

有机磷农药遗传毒性研究

Progress of the studies on the genotoxicity of organophosphorus pesticides

程晓洁, 汝少国

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

中图分类号: S482

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)09-0088-05

有机磷农药是国内生产和使用最多的一类农药, 生产量占全国农药总产量的一半以上。由于其杀虫范围广、毒性较小等特点, 在农业病虫害防治上被广泛使用, 但也对环境造成了严重的污染^[1]。一般在喷施液体农药时, 仅有 20 % 左右附着在植物上, 1 %~4 % 接触到害虫, 其余 40 %~60 % 落到土壤, 5 %~30 % 的药剂漂浮于空气中, 产生大气污染, 大气中的农药又可通过降水返回陆地。这些残留的农药通过食物链进入生物体, 当达到一定剂量时, 就可能造成生物体染色体畸变或 DNA 损伤, 而遗传物质的改变是致癌、致畸的主要原因。国际癌症研究中心(IARC)已将几种有机磷农药, 如敌敌畏、马拉硫磷、甲基对硫磷、敌百虫归类为可能或可疑的对人致癌物^[2]。因此, 对有机磷农药遗传毒性的研究越来越受到关注, 作者综述了近几年有机磷农药的遗传毒性研究进展。

1 有机磷农药遗传损伤的类型

1.1 基因突变

有机磷农药可以导致基因内部 DNA 序列的改变, 引起一定的表型变化。Sukran 等^[3]在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)体细胞突变与重组试验(SMART 试验)中发现, 暴露在不同浓度的甲基对硫磷、甲基吡啶磷、敌敌畏和二嗪农条件下, 可以导致黑腹果蝇三期幼虫两个遗传标记位点 *mwh* 和 *flr* 的交叉杂合, 在表型上观察到果蝇翅膀大小和形状的突变。具有类似阳性结果的有机磷农药有: 甲基

毒死蜱、乐果、亚胺硫磷、乙酰甲胺磷、甲基对硫磷等^[4-6]。

1.2 染色体损伤

有机磷农药导致的染色体损伤主要包括染色体的畸变、姐妹染色单体交换(SCE)和微核(MN)的形成。Das^[7]发现绿亚丽鱼(*Etroplus suratensis*)暴露在一定浓度的甲基对硫磷情况下, 96 h 后能够诱发鱼鳃细胞产生 SCE, 并且其鳃细胞的染色体畸变率与对照相比显著增加。Zahran 等^[8]报道久效磷可以导致雄性小鼠, 怀孕小鼠及其胚胎细胞的染色体畸变, 血浆的蛋白含量、肝脏的 DNA、RNA 含量和胆碱酯酶的下降, 谷氨酰转移酶活性的升高, 表明久效磷具有遗传毒性, 并导致机体的生化指标改变。Wang 等^[9]研究发现敌百虫、久效磷、敌敌畏、乙酰甲胺磷可以显著诱发中国仓鼠(*Phodopus griseus*)卵巢细胞(CHO 细胞)SCE 的产生, 并导致染色体的畸变。Jena 等^[10]发现鸡在久效磷暴露 24 h 后, 骨髓和外周血的红细胞中微核率显著增加。Tolga 等^[11]研究发现草甘膦能够导致金鱼(*Carassius auratus*)外周血细胞微核率的剂量依赖性增长, 具有潜在的遗传毒性。

收稿日期: 2008-03-31; 修回日期: 2008-05-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30200211, 30671618)

作者简介: 程晓洁(1983-), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生, 研究方向: 生态毒理学, E-mail: chengjie17360@163.com; 汝少国, 通讯作者, 教授, 博士, 电话: 0532-82031962, E-mail: rusg@ouc.edu.cn

1.3 DNA 损伤

有机磷农药导致 DNA 损伤的类型主要有碱基的损伤和 DNA 链的断裂,碱基的损伤对生物个体而言后果最严重,而且能转变成 DNA 链的断裂。Saleha 等^[12]发现久效磷纯品能够引起莫桑比克罗非鱼(*Tilapia mossambica*)外周血红细胞 DNA 链断裂,具有剂量依赖效应,其暴露 24 h 后,外周血 DNA 损伤升高并达到峰值,随着暴露时间的延长损伤逐渐下降,暴露 96 h,莫桑比克罗非鱼外周血 DNA 损伤减轻至对照水平,推测损伤的减轻可能是由于 DNA 的修复。Undeger 等^[13]研究发现乐果和甲基对硫磷在 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下,显著增加了人外周血淋巴细胞 DNA 的链断裂。另外,毒死蜱、乙酰甲胺磷、马拉硫磷、甲基对硫磷等也能诱导 DNA 链断裂^[14]。

