

# Vero 细胞对 2,4,6-三氯苯酚的毒性响应特征和敏感性分析

石艳玲, 王磊\*, 周琪

同济大学环境科学与工程学院 污染控制与资源化国家重点实验室, 上海 200092

**摘要:** 以 2,4,6-三氯苯酚(2,4,6-trichlorophenol, TCP) 为例, 采用 MTT 比色实验和 ANNEXIN V-FITC/PI 双染色-流式细胞技术研究了 Vero 细胞对有机化学污染物的毒性响应特征和敏感性, 以期发现一种灵敏、可靠的表征微量化学物质综合毒性的方法。研究结果表明: 1) TCP 浓度对 Vero 细胞的毒性响应特征有决定作用。低浓度 TCP ( $\leq 0.5 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 即可使部分细胞从原有的刚性不规则三角形结构变为圆形或椭圆形, 但细胞的生长未受明显抑制。TCP 浓度在  $1 \sim 5 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 细胞生长开始受到抑制, 表现为细胞增殖受到抑制及部分细胞凋亡或死亡, 但增殖抑制率和 TCP 浓度之间的关系不明显。当 TCP 浓度大于  $5 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 细胞增殖明显受到抑制, 且随 TCP 浓度的增加, 细胞增殖抑制率逐渐升高。2) TCP 作用时间对 Vero 细胞的毒性响应特征有显著影响。ANNEXIN V-FITC/PI 双染色-流式细胞仪检测结果表明, TCP 作用 24h 内 Vero 细胞毒性表现为以细胞膜的完整性受到损伤为主, 凋亡或坏死细胞比例较小; 而 48h 后, 凋亡细胞的比例明显增加。细胞复壮实验结果进一步证实 24h 内形态发生变化的细胞并未完全坏死或凋亡。以上结果表明细胞形态变化和细胞膜损伤均为细胞毒性的早期表现特征, 两者之间可能存在某种相关性, 以此表征化学污染物的生物毒性具有较高的灵敏度, 值得进一步研究。

**关键词:** 三氯苯酚; Vero 细胞; 膜损伤; 细胞变形; MTT 比色法; 流式细胞仪

文章编号: 1673-5897(2008)5-479-09 中图分类号: X131 文献标识码: A

## Cytotoxic Response Characteristics and Sensitivity in Mammalian Vero Cells Exposed to 2,4,6-Trichlorophenol

SHI Yan-ling, WANG Lei\*, ZHOU Qi

State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092

Received 18 April 2008 accepted 18 June 2008

**Abstract:** In order to find a sensitive and reliable method to evaluate comprehensive toxicity of trace level chemicals in environment, MTT assay and ANNEXIN V-FITC/PI-Flow Cytometry are used to study the cytotoxic response characteristics and sensitivity in Vero cells exposed to 2, 4, 6-trichlorophenol (TCP), a typical organic pollutant. Results show that: 1) TCP concentration plays a key role in determining the response characteristics of Vero cytotoxicity. Low dose of TCP ( $\leq 0.5 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) can cause cytomorphosis (some Vero cells become oval or circular from irregular triangle), while the growth of cells is not inhibited significantly. When TCP concentrations are  $1 \sim 5 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , the growth of cells is inhibited, which mainly manifested as inhibition of proliferation and apoptosis or death of some cells. The relationship between the inhibition of proliferation and the TCP concentrations is not obvious. When TCP concentrations are more than  $5 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , significant inhibition of proliferation is found. With the increase of TCP concentrations, the rate of inhibition of proliferation increase gradually. 2) Exposure time has obvious effects on response characteristics of Vero cytotoxicity. Results of ANNEXIN V-FITC/PI-Flow Cytometry show that: cytotoxicity of Vero cells is mainly manifested as the damage of cell membrane intact, and the proportions of cell apoptosis and necrosis are low in 24h exposure of TCP. After 48h exposure of TCP, the proportion of cell apoptosis increases significantly. The results of cell rejuvenation further confirm that the cells which morphology changes within 24h are not complete necrosis and apoptosis. The above results suggest that both of the change of cell morphology and the membrane damage should be the early response characteristics of Vero cytotoxicity and there is certain pertinence between them, which show high sensitivity in characterizing the biological toxicity of chemicals.

**Keywords:** TCP; Vero cells; membrane damage; morphology change; MTT; Flow Cytometry

收稿日期: 2008-04-18 录用日期: 2008-06-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 20677043); 上海市自然科学基金项目 (No. 05ZR14119)

作者简介: 石艳玲 (1983—), 女, 硕士研究生, E-mail: daisy\_l1983@hotmail.com; \* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: celwang@yahoo.com

## 1 引言(Introduction)

随着工业化进程的加速,新合成的有机化学物质日益增多.有机化学物质在生产、运输和使用过程中不可避免地进入环境中,对水体、空气、土壤产生污染.有报道指出,目前饮用水(源)中可检出的有机污染物达2221种(顾涛等,2006),其中许多具有致癌、致畸和致突变作用.由于饮用水中有机物的种类繁多,浓度通常又很低,因此对其检测和安全评价方法的发展提出了较高要求.

传统的水生生物法检测灵敏度低、所需时间长,难以快速评价水体中微量有机物的生物毒性.淡水发光细菌法虽然灵敏度有一定提高,但其与人体细胞的同源性较低,评价结果难以直接反映污染物对人体健康的影响.常用的Ames实验也仅能用于微量化学物三致效应的评价,而不能全面地反映污染物的毒性.基于此,评价水体的安全目前仍然以检测水中上百种物质的含量为主.这种方法既复杂又有技术障碍,并且由于多种化学物质之间存在加合、协同等作用,即使每种化学物质都在其安全浓度范围内,在共同作用下也可能对人体健康造成危害.

