DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2017.07.2016102803
秦洪伟,闫彬,尤国红,等.电化学检测氯酚类污染物对 MCF-7 细胞的毒性[J].环境化学,2017,36(7):1433-1439.
QIN Hongwei, YAN Bin, YOU Guohong, et al. Electrochemical assessment of cytotoxicity of chlorophenols on MCF-7 cell[J]. Environmental Chemistry,2017,36(7):1433-1439.

电化学检测氯酚类污染物对 MCF-7 细胞的毒性*

秦洪伟[1**]　闫　彬[1]　尤国红[2]　武冬梅[3]　丛　俏[1]　袁　星[4]

(1. 渤海大学化学化工学院, 锦州, 121013;　2. 渤海大学工学院, 锦州, 121013;
3. 佳木斯大学药学院, 佳木斯, 154007;　4. 东北师范大学环境学院, 长春, 130117)

摘　要　本文以石墨烯修饰电极(Gr-GCE)为工作电极,以人乳腺癌 MCF-7 细胞为模型细胞,运用线性扫描伏安法研究了 MCF-7 细胞的裂解液电化学行为,确定其响应来源为黄嘌呤和鸟嘌呤的电化学氧化. 跟踪描述了细胞生长曲线,研究了五氯酚(PCP)、2,4,6-三氯酚(TCP)和 2,4-二氯酚(DCP)对 MCF-7 细胞的毒性,计算得到半数抑制效应浓度(IC_{50})值分别为 77.62 、174.08、449.78 $\mu mol \cdot L^{-1}$,并与四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法进行比较,结果表明氯酚类污染物对 MCF-7 细胞活性有明显抑制作用,两种方法测得细胞毒性顺序均为:PCP > TCP > DCP,且细胞电化学法更为灵敏.

关键词　石墨烯, 氯酚, 细胞毒性, 电化学检测.

Electrochemical assessment of cytotoxicity of chlorophenols on MCF-7 cell

QIN Hongwei[1**]　*YAN Bin*[1]　*YOU Guohong*[2]　*WU Dongmei*[3]　*CONG Qiao*[1]　*YUAN Xing*[4]

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Bohai University, Jinzhou, 121013, China;
2. College of Engineering, Bohai University, Jinzhou, 121013, China;　3. College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi, 154007, China;　4. School of Environment, Northeast Normal University, Changchun, 130117, China)

Abstract: In this paper, electrochemical response of lysed human cervical carcinoma (MCF-7) cells on graphene modified electrode was studied, using linear sweep voltammetry. The current was confinmed to result from the oxidation of guanine and xanthine in the cytoplasm of MCF-7 cells. Then the growth of MCF-7 cells was followed by the electrochemical response. The cytotoxicity of pentachlorophenol (PCP), 2,4,6-trichlorophenol (TCP) and 2,4-dichlorophenol (DCP) on MCF-7 cells were assessed, and the 50% inhibitory concentration were calculated, which were 77.62 $\mu mol \cdot L^{-1}$, 174.08 $\mu mol \cdot L^{-1}$ and 449.78 $\mu mol \cdot L^{-1}$, respectively. Furthermore, the results were compared with those obtained from the methyl tetrazolium (MTT) assay. The results implied that the chlorophenols significantly inhibited the viability of MCF-7 cell. The order of toxicity obtained from the electrochemical detection method and the MTT assay were both PCP > TCP > DCP, and the cell electrochemical detection method was more sensitive.

Keywords: graphene, chlorophenols, cytotoxicity, electrochemical detection.

氯酚类化合物(Chlorophenols, CPs)主要作为防腐剂或消毒剂在木材、蔬菜、皮革、涂料等行业使用,

2016 年 10 月 28 日收稿(Received: October 28, 2016)
* 国家自然科学基金(41602351, 61401043, 51309013) 和辽宁省博士科研启动基金(201601344) 资助.
Supported by the National Natural Science Foundation of China (41602351, 61401043, 51309013) and the Doctoral Scientific Research Starting Foundation of Liaoning Province, China (201601344).
* * **通讯联系人**, Tel: 0416-3400302, E-mail: qinhongwei@bhu.edu.cn
Corresponding author, Tel: 0416-3400302, E-mail: qinhongwei@bhu.edu.cn

