

论著

95% 水胺硫磷慢性毒性和致癌性研究

张晓鹏 张馨 王伟 崔文明 刘兆平 向钱 贾旭东 宋雁 张文众 李宁
(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021)

摘要:目的 研究 95% 水胺硫磷的慢性毒性和致癌性, 提出其未观察到有害作用水平。方法 480 只断乳 SD 大鼠按体重随机分成 4 组, 每组 120 只, 雌雄各半。4 组大鼠喂饲含有不同浓度水胺硫磷的块料, 对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组的剂量分别是 0、0.6、6 和 30 mg/kg 饲料, 试验期 2 年。观察大鼠日常表现, 检测体重、进食量、血常规、凝血时间、血生化、胆碱酯酶、尿常规等指标并进行大体和病理组织学检查, 计算食物利用率、脏器系数和肿瘤发生率。结果 试验第 6、18、24 个月, 高剂量组雌性大鼠胆碱酯酶活性显著低于对照组 ($P < 0.01$); 试验第 6、12、18 和 24 个月, 中、高剂量组雄性大鼠胆碱酯酶活性显著低于对照组 ($P < 0.01$)。各组大鼠的其他指标, 包括肿瘤发生率差异均无统计学意义。结论 根据胆碱酯酶的检测结果确定水胺硫磷的未观察到有害作用水平: 雌性为 0.468 mg/(kg BW · d) (中剂量), 雄性为 0.037 mg/(kg BW · d) (低剂量)。未见致癌作用。

关键词: 水胺硫磷; 大鼠; 慢性毒性; 致癌性; 未观察到有害作用水平

中图分类号: TQ453.22; S481.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2010)03-0229-04

Chronic Toxicity and Carcinogenicity of 95% Isocarbophos in Rats

ZHANG Xiao-peng, ZHANG Xin, WANG Wei, CUI Wen-ming, LIU Zhao-ping,
XIANG Qian, JIA Xu-dong, SONG Yan, ZHANG Wen-zhong, LI Ning

(National Institute of Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To study the chronic toxicity and carcinogenicity of 95% isocarbophos and to provide its no observed adverse effect level (NOAEL). **Method** Four hundred and eighty male and female SD rats were divided into 4 groups and fed with foods containing 0, 0.6, 6 and 30 mg/kg isocarbophos respectively for 2 years. The daily behavior, body weight, food consumption, blood biochemistry, clotting time, cholinesterase activity, gross anatomy and histopathology, and the incidence of tumors were examined and analyzed. **Results** Activities of cholinesterase were significant decreased in some females (at the 6, 18, 24 month of the 30 mg/kg group) and males (at the 6, 12, 18, 24 month of the 6 mg/kg and 30 mg/kg groups). There were no significant changes at any level of isocarbophos on any other parameters including the incidence of tumor in any organ or tissue. **Conclusion** The NOAEL of isocarbophos were 0.486 and 0.037 mg/(kg BW · d) for female and male respectively, and isocarbophos is non-carcinogenic under the conditions of the study.

Key words: Isocarbophos; Rat; Chronic Toxicity; Carcinogenicity; No Observed Adverse Effect Level

有机磷农药是中国使用最广泛的杀虫剂之一, 作用机制主要是抑制乙酰胆碱酯酶的活性, 降低其水解乙酰胆碱的能力, 造成乙酰胆碱在神经末梢的大量蓄积, 从而引起神经功能紊乱, 造成各种中毒症状^[1]。农药在对害虫发挥作用的同时对施用者造成一定的毒副作用, 农药的毒副作用是影响农药发展方向及品种取舍的关键因素^[2]。对有机磷农药毒副作用研究较多的是急性中毒问题, 但更为重

要的致癌、致突变和生殖毒性 (carcinogenic, mutagenic or toxic for reproduction, CMR) 研究对于健康风险评估具有现实意义。

水胺硫磷为有机磷农药, 95% 水胺硫磷为白色晶体, 有刺激性气味, 对雌雄大鼠的半数致死剂量 (median lethal dose, LD₅₀) 分别为 17.1 和 28.7 mg/kg BW (本实验室检测), 根据毒性分级属高毒级。本研究对 95% 水胺硫磷进行 2 年大鼠喂养试验, 以了解 95% 水胺硫磷的慢性毒性和致癌性, 为水胺硫磷农药的安全使用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

