

O₃氧化黑碳对 SH-SY5Y 细胞的毒性作用

尚 羽, 王田田, 吴美英, 王 璐, 何慧心, 安 静
(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)

摘要: 以人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 为模型, 在细胞体系探讨经 O₃ 氧化过的黑碳 (O₃-oxidized black carbon, OBC) 颗粒对神经细胞的毒性作用. 应用 MTT 方法评估 SH-SY5Y 细胞的存活率; 通过测定培养液中乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 浓度评估细胞膜的损伤程度; 利用流式细胞术评价细胞凋亡率; 使用荧光探针 (Fluo 3-AM) 检测细胞内 Ca²⁺ 浓度. 结果显示, OBC 颗粒对 SH-SY5Y 细胞暴露 24 和 48 h 的半致死浓度 (IC₅₀) 分别为 202.2 和 133.3 μg/mL; 随着 BC 颗粒染毒浓度的增加 (0, 5, 10, 20, 40 μg/mL), 胞外 LDH 浓度、细胞凋亡率和 Ca²⁺ 浓度均逐渐升高, 呈显著的剂量-效应关系 ($p < 0.05$). 研究表明, OBC 颗粒可导致神经细胞内 Ca²⁺ 浓度升高、细胞膜损坏, 并最终导致细胞凋亡的发生.

关键词: 黑碳颗粒; SH-SY5Y 细胞; 细胞毒性; 细胞凋亡; Ca²⁺

中图分类号: X 513

文献标志码: A

文章编号: 1007-2861(2019)04-0550-08

Cytotoxicity in SH-SY5Y cells induced by O₃-oxidized black carbon particles

SHANG Yu, WANG Tiantian, WU Meiyang, WANG Lu, HE Huixin, AN Jing
(Institute of Environmental Pollution and Health, School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract: SH-SY5Y cells were used to investigate neurotoxicity of O₃-oxidized black carbon (OBC) particles. Cell viability was measured by MTT assay after being treated with OBC for 24 and 48 h. Lactate dehydrogenase (LDH) leakage was determined to evaluate cellular membrane injury after OBC treatment for 24 h. Apoptosis rate was detected by cytometry after OBC treatment for 24 h. Concentrations of Ca²⁺ was then measured with fluorescent probe of Fluo 3-AM. OBC exposure caused significant dose-dependent and time-dependent viability decrease. LC₅₀ for 24 and 48 h were 202.2 and 133.3 μg/mL, respectively. The LDH leakage, apoptosis rate and intracellular Ca²⁺ levels were also increased significantly in a dose-dependent manner after being treated with OBC in SH-SY5Y cells. These results suggest that OBC may mediate cytotoxic effects and apoptosis through Ca²⁺ release.

Key words: black carbon (BC) particles; SH-SY5Y cells; cytotoxicity; apoptosis; Ca²⁺

黑碳 (black carbon, BC) 颗粒是大气细颗粒物 (PM_{2.5}) 的重要组成部分之一, 主要来源于化石燃料及生物质等含碳物质的不完全燃烧. 大量的流行病学研究证实, 城市大气 BC 颗粒暴露

收稿日期: 2017-07-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (91543123); 国家自然科学基金青年基金资助项目 (21107068); 创新团队发展计划资助项目 (IRT13078)

通信作者: 尚 羽 (1982—), 女, 博士, 研究方向为大气污染与人体健康. E-mail: yushang@shu.edu.cn

与全死因死亡率、心肺系统疾病死亡率以及心肺系统疾病发病率和住院率的升高有显著的关联^[1-2]。相对于PM_{2.5},在流行病学研究的统计模型中,BC颗粒的质量浓度与心肺系统疾病发病率和死亡率的相关性更为稳健^[1]。在流行病学研究中,常使用BC颗粒的质量浓度作为城市交通源污染的指示物。例如,交通源污染BC颗粒暴露能降低冠心病患者的肺功能,促进系统炎症反应^[3-4]。在北京和上海开展的两项人群定组研究分别发现,BC颗粒质量浓度与小学生呼吸道急性炎症指示物和中老年糖尿病患者的心律不齐呈显著的正相关^[5-6]。基于流行病学研究建立的暴露-响应关系曲线中,相比PM₁₀和PM_{2.5},每升高单位质量浓度($\mu\text{g}/\text{m}^3$),BC颗粒暴露造成的健康危害更大。

