

· 实验研究 ·

吡虫啉原药致突变实验研究

An experimental mutagenesis study on active compound of imidacloprid

贾强, 郭启明, 谢琳, 刘衍忠, 赛琳霖

JIA Qiang GUO Qiming XIE Lin LIU Yanzhong SAI Linlin

(山东省职业卫生与职业病防治研究所, 山东 济南 250002)

摘要: 为探讨吡虫啉原药的致突变性, 预测其遗传危害性和潜在致癌作用的可能性。采用昆明种健康小鼠经口灌胃染毒吡虫啉原药, 小鼠骨髓多染红细胞微核实验的染毒剂量分别为 90、45、23 mg/kg, 睾丸细胞染色体畸变实验的剂量分别为 150、75、38 mg/kg。取其股骨或睾丸组织, 常规制片, 观察分散良好的中期分裂相。鼠伤寒沙门氏菌回复突变 (Ames) 实验采用平板掺入法, 染毒剂量分别为 5 000、1 000、200、40 μ g/皿。结果小鼠骨髓多染红细胞微核实验、小鼠睾丸细胞染色体畸变实验显示, 吡虫啉原药组与阴性对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Ames实验显示, 不同测试浓度下各菌株的回变菌落数均未超过自发回变菌落数的 2倍。提示在本实验条件下吡虫啉原药无致突变性。

关键词: 农药; 杀虫剂; 吡虫啉; 致突变性

中图分类号: R99 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2008)02-0114-02

吡虫啉 (imidacloprid) 是我国新开发的农药品种, 属硝基亚甲基类内吸杀虫剂。它对生物体的作用与烟碱相似, 能与乙酰胆碱受体结合, 但不被乙酰胆碱酯酶分解, 使生物体神经系统受过度刺激而导致神经传导受阻, 进而导致死亡, 对刺吸式口器害虫有很好的防治作用^[1]。由于吡虫啉具有广谱、高效及优良的内吸性和高残效性、低毒、低蓄积性^[2]等特点, 在我国得到了广泛应用。

为保护环境和人类健康, 预测潜在的遗传危害, 我们以小鼠骨髓多染红细胞微核实验、小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变实验以及鼠伤寒沙门氏菌回复突变 (Ames) 实验对其进行了遗传毒性的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

昆明种小白鼠, 体重 25~35 g, 由山东大学实验动物中心提供, 实验动物为 SPF级, 动物许可证号为: SCXK (鲁) 2003-0004。菌种 TA97、TA98、TA100和 TA102 由中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所提供, 经生物学鉴定均符合实验要求。大鼠肝微粒体 (S_9), 本实验室自制, 液氮保存储用。吡虫啉原药, 为浅黄色粉末, 不溶于水, 由青岛凯源祥化工有限公司提供, 实验时吐温-80助溶, 蒸馏水配制。

收稿日期: 2007-09-18 修回日期: 2007-11-20

作者简介: 贾强 (1978-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 遗传毒理学。

1.2 方法^[3]

1.2.1 小鼠骨髓多染红细胞微核实验 (1) 剂量与分组: 选健康小鼠 50只, 雌雄各半, 按体重随机分为 5组, 每组 10只。其中实验组分为高、中、低 3个剂量组, 剂量分别为 90、45、23 mg/kg, 相当于经口 LD_{50} 的 1/10、1/20、1/40。阴性对照组给予与实验组等量的吐温蒸馏水溶液, 阳性对照组动物腹腔注射环磷酰胺 (CP) 40 mg/kg。(2) 染毒与制片: 实验动物每日经口给药 1次, 连续 2 d。第 2天给药后 6 h处死动物, 处死前 4 h腹腔注射秋水仙素 4 mg/kg。取两侧股骨骨髓常规制片, Giemsa染色, 油镜观察分析, 每只动物观察 100个分散良好的中期分裂细胞, 计算畸变率 (%)。

