

· 研究论文 ·

乙草胺对热带爪蟾的早期致畸效应及遗传毒性研究

李贤宾, 李少南, 袁丙强, 朱国念*

(浙江大学 农药与环境毒理研究所, 杭州 310029)

摘要: 为了评价乙草胺对热带爪蟾 *Xenopus tropicalis* 早期发育阶段的影响, 采用爪蟾胚胎致畸试验 (FETAX) 测定了乙草胺对爪蟾胚胎发育的致畸效应。结果表明, 乙草胺对热带爪蟾胚胎的致畸中浓度 (TC_{50}) 为有效成分 1.20 mg/L, 且能引起爪蟾腹部水肿、面部畸形、脊柱弯曲、尾巴弯曲、头部畸形等多种胚胎畸形。乙草胺的致畸指数 (TI) 为 1.88, 具有潜在的致畸风险。爪蟾蝌蚪在亚致死浓度的乙草胺中暴露 4 d 后, 微核和单细胞凝胶电泳试验结果显示, 乙草胺可导致蝌蚪血细胞的微核率显著升高, 其尾部 DNA 含量和 Olive 尾矩两个指标也均显示细胞 DNA 受到损伤, 且随着药剂浓度的增加, 对 DNA 的损伤程度增强。

关键词: 乙草胺; 热带爪蟾; 致畸效应; DNA 损伤

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2011.01.07

中图分类号: X592; X173

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2011)01-0040-07

Teratogenic effect and genotoxicity of acetochlor on embryos and tadpoles of West-African clawed frog (*Xenopus tropicalis*)

LI Xian-bin, LI Shao-nan, YUAN Bing-qiang, ZHU Guo-nian*

(Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: In order to assess the developmental toxicity and genotoxicity of acetochlor on the early development of *Xenopus tropicalis*, the teratogenicity on embryos exposed to acetochlor was investigated by modified frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* (FETAX). The teratogenic median concentration (TC_{50}) value of acetochlor was 1.20 mg (a.i.) /L. Acetochlor could induce a variety of malformations on *X. tropicalis* embryos, such as facial abnormality, pericardial edema, notochord and tail flexures, cephalic dysplasia and gut malformation. The calculated teratogenic index (TI) value was 1.88, suggesting that acetochlor had a teratogenic potential. Furthermore, the DNA damage was observed on the erythrocytes of tadpoles 4 days after exposed to sub-lethal concentrations of acetochlor by micronucleus test and alkaline single-cell gel electrophoresis. Compared to the control group, the results showed that the micronucleus frequencies were increased significantly, and the tail DNA and Olive tail moment of Comet picture had significant difference after treatment of acetochlor, which indicated that the DNA of erythrocytes was damaged.

Key words: acetochlor; *Xenopus tropicalis*; teratogenic effect; DNA damage

收稿日期: 2010-05-11; 修回日期: 2010-07-18.

作者简介: 李贤宾 (1981-), 男, 博士, 主要从事农药毒理学研究, E-mail: xianbinli@163.com; * 通讯作者 (Author for correspondence): 朱国念 (1957-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事农药学相关领域的研究, 电话: 0571-86971220, E-mail: zhugn@zju.edu.cn

基金项目: 浙江省自然科学基金 (1307448).
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

乙草胺(acetochlor), 化学名称为 2-乙基-6-甲基-N-乙氧基甲基- α -氯代乙酰替苯胺, 是一种内吸型、选择性、芽前处理酰胺类除草剂, 已在世界很多国家和地区包括中国广泛而大量地应用^[1]。乙草胺在我国农业上每年的用量在千万吨以上, 并有逐年上升趋势^[2]。由于乙草胺具有半衰期较长、水溶性较好、土壤吸附性较低等特点而使其成为地表水中常见污染物^[3]。早在 1994 年美国环境保护局(U.S.EPA) 就已将其定为 B-2 类致癌物。因此检测乙草胺对水生生物的发育毒性和遗传毒性十分必要。前人的报道结果显示: 乙草胺可以诱导大鼠产生鼻癌^[4]; 在 T_3 激素存在的情况下能够加速蝌蚪的变态过程, 具有内分泌干扰作用^[5]; 对蛙类具有神经毒性^[6], 并具有发育毒性和遗传毒性^[7-8]。

