甲胺基阿维菌素苯甲酸盐原药对大鼠致畸毒性研究

Experiment study on the teratogenicity of an amectin benzoate in rats

谢广云, 王健, 赵文锦, 刘黎, 孙金秀

XIE Guangyun WANG Jian ZHAO Wenjin LIU Li SUN Jinxu

(中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100050)

摘要: 将受孕的雌鼠随机分为低、中、高 3 个染毒剂量组和溶剂对照组, 每组 15 只孕鼠。分别染毒 1、4、8 mg/kg 的甲胺基阿维菌素苯甲酸盐原药, 溶剂对照组经口给予蒸馏水。对照组和各染毒组在母鼠受孕后 7~16 d 采用灌胃法染毒, 于妊娠第 20 天处死母鼠, 观察母鼠和胎鼠的生长发育情况。8 mg/kg 组妊娠动物于染毒 3~5 d 后出现间断性四肢颤抖和抽搐, 染毒结束后, 症状逐渐减轻或消失; 胎鼠的骨骼检查中可见枕骨发育不全和胸骨缺失, 骨骼畸形率为 12.76%, 与溶剂对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。中、低剂量组各项检查与对照组比较差异无统计学意义。提示在本实验条件下, 甲胺基阿维菌素苯甲酸盐原药对大鼠的母体毒性和胚胎发育毒性的未观察到有害作用剂量 (NOAEL) 为 4 mg/kg 无致畸作用。

关键词: 甲胺基阿维菌素苯甲酸盐; 致畸性; 母体毒性; 胚胎毒性; 大鼠

中图分类号: R994.6 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2009)06-0443-02

甲胺基阿维菌素苯甲酸盐是一种高效生物农药, 具有低毒、高效、高选择性及与环境相容性好等特点, 对小菜蛾(吊丝虫)、甜菜夜蛾(青虫)、菜青虫和棉铃虫等顽固性抗药性害虫及各种有害螨虫(蜘蛛类)有特效, 故被大量推广使用。为探讨甲胺基阿维菌素苯甲酸盐原药的致畸作用, 进行了本次实验。

1 材料与与方法

1.1 受试物

甲胺基阿维菌素苯甲酸盐原药, 纯度 94.6%, 淡黄色粉末, 不易溶于水, 室温避光保存, 由国内某农药厂提供。试验时受试物中加入适量吐温-80 搅拌、混匀, 再加蒸馏水配成所需浓度的混悬液。

1.2 实验动物

Wislar 大鼠, 清洁级, 雌性 60 只, 体重 200~240 g, 雄性 60 只, 260~300 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验前观察 3 d 确认健康后进行实验。动物饲养于中国疾病预防控制中心动物实验室清洁级动物房, 饲料由北京科奥协力饲料有限公司提供。

收稿日期: 2009-07-30

作者简介: 谢广云 (1966-), 女, 副主任技师, 研究方向: 卫生毒理学及安全性评价。

1.3 动物分组及剂量

1.3.1 孕鼠 通过将雌、雄大鼠 1:1 同笼饲养, 次日早晨检查, 以查到阴栓认为交配成功, 计为妊娠 0 天。

1.3.2 染毒剂量 将受孕的雌鼠随机分为低、中、高 3 个染毒剂量组和溶剂对照组, 每组 15 只孕鼠。染毒剂量分别为 1、4、8 mg/kg, 溶剂对照组经口给予蒸馏水。

1.3.3 染毒方法 对照组和各染毒剂量组在母鼠受孕后 7~16 d 均采用灌胃法给药, 根据动物体重的变化调整灌胃量。各组动物于妊娠第 20 天处死。

1.4 检测指标

1.4.1 孕鼠体重与日常观察 每 3 天称量动物体重一次, 每日观察大鼠的症状, 包括皮肤、毛、眼、黏膜、呼吸、神经状态、四肢活动、进食和饮水状况等的变化。

1.4.2 畸形检查 母鼠妊娠第 20 天断头处死动物, 剖腹取出子宫称重, 检查并记录着床数、活胎数、死胎数(估测死胎发生时间)、吸收胎数、外观畸形, 测量仔鼠的体重、身长和尾长。

