

特丁净致突变性与蓄积毒性实验研究

Study on the Mutagenicity and Cumulative Toxicity of Terbutryn

杨卫超¹/徐立²

(1. 河北省疾病预防控制中心, 河北 石家庄 050041; 2. 邢台市第五医院, 河北 邢台 054027)

YANG Wei-chao¹, Xu Li²

(1. Hebei Province Center for Disease Prevention and Control, Shijiazhuang 050041, Hebei, China; 2. Xingtai Fifth Hospital, Xingtai 054027, Hebei, China)

【摘要】背景与目的: 研究特丁净的致突变性与蓄积毒性。材料与方法: 采用小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验, 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验 (Ames 试验), 小鼠骨髓多染红细胞微核试验, 固定剂量蓄积毒性系数法。结果: 小鼠睾丸 M1 期精母细胞染色体畸变数阴性对照组与特丁净各剂量组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而阴性对照组和特丁净各剂量组均低于环磷酰胺组 ($P < 0.05$); 小鼠骨髓多染红细胞微核率阴性对照组与特丁净原药各剂量组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 而阴性对照组和特丁净各剂量组均明显低于环磷酰胺组 ($P < 0.01$); 四株试验菌在各试验剂量下 (活化或非活化) 均没有引起自发回变数呈 2 倍的增加, 5.0 mg/皿剂量组对四个菌株均有抑菌作用, 而 0.5、1.0、2.0 mg/皿组无剂量反应关系。特丁净原药蓄积系数为 1.4。结论: 特丁净原药根据《农药登记毒理学试验方法》评定标准, 未呈现致突变性, 小鼠骨髓多染红细胞微核试验在所选剂量范围内结果为阴性, 小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验在所选剂量范围内结果为阴性, 但蓄积毒性明显。

【关键词】特丁净原药; Ames 试验; 微核试验; 蓄积毒性

中图分类号: R991 文献标识码: A 文章编号: 1004-616X(2006)06-0482-03

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To study the mutagenicity and cumulative toxicity of terbutryn. MATERIALS AND METHODS: Strains TA₉₇, TA₉₈, TA₁₀₀ and TA₁₀₂ with or without S₉ were used for Ames test (at doses of 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0 mg/plate). Also used micronucleus assay of polychromatic erythrocytes (at doses of 400, 800 and 1 600 mg/kg) and spermatogonia chromosome aberration test on mice (at doses of 200, 400 and 800 mg/kg). RESULTS: Ames test showed that terbutryn group didn't cause double increase of revertants with or without S₉ addition in any of the bacterial strain. Four doses, 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0 mg/plate showed no dose-response relationship. No significant difference was found in the micronucleus test and the chromosome aberration test between negative control group and test groups. There was significant difference between those groups and positive control group. Seven days later half of the mice died of cumulative toxicity test. Its cumulation coefficient is 1.4. CONCLUSION: Terbutryn had no mutagenic effect according to these tests but showed significant cumulative toxicity.

【KEY WORDS】 terbutryn; Ames test; micronucleus assay; cumulative toxicity

特丁净为新型除草剂, 主要用于冬小麦、大麦、高粱、向日葵、马铃薯、豌豆、大豆、花生等作物田间, 与人民生活关系紧密, 为了解其亚急性毒性与蓄积毒性特征, 我们进行了本试验。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物用昆明小鼠, 体重 25~30g, 雌雄各半, 由河北省实验动物中心提供, II 级合格动物。特丁净原药

收稿日期: 2006-03-02; 修订日期: 2006-06-06

作者简介: 杨卫超, (1970-) 男, 河北省石家庄人, 主管医师。研究方向: 农药和工业化学品毒理。

为白色粉末,由河北省某化工企业提供。

1.2 方法

根据中华人民共和国国家标准 GB15670-1995《农药登记毒理学试验方法》进行试验和评价。

1.2.1 小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验 将小鼠随机分成不同特丁净剂量的 3 个剂量组和阴性对照、阳性对照组共 5 组,每组 5 只。3 个剂量组特丁净剂量分别为 800、400、200 mg/kg,阴性对照组用植物油,各剂量组及阴性对照组小鼠隔夜禁食,连续 5 d 经口灌胃给药;阳性对照组用生理盐水稀释的环磷酰胺,按 50 mg/kg 连续 5 d 腹腔注射给药。各组均于给药后第 13 d 将动物处死,动物处死前 6 h 腹腔注射秋水仙素 4 mg/kg。取双侧睾丸常规制片、Giemsa 染色。油镜下对每只动物观察 100 个初级精母细胞。计数各处理组的 x-y 单价体、常染色单价体及染色体结构变化。