因此,建立一种广谱、可靠、灵敏、简单易行的微量化学物质综合生物毒性评价技术是人们多年来的追求.Vero细胞来源于非洲绿猴肾脏,与人体细胞高度同源,培养方法简单,在正常情况下生长时呈不规则三角形,在毒性物质作用下形态会发生明显变化,因此可以根据细胞形态的变化检测微量化学物质的综合生物毒性(BS, 2000; Fernández *et al.*, 2005).四氮甲唑蓝(3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)比色法由于可以定量测定哺乳动物细胞线粒体酶活性,以此反映存活细胞的数量及其生命活性(范能全等,2005),近年来在医学、食品等领域广泛用于检测外源物质的生物安全性(黄哲玮等,2005).此外,一种基于对单个细胞进行快速定量检测的方法——流式细胞技术(Flow Cytometry, FCM)被广泛用于医学和海洋学研究中(于洋等,2006;汪保安等,2006),近年来也逐步用于环境和生态毒理学研究中(林本成等,2007).

上述几种细胞毒性检测法均具有一定的灵敏度和广谱性,但对各种方法的敏感性比较,目前缺

乏较为全面的可行性研究.本文比较研究了Vero CCL-81细胞对典型有机化学污染物(以环境优先控制污染物2,4,6-三氯苯酚(TCP)(Oikari *et al.*, 1985; House *et al.*, 1997; 余宇燕等,2006)为例)细胞毒性的响应特征及其敏感性,以期确定一种灵敏、可靠的微量化学物质细胞毒性表征方法,为今后发展和完善一种简单、灵敏的化学污染物综合生物毒性评价技术提供理论依据.

## 2 材料与方法(Materials and methods)

### 2.1 细胞株

Vero(CCL-81)细胞由杭州远方生物科技有限公司提供.

### 2.2 培养基和试剂

MEM培养基粉末、新生牛血清和0.25%胰酶购自美国Gibco公司;MTT粉剂购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司;ANNEXIN V-FITC凋亡试剂盒购自美国Bipeck Biopharma公司;TCP单标购自美国Supelco公司.

### 2.3 器材

培养皿(包括6、24和96孔培养板,加拿大G&H公司),IX71倒置相差显微镜(日本Olympus公司),Bio-Rad Model 550酶标仪(美国Bio-Rad公司),超净工作台,CO<sub>2</sub>培养箱,FACSCalibur流式细胞仪(美国BD公司).

### 2.4 细胞培养和处理

Vero细胞按常规方法(司徒镇强等,2007)培养在Φ100mm培养皿中,置于37℃、CO<sub>2</sub>浓度为5%的恒温培养箱中维持生长.为防止细胞生长过快,传代时使用血清含量为7%的MEM生长培养基,待细胞完全贴壁后换为含血清2%的MEM维持培养基.

在细胞毒性实验阶段,将处于对数生长期的细胞消化,用血球计数板计数,以一定密度接种到24孔板(或6孔板及96孔板),用含不同浓度TCP的MEM生长培养基处理.TCP储备液采用TCP(单标)加十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS),经过超声破碎配制而成.SDS在培养基中的含量不超过0.001%.

## 2.5 细胞形态的观察

分别将  $3 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$  和  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  密度的细胞接种到 24 孔板, 加入终浓度为 0.25、0.5、1、5、10、20、50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TCP 的培养基后放入  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 48h, 然后用倒置显微镜(放大 40 倍)观察各孔细胞的生长状况, 在白光下拍照进行比较. 实验同时设阴性对照(含 0.001% SDS)和阳性对照(含  $800 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4$ ).

## 2.6 细胞增殖抑制率分析(MTT 比色)

实验一: 将终密度为  $1 \times 10^5$ 、 $6 \times 10^4$  和  $3 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$  的细胞接种到 96 孔板, 加生长培养基至  $120 \mu\text{L}$ . 培养过夜后换成含不同浓度 TCP 的培养液, TCP 终浓度为 1、5、10、20、50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每个浓度设 6 个复孔. 同时, 设阴性对照(含 0.001% SDS)、空白对照(不含细胞)和阳性对照( $800 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4$ ). 培养 48h 后加入  $20 \mu\text{L}$  MTT 溶液, 放置 4h, 轻轻吸去培养板各孔溶液, 加入  $120 \mu\text{L}$  酸化异丙醇, 振荡 10min 或放置 40min, 用酶标仪在 570nm 波长下测定光吸收值(OD), 650nm 为参比波长. OD 值越大, 表明相对活细胞数量越多. MTT 实验中, 通常用细胞相对增值率(Relative growth rate, RGR)来反映细胞的活性(郑晓雁等, 2006). 但在本实验中, 为直接反映 TCP 对 Vero 细胞的毒性作用, 将 RGR 转化为相对抑制率. 即设定阴性对照的细胞抑制率为 0%, 空白对照的细胞抑制率为 100%, 各 TCP 浓度组的相对抑制率可用以下公式求出:

$$\begin{aligned} \text{相对抑制率}(\%) = & \frac{(\text{阴性对照 OD} - \text{空白对照 OD}) - (\text{加药孔 OD} - \text{空白对照 OD})}{(\text{阴性对照 OD} - \text{空白对照 OD})} \\ & \times 100\% \quad (1) \end{aligned}$$

实验二: 为进一步了解更低浓度下 TCP 对 Vero 细胞活性的抑制规律, 细胞接种密度选择  $6 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ , TCP 浓度选择 0.25、0.5、1、2、5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 重复上述实验, 考察低浓度下 TCP 对 Vero 细胞活性的抑制.

MTT 溶液实验前用磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)溶液新鲜配制, 浓度为  $5 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 过滤除菌后,  $4^\circ\text{C}$  避光保存, 保存时间不超过 2 周.

