

三氯杀螨醇对中华蟾蜍成体外周血红细胞的影响^{*}

梁 刚, 赵彩虹

(陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062)

[摘 要] 用5种不同剂量的三氯杀螨醇(dicofol, DCF)分别对48只中华蟾蜍(*Bufo gargarizans*)成体进行体腔注射法染毒1~4次, 观察并统计中华蟾蜍成体外周血红细胞产生微核、核异常及细胞异常的细胞数。结果表明, 注射DCF后所有剂量组均能引起中华蟾蜍红细胞微核细胞率显著升高; 除5, 10 mg/kg剂量组在第1次注射后较对照组低外, 其他注射剂量和次数均引起核异常细胞率升高, DCF对细胞膜与细胞质的影响小于其对细胞核的影响, 在4次注射中以第2次注射后对红细胞的毒性效应最大。说明DCF是一种强诱变剂, 对中华蟾蜍成体外周血红细胞具有较强的遗传毒性。

[关键词] 三氯杀螨醇; 中华蟾蜍; 红细胞; 指示动物

[中图分类号] X503.22; X592; Q958.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2006)06-0025-06

随着农牧业生产的发展, 各种农药大量无节制使用, 造成了严重的环境污染和食品安全等问题, 已经引起社会各界的广泛关注。因此, 对农牧业生态系统中农药残留的生物监测已成为目前十分迫切的研究课题之一。为研究农药对环境的污染程度以及对动物的遗传毒性效应, 一些学者以赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)、中国对虾(*Penaeus chinensis*)、多种淡水鱼类和无尾两栖动物的蝌蚪等作为研究对象, 以红细胞微核、血细胞数、血红蛋白量、动物病理变化及行为变化等作为评价指标对该问题进行了探讨。贺维顺等^[1]认为, 以红细胞微核率的变化作为指标, 用无尾两栖类蝌蚪监测水体污染物的遗传毒性, 其灵敏度要比鱼类高得多。但潘晓赋等^[2]认为, 蝌蚪的种类鉴定困难, 且不同种类蝌蚪敏感性有差异, 以蝌蚪作为生物指示器在实际应用中有一定局限性, 并建议今后的研究应注重了解污染物单因子的影响规律, 建立相应的模型。此外, 已有的研究工作主要是以土壤穴居动物或水生动物为对象进行的。

中华蟾蜍(*Bufo gargarizans*)分布于我国29个省、区、市, 是我国农牧业区常见的无尾两栖动物, 由于种群数量大, 分布范围广^[3], 因此生产中使用的各种农药可能首先会对其造成危害。三氯杀螨醇(dicofol, DCF)是现代农牧业生产中普遍使用的一种有机氯杀虫剂, 在美国、中国等国家被大量无控制的注册使用, 由于其具有脂溶、在环境中难降解、生物富

集及环境雌激素效应等特性, 已经给野生动物和人类造成了很大的危害^[4]。因此, 本文选用中华蟾蜍成体作为实验对象, 观察DCF对其外周血红细胞微核、核异常及细胞异常等指标的影响, 旨在研究DCF对中华蟾蜍成体的遗传毒性效应, 探寻对农牧业生态系统中农药较为敏感的指示动物, 并从遗传学角度评价DCF对野生动物和人类健康所造成的潜在危害, 以为安全及合理使用DCF提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材 料

中华蟾蜍成体购自西安市长安区斗门实验动物养殖场, 在实验室饲养2 d后, 取48只健康活跃的个体作为受试动物, 体重81.0~134.8 g, 体长63~76 mm; DCF为江苏省扬农化工集团有限公司生产的20%乳油, 生产批号为HNP32167-B0050, 属低毒杀虫剂。

1.2 方 法

将中华蟾蜍随机分为6组, 每组8只, 雌雄不拘, 采用体腔注射法染毒。第1组为对照组, 注射蒸馏水; 第2~6组为染毒组, DCF用蒸馏水稀释, 染毒剂量分别为2, 5, 10, 20, 40 mg/kg, 每隔24 h注射一次, 共注射4次。各组蟾蜍在每次注射20 h后, 随机取2只毁髓处死, 心室采血, 制备血涂片。涂片

