

氰戊菊酯对 *Trichop lusia ni* 细胞活力的影响^{*}

方心葵^a, 王朝霞^b, 陆 敏^b, 刘春燕^a, 乔中东^b, 黄丹枫^a

(上海交通大学 a 农业与生物学院, b 医学院, 上海 200240)

[摘 要] 以不同浓度的氰戊菊酯处理昆虫细胞 *Trichop lusia ni* (Tn), 并用台盼兰染色、3-(4, 5-Dimethylthiazol)-2, 5-diphenyltrazolium bromide (MTT) 还原试验及流式细胞仪检测等方法对Tn 细胞活力进行测定。结果显示, 氰戊菊酯浓度大于17.5 $\mu\text{mol/L}$ 处理的Tn 细胞形态、活力均发生了明显改变。在台盼兰染色实验中, 氰戊菊酯浓度 $\geq 17.5 \mu\text{mol/L}$ 时, Tn 细胞死亡率升高到29.69%以上, 极显著高于对照($P < 0.01$); 在MTT 还原实验中, 当氰戊菊酯浓度 $\geq 17.5 \mu\text{mol/L}$ 时, Tn 细胞对MTT 试剂的还原物吸光值降低, 细胞相对活力较对照极显著下降($P < 0.01$); 用流式细胞仪检测的结果也证实, 氰戊菊酯浓度为25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 死亡与凋亡细胞数明显高于对照。

[关键词] *Trichop lusia ni* (Tn) 细胞; 氰戊菊酯; 细胞活力

[中图分类号] S482.3⁺5; S481⁺.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)04-0101-04

随着各种害虫抗药性的增强, 杀虫剂的用量和使用频率不断增加, 对环境的危害也逐渐突显。氰戊菊酯(Fenvalerate)的化学式为(RS)- α -氨基-3-苯氧基苄基(RS)-2-(4-氯苯基)-3-甲基丁酸酯, 是一种II型拟除虫菊酯类杀虫剂, 具有高效、低毒、低残留的突出优点^[1], 被广泛用于农林害虫和家畜疾病传播媒介的防治。然而多年的实际应用已使一些昆虫对氰戊菊酯产生了抗药性^[2]。细胞作为新的模式生物在生物、医药、毒理等研究领域中的应用逐渐增多^[1, 3-4], 但有关氰戊菊酯对昆虫细胞活性影响的研究尚未见报道。本研究用不同剂量氰戊菊酯处理昆虫细胞系*Trichop lusia ni* (Tn), 观察细胞形态、活力的变化, 以为进一步研究杀虫剂诱导昆虫细胞解毒酶表达的遗传机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞系与杀虫剂

Trichop lusia ni (Tn) 细胞系来源于粉纹夜蛾(*Trichop lusia ni*) 卵细胞, 是可无限传代的细胞系, 属半贴壁培养的细胞。培养液为 *Trichop lusia ni* medium-Fred Hink (TNM-FH) 昆虫培养基(Sigma, USA) 加体积分数10%小牛血清(四季清, 杭州)配制。细胞培养于50 mL 多苯乙烯细胞培养

瓶, 每2 d 传代1次, 培养温度为25~27 $^{\circ}\text{C}$ 。氰戊菊酯(Fluka, 分析纯)先用二甲亚砜(DMSO)稀释到5 mmol/L, 处理细胞时再用细胞培养液稀释到需要浓度。其他试剂均购自Sigma 公司或上海化学试剂公司。

1.2 台盼兰染色实验

将Tn 细胞接种到96孔板(COSTAR, USA), 密度为 10^4 /孔, 在27 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h, 分别用0, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 和25 $\mu\text{mol/L}$ 氰戊菊酯处理12 h, 然后将细胞悬浮, 与40 g/L 台盼兰溶液(PBS 溶液配制)按体积比1:1混和, 滴于细胞计数板上, 在100 $\times$ 倒置显微镜下计数细胞总数与死亡细胞数, 视野中总计数不低于200个细胞。每处理浓度设3个重复。

