

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2022041304

周浩然, 缪爱军. 细胞内微塑料定性和定量方法概述[J]. 环境化学, 2023, 42(9): 2876-2884.

ZHOU Haoran, MIAO Aijun. Qualitative and quantitative methods for intracellular microplastics: A review[J]. Environmental Chemistry, 2023, 42(9): 2876-2884.

细胞内微塑料定性和定量方法概述*

周浩然 缪爱军**

(污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 南京, 210023)

摘要 微塑料作为一种广泛存在的新型污染物, 可能对生态系统和人类健康产生不利影响, 因此需要建立细胞内微塑料的准确定性和定量分析方法, 以进一步研究微塑料在生物体内的累积、分布及毒性效应. 由于现有研究大多是以人工合成的塑料颗粒(特别是聚苯乙烯颗粒)作为微塑料的模式颗粒, 本文首先总结了4种人工合成微塑料(普通微塑料、荧光标记微塑料、稀有金属标记微塑料、放射性同位素标记微塑料)的特性与制备方法, 随后总结并比较了基于人工合成塑料颗粒的细胞内微塑料定性和定量方法(电子显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪), 并参考其它研究中新兴的微塑料检测技术(电感耦合等离子体质谱、液体闪烁计数仪、高光谱暗场成像、拉曼成像), 为细胞内微塑料检测提供新思路. 最后针对现有细胞内微塑料检测方法存在的问题和局限, 提出未来的研究方向.

关键词 细胞, 微塑料, 定性方法, 定量方法.

Qualitative and quantitative methods for intracellular microplastics: A review

ZHOU Haoran MIAO Aijun**

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment,
Nanjing University, Nanjing, 210023, China)

Abstract Microplastics are widespread contaminants of emerging concern as a result of their potential adverse effects on ecosystems and human health. It is necessary to establish accurate qualitative and quantitative analysis methods for intracellular microplastics, so as to further study the accumulation, distribution and toxicity of microplastics in organisms. Considering the fact that synthetic microplastics (especially polystyrene microspheres) are widely used in current researches, in this review we first focused on recent progress in the characteristics and synthesis methods of four synthetic microplastics (ordinary microplastics, fluorescent-labeled microplastics, rare metal-labeled microplastics, and radioisotope-labeled microplastics). Further, various qualitative and quantitative methods (electron microscopy, confocal scanning laser microscopy, and flow cytometry) for determining intracellular microplastics based on synthetic microplastics were assessed. Emerging techniques (inductively coupled plasma mass spectrometry, liquid scintillation spectrometry, hyperspectral imaging with enhanced darkfield microscopy, Raman spectroscopy) were also

2022年4月13日收稿(Received: April 13, 2022).

* 国家自然科学基金(21822605, 22176093)和国家重点研发计划(2022YFA1205603)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21822605, 22176093) and the National Key R&D Program of China (2022YFA1205603).

** 通信联系人 **Corresponding author**, E-mail: miaoj@nju.edu.cn

evaluated in order to provide new insights into the detection of intracellular microplastics. Finally, we identified knowledge gaps and proposed possible strategies to analyze intracellular microplastics.

Keywords cell, microplastics, qualitative method, quantitative method.

微塑料通常是指直径小于 5 mm 的塑料颗粒^[1], 其在环境中普遍存在且难以降解, 可能对生态系统产生风险, 因而引起了广泛的关注. 微塑料体积小, 很容易被食物网中各个营养级的生物吸收, 并可能在更高的营养级累积^[2-3]. 微塑料进入生物体后, 一方面可能造成直接毒性效应, 如黏膜损坏、肝脏损伤、消化道堵塞等; 另一方面可以吸附其他有毒有害物质而造成间接毒性效应, 如内分泌干扰、致癌等^[4]. 更有研究发现微塑料可以穿过胃肠屏障、气血屏障甚至是胎盘屏障等^[5-7], 从而带来更严重的安全风险. 由于目前不完全明确微塑料对人体的毒性效应和致毒机制, 一些研究者使用人类细胞系作为受试生物探究微塑料的潜在毒性和有害影响. Prietl 等^[8]发现白细胞、单核细胞、巨噬细胞被动吸收 20 nm 的聚苯乙烯(polystyrene, PS), 但对 500 nm 的 PS 则同时进行被动吸收和主动吸收, 且 20 nm 的 PS 对 3 种细胞均有毒性, 500 nm 的 PS 仅对巨噬细胞有毒性. Xu 等^[9]发现, 相较于 70 nm 的 PS, 25 nm 的 PS 更快更有效地内化到人肺癌细胞 A549 的细胞质中, 从而显著影响细胞活力, 改变细胞周期并促进促凋亡蛋白的表达. Wu 等^[10]发现, 100 nm 和 5 μm 的 PS 均可以对人结直肠腺癌细胞 Caco-2 产生毒性, 但 5 μm 的 PS 对细胞内线粒体膜电位产生了更大的影响, 并可以通过诱导线粒体去极化降低质膜 ATP 转运蛋白的活性, 从而对细胞产生更大的毒性. Stock 等^[11]发现, 人结直肠腺癌细胞 Caco-2 大量内化 1 μm 的 PS, 但是对 10 μm 的 PS 吸收效率则低很多, 这也导致 1 μm 的 PS 显示出明显的细胞毒性. 总体而言, 微塑料对细胞毒性的大小与细胞类型、微塑料粒径和细胞吸收程度有关^[12], 因此了解微塑料在细胞内的分布状况和累积量对研究微塑料的致毒机制非常重要, 而这一切的前提是对细胞内微塑料的准确定性和定量分析.

