

· 研究论文 ·

利用 MTT 法测定杀虫剂对家蚕细胞的毒力

毛黎娟, 魏方林, 朱国念*

(浙江大学 农药与环境毒理研究所, 浙江 杭州 310029)

摘要: 利用 [3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基]四氮唑溴盐法 (MTT法)和叶片浸渍法分别测定了毒死蜱、丁硫克百威和阿维菌素对家蚕卵巢细胞 (BmN)和家蚕活体 (2龄幼虫)的毒力,结果表明,两种生测方法获得的毒力测定结果并不完全一致,毒死蜱和丁硫克百威对家蚕细胞和家蚕2龄幼虫的毒力差异均极显著。因此细胞的毒力测定尚不能替代昆虫活体测定。用 MTT法测定了毒死蜱原药和乳油对家蚕卵巢细胞的毒力,结果表明同一杀虫剂的原药与制剂对细胞的毒力有较大差异。因此研究杀虫剂对离体细胞的毒力时,建议使用原药。

关键词: 杀虫剂;家蚕;细胞;MTT法;毒力

中图分类号: S482.4

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2005)01-0045-04

Toxicity of Several Insecticides on Silkworm Cell Line with MTT Method

MAO Li-juan, WEI Fang-lin, ZHU Guo-nian*

(Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: A MTT-based semi-automated colorimetric assay and leaf dipping method were used to study the effects of chlorpyrifos, carbosulfan and abamectin on silkworm ovarian cell and the larva respectively. The results showed that the effects of insecticides on silkworm cell were not always the same as that of the larva. And the difference of toxicity between chlorpyrifos and carbosulfan was distinct in significance level. The toxicity of the technical and the emulsifiable concentrate of chlorpyrifos to silkworm ovarian cell was significantly different by MTT-based semi-automated colorimetric assay. It was suggested that live insect-based assay cannot entirely be replaced by cell-based assay, and the technical is suitable for cell-based assay.

Key Words: insecticides; silkworm; cell; MTT method; toxicity

活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT, [3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基]四氮唑溴盐, 还原为难溶性的蓝紫色结晶物甲臜 (formazan) 并沉积在细胞中, 而已凋亡细胞却无此功能。用裂解液溶解细胞中的甲臜, 在波长 570 nm 处测定其光吸收值, 可间接反映活细胞数量。该方法已广泛用于一些生物活性因子的活性检测、大规模的抗肿瘤药物筛选、细胞毒性试验以

及肿瘤放射敏感性测定等。其特点是灵敏度高、重复性好、操作简便、经济、快速、易自动化、无放射性污染等, 而且与其他检测细胞活力的方法 (如细胞计数法、软琼脂克隆形成试验和 ³H-TdR 掺入试验等) 有良好的相关性^[1-3]。

目前, 国内外主要采用活体昆虫进行杀虫剂的筛选和毒力测定, 但活体生物测定周期长, 费用费时, 而且昆虫对药剂的敏感性受季节、温度、昆

收稿日期: 2004-07-15; 修回日期: 2004-10-05.

作者简介: *朱国念 (1957-), 男, 通讯作者, 浙江诸暨人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事农药环境毒理学研究. 联系电话: 0571-86971902; E-mail: zhugn@zju.edu.cn

虫品系等因素的影响较大。本研究采用昆虫细胞系作为生物试材,培养容易、方便、成本低,MTT法测定简易,适宜于批量快速筛选与毒力测定试验^[4]。利用MTT法测定比较了几种不同的杀虫剂原药及制剂对家蚕细胞系BmN的毒力,对利用昆虫细胞系进行农药活性筛选作了初步的探索。

1 材料与方 法

1.1 材料与药剂

细胞系:家蚕卵巢细胞(BmN);培养基:TC-100 Insect Medium (G B ICOL) + 100 mL/L 的 FBS [Fetal Bovine Serum (G B ICOL)];家蚕:品种为菁松皓月, Bombyx mori L.。

农药:40% 毒死蜱乳油(40% chlorpyrifos EC)、95.61% 毒死蜱原药(95.61% chlorpyrifos TM)(浙江新农化工有限公司生产);20% 丁硫克百威乳油(20% carbosulfan EC,浙江禾田化工有限公司生产);0.6% 阿维菌素乳油(0.6% abamectin EC,浙江海正化工集团有限公司生产)。

MTT(超纯):[3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基]四氮唑溴盐(AMRESCO 产品),用0.01 mol/L的PBS(pH 7.4)缓冲液配制成5 mg/mL,经0.22 μm 微孔滤膜过滤后冻存于-20 冰箱,4 避光保存备用(两周内使用)。

