

细胞体外暴露试验在吸入毒理学研究中的应用进展

冯红敏^{1,2,3}, 胡玥^{1,2,3}, 盛云华³, 唐黎明^{2,3*}, 陈桂良⁴ (1.复旦大学药学院, 上海 201203; 2.中国医药工业研究总院, 上海 201203; 3.上海市食品药品检验所药理毒理室, 上海 201203; 4.上海药品审评核查中心, 上海 201203)

摘要: 吸入毒理学主要研究气体、蒸气和气溶胶等可吸入物质进入呼吸道后对生物体产生的不良反应。当前, 由于对实验动物伦理和福利的倡导, 体外替代方法受到越来越多的关注。吸入毒理学的体外替代方法常用细胞体外暴露试验, 其中体外模型的构建以及毒性评估至关重要。而研究可吸入物质对呼吸道的不良反应需要模拟呼吸道细胞在体内生长的微环境, 然后将细胞暴露于上述物质中, 因此吸入毒理学对细胞模型及体外暴露装置提出了更高的要求。目前, 体外细胞模型从原代细胞、细胞系扩大为共培养及商品化模型。针对细胞体外暴露试验现已开发多种气液界面暴露系统, 并且可实现的暴露时间也已经进一步延长。本文针对呼吸道体外模型及应用、气液界面培养及暴露系统、试验检测指标等方面对近年来国内外细胞体外暴露试验应用于吸入毒理学的研究进展进行综述。

关键词: 吸入毒理学; 呼吸道体外模型; 气液界面; 暴露; 检测指标

中图分类号: R99 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)05-0617-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.05.022

引用本文: 冯红敏, 胡玥, 盛云华, 等. 细胞体外暴露试验在吸入毒理学研究中的应用进展[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(5): 617-624.

Application Progress of *in Vitro* Cell Exposure Test in Inhalation Toxicology

FENG Hongmin^{1,2,3}, HU Yue^{1,2,3}, SHENG Yunhua³, TANG Liming^{2,3*}, CHEN Guiliang⁴ (1.School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China; 2.China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China; 3.Department of Pharmacology & Toxicology, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China; 4.Shanghai Center for Drug Evaluation and Inspection, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: Inhalation toxicology mainly studies toxic reaction of inhalable substances such as gases, vapors and aerosols to the organism after entering respiratory tract. Currently, *in vitro* alternative methods are attracting more and more attention due to the advocacy of ethics and welfare for laboratory animals. For *in vitro* alternatives in inhalation toxicology, the most commonly used method is *in vitro* cell exposure test, in which model construction and toxicity assessments are critical. Studying toxic effects of inhalable substances on respiratory tract requires simulating the micro-environment where respiratory epithelial cells grow *in vivo*, then exposing cells to substances. Therefore, inhalation toxicology puts higher demands on cell models and *in vitro* exposure devices. At present, *in vitro* cell models have expanded from primary cells, cell lines to co-culture and commercial cell models; a variety of air-liquid interface exposure systems have been developed, exposure time is further extended as well. In this paper, the progress of *in vitro* cell exposure test applied to inhalation toxicology is reviewed, including the application of *in vitro* model of respiratory tract, air-liquid interface culture, exposure systems and detection indexes.

KEYWORDS: inhalation toxicology; *in vitro* model of respiratory tract; air-liquid interface; exposure; detection indexes

吸入气体、蒸气和气溶胶等物质可能会引起人体刺激性反应甚至诱发全身性疾病, 从而对人类健康产生不利影响^[1]。室内外空气中存在着大量这样的化学物质和复杂混合物, 尤其是随着各类吸入型制剂的发展, 电子烟市场的兴起, 纳米粒子、纳米纤维等新材料的引入, 情况更是不容乐观, 人类的生命健康问题受到前所未有的挑战。

当前, 吸入毒理学研究仍以传统的在体动物试验为主, 应用实验动物进行口鼻式吸入染毒或整体暴露染毒^[2]。然而动物试验操作复杂、周期长、成本较高, 而且动物与人体之间存在种属差异、呼吸道结构功能差异等问题。与之相比, 用于毒性评估的体外替代试验用时短, 试验条件和因素较为可控, 试验设计相对方便; 通过对离体细胞或

基金项目: 中国烟草总公司科技重大专项[110201501002(XX-02)]; 云南省烟草化学重点实验室 2017 年度开放基金项目(KCFZ-2017-1096)

作者简介: 冯红敏, 女, 硕士生 Tel: 18621825957 E-mail: hmfeng16@fudan.edu.cn *通信作者: 唐黎明, 男, 硕士, 主任药师 Tel: (021)50798172 E-mail: tangliming@sifdc.org.cn

组织的培养,可以对受试物毒性或其他相关特性进行准确、定量的研究,同时践行了减少(reduction)、优化(refinement)和替代(replacement)的3R原则^[3-4]。

上世纪,国内外对于体外替代方法开展了大量研究,美国替代方法验证国际协作委员会(ICCVAM)、欧盟替代试验评估中心(ECVAM)、日本替代方法验证中心(JaCVAM)及经济合作与发展组织(OECD)化学品检验指南的官方网站上收录了一系列的体外替代研究方法^[5-7]。尽管吸入毒理学体外替代研究更具挑战性,但新近发展的细胞体外暴露试验为其提供了更多的可能性。在欧盟,细胞体外暴露试验已应用于替代化学品及化妆品领域的动物试验研究,进而在细胞水平了解毒理、生理及药理上的变化影响。本文从呼吸道体外模型及应用、气液界面(air-liquid interface, ALI)培养及暴露系统、试验检测指标等方面就近年来国内外细胞体外暴露试验应用于吸入毒理学的研究进展进行综述。

