

饮用水中氯代乙酰胺的细胞毒性和遗传毒性

庞维海¹, 杨帆², 楚文海¹, 尹大强¹

(1. 同济大学 长江水环境教育部重点实验室, 上海 200092; 2. 上海核工程研究设计院, 上海 200233)

摘要: 通过细胞增殖实验、单细胞凝胶电泳实验、细胞凋亡实验和细胞周期阻滞实验分别测定了 3 种氯代乙酰胺 (CAcAms) 的细胞毒性和遗传毒性, 同时结合饮用水中 CAcAms 的实际浓度水平, 分析了 3 种 CAcAms 在饮用水中的毒性风险. 结果表明, 一氯乙酰胺 (MCaAm) 在饮用水厂中的浓度低于二氯乙酰胺 (DCaAm) 和三氯乙酰胺 (TCAcAm), 但由于 MCaAm 的毒性较大, 其在饮用水厂中的毒性风险高于 DCaAm 和 TCAcAm. 相对于氯消毒, 氯胺消毒后的饮用水中 CAcAms 的浓度较高, 从而 CAcAms 造成的细胞毒性和遗传毒性风险也较高.

关键词: 含氮消毒副产物 (N-DBPs); 卤代乙酰胺 (HAcAms); 细胞毒性; 遗传毒性; 饮用水

中图分类号: X132

文献标志码: A

Cytotoxicity and Genotoxicity of Chloroacetamides, a Relatively Newly Identified Group of Nitrogenous Disinfection Byproducts in Drinking Water

PANG Weihai¹, YANG Fan², CHU Wenhai¹, YIN Daqiang¹

(1. Key Laboratory of Yangtze River Water Environment of the Ministry of Education, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Shanghai Nuclear Engineering Research & Design Institute, Shanghai 200233, China)

Abstract: We quantified the concentrations of three chloroacetamides (CAcAms) in the final water of five drinking water treatment plants that use either chlorination or chloramination for disinfection and also we evaluated their toxicity in normal rat kidney cells using four *in vitro* toxicity assays, including cell viability test, single cell gel electrophoresis assay, apoptosis assay, and cell cycle analysis. An overall toxicity calculation suggests that minochloroacetamide (MCaAm) represents a significantly higher cytotoxic and genotoxic risk than dichloroacetamide

(DCaAm) and trichloroacetamide (TCAcAm), albeit MCaAm concentration was relatively lower than them. Moreover, the toxicity associated with CAcAms was higher in chloraminated waters than that in chlorinated waters due to the higher concentration of CAcAms in chloraminated waters.

Key words: nitrogenous disinfection by-products (N-DBPs); haloacetamides (HAcAms); cytotoxicity; genotoxicity; drinking water

液氯是一种强氧化剂, 可以有效杀灭饮用水中的细菌和病毒^[1], 但同时也产生许多消毒副产物 (DBPs), 较典型的有三卤甲烷 (THMs)、卤乙酸 (HAAs) 和致诱变化合物 (MX) 等含碳饮用水消毒副产物 (C-DBPs)^[2]. 由于这些 DBPs 会导致一定的健康风险, 各国对于饮用水 DBPs 含量的限制越来越严格, 使许多饮用水厂 (DWTP) 不得不采用新的消毒技术, 例如氯胺消毒. 然而许多研究表明, 饮用水氯胺消毒可以产生许多新兴含氮消毒副产物 (N-DBPs)^[2-5], 其中卤代乙酰胺 (HAcAms) 作为一类高毒性的新兴 N-DBPs, 因其毒性远高于一些常见 C-DBPs, 使饮用水中 HAcAms 的毒性效应备受关注^[6].

