

大气细颗粒物对人肺泡上皮细胞毒性的研究进展

解姣姣*, 付依然, 陈鹏宇, 马雅文, 苑春刚

(华北电力大学 环境科学与工程系, 河北 保定 071000)

摘要: 在过去十年中, 因全球严重的雾霾污染, 学术界对大气细颗粒物($PM_{2.5}$)的毒性及其致毒机制展开了系统性研究。细胞实验具有操作简便、耗时短及重复性强等优点, 已成为目前研究 $PM_{2.5}$ 毒性的主要方法。其中, 人肺泡上皮 A549 细胞由于相对稳定的生物学特性及持续增殖的能力, 在 $PM_{2.5}$ 毒性检测实验中得到广泛应用。该文整理综述了 $PM_{2.5}$ 对 A549 细胞的综合毒性及其不同组分的细胞毒性, 梳理总结了染毒前 $PM_{2.5}$ 的分离及不同组分的提取方法, 并对现有的细胞毒性测定方法进行了整理与比较, 旨在为大气颗粒物及其他颗粒物的细胞毒性研究提供参考, 有助于深入探究颗粒物的毒理机制, 并优化相关领域的检测技术。

关键词: $PM_{2.5}$; 组分; 细胞毒性; 分离提取; 毒性检测

中图分类号: O615.4; X132 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)01-0209-08

Research Progress on the Cytotoxicity of Atmospheric Fine Particulate Matters to Human Lung Epithelial Cells

XIE Jiao-jiao*, FU Yi-ran, CHEN Peng-yu, MA Ya-wen, YUAN Chun-gang

(Department of Environmental Science and Engineering, North China Electric Power University, Baoding 071000, China)

Abstract: Over the past decade, the global prevalence of severe haze pollution has prompted the academic community to engage in systematic investigations into the toxicity of atmospheric fine particulate matter ($PM_{2.5}$) and its underlying toxicological mechanisms. In this context, cellular experiments have emerged as a predominant methodology for assessing $PM_{2.5}$ toxicity, owing to their operational simplicity, efficiency, and high reproducibility. Notably, human lung epithelial A549 cells are frequently employed in toxicity testing due to their relatively stable biological properties and capacity for continuous proliferation. This article reviews the comprehensive toxicity of $PM_{2.5}$ on A549 cell and the cytotoxicity of its different components, summarizes the methods for isolating $PM_{2.5}$ and extracting its various components before exposure, and organizes and compares existing cytotoxicity measurement methods. The aim is to provide a reference for the study of the cytotoxicity of atmospheric particles and other particulate matter, which will help to further explore the toxicological mechanisms of particulate matter and optimize detection technologies in related fields.

Key words: $PM_{2.5}$; components; cytotoxicity; isolating and extracting; cytotoxicity test

过去十年来, 频繁爆发的雾霾引起了公众的广泛关注, 雾霾污染已经成为全球的重大环境问题^[1-3]。大气颗粒物(PMs)是造成雾霾污染的首要污染物。根据世界卫生组织(WHO)报道, 每年有700万人因暴露于空气污染死亡。流行病学研究表明, 人体长期暴露于PMs会增加呼吸道疾病、肺癌、心脑血管等疾病的发病率^[4-7]。其中大气细颗粒物($PM_{2.5}$)因其粒径小、穿透能力强, 会进入支气管末端和肺泡, 并通过血液循环流向全身组织和器官, 造成急性或慢性损伤, 研究表明 $PM_{2.5}$ 浓度每增加 $10 \mu g/m^3$, 心血管疾病(CVD)发病率和死亡率的风险分别增加25%和16%^[8]。因此, 学者们展开了对PMs毒性及致毒机制的研究^[9-12], 细胞实验由于方便、省时、重复性好, 已成为最常用的方法^[13]。目前, 应用于PMs毒性研究的细胞模型主要包括人肺泡上皮细胞 A549 (Human lung epithelial cells)、巨噬细胞 (Macrophages)、气道上皮细胞 AECs (Airway epithelial cells)、正常人支气管上皮细胞 BEAS-2B (Normal

收稿日期: 2025-06-25; 修回日期: 2025-08-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(22206049); 中央高校基本科研业务费专项资金(2024MS174)

* 通讯作者: 解姣姣, 博士, 讲师, 研究方向: 环境污染物有毒组分识别与鉴定、新型污染物毒性数据库构建及环境健康效应, E-mail: jxie@ncepu.edu.cn

网络首发日期: 2025-11-03

human bronchial epithelia cells)和共培养细胞模型等。其中 A549 细胞系来源于人类肺泡上皮的肺癌细胞,兼具恶性肿瘤细胞和肺泡 II 型细胞的特性,相对稳定并且有长期增殖能力,可作为 $PM_{2.5}$ 进入肺泡后的直接作用靶细胞的理想模型,有效模拟 $PM_{2.5}$ 暴露造成的肺损伤(如氧化应激、炎症反应等),被广泛用于研究 PMs 引起的人类肺损伤及肺癌发生、诊断和治疗实验^[14]。

本文系统梳理了 $PM_{2.5}$ 及其上不同组分对 A549 细胞的毒性,其中包括水溶性组分、非水溶性组分、有机组分及新污染物组分;总结了染毒前 $PM_{2.5}$ 的分离及不同组分的提取方法;并对现有的细胞毒性测定方法进行了分析与比较。本综述旨在为大气颗粒物及其他颗粒物的细胞毒性研究提供参考,帮助深入探究颗粒物的毒理机制并优化相关领域的分析检测技术。

1 大气颗粒物对 A549 细胞的毒性研究

1.1 综合细胞毒性

不同季节、不同粒径及不同地区的 PMs 由于来源及组成成分的差异,导致对 A549 细胞的综合毒性不同。Xie^[16-22]等对保定市 PMs 中关键有毒组分重金属及环境持久性自由基(EPFRs)进行了系统研究,结果表明,冬季 $PM_{2.5}$ 中这两种有毒组分的含量均达到峰值,造成的健康风险最高。

