农药学学报 2021, 23(3): 499-508
*Chinese Journal of Pesticide Science* http://www.nyxxb.cn

·研究论文·

**doi**: 10.16801/j.issn.1008-7303.2021.0021

# 五种农药及其二元、三元组合对人肝癌 HepG2 细胞的联合毒性

王天彩， 陈 晨*， 马朦朦， 杨 茜， 李 耘， 钱永忠

(中国农业科学院 农业质量标准与检测技术研究所，北京 100081)

**摘 要：**为研究农产品中农药混合污染的联合毒性，选取生菜中应用广泛、广谱性强的 5 种农药 (苯醚甲环唑、氯氰菊酯、烯酰吗啉、氯氟氰菊酯和啶虫脒) 及其高频检出的二元、三元农药组合为研究对象，采用 CCK-8 (Cell Counting Assay Kit-8) 法探究农药单剂及混合物对人肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制毒性，基于单个农药剂量效应曲线按照等效应的联合毒性测定方法，应用浓度相加、独立作用和联合指数 3 个预测模型推导联合效应，并通过高内涵筛选系统分析农药混合物对人肝癌 HepG2 细胞凋亡的诱导作用。结果表明：不同农药对 HepG2 细胞增殖抑制的影响存在较大差异，但均具有明显的剂量-效应关系，其中苯醚甲环唑具有最强的细胞增殖抑制毒性，细胞活力的半数抑制浓度 ($EC_{50}$) 为 24.72 μmol/L；其余农药毒性顺序为烯酰吗啉 > 氯氟氰菊酯 > 啶虫脒 > 氯氰菊酯。通过联合指数判定农药混合物的联合毒性效应的结果表明：所有二元组合均随农药浓度增大表现出细胞增殖抑制效应增强，联合效应由拮抗转为协同；三元组合烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑 + 氯氰菊酯、烯酰吗啉 + 氯氰菊酯 + 啶虫脒的细胞增殖抑制效应分别为 60% 和 18% 时，联合效应由协同转为拮抗。同时，利用剂量减少指数量化农药混合物之间的协同效应研究表明，在上述两个三元组合的协同效应中，氯氰菊酯发挥较大作用。在凋亡毒性测定中，各农药单独处理组均会造成 HepG2 细胞凋亡率的显著提高，且呈剂量依赖性；三元组合烯酰吗啉 + 氯氰菊酯 + 啶虫脒在 20.02~80.10 μmol/L 浓度范围内可诱导细胞凋亡水平显著提升。本研究明确了农药单剂和混合物对 HepG2 细胞增殖和凋亡毒性具有明显的剂量依赖效应，可为混合农药毒性评价以及风险监测提供科学依据。联合指数模型可以定量地描述农药混合物在不同组分和浓度下的相互作用，对比浓度相加和独立作用模型，可较准确地预测混合物的联合毒性，是一种有效的生态毒理学风险评估工具。

**关键词:** 农药联合毒性；人肝癌细胞；细胞增殖；联合指数；细胞凋亡

**中图分类号：**S481.1；TQ450.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1008-7303(2021)03-0499-10

# Combined toxicity of five pesticides and their binary and ternary mixtures on HepG2 cells

WANG Tiancai, CHEN Chen*, MA Mengmeng, YANG Xi, LI Yun, QIAN Yongzhong

(*Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-Products*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Beijing* 100081, *China*)

**收稿日期：**2020-07-16；**录用日期：**2020-11-02.

**基金项目：**国家重点研发计划 (2018YFC1603000)；国家自然科学基金项目 (31771894).

**作者简介：**王天彩，女，硕士研究生，**E-mail：**18810583803@163.com；*陈晨，通信作者 (Author for correspondence)，男，博士，主要从事食品安全风险评估，**E-mail：**chenchen02@caas.cn

