

梨形四膜虫毒性试验方法

张 志 学

(河北省肿瘤研究所细胞生物研究室)

梨形四膜虫* (*Tetrahymena pyriformis*)^[7] 是广泛分布在中污性水体中, 较容易采集到的一种单细胞动物。是能够成功地人工无菌培养为单株的一个种^[6]。由于它繁殖快, 用于细胞毒性试验, 可以缩短实验研究的周期, 是一种廉价的、比较理想的实验动物^[1]。

本文介绍汞、镉、铅、锌及锰五种重金属离子对梨形四膜虫的毒性作用的研究, 采用了半

抑制浓度 (简称 IC_{50}) 及 10% 抑制浓度 (简称 IC_{10}) 试验方法。兹将其研究试验方法及结果报告如下。

材 料 与 方 法

一、材料

* 新种由北大生物系鉴定和建株。

1. 细胞株: HS1 株梨形四膜虫^[4]。
2. 培养液: 豚 豚 2 克
酵母浸出汁 1 克
葡萄糖 0.5 克
双蒸水 100 毫升

根据需要量按上记比例配制,待溶解后滤去沉渣。然后,用 5%NaOH 调 pH 至 7.2,分装、高压灭菌 10 磅 30 分钟,放置 4℃ 冰箱中备用。

3. 聚苯乙烯微孔培养板, 4 × 10 孔。
4. 移液器, 50 微升。
5. 玻璃毛吸管(自制)。
6. 计数框(用载玻片自制)。
7. 生物显微镜和体视显微镜。
8. 试剂: 使用重金属化合物 HgCl₂、CdCl₂、MnCl₂、ZnCl₂ 及 Pb(CH₃COO)₂ 为分析纯,用十万分之一天平称量。

二、方法

1. 方法的依据 测定细胞繁殖的半抑制浓度 (IC₅₀) 就是以不加毒性物质的对照孔的繁殖率为 100%, 比较换算出在相同量的培养细胞中,加入一定浓度的毒性物质时,所发生的繁殖抑制率^[5]。习惯上常将造成 50% 繁殖抑制率的毒性物质浓度,称为对细胞繁殖的半抑制浓度。造成 10% 繁殖抑制率的毒性物质浓度,称

为对细胞繁殖的 10% 抑制浓度。

关于半抑制浓度和 10% 抑制浓度的具体计算方法,是依据目测概率单位法^[6] 进行统计计算和求出的。

2. 试验步骤 在试验前 1—2 天,要事先对保种的 HS1 株梨形四膜虫进行传代培养。作繁殖抑制试验时,要求使用在 27℃、24 小时内分裂 8 次以上的、正常活泼的细胞群。试验开始,在 25 倍体视显微镜下,吸出 5 个细胞放入盛有 50 微升培养液加 50 微升双蒸水的聚苯乙烯微孔培养板的培养孔中,为对照组。试验孔(组)则分别吸取 5 个细胞,放入盛有 50 微升培养液加 50 微升不同浓度重金属水溶液的培养孔中。然后,将微孔培养板盖好,放入 27℃ 恒温箱内的、铺好湿纱布的、带盖搪瓷盘中,以防止微孔中的液体蒸发。培养 24 小时,尽数取出每个培养孔中的四膜虫细胞,分别在计数框内,用一小滴 10% 甲醛液杀死固定。在显微镜下直接计数、记录每个培养孔中的繁殖后的存活细胞数目。各孔的繁殖抑制率依下列公式求算:

$$\text{繁殖抑制率} = \frac{\text{对照孔的存活细胞数} - \text{各试验孔的存活细胞数}}{\text{对照孔的存活细胞数}} \times 100\%$$

根据四次试验的算数平均数,分别计算出五种重金属不同对数浓度下的细胞繁殖抑制

表 1 五种重金属离子对梨形四膜虫的 IC₅₀

(单位:毫克/升)