Chen 等^[23]研究了不同季节的 $PM_{2.5}$ 对 A549 细胞的毒性效应及其可能机制,结果显示暴露 6 h 后,冬季 $PM_{2.5}$ 的细胞毒性最强,表现为更高的细胞凋亡率、活性氧(ROS)水平、炎症反应和 DNA 损伤;秋季 $PM_{2.5}$ 造成的细胞凋亡率显著高于春季,但其他毒性指标无显著差异;夏季 $PM_{2.5}$ 的细胞毒性最低,但也会导致显著的 DNA 损伤。相关性分析表明,细胞毒性的季节差异主要与 $PM_{2.5}$ 中水溶性离子、金属元素和多环芳烃(PAHs)有关。Chen 等^[24]比较了南京某工业区夏季和冬季 $PM_{2.5}$ 的细胞毒性,结果表明, A549 细胞暴露于冬季 $PM_{2.5}$ 后,乳酸脱氢酶(LDH)水平、ROS 生成水平、白细胞介素 6(IL-6)响应水平和肿瘤坏死因子(TNF- α)水平显著高于夏季 $PM_{2.5}$,且谷胱甘肽(GSH)水平下降更为显著,这与冬季 $PM_{2.5}$ 中较高的 Cu、Mn、Co 含量有关,表明过渡金属对细胞毒性的重要影响。Li 等^[25]对南京市区 $PM_{2.5}$ 细胞毒性的研究表明,寒冷季节 $PM_{2.5}$ 表现出更高的氧化应激水平和更强的细胞毒性;对 $PM_{2.5}$ 中的关键组分进行相关性分析表明,环境持久性自由基(EPFRs)、有机碳(OC)和 Cu、As 和 Pb 具有显著的细胞损伤能力。Zhou 等^[26]检测了杭州市秋季与冬季高速公路和工业场所 $PM_{2.5}$ 的细胞毒性,结果表明,冬季 $PM_{2.5}$ 的细胞毒性均高于秋季,相关性结果表明, $PM_{2.5}$ 中的多环芳烃和重金属与炎症反应和氧化应激密切相关,导致了较高的细胞毒性。Das 等^[27]考察了印度德里的 $PM_{2.5}$ 对 A549 细胞的细胞毒性,结果表明,1 月至 2 月的 $PM_{2.5}$ 细胞毒性最强,产生的活性氧比 10 月至 12 月 $PM_{2.5}$ 高 2.6 倍。

Zhang 等^[28]探讨了沙尘暴期间南京市(DT)和北郊(NS)大气中的 PM_{10} 和 $PM_{2.5}$ 对 A549 的毒性。结果表明, PM_{10} 对 A549 细胞存活率和细胞膜损伤的影响小于 $PM_{2.5}$,相反, $PM_{2.5}$ 对人谷胱甘肽过氧化物(GSH-Px)的抑制作用大于 PM_{10} ,即 $PM_{2.5}$ 的氧化应激水平高于 PM_{10} ;同时 DT 的 PMs 对细胞活力的抑制作用高于 NS。Wang 等^[29]对广州市 $PM_{10-5.8}$ 、 $PM_{5.8-3.3}$ 、 $PM_{3.3-1.1}$ 和 $PM_{1.1-0.43}$ 细胞毒性的研究表明,粒径最大的 $PM_{10-5.8}$ 的细胞毒性最低,粒径最小的 $PM_{1.1-0.43}$ 的细胞毒性最高。Soca-Chafre 等^[30]对墨西哥市 PM_{10} 和 $PM_{2.5}$ 的细胞毒性进行了对比研究,结果表明与 $PM_{2.5}$ 相比, A549 细胞对 PM_{10} 的反应更强。 PM_{10} 含有更高的内毒素含量,从而会诱导更强的炎症作用。Jan 等^[31]对印度 Pune 市不同粒径 PMs 的细胞毒性的研究结果显示, PM_{10} 的细胞毒性、ROS 水平和炎症反应都高于 $PM_{2.5}$ 。 PM_{10} 中的金属含量较高,其中 Fe 和 Cd 与细胞毒性、ROS 水平和炎症水平都显著相关。

综上所述,由于重金属、有机组分、水溶性离子等组分的差异,不同季节、不同粒径及不同地区的 PMs 细胞毒性存在差异,其中冬季 $PM_{2.5}$ 的细胞毒性更高,表现为更高的细胞凋亡率、ROS 水平等。

1.2 不同组分的细胞毒性

目前,对大气颗粒物中不同组分细胞毒性的研究主要包括:水溶性(WS)和水不溶性(WIS)组分、有机组分及新污染物。

$PM_{2.5}$ 的 WS 组分和 WIS 组分在较长时间内对细胞毒性具有协同作用。Wei 等^[32]的研究表明, WS 组分比 WIS 组分具有更高的抑制细胞活力和促进细胞炎症因子分泌的能力。Ma 等^[33]对 $PM_{2.5}$ 中 WS 组分的细胞毒性进行了研究,结果显示冬季 $PM_{2.5}$ 中的 WS 组分含量普遍高于其他季节,导致了较高的细胞毒

性。Sanchez-Soberon等^[34]对 $PM_{2.5-0.25}$ 和 $PM_{0.25}$ 中WS组分的细胞毒性测定结果表明,粒径较小的 $PM_{0.25}$ 中WS组分引起的细胞毒性高于 $PM_{2.5-0.25}$ 。Ma等^[33]研究了中国十大城市 $PM_{2.5}$ 中WS成分的细胞毒性,将不同城市 $PM_{2.5}$ 诱导的细胞死亡率进行排序,结果为:北京(BJ)>兰州(LZ)>太原(TY)>新乡(XX)>成都(CD)>武汉(WH)>上海(SH)>南京(NJ)>广州(GZ),进而得出中国北方 $PM_{2.5}$ 比南方 $PM_{2.5}$ 细胞毒性更高的结论。Barzgar等^[35]对伊朗Metropolitan City城区和工业区 $PM_{2.5}$ 中的WS组分进行了细胞毒性检测,结果显示,虽然工业区 $PM_{2.5}$ 和水溶性离子浓度都普遍高于城区,但是重金属浓度城区普遍高于工业区,从而导致了城区较严重的氧化损伤、炎症反应及较高的细胞毒性。WS组分主要包括水溶性离子和有机酸,而WIS组分主要包括碳酸钙、高岭石和一些有机碳。Zou等^[36]的研究结果表明 $PM_{2.5}$ 中的WS与WIS组分通过不同机制协同作用于细胞损伤,WS组分主要依赖氧化应激(ROS、炎症因子等)引发细胞损伤,而WIS组分通过物理破坏细胞膜加剧损伤,二者协同作用放大细胞毒性。Liu等^[37]的研究表明,由于水溶性离子可以较快进入细胞,短期暴露WS组分诱导的ROS高于WIS组分;但是长期暴露后,不溶性颗粒通过内吞作用进入细胞,抑制相关酶的功能并增加了ROS的产生,加剧了细胞毒性。