两栖动物 FETAX(the frog embryo teraogenesis array-Xenopus) 试验^[9]是一个 96 h 的体外全胚胎试验, 主要用于化学品和复杂混合物潜在致畸和发育毒性的检测, 也是环境污染物发育毒性检测的常用方法。近年来, 国内外利用 FETAX 试验已评估了如莠去津、敌草隆、狄氏剂、2, 4-D 等多种农药^[10-11]。此外, 微核试验和单细胞凝胶电泳试验(又称彗星试验) 是检测污染物对生物细胞遗传物质影响情况的方便、快速、可靠的方法。

两栖类动物由于其自身生理和皮肤结构的特点, 对环境污染物较为敏感, 常被作为环境监测的指示物种。热带爪蟾 *Xenopus tropicalis* 是发育生物学中的模式生物, 既具备非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 的优点, 又具有体型更小、产卵量更多、成熟更快的生理特性, 近年来其在生态毒理学研究中的应用日益增多^[12-13]。笔者以热带爪蟾为研究对象, 研究了乙草胺对热带爪蟾胚胎的致畸效应, 并利用微核和单细胞凝胶电泳试验检测了乙草胺对蝌蚪血细胞遗传物质的影响, 以期在两栖动物风险评估提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

93.2% 乙草胺(acetochlor) 原油, 由浙江庆丰农化有限公司提供; 甲基磺酸甲酯(MMS)、吉姆萨氏(Gimsa) 染色液、4, 6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI) 染色液、正常熔点琼脂糖(NMP) 和低熔点琼脂糖(LMP), 购自 Sigma 公司; 人绒毛膜促性腺激素(HCG), 购自广东丽珠集团丽珠制药厂; 其他试剂购自上海生工生物工程技术有限公司。碱性裂解液的配制: 2.5 mmol/L 的氯化钠,

100 mmol/L 的乙二胺四乙酸(EDTA), 10 mmol/L 的三羟甲基氨基甲烷(Tris), 调 pH 为 10, 临用前加 1% 的聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100) 和 10% 的二甲基亚砷(DMSO); 细胞缓冲液的配制: 2.5 mmol/L 的氯化钠, 10 mmol/L 的 Tris, 调 pH 7.4; 电泳液: 300 mmol/L 的乙二胺四乙酸(EDTA), 100 mmol/L 的 Tris, 调 pH 为 10; 中和液: Tris-HCl 0.4 mmol/L, 调 pH 为 7.0。

1.2 主要仪器

PowerPacTM Basic 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); Nikon E2000 荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司); SZ51-60 型体式显微镜(日本 Olympus 公司); 自制微电泳槽。

1.3 试验生物与管理

性成熟热带爪蟾 *Xenopus tropicalis* 由浙江大学生命科学院惠赠, 成蛙在光周期 12 h 光照/12 h 黑暗(12L/12D)、水温 25 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、曝气除氯的自来水中驯化 14 d。取一对性成熟爪蟾, 雌雄各注射 200 单位(溶于 50 μL 蒸馏水中) 的人绒毛膜促性腺激素(HCG)。用烧杯收集抱对产下的卵, 加入质量分数为 2% 的 L-半胱氨酸溶液(pH 8.0), 轻轻摇动几分钟, 除去卵外胶质, 使卵分开, 然后用 0.1 $\times$ MBS 溶液(Modified Birth's solution, 由 10 mmol/L 的氯化钠、0.2 mmol/L 的氯化钾、0.1 mmol/L 的氯化镁、0.2 mmol/L 的氯化钙、0.5 mmol/L 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES) 组成, pH 7.5) 漂洗 5 次以上, 将卵转移至底部铺有琼脂糖的盛有 0.1 $\times$ MBS 溶液的培养皿中, 剔除未受精卵, 置于光照培养箱内, 使其发育至试验所需的阶段。胚胎发育期间的光照条件为 12L/12D, 水温 26 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

1.4 试验方法

1.4.1 爪蟾胚胎致畸试验(FETAX) 根据美国试验与材料协会(ASTM) 组织的 E1439-98-FETAX 法进行^[14]试验并有所优化。根据 NF 发育表, 取正常发育到 8 期至 11 期的胚胎用于试验。乙草胺原油先用 DMSO 配制成母液, 再用 0.1 $\times$ MBS 溶液稀释。根据预备试验结果设计如下系列试验质量浓度(有效成分): 0、0.078、0.157、0.315、0.625、1.25、2.5、5 mg/L, DMSO 在水溶液中的质量浓度均为 100 mg/L。

为了防止试验过程中死亡胚胎对其他胚胎造成的不利影响, 采用 96 孔细胞培养板进行染毒, 每孔放一枚胚胎, 每孔加液量为 200 μL , 每个浓度 2 块板, 设空白和 DMSO 溶剂对照。将处理后的细胞培

