

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200727001

周实,李锦莲,李秀玲,等. 电化学法检测芴的细胞毒性[J]. 生态毒理学报,2021,16(4):233-239

Zhou S, Li J L, Li X L, et al. Cytotoxicity of fluorene assayed by electrochemistry [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(4): 233-239 (in Chinese)

电化学法检测芴的细胞毒性

周实,李锦莲,李秀玲,郭晓玲,张树萌,武冬梅*

佳木斯大学药学院,佳木斯 154007 收稿日期:2020-07-27 录用日期:2020-09-04

摘要:以小鼠胚胎成纤维细胞(BALB/c 3T3)和中国仓鼠肺细胞(V79)为模型细胞,利用基于石墨烯量子点/玻碳电极(RGOQDs/GCE)的细胞电化学法研究多环芳烃(PAHs)类化合物芴的细胞毒性,并与四唑盐比色试验(MTT)对比,验证电化学法的可靠性。时间-效应研究结果表明,培养时间为 30 h 时,芴对 2 种细胞的毒性最强;剂量-效应研究结果表明,电化学法测得的芴对 BALB/c 3T3 和 V79 细胞毒性的半数抑制浓度(IC₅₀)值分别为 0.89 mmol·L⁻¹和 0.25 mmol·L⁻¹,MTT 法测得的 IC₅₀ 值分别为 1.34 mmol·L⁻¹和 0.86 mmol·L⁻¹。这说明芴对 V79 细胞的毒性效应更强,这可能是由于芴对 V79 细胞嘌呤核苷酸代谢影响更 大。电化学法的检测结果与 MTT 法的结果趋势一致,且 IC₅₀ 值均低于 MTT 法,说明本文使用的电化学法可以有效灵敏地评 价芴的细胞毒性。芴的细胞毒性作用机制可能是通过激活细胞中 *p53* 基因进而影响细胞嘌呤核苷酸代谢。本法通过检测细胞中嘌呤含量变化而评价芴的细胞毒性。

关键词: 芴;BALB/c 3T3;V79;细胞毒性;嘌呤核苷酸;电化学 文章编号: 1673-5897(2021)4-233-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Cytotoxicity of Fluorene Assayed by Electrochemistry

Zhou Shi, Li Jinlian, Li Xiuling, Guo Xiaoling, Zhang Shumeng, Wu Dongmei^{*} College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China **Received** 27 July 2020 **accepted** 4 September 2020

Abstract: Mouse embryonic fibroblasts (BALB/c 3T3) and Chinese hamster lung cells (V79) were used as model cells. Electrochemical methods based on graphene quantum dots/glassy carbon electrode (RGOQDs/GCE) were used to study the cytotoxicity of fluorene on BALB/c 3T3 and V79 cells, which were verified by MTT assay. The results of time-effect showed that the optimal action time of fluorene on BALB/c 3T3 and V79 cells was 30 h. The results of dose-response showed that the median inhibition concentration (IC₅₀) values of fluorene on BALB/c 3T3 and V79 cells measured by electrochemical method were 0.89 mmol·L⁻¹ and 0.25 mmol·L⁻¹, respectively. And the IC₅₀ values measured by MTT method were 1.34 mmol·L⁻¹ and 0.86 mmol·L⁻¹, respectively. It was suggested that fluorene has stronger toxic effect on V79 cells, which may be due to the greater effect of fluorene on purine nucleotide metabolism of V79 cells. The results of electrochemical method, indicating that the electrochemical method used in

第一作者:周实(1987—),女,博士,讲师,研究方向为环境化学,E-mail: xvan2011@163.com

基金项目:黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(2017-KYYWF-0591);佳木斯大学博士专项科研基金启动项目(JMSUBZ2020-13)

^{*} 通讯作者(Corresponding author), E-mail: dmwu@jmsu.edu.cn

this paper can evaluate the cytotoxicity of fluorene effectively and sensitively. The cytotoxicity mechanism may be that p53 gene was activated in cells under the action of fluorene and then affected purine nucleotide metabolism. The cytotoxicity of fluorene could be evaluated by the change of purine content in cells.

