

甲氨基阿维菌素苯甲酸盐原药的致突变性及亚慢性毒性

杨秀鸿^{1,2}, 陆丹², 陈志莲², 吴军²

(1. 湖南省劳动卫生职业病防治所, 湖南 长沙 410007; 2. 中南大学公共卫生学院, 湖南 长沙 410008)

摘要: 目的 探讨甲氨基阿维菌素苯甲酸盐原药的致突变性及亚慢性毒性作用。方法 按照 GB15670—1995《农药登记毒理学试验方法》进行 Ames 试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验及大鼠亚慢性毒性试验。结果 (1) 50~200 μg/皿剂量组的 Ames 试验结果为阴性。(2) 染毒 6.25~50.00 mg/kg 剂量组的微核率与阴性对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐原药不引起小鼠骨髓嗜多染红细胞染色体断裂或整条染色体丢失。(3) 染毒 12.5~50.0 mg/kg 剂量组的小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变率未见增加。(4) 亚慢性毒性试验高剂量组部分动物在染毒后期出现全身震颤、精神不振、被毛蓬松、体重增长缓慢等中毒症状。实验结束时, 高剂量组雌鼠淋巴细胞比例降低、中间细胞比例增高, 肝脏脏器系数明显增高; 雄鼠肾脏和脑的脏器系数增高。中、高剂量组雄鼠淋巴细胞比例降低、中间细胞比例增高, 心脏脏器系数增高。结论 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐原药无明显致突变作用。该药可引起动物出现神经系统症状, 影响动物的生长发育及免疫功能。本实验提示, SD 大鼠口服甲氨基阿维菌素苯甲酸盐原药 90 d 的最大无作用剂量为 $0.89 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

关键词: 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐原药; 致突变性; 亚慢性毒性

中图分类号: R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2007)04-0221-04

Study on mutagenicity and subchronic toxicity of methylaminoemamectin benzoate

YANG Xiu-hong^{1,2}, LU Dan², CHEN Zhi-lian², WU Jun²

(1. Hunan Provincial Institute for Labor Hygiene and Occupational Diseases, Changsha 410007, China; 2. School of Public Health, Zhongnan University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To explore the mutagenicity and subchronic toxicity of methylaminoemamectin benzoate. **Method** The Ames assay, mouse bone marrow cell micronucleus test, mouse testicle cell chromosome aberration test and subchronic toxicity test in rats were conducted according to National Standards of "Toxicological Methods of Pesticides for Registration" (GB15670—1995 of PRC). **Result** 50~200 μg/plate of emamectin benzoate did not induce positive mutations of strains TA97, TA98, TA100, TA102 in Ames test. Mouse bone marrow cell micronucleus test (6.25~50.00 mg/kg) showed that the micronucleus rate in each dosage group significantly increased compared with control group ($P>0.05$), and it also so did in mouse testicle cell chromosome aberration test (12.5~50.0 mg/kg). Subchronic toxicity test showed that at highest dosage ($8.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), part of the administrated rats presented some clinical symptoms such as general tremor, poor spirit, blowy fur, slow growth of body weight during 11 to 13 weeks after experiment; at the end of experiment, there were some decrease of lymphocyte proportion, increase of intermediate cells (MID) proportion and obvious rise of liver coefficient in female rats, but there were some increases of kidney and brain coefficients in male rats. While in middle and high dosage groups, the decrease of lymphocyte proportion, increase of intermediate cells (MID) proportion and obvious rise of heart coefficient only could be seen in male rats. There was no drug-related effects in rats at the dose level of $0.89 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. **Conclusion** The emamectin benzoate did not show any obvious mutagenicity, but it could induce nervous symptoms, interfere with body-weight growth and immunity function. The maximal non-effect dose of emamectin benzoate under oral administration for 90 days in SD rats should be $0.89 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ according to this experiment.

