

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第35卷 第11期

Vol.35 No.11

2014

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

南京北郊夏季近地层臭氧及其前体物体积分数变化特征	邵平, 安俊琳, 杨辉, 林旭, 吉东生 (4031)
亚青会期间南京污染气体与气溶胶中水溶性离子的分布特征	邹嘉南, 安俊琳, 王红磊, 邵平, 段卿, 薛国强, 庞博 (4044)
亚青会期间南京地区气溶胶浓度变化及其与能见度的关系	袁亮, 银燕, 李琦, 肖辉, 李力 (4052)
2013年10月长株潭城市群一次持续性空气污染过程特征分析	廖志恒, 范绍佳, 黄娟, 孙家仁 (4061)
在线单颗粒气溶胶质谱 SPAMS 对细颗粒物中主要组分提取方法的研究	付怀于, 闫才青, 郑玫, 蔡靖, 李小滢, 张延君, 周振, 傅忠, 李梅, 李磊, 张远航 (4070)
PM ₁₀ 可替代源成分谱的建立方法及其应用	陈强, 景毅, 吴焕波, 王芳 (4078)
夏季东海和南黄海一氧化氮的浓度分布、海-气通量和微生物消耗研究	王敬, 陆小兰, 杨桂朋, 徐冠球 (4085)
三峡库区典型农田小流域水体汞的时空分布特征	王娅, 赵铮, 木志坚, 王定勇 (4095)
浑太水系水体中不同粒径有机胶体荧光光谱特性	刘娜娜, 李斌, 刘瑞霞, 宋永会, 吴畏 (4103)
深圳湾流域 TN 和 TP 入海年通量变化规律研究	赵晨辰, 张世彦, 毛献忠 (4111)
滇池沉积物有机磷垂直分布特征及其生物有效性	熊强, 焦立新, 王圣瑞, 彭希琰 (4118)
金山湖闸坝型水体表层沉积物重金属分布特征及生态风险评价	周晓红, 刘龙梅, 陈曦, 陈志刚, 张金萍, 李义敏, 刘彪 (4127)
西藏普莫雍错湖芯沉积物中重金属的垂向分布特征及生态风险评估	谢婷, 罗东霞, 杨瑞强 (4135)
西安市雨水径流中重金属季节性污染特征及分析	袁宏林, 李星宇, 王晓昌 (4143)
城市不同下垫面降雨径流多环芳烃 (PAHs) 分布及源解析	武子澜, 杨毅, 刘敏, 陆敏, 于英鹏, 汪青, 郑鑫 (4148)
粗放型绿色屋面填料的介质组成对出水水质的影响	陈昱霖, 李田, 顾俊青 (4157)
饮用水处理中不同来源生物活性炭微生物群落多样性和结构研究	杜尔登, 郑璐, 冯欣欣, 高乃云 (4163)
压力强化混凝除藻工艺中藻毒素安全性研究	蒋新跃, 栾清, 丛海兵, 徐思涛, 刘玉娇, 朱学源 (4171)
基于膜特征参数变化的蛋白质超滤过程膜污染研究	王旭东, 张银辉, 王磊, 张慧慧, 夏四清 (4176)
臭氧氧化水溶液中对乙酰氨基酚的机制研究	曹飞, 袁守军, 张梦涛, 王伟, 胡真虎 (4185)
电辅助微生物反应器降解苯并噻唑效能的研究	刘春苗, 丁杰, 刘先树, 程旺斌 (4192)
铁铜复合氧化物纳米吸附剂的制备、表征及 As(Ⅲ)吸附性能研究	张伟, 陈静, 张高生 (4198)
重金属铬胁迫下水蚯蚓的生理响应研究	楼菊青, 杨东叶, 曹永青, 孙培德, 郑平 (4205)
光质对蛋白核小球藻 (<i>Chlorella pyrenoidosa</i>) 生长特征及生化组成的影响研究	唐青青, 方治国, 嵇雯雯, 夏会龙 (4212)
常温低基质下碱度和溶解氧对厌氧氨氧化的影响	任玉辉, 王科, 李相昆, 马凯丽, 张杰 (4218)
Fe ²⁺ 和 Fe ³⁺ 对厌氧氨氧化污泥活性的影响	李祥, 黄勇, 巫川, 王孟可, 袁怡 (4224)
CSTR 中亚硝化颗粒污泥的变化过程研究	阴方芳, 刘文如, 王建芳, 吴鹏, 沈耀良 (4230)
盐度对好氧颗粒污泥硝化过程中 N ₂ O 产生量的影响	王珊珊, 梁红, 高大文 (4237)
硫酸盐还原反应器污泥驯化过程中微生物群落变化分析	曾国驱, 贾晓珊, 郑小红, 杨丽平, 孙国萍 (4244)
利用铅同位素方法量化不同端元源对南京土壤和长江下游悬浮物铅富集的影响	王成, 夏学齐, 张义, 廖启林, 杨忠芳, 季峻峰 (4251)
北京东南郊土壤剖面氟喹诺酮类抗生素分布特征	苏思慧, 何江涛, 杨蕾, 乔肖翠, 崔亚丰 (4257)
环境因素对土壤中几种典型四环素抗性基因形成的影响	张俊, 罗方园, 熊浩徽, 焦少俊, 叶波平 (4267)
稻田土壤不同水分条件下硝化/反硝化作用及其功能微生物的变化特征	刘若萱, 贺纪正, 张丽梅 (4275)
典型岩溶土壤微生物丰度与多样性及其对碳循环的指示意义	靳振江, 汤华峰, 李敏, 黄炳富, 李强, 张家喻, 黎桂文 (4284)
变温环境对典型石灰土有机碳矿化的影响	王莲阁, 高岩红, 丁长欢, 慈恩, 谢德体 (4291)
铁氧化物与电子供体基质交互作用对红壤性水稻土中 DDT 还原脱氯影响	刘翠英, 徐向华, 王壮, 姚童言 (4298)
植物套种及化学强化对重金属污染土壤的持续修复效果研究	卫泽斌, 郭晓方, 吴启堂, 龙新宪 (4305)
不同取样尺度下亚高山草甸土壤呼吸的空间变异特征	李洪建, 高玉凤, 严俊霞, 李君剑 (4313)
不同开垦年限黑土温室气体排放规律研究	李平, 郎漫, 徐向华, 李煜姗, 朱淑娟 (4321)
转 Cry1Ac 基因抗虫棉与其亲本棉花根际真菌多样性的比较	潘建刚, 焦海华, 白志辉, 齐鸿雁, 马安周, 庄国强, 张洪勋 (4329)
天津污灌区内气态汞的污染特征及在叶菜类蔬菜中的富集	郑顺安, 韩允垒, 郑向群 (4338)
1-硝基芘和 1,2-萘醌的联合细胞毒性和致 DNA 损伤	尚羽, 蒋玉婷, 张玲, 李怡 (4345)
鸡粪堆肥有机物演化对重金属生物有效性影响研究	卜贵军, 于静, 邱慧慧, 罗世家, 周大寨, 肖强 (4352)
污泥预植重金属 Cu 炭化及炭中重金属的稳定性研究	窦晓敏, 陈德珍, 戴晓虎 (4359)
上层曝气式生物反应器填埋工艺特性的研究	田颖, 王坤, 徐期勇 (4365)
硝酸盐连续回灌对生物反应器填埋场 N ₂ O 产生的影响	卞荣星, 孙英杰, 李晶晶, 张欢欢 (4371)
中国碳强度下降和碳排放增长的行业贡献分解研究	蒋晶晶, 叶斌, 计军平, 马晓明 (4378)
泛长三角地区工业污染重心演变路径及其驱动机制研究	赵海霞, 蒋晓威, 崔建鑫 (4387)
基于污染防治技术模拟的造纸行业环境管理方法研究	张雪莹, 温宗国 (4395)
大气棕色碳的研究进展与方向	闫才青, 郑玫, 张远航 (4404)
《环境科学》征稿简则 (4094) 《环境科学》征订启事 (4126) 信息 (4243, 4266, 4274, 4328)	