养板放入恒温恒湿培养箱中,温度为 25 ℃ ± 1 ℃ ,光照 12 h,黑暗 12 h,试验液每 24 h 更换 1 次。每 12 h 观察 1 次药剂对发育造成的影响,包括死亡率和畸形表型(必要时利用 MS-222 进行短期麻醉后观察),直至胚胎发育至 46 期,约 96 h。试验结束后将存活的胚胎用质量分数为 3% 的福尔马林 (pH = 7) 固定,在体式显微镜下观察畸形表型,记录畸形数和类型,计算致死中浓度 (LC₅₀) 和致畸中浓度 (TC₅₀)。

1.4.2 微核试验 根据预试验结果,将乙草胺母液用水稀释成有效成分为 0、0.157、0.315、0.625、1.25 mg/L 的系列质量浓度溶液。当胚胎在适合条件下发育至 47 期时,随机选取 20 只健康、活泼的蝌蚪投入盛有 10 L 相应质量浓度药液的玻璃缸内进行染毒,每个浓度处理设 3 个重复,并设阳性对照 (MMS,0.5 mg/L)。试验持续时间为 4 d 且不喂食,试验期间环境条件与饲养条件一致。试验结束后每个重复随机取 3 只蝌蚪,每个浓度共 9 只用于微核和单细胞凝胶电泳试验。

蝌蚪心脏采血制备血涂片,每只蝌蚪涂片 2 张。晾干后,用甲醇固定 15 min,用瑞士染色液染色 15 min,用 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液 (pH = 7.4) 冲洗 2~3 次,再用自来水冲洗;用稀释的 Gimsa 染色液染色 20 min,最后用自来水冲洗,晾干,中性树胶封片备用。每个浓度组观察 5 只蝌蚪,每只片子计数约 600 个细胞,记录微核细胞数目,微核率用千分率表示。微核判断标准:位于细胞核中,与主核完全分开,染色与主核一致或稍淡,大小为主核的 1/3,多为圆形或椭圆形边缘清晰的小核。

1.4.3 单细胞凝胶电泳 染毒方式同微核试验。染毒结束后,对蝌蚪进行解剖,利用玻璃毛细针刺破心脏,取得血液后用 PBS 稀释成细胞悬浮液,置于 4 ℃ 冰箱中备用。试验前细胞悬浮液需用苕盼兰染色检验其成活率。

在参照 Yin 等^[8]的方法上适当加以改进,即采用自制微电泳槽铺胶方式代替传统的载玻片铺胶方法。微电泳槽由普通的载玻片和从载玻片切割下的玻璃条粘结组成。1) 铺胶:取 100 μL 质量分数为

0.75% 的正常熔点琼脂糖均匀铺在自制微电泳槽内,将其水平放置于桌面冷却 5 min 待固化;取 25 μL 血细胞悬浮液与 75 μL 质量分数为 0.75% 的低熔点琼脂糖在 37 ℃ 下混匀后均匀铺在第一层胶上,水平放置于桌面冷却 5 min 待固化。2) 裂解:将制好的胶板置于新配制的碱性裂解液中,4 ℃ 下裂解 2 h。3) 解旋和电泳:裂解后的胶板用冷的双蒸水洗涤 3 次,每次 5 min,以除去多余盐分,然后将其置于水平电泳槽内,使新配制的碱性电泳液没过胶面约 0.25 cm,室温下静置 40 min,使 DNA 解螺旋,然后在 25 V、300 mA 电泳条件下电泳 25 min。4) 中和及染色:电泳完毕后的胶板在中和液中中和 3 次,每次 5 min,然后在自制电泳槽的槽室内滴加 100 μL DAPI 染液,在避光处染色 20 min。5) 观察:将染色后胶板在双蒸水中轻轻摇动,以洗去多余染色液,在荧光倒置显微镜下选取电泳槽中央部位观察彗星图形,并随机摄取彗星图片。每个槽室取 50 个图像,每个浓度 3 个重复,共 150 个图像用于统计分析。

1.4.4 统计分析 采用 DPS 7.05 分析软件,通过几率值法计算 FETAX 试验的 LC₅₀ 值和 TC₅₀ 值,单细胞凝胶电泳的彗星图像利用 CASP 图像分析软件自动分析获得尾部 DNA 含量 (Tail DNA%) 和 Olive 尾矩 (Olive tail moment) 指标数据。三个试验所得数据利用 SPSS12.0 软件检验其方差齐性,用单因素方差分析其统计学意义,并利用 *T* 检验进行比较,分析处理组与对照组间的差异。

