

## 西玛津对 MN9D 细胞增殖影响\*

杨君微, 于佳, 吴艳萍, 李百祥

**摘要:**目的 探讨西玛津(Simazine)对多巴胺能神经前体细胞系(MN9D)细胞增殖的影响。方法 选择 MN9D 细胞, 分别以 50、300、600  $\mu\text{mol/L}$  西玛津染毒, 同时设溶剂对照及空白对照, 采用噻唑蓝(MTT)法检测西玛津对 MN9D 细胞生存率影响; 利用倒置显微镜观察染毒后细胞形态改变。结果 西玛津能破坏体外培养 MN9D 细胞形态、抑制其生长和分化; 高剂量西玛津染毒 12、24、36、48、60、72 h 时, MN9D 细胞存活率分别为  $(85.62 \pm 1.07)\%$ 、 $(71.92 \pm 0.43)\%$ 、 $(67.42 \pm 0.45)\%$ 、 $(60.04 \pm 0.11)\%$ 、 $(48.71 \pm 0.76)\%$ 、 $(40.63 \pm 0.86)\%$ , 与溶剂对照组比较, 高剂量西玛津染毒组在染毒各时段细胞存活率均降低( $P < 0.01$ ); 各剂量组细胞存活率随染毒时间增大而下降, 并具有剂量-反应关系( $P < 0.01$ )。结论 除草剂西玛津对 MN9D 细胞有增殖毒性。

**关键词:**西玛津; 除草剂; 多巴胺能神经前体细胞系(MN9D); 细胞增殖率

中图分类号: Q 2-33 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2014)06-0751-02 DOI: 10.11847/zgggs2014-30-06-17

### Effect of simazine on proliferation of MN9D

YANG Jun-wei, YU Jia, WU Yan-ping, et al (Department of Health Toxicology, School of Public Health, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang Province 150081 China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of simazine on proliferation of MN9D cells. **Methods** The MN9D cells *in vitro* were treated with simazine at concentrations of 0  $\mu\text{mol/L}$ , 50  $\mu\text{mol/L}$ , 300  $\mu\text{mol/L}$ , and 600  $\mu\text{mol/L}$  and with 0.5% dimethyl sulfoxide(DMSO) as solvent control. The effect of simazine on the survival rate of MN9D was detected with methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay. Morphological change of MN9D cells was observed with inverted microscope. **Results** Simazine damaged the morphology of MN9D cells. Compared to that of the solvent control group, all of the survival rate of MN9D cells in the high dose group  $(85.62 \pm 1.07\%$ ,  $71.92 \pm 0.43\%$ ,  $67.42 \pm 0.45\%$ ,  $60.04 \pm 0.11\%$ ,  $48.71 \pm 0.76\%$ , and  $40.63 \pm 0.86\%$  for 12, 24, 36, 48, 60, and 72 hours) decreased significantly ( $P < 0.01$  for all). With the increase simazine dose and exposure time, the survival rate of MN9D cells decreased with a dose-time dependent manner. **Conclusion** Herbicide simazine has inhibitive effect on proliferation of MN9D cells.

**Key words:** simazine; herbicide; MN9D; proliferation rate

西玛津又叫西马嗪, 化学名称为 2-氯-4,6-双(乙胺基)均三氮苯或 6-氯-N,N-二乙基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺, 西玛津是现在世界范围内广泛使用的控制经济作物杂草的均三氮苯类除草剂之一<sup>[1-2]</sup>, 其具有价格低廉、杀草广谱、除草速度快等优点; 但西玛津残效期长, 较难降解, 对环境及人类健康的影响日趋严重。本研究通过噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法探讨西玛津对 MN9D 细胞增殖的影响, 结果报告如下。

#### 1 材料与方法

**1.1 细胞株** 多巴胺能神经前体细胞系(MN9D) (货号: 0514A077, 上海佛雷堡生物科技发展有限公司), 用含 10% 胎牛血清的高糖型细胞培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) (美国 Gibco BRL 公司) 置于 37℃ 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养, 传代备用。

**1.2 主要仪器与试剂** 西玛津(纯度 98%, 浙江中山化工有限公司), 用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) (天津博迪化工股份有限公司) 配置西玛津的 200 倍储备液, 染毒时稀释到最终浓度。CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Revco technologies 公司); 倒置显微镜、照相系统(日本 NIKON 公司); 高压灭菌装置(日本 Sanyo 公司); 干热灭菌箱(天津泰斯特仪器有限公司); 80-2 型离心机(上海手术器械厂)。胎牛血清(美国 Hyclone 公司); 胰酶(上海碧云天生物有限公司); MTT(美国 AMRESCO 公司)。

**1.3 指标与方法** MTT 试验: 调整细胞悬液浓度  $1 \times 10^4$  个/mL, 均匀接种到 96 孔板, 每孔 90  $\mu\text{L}$ , 培养箱内培养至对数生长期; 实验设西玛津 50、300、600  $\mu\text{mol/L}$  3 个浓度梯度, 分别染毒 12、24、36、48、60、72 h, 同时设置阴性对照组(DMEM 培养液)及溶剂对照组(0.5% DMSO), 每组均设置 5 个复孔; 西玛津染毒组、阴性对照组及溶剂对照组分别于每

\* 基金项目: 国家自然科学基金(81072332)