细胞裂解液:质量分数为10%的十二烷基磺酸钠(SDS,日本SNBC 产品)水溶液,pH 4.5~4.7(用0.1 mol/L HCl调节)。有机溶剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

酶联免疫检测仪(Bio-RAD Model 550); Lambda 40 UV/VIS 分光光度计(Perkin Elmer)。

1.3 试验方法

1.3.1 细胞培养及毒力测定 供试细胞在27 条件下培养,每2~3 d 传代一次,收集处于对数生长长期的细胞供测。

采用MTT法^[5,6]测定农药对家蚕细胞生长的相对抑制率。将农药制剂用TC-100培养基、农药原药用含20 μL/mL 丙酮的TC-100培养基配成所需浓度梯度,备用。将处于对数生长期的家蚕细胞稀释到每mL 含 $1.0 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^5$ 个细胞,接种到96孔板中,每孔60 μL,留一列只加培养基作为空白对照。24 h后,每一处理加两孔,加

入量为每孔60 μL,分别用加入10 μL/mL 丙酮溶液的正常细胞液作对照。培养20 h后每孔加入10 μL MTT母液(5 mg/mL),4 h后再向每孔加100 μL 质量分数为10%的SDS,1 h后待蓝紫色结晶物完全溶解后,将其置于酶联免疫检测仪上,以空白对照调零,记录570 nm 下的OD 值。按下式计算药剂对细胞的相对抑制率,用DPS 数据处理系统^[7]求毒力回归式,并计算抑制中浓度(LC₅₀)。

细胞抑制率(%) = $[\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{样品}}] / \text{OD}_{\text{对照}} \times 100$

1.3.2 家蚕活体毒力测定 采用叶片浸渍法。按李保同^[8]报道的毒力测定方法,用水把20% 丁硫克百威 EC、0.6% 阿维菌素 EC、40% 毒死蜱 EC 分别稀释成系列浓度。分别将桑叶置于药液中浸渍5 s,取出后自然晾干,置于直径9 cm 的培养皿内,接2龄幼蚕,每处理25头,重复3次,以清水为对照。处理后置于25 培养箱内,观察记录24 h 家蚕的中毒死亡情况。用DPS 数据处理系统求毒力回归式,并计算抑制中浓度(LC₅₀)。

2 结果与分析

2.1 活细胞产生的甲腈吸收光谱

取细胞裂解液溶解甲腈产物的上清液,用紫外分光光度计在400~750 nm 连续范围内读取OD 值,得到吸收光谱曲线在570 nm 处有最大吸收峰,因此可确定选用570 nm 作为测试波长。

2.2 三种杀虫剂对家蚕细胞和对家蚕2龄幼虫的毒力

按1.3.1和1.3.2的测定方法分别测得3种杀虫剂对家蚕细胞和幼虫的毒力,试验结果见表1和表2。可见,毒死蜱和丁硫克百威对家蚕细胞和对家蚕2龄幼虫的毒力差异均较大,毒死蜱对离体细胞的LC₅₀和LC₉₅值分别是活虫的22.75和10.88倍,丁硫克百威对离体细胞的LC₅₀和LC₉₅值分别是活虫的31.76和44.75倍,其95%置信限均不包含1,即表明两者差异显著^[7]。而阿维菌素对家蚕细胞和对家蚕2龄幼虫的毒力相近,阿维菌素对离体细胞的LC₅₀和LC₉₅值分别是活虫的1.61和1.18倍,LC₅₀之比的95%置信限不包含1,而LC₉₅之比的95%置信限包含1,表明两者差异不显著^[7]。由此可见用MTT法对家蚕卵巢细胞的毒力测定结果与用叶片浸渍法对家蚕活体(2龄幼虫)的毒力测定结果并不完全一致。

Table 1 Toxicity of three insecticide emulsifiable concentrate (EC) to silkworm ovarian cell and larva

Insecticide	Target for bioassay	Regression equation	r	LC ₅₀	95% Fiducial limit
				/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹
20% Carbosulfan EC	Cell	Y=2.16x+1.82	0.9754	29.95	18.07~50.48
	Larva	Y=2.68x+5.07	0.9556	0.95	0.70~1.21
0.6% Abamectin EC	Cell	Y=2.88x+8.27	0.9745	0.073	0.065~0.082
	Larva	Y=2.32x+8.12	0.9790	0.045	0.035~0.061
40% Chlopyrifos EC	Cell	Y=2.07x+1.09	0.9379	77.30	55.08~95.62
	Larva	Y=1.57x+4.16	0.9700	3.44	2.52~4.75