1-硝基芘和1,2-萘醌的联合细胞毒性和致DNA损伤

尚羽¹, 蒋玉婷¹, 张玲¹, 李怡^{2*}

(1. 上海大学环境与化学工程学院, 环境污染与健康研究所, 上海 200444; 2. 中国气象科学研究院, 北京 100081)

摘要: 以人肺上皮细胞 A549 为研究对象, 运用 MTT 方法检测 1-硝基芘(1-NP)处理后 A549 的细胞存活率; 测定细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)的漏出率, 评价细胞膜损伤; 运用彗星实验检测 DNA 损伤; 通过荧光探针的方法测定细胞内产生的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS). 通过 1,2-萘醌(1,2-NQ)预先染毒 24 h, 再使用 1-NP 染毒 24 h 的方法, 评估 1-NP 和 1,2-NQ 对 A549 的联合细胞毒性和 DNA 损伤. 结果表明, 1-NP 对 A549 暴露 24 h 和 48 h 的半致死浓度(LC₅₀)分别为 5.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 2.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. LC₅₀ 随着染毒时间的增加而降低, 提示暴露时间越长 1-NP 的细胞毒性越强. A549 在 1、2、3 和 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 1-NP 染毒下, DNA 损伤显著增强, ROS 水平不断升高, 呈现剂量-效应关系($P < 0.05$); 但 LDH 漏出率无显著变化. 1,2-NQ(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)预先染毒 A549 细胞 24 h, 能明显减弱 1-NP 造成的 DNA 损伤和 ROS 升高. 结果说明, 1,2-NQ 预处理可能通过抑制 1-NP 暴露产生的 ROS, 从而降低 A549 的 DNA 的损伤.

关键词: 1-硝基芘; 1,2-萘醌; 细胞毒性; DNA 损伤; 活性氧自由基

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2014)11-4345-07 DOI: 10.13227/j.hjks.2014.11.042

Combined Effects of 1-Nitropyrene and 1,2-Naphthoquinone on Cytotoxicity and DNA Damage in A549 Cells

SHANG Yu¹, JIANG Yu-ting¹, ZHANG Ling¹, LI Yi²

(1. Institute of Environmental Pollution and Health, School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2. Chinese Academy of Meteorological Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Using human lung epithelial A549 cells, viability was measured by MTT assay after treated with 1-nitropyrene (1-NP); lactate dehydrogenase (LDH) leakage was determined to evaluate the cellular membrane injury; DNA damage was detected with comet assay; reactive oxygen species (ROS) generation was measured with fluorescent probe. The combined toxic effects of 1-NP and 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ) on A549 were also evaluated. 1-NP caused a significantly concentration-dependent and time-dependent viability decrease. The LC₅₀ for 24 h and 48 h were 5.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 2.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. DNA damage and intracellular ROS levels were also increased significantly through a dose-dependent manner after exposure to 1-NP. The LDH leakage were not significantly changed. Compared with the groups treated with 1-NP alone, the viability and LDH leakage was not changed significantly in combined-treated groups with 1-NP and 1,2-NQ. However, the DNA damage and ROS levels were significantly reduced in the combined-treated groups compared with the groups treated with 1-NP alone. These results suggest that 1-NP may mediated the genotoxic and cytotoxic effects through ROS generation, and pretreatment with 1,2-NQ, may inhibit the ROS generation induced by 1-NP, and thereby reducing the DNA damage in A549 cells.

Key words: 1-nitropyrene; 1,2-naphthoquinone; cytotoxicity; DNA damage; ROS generation

大量的流行病学和毒理学研究表明, 大气颗粒物(particulate matter, PM)可危害人群健康, 大气颗粒物污染已经成为影响人类健康的主要环境因素之一^[1-3]. PM 是十分复杂的混合物, 包括元素碳、金属、无机盐、有机物、生物源性成分等^[4]. 颗粒物不同的化学组分可导致不同的健康效应机制, 决定了其对机体健康危害的差异. 有机物是大气颗粒的重要化学组分, 约占其干重的 10%~70%. 其中, 在健康影响中最为关注的是多环芳烃(PAHs)及其衍生物, 如硝基多环芳烃和醌类有机物质等. 研究发现硝基多环芳烃和醌等衍生物的毒性效应甚至强于其母体 PAHs^[5-7].

大气中的硝基多环芳烃可直接来源于化石燃料

的燃烧, 也可源于大气光化学反应的二次转化. 研究报道 1-硝基芘(1-NP)是柴油车尾气中检测到的浓度最高的硝基多环芳烃^[8], 对柴油车尾气颗粒的致突变性有重要贡献^[9]. 研究发现硝基多环芳烃致突变和致癌潜力可达其母体 PAHs 的 10~100 000 倍^[10], 因此其引起的健康风险一直受到广泛关注^[11]. 最近的一些研究发现 1-NP 可以引起肝脏细胞发生凋亡^[12]; 促进人肺上皮细胞产生活性氧自

收稿日期: 2014-03-28; 修订日期: 2014-05-30

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(21107068); 创新团队发展计划项目(IRT13078)

作者简介: 尚羽(1982~), 女, 博士, 副研究员, 主要研究方向为大气污染与人体健康, E-mail: yushang@shu.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: liyi@cma.gov.cn

由基(reactive oxygen species, ROS),并诱导细胞因子分泌^[13];造成人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)DNA损伤及凋亡^[14]。李淑贤等^[11]用人外周血淋巴细胞探讨1-NP对DNA的损伤,结果发现1-NP对外周血淋巴细胞的DNA损伤表现出明显的剂量-效应关系,能显著引起人外周血淋巴细胞DNA损伤,具有遗传毒性;Andersson等^[14]以DNA损伤、ROS为指标研究了1-NP对HUVECs的细胞毒性和遗传毒性,结果显示,低剂量的1-NP($< 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)能引起DNA损伤,并导致细胞内的ROS水平显著上升。

醌类有机物是PM中另一类重要的PAHs衍生物,因具有氧化还原活性,可通过氧化还原循环产生ROS,而受到关注。PM中检出的醌类大部分为多环芳醌,如蒽醌、萘醌、菲醌等,主要来源于机动车尾气排放和多环芳烃(PAHs)的光化学氧化^[15,16]。最近的一些研究发现萘醌和蒽醌可以通过氧化还原循环产生ROS,进而诱导人肺上皮细胞释放炎症因子,最终造成细胞死亡^[17~19]。

硝基多环芳烃和醌等PAHs衍生物,在大气中具有相似的来源,现实环境中往往同时存在,但目前国内外关于多种有机物的联合毒性的研究还比较少。本文以1-NP为主体,人肺上皮细胞(A549)作为研究对象,探讨1-NP和1,2-NQ的联合细胞毒性和对DNA的损伤。利用MTT的方法测定A549的细胞增殖能力;通过测定细胞培养液中LDH的漏出率,评价细胞膜损伤程度;利用单细胞凝胶电泳(彗星实验,Comet Assay)的方法测定DNA损伤;并使用荧光探针的方法测定细胞内产生的ROS,以期深入认识1-NP的遗传毒性、了解1-NP和1,2-NQ的联合毒性和对人体健康的影响提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