1.2.2 小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变实验 (1) 剂量与分组: 选健康雄性小鼠 50只, 按体重随机分为 5组。其中实验组分为 150、75、38 mg/kg 3个吡虫啉剂量组。阳性对照组按 2 mg/kg剂量的丝裂霉素 (MMC) 在动物处死前 12 d一次性腹腔注射。阴性对照组给予与实验组等量的吐温蒸馏水溶液灌胃。(2) 染毒与制片: 实验动物每日经口给药 1次, 连续 5 d。第 5天给药后喂养 7 d。于动物处死前 6 h腹腔注射秋水仙素 4 mg/kg。动物处死后立即取出睾丸, 常规制片, Giemsa染色, 油镜观察 5只动物标本, 每只动物观察 100个处于终变期-中期 I 分裂相细胞。

1.2.3 Ames实验 (1) 剂量与分组: 根据受试物抑菌程度, 确定实验浓度 5 000、1 000、200、40 μ g/皿, 每个浓度设 3个平行样品组, 同时设自发回变和阳性对照组。阳性对照组: 非活化实验使用敌克松 (50 μ g/皿)、叠氮钠 (1.5 μ g/皿), 活化实验使用 2-氨基苄 (2-AF, 10 μ g/皿); (2) 平板掺入法: 采用经鉴定符合要求的 4株 (TA97、TA98、TA100和 TA102) 标准突变型菌株, 用多氯联苯 (PCB) 诱导的大鼠肝匀浆制备的 S_9 混合液作为代谢活化系统。向融化并保温在 45℃的 2 ml 顶层培养基试管中依次加入实验样品 0.1 ml、增菌液 0.1 ml 和 0.5 ml S_9 混合液混匀, 迅速倾入底层培养基上, 培养基冷凝后, 将平板翻转, 37℃培养 48 h后计数每皿回变菌落数。

1.3 统计学分析

小鼠骨髓多染红细胞微核实验及小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变实验所得各组的染色体畸变率用 χ^2 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 小鼠骨髓微核实验及睾丸细胞染色体畸变实验

吡虫啉原药组与阴性对照组比较, 实验结果差异无统计学意义 ($P>0.05$); 阳性对照组与阴性对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 见表 1。

表 1 吡虫啉原药骨髓微核及睾丸细胞染色体畸变实验结果 (n=10)

组别	骨髓细胞染色体畸变				睾丸细胞染色体畸变			
	剂量 (mg/kg)	观察细胞数 (个)	畸变数 (个)	畸变率 (%)	剂量 (mg/kg)	观察细胞数 (个)	畸变数 (个)	畸变率 (%)
高剂量染毒	90	1 000	13	1.3	150	500	1	0.20
中剂量染毒	45	1 000	14	1.4	75	500	1	0.20
低剂量染毒	23	1 000	10	1.0	38	500	0	0.00
阴性对照	0	1 000	10	1.0	0	500	1	0.20
阳性对照	40	1 000	263	26.3 [△]	2	500	30	6.00 [△]

注: 阳性对照物为 CP MMC 与阴性对照组比较, $\Delta P<0.01$

表 2 吡虫啉原药 Ames 实验结果

组别	剂量 (μg/皿)	TA97		TA98		TA100		TA102	
		-S	+S	-S	+S	-S	+S	-S	+S
受试样品	5 000	141	163	31	34	140	171	275	303
	1 000	134	159	30	33	154	163	281	294
	200	138	147	29	32	158	166	283	297
	40	147	155	32	31	162	159	273	288
阴性对照	0	137	154	30	32	151	162	273	295
敌克松 *	50	1 924	—	1 620	—	—	—	>3 000	—
叠氮钠 *	1.5	—	—	—	—	1 893	—	—	—
2-AF*	10	—	1 688	—	2 042	—	1 420	—	1 069