2 结果与分析

2.1 乙草胺对非洲爪蟾的发育毒性

乙草胺对爪蟾胚胎的毒性见表 1。空白对照组和 DMSO 溶剂对照组的胚胎试验结束时,爪蟾的死亡率小于 5%。与对照组相比:当乙草胺暴露的质量浓度低于 0.625 mg/L 时,对胚胎存活不会造成显著性影响;当质量浓度大于 0.625 mg/L 时,胚胎死亡率与剂量呈正相关关系;相同质量浓度处理下,胚胎死亡率随着暴露时间的延长而增加;最高浓度试验结束时胚胎全部死亡。除了胚胎死亡外,用乙

表 1 乙草胺(暴露 96 h)对热带爪蟾胚胎发育的毒性

Table 1 LC ₅₀ and TC ₅₀ values of acetochlor to <i>Xenopus troicalis</i> embryo after exposure for 96 h				
毒性效应	回归方程	半数致死(畸)质量	95% 置信区间	致畸指数
Toxicity effect	Regression equation	浓度(a. i) /(mg/L)	95% Confidence interval	TI(LC ₅₀ /TC ₅₀)
致死效应 Lethal effect	Y = 2.025x + 4.282	2.26(LC ₅₀)	2.00 ~ 2.60	
致畸效应 Teratogenic effect	Y = 2.502x + 4.784	1.20(TC ₅₀)	1.09 ~ 1.39	1.88

草胺不同浓度处理的胚胎还产生多种畸形表型(见图1),如面部畸形、心包囊水肿、脊柱弯曲、小头、全身发育紊乱等。试验发现,出现最早的畸形表型是心包囊水肿,于胚胎在高浓度乙草胺中暴露 30 h 时出现,且畸形率随暴露浓度和暴露时间的增加而上升。通过计算 LC_{50} 与 TC_{50} 值的比值可得到致畸指数(TI)为 1.88。

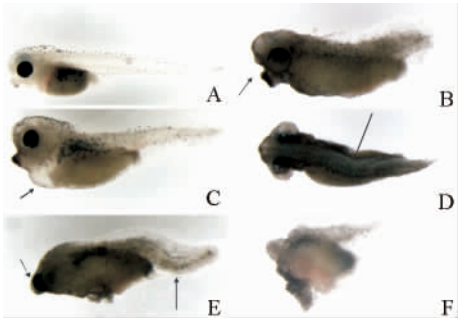


图1 乙草胺诱导热带爪蟾胚胎产生各种畸形
Fig.1 Morphological alterations of *Xenopus tropicalis* embryos exposed to acetochlor
(A) 正常胚胎侧面观; (B) 面部畸形; (C) 心包囊水肿; (D) 脊柱弯曲; (E) 小头和尾部弯曲; (F) 全身发育紊乱。

(A) Lateral view of control larva without treatment; (B) Facial abnormality; (C) Pericardial edema; (D) Axial flexures; (E) Cephalic dysplasia and tail flexures; (F) Gut malformation.

2.2 微核试验结果

经乙草胺处理后,蝌蚪的血细胞出现了典型的微核现象(见图2),各处理质量浓度下造成的血细胞微核率结果见表2。可见,阳性对照处理组的微核率显著高于空白对照组,说明试验数据结果可信。用不同质量浓度的乙草胺对热带爪蟾蝌蚪染毒 4 d 后,发现只有低于 0.315 mg/L 处理组的蝌蚪血细胞的微核率与对照组相比无显著性差异($P > 0.05$),其他质量浓度处理组与对照组都有显著性

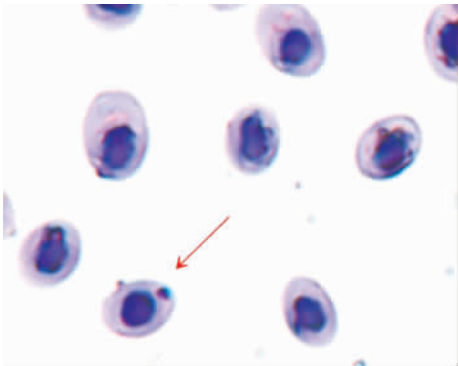


图2 乙草胺诱导热带爪蟾蝌蚪血细胞产生的微核
Fig.2 Micronucleus in erythrocytes of *Xenopus tropicalis* tadpoles exposed to acetochlor

表2 热带爪蟾 *Xenopus trolialis* 蝌蚪暴露于乙草胺后的血细胞微核率

Table 2 Micronucleus frequency in erythrocytes of *Xenopus tropicalis* tadpoles exposed to acetochlor