## 2.7 细胞凋亡与膜损伤分析(流式细胞仪 ANNEXIN V-FITC/PI 双染色分析)

不同 TCP 浓度培养后的细胞经 ANNEXIN V-FITC/PI 双染色后, 通过流式细胞仪可以分析细胞的凋亡、坏死与膜损伤状况(Bryce *et al.*, 2007). 其原理是细胞凋亡的早期, 细胞膜内表面含负电的磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)可从细胞膜的内侧翻转到细胞膜表面, 暴露在细胞外环境中. ANNEXIN V 能与 PS 高亲和力特异性结合, 将 ANNEXIN V 进行荧光素 FITC 标记即能检测到细胞早期凋亡(王敬春等, 2007). 碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种核酸染料, 它不能透过完整的细胞膜, 因此膜完整的细胞对 PI 有抗染性. 但如果细胞已死亡或处于凋亡中晚期, 则细胞膜破裂, PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红. 同时如果细胞膜受损, 但尚未凋亡或死亡, PI 同样可染色. 因此将两种试剂匹配使用, 就可以将细胞膜受损细胞和凋亡早期(PS 外翻)、晚期及死亡的细胞加以区分(Witt *et al.*, 2008).

以  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  的密度将细胞接种到 6 孔板, 设 1、5、20、50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TCP 4 个浓度梯度和阴性对照(含 0.001% SDS). 时间梯度设定为 24h 和 48h. 到达设定时间后, 将 6 孔板中的细胞依次消化, 装入 PE 管, 做好标记. 1000rpm 离心 10min, 轻轻吸去上清液. 用冷的 PBS 将细胞重新悬浮, 离心并弃去上清液, 重复 2 次. 加入  $200 \mu\text{L}$  结合缓冲液( $1 \times$  binding buffer), 将悬浮细胞密度调至  $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ . 加入  $5 \mu\text{L}$  ANNEXIN V-FITC 染料混匀, 置于暗处  $4 \sim 8^\circ\text{C}$  培养 15min. 再加入  $10 \mu\text{L}$  PI, 置于暗处  $4 \sim 8^\circ\text{C}$  培养 5min. 1h 内用流式细胞仪分析(Foladori *et al.*, 2007).

## 2.8 细胞复壮实验

细胞经过高浓度药物(TCP 浓度为  $100 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  浓度为  $800 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )处理 24h 或 48h 后, 去除旧培养液, PBS 冲洗 1 次, 加含有 7% 血清的 MEM 生长培养基培养 24h. 在白光下观察( $\times 40$ ), 拍照, 比较复壮前后细胞形态的变化.

## 2.9 统计分析

实验数据采用 Excel 软件处理并采用 T 检验进行差异显著性分析.

### 3 结果(Results)

#### 3.1 TCP 致 Vero 细胞形态变化的响应浓度

细胞密度不同时细胞的生长状况也不同. 高密度表面接种有利于细胞贴壁, 细胞能较快进入对数生长期. 但当细胞的表面接种密度过大时, 细胞的扩展受到限制, 使得部分细胞不能正常生长(孙祥明等, 1999), 同时由于细胞生长过快而导致营养不充分, 造成部分细胞变圆或死亡, 容易对实验结果造成干扰; 而过低密度下细胞不易贴壁, 生长缓慢, 也不利于进行形态观察.

预实验结果表明细胞密度为  $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$  (24 孔板) 时最利于镜下观察. 此细胞密度下加不同浓度 TCP 后细胞的形态如图 1 所示. 可以看出, 暴露于较低浓度 TCP ( $0.25 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 图 1b) 时已有少部分细胞变圆, 但和阴性对照(图 1a)相比差别不大(阴性对照中细胞正常生长时也存在少量变形或死亡的细胞). 当 TCP 浓度大于  $0.5 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (图 1c) 时, 有较多细胞变圆或脱壁、漂浮在培养基中, 和阴性对照差异较为显著. 随着 TCP 浓度增加(图 1d~g), 圆形和漂浮细胞进一步增多, 贴壁细胞减少. 阳性对照(图 1h)中细胞全部变圆(由于  $\text{ZnSO}_4$  会

