

兽药添加剂阿散酸和土霉素的毒理学研究

曲薨薨, 孙立伟, 陈 璠, 厉以强, 陈源高, 孔志明

(南京大学环境学院 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘要: 采用斑马鱼和鲫鱼作为生物材料, 分别研究了兽药添加剂阿散酸和土霉素对斑马鱼的急性毒性及对鲫鱼肾细胞 DNA 损伤。急性毒性试验表明, 阿散酸和土霉素的斑马鱼 96 h LC₅₀ 分别为 520.747 和 1341.764 mg · L⁻¹。彗星试验结果表明, 阿散酸引起的 DNA 损伤较小, 与阴性对照相比无显著性差异 ($P > 0.05$); 而土霉素能引起较大的 DNA 损伤, 与阴性对照相比均有极显著性差异 ($P < 0.01$)

关键词: 兽药添加剂; 阿散酸; 土霉素; 鱼类急性毒性试验; 单细胞凝胶电泳试验

中图分类号: X503.225 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2004)02-0240-03

Toxicological Characters of Arsanilic Acid and Oxytetracycline

QU Meng-meng, SUN Li-wei, CHEN Jun, LI Yi-qiang, CHEN Yuan-gao, KONG Zhi-ming

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Environmental School, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Veterinary drug additives are widely used in the stock raising. To this respect they represent a potential risk for the animals of many species, including human. In this paper, the toxicology of arsanilic acid and oxytetracycline were studied by using fish acute toxicity test and single cell gel electrophoresis test (comet assay). The results of acute toxicity test to zebra fish (*Brachydanio rerio*) showed the 96h-LC₅₀ of arsanilic acid and oxytetracycline were 520.7 and 1341.7 mg · L⁻¹ respectively. The DNA breakage capacity of two test substances was also assessed with SCGE in crucian (*Carassius auratus*) kidney cells in vivo. The data indicated that no statistically significant was found between the groups exposed to arsanilic and the control groups. However, oxytetracycline could induce extremely significantly different ($P < 0.01$) DNA damage at all the doses tested, compared with the controls.

Keywords: veterinary drug additives; arsanilic acid; oxytetracycline; fish acute toxicity test; single cell gel electrophoresis assay (SCGE)

阿散酸 (Arsanilic Acid)、土霉素 Oxytetracycline) 因其价低而效果显著是最为常用的抗菌促生长兽药添加剂。但由于牲畜的高度集约化饲养也使得大量的阿散酸和土霉素随禽畜粪便排入环境, 对生态系统, 特别是对水生生态系统造成危害^[1]。

鱼类在水生生态系统中处于较高的营养级, 并与人类生活密切相关, 而且鱼类对水质的变化很敏感。因此, 用鱼作为生物材料研究兽药添加剂阿散酸和土霉素对水生生态系统的影响具有很重要的意义。

本文研究了上述兽药添加剂对斑马鱼的急性毒性

以及对鲫鱼肾细胞 DNA 的损伤。从生物个体水平、分子水平对其毒理进行了系统研究, 从而全面评价 2 种兽药添加剂对生物特别是对人类的潜在危害。

1 材料与方法

1.1 受试药物

阿散酸, 土霉素, 纯度均为 98%, 由南京壮大特种饲料厂提供。

1.2 生物材料

斑马鱼 (*Brachydanio rerio*), 购于南京市花鸟市场, 实验室驯养, 实验选用健康幼鱼。

鲫鱼 (*Carassius auratus*), 购自南京市花鸟市场, 实验室驯养 1 周, 选用健康者。体长 (106.6 ± 10.6) mm, 体重 (15.6 ± 2.1) g。

1.3 实验方法

收稿日期: 2003-07-03

基金项目: 教育部博士点基金项目(20020284041); 本工作得到日本学术振兴会中日据点大学交流计划支持

作者简介: 曲薨薨(1979—), 女, 南京大学环境学院环境生物专业硕士, 研究方向为环境遗传毒理学。

联系人: 孔志明, E-mail: zmkong@nju.edu.cn

1.3.1 斑马鱼急性毒性试验

按常规鱼类急性毒性试验方法进行^[2]。根据预试验结果确定浓度范围,设 5 个试验浓度。试验容器为 500 mL 烧杯,每个浓度投放 10 尾斑马鱼。置于 26 °C 光照培养箱内,光周期为 12/12 h(昼/夜),观察并记录 24, 48, 72, 96 h 鱼的死亡情况,并求出各时段 LC₅₀ 及 95% 置信区间。