2 有机磷农药遗传毒性检测方法

2.1 DNA 链断裂检测方法

单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis, SCGE) 又称彗星电泳(comet assay),是一种检测有核细胞 DNA 损伤的技术。彗星电泳由于其灵敏、简便、快速等优点在毒理研究中被广泛应用,但早期的彗星图像多采用人工分析的方法进行 DNA 损伤评估,主要有彗星尾长和损伤分级。Saleha 等^[12]用碱性彗星电泳研究久效磷对莫桑比克罗非鱼的遗传毒性试验中,采用尾长(即 DNA 迁移的长度)来评估 DNA 的损伤,试验发现久效磷可以造成彗星尾长的显著增加,具有潜在的遗传毒性效应。Tolga 等^[11]采用碱性彗星电泳研究草甘磷对金鱼 DNA 损伤中,采用对损伤分级的评估方法,根据目测彗尾的长度把彗星图像分为 0 级(无损伤)、1 级(轻度损伤)、2 级(中度损伤)、3 级(重度损伤)、4 级(完全损伤),将 100 个细胞的分值加在一起表示 DNA 的损伤程度。

随着彗星电泳的发展,彗星图像分析软件能进一步分析一些无法用肉眼测量的指标,如通过测定彗星尾部的荧光强度、尾部长度等参数,计算 OTM 值(Olive 尾矩,即彗星头部重心和尾部重心之间的距离与尾部 DNA 含量的乘积),TM 值(即尾部 DNA 含量乘以尾长),二者能更好地定量反映 DNA 损伤。Sushila 等^[15]用彗星电泳研究敌敌畏导致 CHO 细胞 DNA 链断裂中,采用 OTM 值、尾部 DNA 含量和

尾长来评估 DNA 的损伤,试验采用的 3 个指标具有很好的相关性,结果表明敌敌畏造成了 CHO 细胞显著的 DNA 损伤。

2.2 荧光原位杂交技术

荧光原位杂交(FISH)是一种高度灵敏、特异性好、分辨率强的染色体和基因分析技术。FISH 已成为广泛应用于检测细胞染色体从断裂、易位、成环及重组等细小、复杂的结构畸变以及微核的来源。Padungtod 等^[16]在对有机磷杀虫剂工厂工人精子非整倍体研究中,通过使用三色荧光原位杂交试验,检测出染色体特异性的畸变位点是染色体 18 和 3 种不同种类的性染色体的二倍性。暴露于杀虫剂的工人的非整倍体比例为 0.30%,而对照工人的非整倍体比例为 0.19%,结果表明,暴露在有机磷杀虫剂下能够增加精子非整倍体的水平。

2.3 RAPD 技术

RAPD(random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术,通常它以 10 碱基的寡核苷酸序列为引物,对基因组 DNA 随机扩增来鉴别多态性 DNA 的过程。如基因组 DNA 序列发生改变而使特定结合位点分别发生变化,将导致 PCR 产物的改变和电泳图谱特性的变化。王硕治等^[17]研究发现 1,10 nmol/L 久效磷暴露条件下,海洋线虫(*Chromadorina* sp.)子一代 DNA 的 RAPD 图谱与对照相比多态性明显发生变化,表现为某些特异条带的增加和消失以及条带的亮度差异。RAPD 技术主要优点在于快速,适用于多种生物、多种 DNA 异常,例如断裂、生成加合物、嘧啶二聚体、引物结合位点突变等。但该项技术只能定性评价影响效应,且生物体正常水平的基因表达,基因变异、代谢都会使 RAPD 图谱发生变化。

3 有机磷农药遗传毒性机制研究

3.1 氧化损伤

大量研究表明有机磷农药能引起机体的氧化损伤,而氧化损伤可引发生物细胞内大分子的损伤,其中 DNA 是氧自由基攻击的重要靶目标。有机磷农药如磷胺、敌百虫、敌敌畏等,在体内和体外研究中都可以产生氧化压力,表现为 SOD 活性的抑制,丙二醛产量的增加等^[18]。Sharma 等^[19]报道有机磷农药乐果可以增加大鼠肝和脑组织中自由基的量,并诱导增加了抗氧化酶和自由基清除剂