1 常用呼吸道体外模型及应用

1.1 呼吸道上皮细胞模型

常用呼吸道上皮细胞包括体内分离的原代细胞和永生化细胞系。原代上皮细胞代表的微环境使其成为建立体外细胞或组织模型的最佳选择^[8]。然而,将原代细胞从呼吸道组织中分离出来时,细胞的数量往往是主要限制因素,难以完成大型或是重复性的研究。相比较而言,永生化细胞系在培养过程中更加稳定,成本显著降低,而且不同试验之间的差异性也较小。可应用于体外暴露试验的细胞系有16HBE14o-、A549、RPMI 2650、BEAS-2B、Calu-3、CHL、NCI-H441、NCI-H292等。

1.1.1 16HBE14o- 16HBE14o-细胞系是一种广泛使用的支气管上皮细胞系。Schmid等^[9]体外培养16HBE14o-细胞,然后将其暴露于脂质体包裹的免疫抑制药物(L-CsA)气溶胶中。结果发现暴露24 h后16HBE14o-的细胞活力并未受损,免疫荧光染色的结果显示对照组及L-CsA暴露组细胞形态学均不受影响,且呈现正常上皮细胞形态。Usemann等^[10]将16HBE14o-细胞暴露于配置汽油颗粒过滤器(gasoline particle filter, GPF)的汽车尾气中6 h,研究GPF对尾气成分和气道毒性的影响,并分析细胞毒性、细胞表面受体表达、细胞内标记物、DNA氧化损伤、基因表达等指标的变

化。通过比较对照组(无GPF的汽车尾气)和GPF组(配置GPF的汽车尾气)之间的免疫和细胞毒效应,发现2组在细胞毒性、细胞表面受体表达、基因表达和氧化应激效应之间没有显著差异,但GPF减少了尾气对细胞DNA的氧化损伤,降低了致癌风险。Platel等^[11]应用不同细胞系评估吸入纳米颗粒(nanoparticles, NPs)的毒性,研究发现与L5178Y及TK6细胞相比,16HBE14o-细胞更适合吸入NPs的体外筛选,因此认为可选择16HBE14o-细胞进行吸入NPs的毒理学研究。

1.1.2 A549 源自于人肺腺癌的A549细胞(ATCC, No.CCL-185)是最常用的肺泡上皮细胞系。Lenz等^[12]利用A549细胞对吸入治疗的新候选药物蛋白酶抑制剂硼替佐米进行药效研究,结果显示雾化硼替佐米具有明显的抗炎作用,并且在ALI培养条件下具有较好的吸收动力学。Aufderheide等^[13]通过Cultex[®]-RFS暴露系统将A549细胞分别暴露于乳糖一水合物、硫酸铜(II)、氧化铜(II)的微米和纳米颗粒。结果显示,所有的铜化合物均会产生细胞不良反应,微米和纳米级的氧化铜(II)使细胞存活率降低且呈剂量相关性,而纳米级颗粒能够更大程度地降低细胞代谢活性。Sambale等^[14]应用Cultex[®]-RFS暴露系统将A549细胞分别暴露于ZnO和TiO₂纳米颗粒中,并对动态和静态培养条件下的细胞活力、细胞形态和黏附性的变化进行比较。研究认为,与静态培养条件相比,动态培养条件对于外界刺激反应更加灵敏,且结果的相关性更好。

1.1.3 RPMI 2650 目前,仅有一种用于体外研究的鼻上皮细胞系,即人鼻细胞系RPMI 2650(ATCC, No.CCL30),它由鼻中隔鳞状细胞癌衍生而来。RPMI 2650的核型和细胞角蛋白多肽模式与正常人鼻上皮细胞非常相似,常作为研究鼻腔给药吸收和耐受性的体外模型^[8]。Stützle等^[15]通过体外暴露系统将RPMI 2650暴露于蛋白质气溶胶,进而开发了一套研究蛋白质气溶胶的测试系统,用来考察不同浓度、分子量和制剂条件下蛋白质的转运比,结果显示由RPMI 2650组成的体系较适合蛋白制剂的体外研究。Tilly等^[16]应用RPMI 2650细胞研究了TiO₂纳米丝对呼吸道的影响,并评估了纳米管、纳米线、纳米棒、纳米颗粒的不良反应。结果表明纳米材料的分散方法可能与吸入体外毒性相关,通过微流体法分散的纳

米材料在所有测试浓度下对 RPMI 2650 细胞无不良反应, 而通过超声处理分散的纳米线和纳米管在高浓度时使细胞存活率降低。

1.1.4 BEAS-2B BEAS-2B 细胞(ATCC, NO.CRL-9609)是 SV40 永生化的人正常支气管上皮细胞系, 该细胞系已被用于支气管上皮结构和药物代谢酶的表达及活性的研究。Yu 等^[17]将 BEAS-2B 细胞以低、中、高不同流速($0.15, 0.6, 0.9 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$)暴露于室内产生的二次有机气溶胶(secondary organic aerosols, SOA)中 30 min。结果显示, 在低流速下, 2 组细胞的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放量最低; 3 种流速下, SOA 暴露组中观察到 LDH 的释放与 RNA 完整性具有相关性。结果证明 $0.15 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 是该实验条件下最合适的流速, BEAS-2B 在该条件下相对最稳定。Zhang 等的研究报道^[18], ALI 条件下, BEAS-2B 暴露于全烟烟雾后会诱发氧化应激反应, 同时产生细胞毒性, 就暴露后的细胞毒性而言, BEAS-2B 细胞比 A549 细胞更敏感。