胎牛血清(PAA laboratories GmbH公司,奥地利),HAM'S/F-12培养基(赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司),四甲基偶氮唑盐(MTT, Life Science公司,美国),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物技术有限公司),琼脂糖、1-硝基芘(1-nitropyrene, 1-NP, $> 99\%$)和1,2-萘醌(1,2-naphthoquinone, 1,2-NQ, $> 95\%$)(Sigma-Aldrich公司,美国),96孔、24孔及6孔培养板、35 mm培养皿以及75 cm²培养瓶(Corning公司,美国),其它试剂(分析纯)均购自上海国药集团化学试剂

公司。

仪器:CO₂恒温细胞培养箱(LINGDE公司,德国),iMark-680型酶联免疫检测仪(BIO-RAD公司,美国),正置荧光显微镜(BX51型,Olympus公司,日本)。

1.2 细胞培养和染毒

人肺上皮细胞A549购自上海市中国科学院细胞库,细胞使用HAM'S/F-12培养基,在5% CO₂、37℃恒温恒湿条件下培养。当细胞生长2 d~3 d,单层细胞达到80%以上时,按1:3的比例传代培养。

染毒:取对数生长期的细胞,每孔 3×10^3 接种于96孔培养板供MTT实验使用;每孔 1×10^4 个细胞接种于24孔培养板供LDH实验使用;每孔 5×10^4 个细胞接种于6孔培养板或35 mm培养皿中供彗星实验、ROS测定使用。接种后于5% CO₂、37℃恒温恒湿条件下培养,令其贴壁生长。细胞贴壁后,弃培养基,使用D-hanks清洗两次,进行染毒。1-NP单独染毒:使用不同浓度1-NP(1、2、3、4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)染毒24 h或48 h。1-NP和1-NQ的联合染毒:使用1,2-NQ(5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)预染毒24 h后,弃上清液,使用D-hanks清洗两次,再使用不同浓度1-NP继续染毒24 h。1-NP和1,2-NQ使用二甲基亚砜(DMSO)配置成100 mmol·L⁻¹的储备液,每次染毒时重新稀释至所需浓度。染毒时使用含2%胎牛血清的培养液稀释至需要的浓度,保持DMSO的浓度为0.1%。

1.3 MTT实验

用含2%胎牛血清的培养液稀释1-NP至终浓度为1、2、3、4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,按照每孔100 μL 对细胞染毒,另设溶剂对照组(DMSO,0.1%)和空白对照组(HAM'S/F-12培养基,不含细胞),每组设6个平行孔。染毒24 h后,每孔加入5 mg·mL⁻¹ MTT试剂10 μL ,混匀后,继续培养4 h;弃去培养液,加入DMSO溶液100 μL ,振荡10 min;用酶联免疫检测仪测定光密度(D),波长490 nm,记录数据。细胞存活率计算如下:

$$\text{细胞存活率} = \frac{D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白对照组}}}{D_{\text{溶剂对照组}} - D_{\text{空白对照组}}} \times 100\%$$

1.4 LDH

细胞染毒方法同上。染毒结束后,将细胞培养液移至EP管中,1200 r·min⁻¹,离心3 min;取培养液上清,按照LDH测定试剂盒说明书加入试剂;将上一步所得溶液加入96孔平底培养板中(每孔加200 μL),用酶联免疫检测仪测定光密度(D),波长440 nm,记录数据。

1.5 彗星实验

彗星实验, 又称单细胞凝胶电泳分析 (single cell gel electrophoresis, SCGE), 是一种快速检测单细胞 DNA 损伤的技术. 其原理为: 如果细胞内 DNA 未受损伤, 电泳中核 DNA 因其分子量大而停留在核基质中, 经荧光染色后呈现圆形的荧光团, 无拖尾现象. 若细胞 DNA 受损, 在电泳时 DNA 断链或碎片将向阳极迁移, 形成拖尾. 细胞核 DNA 损伤愈重, 产生的断链或碱易变性片段就愈多, 其断链或短片也就愈小, 在电场作用下迁移的 DNA 量多, 迁移的距离长, 表现为尾长增加和尾部荧光强度增强. 因此, 通过测定 DNA 迁移部分的光密度或迁移长度就可定量测定单个细胞 DNA 损伤程度. 本研究采用 Tice 等^[20] 提出的彗星方法, 具体步骤参考文献^[18, 21]. 使用分析软件 CASP 进行彗星数据分析, 记录尾长 (Tail length), 头部 (Head) 和尾部 (Tail) DNA 的荧光强度, 本研究使用尾部 DNA 含量 (尾部 DNA 荧光强度 / (尾部 DNA + 头部 DNA 荧光强度) × 100%, 即 Tail DNA%) 作为衡量 DNA 拖尾的定量指标^[21]. 每个样本分析不少于 80 个细胞, 取其中位值, 再取 3 ~ 4 个平行样的平均值.

1.6 ROS 测定

本研究选用 2', 7'-二氯荧光素二乙酸酯 (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA), 作为荧光探针, 检测细胞内生成 ROS. 其原理是: DCFH-DA 本身没有荧光, 可自由穿过细胞膜, 进入细胞内后, 可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH, 而 DCFH 不能通透细胞膜, 从而被装载到细胞内. 细胞内的活性氧 ROS 可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF. 因此, 通过 DCF 的荧光强度可指示细胞内活性氧的水平. 具体步骤如下: ①加探针: 染毒结束后, 弃去培养液, 用 D-Hanks 清洗 2 次, 加入用无血清的培养液稀释的 DCFH-DA (终浓度 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 于 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育 30 min; ②弃上清液, 用 D-Hanks 清洗 3 次, 再加入 D-Hanks 缓冲液; ③使用荧光显微镜观察, 并拍照. 每个平行样选取 5 ~ 10 张照片, 使用 Image-pro plus 6.0 分析荧光强度, 取其平均值. 以上步骤都需要避光操作. 本实验中检测的 ROS 水平用光密度值来表示, 将所得结果与对照组做归一化处理.

1.7 数据处理

数据的处理及计算由 Microsoft Office Excel 2007 进行, 数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{X} \pm \text{SD}$) 表示, 各指标组间差异采用 *t* 检验法进行统计.

2 结果与分析

2.1 细胞存活率

1-NP 和 1,2-NQ 的化学结构式, 见图 1.

