

# 克百威及其代谢产物对小鼠 DNA 损伤的研究

刘宝峰, 周培, 陆贻通

(上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101)

**摘要:** 采用微核试验和单细胞凝胶电泳技术研究了克百威及其 4 种主要代谢物的细胞及遗传毒性, 对每种受试物设立 3 个不同剂量组, 微核试验以小鼠活体给药后分离骨髓淋巴细胞, 单细胞凝胶电泳试验采用分离外周血细胞后受试物处理的方法进行。结果表明, 克百威、呋喃酚在两种方法中均显示阴性结果, 可认为无明显细胞及分子毒性; 3-羟基呋喃丹和亚硝基呋喃丹均表现明显的细胞毒性, 而 3-酮基呋喃丹虽无明显微核效应, 却可引起细胞强烈的 DNA 单链断裂, 后 3 种化合物可能具有对机体的毒性, 需要进一步确定其毒害机制。

**关键词:** 克百威; 微核; 单细胞凝胶电泳; 遗传毒性

**中图分类号:** S481.8      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-2043(2003)05-0609-05

## Damage of Carbofuran and Its Metabolites on DNA

LIU Bao-feng, ZHOU Pei, LU Yi-tong

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China)

**Abstract:** Micronucleus (MN) assay and single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay were employed to test the cytotoxic and genotoxic effects of carbofuran and its main metabolites. The animals were exposed to these chemicals by intraperitoneal injection at different dosage in MN test, and isolated peripheral blood lymphocytes were evaluated by SCGE after a 1-h treatment. We found that carbofuran and carbofuran-phenol showed negative results, and hence have no obvious cell toxicity; while 3-hydroxycarbofuran and nitrosocarbofuran were both positive, 3-ketocarbofuran did not induce MN formation but caused significant DNA migration in SCGE test. This may be suggested that 3-ketocarbofuran, 3-hydroxycarbofuran and nitrosocarbofuran be potential mutagenesis and further research be needed.

**Keywords:** carbofuran; micronucleus; SCGE; genotoxicity

克百威(carbofuran, 2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃基-甲基氨基甲酸酯)是一种常用的氨基甲酸酯类杀虫剂, 虽然已被严禁在蔬菜生产中使用, 但由于其杀虫效果好而屡禁不止, 造成的中毒事件也比较严重。克百威在酸性环境中稳定, 但在碱性介质下分解较快, 产物主要有呋喃酚(carbofuranphenol)、3-羟基呋喃丹(3-hydroxycarbofuran)、3-酮基呋喃丹(3-ketocarbofuran)等, 亚硝基呋喃丹(nitrosocarbofuran)是克百威和亚硝酸盐在强酸性条件下生成的产物, 虽不是其主要代谢产物, 但是该物质对人体健康的影响引人注目<sup>[1,2]</sup>。国内外对

于克百威的毒性研究较多较早<sup>[3-5]</sup>, 但对其代谢产物尤其是亚硝基呋喃丹的毒性研究很少, 且主要集中于杀虫机制、环境残留及细胞水平的毒性研究。

微核试验是一种公认的对致突变物进行初步筛选的方法, 单细胞凝胶电泳(SCGE), 亦称彗星试验(comet assay), 由 Ostling 和 Johanson<sup>[6]</sup> 提出后经 Singh<sup>[7]</sup> 等改进而广泛应用, 是一种在分子水平上检测外源化学物对单个细胞 DNA 损伤的技术, 近年来, 被广泛地应用于检测各种理化因素对细胞 DNA 损伤和修复<sup>[8,9]</sup>。本文主要采用上述两种方法对克百威及其代谢产物首次进行分子毒理分析研究, 为正确评价克百威的环境毒性提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 受试物

克百威(纯度 99.5%, 国家农药质量监督检验中

收稿日期: 2003-05-23

基金项目: 上海市科委对外合作项目(023407016)

作者简介: 刘宝峰(1979—), 女, 硕士生, 主要研究方向为农药分子毒理。

联系人: 陆贻通, E-mail: ytlu@mail.sjtu.edu.cn

心提供); 呋喃酚 (纯度 99.2%, 江苏铜山农药厂提供); 3-酮基呋喃丹、3-羟基呋喃丹 (纯度 99.5%, 农业部环境保护科研监测所提供); 亚硝基呋喃丹 (纯度 98.6%, 浙江化工研究院合成)。各受试物均以二甲亚砜(DMSO)溶解, DMSO 终浓度为 1%。

