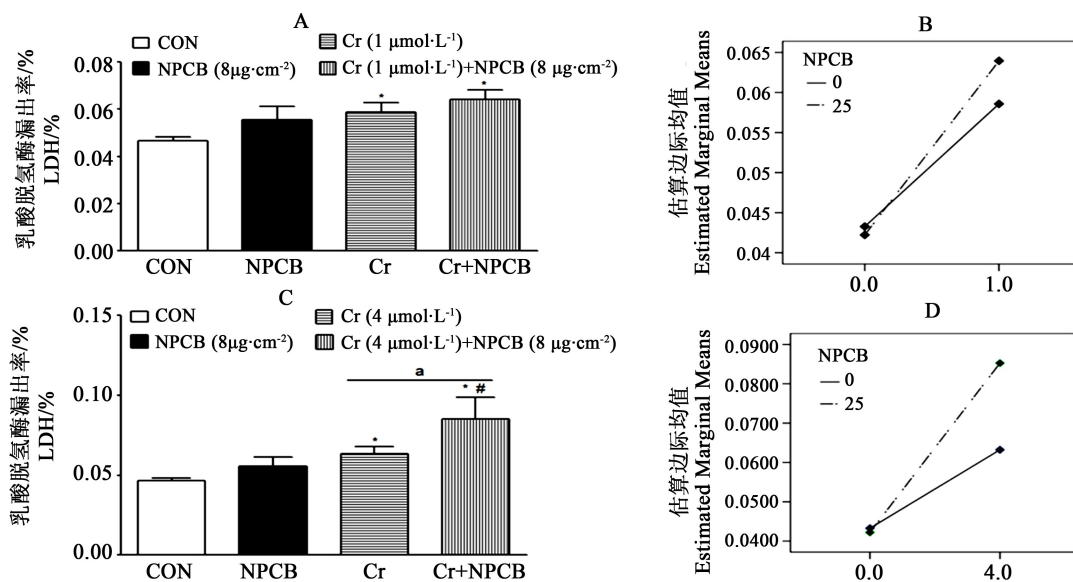


图 8 Cr 与 NPCB 联合染毒 LDH 漏出率与联合作用模式图

A: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)和 Cr (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 单独及联合染毒 24 h 细胞 LDH 漏出率 B: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) 和 Cr (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的细胞 LDH 漏出率联合作用模式图 C: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)和 Cr (4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 单独及联合染毒 24 h 细胞 LDH 漏出率 D: NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) 和 Cr (4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的细胞 LDH 漏出率联合作用模式图

Fig. 8 Effects of combined exposure to NPCB and Cr on LDH

A: LDH leakage of Beas-2B cells exposed to NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), Cr (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and their mixture (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 24h. B: Interaction profile plots of NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and Cr (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on LDH leakage. C: LDH leakage of Beas-2B cells exposed to NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), Cr (4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and their mixture (4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 24h. D: Interaction profile plots of NPCB (8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and Cr (4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on LDH leakage.

Values are shown as mean $\pm$ SD (n=3).

* Different from control, # different from NPCB group, a different from metal group, $P<0.05$

表 1 NPCB 与重金属 (Pb/Cd/Cr)联合染毒作用模式

Table 1 Evaluations of joint toxic effects of NPCB and heavy meatal(Pb/Cd/Cr)

检测指标	染毒组	剂量	α	作用模式
Outcome measures	Treatment group	Concentration		Role type
存活率 Cell viability	$Pb(\mu mol \cdot L^{-1}) + NPCB(\mu g \cdot cm^{-2})$	125+8	0.929	—
		1000+8	0.028	协同(synergistic)
	$Cb(\mu mol \cdot L^{-1}) + NPCB(\mu g \cdot cm^{-2})$	10+8	<0.000	协同(synergistic)
		20+8	0.023	协同(synergistic)
	$Cr(\mu mol \cdot L^{-1}) + NPCB(\mu g \cdot cm^{-2})$	1+8	<0.000	协同(synergistic)
		4+8	<0.000	协同(synergistic)
LDH 漏出率 LDH leakage	$Pb(\mu mol \cdot L^{-1}) + NPCB(\mu g \cdot cm^{-2})$	125+8	0.044	拮抗(antagonistic)
		1000+8	0.295	—
	$Cb(\mu mol \cdot L^{-1}) + NPCB(\mu g \cdot cm^{-2})$	10+8	0.813	—
		20+8	0.019	协同(synergistic)
	$Cr(\mu mol \cdot L^{-1}) + NPCB(\mu g \cdot cm^{-2})$	1+8	0.256	—
		4+8	0.015	协同(synergistic)

注: “—”表示此毒在此检测指标统计无联合作用。
Note: “—”No statistics showed combined effect in this test indicators.