注: * 为阳性对照, “—” 为阴性。

3 讨论

吡虫啉对生态环境的遗传毒理学研究, 国内外已经有了较多报道。封少龙^[4]等应用微核实验和单细胞凝胶电泳技术检测了吡虫啉对黑斑蛙蝌蚪及成体的遗传毒性。结果表明, 吡虫啉达 8 mg/kg 时蝌蚪红细胞微核率与对照组相比, 差异有统计学意义, 并且随着剂量的增加有明显剂量-效应关系; 对青蛙红细胞的 DNA 损伤与阴性对照组相比, 有显著性差异, 且有明显的剂量-效应关系。该作者还以体外细胞染毒方式应用单细胞凝胶电泳技术对小鼠外周血淋巴细胞和精原细胞进行了实验研究^[5], 发现吡虫啉在最低浓度 0.05 mg/L 时, 彗星细胞率与阴性对照组比就有极显著性差异, 并存在明显的剂量-效应关系。钟远^[6]等对吡虫啉进行了蚕豆根尖微核实验和小鼠骨髓多染红细胞微核实验, 结果发现吡虫啉对蚕豆根尖细胞和小鼠骨髓多染红细胞微核率均无明显影响 ($P>0.05$)。

在本实验条件下, 小鼠骨髓多染红细胞微核实验、小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变实验以及鼠伤寒沙门氏菌回复突变 (Ames) 实验均为阴性结果, 表明吡虫啉原药无致突变作用。

致突变实验在鉴定潜在致癌物和揭示致癌作用机制上有重要意义, 其中通过观察染色体形态结构和数目改变, 分析动物骨髓、睾丸染色体畸变这个终点, 可以推测人的体细胞损害, 从而预测化学物的致癌可能性。鼠伤寒沙门氏菌突变实验是应用最广泛的检测基因突变的有效方法, TA97、TA98 可检测各种移码型的突变物, TA100 可检测引起碱基对置换的致突变物, TA102 则对各种氧化型的突变物敏感。本实验以小鼠为研究对象, 采

2.2 Ames 实验

各剂量组吡虫啉原药的回变菌落数均未超过自发回变菌落数的 2 倍, 亦未呈剂量-反应关系, 见表 2。

用体内染毒方式研究其基因突变和染色体畸变, 实验结果与文献报道结果一致^[6]。另外, 微核实验与细胞的分裂密切相关, 微核实验中细胞需经过 2 个周期, 难以避免的存在 DNA 修复过程^[7-8]。因此, 今后的研究中有必要采取更加敏感、避免细胞自身修复过程的方法, 如单细胞凝胶电泳实验, 对体内染毒的哺乳动物进行研究, 以进一步探讨其遗传毒性机制。

参考文献:

[1] 王振荣. 农药商品大全 [M]. 北京: 中国商业出版社, 1996: 345-346.
[2] 张珍玲, 唐玲芳, 姜允中. 新杀虫剂吡虫啉的急性毒性和蓄积作用观察 [J]. 南京医科大学学报, 1996, 16 (3): 274-275.
[3] 国家技术监督局. GB15670-1995 农药登记毒理学实验方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1995.
[4] 封少龙, 孔志明, 王五香. 应用微核试验和单细胞凝胶电泳技术检测农药对青蛙蝌蚪及成体的遗传毒性 [J]. 水生生物学报, 2004, 28 (1): 52-57.
[5] 封少龙, 孔志明, 王新明. 应用彗星试验研究两种农药对小鼠 DNA 的损伤 [J]. 南京大学学报, 2003, 39 (5): 580-585.
[6] 钟远, 孔志明, 臧宇. 吡虫啉与抑食肼的毒理学研究 [J]. 农药, 1999, 38 (9): 15-16.
[7] 陈军建, 夏宜铮. 青蛙蝌蚪微核试验——一种水体诱变剂检测系统的建立 [J]. 水生生物学报, 1993, 17 (4): 298-307.
[8] 耿德贵, 张大生. 四种除草剂对中华大蟾蜍蝌蚪红细胞微核及核异常的影响 [J]. 动物杂志, 2000, 35 (1): 12-16.