由燃烧排放的BC颗粒呈蓬松状,比表面积大,具有很强的吸附能力,极易吸附大气中的污染物质,包括重金属、多环芳烃、多氯联苯、二噁英、多溴联苯醚等^[7]。大气中BC颗粒的粒径范围变化较大,从几个纳米到几个微米。粒径小于100 nm的超细BC颗粒物可以通过人类呼吸道进入肺组织,然后通过肺泡上皮细胞进入血液循环,甚至进入其他器官组织,例如肝脏等^[8]。对木材和柴油燃烧产生的颗粒进行毒理学研究发现,颗粒物表面吸附的有机物,如PAHs和水溶性有机物等,是这些颗粒物产生毒性效应的直接原因,而燃烧产生的BC颗粒只作为这些有机物的载体^[9-10]。新鲜排放的BC(fresh BC, FBC)颗粒可被大气氧化剂(如O₃, NO_x等)氧化,其表面理化特征和吸附化学物质都将发生改变。如何表征大气氧化过程对BC颗粒物物化性质及健康影响的作用,成为近年该领域重点的关注内容。

使用商品化的纳米级BC颗粒为模型,通过体内外的动物和细胞研究发现,BC颗粒可直接造成生物体肺组织和细胞的损伤^[11]。除呼吸系统外,BC颗粒还能诱发血管内皮细胞毒性和炎症反应^[12]。动物实验发现,纳米级BC颗粒暴露可长期活化小鼠大脑内星形胶质细胞,进而诱发退行性神经系统疾病^[13]。研究在体外培养的星形胶质细胞体系,发现BC颗粒可以通过激活连接蛋白通道,诱导谷氨酸盐和ATP的释放^[14]。这些研究都说明,BC颗粒具有神经系统毒性,但其具体的致毒机制尚未明确。

由于BC颗粒在大气中的氧化过程比较复杂,因此关于BC颗粒经O₃氧化后,其细胞毒性如何发生变化,目前尚没有定论^[15]。本工作以人神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y作为细胞模型,探讨经O₃氧化过的BC(O₃-oxidized BC, OBC)颗粒对神经细胞的毒性作用;应用MTT方法测定细胞存活率,探讨OBC颗粒对细胞增殖能力的影响;利用乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LHD)漏出率表征细胞膜的损伤程度;利用流式细胞术评估细胞凋亡比例;通过荧光探针测定细胞内Ca²⁺浓度。本工作以期深入探讨BC颗粒的神经毒性,解释大气中BC颗粒对健康的影响提供基础实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

SH-SY5Y为人神经母细胞瘤细胞,来源于1970年建立的神经母细胞瘤患者的转移骨瘤细胞SK-N-SH经3次克隆后的亚系,购自美国模式培养物集存库。纳米级BC颗粒(Printex U, 粒径30 nm)可以非常好地模拟柴油燃烧排放的焦炭物质^[16],购自Degussa公司(德国),按照文献[17]的方法进行O₃氧化,获得OBC颗粒,氧化过程保持O₃浓度为0.01%。反应时间为120 min。DMEM购自HyClone公司(美国)。胎牛血清购自PAA laboratories GmbH公司(奥地利)。LDH试剂盒,购自南京建成生物技术有限公司。细胞培养板、培养皿和培养瓶均购自康宁公司(Corning, 美国)。其他试剂(分析纯)购自上海国药集团化学试剂公司。

本工作所用仪器如下: 正置荧光显微镜(BX51型, Olympus公司, 日本); iMark-680型酶联免疫检测仪(BIO-RAD公司, 美国); 高速分选型流式细胞仪(Beckman coulterter, 香港); 倒置生物显微镜(Olympus, CKX41, 日本); CO₂ 恒温细胞培养箱(Binder公司, 德国).

