

应用基准剂量法探讨氯吡硫磷的参考剂量

何贤松, 李亭亭, 乙楠楠, 吴 惠, 王 霞, 赵敏娴, 王灿楠

(东南大学公共卫生学院营养与食品卫生学系教育部环境医学与工程重点实验室, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 应用基准剂量(BMD)法探讨氯吡硫磷(毒死蜱)的参考剂量。方法 80 只清洁级成年雌性 SD 大鼠, ig 给予氯吡硫磷 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 和 16 mg·kg⁻¹, 每天 1 次, 连续 21 d。21 d 后处死大鼠测定大鼠大脑皮质、海马和血清中乙酰胆碱酯酶(AChE)活性, 观察氯吡硫磷的未观察到损害作用剂量。采用 R 语言的 PROAST28.1 软件包计算 BMD 及其下限值, 将 BMD 下限值除以安全系数 100 得到氯吡硫磷的参考剂量。结果 与正常对照组相比, 氯吡硫磷 4, 8 和 16 mg·kg⁻¹ 使大鼠海马中 AChE 活性明显降低 ($P < 0.01$); 氯吡硫磷 2, 4, 8 和 16 mg·kg⁻¹ 使大鼠皮质中 AChE 活性明显降低 ($P < 0.01$); 而氯吡硫磷 1, 2, 4, 8 和 16 mg·kg⁻¹ 使大鼠血清中 AChE 活性明显降低 ($P < 0.01$)。随着氯吡硫磷染毒剂量的增加, 大鼠海马、皮质和血清中的 AChE 活性表现出下降趋势。以 AChE 活性作为指标, 海马、皮质和血清中氯吡硫磷的未观察到损害作用剂量分别为低于 2.0, 1.0, 0.5 mg·kg⁻¹ 的剂量, BMD 分别为 0.81, 0.90 和 0.41 mg·kg⁻¹, 参考剂量分别为 5.5, 4.6 和 3.6 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; 为人类膳食安全, 将氯吡硫磷的参考剂量定为 3.6 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。结论 BMD 法可制定比未观察到损害作用剂量法更加安全的参考剂量, 并可以进一步应用于膳食暴露风险评估。

关键词: 氯吡硫磷; 乙酰胆碱酯酶; 基准剂量; 参考剂量

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002(2013)02-0289-05

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.02.028

氯吡硫磷(毒死蜱, chlorpyrifos)作为替代高毒农药的高效、低毒和低残留杀虫剂, 现已成为我国有机磷类杀虫剂的主导品种。随着氯吡硫磷的大量生产和广泛使用, 由其引起的农药残留也随之成为我国的主要食品安全问题。对氯吡硫磷残留进行风险评估, 可以提高对农药残留安全性问题的认识, 同时促进监管部门制定相应的安全标准并做出有效的预防和治理措施, 从而减少氯吡硫磷残留导致的食品安全问题。膳食暴露评估是风险评估的关键、核心步骤, 其目的是求得危害物的暴露剂量或水平, 通过比较膳食暴露剂量与参考剂量来评价人群是否存在风险^[1]。

通常的参考剂量均是以无不良作用水平(no-adverse-effect level, NOAEL)为依据, 经过安全系数和不确定因素的校正计算得出。然而, 该方法因其结果受实验组数、每组实验动物数、剂量间隔宽窄等因素影响, 准确性不高, 其合理性受到了广泛质疑, 越来越多的研究者建议以基准剂量(BMD)法

代替 NOAEL 法。Crump^[2]于 1984 年首次提出 BMD 法, 他将 BMD 定义为通过剂量-反应曲线获得的、使某种反应增加到某一个特定水平的剂量水平。该特定剂量水平所对应的反应称为基准反应。BMD 法拓展了可用的剂量-反应数据的使用范围, 且对剂量-反应数据中的不确定性进行了量化, 因此在推导生物接触限值时, BMD 法是一种更科学、更先进的方法^[3]。

氯吡硫磷的主要作用机制是通过抑制神经组织中的乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)活性而引起中毒反应, 成年大鼠给予低剂量氯吡硫磷后虽不出现行为的变化, 但皮质、海马和血液等组织会出现明显的 AChE 活性抑制作用。本研究以氯吡硫磷为研究对象, 参照 BMD 法^[4-5], 通过动物实验计算氯吡硫磷的参考剂量, 以期为我国有机磷农药膳食暴露评估提供数据和科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂及动物