目前已有综述多针对环境中微塑料的分析方法进行总结, 常用方法有光散射技术(light scattering)、光学显微镜(optical microscopy)、电子显微镜(electron microscopy, EM)、傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)、拉曼光谱显微镜(Raman microspectroscopy, RM)、X 射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)、热重-热差分析(thermogravimetric analysis-differential scanning calorimetry, TGA-DSC)、气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)等^[13-14]. 但由于细胞内微塑料研究与环境中微塑料研究的情景不同(例如细胞研究中微塑料粒径更小, 且细胞组分与微塑料组分相似), 并不是所有环境中微塑料分析方法都直接适用于细胞内微塑料分析. 此外, 细胞内微塑料分析方法可以借鉴细胞内纳米颗粒的分析方法, 从而形成有别于环境中微塑料分析的特殊方法.

目前, 尚未有文章针对细胞内微塑料分析方法进行总结, 本文综述了现有细胞研究中常用的微塑料定性和定量方法, 并参考其它研究中新兴的检测技术, 为细胞内微塑料检测提供新思路.

1 人工微塑料分类与合成(Synthesis and classification of synthetic microplastics)

由于检测微塑料的手段有限, 现有研究大多以人工合成的塑料颗粒作为微塑料的模式颗粒. 聚苯乙烯(PS)是世界上应用最广泛的塑料之一, 也是环境中最常见的塑料垃圾之一. PS 微球合成工艺简单、粒径可控、易于修饰, 已成为最常用的微塑料模式颗粒^[15]. 所以本论文主要介绍以 PS 微球为代表的微塑料定性与定量方法.

1.1 普通微塑料

普通 PS 微球是仅由苯乙烯单体通过聚合反应形成的白色球状颗粒, 制备方法主要有悬浮聚合、乳液聚合、分散聚合. 悬浮聚合主要用于合成 10 μm 以上的微球, 反应体系由苯乙烯、分散剂、溶剂组成, 悬浮在水中的单体液滴在引发剂作用下聚合产生微球, 微球粒径的大小通常由搅拌速度控制, 由于其合成条件简单, 适用于工业制备大量 PS 微球, 但微球尺寸分布较宽^[16]. 乳液聚合主要用于合成 1 μm 以下的微球, 反应体系主要由表面活性剂乳化的苯乙烯液滴构成, 在引发剂作用下进行自由基成核反应, 使乳化的液滴形成 PS 微球, 乳液聚合反应速度快, 但需要在后续过程去除溶液中的表面活性剂^[17].

分散聚合主要用于合成微米级的微球,反应体系由苯乙烯、分散剂、溶剂组成,不含有表面活性剂,在引发剂作用下苯乙烯单体生成活性链,链增长到一定程度即沉淀为微球,分散聚合得到的微球粒径均一,后处理简单^[18]。

1.2 荧光标记微塑料

聚苯乙烯本身为白色,不具备特征信号,因而难以被检测,但可以通过添加荧光物质的方式合成荧光 PS 微球,使其具备荧光信号。荧光 PS 微球在表面或者内部含有荧光物质,在激发光照射下可以发出强烈荧光。依据荧光负载方式的不同可以分为物理吸附法、溶胀法、包埋法、化学键合法、共聚法^[19]。简而言之,物理吸附法和溶胀法是先合成普通 PS 微球,再通过后处理使荧光物质吸附在微球表面或次表面;包埋法是将荧光物质均匀分散在合成介质再进行合成,荧光物质以物理方式包埋在 PS 微球中;化学键合法和共聚法都是以化学作用将荧光物质和微球结合在一起,所不同的是,化学键合法是在普通 PS 微球表面修饰荧光分子,共聚法是合成过程中荧光物质参与了苯乙烯的聚合反应。

传统荧光微球所用荧光染料(例如异硫氰酸荧光素)的分子结构是平面芳香环,这些共平面的芳香环形成共轭 π 键,共轭电子受到能量激发后跃迁,再退激产生荧光。这种结构的荧光染料在聚集状态下由于 π - π 堆积作用会导致荧光淬灭^[20]。近年来,聚集诱导发光(aggregation-induced emission, AIE)材料作为荧光染料被应用于荧光微球合成中,解决了传统荧光微球在实际应用中的诸多问题。AIE 材料主要有硅杂环戊二烯类、四苯乙烯类,这类分子在结构上均具有多个苯环取代基,由于空间位阻效应导致整个分子结构并不处于同一平面内^[21]。在稀溶液中,受到能量激发的 AIE 分子通过苯环的分子内动态旋转释放能量,并不发光。在聚集状态下,AIE 分子中的苯环会受到物理约束限制,导致激发态电子只能通过辐射返回基态,从而产生荧光^[20]。Yan 等^[22]使用 AIE 做荧光染料用乳液聚合法合成了 AIE-PS,后续表征证明 AIE-PS 的荧光强度稳定,且 AIE 难以从微球脱落。

1.3 稀有金属标记微塑料

尽管荧光标记的微塑料合成工艺简单,可以用于研究微塑料在细胞内的分布,但是荧光的不稳定性使其难以实现胞内微塑料的准确定量。由于稀有金属在自然环境以及生物体中含量极低,其定量方法可靠,因而可以使用稀有金属标记微塑料。