作者单位: 哈尔滨医科大学卫生毒理学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150081

作者简介: 杨君微(1986-), 女, 黑龙江大庆人, 硕士在读, 研究方向: 卫生毒理学。

通讯作者: 李百祥, E-mail: libaix@ems.hrbmu.edu.cn

数字出版日期: 2014-4-16 17:01

数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140416.1701.029.html>

孔中加入 10  $\mu\text{L}$  西玛津、DMEM 培养液及 0.5% DMSO, 每孔加 20  $\mu\text{L}$  MTT(终浓度为 5 mg/mL) 溶液, 继续培养 4 h; 终止培养, 吸净培养液, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 震荡 10 min, 使结晶物溶解充分; 波长 490 nm 处测吸光度(A)值, 计算各组细胞存活率。细胞形态改变: 倒置显微镜观察染毒后细胞形态变化, 并拍照。

1.4 统计分析 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 组间比较采用 *t* 检验, 多组比较采用方差齐性检验及方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 西玛津对 MN9D 细胞形态影响 对照组细

胞表面光滑饱满, 界限清晰, 突起连接构成神经网络。西玛津染毒后, 在相同剂量情况下, 随着染毒时间延长, 细胞浓缩变形, 细胞间隙变大, 边界模糊, 胞体暗淡无光, 突起逐渐变形, 尤其高剂量组细胞形态不规则, 细胞死亡数量明显增多, 呈现弥漫性肿胀、空泡及核固缩样等细胞凋亡改变, 细胞排列更紊乱; 随着染毒时间延长, 细胞损伤尤为严重。

2.2 西玛津对 MN9D 细胞增殖影响(表 1) 与溶剂对照组比较, 相同染毒剂量下, 随染毒时间延长, 细胞存活率明显降低, 存在时间 - 效应关系 ( $P < 0.01$ ); 相同染毒时间下, 随剂量增加, 细胞存活率也明显降低, 存在剂量 - 效应关系 ( $P < 0.01$ )。

表 1 西玛津对 MN9D 细胞存活率影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别 ( $\mu\text{g/mL}$ )	染毒时间(h)					
	12	24	36	48	60	72
阴性对照组	100 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00
溶剂对照组	99.22 $\pm$ 0.32	98.99 $\pm$ 0.20	97.36 $\pm$ 1.22	96.26 $\pm$ 0.79	93.88 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	90.70 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>
西玛津 50	93.13 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>	86.84 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>	82.04 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	78.23 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	67.49 $\pm$ 1.11 <sup>b</sup>	52.41 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>
300	89.99 $\pm$ 0.66 <sup>b</sup>	81.17 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>	70.17 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	69.69 $\pm$ 2.62 <sup>b</sup>	53.74 $\pm$ 0.91 <sup>b</sup>	45.67 $\pm$ 0.84 <sup>b</sup>
600	85.62 $\pm$ 1.07 <sup>b</sup>	71.92 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>	67.42 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>	60.04 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	48.71 $\pm$ 0.76 <sup>b</sup>	40.63 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>

注: 与阴性对照组比较,  $a P < 0.01$ ; 与溶剂对照组比较,  $b P < 0.01$ 。

## 3 讨论

目前西玛津对环境污染以及对动物的损伤研究比较多<sup>[3-4]</sup>, 主要集中在免疫毒性、生殖毒性等方面<sup>[5-8]</sup>; 而对西玛津的细胞毒性研究较少, 尤其是对神经细胞毒性研究。本研究选用 MN9D 细胞为靶细胞, MN9D 细胞是一种由 14 d 胚胎小鼠中脑顶盖的多巴胺能神经细胞和 N18TG 细胞系融合而成的杂交瘤细胞系, 是多巴胺能细胞<sup>[9]</sup>。本研究结果表明, 西玛津可破坏体外培养 MN9D 细胞形态、抑制其生长和分化, 并导致 MN9D 细胞存活率下降, 且具有时间 - 反应关系与剂量 - 效应关系。提示西玛津可能具有神经毒性, 但其具体毒性作用及机制还有待进一步研究。

### 参考文献

[1] Tierney D, Clarkson JR, Christensen BR. Exposure to the herbicides atrazine and simazine in drinking water [M]. Washington: Oxford University Press, 1998: 13 - 16.

- [2] Ware GW, Whitacre DM. The pesticide book [M]. 6th edition, Willoughby OH: Meister PRO, 2004: 35 - 39.
- [3] Barbash JE, Thelin GP, Kolpin DW, et al. Major herbicides in ground water: results from the national water-quality assessment [J]. Journal of Environmental Quality, 2001, 30: 831 - 845.
- [4] Calderoo MJ, Ortega M, Hermosin MC, et al. Hexazinone and simazine dissipation in forestry field nurseries [J]. Chemosphere, 2004, 54: 1 - 8.
- [5] 任锐, 王明秋, 郑晶, 等. 除草剂西玛津对小鼠的免疫毒性作用 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2009, 27(10): 601 - 603.
- [6] 高淑英. 西玛津对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国公共卫生, 2006, 22(1): 111.
- [7] Kim KR, Son EW, Hee-Um S, et al. Immune alterations in mice exposed to the herbicide simazine [J]. Toxicol Environ Health, 2003, 66(12): 1159 - 1173.
- [8] Kim KR, Son EW, Rhee DK, et al. The immunomodulatory effects of the herbicide simazine on murine macrophage functions *in vitro* [J]. Toxicol In Vitro, 2002, 16(5): 517 - 523.
- [9] Han BS, Hong HS, Choi WS, et al. Caspase-dependent and independent cell death pathways in primary cultures of mesencephalic dopaminergic neurons after neurotoxin treatment [J]. Neurosci, 2003, 23(12): 5069 - 5078.

收稿日期: 2013-06-03

(解学魁编辑 刘铁校对)