**分类号** 密 **级**

**U D C**   **编 号**



**硕 士 学 位 论 文**

**草甘膦与杀虫单对不同倍性泥鳅鳍细胞系的毒性效应**

向阳

**(1214029)**

指导教师姓名 李霞 教授 专 业 名 称 水产养殖 论文答辩日期 2015 年 6 月 2 日

学位授予日期 2015 年 7 月

**Masteral Dissertation**

**In vitro cytotoxicity testing of glyphosate**

**and monosultap using different ploidy loach fin cell lines**

**Supervisor: Prof. Li Xia Master Candidate: Xiang Yang**

**College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University**

**Dalian, Liaoning, P.R. China June, 2015**

摘要

摘 要

本文研究了不同浓度草甘膦与杀虫单对60-70 代泥鳅鳍二倍体细胞系

（DIMF）和泥鳅鳍三倍体细胞系（TRMF）的毒性作用。采用噻唑蓝（MTT）法测得草甘膦对DIMF与TRMF 24h半致死浓度分别为333.79mg/L，384.91mg/L，杀虫单对DIMF与TRMF 24h半致死浓度分别为119.73mg/L，146.26mg/L. DIMF对草甘膦和杀虫单的敏感性明显高于TRMF。经草甘膦与杀虫单处理的活体细胞均表现为细胞拉长，空泡化和脱落并游离于培养基表面的现象。酶活力测定两种细胞系的结果显示：草甘膦浓度为0～300mg/L时，超氧化物歧化酶（SOD）和谷胱甘肽S转移酶（GST）活力随着浓度的增加而增加，随后逐渐降低；乙酰胆碱酯酶（AChE）活力与草甘膦浓度呈负相关。杀虫单浓度为0～100mg/L时，

SOD和GST活力随着浓度的增加而增加，100～200mg/L浓度组酶活力逐渐降低；

AChE活力与杀虫单浓度呈负相关。并且三种酶活力三倍体均高于二倍体。微核试验结果显示：100mg/L草甘膦与50mg/L杀虫单即能使细胞核产生损伤而形成微核，微核率随着草甘膦与杀虫单浓度增加而增加，草甘膦浓度为500mg/L和杀虫单浓度为200mg/L时微核率最大，草甘膦处理组DIMF与TRMF微核率均为4.3‰，杀虫单处理组DIMF与TRMF微核率分别为3.3‰和3.7‰。电镜观察结果是对照组DIMF和TRMF超微结构无明显差异。经草甘膦与杀虫单处理后，

DIMF和TRMF病理变化情况相似：染色质凝集趋边，细胞核分解成多个；线粒体、核糖体与内质网等细胞器数量减少，细胞内出现空泡，出现凋亡小体，表现出凋亡的特征。本文不仅研究了草甘膦与杀虫单毒性的作用机制和不同倍性细胞系之间的差异，而且为建立草甘膦与杀虫单农药体外监控体系打下基础。

**关键词：**草甘膦；泥鳅鳍细胞系；杀虫单；凋亡

Abstract

60-70 generation of diploid loach fin cell line (DIMF) and triploid loach fin cell line (TRMF) were used to study different concentrations of glyphosate and monosultap toxicity in vitro. The 24h-IC50 of DIMF and TRMF were 333.79mg/L and 384.91mg/L by glyphosate and 119.73mg/L and 146.26mg/L by monosultap respectively, which were measured with MTT. The glyphosate and monosultap sensitivity of DIMF was higher than TRMF obviously. After exposure of glyphosate and monosultap, the cellular morphology showed the phenomenon with elongation, vacuolization and exfoliation. The results of two kinds of cell lines enzyme activity

Determination showed while the glyphosate concentration was 0～300mg/L, the

Activity of SOD and GST were increased with the increasing concentration then gradually decreased. The activity of AChE was negatively correlated with the concentration of glyphosate. monosultap concentration was 0～100mg/L, the activity

Of SOD and GST were increased with the increasing concentration then gradually decreased. The activity of AChE was negatively correlated with the concentration of monosultap. And the three enzymes of TRMF were higher than DIMF. Micronucleus test showed that 100mg/L glyphosate and 50mg/L monosultap can make the nucleus produces damage and then form the micronucleus, the rate of micronucleus increased with the increase of glyphosate and monosultap concentration, when glyphosate and monosultap concentration were 500mg/L and 200mg/L that were maximum, the micronucleus rate of DIMF and TRMF were 4.3‰by glyphosate and which were 3.3‰and 3.7‰by monosultap. The ultrastructural observation show that no significant difference between DIMF and TRMF organelles in control group. After exposure of glyphosate and monosultap, DIMF and TRMF presented similar pathological changes, the both showed chromatin condensation, margination and cell nucleus decomposition. The number of organelles have reduced, including mitochondria, ribosomes and endoplasmic reticulum. Vacuoles and apoptotic bodies occured in cells which indicated cell poptosis has occurred. This paper studied not only the difference betweent different ploidy loach fin cell lines and mechanisms of toxicity by glyphosate and monosultap, but also laid a foundation for establishing pesticide monitoring system in vitro.

Key words: Glyphosate; Loach fin cell line; Monosultap; Apoptosis

目 录

[摘要](#_Toc686735696) 2

[摘 要](#_Toc686735697) 2

[Abstract](#_Toc686735698) 2

[目录](#_Toc686735699) 3

[第一章 综述](#_Toc686735700) 4

**[1.1](#_Toc686735701)** [鱼类细胞系培养概况](#_Toc686735701) 4

**[1.2](#_Toc686735702)** [鱼类细胞培养在环境毒理学中的应用](#_Toc686735702) 4

**[1.3](#_Toc686735703)** [毒性检测的常用指标](#_Toc686735703) 4

**[1.3.1](#_Toc686735704)** [遗传毒性指标](#_Toc686735704) 4

**[1.3.2](#_Toc686735705)** [关键酶活性指标](#_Toc686735705) 5

**[1.4](#_Toc686735706)** [环境中农药残留的几种Th物学检测](#_Toc686735706) 5

**[1.4.1](#_Toc686735707)** [利用水生动物活体检测农药残留](#_Toc686735707) 5

**[1.4.2](#_Toc686735708)** [利用水生动物体外培养检测农药残留](#_Toc686735708) 5

**[1.4.3](#_Toc686735709)** [利用活体与体外培养进行毒性检测的比较](#_Toc686735709) 5

**[1.5](#_Toc686735710)** [细胞凋亡](#_Toc686735710) 5

**[1.6](#_Toc686735711)** [草甘膦与杀虫单的研究进展](#_Toc686735711) 5

**[1.6.1](#_Toc686735712)** [草甘膦的研究进展](#_Toc686735712) 5

**[1.6.2](#_Toc686735713)** [杀虫单的研究进展](#_Toc686735713) 5

**[1.7](#_Toc686735714)** [泥鳅鳍细胞系简介](#_Toc686735714) 6

**[1.8](#_Toc686735715)** [本论文的研究目的及意义](#_Toc686735715) 7

[第二章 草甘膦对不同倍性泥鳅鳍细胞系毒性效应](#_Toc686735716) 7

**[2.1](#_Toc686735717)** [材料与方法](#_Toc686735717) 7

**[2.1.1](#_Toc686735718)** [实验材料](#_Toc686735718) 7

**[2.1.2](#_Toc686735719)** [实验仪器](#_Toc686735719) 7

**[2.1.3](#_Toc686735720)** [试剂](#_Toc686735720) 8

**[2.1.4](#_Toc686735721)** [实验方法](#_Toc686735721) 8

**[2.2](#_Toc686735722)** [结果](#_Toc686735722) 9

**[2.2.1](#_Toc686735723)****[MTT](#_Toc686735723)**[检测法](#_Toc686735723)**[OD](#_Toc686735723)**[值与细胞接种量的关系](#_Toc686735723) 9

**[2.2.2](#_Toc686735724)** [草甘膦对](#_Toc686735724)**[DIMF](#_Toc686735724)**[和](#_Toc686735724)**[TRMF](#_Toc686735724)**[细胞存活率的影响](#_Toc686735724) 9

**[2.2.3](#_Toc686735725)** [草甘膦处理](#_Toc686735725)**[DIMF](#_Toc686735725)**[与](#_Toc686735725)**[TRMF](#_Toc686735725)**[细胞的光镜观察结果](#_Toc686735725) 9

**[2.2.4](#_Toc686735726)** [草甘膦对泥鳅鳍细胞系酶活性的影响](#_Toc686735726) 9

**[2.2.5](#_Toc686735727)** [细胞核异常与微核率](#_Toc686735727) 10

**[2.2.5](#_Toc686735728)** [草甘膦对细胞超微结构的影响](#_Toc686735728) 11

**[2.3](#_Toc686735729)** [讨论](#_Toc686735729) 11

**[2.3.1](#_Toc686735730)** [细胞接种量的选择和草甘膦对细胞存活率的影响](#_Toc686735730) 11

**[2.3.2](#_Toc686735731)** [草甘膦对细胞形态的影响](#_Toc686735731) 11

**[2.3.3](#_Toc686735732)** [草甘膦对细胞酶活力和细胞结构的影响](#_Toc686735732) 11

**[2.3.4](#_Toc686735733)** [草甘膦对细胞微核率和核异常率的影响](#_Toc686735733) 12

**[2.4](#_Toc686735734)** [本章小结](#_Toc686735734) 12

[第三章 杀虫单对不同倍性泥鳅鳍细胞系的毒性效应](#_Toc686735735) 12

**[3.1](#_Toc686735736)** [材料与方法](#_Toc686735736) 12

**[3.1.1](#_Toc686735737)** [实验材料](#_Toc686735737) 12

**[3.1.2](#_Toc686735738)** [实验仪器](#_Toc686735738) 12

**[3.1.3](#_Toc686735739)** [试剂](#_Toc686735739) 12

**[3.1.4](#_Toc686735740)** [实验方法](#_Toc686735740) 12

**[3.2](#_Toc686735741)** [结果](#_Toc686735741) 13

**[3.2.1](#_Toc686735742)** [杀虫单对](#_Toc686735742)**[DIMF](#_Toc686735742)**[和](#_Toc686735742)**[TRMF](#_Toc686735742)**[细胞存活率的影响](#_Toc686735742) 13

**[3.2.2](#_Toc686735743)** [杀虫单处理](#_Toc686735743)**[DIMF](#_Toc686735743)**[与](#_Toc686735743)**[TRMF](#_Toc686735743)**[细胞的光镜观察结果](#_Toc686735743) 13

**[3.2.3](#_Toc686735744)** [杀虫单对泥鳅鳍细胞系酶活性的影响](#_Toc686735744) 13

**[3.2.4](#_Toc686735745)** [细胞核异常与微核率](#_Toc686735745) 14

**[3.2.5](#_Toc686735746)** [杀虫单对细胞超微结构的影响](#_Toc686735746) 15

**[3.3](#_Toc686735747)** [讨论](#_Toc686735747) 15

**[3.3.1](#_Toc686735748)** [杀虫单对细胞存活率的影响](#_Toc686735748) 15

**[3.3.2](#_Toc686735749)** [杀虫单对细胞形态和结构的影响](#_Toc686735749) 16

**[3.3.3](#_Toc686735750)** [杀虫单对细胞酶活力影响](#_Toc686735750) 16

**[3.3.4](#_Toc686735751)** [杀虫单对细胞微核率和核异常率的影响](#_Toc686735751) 16

**[3.4](#_Toc686735752)** [本章小结](#_Toc686735752) 16

[第四章 结论](#_Toc686735753) 16

[参考文献](#_Toc686735754) 16

[攻读硕士期间发表的学术论文目录](#_Toc686735755) 19

[独创性说明](#_Toc686735756) 20

# 第一章 综述

## **1.1** 鱼类细胞系培养概况

鱼类细胞系在技术上主要沿用哺乳动物细胞培养，可分为原代培养和传代培养两部分[1]。从动物组织或器官取出细胞所做的首次培养称作原代培养，而从体外生长的细胞进行扩大和继代称为传代培养[2]。细胞培养的对象可以是单个细胞，也可以是细胞群。水生动物细胞培养的对象主要是水生脊椎动物和水生无脊椎动物，就目前来说，水生无脊椎动物原代培养的细胞很难形成单层或形成的单层无法分裂，导致水生无脊椎动物的细胞培养很难进行[3]。因此，如今仍然没有能够培养出水生无脊椎动物连续性细胞系。海洋生物细胞培养起步较陆地生物晚。二十世纪60年代，Wolf等[4]首次在实验室建立了虹鳟鱼生殖腺细胞系RTG-2，如今仍在传代培养。以后，鱼类细胞系的培养得到了迅速发展，据统计，到2011

