

涕灭威、灭多威的遗传毒性研究

孙肖瑜¹, 金永堂^{1*}, 吴斌², 王伟琴¹, 庞晓露², 王静²

(1. 浙江大学公共卫生学院环境医学系, 杭州 310058; 2. 浙江省环境监测中心, 杭州 310012)

摘要:研究了涕灭威与灭多威的遗传毒性。在去离子水中分别加入涕灭威与灭多威标准品, 涕灭威设计 0.002、0.02、0.2、2、20 $\mu\text{g/L}$ 共 5 个剂量组, 灭多威设计 0.02、0.2、2、20、200 $\mu\text{g/L}$ 共 5 个剂量组。用微核试验检测其对鲤鱼血细胞微核的诱发效应, 采用 Ames 试验检测 2 种农药的致突变性, 采用彗星试验检测其对入外周血淋巴细胞 DNA 的损伤效应, 根据 3 种毒理学试验结果综合分析涕灭威与灭多威的遗传毒性。结果表明, 所有剂量组这 2 种农药未诱导鲤鱼血细胞微核率的明显上升 ($p > 0.05$); 2 种农药各剂量组回变菌落数均未超过自发回变组的 2 倍, 但在非代谢活化条件下, 涕灭威 2~20 $\mu\text{g/L}$ 与灭多威 20~200 $\mu\text{g/L}$ 剂量组的 TA97 菌株回变菌落数分别达到 (129.17 ± 17.00) 、 (129.50 ± 18.28) 、 (109.83 ± 10.80) 和 (114.17 ± 9.37) 个/皿, 明显高于自发回变组 ($p < 0.05$, $p < 0.01$)。在代谢活化条件下, 灭多威 200 $\mu\text{g/L}$ 组的 TA100 与 TA102 菌株的回变菌落数为 (147.83 ± 23.29) 、 (275.83 ± 20.63) 个/皿, 均高于自发回变组 ($p < 0.05$); 在彗星试验中发现, 高浓度的涕灭威与灭多威均可导致人外周血淋巴细胞的 DNA 损伤, 涕灭威 20 $\mu\text{g/L}$ 组, 灭多威 200 $\mu\text{g/L}$ 组的尾部 DNA (%)、尾长、Olive 尾距 3 个指标经统计学分析, 高于去离子水对照组 ($p < 0.01$)。研究未见涕灭威与灭多威对鲤鱼血细胞产生明显的染色体损伤效应, 虽未见其明显的致突变性, 但在高浓度下存在一定的致突变的风险, 并且这 2 种农药可能导致人外周血淋巴细胞的 DNA 损伤, 因此涕灭威与灭多威污染对水环境和人体健康可能存在一定的远期危害。

关键词:涕灭威; 灭多威; 遗传毒性; 微核; DNA 损伤

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)12-2973-08

Study on Genotoxicity of Aldicarb and Methomyl

SUN Xiao-yu¹, JIN Yong-tang¹, WU Bin², WANG Wei-qin¹, PANG Xiao-lu², WANG Jing²

(1. Department of Environmental Medicine, School of Public Health, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Zhejiang Province Environmental Monitoring Centre, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Genotoxicity of aldicarb and methomyl was explored. The aldicarb and methomyl were diluted by the deionized water respectively, and then five concentrations of aldicarb were generated as 0.002, 0.02, 0.2, 2, 20 $\mu\text{g/L}$, methomyl as 0.02, 0.2, 2, 20, 200 $\mu\text{g/L}$. The micronucleus of carp erythrocyte was counted by micronucleus test. The mutation of bacteria was assessed by Ames test. The DNA damage of human lymphocytes was tested by comet assay. The genotoxicity of aldicarb and methomyl was estimated by the three toxicology tests mentioned above. The results showed that, in the micronucleus test, both any concentration of two pesticides were not able to induce higher frequency of micronucleus in carp erythrocyte ($p > 0.05$). Under condition of metabolic inactivation, although the number of colony with back mutation in any concentration of two pesticides did not exceed the double number of those with spontaneous mutation, the revertants of TA97 strains in the aldicarb 2-20 $\mu\text{g/L}$ and the methomyl 20-200 $\mu\text{g/L}$ were (129.17 ± 17.00) , (129.50 ± 18.28) , (109.83 ± 10.80) and (114.17 ± 9.37) entries/plate, respectively, they were significantly greater than those in spontaneous mutation ($p < 0.05$, $p < 0.01$). In the methomyl 200 $\mu\text{g/L}$ group, the revertants of TA100 and TA102 strains were (147.83 ± 23.29) and (275.83 ± 20.63) entries/plate, respectively, they are significantly higher than that of the control group under condition of metabolic activation ($p < 0.05$). In comet assay, both the high concentration groups of aldicarb and methomyl resulted in different degrees of DNA damage of human peripheral blood lymphocytes. Compared with deionized water group, all of three indexes of comet assay in the aldicarb 20 $\mu\text{g/L}$ groups and the methomyl 200 $\mu\text{g/L}$ groups were significantly higher ($p < 0.01$). Despite that both aldicarb and methomyl did not results in damaging chromosome carp erythrocyte and producing apparent mutagenicity, the effect of mutagenicity and DNA damage in human lymphocytes were observed in high concentration groups of both aldicarb and methomyl. Water polluted by aldicarb and methomyl may have the potential adverse effects on the environment and human health.