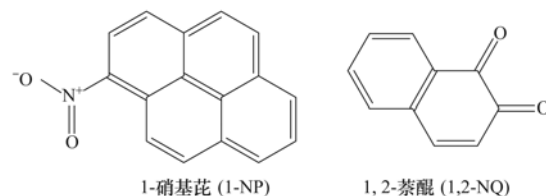
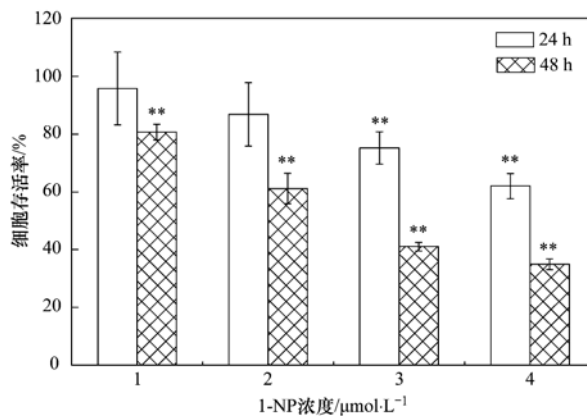


图 1 1-NP 和 1,2-NQ 的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of 1-NP and 1,2-NQ

图 2 显示经 1-NP 处理 24 h 或 48 h 后, A549 的细胞存活率. 1-NP 染毒 24 h 和 48 h, A549 的细胞存活率均有不同程度的下降, 呈现显著的剂量-效应关系 ($P < 0.01$). 利用 Excel 2007 软件计算, 24 h 和 48 h 的半致死浓度 (LC_{50}) 分别为 $5.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 随着染毒时间的增加, LC_{50} 值下降, 说明 1-NP 的毒性随着染毒时间的增加而增强. 如果用 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1,2-NQ 预先染毒 24 h, 再用 1-NP 染毒 24 h, 细胞存活率亦呈现剂量-效应的下降, 但与 1-NP 单独染毒 24 h, 并无显著差异 (数据略).



** ($P < 0.01$) 为染毒组与溶剂对照组相比

图 2 1-NP 对 A549 细胞存活率的影响

Fig. 2 Cell viability of A549 after treated with 1-NP for 24 h and 48 h

2.2 细胞膜损伤

图 3 表示经 1-NP 处理 24 h 或 48 h 后, A549 细胞培养液中 LDH 的浓度水平. 1-NP 染毒 24 h 和 48 h, LDH 的浓度略有升高, 但与溶剂对照相比都没有显著性差异 ($P > 0.05$). 24 h 处理组和 48 h 处理组之间也无显著性差异. 如果用 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1,2-NQ 预先染毒 24 h, 再用 1-NP 染毒 24 h, LDH 漏出浓度也没有显著的升高, 与 1-NP 单独染毒无显著性

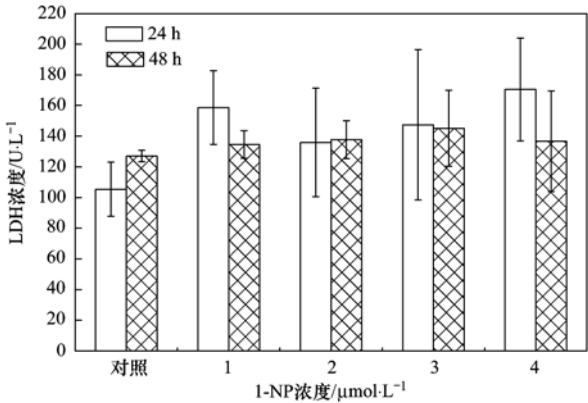


图 3 1-NP 对 A549 细胞 LDH 水平的影响
Fig. 3 LDH release of A549 cells after treated with 1-NP for 24 h and 48 h

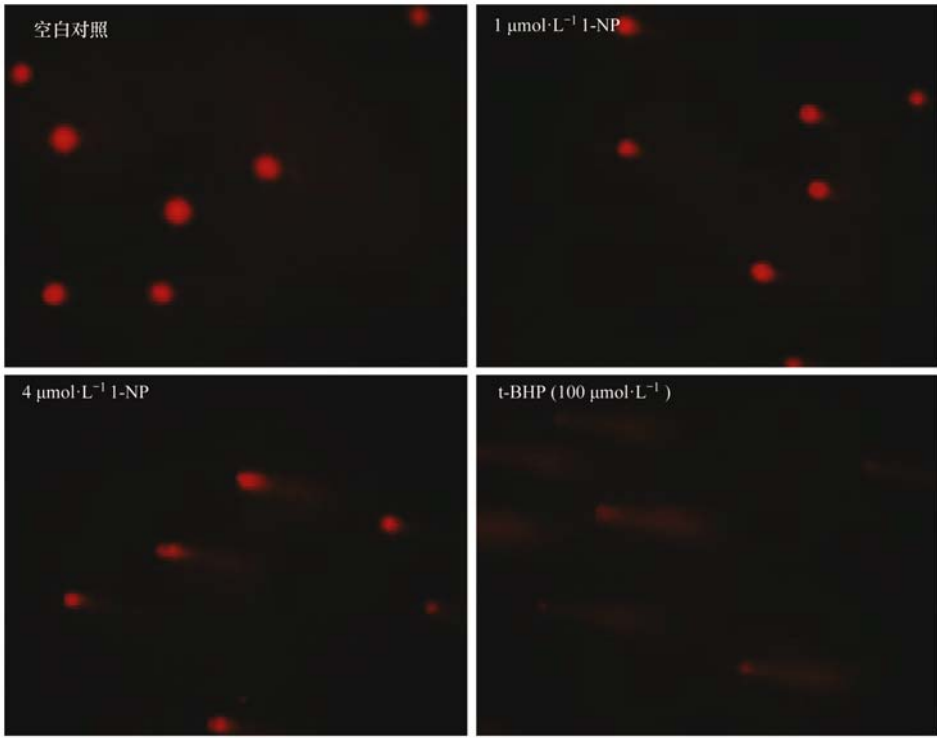


图 4 彗星实验照片
Fig. 4 Pictures from Comet assay

(Tail DNA%) 不断上升,呈显著的剂量-效应关系 ($P < 0.01$). 对照组的 Tail DNA% 约为 3.4%, 当 1-NP 达到 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度后, 出现显著性升高 ($P < 0.05$), 在最大剂量 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 增至 45.3% ($P < 0.01$).

如果用 1,2-NQ ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 预先对 A549 细胞染毒 24 h, 继续使用 1-NP 染毒 24 h, 与溶剂对照组相比, 仍能观察到显著的 DNA 损伤, 结果如图 5 所示. 但使用 1,2-NQ 预染毒, 不同程度地降低了 1-NP 导致的 DNA 损伤, 表现为 Tail DNA% 的下降, 在最高浓度 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处, 呈现出显著性差异. 与

差别(数据略).

2.3 DNA 损伤

选择染毒剂量为 1、2、3、4 和 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 设溶剂对照组 (DMSO, 0.1%), 另设 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 tBHP (染毒 1 h) 作为阳性对照组. 彗星实验中 DNA 拖尾现象如图 4 所示. 对照组细胞头部 DNA 致密, 边缘光滑, 没有明显的损伤; 而 1-NP 染毒组和阳性对照组一样, 头部 DNA 集中, 亮度较强, 尾部由 DNA 片段组成, 拖尾明显, 成扫帚状, 并且 1-NP 的剂量越高, 拖尾现象越明显. 这说明 1-NP 能引起 A549 细胞 DNA 的损伤.

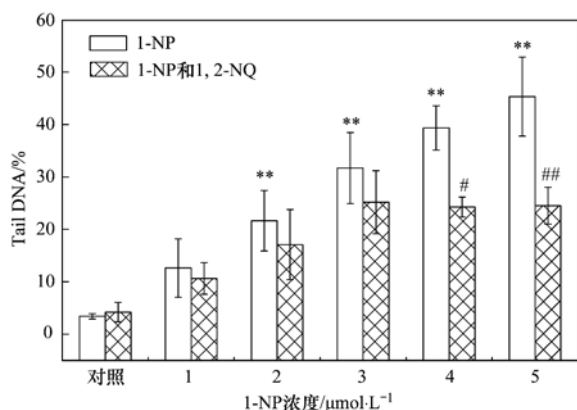
由图 5 可见, 1-NP 单独染毒, 可对 A549 造成 DNA 的损伤, 随着染毒剂量的增大, 尾部 DNA 含量

1,2-NQ 联合染毒, 1-NP 在 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DNA 拖尾量为 24.5%, 较 1-NP 单独染毒下降了约 50%.