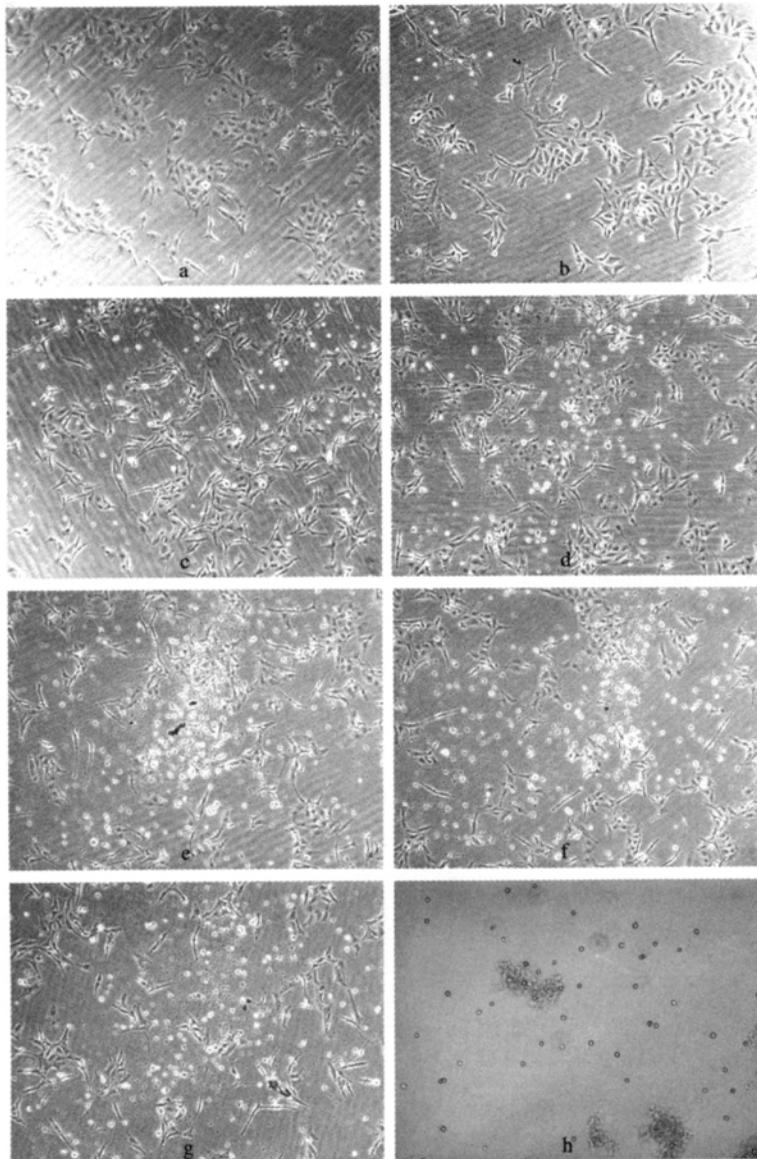


图 1 不同浓度 TCP 作用下 Vero 细胞的变形情况

(接种密度:  $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ ; a: 阴性对照; b~g:  $0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TCP; h: 阳性对照; 图中的白点是漂浮或贴壁变圆的细胞)

Fig.1 Morphology change of Vero cells exposed to different concentrations of TCP

(inoculum density:  $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ ; a: negative control; b~g:  $0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TCP; h: positive control; White points in above photos are suspending or "rounding off" cells)

使血清絮凝，不利于镜下观察，因此图 1h 为弃去培养基加 PBS 后拍摄所得，所以部分悬浮细胞被随之丢弃，导致图 1h 显示的细胞数目少于实际状况。

### 3.2 TCP 对 Vero 细胞增殖的抑制浓度

采用 MTT 法检测 Vero 细胞增殖结果如表 1 所示。不同接种密度下，随着 TCP 染毒浓度的增加，OD 值均呈逐渐降低趋势，表明随着 TCP 浓度的增加，相对活细胞数量逐渐减少。

表 1 采用 MTT 实验检测各实验组光吸收值(OD)

Table 1 Optical absorption values of experimental groups using MTT Assay

TCP 浓度组/ (mg·L <sup>-1</sup> )	OD 值		
	接种密度 3×10 <sup>4</sup> ·mL <sup>-1</sup>	接种密度 6×10 <sup>4</sup> ·mL <sup>-1</sup>	接种密度 1×10 <sup>5</sup> ·mL <sup>-1</sup>
1	0.164±0.016 <sup>**##</sup>	0.389±0.020 <sup>##</sup>	0.909±0.021 <sup>##</sup>
5	0.175±0.016 <sup>**##</sup>	0.355±0.009 <sup>**##</sup>	0.844±0.039 <sup>**##</sup>
10	0.127±0.013 <sup>**##</sup>	0.310±0.022 <sup>**##</sup>	0.822±0.043 <sup>**##</sup>
20	0.096±0.009 <sup>**##</sup>	0.244±0.020 <sup>**##</sup>	0.742±0.054 <sup>**##</sup>
50	0.062±0.007 <sup>**##</sup>	0.146±0.013 <sup>**##</sup>	0.621±0.030 <sup>**##</sup>
阴性对照	0.217±0.018	0.385±0.014	0.894±0.020
阳性对照	0.011±0.010	-0.005±0.017	0.037±0.019
空白对照	0.000±0.001	-0.001±0.005	0.000±0.005

注：\*\*、## 分别表示与阴性对照、阳性对照差异极显著(p < 0.01)

Vero 细胞相对抑制率随 TCP 浓度的变化 (Vero 细胞增殖受抑制曲线) 如图 2 所示。在不同细胞密度下，当 TCP 浓度大于 5mg·L<sup>-1</sup> 时，随着 TCP 浓度增加，细胞抑制率逐渐升高，基本呈对数增长趋势。TCP 浓度在 1~5mg·L<sup>-1</sup> 浓度之间时，TCP 浓度和抑制率的关系不明显，在中、高密度 (6×10<sup>4</sup>、1×10<sup>5</sup>·mL<sup>-1</sup>) 下，TCP 浓度为 1mg·L<sup>-1</sup> 时抑制率甚至出现负值 (即促进细胞增殖)。

此外，从图 2 还可以看出，细胞接种密度对 TCP 的细胞抑制率有较显著影响。随着细胞接种密度的增加，相同 TCP 浓度下细胞抑制率逐渐降低，即较低细胞密度下抑制作用更为显著。一般情况下，OD 在 0.2~0.8 之间时测量误差较小，因此细胞密度最好选择在 6×10<sup>4</sup>·mL<sup>-1</sup>~1×10<sup>5</sup>·mL<sup>-1</sup> 之间。

较低浓度 TCP(0.25~5mg·L<sup>-1</sup>) 对 Vero 细胞增殖的影响如表 2 所示。从表 2 可以看出，在 0.25~5mg·L<sup>-1</sup> 浓度范围内，MTT 测定的相对抑制率结果不稳定。随着 TCP 浓度的增加，相对抑制率呈现不规则的变化，二者的相关关系不明显。当 TCP 浓度小于 1mg·L<sup>-1</sup> 时细胞相对抑制率出现负值，表

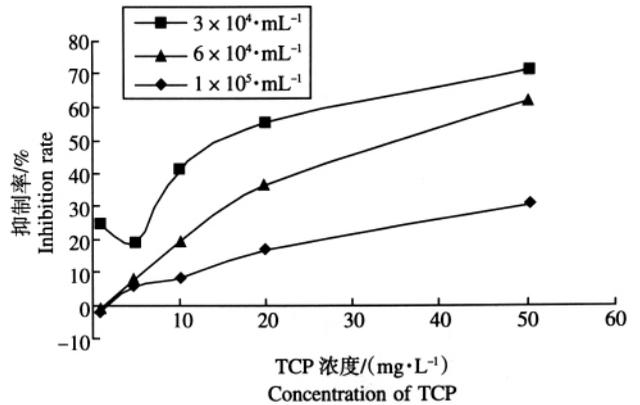


图 2 TCP 对 Vero 细胞活性的抑制作用

Fig.2 Inhibitory effects of TCP on viability of Vero cells

表 2 低浓度组实验的光吸收值(OD)和抑制率(%)