1.2 3D 共培养组织模型

1.2.1 MucilAir™ MucilAir™是一种允许长期、重复暴露的 3D 组织模型, 该模型是通过提取分离人鼻腔、气管和支气管原代细胞, 来模拟人呼吸道上皮细胞的商品化共培养细胞模型。MucilAir™具有基底细胞、杯状细胞和纤毛细胞以及分泌黏液的功能, 并且具有纤毛摆动、紧密连接、活性离子转运、代谢活性/解毒(CYP450)和细胞因子/趋化因子/金属蛋白酶释放等特征。该模型可维持细胞功能>1 年, 因此可用于长期和重复暴露研究。Kooter 等^[19]研究表明 BEAS-2B 和 A549 细胞对暴露于空气和暴露于 CeO_2 颗粒所引起的细胞毒性、炎症和遗传毒性较为敏感, 而 MucilAir™对前者不敏感并且仅在暴露于 CeO_2 颗粒后发生氧化应激反应, 同时 MucilAir™的基因表达情况基本不受暴露的影响。推测是由于 MucilAir™内具有其他细胞中不存在的细胞外防御机制(如完整的黏液体系统)所致。有学者应用该模型暴露于室内污染物中, 每天暴露 1 h, 每周 5 d, 共 4 周, 研究结果显示, 这种复杂的体外模型(Mucil Air™)非常适合研究室内污染物对呼吸系统的影响^[20]。

1.2.2 EpiAirway™ EpiAirway™与 MucilAir™类似, 是与人体上呼吸道生物学相关的体外 3D 组织模型。Ren 等^[21]报道 EpiAirway™是非永生化且

分化良好的人类呼吸道上皮组织模型, 包含紧密连接、杯状细胞、纤毛和非纤毛上皮细胞等, 由于其来自人类气管/支气管细胞, 因此认为它可以代表人类上呼吸道组织的结构与功能。Neilson 等^[22]将 EpiAirway™组织分别暴露于香烟烟雾与 2 种商业电子烟气溶胶中, 暴露时间长达 6 h。研究发现暴露于香烟烟雾后, 细胞活力降低至 12%且呈时间依赖性; 而暴露于电子烟后未有明显变化, 且出现与空气对照组相似的结果, 从而得出在相同的暴露时间内, 与暴露于香烟烟雾相比, 电子烟气溶胶具有较低细胞毒性的结论。Jackson 等^[23]使用该模型进行急性吸入毒性测试的预验证, 结果证明 EpiAirway™毒性试验对识别危险有毒化学物质和/或呼吸道腐蚀物的灵敏度较高, 并且认为其能识别特异性靶向非呼吸器官(例如神经因子)的剧毒化学物质。

1.2.3 其他 Aufderheide 等^[24]构建了 3D 共培养分化模型(由正常原代人细支气管上皮细胞与人肺成纤维细胞组成), 并将其暴露于非致死浓度的卷烟主流烟气中, 每天 1 次, 每天 4 支, 每周 5 d, 重复暴露 4, 8, 13 次后取样, 实验周期为 2.5 周, 通过组织病理学方法进行分析。结果显示, 与对照组(清洁空气和培养箱对照)相比, 暴露组纤毛及分泌黏液的细胞减少; 暴露阶段结束时, 观察到非增殖区角蛋白(CK13)抗体强阳性表达, 提示正常支气管上皮细胞向角化过渡(上皮化生), 而对照组并未出现类似的表型变化。

Bisig 等^[25]将多细胞人肺模型(16HBE14o-细胞系、巨噬细胞和树突细胞)直接暴露于动态的环境空气中, 每天 12 h 连续暴露 3 d, 以评估夏季和冬季环境空气对细胞的不利影响。研究发现, 与夏季相比, 在冬季空气中观察到的颗粒数量更多, 颗粒物质质量和氮氧化物水平更高; 暴露于夏季空气和短期冬季空气的细胞仍保持良好的细胞活力, 但是暴露于冬季空气 3 d 后, 细胞活力受损; 暴露于夏季空气的细胞的氧化应激反应或促炎因子水平未显著上调, 而在冬季空气中暴露 2 d 后, 细胞的氧化应激反应增强, 并且其炎症因子水平暴露 12 h 后升高。

事实上, 可供选择的细胞模型具有多样性, 可以根据关注的靶部位和试验条件来选择细胞模型。一方面, 在实验技术、细胞数量等条件允许的情况下, 可选择原代呼吸道上皮细胞模型进行

研究。另一方面,在不同细胞系的选择上,可使用鼻上皮细胞系(RPMI 2650)研究可吸入物质对鼻部的影响;使用支气管上皮细胞(16HBE14o-, BEAS-2B)或人肺腺癌 A549 细胞(A549)评估其对下呼吸道炎症和刺激的影响;使用单核细胞或巨噬细胞(Mono-Mac-6, THP-1)评估其是否产生呼吸致敏作用^[20]。而 3D 气道组织模型(MucilAir™, EpiAirway™)及共培养分化模型可用于研究对上呼吸道结构和功能(如纤毛摆动及黏液分泌功能)的影响,并且此类复杂模型尤其适合长期和/或重复剂量的体外暴露试验。