Keywords: fluorene; BALB/c 3T3; V79; cytotoxicity; purine nucleotide; electrochemistry

芴被世界卫生组织和美国环境保护局列为多环 芳烃(PAHs)类化合物大气暴露的评价指标,它是一 种可被人体吸入的神经毒性物质^[1],结构简单,仅由 2个苯环及一个五元环组成,因其挥发性高,具有毒 性,且空气中含量高,被美国环境保护局列为16种 优先控制的 PAHs 之一^[2]。芴主要来源于汽车尾气 排放、秸秆燃烧、工业生产,是制备塑料、农药、树脂、 染料和药品的重要工业原料^[3]。近年由于环境污 染,芴逐渐进入人类日常生活领域,甚至在人类的食 品中也出现了芴的踪影,是食品中 PAHs 类污染物 的主要来源。Essumang 等^[4]对烟熏鱼样品进行检 测发现芴的检出率高达 18% ~ 52%;马运明等^[5] 在污水处理厂的入水和回用水中均检测出较高含 量的芴。

研究表明,PAHs 类化合物具有"三致效应",长 期接触 PAHs 会对人体造成不可逆的损害。近年 来,体外试验⁶¹成为 PAHs 对环境和人类潜在风险评 估的快速方法,常用的方法有染料排斥法、克隆形成 实验、四唑盐比色法(MTT)和三磷酸腺苷(ATP)发光 试验,然而这些方法难免需要使用有毒的染色剂、前 处理复杂、检测范围有限,新兴的细胞电化学技术凭 借其简单、快速、灵敏和可即时检测等优点成为了细 胞活性评价的一个可靠方法。2015年,Zhu 等¹⁷利 用细胞电化学法评价重金属类和氯酚类污染物的毒 性,发现通过细胞中嘌呤核苷酸代谢过程中嘌呤含 量的变化,可以更早检测到外源物质对细胞的影响, 而传统的 MTT 法是通过终点变化评价细胞活性的 体外试验,只有在细胞发生死亡时才能检测到变化, 细胞电化学法的灵敏度明显优于传统的 MTT 法。

笔者所在团队前期研究了 V79 和 BALB/c 3T3 这 2 种细胞的电化学行为及信号来源,其中黄/鸟嘌 呤(G/X)的信号相比尿酸(UA)更明显^[8]。因此,本文 以黄/鸟嘌呤的电化学信号为定量依据,利用基于石 墨烯量子点/玻碳电极(RGOQDs/GCE)的细胞电化学 法研究了芴作用下 2 种细胞核苷酸代谢过程中黄/ 鸟嘌呤含量的变化,对比芴对 2 种细胞活性的影响, 并与 MTT 法对比。本研究为 PAHs 的毒性评价提 供了科学依据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 试剂与仪器

小鼠胚胎成纤维细胞(BALB/c 3T3)购自上海细胞库(中国);中国仓鼠肺细胞(V79)购自上海细胞库(中国);芴(Flu)购自中国 Aladdin 公司;黄嘌呤(X)购自美国 Sigma 公司;青霉素/链霉素混合溶液(penicillin-streptomycin solution)购自北京索莱宝科技有限公司(中国);胰蛋白酶(C₆H₁₅O₁₂P₃)购自北京索莱宝科技有限公司(中国);胎牛血清(FBS)购自上海双洳生物科技有限公司(中国);三蒸水为实验室自制;DMEM 培养基(Dulbecco's modified eagle medium)购自美国 Gibco公司;非必需氨基酸(nonessential amino acid)购自北

恒电位仪(CHI 615, 辰华仪器有限公司, 中国); 高效液相色谱仪系统(G1311Agilent 1100, 安捷伦科 技有限公司); 酶联免疫检测仪(Multiskan FC, 美国 Bio Tek 公司); 微量移液器(P型, Eppendorf 公司, 德 国); 三重纯水蒸馏器(SZ-97, 上海亚荣生化仪器厂, 中国); 二氧化碳恒温培养箱(311, 美国 Thermo 公 司); 超洁净工作台(VS-1300U, 苏州华宇净化设备有 限公司, 中国); 玻碳电极(φ=5 mm)、Ag/AgCl/KCl_{sat} (R1000)、铂丝电极(1 mm×10 mm)均购自武汉高仕 睿联科技有限公司(中国)。

