

除草剂丁草胺对蟾蜍脑和肝的毒性及氧化应激效应

梁传成¹,李丽妍²,王丽文¹,邵然¹

(1.沈阳师范大学 生命科学学院,沈阳 110034;2.黄河科技学院 医学院,郑州 450063)

摘要:以中华大蟾蜍为研究对象,通过评价除草剂丁草胺对大脑和肝脏的毒性作用及与氧化应激的相关性,揭示除草剂的广泛应用对生态系统的潜在危害.将成年蟾蜍随机分组,分别暴露于 0,3,15,30 mg/L 的丁草胺,并于 3,6,9 d 后每组分别随机选取 16 只蟾蜍测定脑和肝脏抗氧化系统指标,用尼氏法染色比较各组蟾蜍端脑海马区形态学变化.结果显示,各试验组均呈脑蛋白质量浓度降低而肝蛋白质量浓度升高的趋势.随丁草胺暴露时间延长,脑内 SOD 活性先升后降;肝脏 SOD 活性随丁草胺浓度升高而先升后降;脑内 MDA 质量浓度和 CAT 活性的变化与肝脏相同.MDA 质量浓度随药物浓度和作用时间的增加而增加,除低浓度组外,肝脏 CAT 活性均受到抑制.随药物浓度增加,端脑海马区细胞逐渐溶解,空泡化现象加剧,30 mg/L 组海马区侧脑室因细胞部分溶解使侧脑室界限模糊,表明丁草胺对蟾蜍大脑和肝脏均表现一定的毒性作用.

关键词:除草剂;丁草胺;脑和肝脏毒性;氧化应激

中图分类号:R96

文献标志码:A

21 世纪初,除草剂是农药产业中增长最快的部分.它在世界上的广泛使用导致了严重的环境污染,并通过食物链影响人类健康^[1-2].作为水生生态系统中最重要生物类群之一,两栖动物因对水环境变化的敏感性而对水体污染具有一定的响应能力.水体的化学污染是近年来备受全球关注的两栖动物种群数量减少和一些物种灭绝的主要因素^[3].

丁草胺,即 2,6-二乙基-N-(丁氧甲基)-氯乙酰替苯胺,是一种酰胺类除草剂,因其高效、低毒、价格低廉,成为我国稻田除草剂中用量最大的一种^[4].然而,其疏水性强、易吸附、淋溶性低、对非靶生物的毒性作用已引起广泛关注^[5].丁草胺毒性研究主要涉及除草剂对两栖动物的形态、遗传毒性和生物积累等方面^[6-8],而关于丁草胺对两栖类动物的生理生化毒性,特别是抗氧化防御系统方面的报道较少.本文以环境指示动物中华大蟾蜍(*Bufo bufo gargarigans*)为研究对象,通过评价药物作用后蟾蜍脑肝组织蛋白质量浓度、氧化应激指标和神经组织学变化来揭示丁草胺的脑和肝脏毒性,为除草剂的风险评估提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

丁草胺(2,6-二乙基-N-(丁氧甲基)-氯乙酰替苯胺, $C_{17}H_{26}ClNO_2$,有效成分体积分数 60%,乳油)购自大连孟山都公司.健康成年中华大蟾蜍 120 只,购自沈阳医学院实验动物研究中心.雌雄随机,体质量(37.8±6.9) g,随机分为 4 组.根据丁草胺在稻田中施用的质量浓度设定染毒剂量,丁草胺质量浓度为 3,15,30 mg/L,分别为其稻田施用质量浓度的 1,5,10 倍.试验组分别放入盛有充分曝气的清水和丁草胺溶液的桶内(20 cm×30 cm,1 个实验桶内 5 只蟾蜍).溶液的量为浸没 1/2 蟾蜍体积.每 24 h 更换试验用液一次以保证药液浓度和水中溶解氧质量浓度.染毒期间室温(20~25 °C),自然光照,禁食.连续染毒 3,6,9 d 后,每组分别取 10 只

收稿日期:2021-06-10;修回日期:2021-08-30.

基金项目:国家自然科学基金(31970410);河南省高等学校重点科研项目(21B350001).