1.2 细胞培养和染毒

SH-SY5Y细胞使用DMEM培养基, 在5% CO₂ 和37 °C的恒温恒湿条件下培养. 单层细胞达到80%以上时, 按1:4~1:3的比例传代培养.

在对数生长期, 用胰蛋白酶消化后, 离心, 重新悬浮, 接种于96孔板(每孔 3×10^3 个细胞)、24孔板(每孔 1×10^4 个细胞)、6孔板(每孔 5×10^4 个细胞)以及35 mm培养皿(每孔 5×10^4 个细胞), 分别供MTT实验、LDH实验、细胞凋亡分析和Ca²⁺ 浓度检测实验. 接种后隔夜令细胞贴壁生长, 弃培养基. 使用D-Hanks清洗两次, 加入含有OBC颗粒的培养基进行染毒, 1~48 h后检测. 根据24和48 h的细胞存活率, 筛选OBC颗粒染毒浓度分别为0, 5, 10, 20, 40 μg/mL的样品. 每个浓度设置3~6个平行样, 实验重复3次.

1.3 MTT 实验

染毒结束后弃去上清液, 使用D-Hanks溶液清洗2次, 每孔加入0.1 mL用培养液稀释10倍的MTT溶液, 37 °C继续培养4 h. 弃上清液, 每孔加入100 μL DMSO, 室温下振荡10 min, 之后使用酶标仪检测OD₄₉₀ 值. 细胞存活率的计算公式如下:

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

式中, 实验组为OBC颗粒染毒组, 溶剂对照组为正常培养基培养细胞, 空白对照组为培养基组(未加入细胞).

1.4 LDH 活性检测

染毒结束后, 吸取上层培养液至1.5 mL的EP管中, 离心5 min (1 200 r/min). 弃下层颗粒, 取100 μL上清至EP管中, 按照LDH试剂盒的说明书依次加入相关试剂. 吸取最后一步所得溶液, 加至96孔平底培养板中(每孔加200 μL). 用iMark-680型酶联免疫检测仪测定吸光度(D), 波长为440 nm. 记录数据, 并根据标准曲线计算所得LDH浓度.

1.5 流式细胞术检测

染毒结束后, 弃上层培养液, 用无EDTA的胰蛋白酶消化, 重新悬浮细胞收集于1.5 mL离心管中. 3 000 r/min离心3 min, 弃上清. 使用预冷的PBS重悬细胞, 3 000 r/min离心3 min, 弃上清. 加入100 μL的Binding Buffer和2.5 μL的Annexin V-FITC, 混匀后于室温避光孵育15 min, 进行Annexin V-FITC标记. 使用Binding Buffer洗涤, 并重新悬浮细胞. 再加入100 μL的Binding Buffer和5 μL的PI, 室温避光孵育5 min, 进行PI标记. 补加Binding Buffer至500 μL, 在1 h内用流式细胞仪检测.

1.6 Ca²⁺ 浓度测定

染毒结束后, 弃上层培养液. 用D-Hanks溶液洗涤细胞3次, 加入已被D-Hanks稀释的Fluo 3-AM(终浓度为5 μmol/L), 37 °C孵育45 min. 弃去Fluo 3-AM工作液, 用D-Hanks溶液洗涤3次, 以充分去除残留的Fluo 3-AM. 加入D-Hanks溶液覆盖细胞, 37 °C孵育20 min, 以确保AM在细胞内的完全去酯化, Fluo 3-AM在细胞内转变成Fluo 3. 使用荧光显微镜观察细胞, 激发波长为494 nm, 发射波长为516 nm. 每个平行样选取5~10张照片, 使用Ipwin32图像分析软件分析荧光强度, 取其平均值. Ca²⁺ 水平用光密度值来表示, 并将所得结果与对照组做归一化处理. 值得注意的是, 加入Fluo 3-AM后所有操作都需要避光进行, 以免探针降解.