处理质量浓度 Treatment concentration(a. i) / (mg /L)	血细胞分析个数 Total number of erythrocytes analyzed	观察到的微核数 Total number of micronuclei observed	微核千分率 ^a Micronucleus frequency / (%)	变异系数 CV / %
空白对照 Control group	3 000	6	2.0 ± 1.7	18.6
0.157	3 000	11	3.7 ± 3.1	28.8
0.315	3 000	12	4.0 ± 1.8 [*]	20.1
0.625	3 000	32	10.7 ± 4.9 ^{**}	19.4
1.25	3 000	43	14.3 ± 7.6 ^{**}	25.3
0.5(MMS) ^b	3 000	79	26.3 ± 11.4 ^{**}	22.9

^a 平均值 ± SE; ^{*} 表示处理组与空白对照组具有显著差异($P < 0.05$); ^{**} 表示处理组与空白对照组具有极显著差异($P < 0.01$)。^b MMS, 阳性对照药剂。

Note: Asterisks indicate statistically significant differences between treatments and the corresponding control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

差异,且药剂处理组的微核率随质量浓度的升高而呈上升趋势,说明处理浓度与细胞微核率之间存在剂量-反应关系。

2.3 乙草胺对非洲爪蟾血细胞 DNA 的损伤作用

单细胞凝胶电泳试验发现,药剂处理造成爪蟾的血细胞出现了彗星现象(图3),DNA 损伤情况见图4。由阳性对照药剂(MMS)与空白对照之间存

在显著性差异,可以证明试验过程科学合理。由试验结果得知,选择的尾部 DNA 含量和 Olive 尾矩两个指标都有很高的灵敏性,在乙草胺最低暴露浓度下的 DNA 损伤都与空白对照组之间存在显著性差异。两个指标都显示出了 DNA 的损伤程度随乙草胺浓度的增加而有所增强。图3 为不同质量浓度乙草胺处理的蝌蚪血细胞彗星 DNA 损伤程度示意

图,从图中可以看出,随着处理浓度的增加,DNA 分子的拖尾现象趋于严重。

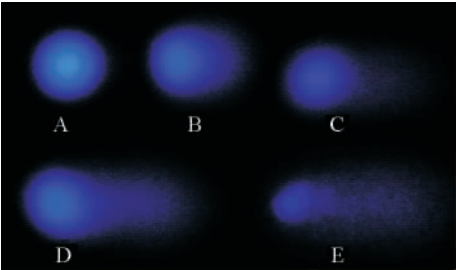


图3 乙草胺诱导热带爪蟾蝌蚪血细胞 DNA 损伤形态图(400 ×)

Fig.3 Comet pictures of damaged DNA induced by acetochlor (all magnifications 400 ×)

注: (A) 阴性对照组细胞 DNA ; (B) 乙草胺 0. 157 mg /L; (C) 乙草胺 0. 315 mg /L; (D) 乙草胺 0. 625 mg /L; (E) 乙草胺 1. 25 mg /L。

Note: (A) Negative control; (B) acetochlor 0. 157 mg (a. i) /L; (C) acetochlor 0. 315 mg (a. i) /L; (D) acetochlor 0. 625 mg (a. i) /L; (E) acetochlor 1. 25 mg (a. i) /L.

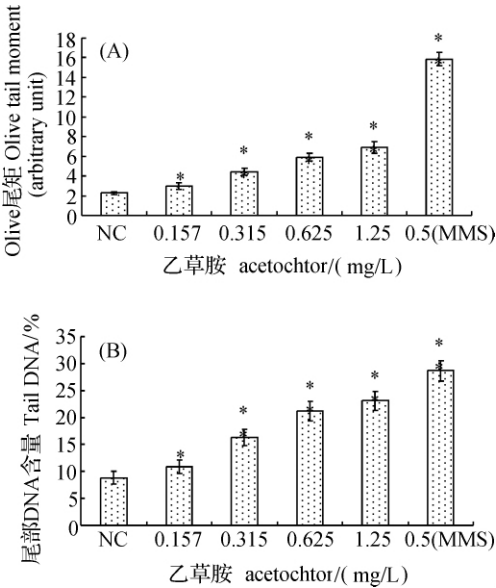


图4 热带爪蟾在亚致死浓度的乙草胺中暴露 96 h 后血细胞 DNA 的损伤情况

Fig.4 DNA damage degree in erythrocytes of *Xenopus tropicalis* exposed to sub-lethal concentrations of acetochlor

(A) 以 Olive 尾矩作为指标; (B) 以尾部 DNA 含量作为指标。
(A) Olive tail monment index; (B) Tail DNA% index.