Chen等^[38]对南京城区与工业区 $PM_{2.5}$ 样品中的有机组分的细胞毒性进行了研究,检测了其中多环芳烃和正构烷烃的含量。结果表明,冬季样品中有机组分诱导的ROS、GSH和超氧化物歧化酶(SOD)的水平最高,造成了更大的炎症损伤,且与机动车尾气和燃煤相关的有机物对细胞毒性影响更为显著,工业区 $PM_{2.5}$ 中有机物的毒性高于城区样品,城区样品对细胞膜的损伤程度远高于工业区样品。Rönkkö等^[39]在南京市分别采集了 $PM_{10-2.5}$ 、 $PM_{2.5-1.0}$ 、 $PM_{1.0-0.2}$ 和 $PM_{0.2}$,对其中的有机组分进行了细胞毒性测定。结果显示,细胞毒性最大的是 $PM_{2.5-1.0}$ 和 $PM_{0.2}$ 中的有机组分PAHs和含氧多环芳烃(OPAHs),其中 $PM_{0.2}$ 对A549细胞的细胞周期、代谢活性和炎症反应影响更大。同时, $PM_{2.5}$ 中的无机组分会降低谷胱甘肽还原酶的活性^[24]、破坏阳离子通道并损害细胞膜导致钙稳态失调^[40],其协同作用使得细胞毒性增强。

近年来,随着对新污染物毒性研究的持续深入, $PM_{2.5}$ 中新污染物的毒性也受到更多关注。Pino等^[41]研究了发动机在柴油模式和天然气-柴油双模式下排放的 $PM_{2.5}$ 的细胞毒性,并检测了PAHs浓度,结果显示,柴油模式排放的 $PM_{2.5}$ 产生更高的PAHs浓度,导致柴油模式排放的 $PM_{2.5}$ 诱导细胞产生的ROS水平显著升高,并引发严重的DNA损伤。Zhou等^[26]在中国杭州采集了 $PM_{2.5}$ 样品,对其中的PAHs和邻苯二甲酸酯(PAE)进行了测定并评价了其毒性机制。结果表明, $PM_{2.5}$ 诱导的炎症反应和氧化应激与颗粒PAHs有关,而 $PM_{2.5}$ 的内分泌干扰作用与颗粒PAE有关。Sun等^[42]在香港鹤咀道和大帽山分别采集 $PM_{2.5}$,对其中的微塑料(MPs)进行了研究。结果显示, $PM_{2.5}$ 中的微塑料以聚乙烯(PE)为主,鹤咀道样品中的MPs浓度更高。MPs通过直接渗透或诱导产生ROS破坏细胞膜,从而导致丙二醛(MDA)形成和细胞膜损伤。Sun等^[43]还聚焦于道路灰尘中的轮胎和道路磨损微塑料(TRWMP)的研究,采集了我国8个特大城市道路灰尘中的 $PM_{2.5}$,检测了LDH和ROS水平,并测定了TRWMP含量,包括天然橡胶(NR)、丁苯橡胶(SBR)和丁二烯橡胶(BR)。结果显示,MPs对细胞活力的影响与粒径大小相关,较大的MPs可降低细胞活力,较小的MPs(纳米塑料)则增加细胞活力,轮胎和道路磨损倾向于产生大碎片而不是纳米塑料,从而导致细胞活力受到抑制,相关性结果也表明,MPs会通过诱导LDH产生和氧化应激导致细胞毒性。Room等^[44]研究了台湾地区不同粒径PMs(PM_{10} 、 $PM_{2.5}$ 、TSP)中的持久性有机污染物(POPs)多氯二苯并二噁英/呋喃(PCDD/Fs)、多氯联苯(PCBs)和多氯萘(PCNs)的浓度及季节变化,结果显示,PCDD/Fs冬季浓度最高,PCBs夏季因温度驱动挥发浓度升高,当地排放和气象影响驱动使 $PM_{2.5}$ 和 PM_{10} 中POPs分别占TSP中POPs的90%和50%,表明细颗粒物是POPs的主要载体。但该研究缺乏对PMs中POPs细胞毒性的研究。随着对PMs中新污染物关注的不断深入,其环境行为、健康效应和毒理机制的研究将成为未来的重要方向。

综上所述, $PM_{2.5}$ 的不同组分会引起不同的毒理学反应,且 $PM_{2.5}$ 来源复杂,因此可引起不同的健康效应,无论是 $PM_{2.5}$ 整体还是各个组分的细胞毒性及致毒机制都值得关注。此外, $PM_{2.5}$ 中新污染物的毒性及毒性机制的研究严重缺乏,是未来研究的重要方向。

2 $PM_{2.5}$ 及组分的分离提取

在对A549细胞进行染毒之前,需要先将颗粒物或颗粒物上的不同组分从采样膜上分离、提取。目

前按照提取成分可分为：总 $\text{PM}_{2.5}$ 提取、水溶性及非水溶性组分提取和有机组分提取，不同方法在提取液选择和预处理流程上各有不同(表 1)。这些方法使用不同的溶剂(超纯水、甲醇、二甲基亚砜等)结合物理分离(超声、涡旋、离心、过滤)及后处理技术(冷冻干燥后重悬)，将 PM_s 或不同组分从采样膜高效提取到悬浮液中，用于细胞染毒实验。

