

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第36卷 第11期

Vol.36 No.11

2015

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



北京大气 PM_{2.5} 与惰性 SiO₂ 的生物毒性比较

刘梦娇¹, 黄艺^{2*}, 文航², 邱国玉¹

(1. 北京大学环境与能源学院, 城市人居环境科学与技术重点实验室, 深圳 518055; 2. 北京大学环境科学与工程学院, 环境模拟与污染控制联合重点实验室, 北京 100871)

摘要: 以惰性 SiO₂ 颗粒作为模式颗粒, 与野外采集 PM_{2.5} 分别作用于模式生物粟酒裂殖酵母菌 (*Schizosaccharomyces pombe*), 旨在通过对比实验确定 PM_{2.5} 致毒的主要因素. 采用紫外分光光度法测定细胞增值率, 环境扫描电镜观察颗粒在细胞表面的附着状态, DHE 荧光染色剂显色法测定细胞 ROS 生成情况, 单细胞凝胶电泳实验检测细胞 DNA 损伤. 结果表明, SiO₂ 颗粒在超微粒尺度 (<60 nm) 下能抑制 *S. pombe* 细胞增殖, 主要是通过附着在细胞表面来改变细胞外壁的通透性, 并不能通过诱导细胞生成 ROS 而造成对细胞的氧化损伤; 而平均粒径较大的 PM_{2.5} 主要是通过诱导细胞生成 ROS 对细胞造成氧化损伤, 同时可损伤 DNA. 结论认为 PM_{2.5} 毒性大小与颗粒物粒径等物理性质并无直接关系.

关键词: SiO₂; PM_{2.5}; 生物毒性; 粒径; 活性氧; 粟酒裂殖酵母菌 (*Schizosaccharomyces pombe*)

中图分类号: X17; X513 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2015)11-3943-09 DOI: 10.13227/j.hjxx.2015.11.002

Comparing Cell Toxicity of *Schizosaccharomyces pombe* Exposure to Airborne PM_{2.5} from Beijing and Inert Particle SiO₂

LIU Meng-jiao¹, HUANG Yi^{2*}, WEN Hang², QIU Guo-yu¹

(1. Key Laboratory for Urban Habitat Environment Science and Technology, School of Environment and Energy, Peking University, Shenzhen 518055, China; 2. State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: To figure out the main factor of PM_{2.5} toxicity to cell, this study compared the cell toxicity of *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), a model organism, exposed to inert ultrafine SiO₂ particles, a model particle, and airborne PM_{2.5} collected from campus of Peking University Beijing China. Using ultraviolet spectrophotometry to measure cell proliferation ratio, and environmental scanning microscope to observe the particle adhesion on the cell surface, and detecting cellular ROS generation with DHE fluorescent dye chromogenic method, and using single cell gel electrophoresis to test cell DNA damage, the experiment results indicated that the ultrafine SiO₂ particles (<60 nm) could inhibit the cell proliferation of *S. pombe*, mainly through adsorbing onto the cell surface to change the permeability of the cell wall; but it could not induce cells to generate ROS to cause the oxidative damage. PM_{2.5}, the average particle size of which was larger than that of SiO₂ particles, could cause oxidative damages to cells mainly by inducing cells to generate ROS, and damage DNA simultaneously. It might illustrate that there was no direct relationship between the toxicity of PM_{2.5} and its physical properties such as the particle size.

Key words: SiO₂; PM_{2.5}; biological toxicity; particle size; ROS; *Schizosaccharomyces pombe*

PM_{2.5} 为大气中空气动力学当量直径 < 2.5 μm 的细颗粒物, 又称为可入肺颗粒物. 虽然 PM_{2.5} 对人体健康的影响受到广泛关注, 但由于成分复杂, 其影响机制并不清楚^[1,2], 各种假设纷争林立. 以物理特征为基础的假说^[3] 认为, 颗粒物的物理性质, 如粒径大小、表面积等, 可能是氧化性损伤机制之一. 而 PM_{2.5} 引起的氧化损伤是其毒性的一种重要的分子机制^[4]. 毒理学研究揭示, PM_{2.5} 是一种载体, 其表面吸附的重金属、水溶性离子、有毒有机物 (如多环芳烃) 等物质是其毒性的主要来源^[5-7]. 综合不同的研究发现, 缺乏单一颗粒变量水平上的生物毒性对比实验, 可能是无法区分颗粒物粒径影响和颗粒物上附着物影响的主要原因.

细颗粒物的毒理学研究通常选择受体细胞模型, 测定其在颗粒物暴露情况下细胞生长和生理指标的受损状态, 如人支气管上皮细胞 (BEAS-2B)^[8,9]、肺腺癌细胞 (A549)、肺泡巨噬细胞^[10]、血管内皮细胞^[11] 等. 然而动物细胞的培养条件苛刻, 且细胞结构和基因组复杂, 影响 PM_{2.5} 的细胞毒性评价和分子及基因水平的毒理阐述.

粟酒裂殖酵母菌 (*Schizosaccharomyces pombe*, *S. pombe*) 作为一种单细胞真核生物, 生理结构和基因研究成熟, 有 50 个基因与人类疾病基因非常相

收稿日期: 2015-05-16; 修订日期: 2015-06-25

作者简介: 刘梦娇 (1990 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为水环境控制与环境生物技术, E-mail: xilin0107@126.com

* 通讯联系人, E-mail: yhuang@pku.edu.cn

似^[12],与人类细胞具有很高的同源性^[13],且培养条件简单,细胞生长稳定,经常用于蛋白质或基因水平上的生物研究^[14,15],具有成为环境毒理研究和生物毒性监测的模式生物的潜力。

因此,本研究选择 *S. pombe* 作为模式细胞,通过比较暴露在不同粒径 SiO₂ 颗粒和附有污染物的野外采集 PM_{2.5} 下 *S. pombe* 细胞的生长和生理变化,探索 PM_{2.5} 的细胞毒性究竟来源于颗粒物的粒径、机械磨损等物理作用,还是所吸附化合物的化学作用,为 PM_{2.5} 的毒性评价提供证据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料和菌种培养

PM_{2.5} 样品采集时间为 2011 年 7 月 2 日~2011 年 8 月 13 日,每日 23.5 h。采集地点位于靠近北京大学东门的逸夫二楼 6 楼顶,距离交通繁忙的北京四环约 1 km。样品采集利用 Anderson 大流量采样器(流量为 300 L·min⁻¹,流量精度 3%),采样膜为石英纤维膜(尺寸 20.3 cm×24.5 cm)。使用前将采样膜放入马弗炉 550℃ 高温灼烧 5 h。经采样过的石英纤维膜用铝箔纸遮光,于 -80℃ 保存。

PM_{2.5} 提取:用经消毒的剪刀将 PM_{2.5} 滤膜剪成 3 cm×3 cm 小块,放入 250 mL 封口烧杯;加入 50 mL 无菌超纯水,4℃ 低温无菌超声 1 h,每隔 10 min 轻轻摇晃烧杯,以混匀悬浮液;用 6 层无菌纱布过滤超声后的颗粒悬浮液,倾倒入已称重的无菌平皿中;用 20 mL 无菌超纯水清洗留在烧杯中的膜 2~3 次,收集悬浮液至同一平皿中;利用低温冻干仪(德国 christ 公司)干燥平皿,称重,计算获得的颗粒物质量。颗粒于 -80℃ 冰箱避光保存。

模式颗粒物:选取两类粒径范围的颗粒,即纳米级(平均粒径 10 nm,美国 Sigma 公司,纯度 > 99.0%; 30 nm 和 60 nm,北京纳辰科技有限公司,纯度 > 99.0%)和微米级二氧化硅颗粒(平均粒径分别为 100 nm 和 400 nm,北京纳辰科技有限公司,纯度 > 99.0%)。为表达方便,本实验根据颗粒粒径设定如下名称:SiO₂-10、SiO₂-30、SiO₂-60、SiO₂-100、SiO₂-400。