在美国 2000—2002 年的一项饮用水调查中, HAcAms 被首次报道为 DBPs^[5], 在这项调查中主要采用液液萃取富集与气相色谱电子捕获分析技术, 检测到了 5 种 HAcAms 存在于氯化消毒后的饮用水中, 包括一氯乙酰胺 (MCaAm)、二氯乙酰胺 (DCaAm)、三氯乙酰胺 (TCAcAm)、一溴乙酰胺 (MBAcAm) 和二溴乙酰胺 (DBAcAm). 最近, 通过固相萃取 (SPE) 富集、高效液相色谱 (HPLC) 分离和三重四级杆质谱仪 (tqMS) 检测建立了能够对饮用水中 13 种氯代、溴代和碘代 HAcAms 进行全面测

收稿日期: 2014-02-13

基金项目: 国家科技重大专项 (2012ZX07403004); 国家自然科学基金 (51278353, 51378366, 51108327)

第一作者: 庞维海 (1976—), 男, 讲师, 工学博士, 主要研究方向为水及污水处理技术. E-mail: pangweihai@yahoo.com.cn

通讯作者: 楚文海 (1983—), 男, 副教授, 工学博士, 主要研究方向为饮用水消毒技术及其副产物控制.

E-mail: 1world1water@tongji.edu.cn

定的分析方法,结果发现氯代乙酰胺(CAcAms)的浓度水平普遍高于溴代和碘代乙酰胺^[3],因此有必要对 CAcAms 开展更深入的毒性研究。

Plewa 等采用细胞增殖实验(MTT 法)和单细胞凝胶电泳实验(SCGE 法)测定了多种 DBPs 对中国仓鼠卵巢细胞的慢性细胞毒性和急性遗传毒性,发现 HAcAms 的毒性远大于一些常规的 C-DBPs,例如 THMs^[6]。然而,除了 MTT 法和 SCGE 法,流式细胞术(FCM)可以对 HAcAms 诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞进行测试,深入分析 HAcAms 的细胞毒性和遗传毒性的大小。同时,大鼠肾脏细胞(NRK-52^E)已被用作研究化合物胞外毒性的一种模式细胞^[7],已有学者对 NRK-52^E 的诱变性、细胞毒性和凋亡机理进行深入探讨^[8-9],然而对 NRK-52^E 在 HAcAms 作用下的毒性研究相对较少。文献^[10]中采用该方法研究对比了 DCaAm 和二氯甲烷(DCM)的毒性及相应风险,发现 DCaAm 的毒性风险高于 DCM。

本研究使用 4 种毒性测试法,分别为 MTT 法、SCGE 法、细胞凋亡测试和细胞周期阻滞测试,分析了 3 种 CAcAms,即 MCAcAm, DCaAm 和 TCAcAm 对 NRK-52^E 的细胞毒性。同时,采用 SPE 富集, HPLC 分离和 tqMS 测定的分析方法检测 5 个饮用水厂中 3 种 CAcAms 的浓度水平。结合 3 种 CAcAms 在饮用水中的实际浓度水平和毒性水平,综合分析比较了所研究的饮用水中 3 种 CAcAms 的毒性风险,为 DBPs 优先控制等级制定和水厂工艺优化提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

DCaAm 和 TCAcAm 标准品(纯度 > 98%)为德国 Alfa Aesar 公司产品;MCAcAm 标准品(纯度 > 95%)购于加拿大 Orchid Cellmark 公司。实验用水(除水样外)为 Millipore Milli-Q system 制备的超纯水(电阻率 ≥ 18.0 MΩ · cm)。

NRK-52^E 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,此细胞株已经被广泛用于研究癌症、细胞毒性以及凋亡机理^[8-9];Annexin V-FITC 凋亡及细胞周期试剂盒,购自中国南京 KeyGEN 公司;Flowjo 分析软件,购自美国 Tree Star 公司;流式细胞仪购自美国,型号为 Guava easyCyte 8HT。

1.2 毒性试验

研究采用 MTT 法和 SCGE 法分别测定 3 种 CAcAms 的细胞毒性和遗传毒性。同时,采用 FCM 对 3 种 CAcAms 进行诱导细胞凋亡分析和诱导细胞周期阻滞分析。具体操作方法详见文献^[10-11]。