Key words: Methylaminoemamectin benzoate; Mutagenicity; Subchronic toxicity

甲氨基阿维菌素苯甲酸盐原药是阿维菌素经过化学改造后得到的产物, 对鳞翅母害虫的药效比阿维菌素显著提高且毒性较低^[1], 是一种新型的生物农药, 广泛用于农业生产。我们对该药的致突变性及亚慢性

毒性进行了实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐原药, 白色粉末状固体, 不溶于水。由上海某厂家提供。用大豆调和油配制。

1.1.2 受试动物 清洁级昆明种小鼠, 体重 23~32 g; 清洁级 SD 大鼠, 体重 80~93 g; 雌、雄各 40 只,

收稿日期: 2006-12-28; 修回日期: 2007-03-16

作者简介: 杨秀鸿 (1973-), 女, 主治医师, 从事毒理专业研究工作, 中南大学公共卫生学院 MPH 在读研究生。

均由湖南农业大学动物科技学院实验动物养殖场提供, 动物生产许可证号为 [SCXK (湘) 2003-0003]。

1.1.3 受试菌株 鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型突变菌株 (TA97、TA98、TA100 和 TA102), 由中国药物研究所提供。

1.2 实验方法

按 GB15670—1995《农药登记毒理学试验方法》的要求进行^[2]。

1.2.1 Ames 试验 试验采用标准平板掺入法, 在加与不加 S-9 的条件下进行测试。试验设 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 3 个剂量组, 同时设自发对照、溶剂对照 (DMSO) 和阳性对照。每个剂量 3 个平行皿, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后, 计数回复突变菌落数。试验组的回复突变菌落数若超过自发回复突变菌落数的 2 倍, 并呈剂量-反应关系, 则为阳性。

1.2.2 微核试验 将 60 只清洁级昆明种小鼠 (雌、雄各半), 随机分为 6 组。根据本实验室甲氨基阿维菌素苯甲酸盐原药的小鼠急性经口毒性实验结果, 分别设 50.00、25.00、12.50、6.25 mg/kg 4 个剂量组。阳性对照组给予 30 mg/kg 环磷酰胺腹腔注射, 阴性对照组给予大豆调和油, 20 ml/kg 。30 h 给药 2 次, 即 2 次给药间隔 24 h。阴性对照组和受试物组均采取灌胃给药。第二次给药后 6 h 颈椎脱臼处死动物, 取胸骨骨髓按常规制片。每只动物计数 1 000 个多染红细胞, 计算其微核率。为观察骨髓细胞是否受抑制, 求出每只动物骨髓细胞中多染红细胞/成熟红细胞之比 (PCE/NCE)。各剂量组及阴性对照组的微核率用泊松分布进行统计学处理。阳性对照组微核率按正态分布处理, 以动物性别分别统计, 采用 u 检验进行比较。

1.2.3 小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验 将 25 只昆明种雄性小鼠, 随机分为 5 组, 分别为 50.0、25.0、12.5 mg/kg 3 个染毒剂量组, 阳性对照组 (40.0 mg/kg 环磷酰胺腹腔注射) 和阴性对照组 (大豆调和油, 20 ml/kg)。每天给药 1 次, 连续 5 d。给药后第 13 天处死动物, 于处死前 6 h 腹腔注射秋水仙素 (4 mg/kg)。取睾丸按常规制片。每只动物每侧睾丸镜检 50 个中期分裂相, 记录畸变细胞数和畸变类型等。各组畸变细胞率、常染色体早熟分离率、性染色体早熟分离率采用 χ^2 检验进行统计学处理。

1.2.4 亚慢性毒性试验

1.2.4.1 染毒剂量及方法 将 80 只清洁级 SD 大鼠随机分成雌、雄各 4 组, 每组雌、雄各 10 只。设高、中、低 3 个染毒剂量组, 分别按 0.89、2.67、8.00

$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的剂量进行灌胃染毒, 每天 1 次, 连续 90 d。并根据动物体重变化调整给药量, 给药体积 0.5 $\text{ml}/100\text{g}$ 。另设一对照组, 给予大豆调和油, 其余处理同剂量组。

