

95% 二氯吡啶酸原药遗传毒性的初步探讨^{*}

汪希兰, 潘雪莉, 杨 清, 陈明丹^{**}

(贵阳医学院 公共卫生学院, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 观察 95% 二氯吡啶酸原药对鼠伤寒沙门菌回复突变试验(Ames 试验)菌株基因突变和中国地鼠肺(CHL)细胞染色体畸变的影响,初步探讨其遗传毒性,为该农药的毒理学安全性评价提供基础数据。方法: 采用 Ames 试验及 CHL 细胞染色体畸变试验在直接作用或代谢活化条件下,分别设立试验剂量组和阴性、阳性对照组,37℃培养检测。结果: 95% 二氯吡啶酸原药在直接作用或代谢活化条件下,对鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 各剂量组回复突变菌落数均未超过阴性对照组回变菌落数的 2 倍;CHL 细胞染色体畸变试验显示各剂量组与阴性对照组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 在本试验条件下,95% 二氯吡啶酸原药无诱发鼠伤寒沙门菌基因突变和 CHL 细胞染色体畸变作用。

[关键词] 二氯吡啶酸; 沙门菌; 鼠伤寒; 毒性实验; 染色体畸变

[中图分类号] R139.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)01-0052-03

A Preliminary Study on Genotoxicity of 95% Clopyralid

WANG Xilan, PAN Xueli, YANG Qing, CHEN Mingdan

(School of Public Health, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of clopyralid at concentration of 95% on gene mutation of bacteria strains used in Ames test and chromosomal aberration of Chinese hamster lung (CHL) cell, and to explore genotoxicity of clopyralid to obtain basic data for its toxicological safety evaluation. **Methods:** Ames test and chromosomal aberration test in CHL were employed to examine genotoxicity of clopyralid. **Results:** By direct action or under metabolic activation, the numbers of reverse mutation colonies of TA97, TA98, TA100 and TA102 of *Salmonella typhimurium* induced by each dosage of 95% clopyralid were less than twice that of negative control group. There was no significant difference in chromosomal aberration rate of CHL cell between each clopyralid dosage group and control group ($P > 0.05$). **Conclusions:** Under this experimental condition, 95% clopyralid could not cause gene mutation of *S. typhimurium* or chromosomal aberration of CHL cell.

[Key words] clopyralid; *salmonella typhimurim*; toxicity tests; chromosome aberration

二氯吡啶酸(clopyralid, 又名龙拳)是美国陶氏益农有限公司开发生产的一种吡啶羧酸类除草剂,其除草效果较好,由于具有杀草谱宽、适用于多种作物、与其它除草剂混用提高对难治杂草的防效等优点,尤其对油菜田难防阔叶杂草稻槎菜有特效,目前正在我国油菜产区广泛推广^[1]。据资料表明,二氯吡啶酸在环境介质和生

物样品中的残留期较长,其对自然环境及人类的潜在危害值得关注^[2,3]。目前,关于二氯吡啶酸的遗传毒性方面资料较少,因此于 2010 年 11 月开展了此项研究,应用 Ames 试验和体外染色体畸变试验,从基因突变和染色体畸变 2 个方面了解二氯吡啶酸的遗传毒性,为该农药的安全性毒理学评价提供基础数据。

^{*} [基金项目] 贵阳医学院青年基金资助项目(K2010-5)

^{**} 贵阳医学院预防医学系 2006 级本科生

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物 95% 二氯吡啶酸原药,白色絮状固体。试验时用二甲基亚砜(DMSO)溶解配制。

1.1.2 菌株及细胞 Ames 菌株,采用经生物学特性鉴定符合要求的鼠伤寒沙门菌组氨酸营养缺陷型 TA97、TA98、TA100、TA102 菌株,由军事医学科学院毒物药物研究所提供。中国地鼠肺(CHL)细胞株,由中科院昆明动物研究所提供。大鼠肝微粒体代谢活化酶(S₉)由苯巴比妥钠和 β-萘黄酮诱导制成,经鉴定符合要求后于 -80 ℃ 低温保存。

