

低浓度五氯酚对鲫鱼血液细胞毒性的体外研究*

张 民 顾宇飞 顾 颖 王 斌 尹大强**

(南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京, 210093)

摘 要 通过细胞体外毒性试验, 研究了低浓度五氯酚对鲫鱼血液淋巴细胞和红细胞的毒性影响. 结果表明: 在 $2.50\text{--}1000.00\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内, 五氯酚对鲫鱼淋巴细胞的活性没有显著效应, 但在 500.00 和 $1000.00\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (高浓度组) 时, 对淋巴细胞膜的完整性产生显著影响, 造成乳酸脱氢酶 (LDH) 相对释放量增加, 并随五氯酚浓度的增加和暴露时间的延长而增加. 低浓度五氯酚组 ($5.00\text{--}1000.00\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 对红细胞溶血没有显著影响, 但与二苯并 [a,h] 蒽联合作用产生协同效应, 红细胞溶血效应明显高于两种化合物单独作用, 并且随浓度的增加, 血色素相对释放量显著增加. 另外, 鲫鱼淋巴细胞膜的完整性 (LDH 的释放) 比淋巴细胞活性和红细胞溶血对低浓度五氯酚更敏感.

关键词 五氯酚, 细胞膜完整性, 淋巴细胞活性, 红细胞溶血, 鲫鱼.

五氯酚具有明显的生物毒性, 特别是对鱼类和贝类等水生生物的毒性较大, 尽管残留在水环境中的五氯酚浓度较低, 不会造成水生生物急性毒性, 然而五氯酚性质较稳定, 易在环境中富集, 可以通过多种途径在动植物体内积累, 具有极大的潜在危害^[1]. 化合物进入高等动物体后, 通过血液参与机体循环输送到靶器官, 可与血液中细胞、功能蛋白等发生作用, 因此, 血液成分的变化是检测化合物生物毒性的早期指标之一, 已被广泛使用.

本试验采用鲫鱼为研究对象, 建立细胞毒性体外试验, 测定了低浓度五氯酚 (PCP) 对鲫鱼血液中淋巴细胞活性、淋巴细胞膜完整性和红细胞溶血的影响, 旨在阐明低浓度五氯酚对鲫鱼血液细胞毒性, 探索这些细胞毒性指标的敏感性, 为我国五氯酚的水生生态风险评价提供科学数据和方法.

1 材料与方法

1.1 试验材料

五氯酚 (Superco 公司) 纯度 $> 98\%$, 二苯并 [a,h] 蒽 (Aldrich 公司), 纯度 $> 99\%$, LDH 试剂 (南京建成生物工程研究所).

RPMI 1640 培养基 (GIBCOBRL 公司) 将 RPMI 1640 干粉溶于 100 mL 蒸馏水中, 摇匀, 使之溶解. 用 CO_2 调节 pH 至 $6.0\text{--}6.3$ 左右 (烧杯中溶液颜色由红转为橙黄). 过滤灭菌, 装于已灭菌的 250 mL 三角瓶里. 向三角瓶中加入 1% 青、链霉素 (溶液中青、链霉素浓度为 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), 4°C 保存. 使用时, 加新生牛血清 (杭州四季青生物工程材料研究所) 使血清浓度约为 15% , 再用 $5\% \text{ NaHCO}_3$ 调 pH 至 $7.2\text{--}7.4$ 用于实验. 所有操作在无菌条件下进行.

Hanks 盐溶液 将 80 g NaCl , 0.98 g MgSO_4 (无水), 4 g KCl , $1.2\text{ g Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $0.6\text{ g KH}_2\text{PO}_4$, 10 g 葡萄糖 (无水) 和 1.4 g CaCl_2 按顺序溶于 1000 mL 蒸馏水中, 并加入 4 mL 碘仿, 4°C 保存, 作为 Hanks 盐溶液母液. 取 100 mL 母液用 900 mL 蒸馏水稀释, 加入 1% 酚红, 高压灭菌 15 min , 然后用 $5\% \text{ NaHCO}_3$ 调 pH 至 $7.0\text{--}7.2$ 用于实验.