1.4.3 骨骼检查 1/2 存活仔鼠经过 95% 乙醇固定 3 周, 72 h KOH 透明和茜素红-S 染色后, 分别置于透明液 A 和透明液 B 2 d 使软组织褪色。体视显微镜下检查受试样品对仔鼠骨骼发育的影响, 包括颅骨、胸骨、前后肢骨和其他骨骼的骨化程度、异变和畸形等。

1.4.4 内脏检查 1/2 存活仔鼠 Bouin 液中固定 2 周。将仔鼠固定于石蜡板, 用解剖刀在其头部做如下切面: (1) 口角至枕部水平切面, (2) 下颚至颈中部水平切面, (3) 眼前的垂直切面, (4) 经眼睛的垂直切面, (5) 经颅骨最大横位的垂直切面, 检查脑组织和颅内其他组织的大小、形状和相对位置。剖开胸腹腔, 检查内脏的大小、形状、相对位置和畸变。

1.5 数据统计

胎鼠身长、尾长、体重、窝平均活仔数、子宫连胎重量等数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 单因素方差分析组间差异, student t 检验两组间的差异; 胎鼠吸收率、死亡率及畸形率用 χ^2 分析组间差异。以 $P < 0.05$ (双侧) 作为检验水准。

2 结果

2.1 染毒后母鼠的临床表现

高剂量染毒组孕鼠于染毒 3~5 d 后, 部分动物出现间断性四肢颤抖抽搐, 染毒结束后, 症状逐渐减轻或消失。其他各组动物在染毒组内进食、饮水和行为未见明显异常。

2.2 对孕鼠体重的影响

整个妊娠期内, 3个染毒组与溶剂对照组比较差异均未见统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 甲氨基阿维菌素苯甲酸原药对孕鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s$)

剂量 (mg/kg)	染毒天数						
	0 d	3 d	7 d	10 d	13 d	16 d	20 d
0	249.4 ± 11.8	269.9 ± 15.6	288.9 ± 15.7	311.5 ± 13.2	325.9 ± 15.8	348.2 ± 29.0	398.7 ± 36.5
1	244.2 ± 7.4	266.9 ± 9.7	287.5 ± 14.1	310.1 ± 19.5	324.7 ± 31.0	350.1 ± 39.7	392.5 ± 57.2
4	248.3 ± 11.4	263.3 ± 11.3	288.3 ± 18.0	307.7 ± 24.1	329.1 ± 32.5	351.5 ± 43.4	396.1 ± 60.2
8	248.7 ± 9.3	270.7 ± 13.3	287.3 ± 16.2	312.1 ± 18.7	329.5 ± 18.8	351.6 ± 23.8	392.5 ± 44.9

2.3 对胚胎发育的影响 率与溶剂对照组比较差异均未见统计学意义 ($P > 0.05$), 见各染毒组的黄体数、着床数、活胎数、死胎率、吸收胎 表 2。

表 2 甲氨基阿维菌素苯甲酸原药对胚胎形成的影响

剂量 (mg/kg)	受孕鼠数 (只)	黄体数 ($\bar{x} \pm s$)	着床数 ($\bar{x} \pm s$)	活胎总数 ($\bar{x} \pm s$)	吸收只数 (%)	死胎数		
						早死	晚死	%
0	13	19.2 ± 4.2	32.0 ± 7.9	162 (11.5 ± 4.9)	2 (1.22)	0	0	0
1	13	17.0 ± 3.2	29.2 ± 7.1	158 (12.3 ± 5.5)	0 (0)	0	2	1.25
4	13	17.5 ± 3.2	29.9 ± 6.0	178 (13.9 ± 2.5)	0 (0)	0	1	0.56
8	15	18.5 ± 4.1	32.8 ± 9.0	196 (13.0 ± 4.8)	4 (1.97)	2	1	1.51

2.4 甲氨基阿维菌素苯甲酸原药对胎鼠生长发育的影响 项指标与溶剂对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。染毒组的胎鼠均重、身长、尾长、窝均重、子宫重等各 见表 3。

表 3 甲氨基阿维菌素苯甲酸原药对胎鼠生长发育的影响 ($\bar{x} \pm s$)

