

文章编号: 1000-8020(2014)03-0382-05

·论著·

## 人肺癌 A549 细胞直接暴露可吸入物质体外试验 方法的建立及应用

鱼涛 刘黎 肖经纬 李斌<sup>1</sup>

中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所 北京 100050

**摘要:**目的 建立人肺癌 A549 细胞直接暴露可吸入物质体外试验方法并进行初步的应用。方法 将二氧化氮气体用洁净空气稀释后分别配制成 5.1、10.7、15.0、20.7 mg/m<sup>3</sup>, 在多孔膜上生长的 A549 细胞放置在水平扩散染毒仓内, 通过气液界面技术 (ALI) 暴露于不同浓度的二氧化氮气体, 15 ml/min, 37 °C 染毒 1 h, 利用 MTT 和 NUR 试验检测细胞毒性; 采集不同工况下的汽油发电机尾气, 10 ml/min, 37 °C 染毒 A549 细胞 15 min, 利用 CCK-8 和 MTT 试验检测细胞毒性。结果 细胞存活率随着 NO<sub>2</sub> 气体浓度的升高 (5.1 ~ 20.7 mg/m<sup>3</sup>) 显著降低 ( $P < 0.05$ ), 并且呈剂量-效应关系 (MTT 拟合曲线:  $y_{\text{MTT}} = 0.989 - 0.021x_{\text{NO}_2}$   $R^2 = 0.84$ ,  $P < 0.01$ ; NUR 拟合曲线:  $y_{\text{NUR}} = 1.032 - 0.026x_{\text{NO}_2}$   $R^2 = 0.88$ ,  $P < 0.01$ )。怠速 (冷启动)、53% 和 100% 负荷下, A549 细胞 MTT 和 CCK-8 存活率显著低于空气暴露组 ( $P < 0.05$ )。结论 体外细胞直接暴露可吸入物质方法可以应用于有害物质的体外吸入毒性研究, 对工业和环境场所中的有害物质的毒性评价提供了新的技术和方法。

**关键词:** 人肺癌 A549 细胞 气液界面技术 可吸入物质

中图分类号: R734.2 R730.231 R994.6

文献标志码: A

## Establishment and application of an *in vitro* model for dynamic direct exposure of lung epithelial cells (A549) to airborne compounds

YU Tao, LIU Li, XIAO Jingwei, LI Bin

National Institute for Occupational Health and Poison Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

**Abstract: Objective** To establish and apply a dynamic *in vitro* model for direct exposure of human cells to gaseous contaminants to investigate the cellular responses to airborne chemical exposures. **Methods** Nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) was selected as a model gas compound. Standard test atmospheres were generated (5.1 - 20.7 mg/m<sup>3</sup>), using clean air dilution method. A549 pulmonary type II-like epithelial cell lines and skin fibroblasts were grown on porous membranes. Human cells on transwell inserts were placed in horizontal diffusion chambers and exposed to various airborne concentrations of NO<sub>2</sub> directly at the air-liquid interface for 1 h at 37 °C, 15ml/min. The gasoline exhaust at different load (idle with cold start, 50% and 100% load) collected in Tedlar air bag directly exposed A549 cell for 15min at 37 °C, 10ml/min. Cytotoxicity of the test gas was investigated using the MTT, NRU (neutral red uptake) and CCK-8 assays. **Results** Dose-dependent effects of NO<sub>2</sub> were observed in human cells tested which resulted in a

基金项目: 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所青年基金; 环保公益性行业科研专项 (No. 201109038)

作者简介: 鱼涛 男 硕士 助理研究员, E-mail: yutao252@126.com

<sup>1</sup> 通信作者: 李斌 男 研究员 研究方向: 神经毒理学, E-mail: binli6511@hotmail.com

significant reduction of cell viability at different concentrations of  $\text{NO}_2$  ( MTT estimated curve:  $y_{\text{MTT}} = 0.989 - 0.021x_{\text{NO}_2}$   $R^2 = 0.84$   $P < 0.01$ ; NUR estimated curve:  $y_{\text{NUR}} = 1.032 - 0.026x_{\text{NO}_2}$   $R^2 = 0.88$   $P < 0.01$  ). Gasoline exhaust exposure at different load resulted in a decreased cell viability ( significantly CCK-8 and MTT levels reduction than air exposure group) . **Conclusion** The dynamic direct exposure method can be used for *in vitro* inhalational and dermal toxicity studies and potentially as a new technology for biomonitoring of airborne contaminants in future occupational and environmental toxicity assessments.