作者简介:梁传成(1964—),男,辽宁沈阳人,沈阳师范大学副教授,研究方向为环境生物学,E-mail:liangcc1964@163.com.

通信作者:李丽妍(1974—),女,辽宁沈阳人,黄河科技学院副教授,研究方向为药学,E-mail:liyanli0921@163.com.

作者贡献:梁传成、李丽妍为共同第一作者.

蟾蜍,毁髓后采集蟾蜍大脑、肝脏样本进行后续实验。

1.2 理化指标检测与统计分析

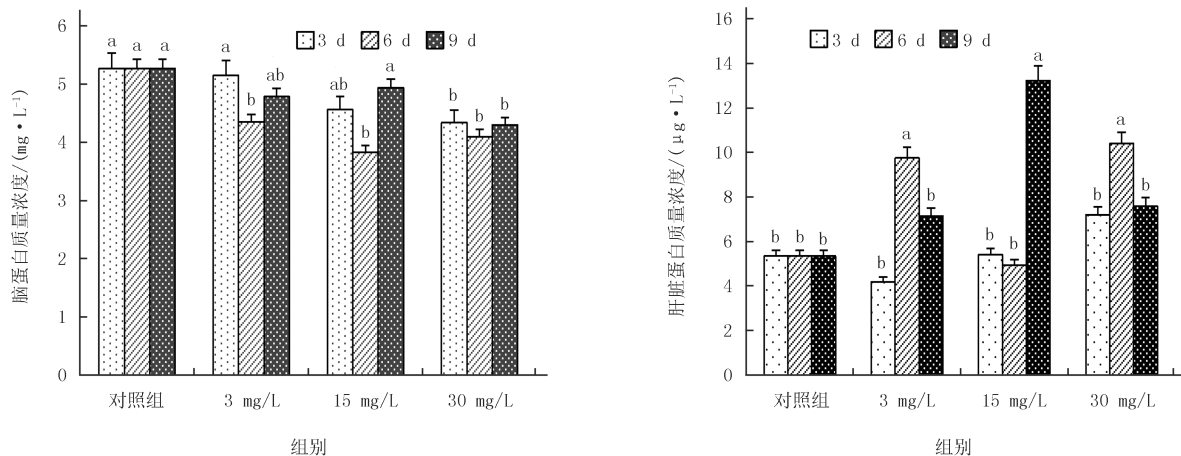
Bradford 法测定脑和肝的蛋白质质量浓度^[9].采用光化学硝酸蓝四唑(NBT)法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性^[10].根据文献^[11]测定过氧化氢酶(CAT)活性.丙二醛(MDA)作为脂质过氧化(LPO)的标记物,采用硫代巴比妥酸法测定^[12].制备蟾蜍脑组织常规石蜡切片,尼氏染色,树脂封片后观察。

实验结果用 SPSS 11.0 软件统计分析.实验组与对照组之间的差异性采用单因素方差分析(One Way ANOVA),组间差异的多重比较采用 Tukey 检验, $P < 0.05$ 为显著差异。

2 结 果

2.1 蛋白质质量浓度

脑和肝脏蛋白质量浓度的变化分别见图 1.由图可知,与对照组相比,各实验组脑蛋白质量浓度均下降,3 mg/L 和 15 mg/L 组仅在染毒 6 d 与对照组有显著性差异($P < 0.05$),而 30 mg/L 组,各染毒时间脑蛋白质量浓度均与对照组呈显著性差异($P < 0.05$),但不呈时间依赖性.不同于脑蛋白,肝蛋白随染毒时间的延长,其质量浓度均增高(除 3 mg/L,3 d 组).3 mg/L 和 30 mg/L 组在染毒 6 d 与对照组差异显著($P < 0.05$),而 15 mg/L 组在染毒 9 d 与对照组差异显著($P < 0.05$).