1.2.2 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验 (Ames 试验) 采用平板掺入法。特丁净按 0.5、1.0、2.0、5.0 mg/皿剂量设 4 个剂量组,并设空白对照和 DMSO 溶剂对照各 1 组,以 9-苄酮(0.2 μg/皿)、2-AF(20 μg/皿)、Na3(2.5 μg/皿)、MMC(1.0 μg/皿)、1,8-二羟基萘醌(50 μg/皿)作阳性对照。将受试物按剂量(加或不加 S₉)和 0.1 ml 菌液,加入 2 ml 保温在 45℃ 的顶层琼脂中,混匀,迅速倒入底层培养基上,37℃ 培养 48 h,计数每皿回变菌落数。每个剂量三个平行皿,重复一次。

1.2.3 小鼠骨髓多染红细胞微核试验 将小鼠随

机各分成 5 组,每组雌雄各 5 只,特丁净设 1 600、800、400 mg/kg 的 3 个剂量组和阴性对照组、阳性对照组。阴性对照组使用植物油;阳性对照组使用环磷酰胺,剂量均为 50 mg/kg。特丁净各剂量组小鼠连续经口给药 2 次,阳性对照组采用腹腔注射给药,两次间隔 24 h,给药后 30 h 取材。断髓处死动物,用止血钳挤出胸骨髓液,滴在载玻片一端的胎牛血清液中涂片,甲醇固定,Giemsa 染色。油镜下计数每只动物镜检 1 000 个嗜多染红细胞,计算微核率。

1.2.4 蓄积毒性试验 采用固定剂量蓄积毒性系数法。40 只小鼠,随机分为染毒组和对照组两组,每组 20 只,雌雄各半,以 1/5 LD₅₀ 的剂量,每日灌胃,观察并记录动物死亡数。当实验组累计发生一半动物死亡即可终止试验。此时,计算累积总接触剂量 [LD₅₀(n)],根据下列公式计算 K 值进行评价。

$$K = LD_{50}(n) / LD_{50}$$

若接触剂量累积达到 5 个 LD₅₀ 剂量,也可终止试验,此时计算出 K > 5。固定剂量法试验期为 25 ~ 100 d。

1.2.5 统计学方法 数据以二项分布检验进行统计学分析,检验水准为 α = 0.05。

2 结果

2.1 小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验 结果见表 1。

小鼠睾丸 M1 期精母细胞染色体畸变数阴性对照

表 1 特丁净小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验结果

Table 1 The results of spermatocytes chromosomal aberration test in mice for Terbutryn

group	dose(mg/kg)	No. of cells scored	Structure abnormality of chromosome	No. of sex chromosomal univalents	No. of autosomal univalents
Test group *、△	800	500	1	0	1
	400	500	0	1	0
	200	500	1	1	0
Negative control #	-	500	1	0	0
Positive control	-	500	26	9	7

Compared with negative control, * P > 0.05; Compared with positive control, △ P < 0.05, # P < 0.05.

组与阳性对照组比较差异有统计学意义 (P < 0.05); 特丁净原药各剂量组均与阴性对照组差异无统计学意义 (P > 0.05), 均低于环磷酰胺组 (P < 0.05), 各剂量组间无剂量反应关系。

2.2 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验 (Ames 试验) 四株试验菌在各试验剂量下(活化或非活化)均没有引起自发回变数 2 倍增加, 5.0 mg/皿剂量组对四个菌株均有抑菌作用, 其余剂量组间无剂量反应关系, 见表 2。

2.3 小鼠骨髓多染红细胞微核试验 结果见表 3。特丁净原药小鼠骨髓细胞微核试验结果经统计学

处理, 小鼠骨髓多染红细胞微核率阴性对照组与阳性对照组比较差异均有统计学意义 (P < 0.05); 特丁净原药各剂量组均与阴性对照组间无明显差异 (P > 0.05), 但均明显低于环磷酰胺组 (P < 0.01), 各剂量组间无剂量反应关系。