植物血凝素溶液 (PHA, 上海伊华医学科技有限公司) 每安瓿瓶加 2 mL 无菌水溶解, 4°C 保存.

淋巴细胞分离液 (上海华精生物高科技有限公司) 用于从血液中分离淋巴细胞.

$0.4\% \text{ Trypan Blue}$ 染液 将 0.4 g Trypan Blue , $0.06\text{ g KH}_2\text{PO}_4$, 0.81 g NaCl , 0.05 g 甲基对羟苯甲酸盐和 95 mL 蒸馏水, 置于 250 mL 三角瓶中煮沸, 冷却后用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaOH}$ 调 pH 至 $7.2\text{--}7.3$, 加蒸馏水定容至 100 mL , 过滤灭菌备用.

2004 年 5 月 8 日收稿.

* 国家自然科学基金资助项目 (20237010 20377022) 和江苏省六大人才高峰资助项目 (2002/A). ** 通讯联系人.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

PBS溶液 将 8 g NaCl 0.2 g KCl 2.89 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 0.20 g NaH_2PO_4 溶于 1000 ml 蒸馏水中，高温灭菌 15 min。

MTT 溶液 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]，AMRESCO 公司) 纯度 > 98%。将 MTT 溶解于 PBS 溶液，配成浓度为 $5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，过滤灭菌后备用。

DMSO 溶解液 二甲亚砜 (A.P.) 与 95% 乙醇按体积 1:1 配制而成。

鲫鱼 () 南京市淡水水产研究所养殖基地，雌性，平均体重 $210.0 \pm 23.5\text{ g}$ 平均体长 $21.5 \pm 4.4\text{ cm}$ 实验室驯养一周后用于实验，驯养采用除氯自来水，平均水温为 $15 \pm 2^\circ\text{C}$ ，光暗比为 12:12 h。

1.2 试验方法

1.2.1 淋巴细胞分离与纯化

鲫鱼血液淋巴细胞分离按 Andrew 的方法进行^[2]。用加有肝素的注射器从鱼尾部静脉抽取血液，通过离心分离并洗涤，制成细胞悬液，用培养基调节细胞浓度至 $2 \times 10^6 \text{个} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，用于淋巴细胞活性试验和淋巴细胞细胞膜完整性试验。

1.2.2 红细胞的分离与纯化

鲫鱼红细胞的分离与纯化按照 Pamham 等的方法进行^[3]，将从鱼尾静脉抽取的血液加入已灭菌的离心管，离心分离并洗涤，用吸管将其打匀成细胞悬液，用于红细胞毒性试验，24 h 内使用。

1.2.3 淋巴细胞活性试验

淋巴细胞活性用 MTT 法测定^[4]。试验结果采用应激指数 (S.I) 表示鲫鱼淋巴细胞的活性效应。

应激指数 (S.I) = 含有应激物 (PHA) 的 OD 值 / 不含应激物 (PHA) 的 OD 值

1.2.4 淋巴细胞膜完整性试验

根据 Dagmar Fischer 等人的方法^[5]测定淋巴细胞乳酸脱氢酶释放量，表示细胞膜完整性。试验结果用 LDH 相对释放量 (L) 表示，L 值小于 10% 认为无 LDH 释放效应，细胞膜完整性无损伤。

LDH 相对释放量 (L) = (各浓度组 LDH 活力 / 空白组 LDH 活力) $\times 100\%$

1.2.5 红细胞毒性试验

红细胞毒性采用测定红细胞溶血 (血色素释放) 进行^[5]。试验结果用血色素相对释放量 (H) 表示，H 值小于 10% 认为无血色素释放效应，无红细胞溶血。

血色素相对释放量 (H) = (各浓度组 OD₅₄₀值 / 参照组 OD₅₄₀值) $\times 100\%$

1.2.6 数据处理

实验数据采用 EXCEL 软件处理，对样本之间进行 t 检验，各剂量组与空白对照组比较，当 $P < 0.05$ 时，认为有显著性差异，当 $P > 0.05$ 时认为没有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 五氯酚对鲫鱼淋巴细胞活性的影响