注:不同小写字母表示处理间差异显著,下同。

图1 丁草胺对蟾蜍脑和肝脏蛋白质量浓度的影响

Fig.1 Effect of butachlor on brain and liver protein content of *Bufo bufo*

2.2 酶活性和 MDA 测定

丁草胺诱导的蟾蜍脑内和肝脏的 SOD 和 MDA 质量浓度,CAT 活性变化分别见图 2.随丁草胺暴露时间的延长和剂量增加,诱导脑内 SOD 活性先升高而后迅速下降.3 mg/L 和 15 mg/L 组 SOD 在染毒 6 d 活性显著降低,9 d 升高.30 mg/L 组在染毒 3 d SOD 活性略有升高,随后显著降低.3 mg/L 组和 15 mg/L 组的肝脏 SOD 活性随染毒时间延长略有上升,30 mg/L 组肝脏 SOD 活性在染毒 3 d 时显著下降,后经升高后再次显著下降。

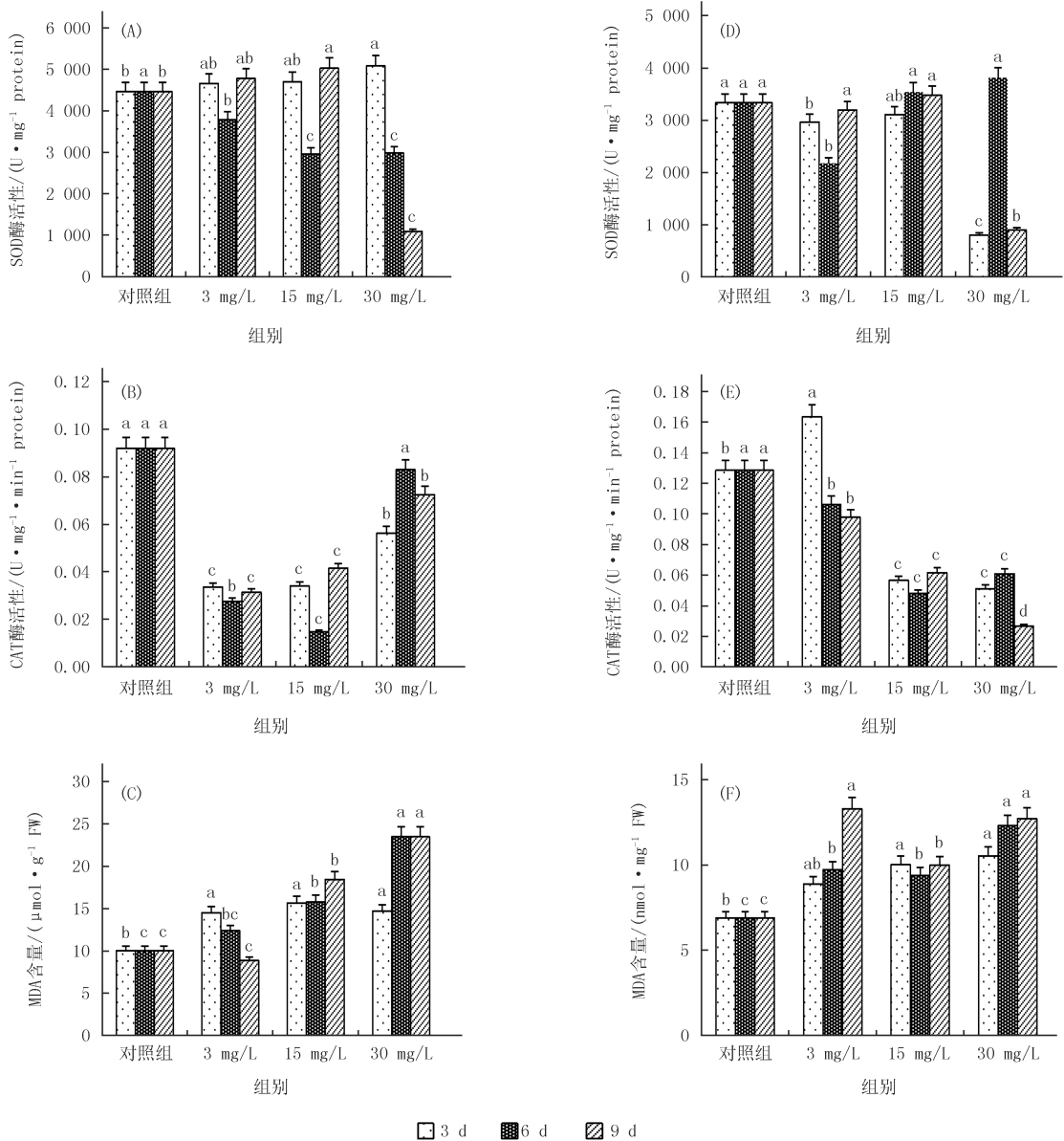
脑部和肝脏 CAT 活性虽然经丁草胺诱导均低于对照组,但趋势相反,脑部 CAT 活性随着染毒时间延长呈上升趋势,而肝脏 CAT 活性随染毒时间延长而逐渐降低(除 3 mg/L,3 d 组).肝脏内,在 3 mg/L 组 3 d CAT 活性诱导升高,后随着染毒时间延长逐渐抑制($P > 0.05$).而在 15 mg/L 和 30 mg/L 组,CAT 活性均被抑制且呈显著性差异。