菌种:野生型粟酒裂殖酵母菌株 (*Schizosaccharomyces pombe*),为美国加州大学戴维斯分校 Kazshiozaki 教授馈赠。

S. pombe 细胞培养:采用 YES 液体培养基^[16]进行细胞培养。挑取单个菌落于盛有 50 mL YES 液体培养基的锥形瓶中,置于 30℃,转速 200 r·min⁻¹

的恒温振荡培养箱中,培养至生长稳定期(约 24~48 h, $D = 2.0$ 以上,约 4×10^7 cells·mL⁻¹)时,取 *S. pombe* 菌液 1.5 mL,再加入 150 mL 的 YES 培养基(比例 1:100),于同样条件下继续培养至对数期(约 8 h, $D = 0.2$,约 4×10^6 cells·mL⁻¹),即获得用于暴露实验的目标 *S. pombe* 细胞。

主要试剂:用于彗星实验中细胞裂壁的试剂有 Buffer A 与 Buffer S,以上溶液均由超纯水配制,并用 0.45 μm 微孔滤膜过滤除菌。用于单细胞凝胶电泳的试剂有:PBS 缓冲液、1% 正常熔点琼脂糖凝胶(NMP)、1% 低熔点琼脂糖凝胶(LMP)、细胞裂解液、电泳缓冲液、TE 缓冲液与 EB 染液。

1.2 实验设计

以终浓度为 0、25、50、100、200、400、800、1 200、2 400 和 4 800 μg·mL⁻¹ 的模型 SiO₂ 颗粒处理细胞培养板(96 孔板)内的对数期 *S. pombe* 细胞。然后将 *S. pombe* 置于 30℃ 的恒温培养箱中培养,于 0、2、4、8、16、24、48 和 72 h 测定 *S. pombe* 的 D_{595} 值,实验重复 5 次(对照组为终浓度为 0 的 SiO₂ 颗粒处理组)。以终浓度为 0、150、300、600、1 200 和 2 400 μg·mL⁻¹ 的 PM_{2.5} 颗粒处理细胞培养板(96 孔板)内的对数期 *S. pombe* 细胞。然后将 *S. pombe* 置于 30℃ 的恒温培养箱中培养,于 0、8、24 和 48 h 测定 *S. pombe* 的 D_{595} 值,实验重复 5 次(对照组为终浓度为 0 的 PM_{2.5} 颗粒处理组)。以上操作均在无菌环境下进行。

用 2.5% 磷酸缓冲戊二醛固定液在 4℃ 黑暗中固定经 24 h 暴露的目标 *S. pombe* 细胞,用 30%、50%、70%、80%、90%、100% 的乙醇溶液依次脱水 10 min 后自然干燥。真空喷镀金后,观察颗粒在细胞表面的附着状态。

取 24 h 暴露后的 *S. pombe* 细胞悬浊液 1 mL(以终浓度为 0 的处理组为空白对照),于 4℃,3 000 r·min⁻¹,离心 5 min,弃去上清液,将下层沉积细胞用 1 mL PBS 溶液冲洗离心两次,最终用 1 mL PBS 溶液悬浮细胞。向悬浮细胞液中加入 5 μmol·L⁻¹ 二氢乙啶(dihydroethidium, DHE)后,在 30℃ 避光孵育 30 min,适当洗涤玻片后,观察活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成情况。

利用单细胞凝胶电泳(彗星实验)进行基因水平上的损伤检测。本实验为首次利用 *S. pombe* 进行 DNA 损伤水平研究,基于 Singh 等^[17]和 Rank 等^[18]的方法,进行一定修改。同时为表征颗粒物对细胞的 DNA 损伤水平,选用双氧水作为参比对象。步骤

为: ①双氧水处理细胞(作为相应的对照组): 取指数生长期的 *S. pombe* 细胞, 以终浓度 4×10^6 cells·mL⁻¹ 的 PBS 悬液接种于 25 mL 锥形瓶, 分别加入终浓度为 0、0.1、0.2、0.5 和 5 mmol·L⁻¹ 的 H₂O₂, 于 4℃ 环境下静置 15 min. 以上操作均在无菌环境下进行. ②采用酶解法, 选择 Zymolyase 20T (MP Biomedicals) 作为生物酶, 获得 *S. pombe* 原生质体. ③单细胞凝胶电泳实验: 将 110 μL 的 1% NMP 滴于全磨砂载玻片上, 其后用盖玻片平铺盖上. 于 4℃ 固定 5 min 后, 轻轻移走盖玻片; 取 10 μL 经破壁的细胞悬浊液和 65 μL 1.0% LMP, 在 37℃ 水浴中进行混合后, 滴于第一层 NMP 上, 盖上盖玻片, 于 4℃ 固定 5 min, 其后移走盖玻片. 将覆有两层胶的载玻片放入细胞裂解液中, 静置 2 h 后, 再移入 4℃ 电泳缓冲液中, 浸泡 20 min; 将载玻片移出, 再放入装有电泳缓冲液的电泳槽中, 通过调节液面, 使电流为 300 mA, 电压为 30 V (0.86 V·cm⁻¹), 4℃ 电泳 20 min; 电泳后, 将载玻片放入 TE 缓冲液, 浸泡 15 min; 取出载玻片, 在每块凝胶上加入 40 μL 的 20 μg·mL⁻¹ EB 染液, 晾干; 正置荧光显微镜观察并拍照.)

1.3 测定方法

细胞悬浊液吸光度: 紫外线分光光度仪(日本岛津 UV-2401 型)于 595nm 波长范围内进行检测, 且 $D = 0.1$ 可折算为细胞密度 2×10^6 cells·mL⁻¹; 对于使用细胞培养板的生长抑制实验, 取一定时间暴露后的 *S. pombe* 细胞液 1 mL 滴入 2 mL 离心管中, 于 4℃, 2 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清液, 用 1 mL PBS 反复清洗离心 2 次, 制成 1 mL 的细胞悬浮液; 然后利用酶标仪(美国 Biotek 公司)于 595 nm 波长范围检测吸光度.

颗粒吸附状态: 利用环境扫描电镜(荷兰 FEI 公司 QUANTA 200 型)进行观察.

荧光染色剂显色: DHE 染色剂显色——正置荧光显微镜以红光波长范围 535 nm 下进行检测; EB 染色剂显色——正置荧光显微镜以红光波长范围 535 nm 下进行检测.

DNA 损伤: 用彗星分析系统(捷克 Lucia Comet Assay 4. X)进行分析经暴露细胞中彗星的尾长、尾 DNA 含量及尾距等指标, 检测 *S. pombe* 细胞 DNA 损伤程度. 每个样本分析 50 个细胞.

1.4 数据处理

计算细胞增殖率: 细胞增殖率 = (处理细胞吸光度 - 对照组颗粒吸光度) / (未处理细胞吸光度 -

空白培养液吸光度)

数据分析由统计学软件 Primer 5.0、SPSS V 17.0 和 EXCEL 2010 进行.

2 结果与分析

2.1 SiO₂ 颗粒及 PM_{2.5} 对 *S. pombe* 细胞的生长影响

2.1.1 SiO₂ 颗粒对细胞的生长影响

S. pombe 细胞经不同粒径 SiO₂ 暴露 24 h 后, 细胞密度变化如图 1 所示. 在低浓度剂量 (≤ 400 μg·mL⁻¹) 暴露下, SiO₂ 对 *S. pombe* 细胞的生长并没有明显抑制作用, 反而在一定程度上促进细胞增殖. 当 SiO₂ 暴露浓度 ≥ 800 μg·mL⁻¹ 时, SiO₂-10 和 SiO₂-30 会对 *S. pombe* 细胞的生长有显著抑制作用 ($P < 0.05$), 并且随着浓度的增大, 抑制作用更加明显 ($P < 0.01$); 而其余 3 种粒径对细胞的生长有一定增殖作用, 尤其是粒径较大的 SiO₂-100 和 SiO₂-400 ($P < 0.05$).

结果表明, 当 SiO₂ 粒径 ≥ 60 nm 时, 未对细胞的生长产生抑制作用; 当粒径足够小时, 高浓度才会对细胞生长有显著性抑制. 不能笼统地说颗粒粒径与毒性效应具有正比例的相关性; 而是只有当粒径小于一定程度时, 颗粒的致毒效应与粒径才有显著相关.