Table 2 Toxicity comparison of three insecticide EC to silkworm ovarian cell and larva

Insecticide	LC ₅₀ /mg · L ⁻¹		LC ₉₅ /mg · L ⁻¹	
	Ratio ratio of LC ₅₀	95% FL	Ratio ratio of LC ₅₀	95% FL
	/cell · larva ⁻¹	/mg · L ⁻¹	/cell · larva ⁻¹	/mg · L ⁻¹
20% Carbosulfan EC	31.76	24.06~41.92	44.75	22.18~90.29
0.6% Abamectin EC	1.61	1.22~2.13	1.18	0.57~2.44
40% Chlopyrifos EC	22.75	16.22~31.91	10.88	4.98~23.79

2.3 杀虫剂原药与制剂对家蚕细胞生长的影响

4种有机溶剂对家蚕细胞生长的影响见表3。

细胞存活率按下式计算:

$$\text{细胞存活率}(\%) = (\text{OD}_{\text{样品}} / \text{OD}_{\text{对照}}) \times 100$$

Table 3 Effect of organic solvent on the livability of silkworm ovarian cell (24 h)

Concentration of solvent /μL · mL ⁻¹	Livability ±SD			
	Toluene	Ethanol	Methanol	Acetone
CK	100 ±0 aA	100 ±0 aA	100 ±0 aA	100 ±0 aA
5	69.72 ±0.19 bB	93.63 ±0.016 aAB	92.64 ±0.036 aA	92.83 ±0.15 abA
10	53.78 ±0.18 bcB	88.05 ±0.062 abAB	92.03 ±0.069 aA	92.03 ±0.057 abA
15	47.41 ±0.19 cB	72.91 ±0.027 bB	91.24 ±0.12 aA	77.69 ±0.15 bA
20	21.12 ±0.021 dC	71.31 ±0.073 bB	88.84 ±0.082 aA	56.97 ±0.027 cB

Note: The difference small letters or capital letters are significantly different at P_{0.05} or P_{0.01} by Duncan's multiple range test

由表3可知,不超过10 μL/mL的丙酮、甲醇细胞液处理家蚕细胞的存活率均大于90%,经显著性检验表明其存活率与对照无显著差异,这与杨红等^[9]、周青春等^[10]的报道一致。本试验中毒死蜱原药用丙酮作为溶剂是合适的。供试制剂中溶剂含量经稀释后均低于5 μL/mL细胞液,因此试验结果(表1、2和表4)受溶剂的影响可以忽略

不计。

毒死蜱的原药及制剂对家蚕细胞的毒力测定结果见表4。40%毒死蜱乳油与95.61%毒死蜱原药致死中浓度(LC₅₀)的比值为1.36,其95%置信区间为1.01~1.83,95%置信区间不包含1,表明农药制剂与原药对家蚕细胞的毒力有一定的差异。

Table 4 Toxicity of the technique and the EC of chlopyrifos to silkworm ovarian cell

Insecticide	LC ₅₀ /mg · L ⁻¹	Regression equation	95% Fiducial limit/mg · L ⁻¹
40% Chlopyrifos EC	77.30	Y=2.07x+1.09	55.08~95.62
95.61% Chlopyrifos TC	56.99	Y=0.98x+3.26	45.26~67.11

3 讨论

通常药剂对离体细胞的毒力总是比相应的活体高^[11,9],但某些神经毒性类的杀虫剂对离体细胞的毒力可能比相应的活体低^[12]。这可能与药剂对活体和离体的作用机理、作用方式的差异有关。阿维菌素对昆虫的作用靶标为氨基丁酸(GABA)受体氯离子通道复合体,通过阻断神经传导系统使昆虫产生麻痹造成死亡^[13]。而丁硫克百威和毒死蜱主要通过抑制昆虫体内胆碱酯酶活性,使昆虫肌肉和腺体持续兴奋,从而导致衰竭死亡^[14,15]。而药物对昆虫细胞的作用主要是对细胞器线粒体中酶系统的破坏^[16]。

