

# 两种农药对泥鳅红细胞微核和核异常的诱导

楼允东 吴萍

(上海水产大学渔业学院, 200090)

**提 要** 本研究以泥鳅作为试验鱼,在测定甲胺磷对其96小时半致死浓度的基础上,在半致死浓度和安全浓度之间设置五个浓度组,研究了甲胺磷和敌枯双各个浓度组对泥鳅红细胞微核形成和核异常的影响。试验结果表明,两种农药都能诱导泥鳅红细胞微核细胞率和核异常率的提高。在一定浓度范围内,微核细胞率与农药浓度呈正相关;但当浓度过高时,微核细胞率反而随浓度的升高而降低。而总核异常率则总是随农药浓度的升高而提高。此外,研究还发现,随着农药浓度的升高,微核细胞率出现高峰的时间也提前。

**关键词** 泥鳅,红细胞,微核,核异常,农药

随着工农业生产的发展,水体污染问题日趋严重,尤其近年来农药的广泛使用,水环境日益恶化。因此,对污染水体中具有诱变和致癌活性的化学物质的检测显得十分重要。目前,除用理化方法对水体进行监测外,还可用生物学方法来检测不同环境中污染物的遗传毒性效应,并可从不同角度评价它们对生物和人类健康造成的潜在危害。

微核测定法(Micronucleus test)是在本世纪七十年代初建立起来的细胞遗传学方法之一。最早,国外学者 Hooftman 和 Raat[1982]曾在鱼类做过一些研究,证明化学诱变剂甲基磺酸乙酯(EMS)能诱发泥鳅鱼(*Umbra pygmaea*)微核的形成。新近,国内学者也进行了类似研究[王丹等,1992;刘爱华与施立明,1985;张允恩等,1986;薛良义,1993]。但上述工作仅限于血细胞中微核率的变化。另外,陈军建与夏宜璋[1992,1993]以及贺维顺与王蕊芳[1990]分别用青蛙蝌蚪和华西大蟾蜍蝌蚪为材料进行微核试验,也得到了较高的微核率。

我们在鱼类红细胞微核测定的基础上,同时研究了红细胞核异常的几种情况。通过对试验组和对照组的比较,表明微核测定法用于环境致突变因子的早期诊断及环境质量的评价是完全可行的。同时,也可为安全和合理使用农药及制订水质标准提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验鱼

试验鱼为泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*),购自图们路农贸市场。体长为11-16厘米,体重10-23克。在室内水族箱暂养数天后,挑选活泼、健康、表皮无损的个体作为试验鱼。整个试验期间的水温范围为11-23℃。

### 1.1.2 试验农药

甲胺磷(Methamidophos) 苏州化工厂生产的50%甲胺磷乳油,化学名称为O,S-二甲基氨基硫代磷酸酯,属高毒杀虫剂。

敌枯双(Dikushuang) 江苏省建湖县农药厂生产的12.5%胶悬剂,化学名称为N,N'-甲撑-双-(2-氨基-1,3,4-噻二唑),属有明显致突变和致畸变作用的杀菌剂。

## 1.2 方法

### 1.2.1 试验设计

#### 1.2.1.1 急性毒性试验

按急性毒性试验的常规方法进行。本试验仅对甲胺磷进行了半致死浓度的测定。在预试验的基础上,配制25、50、100、200、400和800 ppm 六个浓度组。每一浓度组投放10尾泥鳅,并设一对照组。观察中毒症状,记录不同时间泥鳅的死亡数,按直线内插法算出96小时半致死浓度值(96 hrLC<sub>50</sub>)。根据经验公式乘以安全系数0.1,估算其安全浓度。

#### 1.2.1.2 甲胺磷诱发泥鳅微核的浓度、时间关系试验

根据急性毒性试验的结果,在安全浓度和半致死浓度之间设置五个浓度组,即20、65、110、155和200 ppm,并设一对照组。每一浓度溶液中投放20尾泥鳅,每五天更换新配制的处理液。试验组于染毒后6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、6天、10天和15天断尾取血制备血涂片,对照组分别在6小时、10天和15天时三次断尾取血制备血涂片。