含量。在体外实验中乙烷基毒死蜱导致了红细胞中过氧化脂质^[20]。Ranjbar 等^[21]研究发现有机磷杀虫剂工厂工人表现出更多的氧化压力, 主要由于红细胞的过氧化脂质的增多和抗氧化能力的减弱。另外, 也与氧化损伤与染色体的交联^[22], DNA 链断裂^[23], DNA 碱基氧化^[24], 染色体异常^[25]等有关。Pina 等^[26]发现给小鼠喂食甲基对硫磷后, 小鼠精子发生了染色质结构改变和 DNA 损伤, 并与氧化应激密切相关。Bagchi 等^[27]研究发现毒死蜱和对硫磷可以导致 SD 大鼠肝和脑组织脂质过氧化水平和 DNA 损伤的显著增加。Yu 等^[28]在毒死蜱对鼠视网膜损伤的研究中发现, 毒死蜱可以造成细胞凋亡、脂质过氧化、DNA 损伤的增加, 而维生素 C 和维生素 E 可以减轻这种损伤。

有机磷农药引起机体 DNA 的氧化损伤可能通过两条途径: 一是有机磷农药在细胞色素 P450 酶系作用下将—P=S 键转化为—P=O, 后者在氧化还原循环中很容易获得一个电子并将电子转移给氧分子生成超氧阴离子自由基, 超氧阴离子还可进一步转变为其他自由基如羟自由基($\cdot\text{OH}$)^[29]。Bondy^[30]在 1994 年研究发现细胞色素 P450 酶系促使有机磷农药转化为它们的氧化产物, 能够导致肝脏和其他组织中活性氧的产生。另一条途径是由于机体抗氧化能力减弱而引起氧化-抗氧化稳态失衡^[31], 非酶性抗氧化物质如维生素 E、维生素 C 可以改善这种失衡状态, 减轻遗传物质损伤, 维生素 E、过氧化氢酶可降低马拉硫磷对 DNA 的损伤^[32]。

3.2 烷基化

虽然大量的研究表明有机磷农药导致 DNA 损伤主要是由于氧化压力造成的, 但也有不少研究认为有机磷农药导致 DNA 的损伤是通过烷基化作用, 因为有机磷农药多数带有 2 个甚至 3 个烷氧基团, 可以提供烷基与 DNA 或蛋白质发生烷基化。

有机磷农药由于其烷基化对象不同主要有两种机制。一方面有机磷农药可以提供烷基与 DNA 发生烷基化, Dedek 等^[33]报道有机磷农药如乐果等暴露条件下可以造成大鼠肝脏和肾脏 DNA 的烷基化。Mehl 等^[34]发现敌百虫和敌敌畏可致豚鼠(*Cavia porcellus*)小脑颗粒细胞 DNA 烷基化, 并明显抑制烷基转移酶的活性, 使烷基化损伤不能及时修复。有机磷农药也可能成为多官能团烷化剂, 使 DNA

双链间碱基同时烷基化, 形成交联作用^[35], 使得 DNA 不能进行复制和转录, 严重时可能造成细胞死亡^[36]。另一方面, 有机磷农药还可以攻击其它组分, 如蛋白质。有报道表明有机磷农药能烷化鱼精蛋白, 使精子染色质结构改变并最终导致 DNA 损伤^[37]。烷基化常使 DNA 与蛋白质之间发生交联, 交联后的 DNA 链不易修复或发生易错修复, 因而致突变性较高。

3.3 磷酸化

Wild^[38]报道在有机磷农药的共同结构式中, 具有亲电性的磷原子可攻击生物大分子 DNA 的亲核部位, 通过 P—O 键断裂后的磷酸化而诱发突变, 但倪祖尧等^[39]在用计算机辅助分子片断评价程序分析有机磷化合物诱发沙门氏菌回复突变资料的研究中发现, 有机磷农药的磷酸化并不加强或直接诱发突变。Pina 等^[40]发现, 在单次给予小鼠二嗪农染毒 8 d 后, 小鼠精子鱼精蛋白丝氨酸残基发生磷酸化, 精子染色质结构改变并有明显的 DNA 损伤, 且这两者有很好的相关性, 说明二嗪农对精子的诱变性很可能是通过磷酸化核鱼精蛋白使其不能辅助精子细胞染色质完成正常的凝集; 由于缺乏核碱性蛋白的正常保护, DNA 磷酸骨架易于受到外源性和内源性损伤因子攻击, 从而诱发了 DNA 损伤。