表 1 $\text{PM}_{2.5}$ 及组分的分离提取
Table 1 Isolating and extracting of $\text{PM}_{2.5}$ and its components

Extraction method	Sampling membrane type	Extract	Pretreatment method	Reference
总 $\text{PM}_{2.5}$ 提取	石英纤维滤膜	超纯水	超声或涡旋提取，过滤器或无菌纱布过滤去除石英残渣，[25-26,35] 滤液冷冻干燥	[45-46]
		甲醇或丙酮/己烷混合溶液 (V/V=1:1)	超声提取，离心后纱布过滤，纯氮气或者样品浓缩器浓缩干燥	
		超纯水和 DMSO	不同提取液依次超声两次，过滤掉滤膜后冷冻干燥	
	PTFE 滤膜	F-12K 培养基 甲醇	恒温水浴振荡，去膜悬浮液置于烘箱干燥 冷水水浴超声振荡，纯氮气浓缩干燥	[27] [49-50]
水溶性及非水溶性组分提取	石英纤维滤膜	超纯水、去离子水	超声提取，去除滤膜，离心后上清液为 WS- $\text{PM}_{2.5}$ ，沉淀物为 WIS- $\text{PM}_{2.5}$ ，最后将样品分别冷冻干燥	[51]
有机组分提取	石英纤维滤膜	二氯甲烷/正己烷混合溶液 (V/V=2:1)	超声提取，过滤去除不溶性物质，旋转蒸发浓缩，氮气干燥	[52]

总 $\text{PM}_{2.5}$ 提取常用石英纤维滤膜或聚四氟乙烯滤膜(PTFE)，根据提取液的不同可分为水提取和有机提取两种。水提取通常使用超纯水作为提取液，超声提取后，用过滤器或无菌纱布去除石英残渣，滤液冷冻干燥获得样品^[25-26,35]。比如 Li 等^[25]将石英纤维滤膜剪碎，浸入 20 mL 超纯水中，低温超声振荡 3 h，用孔径 2.5 μm 的膜过滤石英残留物，然后将含有大气细颗粒的滤液在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻，于冷冻干燥机中冻干成 $\text{PM}_{2.5}$ 粉末。最后，根据颗粒质量，依次加入无菌磷酸盐缓冲液(PBS)和 RPMI 1640 培养基，稀释成为 80 mg/L 的 $\text{PM}_{2.5}$ 悬液。有机提取使用有机溶剂作为提取液，超声后离心、过滤，最后通过纯氮气或样品浓缩器干燥^[45-46]。例如 Zeng 等^[46]将石英纤维滤膜与丙酮和己烷的混合物(50 mL，体积比 1:1)在 100 mL 管中用水浴振荡器进行振荡，提取 20 min，重复 3 次。氮气流干燥提取物并称量，在一定体积的二甲基亚砜(DMSO)中以 50 mg/mL 的质量浓度重悬。

分离 $\text{PM}_{2.5}$ 中的水溶性组分(WS- $\text{PM}_{2.5}$)与非水溶性组分(WIS- $\text{PM}_{2.5}$)时，常采用石英纤维滤膜，以超纯水为提取液。通过超声提取，过滤去除滤膜后，离心上清液经再次过滤得到 WS- $\text{PM}_{2.5}$ ，沉淀颗粒即为 WIS- $\text{PM}_{2.5}$ ，再分别冷冻干燥^[32,51]。Wei 等^[32]将超纯水浸泡的 $\text{PM}_{2.5}$ 样品在低温下超声处理 3 h。之后，用 5 μm 孔径的膜过滤石英残渣。将 $\text{PM}_{2.5}$ 悬浮液进一步离心(12 000 r/min，30 min)后通过 0.45 μm 滤膜过滤上清液，并收集 WS 组分，沉淀物作为 WIS 颗粒分离。最后，将所有组分分别冷冻干燥。加入无菌 PBS 和 RPMI 1640 培养基，将 3 种 $\text{PM}_{2.5}$ 粉末分别稀释成质量浓度为 80 mg/L 的悬浮液。

$\text{PM}_{2.5}$ 中的有机组分具有很强的遗传毒性，尤其是其中的 PHAs，对大气颗粒物的毒性贡献很大。因此有很多研究用有机溶剂提取 $\text{PM}_{2.5}$ 中的有机组分。超声提取后，过滤去除不溶性物质，通过旋转蒸发浓缩和氮气干燥获得样品^[38]。Chen 等^[38]采用二氯甲烷与正己烷的混合溶液(体积比 2:1)作为溶剂，对滤膜进行 3 h 的超声萃取，然后用 0.22 μm 过滤膜过滤，去除不溶性物质。有机提取物通过旋转蒸发进一步浓缩，并用温和氮气流干燥，用培养基稀释成 80 mg/L 的悬浮液。

PM_s 不同化学组分及其对应提取方法所呈现的细胞毒性有很大差别，要结合目标毒理终点(如炎症反应、DNA 损伤或氧化应激)，选择最优提取方法。

3 细胞毒性效应评价方法

细胞毒性效应评价一般是通过检测染毒一定时间后的细胞活性或死亡率进行判断。常用的细胞活性检测方法包括比色法、流式细胞术、实时细胞分析技术等(表 2)。这些方法在检测原理、实验操作流程和技术参数等方面存在差异，因而各自具有独特的优势与局限性。细胞毒性检测方法的发展进程如图 1 所示，从早期终点检测向实时动态检测的演进，提升了检测灵敏度与时间分辨率，为毒理学机制研究及环境风险监测提供了关键技术支撑。在细胞毒性评估体系中，不同检测方法基于不同的作用原理，呈现出独特的优势与局限性。因此，研究者需基于被测样品的理化特性、毒性强度以及应用场