收稿日期: 2010-01-06

作者简介: 张晓鹏 硕士 助理研究员 研究方向为食品毒理

E-mail: xiaopengbird@yahoo.com

通信作者: 李宁 博士生导师 研究员 研究方向为食品毒理

E-mail: lining65@yahoo.com

日立 7080 型自动生化仪, BECKMAN COULTER Ac. T diff2™ 血液分析仪, 科宝 SCAN100 全自动尿分析仪器, 德国美创四通道 MC-4000plus 血凝仪, BECKMAN DU650 紫外分光光度仪。

库尔特电解质平衡液和库尔特溶血剂(贝克曼库尔特实验系统(苏州)有限公司), 血生化检测试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司)。

1.2 受试物

称取适量 95% 水胺硫磷加入少量吐温-20^[3] 充分搅拌至完全溶解后加蒸馏水制备成溶液, 再混入一定量的大鼠专用饲料(面粉)配制成浓度分别为 30、6 和 0.6 mg/kg(高、中和低剂量组)的大鼠饲料。

1.3 预试验

对 SD 大鼠进行经口急性毒性试验和适口性试验, 为 2 年喂养试验的剂量设定提供基础。结果表明 95% 水胺硫磷对雌、雄 SD 大鼠的 LD₅₀ 分别为 17.1 和 28.7 mg/(kg BW · d)。将 95% 的水胺硫磷按照设定剂量掺入饲料后供大鼠正常摄食。

1.4 动物及处理

1.4.1 实验动物 SPF 级断乳 SD 大鼠 480 只, 雌、雄各半, 由北京动物试验中心维通利华实验技术有限公司提供, 合格证号为[SCXK(京)2002-0003]。饲养于首都医科大学附属北京口腔医院 SPF 级动物房, 许可证号为[SYXK(京)2005-0031], 温度 20~25℃, 湿度 40%~70%, 12 h 明暗交替, 换气次数为 10~20 次/h。本实验符合国家《实验动物管理条例》, 并经中国疾病预防控制中心营养与食品安全所动物伦理委员会认可。

1.4.2 分组和染毒 经口染毒。大鼠按体重随机分成对照、低、中、高剂量组, 每组 120 只, 雌雄各半。兼顾雌雄大鼠 LD₅₀ 的差别, 设定雌雄各组的染毒剂量分别为: 高剂量组为 3.0 mg/(kg BW · d), 约 1/8 LD₅₀ (30 mg/kg 饲料); 中剂量组为 0.6 mg/(kg BW · d), 约 1/40 LD₅₀ (6 mg/kg 饲料); 低剂量组为 0.06 mg/(kg BW · d), 约 1/400 LD₅₀ (0.6 mg/kg 饲料); 对照组为 0 mg/(kg BW · d) (0 mg/kg 饲料)。不同染毒组的雌、雄大鼠均喂饲含有不同浓度的块料。根据体重和摄食量计算实际平均染毒剂量, 计算公式如下:

$$\text{染毒剂量} \left[\frac{\text{mg}}{(\text{kg BW} \cdot \text{d})} \right] = \frac{\text{动物摄食量}(\text{g/d}) \times \text{饲料中受试物浓度}(\text{mg/kg})}{\text{动物体重}(\text{kg})}$$

1.5 观察指标

1.5.1 体重、进食量和日常观察 前 13 周每周记录大鼠体重、进食量 1 次, 以后每月记录; 每日观察大鼠的活动、粪便、进食及饮水情况。

1.5.2 血液和尿液检查 染毒后 6、12、18 和 24 个

月分别取各剂量组相同大鼠(每组雌雄各 10 只, 如有死亡则顺延)的内眦静脉血, 测定血液学(haematology)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、血生化(blood biochemistry)和尿常规(urinalysis)等各项指标。

1.5.3 胆碱酯酶测定 染毒后 6、12、18 和 24 个月分别取各剂量组相同大鼠(每组雌雄各 10 只, 如有死亡则顺延)的内眦静脉血, 分离血浆, 采用改良 Ellman 法^[4]测定血浆胆碱酯酶的活性。