2 三维细胞培养之 ALI 培养

经典的二维细胞培养模式通常是将细胞浸没在液态基质中进行培养,无法模拟呼吸道上皮细胞的真实暴露过程,该方式缺乏源组织微环境从而导致细胞结构与体内存在显著差异,同时浸没条件也可能影响待检测受试物的理化性质。而 ALI 培养通常将细胞接种在 Transwell 培养皿中,细胞表面完全接触空气,细胞仅通过底部培养基获取营养物质,由于这种方式能更好地模拟呼吸道的真实情况,通过此方式获得的细胞在形态和生理功能上往往更接近机体的正常细胞。

李茂中等^[26]通过 ALI 培养原代人气管上皮细胞,研究发现其形态学、黏蛋白(MUC5AC)和Ⅳ型β-微管蛋白(β-tubulin Ⅳ)的表达及紧密连接与假复层的形成情况均与气管组织结构类似,且细胞能在较长时间内维持其正常的形态及功能。Mao 等^[27]首次证明 ALI 培养方式可以诱导冷冻保存的哺乳动物气管上皮细胞纤毛再生,并且新生纤毛具备正常纤毛活性和细胞调节功能。Hui 等^[28]通过 ALI 方式培养人原代鼻上皮细胞,构建了体外鼻上皮细胞模型,并应用该模型研究鼻部炎症反应和药物转运情况,同时量化了药物对纤毛运动的影响。Lin 等^[29]通过 ALI 方式培养人支气管上皮细胞,通过肌动蛋白(Actin)染色证实单层细胞形成了紧密连接,并且发现模型药物的表观渗透系数随着亲脂性的增加而显著增加,且表现出良好的线性关系。因此认为该细胞模型是评估气道递送药物的合适模型,且优于其他P-糖蛋白过度表达的细胞模型。ALI 培养目前被认为是培养呼吸道上皮细胞的标准方法,该方法为吸入毒理学的研究提供了良好的技术平台。

3 细胞体外暴露试验的暴露系统

近年来,吸入毒理学的研究促进了细胞体外暴露技术的发展,尤其是 ALI 暴露系统。细胞通过 Transwell 膜技术进行 ALI 培养,继而应用暴露系统将其暴露于可吸入物质进行染毒。由于染毒时细胞表面暴露于染毒物质,膜基底面处于培养基中,因此该方式模拟了可吸入物质进入人体内的过程。现已开发多种商业化的 ALI 暴露系统,用以评估颗粒或气态污染物、气溶胶等对细胞毒性的影响。各暴露模块用于沉降颗粒的机制不同,包括扩散、沉降、云沉降和静电沉淀等,见表 1。研究显示^[30]所有暴露系统都出现基本沉积现象并且在暴露后显示出阳性反应,但是由于缺乏对 ALI 暴露系统的标准化测试,以及实验室内部暴露系统存在对外使用限制,因此很难对各系统进行评估比较。现针对细胞体外暴露试验各领域广泛使用的 2 种暴露系统 Cultex[®]和 VitroCell[®]进行介绍。

表 1 ALI 暴露系统及沉积机制

Tab. 1 ALI exposure systems and sedimentation mechanism

暴露系统	沉积机制
ALICE [®]	云沉降
Cultex [®] CG	扩散和沉降
Cultex [®] RFS	扩散和沉降
VitroCell [®]	扩散和沉降
BAT [®]	静电沉淀
EPDEX [®]	静电沉淀
NACIVT [®]	静电沉淀
Modified EAVES [®]	静电沉淀
EAVES [®]	静电沉淀

3.1 Cultex[®]暴露系统

Aufderheide 等开发了第 1 代 Cultex[®]细胞暴露系统。Cultex[®]提供多种暴露模块,新近发展起来的辐射流模块 RFS(Cultex[®]-RFS)尤其适合可吸入颗粒物的体外研究,并且能够准确控制培养基的流量。其特征在于模块化结构,主要由 4 个部分组成,自上而下依次为入口适配器、气溶胶引导模块、细胞样品模块和底座模块和带手轮的锁定模块^[13]。Aufderheide 等^[31]进一步开发了全自动细胞长期培养系统(Cultex[®] LTC-C),该系统由计算机控制独立运行,可以自动供应培养基,能有效地降低污染的风险,消除培养过程中的不可控因素,为细胞培养提供了可重复、可控及稳定的培养条件;应用该系统将原代人支气管上皮细胞进行 ALI

培养, 培养至 38 d 细胞就能成功分化出功能性纤毛并分泌黏液, 其优势在于细胞可同步进行 ALI 培养和体外暴露试验。

Steinritz 等^[32]应用 Cultex[®]-RFS 将 A549 暴露于含不同浓度的金属粉尘(纳米和微米级粒子)的空气中, 暴露 24 h 后评估细胞活力, 同时对实验室内部和室间重现性进行考察。研究结果显示 Cultex[®]-RFS 具有普遍适用性, 符合 ECVAM 对于测试稳定性的要求, 并且暴露系统具有良好的鲁棒性, 实验室内部和室间也具有较好的重现性。Aufderheide 等使用的 Cultex[®] 暴露系统包括以下几个部分: 控制中心, 粉尘发生器, 淘析器, 暴露模块, 培养基泵, 结构见图 1。粉尘发生后, 淘析器可以通过沉降作用将气溶胶中的大颗粒物移除, 培养基泵可以自动吸取培养基为细胞供给营养, 细胞在暴露模块暴露于气溶胶, 进而完成细胞体外暴露试验^[13]。Deschl 等^[33]应用 Cultex[®] 暴露系统评估治疗性气雾剂的药理和毒理作用, 认为该系统是化合物早期筛选和体外药效及不良反应评估的有效工具。

