



Todd Davidson/Brand X/Corbis

更人性、更人道

监测空气污染物的一种新方法

空气中的污染物不仅可以从呼吸道吸入，还能通过皮肤吸收。这两种途径都能引发局部毒性反应或者损害内脏，如肝、肾和大脑。气体或蒸气毒性传统实验中，实验动物暴露于致死或亚致死剂量的化学物中，这种方法因为昂贵、不符合伦理、不人道和费时而一直受到质疑。如今，位于澳大利亚悉尼市的新南威尔士大学（University of New South Wales, UNSW）的研究者们已经找到了一种不需要动物的替代方法，这种方法是利用人体细胞来检测空气毒物暴露的反应。

“离体实验为工业化学品、职业和环境污染以及燃烧产物毒性检测开辟一条新途径。” UNSW 安全科学学院化学安全和应用毒物实验室经理，研究小组负责人 Amanda Hayes 说。“另外，这种方法可以帮助研究人员探索纳米粒子对健康的影响，虽然纳米粒子对人类健康的影响所知甚少，但它们被越来越多地广泛应用到化妆品和药品领域中。” Hayes 说。这个项目为 Hayes 和他的同事 Shahnaz Bakand 和 Chris Winder 赢得了 2006 年澳大利亚尤里卡奖（Eureka Prize），这个奖项用于奖励在澳大利亚自然科学领域作出的杰出贡献。

以细胞为基础模型

在传统的离体实验中，细胞在实验室内在细胞培养液覆盖的培养皿底部生长。被检测的污染物溶解在液态培养液中，充满细胞周围。然而，对于评估因直接接触空气污染物所引起的损害来说，这个模型比较差。

Hayes 和他的同事们通过在 Snapwell™ 可渗聚酯膜上培养人细胞，改进了传统离体实验方法。人细胞的种类，包括肺细胞 A549，肝细胞 HepG2 和皮肤纤维原细胞，这些细胞种类代表着可能受空气毒物侵害的靶器官。一旦细胞黏附在膜上开始旺盛生长，就去除培养液上层，使细胞通过空气-液体交界面能够直接和空气污染物接触。同时，从下面供

应营养物质以确保细胞能够健康生长。

下一步，细胞被分散在培养孔中暴露于空气污染物。然后，用常规的实验室检测方法测量细胞生长和能量代谢的变化。研究者们已经发现通过离体方法测得的毒性，诸如抑制细胞生长所需要的化学物量，与动物实验所得的致死剂量相类似。“离体毒性实验能促进科学、经济以及研究的伦理价值，它在替代动物方面起到非常重要的作用。” Hayes 说。

测试概念

在一系列的实验中，澳大利亚研究小组通过检测甲醛（一种工业化学品，与人类肿瘤相关）；二氧化氮（一种引起炎症、肺水肿和肺炎的肺部刺激物）；火灾燃烧产物包括氰化物、硫化氢和氨；以及二甲苯和甲苯（两种挥发性有机化合物，在印刷、油漆和石油工业中存在）来论证了这种离体技术的可行性。上述任何一种化学物的环境和职业暴露都能引起局部和系统毒性。

在 VOC 研究中，3 类细胞分别用 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 或 30 mL 的二甲苯或甲苯蒸气处理，暴露 1 个小时后，用 MTS 实验（检测生长细胞数量）和 NRU 实验（检测细胞膜稳定性）测量细胞的细胞毒性。所有 3 类细胞中均显示空气中的甲苯和二甲苯抑制了细胞生长，呈剂量-效应关系，并且 MTS 和 NRU 实验均得到了相似的结果。

利用上述结果,研究人员计算了空气的 IC_{50} 值,或者半数阻止细胞生长的化学品浓度。二甲苯对3种细胞的 IC_{50} 值范围为5350至8200 ppm,毒性大约是甲苯的2倍,甲苯的 IC_{50} 值为10500至16600 ppm。上述离体实验得到的值与已经发表的动物急性吸入测得的数据结果一致性非常好。 LC_{50} 值(半数致死量,即让半数实验动物死亡的化学品浓度)是从国立职业安全与健康研究所(NIOSH)化学物质毒性作用登记(Registry of Toxic Effects of Chemical Substances)中老鼠在二甲苯或甲苯中暴露4小时后测定得到的。二甲苯 LC_{50} 值5000 ppm和甲苯 LC_{50} 值13000 ppm与Hayes和她的同事们从人肺、肝和皮肤细胞中计算得到的 IC_{50} 值范围一致。这项结果发表在2006年1月出版的《环境监测杂志》(*Journal of Environmental Monitoring*)上。

发表在2006年8月1日《毒物学来信》(*Toxicology Letters*)上的另一项研究中,研究人员把肺A549细胞暴露在浓度2.5~10 ppm的二氧化氮中。Hayes发现在OSHA允许暴露水平5 ppm时,细胞就有显著的副反应,因此她建议工作场所暴露标准可能需要重新评价。