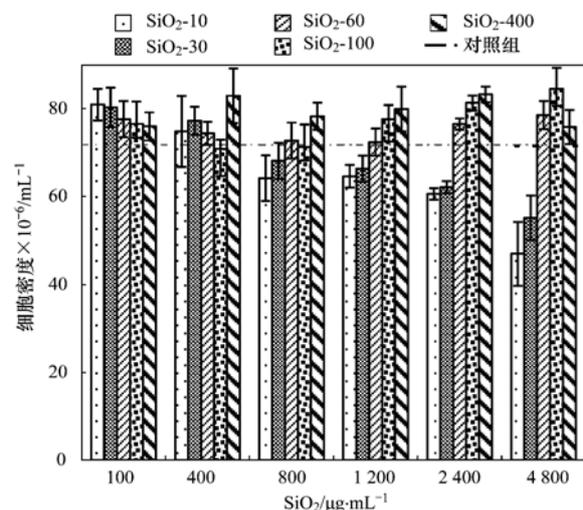


图 1 不同粒径 SiO₂ 暴露 24 h 下的 *S. pombe* 细胞密度

Fig. 1 Cell density of *S. pombe* after 24 h exposure to SiO₂ with different particle size

2.1.2 PM_{2.5} 对细胞的生长影响

为获得理想的 PM_{2.5} 暴露浓度, 同时尽可能细化具有时间代表性的 PM_{2.5} 颗粒样品, 本研究根据采样期间的气象条件(温度、相对湿度、大气压强和降水量)进行聚类分析, 以获取不同类别的 PM_{2.5} 颗

粒. 本研究初步选取聚类相似性水平在 96% 以上的每日 $PM_{2.5}$ 样品进行合并, 共得 5 类 $PM_{2.5}$ 样品, 分别标识(括号内为采样时间)为 S1 (07-24)、S2 (07-04、07-20、07-26、07-30、07-31)、S3 (07-02、07-28)、S4 (07-06、07-12、08-04、08-05、08-12、08-13、07-18) 和 S5 (07-10、07-16、07-27、08-02、08-03). 不同浓度 (0、150、300、600、1 200 和 2 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 5 类 $PM_{2.5}$ 样品 (S1、S2、S3、S4 和 S5) 分别作用于 *S. pombe* 细胞 48 h 后, 对细胞增殖的影响如表 1.

S1、S2 和 S3 暴露下的 *S. pombe* 细胞, 在 48 h 内均未出现被抑制的现象; 相反 $PM_{2.5}$ 对细胞的增殖有一定促进作用 ($P < 0.05$). 不同浓度的 S4 和 S5 对 *S. pombe* 细胞的增殖作用的影响不同, 当暴

露浓度达 2 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, S4 和 S5 对细胞的生长产生抑制作用, 且随着时间增长, 抑制作用愈发明显; 暴露 24 h 后, 增值率为对照组的 77.1% 和 82.9%, 而 48 h 后仅为对照组的 56.1% 和 62.4%. 在相似度为 94% 的水平上, S4 和 S5 之间的相似距离最近. 因此为进一步研究 $PM_{2.5}$ 对 *S. pombe* 细胞的毒性作用机制, 将 S4 和 S5 进行混合以获取理想的可用于暴露实验的 $PM_{2.5}$ 的量, 研究 $PM_{2.5}$ 的可能致毒机制.

比较可知, *S. pombe* 细胞经浓度 2 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 颗粒暴露 24 h 后, 细胞增殖率为: SiO_2 -400 (115.6%) > SiO_2 -100 (113.0%) > SiO_2 -60 (106.2%) > SiO_2 -30 (86.2%) > SiO_2 -10 (84.1%) > $PM_{2.5}$ (80.0%), 说明 $PM_{2.5}$ 的毒性大于模拟颗粒.

表 1 不同浓度的 $PM_{2.5}$ 暴露 48 h 后 *S. pombe* 的增值率¹⁾

Table 1 Growth ratio of *S. pombe* treated for 48 h with $PM_{2.5}$ of different concentrations

t/h	$c_{PM_{2.5}} / \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	<i>S. pombe</i> 增值率/%				
		S1	S2	S3	S4	S5
0	150	104.3 ± 5.2	94.9 ± 6.9 ⁻	103.3 ± 5.6	93.8 ± 3.6 ⁻	96.4 ± 2.1
	300	102.4 ± 3.4	96.8 ± 4.5	101.7 ± 3.8	94.5 ± 5.1 ⁻	98.2 ± 1.7
	600	105.3 ± 9.3	98.1 ± 3.3	96.3 ± 3.5	96.9 ± 2.4	102.1 ± 5.7
	1 200	104.4 ± 1.9	101.3 ± 7.4	99.8 ± 1.5	97.3 ± 3.8	101.2 ± 3.9
	2 400	106.3 ± 1.6	98.4 ± 2.9	95.1 ± 1.2	103.5 ± 0.8	100.6 ± 1.7
8	150	163.2 ± 4.6 ⁺⁺	142.1 ± 7.8 ⁺⁺	143.2 ± 5.1 ⁺⁺	240.3 ± 11.5 ⁺⁺	201.3 ± 8.8 ⁺⁺
	300	134.7 ± 9.9 ⁺⁺	135.9 ± 5.9 ⁺⁺	149.3 ± 8.7 ⁺⁺	260.0 ± 8.2 ⁺⁺	232.7 ± 7.9 ⁺⁺
	600	171.3 ± 5.8 ⁺⁺	123.7 ± 5.2 ⁺⁺	156.3 ± 7.4 ⁺⁺	338.0 ± 5.8 ⁺⁺	406.7 ± 10.5 ⁺⁺
	1 200	159.2 ± 1.0 ⁺⁺	178.4 ± 6.1 ⁺⁺	187.5 ± 4.3 ⁺⁺	256.7 ± 5.8 ⁺⁺	244.7 ± 6.3 ⁺⁺
	2 400	183.0 ± 3.1 ⁺⁺	159.8 ± 5.3 ⁺⁺	143.5 ± 7.7 ⁺⁺	89.3 ± 1.5 ⁻⁻	92.8 ± 1.4 ⁻
24	150	187.3 ± 5.1 ⁺⁺	165.3 ± 10.4 ⁺⁺	118.5 ± 5.1 ⁺⁺	187.3 ± 5.1 ⁺⁺	225.0 ± 7.9 ⁺⁺
	300	286.5 ± 12.5	167.4 ± 10.3	153.4 ± 6.7	286.5 ± 12.5	398.1 ± 14.0
	600	541.5 ± 7.3	191.6 ± 9.5	153.2 ± 8.9	541.5 ± 7.3	552.3 ± 11.6
	1 200	525.9 ± 6.8	196.7 ± 10.9	176.9 ± 6.3	525.9 ± 6.8	490.8 ± 9.1
	2 400	177.1 ± 3.5 ⁺⁺	188.5 ± 3.5 ⁺⁺	115.6 ± 4.0 ⁺⁺	77.1 ± 3.5 ⁻⁻	82.9 ± 1.0 ⁻⁻
48	150	130.8 ± 10.2 ⁺⁺	118.0 ± 10.8 ⁺⁺	100.7 ± 7.4	93.6 ± 9.4	101.4 ± 5.0
	300	149.4 ± 11.4 ⁺⁺	124.8 ± 10.0 ⁺⁺	121.1 ± 6.6 ⁺⁺	138.0 ± 9.2 ⁺⁺	172.6 ± 8.8 ⁺⁺
	600	237.5 ± 6.0 ⁺⁺	129.1 ± 9.9 ⁺⁺	118.5 ± 9.5 ⁺⁺	211.5 ± 4.6 ⁺⁺	226.1 ± 7.1 ⁺⁺
	1 200	217.3 ± 11.8 ⁺⁺	139.6 ± 2.9 ⁺⁺	131.8 ± 6.7 ⁺⁺	142.0 ± 10.7 ⁺⁺	187.6 ± 7.1 ⁺⁺
	2 400	160.4 ± 1.7 ⁺⁺	126.6 ± 3.8 ⁺⁺	97.0 ± 10.9	56.1 ± 8.4 ⁻⁻	62.4 ± 3.4 ⁻⁻

1) 以空白组为对照; 增值率 = 暴露组细胞密度/对照组细胞密度; “++”表示有增殖作用 ($P < 0.01$); “+”表示有增殖作用 ($P < 0.05$); “--”表示有抑制作用 ($P < 0.01$); “-”表示有抑制作用 ($P < 0.05$)

2.2 SiO_2 颗粒及 $PM_{2.5}$ 在细胞表面的附着情况

2.2.1 SiO_2 颗粒在细胞表面的附着情况

经浓度 2 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 SiO_2 -10 和 SiO_2 -400 暴露 *S. pombe* 细胞 24 h 后, 颗粒在 *S. pombe* 表面的状态如图 2 所示. 由图 2(a) 可知, 有大量细小 SiO_2 -10 颗粒直接附着在细胞表面, 且多分布在细胞的中间或顶端(箭头所指). 而 SiO_2 -400 颗粒并未直接附着在表面, 多数发生团聚作用, 包裹在细胞周

围[图 2(b)]. 结合 2.1.1 节实验结果可知, 粒径越小, 其对细胞壁的附着能力越强, 进而损害细胞壁, 对细胞生长造成影响.