3 讨论 (Discussion)

碳黑和重金属是 PM 的主要组分,本研究通过对 NPCB 和重金属联合染毒对 BEAS-2B 细胞存活率和 LDH 漏出率的检测及其联合作用模式的探讨,证实了 NPCB 与重金属 (Pb/Cd/Cr)联合染毒在细胞存活率及 LDH 漏出率方面存在联合作用,但联合作用模式因重金属种类、染毒剂量和检测指标的不同表现不同。本研究为进一步探讨联合作用机制和初步阐明颗粒物的复合毒性提供了前期实验基础。

本研究选择无细胞毒性作用剂量的 NPCB 与不同浓度的重金属联合染毒,研究结果显示即使无毒性剂量的纳米颗粒的存在也会对重金属的毒性产生明显影响。作为环境颗粒物的模拟形式以及颗粒物其他毒性成分的基准对照^[10],NPCB 的体内、外毒性得到了广泛研究。很多研究都表明,氧化损伤在 NPCB 的毒性效应中发挥重要作用^[11],无论在体内还是体外,NPCB 均可诱导产生活性氧 (ROS),引起氧化应激损伤^[10, 12-14]。例如,有学者发现在肺上皮细胞中 NPCB 通过诱导 ROS 水平增加而增加了 DNA 氧化损伤^[15]。另有研究表明,可吸入颗粒物诱导的氧化损伤主要由其吸附的金属元素介导^[16-19]。因此,氧化应激损伤可能是重金属与 NPCB 联合作用的靶点。此外,纳米颗粒不但具有吸附特性,还具有亲细胞特性^[20],我们推测,NPCB 可能通过吸附重金属,并增加其与细胞的相互作用而增强重金属的毒性,但其具体机制还有待于进一步研究证实。

本研究发现染毒剂量对联合作用模式具有重要影响。低剂量的 Pb 与 NPCB 在存活率上无联合作用,高剂量联合表现为协同作用;在 LDH 漏出率上,低剂量联合表现为拮抗作用,高剂量无联合作用。低剂量的 Cd 或 Cr 与 NPCB 在 LDH 漏出率上无联合作用,高剂量联合表现为协同作用。由此可见,剂量不同,联合作用模式不同,联合作用模式的表征非常复杂,仅用单一剂量去表征两种物质之间的联合作用是不够的^[21],我们在做联合作用模式分析时要充分考虑不同剂量对比对结果的影响。

本研究中,我们采用了评价基本细胞毒性的 CCK-8 法和 LDH 活性检测法^[22]评价了重金属与 NPCB 的联合作用,针对不同检测指标,NPCB 与重金属联合作用方式有所不同。低剂量 Cd 或 Cr 与 NPCB 联合染毒在 LDH 漏出率上无联合作用,而在存活率上表现为协同作用。两种指标反映的联合作用模式不同,可能与两种检测方法检测的生物学终点不同有关,我们推测,以线粒体脱氢酶活性作为检测靶点的 CCK-8 法较细胞死亡或胞膜受损为靶点的 LDH 检测法更为敏感^[22]。

通过本研究证实了 NPCB 与重金属的联合作用模式十分复杂,提示在今后的联合毒性研究中,要考虑染毒剂量和检测指标对联合作用模式的影响。

通讯作者简介:彭双清(1962—),男,博士,研究员,博士生导师,主要研究方向为药理学与毒理学。

参考文献 (References):

