

运用 TK 基因突变试验及小鼠微核试验测定 95% 乙草胺原药的遗传毒性

杨光红, 李军*, 张爱华, 张雄飞, 姚慧, 杨远菊

摘要: [目的] 观察 95% 乙草胺原药的遗传毒性, 为其安全使用及农药管理登记提供依据。[方法] 建立 95% 乙草胺原药的致突变试验模型, 通过 TK 基因突变频率和微核率对其遗传毒性进行评价。[结果] 95% 乙草胺原药各剂量组 TK6 细胞 TK 位点突变频率与阴性对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与阴性对照组比较, 95% 乙草胺原药染毒组的骨髓嗜多染红细胞微核率未见明显增高 ($P > 0.05$)。[结论] 在本试验条件下, 95% 乙草胺原药无诱导小鼠骨髓细胞染色体损伤及致 TK6 细胞基因突变的作用。

关键词: 乙草胺; 遗传毒性; TK 基因突变试验; 微核试验

Detection of Genetic Toxicity of 95% Acetochlor by TK Gene Mutation Test and Mice Micro-nucleus Test YANG Guang-hong, LI Jun*, ZHANG Ai-hua, ZHANG Xiong-fei, YAO Hui, YANG Yuan-ju (Department of Occupational Health and Occupational Medicine, School of Public Health, Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China). *Address correspondence to LI Jun; E-mail: guiyilijun2001@sohu.com

Abstract: [Objective] To observe the genetic toxicity of 95% acetochlor, in order to provide scientific basis for its safe use, registered pesticide management and control measures. [Methods] Mutagenicity experimental models were set up. Genetic toxicity of 95% acetochlor was evaluated with TK gene mutation frequency and micronucleus rate. [Results] No significant difference existed between every experimental group and negative control group for TK gene mutation frequency ($P > 0.05$). Compared with negative control group, the micronucleus rates of mice didn't show a statistical increase in every experimental group ($P > 0.05$). [Conclusion] Under this experimental condition, 95% acetochlor cannot induce chromosome injury of mice polychromatic erythrocytes and gene mutation of TK6 cell.

Key Words: acetochlor; genetic toxicity; TK gene mutation assay; micro-nucleus test

随着农副业的飞速发展, 农药的研发生产及应用迅猛加速, 其在大规模促进农业生产的同时, 所带来的安全性问题亦日益突显。因此, 加强农药管理、提高安全防护, 减少或避免其潜在危害就显得至关重要。

TK 基因突变试验是一种利用哺乳动物体细胞检测遗传毒性的短期体外试验, 灵敏度较高, 简便易行。因此, 在许多发达国家, TK 基因突变试验已被广泛应用于化学物的遗传毒性检测。近年来, 国内也开始推广该方法, 我国的食物安全性毒理学评价程序已将其列为必选的遗传毒性试验之一^[1]。

乙草胺 (acetochlor) 又称乙基乙草胺, 是一种优秀的选择性芽前酰胺类除草剂^[2]。因其杀草谱广、效果突出、价格低廉、施用方便, 已作为重要且大面积推广使用的农用化学品^[3]。95% 乙草胺原药是在乙草胺的基础上精制而成, 具有纯度高、有机溶剂含量少、能增强除草效果等优点。目前关于 95% 乙草胺原药的研究以药效及代谢多见, 致突变性研究未见报道。因此, 本研究拟选用新颖、灵敏度高、检测终点覆盖面广的 TK 基因突变试验与经典可靠的微核试验组合配套, 从体内、体外角

度, 染色体及基因水平对 95% 乙草胺原药的致突变性进行研究, 旨在分析其对遗传物质的损伤程度及受累水平, 为其安全使用、农药登记及防治措施的制订提供毒理学依据。

1 材料与方法

1.1 受试物

95% 乙草胺原药, 南通某化工有限公司生产。

1.2 细胞及动物

人类淋巴母细胞株 TK6 细胞, 由四川大学华西公共卫生学院提供。健康成年昆明种小鼠, 由贵阳医学院动物实验中心提供, 动物证号 [SCXK (黔) 2002-001]。

1.3 培养液和培养条件

RPMI1640 培养液, 含 10% 马血清、200 $\mu\text{g/mL}$ 丙酮酸钠。5% 二氧化碳、37℃、饱和湿度条件下作常规悬浮培养。正式实验前, 先清除 TK6 细胞的自发突变^[3]。