Mitrano 等^[23]将钯(Pd)掺杂在聚丙烯腈(polyacrylonitrile, PAN)颗粒中,又在 PAN 表面包裹 PS,形成 Pd-PAN-PS 的核壳结构。通常情况下金属不能与聚合物化学键合,但是 Pd 能够与 PAN 中的氮形成化学键,合成时 99.7% 的 Pd 会掺杂进 PAN-PS 微球。而且 Pd 能够在 PAN-PS 微球中稳定存在,两个月内仅有 0.5% 的 Pd 从微球中溶出。由于 Pd 是以固定比例掺杂在微球中,因此可以使用电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)对 Pd 进行定量,从而作为微塑料的定量依据。

Ando 等^[24]将铕(Eu)有机配合物与苯乙烯、甲基丙烯酸缩水甘油共聚得到 Eu 标记的聚合物微球,随后彭超^[25]对此方法进行改进,通过一步溶胀法制备 Eu 标记的单分散 PS 微球,并证明 Eu 被掺杂在微球内部,短期内难以溶出。由于 Eu 属于稀土元素,因而可以使用 ICP-MS 对 Eu 标记微塑料进行精确定量分析。此外, Eu 有机配合物可以产生荧光,相较于普通荧光材料,这种稀土有机配合物具有荧光寿命长、斯托克斯位移大等特点,因而 Eu 标记的 PS 微球在生物标记和活体成像方面具有很好的应用价值。

1.4 放射性同位素标记微塑料

放射性同位素与普通元素的化学性质和生物性质相同,但它能够产生衰变并释放放射性信号(如 α 、 β 、 γ 射线),这种信号不会受到其他非放射性物质的干扰,可以非常灵敏地被仪器检测。少量放射性同位素不会干扰生物的正常生理活动,因而常被用作示踪剂显示某种物质在生物体内的分布情况和变化规律^[26]。可以使用¹⁴C 放射性同位素标记的苯乙烯合成 PS 微球,其合成方法与普通 PS 微球的合成方法完全一致^[27]。

2 细胞内微塑料分析方法(A analytical methods for intracellular microplastics)

以上 4 种人工合成的微塑料颗粒,为开展微塑料在细胞中累积、分布和毒性效应的研究提供了有

力工具. 为进一步实现细胞内微塑料的定性和定量分析, 可以应用以下几种检测方法.

2.1 电子显微成像

电子显微镜使用高能电子束进行扫描, 检测反射或透射的电子束进行成像, 由于电子的波长相较于可见光短很多, 所以衍射极限很低, 使得电子显微镜的分辨率到达亚纳米. 电子显微镜可以分为扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)和透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM), 其中 SEM 使用较低电子加速电压, 电子通过与样品表面作用从而对样品表面成像; TEM 使用较高的电子加速电压, 通过检测穿透样品的电子束从而提供样品的内部信息, 其分辨率高于 SEM^[28]. 电子显微镜可以结合能量色散光谱、电子能量损失谱从而提供样品元素组成信息^[29]. 由于细胞直径通常在 10 μm 以上, 电子显微镜的电子束难以穿透细胞, 所以需要切片技术将细胞切成薄片, 再用电子显微镜进行观察. 例如, Höcherl 等^[30] 利用 TEM 观察到 107—148 nm PS 颗粒在 HeLa 细胞中的分布, 表明 PS 颗粒在细胞内容易聚集在核内体和溶酶体中. 通过电子显微镜, 可以清晰地观察到亚细胞结构, 有助于了解微塑料在细胞器中的分布, 是一种较为有效的定性手段. 但由于微塑料的电子密度较低, 与细胞自身的电子密度相似, 因而导致两者在电子显微镜下衬度相当, 有时难以直接区分^[31]. 此外, 电子显微镜无法对细胞进行活体原位观测, 而且细胞切片过程可能将原本在细胞外的微塑料颗粒带入细胞内, 从而影响分析结果. 因此, 电子显微镜在检测细胞内微塑料方面应用相对较少.

2.2 荧光显微成像

荧光显微镜是在普通光学显微镜的基础上增加了汞灯或氙灯光源、滤光片等组件. 光源激发样品产生荧光, 再通过滤光片将杂光过滤, 只留下高强度荧光进行成像^[32]. 荧光显微镜在研究荧光微塑料的生物分布方面应用广泛, 例如 Abihssira-García 等^[33] 应用荧光显微镜研究鱼免疫细胞对 1—5 μm 荧光聚苯乙烯、聚乙烯的吸收状况, 发现两种塑料颗粒能够被共同吸收, 单个细胞可摄入 5—8 个颗粒. 由于普通荧光显微镜分辨率有限, 且难以区分样品不同厚度处的荧光, 因而在细胞研究方面应用范围有限.

激光共聚焦显微镜是在普通荧光显微镜的基础上加装了激光扫描等装置, 能够实现细胞的超分辨率成像. 普通荧光显微镜是以汞灯或氙灯作为激发光源照射样品, 由于激发光没有进行共聚焦, 所以样品焦平面的上下部分也可能有荧光被激发, 使成像结果不能代表焦平面结果. 而激光共聚焦显微镜使用激光作为激发光源, 激光经过照明针孔聚焦形成点光源, 从而实现对焦平面的聚焦照射, 样品照射点如果产生荧光, 荧光又会按照原有光路返回并聚焦到相机, 从而实现荧光成像. 因此, 激光共聚焦显微镜只会对焦平面的荧光进行成像, 避免焦平面上下部分荧光的干扰, 从而实现高分辨成像. 此外, 激光共聚焦显微镜配备的软件可以将成像切片进行重构, 从而给出细胞的三维图像, 进一步显示细胞内部结构与颗粒分布^[34]. 激光共聚焦显微镜可以有效地对细胞内荧光微塑料进行定性分析, 揭示微塑料在细胞内的分布. Xu 等^[9] 发现, 人肺癌细胞 A549 能够快速吸收 25 nm 和 70 nm 的 PS 颗粒, 并将其累积在细胞质中. Hwang 等^[35] 利用激光共聚焦的层扫技术, 发现中性粒细胞、巨噬细胞可以吸收 460 nm 的 PS 颗粒, 但是淋巴细胞不会. Jeon 等^[36] 合成了具有不同表面电荷的荧光 PS 颗粒, 并用激光共聚焦显微镜研究不同表面电荷在细胞吸收 PS 颗粒中的作用, 结果表明细胞吸收量与表面电荷呈现良好的正相关关系, 证明表面电荷是决定细胞吸收效率的主要参数之一. 激光共聚焦显微镜的成像分辨率高, 对荧光颗粒定位准确, 是目前研究细胞内荧光微塑料累积、分布的最佳定性工具之一.