^{*} [收稿日期] 2005-08-16

[基金项目] 陕西师范大学校级重点科研项目

[作者简介] 梁 刚(1960-), 男, 陕西岐山人, 副教授, 硕士, 主要从事动物组织学与细胞学研究。

晾干后, 甲醇固定 2~3 min, 用 pH 6.8 磷酸盐缓冲液稀释的 Giesma 染色液染色 30 min, 磷酸盐缓冲液分色、中性树胶封片。Nikon 显微镜观察、统计, MotiBA 300 显微镜拍照。

每张血涂片随机观察红细胞 2 000 个以上, 统计产生微核、核异常、细胞异常的细胞数。微核是位于细胞质中、大小在主核 1/3 以下、嗜色性与主核基本相同的小核^[5], 由于微核属于核异常的一种常见现象^[2], 是评价致突变污染物的一种客观实用指标^[6], 因此将其单独统计; 核异常只统计双核、无核、核内空泡、核质外突、核质内凹、核变形、核周间隙扩张、核固缩、核碎裂、无丝分裂和不均等分裂等; 细胞异常是指红细胞膜和细胞质的形态异常, 包括细胞变形、破裂、萎缩、伸出伪足、胞质空泡等。观察结果以千分率(‰)表示: 微核细胞率/‰= 有微核的细胞总数/观察细胞总数 × 1 000‰; 核异常细胞率/‰= 有核异常的细胞总数/观察细胞总数 × 1 000‰; 总核异常细胞率= 微核细胞率+ 核异常细胞率; 细胞异常率/‰= 异常细胞数/观察细胞总数 × 1 000‰。

2 结果与分析

2.1 DCF 对中华蟾蜍外周血红细胞的影响

2.1.1 对微核细胞率的影响 从表 1 可以看出, 与对照组相比, DCF 在诱导中华蟾蜍微核(图版 1~4)细胞率变化方面, 2, 5, 40 mg/kg 剂量组随着注射次数的增加, 微核细胞率逐渐升高; 10, 20 mg/kg 剂量组随注射次数的增加, 微核细胞率先升高后下降, 其中 10 mg/kg 剂量组在第 2 次注射后微核细胞率在所有剂量组中达最大值, 为 48.50‰。总之, 注射 DCF 后所有剂量组均能引起中华蟾蜍红细胞微核细胞率升高。

2.1.2 对核异常细胞率的影响 由表 1 可知, DCF 在引起核异常(图版 4~11)细胞率变化方面, 除 5, 10 mg/kg 剂量组在第 1 次注射后较对照组低外, 其他注射剂量组各次注射后均引起核异常细胞率升高, 其中以 40 mg/kg 剂量组在注射第 2 次后核异常细胞率达最大值, 为 125.57‰。但总体来看, 核异常细胞率与注射剂量及注射次数之间似乎没有明显的剂量-效应关系和时间-效应关系。在此需要说明的是, 本试验还观察到, 中华蟾蜍有些红细胞在胞质与胞核之间出现了较宽的间隙——核周间隙扩张(图版 10), 此现象在一些肿瘤细胞^[7]和农药重污染地区壮伟环毛蚓(*Pheretima robusta*)的肠黏膜上皮细胞^[8]中也可以见到, 是否可以作为核异常或细胞