试验结果显示,阿维菌素对家蚕细胞和对家蚕2龄幼虫的毒力差异相对小一些,而毒死蜱和丁硫克百威对离体细胞的毒力显著低于对活体的毒力。表明杀虫剂的作用方式和机理对于细胞毒性反应具有重要的影响。因此研究杀虫剂对离体细胞的毒力时,选择合适的细胞系很重要。在进行新化合物的活性筛选时,应结合使用几种不同的细胞系进行试验,以避免漏筛;对具有特定作用机理的杀虫剂进行毒力测定时,还应使用具有某种特定活性的细胞系,如培养具有胆碱酯酶活性的细胞,利用这种细胞系就有可能用于筛选和鉴定相应的具有杀虫活性的化合物。试验还表明毒死蜱原药及制剂对家蚕细胞的毒力有明显差异,这可能与制剂中的乳化剂、农药助剂有关,因此研究杀虫剂对离体细胞的毒力时,建议使用原药。本试验仅对利用昆虫细胞系进行农药活性测定进行了初步探索,还有待于进一步研究。但MTT法测定杀虫剂对家蚕细胞的毒力测定结果,对于杀虫剂对昆虫活体的生物测定具有重要的参考价值,尤其在研究杀虫剂毒理学机制方面提供了重要线索。

参考文献:

[1] XUE Qing-shan (薛庆善). The Principle and Technology of in vitro Culture (体外培养的原理与技术) [M]. Beijing (北京): Chinese Agriculture Press (中国农业出版社), 2001. 343.
[2] SIU Zhen-qiang (司徒镇强), WU Jun-zheng (吴军正). Cell

Culture (细胞培养) [M]. Beijing (北京): The World Library Press Company (世界图书出版公司), 1996. 186.
[3] ZHOU Qing-chun (周青春), HONG Hua-zhu (洪华珠), LUO Qin (罗勤), et al 测定昆虫细胞存活或死亡的MTT方法的改进[J]. Entomological Knowledge (昆虫知识), 1998, 35(3): 165-167.
[4] ZHOU Qing-chun (周青春), YANG Hong (杨红), WANG Hong (汪虹), et al 农药生物测定新方法的研究. 杀虫剂细胞生测体系的建立及改进[J]. J Central China Normal Univ (Nat Sci) [华中师范大学学报(自然科学版)], 1997, 31(4): 456-459.
[5] KONG Xiang-wen (孔祥文). 改良MTT法测定rhL-3生物学活性[J]. Pharmaceutical Biotechnology (药物生物技术), 1998, 5(2): 97-100.
[6] Stipanovic R D, Elissalde M H, Altman D W, et al Cell culture bioassay to evaluate allelochemical toxicity to *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. J Econ Entomol, 1990, 83(3): 737-741.
[7] TANG Qi-yi (唐启义), FENG Ming-guang (冯明光). DPS Data Processing System for Practical Statistics (实用统计分析及其DPS数据处理系统) [M]. Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 2002. 188-201.
[8] LI Bao-tong (李保同). 六种杀虫剂对家蚕的毒性与安全评价研究[J]. Chin J Pestic Sci (农药学学报), 2001, 3(3): 83-85.
[9] YANG Hong (杨红), ZHOU Qing-chun (周青春), WANG Jia-kun (王家坤), et al 利用菜青虫细胞检测几种有机溶剂和有机磷农药的毒力[J]. Acta Phytophylacica Sinica (植物保护学报), 1996, 23(1): 79-83.
[10] ZHOU Qing-chun (周青春), WANG Hong (汪虹), HONG Hua-zhu (洪华珠), et al 农药生物测定新方法的研究 I 几种有机溶剂对中国棉铃虫细胞生长的影响[J]. J Central China Normal Univ (Nat Sci) [华中师范大学学报(自然科学版)], 1997, 31(1): 92-95.
[11] Perlman D. Value of mammalian cell culture as a biochemical tool [J]. Science, 1968, 160: 42-46.
[12] ZHENG Bing-lian (郑丙莲), YANG Hong (杨红), HONG Hua-zhu (洪华珠), et al 八种昆虫离体细胞系对灭多威农药的敏感性研究[J]. Biotechnology Information (生物技术通报), 2000, (5): 30-32.
[13] HE Yu-xian (何玉仙), YANG Xiu-juan (杨秀娟), WENG Qi-yong (翁启勇), et al 阿维菌素对小菜蛾的生物活性研究[J]. Fujian J Agric Sci (福建农业学报), 2001, 16(2): 24-27.
[14] JIANG Ya-jun (姜雅君). 氨基甲酸酯类杀虫剂丁硫克百威[J]. Chin J Pestic (农药), 1998, 37(9): 43.
[15] ZHAO Shan-huan (赵善欢). Chemical Protection of Plant (植物化学保护) [M]. Beijing (北京): Chinese Agriculture Press (中国农业出版社), 2000. 48-116.
[16] XU Ming-fei (许名飞), ZHANG Rui (张瑞), WAN Hong-wen (万洪文). 灭多威对美国棉铃虫细胞的抑制作用研究[J]. J Central China Normal Univ (Nat Sci) [华中师范大学学报(自然科学版)], 2001, 35(1): 51-53.

(Ed. JIN S H)