1.3 3-(4, 5-Dimethylthiazol)-2, 5-diphenyltrazolium bromide (MTT) 还原实验

Tn 细胞用氰戊菊酯处理的方法同台盼兰染色实验, 每处理浓度设6个重复。用氰戊菊酯处理后, 将培养板翻转, 使培养液剩余约20 μL , 每孔加入2 μL MTT (10 mg/mL, 1 g/L PBS 溶液配制)。将培养板放入27 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养4 h, 然后每孔加入无水乙醇100 μL , 将培养板在振荡器上摇10 min。用酶标仪(# ELx800, BioTek, USA) 读取波长490 nm 吸

^{*} [收稿日期] 2005-08-11

[基金项目] 上海交通大学农科基金项目支持

[作者简介] 方心葵(1970-), 女, 河南禹县人, 讲师, 硕士, 主要从事动物遗传学与分子生物学研究。E-mail: fangxinku@970@sohu.com

[通讯作者] 黄丹枫(1960-), 女, 上海市人, 教授, 博士, 主要从事设施园艺学与植物生理学研究。E-mail: hdf@sju.edu.cn

光值,以对照的细胞相对活力为100%,将各组吸光值换算为细胞相对活力。整个操作过程需避光进行^[5]。

1.4 流式细胞仪检测实验

用50 mL 培养瓶将T_n细胞传代,培养36 h后,选生长良好、数量在70%~80%的细胞2瓶,其中1瓶用25 $\mu\text{mol/L}$ 氰戊菊酯处理12 h,另1瓶作为对照。然后悬浮,计数,收集数量约为 2×10^5 的细胞,用PBS洗涤2次后,用5 mL 预冷的体积分数75%乙醇(PBS配制)在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置至少30 min 固定细胞,收集并洗涤细胞。然后用碘化丙啶(Propidium iodide PI, 50 mg/mL, 0.1 g/L RNAase)染色30 min,用流式细胞仪(BD FACSCalibur)检测染色后产生的荧光密度,以此对细胞分群。用CellQuest软件进行数据分析,得细胞数量的散点图和直方图(获

取直方图采用的荧光参数为FL 2-A),每次获取细胞10 000个。

1.5 数据的统计处理

数据统计分析用SPSS11.5软件进行。

2 结果与分析

2.1 氰戊菊酯对T_n细胞形态的影响

氰戊菊酯处理T_n细胞后,首先观察到细胞形态的变化。在正常情况下,大多数细胞贴壁,呈梭型,少量细胞为圆形,细胞透亮,边缘整齐(图1A)。用浓度大于17.5 $\mu\text{mol/L}$ 的氰戊菊酯处理后,T_n细胞形态变化明显:细胞贴壁状态较差,圆形细胞数量增多,梭型细胞数量减少;细胞碎片较多,细胞内颗粒增多,着色加深,边缘粗糙,折光性变差(图1B)。

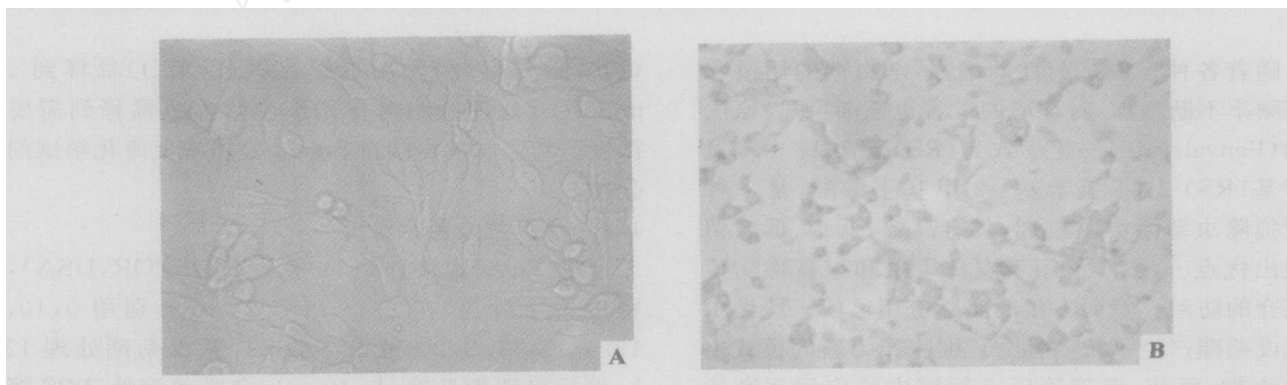


图1 正常T_n细胞(A)及25 $\mu\text{mol/L}$ 氰戊菊酯处理12 h后的T_n细胞(B)