1.3.2 鲫鱼肾细胞单细胞凝胶电泳试验

1.3.2.1 染毒

将鲫鱼暴露在不同浓度的阿散酸和土霉素中 72 h,同时设溶剂对照(吐温-80)及阳性对照(重铬酸钾)。

1.3.2.2 鲫鱼肾细胞的制备^[3]

解剖鲫鱼取出鱼肾,放入 35 mm 玻璃平皿内,用冷 PBS 液冲洗 2 次,用眼科剪将肾尽量剪碎,转移至玻璃管中,在冰水浴中用圆头玻棒碾压后通过 110 目不锈钢筛网过滤,收集细胞悬液,EDTA 消化,分散细胞,将细胞浓度用 PBS 调整为 10⁶~10⁷ 个·mL⁻¹,4 °C 贮存备用,并以苔盼蓝染色观察细胞存活率。

1.3.2.3 单细胞凝胶电泳试验

按 Singh 报道的方法进行^[4]。

1.3.2.4 结果分析

根据细胞彗星荧光尾部与其可见头部的比例可

将损伤程度分为 0, I, II, III, IV 5 个等级,计算 DNA 损伤专用单位(Arbitrary units)。专用单位是一种衡量 DNA 链断裂损伤程度的特有单位,它把不同的分级加以换算统计,得到 DNA 损伤的总体水平。计算方法:专用单位 = 0 × 0 级细胞数 + 1 × I 级细胞数 + 2 × II 级细胞数 + 3 × III 级细胞数 + 4 × IV 级细胞数^[5]。同时应用 CASP 软件进行分析处理,测定 Tail DNA(%) 及 Olive Tail Moment^[6]。各组与阴性对照组比较,用单因素方差分析进行显著性检验。

2 结果

2.1 斑马鱼急性毒性试验

阿散酸、土霉素试验结果见表 1 和表 2。

以 96 h LC₅₀ 为毒性指标,根据毒物对水生生物的毒性分级^[7],则阿散酸为中等毒,土霉素为低毒。

2.2 鲫鱼肾细胞单细胞凝胶电泳试验

阿散酸和土霉素对鲫鱼肾细胞 DNA 损伤的测定结果见表 3。可以看出,阿散酸引起的 DNA 损伤较小,与阴性对照相比均无显著性差异,且无明显的剂量效应关系。土霉素能引起较大的 DNA 损伤,与阴性对照相比均有极显著性差异(参见图 1, 2),且呈现一定的剂量效应关系。

表 1 阿散酸对斑马鱼急性毒性试验结果

Table 1 Acute toxicity test of arsanilic acid in zebra fish (*Brachydanio rerio*)

浓度/mg·L ⁻¹	试验鱼死亡数/尾			
	24 h	48 h	72 h	96 h
400	0	0	0	0
456	0	0	0	2
520	2	4	6	6
593	4	5	6	7
676	6	10	10	10
LC ₅₀ /mg·L ⁻¹	630.985	562.265	542.411	520.747
95% 置信区间/mg·L ⁻¹	581.783~745.897	528.010~600.522	508.843~579.055	485.343~558.802

表 2 土霉素对斑马鱼急性毒性试验结果

Table 2 Acute toxicity test of oxytetracycline in zebra fish (*Brachydanio rerio*)

浓度/mg·L ⁻¹	试验鱼死亡数/尾			
	24 h	48 h	72 h	96 h
1 188	0	0	0	0
1 259	0	2	2	2
1 335	1	4	4	4
1 415	3	4	8	8
1 500	10	10	10	10
LC ₅₀ /mg·L ⁻¹	1 479.813	1 374.578	1 341.764	1 341.764
95% 置信区间/mg·L ⁻¹	1 385.223~1 456.316	1 329.108~1 429.384	1 302.715~1 382.327	1 302.715~1 382.327

表3 阿散酸、土霉素对鲫鱼肾细胞 DNA 的损伤

Table 3 DNA damages of crucian (*Carassius auratus*) kidney cells induced by arsanilic acid and oxytetracycline