研究人员把二氧化氮用动态的形式提供,意味着在1个小时的实验期间,二氧化氮浓度保持恒定。“这种精确性对模拟实际生活中的暴露非常重要。”俄勒冈州卫生与科学大学(Oregon Health & Science University)流行病学家William Lambert说。他解释到,例如人们在公交站点候车时,暴露在汽车排放的短暂高浓度的二氧化氮中,或者用煤气灶烹饪膳食期间。相反,传统的实验方法把动物放在实验箱中,让动物在一段总的时间内不停吸入一定浓度的化学品。

发表在2005年8月出版的《毒物学离体实验》(*Toxicology in Vitro*)上的第3项系列实验中,研究人员把3种细胞暴露在11种火灾燃烧最常见的空气污染物中。火灾燃烧过程中释放多种气体和有机蒸气,火灾相关的死亡中80%是由于吸入了毒性物质,这些毒性物质在整个火灾过程期间的变化所知非常有限。被检测的化学物质中,硫酸对3种细胞的毒性最大,而硝酸钠的毒性作用最小。

一些化学品显示对一些器官有特殊作用。例如,甲醛对肝细胞的作用是对肺细胞和皮肤细胞作用的2倍。这一发现显示了检测化学品毒性时采用多种细胞作实验的重要性。研究人员

推断,离体实验可以追踪火灾时毒性物质的演变,评价建筑材料的安全性,以及为防火专业人员提供更多精确的安全性方面的信息。

未来的承诺

研究小组还在继续验证这种方法在现实生活中的有效性。根据Hayes的观点,一旦离体实验的方法被验证,新方法比动物实验相比较费用将会极其低廉,而且速度显著加快,检验的时间在4至24小时。因为检验在96孔平板上操作,所以可以同时马上检测许多种化学品。

约翰霍普金斯大学替代动物实验(CAAT)中心主任Alan Goldberg称这种方法“是高度聚焦、有明确方向、并且是非常好的科学方法。”新方法符合了3R概念,即降低(reduction),精确(refinement)和替代(replacement),3R是科学家们致力于寻找动物实验替代方法的指导原则。“降低”指实验设计用较少的动物,“精确”代表改进方案以减轻动物的痛苦,“替代”倡导完全消除用整体动物作实验。Goldberg说,正在由Hayes和他的后继者们创建之中这种替代方法,承诺减少和可能取消在空气毒物检测中使用动物。

在Hayes验证离体实验有效性后,她计划为环境采样和毒性监测建立一个简便的现场实验。Lambert说:“确实,需要一个离体暴露系统来研究空气污染物对呼吸道细胞的影响。”这种类型的现场实验或许能够帮助世贸中心在9.11袭击后的救援工作。Lambert说:“复杂而独特的烟雾混



气体暴露试验:人细胞生长在成品插入式细胞培养皿中,被放在水平分散的培养孔中检测空气化学品的作用。

合物和热解决产物不能在呼吸道中模拟,而诸如此类的设备能够提供潜在毒性的快速评估。”

把这种方法带到现场有优点,位于新墨西哥Albuquerque的Lovelace呼吸研究所副教授JeanClare Seagrave说,只要离体实验方法对已知暴露的有效性完成验证,即实验的重复性好,并且包括适当的阳性和阴性对照组。

然而,采用上述方法有局限性,包括缺乏培养细胞和免疫系统之间的交互反应或体内的解毒机制。此外,空气中充满了诸如细菌、真菌和病毒生物原,它们可能会沉积在细胞和培养媒介中并增值。如果细胞与微生物而不是与毒物发生反应,或者细胞与毒物反应的基础上再与微生物反应,那么这些污染可能会使结果偏移。尽管如此,Seagrave说:“对于肺和皮肤细胞来说,空气-液体界面暴露较传统的浸没培养系统而言明显更具生理学相关性。”

-Carol Potera

译自 EHP 115:A148-A151 (2007)

参 考 读 物

- Bakand S, Winder C, Khalil C, Hayes A. 2006. A novel *in vitro* exposure technique for toxicity testing of selected volatile organic compounds. *J Environ Monit* 8:100-105.
- Bakand S, Winder C, Khalil C, Hayes A. 2006. An experimental *in vitro* model for dynamic direct exposure of human cells to airborne contaminants. *Toxicol Lett* 165(1):1-10.
- Goldberg AM, Hartung T. 2006. Protecting more than animals. *Sci Am* 294:84-91.
- Lestari F, Hayes AJ, Green AR, Markovic B. 2005. *In vitro* cytotoxicity of selected chemicals commonly produced during fire combustion using human cell lines. *Toxicol In Vitro* 19:653-663.