脂质过氧化水平以丙二醛(MDA)质量浓度来表示.脑和肝脏中 MDA 质量浓度均在丁草胺诱导下增加,均呈剂量—时间依赖性,且脑中 MDA 质量浓度变化比肝脏中更为显著。

2.3 组织学结果

丁草胺诱导的蟾蜍端脑海马区组织学变化见图 3.由图可见,暴露低浓度丁草胺中的海马区细胞核增大。

随着丁草胺浓度的增加,海马区细胞逐渐溶解,组织间隙增大,出现空泡化.30 mg/L组海马区侧脑室管周膜及周围细胞溶解最为显著,空泡面积加大,使侧脑室界限模糊.



(A), (B), (C) 为脑部相关氧化应激指标; (D), (E), (F) 为肝部相关氧化应激指标.

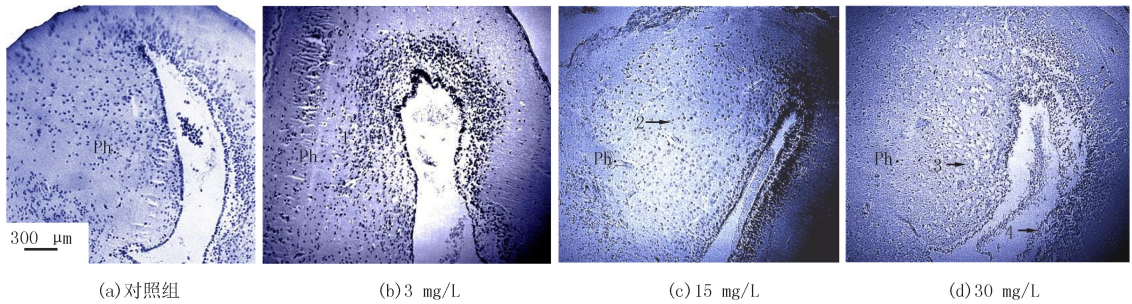
图2 丁草胺对蟾蜍脑与肝部氧化应激指标的影响

Fig.2 Effects of butachlor on oxidative stress indexes in brain and liver of *Bufo bufo*

3 讨论

蛋白质是生理活动的载体和执行者,其正常功能会因外源污染物入侵而发生直接或间接的改变^[13].酰胺类除草剂经杂草的胚芽和根部吸收运输至植株各部位,通过抑制植物细胞内蛋白质合成而导致杂草死亡.本研究中,脑蛋白质质量浓度随丁草胺浓度和暴露时间延长而先升后降,3 mg/L组和15 mg/L组与对照组相比在丁草胺暴露6 d有显著性差异($P < 0.05$).但同肝脏蛋白质质量浓度变化情况比较而言,脑部蛋白质质量浓度虽有下降,但下降幅度远不及肝脏部位,这可能是由于血脑屏障的保护作用,丁草胺在短时间内难以大量透过血脑屏障.染毒9 d出现了蛋白质水平回升现象,可能是由于实验动物对丁草胺染毒的应激反应所产生的应激蛋白水平升高所致,也可能与除草剂在蟾蜍体内的持续积累有关.组织学结果显示端脑海马区细胞

出现自溶现象,以6 d最为明显,而脑蛋白在6 d蛋白质质量浓度最少,由此可从组织学角度印证药物对脑蛋白质量浓度的影响.丁草胺暴露后肝脏蛋白质质量浓度逐渐升高,这与肝脏的功能有关.肝脏是一种重要的代谢器官,可代谢和分解来自机体产生的有害废物及体外的毒物、药物和毒素等.