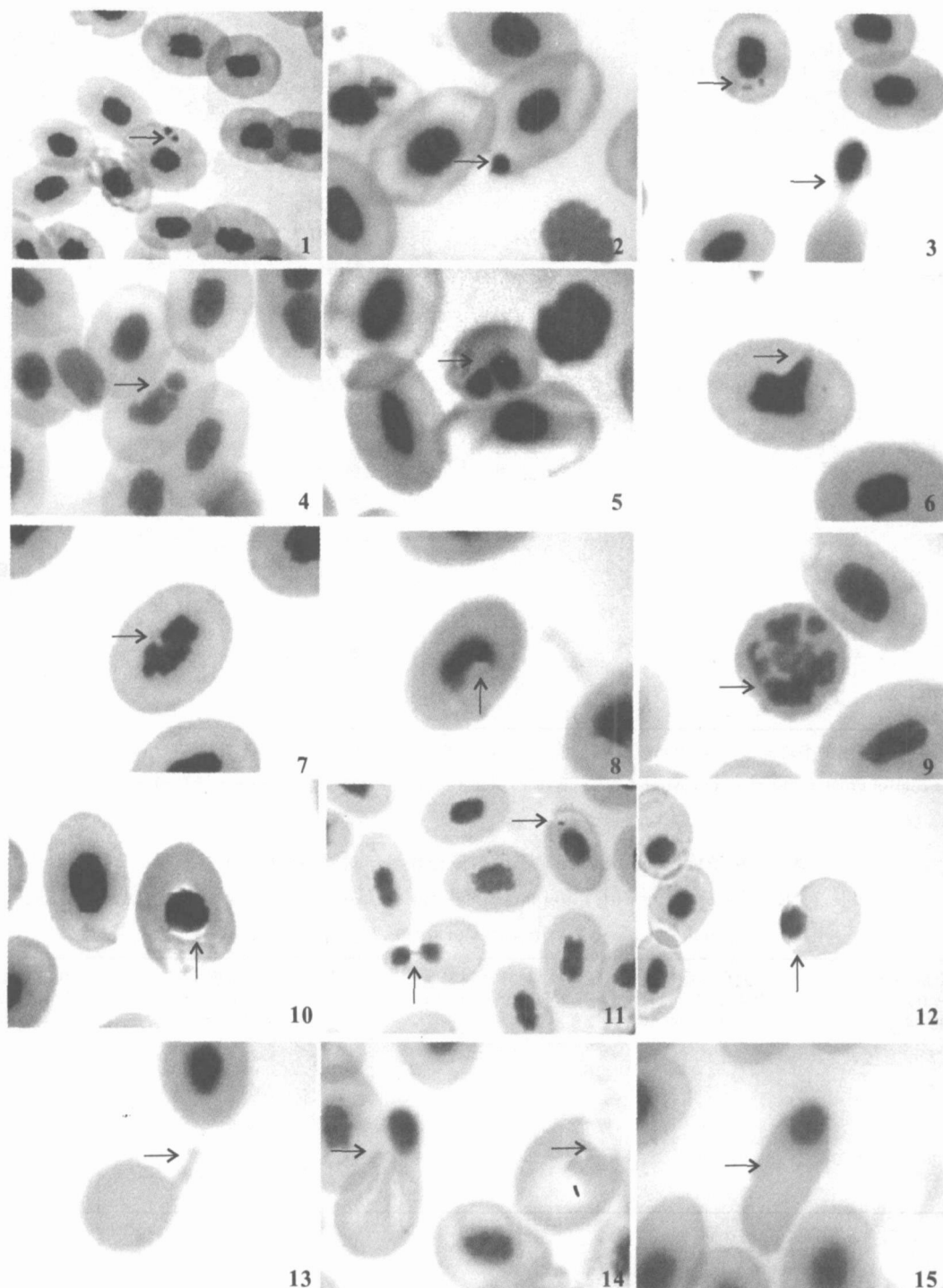
异常的一种现象, 迄今未见文献报道。核周间隙为细胞质与细胞核之间物质交换的重要通道, 该间隙宽度增大可能会影响核内外物质的交换, 进而使细胞产生异常现象。

2.1.3 对细胞异常率的影响 由表 1 可以看出, 在细胞异常(图版 12~15)率方面, 随着注射剂量和注射次数的不同存在较大差异, 其中 5, 10, 20 mg/kg 剂量组随注射次数的增加细胞异常率先升高后降低。在所有剂量组中, 以 2 mg/kg 剂量组在注射第 1, 2, 4 次后引起的细胞异常率最高(其中第 2 次注射后达最大值, 为 48.53‰)。因此, 与其他剂量组相比, 2 mg/kg 剂量组最易诱导红细胞异常率的升高。