#### 1.2.1.3 敌枯双诱发泥鳅微核的浓度、时间关系试验

参照甲胺磷对泥鳅的半致死浓度,设置20、65、110、155和200 ppm 五个浓度组和一个对照组,每个浓度组投放20尾泥鳅,每五天更换新配制的处理液。以后的试验处理同甲胺磷。

### 1.2.2 血涂片的制备

每隔一定时间,每浓度组取两尾泥鳅断尾取血,制成血涂片。涂片晾干后,甲醇固定15分钟,以0.2 M 磷酸缓冲液(pH 6.8)稀释的Giemsa 氏液(5:1)染色10分钟,烘干后二甲苯透明10分钟,再用中性树胶封片。

### 1.2.3 血涂片的显微镜观察

血涂片置于油镜下观察。镜检时在目镜中安放一中间有小孔黑纸圈,以缩小视野,便于观察。每张涂片随机统计3000个以上红细胞,记录其中具有微核以及核异常的红细胞数,以千分率表示之,即为微核细胞率和核异常细胞率。微核细胞率与核异常细胞率之和为总核异常率。

## 2 结果

### 2.1 急性毒性试验

泥鳅刚染毒时,在水族箱中急剧游动,四处乱窜,片刻后便趋于平静,伏于水族箱底,胸鳍张开,鳃盖启动。以后时常有泥鳅游到水面,头伸出水外,意欲跳出,此现象在高浓度组较为明显。泥鳅中毒后,严重者昏迷沉底死亡。急性毒性试验结果见表1。

由表1可知,甲胺磷对泥鳅96小时半致死浓度为200 ppm。

### 2.2 甲胺磷诱发泥鳅微核的浓度、时间关系试验

泥鳅红细胞因甲胺磷诱发产生的微核位于胞质中,为圆形或椭圆形,大小在主核的1/3以下,微核的染色深度与主核一致或略浅于主核。泥鳅红细胞除形成微核以外,还出现各种核异

常的情况,包括核质外凸、核内凹、核碎裂、双核和无丝分裂等。甲胺磷诱发泥鳅红细胞的微核细胞率和总核异常率如表2、3所示。

表1 甲胺磷对泥鳅急性毒性的试验结果

Table 1 The result of acute toxicity tests of methamidophos on loach

浓度 (ppm)	泥鳅死亡数								
	12hr	24hr	36hr	48hr	60hr	72hr	84hr	96hr	总死亡数
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	1	0	0	1	1	3
200	0	0	0	0	0	2	2	1	5
400	0	0	2	6	1	0	1	0	10
800	7	1	2	0	0	0	0	0	10

表2 甲胺磷诱导泥鳅的微核细胞率(%)

Table 2 The rate of micronucleated erythrocytes in loach induced by methamidophos (%)

微核细胞率 浓度 ppm	时间	6h	12h	24h	48h	72h	96h	6d	10d	15d
		0	0.62±0.61							
20		2.32	2.76	3.89	3.32	3.29	3.58	2.64	3.31	3.61
65		2.96	3.76	4.12	3.81	3.49	/	2.69	3.32	3.38
110		3.28	5.24	4.39	3.99	2.73	/	2.99	3.15	3.79
150		3.23	5.27	3.88	3.64	3.64	3.05	2.13	2.75	3.48
200		3.70	3.83	3.19	3.00	2.95	3.45	2.99	/	/

\* 对照组的微核细胞率为三次测定的平均值(n=8)。下同。

表3 甲胺磷诱导泥鳅的总核异常率(%)

Table 3 The rate of total nuclear anomalies in loach erythrocytes induced by methamidophos (%)

总核异常率 浓度 ppm	时间	6h	12h	24h	48h	72h	96h	6d	10d	15d
		0	1.56±0.87							
20		3.31	7.88	11.48	6.32	5.27	3.91	3.96	4.64	5.19
65		4.28	5.74	4.79	21.94	6.48	/	3.35	5.76	5.02
110		4.60	6.22	7.62	11.71	6.51	/	6.93	7.27	5.79
155		4.53	7.27	6.15	8.56	7.76	5.70	5.44	6.05	7.14
200		6.49	19.67	11.41	7.33	7.59	7.44	7.98	/	/

