

# 有机磷农药毒性研究新进展

徐培渝<sup>1</sup>, 吴德生<sup>1</sup>

[关键词] 有机磷农药; 毒性; 研究进展

[中图分类号] R979.8 [文献标识码] A [文章编号] 1006-4028(2004)04-389-04

来自我国农业部门的资料显示, 我国农作物播种面积 2 亿  $\text{hm}^2$ , 化学防治面积达 3.47 亿  $\text{hm}^2$  次, 化学除草面积达 5 000  $\text{hm}^2$ 。估计 1 年中通过化学防治病虫害鼠害减少损失约 600 亿元<sup>[1]</sup>。由此可见施用农药给社会经济带来的益外是巨大的。但使用农药的代价也是巨大的, 那就是农药的毒性给人类和环境带来的不可逆转的不利影响。

长期以来, 农药毒性是农药最重要的副作用之一, 因此而成为毒理学研究领域一个热点。农药毒性决定了农药发展方向及具体品种取舍的关键因素。现代农药发展方向应该是高效、低毒、低残留、与环境相容性好。我国目前使用吨位最大的农药仍为有机磷杀虫剂 (organophosphate insecticides, OPs)、氨基甲酸酯类和拟除虫菊酯类农药, 本文就近年来有机磷农药对健康影响的研究进展作一简单综述。

## 1 有机磷农药一般毒性研究进展

有机磷(OPs)为有机磷酸酯类化合物, 其中毒机制主要是抑制乙酰胆碱酯酶(AchE), 使其失去水解乙酰胆碱(Ach)的能力, 造成胆碱能神经末梢释放的Ach大量蓄积, 兴奋Ach的毒蕈碱受体(M受体)和烟碱能受体(N受体), 产生毒蕈样和烟碱样作用及中枢神经系统症状。OPs急性中毒可引起急性胆碱能危象、迟发性多发性神经病变及中间肌无力综合征3种主要临床表现。临床上OPs中毒病例还出现心脏损害, 心电图和心机病理等多方面的改变。临床观察发现中毒患者在恢复期有猝死现象, 以乐果中毒最多见。乐果可使心肌细胞收缩不规则, 收缩力减弱, 并降低心肌细胞的自发搏动频率, 表现出乐果对心肌细胞有负性肌力作用。胡云平等<sup>[2]</sup>对培养小鼠的心肌细胞的实验研究发现乐果可使心肌细胞的乳酸脱氢酶(LDH)、谷草转氨酶(AST)漏出增加, 细胞膜的通透性改变早于线粒体膜的改变, LDH较AST敏感, 而且随剂量增加心肌细胞损害越严重。

离体心脏灌流研究还发现, 有机磷农药对心肌细胞离子通透有影响, 可能是通过肌浆网钙泵系统刺激了 $\text{Ca}^{2+}$ 的摄取, 使用 $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻滞剂后能缓解有机磷农药的心脏毒性。