氯吡硫磷, 浓度为 480 g·L⁻¹, 购自美国陶氏益农公司, 用蒸馏水配成所需浓度。大鼠 AChE 测定试剂盒和考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒, 购自南京建成科技有限公司。

基金项目: 国家自然科学基金(81072304)

作者简介: 何贤松(1986-), 男, 硕士研究生, 主要从事食品安全与食品功效研究。王灿楠(1958-), 女, 教授, 硕士生导师, 主要从事营养与食品卫生学研究。

通讯作者: 王灿楠, E-mail: wcnsu@126.com, Tel: (025)83272568

1.2 动物、分组给药和体质量测定

80 只清洁级成年雌性 SD 大鼠,体质量 180 ~ 220 g,由浙江省实验动物中心提供。动物许可证号: SCXK(浙)2008-0033。参照 Slob 等^[5]推荐的 BMD 法,以大鼠急性毒性^[6]1/10 LD₅₀作为高剂量,按 2 倍等比级数分别 ig 给予大鼠氯吡硫磷 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 和 16.0 mg·kg⁻¹ (10 ml·kg⁻¹),每天 1 次,连续染毒 21 d。另设一个正常对照组,每组 10 只。每隔 5 d 称体质量一次,并根据体质量调整给药量。实验期间观察大鼠的一般情况、中毒症状和体质量变化。

1.3 胆碱酯酶活性的测定及 NOAEL 剂量的确定

于末次染毒 6 h 后,经乙醚麻醉^[7],通过股动脉收集未抗凝全血,395 × g 离心 8 min 后,取血清。颈椎脱臼处死,分离大脑皮质和海马,分别称质量后加 9 倍生理盐水制成 10% 匀浆,2150 × g 离心 10 min 取上清。上述所有样本均于 -80℃ 冰箱保存待测。按试剂盒说明书分别测定大鼠海马、皮质和血清中的胆碱酯酶活性。

氯吡硫磷各组大鼠海马、皮质和血清中胆碱酯酶活性与正常对照组比较,无统计学差异的最高染毒剂量确定为氯吡硫磷的 NOAEL 剂量。

1.4 氯吡硫磷基准剂量的计算

将氯吡硫磷的剂量和大鼠在海马、皮质和血清中相对应的 AChE 的数值导入 R 语言,采用 PROAST28.1 软件包自动拟合,采用表 1 各剂量-反应数学模型^[8-9]对各指标进行拟合优度检验,选择对数似然值最小的作为最合适的剂量-反应模型。计算 BMD 及其 BMD 下限值。基准反应设定为 0.10,即认为大鼠 AChE 活性相对下降 10% 会引起毒效应^[3],可信限水平为 95%。

Tab.1 Dose-response model for benchmark dose determination

Model	Formula
1	$y = a$
2	$y = a \exp(b x)$
3	$y = a \exp(b x^d)$
4	$y = a [c - (c - 1) \exp(-b x)]$
5	$y = a [c - (c - 1) \exp(-b x^d)]$

Y is cholinesterase activity, X is chlorpyrifos dose, in mg·kg⁻¹. Parameters: a, background level of the endpoint; b, relative efficacy of dose; c, maximum effect (relative to a); d, shape or curvature.

1.5 人的氯吡硫磷参考剂量的确定

由于种属差异,需要把动物实验得出的剂量外推到人类的参考剂量,需要将其缩小一定倍数来校正误差,将大鼠由 AChE 活性的 NOAEL 和 BMD 下限值除以安全系数 100 得到人的毒死蜱参考剂量。

1.6 统计学分析

实验结果数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。体质量采用重复测量设计资料的方差分析方法;胆碱酯酶活性采用单因素方差分析,组间比较采用 Dunnett-t 检验。

