

霍恩氏法与序贯法在急性经口毒性试验中应用研究

于春¹, 李军^{2*}, 岑延利², 王祺², 秦旭¹

(1. 贵州医科大学公共卫生学院中心实验室, 贵州贵阳 550004; 2. 环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州贵阳 550004)

摘要 [目的]探讨序贯法作为农药急性毒性替代方法的可靠性、可操作性以及该方法的优缺点。[方法]采用序贯法与霍恩氏法分别测定6种农药制剂的急性经口半数致死剂量(LD₅₀)和95%可信区间,比较2种方法获得的急性毒性分级和试验所用动物数量。[结果]序贯法测得的LD₅₀与霍恩氏法相近,毒性分级与霍恩氏法均一致;但序贯法试验使用动物数量减少了52.3%。[结论]序贯法测定农药急性经口LD₅₀具有明显优势,用于农药急性经口毒性检测具有广阔前景。

关键词 序贯法;霍恩氏法;半数致死剂量(LD₅₀);急性经口毒性试验

中图分类号 R99 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)21-0007-02

Application of Horn's and Dixon-Mood in Acute Oral Toxicity Test of Pesticides

YU Chun¹, LI Jun^{2*}, CEN Yan-li² et al (1. School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004; 2. Key Laboratory of Ministry of Education by Environmental Pollution and Disease Control Laboratory, Guiyang, Guizhou 550004)

Abstract [Objective] The aim was to explore Dixon-Mood as pesticide acute toxicity alternative methods of reliability and operability and the advantages and disadvantages of this method. [Method] The median lethal dose (LD₅₀) and 95% confidence intervals of 6 pesticides were detected by Dixon-Mood and Horn's, and the two acute toxicity classifications and the animal consumption of the two methods were compared. [Result] The LD₅₀ and 95% confidence intervals of the Dixon-Mood were similar with those of the Horn's, and the animals could be economized by 52.3% with the Dixon-Mood compared with those of the Horn's. [Conclusion] The Dixon-Mood determination of pesticide acute transoral LD₅₀ has obvious advantages, and has wide prospect in the pesticide acute transoral toxicity testing.

Key words Dixon-Mood; Horn's; Median lethal dose (LD₅₀); Acute toxicity

急性毒性试验是农药进行毒理学安全性评价的基础研究^[1],半数致死剂量(LD₅₀)是对化学品进行急性毒性分级的基础标准,传统的测定LD₅₀的方法如寇氏法、霍恩氏法,使用动物较多,工作量较大,浪费资源,与“3R”原则相悖。近年来,美国环保局(EPA)和经济合作和发展组织(OECD)已发布了数种急性替代试验的方法,如序贯法(UDP,又称上-下法)、固定剂量法、急性毒性等级法等^[2-4]。笔者采用序贯法测定了6种农药的LD₅₀,研究了序贯法的具体操作方法及序贯法的统计软件AOT425 StatPgm的使用,并通过与传统的霍恩氏法比较,探讨了序贯法作为农药急性毒性替代方法的可靠性、可操作性和优缺点,旨在为农药急性经口毒性检测研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物。选用6个毒性级别不同的常用农药制剂,由山东省某农药企业提供。所有样品依次标号为A~F,样品均用蒸馏水配制成适当浓度。

1.1.2 试验动物。成年健康SD雌性大鼠,体重180~220 g,由贵州医科大学实验动物中心提供,动物生产许可证号:[SCXK(黔)2012-001]。试验前7 d检疫使动物适应实验室环境,动物饲料由贵州医科大学实验动物中心提供,动物饲养于SPF级动物房。

1.1.3 仪器。AG-285型电子天平为瑞士梅特勒-托利多公司产品。

1.2 方法

1.2.1 霍恩氏法^[5]。由预试验和正式试验组成,预试验根据相似结构化学物获取受试物的有关毒理学资料确定受试物预试验的染毒剂量;正式试验剂量系列可按预试验结果来确定,将动物随机分为4组,每组4只动物。受试物按不同剂量用蒸馏水稀释,按0.01 mL/g灌胃,染毒后密切观察和详细记录动物出现的异常表现及每组动物的死亡数和死亡时间。所有染毒动物的观察期为14 d。