剂量组 (mg/kg)	胎鼠数 (只)	胎鼠均重 (g)	身长 (cm)	尾长 (cm)	窝均重 (g)	子宫重 (g)
0	162	3.67 ± 0.33	4.38 ± 0.12	1.26 ± 0.05	44.85 ± 18.72	72.34 ± 27.39
1	158	3.89 ± 0.30	4.46 ± 0.20	1.22 ± 0.06	46.61 ± 21.05	73.94 ± 31.03
4	178	3.69 ± 0.27	4.31 ± 0.20	1.24 ± 0.06	51.17 ± 9.47	80.52 ± 14.01
8	196	3.63 ± 0.31	4.30 ± 0.17	1.21 ± 0.07	46.21 ± 18.29	73.81 ± 25.79

2.5 对胎鼠外观、内脏和骨骼的影响

高剂量染毒组胎鼠的骨骼检查中有枕骨发育不全和胸骨缺失等畸形, 骨骼畸形率为 12.76%, 与溶剂对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。高剂量组胎鼠外观、内脏和中、低剂量组外观、内脏、骨骼畸形率与溶剂对照组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4。

表 4 对胎鼠外观、内脏和骨骼畸形的影响

剂量 (mg/kg)	外观畸形率 (畸形数/检查数)	内脏畸形率 (畸形数/检查数)	骨骼畸形率 (畸形数/检查数)
0	0 (0/162)	0 (0/81)	0 (0/81)
1	0.63 (1/158)	0 (0/80)	2.56 (2/78)
4	0 (0/178)	0 (0/89)	3.37 (3/89)
8	0 (0/196)	0 (0/102)	12.77 (12/94)**

与对照组比较, ** $P < 0.01$

3 讨论

在致畸实验中, 需观察母体和胎儿的毒性指标。母体毒性是指外源性理化因素对孕母体产生的损害作用, 包括体重减轻、中毒症状和体征甚至死亡; 胚胎毒性通常指外源性理化因素造成孕体着床前后直到器官形成期结束所有的毒性^[1]。本实验中妊娠大鼠在 8 mg/kg 剂量下, 连续染毒 3~5 d 后出现四肢颤抖和抽搐等神经系统中毒症状, 表明染毒剂量已引起母体毒性。母体毒性是致畸实验在剂量设计和致畸作用判定时特别需要注意的。一般来说, 在一定剂量下, 能引起一定的母体毒性作用, 但未观察到胚胎毒性, 可认为不具有致

畸作用; 如果诱发的畸形是在无明显母体毒性剂量下出现的, 那么该物质就是一种真正的或选择性致畸物^[1]。在 8 mg/kg 剂量下, 已满足对甲氨基阿维菌素苯甲酸盐对大鼠致畸作用的剂量要求, 同时也证实了其他学者所观察到的肌肉震颤和动物大脑皮层及海马区部分神经元肿胀等神经系统的损伤^[2,3]。本实验仅观察到 8 mg/kg 剂量下, 胎鼠的骨骼检查中有枕骨发育不全和胸骨缺失, 这与欧盟 EMEA^[4] 中的报道, 8 mg/kg 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐给予孕鼠经口染毒, 胎鼠可见多肋和骨化迟缓的实验结果基本一致。

综上所述, 妊娠大鼠给予 8 mg/kg 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐可引起母体毒性和胚胎毒性, 但无致畸作用。

参考文献:

[1] 王心如. 毒理学基础 [M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 156-157.
 [2] 赵毅波, 陈小玉. 90%甲氨基阿维菌素苯甲酸原药的毒性研究 [J]. 河南预防医学杂志, 2005, 16(6): 321-323.
 [3] 阎希青, 戈杨. 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐对大鼠亚慢性毒性试验研究 [J]. 中国职业医学, 2007, 34(5): 435-437.
 [4] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit [J]. EMEA/MRL/549/99-FINAL, January 1999.
 [5] 毕富春, 徐风波. 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐研究概述 [J]. 农药科学与管理, 2002, 23(3): 31-33.
 [6] 国家技术监督局. GB15670-1995 农药登记毒理学试验方法 [S].