4 展望

目前, 关于有机磷农药遗传毒性的作用机制还未得到一致结论。关于有机磷农药分子机制中的氧化损伤, 可以从检测有机磷农药导致 DNA 损伤的类型、DNA 氧化碱基的量、机体抗氧化酶系的变化、DNA 氧化损伤修复酶等多个角度加以考证。同时还可以应用分子生物学的理论和技术揭示有机磷农药毒性的分子机制。如荧光原位杂交可以与彗星电泳相结合(Comet-FISH), 把荧光标记的与特异 DNA 序列杂交的 DNA 探针应用于彗星电泳。把彗星电泳的简便、快速与荧光原位杂交试验的特异性相结合, 对于进一步研究特定基因的损伤和修复将会有更大的潜力。

另外, 建立快速有效检测遗传毒性物质的筛选体系, 开发检测农药遗传毒性的敏感的、生物标志物, 以筛选目前使用的农药。鉴于新开发的农药都是多元混剂, 所以有必要建立和完善环境遗传毒性

物质的监测方法，加强对未知新开发农药的监测。

参考文献:

- [1] 杨景辉. 土壤污染与防治[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 290-291.
- [2] Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies[J]. **Mutation Research**, 2003, **543**(3): 251-272.
- [3] Sukran C, Rabia S. Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the *Drosophila* wing spot test[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2005, 43: 443-450.
- [4] 刘玉清, 胡渝华, 周谷, 等. 有机磷农药在DNA重组修复试验中的诱变性研究[J]. 现代预防医学, 1996, **23**(2): 117-120.
- [5] Moriya M, Ohta T, Watanabe K, *et al.* Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems [J]. **Mutat Res**, 1983, **116** (3-4): 185-216.
- [6] Cho T H, Wild J R, Donnelly K C. Utility of organophosphorus hydrolase for the remediation of mutagenicity of methyl parathion[J]. **Environ Toxicol Chem**, 2000, **19** (8): 2 022-2 028.
- [7] Das P, John G. Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in vivo in *Etroplus suratensis* (Bloch) following exposure to organophosphorus pesticides[J]. **Toxicol Lett**, 1999, **104**(1/2): 111-116.
- [8] Zahran M M, Abdel A K B, Abdel R A, *et al.* The effect of subacute doses of organophosphorus pesticide, nuvacron, on the biochemical and cytogenetic parameters of mice and their embryos[J]. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, 2005, 1(3): 277-283.
- [9] Wang T C, Lin C M, Lo L W. Genotoxicity of methoxyphosphinyl insecticide in mammalian cells[J]. **Zool Stud**, 2003, **42**(3): 462-469.
- [10] Jena B. Mutagenicity of an organophosphate insecticide acephate-an in vivo study in chicks[J]. **Mutagenesis**, 1994, 9: 319-324.
- [11] Tolga C, Serpil K. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay[J]. **Mutagenesis**, 2007, 12: 1-6.
- [12] Saleha B B, Danadevi K, Rahman M F, *et al.* Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay[J]. **Food Chem Toxicol**, 2001, **39**(4): 361-366.
- [13] Undeger U, Basaran N. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage[J]. **Arch Toxicol**, 2005, 79: 169-176.
- [14] Rahman M F, Mahboob M, Danadevi K, *et al.* Assessment of genotoxic effects of chloropyriphos and acephate by the comet assay in mice leucocytes[J]. **Mutation Research**, 2002, 516: 139-147.
- [15] Sushila Patel, Mahima Bajpayee, Alok Kumar Pandey, *et al.* In vitro induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos[J]. **Toxicology in Vitro**, 2007, 21: 1 409-1 418.
- [16] Padungtod C, Hassold T J, Elise Millie, *et al.* Spermatogenic aneuploidy among Chinese pesticide factory workers: Scoring by the FISH method[J]. **American Journal of Industrial Medicine**, 1999, **36**(2): 230-238.
- [17] 王硕治. 久效磷对自由生活海洋线虫 *Chromadorina* sp. 的亚致死毒性效应研究[D]. 中国海洋大学研究生学位论文, 2008.
- [18] Domenech C E, Machado de Domenech E E, Balegno H F, *et al.* Pesticide action and membrane fluidity. Allosteric behavior of rat erythrocyte membrane-bound acetylcholinesterase in the presence of organophosphorous compounds[J]. **FEBS Lett**, 2000, 74: 243-246.
- [19] Sharma Y, Bashir S, Irshad M, *et al.* Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats[J]. **Toxicol**, 2005, 206: 49-57.
- [20] Gultekin F, Ozturk M, Akdogan M. The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro)[J]. **Arch Toxicol**, 2000, 74: 533-538.
- [21] Ranjbar A, Pasalar P, Abdollahi M. Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers[J]. **Hum Exp Toxicol**, 2002, 21: 179-182.

