

論文

以細胞株直接暴露系統應用於評估燃燒產物細胞毒性

劉怡汶¹ 吳佩芝¹ 戴聿彤¹

¹ 長榮大學職業安全與衛生研究所

摘要

本研究使用蕭等人改良的Air Liquid Interface, ALI (氣、液介面) 暴露系統搭配燃燒系統進行燃燒產物的細胞毒理測試，次評估ALI暴露系統應用在燃燒產物細胞毒理評估之可行性。

本研究將線香放置燃燒系統中使用高壓電源供應器對暴露系統施加電壓，讓微粒直接沉積Transwell的細胞上，進一步使用掃描式電移動度粒徑分析儀監測微粒的濃度及系統的穩定度。燃燒系統會產生三組濃度，讓細胞同時暴露混合污染物，再加裝濾網過濾微粒，讓細胞單純暴露氣態污染物，進而比較其毒性差異。暴露完之後以trypan blue染色法及MTT assay來計算細胞的存活率，並量測細胞釋放Reactive Oxygen Species, ROS的產量評估燃燒產物與細胞氧化性壓力的關係。

研究結果顯示產生源的粒徑分布範圍為100~400nm，且以單峰呈現。數目中位數粒徑介於163nm~195nm之間。本系統的沉積率在施加電壓後使微粒整體的沉積率提升5%~15%。細胞微粒的暴露劑量與Trypan blue染色法所呈現細胞的存活率的減少率呈現顯著的線性關係($R^2=0.9501$)與ROS釋放量的增加率亦呈現顯著的線性關係($R^2=0.9071$)。暴露氣態污染物的細胞存活率皆高於暴露混合污染物細胞，反應出暴露混合物的毒性高過於暴露氣態污染物。

不同的暴露劑量對於Trypan blue染色法所呈現細胞的存活率的減少率及ROS釋放量的增加率都有顯著的相關性，顯示本系統可有效使微粒暴露不同劑量燃燒產物，並可利用Trypan blue及ROS產量評估出混合物及氣態污染物對細胞的毒性危害。但本研究在細胞上的整體沉積率後續仍需以電子顯微鏡確認之。

關鍵字：燃燒產物、直接暴露系統、氣、液介面細胞株、存活率

民國 102 年 10 月 30 日投稿，民國 103 年 7 月 30 日修改，民國 104 年 6 月 19 日接受。
通訊作者：劉怡汶，長榮大學職業安全與衛生研究所，51151彰化縣社頭鄉湳雅村進化巷178號，
電子郵件信箱：yiwenliu615@gmail.com。

緒言

透過各類科學證據的彙整，世界衛生組織已證實，空氣中微粒對於民眾健康的影響層面相當廣泛。影響最明確的主要是呼吸系統和心臟血管系統[1]。整體而言，不同微粒的組成、粒徑、大小、型態等的暴露污染物不同，對健康及各類疾病的影響仍不明確。

許多研究發現，萃取微粒中的化學成分進行毒性測試並不能反映出氣膠微粒實際對人體產生的危害特性，因為微粒的沉積量亦扮演重要的角色[2]，再者傳統暴露方法可能無法使細胞暴露到實際污染物中的半揮發性化學物質，混合污染物的氣態物質更是在採集過程中便已逸散流失[3]。

近年來有一項暴露方法為一氣、液介面 (Air- Liquid Interface, ALI) 培養法，他是將人類的呼吸道細胞養在一個半透膜上，而這個技術提供了一個可以讓微粒直接沉積在細胞表面上的途徑，改善了傳統暴露方法的缺點，使整個暴露方式和微粒進入人體的傳遞途徑及沉積暴露模式更加類似。

目前利用細胞株直接暴露系統應用在空氣污染物暴露的毒理實驗上有不同的系統，大致上有考慮到以下四種機制，包含重力沉降、擴散、靜電吸引、和慣性衝擊，重力沉降和擴散作用這兩個沉降過程都是比較緩慢的，重力沉降對於粒徑大於50微米的微粒收集效率會比較好，擴散作用需要比較長的時間讓微粒沉降，靜電吸引雖然需要高壓電場，但是他微粒的傳遞效率高，沉積率也很高，慣性衝擊是一個可被預期在短時間內讓氣膠微粒沉積在細胞表面上的方法，可是容易對細胞造成衝擊傷害，而且這個機制與重力沉降有相同的缺點，這兩個機制對於小微粒的收集效率很低。