由表2、3可知,经甲胺磷处理后,泥鳅红细胞的微核细胞率和总核异常率均比对照组有显著提高。试验组微核细胞率最大值高达5.27%,为对照组的8.5倍;最小值也有2.13%,为对照组的3.4倍;平均提高4.6倍。总核异常率本底为1.56%,经甲胺磷处理后,最高值达21.94%,为对照组的14.1倍;最小值3.31%,为对照组的2.1倍;平均提高3.6倍。

### 2.3 敌枯双诱发泥鳅微核的浓度、时间关系试验

表4、5列出了敌枯双诱发泥鳅红细胞的微核细胞率和总核异常率。

表4 敌枯双诱导泥鳅的微核细胞率(%)

Table 4 The rate of micronucleated erythrocytes in loach induced by dikushuang (%)

微核细胞率 浓度 ppm	时间	6h	12h	24h	48h	72h	96h	6d	10d	15d
		0	0.62±0.61							
20		1.65	2.63	3.39	4.38	3.63	3.33	3.88	2.00	2.15
65		2.10	2.57	4.96	2.75	2.32	3.11	2.70	2.44	2.65
110		2.30	3.66	4.96	/	3.22	3.31	/	4.84	3.53
155		2.63	5.99	3.66	3.34	5.02	3.31	3.15	3.27	3.27
200		3.17	4.37	2.72	2.66	/	4.11	3.66	3.30	3.00

表5 敌枯双诱导泥鳅的总核异常率(%)

Table 5 The rate of total nuclear anomalies in loach erythrocytes induced by dikushuang (%)

总核异常率 浓度 ppm	时间	6h	12h	24h	48h	72h	96h	6d	10d	15d
		0	1.56±0.87							
20		3.96	9.58	11.94	9.36	3.96	6.99	6.87	4.67	3.81
65		4.10	7.14	8.25	9.00	4.31	5.09	6.00	6.10	6.62
110		4.93	7.32	14.01	/	9.52	8.28	/	9.36	7.71
155		2.96	14.30	14.61	7.00	8.52	7.28	8.62	4.26	6.59
200		7.78	9.85	13.03	12.52	/	7.72	8.97	8.61	11.48

由表4、5可知,经敌枯双处理后,泥鳅红细胞的微核细胞率和总核异常率与对照组比较也有显著增高。微核细胞率最大值高达5.99%,是对照组的9.7倍;最小值为1.65%,是对照组的2.7倍;平均比对照组提高4.5倍。总核异常率本底为1.56%,经敌枯双处理后,最高值达14.61%,为对照组的9.4倍;最小值为2.96%,为对照组的1.9倍;平均比对照组提高4.1倍。

### 3 讨论

#### 3.1 农药诱发泥鳅红细胞微核

利用微核测试法对水环境污染监测的研究,近年来已有人做了不少工作。陈军建等[1992, 1993]用青蛙蝌蚪、薛良义[1993]用黄鳝为材料进行微核试验。本研究选择了泥鳅作为试验鱼,因为泥鳅对于微核的诱发具有较高的敏感性[王丹等,1992;刘爱华等,1985],且泥鳅分布广泛,在实验室容易饲养。因此,国内正在试用它作为水体污染和环境评价的主要水生生物试验材料。

甲胺磷是一种高毒杀虫剂,同时也是农田常用的农药。在本试验中,甲胺磷对泥鳅的毒性影响非常显著。即使在安全浓度,微核细胞率和总核异常率都有显著提高。在不同浓度梯度的甲胺磷作用下,微核细胞率的变化具明显的时间和剂量效应,这一结果与其他文献的报道相一致[朱炳富等,1979]。在各个浓度梯度,均有一定的微核细胞率出现高峰的时间,且在高峰以后,均有下降并趋于平稳的趋势。在20 ppm和65 ppm两个低浓度组,微核细胞率在染毒后24