低浓度五氯酚对鲫鱼淋巴细胞活性的影响见图 1，统计分析结果显示：与对照组相比，在 $2.50 - 1000.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内，各浓度组对淋巴细胞活性的影响均无显著效应，S.I 值无显著变化。

2.2 五氯酚对鲫鱼淋巴细胞乳酸脱氢酶释放的影响

低浓度五氯酚对鲫鱼淋巴细胞乳酸脱氢酶释放的影响见表 1。统计分析结果显示：在 30 min 和 90 min 两个不同暴露时间下，淋巴细胞 LDH 的相对释放量都表现出随浓度增加而增加的趋势，而且在高浓度组 ($500.00 - 1000.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)，LDH 的相对释放量显著增加 ($P < 0.05$)，L 值都大于 10%，同时，随着暴露时间的延长，高浓度组 LDH 的相对释放量也明显增加，而低浓度组 ($5.00 - 125.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 L 值均小于 10%，没有显著效应。

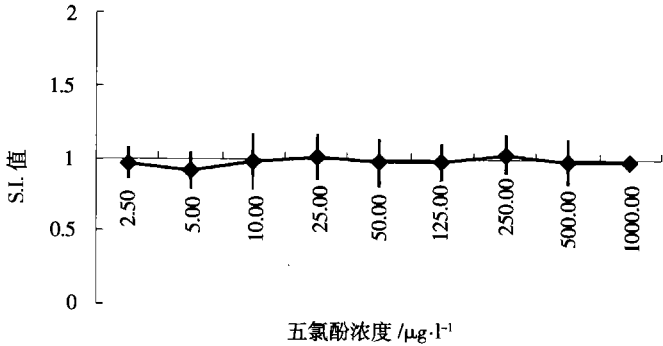


图 1 低浓度五氯酚对鲫鱼淋巴细胞活性的影响

Fig 1 Effects of low concentration PCP on lymphocyte activity of crucian carp

表 1 不同暴露染毒时间下不同浓度五氯酚对鲫鱼淋巴细胞乳酸脱氢酶相对释放量 (L) 的影响 (= 4)

Table 1 Effects of different concentrations PCP on the relative release of lactate dehydrogenase (LDH) of crucian carp lymphocytes in different exposure time (= 4).

浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	5.00	10.00	25.00	50.00	125.00	500.00	1000.00
30 min	4.54 $\pm$ 3.36	4.44 $\pm$ 1.88	7.67 $\pm$ 2.17	7.77 $\pm$ 2.57	9.38 $\pm$ 2.89	11.60 $\pm$ 1.34 [*]	14.63 $\pm$ 2.40 [*]
90 min	6.61 $\pm$ 3.25	6.16 $\pm$ 5.05	5.65 $\pm$ 1.99	7.87 $\pm$ 2.20	9.38 $\pm$ 2.38	12.61 $\pm$ 2.31 [*]	19.78 $\pm$ 2.47 [*]

注: 数据以 Mean $\pm$ SD表示, * 显著效应.

2.3 五氯酚对鲫鱼红细胞溶血的影响

低浓度五氯酚对鲫鱼红细胞溶血的影响见表 2. 统计分析结果显示: 低浓度五氯酚对鲫鱼红细胞溶血没有显著效应, 各浓度组的 H 值均小于 10%. 低浓度二苯并[a h]蒽在 5.00—125.00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内, 对鲫鱼红细胞溶血也没有显著效应, 但高浓度组 (500.00, 1000.00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 导致红细胞溶血效应显著 ($P < 0.05$), H 值均大于 10%, 而且随浓度增加, H 值显著增加. 五氯酚与二苯并[a h]蒽 1:1 的混合物除 5.00 和 10.00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组外, 其余浓度组对红细胞溶血均产生显著效应, H 值均大于 10%, 而且随浓度增加, H 值显著增加.