2.4 ROS 生成

图 6 显示 1-NP 对 A549 细胞内 ROS 水平的影响, 以及 1-NP 和 1,2-NQ 对 A549 细胞内 ROS 生成的联合作用. 从中可见, 1-NP 单独染毒, A549 细胞内 ROS 水平随 1-NP 浓度的增大而不断升高, 在 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度后, 出现显著性升高; 在最高剂量 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ROS 约升高 2.4 倍.

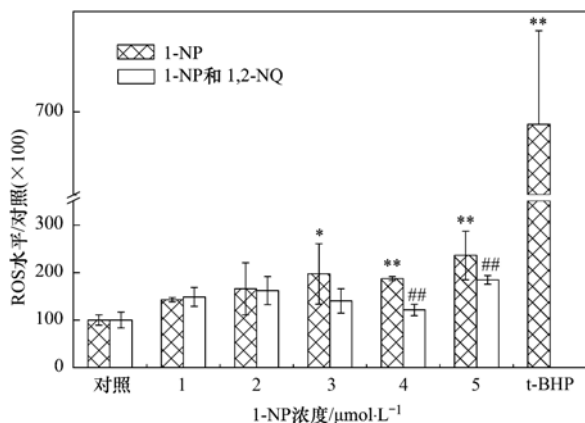
1,2-NQ 预染毒 24 h, 某种程度上抑制了 1-NP 染毒后细胞内 ROS 的生成, 在最高浓度 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



** ($P < 0.01$) 为 1-NP 染毒组与溶剂对照组相比; # ($P < 0.05$) 和 ## ($P < 0.01$) 为 1-NP 单独染毒组与 1-NP 和 1,2-NQ 联合染毒相比

图 5 1-NP 单独以及 1-NP 和 1,2-NQ 联合染毒对 A549 DNA 的影响

Fig. 5 DNA damage in A549 cells induced by 1-NP alone and 1-NP combined with 1,2-NQ



* ($P < 0.05$) 和 ** ($P < 0.01$) 为 1-NP 染毒组与溶剂对照组相比; ## ($P < 0.01$) 为 1-NP 染毒组与 1-NP 和 1,2-NQ 联合染毒相比

图 6 1-NP 单独以及 1-NP 和 1,2-NQ 联合染毒对 A549 细胞内 ROS 水平的影响

Fig. 6 ROS level in A549 cells induced by 1-NP and 1,2-NQ combined with 1-NP

和 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处,呈现出显著性下降。

3 讨论

MTT 方法是评价外源性物质总体毒性的常用方法^[22]。实验结果表明,经 1-NP 染毒 24 h 和 48 h 后, A549 的细胞增殖被显著抑制, 呈现剂量-效应、时间-效应关系; 经 1,2-NQ ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 预处理后的 A549 细胞, 1-NP 对 A549 的增殖抑制作用并没有显著性的变化。LDH 为乳酸脱氢酶, 普遍存在于细胞质中, 当细胞膜受损或是通透性增加时可漏出至细胞外, 因此细胞培养液中 LDH 活性的高低可反映细胞膜的受损程度^[22]。1-NP 单独作用, 或与 1,2-

NQ 联合作用后, 细胞培养上清液中的 LDH 活性与溶剂对照组相比并均没有显著性差异。1-NP 和 1,2-NQ 联合染毒上清液中的 LDH 活性要略低于 1-NP 单独作用的 LDH 活性, 但两组之间没有显著性的差异。以上结果表明, 在该实验的研究浓度、时间下, 细胞膜的受损程度并不显著。

Asare 等^[23]研究了 1-NP 对 Hepa1c1c7 细胞的毒性作用, 研究结果表明, 1-NP ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在 24 h 内能引起细胞形态的显著变化。染毒 6 h 后, 细胞质粒开始液泡化, 诱导细胞的 MARKs 家族的蛋白表达升高, 引起的细胞凋亡是细胞死亡的主要途径。Landvik 等^[24]研究发现 1-NP 和柴油车尾气的有机提取物可以诱发 Hepa1c1c7 细胞凋亡, 并诱导 cyp1a1 的表达。

本研究中采用的彗星实验具有快速、简便、应用范围广和灵敏度高优点, 是检测细胞遗传毒性的常用方法。在本研究使用的是强碱性电泳液 ($\text{pH} > 13$), 通过尾部 DNA 的含量定量表征单个细胞 DNA 损伤的程度, 是单链断裂、双链断裂和碱性不稳定位点的综合损伤结果。该研究的结果显示, 1-NP 可对 A549 细胞造成显著的 DNA 损伤, 随着染毒浓度的升高, DNA 损伤程度显著增加, 并呈现剂量-效应关系 ($P < 0.01$); 经 1,2-NQ 预处理 24 h 能降低 1-NP 对 A549 细胞的 DNA 损伤, 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

“氧化应激”指机体的促氧化与抗氧化之间的不平衡状态: 以促氧化效应为主、抗氧化剂被消耗, 中间会产生大量的 ROS, 通常会导致生物大分子, 如 DNA 的损伤。ROS 主要包括超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、过氧化氢 (H_2O_2) 和羟自由基 ($\cdot\text{OH}$)。为了验证 1-NP 的细胞毒性和遗传毒性是否由细胞的氧化损伤引起的, 利用荧光探针法检测 1-NP 是否会引起 A549 细胞内 ROS 的产生, 实验结果显示, ROS 的水平随着 1-NP 浓度的增加而增加, 呈现显著的剂量-效应关系; 1,2-NQ 与 1-NP 联合作用组, ROS 水平低于 1-NP 单独作用组, 但是仍显著高于对照组。由此推断, 1-NP 可能通过诱导细胞产生大量的 ROS, 造成机体的氧化损伤, 如 DNA 链断裂等, 最终可诱发 A549 细胞死亡。使用 1,2-NQ 预染毒 A549, 降低了 1-NP 产生的 ROS, 从而降低了 DNA 损伤。对于 1-NP 是否可以引起 A549 细胞凋亡或其它死亡途径, 还有待进一步研究。

一些报道表明 1-NP 可以通过产生 ROS 而造成 DNA 损伤, 与该研究结果一致。Andersson 等^[14]

的研究发现较低剂量的 1-NP ($\leq 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可以导致人脐静脉血管内皮细胞 (HUVECs) DNA 损伤, 并显著增强细胞内 ROS 的生成. Kim 等^[25] 发现 1-NP 可以通过诱导 A549 细胞内 ROS 产生, 最终导致细胞内 8-羟基鸟苷 (8-OHdG, DNA 氧化损伤的标记物) 浓度的升高. Su 等^[12] 研究了 1-NP 对 HepG2 细胞的毒性作用, 结果表明 1-NP 被 AKRs 酶代谢活化后与 DNA 形成加合产物, 导致 DNA 损伤; 同时诱导激活 p53 途径, 导致细胞凋亡. Park 等^[13] 研究发现 1-NP 能诱导 BEAS-2B 细胞产生 ROS, 降低 GSH 活性, 诱导促炎症因子 (IL-6, IL-8, TNF- α) 的高表达, 抑制细胞活性.