Key words: aldicarb; methomyl; genotoxicity; micronucleus; DNA damage

近年来氨基甲酸酯类农药在病虫害防治中起着举足轻重的作用, 使用量也在逐年增加, 但其对环境生态也产生了一定的影响^[1], 氨基甲酸酯类农药大多属于中、高毒性, 可通过皮肤, 消化道和呼吸道吸收, 使生物中毒^[2]。涕灭威与灭多威均属氨基甲酸酯类农药, 是高效广谱的杀虫剂, 但也具有较高的毒

性^[3,4], 国内外研究表明这 2 种农药还可能存在一定的遗传毒性, 其对生物和人类可能会存在潜在威

收稿日期: 2010-01-24; 修订日期: 2010-04-07

基金项目: 浙江省重大科技专项 (2006C13060)

作者简介: 孙肖瑜 (1985 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为水污染与健康, E-mail: sunxiaoyu_114@163.com

* 通讯联系人, E-mail: jinedu@zju.edu.cn

胁,有研究显示斑马鱼在大剂量的涕灭威作用下 DNA 发生损伤^[5],也有报道认为涕灭威可对茎线虫的 DNA 产生一定的损伤,且具有剂量-效应反应关系^[6].对于灭多威的遗传毒性研究较少,并且存在一定的争议^[7].涕灭威与灭多威在我国某些水体中普遍存在,但却未列于我国的地表水质量标准^[8],而目前对于这 2 种农药的遗传毒性还不够明确,因此对其进行系统的遗传毒性研究十分必要.本研究结合有关监测结果设计不同浓度的涕灭威与灭多威剂量组,以模拟水中农药污染状况.通过研究其对鲤鱼红细胞染色体损伤效应,对细菌的致突变性,对人体的 DNA 损伤效应 3 种遗传学试验检测水中涕灭威与灭多威的遗传毒性,以期综合评价这 2 种农药对水环境和人体的潜在危害.

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株及试验动物

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)组氨酸缺陷型 TA97、TA98、TA100、TA102 菌株由浙江省疾病预防控制中心惠赠;健康锦鲤(*Cyprinus carpio*)购自花鸟市场,体重 25~40g,实验室 200L 水族箱,水温 20~25℃ 饲养.

1.1.2 主要仪器及试剂

CO₂ 恒温培养箱(Thermo Fisher Scientific 公司),DYY-11B 型水平电泳仪(北京六一仪器厂),BX51 型荧光显微镜及 DP50 数码摄像头(Olympus 公司),水族箱(广东日生公司).涕灭威标准品(100 μg/mL,溶于丙酮,浙江省环境监测中心提供),灭多威标准品(100 μg/mL,溶于丙酮,浙江省环境监测中心提供),正常溶点琼脂糖、低溶点琼脂糖、溴化乙锭(EB)、葡萄糖-6-磷酸、ICR-191(2-甲基-6-氯代-9-[3-(2-氯乙基)氨基丙胺]吡啶·2 盐酸)、吉姆萨染液(均购自美国 Sigma),RPMI 1640 培养基(美国 Gibco),柔毛霉素(意大利 Pharmacia Italia S. P. A),2-氨基芴(2-Aminofluorene, 2-AF, Sigma 公司),叠氮钠、1,8-二羟基蒽醌(上海晶纯试剂公司),环磷酸胺(浙江海正药业公司),其余试剂为国产分析纯.

1.2 试验方法

1.2.1 染色体损伤检测

采用微核试验来检测染色体损伤.使用去离子水配制涕灭威与灭多威,使得涕灭威终浓度为 0.002、0.02、0.2、2、20 μg/L,灭多威终浓度为 0.02、

0.2、2、20、200 μg/L.采用王维等^[9]提出的 30 h 鱼背肌染毒法,各组使用微量进样器均按 1 μL/g 的鱼体重注射于鱼背肌进行染毒,第一次染毒后 24 h 进行第二次染毒,第二次染毒结束 6 h 后使用采血针取鱼尾静脉血,以肝素抗凝管收集血液,将血液滴于玻片上,使用盖玻片推片,制成血涂片,甲醇中固定 3~5 min,后浸入吉姆萨染液中,染色 20 min,结束后用 pH 6.8 磷酸盐缓冲液冲洗.阳性对照设置为环磷酸胺,按 80 μg/g 鱼体重注射,并设去离子水对照组,为排除农药标准品溶剂影响同时设计丙酮对照组,去离子水与丙酮对照均为纯品,均按 1 μL/g 鱼体重进行注射.每个剂量组重复 2 尾鱼,每尾鱼制 3 张血涂片,每张血涂片计数 2 000 个染色良好的红细胞,光学显微镜 100 倍油镜下计数,计算微核千分率(‰).