**Key words:** A549 cell , air-liquid interface , airborne compounds

对于可吸入物质传统的毒理学评价方法是应用动物进行整体或口鼻式吸入染毒,随着 OECD 检测方法和 GHS 化学品分类标签中对于实验动物 3R 的倡导,以及人肺细胞体外染毒在呼吸系统中毒机制研究中的优势, NTP( 美国国家毒理学规划署) 和 ECVAM( 欧洲替代方法验证中心) 均提出建立可吸入物质体外试验方法对于吸入毒理学研究的发展具有重要意义<sup>[1]</sup>。

目前人肺细胞体外吸入染毒主要有以下几种方法<sup>[2]</sup>: ( 1) 可吸入物质通过溶剂溶解后染毒细胞; ( 2) 滤膜抽提环境中的可吸入颗粒物,用溶剂溶解或悬浮后染毒细胞; ( 3) 在冲击管或真空管中将气体通入处于半浸润的细胞; ( 4) 通过摇床或翻转瓶的转动,气态物质间断地染毒细胞。

以上 4 种方法虽然都能够一定程度的达到体外染毒细胞的目的,但仍有很多局限性,例如,方法 1 和 2 中对于溶解度低或难以溶解的物质不能应用,忽视了可吸入物质的粒径分布和溶剂的使用对于物质颗粒理化特性的改变;方法 3 和 4 仅适用于气态物质,人肺细胞悬浮于培养液中,尽管可以让气态物质浸润细胞,但接触面积较小和暴露时间不持续,尚不能解决人肺细胞与可吸入物质直接暴露时培养基在染毒过程中的干扰问题。

近年来,随着多孔膜培养细胞技术的发展,推动了人肺细胞直接暴露可吸入物质体外试验方法的可行性。多孔膜细胞培养技术可直接将人肺细胞暴露于可吸入物质,避免了细胞培养液对可吸入物质染毒过程的干扰,同时又能使可吸入物质与细胞顶部接触面积的最大化,而且对气态、液态和固态气溶胶均适合<sup>[2-6]</sup>( 图 1)。

本研究利用多孔膜细胞培养技术,建立动式人肺细胞直接暴露可吸入物质体外试验方法。同时并利用此技术,选用可引起人肺泡上皮细胞损伤<sup>[7]</sup>的二氧化氮气体染毒 A549 细胞,利用 CCK-8 和 NUR 方法进行该试验体系的验证。同时,采集不同工况下汽油发电机的尾气染毒 A549 细胞,

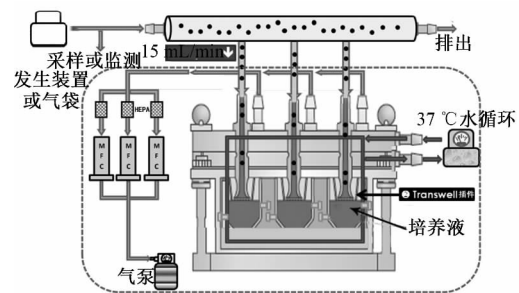


图 1 动式人肺细胞直接暴露可吸入物质体外技术  
Figure 1 Dynamic direct exposure of human cells at the air-liquid interface

用 MTT 和 CCK-8 试验检测其细胞毒性效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 A549 细胞的培养