有机磷农药及其混配制剂引发中间肌无力综合征(intermediate myasthenia syndrome, IMS)的机制研究近年有不少报道<sup>[3~4]</sup>。研究发现IMS患者的红细胞内胆碱酯酶(ChE)活力持续抑制, 但ChE活力持续抑制者并不都出现肌无力, ChE活力抑制程度与肌无力之间没有明显的相关。重频神经刺激(RNS)-肌电图和电刺激单肌纤维肌电图(SSFEMG)检测结果均揭示IMS患者肌无力的发生与神经肌接头(NMJ)突触后传导异常有关。 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶和 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶是骨骼肌细胞保持兴奋性和完成收缩功能的关键酶。动物试验发现OPs引起的神经肌接头传导功能异常机制可能是 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶和 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP酶活力下降引起肌肉兴奋性减低所致, 以及酪氨酸(Tyr)磷酸化增强和丝氨酸(Ser)磷酸化减弱引起的烟碱乙酰胆碱受体失敏加速, 复敏延迟。IMS的发生与个体的遗传背景有关。OPs经氧化脱硫, 硫醚氧化, 羟化和环化4种途径活化, 其中, 细胞色素氧化酶介导的氧化反应是许多OPs活化的重要途径。而以对氧磷酶(Paraoxonase, PON1)为代表的磷酸三酯的水解作用是许多OPs的主要降解途径, 另外, 谷胱甘肽也参与OPs的解毒, 这3类酶均存在基因多态性, 近来研究发现IMS个体易感性与这些酶基因多态有关系, 为IMS易感人群提供预测方法和提出保护措施有了科学依据。一项研究<sup>[5]</sup>以山东省某地区147名急性OPs患者为研究对象, 采集外周血, 检测全血的ChE活力, 用限制性片段长度多态性、等位基因特异性扩增和单链构象多态性PCR技术, 分别进行CYP2E1(1091C-T)、CYP1A1(4889A-G)、GSTP1(313A-G)、GSTT1和PON1第55位点(L-M)的基因分型分析。结果发现, 在OPs及其混配剂中毒患者中, PON1第55位点含有突变型等位基因、GSTM1及其与GSTT1基因型均

<sup>1</sup> 四川大学华西公共卫生学院 (成都 610041)

第一作者简介: 徐培渝, 女, 硕士, 副教授, 毒理学/分子理毒学, 安全性评价。

发生 IMS 的危险增高。此外, 发生 IMS 还与 OPs 种类有关系, 多数为二甲(氧)基磷酸酯(86.1%), 少数为二乙(氧)基磷酸酯(13.9%)。

近年来农药越来越多以混配制剂使用, 一来可以解决多种病虫害并存, 二来可延缓农药抗性。在我国农药登记品种中, 混配制剂占相当大的比例。孙金秀等<sup>[6-7]</sup>针对我国常用的农药二元制剂模式, 用等毒剂量法评价 3 类杀虫剂(OPs、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯)二元混剂对大鼠急性经口联合作用, 涉及的有机磷农药有: 甲基对硫磷、氧乐果、甲胺磷、辛硫磷、丙溴磷、马拉硫磷、水胺硫磷; 拟除虫菊酯有溴氰菊酯、高效氯氰菊酯、氰戊菊酯; 氨基甲酸酯类有灭多威、异丙威、速灭威。结果发现, 辛硫磷+溴氰菊酯、辛硫磷+高效氯氰菊酯、甲基对硫磷+高效氯氰菊酯+甲氰菊酯毒性增加非常明显, 呈协同作用。辛硫磷+氰戊菊酯属相加作用, 但毒性是相加作用的 1.5 倍, 敌敌畏+溴氰菊酯虽属相加作用, 但其毒性略有下降。有机磷与氨基甲酸酯混配时, 马拉硫磷+异丙威呈协同作用, 毒性有较大增加, 辛硫磷+灭多威, 甲胺磷+速灭威混配时毒性呈相加作用。在混配制剂中, 有机磷之间混配, 有机磷与氨基甲酸酯类混配后, 出现相加作用的多见; 有机磷与拟除虫菊酯混配后出现协同作用或毒性相加的情况较多。拟除虫菊酯在哺乳类动物主要代谢途径是酯酶的水解作用。有机磷增加了拟除虫菊酯毒性的主要机制是抑制水解拟除虫菊酯的酯酶。此外氧化代谢也很重要, 因为有机磷可与拟除虫菊酯毒性类竞争 B-酯酶, 或竞争微粒体氧化酶而使拟除虫菊酯代谢延缓, 从而使毒性增加。当然以一个水平的等毒量剂量的结果来评价联合作用性质是不全面的, 因为不同配比时联合作用的性质也可能是不同的。甲基对硫磷与灭多威混配后对大鼠的急性毒作用降低(毒性比为 0.73), 呈拮抗作用。经代谢研究发现, 2 种农药混配后引起 AchE 抑制时间后延, 脱烷基代谢物和对硝基酚的生成延后。总之, 混剂的毒性改变是农药在体内行为的综合反应, 主要与代谢途径的改变有关。为了预测混配的毒性, 应该分别进行毒物代谢动力学研究。目前已有不少生物农药与化学农药的混配制剂出现, 但缺乏较完整的实验研究。