1.2.2 致突变性检测

采用鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验(*Salmonella typhimurium*/mammals microsomal enzyme test, Ames test)来检测受试物的致突变性.受试物剂量组设计同染色体损伤试验.采用 TA97、TA98、TA100、TA102 这 4 种菌株,菌株经生物学特性鉴定,均符合实验要求.采用苯巴比妥和 5,6-苯黄酮联合诱导的大鼠肝匀浆作为代谢活化系统(S9)^[10],经 Lowry 法蛋白定量检测符合实验要求.试验操作均按标准平板掺入法^[11]进行致突变性检测,需要活化时加 10% S9 混合液 0.4 mL,经 37℃,5% CO₂ 培养 48 h 观察计数回复突变菌落数.对照设计根据标准^[11]设计了自发回变组,去离子水对照,丙酮对照与阳性对照. TA97、TA98、TA100 与 TA102 菌株在非代谢活化条件下阳性对照分别使用 ICR-191(1 μg/皿)、柔毛霉素(6 μg/皿)、叠氮钠(1.5 μg/皿)与 1,8-二羟基蒽醌(50 μg/皿),在代谢活化条件下均使用 2-AF(10 μg/皿).每次每菌株每剂量组做 3 个平行皿,重复试验 2 次,以受试物的回变菌落数为自发回变菌落数 2 倍以上,并具有剂量-反应关系者定为阳性.

1.2.3 DNA 损伤效应检测

采用彗星试验检测 2 种农药对人外周血淋巴细胞 DNA 的损伤效应.受试物剂量组设计同染色体损伤试验.抽取健康成年志愿者静脉血,根据文献[12]将血样沿离心管壁缓慢加在等体积淋巴细胞分离液面上,离心后吸取中间淋巴细胞层,经磷酸盐缓冲液洗涤后,用 RPMI 1640 培养基制备细胞悬液,加入受试物,使染毒总体积达 1 mL,细胞密度调整

为约 10^6 个/mL; 于 37°C ,5% CO_2 条件下染毒 2 h. 染毒完毕用台盼蓝测定细胞存活率,以 1:1 比例加入细胞悬液与台盼蓝染液,轻轻混匀,染色 3 min,用细胞计数板于镜下计数细胞总数与未染成蓝色细胞数,未染成蓝色细胞为活细胞,由此可以估计细胞存活率.测定存活率后采用两层凝胶法^[13],经铺片,消化 1 h,碱性解旋 20 min,300 mA、25 V 电泳 20 min,磷酸盐缓冲液中中和洗涤,甲醇固定 3 min 后,用 40 μL EB(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 进行染色,荧光显微镜下观察摄像,利用 CASP 图像软件每张片随机分析 100 个细胞,根据文献[14]选用细胞尾部 DNA 百分比、尾长、Olive 尾距 3 个指标综合反映细胞 DNA 损伤情况.配制终浓度 0.1 mmol/L 的 H_2O_2 作为阳性对照组,另作去离子水对照和丙酮对照.每次试验各组均作 2 个平行样,重复试验 3 次.

1.2.4 统计学方法

使用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析,Ames 各剂量组菌落数与自发回变组菌落数之间及微核试验与彗星试验各剂量组与去离子水对照组之间的比较均采用单因素方差分析.

2 结果与分析

2.1 涕灭威、灭多威的染色体损伤效应检测结果

如表 1 所示,涕灭威与灭多威导致鲤鱼外周血红细胞的微核率经统计分析,与去离子水对照相比,差异不具有显著性($p > 0.05$).丙酮组的微核率与去离子水对照组之间无显著性差异,可排除丙酮的影响.从图 1、2 中可以看出,涕灭威与灭多威最高剂量组的微核率最高,但整体看来,鱼血红细胞微核率并未随着染毒剂量上升而严格上升,个别剂量甚至

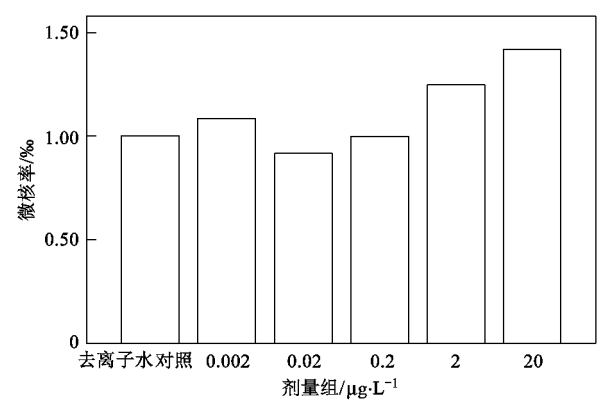


图 1 不同剂量下涕灭威对锦鲤血红细胞微核率的影响
Fig.1 Effects of aldicarb on micronucleus frequency of erythrocytes in koi carp with different exposure concentrations

低于去离子水对照,其未表现出明显的剂量-效应反应关系,可见水中涕灭威与灭多威在本试验条件下未观察到明显的染色体损伤效应.