過去的研究中，無論是動物研究或者是細胞毒理研究都是單獨暴露氣態污染物或單獨補集粒狀污染物進行實驗，單獨暴露的過程中會造成污染物改變原來的特性，雖然兩者實驗都證實會對細胞與動物造成傷害，但人體在實際的暴露狀況下，是暴露氣態與粒狀的混合污染物，不同的混合物型態對人體造成的傷害也會不同，所以開發測試一個可以讓細胞直接暴露混合污染物的系統可以讓整個實驗更接近人體暴露的狀況。

方法

1. 暴露系統

燃燒系統是長的長、寬、高皆為60cm所製做而成的壓克力立方體，實驗過程中會將線香放進此艙體內，以試管架當線香的支架，燃燒系統的進氣端會利用幫浦將空氣引導於燃燒艙體內，使艙體有足夠的氧氣讓線香持續燃燒。

圖1是由蕭大智[4]改良的小型暴露艙的剖面圖，下方圓盤上方增加了一個玻璃器皿用來放置Transwell，將高壓電源供應器(High Voltage Power Supply, Model Bertan 230-10R, Spellman Inc., Hauppauge, NY, USA)直接接在小型暴露艙，施加電壓後，會造成金屬圓盤間產生向下的電場力，微粒會藉由上層的圓柱導管引載下來，透過電壓引導微粒，讓微粒直接沉積在Air-liquid interface的Transwell insert上，由於細胞需要培養在37°C的環境中，所以會以培養箱來調控溫度。為了保持整體系統的穩定，本實驗將燃燒系統進氣端幫浦與小型暴露艙出氣端的幫浦流量的流量皆控制於300ml/min。

本研究會利用燃燒系統產生燃燒產物，將燃燒產物的暴露濃度分為低濃度、中濃度和高濃度，並以1、2、3根線香燃燒來提供暴露

源，再以2小時、4小時及6小時不同的時間長短來調控暴露劑量的高低。

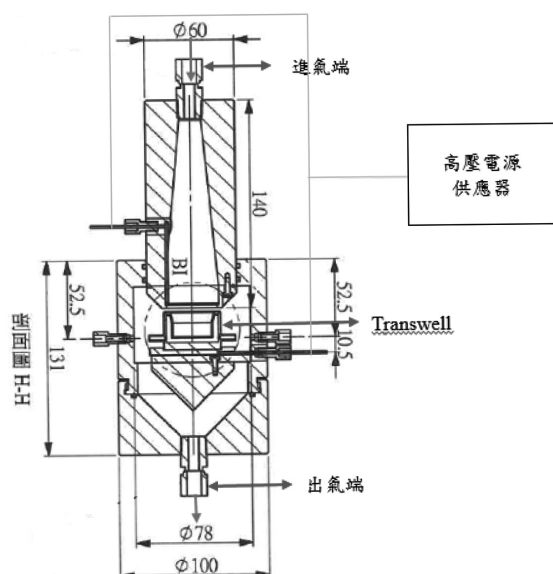


圖1 小型暴露艙的剖面圖

2. 沉積率測試

微粒的沉積率，本實驗以掃描式電動度粒徑分析儀(Scanning Mobility Particle Sizer, SMPS)去做小微粒的測量與計算，分別在小型暴露艙進氣端先測量微粒進氣濃度(C_{in})，小型暴露艙出氣端微粒出氣濃度(C_{out})，再去換算沉積率。

$$\text{沉積率} = [1 - (C_{out} / C_{in})] \times 100\%$$

C_{out} = 暴露艙下游出氣濃度

C_{in} = 暴露艙上游進氣濃度

3. 細胞毒理實驗

細胞實驗方面首先將細胞培養於10公分的培養盤中，等到細胞成長至八分滿，將細胞以每個well 4×10^5 cell/ml 的固定數量，將打下來的細胞培養在6-well plate的Transwell insert進行實驗。進行暴露時會將小型暴露艙中Transwell insert下方的玻璃器皿中培養液加入6ml培養液再將培養在6-well plate的Transwell insert直接用