注: * 表示处理组与对照组之间的差异显著性; $P < 0. 05$ 水平以 “* ”表示, $P < 0. 01$ 以 “** ”表示。

Note: Asterisks indicate statistically significant differences between treatments and the corresponding control group, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$.

由于彗星试验中的传统铺胶过程较为繁琐,且经常会出现脱胶现象,故本试验采用了自制微电泳槽(图5)加以改进。试验时只需将融化的琼脂糖滴加到槽室中央,迅速铺满整个槽室,水平放置几分钟即可完成铺胶步骤,并且有效地避免了操作过程中的脱胶现象,使得铺胶步骤省时、省力,同时获得的彗星图片边缘清晰,有利于结果的分析。

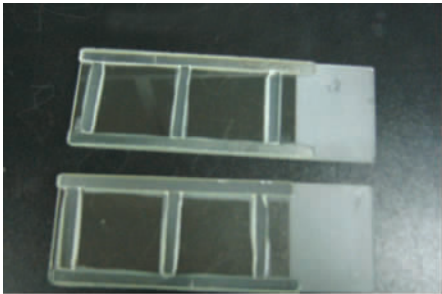


图5 用于单细胞凝胶电泳试验的微电泳槽(自制)

Fig.5 Micro-electrophoresis chamber for alkaline single-cell gel electrophoresis (DIY)

3 讨论

蛙类胚胎是一个非常好的发育模式系统, FETAX 试验本质上是一种器官形成期的检测,两栖类和哺乳类动物早期的器官形成过程高度保守。由于爪蟾在 96 h 的胚胎发育中,器官形成的主要过程与哺乳类一致,故 FETAX 试验可以替代哺乳类动物作为快速筛选发育毒物和致畸剂的有效方法,其试验结果在一定条件下可外推至其他动物包括人类。

与非洲爪蟾 *X. laevis* 相比,热带爪蟾具备作为模式生物的所有优点,有关其在各领域中的应用正逐渐受到关注 [13]。Song [17] 和 Fort [12] 等都曾利用热带爪蟾替代非洲爪蟾来检验 FETAX 试验的结果,发现两个物种对化合物的反应相似,产生畸形类型也相似,热带爪蟾可以作为 FETAX 试验的替代生物。关于乙草胺对胚胎的致畸效应,尹晓辉 [18] 以中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* 的胚胎为研究对象,使用乙草胺制剂进行染毒,其胚胎发育毒性的 LC_{50} 值为 4. 24 mg /L, TC_{50} 为 7. 752 mg /L, TI 值为 0. 547 8。本试验结果与之相比,热带爪蟾胚胎对乙草胺的敏感性高于中华蟾蜍胚胎。杨晓梅等 [9] 将中华大蟾蜍胚胎暴露于乙草胺后也诱导出现了多种胚胎畸形,如头部过大或过小、腹部水肿、尾部畸形、体形不规则等,本试验中出现的畸形类型与其基本

一致。另外还与 Osano 等^[9]报道的甲草胺诱导的非洲爪蟾胚胎畸形的表型也十分相似。因此,本试验结果也验证了热带爪蟾作为筛选致畸剂的模式生物的敏感性和可行性。

按照致畸剂划分标准^[9]: 当 TI 值 ≥ 2 时表示该化合物具有致畸风险,需要做进一步的试验; 当 TI 值在 1.5 ~ 2.0 之间时表示该化合物具有致畸的潜在风险,需要另外的筛选平行试验进行验证确认; 当 TI 值 < 1.5 时表示该物质不具有致畸性。本文的 FETAX 试验结果产生的 TI 值为 1.88,说明乙草胺具有潜在致畸风险。

微核试验是检测环境污染物对细胞遗传物质——染色体损伤的一种简便、快速而有效的筛选方法,现已被许多国家和国际组织推荐作为检测致癌剂、诱变剂的遗传毒理学方法之一^[20]。本试验结果显示,除最低处理浓度外,蝌蚪在其他浓度下暴露后产生的微核率都与对照组有明显的统计学差异,且随质量浓度的增加微核率呈上升趋势。另外,在观察微核的过程中还发现有核异常细胞出现,如双核、无核、内凹、外凸等。