- [22] Nackerdien Z , Rao G , Cacciuttolo M A , *et al.* Chemical nature of DNA-protein cross-links produced in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of iron or copper ions[J]. **Biochemistry**, 1991, 30: 4 873-4 879.
- [23] Hughes C M , Lewis S E , McKelvey-Martin V J , *et al.* A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay[J]. **Mol Hum Reprod** , 1996, 2: 613-619.
- [24] Dizdaroglu M , Nackerdien Z , Chao B C , *et al.* Chemical nature of in vivo DNA base damage in hydrogen peroxide-treated mammalian cells[J]. **Arch Biochem Biophys**, 1991, 285: 388-390.
- [25] Emerit I. Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis[J]. **Free Radical Biol Med**, 1994, 16: 99-109.
- [26] Pina-Guzman B , Solis-Heredia M J , Rojas-Garcia A E , *et al.* Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidative stress[J]. **Toxicol Appl Pharm**, 2006, 216: 216-224.
- [27] Bagchi D , Bagchi M , Hassoun E A , *et al.* In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides [J].**Toxicology**, 1995, 104: 129-140.
- [28] Fu Yu, Ziren Wang, Bao Ju, *et al.* Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E[J]. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 2008, 59: 415-523.
- [29] Kovacic P. Mechanism of organophosphates (nerve gases and pesticides) and antidotes: electron transfer and oxidative stress[J]. **Curr Med Chem**, 2003, 10: 2 705-2 709.
- [30] Bondy S C , Naderi S. Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species [J]. **Biochem Pharmacol**, 1994, 48: 155-159.
- [31] Vidyadagar J , Karunakar N , Reddym S , *et al.* Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning[J]. **Indian J Pharmacol**, 2004, 36(2): 76-79.
- [32] Blasiak J , Jalszynski P , Trzeciak A , *et al.* In vitro studies on the enotoxicity of the rganophosphorus insecticide malathion and its two analogues[J]. **Mutation Research**, 1999, 445(2): 275-283.
- [33] Dedek W , Grahl R , Schmidt R. A comparative study of guanine N7-alkylation in mice in vivo by the organophosphorus insecticides trichlorphon, dimethoate, phosmet and bromophos[J]. **Acta Pharm Toxicol**, 1984, 55(2): 104-109.
- [34] Mehl A , Rolseth V , Gordon S. Brain hypoplasia caused by exposure to trichlorfon and dichlorvos during development can be ascribed to DNA alkylation damage and inhibition of DNA alkyltransferase repair[J]. **Neurotoxicol**, 2000, 21(122): 165-173.
- [35] 孙运光. 有机磷农药的遗传毒性研究[J]. 国外医学卫生学分册, 2000, 27(6): 349-352
- [36] 谈伟君, 王心如, 徐锡坤. 八氯二内醚对 DNA 交联作用的研究[J]. 铁道医学, 1999, 27(6): 386-387.
- [37] Evenson D P , Jost L K , Gandy J. Glutathione depletion potentiates ethyl methanesulfonate -induced damage to sperm chromatin structure[J]. **Reprod Toxicol**, 1993, 7: 297-304.
- [38] Wild D. Mutagenicity studies on organophosphorus pesticide[J]. **Mutat Res**, 1975, 32: 133-137.
- [39] 倪祖尧, 刘玉清, 李寿祺, 等. 有机磷农药分子片段诱发沙门氏菌回复突变的计算机辅助评价[J]. 华西医科大学报, 1994, 25(1): 78-82.
- [40] Pina G B , Solis H M J , Rojas G A E , *et al.* Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines[J]. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2005, 202: 189-198.

(本文编辑: 康亦兼)