2.2 中华蟾蜍外周血红细胞 DCF 处理组与对照组之间的 *t* 检验结果

2.2.1 不同剂量处理组与对照组 由表 2 可知, 除 5 mg/kg 剂量组外, 其他剂量组均引起微核细胞率上升到与对照组差异显著($P < 0.05$)水平; 核异常细胞率在剂量为 2, 20 mg/kg 时上升到与对照组差异显著水平, 其他剂量未达到差异显著水平; 总核异常细胞率在剂量为 2, 10 mg/kg 时上升到与对照组差异显著水平, 20 mg/kg 剂量达到差异极显著($P < 0.01$)水平; 所有剂量组细胞异常率均未上升到与对照组差异显著水平, 说明 DCF 对中华蟾蜍外周血红细胞膜与细胞质的影响较细胞核的小。从表 2 还可以看出, 5 mg/kg 剂量组未引起中华蟾蜍红细胞的各异常变化上升到与对照组差异显著水平, 说明 5 mg/kg 剂量可能对中华蟾蜍红细胞的遗传毒性较其他剂量的小。

2.2.2 不同注射次数处理组与对照组 由表 3 可知, 注射 1~4 次 DCF 均引起中华蟾蜍微核细胞率和总核异常细胞率上升到与对照组差异显著水平, 核异常细胞率只在注射第 2, 3 次后上升到与对照组差异显著水平, 细胞异常率在注射第 1, 2 次后上升到与对照组差异显著水平, 说明注射 DCF 对中华蟾蜍外周血红细胞微核及总核异常的诱导大于对核异常及细胞异常的诱导。从表 3 还可以看出, 注射 2 次均引起中华蟾蜍红细胞的各异常变化上升到与对照组差异显著水平, 说明在 4 次注射 DCF 中, 以第 2 次注射对红细胞的毒性效应最大, 出现此种现象的原因尚不十分清楚, 可能是注射次数增多会使 DCF 在体内积累, 达到一定量时就会抑制甚至终止细胞的正常活动, 从而使红细胞的各异常现象有所下降。



图版 三氯杀螨醇对中华蟾蜍外周血红细胞的影响

1 双微核, $\times 700$; 2 单微核, $\times 1\ 100$; 3 三核核及细胞变形, $\times 900$; 4 核变形及微核, $\times 1\ 000$; 5 双核, $\times 1\ 100$; 6 核质突出, $\times 1\ 100$; 7 核质内凹, $\times 1\ 100$; 8 核内空泡, $\times 1\ 000$; 9 核碎裂, $\times 1\ 100$; 10 核周间隙扩张, $\times 1\ 000$; 11 不等分裂及微核, $\times 750$; 12 细胞质空泡, $\times 700$; 13 无核细胞伸出伪足, $\times 1\ 000$; 14 细胞破裂, $\times 1\ 000$; 15 细胞变形, $\times 1\ 100$

Plate Effects of dicozol on peripheral blood erythrocytes of toads, *Bufo gargarizans*

1 Double micronuclei, $\times 700$; 2 Single micronucleus, $\times 1\ 100$; 3 Trinuclearity and cell abnormality, $\times 900$; 4 Nuclear transmutation and micronucleus, $\times 1\ 000$; 5 Binuclei, $\times 1\ 100$; 6 Nucleus tuber, $\times 1\ 100$; 7 Notched nucleus, $\times 1\ 100$; 8 Vacuole in nucleus, $\times 1\ 000$; 9 Cracked nuclei, $\times 1\ 100$; 10 Expanded nuclear surrounding lacuna, $\times 1\ 000$; 11 Unequal division and micronucleus, $\times 750$; 12 Cytoplasm vacuole, $\times 700$; 13 Cells without nucleus spread pseudopod, $\times 1\ 000$; 14 Cell rupture, $\times 1\ 000$; 15 Cell transmutation, $\times 1\ 100$