Fig. 1 Nature T_n cells (A) and fenvalerate-treated T_n cells (B)

2.2 台盼兰染色实验结果

用不同浓度氰戊菊酯处理后,T_n细胞死亡率用

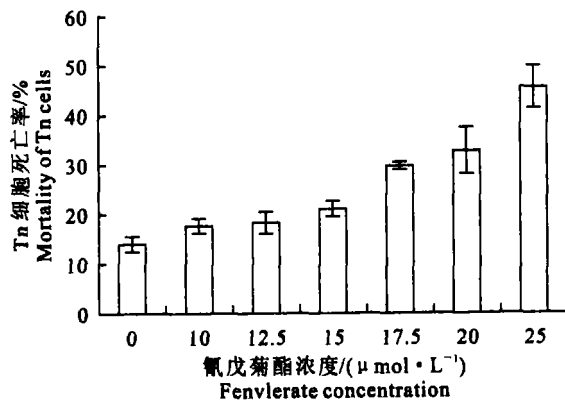


图2 台盼兰染色实验中氰戊菊酯处理后的T_n细胞死亡率

Fig. 2 Mortalities of T_n cells treated with fenvalerate

由图2可见,随氰戊菊酯浓度的增加,T_n细胞死亡率从(13.99 ± 2.65)%升高到(45.51 ± 1.36)%。

台盼兰染色排除法计数的结果如图2所示。

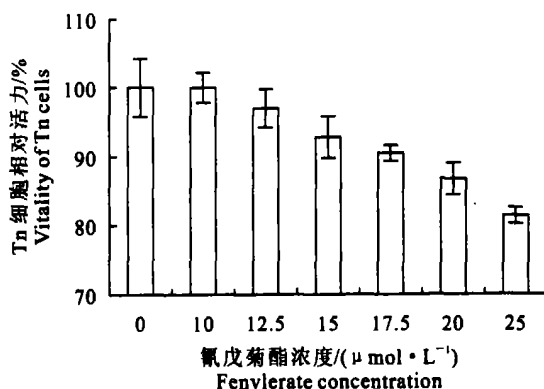


图3 氰戊菊酯处理后由MTT吸光值转化的T_n细胞相对活力

Fig. 3 Relative vitalities of T_n cells treated with fenvalerate

当氰戊菊酯浓度为17.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,死亡率为(29.69 ± 1.36)%,极显著高于对照(13.99 ± 2.65)%。

2.65%) ($P < 0.01$); 当氰戊菊酯浓度为 20 和 25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞死亡率分别为 $(32.71 \pm 8.13)\%$ 和 $(45.51 \pm 7.46)\%$, 也极显著高于对照 ($P < 0.01$)。

2.3 MTT 还原实验结果

用 MTT 还原实验检测 T_n 细胞活力, 结果见图 3。图 3 显示, 随氰戊菊酯处理浓度的提高, T_n 细胞的相对活力逐渐下降。当氰戊菊酯浓度小于 17.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞相对活力与对照无显著差异; 而当

其处理浓度 $\geq 17.5 \mu\text{mol/L}$ 时, T_n 细胞相对活力较对照极显著减小 ($P < 0.01$)。

2.4 流式细胞仪检测结果

氰戊菊酯处理 T_n 细胞后的死亡细胞用流式细胞仪进行检测, 处理及对照 T_n 细胞各细胞群频率的直方图及 Cell quest 软件分析结果如图 4 所示。由图 4 可见, 25 $\mu\text{mol/L}$ 氰戊菊酯处理 12 h 后, 在直方图的前端出现了明显的死亡(凋亡)峰。