1.3 分析方法

采用 SPE 富集, HPLC 分离和 tqMS 测定的分析方法检测饮用水中 3 种 CAcAms 的质量浓度水平。具体检测方法详见文献^[3]。

2 结果与讨论

2.1 3 种 CAcAms 的毒性水平

2.1.1 MTT 法的测试结果

使用酶标仪在 490 nm 波长下测得的光密度值 O 计算抑制率,并将计算结果取平均,得出不同质量浓度的 CAcAms 对 NRK 细胞的抑制率,计算公式如下:

$$O = \left(1 - \frac{O_{\text{实验}} - O_{\text{调零}}}{O_{\text{溶剂}} - O_{\text{调零}}}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中: $O_{\text{实验}}$ 指实验组小孔所测得的光密度值; $O_{\text{调零}}$ 指调零对照组小孔测得的光密度值; $O_{\text{溶剂}}$ 指溶剂对照组小孔测得的光密度值。将抑制率取平均值后绘制质量浓度-效应曲线,结果如图 1 所示。

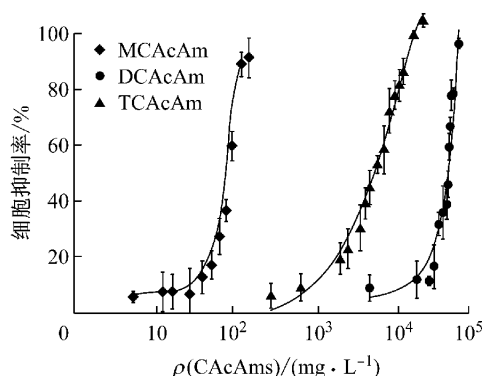


图 1 CAcAms 对 NRK 细胞的抑制率

Fig. 1 NRK cell chronic cytotoxicity concentration-response curves for CAcAms

用 SPSS 软件进行单因素方差分析(ANOVA)发现,3 种 CAcAms 与溶剂对照相比均有统计学差异(显著度 P 均在 0.05 以下)。由表 1 可知, MCAcAm 的最低细胞毒性质量浓度为 30 mg · L⁻¹,在 3 种 CAcAms 中最低;其次是 TCAcAm,最低细胞毒性浓度为 800 mg · L⁻¹;DCaAm 的最低细胞毒性质量浓度最高,为 5 000 mg · L⁻¹。对所

表 1 3 种 CAcAms 作用 NRK 细胞 72 h 后的细胞毒性比较

Tab.1 Comparison of the cytotoxicity of CAcAms in NRK cells after 72 h

CAcAms	最低细胞毒性质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\rho_{50}/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	毒性 排序	R^2	ANOVA 统计
MCAcAm	3.00×10^1	3.17×10^1	1	0.98	显著度 $P < 0.001$
DCAcAm	5.00×10^3	6.39×10^3	3	0.96	显著度 $P < 0.001$
TCAcAm	8.00×10^2	1.16×10^3	2	0.99	显著度 $P < 0.001$

绘制的 3 种 CAcAms 的质量浓度-效应曲线进行回归分析,回归系数 R^2 从 0.96 (DCAcAm) 到 0.99 (TCAcAm). ρ_{50} 值是浓度-效应曲线中的中点所对应的消毒副产物的质量浓度大小, ρ_{50} 值的大小可以衡

量所研究 DBPs 的毒性大小. 在这 3 种 CAcAms 中, ρ_{50} 值最大的是 DCAcAm, 为 $6.39 \times 10^3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明 DCAcAm 的毒性在这 3 种 CAcAms 中最小; ρ_{50} 值最小的是 MCAcAm, 为 $31.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明 MCAcAm 的毒性最大. 以 ρ_{50} 值为指标可以得出 3 种 CAcAms 的细胞毒性排序为: MCAcAm > TCAcAm > DCAcAm.

2.1.2 SCGE 法

经过 SCGE 法处理后,运用 CASP 软件读取每个 CAcAms 的每个质量浓度组的 100 张图片,计算出尾矩的值,并且用横坐标表示 CAcAms 的质量浓度,纵坐标表示尾矩,绘制细胞暴露于 3 种 CAcAms 4h 之后尾矩对质量浓度的箱线图,如图 2 所示.