1.2.2 序贯法^[6]。序贯法是一个阶梯式的染毒程序。使用单一性别的动物,一次染毒1只。第1只动物的染毒剂量最好低于LD₅₀的估计值。后续动物染毒剂量的增减取决于前一只动物的染毒结果(存活或死亡);在不能获得受试物LD₅₀的初步估计值及剂量-反应曲线斜率资料时,计算机模拟结果提示起始剂量可选择175 mg/kg,采用0.5的反对数(对应于一个默认的剂量级数因子3.2)计算剂量间距。以最大似然法计算LD₅₀的点估计值和95%可信区间。

1.2.3 评价方法。霍恩氏法根据14 d内每组动物死亡数量,以传统实验方法的GHS毒性分级作为评价标准。序贯法是将每次染毒剂量及动物的结果输入计算机AOT 425程序,程序自动给出试验的终点剂量,并计算LD₅₀和95%可信区间。同时以霍恩氏法计算传统实验方法所需的实验动物数和实验时间作为参照,观察序贯法在动物数量上的优劣。

1.3 数据处理 采用SPSS 17.0统计软件对使用动物数进行秩和检验。

2 结果与分析

2.1 霍恩氏法和序贯法测定6种农药的LD₅₀及毒性分级 由表1可知,使用2种方法所得6种农药的毒性分级结果均一致;微毒组受试物LD₅₀一致;低毒和中毒组受试物

作者简介 于春(1984—),女,黑龙江尚志人,实验师,硕士,从事农药毒理学研究。*通讯作者,副教授,博士,从事农药毒理学、食品毒理学研究。

收稿日期 2017-05-17

LD₅₀相近。对 2 种方法测得的 LD₅₀进行秩和检验,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 霍恩氏法和序贯法测定 6 种农药急性经口 LD₅₀ 的比较
Table 1 The LD₅₀ of pesticides detected by Dixon-Mood and Horn's

样品编号 Sample No.	样品名称 Sample name	霍恩氏法 Horn's			序贯法 Dixon-Mood		
		LD ₅₀	95% 可信区间 95% confidence interval	毒性分级 Toxicity grading	LD ₅₀	95% 可信区间 95% confidence interval	毒性分级 Toxicity grading
A	30% 灭蝇胺悬浮剂	>5 000.0		微毒	>5 000.0		微毒
B	80% 噻霉胺水分散颗粒	>5 000.0		微毒	>5 000.0		微毒
C	45% 咪鲜胺微乳剂	3 160.0		低毒	2 958.0	1 750 ~ 5 000	低毒
D	5% 阿维·噻螨酮微乳剂	2 150.0	1 380 ~ 3 360	低毒	2 505.0	1 750 ~ 5 000	低毒
E	10% 高效氯氟氰菊酯水乳剂	68.0		中毒	55.0	20 ~ 79	中毒
F	20% 阿维·毒死蜱微乳剂	147.0	78 ~ 275	中毒	310.2	175 ~ 550	中毒

2.2 霍恩氏法和序贯法测定 6 种农药使用动物数 由表 2 可知,霍恩氏法测定 6 种农药共使用了 72 只动物(雌性),序贯法则使用了 34 只动物,相比之下节约了 38 只动物(减少了 52.3%),对 2 种方法所用动物数进行秩和检验,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 霍恩氏法和序贯法使用单性别动物(雌性)数比较
Table 2 Comparison of female animals used by Dixon-Mood and Horn's

样品编号 Sample No.	霍恩氏法 Horn's	序贯法 Dixon-Mood	序贯法节约 The saving number of Dixon-Mood
A	4	3	1
B	4	3	1
C	16	6	10
D	16	7	9
E	16	9	7
F	16	6	10
合计 Total	72	34	38

3 结论与讨论

霍恩氏法是目前国内应用广泛的急性毒性试验方法之一,也是我国现行《农药登记毒理学试验》(GB 15670—1950)规定使用的急性经口 LD₅₀测定方法。霍恩氏法能得到较精确的 LD₅₀,方法简单易行,故应用至今。序贯法于 1987 年被美国测试与材料协会(ASTM)采用^[6]。OECD 也将序贯法作为传统急性毒性试验方法的替代方法,在 2001 年正式采纳^[7]。我国国家食品药品监督管理局颁布的化学药物急性毒性试验技术指导原则也推荐使用该方法^[8]。