## 1.2 试剂与仪器

低熔点琼脂糖 (LMA Gibco); 普通熔点琼脂糖 (NMA Biowest); Triton X-100、RPMI1640(Gibco); 台盼蓝、环磷酰胺、Tris(Sigma); DMSO(Amresco); Sybr-Green(Biotium); 其他试剂为国产分析纯; 电泳仪 (DYY-6C 双稳定时电泳仪); 普通光学显微镜 (Olympus BH-2); 荧光显微镜 (Olympus BX60F-3)。

## 1.3 试验动物

KM 种普通级健康小鼠 (体重 25~30 g), 由中国科学院上海分院实验动物繁育基地提供。

## 1.4 试验方法

### 1.4.1 微核实验

将实验动物随机分组, 每组 8~10 只 (见表 1), 雌雄各半, 包括一个溶剂对照组和一个阳性对照组, 各受试物均以 0.1、0.2、0.4 mg·kg<sup>-1</sup> 3 个剂量组进行腹腔注射, 24 h 后以同样剂量二次注射, 于第一次注射后 30 h 处死动物, 按照文献 [10] 方法取胸骨骨髓, 涂片, 以姬姆萨染液染色, 冲洗后干燥, 选择细胞分散、形态完整、染色良好、背景清晰的嗜多染红细胞 (PCE) 在油镜下观察计数。每只动物计数 1 000 个 PCE, 统计微核细胞率, 数据统计采用 *t* 检验。

### 1.4.2 彗星实验

小鼠肝素化全血以等体积淋巴细胞分离液分离淋巴细胞层, 以 RPMI1640 培养液洗涤两次, 台盼蓝染色显示细胞存活率大于 90%, 所得细胞立即用于实验。分离的淋巴细胞培养于 RPMI1640 完全培养液中并加入受试物, 对各受试物各设 3 个染毒剂量, 克百威和 3-酮基呋喃丹为 10、50、200 μg·mL<sup>-1</sup>; 呋喃酚为 100、500、2 000 μg·mL<sup>-1</sup>; 3-羟基呋喃丹和亚硝基呋喃丹为 0.1、1、10 μg·mL<sup>-1</sup>, 混匀后 37℃ 恒温染毒 1 h, 染毒期间不定时用滴管混匀细胞, 染毒完毕离心收集细胞, 调整细胞浓度为 10<sup>6</sup> 个·mL<sup>-1</sup>, 用于 SCGE 分析。

按文献 [11] 方法取 110 μL 0.6% NMA 浇注到磨砂载玻片上铺第一层胶并置室温 2 min 使其凝固; 以下步骤均在弱光条件下进行, 取约 10 μL 细胞悬液与 75 μL 37℃ 0.6% LMA 混合, 将细胞混悬液加到第一

层琼脂糖上, 置 4℃ 冰箱 5 min 固化; 将 75 μL 0.5% LMA 作为第三层加上, 固化 5 min 后浸入新配细胞消化液 (100 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>-EDTA, 2.5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris, pH10, 用前加新配 1% Triton X-100 和 10% DMSO, 冷藏 30 min) 中, 置 4℃ 过夜后取出, 并列置于水平凝胶电泳槽的阳极端, 加入新配制电泳缓冲液应用液 (300 mmol·L<sup>-1</sup> NaOH, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA), 使液面完全覆盖载玻片, 在碱性缓冲液中放置 30 min 使 DNA 充分解旋, 然后室温电泳 20 min (25V, 300 mA), 电泳完毕后用中和缓冲液 (0.4 mol·L<sup>-1</sup> Tris, pH7.4) 冲洗两次, 每次 5 min, 晾干, 用 50 μL 0.01% SybrGreen 避光染色 30 min, 盖上盖玻片, 在荧光显微镜下 200 倍观察计数, 每组随机观察 50 个细胞, 测定 DNA 迁移 (即彗星尾) 长度。