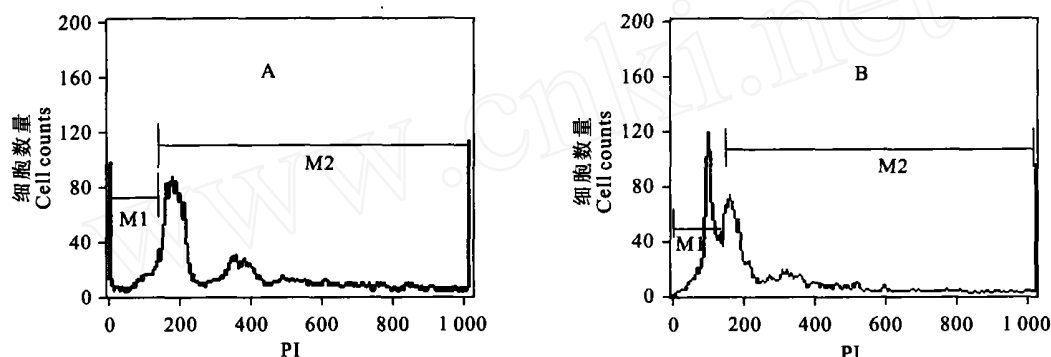


图 4 氰戊菊酯处理和未处理 T_n 细胞的流式直方图

A. 对照 T_n 细胞的直方图; B. 氰戊菊酯处理 T_n 细胞的直方图; 直方图获取采用的荧光参数为 FL 2-A;

M 1. 显示死亡和凋亡细胞群; M 2. 显示正常细胞群

Fig. 4 T_n cell number frequency histograms by FCM treated and untreated with fenvalerate

A. Cell number frequency histogram of untreated T_n cells; B. Cell number frequency histogram of T_n cells treated with fenvalerate;

The fluorescence parameter was FL 2-A; M 1. showed the dead and apoptotic cells; M 2. showed the normal cells

在图 4A 中, M 1 占总细胞量的 16.91%, M 2 占总细胞量的 83.09%; 在图 4B 中, M 1 占总细胞量的 37.64%, M 2 占总细胞量的 62.36%。分析显示, 氰戊菊酯处理的细胞数量占总细胞数量的 37.64%, 而对照的相应部分为 16.91%。

3 讨论

氰戊菊酯对各种细胞(包括昆虫细胞)的活力及形态的影响国内外均未见报道, 但氰戊菊酯对动物及其细胞毒性的研究有较多报道^[1, 4, 6-7]。氰戊菊酯作为可疑的环境内分泌干扰物质, 对动物与人类生殖健康的影响越来越引起人们的警惕。其能干扰人和动物的内分泌功能, 体外试验结果发现氰戊菊酯具有拟雌性激素活性, 流行病学调查也显示其具有一定的生殖毒性^[8]。另外, 氰戊菊酯可影响原癌基因 WNT10B 的表达, 从而增加乳腺癌的发病机会^[9]。

要减少氰戊菊酯的使用量, 减轻其对环境的污染及对人和动物的危害, 必须深入研究昆虫对其抗性产生的机理。在此方面, 人们在生理生化、分子生物学等方面已取得了很大的成绩, 但对其遗传机制的进一步研究却受到阻碍, 主要原因之一是昆虫对

内外有害物质反应的复杂性, 多系统同时参与抗性的产生以及抗性产生途径的综合性, 因此难以将其其中某种抗性的遗传机制分离而进行独立研究。由于体外培养细胞系作为试验材料的巨大优势是, 可忽略试验生物的遗传背景及各系统综合作用的交叉, 在科学试验上方便快捷, 因而其在毒理学领域的应用也越来越广泛。昆虫细胞系除大量用于真核表达系统的构建外, 在其他领域极少应用。

本研究结果表明, 氰戊菊酯对 T_n 细胞活力和形态的影响有其浓度依赖性, 即在达到一定浓度时, 细胞形态和活力受到显著影响, 引起一部分细胞死亡, 而在小剂量氰戊菊酯处理下, 细胞活力和形态未发生变化, 但此时细胞内可能发生了其他变化, 如细胞钙上升, 其作用的靶点钠离子通道开放^[8], 同时在人和其他动物的细胞中也可引起解毒酶 P450 酶系的表达增强^[10]。研究^[11]表明, 在对昆虫个体施加杀虫剂的情况下, 也能引起解毒酶的量或活性增加, 从而增强昆虫对杀虫剂的解毒能力。当某种突变引起同样的表型效应——解毒酶量增加时, 昆虫即对此杀虫剂产生可遗传的抗性, 并在杀虫剂选择压力下不断累积加强。因此, 有学者^[12-13]认为, 由化学物质诱