鑷子取出放置於小型的暴露艙中即可。

細胞實驗中首先會讓細胞暴露氣狀和粒狀混合污染物，另外在暴露艙前加裝HEPA濾網過濾微粒，讓細胞單純暴露氣狀污染物再進而比較細胞之間的存活率及ROS(reactive oxygen species)的釋放量的差異性。

存活率分析會以Trypan blue 染色法和MTT assay，Trypan blue 染色法將暴露後的細胞打下製作成細胞懸浮液加入trypan blue對半稀釋且均勻混合後，使用血球計數器計數細胞數目，在顯微鏡觀察下，存活的細胞不會被染色呈現透明狀態，而死亡細胞的細胞核及細胞質會被染成藍色的，藉由計數存活的細胞數目及死亡的細胞數目便可以計算細胞的總數與其存活率。MTT assay是將暴露完的細胞中的medium移除，再每個well加入2ml的MTT-PBS混合medium的藥劑，將細胞培養盤放置於37°C培養箱避光培養2小時，2小時後移除Transwell上的MTT-PBS混合medium的藥劑，避免移除Transwell上紫色結晶，之後每個well加入2ml的DMSO溶解紫色結晶，溶解後再將Transwell上的細胞抽取至96孔盤，每個well加入100 μ l再拿至ELISA reader，以590nm讀取其吸光值，吸光值越高代表細胞存活數目越高，因此可以間接反應細胞的存活量。

ROS分析會以一種對過氧化物相當敏感的染劑DCFH-DA，可用來偵測細胞內產生的過氧化物。在研究過程中會配置H₂O₂ (30%)標準曲線，以DCFH-HRP做稀釋劑，分別配製100mM、50mM、10mM、5mM、1mM 5種不同濃度的H₂O₂溶液。將暴露後的細胞樣本各取出0.4ml分別加入0.4ml（等倍稀釋）的DCFH-HRP溶液中，接著使用超音波震盪機讓細胞與DCFH-HRP混合溶液震盪10分鐘，震盪結束後將細胞與DCFH-HRP混合溶液轉移置96孔微量

黑色盤每個well加入100 μ l，以鋁箔紙蓋住放置於37 $^{\circ}$ C培養箱中反應15分鐘，15分鐘後再取出於室溫下回溫5分鐘，然後在上機分析。

結果與討論

1. 燃燒產生源粒徑分佈

以掃描式電動度粒徑分析儀(SMPS)進行測量，分析其細微粒的分佈範圍。由圖2可看出本研究所使用的三種燃燒情境（1支、2支、3支）線香香燃燒一小時後所產生之微粒的粒徑分佈圖，在30分鐘的測量時間內可看出線香粒徑大部分分佈在100nm~400nm，燃燒1根香的時候此分佈範圍的微粒數目佔總數目濃度的61%；燃燒2根香的時候此分佈範圍的微粒數目佔總數目濃度的74.71%；燃燒3根香的時候此分佈範圍的微粒數目佔總數目濃度的66.49%。陳沛蓉[5]的研究中使用衝擊瓶直接採集密閉壓力克力容器中的拜香產生微粒，測量拜香0.05 μ m~25 μ m的粒徑分佈，其中100nm~400nm佔了70.2%與本研究燃燒線香產生的粒徑範圍相近。

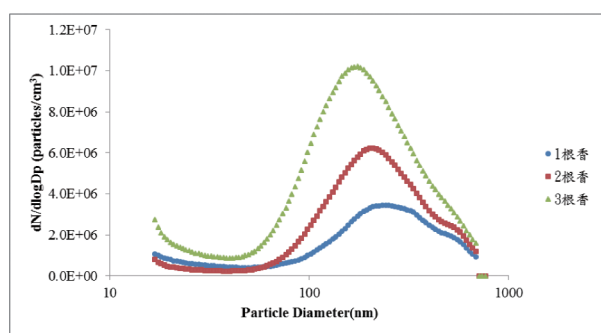


圖2 以SMPS量測之線香燃燒粒徑分佈情形

本研究計算出的數目粒徑中位數燃燒1根香與燃燒2根香為195nm，燃燒3根香為157nm、163nm，燃燒1根香及2根香的數目中位數粒徑與吳信慶[6]研究中的數目中位數粒徑相近，與楊慈定[7]的研究結果也相符。