2.2.2 $PM_{2.5}$ 在细胞表面的附着情况

经浓度为 2 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 $PM_{2.5}$ 暴露 *S. pombe* 细胞 24 h 后, 颗粒在 *S. pombe* 表面的状态如图 3 所示. $PM_{2.5}$ 可直接附着在细胞表面, 与 SiO_2 -10 相比量较少(箭头所指). 可知 $PM_{2.5}$ 对细胞壁或细胞膜

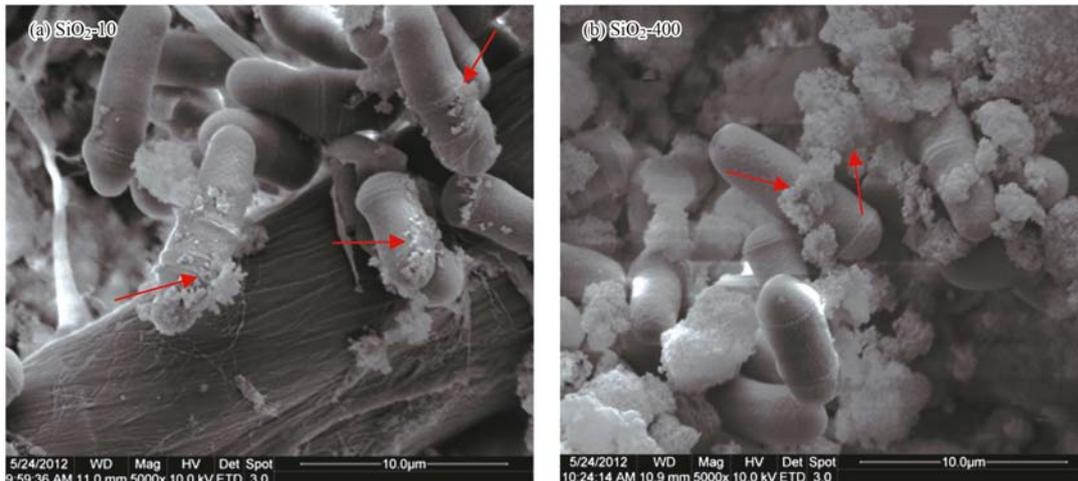


图 2 经 SiO₂ 暴露 24 h 的 *S. pombe* 扫描电镜图

Fig. 2 Transmission electron micrographs of *S. pombe* treated with SiO₂ for 24 h

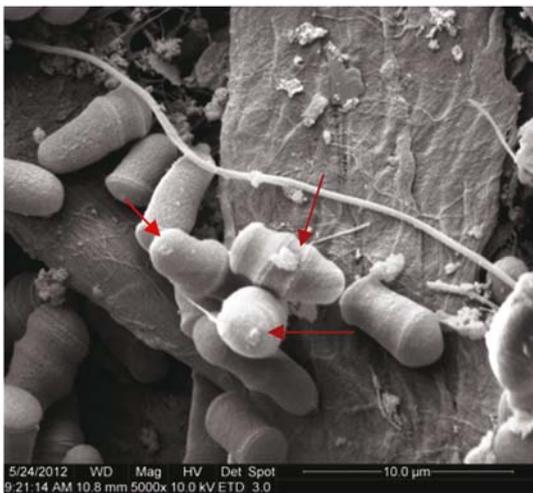


图 3 经 PM_{2.5} 暴露 24 h 的 *S. pombe* 扫描电镜图

Fig. 3 Transmission electron micrographs of *S. pombe* treated with PM_{2.5} for 24 h

的影响不如 SiO₂-10 显著。

2.3 对 *S. pombe* 细胞的氧化损伤作用

2.3.1 SiO₂ 颗粒对 *S. pombe* 细胞的氧化损伤作用

观察暴露浓度 2 400 µg·mL⁻¹ 的 SiO₂-10、SiO₂-30、SiO₂-60、SiO₂-100 和 SiO₂-400 的颗粒作用于 *S. pombe* 细胞 24 h 后, 细胞内 ROS 的变化趋势, 结果表明, 对照组及实验组的荧光强度无明显差异; 且随着粒径增大, 荧光强度无明显差异 (图 4)。上述结果表明, 不同粒径的 SiO₂ 并不能诱导 ROS 生成, 对 *S. pombe* 细胞造成氧化损伤。

2.3.2 PM_{2.5} 对 *S. pombe* 细胞的氧化损伤作用

浓度为 2 400 µg·mL⁻¹ 的 PM_{2.5} 颗粒作用于 *S. pombe* 细胞 24 h 后, 经 DHE 染色后, 细胞内 ROS 的

变化趋势如图 5 所示。相对照组, 经 PM_{2.5} 暴露的 *S. pombe* 的荧光反应较为明显, 说明 PM_{2.5} 可诱导 *S. pombe* 细胞生成 ROS。

2.4 对 *S. pombe* 细胞的 DNA 损伤

2.4.1 SiO₂ 颗粒对 *S. pombe* 细胞的 DNA 损伤作用

采用单细胞凝胶电泳的方法检测浓度为 2 400 µg·mL⁻¹ 的 SiO₂-10、SiO₂-30、SiO₂-60、SiO₂-100 和 SiO₂-400 的颗粒作用于 *S. pombe* 细胞 24 h 后, 对细胞 DNA 的损伤作用。图 6 (a) 表明: 随着颗粒粒径的减小, DNA 拖尾程度、拖尾百分比及尾距都有一定增大, 但与 H₂O₂ 处理的对照组差异比较可以看出 [图 6 (b)], SiO₂ 颗粒处理和对照并没有显著差异 ($P > 0.05$)。该结果说明, SiO₂ 虽然能对细胞的细胞壁和膜造成损伤, 进而改变细胞的通透性, 但是并没有造成 DNA 的显著损伤。

2.4.2 PM_{2.5} 对 *S. pombe* 细胞的 DNA 损伤作用

采用单细胞凝胶电泳方法检测浓度 2 400 µg·mL⁻¹ 的 PM_{2.5} 颗粒对 *S. pombe* 细胞 DNA 的损伤作用。表 2 显示: 经 PM_{2.5} 暴露后, DNA 尾长、尾 DNA 百分比及尾距都有一定增大, 分别比空白对照组增加 19.21 像素、23.43% 及 1.67 像素, 且具有显著的统计学意义 ($P < 0.05$)。说明 PM_{2.5} 虽然未能对细胞的细胞壁造成损伤, 但是却能通过氧化作用导致 DNA 的损伤。

表 2 PM_{2.5} 对 *S. pombe* 细胞的 DNA 损伤¹⁾

Table 2 DNA damage induced by PM_{2.5} on *S. pombe*

c _{PM_{2.5}} /µg·mL ⁻¹	尾长/像素	尾 DNA 含量/%	尾距/像素
0	2.67 ± 1.32	3.18 ± 1.89	0.25 ± 0.24
2 400	21.88 ± 9.45 **	25.61 ± 7.23 **	1.92 ± 0.33 **