导产生的解毒酶量的改变,与由此产生的可遗传抗性的遗传机制是相同的。这就促使人们利用杀虫剂诱导昆虫细胞中的解毒酶,并以此作为研究解毒酶被诱导表达的机制,来加对抗性产生遗传机理的

进一步认识。但诱导试验的前提是在不影响细胞活力的情况下进行的,因此,本试验的结果为建立昆虫细胞诱导解毒酶表达的模式,以及为后续试验的顺利进行奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Giri S, Shama G D, Giri A, et al Fenvalerate-induced chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in the bone marrow cells of mice *in vivo*[J]. Mutation Research, 2002, 520: 125-132
- [2] Srinivas R, Udikeri S S, Jayalakshmi S K, et al Identification of factors responsible for insecticide resistance in *Helicoverpa armigera*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 2004, 137: 261-269
- [3] Schulz R, Lüss M. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics[J]. Aquatic Toxicology, 1999, 46: 155-176
- [4] Hadnagy W, Seemayer N H, Kuhn G L, et al Induction of mitotic cell division disturbances and mitotic arrest by pyrethroids in V79 cell cultures[J]. Toxicology Letters, 1999, 107: 81-87
- [5] 薛庆善 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 342-343
- [6] Carlson R W, Bradbury S P, Drummond R A, et al Neurological effects on startle response and escape from predation by medaka exposed to organic chemicals[J]. Aquatic Toxicology, 1998, 43: 51-68
- [7] Richter A, Davies D E, Alexander P. Growth inhibitory effects of FK506 and cyclosporin A independent of inhibition of calcineurin[J]. Biochemical Pharmacology, 1995, 49: 367-373
- [8] 何俊, 陈建锋, 刘茹, 等 氰戊菊酯对卵巢细胞、组织钙稳态和激素水平的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2004, 38(1): 18-23
- [9] Kasat K, Go V, Beatriz G T, et al Effects of pyrethroid insecticides and estrogen on WNT10B proto-oncogene expression[J]. Environment International, 2002 28: 429-432
- [10] Xiwen H, Weihua Z, Jing L, et al Fenvalerate can induce cytochrome P450 2B1/2B2[J]. Toxicology Letters, 1998, 95: 143-144
- [11] Amichot M, Brun A, Cuany A, et al Induction of cytochrome P450 activities in *Drosophila melanogaster* strains susceptible or resistant to insecticides[J]. Comparative Biochemistry and physiology Part C, 1998, 121: 311-319
- [12] Scott J G. Cytochromes P450 and insecticide resistance[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 29: 757-777
- [13] Terriere L C. Induction of detoxication enzymes in insects[J]. Ann Rev Entomol, 1984, 29: 71-88

Vitality of *Trichoplusia ni*(Tn) cell treated with fenvalerate

FANG Xin-kui^a, WANG Zhao-xin^b, LUM in^b, LIU Chun-yan^a,

QIAO Zhong-dong^b, HUANG Dan-feng^a

(a College of Agriculture, b College of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: The *Trichoplusia ni* (Tn) cells were treated with fenvalerate at ladder concentrations and the vitalities of the cells were detected by Typan blue dye exclusion, MTT reduction assay and Flow cytometer (FCM). Results show that the vitalities of fenvalerate-treated Tn cells were lower than those of untreated cells significantly when the concentrations arrived at 17.5, 20 and 25 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$) in Typan blue dye exclusion and MTT reduction assay. The death and apoptosis cells were increased notably between the cells treated with 25 $\mu\text{mol/L}$ fenvalerate and control. Those results could be a basic study for further research of mechanism of detoxified enzyme induced by fenvalerate.

Key words: *Trichoplusia ni* (Tn) cells; fenvalerate; cell vitality