1.2 方法

1.2.1 Ames 试验 依据 GB15670-1995《农药登记毒理学试验方法》采用平板掺入法,在加 S₉ (+ S₉) 和不加 S₉ (- S₉) 条件下进行测试^[4]。根据预试验结果以每皿 5 000 μg 为最高剂量,按 5 倍组距下设每皿 1 000、200、40、8 μg 4 个剂量组,同时设自发对照组、阴性对照组和阳性对照组。阳性对照组不加 S₉ 的 TA97、TA98 和 TA102 菌株用敌克松(Dexon),TA100 菌株用叠氮钠(NaN₃);阳性对照组加 S₉ 的 TA97、TA98 和 TA100 菌株用 2-氨基芴(2-AF),TA102 菌株用 1,8-二羟基蒽醌(1,8-HAQ)。37 ℃ 培养 48 h 后计数每皿回变菌落数,每个剂量作 3 个平行皿。重复试验 1 次。

1.2.2 CHL 细胞染色体畸变试验 依据文献

[5] 方法,采用 CHL 细胞株进行试验,根据预试验结果在加入或不加入 S₉ 的条件下,95% 二氯吡啶酸原药的最高剂量均为 5 000 mg/L,按 2 倍组距下设 2 500 mg/L 和 1 250 mg/L 2 个剂量组,同时设阴性对照、阳性对照。不加 S₉ 的阳性对照为丝裂霉素 C(MMC);加 S₉ 的阳性对照为环磷酰胺(CP)。37 ℃ 培养 24 h 后收获细胞,低渗处理,制片、阅片。油镜下每组观察中期细胞分裂相 200 个(阳性对照组观察 100 个细胞),记录畸变类型,计算染色体畸变率(%)。每个剂量作 2 个平行孔。

1.2.3 统计学方法 采用 SPSS 15.0 软件建立数据库进行统计处理。Ames 试验以试验组的回变菌落数大于阴性对照组回变菌落数的 2 倍,并呈剂量-反应关系,判为阳性。剂量-反应关系采用相关分析,染色体畸变试验用 R × C 表 χ² 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ames 试验

试验结果表明,受试物各剂量组对各测试菌株在加或不加 S₉ 的条件下,其回变菌落数均未超过阴性对照组回变菌落数的 2 倍,亦无明显的剂量-反应关系,而阳性对照组各测试菌株的回变菌落数均明显增加,并超过阴性对照组回变菌落数的 2 倍以上。见表 1。

表 1 95% 二氯吡啶酸原药的 Ames 试验结果($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Results of Ames test with 95% clopyralid

组别		剂量 (μg / 皿)	回变菌落数							
			TA97		TA98		TA100		TA102	
			- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉
自发对照		0	117 ± 13	121 ± 17	30 ± 6	36 ± 4	127 ± 7	119 ± 16	240 ± 20	241 ± 6
阴性对照		0	122 ± 16	115 ± 10	34 ± 9	32 ± 4	125 ± 14	132 ± 9	247 ± 20	252 ± 23
二氯吡啶酸		8.0	123 ± 19	119 ± 16	29 ± 4	30 ± 3	149 ± 6	126 ± 19	264 ± 20	267 ± 11
		40.0	127 ± 16	112 ± 6	33 ± 2	32 ± 3	146 ± 26	115 ± 22	246 ± 15	249 ± 23
		200.0	105 ± 5	120 ± 5	34 ± 4	30 ± 6	140 ± 20	123 ± 23	238 ± 29	247 ± 11
		1 000.0	122 ± 14	111 ± 16	35 ± 3	32 ± 6	132 ± 22	127 ± 20	268 ± 29	266 ± 24
		5 000.0	115 ± 8	120 ± 9	32 ± 4	26 ± 2	137 ± 18	127 ± 4	248 ± 23	255 ± 19
阳性对照	Dexon	50.0	2 953 ± 186		1 120 ± 130				785 ± 80	
	NaN ₃	1.5					1 015 ± 140			
	2-AF	10.0	1 139 ± 113		1 157 ± 158		1 167 ± 117			
	1,8-HAQ	50.0							771 ± 34	