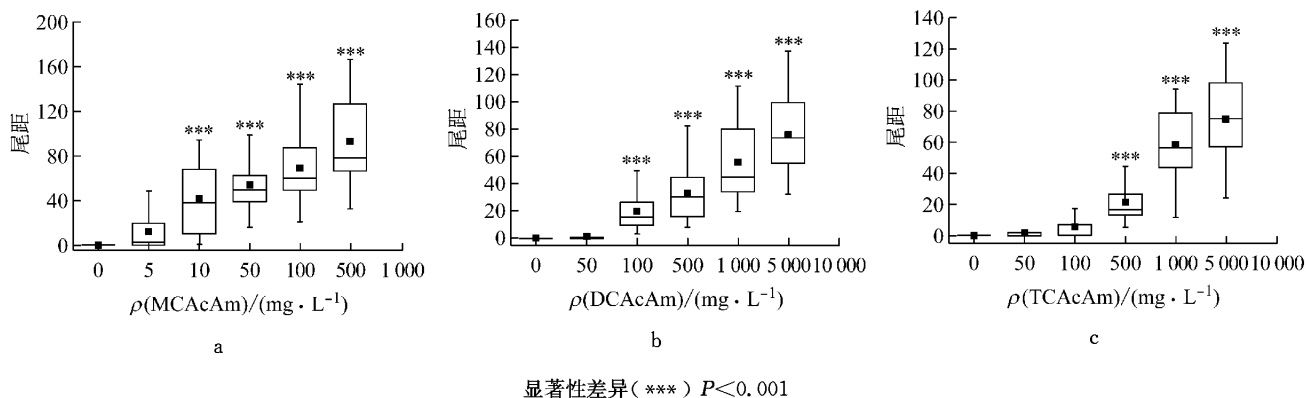


图 2 NRK 细胞的尾矩随 CAcAms 质量浓度变化的箱线图

Fig.2 NRK cell acute genotoxicity (SCGE tail moment values) of CAcAms

在图 2 中,测量值中间的 50% 的数据显示在方形盒子中,盒子的上限表示数据中由小到大排列在 75% 的尾矩值,下限表示排列在 25% 的尾矩值,而盒子中间的横线表示所测数据的中位数,盒子上方的横线为 90% 的尾矩值,盒子下方的横线为 10% 的尾矩值,盒子中间的实心方框表示所有数据的平均数. 由于彗星的尾矩有一个较广泛的分布,选取平均数代表这一质量浓度所致的彗星尾矩的大小. 对平均数进行单因素方差分析 (ANOVA), 计算得 4 种 DBPs 所导致的 P 值均 ≤ 0.05 . 由此可以得出各 CAcAms 最小的遗传毒性质量浓度,并且用遗传毒性的 ρ_{50} 来衡量各 CAcAms 遗传毒性的大小, ρ_{50} 值为采用平均尾矩所绘制的剂量-效应曲线的中点所对应的 CAcAms 的质量浓度值. 根据 ρ_{50} 值的大小可以得出 3 种 CAcAms 的急性遗传毒性的排序,为 MCAcAm > DCAcAm > TCAcAm. 所得的 ANOVA 的结果见表 2.

表 2 CAcAms 作用 NRK 细胞 4 h 后的遗传毒性比较

Tab.2 Comparison of the genotoxicity of CAcAms in NRK cells after 4 h

CAcAms	最低遗传毒性质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\rho_{50}/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	毒性 排序	R^2	ANOVA 统计
MCAcAm	10	2.60×10	1	0.96	显著度 $P < 0.001$
DCAcAm	10^2	4.31×10^2	2	0.97	显著度 $P < 0.001$
TCAcAm	5×10^2	7.35×10^2	3	0.99	显著度 $P < 0.001$

2.1.3 FCM 对 CAcAms 诱导细胞凋亡分析

染毒后的细胞经流式细胞仪及 Flowjo 软件分析后,将凋亡细胞的比例随 CAcAms 质量浓度的变化绘制成柱状图,结果如图 3 所示. 由图 3 可知,经 3 种 CAcAms 处理的 NRK 细胞的凋亡细胞比例均随着 3 种 CAcAms 质量浓度的增加而增加. MCAcAm 的凋亡细胞比例从 8.15% 增加到 83.8%, DCAcAm