hjhx.rcees.ac.cn

或以原材料形式在农药、杀菌剂、制药业等使用,此外它也是多数工业合成领域的中间产物. 在废物焚烧、纸浆漂白、饮用水氯化消毒过程中也可能有氯酚及其衍生物产生[1-3]. 对我国河流和沉积物等水体环境的采样监测结果表明五氯酚(PCP)、2,4-二氯酚(DCP)和 2,4,6-三氯酚(TCP)的检出率较高[4-5]. 进入水环境的氯酚类化合物能稳定且长期存在,随后通过食物链富集于水生生物,最后进入人体. 几乎所有 CPs 都具有杀菌活性、植物毒性及累积性,许多 CPs“三致”效应明显,特别对水生生物的生长、繁殖等影响较大,大量使用 CPs 已严重威胁人类健康与安全[6-7]. PCP 可在水生生物肝、肾等器官内大量富集,严重损害肝、肾及中枢神经系统,引起肿瘤和白血病[8-9]. 目前,PCP、TCP 和 DCP 等已被美国环保局列为优先控制污染物. 我国的“生活饮用水卫生标准”(GB5749—2006)也将 PCP、TCP 和 DCP 列为常规水质监测项目[10]. 因此开展氯酚类污染物的毒性研究具有重要意义.

利用体外培养细胞系对环境污染物进行毒性检测,已成为污染物监测和安全性评价领域较常用的方法之一. 以往研究中通常以细胞增殖活力、细胞存亡等为指标使用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法、流式细胞仪法、乳酸脱氢酶漏出法、染色计数法、硫化罗丹明法、中性红染色法来检测细胞活性. 这些方法以活细胞与受损细胞甚至死亡细胞对染料的亲和力不同、细胞中生物大分子与染料结合引起颜色变化以及细胞中酶活性为基础,无法检测细胞代谢产物,且均不可避免具有费用高、操作复杂、费时、需使用有毒试剂等缺点[11-12]. 电化学法检测细胞活性是近 10 年来兴起的新的研究领域,凭借其操作简单、检测快速、灵敏度高、无毒性、费用低等特点已成为细胞分析的一个重要检测手段[13-15].

本文以人乳腺癌(MCF-7)细胞为模型,采用所制备的石墨烯修饰电极,应用细胞电化学检测方法研究了 PCP、TCP 和 DCP 对 MCF-7 细胞的毒性,并与常规的 MTT 法进行比较,验证细胞电化学法对环境污染物细胞毒性检测的可行性. 该研究结果将为氯酚类污染物细胞毒性评价提供新的技术手段.

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

LK2005 恒电位仪,天津市兰力科化学电子高技术有限公司;玻碳电极,武汉高仕睿联科技有限公司; HH.CP-T 型二氧化碳培养箱,上海一恒科学仪器有限公司; HH.W21.420 型恒温水浴箱,武汉精华科教仪器公司.

MCF-7 细胞,东北林业大学生命科学学院赠送;链霉素、青霉素、DMEM 培养基(粉末)、优级胎牛血清和 MTT,Gibco 公司; PCP、TCP、DCP,北京化工厂;氧化石墨烯(GO),大连理工大学环境学院赠送.

无水乙醇、氯化钾、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、铁氰化钾、盐酸、氢氧化钠、和三氧化二铝粉(0.05 μm、0.3 μm 和 1.0 μm)为分析纯,磷酸为色谱纯. 所用水均为二次或三次蒸馏水.

1.2 细胞培养与收集

MCF-7 细胞常规培养于 DMEM 培养液中,置于二氧化碳培养箱中在 37 ℃ 恒温、5% CO_2、100% 饱和湿度条件下培养.

取生长状态良好的细胞依次 0.25% 胰蛋白酶消化、吹打悬浮和计数后,按一定浓度接种于装有新鲜 DMEM 培养基的培养皿中,置于 37 ℃ 恒温、5% CO_2、100% 饱和湿度条件的二氧化碳培养箱中,一定时间后,弃掉培养皿中的培养基,并用 pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗 3 次,接着再加入一定体积的 pH 7.4 PBS,置于 50 ℃ 恒温水浴箱中加热裂解 30 min,获得细胞裂解液.

1.3 石墨烯修饰电极的制备

将适量的 GO 粉末超声分散于双蒸水中,得 GO 混悬液. 用微量移液器吸取一定体积 GO 混悬液,垂直滴涂到抛光后的玻碳电极(GCE)表面,红外灯烤干后恢复至室温. 然后在酸性 PBS 溶液中恒电位还原 GO 修饰的玻碳电极,即得石墨烯修饰玻碳电极(Gr-GCE). Gr-GCE 使用前置于 pH 7.4 的 PBS 中多次循环伏安法(0.0—0.8 V)扫描直至背景信号稳定.