Shang 等^[26] 的研究结果表明, 利用 1,2-NQ ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 染毒 24 h, A549 细胞的增殖率不受影响, 但会导致 A549 细胞内 ROS 水平和 Ca^{2+} 浓度升高. Cheng 等^[27] 的研究结果表明, 1,2-NQ ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 染毒后可以诱导胞内 ROS 产生及使胞内的过氧化氢酶的升高; 同时导致细胞内的血红素加氧酶-1 (HO-1) 表达上升, HO 系统是炎症发生过程中, 细胞内重要的保护通路之一. Sumi 等^[28] 将 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞用 1,2-NQ 染毒, 发现 1,2-NQ 能抑制核转录因子 NF- κB 的 DNA 结合活性. Endo 等^[29] 发现在牛主动脉内皮细胞 (BAECs) 内, 1,2-NQ 能与转录因子 cAMP 反应元件结合蛋白 CREB 共价结合, 抑制 CREB 的 DNA 结合活性, 从而下调 Bcl-2 基因表达.

在该研究中使用 1,2-NQ 预染毒 A549, 降低了 1-NP 产生的 ROS, 从而降低了 DNA 损伤. 可以理解为 1,2-NQ 预染毒 A549, 诱导胞内的抗氧化酶如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶 (CAT) 等酶活化, 使细胞的抗氧化能力增强, 对细胞形成保护作用, 降低了 1-NP 产生的 ROS, 从而降低了 DNA 损伤. 或是 1,2-NQ 预染毒 A549, 大量的 1,2-NQ 占据有限的结合位点, 从而降低了 1-NP 的结合效率, 1,2-NQ ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的实验浓度几乎无细胞毒性, 因此, 当 1,2-NQ 预染毒 A549 时, 联合毒性低于 1-NP 单独作用细胞时的毒性. 污染物联合毒性效应机制复杂, 不同的污染物化学性质及参与生物化学反应的过程不同, 其详细机制有待于进一步深入研究.

目前, 对 1-硝基芘遗传毒性机制的研究主要集中在细胞对 1-NP 的代谢途径所引起的细胞毒性. 竺乃恺等^[30] 研究了 1-硝基芘和其他 (硝基-) 多环芳烃对 Ames 实验的 6 种菌株的单一和联合致突变性, 结果从一个侧面说明了共存的 PAHs 或 NO_2 -PAHs 并不是

通过改变 1-NP 的代谢途径或代谢酶活性来影响其致突变性, 可能是存在其他的某种原因.

大气颗粒物可引发机体发生氧化应激、诱导 ROS 生成已经在实验室和人体实验中得到了很好的证实^[31]. 近年来不少研究者相继用氧化应激理论来探讨颗粒物的致病作用, 检测颗粒物介导产生的 ROS, 并通过体内体外实验发现 ROS 生成在颗粒物致病过程中发挥着重要作用^[32]. 1-NP 是大气颗粒物重要的有机组分之一, 本研究的结果提示, 1-NP 可通过诱导 ROS 生成, 在大气颗粒物的致病过程中起重要作用. 随着经济和工业的迅速发展, 化石燃料的消耗增长, 硝基多环芳烃的排放会不断增加. 有调研资料表明, 一些城市地区, 大气中多环芳烃和氮氧化物处于较高水平, 这也将导致大气光化学作用产生的硝基多环芳烃相应增加^[33]. 尽管目前尚未见到环境中 1-NP 对人类癌症影响的报道, 也未见到 1-NP 对哺乳动物及其后代研究的报道, 但众多的相关研究表明, 1-NP 能显著地引起细胞的遗传毒性, 因此, 要更加关注环境硝基多环芳烃的环境浓度水平与其相应的健康影响.

4 结论

(1) 1-NP (染毒剂量 1、2、3、4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可显著抑制 A549 细胞增殖, 24 h 和 48 h 的 LC_{50} 分别为 $5.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 但 1-NP 对 A549 细胞 LDH 的漏出率并没有显著影响.

(2) 1-NP (染毒剂量 1、2、3、4 和 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可造成 A549 细胞 DNA 损伤, 呈现剂量-效应关系; 并能显著增强细胞内 ROS 的生成.

(3) 使用 1,2-NQ ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预染毒 24 h, 再使用 1-NP 染毒 24 h, 可显著降低 1-NP 诱导的 A549 细胞内 ROS 生成量, 从而降低 DNA 损伤.

参考文献:

- [1] Pope III C A, Burnett R T, Thun M J, *et al.* Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution[J]. The Journal of the American Medical Association, 2002, **287**(9): 1132-1141.
- [2] Halonen J I, Lanki T, Yli-Tuomi T, *et al.* Particulate air pollution and acute cardiorespiratory hospital admissions and mortality among the elderly[J]. Epidemiology, 2009, **20**(1): 143-153.
- [3] Kan H D, London S J, Chen G H, *et al.* Season, sex, age, and education as modifiers of the effects of outdoor air pollution on daily mortality in Shanghai, China: The public health and air pollution in Asia (PAPA) study[J]. Environmental Health Perspectives, 2008, **116**(9): 1183-1188.