**Abstract:** To study the combined toxicity of pesticides mixtures in agricultural products, five pesticides with wide application and broad spectrum, including difenoconazole, cypermethrin, dimethomorph, cyhalothrin, acetamiprid, and relevant binary and ternary combinations with high exposure levels in lettuce were selected. Cell Counting Assay Kit-8 method was used to determine the proliferation inhibition toxicity of single pesticide and mixtures on HepG2 hepatocytes. The combined effects were assessed by three prediction models, concentration addition, independent action and combination index, based on the concentration-response curve of individual pesticides. Then the induction effects of two ternary combinations on cell apoptosis were analyzed by High Content Screening. The results showed that the effects of different pesticide combinations on the cell growth inhibitory rate of HepG2 cells were different, all of which had obvious concentration-response relationship. Among them, difenoconazole had a strong inhibition of proliferation toxicity, and the median effective concentration was 24.72 μmol/L. The order of toxicity for the other individual pesticides was ranked as dimethomorph > cyhalothrin > acetamiprid > cypermethrin. The combined toxicity of the pesticide mixtures was determined by the combination index. The results showed that with the increase of pesticide concentrations, the combined effects of all binary combinations changed from antagonism to synergy. While in ternary mixtures, including dimethomorph + difenoconazole + cypermethrin and dimethomorph + cypermethrin + acetamiprid, the combined effects changed from synergy to antagonism when the growth inhibition effect were 60% and 18%, respectively. In addition, the dose reduction index was used to quantify the synergistic effect between pesticide mixtures, indicating that cypermethrin played a greater role in the synergistic effect of the above two ternary combinations. In the measurement of apoptosis toxicity, the apoptotic rate of HepG2 cells significantly increased in the groups treated by individual pesticides in a concentration-dependent manner. The apoptotic rate induced by the ternary combination of dimethomorph + cypermethrin + acetamiprid was significantly increased in concentration between of 20.02-80.10 μmol/L. This work confirmed that the toxicities of proliferation inhibition and apoptosis induction of different pesticides mixtures on HepG2 cells both showed obvious concentration-response relationship, which could provide a scientific basis for toxicity evaluation and risk monitoring of pesticides mixtures. The combination index model as an effective ecotoxicological risk assessment tool can quantitatively describe the interactions of pesticide mixtures under different components and concentrations, which can predict the combined toxicity of pesticide mixtures more accurately compared with the concentration addition model and the independent action model.

**Keywords:** pesticide combined toxicity; hepatoma carcinoma cells; cell proliferation; combination index; cell apoptosis

农药在农业生产及农业环境保护中起到重要的作用[1]。中国农药年用量 183 万吨，农药市场销售额仅居于巴西、美国、日本、法国之后，占全球 5.23%[2]。但目前使用的许多农药都具有相当的持久性和毒性，加之存在使用不当等现象，农药在不同基质中的检出和超标现象已引起人们的广泛关注[3-5]。Hvězdová 等对捷克共和国 75 个耕地土壤中的 53 种农药和 15 种转化产物进行了检测分析，检出率高达 98.7%[6]。农药品种繁多，复配农药占很大比例，多种农药混合使用、盲目使用或者滥用致使农产品中多农药残留现象比较突出。Lozowicka 等在测定波兰水果中的农药残留时发现，64.2% 的样本中含有可检出的农药残留，其中 13% 的样本农药含量超过欧盟规定的最高残留限量 (MRL)，高达 46.3% 的样本中含有 2~8 种农药残留[7]。Fosu 和 Bakirci 等分别对 2010—2012 年间加纳和土耳其果蔬中的农药含量进行监测。结果显示，多农药残留样本分别高达 88.40% 和 20.03%，显著高于 32.40% 和 9.21% 的超标样本[8-9]。由此可见，相对于农药超标，农药多残留现象更不容忽视，农药多残留带来的安全隐患更是不容小觑。

农药能够杀死、击退或抑制生物生长[10]。一些农药不仅针对一类害虫，对其他生物也具有相当的毒性。残留的农药会被部分生物摄入或者通过其他方式吸入，并在体内积累，再通过食物链转移到其他生物体内，最终进入人体[11]。农药暴露会对人体产生肝脏、神经、免疫、基因等毒性，一些农药还具有内分泌干扰效应[12-16]。混合农药各组分之间可能产生生物学效应，呈现十分复杂的交互作用。Du 等应用血浆代谢组学评估了敌敌畏、高灭磷、乐果及甲拌磷 4 种有机磷农药对雄性 Wistar 大鼠的毒性作用。结果表明，4 种药物在对大鼠无损害作用水平下混合可产生联合效应，会引起机体氧化应激和肝肾功能障碍[17]。综上所述，多农药残留可能产生复杂的联合毒性效应，但目前国内外在制定农药限量标准时往往仅考虑单一或一类农药的危害，而忽略了混合污染带来的联合毒性问题[18-20]。因此，评估多农药残留的潜在联合毒性和量化风险，成为环境科学家、风险评估人员和监管机构面临的主要挑战。