1.5.4 病理学检查 试验结束时戊巴比妥钠麻醉后断头处死所有动物, 对有关脏器进行大体解剖和病理学检查。观察所见的肿瘤和可疑病变部位都留取标本做组织学检查。对重要脏器称重并计算脏器系数。实验期间死亡或因濒死而处死的动物采用同样的方式处理。

1.5.5 肿瘤发生率 肿瘤发生率(%) = 患瘤动物总数/有效动物总数 × 100% (有效动物总数指最早出现肿瘤时的存活动物总数)

1.6 统计学方法

体重、进食量、血常规、生化等指标经 PEMS 统计软件包进行方差分析, 方差不齐者采用非参数分析。所有的配对比较都为处理组与对照组进行比较。显著性水平为 0.05。

2 结果

2.1 染毒剂量

各组设计染毒剂量分别为 0、0.06、0.6 和 3.0 mg/(kg BW · d), 配制饲料浓度分别为 0、0.6、6 及 30 mg/kg, 试验结束根据摄食量计算出各组的实际染毒剂量分别为: 雌性大鼠 0、0.048、0.468 和 2.316 mg/(kg BW · d), 雄性大鼠 0、0.037、0.365 和 1.822 mg/(kg BW · d)。

2.2 体重和进食量

试验期间各剂量组大鼠随着周龄的增加体重逐渐增加, 各染毒组雌雄大鼠体重、进食量和食物利用率与对照组比较差异无统计学意义。

2.3 血液和尿液检查

2.3.1 血常规 试验 12 个月时雌性大鼠低剂量组红细胞数(red blood cell, RBC)和白细胞数(white blood cell, WBC)显著高于对照组, 雌性大鼠低剂量组红细胞压积(mean corpuscular volume, MCV)和中剂量组 WBC 显著低于对照组, 雄性大鼠低剂量组 MCV 和高剂量组 RBC 显著高于对照组; 试验 18 个月时高剂量组雌性大鼠白细胞分类的单核细胞百分比(monocyte, MO%)和雄性大鼠淋巴细胞百分比(lymphocyte, Ly%)显著高于对照组, 中、低剂量

组雄性大鼠中性粒细胞百分比 (granulocyte, GR%) 显著低于对照组; 试验 24 个月雌性大鼠中、高剂量 RBC 和血红蛋白 (hemoglobin, Hgb) 浓度显著低于对照组, 中剂量组 WBC 和各剂量组 GR% 显著高于对照组, 雄性大鼠中剂量组血小板计数 (platelet count, Plt) 显著低于和高剂量组 Plt 显著高于对照组; 以上差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。除此之外, 其他各剂量组雌雄大鼠各项血液学指标与对照组比较差异均无统计学意义。

2.3.2 血生化 试验 6 个月雄性大鼠低剂量组血糖 (glucose, GLU) 和 12 个月雌性大鼠中剂量组胆固醇 (cholesterol, CHO) 显著高于对照组, 12 个月雌性大鼠低剂量组白蛋白 (albumin, ALB) 显著低于对照组, 18 个月雄性大鼠低剂量组尿素氮 (urea nitrogen, BUN) 和 GLU 显著高于对照组, 24 个月雌性大鼠中剂量组总蛋白 (total protein, TP) 和 ALB

显著低于对照组, 雄性大鼠中、低剂量组 ALB 显著高于对照组; 以上差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。除此之外, 其他各剂量组雌雄大鼠各项常规血生化指标与对照组相比均未见统计学差异。

2.3.3 尿常规 试验期间雌雄各剂量组大鼠尿常规指标与对照组比较差异无统计学意义。

2.4 乙酰胆碱酯酶

雌性大鼠试验第 6 个月乙酰胆碱酯酶活性随着剂量的增加逐渐降低, 但与对照组比较, 只有高剂量组差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 第 12 个月各剂量组乙酰胆碱酯酶活性均低于对照组, 但差异无统计学意义; 试验第 18 和 24 个月高剂量组乙酰胆碱酯酶活性显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。雄性大鼠试验第 6、12、18 和 24 个月中、高剂量组乙酰胆碱酯酶活性均显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 95% 水胺硫磷大鼠慢性毒性与致癌合并试验乙酰胆碱酯酶活性 (U/ml, $\bar{x} \pm s$)