表 1 涕灭威、灭多威对锦鲤血红细胞微核率的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Micronucleus induction in koi carp erythrocytes exposed to aldicarb and methomyl ($\bar{x} \pm s$)

受试物	剂量/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	微核率/%
涕灭威	20.000	1.42 $\pm$ 0.38
	2.000	1.25 $\pm$ 0.52
	0.200	1.00 $\pm$ 0.32
	0.020	0.92 $\pm$ 0.38
	0.002	1.08 $\pm$ 0.58
灭多威	200.00	1.33 $\pm$ 0.26
	20.00	1.17 $\pm$ 0.41
	2.00	1.00 $\pm$ 0.63
	0.20	1.08 $\pm$ 0.49
	0.02	0.92 $\pm$ 0.49
去离子水对照		1.00 $\pm$ 0.32
环磷酰胺		7.25 $\pm$ 2.73
丙酮		1.17 $\pm$ 0.26

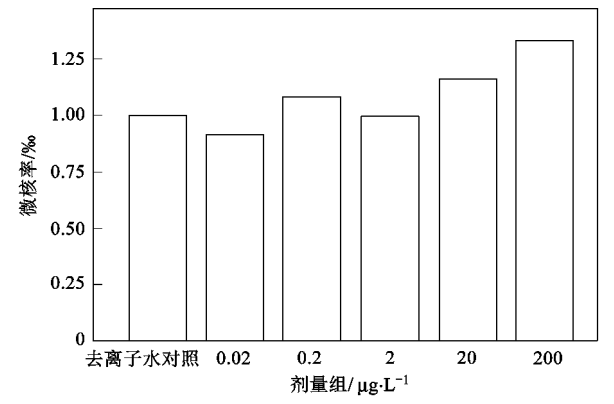


图 2 不同剂量下灭多威对锦鲤血红细胞微核率的影响
Fig.2 Effects of methomyl on micronucleus frequency of erythrocytes in koi carp with different exposure concentrations

2.2 涕灭威、灭多威的致突变作用检测结果

在非代谢活化条件下,丙酮的 Ames 试验结果为阴性,可排除标准品中丙酮的影响,涕灭威、灭多威 4 个菌株的所有剂量组的回变菌落数均未超过自发回变组的 2 倍,因此可判定 Ames 试验阴性.在研究中发现涕灭威 2 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 剂量组与灭多威 20 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 剂量组中 TA97 菌回变菌落数与自发回变组相比具有显著性差异($p < 0.05$, $p < 0.01$).

在代谢活化条件下,丙酮和 2 种农药所有剂量组仍未达到 Ames 阳性判定标准.但涕灭威 0.2 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 组与灭多威 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 组的 TA97 菌株明显

高于自发回变组 ($p < 0.05, p < 0.01$), 研究还发现灭多威 200 $\mu\text{g/L}$ 组的 TA100 与 TA102 菌株的回变菌落数也要高于自发回变组 ($p < 0.05$). 这也显示出 2 种农药虽未表现出明显的致突变性, 但随着剂量上升可能出现一定的致突变性. 具体结果见表 2、3.

表 2 非代谢活化条件下 (- S9) 涕灭威、灭多威的致突变性¹⁾ ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Mutagenicity of aldicarb and methomyl without metabolic activation (- S9) ($\bar{x} \pm s$)