1.4 主要试剂及仪器

三氟胸苷 (trifluorothymidine, TFT)、甲基磺酸甲酯 (methyl methanesulfonate, MMS)、丙酮酸钠 (美国 Sigma 公司); 环磷酰胺 (cyclophosphamide, CP, 江苏恒瑞医药股份有限公司); 超净生物工作台 (SW-CJ-1F, 苏州安泰空气技术有限公司), 隔水式 CO₂ 培养箱 (15AC, 日本三洋公司), OLYMPUS 显微镜 (日本 OLYMPUS 公司)。

[作者简介] 杨光红 (1975-), 女, 硕士, 副教授; 研究方向: 环境毒理学; E-mail: 280446859@qq.com

[*通信作者] 李军副教授; E-mail: guiyilijun2001@sohu.com

[作者单位] 贵阳医学院公共卫生学院职业卫生与职业医学教研室, 贵州 贵阳 550004

1.5 试验方法

1.5.1 TK 基因突变试验 依据 OECD 试验标准及参考文献[1, 4-6], 采用人类淋巴瘤细胞株 TK6 细胞, 测定细胞在 95% 乙草胺原药处理后的相对存活率(relative survival, RS), 据此进行试验剂量的选择。以 RS 为 10%~20% 时的受试物浓度为最高剂量, 再 2 倍向下等比稀释设置三个剂量组, 分别为 3.7500×10^{-1} 、 1.8750×10^{-1} 、 9.3750×10^{-2} 、 $4.6875 \times 10^{-2} \mu\text{L/mL}$, 剂量范围覆盖最大毒性及几乎无毒性。另设阴性对照(双蒸水)、溶剂对照(二甲基亚砜, DMSO)及阳性对照(甲磺酸甲酯, MMS)组, 进行 TK 基因突变试验。

1.5.2 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验 取昆明种小鼠 60 只, 雌雄各半, 体重 23~28 g, 随机分成雌雄各 6 组每组 5 只。设置阴性对照组(植物油, 20.0 mL/kg)、阳性对照组(CP, 50.0 mg/kg)和 4 个受试物试验组(剂量分别为 1/2、1/4、1/8 和 1/16 LD₅₀, 本实验测得 95% 乙草胺原药雌、雄小鼠急性经口 LD₅₀ 分别为 681 mg/kg 和 1 210 mg/kg)。依据 GB15670—1995

《农药登记毒理学试验方法》^[7]进行哺乳动物体内骨髓嗜多染红细胞微核试验。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件建立数据库, 各剂量组的 TK 基因突变频率及微核率采用 Poisson 分布进行统计分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 TK6 细胞毒性及基因突变试验

随着受试农药浓度的增加, 各剂量组的 RS、相对悬浮生长(RSG)、相对总生长(RTG)均相应地下降, 表明细胞毒性随样品浓度的增加而明显增大, 高剂量组时相对存活率(RS₀)仅为 13.57%。各剂量组 TK6 细胞 TK 位点的突变频率呈上升趋势, 为 $(4.81\sim8.23) \times 10^{-6}$, 与阴性对照组相比, 差异无统计学意义($P>0.05$), 见表 1。

表 1 95% 乙草胺原药的 TK 基因突变试验结果

组别	剂量	PE ₀ (%)	PE ₃ (%)	RS ₀ (%)	RS ₃ (%)	RSG(%)	RTG(%)	TMF($\times 10^{-6}$)
阴性对照组(双蒸水)	0.0000	79.49	89.44	100.00	100.00	100.00	100.00	3.58
溶剂对照组(DMSO)	0.15%	30.98	70.47	38.97	79.08	75.00	59.31	5.66
染毒组(95% 乙草胺原药)	$4.6875 \times 10^{-2} \mu\text{L/mL}$	30.72	122.53	38.65	136.99	85.00	116.44	4.81
	$9.3750 \times 10^{-2} \mu\text{L/mL}$	26.62	108.11	33.49	120.87	70.00	84.61	5.99
	$1.8750 \times 10^{-1} \mu\text{L/mL}$	19.01	99.50	23.91	111.25	45.00	50.06	7.19
	$3.7500 \times 10^{-1} \mu\text{L/mL}$	10.79	92.00	13.57	102.86	20.00	20.57	8.23
阳性对照组(MMS)	5.0000 $\mu\text{g/mL}$	8.27	52.97	10.40	59.22	30.00	17.77	58.20*▲

[注] PE₀: 0 天的平板接种效率; PE₃: 第 3 天的平板接种效率; TMF: 总突变频率; RS₀: 第 0 天的相对存活率; RS₃: 第 3 天的相对存活率; *: 与阴性对照组比较, $P<0.01$; ▲: 与溶剂对照组比较, $P<0.01$ 。