## 2 有机磷农药遗传毒理学研究进展

癌症的发生与环境 and 饮食有关不容置疑, 农药对人类癌症发生发展的关系一直受到国内外科科学家的关注。职业暴露已经与数种肿瘤性疾病联系起来, 特别是其对复合性骨髓瘤, 非 Hodgkin 氏淋巴瘤,

Hodgkin 氏淋巴瘤, 软组织肉瘤, 以及肺, 胃, 肝, 膀胱癌的影响明显增大<sup>[8]</sup>。在 Richter<sup>[9]</sup>的综述文章中讲到癌症的发生是模糊不清的, 是复杂的。他指出预测长期接触低浓度农药者患癌危险性的必要性。多数实验室和人群监测结果都对农药的遗传毒性做出了肯定的结论。

倪祖尧等<sup>[10]</sup>对 59 种 OPs 与诱发基因突变之间的关系进行了研究。发现有机磷诱发沙门菌回复突变与分子片段所带的基团种类有关, 甲氧磷酰基的阳性概率为 0.557, 可视为阳性结果的特征片段, 而乙基分子片段, 乙氧硫羰磷酰基阳性概率最低, 可视为阴性结果的特征片段。他们的实验提示有机磷诱发细菌回变主要是通过对 DNA 的甲基化, 而磷酸化似乎不加强或直接诱发突变。

人群流行病学调查结果在判断农药的遗传毒性起到决定性的作用。近年来较注重中毒与个体易感性的研究。通过调查农药暴露者遗传损伤与农药暴露之间的关系有助于进一步理解和预防农药对人类健康的损害。常规的遗传毒理学试验和近年来发展起来的新方法都有相关报道。

Garaj 等<sup>[11]</sup>进行了 1 项对于农药混合物职业暴露而导致的基因损害的纵向研究, 在特定人群中对农药混配制剂的遗传毒性进行评估。遗传毒理学试验有染色体畸变分析(CA), 姊妹染色单体交换试验(SCE), 微核试验和彗星实验。研究对象都同时暴露于相同的农药复杂混合物中, 包括莠去津, 甲草胺, 氰草津以及马拉硫磷等。工人从事农药生产 8 个月后第 1 次采集血样, 受试者离开生产环境后 8 个月第 2 次采样。第 1 次采样结果显示暴露者微核增加及染色体畸变率增加, 部分无着丝点染色体断片和具有双着丝点染色体的增加, 姐妹染色单体互换频率及彗星实验结果均为阳性结果。第 2 次采样与第 1 次样本比较, 农药生产工人的染色体畸变、微核率以及彗星实验结果都有显著的下降, 但仍明显高于对照组, 有趣的是 SCE 交换率在非暴露环境下 8 个月后仍没有下降, 提示农药混合物对 DNA 完整性可能存在长期危害。这项研究表明同时采用多种细胞遗传学试验对职业性暴露于农药混合物的人员进行长期的遗传学监测是必要的。

William 等<sup>[12]</sup>的研究不但做了暴露混合农药的遗传毒性, 还探讨了有关代谢酶基因多态性与效应之间的关系。采用染色体畸变试验、染色体诱变试验和荧光原位杂交, 结合细胞色素 P450 系酶系统的 CYP2E1、谷胱甘肽硫转移酶系的 GSTM1 和 GSTT1、PON1 的基因多态研究, 寻找二者之间的关