景，进行系统性的选择与优化，确保细胞毒性检测结果的可靠性与生物学意义，为后续研究提供科学的实验依据。

表2 PM_{2.5}细胞毒性检测方法总结
Table 2 Summary of PM_{2.5} cytotoxicity test methods

Cytotoxicity test methods	Operation method	Advantage	Disadvantage
MTT 比色法	将细胞接种到孔板中孵育 24 h 后用培养基稀释后的 PM _{2.5} 悬浮液染毒，并加入 MTT 溶液，形成 Formazan 晶体，用 DMSO 溶解后测吸光度	简单、灵敏度高、经济实惠、重复性好、应用广泛	步骤繁琐，MTT 试剂不稳定，Formazan 晶体可能溶解不完全
CCK-8 比色法	将细胞接种到孔板中孵育 24 h 后用培养基稀释后的 PM _{2.5} 悬浮液染毒，加入 CCK-8 试剂孵育，测定吸光度	简便、灵敏度高、重复性好、对细胞毒性小	价格较高，显色时间受细胞数量影响
LDH 比色法	将细胞接种到孔板中孵育 24 h 后用培养基稀释后的 PM _{2.5} 悬浮液染毒，多孔离心机离心提取上清液，加入四氮唑盐试剂（如 INT 试剂）显色，孵育 15~30 min 加入终止剂终止显色，测定吸光度	能直接反映细胞膜损伤程度，操作相对简单	灵敏度较低，可能受细胞代谢产物影响
流式细胞术	将细胞接种到孔板中孵育 24 h 后用培养基稀释后的 PM _{2.5} 悬浮液染毒，消化离心重悬细胞悬浮样品，用荧光染料标记，比如膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶（Annexin V-FITC/PI），避光后载入流式细胞仪，生成流式细胞图检测细胞凋亡、周期等指标	可定量分析细胞凋亡、坏死及周期变化，能同时检测多种参数	需专业仪器和操作技能，样本制备过程复杂，成本较高
实时细胞分析仪检测法	在 E-Plate 孔板中接种细胞，待细胞贴壁并进入对数增长期后，加入 PM _{2.5} 悬浮液染毒，将 E-Plate 孔板放入实时细胞分析仪中，将细胞贴壁情况转化为电阻信号，生成实时细胞指数（CI）图和实时半数抑制浓度（IC ₅₀ ）图，判断细胞活性	可实时、无标记监测细胞状态，无需染色，能反映细胞动态变化过程	设备成本高昂，对细胞贴壁状态要求高，不适用于悬浮细胞检测

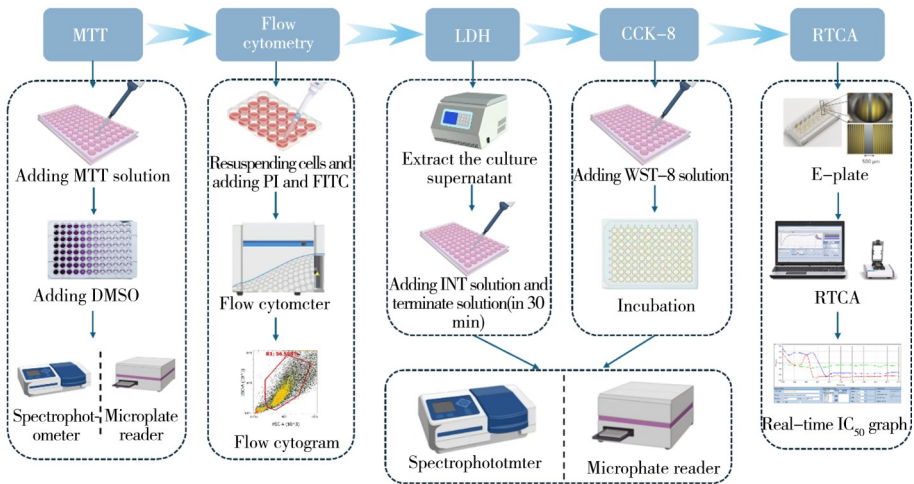


图1 细胞毒性检测方法的发展进程
Fig. 1 The development process of cytotoxicity test methods

3.1 比色法

比色法通过不同方法提取细胞代谢过程中生成的甲臞产物，利用分光光度计或酶标仪测定特定波长下的吸光值，根据显色差异定量分析细胞状态。该方法因操作简便、灵敏度高等特点，已成为体外评估细胞活力、增殖能力的常规检测技术^[53]。

3.1.1 MTT 比色法 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)，是一种黄色四甲基偶氮唑盐，易于通过细胞膜、线粒体膜等生物膜结构。活细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶等还原酶可将黄色水溶性 MTT 还原为蓝紫色不溶于水的甲臞(Formazan)结晶并沉积在细胞中^[54-55]。因此，活细胞数量越多，生成的甲臞量就越多，相应地蓝紫色也就越深。形成的甲臞结晶经二甲基亚砷或酸化异丙醇等有机溶剂溶解后，在 490 nm 或 570 nm 波长下测定其吸光度值，可间接反映细胞存活率。这种方法的优势在于成本低廉、简洁、灵敏度高、经济实惠、可重复，从而被广泛用于体外细胞活力、增殖、细胞毒性的研究，适用于大规模样本筛选；不足是步骤繁琐、MTT 试剂稳定性差、检测时间长，且甲臞晶体可能溶解不完全，导致结果误差^[54]。

3.1.2 CCK-8 比色法 CCK-8(Cell Counting Kit-8)法是一种基于水溶性四唑盐 2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2, 4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐(WST-8)还原反应的比色分析法。WST-8 在活细胞线粒体中的脱氢酶还原成具有高度水溶性的橙黄色甲臌。因此,活细胞数量越多,生成橙黄色甲臌越多,颜色越深。与 MTT 法不同,生成的甲臌产物溶解于培养基中,无需额外添加有机溶剂溶解,可直接在 450 nm 波长下测定吸光度,间接反映活细胞数量^[56]。CCK-8 法的优点是操作简便、检测时间较短(通常 1~4 h),避免了细胞计数过程中人为因素的影响,灵敏度高、重复性好、细胞用量少且试剂对细胞毒性低;缺点是试剂成本较高,显色时间易受细胞密度影响,需严格控制接种细胞数^[57]。