的凋亡细胞比例从 8.15% 增加到 19.9%, TCACAm 的凋亡细胞比例从 8.15% 增加到 46.7%。根据以上结果可以得出, 3 种 CACAm 在所测质量浓度范围内均显示出细胞的死亡是通过细胞凋亡的途径诱导的, 其中 MCACAm 的毒性最大, 其次为 TCACAm, 而 DCACAm 的毒性要小于 MCACAm 和 TCACAm。3 种 CACAm 诱导细胞凋亡能力由大到小排序为 MCACAm > TCACAm > DCACAm。

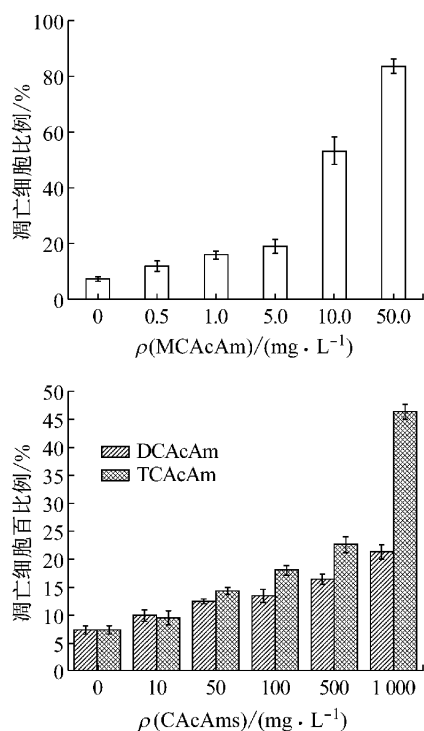


图 3 凋亡细胞比例随 CACAm 质量浓度变化柱状图

Fig. 3 The percentage of apoptotic cells in NRK cells exposed to CACAm

FCM 依靠荧光特性进行检测, 通过 PI/Annexin V 染色可以区分凋亡细胞和死亡细胞。细胞死亡是由于外来损伤导致, 凋亡是一种程序性死亡, 以 DNA 的降解为特点^[12]。太多的凋亡可以导致免疫缺陷和机能退化^[13-14], 太少的凋亡又能引起恶性肿瘤和淋巴组织增生^[15]。所以明确 CACAm 导致 NRK 细胞毒性的途径对于了解 CACAm 的毒性机理非常重要。由结果可知 3 种 CACAm 相比于溶剂对照能够引起显著的细胞凋亡 ($P < 0.05$), 其中 MCACAm 引起的细胞凋亡最明显, 其次为 TCACAm。这与 MTT 法所得的毒性大小结果一致, 同时也表明 3 种 CACAm 造成 NRK 细胞毒性的的重要因素为细胞凋亡, 即 DNA 的降解。

2.1.4 FCM 对 CACAm 诱导细胞周期阻滞分析

细胞的 DNA 含量和细胞凋亡的诱导都是通过

细胞周期的调控进行的, 由此, 本研究检测了 3 种 CACAm 对 NRK 细胞的细胞周期调控。经 Flowjo 软件分析的结果选取了高浓度数据组列于图 4。图 4 中, G1, S 和 G2 分别表示细胞周期的不同阶段; Sub-G1 表示凋亡细胞。

NRK 细胞经 3 种 CACAm 暴露 4h 后, G1 期的细胞比例均有所增加。MCACAm 作用的细胞, G1 期的细胞比例从 46.61% 增加到 69.85% (图中未显示); DCACAm 作用的细胞, G1 期细胞比例从 46.61% 增加到 70.01% (图中未显示); TCACAm 作用的细胞, G1 期细胞比例从 46.61% 增加到 71.34%。同时, 由图示可知 G1 期细胞比例的增加, 伴随着 S 期和 G2 期细胞比例的降低。这 3 种 CACAm 诱导 G1 期阻滞的能力由大到小排序为 MCACAm > DCACAm > TCACAm。