## 2 结果与分析

### 2.1 克百威及其代谢产物对小鼠骨髓 PCE 的微核效应

克百威及其代谢产物对小鼠骨髓 PCE 的微核效应结果见表 1。结果表明, 克百威、呋喃酚和 3-酮基呋喃丹在受试剂量范围内各组微核细胞率与溶剂组比较无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 提示其无明显细胞毒性。3-羟基呋喃丹在中低剂量时无明显微核效应, 但高剂量组有微核效应 ( $P < 0.05$ )。亚硝基呋喃丹诱发微核率随剂量增加而增加, 低剂量组与溶剂组有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 而中高剂量组具极显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 组间对照发现中低剂量组间无显著差异, 但与高剂量组均差异极显著, 有细胞毒性。

### 2.2 克百威及其代谢产物对小鼠外周血淋巴细胞 DNA 的损伤

克百威和呋喃酚各剂量组引起的 DNA 损伤均不明显, 与溶剂对照组相比无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 3-酮基呋喃丹 3 个剂量组 DNA 损伤所引起的彗尾长分别为 6.65、8.56、11.02, 与溶剂对照组 (0.67) 相比差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 不同剂量组组间比较无明显差别; 3-羟基呋喃丹和亚硝基呋喃丹在中低剂量时无 DNA 损伤效应, 但高剂量组显示明显 DNA 损伤效应, 引起的 DNA 损伤程度明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 亚硝基呋喃丹引起 DNA 迁移程度随剂量增加而提高, 与溶剂对照组相比较, 低剂量组无显著差别, 中剂量组有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 而高剂量组则有极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 各组之间有极显著差异。

### 2.3 克百威及其代谢产物的 DNA 损伤

表 1 克百威对小鼠骨髓细胞微核率的影响

Table 1 Micronuclei formation induced by carbofuran and its metabolites

项目	浓度/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	动物数	计数细胞数	微核数	微核率/ $\%$
溶剂对照	0	10	1 000 × 10	9	0.90 ± 1.20
克百威	0.1	10	1 000 × 10	10	1.00 ± 1.05
	0.2	10	1 000 × 10	13	1.30 ± 0.95
	0.4	10	1 000 × 10	13	1.30 ± 0.82
	0.1	8	1 000 × 8	22	2.75 ± 1.28
呋喃酚	0.2	8	1 000 × 8	25	3.12 ± 2.23
	0.4	8	1 000 × 8	26	3.25 ± 2.12
	0.1	8	1 000 × 8	21	2.62 ± 1.92
3-酮基呋喃丹	0.2	8	1 000 × 8	25	3.12 ± 1.73
	0.4	8	1 000 × 8	29	3.62 ± 1.85
	0.1	8	1 000 × 8	20	2.50 ± 1.06
3-羟基呋喃丹	0.2	8	1 000 × 8	31	3.88 ± 2.23
	0.4	8	1 000 × 8	56	7.00 ± 2.39**
	0.1	8	1 000 × 8	29	3.62 ± 1.06*
亚硝基呋喃丹	0.2	8	1 000 × 8	40	5.00 ± 1.60**
	0.4	8	1 000 × 7***	55	7.85 ± 1.57**
	阳性对照 (CP)	40	10	1 000 × 10	328

注: \* 为  $P < 0.05$ , 差异显著; \*\* 为  $P < 0.01$ , 差异极显著; \*\*\* 为试验过程中小鼠死亡 1 只。

表 2 克百威及其代谢产物对小鼠淋巴细胞 DNA 的损伤

Table 2 DNA migration induced by carbofuran and its metabolites

项目	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	细胞数	DNA 迁移/ $\mu\text{m}$
溶剂对照	0	50	0.67 ± 1.43
克百威	10	50	1.37 ± 2.33
	50	50	1.13 ± 2.82
	200	50	0.43 ± 1.83
	100	50	0.19 ± 0.61
呋喃酚	500	50	1.00 ± 2.55
	2 000	50	0.82 ± 1.62
	10	50	6.65 ± 9.40**
3-酮基呋喃丹	50	50	8.56 ± 11.72**
	200	50	11.02 ± 9.34**
	0.1	50	0.88 ± 1.36
3-羟基呋喃丹	1	50	1.20 ± 2.97
	10	50	2.32 ± 3.53*
	0.1	50	0.19 ± 0.52
亚硝基呋喃丹	1	50	0.80 ± 1.42
	10	50	6.51 ± 8.30**