1.4 电化学检测

电化学检测以 Gr-GCE 为工作电极,Ag/AgCl 为参比电极,铂丝电极为对电极. 线性扫描伏安法(LSV)扫描范围为 0.0—0.8 V,扫描速率为 50 $mV \cdot s^{-1}$,温度 25 ℃. 同一样品扫描两次,采集第一次数据.

hjhx.rcees.ac.cn

每个实验做 3 个平行样. 按照下面公示计算细胞毒性:

$$细胞毒性=[(I_{P对照}-I_{P染毒})/I_{P对照}]\times 100\%$$

式中,$I_{P对照}$是对照组细胞裂解液的峰电流值,$I_{P染毒}$是染毒组细胞裂解液的峰电流值.

1.5　MTT 试验

用 0.25% 胰蛋白酶将培养好的细胞消化至间隙清晰,吹打悬浮后用培养液调节细胞浓度为 1.0×10^4 cells·mL^{-1},用微量移液器吸取细胞悬液各 200 μL 接种于 96 孔板内,培养过夜后分为对照组和加药染毒组,并加药. 继续培养 24 h 后,每孔加入 20 μL MTT 溶液,继续培养 4 h,吸除培养上清液,每孔加入 150 μL DMSO 并充分振荡溶解蓝紫色沉淀. 30 min 内测定每孔的吸光度值(A),测定波长为 490 nm. 并按照下述公示计算细胞毒性:

$$细胞毒性=[(A_{对照}-A_{染毒})/A_{对照}]\times 100\%$$

式中,$A_{对照}$是对照孔的吸光度值,$A_{染毒}$是染毒孔的吸光度值.

2　结果与讨论(Results and discussion)

2.1　细胞裂解液的电化学行为检测

以裸电极或 Gr-GCE 为工作电极对 MCF-7 细胞裂解液进行线性扫描伏安检测,结果如图 1. Gr-GCE 的背景电流和裸电极相比明显增加,因为石墨烯修饰使电极反应的有效表面积增大;裸电极在 MCF-7 细胞裂解液中以及 Gr-GCE 在 PBS 中均未检测到电化学响应;Gr-GCE 在 MCF-7 细胞裂解液中于 +0.686 V检测到相当明显的氧化峰,峰电流值为 13.16 μA,这表明石墨烯对 MCF-7 细胞裂解液中的电活性物质具有良好的电催化氧化作用. 同时发现 Gr-GCE 在 MCF-7 细胞裂解液中线性扫描第一次氧化峰信号非常明显,第二次线性扫描电化学响应显著减小甚至消失. 主要是由于第一次线性扫描时产生的氧化物质附着于电极表面阻碍了电流的传递. 同时与常用的 MWNTs/GCE 检测结果进行了比较,发现石墨烯修饰将检测系统的灵敏度提高了近 50%,这主要归因于石墨烯材料具有独特的平面结构,拥有巨大的比表面积和优越的电子迁移率和流动性[16].

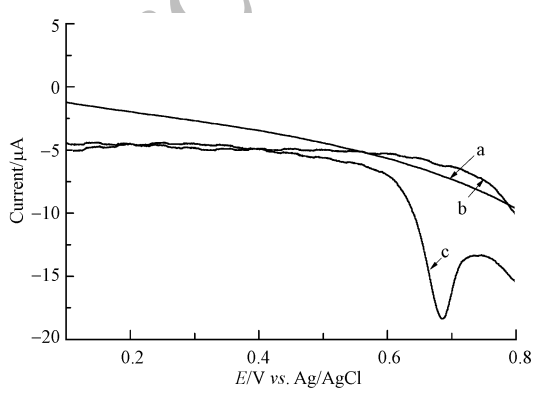

图 1　线性扫描伏安图

(a) 细胞裂解液在裸电极上的电化学行为,(b) PBS(pH=7.4)在石墨烯修饰电极上的电化学行为,
(c) 细胞裂解液在石墨烯修饰电极上的电化学行为. 细胞浓度:3.3×10^6 cells·mL^{-1}