受试物	剂量/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TA97	TA98	TA100	TA102
涕灭威	20.000	129.50 $\pm$ 18.28 ^b	34.17 $\pm$ 7.33	133.00 $\pm$ 16.69	269.00 $\pm$ 18.03
	2.000	129.17 $\pm$ 17.00 ^b	34.67 $\pm$ 5.35	124.50 $\pm$ 9.07	265.00 $\pm$ 16.96
	0.200	110.33 $\pm$ 11.20	33.00 $\pm$ 7.67	120.50 $\pm$ 8.36	252.50 $\pm$ 25.49
	0.020	104.00 $\pm$ 12.15	26.83 $\pm$ 4.26	116.50 $\pm$ 12.79	243.17 $\pm$ 22.04
	0.002	104.17 $\pm$ 8.57	28.67 $\pm$ 6.53	124.50 $\pm$ 7.66	234.33 $\pm$ 22.23
灭多威	200.00	114.17 $\pm$ 9.37 ^b	34.17 $\pm$ 6.79	124.17 $\pm$ 22.61	252.33 $\pm$ 13.31
	20.00	109.83 $\pm$ 10.80 ^a	24.33 $\pm$ 7.99	123.33 $\pm$ 14.94	240.00 $\pm$ 18.54
	2.00	106.00 $\pm$ 8.56	27.17 $\pm$ 8.47	121.00 $\pm$ 18.32	238.50 $\pm$ 29.47
	0.20	105.33 $\pm$ 8.78	26.67 $\pm$ 7.12	112.33 $\pm$ 12.60	237.83 $\pm$ 22.76
	0.02	104.67 $\pm$ 5.20	27.00 $\pm$ 5.10	110.83 $\pm$ 10.21	230.83 $\pm$ 11.44
去离子水对照		106.67 $\pm$ 13.57	24.00 $\pm$ 4.20	120.00 $\pm$ 23.44	241.17 $\pm$ 28.56
自发回变		97.17 $\pm$ 11.25	31.17 $\pm$ 7.36	125.50 $\pm$ 36.88	245.00 $\pm$ 25.77
ICR-191		1 587.00 $\pm$ 170.73			
柔毛霉素			1 183.50 $\pm$ 320.59		
叠氮钠				1 212.00 $\pm$ 410.58	
1,8-二羟基蒽醌					805.00 $\pm$ 184.33
丙酮		110.17 $\pm$ 10.68	29.50 $\pm$ 7.66	129.17 $\pm$ 13.80	235.17 $\pm$ 21.28

1) 上标中 a 表示与自发回变组比较 $p < 0.05$, b 表示与自发回变组比较 $p < 0.01$, 下同

表 3 代谢活化条件下 (+ S9) 涕灭威、灭多威的致突变性 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Mutagenicity of aldicarb and methomyl with metabolic activation (+ S9) ($\bar{x} \pm s$)

受试物	剂量/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TA97	TA98	TA100	TA102
涕灭威	20.000	139.50 $\pm$ 15.64 ^b	36.00 $\pm$ 4.00	136.00 $\pm$ 24.32	265.83 $\pm$ 20.65
	2.000	133.83 $\pm$ 10.76 ^b	35.00 $\pm$ 7.38	128.17 $\pm$ 16.38	260.00 $\pm$ 13.24
	0.200	121.33 $\pm$ 16.65 ^a	30.83 $\pm$ 6.46	121.67 $\pm$ 17.64	260.83 $\pm$ 19.67
	0.020	112.50 $\pm$ 13.41	30.00 $\pm$ 9.57	131.50 $\pm$ 20.46	235.50 $\pm$ 18.50
	0.002	112.67 $\pm$ 12.71	29.50 $\pm$ 6.28	121.33 $\pm$ 17.82	236.17 $\pm$ 21.72
灭多威	200.00	123.33 $\pm$ 12.86 ^b	32.50 $\pm$ 4.64	147.83 $\pm$ 23.29 ^a	275.83 $\pm$ 20.63 ^a
	20.00	112.83 $\pm$ 10.11	32.00 $\pm$ 8.94	128.33 $\pm$ 10.13	270.00 $\pm$ 14.45 ^a
	2.00	110.17 $\pm$ 9.97	28.83 $\pm$ 2.32	117.83 $\pm$ 12.88	247.67 $\pm$ 22.24
	0.20	108.50 $\pm$ 11.62	30.83 $\pm$ 4.88	123.33 $\pm$ 16.52	235.33 $\pm$ 13.85
	0.02	105.17 $\pm$ 8.80	30.00 $\pm$ 7.97	119.50 $\pm$ 12.97	233.17 $\pm$ 17.34
去离子水对照		98.83 $\pm$ 35.13	26.00 $\pm$ 7.18	122.83 $\pm$ 19.89	242.17 $\pm$ 29.32
自发回变		102.67 $\pm$ 6.68	33.83 $\pm$ 6.34	126.67 $\pm$ 19.83	248.00 $\pm$ 19.46
2-AF		842.67 $\pm$ 153.33	1 141.20 $\pm$ 366.42	1 105.80 $\pm$ 229.26	558.17 $\pm$ 103.57
丙酮		116.17 $\pm$ 20.55	30.00 $\pm$ 8.83	126.50 $\pm$ 13.07	242.50 $\pm$ 23.24

2.3 涕灭威、灭多威 DNA 损伤效应检测结果

涕灭威与灭多威的 DNA 损伤效应检测典型彗星照片如图 3、4 所示, 去离子水对照组中淋巴细胞完整, 无明显拖尾结果. 在高剂量组中淋巴细胞出现拖尾现象, 表现在尾长变长, 尾部面积变大, 在低剂量组中则不明显, 细胞受损程度随着剂量增大而加重.