小时达到高峰,然后开始下降,并逐渐趋于稳定。在110 ppm、155 ppm和200 ppm三个高浓度组,微核细胞率在染毒后12小时即达到高峰。这表明随着农药浓度的提高,泥鳅红细胞微核率出现高峰的时间也提前。

另外,泥鳅刚染毒6小时,微核细胞率随浓度升高而提高。而随着时间的推移,从染毒后24小时开始,微核细胞率在较低浓度梯度时与浓度呈正相关;但在155 ppm以上时,却随浓度的升高而下降。这说明微核细胞率与浓度的相关性有一定的范围,超过此范围,因剂量过高会抑制或终止细胞的正常分裂活动[沈光平等,1985],微核细胞率反而下降。结合上面提到的110 ppm时高峰开始提前的现象,表明甲胺磷在110 ppm时具有最高的诱变活性。

农药敌枯双是已知有明显致突变和致畸变作用的杀菌剂。有文献报道敌枯双诱发泥鳅红细胞微核率在给药后12小时达到高峰[刘爱华等,1985],然后开始下降。本试验中,在每一浓度梯度,微核细胞率均有一定的高峰时间,高峰过后,逐渐趋于稳定。在20 ppm的低浓度组,染毒后48小时达到高峰,然后开始下降,并逐渐稳定下来。在65 ppm和110 ppm浓度组,染毒后24小时即达到高峰;而在155 ppm和200 ppm的高浓度组,到达高峰的时间缩短为12小时。这说明随着浓度的提高,泥鳅红细胞出现微核高峰的时间提前,这一点与甲胺磷的作用效果相一致。

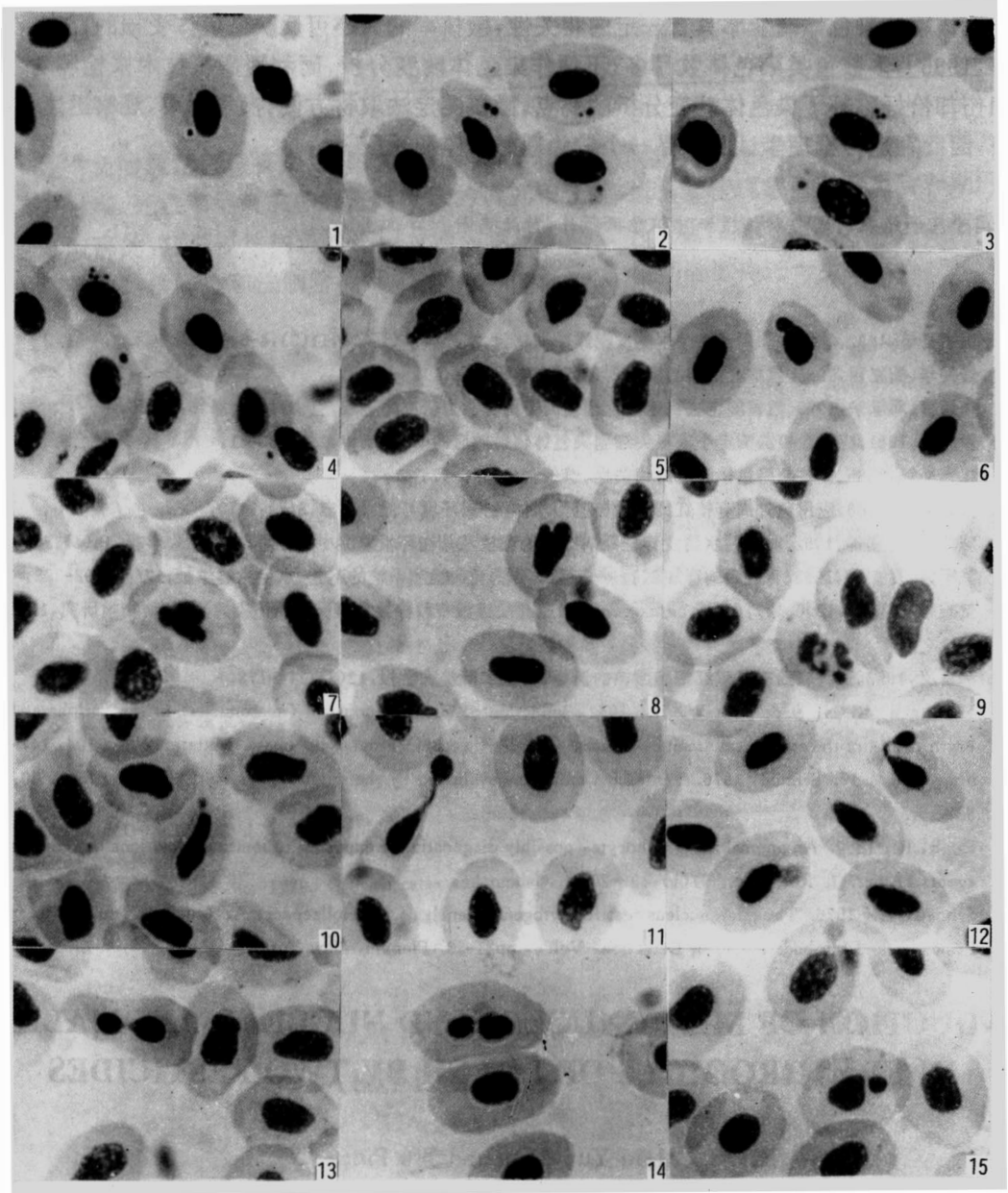
另外,在试验之初,即染毒后6小时,微核细胞率与试验浓度呈正相关。但随着时间的推移,表现为微核细胞率在一定浓度范围内随浓度升高而提高,超过此范围,微核细胞率反而下降。这一结果也与甲胺磷的作用效果基本一致。表明泥鳅微核试验结果重复性较好。