1.2.4.2 检查项目 每天观察动物的临床表现, 每周称体重一次并计算其食物利用率。于试验前、染毒第 6 周末、染毒结束时取静脉血, 分别用 ABX MICROS 60 血球计数仪、康仁 560 全自动生化分析仪测定其血常规、血生化指标。实验结束后, 股动脉放血处死动物, 分离脑、心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、睾丸或卵巢并称量, 计算脏器系数。上述标本用甲醛固定, 进行病理组织学检查。

1.2.4.3 统计方法 采用 SPSS 11.5 统计软件对各项检测数据作单因素方差分析。

2 结果

2.1 致突变试验

2.1.1 Ames 试验 受试物各剂量组对试验菌株在加与不加 S-9 代谢活化系统条件下, 回复突变数均未超过自发回变数的 2 倍, 亦无剂量-反应关系, Ames 试验结果为阴性。

2.1.2 微核试验 阴性对照组雌、雄小鼠骨髓 PCE 微核率均为 0.6%; 各剂量组雌、雄小鼠骨髓 PCE 微核率为 0~1.0% 和 0.4%~1.4%, 与阴性对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 阳性对照组雌、雄小鼠骨髓 PCE 微核率分别为 33.2% 和 28.6%, 与阴性对照组比较差异有统计学意义。

2.1.3 小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验 阴性对照组精母细胞染色体畸变率为 0.2%; 各剂量组畸变率为 0.2%~0.6%, 与阴性对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 阳性对照组染色体畸变率为 5.8%。

2.2 亚慢性毒性试验

2.2.1 一般情况及临床表现 自染毒后第 10~11 周, 高剂量组部分动物相继出现消瘦、精神状态不佳、被毛蓬松、全身震颤等中毒症状, 症状持续加重至试验结束。在整个试验期间, 对照组及低、中剂量组动物外貌、活动及一般状况均正常。

2.2.2 体重变化 与对照组相比, 染毒第 8~13 周, 各剂量组雄鼠体重增长明显缓慢; 染毒第 12 周, 中、高剂量组雄鼠体重增长明显缓慢 ($P<0.05$)。各剂量组雌鼠及低剂量组雄鼠在整个试验期间的体重变化与对照组相比差异无统计学意义。各剂量组雄鼠食饲效率与对照组相比差异, 无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

表1 甲氨基阿维菌素苯甲酸原药实验末期雄鼠体重的变化 (n=10)

g

组别	试验前	试验期间					试验结束时
		8周	9周	10周	11周	12周	
对照组	118.9±11.6	324.3±36.0	350.8±38.8	373.8±42.1	384.1±45.4	408.8±51.4	413.8±50.9
低剂量组	117.9±10.9	333.5±46.4	379.5±61.2	403.2±75.7	424.6±8.5	441.2±89.0	454.6±91.1
中剂量组	115.8±11.4	288.7±42.3	304.8±55.9	320.1±62.5	342.6±61.8	345.8±70.6*	364.7±67.5
高剂量组	114.4±14.6	279.2±42.9*	296.7±42.3*	311.7±53.6*	323.0±5.7*	328.2±53.1*	336.7±57.1*