年，世界上已经培养出275 株鱼类细胞系，其中淡水与溯河洄游性细胞系175

株，海水鱼类细胞系100株[5]。就目前来说，鱼类细胞系的数量远远超过这个数

值。我国学者张念慈和杨广智于1981年建立了草鱼吻端组织细胞系，成为我国建立的第一株鱼类细胞系。此后我国又陆续培养出了以淡水鱼为主的数十多种鱼类细胞系，随着近年来海水养殖业的迅猛发展，海水鱼类细胞系的培养也逐渐受到重视。在我国建立的鱼类细胞系主要有：牙鲆（*Paralichthys lethostigma*）胚胎细胞系FEC[6]、鲤鱼（*Cyprinus carpio*）吻端细胞系[7]、中华鲟（*Acipenser*

*sinensis*) CSTF细胞系[8]、花鲈（*Lateolabrax japonica*)肝细胞系SPL-1[9]等。

## **1.2** 鱼类细胞培养在环境毒理学中的应用

由于近年来水产业的快速发展，导致大面积水环境的污染程度加剧，利用体外培养的鱼类细胞系替代活体鱼类进行毒理学研究具有重要意义。与活体鱼比较，鱼类细胞系具有均一性好、经济方便、药物与细胞直接作用、反应速度快等特点[10]。因此，利用鱼类细胞系对农药、重金属、致癌物、环境激素和干扰素进行监测和安全评估，是细胞系培养极其重要的一个用途。Rachlin和Perimutter在1968年最早利用鱼类细胞系来检测环境污染物的毒性作用[11]，在此后的几十

年内，这种体外的检测技术手段得到了快速地利用[1]。例如，Marques等[12]于2002年利用褐色大头鲢BB细胞系和红鳟RTG-2细胞系研究了苯并芘的毒性效应，为细胞系可作为环境污染物检测的工具提供了用力证据。另外，在20世纪50年代早期，学者就利用培养的细胞对多种药物进行了毒性测试，通过这种方法大致能确定药物对不同细胞的毒性剂量范围，最后可以用于药物的临床试用。此外，体外培养技术为药物筛选、细胞毒性和活力检测提供了技术保障。随着现代生物技术的发展，结合体外培养的细胞进行基因毒性检测也衍生出了多种方法。例如：

流式细胞术检测细胞微核水平[13]；细胞基因组DNA的损伤（RAPD）[14]；

单细胞凝胶电泳SCGE[15,16]

## **1.3** 毒性检测的常用指标

用于毒性检测的指标有组织病理学变化，生理行为变化，关键酶活性变化和遗传毒性指标等。

### **1.3.1** 遗传毒性指标

随着现代农药和分子技术的发展，人们逐渐开始运用分子技术手段去检测农药等污染物对生物遗传物质的毒性作用机制，并发展建立了一系列的遗传毒性检测方法，如染色体畸变、微核实验、彗星电泳等，为环境污染遗传毒性的鉴定打下了基础。

#### 1.3.1.1 染色体畸变实验

农药的毒性作用是在生物体内产生大量有毒性的超氧自由基，当里面的超氧阴离子与DNA结合后，就会造成遗传损伤，使生物体细胞染色体数目和结构发生改变。因此，染色体畸变可以作为检测农药毒性的一个重要指标。范立民等[17]研究了嗪草酮、2, 4-D丁酯、艾割和使它隆4中除草剂对黄鳝肾细胞染色体数目和形态的影响，结果显示低剂量的四种农药即可引起黄鳝染色体畸变，表明这4种除草剂对黄鳝均具有遗传毒性。随着现代分子技术的发展，荧光原位杂交是在原位杂交基础上建立起来的一种染色体分析技术，其具有灵敏度高、特异性好和分辨率强等特点[18-20]。

#### 1.3.1.2 微核实验（micronucleus test）

Matter和Schmid首先用啮齿类动物骨髓细胞微核率来测定疑有诱变活力的化合物，建立了微核测定法[21]。微核是无着丝粒的染色体片段或因纺锤体受损而丢失整个染色体，在细胞分裂后期仍留在子细胞的细胞质中形成的。微核率的大小可以反映染色体受损程度，鱼类具有染色体数目多，体积小等特点，在农药等污染物对水生动物的遗传损伤检测中被广泛应用[22]。Brunetti等[23]于1988年首次将微核实验用于海洋无脊椎动物对海洋污染物的检测。在我国，楼允东等

[24]分析了农药甲胺磷与敌枯双对泥鳅红细胞微核形成与核异常的影响，结果表

明两种农药都能诱导泥鳅红细胞核异常并出现微核，在一定浓度范围内，微核率与农药浓度呈正相关；当农药浓度过高时，微核率反而随浓度升高而降低，而总核异常率总是与浓度呈正相关。早期微核检测借助显微镜人工观测，需要计数几千个细胞中微核的出现频率，过程繁琐且误差大，这些限制了它的发展。流式细胞仪和影像技术的发展使得微核实验的准确度、方便性有了极大的提高，Schultz等[25]在鱼体内所作的微核检测和Kolpoth等[26]利用鱼永生性细胞系所作的微核检测均取得了很好的结果。

#### 1.3.1.3 彗星实验

彗星实验也称单细胞凝胶电泳（SCGE），是20世纪80年代发展起来的一种在单细胞水平上检测DNA损伤的技术[27]。彗星实验的原理：环境污染物对生物体造成遗传损伤，遗传损伤的标记为DNA链的断裂，将受到损伤的单细胞包埋在凝胶中，在一定条件下电泳时会发现，DNA片段分子量小离开核DNA向正极迁移形成“彗星”状图像，而未受损的DNA部分保持球型。通过DNA的迁移率来确定单个细胞DNA损伤程度，从而确定污染物的作用剂量与DNA损伤效应关系。彗星实验具有对低浓度农药有高灵敏度的特点，彗星实验的检测效果比微核实验好，因为环境中的农药浓度一般很低，彗星实验检测低浓度农药具有高度灵敏性（可以检测到每109Da 0.1 DNA的断裂），并且所研究的细胞也不需要处于有丝分裂期[28-30]. Pavlica等[31]利用彗星实验研究了五氯苯酚（PCP）处理的淡水蚌类（*Dreissena polymorpha* Pallas）血细胞，发现高浓度的PCP(80g/L)会引起血细胞DNA断裂，表明利用彗星实验可以监测水体中PCP的污染。

### **1.3.2** 关键酶活性指标

当鱼类受到污染物的毒害时，机体的防御系统主要是酶系统会迅速被激活，调动自身的酶系统来清除这种毒性效应，从而表现出酶活性的变化[32]。在鱼类细胞系中，生物标志酶主要是乙酰胆碱酯酶（AChE）、谷胱甘肽S转移酶（GST）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、谷胱甘肽还原酶（GR）、超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）等[33]。农药能导致水生动物的氧化胁迫[34]，刺激诱导生物体自由基地生成，而自由基能导致生物体氧化损伤[35]。抗氧化酶系统是生物体抵抗活性氧或氧自由基伤害的重要保护屏障，是对污染物解毒的重要组成部分。当细胞暴露在不同污染物下，细胞中的标志酶活性变化会不同[36,37]，比如，有机磷农药作用作用乙酰胆碱酯酶，同时也能引起超氧化物歧化酶等几种抗氧化酶的变化。目前，研究较多的酶有：SOD、CAT、GSH-Px等。SOD是作为生物体内天然氧化剂可以消除体内氧自由基的，并能有效地将负氧离子转化成氧化氢与氧气[38,39]。SOD在生物体中广泛存在，以肝、肾、脑等组织含量居多。CAT将过氧化氢分解为氧和水，将细胞有毒的代谢产物清除[40-42]. GSH-Px能清除过氧化氢，以保护细胞膜结构功能的完整[43]。采用鱼类细胞系来检测环境污染物的毒性大小，不仅灵敏度高，而且还可以将酶活性的变化进行定量检测，还可以研究污染物的制毒机理，因此理论研究意义和实际应用价值很高。

## **1.4** 环境中农药残留的几种Th物学检测

农药作为一种重要的生产资料，在现代农药中占着举足轻重的作用。它在病虫害的防治，保障农药稳定高产中至关重要。但是，农药使用的同时，必然会导致残留的农药随着排污水、降雨、灌溉等一系列途径进入到江河湖海，对水环境中的生物，如鱼、虾、贝等造成毒害，并通过食物链与生物富集来传递有毒物质，最终影响人类的健康。因此，对环境中残留农药的毒性进行科学的检测和评估，能够正确指导其合理生产及使用，意义重大。农药检测可分为理化检测与生物检测。常用的理化检测包括：气相色谱[44]、液相色谱[45]、光谱法[46]等，通过上述方法能够准确地测定农药的含量，但是它的缺点在于不能测定农药对生物体的毒性作用，而且理化方法的测定往往会存在一个最低检出值，水环境中最低检出值

以下浓度的农药仍然可能对水生动物造成伤害。所以，利用水体中农药的含量来反应水体的污染程度是不够全面的。如果能够与生物检测配合应用，就能够充分地说明农药对生物体的毒性效应，也能真实的反映水体的污染程度。

常用的生物检测包括：活体动物检测、体外培养的细胞检测、水生动物精子或胚胎检测。以下总结了利用活体动物检测和体外细胞检测农药毒性的方法和研究进展。

### **1.4.1** 利用水生动物活体检测农药残留

利用水生动物活体对农药进行毒性分析，可分为急性和慢性实验两种，鱼类的急性实验的原理是鱼类在不同浓度处理下，短时间内（一般为24h-96h）产生中毒反应，受试鱼死亡数一半时的药物浓度值为（LC50），以LC50的值来表示检测药物的毒性大小[47]。鱼类急性毒性实验的方法简单，时间短等特点在国内外环境保护中占有不可或缺地位。慢性毒性实验是指用低剂量药物长期接触实验动物，观察实验动物对药物所产生的毒性作用[48]。慢性毒性实验是用于确定污染物的毒性下限，即长期接触此污染物对机体产生危害的阈剂量，最后为制定人接触此污染物的安全量标准提供依据。在进行急性毒性实验时，应选择对污染物敏感、饲养方便、遗传稳定且具有代表性的水生动物[49]。在国际上斑马鱼常当作急性毒性实验的材料。在我国常用的实验材料有斑马鱼[50]、草鱼[51]、鲢鱼[52]、泥鳅[53]、鲤鱼[54]等。

### **1.4.2** 利用水生动物体外培养检测农药残留

随着细胞培养技术的成熟，一些学者开始把鱼类细胞用于农药污染的毒性评价中[55]。例如：Briischweiler等[56]在1995年采用中性红（NR）和MTT法分析了多种有机锡类化合物对鱼肝细胞PLHC-1（*Poeciliopsis lucida hepatocyte*）的毒性作用，并且和体内的毒性实验进行了比较，结果发现PLHC-1细胞系可以有效地为有机锡化合物的毒性作出指示。Bury等[57]研究了Cu2+和可的松(cortisol)对罗非鱼鳃中的氯细胞(chloricle cell)的作用，结果发现Cu2+能导致氯细胞的坏死；而低浓度的可的松拮抗Cu2+的毒性作用从而保护氯细胞，高浓度的可的松则能诱导氯细胞的凋亡。Bieberstein[58]和Braunbeck[59]利用光学显微镜和电子显

微镜研究了3, 5-二氯苯酚（Dichlorophenol）和RTG-2细胞系的细胞病理学作用。

### **1.4.3** 利用活体与体外培养进行毒性检测的比较

利用活体鱼进行急性毒性实验具有许多缺点，例如：实验耗用大量活鱼，这就得有一定规模的养殖场地及设备作保障，养殖周期长，耗费大量成本；从外在的表现很难判断出机体内部的损伤情况，会给污染物的评估带来一定的难度。鱼类细胞体外培养检测恰好弥补了利用活体鱼进行毒性实验的不足，比如，可以控制细胞处于同一时期，同一条件和同一形态；实验细胞具有单一稳定的特性，活体组织结构复杂；实验过程观察与检测简单快捷；不会对环境造成第二次污染；通过电子显微镜可以在细胞水平或亚细胞水平上观察农药对细胞内部结构的损伤。总之，利用体外培养的鱼类细胞系虽然有着诸多的优点，但是也存在着一些问题：体外实验只是在细胞水平上的反应，与体内实验不能完全的吻合，例如，一些污染物对细胞有一定的毒性，能引起细胞一系列的生理变化，当用于体内实验的时候，有可能经过体内自身酶的代谢，不能引起其中毒；不同的细胞系对同一污染物的敏感性不同，也会因为毒性测试方法不同而出现差异；实验常常通过存活率和代谢的变化来确实污染物的毒性，而体外实验主要个体的炎症反应[60]。