本研究的燃燒1根香的高峰值為241nm，燃燒2根香及3根香為209.13nm，而Wu等人[8]的研究中台灣製香柱的高峰值為132.7 \pm 7.3nm，吳信慶[6]研究中的高峰值187.7 nm、194.6 nm皆有差異，主要的原因為燃燒效率的差異，拜香原物料組成的差異。

2. 沉積率測試

本研究為了推估細胞暴露的微粒劑量對細胞造成的傷害所以需要測試暴露艙整體的沉積率，實驗過程中的燃燒源為多粒徑的微粒，而不同大小的微粒沉積效率皆會不一樣，所以分別計算不同粒徑大小的沉積效率，利用SMPS量測暴露艙上游進氣的濃度接著再量測暴露艙下游的濃度去推算不同粒徑的貫穿率。

假設1為微粒100%通過暴露艙，以1扣除微粒貫穿率即可推算出暴露艙中微粒沉積比率，不同粒徑未施加電壓的沉積率為15%~45%，施加電壓4kV後，沉積率比未施加電壓的沉積率提升5~15%，不同粒徑的沉積率平均範圍為28%~50%，本研究估算出的沉積率為整個暴露艙的沉積率，不代表實際上沉積於Transwell insert的比率，與其他的暴露系統沉積率相比，本研究整體的沉積率相較較高。

利用慣性碰撞所建立的直接暴露系統，設定噴射流量為0.5 l/s的時候，其微粒沉積率可達8.6%[9]。由Lenz等人所研發的ALICE系統，此研究結果氣膠的總沉積率可達57%，但實際上沉積在6-well plates的沉積率只有7%[10]。Volckens等人利用靜電吸引製作一個暴露系統，此系統可以收集0.5 μ m的微粒沉積效率為88%而10 μ m微粒沉積效率為100%，但是其粒收集區覆蓋面積為55.3cm²，而細胞暴露區域為1.12cm²，假設他的沉積率均勻的，每個細胞暴露區可能收集到微粒為2%。然而鉍熒光顆粒

沉積實際結果發現，每個細胞暴露區只有1.3%沉積率[11]。

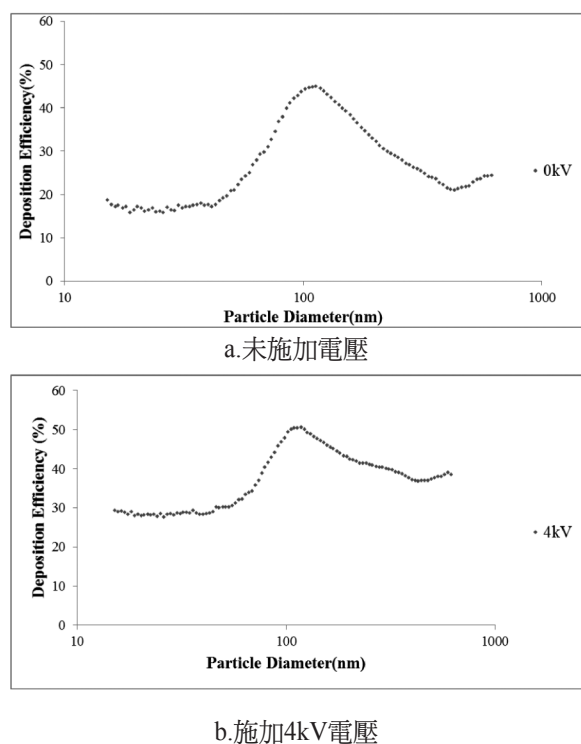


圖3 沉積率測試結果

3. 暴露劑量計算

據本研究的暴露艙平均濃度，進一步透過不同的濃度、沉積率與暴露時間間接估算出細胞微粒的暴露劑量，公式如下：

$$\text{Dose} = (Q \times C \times \text{Deposition Rate} \times \Delta t) / A$$

$$Q = \text{流量}(\text{ml}/\text{min})$$

$$C = \text{質量濃度}(\mu\text{g}/\text{m}^3)$$

$$\Delta t = \text{暴露時間}(\text{min})$$

$$A = \text{Transwell表面積}(\text{cm}^2)$$

4. 線香對細胞的存活率分析

將肺癌細胞培養於Air-liquid interface，分別暴露三組不同的濃度由表1可看出同一個時間比較不同濃度的存活率，結果顯示control與三組不同根數的拜香暴露2小時(p value=0.027)、4小時(p value=0.027)、6小時(p