1.2 细胞培养与收集

配制 10% 胎牛血清、1% 100 μg·mL⁻¹青霉素/ 链霉素、1% 非必需氨基酸的 DMEM 培养基,细胞在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。采用原位细胞裂解 法^[9]进行电化学检测,每皿细胞的培养基吸去,磷酸 盐缓冲溶液(PBS)冲洗培养皿一次,再加入一定量的 PBS,于恒温水浴锅中 50 ℃原位裂解 30 min 后进行 电化学检测。

加药组细胞和对照组细胞分别在含芴和二甲基 亚砜(DMSO)的完全培养基中培养, DMSO 的含量 低于 0.1%。

1.3 MTT 试验

将浓度为 1×10⁴ cells·mL⁻¹的细胞接种于 96 孔 板,每孔 200 μL,培养 24 h 后,加药组细胞加入含不

同浓度芴的培养基,对照组加入含 DMSO 培养基, 空白对照组只加入培养基。培养 24 h 后,每孔加入 20 μL 的 MTT,培养 4 h 后弃去培养液,加入 DM-SO,测定 490 nm 波长下的吸光度值(A)^[10-11]。

细胞毒性公式:

$$Cytotoxicity = \frac{A_{control} - A_{exp}}{A_{control} - A_{blank}} \times 100\%$$

式中:A_{control}、A_{exp}、A_{blank}分别为对照组、加药组和空白对照组吸光度值。

1.4 电化学检测方法

利用 RGOQDs/GCE 工作电极、Ag/AgCl/KCl_{sat} 和铂丝对电极组成的三电极体系,使用差分脉冲伏 安法(DPV)进行电化学检测,电位范围 0.4~0.9 V。

细胞毒性公式[11]:

Cytotoxicity =
$$\frac{i_{p,control} - i_{p,exp}}{i_{p,control}} \times 100\%$$

式中:*i*_{p,control}和 *i*_{p,exp}分别为对照组和加药组细胞裂解液的电流强度。

1.5 高效液相色谱(HPLC)检测

检测条件: Ascenis RP-Amide 色谱柱(4.0 mm× 1 250 mm×15.0 μm);检测波长 254 nm;柱温 25 ℃; 流动相 0.02 mol·L⁻¹的 KH₂PO₄ 溶液(pH 4.9);流动 相流速 1.0 mL·min⁻¹;进样量 20 μL。样品用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后进样检测。

1.6 数据处理与分析

文中数据为 5 次测定结果的平均值±标准偏差。利用 Origin 2018 软件作图, SPSS 20.0 软件处理数据。

2 结果(Results)

2.1 HPLC 法确定 BALB/c 3T3 和 V79 细胞的电 化学信号来源

利用 HPLC 外标法确定 BALB/c 3T3 和 V79 这 2 种细胞裂解液的电化学信号来源。UA、G 和 X 标准品(图 1 (a))的保留时间分别为 8.707、 13.730 和 15.210 min,与 BALB/c 3T3 细胞裂解液 (图 1(b))的保留时间 8.755、13.937 和 15.357 min 吻合,与 V79 细胞裂解液(图 1(c))的保留时间 8.788、13.962 和 15.382 min 亦吻合,这说明 BALB/ c 3T3 和 V79 这 2 种细胞中均含有 UA、G 和 X 这 3 种物质。

2.2 芴作用时间对 BALB/c 3T3 细胞的影响

通过考察不同作用时间下 1 mmol·L⁻¹ 芴对 BALB/c 3T3 细胞 G/X 氧化峰电流的影响,得到相 应的时间-效应关系。图 2(a)为加药组和对照组细 胞的 G/X 氧化峰电流随作用时间变化图,加药组细 胞的 G/X 氧化峰电流均低于对照组,可能芴的存在 抑制了细胞中 G/X 的产生。加药组和对照组细胞 的 G/X 氧化峰电流均随着培养时间的增加而增加, 对照组细胞的 G/X 氧化峰电流培养至 30 h 后开始 降低,可能是培养基中的营养物质消耗殆尽;加药组 细胞的 G/X 氧化峰电流 24 h 后呈下降趋势,且加药 组与对照组细胞的 G/X 氧化峰电流差值在 30 h 时 最大。由加药组和对照组细胞的 G/X 氧化峰电流 计算出芴在不同作用时间下的细胞毒性,如图 2 (b) 所示,随着芴作用时间的增加细胞毒性增强,在 30 h 处达到最大值,为最佳作用时间。