考察 MCACAm 和 DCACAm 高质量浓度作用下的 NRK 细胞周期分布情况, 发现当 MCACAm 和 DCACAm 的质量浓度超过 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, G1 期的细胞数量开始下降, MCACAm 作用的 G1 期细胞从 69.85% ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 降低到 57.33% ($500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 同时开始出现亚 G1 期细胞, 比例为 16.2%。DCACAm 作用的细胞, 在 DCACAm 质量浓度超过 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 G1 期的细胞数量开始减少, 从 70.1% ($500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 降低至 53.00% ($5000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 同时产生亚 G1 期细胞, 比例为 11.14% ($5000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。而 TCACAm 没有亚 G1 期细胞出现。亚 G1 期的细胞代表凋亡细胞, 表明只有当 MCACAm 和 DCACAm 在高质量浓度时, NRK 细胞才会出现凋亡细胞。

2.2 氯代乙酰胺的质量浓度分布

所调查的 5 个饮用水厂的出水中均检测到这 3 种 CACAm, 如表 3 所示。其质量浓度大小排序均为 DCACAm > TCACAm > MCACAm。用氯胺做消毒剂的水厂中产生的 CACAm 的质量浓度总体上远大于用氯做消毒剂的水厂。只有用氯胺做消毒剂的水厂 4 产生的 TCACAm 的质量浓度略微低于用氯做消毒剂的水厂 3 产生的 TCACAm。需要说明的是, 5 个水厂原水中的氨氮经过常规和深度处理工艺处理后含量较低, 因此未考虑投加消毒剂氯时氨氮会部分转化成氯胺。