*与对照组比较, P<0.05

2.2.3 血液学指标检查 雌、雄鼠各剂量组白细胞计数与对照组比较尽管无显著差异,但呈现出随着剂量的增加而下降的趋势。雌鼠高剂量组淋巴细胞

(LYM)比例降低、中间细胞(MID)比例增高(P均<0.01),雄鼠中、高剂量组LYM比例降低、MID比例增高(P均<0.01),见表2。

表2 甲氨基阿维菌素苯甲酸原药对部分血液学指标的影响

性别	组别	动物数	RBC (×10 ¹² /L)	Hb (g/L)	PLT (×10 ⁹ /L)	WBC (×10 ⁹ /L)	LYM (%)	MID (%)	GRA (%)
雌性	对照组	10	8.38±1.11	142.5±15.3	454.5±184.5	10.3±3.9	92.0±2.4	7.0±2.3	1.1±0.7
	低剂量组	10	8.42±0.83	142.0±9.5	443.0±100.5	10.1±4.6	85.6±11.4	9.9±6.2	4.5±5.6
	中剂量组	10	8.27±0.88	144.5±7.6	500.0±125.4	9.3±2.7	88.1±4.8	9.3±3.2	2.7±1.9
	高剂量组	10	8.15±0.88	148.5±10.8	409.5±143.1	9.2±3.9	78.6±12.5**	15.6±7.1**	5.7±5.7
雄性	对照组	10	9.44±0.71	153.0±9.2	427.5±130.8	11.4±3.2	87.6±5.7	9.3±3.1	3.1±3.2
	低剂量组	10	8.49±0.62	138.5±6.3*	427.5±120.5	11.3±3.2	82.7±7.0	12.0±3.0	5.2±4.4
	中剂量组	10	8.79±1.13	144.5±11.4	503.0±205.8	11.1±4.5	76.9±11.0**	14.7±4.4**	8.4±6.8
	高剂量组	10	9.21±1.02	151.5±16.8	448.5±115.4	9.5±2.7	73.0±7.9**	18.4±3.9**	8.7±5.5

与对照组比较, *P<0.05 **P<0.01, 表3、4同。

2.2.4 血清生化指标检查 与对照组相比,雌鼠低剂量组总蛋白降低,高剂量组总蛋白增加(P<0.05),因无剂量-反应关系,故而无临床意义。雄鼠中、高剂量组总蛋白及白蛋白增加(P<0.01或<

0.05),且有剂量-反应关系。雄鼠高剂量组肌酐(Cr)及血糖降低,但缺乏相应的剂量-反应关系,故而无临床意义;其余各组各项血液生化指标与对照组相比差异无统计学意义(P>0.05)见表3。

表3 甲氨基阿维菌素苯甲酸原药对血液生化指标的影响 (n=10)

性别	组别	TP (g/L)	Alb (g/L)	ALT (U/L)	Urea (μmol/L)	Cr (μmol/L)	GLU (μmol/L)	AST (U/L)
雌性	对照组	75.0±3.25	40.2±2.0	51.4±21.1	6.31±1.48	117.3±8.9	5.44±0.60	211.0±39.6
	低剂量组	71.1±5.30*	38.6±3.6	43.4±10.6	6.52±1.03	111.3±12.3	7.75±3.04	164.3±34.3
	中剂量组	76.4±3.60	40.3±1.5	58.1±17.7	7.92±2.05	112.6±17.2	5.52±1.51	214.1±76.3
	高剂量组	78.8±3.52*	41.8±3.3	85.8±49.4	8.57±2.53	107.5±16.2	6.60±2.23	245.3±116.7
雄性	对照组	70.5±3.27	38.1±1.2	54.9±10.4	6.23±0.68	126.8±13.4	8.25±2.89	222.0±22.4
	低剂量组	71.9±4.01	38.2±2.5	55.7±15.4	6.68±1.66	112.6±26.9	6.74±2.00	198.1±44.6
	中剂量组	77.0±5.97**	40.9±3.2*	60.3±9.9	9.30±1.31	127.5±10.9	8.54±1.95	217.9±34.8
	高剂量组	80.4±3.34**	44.2±2.3**	69.9±22.0	7.78±2.05	95.5±16.5**	3.54±0.93*	203.1±47.2

2.2.5 尿液指标检查 各组动物尿液指标与对照组比较差异无统计学意义(P>0.05)。

量与对照组相比差异无统计学意义(P>0.05),但雌鼠高剂量组肝脏、雄鼠高剂量组肾和脑以及中、高剂量组心脏脏器系数明显增加(P<0.01)。见表4。

2.2.6 脏器重量与脏器系数 各剂量组动物脏器重

表4 甲氨基阿维菌素苯甲酸原药对动物脏器系数的影响 (x̄±sd, n=10)