1.7 数据处理

数据以“算术平均值 \pm 标准差($X\pm SD$)”的方式表示,采用 Microsoft Office Excel 2007 软件进行分析和检验,各指标组间差异采用 t 检验法进行统计,显著性水平以 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 为判断标准。

2 结果与分析

2.1 细胞存活率

图1为OBC颗粒染毒24和48 h后,SH-SY5Y细胞的存活率.使用不同浓度(0~40 $\mu\text{g/mL}$)的OBC颗粒进行染毒后,SH-SY5Y细胞的存活率有不同程度的下降,并呈现出统计差异的剂量-效应关系($**p < 0.01$).OBC颗粒染毒24和48 h后,对SH-SY5Y细胞的半致死浓度(LC_{50})分别为202.2和133.3 $\mu\text{g/mL}$ (通过线性回归模型计算).随着染毒时间从24 h增加到48 h, LC_{50} 值有所下降,说明OBC颗粒对SH-SY5Y的细胞毒性随着染毒时间的增加而增强。

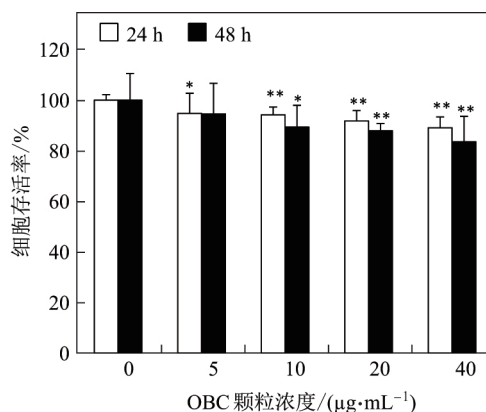


图1 OBC颗粒浓度对SH-SY5Y细胞存活率的影响

Fig. 1 Cell viability of SH-SY5Y cells after treated with different concentrations of OBC particles

2.2 LDH 活性

图2为OBC颗粒染毒24 h后,SH-SY5Y细胞培养液中LDH的浓度水平.可见,OBC颗粒染毒24 h后,胞外LDH的浓度显著升高,亦呈现剂量-效应关系($**p < 0.01$),说明OBC颗粒暴露导致明显的SH-SY5Y细胞损伤。

2.3 细胞凋亡

使用不同浓度(0, 5, 10, 20和40 $\mu\text{g/mL}$)的OBC颗粒.染毒24 h后,经流式细胞仪分析,细胞凋亡率如图3所示.可见,OBC颗粒可导致SH-SY5Y细胞发生细胞凋亡,且随着染毒剂量的增加,凋亡率不断上升,呈显著的剂量-效应关系($**p < 0.01$).在最高染毒剂量40 $\mu\text{g/mL}$ 组,细胞凋亡率达到7.0%($**p < 0.01$).

2.4 Ca^{2+} 浓度

图4为OBC颗粒对SH-SY5Y细胞内 Ca^{2+} 水平的影响.可见,细胞内 Ca^{2+} 浓度随染毒时间的增加呈现先升高再降低的趋势.在染毒1~4 h内, Ca^{2+} 浓度升高最显著;染毒6 h后, Ca^{2+} 浓度逐渐回归到正常水平.染毒1和4 h,随着OBC剂量的升高,呈现剂量-效应关系($**p < 0.01$).