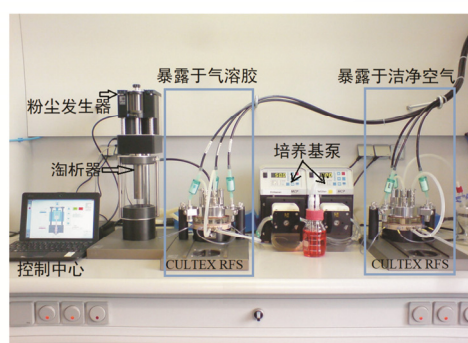


图 1 Cultex[®]应用于细胞暴露试验装置图^[13]

Fig. 1 Installation diagram of Cultex[®] in cell exposure test^[13]

3.2 VitroCell[®]暴露系统

VitroCell[®]所有的暴露模块均采用与 Cultex[®]共享的“喇叭”技术, 将气溶胶引导至细胞表面, 使模块内部产生有效的扩散和沉积。它适用于体外培养的上皮细胞(如呼吸道上皮细胞)在 ALI 条件下直接暴露于气体、混合物、颗粒物、气溶胶等的毒理学研究, 广泛应用于制药、大气环境, 尤其是烟草等领域的研究。

Loret 等^[34]应用 VitroCell[®]暴露系统将 A549 细胞暴露于气溶胶中, 来评估几种难溶性纳米材料的毒性。混悬液通过喷雾器雾化后发生气溶胶,

干燥器将气溶胶干燥后使其相对湿度降低至 90%, 然后借助真空泵的吸入作用使气溶胶沉积在细胞上, 流量控制器控制每孔流速 $< 5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 防止气流冲击造成细胞损伤, 结构见图 2A。研究显示, 与浸没培养条件相比, ALI 暴露能够观察到更低剂量的生物反应。Zhang 等^[18]利用 VitroCell[®]暴露系统进行全烟气的 ALI 暴露, 在计算机控制系统的调控下整个暴露系统由 3 部分组成: 吸烟机、烟雾稀释系统、暴露模块。吸烟机用于抽吸产生新鲜的全烟烟雾, 并与烟雾稀释系统相连接, 结构见图 2B; 新鲜生成的全烟烟雾随后被不同流速的洁净空气稀释; 由于暴露模块包含温浴系统, 因此能够保持细胞在 37°C 条件下进行体外暴露试验。Zavala 等^[35]报道指出 VitroCell[®]装置依靠扩散和沉降力将颗粒沉积到细胞上, 气体流动和气体分子扩散使得气体污染物与细胞充分作用。他们在考察香烟烟雾及其组分的毒理学特征中, 对香烟烟雾及其组分的暴露时间 $< 30 \text{ min}$, 而 Neilson 等^[22]应用该暴露系统研究 2 种电子烟对呼吸道的潜在刺激作用时, 气管/支气管上皮细胞在体外暴露的时间长达 6 h。

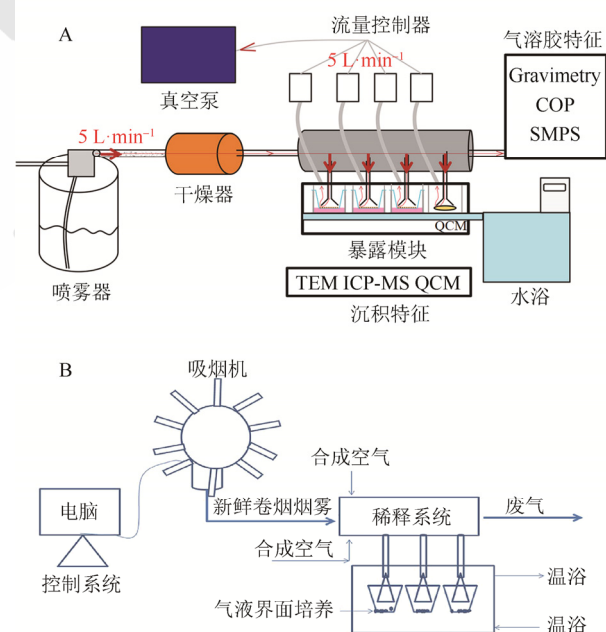


图 2 VitroCell[®]应用于细胞暴露试验装置图^[34,18]

Fig. 2 Installation diagram of VitroCell[®] in cell exposure test^[34,18]

4 细胞体外暴露试验的常用检测指标

基于 ALI 暴露的细胞体外暴露试验的吸入毒理学研究通常是将细胞或 3D 培养物等暴露于可

吸入受试物进行研究,检测方法主要涉及细胞毒性、氧化应激和炎症测试等^[10,20,36]。除此之外,对于纤毛形态和功能改变、黏蛋白表达、渗透性改变等指标的考察也有相关报道^[24,37-38]。