性别	组别	脑	心	肝	脾	肺	肾
雌性	对照组	0.68±0.15	0.31±0.02	2.56±0.18	0.22±0.05	0.62±0.25	0.57±0.07
	低剂量组	0.60±0.08	0.30±0.03	2.56±0.21	0.26±0.05	0.64±0.18	0.52±0.04
	中剂量组	0.64±0.16	0.31±0.04	2.68±0.23	0.22±0.08	0.72±0.62	0.54±0.05
	高剂量组	0.63±0.13	0.29±0.03	2.92±0.43**	0.28±0.11	0.61±0.14	0.59±0.10
雄性	对照组	0.44±0.06	0.26±0.02	2.39±0.17	0.16±0.01	0.41±0.10	0.50±0.04
	低剂量组	0.37±0.14	0.28±0.02	2.43±0.18	0.20±0.04	0.56±0.17	0.50±0.04
	中剂量组	0.46±0.10	0.30±0.02**	2.55±0.27	0.18±0.05	0.60±0.28	0.53±0.05
	高剂量组	0.60±0.18**	0.30±0.03**	2.58±0.27	0.21±0.08	0.56±0.20	0.61±0.05**

2.2.7 病理学检查 肉眼大体观察未见明显异常。

病理组织学检查对照组有1只雌鼠出现肝轻度脂肪变

性,肺及肾间质出现炎性细胞浸润,另有1只雌鼠肾盂肾炎,高剂量组有1只雌鼠出现肝点状坏死及肝间质少量炎细胞浸润。其他动物被检脏器未见改变。

3 讨论

致突变试验通常采用反映基因突变、体细胞突变和遗传危害(生殖细胞突变)的配套试验来检测外来化合物的诱变性。以往报道利用微核试验、Ames 试验及小鼠精子畸形试验评价甲氨基阿维菌素苯甲酸原药的致突变性,结果表明甲氨基阿维菌素苯甲酸原药无明显致突变作用^[3]。因不少非诱变性因素如变态反应、缺血、体温升高、感染都可引起精子畸形,增加了试验结果的不确定性。而小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验主要是检测生殖细胞染色体结构和数目的改变,对遗传危害评价意义较大^[4]。本研究中微核试验、Ames 试验结果均为阴性,与文献报道一致^[3]。小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验结果亦为阴性,更进一步证实了甲氨基阿维菌素苯甲酸没有遗传危害。

甲氨基阿维菌素苯甲酸具有明显的神经毒性作用,急性中毒时主要表现为乏力、运动失调、肌肉颤动等^[5]。发育神经毒理学研究亦显示该农药对动物子代具有明显的神经毒副作用^[6]。本研究给大鼠连续灌胃染毒3个月,观察到高剂量组部分动物在实验末期出现全身震颤、精神不振等神经毒性症状。雄鼠脑的脏器系数增加,但脑的病理组织学检查未见改变。

在亚慢性经口染毒毒理学研究中,血液学检查发现高剂量组雌鼠及中、高剂量组雄鼠淋巴细胞比例降低,中间细胞比例增高。各剂量组的白细胞计数与对照组比较尽管无统计学意义,但却呈现出随着剂量的

增加而下降的趋势。提示甲氨基阿维菌素苯甲酸对动物的造血系统及免疫功能有一定的影响。

血生化检查结果显示雄鼠总蛋白及白蛋白增加且有剂量-反应关系。高剂量组肝脏脏器系数明显增加,但肝脏的病理组织学检查与对照组比较未见明显改变。甲氨基阿维菌素苯甲酸是否影响肝脏的蛋白代谢及其机制有待进一步探讨。有文献报道,甲氨基阿维菌素苯甲酸原药能引起动物肾功能及肾脏脏器系数改变^[7]。研究结果显示雄鼠高剂量组肾脏脏器系数明显增加,但肾功能指标与病理检查未见改变。