微核主要是由于染色体断裂产生的无着丝粒片断或分裂后期没有迁移到纺锤体极位去的整条染色体滞留在胞质中形成的[Schmid,1976]。我们在阅片过程中,经常可见到一些较大的微核(图版15),Maier和Schmid[1976]认为这种大微核很可能是在细胞进入后期由单一或一组落后的染色体形成的。朱炳富和邓承宗[1979]也观察到一些较大的微核,按其大小难于用染色体断片的来源解释,很可能这种较大的微核也是在细胞进入后期后,由丧失了着丝点的单个或一组落后的染色体所组成。另外,正如Rugh[1964]所指出的那样,微核也可以由主核向外突出(出芽)而成。伊虎英[1981]也曾看到辐射过的小麦根尖胞的核出芽现象,芽突大小不一致,最终也可能形成微核。我们在阅片过程中,发现有些微核与主核有一细丝相连,两者还没有完全分离(图版10),因此,我们认为微核也有可能是由细胞核向外突出并延伸而成的。此外,在高浓度组,发现具有两个或多个微核的红细胞增多(图版2,3,4),一个细胞中最多可有4个微核(图版4),这反映出遗传物质损伤的加重。

### 3.2 农药诱发泥鳅红细胞核异常

试验过程中,发现两种农药除对泥鳅红细胞微核细胞率有一定影响外,还同时出现其他核异常现象,如细胞核呈不规则凸出(图版5,6,7)、核质内凹(图版8)和核碎裂(图版9)。有的细胞发生无丝分裂(图版11)和不等缢裂(图版12)。另外,还有的红细胞仅发生核缢裂而形成双核细胞(图版13,14,15)。在对照组中,仅可见到极少的核异常现象。

试验表明,经农药处理后,泥鳅红细胞的总核异常率均有显著提高。但出现高峰的时间明显晚于微核细胞率,说明红细胞中核异常与微核的出现并不完全同步。总核异常率在各个时间阶段,基本上随浓度的升高而提高,并不囿于一定的范围。过高的浓度,虽然抑制了细胞分裂使微核率下降,但其对细胞的损伤并没有减轻,总核异常率与浓度呈正相关就充分证明了这一点。



图版 plate

1.单微核红细胞； 2.双微核红细胞； 3.三微核红细胞； 4.四微核红细胞； 5、6、7.各种形状的核凸出； 8.核质内凹； 9.核碎裂； 10.与主核有细丝相连的微核； 11.无丝分裂； 12.不等缢裂； 13.核缢裂； 14,15.双核细胞。