系。接触的农药有二溴氯丙烷、氯磷硫磷、噻苯哒唑和特丁磷。在诱导突变试验中, 缺乏 GSTM1 纯合子的农民与带有相同基因型的对照相比, 遗传学效应明显增加, CYP2E1 突变等位基因与诱导染色体断裂有显著相关性。携带低解毒 PON 基因(PONA/A)与携带高解毒基因(PONA/B 或 PONB/B)的暴露农民比较, 诱导染色体双着丝点数量明显增加。研究结果表明携带了不利的遗传基因个体对职业危害更敏感。个体解毒酶基因多态性研究对于指导就业, 减少职业危害具有实际意义。

### 3 有机磷农药的神经毒理学研究进展

近年来, 对有机磷农药的神经毒性和中毒耐受性进行了更深入的研究。OPs 对脑突触体自主型受体功能(NAF)的作用不同, 伍一军等<sup>[13]</sup>用体外放射性灌流方法和体内染毒取大脑皮质测定 NAF 和 AchE 活力, 发现对氧磷在体外对 NAF 的影响较小(平均抑制率 < 23%), 主要中毒机制可能是其对 AchE 活力的强烈抑制。毒死蜱在体内和体外都可彻底抑制 NAF(抑制率为 100%), 体内试验显示毒死蜱抑制 90% 的 AchE 的同时, 对 NAF 也有较强大的抑制能力(抑制率为 66%)。已知 NAF 在体内主要是正反馈调节 Ach 的释放, 可以推测当接触毒死蜱时, AchE 活力受到强烈的抑制, 突触间隙和神经肌肉接头处 Ach 堆积, NAF 被抑制, 减少 Ach 的反馈性释放, 有助于毒性缓解。这也许是有机磷中毒时自身防御的一种机制。

有机磷农药不但抑制胆碱酯酶活力, 而且对其受体也有影响, 长期接触有机磷农药, 可引起胆碱能受体减少, 即胆碱能受体的“负向调节”, 其结果可能: ①诱发农药的耐受现象; ②此与多种神经系统慢性疾病有关, 如早老性痴呆, Parkinson 综合症<sup>[14]</sup>。伍一军等<sup>[15~16]</sup>的研究发现, 急性乐果染毒后, 大鼠的 M1、M2 受体密度有下降趋势, 减轻了胆碱亢进的症状。乐果亚急性染毒诱导大鼠耐受实验中<sup>[17]</sup>, 发现用小剂量(25 mg/kg)诱导后, 再用大剂量乐果染毒(最高剂量 100 mg/kg), 血 ChE 有轻度下降, 脑中 ChE 轻度抑制, 未出现中毒症状。但电镜发现神经元已坏死, 受体检测发现 M1 和 M2 密度均下降, 也可能动物形成耐受的同时掩盖了某些潜在的危害。

人类通过生产和生活环境长期接触低剂量的农药, 由此带来的农药耐受问题近年来引起广泛关注。尽管耐受现象于上世纪 50 年代在动物实验中就已经发现, 但目前仍缺乏系统人群资料。有机磷农药诱导耐受的形成机制有几种可能: ①对胆碱能激动剂

的失敏性, 增强代谢解毒机制; ②非胆碱能机制; ③胆碱能突触前机制; ④乙酰胆碱酯酶以及胆碱能受体负向调节机制等方面。目前获支持最多的是胆碱能受体的负向调节机制<sup>[17]</sup>。耐受是否对机体有利? 一般来说, 有机磷农药诱导耐受是以毒蕈碱受体减少为其实验依据, 在受体发生下调的动物中观察到的功能缺失提示, 耐受的形成和维持是以机体的功能损害为代价的。形成耐受的同时, 不出现临床症状, 但是应该注意耐受也许掩盖了长期接触有机磷对人体神经系统的损害。Stocks<sup>[18]</sup>对接触有机磷工人的神经毒性调查研究发现, 农药施药工人的优势手和非优势手的震动感觉阈值较对照组有升高, 提示农药接触同外周神经功能的丧失有一定的联系。横断面调查方法研究还发现长期接触有机磷工人神经系统症状、震动感、运动震颤, 与非施药工人相比有更多的眩晕、嗜睡、头痛以及较高的神经症状评分, 与过去的有机磷中毒史和目前施药有很强的相关性。在健康防护中应注重工人的神经系统症状, 研究防治方案, 保护工人的健康水平。