肝脏是外源性物质代谢的重要场所，其中人肝癌 HepG2 细胞是一种用于毒性研究的模型细胞株，常用于药物代谢和肝毒性研究[21-22]。CCK-8 (Cell Counting Assay Kit-8) 法由于其卓越的灵敏度和便捷的操作，已广泛用于药物的细胞毒性评估[23-25]。基于近几年国家食品及农产品质量安全风险监测和风险评估数据，本研究以生菜中残留的苯醚甲环唑、氯氰菊酯、烯酰吗啉、氯氟氰菊酯和啶虫脒 5 种农药及其典型二元、三元混合物为研究对象，采用 CCK-8 法探究农药单剂及混合物对 HepG2 细胞的增殖抑制毒性，应用浓度相加 (concentration addition，CA)、独立作用 (independent action，IA) 和联合指数 (combination index，CI) 模型，通过单个农药的细胞毒性作用推导出混合物联合效应，进一步探究农药混合物对细胞凋亡的诱导作用。其中典型二元组合包括烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑、烯酰吗啉 + 氯氰菊酯和烯酰吗啉 + 啶虫脒；典型三元组合包括烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑 + 氯氰菊酯、烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑 + 氯氟氰菊酯及烯酰吗啉 + 氯氰菊酯 + 啶虫脒。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

98.7% 烯酰吗啉 (dimethomorph)、97.2% 苯醚甲环唑 ( difenoconazole)、94.3% 氯氰菊酯 (cypermethrin)、98.3% 氯氟氰菊酯 (cyhalothrin) 和 97.8% 啶虫脒 (acetamiprid) 农药标准品 (德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)；DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶 (0.25 Trypsin-EDTA)、磷酸盐缓冲液 (PBS)、青霉素-链霉素溶液和 0.4% 台盼蓝染液 (美国 Thermo Fisher 公司)；CCK-8 试剂盒 (Dojindo 日本同仁化学公司)；细胞凋亡试剂盒 (美国 BD-Pharmingen 公司)；Hoechst 染料 (美国 Invitrogen 公司)；二甲基亚砜 (DMSO) (美国 Sigma 公司)。

CKX41SF 倒置显微镜 (奥林巴斯中国有限公司)；M200 PRO 多功能酶标仪 (美国 TECAN 公司)；Thermo Forma 311 直热式二氧化碳恒温培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司)；HHS 电热恒温水浴锅 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂)；IKAMS3 涡旋振荡器 (德国 IKA 公司)；TDZ4-WS 低速自动平衡离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司)；IC1000 Countstar 全自动细胞计数仪 (美国 Countstar 公司)；OPRT1168 高内涵筛选系统 (美国 PerkinElmer 公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 细胞使用 DMEM 培养基 (添加 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗)，在 37 ℃、饱和湿度及 5% $CO_2$ 条件下进行恒温培养。当细胞铺满培养瓶底面积约至 90% 时，用胰蛋白酶进行消化，以 1: 2 的比例进行传代。

1.2.2 染毒液配制 在超净台中，将农药标准品用 DMSO 稀释成一定浓度的母液，用不含血清的培养基逐级稀释至所需浓度用于后续试验，其中保证 DMSO 最终含量小于 0.1%。混合物中各组分联合暴露方式为等毒性效应暴露。

1.2.3 细胞活力测定 调整细胞密度至每毫升 $3 \times 10^5$ 个细胞，在 96 孔板中每孔加入 100 μL 细胞悬液，在培养箱中培养 24 h 后，将旧培养液吸出换为不同浓度的染毒液，继续孵育 24 h。向每孔中加入 10 μL CCK-8 溶液，孵育 1 h后用酶标仪测定其在 450 nm 处的吸光度。按 (1) 式计算抑制率 ($I$)。

$$I/\% = \frac{A_c - A_s}{A_c - A_b} \times 100 \quad (1)$$

(1) 式中：$A_s$ 为处理孔吸光值 (含有细胞和毒性物质的培养基)；$A_b$ 为对照孔吸光值 (含有细胞、没有毒性物质的培养基)；$A_c$ 为空白孔吸光值 (不含细胞和毒性物质的培养基)。