Table 2 Optical absorption values and inhibition rates of low-dose groups

TCP 浓度组/ (mg·L <sup>-1</sup> )	实验组 1 <sup>a)</sup>		实验组 2 <sup>a)</sup>	
	吸光值(OD)	抑制率/%	吸光值(OD)	抑制率/%
0.25	0.455±0.028	-4.4	0.417±0.048	-6.4
0.5	0.441±0.034	-1.1	0.402±0.051	-2.6
1	0.466±0.031	-7.0	0.371±0.018	5.3
2	0.419±0.056	3.8	0.377±0.042	3.8
5	0.355±0.053 <sup>*</sup>	18.6	0.385±0.033 <sup>*</sup>	1.8
阴性对照	0.436±0.050	0.0	0.392±0.055	0.0
阳性对照	0.003±0.002	99.3	0.006±0.003	98.6

注：\* 表示与阴性对照差异显著(p < 0.05)；a)：两组平行实验结果

现为无细胞毒性，促进细胞增殖。

### 3.3 不同浓度和作用时间下 TCP 致 Vero 细胞损伤状态

TCP 作用 24h 和 48h 后的 Vero 细胞通过 ANNEXIN V-FITC/PI 双染色-流式细胞仪分析，可以得出处于不同状态的 Vero 细胞的分布图。一般情况下，在双染色-流式细胞仪的散点图上，左下象限表示正常活细胞，染色显示为 FITC-/PI-；右上象限表示非活细胞，即凋亡中晚期和坏死细胞，染色显示为 FITC+/PI+；而右下象限表示早期凋亡细胞，染色显示为 FITC+/PI-。目前研究人员多从这 3 项来判别细胞的凋亡过程，但对于左上象限 (染色显示为 FITC-/PI+) 的细胞尚缺乏深入的研究，目前说法不一 (Murata *et al.*, 2000; Bryce *et al.*, 2007)。本实验将结合细胞形态变化对该象限细胞作初步分析。

图 3 为 TCP 暴露 24h 后双染色 Vero 细胞散点

图。由图可见,随着 TCP 浓度的增加,活细胞比例(左下象限,LL)逐渐减少,死细胞比例(包括凋亡和坏死,右上象限,UR)逐渐增加,但早期凋亡细胞随 TCP 浓度增加而增加的现象并不明显(右下象限细胞数量较少,LR)。值得注意的是,随着

TCP 浓度上升(从  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  到  $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )左上象限 UL(FITC-/PI+)中的细胞比例增加,尤其当 TCP 浓度达到  $20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  以上时,这部分细胞的比例超过了凋亡和坏死细胞总数。

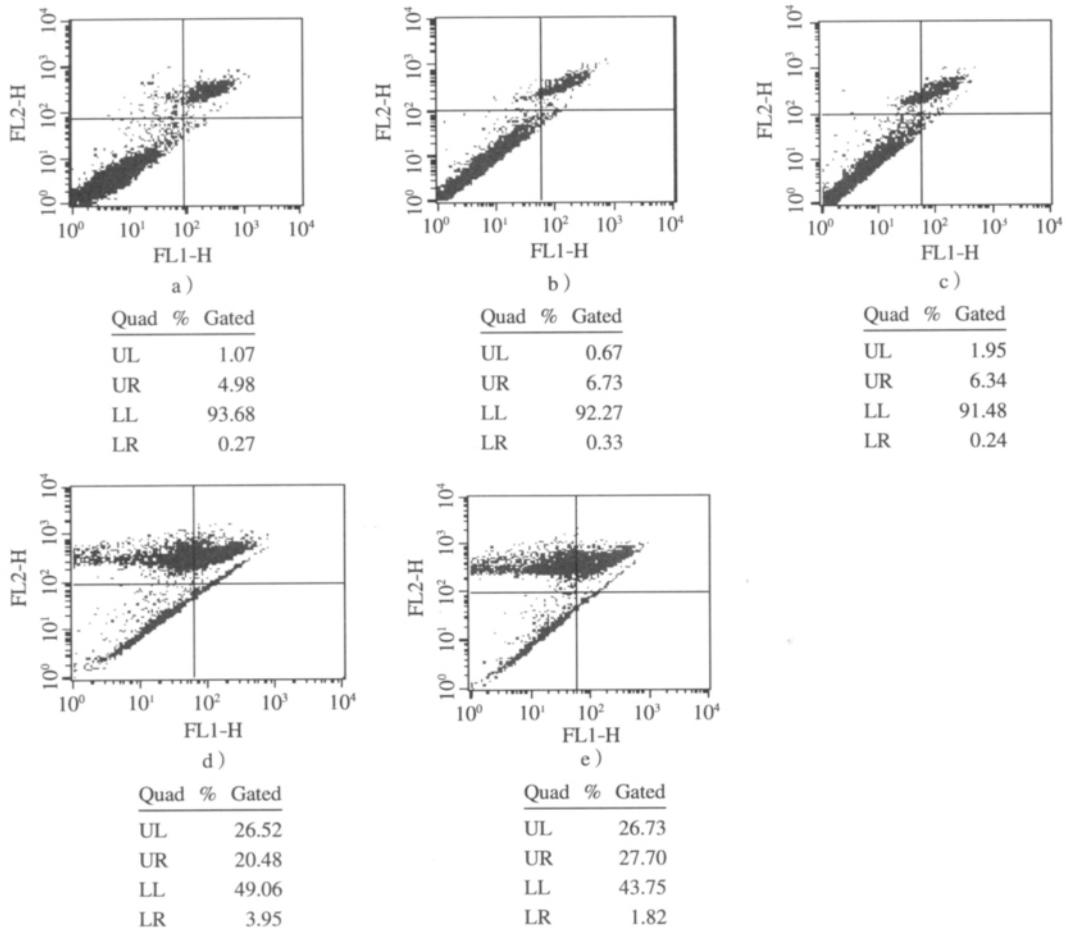


图3 TCP 作用 24h 后 Vero 细胞的流式细胞仪双染色散点图  
(a: 阴性对照; b-e:  $1, 5, 20, 50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TCP)