A549 购买于国家细胞资源共享平台( 中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心保存株 3111C0001CCC000002) ,用无菌级 25  $\text{cm}^2$  细胞培养瓶( Corning) ,USA Gibco1640 培养基和 HyClone 10% 胎牛血清和 1% ( V/V) 抗生素( 200  $\text{mmol/L}$  L-谷氨酰胺,10 000 U/ml 青霉素和 10  $\text{mg/ml}$  链霉素) 进行培养。细胞培养箱中 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  孵育。用胰酶( Trypsin/EDTA, Gibco USA) 溶解于 PBS 中,消化细胞后,加入培养液稀释,以 1:2 ~ 1:3 传代培养。细胞活性用 0.4% 台盼蓝( Trypan blue, Sigma USA) 染色,光学显微镜观察。

### 1.2 染毒物质

94.3  $\text{mg/m}^3$  ( 50 ppm) 标准  $\text{NO}_2$  气体由北京海普气体有限公司提供,合格证号: 2012060711215796-1-1,平衡于合成空气中。

泽藤本田( SHX2000) 变频发电机,排量 98cc,额定功率 1.5 kW,发动机型号 HONDA GX100,使用中石化市售 93# 汽油,分别在怠速( 冷启动) 、53% 和 100% 负荷下,将汽油尾气降温,温度控制在 ( 23 ~ 37)  $^{\circ}\text{C}$ ,采集尾气于 10 L Tedlar 气

袋中,染毒前现用现采。

### 1.3 细胞染毒

A549 细胞生长在 Corning Transwell 多孔膜上,此插入式培养皿中的每个多孔膜孔径为 0.4  $\mu\text{m}$ ,直径为 24 mm,可提供面积为 4.67  $\text{cm}^2$  的细胞生长空间,每个 Tanswell 培养板由 6 孔培养插件组成。

用含 0.01 mol/L HEPES 的 Gibco 1640 培养基加入 Corning Tanswell 培养插件的顶部和底部,作为 A549 细胞转膜前的起始平衡时间,分别各加 0.5 ml 和 2 ml 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。1 h 后用移液器移除顶部培养液,加入新鲜的含  $20 \times 10^4 \sim 40 \times 10^4$  个/ml 细胞悬液 0.5 ml (含 10% 胎牛血清和 1% 抗体) 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 h。

移液器清除顶部和底部培养液后,用 HBSS 液清洗顶部和底部 (0.5 ml 和 2 ml) 一次。将 Corning tanswell 插件取出,放入细胞直接暴露可吸入物质体外染毒装置 (天津合普,HOPE-MED8170A) 的染毒舱内,密闭。

将 94.3  $\text{mg}/\text{m}^3$  标准  $\text{NO}_2$  气体用洁净空气 (经 HEPA 过滤) 直接稀释的方法配成不同染毒浓度的气体。将分别配制成 5.1、10.7、15.0 及 20.7  $\text{mg}/\text{m}^3$  的  $\text{NO}_2$  气体充入 50 L Tedlar 采气袋中,用盐酸萘乙二胺比色法测定实际染毒浓度,以 15 ml/min 流速染毒 A549 细胞 1 h。所有的连接软管均由特氟龙制成,与  $\text{NO}_2$  气体无化学反应。染毒期间染毒仓通过温控系统保持在 37  $^{\circ}\text{C}$ 。染毒结束,取出 Corning tanswell 插件,放回到 6 孔培养皿中,2 ml 新鲜的含 10% 胎牛血清的 1640 培养液加入到培养皿底部,为下一步 CCK-8 和 NUR 试验做准备。

### 1.4 中性红 (NUR) 比色法

染毒后每孔加入 1.0 ml 中性红活染工作液,继续孵育 2 h 后,弃培养液,并以 pH7.4  $0.2 \text{ mol/L}$  PBS 洗涤细胞 3 次;最后在每个培养孔中均加入 1 ml 0.05 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50% 乙醇溶液,并置微型振荡器上振荡 5 min,使细胞中的中性红全部溶出,转移到 96 孔培养板上,置酶标仪 (Biotek Epoch) 测吸光度值,选择检测波长为 550 nm,以三个平行孔的平均值为实测 A 值。