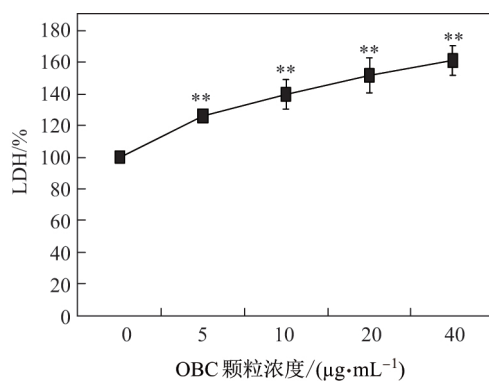


图 2 OBC 颗粒浓度对 SH-SY5Y 细胞 LDH 水平的影响

Fig. 2 LDH release of SH-SY5Y cells after treated with different concentrations of OBC particles

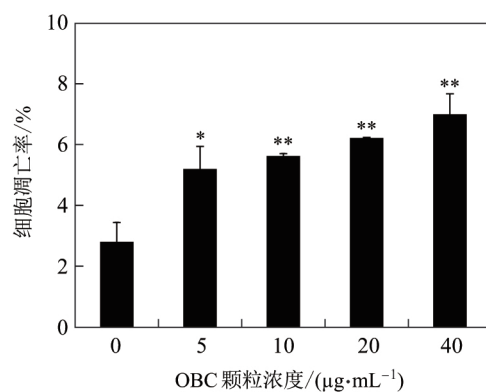
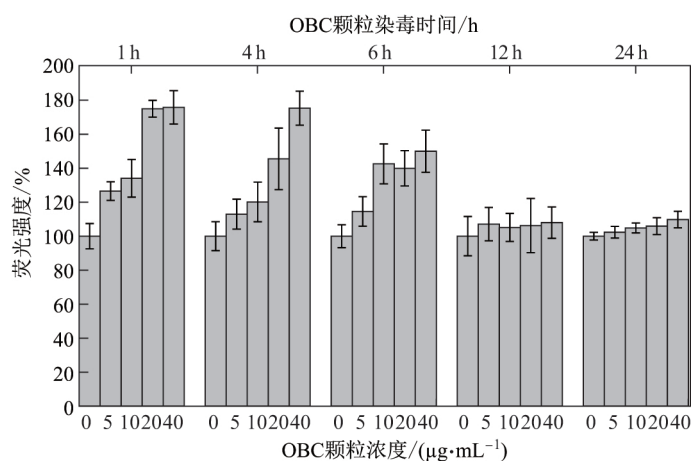


图 3 OBC 颗粒浓度对 SH-SY5Y 细胞凋亡率的影响

Fig. 3 Apoptosis in SH-SY5Y cells induced by different concentrations of OBC particles

图 4 OBC 染毒时间对 SH-SY5Y 细胞内 Ca^{2+} 水平的影响Fig. 4 Ca^{2+} levels in SH-SY5Y cells induced by OBC exposure time

3 讨 论

MTT 方法, 又称为 MTT 比色法, 可用于检测细胞的增殖活性. 在体外培养细胞体系中,

MTT 方法是评价外源物总体毒性的常规方法^[18]. LDH 存在于机体所有组织细胞的胞质内,当细胞受到外源性刺激,导致细胞膜损伤、细胞通透性增强后,LDH 可从细胞质中泄出至细胞外的培养基中.通过检测培养液中 LDH 的浓度水平,可以指示细胞受损伤的程度.因此,培养基中 LDH 浓度亦可用于表征外源性物质的毒性大小^[18].实验结果表明:经 OBC 颗粒染毒 24 和 48 h 后,SH-SY5Y 细胞的增殖能力被显著抑制,呈现剂量和时间-效应关系;染毒 24 h 后,SH-SY5Y 细胞膜显著受损,亦呈现剂量-效应关系.

An 等^[15]研究了 OBC 颗粒对人肺上皮细胞 A549 的毒性作用.结果发现,OBC 颗粒在染毒 24 h 后,可以导致细胞 DNA 损伤和细胞死亡.Li 等^[17]的研究也发现,OBC 颗粒可以造成 A549 细胞和 16HBE 细胞显著的毒性效应,诱导细胞发生氧化应激,造成细胞死亡.以上研究中 OBC 颗粒暴露 24 h 导致细胞死亡的半致死浓度在 100~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间,与本研究结果基本一致.