Fig.3 Double staining scatter plots of Vero cells exposed to TCP for 24h  
(a: negative control; b-e:  $1, 5, 20, 50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TCP)

TCP 暴露 48h 后双染色 Vero 细胞散点图如图 4 所示。随着 TCP 浓度的增加,左下象限活细胞比例减少,右上象限坏死细胞和凋亡细胞的总比例增加,右下象限早期凋亡细胞变化不明显。与 24h 相比,左上象限(FITC-/PI+)中的细胞比例变小,小于右上象限坏死和凋亡细胞的比例。综合图 3、图 4 可以看出,TCP 作用 2h 内 Vero 细胞毒性表现为以细胞膜的完整性受到损伤为主(PI 染色),凋亡或坏死细胞比例较小(PI 和 FITC 均染色);而 48h 后,凋亡和坏死细胞的比例明显增加。

### 3.4 复壮实验

为确认细胞膜完整性受到损伤而未发生凋亡的细胞是否死亡,需进行细胞复壮实验。将经过高浓度 TCP 和  $\text{ZnSO}_4$  处理,培养 24h 后变形的细胞重新转入正常培养液中复壮,发现经 24h 后细胞又重新贴壁,并成不规则三角状(图 5),而 48h 后的变形细胞已不可复壮(图未列出)。

## 4 讨论(Discussion)

形态观察结果表明,TCP 在  $0.25\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  以上时可导致部分 Vero 细胞形态发生明显变化,且浓

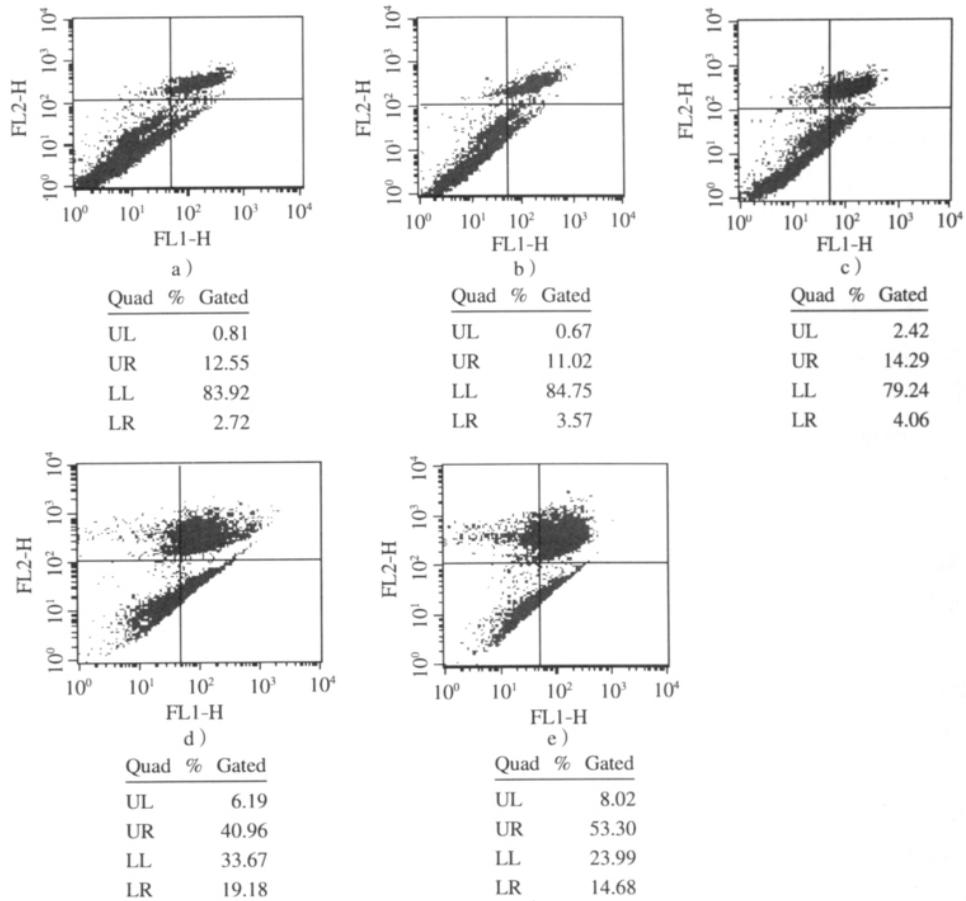


图 4 TCP 作用 48h 后 Vero 细胞的流式细胞仪双染色散点图  
(a: 阴性对照; b-e: 1、5、20、50mg·L<sup>-1</sup> TCP)

Fig.4 Double staining scatter plots of Vero cells exposed to TCP for 48h  
(a: negative control; b-e: 1, 5, 20, 50mg·L<sup>-1</sup> TCP)