表 2 不同化合物对鲫鱼红细胞色素相对释放量的影响 (= 4)

Table 2 Effects of different chemicals on erythrocytes hemolysis of crucian carp

浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	5.00	10.00	25.00	125.00	500.00	1000.00
PCP	7.49 $\pm$ 1.09	1.48 $\pm$ 0.56	0.32 $\pm$ 1.15	0.88 $\pm$ 1.42	4.58 $\pm$ 1.39	9.47 $\pm$ 0.74
二苯并[a h]蒽	1.18 $\pm$ 0.18	5.26 $\pm$ 0.13	9.95 $\pm$ 0.21	9.45 $\pm$ 0.59	16.80 $\pm$ 0.25 [*]	39.36 $\pm$ 0.24 [*]
联合作用	5.94 $\pm$ 0.05	8.47 $\pm$ 0.29	10.48 $\pm$ 0.07 [*]	10.28 $\pm$ 0.19 [*]	18.16 $\pm$ 0.76 [*]	41.16 $\pm$ 0.80 [*]

注: 数据以 Mean $\pm$ SD表示, * 显著效应.

2.4 讨论

综上所述, 低浓度五氯酚 (2.50—1000.00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 对鲫鱼淋巴细胞活性和红细胞溶血都没有显著影响, 但 500.00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1000.00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组对淋巴细胞细胞膜完整性有显著影响, 表现为 LDH 相对释放量显著升高. Repetto 等利用虹鳟鱼 () RTG-2 细胞体外的研究表明, 低浓度 PCP 对 RTG-2 细胞活性没有显著影响, 高浓度 PCP (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 引起 LDH 释放量显著增加^[6], 与本研究结果基本相似. 他们认为, 一些化合物造成细胞膜损伤的主要途径是改变细胞膜的通透性, 可以推测五氯酚引起细胞膜完整性损伤的机制之一是改变细胞膜的通透性, 造成乳酸脱氢酶释放. 然而, 亲脂性的五氯酚是通过镶嵌在细胞膜的脂层改变了细胞膜的通透性, 还是通过改变了细胞膜膜离子通道的通透性, 需要进一步实验证据证实. 从本研究还可以看出, 同一化合物对不同细胞膜损伤不一, 低浓度五氯酚对红细胞膜没有显著的影响, 表现为没有产生血红素显著释放, 发生红细胞溶血现象. 可能是由于细胞膜的组成不同所致, 红细胞具有完整的膜骨架网络, 膜骨架网络通过锚蛋白和带 4.1 蛋白同细胞膜紧密相连, 保证了红细胞膜很好的弹性和较高的强度.

五氯酚不仅可以单独产生生物毒害作用，而且与其它化合物具有协同作用，产生对生物产生更大的毒害。Zhu等人发现PCP和双邻二氮杂菲铜[*bis*-(1, 10-phenanthroline) cupric Cu() (OP)₂]复合物对微生物的急性毒性具有协同效应^[7]，Till Luckenbach等人利用虹鳟鱼研究发现PCP和PAHs联合作用对热休克蛋白hsp 70(heat shock protein hsp)也具有协同作用^[8]。本研究中低浓度五氯酚不产生红细胞溶血效应，其毒害作用远小于二苯并[a,h]蒽，但与二苯并[a,h]蒽混合后产生协同作用，使红细胞血色素释放显著增加。这种协同作用表明，五氯酚在真实环境中具有更大的生物危害。但其协同作用机理尚不明确，有待进一步研究。

目前，运用血液细胞检测化合物细胞毒性的方法很多，细胞膜损伤LDH释放被认为是一种快速灵敏的检测细胞毒性的方法。Cho等人指出LDH释放是检测细胞膜损伤的重要标志物^[9]，A Soltan M enem等人指出细胞膜损伤可以作为高速中子辐射污染的生物标志物^[10]。本文中500.00和1000.00 μg· l⁻¹浓度组五氯酚引起LDH释放量的显著升高，而对淋巴细胞活性和红细胞溶血没有显著效应，说明细胞膜损伤LDH释放这一指标对低浓度五氯酚有较高的敏感性，建议将鱼淋巴细胞LDH酶释放作为监测和评价低浓度五氯酚对水生生态系统危害的生物标志物。

3 结论

- (1) 在2.50—1000.00 μg· l⁻¹的浓度范围内，五氯酚不影响淋巴细胞的活性，但高浓度组(500.00 μg· l⁻¹和1000.00 μg· l⁻¹)可造成细胞膜的损伤，引起LDH释放，具有细胞毒性。
- (2) 在试验浓度范围内，五氯酚对红细胞溶血没有显著效应，但与二苯并[a,h]蒽会产生协同效应，增加对红细胞的毒性。
- (3) 细胞膜完整性(LDH释放)对低浓度五氯酚反应敏感，建议作为生物标志物来监测和评价五氯酚对水生生态系统的危害。