Fig.1　Linear sweep voltammograms (LSVs) of bare GC electrode in the lysed MCF-7 cell suspension (a), the Gr-GC electrode in pH 7.4 PBS (b), the Gr-GC electrode in the lysed MCF-7 cell suspension(c). Cell concentration, 3.3×10^6 cells·mL^{-1}

2.2　细胞裂解液与嘌呤标准品伏安行为比较

已有研究表明,细胞中电化学响应来源为细胞质中鸟嘌呤和黄嘌呤的氧化反应[17-18]. 为了确定 MCF-7 细胞裂解液的线性扫描伏安响应来源,本研究将鸟嘌呤、黄嘌呤以及它们混合溶液的伏安行为与细胞裂解液的伏安行为进行了比较,结果见图 2. 黄嘌呤、鸟嘌呤及两者的混合溶液分别在+0.696 V、+0.689 V和+0.697 V 处出现了明显的氧化峰,与 MCF-7 细胞裂解液氧化峰电位+ 0.686 V 基本一致. 说

明 MCF-7 细胞裂解液的电化学响应信号同样来源于细胞质中的鸟嘌呤和黄嘌呤的氧化反应. 但 MCF-7 细胞裂解液的氧化峰电位与嘌呤标准品相比更趋向于正电位方向. 可能是由于细胞裂解引起细胞膜破裂,细胞内含物被释放进入到细胞裂解液中,引起细胞裂解液 pH 值的轻微变化,从而使 MCF-7 细胞裂解液与嘌呤标准品间的电化学响应峰电位间出现微小差异[19].

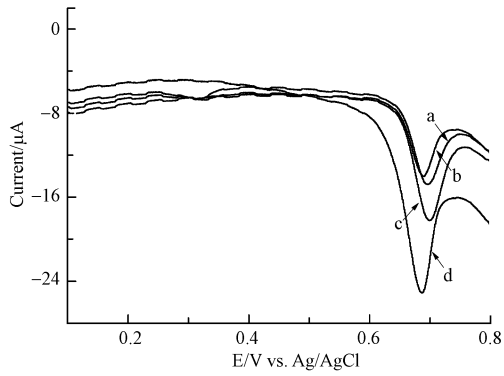

图 2 细胞裂解液与嘌呤标准品的线性扫描伏安图

(a)1.3 μg·mL^{-1}黄嘌呤,(b) 1.5 μg·mL^{-1}鸟嘌呤,(c)黄嘌呤和鸟嘌呤混合液,(d) MCF-7 细胞裂解液. 细胞浓度:4.5×10^6 cells·mL^{-1}

Fig.2 LSVs of 1.3 μg·mL^{-1} xanthine (a),1.5 μg·mL^{-1} guanine (b),the mixture of xanthine and guanine(c), and the lysed MCF-7 cell suspension (d). Cell concentration,4.5×10^6 cells·mL^{-1}

2.3 细胞生长曲线

取生长状况良好的 MCF-7 细胞接种于培养皿中,浓度控制为 6.3×10^5 cells·mL^{-1},培养 6 h 细胞贴壁后,置换入新鲜培养基继续培养并计时,从 0 h 开始每 6 h 取样进行电化学检测,平行进行细胞计数. 以 MCF-7 细胞裂解液电化学检测峰电流为准绘制的细胞生长曲线见图 3. 随着培养时间增长,细胞裂解液氧化峰电流值不断增大,30 h 时达到最大,这归因于细胞在养分充足的条件下不断生长增殖,数目增多,细胞内电活性物质含量也随之增大. 继续培养,氧化峰电流逐渐下降,因为培养基内养分的缺失而导致细胞代谢活力下降甚至凋亡. 检测结果与细胞计数法所获得的细胞生长曲线基本一致. 说明细胞电化学法能够在细胞培养过程中跟踪细胞的生长状态,进而描述细胞生长曲线.