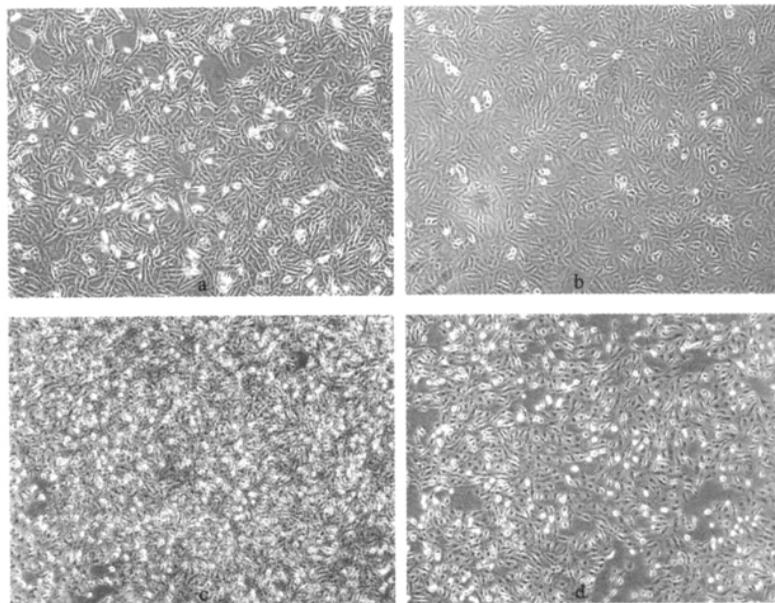


图 5 复壮 24h 前后 Vero 细胞形态的变化  
(a, c: TCP 和 ZnSO<sub>4</sub> 处理 24h 后的细胞形态; b, d: 换新鲜培养基复壮 24h 后的细胞形态)

Fig.5 Morphology change of Vero cells after recover for 24h  
(a, c: TCP and ZnSO<sub>4</sub> exposure for 24h; b, d: recover for 24h)

度越高,变形率越高。MTT比色实验表明,TCP浓度大于 $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时细胞增殖抑制率随浓度增加而逐渐升高,但在 $1\sim 5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内,两者关系不稳定;在TCP浓度小于 $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时细胞增殖抑制率出现负值。这表明以细胞形态变化表征TCP对Vero细胞的毒性可能比传统的细胞增殖抑制率灵敏度更高。

流式细胞术除了能够检测细胞凋亡外,还能反映受试细胞的损伤状态。在24h流式细胞仪双染色散点图中,随着TCP浓度增加,左上象限UL(FITC-/PI+)中的细胞比例增多,尤其当TCP浓度达到 $20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时,这部分细胞的比例超过了凋亡和坏死细胞总数(图3)。一般认为左上象限(UL)的细胞属于机械损伤细胞,是实验操作过程中的机械扰动导致损伤的细胞,因此该象限细胞应该维持一个基本的背景值。但在24h实验中,该象限的细胞比例随TCP浓度的增加,有显著的上升。从理论上来说,PI染色说明该细胞膜已经不完整(膜损伤),而FITC未染色,说明PS没有外翻,也就是尚未发生凋亡。因此推测TCP接触24h后导致了细胞膜的损伤(如果仅为机械受损,各浓度散点图中该象限细胞比例应该相近)。但是TCP接触48h后,凋亡和坏死细胞的比例大于膜受损细胞的比例(图4)。由此我们分析,细胞膜损伤是细胞在TCP作用下的早期受损状态,即TCP在导致细胞凋亡与坏死前,已导致Vero细胞膜的损伤。因此膜损伤是一种比凋亡和坏死更为灵敏的细胞毒性早期表征指标。结合细胞形态变化的研究,我们可以推测,变形细胞可能和细胞膜受损有关。细胞复壮实验也证实了这一点:高浓度TCP和阳性对照( $\text{ZnSO}_4$ )培养24h后的变形细胞经复壮后细胞形态可恢复正常,细胞可继续生长,而48h后的细胞不可复壮。这表明24h内变形细胞并未完全坏死或产生凋亡,变形可能是细胞膜内某种和刚性结构有关的组分发生变异或释放造成的。因此细胞变形可能是膜损伤的宏观表现之一。

以上的实验结果和分析表明Vero细胞在接触较低浓度的化学污染物或在接触污染物早期表现出的细胞毒性可能是细胞膜损伤导致的细胞形态变化,只有在接触时间较长或浓度较高时才表现为细胞凋亡与坏死。因此,和细胞变形有某种关联的细胞膜毒性可能是一种较细胞增殖、凋亡、坏死更为敏感的化学污染物综合生物毒性表征方法。

不过,由于目前对Vero细胞形态变化的检测还依赖于显微镜观察等感性指标,因此还存在一系列问题,如:1)细胞变形的差异难以用肉眼区别;2)变形细胞数难以准确界定和计数;3)细胞状态不好时观察结果很容易受到干扰。这些都导致目前难以建立污染物浓度-变形细胞率之间的定量函数关系,从而难以准确判断化学物的最低无效浓度。本实验结果可以初步推断TCP致Vero细胞变形可能和细胞膜完整性遭到破坏有关。基于此,如能在后继的研究中建立化学污染物导致Vero细胞变形率与膜完整性有关组分的定量表征关系,或者说通过某种特异性的细胞变形标志物的定量分析来表征细胞变形率,将从根本上解决可能和细胞变形有关的细胞膜毒性难以定量表征的缺陷。