台盼蓝细胞存活率检测结果显示, 各剂量组染毒后的细胞存活率均在 95% 以上, 可认为在染毒条

件下, 毒物未表现出细胞毒性, 可进行彗星试验检测^[15]. 丙酮 3 个彗星指标与去离子水对照组相比未具有显著性差异 ($p > 0.05$), 可认为丙酮不会干扰试验结果. 涕灭威 20 $\mu\text{g/L}$ 组与灭多威 20 ~ 200 $\mu\text{g/L}$ 的 3 个彗星指标与去离子水对照相比, 结果均有统计学差异 ($p < 0.01$), 表明在高剂量的涕灭威与灭多威暴露下, 可导致人外周血淋巴细胞 DNA 损伤. 具体结果见表 4.

遗传风险,为科学使用涕灭威与灭多威,控制这 2 种农药在水体中的污染提供参考。

微核试验是遗传毒理学研究中的一种实用检测方法^[21],外界损伤因素作用细胞后导致细胞的染色体损伤形成微核^[22]。鱼类对水污染比较敏感,在环境遗传毒理研究中越来越受到科研工作者的重视^[23]。Nwani 等^[24]发现长时的丁硫克百威暴露,使鳢红细胞的微核率明显上升。南旭阳^[25]研究了草甘膦对鲫鱼血红细胞微核产生频率的影响,结果表明阴性对照组的微核率为 0.96‰,剂量组中微核率最高值达到 4.29‰,但无明显的剂量-效应关系。孟顺龙等^[26]的研究发现阴性对照组鲫鱼红细胞的微核率在 0.5‰左右,而经高浓度的阿特拉津染毒后,微核率明显上升,最高达到 3‰。也有报道用鲤鱼、鲢鱼研究了杀虫双的遗传毒性,结果发现各剂量组微核率并未明显上升,均在 1‰以下^[27]。为研究 2 种农药对水生生物的遗传毒性,本试验选择了目前在水质污染评价较常用的淡水鱼类鲤鱼进行微核试验^[28,29],结果发现去离子水对照组的微核率较低,而环磷酰胺组的微核率明显高于去离子水对照组,达到 $7.25‰ \pm 2.73‰$,但涕灭威与灭多威诱导的微核率并未明显高于去离子水对照 ($p > 0.05$),这显示在本研究条件下,涕灭威与灭多威未能引起鲤鱼外周血红细胞微核率明显上升,国内外对涕灭威与灭多威诱导鱼类微核产生的研究十分罕见,并未发现这 2 种农药能够导致鲤鱼染色体发生损伤,同时鱼类微核发生频率不仅取决于诱变剂,剂量等,还跟鱼种、靶组织和环境有关^[30],在今后的研究中可选择更多的鱼类作为研究对象,并可研究多个因素与微核率之间的关系,进一步深入地分析涕灭威与灭多威对水生生物的慢性毒性。

目 α 有研究证明涕灭威具有致突变性^[31],也有学者曾用 TA98 与 TA100 菌株研究灭多威的致突变性,结果呈阴性^[32]。在 Ames 试验中 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,而 TA102 可检测其他类型的致突变物^[33],本试验按照标准采用 4 种菌株全面研究了涕灭威与灭多威的致突变性,但未发现其具有明显的致突变性,但经过统计学分析,高剂量组中涕灭威与灭多威的某些菌株的回变菌落数虽未超过自发回变组的 2 倍,但却出现一定程度的增加,提示高剂量涕灭威与灭多威可能存在一定程度的致突变风险。

关于 2 种农药的 DNA 损伤研究在国内外尚不

多见,李阳等^[5]研究指出涕灭威暴露可导致斑马鱼 DNA 单链断裂,在高浓度条件下可引起难以修复的双链断裂。而灭多威的商业化产品“万灵 25”能导致小鼠肝脏 DNA 收缩^[7]。本研究选择了在 DNA 损伤研究中较常用的彗星试验研究该 2 种农药对人外周血淋巴细胞的 DNA 损伤效应。彗星试验为 Singh 等^[34]进一步完善的单细胞凝胶电泳试验,由于其检测谱宽,灵敏度好而得到广泛应用,其主要可以反映 DNA 链断裂。试验结果显示,水中涕灭威与灭多威可能对人血淋巴细胞 DNA 产生一定的损伤作用,使 DNA 链发生断裂,使得细胞尾长变长,尾部 DNA% 增加。目前对这 2 种农药高剂量造成 DNA 损伤的机制还不够明确,宋艳等^[35]研究认为高浓度的涕灭威及其有毒代谢产物可与小牛胸腺 DNA 结合,形成 DNA 加合物,引起吸收光谱波峰移位,呈现一定剂量关系。有研究认为烷基可与 DNA 共价结合,因此可能造成 DNA 损伤^[36],涕灭威与灭多威属烷基类氨基甲酸酯农药,可能具有一定的烷化作用。另外,国外学者认为氨基甲酸酯类农药丁硫克百威引起 DNA 链断裂由 DNA 受到氧化损伤造成^[24],也有研究表明灭多威对大鼠细胞可产生氧化损伤^[37],因此推测氧化应激在涕灭威与灭多威导致的 DNA 损伤中发挥一定作用,具体机制目前无法明确,今后需在这方面进行深入研究。