4.1 细胞毒性测试

细胞毒性测试方法主要包括中性红摄取测定法(NRU)、噻唑蓝比色法(MTT)、乳酸脱氢酶释放法(LDH法)、吖啶橙-溴化乙锭双染法(AO-EB双染法)、台盼蓝拒染法和水溶性四唑盐(WST-1)测定法等,不同的测试方法对受试物可能具有不同敏感性。Vaughan^[39]将原代人支气管上皮细胞(HBECs)通过Cultex®-RFS暴露于柴油排放物(diesel emissions, DE)中,探究DE对上皮细胞的影响,并进一步比较除去有机物后的残留DE(residual DE, rDE)与未经处理的DE(neat DE, nDE)对细胞的影响,同时通过WST-1细胞增殖试验考察细胞活力的变化。研究显示,与阴性对照(过滤空气)相比,暴露于nDE 30 min后的上皮细胞活力显著降低,而暴露于rDE 30 min并未发生明显变化;暴露于nDE 60 min与30 min的结果相似;与阴性对照和暴露于rDE 30 min相比,暴露于rDE 60 min导致上皮细胞活力下降程度最大。研究认为除去有机物后的rDE在暴露30 min的条件下,可以减弱DE对细胞活力的影响,但与暴露rDE 30 min及暴露于nDE相比,暴露于rDE 60 min会产生更大程度的细胞损伤。

4.2 氧化应激

当生物体暴露于可吸入物质时,细胞内氧化/抗氧化平衡可能受到干扰,进而导致细胞内发生氧化应激反应。活性氧、丙二醛、4-羟基壬烯醛、还原性谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、过氧化氢酶、细胞外超氧化物歧化酶(EC-SOD)、8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)的水平和还原型谷胱甘肽(GSH)与氧化型谷胱甘肽(GSSG)的比例(GSH/GSSG)是氧化应激常检测的指标。据研究报道,将A549和BEAS-2B细胞通过VibroCell®系统暴露于全烟烟雾后,相对于空气对照组细胞而言GSH/GSSG水平降低,而丙二醛、4-羟基壬烯醛、EC-SOD和8-OHdG水平升高,结果证明暴露于全烟烟雾会影响上述2种细胞的氧化应激反应^[18]。Bathrinarayanan等^[40]将人支气管上皮细胞(Calu-3)和肺成纤维细胞(MRC-5)通过ALI共培养11~14 d,然后暴露于全烟烟雾和电子烟蒸气中,进而评估电子烟对细

胞的影响。结果表明,与阴性对照(空气对照)相比,暴露于全烟烟雾和电子烟蒸气3 h均使H₂O₂水平显著增加,且分别增加约1.6倍和1.4倍。由此可见,暴露于电子烟蒸气引起的氧化应激水平低于全烟烟雾,但长期暴露于电子烟蒸气(≥3 h)的氧化应激水平会显著升高。Hong等^[41]将RPMI 2650细胞暴露于PM 2.5中,结果发现其细胞活力降低,细胞内活性氧水平升高,EC-SOD、过氧化氢酶和GSH-PX的水平降低等;而N-乙酰-L-半胱氨酸(抗氧化剂)预处理则可以减弱PM 2.5诱导的氧化应激反应。研究表明空气中的细颗粒物可能会损害人鼻上皮细胞的屏障功能,同时引起氧化应激反应。

4.3 炎症反应测试

当生物体暴露于可吸入物质时,各种细胞因子的释放或发生改变可导致炎症反应。炎症反应测试主要通过检测单核细胞趋化蛋白(MCP-1)、血管内皮生长因子(VEGF)、白细胞介素-6, 8, 10(IL-6, IL-8, IL-10)和基质金属蛋白酶-1(MMP-1)等物质在细胞内释放的变化来评估可吸入物质的影响。Phillips等^[37]使用BAT®暴露系统将人肺上皮细胞NCI-H292暴露于香烟烟雾中,结果显示低剂量的香烟烟雾可以上调黏蛋白MUC5AC的mRNA表达,且IL-6、IL-8和MMP-1在细胞内的释放量也显著增加,但IL-6、IL-8和MMP-1的释放并无剂量-反应关系,该剂量条件下对细胞活力也并未产生影响。

Anderson等^[20]探究暴露于室内空气的反应产物是否影响细胞促炎因子分泌,并将A549细胞暴露于臭氧、柠檬烯和柠檬烯+臭氧的反应物中4 h。研究发现与清洁空气相比,暴露于柠檬烯后观察到IL-8(暴露后12 h)和MCP-1(暴露后12和24 h)的表达显著增加,暴露于臭氧后细胞因子水平无显著差异;与单独使用柠檬烯相比,暴露于柠檬烯+臭氧(暴露后12 h)后观察到IL-8显著增加,MCP-1(暴露后12和24 h)无显著差异,且观察到细胞代谢/增殖水平显著降低。结果表明与暴露于母体化合物柠檬烯相比,暴露于柠檬烯+臭氧反应产物可能会产生更严重的炎症反应,进一步证实了二次反应产物可能是导致室内空气污染的重要因素。

4.4 其他

Ishikawa等^[38]构建了人支气管组织3D共培养

模型, 该组织由胶原基质层(基底层&成纤维细胞层)和上皮细胞层组成。ALI 培养条件下上皮细胞层进行分化, 与此同时应用 Cultex®-RFS 将培养至 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 d 的该组织模型重复暴露于香烟烟雾进行研究。在 ALI 培养第 21 天, 通过分析组织学和基因表达的变化来考察香烟烟雾对模型分化的影响。研究显示, 随着香烟烟雾重复暴露的进行, 纤毛细胞减少, 杯状细胞分化受到干扰, 而且观察到 IL-8、IL-1 β 、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和人生长调节致癌基因 α 的分泌显著增加且呈时间依赖性, 研究认为重复暴露于香烟烟雾会扰乱人支气管分化并且诱发炎症反应。