Ph表示海马区;1表示细胞核增大;2表示组织间隙增大;3表示空泡;4表示侧脑室管周膜.

图3 中华大蟾蜍端脑海马区各浓度染毒6 d后组织学横切片(HE×40)

Fig.3 Influence of butachlor on tissue of telencephalon(HE×40) in *Bufo bufo* after of 6 d

本研究表明丁草胺对蟾蜍肝脏蛋白质质量浓度的影响具有剂量和时间依赖性,这可能与蟾蜍对药物的应激反应有关.当机体促氧化剂和抗氧化剂比例失衡时,即产生氧化应激,导致活性氧(ROS)的产生.细胞内抗氧化酶如SOD和CAT是生物体中负责清除ROS和保护细胞的重要抗氧化酶.SOD活性水平可以间接反映ROS水平和细胞损伤程度.随环境污染加剧,SOD活性会产生诱导或抑制的应激性变化.这些变化是仅是生物体的一种暂时状态而非最终的毒理学影响.这两种状态的出现取决于毒物暴露的强度和持续时间,当然也取决于物种的敏感性.与对照组相比,丁草胺3 mg/L和15 mg/L组蟾蜍肝脏中SOD活性在3 d后显著升高,而30 mg/L组蟾蜍肝脏中SOD活性显著降低,仅在第6 d出现应激性升高,后下降.上述结果表明,低剂量除草剂对抗氧化酶的产生有一定的刺激作用,而高剂量除草剂对抗氧化酶的产生有一定的抑制作用,高剂量组直接破坏了抗氧化应激的保护机制.该结果与文献[14]报道的中高浓度阿维菌素抑制鲤鱼肝细胞中SOD活性相似.

在诱导SOD清除细胞间超氧阴离子自由基的过程中,会产生大量的 H_2O_2 ,作为细胞内防御系统关键酶之一的过氧化氢酶(CAT)能促进 H_2O_2 分解,保护细胞免受 H_2O_2 的氧化损伤,并减少自由基的形成和脂质过氧化.CAT活性可以被污染胁迫所改变.本研究表明,蟾蜍脑内CAT活性受到了明显的抑制,这可能与丁草胺使CAT与 H_2O_2 相互作用使酶活性降低有关.而肝脏在低剂量暴露时,CAT活性受到诱导显著升高,与肝脏中SOD活性的变化相对应.而随着染毒时间和浓度的增加,CAT活性呈时间-剂量依赖性抑制,大剂量和较长时间的药物处理,均超过了SOD和CAT的清除能力范围.

H_2O_2 或超氧化物等强氧化剂使不饱和脂肪酸经非酶性氧化的过程被称为脂质过氧化.MDA即为脂质过氧化的典型产物之一,是由氧自由基攻击生物膜的多不饱和脂肪酸而引发脂质过氧化作用中形成的,可以间接反映细胞损伤的程度.本研究结果表明,MDA水平随着丁草胺剂量的增加而显著升高,并呈时间-剂量依赖关系.提示药物作用使活性氧自由基水平增加,脂质过氧化逐渐增强,MDA积累增多.这与他人鱼类中发现的结果相似^[15].

参 考 文 献

- [1] SHAH Z U, PARVEEN S. Pesticides pollution and risk assessment of river Ganga: a review[J]. Heliyon, 2021, 7(8): e07726.
- [2] 张榜军, 张佳乐, 陈联国. 2,4-D对赤子爱胜蚓抗氧化系统和基因表达的影响[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2021, 49(5): 89-95.
ZHANG B J, ZHANG J L, CHEN L G. Effects of 2,4-D on the antioxidant system and the gene expression of the earthworm *Eisenia fetida*[J]. Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition), 2021, 49(5): 89-95.
- [3] MANN R M, HYNNE R V, CHOUNG C B, et al. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment[J]. Environmental Pollution, 2009, 157(11): 2903-2927.
- [4] 代丽萍, 史海滨, 苗庆丰, 等. 不同灌水量下除草剂对玉米生长与籽粒农药残留量的影响[J]. 灌溉排水学报, 2021, 40(5): 30-38.
DAI L P, SHI H B, MIAO Q F, et al. Effects of herbicides on maize growth and grain pesticide residues under different irrigation amounts [J]. Journal of Irrigation and Drainage, 2021, 40(5): 30-38.