2.3 流式细胞术

流式细胞仪是一种能够对细胞进行逐个快速定性和定量的工具, 能够同时进行多参数测量, 而且检测速度快、采集数据量大, 目前已经成为细胞分析的通用技术. 流式细胞仪的工作原理是以激光作为激发光源, 垂直照射细胞样品流, 细胞在其照射下产生反映细胞体积大小的前向光散射信号(forward scatter, FSC)和反应细胞内颗粒复杂情况的侧向光散射信号(side scatter, SSC), 如果细胞内部含有荧光颗粒, 还可以产生荧光信号^[37]. 由于流式细胞仪是对细胞流中的每个细胞进行快速检测, 单次检测量一般在 1000 个细胞以上, 因而输出的结果能够定量反应细胞状态. 因此, 可以使用流式细胞仪检测吸收了荧光微塑料的细胞, 通过荧光强度反应细胞对微塑料的平均累积量. 目前细胞吸收微塑料的定量研究大多基于荧光微塑料和流式细胞仪实现, 例如 Santos 等^[6] 发现, HeLa 细胞暴露 40 nm 和 200 nm 荧光 PS 颗粒的 4 h 内, 细胞内荧光强度随时间线性增加, 表明细胞能够直接吸收 PS 颗粒. 由于

不同粒径的荧光微塑料荧光强度存在差异,所以不能直接比较流式细胞仪给出的细胞对不同粒径微塑料的吸收情况. Varela 等^[38]利用单颗粒追踪技术校正流式细胞仪给出的荧光数据,从而比较了 A549 细胞对 20 nm、40 nm 和 100 nm 荧光 PS 颗粒的吸收差异,表明 A549 细胞对 40 nm 的 PS 颗粒吸收速度最快. 由于流式细胞仪可以高通量地测定细胞状态,且不需要对样品进行过多预处理,因而是目前定量细胞内荧光微塑料的最佳工具之一. 此外,将流式细胞仪数据与总有机碳分析仪、纳米颗粒跟踪分析仪的数据相结合,可以得到以颗粒浓度表示的细胞内微塑料浓度.

2.4 电感耦合等离子体质谱

电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)被认为是最理想的金属元素分析方法,可以用于金属元素的准确定性和定量,对于金属元素的检出限在 $10^{-6} \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以下. 其原理是样品在高温下电离生成不同质荷比的离子,经过加速电场作用形成离子束,再经由质谱进行检测^[39]. 通过将含有稀有金属标记微塑料的样品进行消解,以 ICP-MS 对稀有金属进行定量,按稀有金属掺杂比例进行换算从而可以实现微塑料的准确定量. Redondo-Hasselerharm 等^[40]证明,使用 Pd 掺杂微塑料可以快速精确的量化淡水动物体内的微塑料浓度. He 等^[41]以 Pd 掺杂微塑料作为材料,发现微塑料进入淡水生态系统后主要分布在沉积物中,能够被水生植物、蛤、螺、鱼等生物吸收,但是并不存在生物放大效应. Monikh^[42]使用 Eu 标记微塑料证明微塑料可以被藻类吸收,能够沿食物链传递给大型蚤,并且可以在大型蚤中代际传递. 近年来,单颗粒电感耦合等离子体质谱(single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, SP-ICP-MS)飞速发展. 与传统 ICP-MS 相比,SP-ICP-MS 能够同时表征和定量纳米颗粒,提供粒子浓度、尺寸等信息,对了解纳米颗粒在环境中的行为具有重要意义^[43]. 笔者认为,SP-ICP-MS 在分析稀有金属标记微塑料方面也将发挥重要作用,通过研发和改进样品分析方法,进一步实现细胞内稀有金属标记微塑料的准确定量.

2.5 液体闪烁计数和放射性自显影技术

液体闪烁计数仪可以定量放射性同位素,原理是放射性同位素发出的辐射能量可以转移给闪烁液,从而使闪烁液发出荧光,荧光发射光子数与吸收的辐射能量近似为线性关系,通过检测荧光闪烁情况即可反应放射性强度^[44]. 放射性自显影技术可以对放射性同位素的分布进行成像,原理是放射性同位素发出的辐射可以使乳胶感光,从而显示放射性物质存在的位置. 使用这两种技术可以实现对¹⁴C 标记 PS 颗粒的定量检测和定性成像, Tian 等^[27]通过¹⁴C 标记的 PS 证明青霉菌具有降解塑料的能力,尽管这种降解能力非常弱,但还是可以通过放射性信号准确检出. Al-Sid-Cheikh 等^[45]使用¹⁴C 标记的 PS 颗粒对扇贝展开研究,发现扇贝可以快速摄入 24 nm 和 250 nm 微塑料,放射性自显影表明 24 nm 微塑料可以在各组织中检出,而 250 nm 微塑料只在肠道内检出. 放射性同位素的检测非常灵敏,相对偏差小,但由于¹⁴C 标记的原料价格昂贵,因而其在研究细胞累积微塑料方面应用较少.