2.2 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验

由表 2 可知, 阳性对照组的骨髓嗜多染红细胞微核率较阴性对照组明显升高($P<0.01$); 而 95% 乙草胺原药各染毒组的嗜多染红细胞微核率在 1.0% 左右波动, 与阴性对照组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。阴性对照组的嗜多染红细胞与成熟红细胞比值(PCE/NCE)为 1.56 ± 0.20 , 给予 95% 乙草胺原药后, 各剂量组的 PCE/NCE 值未见明显降低($P>0.05$)。

表 2 95% 乙草胺原药对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的影响

组别	剂量 [△] (mg/kg)	性 别	动物数 (只)	镜检 PCE 数(个)	含微核的 PCE 数(个)	微核率 (%)	PCE/NCE ($\bar{x} \pm s$)
阴性对照组 (植物油)	20.0	雌	5	5 000	5	1.0	1.56 ± 0.20
		雄	5	5 000	4	0.8	1.59 ± 0.18
阳性对照组 (CP)	50.0	雌	5	5 000	161	32.2*	1.65 ± 0.23
		雄	5	5 000	154	30.8*	1.63 ± 0.27
染毒组 (95% 乙草 胺原药)	42.6	雌	5	5 000	4	0.8	1.53 ± 0.31
	85.1	雌	5	5 000	4	0.8	1.58 ± 0.31
	170.3	雌	5	5 000	5	1.0	1.62 ± 0.29
	340.5	雌	5	5 000	4	0.8	1.58 ± 0.28
	75.6	雄	5	5 000	3	0.6	1.65 ± 0.18
	151.3	雄	5	5 000	6	1.2	1.65 ± 0.33
	302.5	雄	5	5 000	3	0.6	1.49 ± 0.18
	605.0	雄	5	5 000	5	1.0	1.60 ± 0.29

[注] △: 阴性对照组的剂量单位为 mL/kg; PCE: 嗜多染红细胞; NCE: 正染红细胞; *: 与阴性对照比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

TK 基因突变试验自创建以来, 已广泛应用于多种理化因素的突变检测及致突变作用所致遗传损伤的研究。其与传统的 HGPRT 基因突变试验不同, 它不仅能检出 TK 位点的点突变、小缺失等小的基因突变, 还能检出大缺失、易位、重组甚至染色体非整倍性的遗传学改变等。经过 30 多年不断地改进和完善, 已形成了国际上致突变检测试验组合中具备较高可靠性和适用性的重要试验^[8]。因此, 如何利用好其检测突变谱广泛的优势, 将其应用于农药遗传毒性的检测, 为 TK 基因突变试验在农药安全性评价中的推广应用积累资料, 正是本研究所探讨的问题。

目前国际上检测 TK 位点突变的常用靶细胞株是小鼠淋巴瘤细胞(L5178Y), 而本研究选用 TK6 细胞进行 TK 基因突变试验, 是因为 TK6 细胞试验在检测低剂量受试物时比 L5178Y 细胞敏感, 且来源于人类, 故在研究外来化合物对人体遗传毒性的作用机理方面, TK6 细胞具有更大的实际意义。依照目前各国的常规, 阴性对照组 PE₀ 在 60%~140%、PE₃ 在 70%~130%, 最高剂量组 RS 在 10%~20% 时, 试验成立^[9]。本试验中, 阴性对照组的 PE₀、PE₃ 分别为 79.49% 及 89.44%; 最高剂量组的 RS 为 13.57%; 阳性对照(MMS)的突变频率与阴性对照、溶剂对照比较差异有统计学意义($P<0.01$)且达到阴性、溶剂对照的 10 倍以上, 表明本试验系统可靠。研究发现, 随着 95% 乙

草胺原药染毒浓度的增加,各剂量组的 RS、RSG、RTG 皆呈下降趋势,最高剂量组的 RS 为 13.57%、RSG 为 20.00%、RTG 为 20.57%,表现出较大的细胞毒性,明显抑制了 TK6 细胞的生长。而对其总突变频率(TMF)观察发现:TK6 细胞 TK 位点的总突变频率随染毒剂量的增加有升高的趋势,但最高剂量组的 TMF 仅达 8.23×10^{-6} ,明显低于阳性对照组(58.20×10^{-6} , $P < 0.01$),与阴性对照组、溶剂对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示在已产生明显细胞毒性的情况下,95% 乙草胺原药尚不能诱发 TK6 细胞的突变频率明显增加,因此,在本研究的检测剂量范围内其无诱导 TK6 细胞基因突变的作用。