### 1.5 噻唑蓝比色法 (MTT) 试验

使用 MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (Solarbio M1020) 检测细胞存活数量。将 MTT 溶液用培养液按 1:9 体积进行稀释,每孔加入 1 ml 稀释液,继续培养 4 h,弃 MTT 液,每孔加入 1 ml Formazan 溶解液,置摇床上低速震荡 10 min,使结晶物充分溶解。酶标仪 (Biotek Epoch) 490 nm 处

检测各孔的吸光度值。

### 1.6 CCK-8 试验

CCK 法实际为 MTT 法的替代方法,是一种基于水溶性四唑盐 (WST) 的广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测试剂盒。将 CCK 试剂盒 (北京泛博生物化学有限公司) 中的 CCK 溶液用培养液按 1:9 体积进行稀释,每孔加入 1 ml 稀释液,继续培养 1.5 h 后,将上清液 4 等份转移到 96 孔培养板中,用酶标仪 (Biotek Epoch) 490 nm 处检测各孔的吸光度值 A,孔平均吸光度值为实测 A 值。

### 1.7 汽油尾气中常规成分检测和颗粒物特征分析

用 CO 和  $\text{CO}_2$  快速检测管 (KOMYO RIKAGAKU KOGYO K. K.); 用盐酸萘乙二胺分光光度法检测汽油尾气中 NO 和  $\text{NO}_2$  的浓度;用挥发性有毒气体分析仪 (Thermo TVA-1000B) FID 检测器检测碳氢化合物浓度;粒径谱仪 (TSI 3321 USA) 分析颗粒物的质量、表面积和颗粒物浓度。

### 1.8 统计学分析

用 SPSS 16.0 统计软件对实验数据进行分析。先进行方差齐性检验,如果方差齐进行单因素方差分析和组间两两比较,并对  $\text{NO}_2$  气体染毒 A549 细胞后检测的 MTT 和 NUR 指标进行曲线拟合。若数据方差不齐则进行对数转换。

## 2 结果

### 2.1 MTT 和 NUR 试验

由表 1 可见,细胞存活率随着  $\text{NO}_2$  气体浓度的升高显著降低 ( $P < 0.05$ ),并且呈剂量-效应关系 (MTT 拟合曲线:  $y_{\text{MTT}} = 0.989 - 0.021x_{\text{NO}_2}$ ,  $R^2 = 0.84$ ,  $P < 0.01$ ; NUR 拟合曲线:  $y_{\text{NUR}} = 1.032 - 0.026x_{\text{NO}_2}$ ,  $R^2 = 0.88$ ,  $P < 0.01$ )。

表 1 人肺癌 A549 细胞暴露不同浓度  $\text{NO}_2$  气体后细胞存活率的比较

Table 1 Cytotoxic effects of  $\text{NO}_2$  in A549 cells with two *in vitro* assays ( $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	$\text{NO}_2 / (\text{mg}/\text{m}^3)$	MTT	NUR
空气暴露	0	0.97 $\pm$ 0.05	0.99 $\pm$ 0.04
染毒组	5.1	0.88 $\pm$ 0.05 <sup>(1)</sup>	0.92 $\pm$ 0.07 <sup>(1)</sup>
	10.6	0.81 $\pm$ 0.07 <sup>(1)</sup>	0.84 $\pm$ 0.07 <sup>(1)</sup>
	15.4	0.66 $\pm$ 0.08 <sup>(1)</sup>	0.58 $\pm$ 0.03 <sup>(1)</sup>
	20.7	0.54 $\pm$ 0.09 <sup>(1)</sup>	0.48 $\pm$ 0.04 <sup>(1)</sup>

注: (1) 与空气暴露组比较  $P < 0.05$

### 2.2 不同工况下汽油尾气常规成分含量

由表 2 可见,53% 负荷和 100% 负荷工况下汽油尾气中 CO、NO、NO<sub>2</sub> 浓度均高于冷启动怠速工况 ( $P < 0.05$ ),而冷启动怠速时(0% 负荷)汽油尾气中总碳氢化合物(THC) 浓度最高 ( $P < 0.05$ ),尚未发现不同工况状态下汽油尾气中 CO<sub>2</sub> 浓度有统计学差异。