注: \* 为  $P < 0.05$ , 差异显著; \*\* 为  $P < 0.01$  差异极显著。

染色后在荧光显微镜下观察,未受损细胞表现为—圆形荧光核心,即彗星头部,没有尾巴,荧光强度均匀,边缘整齐;而受损细胞有彗星尾从核中伸向阳极,形成一个亮的荧光头部和尾部。根据拖尾中 DNA 量的多少对 DNA 损伤程度进行人工分级,分级标准为:无损伤(0 级)、轻微损伤(1 级)、中度损伤(2 级)、严重损伤(3 级)。不同受试物引起的小鼠外周血淋巴细胞 DNA 损伤分级计数结果如图 1。

如图 1 所示,对于克百威和呋喃酚,各不同剂量组无损伤细胞基本成一直线,无明显的变化,甚至在克百威高剂量组反而比低剂量和溶剂对照组的数量要高,中度损伤和严重损伤细胞数量极小,可以忽略。其他 3 种受试物均可见到无损伤细胞数量的明显下降。3-酮基呋喃丹伴随着无损伤细胞曲线的下降其他 3 种细胞都有上升的趋势,且与其他物质的作用效果相比中度损伤和严重损伤的细胞数量明显增多,剂量提高引起细胞损伤显著加重。3-羟基呋喃丹、亚硝基呋喃丹在无损伤细胞数有明显梯度下降时轻微损伤细胞数有明显的上升。

### 3 讨论

以微核细胞率为观察指标时,主要影响因素为给药剂量,微核效应符合一般剂量反应关系。本试验过程中剂量的选择以克百威  $\text{LD}_{50}$  为参照,选择其 1/20、1/10、1/5 剂量组,其代谢产物也参照该数值,对于呋喃酚和 3-酮基呋喃丹在试验剂量范围内无明显微核效应,同时设定更高剂量组,结果依然与溶剂对照组无显著差异,故可认为试验结果是可靠的。在彗星试验中采用肉眼观察测定尾长以及人工判断 DNA 损伤分级来推测细胞毒性的方法,虽然人工判断主观性强,精确度不够,但是简便易行,具有实用性,且有人工计数彗星尾频数与计算机测量彗星尾 DNA 泳动量结果比较完全一致的报道<sup>[12]</sup>。所以虽然有研究指出