1) ** 表示参比对照组 $P < 0.01$

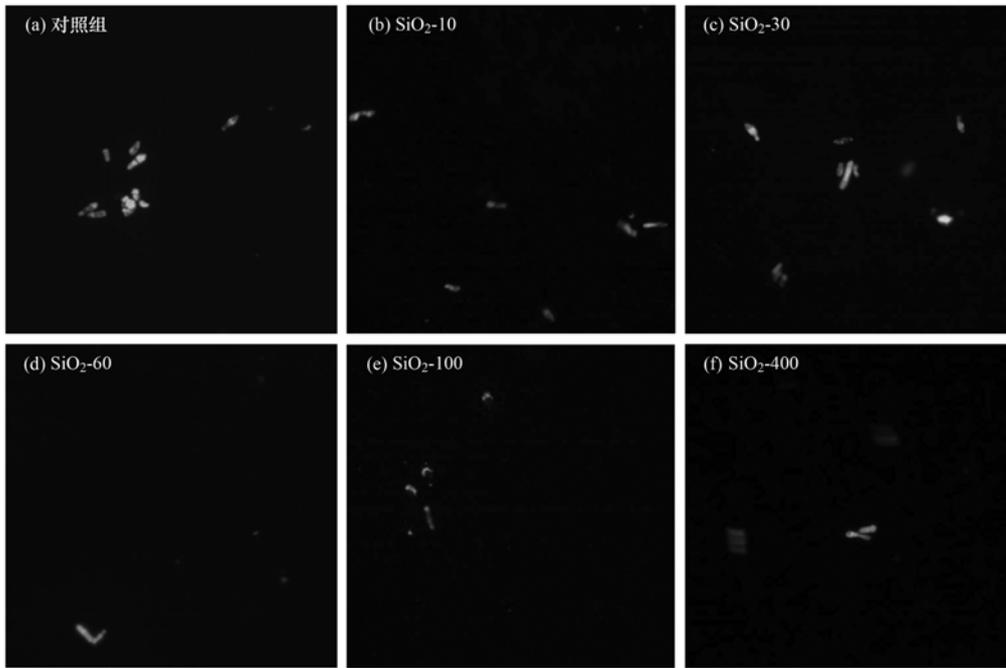


图 4 *S. pombe* 细胞经不同粒径 SiO_2 暴露 24 h 后的 ROS 表征

Fig. 4 ROS characterization in *S. pombe* treated for 24 h with SiO_2 of different particle size

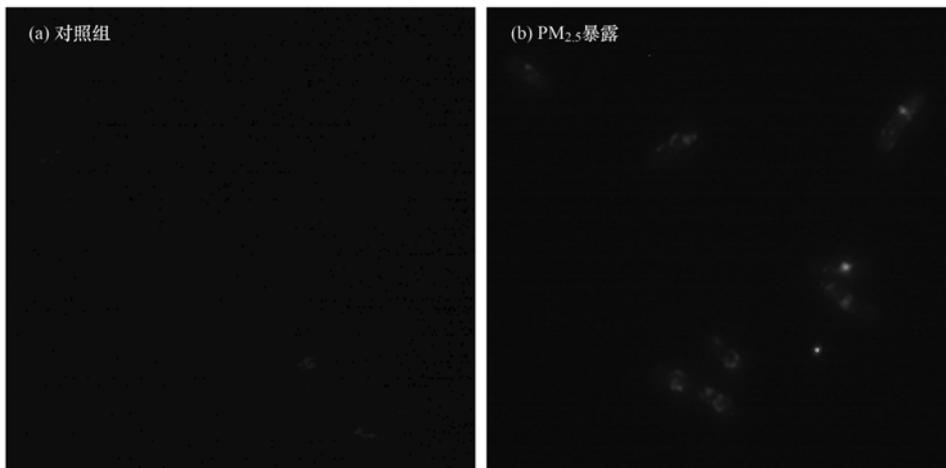


图 5 *S. pombe* 细胞经 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露 24 h 后的 ROS 表征

Fig. 5 ROS characterization of *S. pombe* incubated with $\text{PM}_{2.5}$ after 24 h

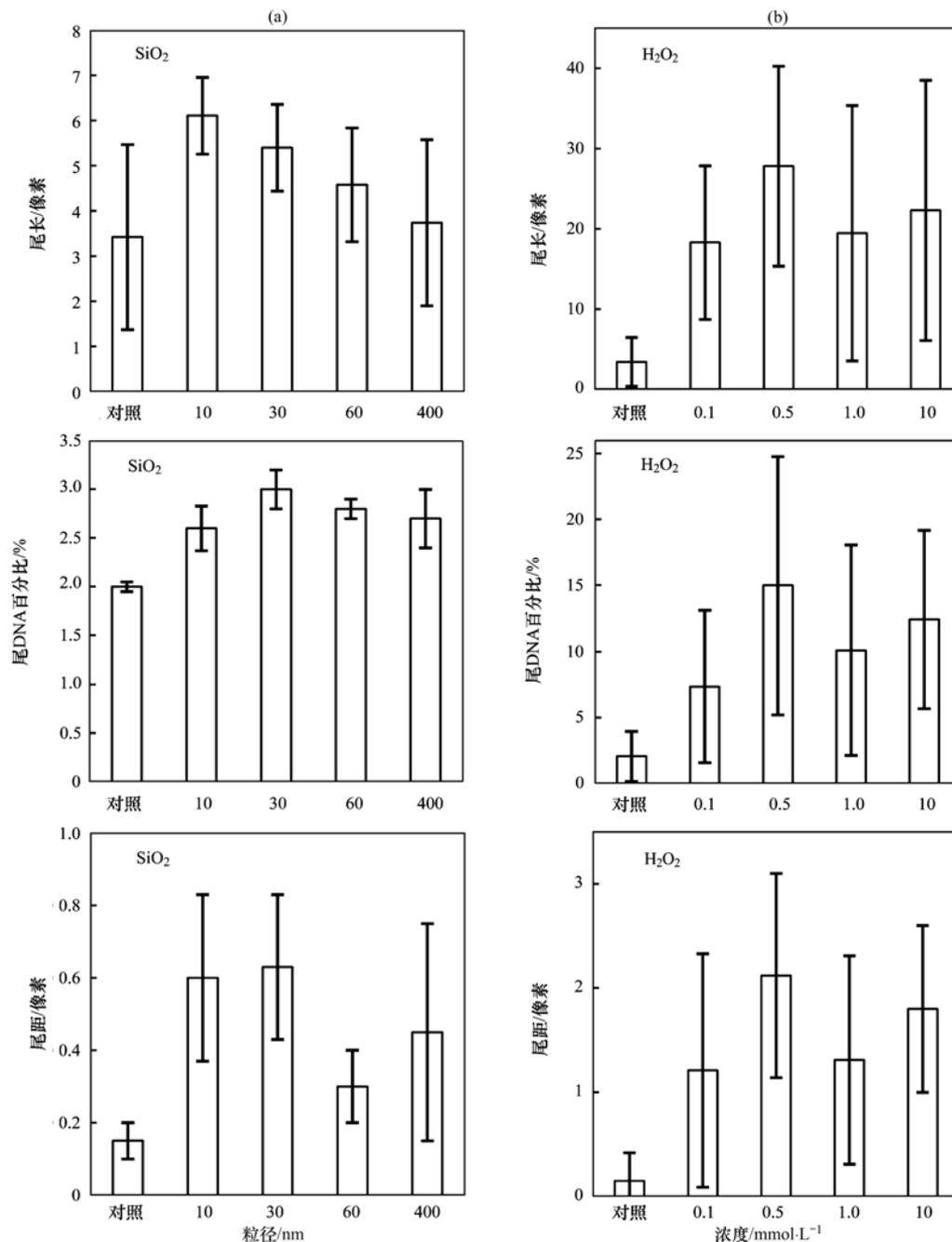
3 讨论

3.1 粒径效应

只有当粒径小于一定值(60 nm)时, SiO_2 对*S. pombe*细胞的生长影响才会存在剂量-反应关系,高浓度才会对细胞生长有显著性抑制作用.李阳^[19]研究不同粒径纳米 SiO_2 的细胞毒性作用时,对浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的4种不同粒径的 SiO_2 颗粒产生的细胞毒性作用进行比较,发现粒径为498 nm的

SiO_2 处理组细胞存活率与对照组相比,无显著性改变;而68、43及19 nm的 SiO_2 处理组与对照组相比,细胞存活率明显降低,并且颗粒粒径越小,其对细胞的生长抑制作用越明显.这与本实验结果基本符合.

