

农抗“769”急性、 亚急性毒性及致突变实验研究

赫梅生 郭景阳 詹丽芳 张玉芝 苏曼昭* 周艳香*

(中国医科大学药理教研组)

农抗“769”菌种是1971年吉林省农科院植保研究所从公主岭土壤中分离到的一株放线菌，经中国科学院微生物研究所鉴定，定名为不吸水链霉菌公主岭新变种(*Streptomyces ahygroscopicus gongzhulingensis* n. var.)。该菌株培养液中的有效成分暂称为农抗“769”，已进行了工业化小试工艺的研究^[1]，现已制得白色无定形纯品的粉末。农抗“769”能防治种子传染的禾谷类黑穗病和水稻恶苗病，是一个很有前途的代录拌种剂^[2]。应吉林省农科院植保研究所的要求，我们于1980年对农抗“769”的急性毒性、亚急性毒性、蓄积性和致突变作用进行了实验研究，现报告如下。

材 料 和 方 法

农抗“769”：吉林省农科院植保所于本年2月提供的粗提品，为玻璃安瓶封装的无定型淡黄色粉末。农抗“769”水溶性良好，但溶解较慢，最后极少量胶状不溶物。以蒸馏水溶成10%母液供急性毒性实验用，冰箱中保存，临用时稀释成所需浓度；其他实验时配成1%母液冰箱中保存，用前酌情稀释。

实验用动物：毒性实验用的小白鼠是中国医科大学动物饲养室供给的，制备S-9（肝脏药物代谢酶P450）所用的雄性大白鼠也是本校动物饲养室供给的。

急性LD₅₀毒性测定用简化机率单位法和Karber氏修正法计算。

亚急性毒性实验共用药48天，每天一次腹腔注射一定剂量，视动物死亡、体重增长、血象及肝肾功能情况。

红细胞、白细胞和血小板计数，以及尿沉渣和蛋白检查，按临床常规方法^[3]进行。

肝功（转氨酶活性测定）检查基本上按King氏改良Reitman氏法^[4]。

肾功（血清尿素氮测定）检查按二乙酰一胂法进行^[5]。

致突变实验用两种方法：一是Ames回变检定法，用TA100、TA98、TA1538、TA1537四株依赖组氨酸变异型鼠伤寒杆菌^[6, 6]；二是用枯草杆菌修复检定法，菌株是日本的H17及M45，后者是修复缺陷型^[7]。

*进修人员

实 验 结 果

一、急性毒性实验

1、急性LD50及其95%可信限测定

测定了两种给药方法（腹腔注射及灌胃）的数据，每种给药法正式实验时都用雄性小白鼠60支，分为6个剂量组，每组10支动物。用两种方法计算LD50及其95%可信限，结果如下：

腹腔注射（i.p.）：

简化机率单位法为 $25.4 \pm 12.0 \text{mg/kg}$ （ $P = 0.95$ ）

Karber氏修正法为 $132.3 \pm 13.7 \text{mg/kg}$ （ $P = 0.95$ ）

灌胃（p.o.）：

简化机率单位法为 $129.2 \pm 25.9 \text{mg/kg}$ （ $P = 0.95$ ）

Karber氏修正法为 $132.2 \pm 17.2 \text{mg/kg}$ （ $P = 0.95$ ）

腹腔注射和灌胃的LD50基本一致，这说明农抗“769”可由消化道完全而充分地吸收。此农抗“769”样品就急性毒性而言，按卫生部规定标准，属于中毒类药物。

2、小白鼠死亡情况

动物死亡较慢，在正式LD50测定实验中，给药后10小时以内动物无死亡者，一般多在用药后1~4天内死亡，高峰在用药后第一、二天，超过4天死亡者是极个别的。但特大剂量时，小白鼠可在1小时内死亡。

动物死前有脱水、肚门不洁、立毛、瘦、行动不便和呼吸明显减慢等现象。

3、“769空白”制剂的急性毒性测定

“769空白”制剂除不接种“769”菌种外，其他工艺过程与农抗“769”完全相同，为黄褐色不定型粉块状物，易溶于水。安瓶封装，本年7月份收到。

于8月份用小白鼠进行了农抗“769”和“769空白”制剂急性毒性实验比较。因后者总量太少，只能作两个剂量组（每组10支动物）的毒性测定。结果是：农抗“769”LD50剂量（ 130mg/kg ）死亡60%， $2 \times \text{LD50}$ 剂量（ 260mg/kg ）死亡100%。“769空白”制剂用 130mg/kg 或 260mg/kg 都无死亡者，有两个小鼠用到 500mg/kg 仍未死亡。这说明农抗“769”的毒效是由该菌种所致。