由于体内实验可能更接近遗传毒性危害性鉴定的目标,因此,毒理学评价常在体外实验的基础上,同时进行体内实验。作为一种经典、稳定的体内致突变试验方法,微核不但能检测染色体完整性受损,尚能判定染色体分离异常。本试验采用 95% 乙草胺原药对小鼠进行染毒,发现各染毒组小鼠的微核率与阴性对照组接近,差异无统计学意义($P > 0.05$)。同时对阴性对照组和染毒组的嗜多染红细胞与成熟红细胞的比值(PCE/NCE)进行观察,发现给药后该比值未见明显降低,表明染毒剂量对小鼠骨髓细胞无明显毒性作用。因此认为,95% 乙草胺原药无明显致小鼠骨髓细胞染色体完整性受损及染色体分离异常的作用。

此外,结合本实验室遗传毒性评价试验中其他试验的结果(染色体畸变试验和 Ames 试验均为阴性),可进一步验证 95% 乙草胺原药在体内外均无遗传毒性。本研究结果的获得丰富了 95% 乙草胺原药的致突变性资料,可为其安全使用及农药管理登记提供依据。同时,鉴于目前正在修订的《农药登记毒理学试验方法》已将 TK 基因突变试验列为致突变性评价的必选实验,本研究可为该试验方法推广应用于农药安全性评价提供依据。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB 15193.20—2003 食品安全性毒理学评价程序和方法: TK 基因突变试验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003: 123-127.
- [2] 李华文, 陆丹, 吴军, 等. 乙草胺经皮毒性的研究[J]. 毒理学杂志, 2008, 22(4): 327-329.
- [3] 周启星, 孙福红, 郭观林, 等. 乙草胺对东北黑土铅形态及生物有效性的影响[J]. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1883-1886.
- [4] OECD. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, 476. In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test[EB/OL]. [2009-05-01]. <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9747601e.pdf?expires=1292550219&id=0000&accname=freeContent&checksum=1C3BDC434977A4344C0146D1B3E53CBD>.
- [5] 丁晓琴, 陈杰, 张立实. 用 TK 基因突变试验评价葛根素的抗诱变性[J]. 癌变·畸变·突变, 2007, 19(6): 463-465.
- [6] 帅培强, 张立实, 王怡净. L5178Y 与 TK6 细胞的 TK 基因突变实验比较[J]. 四川大学学报: 医学版, 2004, 35(5): 650-653.
- [7] 国家技术监督局. GB15670—1995 农药登记毒理学试验方法: 小鼠骨髓多染红细胞微核试验[S]. 北京: 中国标准出版社, 1995: 16-17.
- [8] 袁健, 曹佳. 小鼠淋巴瘤细胞试验用于突变检测的研究进展[J]. 毒理学杂志, 2005, 19(4): 328-330.
- [9] 赵洁, 胡燕平, 宋捷, 等. 运用小鼠淋巴瘤细胞基因突变试验测定 4,4'-二甲基二苯基碘盐六氟磷酸盐的遗传毒性[J]. 中国药理学与毒理学, 2006, 20(6): 500-503.

(收稿日期: 2009-12-31)

(英文编审: 黄建权; 编辑: 王晓宇; 校对: 徐新春)

(上接第 741 页)

参考文献:

- [1] KIMURA A C, PALUMBO M S, MEYERS H, et al. A multi-state outbreak of Salmonella serotype Thompson infection from commercially distributed bread contaminated by an ill food handler[J]. Epidemiol Infect, 2005, 133(5): 823-828.
- [2] 许学斌, 顾宝柯, 杨兰萍, 等. 5 种沙门菌分离培养基的应用和比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(7): 773-775.
- [3] 许学斌, 袁政安, 金汇明, 等. 上海市山夫登堡沙门菌流行特征和分子分型研究[J]. 中华流行病学杂志, 2009, 30(9): 933-937.
- [4] 顾宝柯, 袁政安, 金汇明. 上海市沙门菌病流行特征分析[J]. 环境与职业医学杂志, 2008, 25(3): 245-247.
- [5] LUO Y P, LI J Y, MA Y, et al. Isolation and characterization of nontyphoid Salmonella from hospital food handlers in Beijing, China[J]. J Food Safety, 2009, 29(3): 414-423.
- [6] FEDER I, NIETFIELD J C, KELLY B, et al. Evaluation of enrichment techniques for the isolation of Salmonella choleraesuis from swine feces[J]. J Microb Methods, 1998, 33(2): 143-151.
- [7] 朱超, 许学斌. 沙门菌血清型诊断[M]. 上海: 同济大学出版社, 2009: 86-127.

(收稿日期: 2009-10-23)

(英文编审: 黄建权; 编辑: 徐新春; 校对: 王晓宇)