作为对比, $\text{PM}_{2.5}$ 对*S. pombe*细胞的生长影响表现为:S4、S5类 $\text{PM}_{2.5}$ 在低浓度($\leq 1200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)促进*S. pombe*细胞增殖,高浓度($2400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)时对其产生明显抑制作用.这与其他体外细胞实验存在一定差异.祖桂芳等^[20]采集北京城区大气可

图6 SiO₂ 对 *S. pombe* 细胞的 DNA 损伤Fig. 6 DNA damage induced by SiO₂ on *S. pombe*

吸入颗粒物中的 PM_{2.5}, 用其对入肺腺癌 A549 细胞染毒, 发现当 PM_{2.5} 浓度 < 150 mg·L⁻¹ 时可刺激 A549 细胞增殖, 浓度 ≥ 150 mg·L⁻¹ 时可抑制细胞增殖, 浓度为 200 mg·L⁻¹ 时细胞存活率明显降低, 仅为 42.06%。可能由于受体细胞种类和测定方法不同等因素, 导致 PM_{2.5} 毒性影响的强弱差异。但 PM_{2.5} 对细胞生长的毒性趋势是一致的, 均为低浓度促进细胞增殖, 高浓度时抑制细胞增殖。

PM_{2.5} 对 *S. pombe* 细胞的毒性趋势与粒径小于

一定值 (60 nm) 的 SiO₂ 颗粒相似。但通过相同浓度、暴露时间的比较实验可知, PM_{2.5} 的毒性大于 SiO₂ 颗粒。由于北京城区 PM_{2.5} 的粒径分布集中于 0.2 ~ 0.3 μm 及 0.5 ~ 1.0 μm 两个区段内^[21], PM_{2.5} 相对 SiO₂ 颗粒粒径偏大。张睿等对上海大气颗粒物的细胞毒性研究发现, 在相同染毒浓度下, 粗颗粒物 (1.8 ~ 10.0 μm)、细颗粒物 (0.1 ~ 1.8 μm) 及超细颗粒物 (0.01 ~ 0.1 μm) 3 种染毒组中, 细颗粒物处理组的细胞存活率最低^[22]。可见大气颗粒物的

细胞毒性效应并非严格地符合“粒径越小,毒性越大”,因此推测 $PM_{2.5}$ 的粒径等物理性质引起的细胞毒性效应有限。

通过利用扫描电镜观察颗粒物在 *S. pombe* 细胞表面的附着状态发现, SiO_2 粒径越小,对细胞壁的附着能力越强,进而损害细胞壁,对细胞生长造成影响。赵光强等^[23]对 BEAS-2B 细胞研究发现,微米级 SiO_2 不能进入细胞,纳米级 SiO_2 可通过细胞膜进入细胞,存在细胞质中,未进入细胞核。Yu 等^[24]将小鼠鼠蛋白细胞暴露于粒径为 30、48、118、535 nm 的 SiO_2 颗粒悬浮液中 24 h,透射电镜结果显示 4 种粒径的 SiO_2 颗粒均可跨越细胞膜进入胞质当中。由于采用受体细胞种类不同,本研究与上述研究结果并不一致。 $PM_{2.5}$ 相对于 SiO_2 颗粒较大,附着于细胞壁表面的数量较少,推测其对细胞壁的影响不如 SiO_2 显著。

3.2 氧化损伤

本实验表明, $PM_{2.5}$ 可诱导 *S. pombe* 细胞生成 ROS,但不同粒径 SiO_2 并不能显著诱导 ROS 生成,从而对细胞造成氧化损伤。Dergham 等^[25]在研究 $PM_{2.5-0.3}$ 对人支气管上皮细胞 BEAS-2B 的毒性作用中发现, $PM_{2.5-0.3}$ 暴露引起人支气管上皮细胞 BEAS-2B 的氧化损伤(ROS 水平提高)和细胞因子分泌,具有剂量、暴露时间依赖性。关于 SiO_2 颗粒对细胞的氧化损伤, Yu 等^[26]在对人肺腺癌细胞 A549 进行纳米级 SiO_2 (平均粒径为 62 nm)、甲基汞的联合暴露实验中,发现研究表明 SiO_2 可降低细胞活性,提高细胞内 ROS 水平。夏银叶等^[27]研究也表明,平均粒径为 (57.66 ± 7.30) nm 的 SiO_2 颗粒作用于 HUVECs 后,细胞活力下降 ($P < 0.05$),细胞中 ROS 水平升高,线粒体膜电位下降,甚至发生细胞凋亡。大部分研究与本实验结果并不一致,可能由于目前多采用无细胞壁的动物细胞为受体, SiO_2 颗粒物直接作用于细胞膜,产生较大的毒害作用;而本实验中采取具有 *S. pombe* 真菌模式细胞,其细胞壁起到重要的保护作用。

以上研究说明,超细颗粒 SiO_2 本身并不能因其界面极性、粒径等物理因素诱导细胞生成 ROS,而平均粒径较大的 $PM_{2.5}$ 却能诱导细胞生成 ROS。可推测 $PM_{2.5}$ 表面吸附的化学成分,如 Fe、Zn、Mn、Cr 等金属组分^[28]或有害有机物,引起细胞的氧化应激作用,对细胞产生毒害。

3.3 DNA 损伤

如果氧化与抗氧化平衡被打破,细胞 DNA 会因

氧化应激而受损^[29]。本实验表明, SiO_2 虽能对细胞壁造成损伤,改变细胞通透性,但并不能诱导生成 ROS 对细胞造成氧化损伤,也无法造成 DNA 损伤。而 Yu 等^[26]研究发现纳米级 SiO_2 处理可引起 A549 细胞的 DNA 损伤。Kim 等^[30]关于 SiO_2 与 ZnO 纳米颗粒物对人脑胶质母细胞瘤 U373MG 细胞的毒性作用实验表明, SiO_2 与 ZnO 纳米颗粒物暴露均能使 U373MG 细胞 DNA 断裂。上述结果与本研究并不一致,可能是由于模式细胞类型不同,使 SiO_2 颗粒毒性的表达存在差异,也可能是 SiO_2 颗粒的纯度不同所致。需要进一步的实验研究与分析。

$PM_{2.5}$ 虽未能对细胞壁和膜造成损伤,却能通过氧化作用导致 DNA 损伤。覃辉艳等^[31]研究结果与之相符,并认为大气 $PM_{2.5}$ 对细胞的 DNA 损伤程度与染毒剂量、时间呈正相关。Gualtieri 等^[32]也发现,冬天采集的 $PM_{2.5}$ 可改变 A549 细胞基因的表达,从而导致 ROS 的产生和 DNA 的损伤。结合本实验结果可以推断, $PM_{2.5}$ 的细胞毒性主要来自于其表面吸附的化学物质,如重金属、有机物等。 $PM_{2.5}$ 所吸附的水溶性金属离子可溶于液体环境,被细胞吸收富集,从而对 DNA 造成间接损伤^[33]。李怡等^[34]发现水溶性铁离子通过 Fenton 反应诱导细胞生成羟基自由基,从而对机体产生氧化损伤。

4 结论

(1)超细纯 SiO_2 颗粒在小粒径范围内 (< 60 nm)对细胞生长的影响具有粒径和剂量的依赖性。 SiO_2 颗粒物大量吸附于 *S. pombe* 细胞壁,但没有诱导细胞生成 ROS,也没有造成氧化损伤。

(2)高浓度、长时间的 $PM_{2.5}$ 暴露才能抑制 *S. pombe* 细胞的生长。粒径相对较大且吸附大量污染物的 $PM_{2.5}$ 少量附着于 *S. pombe* 细胞壁,但显著提高细胞内 ROS 水平,同时损伤 DNA。

(3)在相同浓度、暴露时间的条件下, $PM_{2.5}$ 对 *S. pombe* 细胞的毒性作用大于 SiO_2 颗粒。

致谢:衷心感谢美国 University of California, Davis 的 Kazshiozaki 教授无偿提供菌株,同时感谢重点实验室的胡敏老师和郑玫老师在颗粒物样品采集上的大力帮助,以及程珊珊同学的帮助。

参考文献:

- [1] 李金娟,邵龙义,杨书申,等.可吸入颗粒物生物活性及其微观特征分析[J].环境科学,2006,27(3):572-577.
- [2] 徐雯,江俊康,杨北平,等.不同粒径汽车尾气颗粒物对 A549 细胞毒性作用的比较[J].环境科学学报,2013,33