value=0.027)時間狀態下，可以看出有暴露的濃度隨著香的根數越多細胞的存活率越低。與傳統的研究相比，本研究所使用的ALI暴露系統除了能評估劑量效應上的差別外，細胞的毒理反應較於敏感且差異性大。

細胞暴露三個不同的時間後，其細胞存活率隨著暴露時間而降低，燃燒3根香時更可以發現隨著暴露的時間越長，再與對照組比較，細胞的存活率相較下都降低而暴露4小時與6小時的反應較明顯，與過去研究指出對於細微粒的細胞毒理反應，需要暴露4小時以上細胞壞死數目才會不斷增加的結果相符合[12]。

表1 暴露濃度及時間與細胞存活率(Typan blue)相關性

Viability hrs	Mixture			Gas				
	1	2	3	P ₁	1	2	3	P ₁
Control	89.67	85.33	77.67		88.33	84.67	76.67	
2	85.67	75	60.33	0.027	85.67	77.67	77	0.184
4	74.67	57	8.67	0.027	81.67	66.67	51.67	0.027
6	71.67	29	3.33	0.027	73.33	57.33	42.67	0.027
P ₂	0.052	0.027	0.027		0.106	0.032	0.047	

以MTT的吸光值來探討細胞存活率結果表2以同一個時間來看不同根數的香對細胞造成的傷害是否有差異，暴露2小時(p value=0.000)、4小時(p value=0.000)、6小時(p value=0.004)，而三組不同根數的香之間，隨著香的根數越多，細胞的吸光值隨之降低代表其存活率隨著濃度增高而下降。

以暴露同樣的濃度比較細胞暴露2小時、4小時、6小時相關性，由表3可以發現與control組比較可看出吸光值有明顯下降趨勢，代表MTT是一個敏感的檢測方法，但是三組之間的減少率卻沒有太大的差異此結果與trypan blue染色法有所差異，其原因可能是奈米微粒的特性會影響MTT吸光值的偵測結果，例如酸鹼值相關變化或是奈米微粒與基值產生交互反應，

此篇作者提出讓細胞暴露奈米微粒後進行MTT的實驗，發現MTT所產生的formazan結晶會與奈米結合或者在formazan結晶中發現奈米微粒，因此影響儀器的偵測結果[13]。

表2 暴露濃度及時間與細胞MTT相關性

OD值 hrs	Mixture				Gas			
	1	2	3	P ₁	1	2	3	P ₁
Control	2.1615	1.782	1.618		2.118	1.935	1.282	
2	0.4849	0.4029	0.3324	0.000	2.0629	0.5341	0.4969	0.000
4	0.4849	0.3727	0.3424	0.000	1.3240	0.4984	0.4154	0.000
6	0.4154	0.3953	0.3454	0.004	1.3426	0.4460	0.3597	0.000
P ₂	0.033	0.001	0.023		0.000	0.015	0.001	

P₁:同一時間下，隨著支數增加是否有顯著差異

P₂:同一支數下，隨著時間增加是否有顯著差異

p value < 0.05表示顯著

表3 不同時間細胞MTT吸光值的下降比率

Reduction hrs	Mixture			Gas		
	1	2	3	1	2	3
2	77.61%	72.84%	74.51%	13.88%	30.66%	2.51%
4	82.72%	78.96%	75.93%	74.68%	73.99%	66.66%
6	84.45%	80.74%	78.03%	77.83%	78.68%	73.41%

5. 線香暴露對細胞活性氧化物分析

過去研究認為可吸入微粒進入人體的呼吸道環境並產生的氧化壓力產物導致細胞產生炎症反應並對細胞造成傷害且對人體健康造成影響，Hsiao-Chi等人的研究中透過迴歸分析微粒粒徑大小與ROS產生的相關性，結果顯示微粒的粒徑越小產生的ROS量越多[14]。