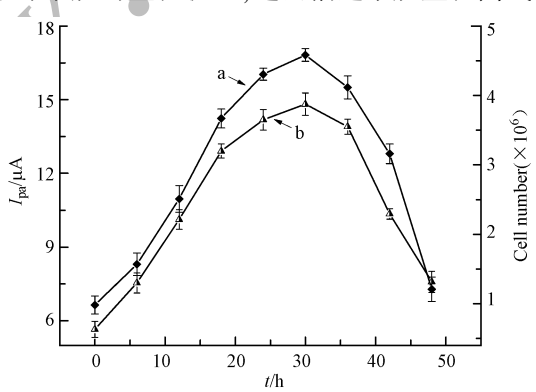

图 3 MCF-7 细胞生长曲线图

(a) 电化学法,(b) 细胞计数法,细胞接种浓度:6.3×10^5 cells·mL^{-1}

Fig.3 MCF-7 cell growth curve obtained by the electrochemical method (a) and the cell counting method (b). Cell inoculation concentration,6.3×10^5 cells·mL^{-1}

2.4 氯酚类细胞毒性的电化学检测

研究了氯酚类污染物染毒作用时间对 MCF-7 细胞裂解液的电化学响应的影响(图 4). 结果发现,3 种氯酚类污染物(PCP:70 μmol·L^{-1},TCP:100 μmol·L^{-1},DCP:400 μmol·L^{-1})染毒处理后,随着培养时间的增长,细胞周围养分充足,不断进行分裂增殖,对照组和染毒组细胞裂解液的电化学响应信号不断

增大,30 h 时达到最大,随后开始下降,原因在于细胞培养液中养分的不断消耗殆尽,导致细胞生长变慢甚至死亡. 综合考虑,选择 30 h 为最佳电化学检测染毒处理时间. 此时各氯酚类污染物处理组电化学响应峰电流与对照组相比差距最大.

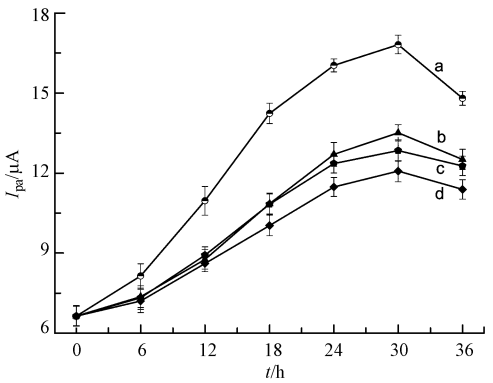

图 4　MCF-7 细胞裂解液电化学响应与染毒作用时间的关系

(a) 对照组,(b) TCP 染毒组,(c) PCP 染毒组,(d) DCP 染毒组

Fig.4　Dependence of the electrochemical responses of the lysed MCF-7 cell suspension on the exposure time in control group (a),TCP treatment group (b),PCP treatment group (c),DCP treatment group (d)

此外还研究了氯酚类污染物染毒作用剂量(PCP:0、29.3、46.9、75.0、120.0、192.0 μmol·L^{-1};TCP:0、49.0、85.7、150.0、262.5、459.4 μmol·L^{-1};DCP:0、199.6、319.4、511.0、817.6、1308.2 μmol·L^{-1})对 MCF-7 细胞裂解液的电化学响应的影响(图 5). 结果表明,随着 3 种氯酚类污染物浓度的增加(图 5 中 a→f 表示),MCF-7 细胞裂解液的氧化峰电流均呈明显下降趋势,说明氯酚类污染物均可以明显地抑制 MCF-7 细胞的增值及活性的增大,且抑制作用具有剂量效应性. 与对照组相比,3 种氯酚类污染物各浓度作用均差异显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$).

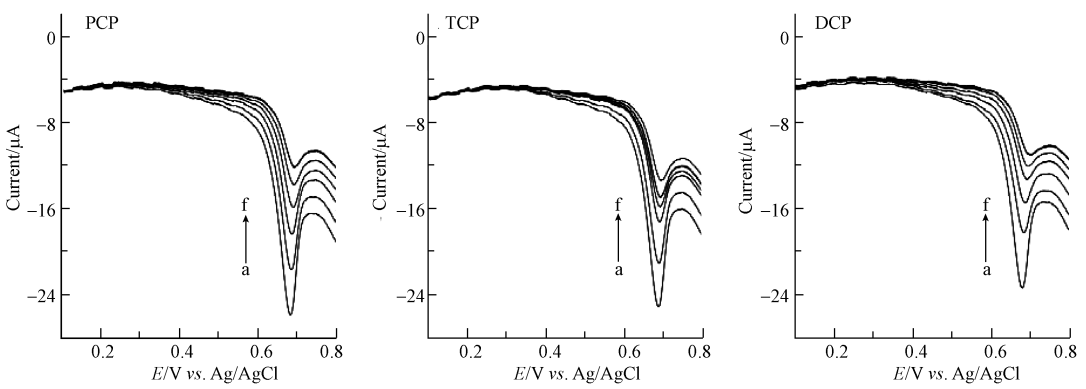

图 5　不同浓度氯酚类污染物染毒处理 MCF-7 细胞裂解液的线性扫描伏安图

细胞浓度:6.5×10^5 cells·mL^{-1};染毒作用时间:30 h

(a—f:PCP:0、29.3、46.9、75.0、120.0、192.0 μmol·L^{-1};TCP:0、49.0、85.7、150.0、262.5、459.4 μmol·L^{-1};DCP:0、199.6、319.4、511.0、817.6、1308.2 μmol·L^{-1})