2 结果

2.1 氯吡硫磷对大鼠体质量的影响

给药期间,氯吡硫磷组未出现明显的中毒症状,体质量呈正性增长(表 2)。氯吡硫磷不同剂量组的体质量增长速度不同 ($P < 0.01$),随着染毒剂量的增加体质量增加速度减慢。与正常对照组比较,氯吡硫磷 16.0 mg·kg⁻¹ 组大鼠体质量在第 5 天,第 10,第 15 和第 21 天显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

Tab.2 Effect of chlorpyrifos on body mass of rats

Chlorpyrifos/ mg·kg ⁻¹	Body mass/g				
	1	5	10	15	21 (d)
0.00	217 ± 12	220 ± 13	238 ± 14	248 ± 14	254 ± 14
0.25	220 ± 9	228 ± 12	239 ± 13	249 ± 12	254 ± 15
0.50	219 ± 14	222 ± 15	233 ± 13	239 ± 12	242 ± 19
1.00	214 ± 12	215 ± 12	228 ± 12	237 ± 11	243 ± 12
2.00	212 ± 17	223 ± 13	239 ± 17	243 ± 15	248 ± 17
4.00	220 ± 10	229 ± 9	238 ± 13	248 ± 12	252 ± 12
8.00	218 ± 11	228 ± 13	243 ± 12	246 ± 12	251 ± 16
16.00	210 ± 13	203 ± 21*	212 ± 22**	224 ± 24**	227 ± 25**

SD rats were ig given chlorpyrifos 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 16 mg·kg⁻¹, respectively, once daily, for 21 d, while rats in normal control (chlorpyrifos 0 mg·kg⁻¹) group were ig given the same volume of water. All rats were sacrificed and weighed at 6 h after the last administration. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with normal control (chlorpyrifos 0 mg·kg⁻¹) group.

2.2 氯吡硫磷对大鼠海马、皮质、血清中的乙酰胆碱酯酶活性的影响及 NOAEL 剂量

由表 3 可知,随着氯吡硫磷染毒剂量的增加,大鼠海马、皮质和血清中的 AChE 活性表现出下降趋势;与正常对照组比较,氯吡硫磷 4, 8 和 16 mg·kg⁻¹ 组的海马 AChE 活性明显降低;氯吡硫磷 2, 4, 8 和 16 mg·kg⁻¹ 使大鼠皮质中 AChE 活性明显降低 ($P < 0.01$);氯吡硫磷 1, 2, 4, 8 和 16 mg·kg⁻¹ 使大鼠血清中 AChE 活性明显降低 ($P < 0.01$)。

NOAEL 剂量是在规定的暴露条件下,通过实验观察,并与相应的对照机体比较,该种物质不引起机体任何作用的最高剂量或浓度^[10-11]。在本实验条件下,由表 3 可知,以海马、皮质、血清中 AChE 活性作为观察指标,氯吡硫磷的 NOAEL 剂量分别为低于 2.0, 1.0 和 0.5 mg·kg⁻¹。

Tab.3 Effect of chlorpyrifos on the hippocampus, cortex and serum acetylcholinesterase activity in rats

Chlorpyrifos/ mg·kg ⁻¹	Acetylcholinesterase activity/kU·g ⁻¹ protein		
	Hippocampus	Cerebral cortex	Serum ^a
0.00	0.33 ± 0.13	0.37 ± 0.12	42.0 ± 6.4
0.25	0.34 ± 0.09	0.40 ± 0.07	39.5 ± 6.0
0.50	0.38 ± 0.14	0.33 ± 0.06	37.9 ± 6.4
1.00	0.30 ± 0.14	0.32 ± 0.08	27.3 ± 4.8**
2.00	0.33 ± 0.10	0.26 ± 0.07**	22.6 ± 6.3**
4.00	0.23 ± 0.06**	0.15 ± 0.04**	15.2 ± 4.8**
8.00	0.15 ± 0.05**	0.08 ± 0.02**	6.7 ± 3.0**
16.00	0.14 ± 0.04**	0.08 ± 0.03**	3.5 ± 1.8**

See Tab.2 for rat treatments. a: unit of acetylcholinesterase activity in serum was kU·L⁻¹. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ** $P < 0.01$, compared with normal control (chlorpyrifos 0 mg·kg⁻¹) group.