### 2.3 汽油尾气中 0.5 ~ 10 μm 颗粒物空气动力学粒径分布特征分析

由表 3 可见,冷启动怠速状态下颗粒物的表

面积浓度、质量浓度和数量浓度均明显高于 53% 和全负荷状态;53% 负荷下的汽油尾气表面积浓度、质量浓度和数量浓度最低。

### 2.4 CCK-8 和 MTT 试验

由图 2 可见,MTT 试验中冷启动、53% 负荷和 100% 负荷工况下 A549 细胞存活率(74.3%、58.8% 和 63.9%) 显著低于空气暴露组(90.6%,  $P < 0.05$ );CCK-8 试验中冷启动、53% 负荷和 100% 负荷工况下细胞存活率(64%、58% 和 66%) 显著低于空气暴露组(92%  $P < 0.05$ )。

表 2 不同工况下汽油尾气中常规成分的浓度

Table 2 Gasoline exhaust composition at different load ( $n = 5 \bar{x} \pm s$ )

负荷 / %	CO / %	CO <sub>2</sub> / %	NO / (mg/m <sup>3</sup> )	NO <sub>2</sub> / (mg/m <sup>3</sup> )	THC / ppm
0 <sup>(1)</sup>	4.0 ± 0.3	17.0 ± 1.2	131.3 ± 10.9	6.6 ± 0.8	280.0 ± 27.0
53	7.5 ± 0.2 <sup>(2)</sup>	18.5 ± 2.1	187.5 ± 7.5 <sup>(2)</sup>	9.2 ± 1.6 <sup>(2)</sup>	198.0 ± 35.0 <sup>(2)</sup>
100	9.0 ± 1.1 <sup>(2)</sup>	19.5 ± 3.6	200.9 ± 12.1 <sup>(2)</sup>	8.2 ± 0.7 <sup>(2)</sup>	158.0 ± 42.0 <sup>(2)</sup>

注: (1) 冷启动; (2) 与 0% 负荷比较  $P < 0.05$

表 3 汽油尾气中颗粒物表面积浓度、颗粒物数量和质量浓度

Table 3 Gasoline exhaust particle size distribution with respect to number, surface distributions and mass distributions

负荷 / %	表面积浓度 / (μm <sup>2</sup> / cm <sup>3</sup> )			数量浓度 / (颗粒数 / cm <sup>3</sup> )			粒径 / (μg / m <sup>3</sup> )		
	0.5 ~ 1.0 μm	0.5 ~ 2.5 μm	0.5 ~ 10 μm	0.5 ~ 1.0 μm	0.5 ~ 2.5 μm	0.5 ~ 10 μm	0.5 ~ 1.0 μm	0.5 ~ 2.5 μm	0.5 ~ 10 μm
0 <sup>(1)</sup>	4803.4	28 493.4	324 963.4	2 307.2	4 950.3	8 083.6	0.7	8.0	339.3
53	476.5	2 705.9	26 018.0	232.1	485.5	722.4	0.1	0.7	27.6
100	1576.3	9 132.0	108 222.0	771.0	1 609.4	2 683.7	0.2	2.6	111.5

注: (1) 冷启动

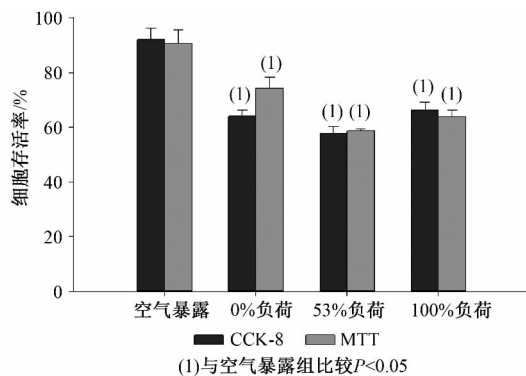


图 2 不同工况的汽油尾气对 A549 细胞存活率的影响  
Figure 2 Cytotoxic effects of gasoline exhaust in A549 cells with two in vitro assays