- (12): 3407-3412.
- [3] Wilson M R, Lightbody J H, Donaldson K, *et al.* Interactions between ultrafine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro* [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2002, **184** (3): 172-179.
- [4] Deng X B, Zhang F, Rui W, *et al.* PM_{2.5}-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 2013, **27**(6): 1762-1770.
- [5] 范兰兰, 尚羽, 张玲. 大气颗粒物对 A549 和 HUVECs 细胞的毒性作用 [J]. *环境科学研究*, 2012, **25**(10): 1166-1172.
- [6] Kouassi K S, Billet S, Garçon G, *et al.* Oxidative damage induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter (PM_{2.5}) collected in Abidjan, Côte d'Ivoire [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2010, **30**(4): 310-320.
- [7] Roubicek D A, Gutiérrez-Castillo M E, Sordo M, *et al.* Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City [J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2007, **631**(1): 9-15.
- [8] Oh S M, Kim H R, Park Y J, *et al.* Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells) [J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2011, **723**(2): 142-151.
- [9] Dergham M, Lepers C, Verdin A, *et al.* Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM_{2.5-0.3}) produced in rural, urban, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2012, **25**(4): 904-919.
- [10] 徐佳, 牛静萍, 丁国武, 等. 兰州市大气细颗粒物对大鼠肺泡巨噬细胞吞噬功能的影响 [J]. *环境与健康杂志*, 2008, **25**(3): 243-245.
- [11] 王菲菲, 王先良, 刘芳盈, 等. 燃煤 PM_{2.5} 不同组分对血管内皮细胞的氧化损伤效应 [J]. *中国环境科学*, 2014, **34**(3): 780-785.
- [12] Wood V, Gwilliam R, Rajandream M A, *et al.* The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *Nature*, 2002, **415** (6874): 871-880.
- [13] 文航, 黄艺. 粟酒裂殖酵母菌对环境压力响应的研究进展 [J]. *生态学杂志*, 2011, **30**(8): 1845-1850.
- [14] Chen J S, Beckley J R, McDonald N A, *et al.* Identification of new players in cell division, DNA damage response, and morphogenesis through construction of *Schizosaccharomyces pombe* deletion strains [J]. *G3-Genes Genomes Genetics*, 2015, **5**(3): 361-370.
- [15] Jeffares D C, Rallis C, Rieux A, *et al.* The genomic and phenotypic diversity of *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *Nature Genetics*, 2015, **47**(3): 235-241.
- [16] Moreno S, Klar A, Nurse P. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *Methods in Enzymology*, 1991, **194**: 795-823.
- [17] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. *Experimental Cell Research*, 1988, **175**(1): 184-191.
- [18] Rank J, Syberg K, Jensen K. Comet assay on tetraploid yeast cells [J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2009, **673**(1): 53-58.
- [19] 李阳. 纳米二氧化硅粒径相关的细胞毒性作用 [D]. 长春: 吉林大学, 2010. 53-56.
- [20] 祖桂芳, 姜薇, 赵晓红, 等. 天然提取物抗 PM_{2.5} 诱导 A549 细胞凋亡的作用 [J]. *生态毒理学报*, 2011, **6**(4): 429-434.
- [21] 邵龙义, 杨书申, 时宗波, 等. 城市大气可吸入颗粒物物理化学特征及生物活性研究 [M]. 北京: 气象出版社, 2006. 73-81.
- [22] 张睿, 吕森林, 尚羽, 等. 上海大气超细颗粒物和工业纳米颗粒的表征及细胞毒性的比较研究 [J]. *环境科学*, 2012, **33**(5): 1431-1437.
- [23] 赵光强, 黄云超, 李光剑, 等. 纳米二氧化硅在人支气管上皮细胞内的亚细胞分布和遗传毒性 [J]. *中国肺癌杂志*, 2013, **16**(3): 117-124.
- [24] Yu K O, Grabinski C M, Schrand A M, *et al.* Toxicity of amorphous silica nanoparticles in mouse keratinocytes [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2009, **11**(1): 15-24.
- [25] Dergham M, Lepers C, Verdin A, *et al.* Temporal-spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution particulate matter (PM_{2.5-0.3}) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) [J]. *Environmental Research*, 2015, **137**: 256-267.
- [26] Yu Y B, Duan J C, Li Y, *et al.* Combined toxicity of amorphous silica nanoparticles and methylmercury to human lung epithelial cells [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, **112**: 144-152.
- [27] 夏银叶, 李艳博, 牛丕业, 等. 纳米二氧化硅颗粒对血管内皮细胞的毒性及其凋亡诱导作用 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2015, **41**(3): 454-459.
- [28] 魏红英, 邓芙蓉, 郭新彪. 北京奥运大气污染控制措施对大气细颗粒物金属组分及其细胞毒性的影响 [J]. *环境与健康杂志*, 2011, **28**(10): 847-850.
- [29] 孙志豪, 崔燕平. PM_{2.5} 对人体健康影响研究概述 [J]. *环境科技*, 2013, **26**(4): 75-78.
- [30] Kim J E, Kim H, An S S A, *et al.* In vitro cytotoxicity of SiO₂ or ZnO nanoparticles with different sizes and surface charges on U373MG human glioblastoma cells [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2014, **9**(S2): 235-241.
- [31] 覃辉艳, 彭晓武, 蒙智娟, 等. 大气 PM_{2.5} 致人支气管上皮细胞 DNA 损伤的研究 [J]. *环境与健康杂志*, 2012, **29**(5): 391-393.
- [32] Gualtieri M, Longhin E, Mattioli M, *et al.* Gene expression profiling of A549 cells exposed to Milan PM_{2.5} [J]. *Toxicology Letters*, 2012, **209**(2): 136-145.
- [33] Perrone M G, Gualtieri M, Ferrero L, *et al.* Seasonal variations in chemical composition and *in vitro* biological effects of fine PM from Milan [J]. *Chemosphere*, 2010, **78**(11): 1368-1377.
- [34] 李怡, 朱彤. 大气颗粒物致机体损伤的 OH 自由基机制 [J]. *生态毒理学报*, 2007, **2**(2): 142-149.