Fig.5　LSVs of the lysed MCF-7 cell suspension treated with CPs of various concentrations

Cell inoculation concentration,6.5×10^5 cells·mL^{-1}; CPs treatment time,30 h

采用电化学法和 MTT 法分别研究了 3 种氯酚类污染物对 MCF-7 细胞的毒性,结果如图 6 所示. 3 种氯酚类污染物对 MCF-7 细胞的毒性作用均随着染毒剂量增大而增强,剂量效应关系显著. 表 1 列出了 PCP、TCP 和 DCP 对 MCF-7 细胞毒性的剂量效应关系方程及半数抑制效应浓度(IC_{50})值,可知细胞电化学法测得 PCP、TCP 和 DCP 对 MCF-7 细胞的 IC_{50}值分别为 77.62 、174.08、449.78 μmol·L^{-1}. MTT 法是目前细胞毒性研究中细胞活性检测首选的常规方法,其原理是活细胞内的线粒体中含有琥珀酸脱氢酶,可代谢还原淡黄色 MTT,在细胞色素 C 的作用下,生成蓝色(或蓝紫色)不溶于水的甲臜,并沉积在

细胞中,死细胞无此功能,甲臜的多少代表着活细胞数目,以此表示细胞活性[20]. 而细胞电化学法是在以检测细胞核苷酸代谢的中间产物嘌呤碱基的含量来反映细胞核苷酸代谢活力,进而表示细胞活性大小[21]. 研究发现,对于同一污染物,基于电化学法计算所得的 IC_{50} 值和 MTT 法所得的 IC_{50} 值比较接近,电化学法所得 IC_{50} 值更小,且两种方法测得的 3 种氯酚类污染物对 MCF-7 细胞毒性作用规律均为:PCP > TCP > DCP,这一结果与以往氯酚类污染物毒性研究结果基本一致,再次证实氯酚类污染物毒性大小与其化合物中取代氯原子数密切相关[22-23].表明使用细胞电化学法评价细胞活性和检测氯酚类污染物细胞毒性是可行的,且与传统的 MTT 法相比,细胞电化学法具有更好的检测灵敏度.

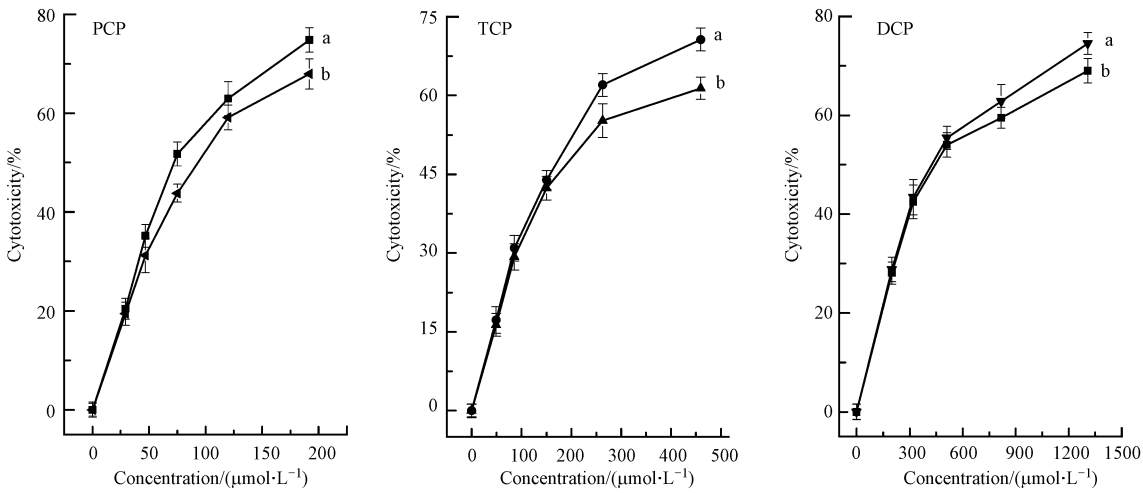

图 6 氯酚类污染物对 MCF-7 细胞毒性曲线

(a)电化学法,(b) MTT 法. 细胞接种浓度:6.5×10^5 cells·mL^{-1};染毒作用时间:30 h

Fig.6 Cytotoxicity of PCP,TCP,DCP on MCF-7 cells measured by the electrochemical method(a), the MTT assay(b). Cell inoculation concentration,6.5×10^5 cells·mL^{-1}; CPs treatment time,30 h