表4主要以暴露3組不同濃度來看細胞ROS的釋放量是否會有差異，由同，燃燒1根香組別劑量分別為6.85(mg/cm²)、13.71(mg/cm²)、20.57(mg/cm²)，隨著時間增加、劑量增加，細胞的ROS釋放量有逐漸升高的趨勢，而燃燒兩根香與燃燒三根香的組別整體也是有顯著性的差異。

表4 暴露濃度及時間與細胞ROS釋放量相關性

ROS hrs	Mixture				Gas			
	1	2	3	P ₁	1	2	3	P ₁
Control	12.30	13.72	13.41		12.13	11.92	13.29	
2	14.26	17.57	49.86	0.001	14.61	14.75	16.22	0.001
4	15.88	22.77	201.77	0.001	14.22	17.59	20.72	0.001
6	16.56	42.79	564.69	0.001	16.65	20.56	31.32	0.001
P ₂	0.001	0.001	0.001		0.001	0.001	0.001	

P₁:同一時間下，隨著支數增加是否有顯著差異

P₂:同一支數下，隨著時間增加是否有顯著差異

p value < 0.05表示顯著

過去有研究者發現傳統方法中使用濃度50μg/ml的微粒懸浮液讓細胞暴露劑量達到10μg/cm²、50μg/cm²、100μg/cm²，而細胞的reactive oxygen species(ROS)有呈現明顯劑量效應，而細胞株直接暴露系統的劑量控制是透過氣膠噴霧器每0.5秒所噴射的次數來區別低、中、高三組濃度，其劑量分別為10μg/cm²、50μg/cm²、100μg/cm²，細胞暴露後細胞釋放的reactive oxygen species(ROS)有呈現明顯劑量效應的關係，但是細胞株直接暴露系統的整體結果比較明顯且差異性也比較大[9]。

無論是暴露不同濃度或暴露不同劑量，其暴露氣態污染物的細胞ROS釋放量是有明顯的劑量效應，另外可以從表中發現暴露混合污染物的細胞ROS釋放量都是高過於暴露氣態污染物的細胞ROS釋放量。

本研究讓細胞暴露不同的濃度隨著時間增加、劑量增加，細胞的ROS釋放量有逐漸升高的趨勢，過去研究者比較傳統方法與細胞株直接暴露系統細胞釋放的reactive oxygen species(ROS)的結果，兩者皆呈現明顯劑量效應的關係與本研究相同，此外，本研究比較暴露混合污染物與單純暴露氣態污染物結果顯示暴露混合污染物的ROS釋放量是較高的與過去研究結果[15]是相同的。劑量控制方面本研究計算整體的微粒沉積，微粒的粒徑大小影響整體的微粒重量，也高估實際沉積在Transwell上

的微粒的沉積率，劑量遠高於過去的研究。

本研究間接估算劑量與Trypan blue染色法所呈現暴露混合污染物細胞存活率的減少率呈現顯著的線性關係($R^2=0.9501$)而暴露氣態污染細胞存活率的減少率 R^2 達到0.9876，暴露混合污染物($R^2=0.9071$)及暴露氣態污染物($R^2=0.8644$)的細胞ROS釋放量的增加率亦呈現顯著的線性關係，至於MTT計算出的下降率與劑量均無顯著的線性關係，MTT這個方法並不適用評估燃燒產物對細胞的毒理反應。此外本研究透過加裝HEPA濾網除去大部分的微粒，讓細胞單存的暴露氣態污染物，由圖4可明顯看出隨著劑量增加暴露混合污染物的細胞存活率的下降率與暴露氣態污染物的差異就越大，由圖5的ROS釋放量的減少率也可以明顯的看出差異，顯示出當暴露劑量越高時暴露混合污染物對細胞毒造成的影響高於單純暴露氣態污染細胞。