### 4 有机磷农药的生殖发育毒性研究进展

接触农药对雄性和雌性的生殖功能及幼仔发育都有不同方面的不利影响。近年来在实验室和人群监测都有一些新发现。据估计, 4/1 000 的出生活婴和 35% 的自发性流产与非整倍体有关。已有研究发现接触农药与精子多倍体和亚倍体有密切关系。Recio 等<sup>[19]</sup>进行了接触农药工人精子的非整倍体发生的频率(X, Y 和 18)的尿中 OPs 代谢产物与精子染色体异常之间的关系的研究。XY 染色体比常染色体更易受到损伤。有机磷可诱导烷化 DNA, 形成 DNA 加合物。通过气相和液相色谱方法, 发现这些暴露者精子非整倍体的发生率为 0.67%, 最常见的是性染色体缺失(0.19%), 其次是 XY18(0.15%)。OPs 的代谢产物主要是二甲基磷酸盐、甲基硫酸盐和二乙基磷酸盐(DEP)。研究发现代谢产物中 DEP 与性染色体缺失有关系。还有研究<sup>[20]</sup>发现农药二溴氯丙烷和二氯苯氧基四酸对作业工人的精子质量有明显的影响, 可引起不育。

目前研究发现<sup>[21]</sup>, AchE 在神经发育过程中起着重要作用, 神经系统发育关键时期抑制 AchE 活性, 会影响细胞生长、分化和脑的正常功能。OPs 的急性毒性试验表明, 新生鼠或幼鼠的 ED<sub>50</sub>及脑组织 AchE 的 ED<sub>50</sub> 远低于成年鼠。OPs 引起的迟发性神经病(OPIDN)与年龄有关, 同一种动物的耐受性低龄动物往往高于成年动物, 分别给予 1、3、5、6 月龄的大鼠相同剂量的可致迟发性神经病的 OPs, 结果发现

所有 6 月龄大鼠均出现明显的 OPIDN, 3、5 月大鼠症状轻微, 而 1 月龄的大鼠没有任何症状, 这种差异可能与神经再生及修复能力有关。研究发现早期接触 OPs 可能会对发育中的神经系统产生长远影响。目前认为, 未成年动物脑组织 AchE 活性对 OPs 毒性反应较成年动物敏感, 较低的剂量即可脑组织 AchE 较大的抑制, 而且恢复时间早于成年动物。许多证据表明 AchE 在脑发育的关键时期作为神经营养因子, 起着信息联系与终止细胞复制并促进胆碱能靶部位细胞分化和结构构建的功能。OPs 通过在神经发育期影响 AchE 活性、DNA 与蛋白质合成, 从而对未成年动物神经发育造成长远损害。虽然报道认为人类接触 OPs 不影响妊娠结局, 也许没有任何症状表现时, 其婴幼儿神经细胞发育就已经产生了影响。

## 5 结语

有机磷农药是一个传统的高中毒农药, 但对农药的评价应该全面考虑和权衡其对各个方面的影响和作用, 不仅要考虑农药对使用者、消费者以及自然环境的有害影响, 也要考虑这种农药对农业生产的贡献。为使农药对健康影响减少到最低限度, 正确施药, 作好个人防护是很重要的措施。某些人群遗传毒性调查阴性结果表明, 减少农药接触是有效的。农药中毒机制的研究为评价和防护提供了决策时必要的科学依据。发展低毒高效的农药替代目前仍广泛使用的高中毒有机磷农药是避免农药危害健康最根本的措施。