参 考 文 献

[1] International Programme on Chemical Safety/World Health Organization (ed): Pentachlorophenol Environmental Health Criteria 71, Geneva, 1987

[2] Andrew F R. Collection, Separation and Identification of Fish Leucocytes. In: Stolen S J et al., Techniques in Fish Immunology. USA: SOS Publication, 1990 113—135

[3] Panham M, J W et zlg H. Toxicity Screening of Liposomes. 1993, 64: 263—274

[4] 李延, 胡双庆, 尹大强等. 11种取代酚类内分泌干扰活性的初步筛选与评价, 环境化学, 2003, 22 (4): 385—389

[5] Dagmar Fischer, LiY ouxin, Barbara Ahlmeier et al., In Vitro Cytotoxicity Testing of Polycations Influence of Polymer Structure on Cell Viability and Hemolysis, 2003, 24 1121—1133

[6] Repetto G, Jos A, Hazen M J et al., A Test Battery for the Ecotoxicological Evaluation of Pentachlorophenol, 2001, 15 503—509

[7] Zhu Berr zhan, Mordechai Chevion. Mechanism of the Synergistic Cytotoxicity between Pentachlorophenol and Copper(1, 10-phenanthroline) Complex: the Formation of a Lipophilic Ternary Complex, 2000, 129 249—261

[8] Till Luckenbach, Hemann Ferling, Make Gemhoefer et al., Developmental and Subcellular Effects of Chronic Exposure to Sub-lethal Concentrations of Ammonia, PAH and PCP Mixtures in Brown Trout (Salmo trutta L.) Early Life Stages, 2003, 65 39—54

[9] Cho Yoursook, Kim Mee-jeong, Lee Jooryoung et al., The Role of Thiols in Protecting Against Simultaneous Toxicity of Menadione to Platelet Plasma and Intracellular Membranes, 1997, 280 (3): 1335—1340

[10] A Soltan Monem, Fadel M Ali, Noura J J Athani et al., Membrane Solubilization in Erythrocytes as a Measure of Radiation Exposure to Fast Neutrons, 1999, 44: 347—355

**CYTOTOXICITY TESTING OF PENTACHLOROPHENOL
IN LOWER CONCENTRATION TO BLOOD CELLS OF *CYPRINUS
CARPIUS* IN VITRO**

$$\frac{\partial}{\partial t} \left(\frac{1}{\rho} \right) + \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{1}{\rho} u \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(\frac{1}{\rho} v \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(\frac{1}{\rho} w \right) = 0$$

(State Key laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093)

ABSTRACT

The effects of pentachlorophenol (PCP) on lymphocyte activity, lymphocyte membrane integrity and erythrocytes hemolysis were examined using the MTT assay, the release of the lactate dehydrogenase (LDH) and the hemoglobin release respectively in *in vitro*. The results showed that lymphocyte activity had no remarkable response to PCP in all test concentrations (2.50–1000.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). But the membrane damage was found in 500.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and 1000.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ groups, and the significant release of LDH was observed. The release of LDH increased with exposure time prolonging and exposure concentration increasing. The results also showed that PCP didn't change the release of hemoglobin from erythrocytes. But the release of hemoglobin was affected significantly by synergistic effects of PCP and Dibenzo[a,h]anthracene and the release of hemoglobin increased with the concentration of the mixture of PCP and Dibenzo[a,h]anthracene increasing. It is a conclusion in the present study that there is obvious cytotoxicity of PCP in lower concentration to blood cells of *in vitro*. The damage of lymphocyte membrane is more sensitive than lymphocyte activity and erythrocytes hemolysis to lower concentration of PCP. It is suggested that the release of LDH as a biomarker could be used to monitor and evaluate the contamination of PCP in aquatic ecosystem.

Keywords pentachlorophenol membrane integrity lymphocyte activity erythrocyte hemolysis