## **1.5** 细胞凋亡

细胞凋亡（apoptosis）是基因控制的细胞自主有序的死亡，又称为细胞程序性死亡（Programmed Cell Death, PCD）[61]。它并不是病理条件下的自体损伤，而是为了更好地适应生存环境主动争取死亡的过程。出现凋亡的细胞都会出现特定的形态特征，表现为胞质浓缩、核染色质浓缩、DNA片段化、细胞膜内陷，发泡等最后形成凋亡小体[62]。细胞凋亡的概念于1965年被提出来到现在，由于它在保证多细胞生物能够更好地适应环境中起着独特的作用，学者对其的机制的研究成了目前生命科学界研究的热点之一，但是细胞凋亡的确切机制仍不清楚。目前较多的研究说明了线粒体在细胞凋亡中的作用[63]。线粒体作为细胞产能的中心，也是细胞内活性氧（ROS）的主要来源和靶位，在细胞凋亡中起着至关重要的作用。已经证实在细胞承受的浓度范围内，ROS诱导细胞进行胁迫应答，通过改变一些基因的表达代维持正常的代谢功能，当超过承受的浓度范围后，

ROS能改变细胞膜渗透性和诱导细胞色素C释放，进而诱导细胞凋亡[64]。

## **1.6** 草甘膦与杀虫单的研究进展

### **1.6.1** 草甘膦的研究进展

草甘膦（glyphosate），化学名称N-（膦酰基甲基）甘氨酸，一种广效型有机磷除草剂。其商品名为农达、治草春、好过春等，是由化学家约翰・E. 弗朗茨于1970年发现。是70年代开发最为成功的除草剂。草甘膦除草能力卓越，问世不久就成为全球销量最大的除草剂。近几年来，包括草甘膦在内的一些除草剂的大量使用，对农田的污染程度加剧，农田中的泥鳅有绝迹的危险[65]，据邓晓和李雅琦的报道，草甘膦对土壤中放线菌和真菌的生长速率有抑制作用，并且随药物浓度升高抑制作用加强[66]。耿德贵等[67]报道了草甘膦能明显地诱发黄鳝染色体数目和畸变率上升。Williams等[68]在研究小鼠直接暴露在草甘膦后，肝组织受到了严重的氧化损伤。虽然草甘膦被称作低毒农药，但仍然有其中毒的案例。据报道，患者出现心、肝、肾等一些内脏器官受损的临床表现，最终因呼吸衰竭，肾功能衰竭死亡[69]。Yoursef等[70]报道草甘膦能引起雄性新西兰大白兔体重减轻、精液浓度降低，同时伴随着精子异常和死亡的现象，并且这种危害有着浓度依赖性。曾明和黄婷等[71]研究了草甘膦对GC-1 小鼠精原细胞的毒性作用，结果表明

60~180mg/L浓度的草甘膦就对GC-1细胞有明显的损伤，可能的原因是草甘膦诱导氧化应激，致使细胞通透性增加和DNA损伤。草甘膦作为广谱性除草剂，虽然毒性低，但它使用范围广，渗透到土壤的能力强，在土壤与水体中的残留必然会造成生态系统的危害，最后可能危害到人类的健康。

### **1.6.2** 杀虫单的研究进展

杀虫单（monosultap），化学名称1-硫代磺酸钠基-2-二甲氨基-3-硫代磺酸基丙烷，白色至黄色粉状固体，是我国自主合成的沙蚕类杀虫剂，并具有较强的吸附性。由于其杀虫谱广，被广泛用于多种害虫的防治。杀虫单的作用机制与有机磷不同，对乙酰胆碱酯酶没有抑制作用，它作用于昆虫神经细胞的接合部位，切

断前一神经细胞分泌的乙酞胆碱阻碍后一神经细胞的刺激作用，导致神经细胞不发生兴奋作用。杀虫单是一种神经系统的毒剂，害虫接触杀虫单后，最初并无任何反应，但动作显著缓慢，失去侵害农作物的能力，发育停止，虫体软化，最终瘫痪死亡。目前，对杀虫单的研究比较少，主要是对其残留检测方法的研究。黄雅俊等[72]于2002年采用气象色谱法（GC）分析了土壤、水、稻米、稻壳中杀虫单的残留，并建立了杀虫单残留的GC分析方法。另外，李羡筠等[73]以小鼠为实验对象，研究了杀虫单的致突变作用，实验结果并未发现杀虫单原药能产生致突变作用。

## **1.7** 泥鳅鳍细胞系简介

大连海洋大学细胞工程实验室于2012年分别建立了二倍体、三倍体和四倍体泥鳅鳍细胞系。该三种细胞系贴壁生长，形态呈成纤维样，已经保存在中国典型培养物保藏中心（CCTCC），并分别命名为DIMF、TRMF、TEMF。三种细胞系的基本培养特征如表1-1所示：

表1-1 不同倍性泥鳅鳍细胞系的基本培养特征

Table 1-1 Characters of DIMF, TRMF and TEMF

|  | DIMF | TRMF | TEMF |
| --- | --- | --- | --- |
| 组织来源 | 二倍体泥鳅鳍组织 | 三倍体泥鳅鳍组织 | 四倍体泥鳅鳍组织 |
| 培养条件 | 25℃、5%CO2 | 25℃、5%CO2 | 25℃、5%CO2 |
| 细胞形态  染色体分析 | 成纤维样  2n=50 | 成纤维样  3n=75 | 成纤维样  4n=100 |
| 倍增时间 | 48.43h | 36.01h | 41.45h |
| 病毒敏感性 | SVCV 敏感  鱼类诺达病毒不敏感 | SVCV 敏感  鱼类诺达病毒不敏感 | SVCV 敏感  鱼类诺达病毒不敏感 |
| 培养基 | 20%FBS 的 DMEM/F12 | 20%FBS 的 DMEM/F12 | 20%FBS 的DMEM/F12 |

## **1.8** 本论文的研究目的及意义

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)隶属于鲤形目(Cypriniformes)，鲤科

（Cobitidae）在我国广泛分布，是农田中常见的鱼类，肉鲜味美，营养价值高，有

“水中人参”的美誉，是生物学及环境毒理学研究的良好材料。目前，随着农业的发展，农药的大量使用给泥鳅的生存环境造成了极大的威胁。本文选取草甘膦与杀虫单两种较为常见的农药，来探讨其对泥鳅细胞系的毒性作用机制，以此来建立草甘膦与杀虫单体外监测体系，同时也分析了不同倍性泥鳅鳍细胞系对农药敏感性的差异，为不同倍性生物在抗性方面提供理论依据。目前，关于泥鳅的报道主要是泥鳅成体、仔鱼、胚胎等的研究[74, 75]，本文把泥鳅细胞系作为环境毒理学的工具，为体外毒性检测提供了重要的理论支持。

# 第二章 草甘膦对不同倍性泥鳅鳍细胞系毒性效应

草甘膦（glyphosate）化学名称为N-膦酸甲基甘氨酸，白色无臭稳定性好，是全球销量最大的除草剂，我国每年约消耗5万吨。除草剂在使用过程中，仅约有

1%作用于靶生物，其余残留在土壤，或通过间接途径进入水体，水环境中的农药通过食物链逐级浓缩，最后危害人类健康[71]。泥鳅作为一种较好的环境污染指示生物，分布广泛，具有对化学诱变剂、致癌剂较敏感等特点[74,75]。现在较多的报道是农药对泥鳅成体、仔鱼、胚胎等的研究，但尚未见利用泥鳅细胞系进行农药毒性研究的报道[76,77]。利用体外培养的鱼类细胞系检测环境污染物对水生动物的毒性作用，与活体鱼比较，具有平行性、均一性好、无个体差异等特点，能够快速、直接地反映环境污染物的毒性效应[78]。Rachlin等[79]最早将黑头软口鲦

（*Pimephales promelas*）肌肉细胞系用于水环境中锌的毒性分析及其检测中，之后，许多学者利用鱼类细胞系分别研究了丙溴磷[80]、丁草胺[33]、甲基对硫磷[33]和久效磷[81]等的毒性作用机制，但是草甘膦的研究尚未见报道。本文利用实验室建立的二倍体与三倍体泥鳅鳍细胞系，研究了草甘膦对其存活率、细胞形态、酶活力、微核率和超微结构的影响，目的是探讨草甘膦农药的作用机理，从而建立有机磷农药的体外毒性检测及其监控体系，同时也分析了不同倍性的泥鳅鳍细胞系对草甘膦的毒性效应。

## **2.1** 材料与方法

### **2.1.1** 实验材料

实验所用的60-70代二倍体泥鳅鳍细胞系（DIMF）和三倍体泥鳅鳍细胞系

（TRMF）由大连海洋大学细胞工程实验室2012年建立。细胞在含20%胎牛血清(FBS) DMEM/F12培养基中培养（25℃、5%二氧化碳培养箱）。DIMF 4-5d传代一次，TRMF 2-3d传代一次。

### **2.1.2** 实验仪器

实验所用的仪器设备见表2-1

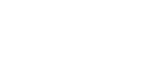


表2-1 实验仪器

Table.2-1 Experimental apparatus

| 仪器设备 | 生产厂家 |
| --- | --- |
| LDZX-40SCI 型自动型压力蒸汽灭菌锅 | 上海申安医疗器械厂 |
| 超净工作台 | 苏州华宇净化设备有限公司 |
| 倒置显微镜 | OLYMPUS |
| BB15CO2 恒温培养箱 | Heraeus |
| LD4-2A 离心机 | 北京医用离心机厂 |
| 低温高速离心机 CT15RE | Hitachi Koki Co |
| 酶标仪 ELx808 | BIO-TEK |
| 可见分光光度计 mapada18 | 上海美谱达仪器有限公司 |
| 细胞培养瓶，96 孔细胞培养板 | Coring |

### **2.1.3** 试剂

实验所用的95%草甘膦原粉购于西华农药厂。DMEM/F12培养基、胎牛血清（FBS）、胰酶均Hyclone公司产品。MTT粉，二甲基亚砜（DMSO）购置于上海生工。超氧化物歧化酶SOD、乙酰胆碱酯酶AChE和谷胱甘肽-S-转移酶GST试剂盒购为南京建成生物工程研究所产品。其他化学试剂均为分析纯。

草甘膦母液用含20%FBS DMEM/F12培养基配制，经0.22μm滤膜过滤除菌，现配现用。

磷酸缓冲液（PBS）：按薛庆善[82]的方法配制，用1mol/L NaOH调节pH值到7.2。高压蒸汽灭菌30min，4℃保存。

吉姆萨染液：取1.0g吉姆萨染液，66mL甘油，甲醇66mL，用吉姆萨粉和少量甘油一起研磨至无颗粒，然后加入剩余甘油，放入56℃烘箱2h，加入甲醇并放入棕色试剂瓶4℃保存。吉姆萨使用液，将吉姆萨原液与磷酸缓冲液1: 9混合。

### **2.1.4** 实验方法

#### 2.1.4.1 染毒方法

在超净工作台上，取对数生长期、状态良好的60-70代DIMF细胞和TRMF细胞，用0.25%的胰酶消化后制成单细胞悬液，调整细胞密度为1×10 5个/ml，以每孔100μL接种于96孔板或等密度接种5mL到25mL细胞培养瓶中，培养24h后，弃掉原培养基，96孔板中加入等体积浓度为0、100、300、500、700、900、

1100、1300mg/L的草甘膦，每个浓度设置5个重复，用于MTT检测。培养瓶中加入5mL浓度为0、100、300、500、700mg/L草甘膦，用于酶活性、微核和超微结构变化的研究。以上细胞均在CO2培养箱（5%, 25℃）中培养24h。

#### 2.1.4.2 采用MTT法检测OD值与细胞接种量的关系

用台盼蓝排斥法制备5×10 5个/ml活细胞悬液，在96孔板中用培养基倍半稀释，培养24h细胞贴壁后，进行MTT检测，每个孔设置5个重复。

#### 2.1.4.3 草甘膦对泥鳅鳍细胞系毒性作用的MTT检测

按照2.1.4.1方法染毒24h后，加入20μl的5mg/LMTT溶液于96孔板中，

Zkq 20151222

25℃孵育4h，弃掉培养基，用预热到37℃磷酸缓冲液（PBS）轻轻快速清洗两

次，每孔加入150μlDMSO溶解甲臜溶液，室温震荡10min，在酶标仪492nm波长下测各孔吸光值，计算其平均值。

细胞存活率= (处理组吸光度值－空白对照组吸光度值) /（阴性对照组吸光度值－空白对照组吸光度值）×100% 。

#### 2.1.4.4 细胞总蛋白含量的测定

染毒方法按照2.1.4.1处理细胞24h后，轻轻移去旧的培养基。细胞用PBS漂洗后，加入50μL0.1 mol/L NaOH裂解细胞，96孔培养板中20℃孵育1h，每孔加入200μL考马斯亮蓝溶液，室温放置20min，在酶标仪上590 nm处测定其光吸收值。