CONTENTS

Composition and Source Apportionments of Saccharides in Atmospheric Particulate Matter in Beijing	LIANG Lin-lin, Guenter Engling, DUAN Feng-kui, <i>et al.</i> (3935)
Comparing Cell Toxicity of <i>Schizosaccharomyces pombe</i> Exposure to Airborne PM _{2.5} from Beijing and Inert Particle SiO ₂	LIU Meng-jiao, HUANG Yi, WEN Hang, <i>et al.</i> (3943)
Analysis on Regional Characteristics of Air Quality Index and Weather Situation in Beijing and Its Surrounding Cities During the APEC	GAO Qing-xian, LIU Jun-rong, WANG Ning, <i>et al.</i> (3952)
Analysis About Spatial and Temporal Distribution of SO ₂ and An Ambient SO ₂ Pollution Process in Beijing During 2000-2014	CHENG Nian-liang, ZHANG Da-wei, LI Yun-ting, <i>et al.</i> (3961)
Characteristics and Formation Mechanism of a Multi-Day Haze in the Winter of Shijiazhuang Using a Single Particle Aerosol Mass Spectrometer (SPAMS)	ZHOU Jing-bo, REN Yi-bin, HONG Gang, <i>et al.</i> (3972)
Modeling Study of A Typical Summer Ozone Pollution Event over Yangtze River Delta	ZHANG Liang, ZHU Bin, GAO Jin-hui, <i>et al.</i> (3981)
Distribution of Regional Pollution and the Characteristics of Vertical Wind Field in the Pearl River Delta	LIU Jian, WU Dui, FAN Shao-jia (3989)
Distribution Characteristics of Urea and Constitution of Dissolved Nitrogen in the Bohai Sea and the Huanghai Sea in Spring	LI Zhi-lin, SHI Xiao-yong, ZHANG Chuang-song (3999)
Relationship Between Agricultural Land and Water Quality of Inflow River in Erhai Lake Basin	PANG Yan, XIANG Song, CHU Zhao-sheng, <i>et al.</i> (4005)
Input Characteristics and Pollution Assessment of Nutrients Pollution in the Primary Pollution Source of the Daliao River	MA Ying-qun, ZHANG Lei, ZHAO Yan-min, <i>et al.</i> (4013)
Temporal and Spatial Distribution of Nutrients in Daning River Sediments and Their Correlations with Chlorophyll in the Three Gorges Reservoir Area	ZHANG Yong-sheng, LI Hai-ying, REN Jia-ying, <i>et al.</i> (4021)
Summer Greenhouse Gases Exchange Flux across Water-air Interface in Three Water Reservoirs Located in Different Geologic Setting in Guangxi, China	LI Jian-hong, PU Jun-bing, SUN Ping-an, <i>et al.</i> (4032)
Distribution of Redox Zone at Different Water Layers in the Presence of Periphyton and the Responsible Microorganisms	WANG Feng-wu, LIU Wei, WAN Juan-juan, <i>et al.</i> (4043)
Distribution Characteristics and Source of Fluoride in Groundwater in Lower Plain Area of North China Plain: A Case Study in Nanpi County	KONG Xiao-le, WANG Shi-qin, ZHAO Huan, <i>et al.</i> (4051)
Distribution Characteristics of Fluoroquinolones Antibiotics in Surface Water and Groundwater from Typical Areas in A City	CUI Ya-feng, HE Jiang-tao, SU Si-hui, <i>et al.</i> (4060)
Distribution of Aerobic Ammonia-Oxidizing Microorganisms in Sediments from Adjacent Waters of Rushan Bay	HE Hui, ZHEN Yu, MI Tie-zhu, <i>et al.</i> (4068)
Sources, Migration and Conversion of Dissolved Sterols in Qingmuguan Underground River	LIANG Zuo-bing, SHEN Li-cheng, SUN Yu-chuan, <i>et al.</i> (4074)
Water-Sediment Partition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Karst Underground River	LAN Jia-cheng, SUN Yu-chuan, XIAO Shi-zhen (4081)
Variation Characteristics and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Karst Subterranean River During Rainfall Events	JIANG Ze-li, SUN Yu-chuan, WANG Zun-bo, <i>et al.</i> (4088)
Distribution and Transportation Characteristics of Heavy Metals in Nanshan Laolongdong Subterranean River System and Its Capacity of Self-Purification in Chongqing	REN Kun, LIANG Zuo-bing, YU Zheng-liang, <i>et al.</i> (4095)
Distribution of Mercury in Plants at Water-Level-Fluctuating Zone in the Three Gorges Reservoir	LIANG Li, WANG Yong-min, LI Xian-yuan, <i>et al.</i> (4103)
Development of Sediment Micro-Interface Under Physical and <i>Chironomus plumosus</i> Combination Disturbance	WANG Ren, LI Da-peng, HUANG Yong, <i>et al.</i> (4112)
Norfloxacin Solution Degradation Under Ultrasound, Potassium Persulfate Collaborative System	WEI Hong, SHI Jing-zhuan, LI Jia-lin, <i>et al.</i> (4121)
Degradation of Acid Orange 7 with Persulfate Activated by Silver Loaded Granular Activated Carbon	WANG Zhong-ming, HUANG Tian-yin, CHEN Jia-bin, <i>et al.</i> (4127)
Kinetics and Reactive Species Analysis of Dimetridazole Degradation by TiO ₂	CHEN Dong-mei, YU Ze-bin, SUN Lei, <i>et al.</i> (4135)
Performance and Mechanism of Ferric Tannate in the Removal of Inorganic Nitrogen from Wastewater	ZHANG Rui-na, LI Lin, LIU Jun-xin (4141)
Performance of an Intermittent Aeration Membrane Bioreactor for Removal of Veterinary Antibiotics from Piggery Wastewater	DING Jia-li, LIU Rui, ZHENG Wei, <i>et al.</i> (4148)
Advanced Treatment of Incineration Leachate with O ₃ -BAC and Double O ₃ -BAC	DU An-jing, FAN Ju-hong, LIU Rui, <i>et al.</i> (4154)
Effects of Hydraulic Retention Time and Dissolved Oxygen on a CANON Reactor with Haydite as Carrier	WANG Hui-fang, FU Kun-ming, ZUO Zao-rong, <i>et al.</i> (4161)
Inhibiting Form of Ammonium to AOB and Inhibiting Rule	CUI Jian-hong, LI Xiang, HUANG Yong, <i>et al.</i> (4168)
Nitrogen Removal Using ANAMMOX and Denitrification for Treatment of Municipal Sewage	ZHANG Shi-ying, WU Peng, SONG Yin-ling, <i>et al.</i> (4174)
Rapid Start-up of Simultaneous Nitrification and Denitrification Coupled Phosphorus Removal Process and Its Performing Characteristics	LENG Lu, XIN Xin, LU Hang, <i>et al.</i> (4180)
Effect of HCO ₃ ⁻ on Nitrogen Removal Efficiency in Partial Nitritation-ANAMMOX Process	LI Xiang, CHENG Zong-heng, HUANG Yong, <i>et al.</i> (4189)
Research on Cultivation and Stability of Nitritation Granular Sludge in Integrated ABR-CSTR Reactor	WU Kai-cheng, WU Peng, SHEN Yao-liang, <i>et al.</i> (4195)
Influence of the Application of Activated Persulfate on Municipal Sludge Conditioning	XU Xin, PU Wen-hong, SHI Ya-fei, <i>et al.</i> (4202)
Influence of Temperature on the Anaerobic Packed Bed Reactor Performance and Methanogenic Community	XIE Hai-ying, WANG Xin, LI Mu-yuan, <i>et al.</i> (4208)
Research on the Screening Method of Soil Remediation Technology at Contaminated Sites and Its Application	BAI Li-ping, LUO Yun, LIU Li, <i>et al.</i> (4218)
Comprehensive Risk Assessment of Soil Heavy Metals Based on Monte Carlo Simulation and Case Study	YANG Yang, DAI Dan, CAI Yi-min, <i>et al.</i> (4225)
Heavy Metals Pollution in Topsoil from Dagang Industry Area and Its Ecological Risk Assessment	ZHANG Qian, CHEN Zong-juan, PENG Chang-sheng, <i>et al.</i> (4232)
Effects of Land Use Type on Soil Microbial Biomass Carbon and Nitrogen in Water-Stable Aggregates in Jinyun Mountain	LI Zeng-quan, JIANG Chang-sheng, HAO Qing-ju (4241)
Influence of Different Straws Returning with Landfill on Soil Microbial Community Structure Under Dry and Water Farming	LAN Mu-ling, GAO Ming (4252)
Carbon Source Utilization Characteristics of Soil Microbial Community for Apple Orchard with Interplanting Herbage	DU Yi-fei, FANG Kai-kai, WANG Zhi-kang, <i>et al.</i> (4260)
Effects of Different Kinds of Organic Materials on Soil Heavy Metal Phytoremediation Efficiency by <i>Sedum alfredii</i> Hance	YAO Gui-hua, XU Hai-zhou, ZHU Lin-gang, <i>et al.</i> (4268)
<i>In-situ</i> Study on Effects of Combined Amendment on Translocation Control of Pb and Cd in Soil-Vegetable System	ZHU Wei, LIU Li, WU Yan-ming, <i>et al.</i> (4277)
Effects of Rice Cultivar and Typical Soil Improvement Measures on the Uptake of Cd in Rice Grains	WANG Mei-e, PENG Chi, CHEN Wei-ping (4283)
Pollution Characteristics and Ecological Risk Assessment of PAHs in Water and Fishes from Daqing Lakes	WANG Xiao-di, ZANG Shu-ying, ZHANG Yu-hong, <i>et al.</i> (4291)
Depth Profiles of Methane Oxidation Kinetics and the Related Methanotrophic Community in a Simulated Landfill Cover	XING Zhi-lin, ZHAO Tian-tao, GAO Yan-hui, <i>et al.</i> (4302)
Enhanced Performance of Rolled Membrane Electrode Assembly by Adding Cation Exchange Resin to Anode in Microbial Fuel Cells	MEI Zhuo, ZHANG Zhe, WANG Xin (4311)
Development of a Monoclonal Antibody-Based Sensor for Environmental Pyrene and Benzo(a)pyrene Detection	LI Xin, QIAO Yan, ZHONG Guo-zhen (4319)

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军
朱永官 刘志培 刘 毅 汤鸿霄 孟 伟 周宗灿 林金明
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2015年11月15日 第36卷 第11期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 36 No. 11 Nov. 15, 2015

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧阳自远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel:010-62941102, 010-62849343; Fax:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印刷装订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科 学 出 版 社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencecp. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencecp. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 120.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行人