2.3 氯代乙酰胺在饮用水厂中的总毒性比较

由于饮用水厂出水中消毒副产物的总毒性与两个因素有关, 其一为饮用水厂中消毒副产物的质量浓度水平, 其二为所测饮用水消毒副产物的毒性大

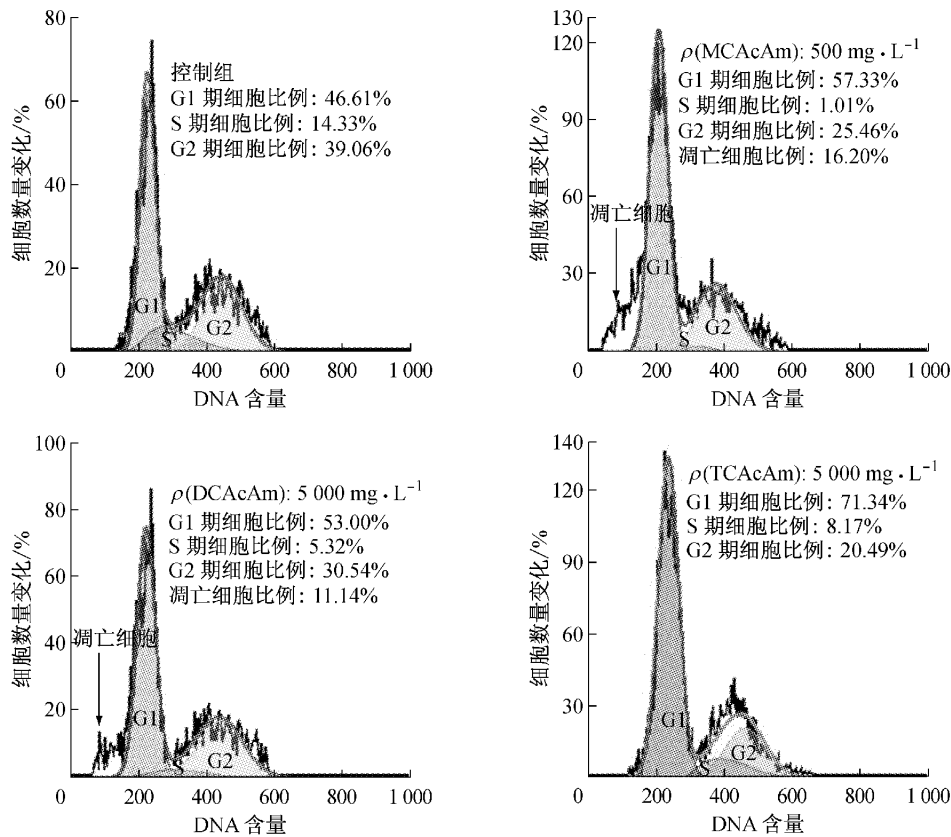


图 4 NRK 细胞经 CAcAms 作用后的细胞周期阻滞分析

Fig.4 Cell cycle analysis of NRK cells exposed to CAcAms

表 3 5 个饮用水厂中 3 种 CAcAms 的质量浓度

Tab.3 The concentrations of 3 CAcAms in 5 DWTPs

水厂	消毒剂	$\rho(\text{CAcAms})/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$			总计
		MCAcAm	DCAcAm	TCAcAm	
1	氯	35	220	72	327
2	氯胺	620	3 550	1 700	5 870
3	氯	270	1 730	510	2 510
4	氯胺	380	2 900	420	3 700
5	氯	170	2 270	410	2 850
总计		1 475	10 670	3 112	15 257

小。选取 3 种 CAcAms 在水厂中的质量浓度水平(表 3)与毒性指数 T_c 的乘积来表示这种饮用水消毒副产物在饮用水厂中的毒性风险,如式(2)所示。

$$T_c = (1/\rho_{50}) \times 100 \quad (2)$$

计算结果如表 4 和表 5 所示。由表 4 的结果可知,3 种 CAcAms 在 5 个饮用水厂中的毒性都相对较高,其中,在 5 个水厂中,尽管 MCAcAm 的质量浓

度水平低于 DCAcAm 和 TCAcAm,但由于 MCAcAm 的 T_c 值高于 DCAcAm 和 TCAcAm,故 MCAcAm 的细胞毒性大于 DCAcAm 和 TCAcAm。而 DCAcAm 和 TCAcAm 在饮用水厂中的细胞毒性大小没有明显规律:在水厂 1、水厂 2 和水厂 3 中, DCAcAm 的细胞毒性低于 TCAcAm 的细胞毒性,在水厂 3 和水厂 4 中则相反。

由表 5 的结果可知, MCAcAm 的遗传毒性指数 T_g 值很高,其在 5 个水厂中的总遗传毒性明显高于 DCAcAm 和 TCAcAm。观察 DCAcAm 和 TCAcAm 在 5 个水厂中总遗传毒性的大小可以发现, DCAcAm 的遗传毒性在 5 个水厂中都高于 TCAcAm,这与饮用水厂中总细胞毒性的计算结果略有不同。

表 4 5 个水厂出水中 3 种 CAcAms 所致 NRK 总细胞毒性比较

Tab.4 Comparison of final cytotoxicity of CAcAms in the finished water of 5 DWTPs

CAcAms	T_c	饮用水厂出水中总细胞毒性				
		水厂 1	水厂 2	水厂 3	水厂 4	水厂 5
		氯消毒	氯胺消毒	氯消毒	氯胺消毒	氯消毒
MCAcAm	3.15	110	1.95×10^3	8.5×10^2	1.2×10^3	5.36×10^2
DCAcAm	1.56×10^{-2}	3.43	55.4	27.0	45.2	35.4
TCAcAm	8.62×10^{-2}	6.21	1.47×10^2	44.0	36.2	35.3

表 5 5 个水厂出水中 3 种 CAcAms 所致 NRK 总遗传毒性比较

Tab.5 Comparison of final genototoxicity of CAcAms in the finished water of 5 DWTPs

CAcAms	T_g	饮用水厂出水中总遗传毒性				
		水厂 1	水厂 2	水厂 3	水厂 4	水厂 5
		氯消毒	氯胺消毒	氯消毒	氯胺消毒	氯消毒
MCAcAm	3.85	1.35×10^2	2.39×10^3	1.04×10^3	1.46×10^3	6.55×10^2
DCAcAm	0.232	51.0	8.24×10^2	4.01×10^2	6.72×10^2	5.27×10^2
TCAcAm	0.136	9.79	2.31×10^2	69.4	57.1	55.8

由上述结果可知, DCAcAm 和 TCAcAm 的质量浓度虽然高于 MCAcAm, 但由于 MCAcAm 的毒性较大, 造成的毒性风险要明显高于 DCAcAm 和 TCAcAm.