2.6 高光谱暗场成像

高光谱暗场成像是近年来研究纳米颗粒与生物相互作用的有力工具,它是将高光谱与暗场显微镜相结合的一种成像手段,能提供原位、实时、无标记的观测^[46]. 暗场显微镜是光学显微镜的一种特殊亚型,不同于将光直接聚焦于样品的明场显微镜,只有与样品发生相互作用而被改变路径的光被收集,从而在黑色背景上产生明亮的图像^[31]. 高光谱成像是一种获取二维图像的技术,它能够收集图像中每个像素的整段光谱,因而能依据高光谱对颗粒进行识别^[47]. 高光谱成像与暗场显微镜联用可以实现纳米材料的快速、无标记检测,与明场显微成像相比,高光谱暗场显微镜由于降低了背景光,可以使分辨率扩大 1—2 个数量级,从而能够分辨生物样品中的纳米颗粒. 例如, Zamora 等^[46]利用高光谱暗场成像在单细胞水平上对 25 nm Au 和 CuS 颗粒进行跟踪, Fakhru'llin 等^[48]成功识别出秀丽隐杆线虫体内低至 100 nm 的 PS 颗粒. Ishmukhametov 等^[49]应用高光谱暗场成像开发了一套自动识别细胞内微塑料的方法,实现了对细胞内 1 μm PS 的高通量识别,极大提高了检测速度. 作为一种新兴的生物成像技术,高光谱暗场成像在定性识别细胞内微塑料方面存在巨大的潜力. 相较于电子显微镜和激光共聚焦显微镜,高光谱暗场成像的光源是普通 LED 灯,不会对细胞产生损伤,因而可以实现对细胞的活体原位检测.

2.7 拉曼成像

拉曼光谱是一种散射光谱,通过对拉曼光谱分析可以得到分子振动和转动信息,从而了解物质的

化学组成. 将拉曼光谱与显微技术相结合的拉曼成像可以快速表征样品的局部信息, 因而被应用于检测细胞内颗粒^[50]. 为了提高拉曼成像的空间分辨率, 通常使用波长更短的激光作为拉曼成像的光源, 同时使用共聚焦技术降低背景信号强度, 这使得激光共聚焦拉曼成像可以用于分析 1 μm 的微塑料颗粒^[51]. 对激光共聚焦拉曼成像技术的改进能有效提高图像分辨率以及识别效力, 并扩大应用场景, 例如 Ahlinder 等^[50] 通过使用 Tikhonov 正则化超分辨算法成功提高了拉曼成像分辨率, 并将其应用于识别 A549 细胞内 300 nm 的微塑料颗粒. 近些年来, 表面增强拉曼 (surface enhanced Raman scattering, SERS)、相干反斯托克斯拉曼散射 (coherent antistokes Raman scattering, CARS)、受激拉曼散射 (stimulated Raman scattering, SRS) 这 3 种提高拉曼信号的方式也被成功应用于显微成像中^[52-54]. SERS 是通过将待测物质吸附在粗糙金银表面从而提高拉曼散射信号; CARS 和 SRS 是通过两束激发光照射样品, 反斯托克斯光为 CARS 信号, 斯托克斯光的增益为 SRS 信号. 由于这些增强方式可以将拉曼信号放大几个数量级^[55], 这使拉曼成像的扫描速度和分辨率大幅提高. 例如 SRS 成像相较于普通拉曼成像, 其扫描速度提升 1000—10000 倍^[56], 并且能够对细胞内低至 40 nm 的颗粒进行成像检测^[57]. Chio 等^[58] 应用 CARS 成像实现了对活细胞中无标记 PS 颗粒的实时跟踪, 描述了 PS 颗粒的胞内动力学. 目前基于拉曼增强技术的显微成像方法尚不成熟, 相关仪器商业化水平偏低, 使得其在细胞内微塑料检测方面应用较少. 但由于它能够极大提高成像分辨率和检测速度, 实现无标记微塑料的快速检测, 因而在定性乃至定量细胞内微塑料方面存在巨大潜力.

2.8 其他方法

傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 是定性环境中微塑料最常用的光谱技术, 可以反映物质的化学键和官能团. 基于焦平面阵列 (focal plane array, FPA) 的 FT-IR 显微镜对微塑料颗粒的分辨率可达 10—20 μm ^[59]. 但在细胞内微塑料研究中, 所用的微塑料粒径通常在 10 μm 以下^[8-11, 30, 33], 这导致 FT-IR 在细胞研究中不如拉曼成像应用广泛. 热重-热差分析 (TGA-DSC) 是定性和定量微塑料的方法, 由于不同种类塑料的分解温度存在差异, 随着温度的升高样品质量逐级降低, 从而可以得到热失重曲线作为分析的依据. 但 TGA-DSC 需要较大的样品量, 且容易受到杂质干扰, 因而应有范围有限^[60]. 气相色谱-质谱 (GC-MS) 是分析环境中微塑料的另一种常见方法, 能够提供微塑料质量分数的信息. GC-MS 有两种不同的方法, 一种是热裂解 (pyrolysis Gas, Py) GC-MS, 样品在惰性气体中热裂解成碎片, 再通过气相色谱分离和质谱表征^[61]; 另一种是热萃取脱附 (thermal extraction desorption, TED) GC-MS, 通过对固相吸附剂进行热萃取和热重分析, 随后使用热解吸气相色谱-质谱对这些吸附剂进行分析表征^[62]. GC-MS 的方法对实验条件的要求较高, 分析流程相对复杂, 且目前细胞微塑料研究多使用人工合成的化学组分已知的颗粒, 因而应用较少. 但 GC-MS 不仅能够对微塑料进行定量, 还能够有效区分微塑料的种类, 未来将会在研究细胞累积自然环境中微塑料方面发挥重要作用.