表 1 氯酚类污染物对 MCF-7 细胞的毒性

Table 1 The cytotoxicity of CPs on MCF-7 cells

氯酚 CPs	电化学检测法 Electrochemical method			MTT 法 MTT assay		
	剂量效应关系 Dose-effect relationship	相关系数 Correlation coefficent (r)	半数抑制效应浓度 IC_{50}/($\mu mol\cdot L^{-1}$)	剂量效应关系 Dose-effect relationship	相关系数 Correlation coefficent (r)	半数抑制效应浓度 IC_{50}/($\mu mol\cdot L^{-1}$)
PCP	$Y=66.87X-76.38$	0.9939	77.62	$Y=62.15X-72.44$	0.9975	93.33
TCP	$Y=56.76X-77.18$	0.9960	174.08	$Y=47.76X-63.01$	0.9931	232.27
DCP	$Y=54.31X-94.10$	0.9942	449.78	$Y=48.39X-79.45$	0.9873	473.15

注:Y 和 X 分别代表抑制效应百分数($0\leqslant Y\leqslant100$) 和氯酚类污染物浓度对数值. Y and X represent the percentage of inhibition effect ($0\leqslant Y\leqslant100$) and the numerical value of chlorophenol concentration,respectively.

3 结论(Conclusion)

以 Gr-GCE 为工作电极,研究了 MCF-7 细胞的电化学行为及来源,应用细胞活性检测的电化学法研究 PCP、TCP 和 DCP 染毒作用时间和作用剂量对 MCF-7 细胞活性的影响,测定了 3 种氯酚类污染物的细胞毒性. 研究发现 3 种氯酚类污染物对 MCF-7 细胞毒性的时间效应和剂量效应关系显著. 且细胞电化学法与传统 MTT 法测得 3 种氯酚类污染物毒性顺序一致,即为 PCP > TCP > DCP,且对于同一污染物,两种方法所得 IC_{50} 值较为接近. 说明采用细胞电化学法评价氯酚类污染物的细胞毒性是可行的.

参考文献(References)

[1] OLANIRAN A O, IGBINOSA E O. Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: Properties, distribution and microbial degradation processes[J]. Chemosphere, 2011, 83(10): 1297-1306.

hjhx.rcees.

[2] ZHANG H M,XU Y Q,ZHOU Q H,et al. Investigation of the interaction between chlorophenols and lysozyme in solution[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,2011,104(3): 405-413.

[3] 欧阳培毓,谭建华,汤嘉骏,等. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱测定沉积物中 4 种氯酚类物质[J]. 环境化学,2016,35(7): 1486-1492.
OUYANG P Y, TAN J H, TANG J J, et al. Determination of four chlorophenols in sediments by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry[J]. Environmental Chemistry,2016,35(7): 1468-1492 (in Chinese).

[4] GAO J J,LIU L H,LIU X R,et al. Levels and spatial distribution of chlorophenols—2,4-dichlorophenol,2,4,6-trichlorophenol,and pentachlorophenol in surface water of China[J]. Chemosphere,2008,71(6): 1181-1187.

[5] 吴明红,李刚,徐刚,等. 上海市河流表层沉积物中的氯酚,溴酚及多环芳烃[J]. 环境化学,2012,31(11): 1750-1758.
WU M H,LI G,XU G,et al. Chlorophenols,bromophenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of rivers in Shanghai, China[J]. Environmental Chemistry,2012,31(11): 1750-1758 (in Chinese).

[6] ZHANG X Y,ZHA J M,LI W,et al. Effects of 2,4-dichlorophenol on the expression of vitellogenin and estrogen receptor genes and physiology impairments in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*)[J]. Environmental Toxicology,2008,23(6): 694-701.