#### 2.1.4.5 草甘膦对泥鳅鳍细胞系三种酶活性的检测

按照2.1.4.1方法染毒，培养24h后，用胰酶消化并收集细胞培养瓶中的细胞，1500rpm离心l0min，将沉淀用PBS重悬后，在冰浴中用超声波破碎仪破碎细胞（工作3s，间隙3s，处理10min），将破碎后的细胞悬液于2000rpm，4℃离心10min，离心收集上清液，分别按照试剂盒说明书进行酶活力测定。酶活力测

定均采用超氧化物歧化酶（SOD）、乙酰胆碱酯酶（AChE）、谷胱甘肽S转移酶（GST）试剂盒。

#### 2.1.4.6 细胞微核率及核异常率的测定

按照2.1.4.1染毒方法处理细胞24h后，胰酶消化并收集培养瓶中的细胞，

1000rpm离心5min，去上清，用0.5mLPBS重悬细胞。将细胞滴于干净的载玻片上，采用45°推片的方法快速推片，甲醇固定10 min，用Giemsa染液（PBS: Giemsa 9:1）染色5min，蒸馏水轻轻冲洗，晾干，油镜观察。每个片计数1000个细胞以上，记录微核及核异常的细胞数。核异常率=具有核异常的细胞数/观察到的细胞总数×1000‰，微核率=有微核的细胞数/观察到的细胞总数×1000‰。

#### 2.1.4.7 电镜样品制备及观察

取对照组和半致死浓度组的DIMF和TRMF细胞，用胰酶处理细胞并收集在离心管中，1500rpm离心10min，去上清，加入3%戊二醛固定，4℃固定6h以上。弃去固定液，固定好的样品用PBS漂洗3次，每次5min。再用1%锇酸于4℃固定1.5h，然后用乙醇系列脱水，用环氧树脂Epon812对样品包埋后切片，

超薄切片经醋酸双氧铀和柠檬酸各染色30min，置于HITACHI-600透射电镜下

Zkq 20151222

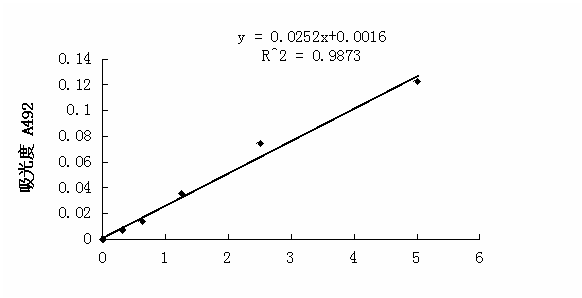
观察拍照。

#### 2.1.4.8 数据处理

用SPSS 17.0软件分析处理数据。使用t-test进行组间显著性差异分析，实验结果用平均值标准误表示，*P*＜0.05表示显著差异，*P*＜0.01表示极显著差异。

## **2.2** 结果

### **2.2.1** **MTT**检测法**OD**值与细胞接种量的关系



**细胞量×104 cell number**

结果表明细胞量与吸光值呈显著线性正相关（R2=0.9873），见图2.1。

图2.1 MTT法检测活细胞数的标准曲线（n=5,　x±s)

Fig. 2.1 Standard curve for determination of viable cell number in MTT assay

### **2.2.2** 草甘膦对**DIMF**和**TRMF**细胞存活率的影响

不同浓度的草甘膦处理DIMzkFq和 T2R0M15F12242h2后，其存活率如图2.2所示，从图中可见二倍体和三倍体细胞变化规律基本一致。100mg/L草甘膦即可引起细胞死亡，随着浓度的增加，其存活率逐渐降低，且存在明显的浓度依赖性。根据存活率与浓度之间的回归方程，计算二倍体和三倍体半致死浓度分别333.79mg/L和384.91mg/L。当草甘膦浓度达到1300mg/L时，二倍体与三倍体全部死亡。总体来看，二倍体各浓度组死亡率比三倍体要高一些。



图2.2 草甘膦对DIMF和TRMF存活率的影响注：测定数据用平均值±标准误表示(n=5)

Fig.2.2 Glyphosate effects on DIMF and TRMF of cell viability Notes: Datazakreqe x pr2e0ss1ed5a1s2m2e2an±S. D. (n=5).

### **2.2.3** 草甘膦处理**DIMF**与**TRMF**细胞的光镜观察结果

在倒置显微镜下观察染毒后细胞的变化，发现正常细胞排列紧密，呈纤维样，贴壁生长（图2.3A, D）。染毒24h后鳍细胞出现明显的形态学变化，二倍体和三倍体细胞变化一致。100mg/L草甘膦浓度组部分细胞胞体伸长呈线状，300mg/L草甘膦浓度组中多数细胞胞体伸长，细胞轮廓模糊，有些细胞内出现空泡或脱离培养瓶壁，悬浮在培养液中（见图2.3B，E），达700mg/L时多数细胞变圆脱落、贴壁的很少（见图2.3C, F）。





图 2.3 不同浓度草甘膦处理DIMF与TRMF的形态变化

注：A.对照组二倍体细胞；；B.300mg/L草甘膦处理的二倍体细胞形态；C.700mg/L草甘膦处理的二倍体细胞形态；D.对照组三倍体细胞；E.300mg/L草甘膦处理的三倍体倍体细胞形态；F.700mg/L草甘膦处理的三倍体倍体细胞形态，标尺=100μm）

Fig. 2.3 Morphological changes of DIMFand TRMF treated by glyphosate

Notes: A. Control normal DIMF; B. DzIkMqF tr e2at0ed15by1320202mg/L glyphosate; C. DIMF treated by

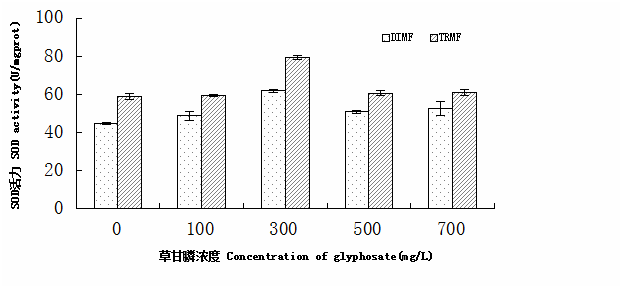
300Mg/L glyphosate; D.; Control normal TRMF; E. TRMF treated by 300mg/L glyphosate; F. TRMF treated by 700mg/L glyphosate. bar=100μm

### **2.2.4** 草甘膦对泥鳅鳍细胞系酶活性的影响

#### 2.2.4.1 草甘膦对细胞系**SOD**的影响

不同浓度草甘膦处理DIMF和TRMF的SOD酶活性的变化如图2.4所示，草甘膦处理24h后，100mg/L草甘膦浓度组SOD酶活性和对照组比较没有明显变化，300mg/L草甘膦浓度组SOD活性最高，和对照组比较差异显著（*P* ＜0.05），以后随浓度升高酶活性降低，各浓度组三倍体细胞系酶活力均高于二倍体细胞系

（*P*＜0.05） 。



\*

\*

图2.4 不同浓度草甘膦处理DIMF和TRMF SOD活力注：测定数据用平均值±标准误表示(n=3) \**P* <0.05

Fig. 2..4 Effects of different concentrations of glyphosate on DIMF and TRMF loach fin cell lines’SOD activity

Notes: Data are expressed as mean±S. D. (n=3). \**P* <0.05

#### 2.2.4.2 草甘膦对细胞系**AChE**的影响

随草甘膦浓度的增加，二倍体与三倍体AChE酶活力与对照组比均显著性降低（*P* ＜0.05），并具有浓度依z赖kq性 。2但01三5倍12体22酶活力均高于二倍体细胞（*P* ＜

0.05)。



\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

图2.5 不同浓度草甘膦处理DIMF和TRMF AChE活力注：测定数据用平均值±标准误表示(n=3) \**P* <0.05

Fig. 2.5 Effects of different concentrations of glyphosate on DIMF and TRMF loach fin cell lines’

AChE activity

Notes: Data are expressed as mean±S. D. (n=3). \**P* <0.05

#### 2.2.4.3 草甘膦对细胞系**GST**的影响

草甘膦处理24h后，100mg/L浓度组并未引起二倍体与三倍体GST活性的变化。但300mg/L浓度组酶活力显著升高，达到最大值，与对照组比较差异显

著，（*P*＜0.01），随着草甘膦浓度增加酶活性又逐渐降低，各浓度组三倍体细胞系酶活性均高于二倍体细胞系（*P*＜0.05）。



\*\*

\*\*

\*

\*

图2.6 不同浓度草甘膦处理DIMF和TRMF GST活力

注：测定数据用平均值±标准误表示(n=3) \**P* <0.05、\*\**P* <0.01

Fig. 2.6 Effects of different concentrations of glyphosate on DIMF and TRMF loach fin cell lines’GST activity

Notes: Data are expressed as mean±S. D. (n=3). \**P* <0.05、\*\**P* <0.01

### **2.2.5** 细胞核异常与微核率

不同浓度草甘膦处理后的DIMF与TRMF均出现核异常并出现微核，两者的变化规律一致，如表2-2所示。核异常表现为核异型、小核、核碎裂等。微核出现在细胞质中，呈圆形且边缘光滑，与细胞核染色一致，如图2.7A, B所示。0～

500mg/L草甘膦处理组，核异常率与微核率逐渐增加，500mg/L时微核率均出现最大值，700mg/L时核异常率出现最大值，以后随浓度提高，核异常率与微核率均降低，与对照组比较，差异极显著（*P*＜0.01）。在同一浓度下，二倍体与三倍体之间微核率与核异常率差异不显著（*P*＞0.05）。

表2-2 不同浓度草甘膦对DIMF和TRMF核异常与微核率的影响。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 草甘膦glyphosate mg/L | DIMF  核 异 常 率 Nuclear abnormal rate‰ | DIMF  微核率  Micronucles rate‰ | TRMF  核 异 常 率 Nuclear abnormal rate‰ | TRMF  微核率Micronucleus rate‰ |
| 0 | 1.12±0.06 | 0.37±0.10 | 1.27±0.04 | 0.33±0.10 |
| 100 | 3.25±0.05 \*\* | 1.10±0.14 \*\* | 3.38±0.17 \*\* | 1.13±0.14 \*\* |
| 300 | 4.02±0.04 \*\* | 3.00±0.12 \*\* | 3.96±0.10 \*\* | 3.00±0.17 \*\* |
| 500 | 4.58±0.04 \*\* | 4.30±0.10 \*\* | 4.65±0.06 \*\* | 4.30±0.02 \*\* |
| 700 | 5.38±0.08 \*\* | 3.95±0.17 \*\* | 5.56±0.05 \*\* | 4.05±0.21 \*\* |
| 900 | 4.81±0.08 \*\* | 3.62±0.21 \*\* | 5.01±0.37 \*\* | 3.97±0.02 \*\* |

Table 2-2 The effect of different concentrations of glyphosate on the micronucleus rates of DIMF and TRMF

注：测定数据用平均值±标准误表示(n=3)

与0mg/L对照组比较，经单因素方差分析，\**P*＜0.05，\*\**P*＜0.01。Notes: Data are expressed as mean±S. D. (n=3)

Compared with 0mg / L in the control group, ANOVA, \**P*＜0.05，\*\**P*＜0.01 .