- [4] Pöschl U. Atmospheric aerosols: composition, transformation, climate and health effects[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, **44**(46): 7520-7540.
- [5] Sidhu S, Gullett B, Striebich R, *et al.* Endocrine disrupting chemical emissions from combustion sources: diesel particulate emissions and domestic waste open burn emissions [J]. *Atmospheric Environment*, 2005, **39**(5): 801-811.
- [6] Walgraeve C, Demeestere K, Dewulf J, *et al.* Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter: Molecular characterization and occurrence [J]. *Atmospheric Environment*, 2010, **44**(15): 1831-1846.
- [7] Bonnefoy A, Chiron S, Botta A. Environmental nitration processes enhance the mutagenic potency of aromatic compounds [J]. *Environmental Toxicology*, 2012, **27**(6): 321-331.
- [8] 王帮进, 李怀建, 占洁, 等. 大气气溶胶中硝基多环芳烃分析方法的建立及应用[J]. *环境科学学报*, 2011, **31**(8): 1745-1749.
- [9] Kucab J E, Phillips D H, Arlt V M. Metabolic activation of diesel exhaust carcinogens in primary and immortalized human TP53 knock-in (Hupki) mouse embryo fibroblasts [J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2012, **53**(3): 207-217.
- [10] Durant J L, Busby W F Jr, Lafleur A L, *et al.* Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols [J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 1996, **371**(3-4): 123-157.
- [11] 李淑贤, 王新明, 徐海娟. 1-硝基芘对外周血淋巴细胞 DNA 的损伤[J]. *环境与健康杂志*, 2009, **26**(5): 383-384.
- [12] Su J G, Liao P J, Huang M C, *et al.* Aldo-keto reductase 1G2 is essential for 1-nitropyrene's but not for benzo [a] pyrene's induction of p53 phosphorylation and apoptosis[J]. *Toxicology*, 2008, **244**(2-3): 257-270.
- [13] Park E J, Park K. Induction of pro-inflammatory signals by 1-nitropyrene in cultured BEAS-2B cells[J]. *Toxicology Letters*, 2009, **184**(2): 126-133.
- [14] Andersson H, Piras E, Demma J, *et al.* Low levels of the air pollutant 1-nitropyrene induce DNA damage, increased levels of reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress in human endothelial cells [J]. *Toxicology*, 2009, **262**(1): 57-64.
- [15] Eiguren-Fernandez A, Miguel A H, Lu R, *et al.* Atmospheric formation of 9, 10-phenanthraquinone in the Los Angeles air basin [J]. *Atmospheric Environment*, 2008, **42**(10): 2312-2319.
- [16] Jakober C A, Riddle S G, Robert M A, *et al.* Quinone emissions from gasoline and diesel motor vehicles [J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, **41**(13): 4548-4554.
- [17] Shang Y, Chen C Y, Li Y, *et al.* Hydroxyl radical generation mechanism during the redox cycling process of 1, 4-naphthoquinone [J]. *Environmental Science and Technology*, 2012, **46**(5): 2935-2942.
- [18] Shang Y, Fan L L, Feng J L, *et al.* Genotoxic and inflammatory effects of organic extracts from traffic-related particulate matter in human lung epithelial A549 cells: The role of quinones [J]. *Toxicology in Vitro*, 2013, **27**(2): 922-931.
- [19] Li Y, Zhu T, Zhao J C, *et al.* Interactive enhancements of ascorbic acid and iron in hydroxyl radical generation in quinone redox cycling [J]. *Environmental Science and Technology*, 2012, **46**(18): 10302-10309.
- [20] Tice R R, Agurelle E, Anderson D, *et al.* Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing [J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2000, **35**(3): 206-221.
- [21] 尚羽, 张玲, 范兰兰, 等. 大气颗粒物对 A549 和 HUVEC 的 DNA 损伤机制[J]. *上海大学学报(自然科学版)*, 2013, **19**(4): 411-416.
- [22] 金帮明, 王辅明, 熊力, 等. 五氯酚对 HeLa 细胞毒性及 DNA 损伤的研究[J]. *环境科学*, 2012, **33**(2): 658-664.
- [23] Asare N, Tekpli X, Rissel M, *et al.* Signalling pathways involved in 1-nitropyrene (1-NP)-induced and 3-nitrofluoranthene (3-NF)-induced cell death in Hepa1c1c7 cells [J]. *Mutagenesis*, 2009, **24**(6): 481-493.
- [24] Landvik N E, Gorria M, Arlt V M, *et al.* Effects of nitrated-polycyclic aromatic hydrocarbons and diesel exhaust particle extracts on cell signalling related to apoptosis: Possible implications for their mutagenic and carcinogenic effects [J]. *Toxicology*, 2007, **231**(2-3): 159-174.
- [25] Kim Y D, Ko Y J, Kawamoto T, *et al.* The effects of 1-nitropyrene on oxidative DNA damage and expression of DNA repair enzymes [J]. *Journal of Occupational Health*, 2005, **47**(3): 261-266.
- [26] Shang Y, Zhang L, Jiang Y T, *et al.* Airborne quinones induce cytotoxicity and DNA damage in human lung epithelial A549 cells: The role of reactive oxygen species [J]. *Chemosphere*, 2014, **100**: 42-49.
- [27] Cheng W Y, Currier J, Bromberg P A, *et al.* Linking oxidative events to inflammatory and adaptive gene expression induced by exposure to an organic particulate matter component [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2012, **120**(2): 267-274.
- [28] Sumi D, Akimori M, Inoue K-I, *et al.* 1, 2-Naphthoquinone suppresses lipopolysaccharide-dependent activation of IKK β /NF- κ B/NO signaling: an alternative mechanism for the disturbance of inducible NO synthase-catalyzed NO formation [J]. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2010, **35**(6): 891-898.
- [29] Endo A, Sumi D, Kumagai Y. 1, 2-Naphthoquinone disrupts the function of cAMP response element-binding protein through covalent modification [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, **361**(1): 243-248.
- [30] 竺乃恺, 张朝, 夏希娟, 等. 1-硝基芘和多环芳烃联合致突变性的研究[J]. *环境科学学报*, 2000, **20**(5): 612-615.
- [31] Maier K L, Alessandrini F, Beck-Speier I, *et al.* Health effects of ambient particulate matter-Biological mechanisms and inflammatory responses to in vitro and in vivo particle exposures [J]. *Inhalation Toxicology*, 2008, **20**(3): 319-337.
- [32] 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.
- [33] Chan C K, Yao X. Air pollution in mega cities in China [J]. *Atmospheric Environment*, 2008, **42**(1): 1-42.