2.2 CHL 细胞染色体畸变

表 2 显示,在加或不加 S_0 的条件下,95% 二氯吡啶酸原药各剂量组的染色体畸变率与阴性对照组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);阳性对照组 (MMC 和 CP) 染色体畸变率显著增加,与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$),畸变类型主要有断裂、缺失和交换。

表 2 95% 二氯吡啶酸原药的 CHL 细胞
染色体畸变结果

Tab. 2 Analysis results of chromosomal
aberration test with 95% clopyralid

组别	剂量 (mg/L)	S_0	观察细胞 数(个)	染色体异常 细胞数(个)	畸变细 胞率(%)
阴性对照	0	+	200	16	8.0
		-	200	10	5.0
二氯吡啶酸	1 250.0	+	200	16	8.0
		-	200	18	9.0
	2 500.0	+	200	15	7.5
		-	200	19	9.5
	5 000.0	+	200	14	7.0
		-	200	16	8.0
阳性对照 MMC	0.5	-	100	35	35.0 ⁽¹⁾
	CP 25.0	+	100	24	24.0 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ 阳性对照与阴性对照比较, $P < 0.01$; 加 S_0 时, 95% 二氯吡啶酸原药各剂量组与加 S_0 的阴性对照比较, $\chi^2 = 0.195$, $P > 0.05$; 不加 S_0 时, 95% 二氯吡啶酸原药各剂量组与不加 S_0 的阴性对照比较, $\chi^2 = 3.360$, $P > 0.05$

3 讨论

二氯吡啶酸除草剂, 在目前的油菜田杂草管理体系中起着非常重要的作用, 能有效提高防治效果和减轻劳动强度。随着该农药的发展和需求量的日益增长, 随之而来的安全性问题备受关注, 对其远期危害的研究也显得尤为重要。

Ames 试验是目前国际公认的检测环境化学物的致突变性、致癌性的首选试验, 是应用最广泛的检测基因突变的有效方法, 试验菌株中 TA97、

TA98 可检测各种移码型致突变物, TA100 可检测碱基对置换致突变物, TA102 可检测氧化型致突变物, 分别从不同角度判定其致基因突变性^[6]。本试验在 $-S_0$ 和 $+S_0$ 条件下, 受试物各剂量组均未诱发测试菌株回变菌落数明显增加, 结果为阴性, 显示 95% 二氯吡啶酸原药无诱发菌株基因突变活性。

体外哺乳动物细胞染色体畸变试验是目前较新颖实用的短期致突变试验之一, 反映的遗传学终点是染色体分离改变和染色体完整性改变^[7]。从该试验也未观察到 95% 二氯吡啶酸原药能引起细胞染色体畸变率增加。根据以上试验结果, 从基因突变和染色体畸变两个方面检测均未观察到该农药的致突变作用, 显示无潜在的遗传毒性。该研究结果为 95% 二氯吡啶酸原药遗传毒性资料的完善及安全性评价提供了数据支撑, 并为进一步的研究提供了一定的参考依据。

4 参考文献

- [1] 唐晓燕. 油菜田防治阔叶杂草除草剂——75% 龙拳 (二氯吡啶酸) GS[J]. 现代农药, 2006(4): 41-42.
- [2] 余苹中, 戴荣彩, 贺敏, 等. 二氯吡啶酸在小麦和土壤中的残留分析方法[J]. 农药科学与管理, 2006(11): 8-11.
- [3] Wall D A. Potato response to simulated drift of dicamba, clopyralid, and tribenuron[J]. Weed Sci, 1994(42): 110-114.
- [4] GB15670-1995. 农药登记毒理学试验方法[S]. 1996: 13-16.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 化学品毒性鉴定技术规范[S]. 2005: 59-63.
- [6] 左派欣, 徐颖, 姜红, 等. 代森锰原药的致突变性试验研究[J]. 安徽农业科学, 2010(2): 748-749.
- [7] 何林, 吴赤蓬, 邹志飞. 亚硝酸钠对中国仓鼠肺细胞染色体畸变率的影响[J]. 现代预防医学, 2008(17): 3288-3293.

(2011-10-19 收稿, 2011-11-24 修回)

编辑: 周 凌