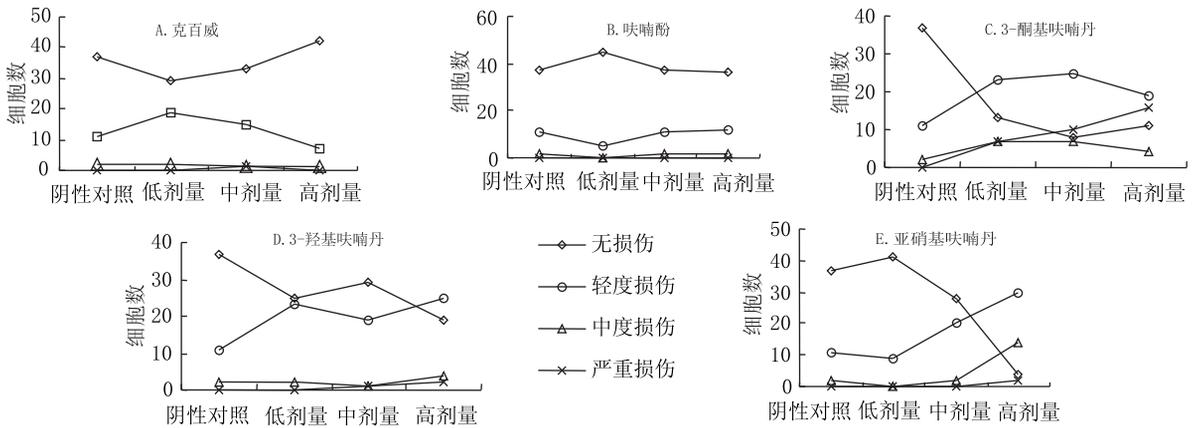


图 1 克百威及代谢物 DNA 损伤分级图

Figure 1 DNA migration degree induced by carbofuran and metabolites

彗星长度不适用于剂量 - 反应关系的确定, 而最好用面积或者尾部荧光强度做判断, 但我们认为该方法仍然具有可行性。

两种不同研究方法对于克百威及其代谢物的遗传毒性研究结果相似, 克百威和最主要的代谢产物呋喃酚都没有明显的细胞毒性, 而 3-羟基呋喃酚和亚硝基呋喃酚在动物体内体外都具有强烈的细胞损伤毒性。值得注意的是 3-酮基呋喃酚, 虽无体内致微核效应, 却对细胞有严重的 DNA 损伤作用。3-酮基呋喃酚大鼠经口 LD<sub>50</sub> 为 108(雄性) 和 93.1(雌性) mg · kg<sup>-1</sup>, 其急性毒性明显低于母体克百威 (11 mg ·

kg<sup>-1</sup>) 及 3-羟基呋喃酚 (雄性 21.9 mg · kg<sup>-1</sup>、雌性 8.3 mg · kg<sup>-1</sup>), 但对体外细胞毒性却很大。推测是由于在体内代谢酶存在时, 3-酮基呋喃酚直接转化为毒性极小的酚类(呋喃酚、3-羟基呋喃酚、3-酮基呋喃酚的 LD<sub>50</sub> 分别为 2 450、1 916 和 800 mg · kg<sup>-1</sup>), 而 3-羟基呋喃酚的代谢物为对细胞直接毒性极大的 3-酮基呋喃酚和酚(如图 2), 故相对比较 3-羟基呋喃酚的体内毒性较强。

一般认为克百威及其他氨基甲酸酯类杀虫剂对人和动物遗传毒性极小, 本试验发现虽然克百威本身无毒害作用, 其代谢产物却可能有遗传毒性, 仍需引

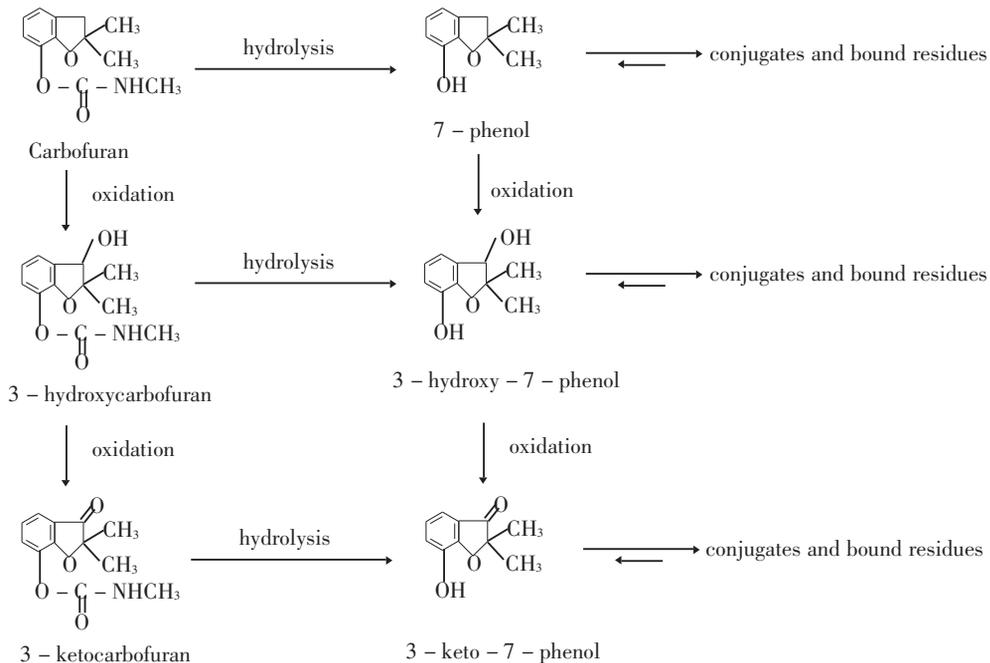


图 2 克百威主要代谢途径(E. Bosshard)