甲氨基阿维菌素苯甲酸原药对雄鼠体重、临床表现、血液及生化指标的影响比雌鼠明显,说明其对动物的毒性作用存在性别差异。经对实验结果的综合分析,甲氨基阿维菌素苯甲酸原药SD大鼠亚慢性经口毒性的最大无作用剂量为0.89 mg·kg⁻¹·d⁻¹。

参考文献:

- [1] 倪珏萍,侯华民,曾霞,等.甲氨基阿维菌素苯甲酸与阿维菌素生物活性比较[J].现代农药,2003,(3):38.
- [2] GB 15670-1995 农药登记毒理学试验方法[S].1995:13-18.
- [3] 邢彩虹,戴宇飞,常平等.甲氨基阿维菌素的致突变性、致畸性及亚慢性毒性的研究[J].癌变·畸变·突变,2000,12(3):156-161.
- [4] 李寿祺.毒理学原理与方法[M].四川大学出版社,2003:164-165.
- [5] 吴强恩,周志俊.甲氨基阿维菌素的毒理学研究概况[J].中国公共卫生,2003,19(9):1129-1131.
- [6] Wise L D, Allen H L, Hoe C M, et al. Developmental neurotoxicity evaluation of the avermectin pesticide emamectin benzoate in Sprague-Dawley rats[J]. Neurotoxicol Teratol, 1997, 19(4): 315-326.
- [7] 邢彩虹,常平,张林林,等.甲氨基阿维菌素的毒性试验[J].卫生毒理学杂志,2001,15(1):45-46.

(上接第220页)

的主要原因之一,与以往报道相一致^[5]。

本次实验表明氯乙烯代谢酶 CYP 2E 1 基因型、饮酒、平均每年接触剂量是作业工人发生DNA损伤的影响因素。接触氯乙烯浓度越高、饮酒较为严重以及具有 CYP 2E 1 c 1c 2c 2c 2 基因型者容易发生DNA损伤。提示对VCM接触工人的健康监护应综合考虑,企业注重改进工艺流程,更新设备,减少跑冒滴漏,降低工作场所氯乙烯浓度,同时提高对具有 CYP 2E 1 c 1c 2c 2c 2 基因型者的监护水平,及早发现易感者,达到一级预防的目的。

参考文献:

- [1] 邵冰燃,张英民,郎需霞,等.国内聚氯乙烯产业现状和发展趋势分析[J].中国氯碱,2004,(4):1-5.
- [2] Christine B A, Carol S, Brian F C, et al. Polymorphisms in glutathione

S-transferases (GSTM and GSTT 1) and survival after treatment for breast cancer [J]. Cancer Res, 2001, 61(19): 7130-7135.

- [3] Huang C Y, Huang K L, Cheng T J, et al. The GSTT 1 and CYP 2E 1 genotypes are possible factors causing vinyl chloride induced abnormal liver function [J]. Arch Toxicol, 1997, 71(8): 482-485.
- [4] Wan J, Shi J, Hui L, et al. Association of genetic polymorphisms in CYP 2E 1, MPO, NQO 1, GSTM1 and GSTT1 genes with benzene poisoning [J]. Environ Heal Pers, 2002, 110(12): 1213-1218.
- [5] Rucy H W, Chung L D, Jung D W, et al. XRCC 1 and CYP 2E 1 polymorphisms as susceptibility factors of plasma mutant p53 protein and anti-p53 antibody expression in vinyl chloride monomer-exposed polyvinyl chloride workers [J]. Cancer Epid Bio & Pre, 2002, 11: 475-482.
- [6] Xiangde Liu, Heather Conner, Tetsu Kobayashi, et al. Cigarette smoke extract induces DNA damage but not apoptosis in human bronchial epithelial cells [J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2005, 33: 121-129.
- [7] 乔琰,鲁志松,姚汉超,等.彗星试验分析指标的进展和应用[J].卫生毒理学杂志,2004,3(18):190-192.