图2.7 草甘膦处理二倍体（A）与三倍体（B）细胞核的形态，箭头所示为微核。

Fig. 2.7 The Nuclear morphology of DIMF(A) andTRMF(B) treated by glyphosate，arrow shows the micronucleus

### **2.2.5** 草甘膦对细胞超微结构的影响

对照组中DIMF细胞形态规则，有明显可见的核，核膜完整，细胞核边界明显，粗面内质网结构完整，有大量线粒体。TRMF细胞形态结构与DIMF相似，只是核体积较DIMF大，细胞中空泡较多。（见图2.8A，B）。经半致死浓度草甘膦处理的细胞，DIMF和TRMF病理变化一致，细胞超微结构发生明显改变：染色质凝集趋边（见图2.8C），细胞核分解成多个；线粒体、核糖体与内质网等细胞器数量减少（见图2.8D），细胞内出现空泡（见图2.8E），出现凋亡小体（见图2.8F），表现出凋亡的特征。



图2.8 草甘膦处理后DIMF和TRMF超微结构变化

A.对照组DIMF细胞；B.对照组TRMF细胞；C.细胞染色质凝集；D.细胞核分解成多个E.细胞出现大量空泡；F.出现凋亡小体

N-细胞核；Mt-线粒体；RER-粗面内质网；V-空泡；Ap-凋亡小体Fig.2.8 Ultrastructural changes of DIMF and TRMF cells after glyphosate processing. A. Control DIMF cells; B. Control TRMF cells; C. Condensation of chromosomes

D. Nucleus disintegrated into serval parts; E. Appear many vacuoles in cells; F. Appear apoptotic bodies in both cells N- nucleus; Mt- mitochondria; RER- rough endoplasmic reticulum; V- vacuoles; Ap-apoptotic bodies

## **2.3** 讨论

### **2.3.1** 细胞接种量的选择和草甘膦对细胞存活率的影响

为了使农药作用期间，细胞活力处于最佳状态，并且细胞量与OD值呈现显著的线性关系，需要选择最适的细胞接种量。将细胞按不同浓度接种量加入96孔板中，培养24h后，进行MTT分析，得出标准曲线。依据标准曲线实验采用接种密度1×105cell/mL，接种量为100μL。利用不同浓度的草甘膦分别处理DIMF与TRMF24h后，MTT法分析草甘膦对两种细胞系的毒性效应，结果显示半致死浓度分别为333.79 mg/L和384.91mg/L。二倍体细胞系的半致死浓度小于三倍体，各浓度组的存活率低于三倍体，说明二倍体细胞系对草甘膦敏感性高于三倍体。100mg/L草甘膦即对二倍体和三倍体细胞系表现出细胞毒性和生长抑制作用。魏云波等[83]和许晓辉等[3]的研究都得出了细胞死亡率随农药久效磷浓度增加而增加的变化规律，与本文的研究结果一致。

### **2.3.2** 草甘膦对细胞形态的影响

樊廷俊等[81]在研究久效磷对大黄鱼鳍细胞的毒性结果中发现，经低浓度久效磷处理的大黄鱼鳍细胞表现出细胞伸长的变化，随着久效磷浓度增加，细胞空泡化，最后脱落死亡。与本实验所做的草甘膦对细胞毒性作用的形态变化一致。说明环境可影响细胞形态的改变，而形态的改变可作为细胞对环境变化的最早反应。晚期的空泡化和脱落是细胞死亡的特征[84]。作者认为泥鳅鳍细胞系早、晚期形态的改变以及死亡率等特征可作为环境中草甘膦的检测指标，二倍体细胞系

比三倍体细胞系更敏感一些。

### **2.3.3** 草甘膦对细胞酶活力和细胞结构的影响

环境污染物作用于细胞后，会干扰细胞的正常生理代谢，引发细胞自身的各种酶系统做出应激反应，从而表现出酶活力的变化[85]。SOD是细胞抗氧化系统中的关键酶，对细胞中的活性氧（ROS）具有较强的清除能力。用不同浓度草甘膦处理二倍体和三倍体细胞24h后，发现100mg/L草甘膦浓度组即引起细胞中

SOD活性升高，在300mg/L时显著升高（*P*＜0.05）并达到最大值，以后随浓度升高，细胞中SOD活性显著下降。说明在0到300mg/L浓度组之间，细胞能够通过自身的抗氧化系统对草甘膦产生的活性氧进行清除，但当高于300mg/L草甘膦浓度组时，会导致细胞自身的抗氧化能力的不足，造成抗氧化酶系统的损伤，从而导致SOD活力的降低。AChE作为生物神经传导中的一关键酶，可降解乙酰胆碱，并且有机磷农药主要作用于AChE，可使AChE活性中心的丝氨酸羟基磷酰化从而抑制其活性。实验组0到700mg/L浓度组，导致细胞AChE活力显著降低（*P*＜0.05），并呈现明显的浓度依赖性。谷胱甘肽S转移酶（GST）是生物体内重要的解毒酶，可催化一些脂溶性物质的甲基与GSH结合，生成甲基谷胱甘肽和相应的脱甲基物质，多种污染物可导致GST活力改变，GST的活性可作为环境污染检测的一项敏感生物检测标记[86]。樊廷俊等[81]在研究久效磷对大黄鱼鳍细胞系毒性作用中得出GST活性随着久效磷浓度先增加后逐渐降低的趋势。本文中0～300mg/L草甘膦首先引起GST活性显著升高，随后又随浓度增加依赖性的降低，可能的原因是低浓度的草甘膦对细胞产生了毒性，促进了

GST酶活性，当浓度达到一定时，细胞内底物GSH耗尽，细胞内GST无法再诱导[11]。当细胞内的酶系统功能出现障碍，会使细胞表现出一系列的中毒症状。

实验中还发现经草甘膦处理的DIMF和TRMF细胞超微结构表现一致，都出现了细胞染色质趋边，细胞核分解成多个，并伴随着凋亡小体产生的细胞凋亡现象。说明草甘膦能诱导DIMF和TRMF细胞产生凋亡。当草甘膦作用细胞后，少量的ROS能够被SOD酶清除，当细胞抗氧化酶系统损伤后，细胞中ROS的增加能诱导线粒体渗透性改变和细胞色素C的释放，最后导致凋亡[87]。草甘膦

是一种有机磷除草剂，与Carlson等[86]得出的有机磷能诱导细胞凋亡的研究结果一致。

草甘膦作用于细胞后，对泥鳅鳍细胞二倍体和三倍体产生了显著的毒性作用，并引起了细胞内SOD、AChE和GST酶活性的显著变化。可以将这三种酶作为检测有机磷农药的生物指标。研究中还发现三倍体酶活力均高于二倍体，这可能与三倍体细胞体积大，胞内物质含量多，细胞活力好、分裂快、生长旺盛有关[88]。这一结论也可以为泥鳅三倍体在抗性上要优于二倍体[89]上提供理论依据。

### **2.3.4** 草甘膦对细胞微核率和核异常率的影响

由表2-2可知，草甘膦染毒后DIMF和TRMF核异常和微核率变化是一致的。与对照组比较，实验组微核率与核异常率差异显著。草甘膦处理细胞24h后，100mg/L浓度组出现微核与核异常，随着浓度增加，微核率与核异常率显著性增加（*P*＜0.01），500mg/L时出现最大微核率，以后，随浓度增加微核率反而降低。这与张贵生等[90]在研究铜离子诱发鲦鱼（*Hemiculter leucisculus*）红细胞微核的核异常率和微核率的变化是一致的。草甘膦对细胞的影响主要作用于分裂期细胞纺锤体，使染色体断裂、丢失、结构破坏[91]。带有微核和核异常的细胞仍能够存活，所以在一定范围内微核率与核异常率与浓度呈正相关，而当浓度过高时，细胞因为药物毒性作用而大量死亡，细胞核表现为坏死的症状，微核率与核异常率反而降低[92]。实验中还发现，草甘膦作用细胞后核异常率均显著提高，但出现的最大值要晚于细胞微核率，说明核异常率与微核率最大值的出现并不完全同步，原因是高浓度的药物抑制了细胞的分裂使细胞微核率下降，但其对细胞的损伤并没有减轻[24]，此时的核异常率还会继续增加。通过差异性分析可知，同一浓度下，二倍体与三倍体微核率无显著差异。核异常和微核率可作为农药对细胞损伤的指示指标。

## **2.4** 本章小结

1.通过计算得出草甘膦对DIMF和TRMF细胞系的半致死浓度分别为333.79

mg/L、384.91mg/L. DIMF对草甘膦的敏感性高于TRMF。

2.草甘膦对DIMF和TRMF细胞系毒性作用的细胞形态一致，表现为细胞伸

长，空泡化，随着草甘膦浓度增加，细胞脱落与死亡的程度加深。超微结构显示：半致死浓度处理的DIMF和TRMF细胞系出现染色质凝集趋边，细胞核分解成多个，胞内出现大量空泡，并出现凋亡小体，表现为凋亡的症状。

3.不同浓度草甘膦作用于细胞后，DIMF的SOD和GST活力随着浓度的增加而增加，随后逐渐降低，AChE活力与草甘膦浓度呈负相关。TRMF的酶活力变化规律与DIMF相似，TRMF的三种酶活力均高于DIMF。

4.草甘膦染毒后DIMF和TRMF的微核率与核异常率表现一致，100mg/L浓度组就能诱导细胞产生微核与核异常，随着浓度增加，微核率与核异常率显著性增加（*P*＜0.01），500mg/L草甘膦浓度组出现最大微核率，以后，随浓度增加微核率降低。核异常率出现最大值时期要晚于微核率最大值。

# 第三章 杀虫单对不同倍性泥鳅鳍细胞系的毒性效应

农药的使用，虽然给农业的增产增收提供了保障，却给水生生物以及人类健康带来了严重威胁[93]。相关农药毒性分析较多是利用鱼类个体开展的，近年来利用鱼类细胞系的毒性研究越来越受到重视。陆续报道的有褐色大头鲶BB细胞系[94]、虹鳟RTG-2细胞系[95]、鲈鱼心脏细胞系[96]、真鲷鳍细胞系[96]、牙鲆鳃细胞系[33]、褐点石斑鱼鳍细胞系[83]、大黄鱼鳍细胞系[63]等用于农药及海洋污染物的毒性分析中。杀虫单（monosultap）化学名称1-硫代磺酸钠基-2-二甲氨基-3-硫代磺酸基丙烷，是一种对昆虫具有触杀和胃毒作用的人工合成沙蚕毒类杀虫剂

[97]，主要用于水稻害虫的防治。目前较多报道是杀虫单在环境中残留的检测方

法[98, 99]，而利用细胞系对杀虫单的检测尚未见报道。

泥鳅作为一种环境污染指示生物，具有对农药敏感的特点，成为毒理学研究较为理想的实验材料。泥鳅毒理学研究多集中于重金属、农药等的毒性效应[100]。已有报道Hg、Cu、Pb和Zn四种重金属对泥鳅胚胎发育与仔鱼成活影响的研究

[101]，楼允东等[24]探讨了甲胺磷与敌枯双对泥鳅红细胞微核的诱导的影响。将杀

虫单用于泥鳅毒理学的研究还未见报道。本文利用实验室建立的泥鳅鳍二倍体和三倍体细胞系为实验材料，研究了杀虫单对其存活率、细胞形态、酶活力、微核率和超微结构损伤的影响。目的是探讨杀虫单对细胞的毒性作用机理，从而建立杀虫单农药的体外毒性检测体系。

## **3.1** 材料与方法

### **3.1.1** 实验材料

大连海洋大学细胞工程实验室2012年建立的DIMF和TRMF细胞系。培养条件：细胞在含20%胎牛血清DMEM/F12培养基中培养（25℃、5%二氧化碳培养箱）。

### **3.1.2** 实验仪器

同2.1.2

### **3.1.3** 试剂

90%杀虫单可溶性粉剂购于西华农药厂。

杀虫单母液用含20%FBS DMEM/F12培养基配制，经0.22μm滤膜过滤除菌，现配现用。

其余试剂及配制方法同2.1.3。

### **3.1.4** 实验方法

#### 3.1.4.1 实验设计

在超净工作台上取对数生长期、状态良好的60-70代DIMF细胞和TRMF细胞，用0.25%的胰酶消化后制成单细胞悬液，调整细胞密度为1×10 5个/ml，以每孔100μL接种于96孔板或等密度接种5mL到25mL细胞培养瓶中，培养24h后，弃掉原培养基，96孔板中加入等体积浓度为0、50、100、150、200、250、

300、350mg/L的杀虫单，每个浓度设置5个重复，用于MTT检测。培养瓶中加入5mL浓度为0、50、100、150、200mg/L杀虫单，用于酶活性、微核与核异常的研究。以上细胞均在CO2培养箱（5%, 25℃）中培养24h。

#### 3.1.4.2 杀虫单对泥鳅鳍细胞系毒性作用的MTT检测

按照2.2.4.1方法染毒24h后，MTT检测方法同2.1.4.3.