单细胞凝胶电泳试验也称彗星试验,是近年来研究遗传毒性时常用到的一种快速检测方法,主要用于检测化学物质对 DNA 分子造成的损伤^[21-22]。该方法的缺点是: 制胶步骤复杂,且在后续步骤中常会出现脱胶现象而导致试验失败; 另外,染色步骤中使用的 EB(溴化乙锭)染色剂往往毒性过大。为此本研究采用自制微电泳槽结合使用 DAPI 染色剂对试验加以改进,并利用改进后的方法进行了结果验证。Liu 等^[23]和 Yin 等^[8]曾研究了乙草胺对蛙类的 DNA 损伤,结果显示,乙草胺可造成两种本地蛙(花背蟾蜍 *Bufo raddei* 和中华大蟾蜍)细胞的 DNA 损伤。本试验采用热带爪蟾蝌蚪为受试生物,采用改进后的方法,试验结果与前人报道一致,且试验操作过程省时、高效、安全。

农药对环境生物个体的影响无论多复杂,或最终结果多严重,其最早的影响必然是从细胞内分子水平上开始的,然后逐步在细胞、组织、个体等各个水平上反映出来,这种作用层级方式已在生态毒理学者中达成了共识。本研究首先利用 FETAX 试验检测到个体和器官水平上有畸形现象,并从细胞水平(微核试验)和分子水平(彗星试验)对其作用机理进行了初探,结果显示,生物的遗传物质的确受到了药剂的影响,说明 DNA 损伤可能是造成畸形的一个因素。

参考文献:

- [1] LENGYEL Z, FOLDENYI R. Acetochlor as a soil pollutant [J]. *Environ Sci Pollut R*, 2003, 10(1): 13-18.
- [2] YE C. Environmental behavior of the herbicide acetochlor in soil [J]. *B Environ Contam Tox*, 2003, 71(5): 919-923.
- [3] LIU W P, GAN J Y, YATES S R. Influence of herbicide structure, clay acidity, and humic acid coating on acetanilide herbicide adsorption on homoionic clays [J]. *J Agr Food Chem*, 2002, 50(14): 4003-4008.
- [4] GREEN T, LEE R, MOORE R B, et al. Acetochlor-induced rat nasal tumors: further studies on the mode of action and relevance to humans [J]. *Regul Toxicol Pharm*, 2000, 32(1): 127-133.
- [5] CHEEK A O, IDE C F, BOLLINGER J E, et al. Alteration of Leopard frog (*Rana pipiens*) metamorphosis by the herbicide acetochlor [J]. *Arch Environ Con Tox*, 1999, 37(1): 70-77.
- [6] ZAFEIRIDOU G, GERONIKAKI A, PAPAETHIMIOU C, et al. Assessing the effects of the three herbicides acetochlor, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the compound action potential of the sciatic nerve of the frog (*Rana ridibunda*) [J]. *Chemosphere*, 2006, 65(6): 1040-1048.
- [7] YANG Xiao-mei (杨晓梅), TAN Zhi-jun (谭志军), ZHAI Yu-mei (翟玉梅). 乙草胺对中华大蟾蜍早期胚胎发育的影响 [J]. *Acta Zoologica Sinica (动物学报)*, 2001, 47: 125-130.
- [8] YIN X H, LI S N, ZHANG L, et al. Evaluation of DNA damage in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) after *in vivo* exposure to sublethal concentrations of four herbicides using the comet assay [J]. *Ecotoxicology*, 2008, 17(4): 280-286.
- [9] WANG Guo-xiang (王国祥). 生物监测若干问题的探讨 [J]. *The Administration and Technique of Environmental Monitoring (环境监测与管理技术)*, 1994, 6(6): 7-10.
- [10] MORGAN M K, SCHEUERMAN P R, BISHOP C S, et al. Teratogenic potential of atrazine and 2,4-D using FETAX [J]. *J Toxicol Env Health*, 1996, 48(2): 151-168.
- [11] SCHUYTEMA G S, NEBEKER A V. Comparative toxicity of diuron on survival and growth of pacific treefrog, bullfrog, red-legged frog, and African clawed frog embryos and tadpoles [J]. *Arch Environ Con Tox*, 1998, 34(4): 370-376.
- [12] FORT D J, ROGERS R L, THOMAS J H, et al. Comparative sensitivity of *Xenopus tropicalis* and *Xenopus laevis* as test species for the FETAX model [J]. *J Appl Toxicol*, 2004, 24(6): 443-457.
- [13] SONG M O, FORT D J, MCLAUGHLIN D L, et al. Evaluation of *Xenopus tropicalis* as an alternative test organism for frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX) [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2004, 27(1): 93-94.
- [14] OLMSTEAD A W, KOSIAN P A, KORTE J J, et al. Sex reversal of the amphibian, *Xenopus tropicalis*, following larval exposure to an aromatase inhibitor [J]. *Aquat Toxicol*, 2009, 91(2): 143-150.