[7] 高先军,房彦军,王彩红,等. 两种典型氯酚类化合物暴露致稀有鮈鲫肝细胞的损伤效应[J]. 生态毒理学报,2009,4(5): 682-687.
GAO X J,FANG Y J,WANG C H,et al. Toxicity effects of two kinds of typical chlorophenols on hepatocytes of *Gobiocypris Rarus*[J]. Asian Journal of Ecotoxicology,2009,4(5): 682-687 (in Chinese).

[8] DANIEL V,HUBER W,BAUER K,et al. Impaired *in-vitro* lymphocyte responses in patients with elevated pentachlorophenol (PCP) blood levels[J]. Archives of Environmental Health,1995,50(4): 287-292.

[9] TUGIYONO, GAGNON M M. Metabolic disturbances in fish exposed to sodium pentachlorophenate (NaPCP) and 3,3′,4,4′,5-pentachlosobiphenyl (PCB126),individually or combined[J]. Comparative Biochemistry and Physiology,Part C,2002,132(4): 425-435.

[10] ZHU X L,QIN H W,WU G L,et al. Voltammetric behavior of HeLa cells on a carbon nanotube/ionic liquid modified electrode for cytotoxicity evaluation of chlorophenols[J]. Analytical Methods,2016,8(1): 171-176.

[11] 李磊,杨雨晗,王双等. 细胞活性检测方法之比较[J]. 生物学杂志,2011,28(1): 87-93.
LI L,YANG Y H,WANG S,et al. Comparison of cellular activity detection methods[J]. Journal of Biology,2011,28(1): 87-93 (in Chinese).

[12] JOHANSEN J L,SAGER T N,LOTHARIUS J,et al. HIF prolyl hydroxylase inhibition increases cell viability and potentiates dopamine release in dopaminergic cells [J]. Journal of Neurochemistry,2010,115(1): 209-219.

[13] QIN H W,GAO Q D,NIU H M,et al. An *in situ* electrochemical detection method of cell viability[J]. Analyst,2013,138(12): 3372-3375.

[14] 鞠煜先. 电分析化学与生物传感技术 [M]. 北京: 科学出版社,2006.
JU H X. Electrochemical analysis and biological sensing technology[M]. Beijing: Science Press,2006 (in Chinese).

[15] GUO X L,WANG Q,LI J L,et al. A mini-electrochemical system integrated micropipet tip and pencil graphite electrode for detection of anticancer drug sensitivity *in vitro*[J]. Biosensors and Bioelectronics,2015,64: 594-596.

[16] 张晓媛,白雪,黄欣,等. 二氧化钛/石墨烯复合光催化剂的制备及其对水中双酚 A 的降解[J]. 环境化学,2015,34(6): 1177-1184.
ZHANG X Y, BAI X, HUANG X, et al. Synthesis of TiO_2-graphene nanocomposite for photocatalytic degradation of bisphenol-A[J]. Environmental Chemistry,2015,34(6): 1177-1184 (in Chinese).

[17] XU G B,CUI J M,LIU H,et al. Highly selective detection of cellular guanine and xanthine by polyoxometalate modified 3D graphene foam [J]. Electrochimica Acta,2015,168: 32-40.

[18] LI J L,SONG J,BI S,et al. Electrochemical estrogen screen method based on the electrochemical behavior of MCF-7 cells[J]. Journal of Hazardous Materials,2016,313: 238-243.

[19] QIN H W,LIU J G,ZHANG Z S,et al. *In situ* electrochemical assessment of cytotoxicity of chlorophenols in MCF-7 and HeLa cells[J]. Analytical Biochemistry,2014,462: 60-66.

[20] CAMINADA D,ESCHER C,FENT K. Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: Comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines [J]. Aquatic Toxicology,2006,79(2): 114-123.

[21] ZHU X L,QIN H W,LIU J G,et al. A novel electrochemical method to evaluate the cytotoxicity of heavy metals[J]. Journal of Hazardous Materials,2014,271: 210-219.

[22] TIENSING T,STRACHAN N,PATON G I. Evaluation of interactive toxicity of chlorophenols in water and soil using lux-marked biosensors [J]. Journal of Environmental Monitoring,2002,4(4): 482-489.

[23] CHEN C Y,LIN J H. Toxicity of chlorophenols to Pseudokirchneriella subcapitata under air-tight test environment[J]. Chemosphere,2006, 62(4): 503-509.

hjhx.rcees.ac.cn