图 1 不同样品的 HPLC 图

注:(a) 35 μg·mL⁻¹尿酸(UA)、10 μg·mL⁻¹鸟嘌呤(G)和 10 μg·mL⁻¹黄嘌呤(X)混合标准样品;(b) BALB/c 3T3 细胞裂解液, 细胞浓度 4×10⁶ cells·mL⁻¹;(c) V79 细胞裂解液,细胞浓度 4×10⁶ cells·mL⁻¹。

Fig. 1 HPLC chromatograms of different samples

Note: (a) the mixture of 35 μ g·mL⁻¹ uric acid (UA), 10 μ g·mL⁻¹ guanine (G) and 10 μ g·mL⁻¹ xanthine (X);

(b) BALB/c 3T3 cell suspension, cell concentration 4×10^6 cells · mL⁻¹; (c) V79 cell suspension, cell concentration 4×10^6 cells · mL⁻¹.

2.3 芴作用剂量对 BALB/c 3T3 细胞的影响

通过考察不同剂量芴对 BALB/c 3T3 细胞 G/X 氧化峰电流的影响,得到相应的剂量-效应关系,并 利用 MTT 法验证电化学法的准确性。图 3(a)为不 同剂量芴作用下 BALB/c 3T3 细胞 G/X 氧化峰电流 的变化图,随着作用剂量的增加,BALB/c 3T3 细胞 的 G/X 氧化峰电流降低,说明随着细胞培养环境中 芴剂量的增加,细胞的嘌呤核苷酸代谢被抑制, BALB/c 3T3 细胞的 G/X 含量减少。由不同剂量芴 作用下 BALB/c 3T3 细胞的 G/X 氧化峰电流变化得 到对应的毒性曲线,半数抑制效应浓度(IC₅₀)值 为0.89 mmol·L⁻¹。利用基于 RGOQDs/GCE 的细胞





Fig. 2 Effect of culture time on cell oxidation peak currents in the drug group and control group (a) and relationship between fluorene action time and the cytotoxicity to BALB/c 3T3 cells (b)

Note: The inset diagram is the corresponding electrochemical curve at 0, 6, 12, 18, 24, 30 and 36 h; cell inoculation concentration is 2.0×10^5 cells · mL⁻¹.





注:嵌图为0~3.8 mmol·L⁻¹ 芴作用下对应的电化学曲线图;细胞接种浓度2.0×10⁵ cells·mL⁻¹; 芴作用时间 30 h。

Fig. 3 Effect of fluorene at different doses on the oxidation peak currents of BALB/c 3T3 cells (a), and cytotoxicity curves of

fluorene acted on BALB/c 3T3 cells by the electrochemical method and MTT assay (b)

Note: The inset diagram is the corresponding electrochemical curve at $0 \sim 3.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ concentration of fluorene;

cell inoculation concentration is 2.0×10^5 cells \cdot mL⁻¹; fluorene-treated time is 30 h.

电化学法得到的毒性曲线与 MTT 法测得的毒性曲 线趋势一致,如图 3(b)所示,且电化学法测得的 IC₅₀ 值低于 MTT 法(1.34 mmol·L⁻¹),说明该电化学法有 望成为毒性评价的可靠方法。

PAHs 的细胞毒性并不强,在体外细胞实验中需要加入代谢活化系统,PAHs 被细胞加氧酶分解生成的环氧化物、二酮等化合物的细胞毒性较强。顾祖

维^[12]利用微核试验对苯并[a]芘、黄曲霉毒素、联苯 胺、3-甲基胆菌和N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍等致 癌物的遗传毒性进行研究发现,BALB/c 3T3 细胞不 加入代谢活化系统,其自身就能代谢这些物质而显 现出明显的遗传毒性。Colacci 等^[13]研究了 3-甲基 胆蒽和苯并[a]芘的对 BALB/c 3T3 A31-1-1 细胞的 "三致效应",发现不需要加入代谢活化系统,2 种化



图 4 芴作用时间对加药组和对照组细胞氧化峰电流的影响(a) 及与 V79 细胞毒性的关系(b)

注:嵌图为0、6、12、18、24、30和36h对应的电化学曲线图,细胞接种浓度2.0×10⁵ cells·mL⁻¹。

Fig. 4 Effect of culture time on cell oxidation peak currents in the drug group and control group (a) and relationship between fluorene action time and the cytotoxicity to V79 cells (b)

Note: The inset diagram is the corresponding electrochemical curve at 0, 6, 12, 18, 24, 30 and 36 h; cell inoculation concentration is 2.0×10^5 cells · mL⁻¹.