- [1] Van B D, Hullmann M, Schins R P F. Toxicology of ambient particulate matter [J]. *Particle Research*, 2012, 101: 165—217
- [2] Akhtar U S, Rastogi N, Mcwhinney R D, et al. The combined effects of physicochemical properties of size-fractionated ambient particulate matter on in vitro toxicity in human A549 lung epithelial cells [J]. *Toxicology Reports*, 2014, 1(1): 145—156
- [3] Leung P Y, Wan H T, Billah M B, et al. Chemical and biological characterization of air particulate matter 2.5, collected from five cities in China [J]. *Environmental Pollution*, 2014, 194(7): 188—195
- [4] 刘芳盈, 丁明玉, 王菲菲, 等. 燃煤 PM_{2.5} 不同组分对血管内皮细胞的毒性[J]. *环境科学研究*, 2011, 24(6): 684—690
- [5] Qiu H, Tian L W, Pun V C, et al. Coarse particulate matter associated with increased risk of emergency hospital admissions for pneumonia in Hong Kong [J]. *Thorax*, 2014, 69(11): 1027—1033
- [6] Cao J, Shen Z X, Chow Z C, et al. Winter and summer PM_{2.5} chemical compositions in fourteen Chinese cities [J]. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 2012, 62(10): 1214—1226
- [7] Gray D L, Wallace L A, Brinkman M C, et al. Respiratory and cardiovascular effects of metals in ambient particulate matter: A critical review [J]. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology*, 2015, 234: 135—203
- [8] 顾兵, 王心如. 联合作用特征的评价[J]. *中国工业医学杂志*, 2000, 13(1): 55—58
- [9] 张蕾, 徐镜波, 杨丽. 析因试验设计在环境污染联合毒性研究中的应用[J]. *干旱环境监测*, 2004, 18(1): 20—22
- [10] Janssen N A H, Hoek G, Simic-Lawson M, et al. Black carbon as an additional indicator of the adverse health effects of airborne particles compared with PM₁₀ and PM_{2.5} [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2011, 119(12): 1691—1699
- [11] Mroz R M, Schins R P, Li H, et al. Nanoparticle-driven DNA damage mimics irradiation-related carcinogenesis pathways [J]. *European Respiratory Journal*, 2008, 31(2): 241—251
- [12] Sayes C M, Reed K L, Warheit D B. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: Comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles [J]. *Toxicological Sciences*, 2007, 97(1): 163—180
- [13] Koike E, Kobayashi T. Chemical and biological oxidative effects of carbon black nanoparticles [J]. *Chemosphere*, 2006, 65(6): 946—951
- [14] Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, et al. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: Respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms [J]. *International Journal of Environmental Research & Public Health*, 2013, 10(9): 3886—3907
- [15] Borgie M, Ledoux F, Verdin A, et al. Genotoxic and epigenotoxic effects of fine particulate matter from rural and urban sites in Lebanon on human bronchial epithelial cells [J]. *Environmental Research*, 2015, 136: 352—362
- [16] Flora S J S, Megha M, Ashish M. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy [J]. *Indian Journal of Medical Research*, 2008, 128(4): 501—523
- [17] Hong Y C, Hwang S S, Kim J H, et al. Metals in particulate pollutants affect peak expiratory flow of schoolchildren [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2007, 115(3): 430—434
- [18] Hartwig A, Schwerdtle T. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications [J]. *Toxicology Letters*, 2002, 127(1—3): 47—54
- [19] Sr W J, Wise S S, Little J E. The cytotoxicity and genotoxicity of particulate and soluble hexavalent chromium in human lung cells [J]. *Mutation Research/fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2002, 517(1—2): 221—229
- [20] Xia T, Li N, Ae N. Potential health impact of nanoparticles [J]. *Annual Review of Public Health*, 2009, 30: 135—70
- [21] Meek M E, Boobis A R, Crofton K M, et al. Risk assessment of combined exposure to multiple chemicals: A WHO/IPCS framework [J]. *Regulatory Toxicology & Pharmacology*, 2011, 60(2): S1—S14
- [22] Wörle-Knirsch J M, Pulskamp K, Krug H F. Oops they did it again! carbon nanotubes hoax scientists in viability assays [J]. *Nano Letters*, 2006, 6(6): 1261—1268 ◆