3.1.3 乳酸脱氢酶(LDH)比色法 LDH 是一种糖酵解酶,在细胞膜受损(如细胞凋亡或坏死)后会快速释放到细胞培养液中。释放的 LDH 可催化乳酸氧化生成丙酮酸,同时将辅酶 I (NAD⁺)还原为还原型辅酶 I (NADH)。在递氢体(如吩嗪二甲酯硫酸盐, PMS)存在下, NADH 进一步将四氮唑盐(如 INT 或 WST-1)还原为水溶性的红色甲臌。生成的甲臌在 490~500 nm 波长处具有特征吸收峰,其吸光度与 LDH 活性呈正相关。LDH 法是一种基于细胞膜完整性检测细胞毒性的常用方法,通过酶促反应测定细胞培养上清液中的 LDH 活性,可直接反映细胞膜损伤程度。LDH 法操作流程短,能快速判断细胞毒性;但灵敏度较低,乳酸脱氢酶是大分子,在细胞膜完全被破坏后才能释放出来,不能较早地反映细胞存活状态,易受细胞代谢产物或提取物成分干扰,且无法区分细胞凋亡与坏死^[55]。

3.2 流式细胞术

流式细胞术(Flow cytometry)是以流式细胞仪为核心检测平台,结合流体力学、激光光学、信号处理与计算机分析技术,实现快速定量分析和分选悬浮液中单个细胞或其他生物微粒(如细菌、病毒等)物理和化学特性的技术。由于其在短时间内对复杂细胞群体进行详细分析的强大能力,流式细胞仪已成为临床应用及各类研究的首选工具^[58-59]。在进行 PM_{2.5} 细胞毒性检测时,首先将用 PM_{2.5} 悬浮液处理的 A549 细胞进行消化和离心,随后重悬为细胞悬浮样品。接着,使用荧光染料(如 Annexin V-FITC/PI)对细胞进行双重染色,避光后利用流式细胞仪分析细胞凋亡及细胞周期进程等指标。流式细胞术的显著优势在于能够同时分析多种指标,且结果精准、可量化。然而,该技术需要专业的仪器和操作技能,样本制备过程较为复杂,且成本较高^[60-61]。

3.3 实时细胞分析仪检测法

实时细胞分析仪(RTCA)是一种新型细胞毒性检测方法,相比于传统的 MTT 比色法、LDH 测试等,该方法灵敏度更高,可以实时监测细胞存活率,且不会对细胞造成损伤^[57]。RTCA 的基本原理是基于电子阻抗技术的检测方法^[62],微金电极集成在孔板底部构成 E-Plate 检测板,细胞附着在微金电极的表面引起阻抗变化,通过阻抗变化反映活细胞数量的变化^[63]。由于在整个 RTCA 测试过程中不需要对细胞进行标记,因此该技术可实时、全自动、连续地检测细胞存活率,而不会对细胞造成损伤,但设备成本高昂,且仅适用于贴壁细胞检测,应用场景受限。

4 结论与展望

利用 A549 细胞进行 PMs 的细胞毒性测试是研究 PMs 毒理学及其毒性机制的常用方法。本文系统性地梳理了 PMs 对 A549 细胞的综合毒性及其不同组分的毒性,并总结了 PM_{2.5} 样品及组分分离提取的流程和现有的细胞毒性效应检测方法。PMs 对 A549 细胞综合毒性的结果表明,不同季节、不同地区及不同粒径的 PMs 对 A549 细胞的综合毒性存在显著差异。冬季的 PM_{2.5} 表现出最强的毒性,具体表现为更高的细胞凋亡率、氧化应激水平、炎症反应及 DNA 损伤,其毒性与重金属、有机碳、多环芳烃等组分密切相关。PM_{2.5} 中水溶性组分、非水溶性组分、有机组分和新污染物表现出不同的细胞毒性机制。水溶性组分通过氧化应激对细胞造成损伤,而非水溶性组分通过物理方式破坏细胞膜,从而协同增强细胞毒性;有机组分则通过诱导氧化损伤和炎症反应造成细胞毒性。在对 A549 细胞进行染毒之前,需先将颗粒物或颗粒物上的组分从采样膜上分离、提取。目前按照提取成分可分为:总 PMs 提取、PMs 水溶性及非水溶性组分提取和有机组分提取。这些方法使用不同的溶剂(超纯水、甲醇、DMSO 等)结合物理分离(超声、涡旋、离心、过滤)及后处理技术(冷冻干燥后重悬),将 PMs 或不同组分从采样膜高效提取到悬浮液中,用于细胞染毒实验。细胞毒性检测方法包括比色法(如 MTT、CCK-8、LDH)、流

式细胞术及实时细胞分析技术等, 各方法在灵敏度、操作复杂性及成本上存在差异。比色法操作简便、耗时较短且灵敏度高, 是目前检测PM_{2.5}细胞毒性最常用的方法。

然而, 现有研究仍存在不足: (1)对PM_{2.5}中新污染物的细胞毒性及其毒理机制的研究相对不足; (2)PM_{2.5}组分提取技术亟待优化, 需要开发更高效的提取方法, 并应用更灵敏、实时的细胞毒性检测技术; (3)现有实验模型多采用急性高剂量暴露模式, 难以模拟真实环境中慢性低剂量暴露的累积生物效应, 应使用更接近真实暴露的模型进行毒性测定; (4)体外细胞模型与真实人体暴露存在差异, 人体是由多种细胞组织构成的复杂系统, 而单细胞模型无法模拟这些过程。未来应思考如何降低或量化两者毒性结果差异, 使体外细胞模型得到的毒性数据更具科学性。

参考文献:

- [1] Guo H, Gu X F, Ma G X, Shi S Y, Wang W N, Zuo X, Zhang X C. *Sci. Rep.*, **2019**, 9(1): 15201.
- [2] Shen Y W, Zhao C X, Zhao H, Dong S F, Guo Q, Xie J J, Lv M L, Yuan C G. *J. Environ. Sci.*, **2024**, 138: 439–449.
- [3] Manisalidis I, Stavropoulou E, Stavropoulos A, Bezirtzoglou E. *Front. Public Health*, **2020**, 8: 14.
- [4] Alexeeff S E, Liao N O S, Liu X, Van den Eeden S K, Sidney S. *J. Am. Heart Assoc.*, **2021**, 10(1): 016890.
- [5] Wang T H, Huang K Y, Chen C C, Chang Y H, Chen H Y, Hsueh C, Liu Y T, Yang S C, Yang P C, Chen C Y. *EMBO Mol. Med.*, **2023**, 15(6): e17014.
- [6] Lu T T, Qin P, Xue H M, Feng Z, Luo X P, Zheng M Z. *J. Instrum. Anal.* (鲁婷婷, 秦鹏, 薛慧铭, 冯真, 罗旭萍, 郑梅竹. 分析测试学报), **2024**, 43(8): 1294–1300.
- [7] Zuo P J, Huang Y M, Li X Y, Li L Q, Lu D W, Liu Q, Jiang G B. *J. Instrum. Anal.* (左培杰, 黄俞铭, 李翔宇, 李林谦, 陆达伟, 刘倩, 汪桂斌. 分析测试学报), **2024**, 43(3): 501–510.
- [8] Li S Q, Zhou R X, Wu W B, Luan M X, Li X H, Liu C, Zhang L M, Liu Y M, Tan F J, Han X L, Wang Q, Tan J F, Zou Y J, Yu L, Li W W. *Int. Immunopharmacol.*, **2025**, 161: 115073.
- [9] Xie J J, Yuan C G, Xie J, Shen Y W, He K Q, Zhang K G. *Environ. Pollut.*, **2019**, 252: 336–343.
- [10] Xie J J, Yuan C G, Xie J, Niu X D, He A E. *Ecotox. Environ. Safe.*, **2020**, 192: 110249.
- [11] Xie J J, Yuan C G, Xie J, Niu X D, Zhang X R, Zhang K G, Xu P Y, Ma X Y, Lv X B. *Environ. Pollut.*, **2020**, 259: 113881.
- [12] Shen Y W, Zhao H, Zhao C X, Dong S F, He K Q, Xie J J, Lv M L, Yuan C G. *J. Cleaner Prod.*, **2023**, 408: 137165.
- [13] Tosca E M, Ronchi D, Facciolo D, Magni P. *Biomedicines*, **2023**, 11(4): 1058.
- [14] Billet S, Landkocz Y, Martin P J, Verdin A, Ledoux F, Lepers C, André V, Cazier F, Sichel F, Shirali P, Gosset P, Courcot D. *J. Environ. Sci.*, **2018**, 71: 168–178.
- [15] Xie J, Niu X D, Xie J J, He K Q, Shi M D, Yu S J, Yuan C G, Liu J F. *J. Environ. Sci.*, **2021**, 108: 1–7.
- [16] Xie J J, Yuan C G, Shen Y W, Xie J, He K Q, Zhu H T, Zhang K G. *Ecotox. Environ. Safe.*, **2019**, 169: 487–495.
- [17] Shen Y W, Zhao C X, Zhao H, Dong S F, Guo Q, Xie J J, Lu M L, Yuan C G. *J. Environ. Sci.*, **2024**, 138: 439–449.
- [18] He A E, Xie J J, Yuan C G. *Prog. Chem.* (何安恩, 解皎皎, 苑春刚. 化学进展), **2021**, 33(9): 1627–1647.
- [19] Shen Y W, Zhao C X, Zhao H, Dong S F, Xie J J, Lv M L, Yuan C G. *Environ. Pollut.*, **2023**, 328: 121600.
- [20] Shen Y W, Zhao H, Zhao C X, Dong S F, Cao Y M, Xie J J, Lyu M L, Yuan C G. *Chem. Res. Chin. Univ.*, **2023**, 39(3): 465–471.
- [21] Xie J J, Yuan C G, Xie J, Shen Y W, Zha D W, Zhang K G, Zhu H T. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **2019**, 26(30): 30826–30835.
- [22] Xie J J, Li M Y, Yuan C G, Fu Y R, Long Y X, Deng S. *Environ. Toxicol. Chem.*, **2025**, 44(10): 2996–3003.
- [23] Chen W K, Ge P X, Lu Z Y, Liu X M, Cao M Y, Yan Z S, Chen M D. *Environ. Res.*, **2024**, 248: 118283.
- [24] Chen Y, Luo X S, Zhao Z, Chen Q, Wu D, Sun X, Wu L C, Jin L. *Ecotox. Environ. Safe.*, **2018**, 165: 505–509.
- [25] Li H H, Zhao Z, Luo X S, Fang G D, Zhang D, Pang Y T, Huang W J, Mehmood T, Tang M W. *Ecotox. Environ. Safe.*, **2022**, 234: 113356.
- [26] Zhou Q H, Chen J Y, Zhang J F, Zhou F F, Zhao J J, Wei X Z, Zheng K Y, Wu J, Li B J, Pan B J. *Environ. Pollut.*, **2022**, 292: 118349.
- [27] Das A, Habib G, Vivekanandan P, Kumar A. *Chemosphere*, **2021**, 262: 128305.
- [28] Zhang D, Li H H, Luo X S, Huang W J, Pang Y T, Yang J S, Tang M W, Mehmood T, Zhao Z. *Process Saf. Environ.*, **2022**, 162: 859–866.
- [29] Wang T, Rovira J, Sierra J, Blanco J, Chen S J, Mai B X, Schuhmacher M, Domingo J L. *Environ. Res.*, **2021**, 196: 110953.
- [30] Soca-Chafre G, Avila-Vásquez H, Rueda-Romero C, Huerta-García E, Márquez-Ramírez S G, Ramos-Godínez P, López-Marure R, Alfaro-Moreno E, Montiel-Dávalos A. *Environ. Res.*, **2021**, 198: 111242.