检测细胞凋亡的方法众多.本研究采用流式细胞术检测凋亡,可以对发生凋亡的细胞进行准确计数,是一种常用的检测方法.研究结果显示,OBC 颗粒可诱导 SH-SY5Y 细胞发生细胞凋亡,且随着染毒剂量的增加,凋亡率不断上升.在最高剂量 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,凋亡率达到 7.0%,显著高于对照细胞,具有统计学意义 (** $p < 0.01$).有文献报道,OBC 颗粒可诱导人肺上皮 A549 细胞发生细胞凋亡和 DNA 损伤^[15],与本研究结果一致.

Ca^{2+} 是机体内主要的细胞信使之一,参与调控许多细胞的生理活动,包括细胞分裂和细胞凋亡等.有研究表明, Ca^{2+} 可能参与了大气颗粒物诱导的细胞凋亡和炎症反应.Brown 等^[19]发现,大气颗粒物既可增加细胞内 Ca^{2+} 浓度又可促进活性氧的产生.Sakamoto 等^[20]发现,PM₁₀ 可增加人支气管上皮细胞内 Ca^{2+} 浓度,并且与炎症因子 IL-1 β 和 IL-8 的释放有一定关联.本研究发现,BC 颗粒可导致神经细胞 SH-SY5Y 中 Ca^{2+} 浓度的增加,染毒 4 h, Ca^{2+} 浓度达到最高峰.之后随着染毒时间增加, Ca^{2+} 浓度逐渐趋于正常细胞.动物和细胞实验发现,BC 颗粒可以通过激活连接蛋白通道,诱导谷氨酸盐和 ATP 的释放,进而活化小鼠大脑内星形胶质细胞,诱发退行性神经系统疾病^[13-14].本研究提示,信号分子 Ca^{2+} 可能在 BC 颗粒诱导神经细胞凋亡及神经系统疾病的过程中起重要的调控作用,值得进一步深入探讨.

大气颗粒物对神经系统的毒性作用,已经在一些动物和细胞体系中得到证实.BC 颗粒是大气颗粒物重要的组成部分.本研究结果提示,OBC 颗粒可以诱导体外神经细胞 Ca^{2+} 释放,导致细胞凋亡,进而在颗粒物导致神经系统疾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,大气中 BC 颗粒的排放会不断增加.有调研资料表明,一些城市地区的大气中 BC 颗粒的浓度处于较高水平^[21].因此,要更加关注城市大气中 BC 颗粒的浓度水平与其相应的健康影响.

4 结 论

- (1) OBC 颗粒可显著抑制 SH-SY5Y 细胞的增殖,造成细胞膜的损伤.
- (2) OBC 颗粒可诱导 SH-SY5Y 细胞发生凋亡,呈现剂量-效应关系,并能显著增加细胞内 Ca^{2+} 的浓度.
- (3) OBC 颗粒体外暴露可导致神经细胞损伤,胞内 Ca^{2+} 浓度增加,最后导致细胞凋亡.

参考文献:

- [1] EKLUND G A, CHOW C J, GREENHAUM S D, et al. Public health and components of particulate