研究表明,雌性动物对化学物质的敏感性一般大于或等于雄性动物,所以序贯法推荐使用单性别的雌性动物^[9-10]。

该研究表明,霍恩氏法和序贯法测定的 6 种不同毒性级别的农药 LD₅₀数据接近,毒性分级均一致,提示序贯法试验评价农药急性毒性有普遍适用性和准确度。该研究中,霍恩氏法(单性别试验)共使用 72 只动物,而序贯法共使用 34 只动物,相比之下节约了大量动物,也节省了人力、物力,这是序贯法的最大优点。为便于序贯法试验数据的分析,美国 EPA 开发了计算机软件 AOT 425 程序,研究者只需将每次的给药剂量及动物情况输入程序,程序就会自动给出试验的终点剂量,并计算出 LD₅₀及其可信区间,避免了纷繁复杂的计算过程,实用性较强,较霍恩氏法更优越。序贯法能应用最少的动物评估受试物的急性经口毒性,是传统急性毒性试验的一种优良替代方法。

参考文献

[1] 连勇,徐培瑜,孙强.上-下法替代实验与 Horn's 法测定 LD₅₀的试验研究[J].现代预防医学,2008,35(18):3591-3593.
[2] OECD. Acute oral toxicity-fixed dose procedure. OECD guidelines for the testing of chemicals (NO. 425)[S]. [s.l.]:OECD,2001.
[3] OECD. Acute oral toxicity-up-and-down procedure. OECD guidelines for the testing of chemicals,425[S]. [s.l.]:OECD,2001:1-26.
[4] 肖经纬,崔涛,孟会林,等.3 种急性经口毒性试验方法的比较[J].毒理学杂志,2007,21(2):135-136.
[5] 国家技术监督局.农药登记毒理学试验方法:GB 15670—1995[S].北京:中国标准出版社,1996.
[6] OECD. OECD guideline for the testing of chemieals. Test guideline 425, acute oral toxicity-up-and-down procedure[S]. [s.l.]:OECD,2008.
[7] ASTM. Standard test method for estimating acute oral toxicity in rats[S]. Philadelphia Pa,USA: American Society for Testing and Materials,1987:1163-1187.
[8] 李佳,金品,黄芝瑛.上下法在急性毒性试验中的应用进展[J].中国比较医学杂志,2008,18(6):70-72.
[9] 林心君,许茜,刘赞,等.石斛合剂序贯法治疗糖尿病大鼠的基因和蛋白表达谱之糖代谢研究[J].中华中医药学刊,2014,32(12):2857-2860.
[10] 张林媛,孙金秀.上下增减剂量法与 Horn's 测定 LD₅₀研究[J].卫生毒理学杂志,2003,17(4):234-236.

(上接第 3 页)

[6] 陈玉娟,张宏桂,王会堂,等.水曲柳镇痛抗炎活性研究[J].时珍国医国药,2008,19(4):780-781.
[7] 王淑艳.论东北水曲柳的育苗技术[J].生物技术世界,2015(10):45.
[8] 林士杰,张忠辉,谢朋,等.中国水曲柳基因资源的保护与利用[J].中国农学通报,2009,25(24):158-162.
[9] 王广发,庄发明,赵俊昌.长白山林区水曲柳人工更新方式的研究[J].吉林林业科技,2006,35(3):13-18.
[10] 陈晓芳,凌宪法,王钦刚,等.水曲柳人工林生长特性研究[J].吉林林业科技,2006,35(5):1-6.
[11] 谷安根,陆静梅,王立军.维管植物演化形态学[M].长春:吉林科学技术出版社,1993.

[12] 王丽芳,于秋雪,朱俊义,等.不同生态环境蒙古栎的解剖结构差异分析[J].农业与技术,2015,35(3):64-65.
[13] 王丽芳,吴东梅,陆静梅.阴生与阳生植物形态结构差异分析[J].吉林农业,2014(12):18.
[14] 叶龙华,黄香兰,薛立.干旱对树木叶片性状及抗旱生理的影响[J].世界林业研究,2014,27(1):29-34.
[15] 常英俏,徐文远,穆立蕾,等.干旱胁迫对 3 种观赏灌木叶片解剖结构的影响及抗旱性分析[J].东北林业大学学报,2012,40(3):36-40.
[16] 吴建慧,崔艳桃,赵倩竹,等.干旱胁迫下委陵菜和翻白委陵菜叶片结构和生理指标的变化[J].草业科学,2013,30(9):1369-1373.