3 结论与展望 (Conclusion and perspective)

本文总结了细胞研究中常用的微塑料定性和定量方法, 并参考其它研究中新兴的检测技术, 为细胞内微塑料检测提供新思路. 目前, 基于荧光 PS 的激光共聚焦显微镜法和流式细胞仪法是定性和定量细胞内微塑料的主要工具, 应用非常广泛, 但荧光的不稳定性可能干扰测定结果. 随着合成方法的成熟与进步, 稀有金属标记微塑料联用 ICP-MS 检测技术的研究逐渐增多, 其定量精准、检测成本低的特点是其他方法不能相比的, 今后将在细胞研究方面发挥重要作用. 液体闪烁计数和放射性自显影技术所需的¹⁴C 同位素虽然价格高昂, 但是其灵敏度高、相对偏差小、能够同时实现准确定性和定量, 可以在特殊检测情境下发挥作用. 高光谱暗场成像和拉曼成像能够实现对无标记微塑料的检测, 而且可以活体原位成像, 这两种技术能够突破电子显微镜和激光共聚焦显微镜的应用局限, 有望成为细胞微塑料研究的专有定性方法. 虽然对细胞内微塑料的定性和定量方法已有很多深入的研究, 但仍有以下三个方面需要加强和完善:

(1) 由于检测方法存在差异, 难以横向比较不同研究中细胞对微塑料的累积差异. 后续研究需要建立统一标准化的检测流程, 加强检测过程的质量控制, 提高数据的准确性和可比性.

(2) 微塑料在进入生物体以及细胞后可能降解为纳米级塑料颗粒, 然而随着塑料颗粒尺寸的减小,

识别过程会变得更加困难、耗时. 后续研究需进一步开发高效的细胞内纳米塑料的定性和定量方法, 并结合图像识别、机器学习等手段实现全自动或半自动分析.

(3) 目前对细胞内微塑料的定性和定量技术大多依赖于人工合成的微塑料, 如何识别并定量细胞累积的自然环境中的微塑料, 需要在未来进行更深入的研究.

参考文献 (References)

- [1] MOORE C J. Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat [J]. *Environmental Research*, 2008, 108(2): 131-139.
- [2] KARLSSON T M, VETHAAK A D, ALMROTH B C, et al. Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: Method development and microplastic accumulation [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 122(1/2): 403-408.
- [3] IVLEVA N P, WIESHEU A C, NIESSNER R. Microplastic in aquatic ecosystems [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(7): 1720-1739.
- [4] de SOUZA MACHADO A A, KLOAS W, ZARFL C, et al. Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems [J]. *Global Change Biology*, 2018, 24(4): 1405-1416.
- [5] REJMAN J, OBERLE V, ZUHORN I S, et al. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis [J]. *Biochemical Journal*, 2004, 377(Pt 1): 159-169.
- [6] dos SANTOS T, VARELA J, LYNCH I, et al. Effects of transport inhibitors on the cellular uptake of carboxylated polystyrene nanoparticles in different cell lines [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24438.
- [7] RAGUSA A, SVELATO A, SANTACROCE C, et al. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta [J]. *Environment International*, 2021, 146: 106274.
- [8] PRIETL B, MEINDL C, ROBLEGG E, et al. Nano-sized and micro-sized polystyrene particles affect phagocyte function [J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2014, 30(1): 1-16.
- [9] XU M K, HALIMU G, ZHANG Q R, et al. Internalization and toxicity: A preliminary study of effects of nanoplastic particles on human lung epithelial cell [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 694: 133794.
- [10] WU B, WU X M, LIU S, et al. Size-dependent effects of polystyrene microplastics on cytotoxicity and efflux pump inhibition in human Caco-2 cells [J]. *Chemosphere*, 2019, 221: 333-341.
- [11] STOCK V, BÖHMERT L, LISICKI E, et al. Uptake and effects of orally ingested polystyrene microplastic particles *in vitro* and *in vivo* [J]. *Archives of Toxicology*, 2019, 93(7): 1817-1833.
- [12] YONG C Q Y, VALIYAVEETIL S, TANG B L. Toxicity of microplastics and nanoplastics in mammalian systems [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17(5): 1509.
- [13] BOTTERELL Z L R, BEAUMONT N, DORRINGTON T, et al. Bioavailability and effects of microplastics on marine zooplankton: A review [J]. *Environmental Pollution*, 2019, 245: 98-110.
- [14] SCHWAFERTS C, NIESSNER R, ELSNER M, et al. Methods for the analysis of submicrometer- and nanoplastic particles in the environment [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 112: 52-65.
- [15] 王昆, 林坤德, 袁东星. 环境样品中微塑料的分析方法研究进展 [J]. *环境化学*, 2017, 36(1): 27-36.
WANG K, LIN K D, YUAN D X. Research progress on the analysis of microplastics in the environment [J]. *Environmental Chemistry*, 2017, 36(1): 27-36(in Chinese).
- [16] 徐昊垠, 董春明. 悬浮聚合制备微米级聚苯乙烯微球 [J]. *化工生产与技术*, 2010, 17(3): 24-26,70.
XU H Y, DONG C M. Synthesis of micron polystyrene microspheres by suspension polymerization [J]. *Chemical Production and Technology*, 2010, 17(3): 24-26,70(in Chinese).
- [17] 张心亚, 孙志娟, 黄洪, 等. 乳液聚合技术最新研究进展 [J]. *合成材料老化与应用*, 2006, 35(1): 38-43,58.
ZHANG X Y, SUN Z J, HUANG H, et al. Research progress of emulsion polymerization technology [J]. *Synthetic Materials Aging and Application*, 2006, 35(1): 38-43,58(in Chinese).
- [18] 张凯, 雷毅, 王宇光, 等. 单分散聚苯乙烯微球的制备及影响因素研究 [J]. *功能高分子学报*, 2002, 15(2): 189-193.
ZHANG K, LEI Y, WANG Y G, et al. Studies of the preparation of monodisperse polystyrene microspheres and its influence factors [J]. *Journal of Functional Polymers*, 2002, 15(2): 189-193(in Chinese).
- [19] 张荣荣, 徐自力. 荧光微球的制备技术及其应用进展 [J]. *高分子通报*, 2009(1): 63-70.
ZHANG R R, XU Z L. Development of preparations and applications of fluorescent microsphere [J]. *Polymer Bulletin*, 2009(1): 63-70(in Chinese).
- [20] HONG Y N, LAM J W, TANG B Z. Aggregation-induced emission [J]. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40(11): 5361-5388.
- [21] 张双, 秦安军, 孙景志, 等. 聚集诱导发光机理研究 [J]. *化学进展*, 2011, 23(4): 623-636.
ZHANG S, QIN A J, SUN J Z, et al. Mechanism study of aggregation-induced emission [J]. *Progress in Chemistry*, 2011, 23(4): 623-