#### 3.1.4.2 杀虫单对泥鳅鳍细胞系超氧化物歧化酶（SOD）、乙酰胆碱酯酶（AChE ）、谷胱甘肽S转移酶（GST）活性检测

按照2.2.4.1方法染毒，培养24h后，三种酶活力测定同2.1.4.5，细胞蛋白含量测定同2.1.4.4。

#### 3.1.4.3 细胞微核率的测定

按照2.2.4.1染毒方法处理细胞24h后细胞微核率与核异常率测定同2.1.4.6。

#### 3.1.4.4 电镜样品制备及观察

取对照组和半致死浓度组的DIMF和TRMF细胞，电镜样品处理方法同

2.1.4.7.

#### 3.1.4.5 数据处理

用SPSS 17.0软件分析处理数据。使用t-test进行组间显著性差异分析，实验结果用平均值标准误表示，*P*＜0.05表示显著差异，*P*＜0.01表示极显著差异。

## **3.2** 结果

### **3.2.1** 杀虫单对**DIMF**和**TRMF**细胞存活率的影响

图3.1给出了不同浓度杀虫单处理DIMF和TRMF细胞24h后的存活率曲线。从图中可以看出两种细胞变化规律基本一致。50mg/L杀虫单即可引起细胞死亡，此时两者的存活率分别为95.89%与97.93%，随着浓度的增加，其存活率逐渐降低，且存在明显的浓度依赖性。测得DIMF与TRMF细胞24h半致死浓度分别为119.73mg/L、146.26mg/L。当杀虫单浓度达到300mg/L时，二倍体全部死亡，当浓度达到350mg/L时，三倍体全部死亡。总体来看，二倍体各浓度组死亡率比三倍体要高一些。



图3.1 杀虫单对DIMF和TRMF存活率的影响

Fig. 3.1 Monosultap effects on DIMF and TRMF of cell viability

### **3.2.2** 杀虫单处理**DIMF**与**TRMF**细胞的光镜观察结果

在倒置显微镜下观察，发现正常细胞排列紧密，呈成纤维样，贴壁生长（图

3.2 A，D）。染毒24h后细胞出现明显的形态学变化，二倍体和三倍体细胞形态变化规律一致。100mg/L杀虫单浓度组部分细胞胞体伸长呈线状，200mg/L杀虫单浓度组中多数细胞胞体伸长，细胞轮廓模糊，有些细胞内出现空泡或脱离培养瓶壁，悬浮在培养液中（见图3.2B，E），当杀虫单浓度达250mg/L时多数细胞变圆脱落、贴壁的很少（见图3.2C，F）。





图 3.2 不同浓度杀虫单处理DIMF与TRMF的形态变化

注：A.对照组二倍体细胞；B.200mg/L草甘膦处理的二倍体细胞形态；C.250mg/L杀虫单处理的二倍体细胞形态；D.对照组三倍体细胞；E.200mg/L杀虫单处理的三倍体倍体细胞形态；F.250mg/L杀虫单处理的三倍体细胞形态，标尺=100μm）

Fig.3.2 Morphological changes of DIMF and TRMF treated by monosultap Notes: A. Control normal DIMF; B. DIMF treated by 150mg/L monosultap; C. DIMF treated by 300mg/L monosultap; D.; Control normal TRMF; E. TRMF treated by 300mg/L monosultap；

F. TRMF treated by 700mg/L monosultap. bar=100μm

### **3.2.3** 杀虫单对泥鳅鳍细胞系酶活性的影响

#### 3.2.3.1 杀虫单对细胞系SOD的影响

不同浓度杀虫单处理DIMF和TRMF的SOD酶活性的变化如图3所示，两者变化趋势一致。杀虫单处理24h后，50mg/L杀虫单浓度组SOD酶活性和对照



\*\*

\*\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

组比较有显著增加，100mg/L草甘膦浓度组SOD活性最高，和对照组比较差异显著（*P*＜0.05），以后随浓度升高酶活性降低，各浓度组三倍体细胞系酶活力均高于二倍体细胞系（*P*＜0.01）。

图3.3 不同浓度杀虫单处理DIMF和TRMF的SOD酶活力

Fig. 3.3 Effects of different concentrations of monosultap on DIMF and TRMF loach fin cell lines’SOD activity

#### 3.2.3.2 杀虫单对细胞系AChE的影响

随杀虫单浓度的增加，二倍体与三倍体AChE酶活力与对照组比均显著性降低（*P*＜0.05），并具有浓度依赖性。但三倍体酶活力均高于二倍体细胞（*P*＜0.05）。



\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

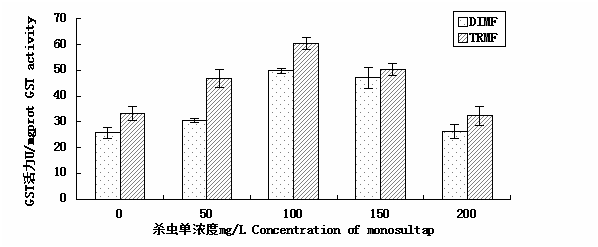
\*

图3.4 不同浓度杀虫单处理DIMF和TRMF的AChE酶活力

Fig. 3.4 Effects of different concentrations of monosultap on DIMF and TRMF loach fin cell lines’AChE activity

#### 3.2.3.3 杀虫单对细胞系GST的影响

杀虫单处理24h后，50mg/L浓度组即引起了二倍体与三倍体细胞GST活性



\*

\*

\*

\*

\*

\*

显著性增加。100mg/L浓度组酶活力显著升高，达到最大值，与对照组比较差异显著，（*P*＜0.01），随着杀虫单浓度增加酶活性又逐渐降低，各浓度组三倍体细胞系酶活性均高于二倍体细胞系（*P*＜0.05）。

图3.5 不同浓度杀虫单处理DIMF和TRMF的SOD酶活力

Fig. 3.5 Effects of different concentrations of monosultap on DIMF and TRMF loach fin cell lines’GST activity

### **3.2.4** 细胞核异常与微核率

杀虫单处理不同倍性泥鳅鳍细胞系24h微核率与核异常率变化规律如表3-1

表3-1 不同杀虫单对DIMF和TRMF微核率的影响

Table.3-1 The effect of different concentrations of monosultap on the micronucleus rates of DIMF

And TRMF

| 杀虫单monosultap mg/L | DIMF  核 异 常 率 Nuclear abnormal rate‰ | DIMF  微核率Micronucles rate‰ | TRMF  核 异 常 率 Nuclear abnormal rate‰ | TRMF  微核率Micronucleus rate‰ |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 0 | 1.12±0.06 | 0.33±0.10 | 1.27±0.04 | 0.33±0.10 |
| 50 | 1.28±0.05 \*\* | 0.67±0. 04\*\* | 1.38±0.17 \*\* | 0.67±0.14 \*\* |
| 100 | 2.02±0.04 \*\* | 1.30±0. 21\*\* | 2.95±0.10 \*\* | 1.00±0.17 \*\* |
| 150 | 3.58±0.04 \*\* | 2.60±0.10 \*\* | 3.45±0.06 \*\* | 2.60±0.02 \*\* |
| 200 | 4.81±0.08 \*\* | 3.35±0. 14\*\* | 5.01±0.37 \*\* | 3.70±0.21 \*\* |
| 250 | 5.38±0.08 \*\* | 3.30±0.2 1\*\* | 5.56±0.05 \*\* | 3.65±0.02 \*\* |

注：测定数据用平均值±标准误表示(n=3)

与0mg/L对照组比较，经单因素方差分析，\**P*＜0.05，\*\**P*＜0.01。Notes: Data are expressed as mean±S. D. (n=3)

Compared with 0mg / L in the control group, ANOVA, \**P* ＜0.05，\*\**P* ＜0.01 .

不同浓度杀虫单处理后的DIMF与TRMF均出现微核，两者的变化规律较一致，微核出现在细胞质中，呈圆形且边缘光滑，与细胞核染色一致，如图3.6A, B所示。由表一可知，经杀虫单处理后DIMF和TRMF微核率与对照组比较有显著提高，当浓度达到200mg/L时，两者的微核率最大，分别为3.3‰和3.7‰，分别为对照组的10倍和11.2倍。随着浓度增加，在同一浓度下，二倍体与三倍体之间微核率与差异不显著（*P*＞0.05）。



图3.6杀虫单处理DIMF（A）与TRMF（B）细胞核的形态，箭头所示为微核。Fig3..6 The Nuclear morphology of DIMF(A) and TRMF(B) treated by monosultap, arrow shows

The micronucleus.

### **3.2.5** 杀虫单对细胞超微结构的影响

对照组中DIMF细胞形态规则，有明显可见的核，核膜完整，细胞核边界明显，粗面内质网结构完整，有大量线粒体。TRMF细胞形态结构与DIMF相似，只是核体积较DIMF大，细胞中空泡较多。（见图3.7A，B）。经半致死浓度杀虫单处理的细胞，DIMF和TRMF病理变化一致，细胞超微结构发生明显改变：细胞核分解成多个，线粒体、核糖体与内质网等细胞器消失（见图3.7C），细胞内出现大量空泡（见图3.7D），出现凋亡小体（见图3.7F），表现出凋亡的特征。







图3.7 杀虫单处理后DIMF和TRMF超微结构变化

B.对照组DIMF细胞；B.对照组TRMF细胞；C..细胞核分解成多个；D.细胞出现大量空泡；

E.出现凋亡小体

N-细胞核；Mt-线粒体；RER-粗面内质网；Ap-凋亡小体

Fig.3.7 Ultrastructural changes of DIMF and TRMF cells after glyphosate processing.

A. Control DIMF cells; B. Control TRMF cells; C. Nucleus disintegrated into serval parts; D. Appear many vacuoles in cells; F. Appear apoptotic bodies in both cells

N- nucleus; Mt- mitochondria; RER- rough endoplasmic reticulum; Ap-apoptotic bodies

## **3.3** 讨论

### **3.3.1** 杀虫单对细胞存活率的影响

不同浓度的杀虫单分别处理DIMF与TRMF 24h后，MTT法分析杀虫单对两种细胞系的毒性效应，得出二倍体和三倍体半致死浓度分别为119.73mg/L，

146.26mg/L。二倍体细胞系的的半致死浓度小于三倍体，各浓度组的存活率低于

三倍体，说明二倍体细胞系对杀虫单敏感性高于三倍体。50mg/L杀虫单即对二倍体和三倍体细胞系表现出细胞毒性和生长抑制作用。韩招久等[102]在研究杀虫单对二化螟谷胱甘肽转移酶(GSTs)的抑制作用得出的IC50为442.89mg/L，与本实验得出的结果相差较大，原因可能是细胞与生物个体相比，体外实验细胞对药物更为敏感。

### **3.3.2** 杀虫单对细胞形态和结构的影响

对照组的DIMF和TRMF细胞系形态一致，呈成纤维样，排列紧密，细胞轮廓清晰。殷立成[33]在探讨丁草胺对牙鲆鳃细胞系急性毒性作用中发现，经丁草胺处理的细胞形态表现出细胞伸长，透明度降低的变化，随着药物浓度的增加，细胞空泡化，颗粒样物质增多，细胞间空隙加大，最后脱离培养瓶底，并最终死亡的现象。这一现象和结果与本实验的细胞形态变化一致。说明环境可影响细胞形态的改变，晚期的空泡化和脱落是细胞死亡的特征。作者认为泥鳅鳍细胞系早、晚期形态的改变以及死亡率等特征可作为环境中杀虫单的检测指标，二倍体细胞系比三倍体细胞系更敏感一些。实验中还发现经杀虫单处理的DIMF和TRMF细胞，细胞核分解成多个，并伴随着线粒体、内质网、核糖体等细胞器消失，同时细胞内出现大量空泡，并伴随着凋亡小体产生，上述变化符合细胞凋亡的特征

[86,103]，所以可初步认为杀虫单导致细胞死亡的作用机理是通过诱导其凋亡来进

行的。

### **3.3.3** 杀虫单对细胞酶活力影响

杀虫单作用于细胞后，对泥鳅鳍二倍体和三倍体细胞产生了显著的毒性作用，并引起了细胞内SOD、AChE和GST酶活性的显著变化。抗氧化系统在生物体内研究的比较多，而在生物体外研究相对较少。许多研究表明细胞中SOD活性和含量与细胞凋亡的发生有直接的联系。Peikert等[104]在研究呼吸道上皮细胞凋亡时发现，SOD活性与含量高时可以保护细胞而不发生凋亡，当SOD活性与含量降低时，细胞会受损并发生凋亡，这说明了SOD在细胞凋亡中起着重要作用。SOD对细胞中的活性氧（ROS）具有较强的清除能力，GST作为抗氧化系统中又一主要成员，在保护细胞膜方面起着重要作用，同时也能清除不同的过