Figure 2 Major metabolic pathway of carbofuran

起注意。关于克百威代谢产物对 DNA 损伤的机制目前尚无十分明确的研究。亚硝胺类物质是强烈的致癌物,通过细胞色素 P450 催化生成活化的中间产物与 DNA 结合致癌。另一种氨基甲酸酯类农药西维因的亚硝基产物亚硝基西维因 (nitrosocarbaryl) 具有致癌性和致突变性<sup>[13、14]</sup>,亚硝基残杀威 (Nitrosopropoxur) 诱导 GC-AT 碱基对的置换而引起基因突变<sup>[15]</sup>,故结合目前研究结果推测亚硝基呋喃丹也可能具有致癌致突变性。有研究发现亚硝基呋喃丹可诱导 CHL 细胞凋亡<sup>[1]</sup>,认为其原因是发生 O<sup>6</sup>-MeG 加合,但是一般认为 O<sup>6</sup>-MeG 加合物是前诱变剂,可诱导肿瘤发生,且该试验中所用 CHL 细胞株本身具有较高 P53 表达水平而易引发细胞凋亡抑制细胞增殖,所以对于该物质在体内是引起细胞凋亡还是具有致癌性还需进一步研究探讨。亚硝基呋喃丹不是克百威的主要代谢产物,但在胃内酸性条件下有亚硝基物质存在时可生成<sup>[16]</sup>。亚硝酸盐是人胃液中的自然组成物质,而亚硝酸钠被广泛用作食品添加剂,而克百威由于其应用的广泛性在环境和食物中残留也较多,所以不可忽视该种物质在胃中内源性形成的可能性。

#### 参考文献:

- [1] Ji - Young Yoon, Seon - Hee Oh, Su - Mi Yoo, et al. N - Nitrosocarbonyl, but not Carbofuran, induces apoptosis and cell cycle arrest in CHL cells[J]. *Toxicology*, 2001, 169(2): 153 - 161.
- [2] Nelson J, MacKinnon E A, Mower H F, et al. Mutagenicity of N - nitroso derivatives of carbofuran and its toxic metabolites[J]. *J Toxicol Environ Health*, 1981, 7(3 - 4): 519 - 531.
- [3] 徐 赫. 呋喃丹致畸性研究[J]. *环境科学研究*, 1989, 2(1): 27 - 29.
- [4] Ferguson P W, Dey M S, Jewell S A, et al. Carbofuran metabolism and toxicity in the rat[J]. *Fundamental and Applied Toxicology*, 1984, 4(1): 14 - 21.
- [5] Public health goal for chemicals in drinking water: carbofuran[M]. California Environmental Protection Agency, 2000, 8.
- [6] Ostling R N, Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 123: 291 - 298.
- [7] Singh N P, Mecoy M T, Tice B R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. *Experimental Cell Research*, 1988, 175: 184 - 191.
- [8] 封少龙, 罗 屿, 钟 远, 等. 应用单细胞凝胶电泳技术测定农药对蚯蚓的 DNA 损伤[J]. *南京大学学报*, 2000, 36: 649 - 652.
- [9] Vigueux C, Doull J M, Deslandes E, et al. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells[J]. *Mutation Research*, 1998, 419: 79 - 90.
- [10] GB15670—1995, 农药登记毒理学试验方法[M]. 北京: 1995.
- [11] 秦椿华. 化学物致突变致癌检测技术[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技出版社, 1996.
- [12] 李达圣, Kanehisa Morimoto, Tatsuya Takeshita, 等. 应用单细胞凝胶电泳比较研究砷对人类细胞 DNA 的损伤[J]. *中国地方病学杂志*, 2001, 20(3): 212 - 216.
- [13] Wang T C, Chiou C M, Chang Y L. Genetic toxicity of N - methylcarbamate insecticides and their N - nitroso derivatives[J]. *Mutagenesis*, 1998, 13(4): 405 - 408.
- [14] Lijinsky W, Schmaehl D. Carcinogenicity of N - nitroso derivatives of N - methylcarbamate insecticides in rats[J]. *Ecotoxicol Environ Safety*, 1978, 2(3 - 4): 413 - 419.
- [15] Wang T C, Chiou J M, Chang Y L, et al. Genotoxicity of propoxur and its N - nitroso derivative in mammalian cells[J]. *Carcinogenesis*, 1998, 19: 623 - 629.
- [16] Robert W R, Gerd W E, et al. Importance of pH in assessing the potential for nitrosocarbamate formation in the stomach[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1982, 8: 325 - 333.