Fig. 5 Effect of fluorene at different doses on the oxidation peak currents of V79 cells (a), and cytotoxicity curves of fluorene acted on V79 cells by the electrochemical method and MTT assay (b)

Note: The inset diagram is the corresponding electrochemical curve at $0 \sim 1.5$ mmol·L⁻¹ concentration of fluorene;

cell inoculation concentration is 2.0×10^5 cells · mL⁻¹; fluorene-treated time is 30 h.

合物就有较强的致癌作用。因此,对芴的 BALB/c 3T3 细胞毒性效应评价时,不仅考虑芴的作用,还要 考虑芴在细胞中发生代谢后产物的毒性作用。

2.4 芴作用时间对 V79 细胞的影响

考察不同作用时间下 0.3 mmol·L⁻¹ 芴对 V79 细胞 G/X 氧化峰电流的影响,进而得到相应的时间-效应关系。图 4(a)为加药组和对照组细胞的 G/X 氧化峰电流随作用时间变化图,加药组细胞的 G/X 氧化峰电流均低于对照组,可能芴的存在抑制了细胞中 G/X 的产生。对照组细胞的 G/X 氧化峰电流随着培养时间的增加而增加,培养至 30 h 后开始降低,可能是培养基中的营养物质消耗殆尽;而加药组细胞的 G/X 氧化峰电流在初期呈下降趋势,6 h 后随着培养时间的增加而增加,培养至 30 h 后开始降低,且加药组与对照组细胞的 G/X 氧化峰电流差值在 30 h 时最大。由加药组和对照组细胞的 G/X 氧化峰电流计算出芴在不同作用时间下的细胞毒性,如图 4(b)所示,随着芴作用时间的增加细胞毒性增强,在 30 h 处达到最大值,为最佳作用时间。

2.5 芴作用剂量对 V79 细胞的影响

考察不同剂量芴对 V79 细胞 G/X 氧化峰电流 的影响,并利用 MTT 法验证电化学法的准确性,得 到芴的 V79 细胞剂量-效应关系。图 5(a)为不同剂 量芴作用下 V79 细胞 G/X 氧化峰电流的变化图,当 芴的作用剂量为 0.010 mmol·L⁻¹时, 细胞的 G/X 氧 化峰电流明显下降,说明少量的芴便影响了细胞的 嘌呤核苷酸代谢:随着芴作用剂量的增加,V79 细胞 的 G/X 氧化峰电流降低,说明随着细胞培养环境中 芴剂量的增加,细胞的嘌呤核苷酸代谢被抑制,V79 细胞的 G/X 含量减少。由不同剂量芴作用下 V79 细胞的 G/X 氧化峰电流变化得到对应的毒性曲线, IC₅₀值为 0.25 mmol·L⁻¹。利用基于 RGOQDs/GCE 的细胞电化学法得到的毒性曲线与 MTT 法测得的 毒性曲线趋势一致,如图 5(b)所示,且电化学法测得 的 IC₅₀ 值低于 MTT 法(0.86 mmol·L⁻¹),说明电化学 法的灵敏度高于 MTT 法。刘云岗等^[14]在对青石棉 的细胞毒性研究中发现,青石棉对 V79 细胞的毒性 要强于 BALB/c-3T3 细胞。由于不同类型细胞的代 谢途径不同,使得芴作用下2种细胞的 IC50 值有一 定的差异, 芴对 V79 细胞毒性的 IC50 值更小, 说明 芴对 V79 细胞的毒性更强。

3 讨论(Discussion)

本文研究了芴对 BALB/c 3T3 和 V79 这 2 种细

胞毒性的时间-效应和剂量-效应,利用基于 RGO-QDs/GCE 的细胞电化学法测得的 IC₅₀ 值为 0.89 mmol·L⁻¹和 0.25 mmol·L⁻¹,MTT 法测得的 IC₅₀ 值 为 1.34 mmol·L⁻¹和 0.86 mmol·L⁻¹。2 种方法测得 的 BALB/c 3T3 细胞的 IC₅₀ 值均大于 V79 细胞的 IC₅₀ 值,说明芴对 V79 细胞的毒性更强;电化学法 测得的 IC₅₀ 值要小于 MTT 法测得的 IC₅₀ 值,说明 电化学法的灵敏度要更高一些。p53 基因具有基因 调节作用并参与 DNA 修复、细胞周期阻滞、凋亡 等,而具有基因毒性的 PAHs 类物质会激活细胞中 的 p53 基因进而影响细胞周期。Chramostová 等^[15] 通过研究 PAHs 对不同细胞的影响发现,由于细胞 类型不同,在 G₁期阻滞、S 期延长或细胞凋亡等方 面有一定差异,所示不同细胞在代谢产物上也不同。