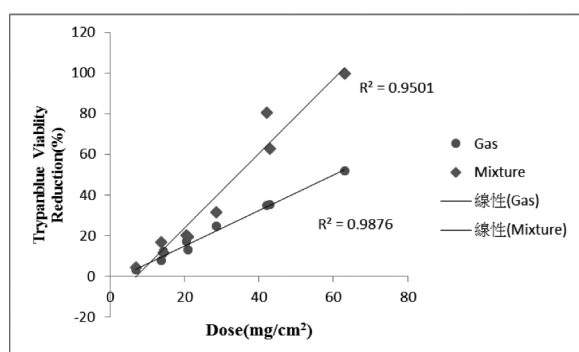


圖4 劑量與Trypanblue Viability Reduction 線性關係

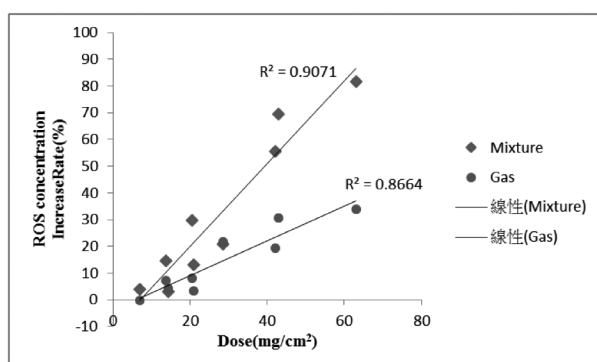


圖5 劑量與ROS產生量提升率線性關係

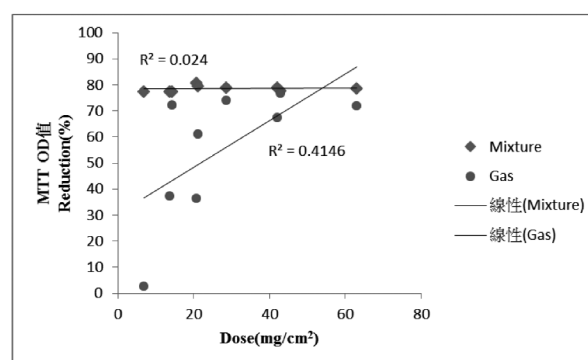


圖6 劑量與MTT吸光值Reduction線性關係

結論

此次研究由線香代替燃燒產物的產生源，其微粒粒徑範圍大部分分佈於100nm~400nm，中位數粒徑介於163nm ~195nm之間。本暴露系統施加電壓後不同粒徑範圍的整體沉積率為28%~50%，與其他研究的暴露系統沉積率相比，本研究的整體沉積率相較較高，但後續仍進一步以電子顯微鏡確認實際沉積於ALI細胞表面的沉積率為何。透過暴露艙中濃度、沉積率與暴露時間去估算細胞的暴露劑量，估算公式為： $Dose = (Q \times C \times Deposition Rate \times \Delta t) / A_{cell}$ 。透過濃度、沉積率與暴露時間間接推估細胞微粒的暴露劑量，不同的暴露劑量對於Trypan blue染色法所呈現細胞的存活率的減少率及ROS釋放量的增加率都有顯著的相關性，顯示本系統可有效使微粒暴露不同劑量燃燒產物，並可利用Trypan blue及ROS產量評估出混合物及氣態污染物對細胞的毒性危害。