## 6 参考文献

- [1] 胡笑彤. 环境友好的化学农药仍是 21 世纪全球植物保护主体—概述世界农药技术与发展趋势 [A]. 农药第二届农药交流论文集 [C]. 杭州: 中国农业协会, 中国化工信息中心, 2002: 54-70.
- [2] 胡云平, 周志俊, 孙运光, 等. 乐果对培养乳鼠心肌培养细胞的毒作用 [J]. 卫生毒理学杂志, 2000, 14(4): 209-211.
- [3] 肖诚, 牛勇, 何凤生. 大鼠急性有机磷杀虫剂及其混剂中毒的单肌纤维肌电图研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2002, 20(2): 125-127.
- [4] Furlong CE, Li WF, Costa LG, et al. Genetically determined susceptibility to organophosphorus insecticides and nerve agents: developing a mouse model for the human PON1 polymorphism [J]. Neurotoxicology, 1998, 19(8): 645-650.
- [5] 肖诚, 何凤生, 郑玉新, 等. 有机磷杀虫剂中毒致中晚期肌无力综合症的遗传易感性研究 [J]. 中华预防医学杂志, 2003, 37(4): 259-262.
- [6] 孙金秀, 陈波, 姚佩佩. 农药混剂联合毒性评价 [J]. 卫生研究, 2000, 29(2): 65-66.
- [7] 孙金秀, 陈波, 姚佩佩. 有机磷与拟除虫菊酯农药联合作用的毒性评价 [J]. 卫生毒理学杂志, 2000, 14(3): 141-144.
- [8] Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review. of human biomonitoring studies [J]. Mutation Res, 2003, 543: 251-272.
- [9] Richter ED, Chlamtac N, Ames, Pesticides, and cancer revisited [J]. Inter J of Occupa & Environ Health. 2002, 8(1): 63-72.
- [10] 倪祖尧, 刘玉清, 李寿祺, 等. 有机磷片段与 Ames 试验诱变的关系研究 [J]. 华西医科大学报, 1994, 25(1): 78-82.
- [11] Garaj - Vrhovac Davor Zejezic. Cytogenetic monitoring of croatian population occupational exposed to a complex mixture of pesticides [J]. Toxicology, 2001, 165-162.
- [12] Garaj - Vrhovac Davor Zejezic. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide using single-cell gel electrophoresis(SCGE) assay [J]. Muta Res. 2000, 469: (1)279-285.
- [13] Au WW, Sierra - Torres CH, Cajas - Salazar, et al. Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility [J]. Environ Health Perspect 1999, 107(6): 501-505.
- [14] Shiozaki K, ISEKI E, Uchiyama H, et al. Alternations of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in diffuse lewy body disease: relation to Alzheimer's disease [J]. Int J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1999, 67: 209-213.
- [15] 伍一军, 孙英健, 鲍凯瑞. 有机磷类杀虫剂对脑突触体烟碱型自主受体功能的影响 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2003, 21(3): 188-190.
- [16] 伍一军, 孙英健, 鲍凯瑞. 乐果对大鼠脑毒蕈碱受体的影响及其与胆碱酯酶的关系 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2003, 21(3): 188-190.
- [17] 孙运光, 周志俊, 胡云平, 等. 乐果亚急性染毒诱导大鼠耐受以及对大鼠脑组织 M 受体的影响 [J]. 环境与职业医学, 2003, 20(3): 154-158.
- [18] Stocks L, Stark A, Marshall E, et al, Neurotoxicity among pesticide applicators exposed to organophosphates [J]. Occup and Environ Med, 1995, 52: 648-653.
- [19] Recio N, Nell V, Tompson ML, et al. Organophosphorus pesticide exposure increases the frequency of sperm sex null aneuploidy [J]. Environmental Health Perspective 2001, vol1109, 1237-1240.
- [20] Sheiner EK. Hammel RD. Effect of occupational exposures on male fertility literature review [J]. Industrial Health. 2003, 41(2): 55-62.
- [21] 李涛. 国外有机磷农药神经发育毒性研究 [J]. 国外医学卫生学分册, 2001 28(5): 257-261.

(收稿日期: 2004-03-31)