3 结论

(1) 4 种胞外毒性测试方法, MTT 法、SCGE 法、细胞凋亡分析和细胞周期阻滞分析均表明 MCAcAm 的毒性要显著高于 DCAcAm 和 TCAcAm.

(2) 用氯胺消毒的饮用水厂出水中所产生的 CAcAms 的质量浓度高于用自由氯做消毒剂的水厂出水产生的 CAcAms 的质量浓度. 同时, 饮用水厂出水中 DCAcAm 的质量浓度明显高于 MCAcAm 和 TCAcAm.

(3) 对 5 个饮用水厂中 5 种 CAcAms 的综合总毒性分析表明, 虽然 MCAcAm 的质量浓度低于 DCAcAm 和 TCAcAm, 但由于 MCAcAm 的毒性较大, 在被调查的饮用水中 MCAcAm 所造成的细胞毒性风险和遗传毒性风险皆高于 DCAcAm 和 TCAcAm.

参考文献:

- [1] Galal-Gorchev H, Chlorine in water disinfection[J]. Pure and Applied Chemistry, 1996, 68(9): 1731.
- [2] Richardson S D, Plewa M J, Wagner E D, *et al.* Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research [J]. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2007, 636(1/3): 178.
- [3] Chu W H, Gao N Y, Yin D, *et al.* Trace determination of 13 haloacetamides in drinking water using liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization[J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1235(27): 178.
- [4] Chu W H, Gao N Y, Krasner S W, *et al.* Formation of halogenated C-, N-DBPs from chlor(am)ination and UV irradiation of tyrosine in drinking water[J]. Environmental Pollution, 2012, 161: 8.
- [5] Krasner S W, Weinberg H S, Richardson S D, *et al.* Occurrence of a new generation of disinfection byproducts[J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(23): 7175.
- [6] Plewa M J, Muellner M G, Richardson S D, *et al.* Occurrence, synthesis, and mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity of haloacetamides: an emerging class of nitrogenous drinking water disinfection byproducts [J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(3): 955.
- [7] Zhang X, Bull R J, Fisher J, *et al.* The synergistic effect of sodium chlorite and bromochloroacetic acid on BrO_3^- induced renal cell death[J]. Toxicology, 2011, 289 (2/3): 151.
- [8] Carriere M, Avoscan L, Collins R, *et al.* Influence of uranium speciation on normal rat kidney (NRK-52E) proximal cell cytotoxicity[J]. Chemical Research in Toxicology, 2004, 17 (3): 446.
- [9] Chang S H, Phelps P C, Berezsky I K, *et al.* Studies on the mechanisms and kinetics of apoptosis induced by microinjection of cytochrome c in rat kidney tubule epithelial cells (NRK-52E) [J]. American Journal of Pathology, 2000, 156 (2): 637.
- [10] Yang F, Zhang J, Chu W H, *et al.* Haloacetamides versus halomethanes formation and toxic risk in chloraminated drinking water[J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 274 (15): 156.
- [11] Collins A R, Dusinska M, Ma A G, *et al.* The comet assay modified to detect DNA-base oxidation, and repair of DNA-damage in cellular and subcellular systems [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 1995, 21A, 347.
- [12] Jiao Z X, Ao Q L, Xiong M. Cigarette smoke extract inhibits the proliferation of alveolar epithelial cells and induces apoptosis [J]. Acta Physiologica Sinica, 2006, 58(3): 244.
- [13] Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death[J]. Journal of Immunological Methods, 2000, 243(1/2): 167.
- [14] Griffith T S, Brunner T, Fletcher S M, *et al.* FAS ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege [J]. Science, 1995, 270(5239): 1189.
- [15] Nagata S, Golstein P. The FAS death factor [J]. Science, 1995, 267 (5203): 1449.