二、亚急性毒性实验

1、农抗“769”溶液毒效稳定性实验

因样品较少，且安瓶开封后很快潮解不能保存，所以只好配成母液冰箱保存，连续使用20天左右。通过40支小白鼠实验证明：冰箱保存20天的母液（1或2%）毒效毫无降低；所以此种保存方式不能影响亚急性实验结果。

2、不同剂量组动物的累积死亡情况

共设7个组，1个对照组，6个不同剂量组，一般每组雄性小白鼠20支。每鼠每天腹腔注射一次，注液量0.5毫升。对照注射生理盐水；用药组注射以生理盐水稀释的农抗“769”，剂量分别为 $1/200$ 、 $1/100$ 、 $1/50$ 、 $1/30$ 、 $1/10$ 、 $1/5$ LD50，除 $1/5$ 剂量组用药5天、 $1/10$ 剂量组用药10天以外，其余各组皆用药48天，结果见表1。证明剂量越大累积死亡率越高，剂量如低于一定程度则无累积死亡发生。绝大多数死

亡都发生在用药30天之内。

表 1 各组累积死亡及体重增长情况

剂 量 (LD50)	n *	死 亡		平 均 体 重 (g)				
		数	%	用 药 前	用 药 后 天 数			
					10	21	36	47
对 照 组	18	0	0.0	16.3	18.8	25.0	27.1	27.0
1/200	17	0	0.0	16.3	17.9	22.0	25.6	24.8
1/100	18	1	5.6	16.2	18.3	23.2	24.6	25.3
1/50	17	2	11.8	16.3	17.0	21.0	24.5	23.4
1/30	17	6	35.3	16.3	17.0	20.0	25.2	26.7
1/10	18	6	33.3	16.3	16.7			
1/5	10	4	40.0					

* 除外注射本身致死后的动物数

经卡方统计分析(自由变为6,卡方值为20.56)证明不同剂量组的累积死亡率之间有非常显著的差异($P < 0.01$)。

3、不同剂量组动物的体重增长情况

各组用药和用药后不同天数存活动物体重增长情况(均值)见表1之右半部分。证明剂量越大则体重增长越慢,以用药后20天左右相差最为明显,以后又逐渐趋向一致。

4、不同剂量组血常规化验结果

用药48天后,各组存活动物断头采血,计测红细胞、白细胞和血小板三项指标,结果如表2。每个小鼠断头采血时血量也不多,所以每三支或两支小鼠的血集于一起,称之为

表 2 各 组 血 常 规 化 验 结 果

剂 量 (LD50)	n	批 次	红细胞均值及其s. e. (万/mm ³)	批 次	白细胞均值及其s. e. (个/mm ³)	批 次	血小板均值及其s. e. (万/mm ³)
对 照 组	18	6	802±72	5	7640±605	6	19.5±2.0
1/200	17	5	780±18	5	7850±707	6	16.2±1.5
1/100	17	6	731±32	6	6293±824	6	18.6±2.2
1/50	15	5	736±90	5	6400±693	4	16.4±2.7
1/30	11	3	728±45	4	7425±364	2	15.0±1.0

一批次。表中列举了各组三项指标的均值及其标准误差,与对照组相比,各用药组的数据无明显差异($P > 0.05$)。

5、不同剂量组肝、肾功能的化验结果

1/10LD50剂量组用药10天后,其余各组用药48天后断头采血测血清(或血浆)谷丙转氨酶活性和尿素氮含量,结果如表3。用血浆测得的转氨酶活性,经过血清与血浆实测值对比较正后都换算成血清转氨酶活性单位;血清与血浆测得的尿素氮结果一致,不必换算。我们的实验先是用的血清,后因易出现凝血问题而改为采血后抗凝取血浆供实验用。

表 3

各组转氨酶活性及尿素氮含量结果

剂 量 (LD50)	n	批 次	转氨酶活性均值及 s. e. (U)	显著性测验	批 次	尿素氮均值及 s. e. (N2 mg%)	显著性测验
对 照 组	18	5	144±17		5	19.3±1.7	
1/200	17	4	159±20	(P>0.05)	4	22.5±4.3	(P>0.05)
1/100	17	5	147±22	(P>0.05)	5	20.5±2.1	(P>0.05)
1/50	15	5	234±41	(P>0.05)	5	25.5±8.0	(P>0.05)
1/30	11	4	154±32	(P>0.05)	4	19.0±3.9	(P>0.05)
1/10	12	5	161±8	(P>0.05)			
正 常 鼠	21	7	162±8				