氧化物，来降低农药对细胞的损伤，AChE的活性被杀虫单抑制，使细胞对药物的刺激降低，从而表现出中毒症状[105-107]。综合上述，杀虫单通过破坏DIMF 和

TRMF细胞的抗氧化酶系统平衡和神经传导路径，致使细胞内活性氧大量积累和对外界反应迟钝，从而改变细胞形态，抑制细胞生长并最终导致细胞死亡。

### **3.3.4** 杀虫单对细胞微核率和核异常率的影响

由表3-1可知，杀虫单处理后DIMF和TRMF微核率变化是一致的。经

50mg/L杀虫单浓度组处理24h，就能导致细胞产生微核，随着浓度增加，微核率与对照组比较显著性增加（*P*＜0.01），并且还出现碎核的现象。200mg/L时出现最大微核率，以后随浓度增加微核与核异常率呈现降低的趋势。微核与核异常的形成是药物作用于分裂期细胞的纺锤体，使染色体断裂、丢失、结构破坏

[91]. 楼允东等[24]在研究甲胺磷和敌枯双两种农药对泥鳅红细胞微核影响时发现

在一定浓度范围内，细胞微核率与农药浓度呈正相关，之后随农药浓度增加微核率不再增加，核异常率却继续增加，原因是高浓度药物抑制细胞分裂而使微核率下降，此时却还能继续对细胞核造成损伤，细胞核异常率仍然会增加。这一结论与本实验研究结果较为一致，通过分析比较可知，二倍体与三倍体细胞微核率比较差异不显著（*P*＞0.05），说明50mg/L杀虫单就能对细胞核产生损伤，并对

DIMF和TRMF细胞核损伤程度相同。利用微核率检测对揭示农药对水生生物体的潜在危害及作用本质具有重要意义，可以将微核率作为检测杀虫单对细胞损伤的指标。

## **3.4** 本章小结

1. MTT法得出DIMF和TRMF细胞系的半致死浓度分别为119.73 mg/L、

146.26mg/L. DIMF对草甘膦的敏感性高于TRMF。

2.杀虫单对DIMF和TRMF细胞系形态影响的结果一致，表现为细胞伸长，透明度降低和空泡化，随着杀虫单浓度增加，细胞脱落与死亡的程度加深。超微结构显示：半致死浓度处理的DIMF和TRMF细胞系出现染色质凝集趋边，细胞核分解成多个，胞内出现大量空泡，并出现凋亡小体，表现为凋亡的症状。

3.不同浓度杀虫单作用于细胞后，DIMF的SOD和GST活力随着浓度的增加而增加，随后逐渐降低，AChE活力与草甘膦浓度呈负相关。TRMF的酶活力

变化规律与 DIMF 相似，TRMF 的三种酶活力均高于 DIMF。4.杀虫单作用DIMF和TRMF细胞的微核率与核异常率表现一致，50mg/L

浓度组就能诱导细胞产生微核与核异常，随着浓度增加，微核率与核异常率显著性增加（*P*＜0.01），200mg/L草甘膦浓度组出现最大微核率，以后，随浓度增加微核率降低。核异常率出现最大值时期要晚于微核率最大值。

# 第四章 结论

利用泥鳅鳍二倍体和三倍体细胞系探讨了草甘膦与杀虫单的毒性作用机制。采用MTT法分析了两种农药对两个倍性细胞系的24h半致死浓度，同时对细胞形态，细胞酶活力，微核率及核异常率，细胞超微结构等进行了比较分析，得出以下结论：

1. MTT法得出，DIMF对草甘膦与杀虫单的敏感性高于TRMF。

2.光镜观察结果显示：经不同浓度草甘膦与杀虫单处理的DIMF与TRMF细胞形态表现为细胞伸长，透明度降低的变化，随着药物浓度的增加，细胞空泡化，颗粒样物质增多，细胞间空隙加大，最后脱离培养瓶底，并最终死亡的现象。说明环境能改变细胞的形态，泥鳅鳍细胞系早、晚期形态的改变可以作为检测草甘膦与杀虫单的检测指标。

3.超微结构观察结果显示：经草甘膦与杀虫单处理的DIMF和TRMF细胞，细胞核分解成多个，并伴随着线粒体、内质网、核糖体等细胞器消失，同时细胞内出现大量空泡，并伴随着凋亡小体产生，说明草甘膦与杀虫单能诱导泥鳅鳍二倍体和三倍体细胞产生凋亡。

4.草甘膦与杀虫单作用于细胞后，并能引起细胞内抗氧化酶SOD、GST活力呈现先增加后降低的趋势，AChE酶活力持续降低。同时，TRMF细胞酶活力显著高于DIMF。

5.微核结果显示：100mg/L草甘膦与50mg/L杀虫单即能使细胞核产生损伤而形成微核与核异常，微核率与核异常随着草甘膦与杀虫单浓度增加呈现先增加后降低的趋势，核异常率出现最大值时期要晚于微核率最大值。可以将微核率与核异常率作为检测草甘膦与杀虫单对细胞核损伤的指标。

参考文献

[1]于淼，管华诗，郭华荣，张士璀.鱼类细胞培养及其应用[J].海洋科学,2003, 03: 4-8.

[2]姜泽东，周伯文，段晶晶。鱼类细胞培养的研究与应用[J]. 北京水产,2008,03:42-47.

[3]徐晓辉. 两种星鲽组织细胞系的建立及久效磷对其毒性作用的研究[D].中国海洋大学,2010。

[4] Wolf k, Quimby M C. Established eurthermicline of fish cells in virto[J], Science, 1962,135(23):1065-1066.

[5]张博，陈松林. 近10 年鱼类细胞培养研究进展及应用展望[J]. 海洋科

学,2011,07:113-121.

[6] Chen S L, Ren G C, Sha Z X, *et al*. Development and characterization of a continuous embryonic cell line from turbot (*Scophthalmus* maximus)[J]. Aquaculture,2005,249(1):63-68.

[7]孟凡华，尹洪滨，孙中武，等. 鲤鱼(*Crprinus* carpio)体细胞系的建立及其生物学

特性分析[J]. 实验生物学报，2005，38(1):80-84.

[8] Zhou G Z, Gui L, Li Z Q, *et al*. Establishment of a Chinese sturgeon Acipenser sinensis tail-fin cell line and its susceptibility to frog iridovirus [J]. Fish Biol, 2008, 73:2058-2067.

[9] Ye H Q, Chen S L, Sha Z X, *et al*. Development and characterization of cell lines from heart, liver, spleen and head kidney of sea perch (*Lateolabrax* japonicas)[J]. Journal of fish biology, 2006, 69(sa): 115-126.

[10] Villena A J. Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control[J]. Reviews in fish biology and Fisheries, 2003, 13:111-140.

[11] Rachlin J W, Perlmutter A. Fish cells in culture for study of aquatic toxicants[J].

Water Research, 1968, 2(6): 409-414.

[12] Araújo C S A, Marques S A F, Carrondo M J T, *et al*. In vitro response of the brown bullhead catfish (BB) and rainbow trout (RTG-2) cell lines to benzo [a] pyrene[J]. Science of the total environment, 2000, 247(2): 127-135.

[13] Kohlpoth M, Rusche B, *et al*. Flow cytometric measurement of micronuclei induced in a permanent fish cell line as a possible screening test for the genotoxicity of industrial waste waters[J]. Mutagenesis, 1999, 14(4): 397-402.

[14] Ferrero M, Castano A, Gonzalez A, *et al*. Characterization of RTG-2 fish cell line by random amplified polymorphic DNA[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 1998, 40(1): 56-64.

[15] Braunbeck T, Neumüller D. The COMET assa y in permanent and primary fish cell cultures-a novel system to detect genotoxicity[J]. vitro Cell. Dev. Biol, 1996, 32: 61A

[16] Kammann U, Bunke M, Steinhart H, *et al*. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay[J]. Mutation Research, 2001, 498(1): 67-77.

[17]范立民， 陈家长， 吴伟， 等. 4 种除草剂对黄鳝遗传毒性的研究[J]. 农业环境

科学学报, 2006, 24(4): 701-704.

[18]曾瑄，赵大春，周炜洵，等. 荧光原位杂交检测乳腺癌HER2 基因状态[J]. 中华病理学杂志, 2006, 34(11): 701-705.

[19] Price C M. Fluorescence in situ hybridization[J]. Blood reviews, 1993, 7(2): 127-134.

[20] Pinkel D, Landegent J, Collins C, *et al*. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988, 85(23): 9138-9142.

[21] Matter B, Schmid W. Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test[J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1971, 12(4): 417-425.

[22] Schmid W. The micronucleus test[J]. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, 1975, 31(1): 9-15.

[23] Brunetti R, Majone F, Gola I, *et al*. Micronucleus Test: Examples of Application to Marine Ecology[J]. Marine Ecology Progress Series, 1988, 44(1):65-68.

[24]楼允东，吴萍.两种农药对泥鳅红细胞微核和核异常的诱导[J].上海水产大学学报.1994，3(3)：104-110.

[25] Schultz N, Norrgren L, Grawe J, *et al*. Micronuclei frequency in circulating erythrocytes from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) subjected to radiation, an image analysis and flow cytometric study[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 1993, 105(2): 207-211.

[26] Kohlpoth M, Rusche B, Nüsse M. Flow cytometric measurement of micronuclei induced in a permanent fish cell line as a possible screening test for the genotoxicity of industrial waste waters[J]. Mutagenesis, 1999, 14(4): 397-402.

[27] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al*. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. Experimental cell research, 1988, 175(1): 184-191.

[28] Tice R R, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing[J]. Environmental and molecular mutagenesis, 2000, 35(3): 206-221.

[29] Fairbairn D W, Olive P L, O'Neill K L. The comet assay: a comprehensive review[J]. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, 1995, 339(1): 37-59.

[30] Collins A R. The comet assay for DNA damage and repair[J]. Molecular biotechnology, 2004, 26(3): 249-261.

[31] Pavlica M, Klobučar G I V, MojašN, *et al*. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay[J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2001, 490(2): 209-214.

[32]魏渲辉，汝少国，姜明，魏建功，李永祺. 有机磷农药对鱼类的毒性效应及内分

泌扰乱作用[J]. 海洋科学,2002,09:27-31.

[33]殷立成. 除草剂丁草胺对牙鲆及其鳃细胞系的急性毒性研究[D].中国海洋大学,2007。

[34] Winston G W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 1991, 100(1): 173-176.

[35] Michiels C, Remacle J. Use of the inhibition of enzymatic antioxidant systems in order to evaluate their physiological importance[J]. European Journal of Biochemistry, 1988, 177(2): 435-441.

[36] Röhrdanz E, Ohler S, Tran -Thi Q H, *et al*. The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE cells[J]. The Journal of nutrition, 2002, 132(3): 370-375.

[37] Yu M, Li S M, Li X Y, et al. Acute effects of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid on the antioxidant enzyme system of mouse liver[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2008, 71(3): 903-908.

[38] McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein [J]. Journal of Biological chemistry, 1969, 244(22): 6049-6055.

[39] Fridovich I. The biology of oxygen radicals[J]. Science, 1978, 201(4359): 875-880.

[40] Gamble S C, Goldfarb P S, Porte C, *et al*. Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (Mytilus edulis, Pecten maximus, Carcinus maenas and Asterias rubens)[J]. Marine Environmental Research, 1995, 39(1): 191-195.

[41] Livingstone D R, Lips F, Martinez P G, *et al*. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common musselMytilus edulis[J]. Marine Biology, 1992, 112(2): 265-276.

[42] Doyotte A, Cossu C, Jacquin M C, *et al*. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve Unio tumidus[J]. Aquatic toxicology, 1997, 39(2): 93-110.

[43] Llopis I, Arandiga R, Real E, *et al*. Lymphangiomyomatosis mimicking an abdominal lymphoma[J]. Haematologica, 2002, 87(10): 23.

[44]张曙明， 田金改. 中药中有机磷农药残留量的毛细管气相色谱测定方法[J].

分析测试学报, 1999, 18(5): 15-17.

[45]徐炜. 高效液相色谱法测定环境水体中8 种农药残留量[J]. 环境与健康杂

志, 2000, 17(6): 362-363.

[46]苟中坤. 有机磷农药的匈曼反应[J]. 分析化学, 1994, 22(1): 41-43.

[47] Lorke D. A new approach to practical acute toxicity testing[J]. Archives of toxicology, 1983, 54(4): 275-287.

[48] Sprague J B. Measurement of pollutant toxicity to fish I. Bioassay methods for acute toxicity[J]. Water Research, 1969, 3(11): 793-821.

[49] Gaines T B. Acute toxicity of pesticides[J]. Toxicology and applied pharmacology, 1969, 14(3): 515-534.