636(in Chinese).

- [22] YAN N, TANG B Z, WANG W X. Cell cycle control of nanoplastics internalization in phytoplankton [J]. *ACS Nano*, 2021, 15(7): 12237-12248.
- [23] MITRANO D M, BELTZUNG A, FREHLAND S, et al. Synthesis of metal-doped nanoplastics and their utility to investigate fate and behaviour in complex environmental systems [J]. *Nature Nanotechnology*, 2019, 14(4): 362-368.
- [24] ANDO K, KAWAGUCHI H. High-performance fluorescent particles prepared via miniemulsion polymerization [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, 285(2): 619-626.
- [25] 彭超. 含稀土配合物的荧光编码聚苯乙烯微球的制备与表征[D]. 天津: 天津大学, 2012.
PENG C. Rare earth complex-encoded fluorescent polystyrene microspheres: Preparation and characterization[D]. Tianjin: Tianjin University, 2012(in Chinese).
- [26] 田莉莉. 基于C-14同位素示踪技术的聚苯乙烯纳米塑料光降解研究[D]. 南京: 南京大学, 2020.
TIAN L L. Photodegradation of polystyrene nanoplastics using C-14 isotope tracer[D]. Nanjing: Nanjing University, 2020(in Chinese).
- [27] TIAN L L, KOLVENBACH B, CORVINI N, et al. Mineralisation of ¹⁴C-labelled polystyrene plastics by *Penicillium variable* after ozonation pre-treatment [J]. *New Biotechnology*, 2017, 38: 101-105.
- [28] LABORDA F, BOLEA E, CEPRIÁ G, et al. Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 904: 10-32.
- [29] HERNANDEZ L M, YOUSEFI N, TUFENKJI N. Are there nanoplastics in your personal care products? [J]. *Environmental Science & Technology Letters*, 2017, 4(7): 280-285.
- [30] HÖCHERL A, DASS M, LANDFESTER K, et al. Competitive cellular uptake of nanoparticles made from polystyrene, poly(methyl methacrylate), and polylactide [J]. *Macromolecular Bioscience*, 2012, 12(4): 454-464.
- [31] NIGAMATZYANOVA L, FAKHRULLIN R. Dark-field hyperspectral microscopy for label-free microplastics and nanoplastics detection and identification *in vivo*: A *Caenorhabditis elegans* study [J]. *Environmental Pollution*, 2021, 271: 116337.
- [32] 杨广烈. 荧光与荧光显微镜 [J]. *光学仪器*, 2001, 23(2): 18-29.
YANG G L. Fluorescence and fluorescence microscope [J]. *Optical Instruments*, 2001, 23(2): 18-29(in Chinese).
- [33] ABIHSSIRA-GARCÍA I S, PARK Y, KIRON V, et al. Fluorescent microplastic uptake by immune cells of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2020, 8: 560206.
- [34] PADDOCK S W. Principles and practices of laser scanning confocal microscopy [J]. *Molecular Biotechnology*, 2000, 16(2): 127-149.
- [35] HWANG J, CHOI D, HAN S, et al. Potential toxicity of polystyrene microplastic particles [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 7391.
- [36] JEON S, CLAVADETSCHER J, LEE D K, et al. Surface charge-dependent cellular uptake of polystyrene nanoparticles [J]. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 2018, 8(12): 1028.
- [37] 赵书涛, 武晓东, 王策, 等. 流式细胞仪的原理、应用及最新进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(22): 4378-4381.
ZHAO S T, WU X D, WANG C, et al. Principles, applications and latest developments of flow cytometer [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 11(22): 4378-4381(in Chinese).
- [38] VARELA J A, BEXIGA M G, ÅBERG C, et al. Quantifying size-dependent interactions between fluorescently labeled polystyrene nanoparticles and mammalian cells [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2012, 10: 39.
- [39] AMMANN A A. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): A versatile tool [J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2007, 42(4): 419-427.
- [40] REDONDO-HASSELERHARM P E, VINK G, MITRANO D M, et al. Metal-doping of nanoplastics enables accurate assessment of uptake and effects on *Gammarus pulex* [J]. *Environmental Science. Nano*, 2021, 8(6): 1761-1770.
- [41] HE S, CHI H Y, LI C J, et al. Distribution, bioaccumulation, and trophic transfer of palladium-doped nanoplastics in a constructed freshwater ecosystem [J]. *Environmental Science: Nano*, 2022, 9(4): 1353-1363.
- [42] ABDOLAHPUR MONIKH F, CHUPANI L, VIJVER M G, et al. Parental and trophic transfer of nanoscale plastic debris in an assembled aquatic food chain as a function of particle size [J]. *Environmental Pollution*, 2021, 269: 116066.
- [43] FLORES K, TURLEY R S, VALDES C, et al. Environmental applications and recent innovations in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) [J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2021, 56(1): 1-26.
- [44] 张向阳, 郭华良, 刘福亮, 等. 液体闪烁谱仪的检定方法 [J]. *核电子学与探测技术*, 2010, 30(6): 779-781,786.
ZHANG X Y, GUO H L, LIU F L, et al. A calibration method of liquid scintillation spectrometry [J]. *Nuclear Electronics & Detection Technology*, 2010, 30(6): 779-781,786(in Chinese).
- [45] AL-SID-CHEIKH M, ROWLAND S J, KAEGI R, et al. Synthesis of ¹⁴C-labelled polystyrene nanoplastics for environmental studies [J]. *Communications Materials*, 2020, 1: 97.
- [46] ZAMORA-PEREZ P, TSOUTSI D, XU R X, et al. Hyperspectral-enhanced dark field microscopy for single and collective nanoparticle characterization in biological environments [J]. *Materials (Basel, Switzerland)*, 2018, 11(2): 243.