- [31] Jan R, Roy R, Bhor R, Pai K, Satsangi P G. *Environ. Pollut.*, **2020**, 261: 113724.
- [32] Wei Y Q, Chen Y, Hong Y W, Chen J S, Li H B, Li H H, Yao X W, Mehmood T, Feng X Y, Luo X S. *Toxicol. in Vitro*, **2024**, 98: 105828.
- [33] Ma H M, Chen W J, Zhang Q Y, Wan C, Mo Y Z, Liu F, Dong G H, Zeng X W, Chen D H, Yu Z Q, Li J, Zhang G. *Environ. Int.*, **2023**, 173: 107820.
- [34] Sanchez-Soberon F, Cuykx M, Serra N, Linares V, Belles M, Covaci A, Schuhmacher M. *Chemosphere*, **2018**, 209: 137–146.
- [35] Barzgar F, Sadeghi-Mohammadi S, Aftabi Y, Zarredar H, Shakerkhatibi M, Sarbakhsh P, Gholampour A. *Sci. Total Environ.*, **2023**, 877: 162726.
- [36] Zou Y J, Jin C Y, Su Y, Li J R, Zhu B S. *Environ. Pollut.*, **2016**, 212: 627–635.
- [37] Liu X, Ge P, Lu Z, Cao M, Chen W, Yan Z, Chen M, Wang J. *Chemosphere*, **2023**, 316: 137672.
- [38] Chen Q, Luo X S, Chen Y, Zhao Z, Hong Y W, Pang Y T, Huang W J, Wang Y, Jin L. *Chemosphere*, **2019**, 230: 424–431.
- [39] Rönkkö T J, Jalava P I, Happonen M S, Kasurinen S, Sippula O, Leskinen A, Koponen H, Kuuspallo K, Ruusunen J, Väisänen O, Hao L Q, Ruuskanen A, Orasche J, Fang D, Zhang L, Lehtinen K E J, Zhao Y, Gu C, Wang Q G, Jokiniemi J, Komppula M, Hirvonen M R. *Sci. Total Environ.*, **2018**, 639: 1290–1310.
- [40] Sun J, Niu X Y, Zhang B, Zhang L M, Yu J J, He K, Zhang T, Wang Q Y, Xu H M, Cao J J, Shen Z X. *J. Environ. Manage.*, **2022**, 320: 115822.
- [41] Pino J S, Alvarado P N, Larrea A M, Rojas W, Gomez-Lopera N. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **2025**, 114: 104638.
- [42] Sun J, Yang J, Ho S S H, Peng Z Z, Niu X Y, Qu L L, Lui K H, Guo H, Ho K F. *Atmos. Environ.*, **2024**, 337: 120779.
- [43] Sun J, Ho S S H, Niu X Y, Xu H M, Qu L L, Shen Z X, Cao J J, Chuang H C, Ho K F. *Sci. Total Environ.*, **2022**, 823: 153717.
- [44] Room S A, Chen P J, Chen Z Y, Shih Y J, Pan S Y, Hsu Y C, Hsiao T, Ting Y C, Chou C C K, Wu C, Chi K H. *Environ. Res.*, **2025**, 279: 121747.
- [45] Wu D, Cheng A Y, Shao Y K, Huo Y Q, Cai D M, Wang Q, Ding X, Liu A L, Huang C, Wang S B, Zhang H, Chen Y J, Chen J M, Li Q. *Environ. Sci. Technol. Lett.*, **2022**, 9(4): 280–285.
- [46] Zeng Y, Ma H M, Zhang Q Y, Tao L, Wang T, Wan C, Chen S J, Mai B X. *Environ. Int.*, **2023**, 179: 108159.
- [47] Jia J B, Yuan X R, Peng X W, Yan B. *Ecotox. Environ. Safe.*, **2019**, 172: 152–158.
- [48] Liu G H, Yan X L, Wang S Q, Yu Q H, Jia J B, Yan B. *Environ. Sci. Technol.*, **2021**, 55(9): 6128–6139.
- [49] Niu X Y, Liu X Y, Zhang B, Zhang Q, Xu H M, Zhang H A, Sun J, Ho K F, Chuang H C, Shen Z X, Cao J J. *Sci. Total Environ.*, **2023**, 866: 161332.
- [50] Chen Y C, Zhang L, Wu Y, Huang W X, Luo Z H, Li Y J, Qi Y, Liu X L, Shen G F, Liu S J, Tao S. *Environ. Sci. Technol.*, **2024**, 58(40): 17786–17796.
- [51] Wang Y X, Puthussery J V, Yu H R, Verma V. *Sci. Total Environ.*, **2020**, 736: 139511.
- [52] Chen Q, Luo X S, Chen Y, Zhao Z, Hong Y, Pang Y, Huang W, Wang Y, Jin L. *Chemosphere*, **2019**, 230: 424–431.
- [53] Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. *Acta Histochem.*, **2018**, 120(4): 303–311.
- [54] Handali S, Rezaei M. *J. Controlled Release*, **2020**, 320: 404–411.
- [55] Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2011**, 10(3): 221–237.
- [56] Skrzydlewski P, Twaruzek M, Grajewski J. *Toxins*, **2022**, 14(4): 244.
- [57] Cai L, Qin X J, Xu Z H, Song Y Y, Jiang H J, Wu Y, Ruan H J, Chen J. *ACS Omega*, **2019**, 4(7): 12036–12042.
- [58] Tait B D. *Front. Immunol.*, **2016**, 7: 570.
- [59] Rozanc J, Finsgar M, Maver U. *Analyst*, **2021**, 146(16): 4985–5007.
- [60] Dong H, Zheng L L, Duan X X, Zhao W, Chen J M, Liu S X, Sui G D. *Sci. Total Environ.*, **2019**, 677: 108–119.
- [61] Xia Y, Zhang X L, Sun D J, Gao Y M, Zhang X E, Wang L, Cai Q J, Wang Q H, Sun J. *Part. Fibre Toxicol.*, **2021**, 18(1): 1–23.
- [62] Zhu J, Wang X B, Xu X, Abassi Y A. *J. Immunol. Methods*, **2006**, 309(1/2): 25–33.
- [63] Albulescu L, Suciu A, Neagu M, Tanase C, Pop S. *Antioxidants*, **2024**, 13(12): 1435.

(责任编辑: 盛文彦)