[50]修瑞琴， 许永香. 砷与镉， 锌离子对斑马鱼的联合毒性实验[J]. 中国环境科

学, 1998, 18(4): 349-352.

[51]张四明，邓怀. 长江水系钱草鱼遗传结构及变异性的RAPD研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25(4)：324-330.

[52]赵元凤，吕景才. 镉污染对鲢鱼超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的影响[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(3)：267-271.

[53]高晓莉，齐凤生. 铜，汞，铬对泥鳅的急性毒性和联合毒性实验[J]. 水利渔业, 2003, 23(2)：63-64.

[54]吴乃虎， 王钢锋， 阎景智， 等. 草鱼和鲤鱼线粒体DNA 的分离纯化及其

COI基因的分子克隆[J]. 动物学报, 1991, 37(4): 375-382.

[55] Babich H, Goldstein S H, Borenfreund E. In vitro cyto-and genotoxicity of organomercurials to cells in culture[J]. Toxicology letters, 1990, 50(2): 143-149.

[56] Brüschweiler B J, Würgl er F E, Fent K. Cytotoxicity in vitro of organotin compounds to fish hepatoma cells PLHC-1 (Poeciliopsis lucida)[J]. Aquatic toxicology, 1995, 32(2): 143-160.

[57] Bury N R, Jie L, Flik G, *et al*. Cortisol protects against copper induced necrosis and promotes apoptosis in fish gill chloride cells in vitro[J]. Aquatic Toxicology, 1998, 40(2): 193-202.

[58] Bieberstein U, Braunbeck T. Light and scanning electron microscopic cytopathology of 3, 5-dichlorophenol in the permanent fish cell line RTG-2[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 1998, 41(3): 298-306.

[59] Braunbeck T. Cytological alterations in fish hepatocytes following in vivo and in

Vitro sublethal exposure to xenobiotics—structural biomarkers of environmental contamination[M] //Fish ecotoxicology. Birkhäuser Basel, 1998: 61 -140.

[60]王道飞. 季铵盐碘和季磷盐碘对三种鱼类肝细胞的毒性研究[D]. 长江大学，

2014.

[61] Simon H U, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction[J]. Apoptosis, 2000, 5(5): 415-418.

[62] Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis[J]. Science (New York, NY), 1998, 281(5381): 1309-1312.

[63]樊廷俊， 夏兰， 韩贻仁. 线粒体与细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理学报，

2001, 33(1): 7-12.

[64] Yousefi S, Green D R, Blaser K, *et al*. Protein-tyrosine phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophils and neutrophils[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91(23): 10868-10872.

[65]周垂帆，李莹，张晓勇，等. 草甘膦毒性研究进展[J]. Environmental Sciences,

2013, 22(10): 1737-1743.

[66]邓晓，李雅琦. 草甘膦对土壤微生物影响的研究[J]. 农药, 2005, 44(2): 59-62.

[67]耿德贵，韩燕. 除草剂农达对黄鳝致突变性研究[J]. 徐州师范大学学报： 自然科学版, 2000, 18(2)：59-61.

[68] Williams G M, Kroes R, Munro I C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2000, 31(2): 117-165.

[69] Nosanchuk J D, Ovalle R, Casadevall A. Glyphosate inhibits melanization of Cryptococcus neoformans and prolongs survival of mice after systemic infection[J]. Journal of Infectious Diseases, 2001, 183(7): 1093-1099.

[70] Yousef M I, Salem M H, Ibrahim H Z, *et al*. Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits[J]. Journal of Environmental Science & Health Part B, 1995, 30(4): 513-534.

[71]曾明， 黄婷， 易吉平，等. 草甘膦对GC-1 小鼠精原细胞的毒性作用及N-乙

酰半胱氨酸的干预效应[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 27(S1): 51-51.

[72]黄雅俊. 杀虫单在土-水-稻中残留降解动态的研究[D]. 浙江大学, 2003。

[73]陈晓琴，李羡筠，陈婷婷，等. 化学农药对大白兔的眼刺激性[J]. 毒理学杂志, 2006, 19(A03): 280-281.

[74]杜启艳，李宁宁，崔俊丽，等.柠檬黄对大鳞副泥鳅的急性毒性及遗传毒性实验[J].水生态学杂志，2009，(3)：81-84.

[75]谢志浩，蔡亚非.四种除草剂对泥鳅红细胞微核和核异常的诱导[J].水产科学，

2004(6):17-19.

[76] Titenko-Holland N, Levine A J, Smith M T, *et al*. Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde[J]. Mutation Research/Genetic Toxicology, 1996, 371(3): 237-248.

[77] Pérez S, Guillamón M, BarcelóD. Quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge from wastewater treatment plants[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 938(1): 57-65.

[78] Villena A J. Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture[J]. Reviews in fish biology and Fisheries, 2003, 13(1): 111-140.

[79] Rachlin J W, Perlmutter A. Fish cells in culture for study of aquatic toxicants[J]. Water Research, 1968, 2(6): 409-414.

[80]李红岩.有机磷农药对牙鲆鳃细胞系的体外细胞毒性效应[D].青岛海洋大学，

2002.

[81]樊廷俊，孙爱，杨秀霞，等.大黄鱼鳍细胞系的建立及久效磷对其毒性作用的研究[J].中国海洋大学学报，2010,40(12)：67-70.

[82]薛庆善. 体外培养的原理与技术（第一版）[M]. 北京：科学出版社.1999, 1-5.

[83]魏云波. 褐点石斑鱼（*Epinephelus fuscoguttatus*）三种细胞系的建立、病毒敏感性以及环境污染物对其毒性作用的研究[D].中国海洋大学,2009。

[84]司维柯，肖桃元，康格非. 苦参碱对人肝癌细胞HepG-2 的细胞形态影响和相关增殖因素的变化[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(6)：553-556.

[85]田秀梅， 周启星， 王林ft. 氯烃类污染物的生态行为与毒理效应研究进展[J].

生态学杂志, 2005, 24(10): 1204-1210.

[86] Carlson K, Jortner BS, Ehrich M. Organophosphorus compound-induced apoptosisd in SH-SY5Y human neuroblastona cells[J]. Toxical Appl Pharmacol, 2000, 168(2):102-113.

[87] Simon H U, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction[J]. Apoptosis, 2000, 5(5): 415-418.

[88]李霞，马辰，等.不同倍性泥鳅鳍细胞系的建立及生物学特性分析[J].水生生

物学报，2014，38(1)：150-155.

[89]吴萍，吴小松，等. 三倍体与二倍体泥鳅的组织细胞学比较[J]. 水产学报.2007, 31(1)：01-05.

[90]张贵生，朱道玉.铜离子诱发鲦鱼红细胞微核及核异常的研究[J].环境与健康杂志，2006, 23(6):543.

[91]苑宇哲，徐仕霞，姚春生，等.应用蝌蚪快速检测环境变异的两种方法—微核试验和单细胞凝胶电泳[J].四川动物，2004，(1)：74-76.

[92]耿德贵，王秀琴，刘士旺，等.除草剂使它隆对黄鳝细胞的致突变作用研究

[J].环境与健康杂志，2000，(2)：103-105.

[93]杨先乐，湛嘉，黄艳平. 有机磷农药对水生生物毒性影响的研究进展[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(4)：378-382.

[94] Martin-Alguacil N, Babich H, Rosenberg D W, *et al*. In vitro response of the brown bullhead catfish cell line, BB, to aquatic pollutants[J]. Archives of environmental contamination and toxicology, 1991, 20(1): 113-117.

[95] Jobling S, Sumpter J P. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) hepatocytes[J]. Aquatic toxicology, 1993, 27(3): 361-372.

[96]郭华荣. 海水鱼细胞系FG, SPH 和RSBF 的特性分析及其在典型海洋污

染物毒性检测上的应用[D]. 中国科学院海洋研究所, 2001。

[97]李羡筠，甘永金，郑艳艳.沙蚕毒农药杀虫单原药的致突变作用[J]. 应用预防医学，2007, 06: 365-367.

[98] Sandra P, Guillamon M, Barcelod D. Quantitative analysis of *polycyclicaromatic hydrocarbons* in sewage sludge from wastewater treatment plants [J]. Journal of

Hromatography, 2001, 938 (59): 57-65.

[99]黄雅俊.杀虫单在土-水-稻中残留降解动态的研究[D]. 浙江大学, 2003。

[100]陈玉明，卢少勇，朱旭，等.泥鳅在污染物毒性评价中的应用[J]. 生态毒理 学报, 2013, 4: 002。

[101]周立红，陈学豪，秦德忠.四种重金属对泥鳅胚胎和仔鱼毒性的研究[J]. 厦门水产学院学报, 1994, 16(1)：11-19.

[102]韩招久，韩召军，陈长琨，等. 杀虫单对二化螟谷胱甘肽转移酶(GSTs)的抑制作用[J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(3)：27-30.

[103] Carlson K, Jortner BS, Ehrich M. Organophosphorus compound-induced apoptosisd in SH-SY5Y human neuroblastona cells[J]. Toxical Appl Pharmacol, 2000, 168(2):102-113.

[104] Peikert T, Specks U, Farver C, *et al*. Comhair," Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis[C]. Cancer Research. 2006:4693--4700.

[105]朱丽岩. 几种环境内分泌干扰物对青岛近海常见海洋动物的毒性效应[D].

中国海洋大学,2005。

[106] 闫建国, 汝少国, 邴欣, 王蔚. 久效磷对黄鳝过氧化氢酶和Na+, K+-ATP酶活性的影响[J]. 环境科学研究, 2006, 19(3): 96-100.

[107] Galgani F, Bocquene G. In vitro inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates[J]. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 1990, 45(2): 243-249.

# 攻读硕士期间发表的学术论文目录

单莉娟，向阳，李霞，王茂林，秦艳杰，吴迪，白丽雯. 松江鲈脾组织细胞的短期培养及染色体分析[J]. 大连海洋大学学报，2015, 02: 161-164.

向阳，李霞，秦艳杰等.草甘膦对不同倍性泥鳅鳍细胞系的毒性效应[J]. 水产学报

（外审中）。

# 独创性说明

作者郑重声明：本硕士论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包括其他人已经发表或撰写的研究成果，也不包含为获得大连海洋大学或其他单位的学位或证书所使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的贡献均已在论文中做了明确的说明并表示了谢意。

作者签名：

年月日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者和指导教师完全了解大连海洋大学有关保留、使用学位论文的规定：即学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的纸质版和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人同意大连海洋大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索、交流。

学位论文作者签名：导师签名：

签字日期：签字日期：

致 谢

匆匆三年，逝者如斯。遥想当年背着行囊踏入大连海洋大学，距今已有三年。三年研究生学习时光，积满了沉甸甸的回忆。

论文的完成，离不开恩师李霞教授耐心地指导。[授人以鱼不如授人以渔](http://www.haosou.com/s?q=%E6%8E%88%E4%BA%BA%E4%BB%A5%E9%B1%BC%E4%B8%8D%E5%A6%82%E6%8E%88%E4%BA%BA%E4%BB%A5%E6%B8%94&amp;ie=utf-8&amp;src=wenda_link)，置身其间，耳濡目染，使我接受了全新的思想观念，树立了宏伟的学术目标，领会了基本的思考方式，从论文的选题、试验设计乃至成文过程无不倾注着恩师的心血。李老师博闻强记，学识渊博，为我展现了知识的无限魅力，她严谨的科研精神、实事求是的学术作风和平易近人的师表风范更是使我受益匪浅。在此，谨向恩师表示我崇高的敬意和衷心的感谢。

感谢秦艳杰老师在我实验过程中的悉心帮助，在她的帮助下实验才能顺利完成。秦老师工作认真负责、兢兢业业的工作态度，在未来工作中将时刻影响着我。感谢王福景师兄、马辰师姐在学习生活中给予的帮助和宝贵的意见，感谢同门裴爱君、单莉娟、杨艳津，还有吴迪、白丽雯、蒋玉荣、王文文师妹们陪我度过实验室的时光和对我实验的帮助，还要感谢刚进实验室的师弟李壮壮与师妹周诗珈，你们为实验室增添了新的血液；非常感谢室友刘辉、彭国干和张兴志，还有好友杜鑫、胥贤、朱德鹏与你们相识，我感到无比幸运，研究生生活因为你们而更加精彩。

最后，由衷感谢我的家人，焉得谖草，言树之背，是你们把我养育成人，教会我做人的道理，教导我做事的方法，敦促我努力学习报效社会。在此，祝愿你们身体健康。同时，感谢所有关心我的亲人和朋友，你们就是我一直前进的动力！

向阳

2015年6 月