2.3 氯吡硫磷的基准剂量的确定

Proast 软件包绘制拟合的剂量反应关系曲线(图 1 ~ 图 3)结果显示,随着氯吡硫磷染毒剂量的增加,大鼠海马、皮质和血清中 AChE 活性表现出下降趋势。由 Proast 软件各模型经拟合优化和计算得到氯吡硫磷在海马、皮质和血清的 BMD 分别为 0.81, 0.90 和 0.41 mg·kg⁻¹, 95% 可信区间下限值分别为 0.55, 0.46 和 0.36 mg·kg⁻¹。

2.4 人的氯吡硫磷参考剂量的计算

将大鼠依据 AChE 指标的 NOAEL 剂量和 BMD 下限值除以安全系数 100 得参考剂量。由表 4 可见, BMD 法得到的参考剂量均低于未观察到损害作用剂量法得到的参考剂量;用 BMD 法计算的以 AChE 为指标的参考剂量间差异小于未观察到

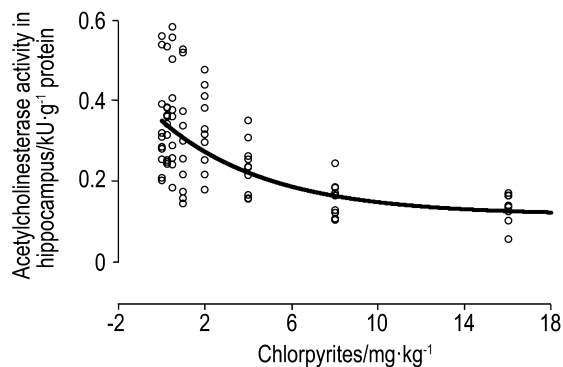


Fig.1 Effect of chlorpyrifos on hippocampus acetylcholinesterase activity in rats. See Tab.2 for rat treatments.

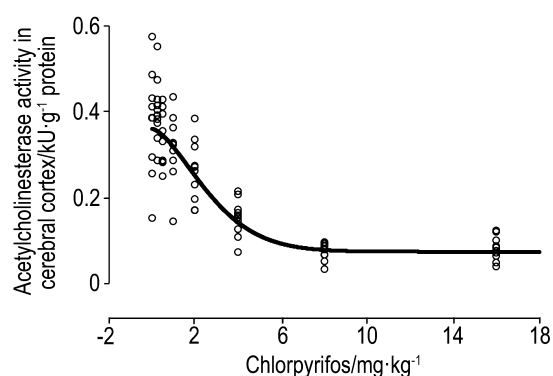


Fig.2 Effect of chlorpyrifos on cerebral cortex acetylcholinesterase activity in rats. See Tab.2 for rat treatments.

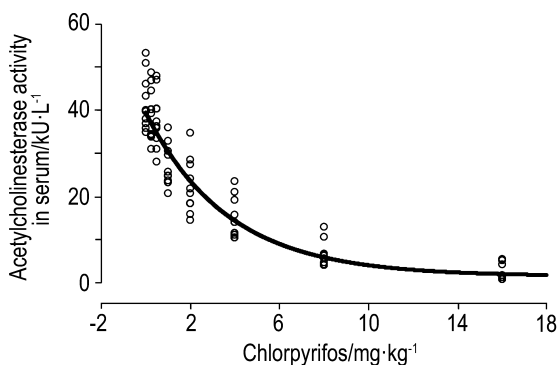


Fig.3 Effect of chlorpyrifos on serum acetylcholinesterase activity in rats. See Tab.2 for rat treatments.

损害作用剂量法。基于对人类膳食安全角度考虑,可将氯吡硫磷的参考剂量定为 3.6 μg·kg⁻¹。

Tab.4 Reference dose of chlorpyrifos

Method	Reference dose of chlorpyrifos/μg·kg ⁻¹		
	Hippocampus	Cerebral cortex	Serum ^a
NOAEL	20.0	10.0	5.0
BMD	5.5	4.6	3.6

NOAEL: no-adverse-effect level; BMD: benchmark dose. a: unit of acetylcholinesterase activity in serum was kU·L⁻¹.