- [47] GIANNONI L, LANGE F, TACHTSIDIS I. Hyperspectral imaging solutions for brain tissue metabolic and hemodynamic monitoring: Past, current and future developments [J]. *Journal of Optics*, 2018, 20(4): 044009.
- [48] FAKHRULLIN R, NIGAMATZYANOVA L, FAKHRULLINA G. Dark-field/hyperspectral microscopy for detecting nanoscale particles in environmental nanotoxicology research [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 772: 145478.
- [49] ISHMUKHMETOV I, NIGAMATZYANOVA L, FAKHRULLINA G, et al. Label-free identification of microplastics in human cells: Dark-field microscopy and deep learning study [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2022, 414(3): 1297-1312.
- [50] AHLINDER L, WIKLUND LINDSTRÖM S, LEJON C, et al. Noise removal with maintained spatial resolution in Raman images of cells exposed to submicron polystyrene particles [J]. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 2016, 6(5): 83.
- [51] RIBEIRO-CLARO P, NOLASCO M M, ARAÚJO C. Characterization of microplastics by Raman spectroscopy[M]//Characterization and Analysis of Microplastics. Amsterdam: Elsevier, 2017: 119-151.
- [52] EVANOFF D D Jr, HECKEL J, CALDWELL T P, et al. Monitoring DPA release from a single germinating *Bacillus subtilis* endospore via surface-enhanced Raman scattering microscopy [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(39): 12618-12619.
- [53] CHENG J X, JIA Y K, ZHENG G F, et al. Laser-scanning coherent anti-stokes Raman scattering microscopy and applications to cell biology [J]. *Biophysical Journal*, 2002, 83(1): 502-509.
- [54] FREUDIGER C W, MIN W, SAAR B G, et al. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Science*, 2008, 322(5909): 1857-1861.
- [55] BAE K, ZHENG W, HUANG Z W. Spatial light-modulated stimulated Raman scattering (SLM-SRS) microscopy for rapid multiplexed vibrational imaging [J]. *Theranostics*, 2020, 10(1): 312-322.
- [56] ZHANG D L, WANG P, SLIPCHENKO M N, et al. Fast vibrational imaging of single cells and tissues by stimulated Raman scattering microscopy [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2014, 47(8): 2282-2290.
- [57] HUANG B, YAN S, XIAO L, et al. Label-free imaging of nanoparticle uptake competition in single cells by hyperspectral stimulated Raman scattering [J]. *Small*, 2018, 14(10): 1703246.
- [58] CHOI D S, LIM S, PARK J S, et al. Label-free live-cell imaging of internalized microplastics and cytoplasmic organelles with multicolor CARS microscopy [J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56(5): 3045-3055.
- [59] LÖDER M G J, KUCZERA M, MINTENIG S, et al. Focal plane array detector-based micro-Fourier-transform infrared imaging for the analysis of microplastics in environmental samples [J]. *Environmental Chemistry*, 2015, 12(5): 563-581.
- [60] MAJEWSKY M, BITTER H, EICHE E, et al. Determination of microplastic polyethylene (PE) and polypropylene (PP) in environmental samples using thermal analysis (TGA-DSC) [J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 568: 507-511.
- [61] FRIES E, DEKIFF J H, WILLMEYER J, et al. Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy [J]. *Environmental Science. Processes & Impacts*, 2013, 15(10): 1949-1956.
- [62] DUEMICHEN E, BRAUN U, KRAEMER R, et al. Thermal extraction combined with thermal desorption: A powerful tool to investigate the thermo-oxidative degradation of polyamide 66 materials [J]. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2015, 115: 288-298.