化合物	重金属离子	IC ₅₀	对数值标准误	95% 可信区间
HgCl ₂	Hg ⁺⁺	0.10	0.0048	0.098—1.022
CdCl ₂	Cd ⁺⁺	0.11	0.0065	0.107—0.113
ZnCl ₂	Zn ⁺⁺	2.62	0.0162	2.522—2.718
Pb(CH ₃ COO) ₂	Pb ⁺⁺	0.41	0.0035	0.401—0.414
MnCl ₂	Mn ⁺⁺	10.99	0.0035	10.79—11.14

表 2 五种重金属离子对梨形四膜虫的 IC₁₀

(单位:毫克/升)

化合物	重金属离子	IC ₁₀	对数值标准误	95% 可信区间
HgCl ₂	Hg ⁺⁺	0.04	0.0048	0.039—0.041
CdCl ₂	Cd ⁺⁺	0.02	0.0065	0.019—0.021
ZnCl ₂	Zn ⁺⁺	0.10	0.0162	0.093—0.104
Pb(CH ₃ COO) ₂	Pb ⁺⁺	0.20	0.0035	0.196—0.203
MnCl ₂	Mn ⁺⁺	5.50	0.0035	5.409—5.583

表3 测得 IC_{10} 、 IC_{50} 同各国饮用水卫生标准比较

(单位: 毫克/升)

重金属	$IC_{10}/100^*$	$IC_{50}/100^*$	中 国 ^[2]	WHO	欧 洲 ^[2]	美 国 ^[2]	苏 联 ^[2]
Hg ⁺⁺	0.0004	0.001	0.001	0.001	—	0.05	(0.005)**
Cd ⁺⁺	0.0002	0.0011	0.01	0.01	0.01	0.05	0.01
Pb ⁺⁺	0.002	0.0041	0.1	0.5	0.1	0.05	0.1
Zn ⁺⁺	0.001	0.0262	1.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Mn ⁺⁺	0.055	0.1099	0.1	0.1	0.1	0.05	(1.0)**

* 因各国标准已采用了1/100的安全系数,故应以 $IC_{10}/100$ 、 $IC_{50}/100$ 同标准比较。

** 括弧内为地面水标准。

率。然后,将繁殖抑制率查表换算成概率单位,再依据目测概率单位法,进行统计计算求五种重金属的半抑制浓度及10%抑制浓度。

实 验 结 果

试验测得五种重金属离子对梨形四膜虫细胞的半抑制浓度(IC_{50})、对数值标准误及95%可信区间。见表1。

测得五种重金属离子对梨形四膜虫细胞的10%抑制浓度(IC_{10})、浓度的对数值标准误及95%可信区间。见表2。

讨 论 和 小 结

试将本试验用梨形四膜虫细胞测得的半抑制浓度和10%抑制浓度同我国和世界各国饮用水卫生标准^[2]加以比较,详见表3。

从表3的数据比较中,可以看出:除汞的 IC_{50} 值同中国和世界卫生组织的卫生标准值相平;锰的 IC_{10} 值接近美国卫生标准;锰的 IC_{50} 值接近中国、世界卫生组织和欧洲各国饮用水

卫生标准值外,其它本试验利用梨形四膜虫测得的汞、镉、铅及锌的 IC_{10} 、 IC_{50} 值,均明显低于我国和世界各国饮用水卫生标准值。

综上,笔者认为:使用梨形四膜虫细胞测定 IC_{10} 及 IC_{50} 方法,可作为检测水污染重金属的毒性的指标。

参 考 文 献

- [1] 四川医学院主编 1979 目测概率单位法,卫生统计学,88—91,人民卫生出版社。
- [2] 辽宁省卫生防疫站等 1972 车间、大气、地面水有害物质卫生标准资料,114—119。
- [3] 张志学等 1981 重金属对梨形四膜虫细胞分裂的影响,中国环境科学,1(6): 78—80。
- [4] 曹同庚等 1982 九个新株梨形四膜虫的生物学特征,中国原生动物学学会第一次学术讨论会论文摘要汇编,15—16。
- [5] 下山正德等 1979 抗癌药物的细胞杀伤作用的定量法,人癌细胞培养(大屋章一主编,吴政安等译),科学出版社,324。
- [6] 野沢義則 1981 培養法,原生動物細胞,2—14,講談社。
- [7] 野沢義則 1981 原生動物分類法,原生動物細胞,17—18,講談社。