通讯作者简介:武冬梅(1967—),女,博士,教授,主要研究方 向为环境毒理学。

参考文献(References):

- Alegbeleye O O, Opeolu B O, Jackson V. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds: (Acenaphthene and fluorene) in water using indigenous bacterial species isolated from the Diep and Plankenburg Rivers, Western Cape, South Africa [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2017, 48(2): 314-325
- [2] Akdogan H A, Pazarlioglu N K. Fluorene biodegradation by *P. ostreatus*—Part I: Biodegradation by free cells [J]. Process Biochemistry, 2011, 46(4): 834-839
- [3] Danz M, Bräuer R. Carcinogenic and non-carcinogenic fluorene derivatives: Induction of thymocyte stimulating serum factors by 2-acetylaminofluorene (AAF) and their synergy with lymphocyte mitogens [J]. Experimental Pathology, 1988, 34(4): 217-221
- [4] Essumang D K, Dodoo D K, Adjei J K. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in smoke-cured fish products [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2012, 27(2): 128-138
- [5] 马运明, 姜淑卿, 张静, 等. 某城市回用水中多环芳烃 的含量及其有机提取物的细胞毒性[J]. 环境与健康杂 志, 2010, 27(12): 1074-1076
 Ma Y M, Jiang S Q, Zhang J, et al. Levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in reclaimed water used in a city and the cytotoxicity of organic extracts [J]. Journal of Environment and Health, 2010, 27(12): 1074-1076 (in Chinese)
- [6] Schirmer K, Dixon D G, Greenberg B M, et al. Ability of

16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill [J]. Toxicology, 1998, 127(1-3): 129-141

- [7] Zhu X L, Qin H W, Liu J G, et al. A novel electrochemical method to evaluate the cytotoxicity of heavy metals
 [J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 271: 210-219
- [8] Zhou S, Guo P, Li J L, et al. An electrochemical method for evaluation the cytotoxicity of fluorene on reduced graphene oxide quantum dots modified electrode [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 255: 2595-2600
- [9] Qin H W, Gao Q D, Niu H M, et al. An *in situ* electrochemical detection method of cell viability [J]. The Analyst, 2013, 138(12): 3372-3375
- [10] Li J L, Lin R X, Wang Q, et al. Two-signal electrochemical method for evaluation suppression and proliferation of MCF-7 cells based on intracellular purine [J]. Analytical Biochemistry, 2014, 456: 1-5
- [11] Li J L, Song J, Bi S, et al. Electrochemical estrogen screen method based on the electrochemical behavior of MCF-7 cells [J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 313: 238-243

- [12] 顾祖维. BALB/c-3T3 细胞的体外微核试验[J]. 工业卫 生与职业病, 1994, 20(4): 204-206
 Gu Z W. *In vitro* micronucleus assay in BALB/c-3T3 cells
 [J]. Industrial Health and Occupational Diseases, 1994, 20
 (4): 204-206 (in Chinese)
- [13] Colacci A, Mascolo M G, Perdichizzi S, et al. Different sensitivity of BALB/c 3T3 cell clones in the response to carcinogens [J]. Toxicology in Vitro, 2011, 25(6): 1183-1190
- [14] 刘云岗, 刘玉清, 周谷, 等. 青石棉体外诱发细胞微核
 与多核[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1997, 11(1): 63-66

Liu Y G, Liu Y Q, Zhou G, et al. Induction of micronuclei and multinuclei *in vitro* by crocidolite [J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 1997, 11 (1): 63-66 (in Chinese)

[15] Chramostová K, Vondráček J, Šindlerová L, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons modulate cell proliferation in rat hepatic epithelial stem-like WB-F344 cells [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2004, 196(1): 136-148

٠