- [5] GYLLENHAMMAR I, HOLM L, EKLUND R, *et al.* Reproductive toxicity in *Xenopus tropicalis* after developmental exposure to environmental concentrations of ethynylestradiol [J]. *Aquat Toxicol*, 2009, 91(2): 171–178.
- [6] BANTLE J A, FINCH R A, FORT D J, *et al.* Phase III interlaboratory study of FETAX—Part 3. FETAX validation using 12 compounds with and without an exogenous metabolic activation system [J]. *J Appl Toxicol*, 1999, 19(6): 447–472.
- [7] SONG M O, FORT D J, MCLAUGHLIN D L, *et al.* Evaluation of *Xenopus tropicalis* as an alternative test organism for frog embryo teratogenesis assay—*Xenopus* (FETAX) [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2003, 26(3): 177–189.
- [8] YIN Xiao-hui(尹晓辉). Molecular toxicity and ecotoxicology effects on Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) exposed to several pesticides (几种农药对中华蟾蜍生态毒理效应及分子毒性研究) [D]. Shanghai (上海): Donghua University (东华大学), 2008.
- [9] OSANO O, ADMIRAAL W, OTIENO D. Developmental disorders in embryos of the frog *Xenopus laevis* induced by chloroacetanilide herbicides and their degradation products [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2002, 21(2): 375–379.
- [20] HUANG D J, ZHANG Y M, WANG Y J, *et al.* Assessment of the genotoxicity in toad *Bufo raddei* exposed to petrochemical contaminants in Lanzhou region, China [J]. *Mutat Res-Gen Tox En*, 2007, 629(2): 81–88.
- [21] FAIRBAIRN D W, OLIVE P L, ONEILL K L. The comet assay—a comprehensive review [J]. *Mutat Res-Rev Genet*, 1995, 339(1): 37–59.
- [22] STEINERT S A. DNA damage as a bivalve biomarker [J]. *Biomarkers*, 1999, 4(6): 492–496.
- [23] LIU Y, ZHANG Y M, LIU H H, *et al.* The role of reactive oxygen species in the herbicide acetochlor-induced DNA damage on *Bufo raddei* tadpole liver [J]. *Aquat Toxicol*, 2006, 78(1): 21–26.

(责任编辑: 金淑惠)

欢迎订阅 2011 年《农药学学报》

双月刊 邮发代号 2-949 A4 开本 彩色四封

《农药学学报》是由中国农业大学主办、国内外公开发行的农药学综合性学术期刊,“中国精品科技期刊”、“中国科技核心期刊”、“中国高校精品科技期刊”、“中文核心期刊要目总览(2008版)入编期刊”、“中国科技引文数据库”源刊。主要面向农药和植保专业科研工作者及大专院校师生,旨在及时、全面报道农药学各分支学科有创造性的最新研究成果与综合评述,是了解我国农药学研究动态的理想园地。

本刊现设4个栏目:专论与综述、研究论文、研究简报及相关信息。所发表的论文几乎涵盖了农药学所有分支领域,主要包括合成与构效关系、分析与残留、环境与毒理、作用机制研究、制剂加工及应用等。

本刊现已被美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、英国《动物学记录》以及汤姆森科技信息集团(Thomson Scientific)等10家国外重要检索机构收录,同时是《中国科学引文数据库》等多家国内重要数据库的来源期刊。曾荣获教育部科技司“全国高校优秀期刊评比·优秀编辑出版质量奖”、“中国科技论文在线优秀期刊·一等奖”及“第四届全国优秀农业期刊评选·学术类期刊二等奖”等奖项,2010年在教育部科技司举办的“第3届中国高校精品·优秀·特色科技期刊评比”中又被评为了“中国高校精品科技期刊”。

《农药学学报》现为A4开本,自2011年起已由季刊变更为双月刊。全国统一邮政发行(邮发代号2-949),2011年国内定价为20元/期,全年6期共120元。订户可通过当地邮局订阅,也可直接汇款到本刊编辑部订阅(1999~2010年已出版期刊,本编辑部还有少量库存,欢迎联系购买)。

汇款地址:北京海淀区圆明园西路2号 中国农业大学西校区理学院《农药学学报》编辑部

邮 编: 100193 联系人: 唐 静 电 话: 010-62733003 E-mail: nyxuebao@263.net

欢迎单位和个人踊跃订阅!

《农药学学报》编辑部