表 1 DCF 对中华蟾蜍外周血红细胞的影响

Table 1 Effects of dicofol on peripheral blood erythrocytes of toads, *Bufo gargarizans*

组别 Groups	DCF 剂量/ (mg · kg ⁻¹) Dosage	注射次数 Injection times	微核 细胞率/‰ M icronucleus cell frequencies	核异常 细胞率/‰ N uclear abno mality cell frequencies	总核异常 细胞率/‰ A ll nuclear abno mality cell frequencies	细胞异常率/‰ Cell abno mality frequencies
1	0		5.27	11.36	16.63	5.87
2	2	1	9.23	21.68	30.91	13.27
		2	14.82	41.61	56.43	48.53
		3	11.10	30.00	41.10	3.51
		4	22.76	44.92	67.68	19.73
3	5	1	9.75	9.13	18.88	4.01
		2	10.13	55.78	65.91	16.21
		3	11.50	15.61	27.11	23.13
		4	33.97	22.21	56.18	0.00
4	10	1	22.30	9.44	31.74	3.32
		2	48.50	56.20	104.70	25.11
		3	21.98	39.32	61.30	8.07
		4	26.03	82.53	108.56	1.13
5	20	1	14.89	76.63	91.52	11.10
		2	36.23	53.50	89.73	41.33
		3	42.23	34.76	76.99	16.35
		4	19.41	49.85	69.26	14.03
6	40	1	22.66	29.74	52.40	11.86
		2	31.83	125.57	157.40	15.50
		3	39.67	45.35	85.02	38.46

注: 对照组为 4 次注射的平均值($n=4$); 40 mg/kg 剂量组在第 4 次注射后动物死亡。
Note: The control group is the average cost of 4 times in succession ($n=4$); the toad of the dosage with 40 mg/kg is died after the fourth injection

表 2 中华蟾蜍外周血红细胞不同剂量处理组与对照组间的 t 检验结果

Table 2 Results of t test with different dosages in the treated and controlled groups of peripheral blood erythrocytes of toads, *Bufo gargarizans*

注射剂量/(mg · kg ⁻¹) Injection dosage	微核细胞率 M icronucleus cell frequencies	核异常细胞率 N uclear abno mality cell frequencies	总核异常细胞率 A ll nuclear abno mality cell frequencies	细胞异常率 Cell abno mality frequencies
2	3.94*	5.19*	4.79*	1.54
5	1.76	1.31	2.24	1.55
10	4.03*	2.62	3.52*	0.75
20	3.32*	3.83*	7.07**	2.35
40	5.61*	1.91	2.68	2.52

注: * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。表 3 同。
Note: * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。Table 3 is the same as Table 2

表 3 中华蟾蜍外周血红细胞不同注射次数处理组与对照组间的 t 检验结果

Table 3 Results of t test with different injection times in the treated and controlled groups of peripheral blood erythrocytes of toads, *Bufo gargarizans*

注射次数 Injection times	微核细胞率 M icronucleus cell frequencies	核异常细胞率 N uclear abno mality cell frequencies	总核异常细胞率 A ll nuclear abno mality cell frequencies	细胞异常率 Cell abno mality frequencies
1	4.04*	1.95	2.82*	3.68*
2	3.73*	3.84*	4.71*	3.20*
3	2.88*	3.48*	3.40*	1.04
4	5.27*	2.73	4.41*	1.18

3 讨 论

3.1 DCF 对中华蟾蜍成体外周血红细胞的遗传毒性

微核是由染色单体或染色体的无着丝点断片或因纺锤体损伤而失去的整个染色体,在分裂后期仍留在细胞质中,或因核膜受损后核物质向外突出并延伸,形成一个或几个嗜染性与细胞核相似但较主核小的小体。所有进行分裂的细胞,在染色体断裂剂的作用下均能产生微核^[9]。微核测定法(micronucleus test)是20世纪70年代建立起来的细胞遗传毒理学方法,由于该法具有简便、快速、可靠、便于推广应用等优点,现已广泛应用于不同环境中污染物对遗传物质损害程度和毒理效应的生物检测^[5,10]。