受试物	暴露剂量 /mg · L ⁻¹	在各个分级中的细胞数/%					DNA 损伤	TailDNA /%	OTM /μm
		0	I	II	III	IV			
阿散酸	125	74.87	24.64	0.49	0.00	0.00	25.62	13.85	2.984
	250	74.99	24.68	0.33	0.00	0.00	25.34	13.45	2.980
	500	71.57	27.78	0.65	0.00	0.00	29.08	15.41	2.99
土霉素	250	0.00	47.31	39.53	13.16	0.00	165.85**	27.68	3.788
	500	0.00	29.32	48.31	21.88	0.49	193.55**	30.89	5.660
	1 000	0.00	28.31	39.70	26.94	5.05	208.74**	39.53	9.783
阳性对照(重铬酸钾)	10	0.00	19.17	34.62	32.95	13.26	240.30**	46.48	11.121
溶剂对照(吐温-80)		83.67	16.33	0.00	0.00	0.00	21.10	11.24	2.209

注: **为 $P < 0.01$; # DNA 专用单位 $U = \sum_{i=0}^4 i \times ni$, ni 为第 i 级损伤细胞数。



图1 溶剂对照组细胞(x400)

Figure 1 Comet image of cell in control solvent (x400)

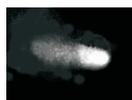
图2 土霉素(1 000 mg · L⁻¹)对细胞 DNA 的损伤(x400)

Figure 2 Comet image of cell induced by oxytetracycline (x400)

3 讨论

阿散酸作为饲料添加剂, 其应用研究已经有 40 多年的历史, 不但起着补充必要微量元素砷的营养性作用, 而且还具有重要的药物作用^[8]。据美国 EPA 的数据, Ames 试验和小鼠骨髓细胞微核试验都表明阿散酸不具有致突变作用。本文的彗星试验结果也表明, 在设定的试验浓度内, 阿散酸对鲫鱼肾细胞无基因毒害。因此, 适量地在饲料中添加阿散酸应该是安全的, 然而, 作为一种砷制剂, 其在环境中的转归依然值得关注。

土霉素作为广谱性抗生素, 在畜牧养殖业中应用范围很广, 但大剂量或长期使用时会造成畜禽肝功能损害及二重感染^[9]。从本试验结果也可看出, 虽然土霉素的急性毒性小于阿散酸, 但在所设的浓度范围, 能诱导鲫鱼肾细胞严重的 DNA 损伤, 这表明土霉素可能有较强的基因毒性。同时, 有报道表明, 土霉素在环境中较难降解并可蓄积^[10], 因此, 有必要加强管理, 合理控制其使用剂量和使用期限。

用鲫鱼肾细胞来做单细胞凝胶电泳实验在国内

尚属少见。本实验用单细胞凝胶电泳试验检测 2 种添加剂对其 DNA 的损伤, 是对彗星试验方法的发展和延伸。彗星试验应用于鱼类、贝类或植物细胞, 对来自土壤、水体、大气的常见动植物进行监测, 将为环境污染物的遗传毒性评估、环境质量的监测与评估提供新的手段。

兽药添加剂随禽畜粪便排入环境, 可在环境中迁移转化, 并可被微生物降解。研究其微生物降解产物的毒性作用, 具有更现实的意义, 有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 齐德生. 猪场废弃物对附近地面水污染状况的调查研究[J]. 农业环境保护, 1998, 17(1): 32-33.
- [2] 邱郁春. 水污染鱼类毒性试验方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1992. 50-62.
- [3] Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch-Volders M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish[J]. *Mutation Research*, 1998, 415: 67-184.
- [4] Singh NP, McCoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells[J]. *Exp cell res*, 1988, 175: 184-191.
- [5] Collins AR, A-g Ma, Duthie S J. The kinetics of repair of oxidative (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells[J]. *Mutation Research*, 1995, 336: 69-77.
- [6] Yusuf AT, Vian L, Sabatier R, et al. In vitro detection of indirect-acting genotoxins in the comet assay using Hep G2 cells[J]. *Mutation Research*, 2000, 468: 227-234.
- [7] 国家环保局《水生生物监测手册》编委会. 水生生物监测手册[M]. 南京: 东南大学出版社, 1993. 192-202.
- [8] 曾梦良. 阿散酸的特性与应用[J]. 湖南畜牧兽医, 1998, 4: 5-6.
- [9] 陈四清, 李美同. 饲喂土霉素对鲤鱼生长及代谢残留的研究[J]. 饲料工业, 1997, 18(5): 19-20.
- [10] Samuelsen OB, Torsvik A. long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance toward oxytetracycline in a fish farm sediment after medication[J]. *Sci Total Environ*, 1992, 114: 25-36.