CONTENTS

Variation Characteristics of Surface Ozone and Its Precursors During Summertime in Nanjing Northern Suburb	SHAO Ping, AN Jun-lin, YANG Hui, <i>et al.</i> (4031)
Distribution Characteristics of Pollution Gases and Water Soluble Ion in Aerosol During the Asian Youth Games of Nanjing, China	ZOU Jia-nan, AN Jun-lin, WANG Hong-lei, <i>et al.</i> (4044)
Aerosol Concentration Variation in Nanjing During Asian Youth Games and the Relationship Between Aerosol Concentration and Visibility	YUAN Liang, YIN Yan, LI Qi, <i>et al.</i> (4052)
Characteristic Analysis of a Multi-day Pollution Event in Chang-Zhu-Tan Metropolitan Area During October 2013	LIAO Zhi-heng, FAN Shao-jia, HUANG Juan, <i>et al.</i> (4061)
Application of On-line Single Particle Aerosol Mass Spectrometry (SPAMS) for Studying Major Components in Fine Particulate Matter	FU Huai-yu, YAN Cai-qing, ZHENG Mei, <i>et al.</i> (4070)
Establishment and Application of Replaceable Source Profiles of PM ₁₀	CHEN Qiang, JING Yi, WU Huan-bo, <i>et al.</i> (4078)
Distribution, Flux and Biological Consumption of Carbon Monoxide in the East China Sea and the South Yellow Sea in Summer	WANG Jing, LU Xiao-lan, YANG Gui-peng, <i>et al.</i> (4085)
Spatial and Temporal Distribution of Mercury in Water of a Small Typical Agricultural Watershed in the Three Gorges Reservoir Region	WANG Ya, ZHAO Zheng, MU Zhi-jian, <i>et al.</i> (4095)
Fluorescence Characteristics of Fractionated Colloidal Organic Matter in Freshwater from Hunhe and Taizihe Watersheds	LIU Na-na, LI Bin, LIU Rui-xia, <i>et al.</i> (4103)
Variations of Annual Load of TN and TP in the Deep Bay Watershed, Shenzhen	ZHAO Chen-chen, ZHANG Shi-yan, MAO Xian-zhong (4111)
Characteristics and Bioavailability of Organic Phosphorus from Different Sources of Sediments in Dianchi Lake	XIONG Qiang, JIAO Li-xing, WANG Sheng-rui, <i>et al.</i> (4118)
Heavy Metals Distribution Characteristics and Ecological Risk Evaluation in Surface Sediments of Dammed Jinshan Lake	ZHOU Xiao-hong, LIU Long-mei, CHEN Xi, <i>et al.</i> (4127)
Vertical Distribution Pattern and Ecological Risk Assessment of Heavy Metals in a Sediment Core from Pumoyum Co, Tibet	XIE Ting, LUO Dong-xia, YANG Rui-qiang (4135)
Heavy Metals Pollution and Analysis of Seasonal Variation Runoff in Xi'an	YUAN Hong-lin, LI Xing-yu, WANG Xiao-chang (4143)
Distribution and Source Apportionment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Urban Rainfall Runoff	WU Zi-lan, YANG Yi, LIU Min, <i>et al.</i> (4148)
Influence of the Substrate Composition in Extensive Green Roof on the Effluent Quality	CHEN Yu-lin, LI Tian, GU Jun-qing (4157)
Investigation of the Microbial Diversity and Structure of Biological Activated Carbon from Different Sources in Drinking Water Treatment Process	DU Er-deng, ZHENG Lu, FENG Xin-xin, <i>et al.</i> (4163)
Microcystin Safety Study During <i>Cyanobacteria</i> Removal by Pressure Enhanced Coagulation Process	JIANG Xin-yue, LUAN Qing, CONG Hai-bing, <i>et al.</i> (4171)
Membrane Fouling Based on Change of Membrane Characteristic Parameters During Ultrafiltration of Protein	WANG Xu-dong, ZHANG Yin-hui, WANG Lei, <i>et al.</i> (4176)
Impact Factors and Degradation Mechanism for the Ozonation of Acetaminophen in Aqueous Solution	CAO Fei, YUAN Shou-jun, ZHANG Meng-tao, <i>et al.</i> (4185)
Degradation of Benzothiazole in Electro-Assisted Microbial Reactor	LIU Chun-miao, DING Jie, LIU Xian-shu, <i>et al.</i> (4192)
Preparation and Evaluation of Fe-La Composite Oxide Nanoabsorbent for As(III) Removal from Aqueous Solutions	ZHANG Wei, CHEN Jing, ZHANG Gao-sheng (4198)
Physiological Responses of Tubificidae to Heavy Metal Chromium Stress	LOU Ju-qing, YANG Dong-ye, CAO Yong-qing, <i>et al.</i> (4205)
Effects of Light Quality on the Growth Characteristics and Biochemical Component of <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	TANG Qing-qing, FANG Zhi-guo, JI Wen-wen, <i>et al.</i> (4212)
Influence of Alkalinity and DO on ANAMMOX Bioreactor at Normal Temperature and Low Substrate Concentration	REN Yu-hui, WANG Ke, LI Xiang-kun, <i>et al.</i> (4218)
Effect of Fe ²⁺ and Fe ³⁺ on the Activity of ANAMMOX	LI Xiang, HUANG Yong, WU Chuan, <i>et al.</i> (4224)
Research on Change Process of Nitrosation Granular Sludge in Continuous Stirred-Tank Reactor	YIN Fang-fang, LIU Wen-ru, WANG Jian-fang, <i>et al.</i> (4230)
Effects of Salinity on N ₂ O Production During Nitrification Using Aerobic Granular Sludge	WANG Shan-shan, LIANG Hong, GAO Da-wen (4237)
Analysis of Microbial Community Variation in the Domestication Process of Sludge in a Sulfate-reducing Reactor	ZENG Guo-qu, JIA Xiao-shan, ZHENG Xiao-hong, <i>et al.</i> (4244)
Quantifying the Influence of Different Matrices on Pb Accumulation in the Soil from Nanjing and Suspended Matter from the Lower of the Yangtze River with Pb Isotopic Technique	WANG Cheng, XIA Xue-qi, ZHANG Yi, <i>et al.</i> (4251)
Contamination Characteristics of Fluoroquinolones in Different Kinds of Soil Profiles in Southeast Suburb of Beijing	SU Si-hui, HE Jiang-tao, YANG Lei, <i>et al.</i> (4257)
Effect of Environmental Factors on the Formation of Several Typical Tetracycline Resistance Genes in Soil	ZHANG Jun, LUO Fang-yuan, XIONG Hao-hui, <i>et al.</i> (4267)
Response of Nitrification/Denitrification and Their Associated Microbes to Soil Moisture Change in Paddy Soil	LIU Ruo-xuan, HE Ji-zheng, ZHANG Li-mei (4275)
Microbial Community Abundance and Diversity in Typical Karst Ecosystem to Indicate Soil Carbon Cycle	JIN Zhen-jiang, TANG Hua-feng, LI Min, <i>et al.</i> (4284)
Effects of Variable Temperature on Organic Carbon Mineralization in Typical Limestone Soils	WANG Lian-ge, GAO Yan-hong, DING Chang-huan, <i>et al.</i> (4291)
Influence of the Interaction Between Iron Oxide and Electron Donor Substances on 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(<i>p</i> -chlorophenyl)ethane (DDT) Reductive Dechlorination in Hydragic Acrisols	LIU Cui-ying, XU Xiang-hua, WANG Zhuang, <i>et al.</i> (4298)
Continuous Remediation of Heavy Metal Contaminated Soil by Co-Cropping System Enhanced with Chelator	WEI Ze-bin, GUO Xiao-fang, WU Qi-tang, <i>et al.</i> (4305)
Spatial Heterogeneity of Soil Respiration in a Subalpine Meadow at Different Sampling Scales	LI Hong-jian, GAO Yu-feng, YAN Jun-xia, <i>et al.</i> (4313)
Study on Regularity of Greenhouse Gas Emissions from Black Soil with Different Reclamation Years	LI Ping, LANG Man, XU Xiang-hua, <i>et al.</i> (4321)
Comparison Between Transgenic Insect-Resistant Cotton Expressing CryI _{Ac} Protein and Its Parental Variety in Rhizospheric Fungal Diversity	PAN Jian-gang, JIAO Hai-hua, BAI Zhi-hui, <i>et al.</i> (4329)
Concentrations of Mercury in Ambient Air in Wastewater Irrigated Area of Tianjin City and Its Accumulation in Leafy Vegetables	ZHENG Shun-an, HAN Yun-lei, ZHENG Xiang-qun (4338)
Combined Effects of 1-Nitropyrene and 1,2-Naphthoquinone on Cytotoxicity and DNA Damage in A549 Cells	SHANG Yu, JIANG Yu-ting, ZHANG Ling, <i>et al.</i> (4345)
Influence of Organic Matter Evolution During Composting on the Bioavailability of Heavy Metals	BU Gui-jun, YU Jing, DI Hui-hui, <i>et al.</i> (4352)
Carbonization of Heavy Metal Cu Implanted Sewage Sludge and Stability of Heavy Metal in the Resulting Char	DOU Xiao-min, CHEN De-zhen, DAI Xiao-hu (4359)
Technological Characteristics of Bioreactor Landfill with Aeration in the Upper Layer	TIAN Ying, WANG Shen, XU Qi-yong (4365)
Impact of Nitrate Continuous Injection on N ₂ O Releases from Bioreactor Landfill	BIAN Rong-xing, SUN Ying-jie, LI Jing-jing, <i>et al.</i> (4371)
Research on Contribution Decomposition by Industry to China's Carbon Intensity Reduction and Carbon Emission Growth	JIANG Jing-jing, YE Bin, JI Jun-ping, <i>et al.</i> (4378)
Shifting Path of Industrial Pollution Gravity Centers and Its Driving Mechanism in Pan-Yangtze River Delta	ZHAO Hai-xia, JIANG Xiao-wei, CUI Jian-xin (4387)
Method for Environmental Management in Paper Industry Based on Pollution Control Technology Simulation	ZHANG Xue-ying, WEN Zong-guo (4395)
Research Progress and Direction of Atmospheric Brown Carbon	YAN Cai-qing, ZHENG Mei, ZHANG Yuan-hang (4404)

《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 汤鸿霄 陈吉宁 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)

2014年11月15日 第35卷 第11期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 35 No. 11 Nov. 15, 2014

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. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. 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: 90.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行