楼允东等^[10]用强烈诱变剂和致癌剂亚硝基胍处理泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)后,诱发的泥鳅外周血微核细胞率是对照组的1.39~10.97倍;耿德贵等^[11]在除草剂对中华蟾蜍蝌蚪红细胞微核的诱发实验中,精克草星、苯磺隆、使它隆和乙草胺诱发的微核细胞率分别为对照组的0.51~2.04,0.86~2.11,0.98~3.60和0.85~1.84倍。本研究结果表明,在对中华蟾蜍成体无致死的条件下,DCF均能引起其外周血红细胞微核细胞率显著升高,其微核细胞率是对照组的1.75~9.20倍。由此看来,在所谓的“安全浓度”范围内,DCF能够诱发中华蟾蜍出现极高的微核细胞率,与强烈诱变剂和致癌剂亚硝基胍的作用效果相当。一般认为,小微核是由染色体断裂产生的无着丝粒断片形成的,大微核是由纺锤丝断裂造成的一条或一组染色体滞后形成的^[12]。耿德贵等^[13]用除草剂乙草胺处理中华蟾蜍蝌蚪,使其红细胞内出现了大小不等的微核,本试验也观察到DCF诱发的红细胞微核有些较小(直径约0.7 μm)、有些较大(直径约3.0 μm),说明DCF具有较强染色体断裂剂和纺锤体毒剂的双重作用。此外,在制片观察中还注意到,出现微核的大多数红细胞只有1个微核,有些红细胞的微核达2~4个,红细胞微核的增多也从另一个角度反映出DCF对遗传物质损伤的加重。综合以上3个证据,加之DCF对中华蟾蜍外周血红细胞膜与细胞质的影响小于对细胞核的影响等结论,说明DCF是一种强诱变剂,对中华蟾蜍成体外周血红细胞具有较强的遗传毒性。

3.2 中华蟾蜍成体作为农药污染敏感指示动物的可行性

农牧业生态系统是粮食、蔬菜、水果、肉类和蛋

奶等食品生产的环境背景,是人类赖以生存的环境主体,该主体目前最主要的污染源是农药和化肥,其会残留在食品中,通过食物链最终进入人体,对人类健康造成的潜在危害将更为深刻而持久。因此,探寻对农牧业生态系统中农药等污染物敏感性高的指示动物,是人类目前十分紧迫的研究课题之一。

尽管用无尾两栖类蝌蚪监测水体污染物的遗传毒性灵敏度较鱼类高得多^[1],但是与蝌蚪相比,用中华蟾蜍成体作为监测农牧业生态系统中农药等污染物的指示动物具有以下优点:分布范围广、种群数量大、易于捕捉。中华蟾蜍广泛分布于我国29个省市区、朝鲜半岛及俄罗斯远东地区,栖息于不同海拔的各种生境中^[3],其成体数量多、体形大、行动迟缓,极易捕捉,是常用的实验动物。一年四季均能获取足够标本,保证实验用材。即使在冬眠季节,中华蟾蜍成体也能够实验动物养殖场购买到,而大多数物种的蝌蚪只有在每年春季才能采到标本。活动范围比较固定,符合农牧业的生产实际。中华蟾蜍成体冬眠和繁殖季节在水中生活,其余季节主要在该水域附近的陆地上生活,是我国农牧业区多种有害昆虫的主要天敌^[3]。因此,无论是水田还是旱地,生产中使用的各种农药可能首先会对其造成危害。

外形特征明显,种类容易鉴定,生命力强,易于实验室饲养。循环血量多、血样易于采集。外周血红细胞较大(约12 μm × 19 μm),微核及核异常等现象容易分辨。对DCF诱发红细胞微核和核异常的灵敏度很高。基于以上优点,本研究认为使用中华蟾蜍成体监测农药等污染物的遗传毒性不仅比较理想和符合实际,而且其可能是农牧业生态系统中对污染源敏感性较高的指示动物。