致谢:感谢复旦大学遗传学院的任大明老师、沈素芹老师和朱向莹同学在实验过程中的帮助和支持。

通讯作者简介:王磊(1963—),男,教授,博士生导师,研究方向为环境毒理与生物安全、生物处理与生态修复。

## References

- Bryce S M, Bemis J C, Avlasevich S L, Dertinger S D. 2007. *In vitro* micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity [J]. *Mutation Research*, 630: 78-91
- BS. 2000. BS 6920-2.5:2000 Suitability of Non-Metallic Products for Use in Contact with Water Intended for Human Consumption with Regard to Their Effect on the Quality of the Water[S]
- Fan N Q, Peng L. 2005. Study of measurement on the cytotoxicity by MTT and XTT-PMS assay[J]. *China Pharmaceuticals*, 14: 28-29 (in Chinese)
- Fernández Freire P, Labrador V, Pérez Martín J M, Hazen M J. 2005. Cytotoxic effects in mammalian Vero cells exposed to pentachlorophenol[J]. *Toxicology*, 210: 37-44
- Foladori P, Laura B, Gianni A, Giuliano Z. 2007. Effects of sonication on bacteria viability in wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry—Fecal indicators, wastewater and activated sludge[J]. *Water Research*, 41: 235-243
- Gu T, Yang Y M, Zhu F M, Zhou J J, Zou X X. 2006. Study on organic pollutants of tap water and its genotoxicity in Kunming [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 16: 261-263 (in Chinese)
- House W A, Leach D, Long J L A, Cranwell P, Smith C, Bharwaj L, Meharg A, Ryland G, Orr D O, Wright J. 1997. Micro-organic compounds in the Humber rivers [J]. *Science of the Total Environment*, 194/195: 357-371

- Huang Z W, Sun J, Meng A Y. 2005. Study on comparison of two *in vitro* cytotoxicity tests [J]. Shanghai Journal of Biomedical Engineering, 26: 205-207 (in Chinese)
- Lin B C, Xi Z G, Zhang Y G, Zhang H S, Yang D F, Sun X, Zhang W, Liu H L. 2007. Toxic effects of micro-nano-scale SiO<sub>2</sub> on male rat spermatogenic cells assessed by flow cytometry [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2: 322-326 (in Chinese)
- Murata K, Okamoto M, Suzuki T. 2000. Morphological change of cell-membrane-integrated crystalline structure induced by cell shape change in *Euglena gracilis* [J]. Protoplasma, 214: 73-79
- Oikari A, Holmbom B, Ånäs E, Miilunpalo M, Kruzynski G, Castrén M. 1985. Ecotoxicological aspects of pulp and paper mill effluents discharged to an inland water system: Distribution in water, and toxicant residues and physiological effects in caged fish (*Salmo gairdneri*) [J]. Aquatic Toxicology, 6: 219-239
- SiTu Z Q, Wu J Z. 2007. Cell Culture [M]. Beijing: World Publishing Company (in Chinese)
- Sun X M, Tan W S, Zhang Y X, Hua P, Zhou Y J. 1999. Effect of the seeding density on the growth of Vero cells on microcarriers [J]. Journal of East China University of Science and Technology, 25: 367-370 (in Chinese)
- Wang B A, Li M, Mu Y M, Lü Z H, Li J Y. 2006. Effects of tributyltin chloride (TBT) and triphenyltin chloride (TPT) on rat testicular Leydig cells [J]. National Journal of Andrology, 12: 516-519 (in Chinese)
- Wang J C, Miao S, Huang H T. 2007. Flow cytometry and its application in cell apoptosis detection [J]. Journal of Qiqihar Medical College, 28: 970-971 (in Chinese)
- Witt K L, Livanos E, Kissling G E, Torous D K, Caspary W, Tice R R, Recio L. 2008. Comparison of flow cytometry and microscopy-based methods for measuring micronucleated reticulocyte frequencies in rodents treated with nongenotoxic and genotoxic chemicals [J]. Mutation Research, 649: 101-113
- Yu Y, Kong F X. 2006. Progress in applications of flow cytometry to ecotoxicological studies [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 12: 131-134 (in Chinese)
- Yu Y Y, Zhuang H S. 2006. Synthesis of artificial antigens of 2,4,6-trichlorophenol [J]. Chinese Journal of Synthetic Chemistry, 14: 47-49 (in Chinese)
- Zheng X Y, Zhang Z T, Fang Y. 2006. Biological evaluation of domestic carbon fiber-reinforced post materials [J]. Beijing Journal of Stomatology, 14: 189-191 (in Chinese)
- ### 中文参考文献
- 范能全, 彭兰. 2005. MTT 法和 XTT-PMS 法测定细胞毒性的探讨 [J]. 药物研究, 14: 28-29
- 顾涛, 杨叶梅, 朱凤鸣, 周俊杰, 邹学贤. 2006. 自来水痕量有机污染物检测及致突变性研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 16: 261-263
- 黄哲玮, 孙皎, 孟爱英. 2005. 两种体外细胞毒性检测方法的比较研究 [J]. 上海生物医学工程, 26: 205-207
- 林本成, 裘著革, 张英鸽, 张华山, 杨丹凤, 孙欣, 张伟, 刘焕亮. 2007. 应用流式细胞分析技术研究微纳尺度 SiO<sub>2</sub> 对雄性大鼠睾丸生精细胞的毒性作用 [J]. 生态毒理学报, 2: 322-326
- 司徒镇强, 吴军正. 2007. 细胞培养 [M]. 北京: 世界图书出版社
- 孙祥明, 谭文松, 张元兴, 华平, 周亚竞. 1999. 接种密度对 Vero 细胞在微载体表面生长的影响 [J]. 华东理工大学学报, 25: 367-370
- 汪保安, 李明, 母义明, 吕朝晖, 李江源. 2006. 环境污染物质三丁基氯化锡和氯化三苯锡对大鼠睾丸 Leydig 细胞的影响 [J]. 中华男科学杂志, 12: 516-519
- 王敬春, 苗术, 黄海涛. 2007. 流式细胞仪在细胞凋亡检测中的应用 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 28: 970-971
- 于洋, 孔繁翔. 2006. 流式细胞技术应用于生态毒理学的研究方法及其进展 [J]. 应用与环境生物学报, 12: 131-134
- 余宇燕, 庄惠生. 2006. 环境荷尔蒙类物质 2,4,6-三氯酚人工抗原的合成 [J]. 合成化学, 14: 47-49
- 郑晓雁, 张振庭, 方玉. 2006. MTT 法评价国产碳纤维桩材料的细胞毒性 [J]. 北京口腔医学, 14: 189-191 ◆