性别	剂量	第 6 个月	第 12 个月	第 18 个月	第 24 个月
雌	对照组	5.66 ± 0.75	5.39 ± 0.76	5.43 ± 0.71	5.64 ± 0.85
	低剂量组	5.11 ± 0.74	4.96 ± 0.72	5.09 ± 0.59	5.33 ± 0.62
	中剂量组	5.04 ± 0.46	5.02 ± 0.45	5.20 ± 0.68	5.05 ± 0.74
	高剂量组	4.62 ± 0.35 ^a	4.84 ± 0.46	4.46 ± 0.20 ^a	4.60 ± 0.27 ^a
雄	对照组	12.36 ± 1.77	12.46 ± 1.91	12.73 ± 1.83	12.34 ± 1.17
	低剂量组	11.89 ± 0.63	11.71 ± 0.96	11.90 ± 0.92	11.89 ± 1.60
	中剂量组	11.14 ± 0.98 ^a	11.07 ± 1.04 ^a	10.20 ± 0.32 ^a	10.23 ± 0.49 ^a
	高剂量组	10.60 ± 0.76 ^a	10.62 ± 1.02 ^a	10.23 ± 0.64 ^a	10.21 ± 0.41 ^a

注: ^a 为与对照组比较 $P < 0.01$ 。

2.5 病理学检查

高剂量组雌雄大鼠被检脏器与对照组比较未

见有意义的病理改变。雌雄大鼠各剂量组脏器系数与对照组比较无统计学意义, 见表 2。

表 2 95% 水胺硫磷大鼠慢性毒性与致癌合并试验脏器系数 ($\bar{x} \pm s$)

性别	脏器	对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
雌	脑	0.42 ± 0.07	0.43 ± 0.09	0.42 ± 0.8	0.44 ± 0.08
	心脏	0.29 ± 0.05	0.33 ± 0.07	0.29 ± 0.06	0.31 ± 0.09
	肝脏	2.40 ± 0.50	2.58 ± 0.44	2.35 ± 0.54	2.38 ± 0.52
	脾脏	0.14 ± 0.04	0.16 ± 0.04	0.14 ± 0.04	0.16 ± 0.06
	肾脏	0.52 ± 0.09	0.51 ± 0.12	0.53 ± 0.10	0.56 ± 0.11
	卵巢	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
	肾上腺	0.039 ± 0.008	0.039 ± 0.100	0.040 ± 0.007	0.043 ± 0.007
雄	脑	0.31 ± 0.04	0.31 ± 0.05	0.33 ± 0.07	0.31 ± 0.05
	心脏	0.27 ± 0.05	0.28 ± 0.04	0.28 ± 0.06	0.27 ± 0.04
	肝脏	2.09 ± 0.36	2.20 ± 0.34	2.08 ± 0.36	2.23 ± 0.45
	脾脏	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.13 ± 0.03
	肾脏	0.50 ± 0.12	0.52 ± 0.06	0.53 ± 0.15	0.52 ± 0.07
	睾丸	0.47 ± 0.08	0.48 ± 0.08	0.49 ± 0.09	0.51 ± 0.11
	肾上腺	0.031 ± 0.005	0.032 ± 0.005	0.034 ± 0.006	0.033 ± 0.005

2.6 肿瘤发生率

雄性动物最早发生肉眼可见肿物的时间为染毒后 14 个月, 出现 4 例, 对照组和中剂量组各 2 例; 雌性动物最早发生肉眼可见肿物的时间为染毒后 10 个月, 出现 6 例, 对照组和中、高剂量组各 2 例,

可见肿瘤发生潜伏期与染毒无关。外表观察和解剖所见肿瘤发生的数量和性质在雌雄各组动物之间的差异无统计学意义。组织形态学分析肿瘤组织类别为乳腺癌、乳腺纤维腺瘤、甲状腺 C 细胞腺瘤、甲状腺癌、甲状旁腺增生、肾上腺嗜铬细胞瘤、