### 3 讨论

二氧化氮气体是一种氧化性气体,广泛存在于室内和环境大气中,机动车尾气、发电机尾气、电焊行业、电镀行业、硝酸盐的生产和饲料青贮早期过程中都会产生二氧化氮。KOEHLER 等<sup>[7]</sup>和 TU<sup>[8]</sup>等报道,由于二氧化氮气体的低溶解性和高活性,其对呼吸道深部有强烈的刺激作用易侵入

呼吸道深部的细支气管和肺泡,作用于 I 型和 II 型肺泡皮细胞,并缓慢地溶解于肺泡细胞表面的水分中,形成亚硝酸和硝酸。亚硝酸和硝酸对组织产生强烈的刺激和腐蚀作用,并使毛细血管通透性增加,而逐步形成肺水肿,严重者可形成肺纤维化。正是由于 NO<sub>2</sub> 气体的广泛存在和对呼吸系统的毒性作用,本研究选取其作为人肺癌 A549 细胞直接暴露可吸入物质体外试验方法建立的暴露物质。A549 细胞,是一种人肺腺癌细胞系,具有稳定的人 II 型肺泡上皮细胞的特点,常被用作人 II 型肺泡上皮细胞的代表试验细胞<sup>[4-7]</sup>。目前大多数 NO<sub>2</sub> 气体毒性的体外试验研究未使用气液界面( ALI) 技术,也很少使用人体组织细胞。本研究利用 ALI 技术发现 20.7 mg/m<sup>3</sup> 的 NO<sub>2</sub> 暴露 1h,可致 A549 细胞半数死亡,并且各剂量组间有明显的剂量-反应关系,结果与国外报道相一致<sup>[9]</sup>。此外,本研究还发现,洁净空气暴露组在 5 ~ 25ml/min 的流量范围内暴露 1 h, A549 细胞存活率与对照组间未见显著统计学差异,SAUER 等<sup>[10]</sup>和 SWITALLA 等<sup>[11]</sup>也通过研究认为流量小

于 25 ml/min 对于细胞的形态和活力未见改变,微核试验中双核细胞数量也未见显著的改变,故本研究选取 15ml/min 作为 NO<sub>2</sub> 气体染毒流量,以排除过大流量气流对细胞产生机械性的损伤,干扰试验结果。

随着工业的发展,机动车数量急剧增多,汽车尾气对环境造成的污染日益严重,对人类健康也构成了巨大威胁,汽车尾气不仅可以导致非致癌性疾病发生率升高,而且还具有明显的遗传毒性,被认为是肺癌发生的重要因素<sup>[12-13]</sup>。目前在汽油尾气的体外毒性试验研究中,多数研究还是其提取物作为研究对象<sup>[14-15]</sup>。本研究认为提取的过程就改变了混合物质的物理化学性质,并且提取物毒性作用大小与细胞培养液的溶解度有关,故这样的结果只能代表其中的部分物质的毒性作用。此外,汽油尾气中有大量的颗粒物,其毒性作用大小与颗粒物数量浓度、表面积浓度和质量浓度都密切相关。本研究检测了不同工况状态下发电机的汽油尾气中主要有害成分并进行了颗粒物的空气动力学粒径分布特征分析,将汽油尾气作为一个整体混合物,而并非汽油尾气提取物,不仅同时考虑了汽油尾气中各种有机物、无机物 and 不同粒径的颗粒物对细胞的毒性作用,而且还考虑了颗粒物、有机物和无机物间之间彼此相互依赖的交互作用,利用 ALI 技术染毒细胞,其细胞毒性是汽油尾气中各种有害物质对 A549 细胞联合作用的结果。