3 讨论

目前, BMD 法因其诸多优点受到了研究者的青睐^[12], 但是不同的实验设计得出的 BMD 会存在一定的差异, 而合理的实验设计能使计算出的 BMD 更加稳定。Slob 等利用计算机模拟的方法证明样本量和剂量组的设置是影响 BMD 稳定性的两大重要因素: ① 样本量越大, 得出的 BMD 越精确和稳定; ② 在总样本量一定的情况下, 适当的增大实验组数能使结果更稳定; ③ 高剂量组要能产生一定的生物学效应, 最低剂量组要接近临界效应量, 通常小于临界效应量。Kuljus 等^[13]研究表明当实验效应指标为连续性资料时设置 5~6 个剂量组是最合适的选择。Woutersen 等^[14]通过动物实验研究证明在动物总数相等的条件下, 设置 7 个剂量组的实验设计比 4 个剂量组得出的 BMD 更加可靠。本研究参考以上设计原则设计实验并设置了 7 个剂量组, 得出大鼠大脑皮质和海马的 BMD 分别为 0.81 和 0.90 mg·kg⁻¹, 这与美国环境保护署通过收集以往的氯吡硫磷毒性实验数据计算出的 0.83 mg·kg⁻¹ 相吻合。本研究应用 BMD 法得出的氯吡硫磷参考剂量 3.6 μg·kg⁻¹ 低于 NOAEL 法得出的值 5.0 μg·kg⁻¹, 同时也低于 Zhao 等^[15]通过研究确定的氯吡硫磷参考剂量 10.0 μg·kg⁻¹; 若在膳食暴露评估中利用 BMD 代替 NOAEL 会得出更多的存在风险的人群, 说明用 BMD 法得出的参考剂量值比 NOAEL 法更安全, 这将有利于监管部门制定和实施更有效的预防和治理措施。

由于实验设计不同和观察的效应指标不同结果均会出现差异。本研究以海马、皮质中 AChE 活性下降 10% 作为效应指标计算出的 BMD 分别为 0.81, 0.90 mg·kg⁻¹, 均大于以血清为效应指标得出的 0.41 mg·kg⁻¹。Zheng 等^[16]研究了氯吡硫磷经口暴露的神经毒性, 通过动物实验得出大鼠脑组织中胆碱酯酶活性相对下降 50% 的氯吡硫磷剂量 3.3 mg·kg⁻¹ 高于血浆的剂量 1.5 mg·kg⁻¹, 其结论与本研究结果一致。这可能与血液组织中的 AChE 对氯吡硫磷的敏感性和抑制后的重活化能力强于脑组织有关^[6]。Moser 等^[7]通过实验表明, 大鼠脑组织中的 AChE 重活化需要很长一段时间, 而全血和红细胞的 AChE 2 周就能够完全重活化, 这说明血液组织中的 AChE 抑制后重活化能力强于脑组织, 也说明以血清中胆碱酯酶活性强度确定参考剂量较为合理。

综上所述, BMD 法可制定比 NOAEL 法更加安全的参考剂量, 并可以进一步应用于膳食暴露评估。

参考文献:

- [1] Xu Y, Wang CN, Yuan BJ, Ma YJ, Liu P. Acute dietary chlorpyrifos exposure assessment among people in Jiangsu Province [J]. *Chin J Public Health* (中国公共卫生), 2010, 26(6):739-740.
- [2] Crump KS. A new method for determining allowable daily intakes [J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1984, 4(5):854-871.
- [3] Fang J, Jia XD. Benchmark dose method and its application in risk assessment [J]. *Chin J Food Hyg* (中国食品卫生杂志), 2011, 23(1):50-53.
- [4] Rhomberg LR. Seeking optimal design for animal bioassay studies [J]. *Toxicol Sci*, 2005, 84(1):1-3.
- [5] Slob W, Moerbeek M, Rauniomaa E, Piersma AH. A statistical evaluation of toxicity study designs for the estimation of the benchmark dose in continuous endpoints [J]. *Toxicol Sci*, 2005, 84(1):167-185.
- [6] Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, et al. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2008, 38(Suppl 2):1-125.
- [7] Moser VC, Padilla S. Age- and gender-related differences in the time course of behavioral and biochemical effects produced by oral chlorpyrifos in rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998, 149(1):107-119.
- [8] Muri SD, Schlatter JR, Brüschweiler RJ. The benchmark dose approach in food risk assessment: is it applicable and worthwhile? [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(12):2906-2925.
- [9] Slob W. Dose-response modeling of continuous endpoints [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 66(2):298-312.
- [10] Hong F, Zeng QB. Use of Benchmark dose method to determine the biological exposure limits of 95% alachlor [J]. *Med Inform* (医学信息), 2010, 5(10):2959-2960.
- [11] Solecki R, Davies L, Dellarco V, Dewhurst I, Raaij Mv, Tritscher A, et al. Guidance on setting of acute reference dose (ARfD) for pesticides [J]. *Food Chem Toxicol*, 2005, 43(11):1569-1593.
- [12] Kavlock RJ. Recent advances in mathematical modeling of developmental abnormalities using mechanistic information [J]. *Reprod Toxicol*, 1997, 11(2-3):423-434.
- [13] Kuljus K, von Rosen D, Sand S, Victorin K. Comparing experimental designs for benchmark dose calculations for continuous endpoints [J]. *Risk Anal*, 2006, 26(4):1031-1043.
- [14] Woutersen RA, Jonker D, Stevenson H, te Biesebeek JD, Slob W. The benchmark approach applied to a 28-day toxicity study with rhodorsil silane in rats. the impact of increasing the number of dose groups [J]. *Food Chem Toxicol*, 2001, 39(7):697-707.
- [15] Zhao Q, Dourson M, Gadagbui B. A review of the reference dose for chlorpyrifos [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2006, 44(2):111-124.
- [16] Zheng Q, Olivier K, Won YK, Pope CN. Comparative cholinergic neurotoxicity of oral chlorpyrifos exposures in preweaning and adult rats [J]. *Toxicol Sci*, 2000, 55(1):124-132.

Determination of reference dose of chlorpyrifos by benchmark dose method

HE Xian-song, LI Ting-ting, YI Nan-nan, WU Hui, WANG Xia, ZHAO Min-xian, WANG Can-nan
(*Key Laboratory of Medical Engineering Environment, Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China*)

Abstract: **OBJECTIVE** To determine the reference dose of chlorpyrifos by the benchmark dose method. **METHODS** Eighty adult female SD rats were ig given chlorpyrifos 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 16 mg·kg⁻¹, respectively, once daily, for 21 d. Rats were sacrificed, and acetylcholinesterase (AChE) activity in the hippocampus, cerebral cortex and serum of rats was determined after chlorpyrifos was ig given to rats for 21 d. The no-adverse-effect level (NOEAL) was observed and determined while. The benchmark dose (BMD) and the lower confidence limit of the benchmark dose (BMDL) were calculated by software of R language (PROAST28.1 package). The reference dose of chlorpyrifos was obtained by BMDL dividing by safety factor 100. **RESULTS** Compared with normal control group, the AChE activity in hippocampus significantly decreased in chlorpyrifos 4, 8 and 16 mg·kg⁻¹ groups ($P < 0.01$), the AChE activity in cortex significantly decreased in chlorpyrifos 2, 4, 8 and 16 mg·kg⁻¹ groups ($P < 0.01$) and the AChE activity in serum significantly decreased in chlorpyrifos 1, 2, 4, 8 and 16 mg·kg⁻¹ groups ($P < 0.01$). The AChE activity showed decreasing trend with increasing dose. NOEAL in hippocampus, cortex and serum of rats was 2.0, 1.0 and 0.5 mg·kg⁻¹, respectively, and the BMD of chlorpyrifos was 0.81, 0.90 and 0.41 mg·kg⁻¹, respectively, while reference dose in the hippocampus, cortex and serum of rats was 5.5, 4.6 and 3.6 μg·kg⁻¹, respectively. For human safety, the reference dose of chlorpyrifos was determined to be 3.6 μg·kg⁻¹. **CONCLUSION** This method can formulate more secure reference doses, that are potentially used in dietary exposure assessment in the future.

Key words: chlorpyrifos; acetylcholinesterase; benchmark dose; reference dose

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China (81072304)

Corresponding author: WANG Can-nan, E-mail: wcnseu@126.com, Tel: (025)83272568

(收稿日期: 2012-04-03 接受日期: 2012-09-05)

(本文编辑: 付良青)