本研究显示涕灭威、灭多威在微核试验与 Ames 试验中呈阴性,但在彗星试验中,可导致人外周血淋巴细胞产生一定的 DNA 损伤,3 种试验结果存在一定的差异。3 种试验反映的是 3 个不同的遗传终点,微核试验反映染色体的损伤效应,Ames 试验 4 个菌株可检测碱基置换等多种类型致突变物,这 2 种试验结果表明涕灭威与灭多威并未造成染色体损伤与细菌基因突变。而彗星试验检测的遗传学终点为 DNA 损伤,可以检测 DNA 链断裂,DNA 链断裂是目前 DNA 损伤中最为灵敏的指标^[38],彗星试验可以检测出较低浓度毒物引起的比较轻微的 DNA 链断裂,而这些轻微的断裂并不一定导致基因突变和染色体的损伤,使 Ames 试验与微核试验检测呈现阴性结果。另外微核试验为体内试验,受试验动物、饲养条件、抽样等影响,考虑敏感度不如体外试验,而彗星试验所能检测的诱变物种类也要多于 Ames 试验,甚至可检测 Ames 试验较难检出的金属类与氯化碳氢类物质^[39]。今后的研究也应选取多个遗传终点进行全面分析,才可更确切、更充分地了解毒物的遗传毒性。

4 结论

(1)涕灭威与灭多威所有剂量组均未明显诱导鲤鱼血红细胞微核率上升,未观察到明显的染色体损伤效应。

(2)在本试验条件下,各剂量组的 Ames 试验结果均为阴性,但高剂量组涕灭威与灭多威的某些菌株回变菌落数高于自发回变组 ($p < 0.05$, $p < 0.01$),虽未超过自发回变数的 2 倍,却有增加的趋势,提示存在一定的致突变风险。

(3)在彗星试验中,涕灭威 0.2 ~ 20 $\mu\text{g/L}$ 剂量组存在一定的 DNA 损伤效应,灭多威 20 ~ 200 $\mu\text{g/L}$ 的 3 个彗星指标也高于去离子水对照组 ($p < 0.01$)。可看出高剂量的涕灭威与灭多威可导致人外周血淋巴细胞的 DNA 发生损伤。

(4)研究结果提示水体中若出现涕灭威与灭多威较重污染将可能对水生生物以及人体造成潜在威胁,须引起相关部门的重视。

致谢:本课题得到了浙江省环境监测中心的大力帮助,在此表示诚挚地谢意,同时感谢浙江省疾病预防控制中心在本研究中提供帮助。

参考文献:

[1] 王品维,黄诚,王芸,等. 6 种氨基甲酸酯类农药对绿藻的毒性试验[J]. 浙江林业科技,2007,27(3):45-50.

[2] 张丽英,王静. 急性氨基甲酸酯类杀虫药中毒 56 例临床分析[J]. 新医学导刊,2009,8(4):45-46.

[3] Küster E, Altenburger R. Suborganismic and organismic effects of aldicarb and its metabolite aldicarb-sulfoxide to the zebrafish embryo (*Danio rerio*) [J]. Chemosphere, 2007, 68(4):751-760.

[4] 胡俊西,武向伟,庄文静. 灭多威暴露下斑马鱼的组织学变化[J]. 漳州师范学院学报(自然科学版),2009,33(2):107-111.

[5] 李阳,张清敏,戴树桂. 涕灭威及其复合污染对斑马鱼胚胎 DNA 的影响[J]. 应用生态学报,2003,14(6):982-984.

[6] 张清敏,陈正雄,郭立,等. 涕灭威-十二烷基苯磺酸钠复合污染体系对茎线虫 DNA 的损伤与修复[J]. 农业环境科学学报,2003,22(1):97-101.

[7] 李少南. 灭多威的环境毒理研究进展[J]. 环境科学进展,1997,5(3):65-69.

[8] 王静,潘荷芳,刘铮铮,等. 地表水中氨基甲酸酯农药及代谢物的快速、灵敏分析方法研究[J]. 中国环境检测,2009,25(4):11-15.

[9] 王维,赵影,黄晓沐,等. 巢湖水有机污染物的遗传毒性及对饮用水水质的影响[J]. 癌变·畸变·突变,2004,16(6):352-354.

[10] 王亚其,李宏霞,肖凯,等. 两种诱导方法制备大鼠肝 S9 在两

种遗传毒性试验中活性比较[J]. 现代预防医学,2006,33(4):457-463.

[11] GB 15193.4-2003,鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验[S].