- [5] LAKRA W S, NAGPURE N. Genotoxicological studies in fishes: a review[J]. *Indian J Anim Sci*, 2009, 79: 93-98.
- [6] XIANG Q Q, XU B F, DING Y L, et al. Oxidative stress response induced by butachlor in zebrafish embryo/larvae: the protective effect of vitamin C[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2018, 100(2): 208-215.
- [7] HUANG Y, MA J Z, MENG Y L, et al. Exposure to Oxadiazon-Butachlor causes cardiac toxicity in zebrafish embryos[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 265: 114775.
- [8] 杨桂华, 卜宁, 冯甲棣, 等. 除草剂丁草胺对蟾蜍心肌收缩力和心肌酶谱的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2007, 36(6): 644-646.
YANG G H, BU N, FENG J D, et al. Effect of herbicide butachlor on myocardial contracts dint and myocardial enzymogram of *Bufo bufo* [J]. *Journal of China Medical University*, 2007, 36(6): 644-646.
- [9] LOWRY O, ROSEBROUGH N, FARR A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265-275.
- [10] BEYER W F J, FRIDOVICH I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions[J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 161(2): 559-566.
- [11] AEBI H E. Catalase, in *Methods of Enzymatic Analysis* [M]. Weinheim: Verlag Chemie, 1982: 273-282.
- [12] ESTERBAUER H, CHEESEMAN K H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal[J]. *Methods in Enzymology*, 1990, 186: 407-421.
- [13] WEI Y H, CHAN L, WANG D Z, et al. Proteomic analysis of hepatic protein profiles in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to perfluorooctanoic acid[J]. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7(4): 1729-1739.
- [14] LI R G, LI T T, HAO L, et al. Hydrogen peroxide reduces lead-induced oxidative stress to mouse brain and liver[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2009, 82(4): 419-422.
- [15] VAJARGAH M F, NAMIN J I, MOHSENPOUR R, et al. Histological effects of sublethal concentrations of insecticide Lindane on intestinal tissue of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Veterinary Research Communications*, 2021, 45(4): 373-380.

Toxicity and oxidative stress effects of butachlor on brain and liver of *Bufo bufo gargarigans*

Liang Chuancheng¹, Li Liyan², Wang Liwen¹, Shao Ran¹

(1. Life Science College, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China; 2. Medical School, Huanghe Science and Technology University, Zhengzhou 450063, China)

Abstract: *Bufo bufo gargarigans* was employed to investigate the toxic effects of the herbicide butachlor on brain and liver of toad and its correlation with oxidative stress, and to reveal the potential harm of the wide application of herbicides to the ecosystem. *Bufo bufo gargarigans* were randomly assigned to butachlor exposure tests at 3, 15, and 30 mg/L, respectively. No drug was used as control group. After 3, 6 and 9 days of drug treatment, 16 toads were randomly selected from each group, respectively. The morphological characteristics of brain hippocampus were compared by Nissl staining. The results showed that the contents of brain protein decreased in each drug group, while the contents of liver protein increased, SOD activities in brain all increased and then decreased following with increasing of treatment time. SOD activities induced in liver increased and then decreased rapidly following with the increasing treatment time. The changes of malondialdehyde content and CAT activity in brain were same as those in liver. MDA content increased with the increasing concentration and time, and CAT activity in liver was inhibited except in low concentration group. With the increasing toxin concentration, the cells in the hippocampus area of the distal brain dissolved gradually, and the phenomenon of cavitation was intensified. In the 30 mg/L group, the boundary of the lateral ventricle of the hippocampus was blurred because of partial dissolution of the cells. The results showed that butachlor exhibited certain toxic effects on brain and liver of toad.

Keywords: herbicides; butachlor; brain and liver toxicity; oxidative stress

[责任编辑 刘洋 杨浦]