本研究认为,中华蟾蜍成体作为监测农牧业生态系统中农药污染的指示动物还需要在以下两个方面进一步积累证据。分别检测几种农药注射染毒后对中华蟾蜍成体外周血红细胞的遗传毒性效应,横向比较不同农药诱发微核与核异常细胞率的异同,最终建立可供对照的标准和模型。以实验室所用的农药种类为依据,在该种农药污染较为严重的农牧业区采集中华蟾蜍成体,检测外周血红细胞的微核和核异常细胞数,纵向比较实验室与生产实际之间存在的差异,进一步确定中华蟾蜍成体对该种农药遗传毒性的重复性。

[参考文献]

- [1] 贺维顺, 王蕊芳. 蝌蚪(*Bufo bufoandrewsi*) 血红细胞微核和核异常监测水质污染的研究[J]. 动物学研究, 1990, 11(1): 1-6
- [2] 潘晓斌, 周伟, 蔡佩玲. 昆明地区四种蛙血红细胞微核与环境质量关系[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(4): 437-441.
- [3] 叶昌媛, 费梁, 胡淑琴. 中国珍稀及经济两栖动物[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1993: 182-186
- [4] 梁刚, 唐超智. 三氯杀螨醇的雌激素效应及其机制的研究进展[J]. 四川环境, 2004, 23(5): 54-71
- [5] 楼允东, 吴萍. 两种农药对泥鳅红细胞微核和核异常的诱导[J]. 上海水产大学学报, 1994, 3(3): 104-111
- [6] 史延萍. 微核技术监测污水养鱼鱼体污染率[J]. 农业环境与发展, 1998, 15(3): 11-12
- [7] 第二军医大学电镜室, 复旦大学生物系电镜室. 细胞超微结构及功能[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1981: 11-13
- [8] 左海根, 林玉锁, 龚瑞忠. 农药污染对蚯蚓毒性毒理研究进展[J]. 农村生态环境, 2004, 20(4): 1-5
- [9] 孔繁翔, 尹大强, 严国安. 环境生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 94-123
- [10] 楼允东, 吴萍. 亚硝基胍对泥鳅红细胞微核及核异常的诱发[J]. 中国环境科学, 1996, 16(4): 275-278
- [11] 耿德贵, 张大生, 程伟, 等. 四种除草剂对中华大蟾蜍蝌蚪红细胞微核及核异常的影响[J]. 动物学杂志, 2000, 35(1): 12-17.
- [12] 贺维顺, 王蕊芳. 污水和污水土地处理系统中各种水质对华西蟾蜍蝌蚪红细胞微核率的影响[J]. 动物学研究, 1992, 13(3): 275-279
- [13] 耿德贵, 刘贤德, 温洪宇, 等. 除草剂乙草胺对蝌蚪红细胞微核及核异常的影响[J]. 环境与健康杂志, 2000, 17(1): 36-38

Effects of dicofol on peripheral blood erythrocytes of toads

LIANG Gang, ZHAO Cai-hong

(College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China)

Abstract: The experiment was conducted to study the possible effects of toxicity in the toad erythrocytes induced by dicofol (DCF), 48 mature toads, *Bufo gargarizans*, were injected with five different dosages of DCF in coelom every 24 h and 1-4 times in succession, and cells producing micronucleus, nuclear abnormality and cell abnormality were counted separately. Results showed that DCF with different dosages could increase the frequency of micronucleated erythrocytes markedly, except the first injection of the dosage with 5 and 10 mg/kg, every group caused an increase in the frequency of nuclear abnormality erythrocytes, the effects in cell membrane and cytoplasm were less than the effects in karyon by DCF, and the most toxicity was exhibited after the second injection. The experiment indicated that DCF was a strong revulsant which presented genotoxicity in peripheral blood erythrocytes of the mature toad.

Key words: dicofol; toad (*Bufo gargarizans*); erythrocyte; indicator