结果经统计分析证明各组之间此两项指标的数值无明显差异(P>0.05); 仅1/50LD50组的转氨酶活性较高(234单位), 接近尚显著的边缘。

此外, 在处死前还对1/30LD50以下剂量组和对照组的尿进行了蛋白和沉渣的检查, 未发现异常所见。

三、致突变作用检定

通过Ames回变检定法和日本枯草杆菌修复检定法实验(前者包括用S-9肝药酶激活), 证明农抗“769”在极高剂量时(每皿2000微克)也不具有致突变作用, 可以认为有致癌作用的可能性也很小。

讨 论

主要讨论一下农抗“769”的蓄积毒性问题。假设此药完全不排出也不代谢(100%累积)。则1/5、1/10、1/30、1/50LD50剂量用药5、10、30、50次后动物都应死亡半数, 然而表1的结果死亡率低于50%, 可见上述假设不成立。假设此药24小时毒效蓄积率为80%, 根据公式计算则1/5剂量用药5天后体内应相当0.67LD50, 1/10剂量用药10天后应相当0.45LD50, 由急性LD50实测结果来看, 此种体内存量反应使10%左右的动物死亡, 然而实测数值远高于此。所以认为此药24小时毒效蓄积率约为90%。这样的话, 依

公式推算此药的生物半衰期约为6.5天, 因为 $K = \frac{\ln X_0 - \ln X_t}{t}$, 令 X_0 为 1, t 为 1

天, X_t 知为 0.9 (90%), $\therefore K = \frac{\ln 1.0 - \ln 0.9}{1} = 0.1054$, 而半衰期 $T_{1/2} = \frac{\ln 2}{K}$

$= \frac{0.693}{0.1054} = 6.57$ 天。每天用药一次的话, 坪值(药物在体内蓄积的较恒定的最高水平)

极限约每天用量的10倍, 因为 $(X_n)_{\max} = X_0 = \frac{1 - e^{-nkt}}{1 - e^{-kt}}$, 当 n 为无限大时, $e^{-nkt} =$

0, 而用药间隔 t 为 1, 所以 $(X_n)_{\max} = X_0 \frac{1 - 0}{1 - e^{-0.1054}} = X_0 \frac{1}{1 - 0.9} = X_0$

$\frac{1}{0.1} = 10X_0$ 。达到坪值的时间约为30天, 因为以 $n = 30$ 代入上式则 $(X_n)_{\max} = X_0$

$$\frac{1 - e^{-30 \times 0.1054}}{1 - e^{-1.054}} = X_0 \frac{1 - 0.0423}{1 - 0.9} = X_0 \frac{0.9577}{0.1} = 9.58 X_0, \text{ 这已很接近 } 10 X_0 \text{ 的极}$$

限。事实上亚急性实验中动物死亡也都发生在30天之内。例如,每天用1/100LD50剂量的话,永久用下去,约30天即达相当于0.1LD50的最高水平,以后不会再增加。所以此药虽然蓄积性高,但只要量小就不会有什么问题;实际上此药用于处理种子,由种子成长为植株,而且又经过了植物的一生,就更不应该成为问题了。当然,还需要有残留量测定工作的验证。

小 结

此农抗“769”对雄小白鼠急性灌胃或腹腔注射LD50都约为130mg/kg,属中毒类药物。48天用药的亚急性实验,1/5~1/50LD50剂量时有一定的蓄积毒性,如每天摄入量小于1/100LD50则蓄积毒性不明显。各被试剂量对存活动物的体重增长、血液相和肝肾功能无显著影响。此药的生物半衰期估计约为6天,达到坪值时间约为30天。Ames法和枯草杆菌法证明本药无致突变作用。

参 考 文 献

- [1] 曾广然等 吉林农业科学(4): 61, 1979.
- [2] 吴新兰等 吉林农业科学(1)35, 1979.
- [3] 福州部队总医院 临床医学检验 1978.
- [4] 湖南医学院第二附属医院检验科 临床生化检验 1978.
- [5] B. N. Ames: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. , 72: 2423, 1975.
- [6] B. N. Aes et al: Mutation Res, 31: 347, 1975.
- [7] Hiroshi Tanooka: Mutation Res, 42: 19, 1977.