进一步分析不同工况下汽油尾气中常规成分的浓度和,发现 53% 负荷和 100% 负荷工况下汽油尾气中 CO、NO 和 NO<sub>2</sub> 浓度均高于冷启动怠速工况,尽管冷启动怠速时(0% 负荷),汽油尾气中总碳氢化合物浓度最高,但由于 CO 和氮氧化物(NO 和 NO<sub>2</sub>) 在整个汽油尾气中所含比例高于碳氢化合物,而 CO 对人体危害主要是通过肺进入血液与血红蛋白结合对人体产生危害,肺脏并不是其靶器官。此外,尽管汽油尾气中 0.5 ~ 10 μm 颗粒物空气动力学粒径分布特征分析发现,冷启动怠速状态下颗粒物的表面积浓度、质量浓度和数量浓度均明显高于 53% 和全负荷状态,但怠速状态下颗粒物的质量浓度为 339.3 μg/m<sup>3</sup>,与 53% 负荷下 NO 和 NO<sub>2</sub> 浓度相比(分别为 187.5 和 9.2 mg/m<sup>3</sup>) 较低,在汽油尾气的主要成分中所占比例较少,故不同工况下汽油尾气对 A549 细胞存活率的差异主要是由于汽油尾气中含量较高的氮氧化物所占比例不同造成的。

体外吸入毒性研究对染毒物质的实时监测

问题目前是国内外学者遇到的困难之一,已经有学者用搅拌棒吸附萃取技术(SBSE)在染毒舱内检测挥发性和半挥发性有机物<sup>[16]</sup>,但对于无挥发性的颗粒物和液体气溶胶,由于染毒舱内气流非常小,目前均是在染毒舱前端分流后进行采样分析<sup>[17]</sup>,故设计在染毒舱内进行合理采样的技术对于体外吸入技术的发展将起到至关重要的影响。

## 参考文献

- [1] ALLEN C B. *In vitro* models for lung toxicology: toxicology of the lung [M]. New York: Taylor Francis, 2006: 107-150.
- [2] BAKAND S, HAYES A. Troubleshooting methods for toxicity testing of airborne chemicals *in vitro* [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2010(6): 76-85.
- [3] BAKAND S, WINDER C, HAYES A, et al. Toxicity assessment of industrial chemicals and airborne contaminants: transition from *in vivo* to *in vitro* test methods: a review [J]. *Inhal Toxicol*, 2005(17): 775-787.
- [4] AUFDERHEIDE M, KNEBEL J W, RITTER D. Novel approaches for studying pulmonary toxicity *in vitro* [J]. *Toxicol Lett*, 2003(140-141): 205-211.
- [5] AUFDERHEIDE M. Direct exposure methods for testing native atmospheres [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2005(57): 213-226.
- [6] BAKAND S, HAYES A, WINDER C, et al. *In vitro* cytotoxicity testing of airborne formaldehyde collected in serum-free culture media [J]. *Toxicol Ind Health*, 2005 21(7-8): 147-154.
- [7] KOEHLER C, GINZKEY C, FRIEHS G, et al. Aspects of nitrogen dioxide toxicity in environmental urban concentrations in human nasal epithelium [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010(245): 219-225.
- [8] TU B, WALLIN A, MOLDEUS P, et al. Cytotoxicity of NO<sub>2</sub> gas to cultured human and murine cells in an inverted monolayer exposure system [J]. *Toxicology*, 1995(96): 7-18.
- [9] BAKAND S, WINDER C, HAYES A. Comparative *in vitro* cytotoxicity assessment of selected gaseous compounds in human alveolar epithelial cells [J]. *Toxicol in vitro*, 2007(21): 1341-1347.
- [10] SAUER U G, VOGEL S, HESS A, et al. *In vivo-in vitro* comparison of acute respiratory tract toxicity using human 3D airway epithelial models and human A549 and murine 3T3 monolayer cell systems [J]. *Toxicol in vitro*, 2013, 27(1): 174-190.