- matter: the changing assessment of black carbon [J]. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 2014, 287(9): 1132-1141.
- [2] QIAO L, CAI J, WANG H, et al. PM_{2.5} Constituents and hospital emergency-room visits in Shanghai, China [J]. *Environmental Sciences & Technology*, 2014, 48(17): 10406-10414.
- [3] SUGLIA S F, GRYPARIS A, SCHWARTZ J, et al. Association between traffic-related black carbon exposure and lung function among urban women [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2008, 116(10): 1333-1337.
- [4] DELFINO R J, STAIMER N, TJOA T, et al. Circulating biomarkers of inflammation, antioxidant activity, and platelet activation are associated with primary combustion aerosols in subjects with coronary artery disease [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2008, 116(7): 898-906.
- [5] LIN W, HUANG W, ZHU T, et al. Acute respiratory inflammation in children and black carbon in ambient air before and during the 2008 Beijing Olympics [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2011, 119(10): 1507-1512.
- [6] SUN Y, SONG X, HAN Y, et al. Size-fractioned ultrafine particles and black carbon associated with autonomic dysfunction in subjects with diabetes or impaired glucose tolerance in Shanghai, China [J]. *Particle and Fibre Toxicology*, 2015, 12: 8.
- [7] MATTILA T J, VERTA M. Modeling the importance of biota and black carbon as vectors of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the Baltic sea ecosystem [J]. *Environmental Sciences & Technology*, 2008, 42(13): 4831-4836.
- [8] SHRESTHA G, TRAINA S J, SWANSTON C W. Black carbon's properties and role in the environment: a comprehensive review [J]. *Sustainability*, 2010, 2(1): 294-320.
- [9] JALAVA P I, SALONEN R O, NUUTINEN K, et al. Effect of combustion condition on cytotoxic and inflammatory activity of residential wood combustion particles [J]. *Atmospheric Environment*, 2010, 44(13): 1691-1698.
- [10] BISWAS S, VERMA V, SCHAUER J J, et al. Oxidative potential of semi-volatile and non-volatile particulate matter (PM) from heavy-duty vehicles retrofitted with emission control technologies [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(10): 3905-3912.
- [11] GAO X, XU H, SHANG J, et al. Ozonized carbon black induces mitochondrial dysfunction and DNA damage [J]. *Environmental Toxicology*, 2017, 32(3): 944-955.
- [12] YAMAWAKI H, IWAI N. Mechanisms underlying nano-sized air-pollution-mediated progression of atherosclerosis: carbon black causes cytotoxic injury/inflammation and inhibits cell growth in vascular endothelial cells [J]. *Circulation Journal*, 2006, 70(1): 129-140.
- [13] ONODA A, KAWASAKI T, TSUKIYAMA K, et al. Perivascular accumulation of β -sheet-rich proteins in offspring brain following maternal exposure to carbon black nanoparticles [J]. *Frontiers in Cellular Neuroscienc*, 2017, 11: 1-15.
- [14] WEI H, DENG F, CHEN Y, et al. Ultrafine carbon black induces glutamate and ATP release by activating connexin and pannexin hemichannels in cultured astrocytes [J]. *Toxicology*, 2014, 323: 32-41.
- [15] AN J, ZHOU Q, QIAN G, et al. Comparison of gene expression profiles induced by fresh or ozone-oxidized black carbon particles in A549 cells [J]. *Chemosphere*, 2017, 180: 212-220.
- [16] MUL G, NEEFT J, KAPTEIJN F, et al. The formation of carbon surface oxygen complexes by oxygen and ozone. The effect of transition metal oxides [J]. *Carbon*, 1998, 36(9): 1269-1276.

- [17] LI Q, SHANG J, ZHU T. Physicochemical characteristics and toxic effects of ozone-oxidized carbon black particles [J]. *Atmospheric Environment*, 2013, 81(4): 68-75.
- [18] 尚羽, 周倩, 蒋玉婷. 1-硝基芘和苯并[a]芘对人肺上皮A549 细胞的联合细胞毒性 [J]. *上海大学学报 (自然科学版)*, 2016, 22(2): 181-187.
- [19] BROWN D M, HUTCHISON L, DONALDSON K, et al. The effects of PM₁₀ particles and oxidative stress on macrophages and lung epithelial cells: modulating effects of calcium-signaling antagonists [J]. *American Journal of Physiology Lung Cellular & Molecular Physiology*, 2007, 292(6) : 1444-1451.
- [20] SAKAMOTO N, HAYASHI S, GOSSELINK J, et al. Calcium dependent and independent cytokine synthesis by air pollution particle-exposed human bronchial epithelial cells [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007, 225(2): 134-141.
- [21] WANG G, BAI J, KONG Q, et al. Black carbon particles in the urban atmosphere in Beijing [J]. *Advances in Atmospheric Sciences*, 2005, 22(5): 640-646.