5 总结

实验动物的吸入毒理学研究已被广泛用于探索可吸入物质的不良反应, 即便如此, 对于绝大多数可吸入化学物质的潜在毒性仍知之甚少。随着 3R 原则的倡导及体外替代方法的发展, 细胞体外暴露试验在吸入毒理学研究中的应用越来越多。尽管吸入毒理学体外研究对技术实施和细胞培养模型要求较高, 但庆幸的是随着暴露系统和细胞模型的发展, 该体外替代方法的前提条件已逐步实现。目前, 体外细胞模型从原代细胞、细胞系扩大为共培养模型及商品化模型, 而且已经开发了多种 ALI 暴露系统, 可实现的暴露时间也进一步延长。但是问题仍然是存在的, 就解释数据和比较实验室之间结果一致性方面而言, 细胞模型的标准化与一致性非常重要。细胞模型的培养条件如培养基种类、所用细胞的数量、生长持续时间等的不同可能导致不同的生长特性甚至表型, 且均可能造成研究结果产生差异性。与此同时, 由于试验的发展需要, 暴露装置及暴露条件也亟待优化升级。因此, 细胞体外暴露试验应用于吸入毒理学仍存在巨大的发展空间, 更稳定、可靠的细胞模型及优异的暴露系统将对吸入毒理学的体外研究有极大的帮助。

REFERENCES

- [1] HAYES A, BAKAND S. Inhalation toxicology [J]. EXS, 2010, 100(4): 461-488.
- [2] CHEN L C, LIPPMANN M. Inhalation toxicology methods: the generation and characterization of exposure atmospheres and inhalational exposures [J]. Curr Protoc Toxicol, 2015, 63(1): 24.4.1-24.4.23.
- [3] SANG J, CHEN S H, MENG H, et al. Study of the application of *in vitro* human cell line activation test with four hair dyes [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(4): 484-487.
- [4] BEEKHUIJZEN M. The era of 3Rs implementation in developmental and reproductive toxicity(DART) testing: Current overview and future perspectives [J]. Reprod Toxicol, 2017(72): 86-96.
- [5] CASEY W, JACOBS A, MAULL E, et al. A new path forward: the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and National Toxicology Program's Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2015, 54(2): 170-173.
- [6] KOJIMA H. Update from the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) [J]. Altern Lab Anim, 2013, 41(6): 435-441.
- [7] BARROSO J, AHN IY, CALDEIRA C, et al. International harmonization and cooperation in the validation of alternative methods [J]. Adv Exp Med Biol, 2016(856): 343-386.
- [8] PAPAIZIAN D, WÜRTZEN P A, HANSEN S W K. Polarized airway epithelial models for immunological co-culture studies [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2016, 170(1): 1-21.
- [9] SCHMID O, JUD C, UMEHARA Y, et al. Biokinetics of aerosolized liposomal ciclosporin a in human lung cells *in vitro* using an air-liquid cell interface exposure system [J]. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2017, 30(6): 411-424.
- [10] USEMANN J, ROTH M, BISIG C, et al. Gasoline particle filter reduces oxidative DNA damage in bronchial epithelial cells after whole gasoline exhaust exposure *in vitro* [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2297. Doi: 10.1038/s41598-018-20736-z.
- [11] PLATEL A, CARPENTIER R, BECART E, et al. Influence of the surface charge of PLGA nanoparticles on their *in vitro* genotoxicity, cytotoxicity, ROS production and endocytosis [J]. J Appl Toxicol, 2016, 36(3): 434-444.
- [12] LENZ A G, STOEGER T, CEI D, et al. Efficient bioactive delivery of aerosolized drugs to human pulmonary epithelial cells cultured in air-liquid interface conditions [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014, 51(4): 526-535.
- [13] AUFDERHEIDE M, HALTER B, MÖHLE N, et al. The CULTEX RFS: a comprehensive technical approach for the *in vitro* exposure of airway epithelial cells to the particulate matter at the air-liquid interface [J]. Biomed Res Int, 2013(2013): 734137. Doi: 10.1155/2013/734137.
- [14] SAMBALE F, STAHL F, BAHNEMANN D, et al. *In vitro* toxicological nanoparticle studies under flow exposure [J]. J Nanopart Res, 2015, 17(7): 298.
- [15] STÜTZLE M, CARLE S, ENGELHARDT L, et al. Protein aerosol for intranasal nose to brain (N2B) delivery [J]. BMC Proceedings, 2015, 9(Suppl 9): O11.
- [16] TILLY T B, LEI L K, BRAYDICH-STOLLE L K, et al. Dispersions of geometric TiO₂ nanomaterials and their toxicity to RPMI 2650 nasal epithelial cells [J]. J Nanopart Res, 2014, 16(11): 2695.
- [17] YU Z, JANG M, SABOATWOOD T, et al. Prediction of delivery of organic aerosols onto air-liquid interface cells *in vitro* using an electrostatic precipitator [J]. Toxicol In Vitro, 2017(42): 319-328.
- [18] ZHANG S, LI X, XIE F, et al. Evaluation of whole cigarette smoke induced oxidative stress in A549 and BEAS-2B cells [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2017(54): 40-47.
- [19] KOOTER I M, GRÖLLERS-MULDERIJ M, STEENHOF M, et al. Cellular effects in an *in vitro* human 3D cellular airway model and A549/BEAS-2B *in vitro* cell cultures following air exposure to cerium oxide particles at an air-liquid interface [J].