试验结果还表明,农药能对鱼类遗传物质造成损害,而这种变化通常不表现为急性中毒事件,因此不易察觉而往往被人们所忽视,但实际上,它可能会对水生生物和人类健康造成危害。微核测试法可灵敏地检测到这种潜在的遗传损害。

微核率与染色体畸变率具有一定的相关性,微核率的大小可反映染色体受损的程度[沈光平等,1985]。多数鱼类染色体数目多,不便作染色体畸变分析,而利用微核技术来检测对鱼类的损伤却恰好弥补了染色体畸变分析的弱点。微核测定法取材方便,操作简单,观察迅速,效果显著,因此在遗传毒理学试验中是一个较为理想的监测手段。

周平凡和张敏同志协助拍摄和冲印显微照片,特此鸣谢。

### 参 考 文 献

- [1] 王丹等,1992.沈阳采油厂回注废水诱发泥鳅微核试验.水产科学(辽宁),11(9):4-6.
- [2] 刘爱华、施立明,1985.鱼类血细胞的微核测定.动物学研究,6(1):8-9.
- [3] 朱炳富、邓承宗,1979.微核测定法快速评价理化因子诱变能力研究的进展.生物科学动态,6:26-36.
- [4] 伊虎英,1981.应用微核法测定小麦根尖细胞染色体辐射效应的研究.遗传,3(3):30-31.
- [5] 沈光平等,1985.微核与染色体畸变的相关性.遗传,7(1):15-17.
- [6] 张尤恩等,1986.应用鱼外周有核红细胞微核监测水体污染.环境与健康杂志,3(2):9-10.
- [7] 陈军建、夏宜琮,1992.城镇污水诱发青蛙蝌蚪红细胞微核及其在环境监测中的应用.水生生物学报,16(4):305-312.
- [8] 陈军建、夏宜琮,1993.青蛙蝌蚪微核试验——一种水体诱变剂检测系统的建立.水生生物学报,17(4):298-308.
- [9] 贺维顺、王蕊芳,1990.蝌蚪(*Bufo bufo andrewsi*)血细胞微核和核异常监测水质污染的研究.动物学研究,11(1):1-5.
- [10] 薛良义,1993.三种农药对黄鳝红细胞微核的诱导.浙江水产学院学报,12(3):174-179.
- [11] Hooftman, R. N. & de Raat W. K., 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. Mutation Res., 104: 147-152.
- [12] Maier, P. & W. Schmid, 1976. Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test. Mutation Res., 40:325-338.
- [13] Rugh, R., 1964. An anomalous lymphocyte; possibly diagnostic for exposure to ionizing radiations or radiomimetic agents. Amer. J. Roentgen., 91(1):192-201.
- [14] Schmid, W., 1976. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In Hollaender, A. (ed.), Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection, Vol. 4, pp31-53. Plenum, New York.

## INDUCTION OF MICRONUCLEI AND NUCLEAR ANOMALIES IN ERYTHROCYTES OF LOACH BY TWO PESTICIDES

Lou Yun-dong and Wu Ping  
(Fisheries College, SFU, 200090)

**ABSTRACT** Pesticides causing damages to the erythrocyte nucleus of loach, *Misgurnus anguillicaudatus* Cantor, were reported in this paper. On the basis of determining 96hr LC50 of methamidophos, the effects of two pesticides on micronuclei and nuclear anomalies in erythrocytes of loach at five different concentration between LC50 and the safety were discussed. The experimental results indicated that the two pesticides could increase the

frequency of micronucleated erythrocytes and the rate of nuclear anomalies. At the certain range of the pesticide concentration, the frequency of micronucleated erythrocytes showed a dosedependent elevation. However, it decreased with the increase of pesticide concentration when the concentration was over a suitable range. But the rate of total nuclear anomalies showed a significant dose-dependent increases in the test. In addition, with the increase of the doses for each pesticide, the high frequency of micronucleated erythrocytes appeared also earlier.

**KEYWORDS** loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, erythrocyte, micronucleus, nuclear anomalies, pesticide