[12] 刘强,姜恩海,李进,等. 单细胞凝胶电泳技术对离体和整体照射致细胞 DNA 断裂的一致性研究[J]. 中国辐射卫生,2006,15(2):734-738.

[13] 于立群,蒋守芳,冷曙光,等. 甲醛暴露工人外周血淋巴细胞遗传物质损伤水平的研究[J]. 中华预防医学杂志,2005,39(6):392-395.

[14] 汤艳,张青碧,甘仲霖,等. 杀虫剂诱导人外周血淋巴细胞 DNA 损伤[J]. 现代预防医学,2006,33(8):1342-1343.

[15] Poletta G L, Larriera A, Kleinsorge E, et al. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the comet assay and the micronucleus test[J]. Mutation Research, 2009, 672(2):95-102.

[16] 98/83/EC, Council directive on the quality of water intended for human consumption[S].

[17] Mohanty G, Mohanty J, Garnayak S K, et al. PCR based detection of furadan genotoxicity effects in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings[J]. Veterinary Research Communications, 2009, 33(1):771-780.

[18] Soloneski S, Larramendy M L. Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells treated with the insecticide pirimicarb [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 174(1-3):410-415.

[19] Priddle M W. 长期监测加拿大马铃薯种植区涕灭威残留物[J]. 水文地质工程地质技术方法动态,2007,24(5):24-32.

[20] 张清敏,熊瑛,李得翔,等. 一种简便快速检测涕灭威对 DNA 损伤的方法[J]. 环境科学,2001,22(5):126-128.

[21] Grisolia C K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides [J]. Genetic toxicology and Environmental Mutagenesis, 2002, 518(2):145-150.

[22] 张红梅. 铅长期暴露对黄河鲤红细胞微核率、核异常率的影响[J]. 动物医学进展,2009,30(8):38-40.

[23] 沈燕飞,厉以强,黎刚. 利用鱼外周血红细胞微核技术监测长江江苏段水质污染[J]. 江苏环境科技,2007,20(6):49-50.

[24] Nwani C D, Lakra W S, Nagpure N S, et al. Mutagenic and genotoxic effects of carbosulfan in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gelelectrophoresis[J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(1):202-208.

[25] 南旭阳. 除草剂“草甘膦”对鲫鱼外周血红细胞微核及核异常的影响[J]. 安徽师范大学学报·自然科学版,2001,24(4):329-331.

[26] 孟顺龙,胡庚东,瞿建宏,等. 除草剂阿特拉津对鲫鱼外周血红细胞微核和总核异常的影响[J]. 生态环境,2008,17(1):178-183.

[27] 张文成,张敏,陈小义,等. 杀虫双致突变性研究[J]. 癌变·畸变·突变,1997,9(3):162-165.

- [28] 龙静,张迎梅,朱丽娜,等. 利用微核试验和彗星电泳试验评价黄河兰州段水质致遗传毒性作用[J]. 应用与环境生物学报,2006,**12**(1):59-63.
- [29] Pellacani C, Buschini A, Furlini M, *et al.* A battery of in vivo and in vitro tests useful for genotoxic pollutant detection in surface water [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, **77**(1):1-10.
- [30] 王利,汪开毓. 硫酸铜诱发鲤鱼红细胞微核和核异常的研究[J]. 湖北农业科学, 2008, **47**(11):1336-1337,1349.
- [31] 朱忠林,蔡道基. 涕灭威农药的残留、毒性及其对生态环境的影响[J]. 农村生态环境, 1993, **19**(2):50-53.
- [32] 高锦亚,曾益良. 灭多威对家蝇的毒力及其对动物的毒性[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 1995, **6**(5):344-348.
- [33] 桂明英,郭永红,朱萍,等. 美味牛肝菌致突变作用研究[J]. 食用菌学报, 2008, **15**(2):42-46.
- [34] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. *Experimental Cell Research*, 1988, **175**(1):184-191.
- [35] 宋艳,朱鲁生,王军,等. 涕灭威及其有毒代谢产物对 DNA 潜在损伤研究[J]. 生态毒理学报, 2006, **1**(1):40-44.
- [36] 倪永年,杜姗. 异丙威及其水解产物对 DNA 潜在损伤作用的研究[J]. 农业环境科学学报, 2006, **25**(3):619-622.
- [37] Mansour S A, Mossa A T, Heikal T M. Effects of methomyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat erythrocytes: In vitro studies [J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2009, **25**(8):557-563.
- [38] 洪承皎,童建,王静. 单细胞电泳检测有机磷农药接触工人外周血淋巴细胞 DNA 损伤[J]. 工业卫生与职业病, 2002, **28**(5):303-304.
- [39] 王涛,衡正昌,等. 彗星试验检测环境致癌物的敏感性评价[J]. 卫生毒理学杂志, 2001, **15**(1):58-60.