- Appl In Vitro Toxicol, 2016, 2(1): 56-66.
- [20] ANDERSON S E, KHURSHID S S, MEADE B J, et al. Toxicological analysis of limonene reaction products using an *in vitro* exposure system [J]. Toxicol In Vitro, 2013, 27(2): 721-730.
 - [21] REN D, DAINES D A. Use of the EpiAirway™ model for characterizing long-term host-pathogen interactions [J]. J Vis Exp, 2011(55): e3261. Doi: 10.3791/3261.
 - [22] NEILSON L, MANKUS C, THORNE D, et al. Development of an *in vitro* cytotoxicity model for aerosol exposure using 3D reconstructed human airway tissue; application for assessment of e-cigarette aerosol [J]. Toxicol In Vitro, 2015, 29(7): 1952-1962.
 - [23] JACKSON G J, MAIONE A G, KLAUSNER M, et al. Prevalidation of an acute inhalation toxicity test using the epiairway *in vitro* human airway model [J]. Appl In Vitro Toxicol, 2018, 4(2): 149-158.
 - [24] AUFDERHEIDE M, ITO S, ISHIKAWA S, et al. Metaplastic phenotype in human primary bronchiolar epithelial cells after repeated exposure to native mainstream smoke at the air-liquid interface [J]. Exp Toxicol Pathol, 2017, 69(5): 307-315.
 - [25] BISIG C, PETRIFINK A, ROTHENRUTISHAUSER B. A realistic *in vitro* exposure revealed seasonal differences in (pro-)inflammatory effects from ambient air in Fribourg, Switzerland [J]. Inhal Toxicol, 2018, 30(1): 40-48.
 - [26] 李茂中. 呼吸道上皮细胞气液界面培养的研究[D]. 北京:中国疾病预防控制中心, 2015.
 - [27] MAO H, WANG Y, YUAN W, et al. Ciliogenesis in cryopreserved mammalian tracheal epithelial cells cultured at the air-liquid interface [J]. Cryobiology, 2009, 59(3): 250-257.
 - [28] HUI X O, JACKSON C L, COLE J L, et al. Primary air-liquid interface culture of nasal epithelium for nasal drug delivery [J]. Mol Pharm, 2016, 13(7): 2242-2252.
 - [29] LIN H, LI H, CHO H, et al. Air-liquid interface (ALI) culture of human bronchial epithelial cell monolayers as an *in vitro* model for airway drug transport studies [J]. J Pharm Sci, 2007, 96(2): 341-350.
 - [30] ZAVALA J, LICHTVELD K, EBERSVILLER S, et al. The gillings sampler—an electrostatic air sampler as an alternative method for aerosol *in vitro* exposure studies [J]. Chem Biol Interact, 2014(220): 158-168.
 - [31] AUFDERHEIDE M, FÖRSTER C, BESCHAY M, et al. A new computer-controlled air-liquid interface cultivation system for the generation of differentiated cell cultures of the airway epithelium [J]. Exp Toxicol Pathol, 2016, 68(1): 77-87.
 - [32] STEINRITZ D, MOHLE N, POHL C, et al. Use of the Cultex(R) Radial Flow System as an *in vitro* exposure method to assess acute pulmonary toxicity of fine dusts and nanoparticles with special focus on the intra- and inter-laboratory reproducibility [J]. Chem Biol Interact, 2013, 206(3): 479-490.
 - [33] DESCHL U, VOGEL J, AUFDERHEIDE M. Development of an *in vitro* exposure model for investigating the biological effects of therapeutic aerosols on human cells from the respiratory tract [J]. Exp Toxicol Pathol, 2011, 63(6): 593-598.
 - [34] LORET T, PEYRET E, DUBREUIL M, et al. Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions [J]. Part Fibre Toxicol, 2016, 13(1): 58.
 - [35] ZAVALA J, GREENAN R, KRANTZ Q T, et al. Regulating temperature and relative humidity in air-liquid interface *in vitro* systems eliminates cytotoxicity resulting from control air exposures [J]. Toxicol Res, 2017, 6(4): 448-459.
 - [36] LI X. *In vitro* toxicity testing of cigarette smoke based on the air-liquid interface exposure: A review [J]. Toxicol In Vitro, 2016(36): 105-113.
 - [37] PHILLIPS J, KLUSS B, RICHTER A, et al. Exposure of bronchial epithelial cells to whole cigarette smoke: assessment of cellular responses [J]. Altern Lab Anim, 2005, 33(3): 239-248.
 - [38] ISHIKAWA S, ITO S. Repeated whole cigarette smoke exposure alters cell differentiation and augments secretion of inflammatory mediators in air-liquid interface three-dimensional co-culture model of human bronchial tissue [J]. Toxicol In Vitro, 2016(38): 170-178.
 - [39] VAUGHAN A. Removal of organic content from diesel exhaust particles alters cellular responses of primary human bronchial epithelial cells cultured at an air-liquid interface [J]. J Environ Anal Toxicol, 2015(5): 316.
 - [40] BATHRINARAYANAN P V, BROWN J, MARSHALL L J, et al. An investigation into E-cigarette cytotoxicity *in-vitro* using a novel 3D differentiated co-culture model of human airways [J]. Toxicol In Vitro, 2018(52): 255-264.
 - [41] HONG Z, GUO Z, ZHANG R, et al. Airborne fine particulate matter induces oxidative stress and inflammation in human nasal epithelial cells [J]. Tohoku J Exp Med, 2016, 239(2): 117-125.

收稿日期: 2018-07-05
(本文责编: 李艳芳)