(下转第 404 页)

- [19] COQUETTE A , BERNA N , VANDENBOSCH A , et al. Analysis of interleukin-1 $\alpha$  ( IL-1 $\alpha$  ) and interleukin-8 ( IL-8 ) expression and release in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of *in vivo* skin irritation and/or sensitization [J]. *Toxicol in vitro* ,2003 ,17( 3) : 311-321.
- [20] NUKADA Y , MIYAZAWA M , KOSAKA N , et al. Production of IL-8 in THP-1 cells following contact allergen stimulation via mitogen-activated protein kinase activation or tumor necrosis factor- $\alpha$  production [J]. *J Toxicol Sci* , 2008 , 33 ( 2) : 175-185.
- [21] DOS SANTOS G G , REINDERS J , OUWEHAND K , et al. Progress on the development of human *in vitro* dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* ,2009 ,236( 3) : 372-382.
- [22] SON D , NA Y , CHO W S , et al. Differentiation of skin sensitizers from irritant chemicals by interleukin-1 $\alpha$  and macrophage inflammatory protein-2 in murine keratinocytes [J]. *Toxicol Lett* ,2012.
- [23] MIYAZAWA M , ITO Y , KOSAKA N , et al. Role of TNF- $\alpha$  and extracellular ATP in THP-1 cell activation following allergen exposure [J]. *J Toxicol Sci* ,2008 , 33( 1) : 71-83.

收稿日期: 2013-05-09

( 上接第 381 页)

- [ 9 ] HE Z , WANG X , DENG Y , et al. Epigenetic regulation of Thy-1 gene expression by histone modification is involved in lipopolysaccharide-induced lung fibroblast proliferation [J]. *J Cell Mol Med* , 2013 ,17( 1) : 160-167.
- [10] NG H H , CICCONE D N , MORSHEAD K B , et al. Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2003 ,100( 4) : 1820-1825.
- [11] LEE M Y , KIM M A , KIM H J , et al. Alkylating agent methyl methanesulfonate ( MMS ) induces a wave of global protein hyperacetylation: implications in cancer cell death [J]. *Biochem Biophys Res Commun* ,2007 ,360( 2) : 483-489.
- [12] NOBILI V , SIOTTO M , BEDOGNI G , et al. Levels of serum ceruloplasmin associate with pediatric nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* ,2013 ,56( 4) : 370-375.
- [13] JI Ming , ZHANG Q , YE J , et al. Myostatin induces p300 degradation to silence cyclin D1 expression through the PI3K/PTEN/Akt pathway [J]. *Cell Signal* ,2008 ,20( 8) : 1452-1458.
- [14] LIU Yan , XING Z B , ZHANG J H , et al. Akt kinase targets the association of CBP with histone H3 to regulate the acetylation of lysine K18 [J]. *FEBS Lett* ,2013 ,587( 7) : 847-853.

收稿日期: 2013-10-10

( 上接第 386 页)

- [11] SWITALLA S , KNEBEL J , RITTER D , et al. Effects of acute in vitro exposure of murine precision-cut lung slices to gaseous nitrogen dioxide and ozone in an air-liquid interface ( ALI ) culture [J]. *Toxicol Lett* ,2010 ( 196) : 117-124.
- [12] HANSEN E S. A follow-up study on the mortality of truck drivers [J]. *Am J Ind Med* ,1993 ,23( 5) : 811-821.
- [13] HANSEN J , RASSCHOU-NIESEN O , OLSEN J H. Increased risk of lung cancer among different types of professional drivers in Denmark [J]. *Occup Environ Med* ,1998 ,55( 2) : 115-118.
- [14] ZHANG Zunzhen , CHE Wangjun , LIANG Ying , et al. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity induced by the extracts of methanol and gasoline engine exhausts [J]. *Toxicol in Vitro* ,2007 ( 21) : 1058-1065.
- [15] WESTPHAL G A , KRAHL J , BRÜNING T , et al. Ether oxygenate additives in gasoline reduce toxicity of exhausts [J]. *Toxicology* , 2010 , 268 ( 3) : 198-203.
- [16] KAUR N , CABRAL J L , MORIN A , et al. Headspace stir bar sorptive extraction-gas chromatography/mass spectrometry characterization of the diluted vapor phase of cigarette smoke delivered to an *in vitro* cell exposure chamber [J]. *J Chromatogr A* ,2011 ,1218( 2) : 324-333.
- [17] DAVID T , JASON A. A review of *in vitro* cigarette smoke exposure systems [J]. *Exp Toxicol Pathol* , 2013( 65) : 1183-1193.

收稿日期: 2013-12-06