2.4 蓄积毒性试验

以特丁净 1/5 LD₅₀ 剂量连续灌胃 7 d, 染毒试验组小鼠死亡半数 (10 只), 计算得 K = 1.4, 蓄积毒性为明显蓄积。



表 2 特丁净对鼠伤寒沙门氏菌的回变结果
Table 2 The results of Ames test for Terbutryn

group	dose (mg/plate)	TA ₉₇		TA ₉₈		TA ₁₀₀		TA ₁₀₂	
		- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉
Test group	0.5	114 ± 8.1	117 ± 11.9	32 ± 2.0	31 ± 2.9	121 ± 11.3	122 ± 11.5	267 ± 17.7	269 ± 23.9
	1.0	118 ± 10.6	121 ± 11.8	34 ± 1.9	32 ± 1.9	128 ± 9.1	127 ± 13.4	262 ± 15.7	261 ± 19.2
	2.0	101 ± 7.9	119 ± 10.5	24 ± 7.0	29 ± 3.1	118 ± 10.9	121 ± 9.7	238 ± 15.5	244 ± 17.6
	5.0	40 ± 8.5	52 ± 16.7	11 ± 4.4	13 ± 6.1	74 ± 41.8	77 ± 38.6	128 ± 37.1	109 ± 24.7
Blank control	-	119 ± 11.2	122 ± 13.9	33 ± 3.3	35 ± 2.9	144 ± 10.1	128 ± 19.9	293 ± 12.4	273 ± 17.4
Solvent control	-	116 ± 8.9	117 ± 9.5	33 ± 2.9	36 ± 3.4	135 ± 24.1	125 ± 12.0	292 ± 9.6	276 ± 16.3
Positive control	-	1 910 ± 105 ^a	1 420 ± 89 ^b	3 953 ± 136 ^a	2 916 ± 225 ^d	2 116 ± 139 ^e	2 312 ± 188 ^b	1 171 ± 117 ^d	1 253 ± 105 ^e

a: a-fluorenone(0.2 μg/ plate); b: 2-AF(20 μg/ plate); c: NaN₃(2.5 μg/ plate); d: MMC(1.0 μg/ plate); e: 1, 8 dihydroxy anthraquinone (50 μg/plate)

表 3 小鼠骨髓多染红细胞微核试验结果
Table 3 The results of micronucleus test of bone marrow PCE in mice for Terbutryn

group	dose (mg/kg)	No. of animal	No. of PCE scored	No. of micronucleus	Requency of micronucleus PCE ($\bar{x} \pm s, \%$)
Test group [*]	1 600	10	10 000	16	1.6 ± 0.97
	800	10	10 000	20	2.0 ± 1.69
	400	10	10 000	17	1.7 ± 1.17
Negative control	Corn oil	10	10 000	13	1.3 ± 0.95
Positive control	Cyclophosphamide	10	10 000	174	17.4 ± 5.95 [△]

Compared with negative control ^{*} P > 0.05; compared with negative control and test group, [△] P < 0.01.

3 讨论

我们利用 3 项致突变试验从体内体外两个层次探讨特丁净的潜在危害。其中,鼠伤寒沙门氏菌突变试验是应用最广泛的检测基因突变的方法,了解受试物对体外细胞的致突变作用,在 Ames 试验中的 4 株标准突变型菌株中,TA₉₇、TA₉₈ 可检测各种移码型的致突变物,TA₁₀₀ 可检测碱基对置换的致突变物,TA₁₀₂ 可检测氧化型的致突变物。通过观察小鼠骨髓微核及睾丸精母细胞染色体畸变试验,可推测其对体内体细胞及生殖细胞的损害,并预测该除草剂的致癌可能性。结果显示,在本试验剂量的条件下,特丁净的小鼠骨髓细胞微核试验,睾丸精母细胞染色体畸变试验以及 Ames 试验均为阴性结果,未显示致突变性。林爱军等^[1]用特丁净做彗星实验、Moretti 等^[2]以人体血液外围淋巴细胞为材料,采用姊妹染色体交换、微核实验和彗星实验研究豆田除草剂特丁净的基因毒性,结果姊妹染色体交换、微核实验和彗星实验表明与 S₉ 混合后特丁净不引起 DNA 的伤害,但不与 S₉ 混合则引起细胞 DNA 的伤害。本实验结果与其基本一致,表明特丁净可作为农作物的除草农药。

特丁净蓄积毒性试验结果表明,本品有明显的蓄积毒性。本实验室以前试验结果显示特丁净原药大鼠急性经口试验 LD₅₀ 为 2 000 mg/kg;张宏军^[3]报道在 70 °C、pH 5~9 条件下无明显水解,土壤中 DT₅₀ 14~28 d,表明其在自然条件下有较高的稳定性,特丁净作为内吸传导型除草剂,使用时可用在植物的芽前、芽后期除草,土壤中持效期 3~10 周^[4],因此安全使用的问题应该引起关注,首先是施药人员连续作业时,注意防止本药的蓄积中毒,其次在农作物施药与收获期应注意有足够的时间间隔。

参考文献:

- [1] 林爱军,耿春女,朱永官. 细胞凝胶电泳技术及在土壤生态毒理学中的应用[J]. 生态学杂志 2005, 24(8): 975-979.
- [2] Moretti M, Marcarelli M, Villarini M, et al: In vitro testing for genotoxicity of the herbicide terbutryn: cytogenetic and primary DNA damage[J]. Toxicol In Vitro. 2002 Feb; 16(1): 81-83.
- [3] 张宏军. 除草剂在土壤中移行的原理、途径及过程[J]. 世界农药, 2002, (06), 46-47.
- [4] 冯彦华. 特丁净除草剂[J]. 世界农药, 1996, (2): 32-33.