誌謝

本研究承蒙中央大學蕭大智教授、大葉大學葉靜華教授、長榮大學戴聿彤與吳佩芝教授的指導與審查，並提供寶貴意見，敬表謝忱。

參考文獻

- [1] Wan J, Diaz-Sanchez D. Antioxidant enzyme induction: a new protective approach against the adverse effects of diesel exhaust particles. *Inhalation Toxicology* 2007; 19 Suppl 1: 177-82.
- [2] Sonja B, Armelles BS, Thierry F, Odile H, Marie-Claude G, Gilles J, et al. Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology* Published 1999; 276: 604-13.
- [3] Sager TM, Porter DW, Robinson VA, Lindsley WG, Schwegler-Berry DE, Castranova V. Improved method to disperse nanoparticles for in vitro and in vivo investigation of toxicity. *Nanotoxicology* 2007; 1: 118-29.
- [4] 蕭大智：空氣中微粒進行細胞株危害測試方法建立（一）。行政院勞工委員會勞工安全衛生研究所研究計畫（未發表）。
- [5] 陳佩蓉：拜香、香菸及稻草燃燒產生微粒之細胞毒性研究。國立陽明大學環境與職業衛生研究所碩士論文；2004。
- [6] 吳信慶：拜香燃煙之有機指標特徵及數目參數研究。嘉南藥理科技大學環境工程與科學系暨研究所碩士論文；2011。
- [7] 楊慈定：健康拜香之研發：拜香燃煙生成微粒與氣態污染物排放特性。國立台灣大學環境衛生研究博士論文；2005。
- [8] Wu CL, Chao YH, Sze-To GN, Wan MP, Chan TC. Ultrafine particle emission from cigarette smouldering, incense burning, vacuum cleaner motor operation and cooking. *Indoor and Built Environment* 2011; 21:782.
- [9] Cooney DJ, Hickey AJ. Cellular response to the deposition of diesel exhaust particle aerosols onto human lung cells grown at the air-liquid interface by inertial impaction. *Toxicology in Vitro* 2011; 25: 1953-65.
- [10] Lenz AG, Karg E, Lentner B, Dittrich V, Brandenberger C, Rothen-Rutishauser B, et al. A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles. *Particle and fibre toxicology* 2009; 6: 32.
- [11] Volckens J, Dailey L, Walters G, Devlin RB. Direct Particle-to-Cell Deposition of Coarse Ambient Particulate Matter Increases the Production of Inflammatory Mediators from Cultured Human Airway Epithelial Cells. *Environmental science & technology* 2009; 43: 4595-9.
- [12] Totlandsdal AI, Cassee FR, Schwarze P, Refsnes M, Lag M. Diesel exhaust particles induce CYP1A1 and pro-inflammatory responses via differential pathways in human bronchial epithelial cells. *Particle and fibre toxicology* 2010; 7: 41.
- [13] Wo1rle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *American Chemical Society* 2006; 6: 1261-68.
- [14] Chuang HC, Jones TP, Lung SC, BeruBe KA. Soot-driven reactive oxygen species formation from incense burning. *The Science of the total environment* 2011; 409: 4781-7.
- [15] 林欣儀：多環芳香烴和微粒共同暴露對細胞毒性之研究。國立陽明大學環境衛生研究所碩士論文；2005。

Commentary

Using Cell Direct Exposure System in Evaluating Toxicity of Combustion Product

Yi-Wen Liu¹ Pei-Chih Wu¹ Yu-Tung Dai¹

¹ Department of Occupational Safety and Health Chang Jung Christian University

Abstract

One study use a modified ALI exposure system developed by Hsiao et al with combustion products from the combustion systems for cell toxicity testing. We evaluated the feasibility of the ALI exposure system using for air mixtures from combustion.

The incense was placed in burning system and high voltage power supply was applied on the exposure system. To increase particles deposition on Transwell. Scanning Mobility Particle Sizer was used to measure the particles levels in the exposure system. There levels of combustion products were introduced to cell exposure chamber. Filtration system was then used to remove the particles from the system, to create a gas phase exposure scenario for ALI. Trypan blue staining and MTT assay were used to measure the cell viability, and ROS production was used to evaluate the oxidative stress from combustion products.

One results shown the range of particle diameter were 100 to 400 nm with unimodal distribution. The number median diameter were between 163nm to 195nm three levels of generation source. The deposition rate of the exposure system shows the increased 5% to 15% with applying voltage.

Cell viability reduction rate shown a significant decrease with increasing exposing doses in a linear relationship ($R^2 = 0.9501$). The increase of ROS release also shown a significant linear relationship with exposing doses ($R^2 = 0.9071$). Linear dose dependent effects also shown on gas phase exposure. However, the toxicity were lower than mixtures of combustion.

One study use significantly, decrease linear dose-dependent effects deposition rate and exposure

Accepted 19 June, 2015

Correspondence to: Yi-Wen Liu, Department of Occupational Safety and Health, Chang Jung Christian University, No.178, Jinhua Ln., Shetou Township, Changhua Country 51151, Taiwan(R.O.C), Email address:yiwenliu615@gmail.com

time to estimate the exposure dose for cells both could be observed on reduction rate of cell viability and the increase of ROS for mixture of combustion and only gas phase. One system can effectively use to different combustion products, showing the overall deposition rate on ALI cells should further examine by electron microscopy in the near future.

Keywords: Burning product, Direct exposure system, Air Liquid Interface, Cell viability