肾上腺皮质腺瘤、垂体前叶腺瘤、皮肤鳞癌、宫颈癌、空肠腺癌等,高剂量组肿瘤发生率和对照组比较差异无统计学意义,见表3。

表3 95%水胺硫磷慢性毒性与致癌合并试验肿瘤发生率

组别	动物数	肿瘤发生例数	发生率(%)
对照组	120	28	23.3
高剂量组	120	29	24.1

3 讨论

慢性毒性和致癌性试验是农药安全性评价的重要部分,要求实验动物终生都染毒,并把非染毒因素引起的死亡控制到最小程度,因此要有严格的饲养条件,试验结束时动物的存活率不应低于50%^[5]。本试验采用SD大鼠试验2年,试验结束时各剂量组大鼠存活率之间的差异无统计学意义,存活大鼠最少的高剂量组的存活率为78.3%,符合试验规范的要求。

慢性毒性合并致癌试验的剂量设定要求高剂量产生明显的毒性作用,用于确定毒作用靶器官和毒性效应,低剂量不表现任何毒性作用,用于确定NOAEL^[6],因此,剂量的设定至关重要。水胺硫磷的毒理学资料较少,文献报道过国产水胺硫磷农药的一些毒性资料^[7],但未报道其慢性毒性和致癌性,本试验在进行剂量设定时,参考了上述文献,并测定了本实验室条件下水胺硫磷的LD₅₀,以此为基础设定1/8 LD₅₀为高剂量,采用50倍的剂量跨度,低剂量设定为1/400 LD₅₀,结果表明剂量设计合理。因水胺硫磷不溶于水,本试验用少量吐温-20将其乳化使其均匀分布于水溶液中,吐温-20性质稳定,基本无毒,常作为赋形剂和乳化剂应用于食品和化妆品中^[3]。

有机磷农药的毒作用机制是抑制胆碱酯酶的活性,血浆乙酰胆碱酯酶能够较好地反映机体胆碱酯酶的水平,本研究在试验开始后第6、12、18和24个月测定大鼠血浆胆碱酯酶,均观察到染毒组的乙酰胆碱酯酶活性降低,雌性大鼠高剂量组和雄性大鼠中、高剂量组与对照组比较差异有统计学意义(P

<0.01)。除乙酰胆碱酯酶外,血常规和其他血生化检测结果也发现部分剂量组个别指标在不同的时间点与对照组比较差异有统计学意义,但这些有统计学意义指标的检测值均在本实验室历史正常对照检测范围内,且不具有剂量-反应关系,认为没有生物学意义。因此,在本实验条件下,根据乙酰胆碱酯酶的结果确定水胺硫磷的NOAEL雌性为0.468 mg/(kg BW·d)(中剂量),雄性为0.037 mg/(kg BW·d)(低剂量)。

本试验中肿瘤多发生于内分泌腺,如乳腺、甲状腺、肾上腺和垂体等,日常触诊检查浅表部位(乳腺和皮下组织)肿瘤最早在试验10个月时出现,多发生于试验后期,符合自发肿瘤的特点。肿瘤在对照组和高剂量组出现的时间相当,说明肿瘤发生潜伏期与染毒无关。病理组织学检查发现高剂量组肿瘤发生率和对照组比较差异无统计学意义,而且与本实验室SD大鼠的自发肿瘤发生率一致。因此,在本试验条件下未观察到水胺硫磷有致癌作用。

参考文献

- [1] 何祖钊,梁皇英.农药的毒性(二)[J].山西农业科学,1990,4:36-37.
- [2] 徐培渝,吴德生.有机磷农药毒性研究新进展[J].预防医学情报杂志,2004,20(4):389-392.
- [3] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1974). Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. WHO Food Additives Series No. 5. World Health Organization [R/OL]. [2009-12-12]. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v05je47.htm>.
- [4] 张金松,黄金祥,史硕岭,等.全血、红细胞、血浆胆碱酯酶活性微量、快速比色测定法[J].卫生研究,1987,16(6):36-38.
- [5] 国家环境保护总局.化学品测试方法:慢性毒性与致癌性联合试验[M].北京:中国环境科学出版社,2004:633-638.
- [6] Organisation for Economic Cooperation and Development. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 453, Combined Chronic Toxicity \ Carcinogenicity Studies [S]. OECD, Adopted: 7 September 2009: 1-20.
- [7] 陈学敏,肖慧珠,陈国华,等.水胺硫磷毒性研究[J].农药,1981,5:21-24.