1.2.4 基于 CA、IA 和 CI 模型的联合毒性效应评估 目前，国际上广泛认可的混合物联合毒性评

估模型主要有 CA 和 IA 模型[26-27]。CA 模型基于混合物成分具有相同或相似的作用模式的假设，通过公式 (2) 计算[26]。

$$EC_{x,\mathrm{mix}} = \left(\sum_{i=1}^{n} \frac{p_i}{EC_{x,i}}\right)^{-1} \tag{2}$$

(2) 式中：$EC_{x,\mathrm{mix}}$ 是引起 $x$% 效应时的混合物浓度；$EC_{x,i}$ 为第 $i$ 个成分单独存在并引起与混合物相同的效应 $x$% 时的浓度；$p_i$ 为第 $i$ 个成分在混合物中的相对质量比。

IA 模型是基于混合物中各组分具有不同的作用模式的假设，计算公式为 (3)[26]。

$$E(c_{\mathrm{mix}}) = 1 - \prod_{i=1}^{n} [1 - E(c_i)] \tag{3}$$

(3) 式中：$c_{\mathrm{mix}}$ 和 $E(c_{\mathrm{mix}})$ 分别是混合物的总浓度和总效应；$E(c_i)$ 表示第 $i$ 个成分对混合物中 $c_i$ 浓度的影响。

Chou 等通过多年的理论研究与实验验证，提出了基于半数效应方程但不依赖于作用模式的 CI 模型来评估混合物毒性相互作用，并已广泛地应用于药物组合研究[28]。基于药物半数效应浓度 (median effective concentration，$EC_{50}$) 选择 5 个浓度梯度 (0.25 × $EC_{50}$、0.5 × $EC_{50}$、$EC_{50}$、2 × $EC_{50}$ 和 4 × $EC_{50}$) 等毒性配比组成联合药物体系，评估混合药物相互作用的类型及程度，计算方法见 (4) 式[27]。

$$EC_{x,\mathrm{mix}} = \left(\sum_{i=1}^{n} \frac{p_i}{EC_{x,i} \times CI_{x\,\mathrm{comp}}}\right)^{-1} \tag{4}$$

(4) 式中：$EC_{x,\mathrm{mix}}$ 为混合物产生 $x$% 效应时的浓度；$EC_{x,i}$ 为第 $i$ 个成分单独存在并引起与混合物相同的效应 $x$% 时的浓度；$p_i$ 为混合物中第 $i$ 个组分的相对质量比；$CI_{x\,\mathrm{comp}}$ 是根据混合物的实验毒性曲线计算出的混合物在 $x$% 效应水平下的组合指标值。CI < 1，CI = 1 和 CI > 1 分别表示协同作用，相加作用和拮抗作用。当混合物发生协同作用时，可计算出每个农药单剂的剂量减少指数 (dose reduction index，DRI)。DRI 衡量的是在给定的效应水平上与单独使用每种农药的剂量相比，协同组合中每种农药的剂量可减少的倍数[29-30]。

1.2.5 细胞凋亡毒性实验 为探究各农药单剂和混合物对细胞凋亡的影响，基于细胞增殖毒性实验结果，选取各农药单剂的 0.25 × $EC_{50}$、0.5 × $EC_{50}$ 和 $EC_{50}$ 值作为凋亡实验暴露浓度。采用标记异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate，FITC) 的 Annexin V 作为荧光探针与碘化丙啶 (propidium iodide，PI)、Hoechst 染料联合使用，利用高内涵筛选系统进行检测，以测定农药单剂及混合物对细胞凋亡的影响[31-32]。操作方法为：调整细胞密度至每毫升 3 × $10^5$ 个细胞，在 96 孔黑板中每孔加入 100 μL 细胞悬液，先将培养板在培养箱中培养 24 h，再将旧培养液吸出换为不同浓度的染毒液，继续孵育 24 h。用 PBS 将 FITC 染料稀释 10 倍、PI 和 Hoechst 染料稀释 1 000 倍后组成混合染料，每孔加入 100 μL，37 ℃ 孵育 20 min，PBS 清洗 3 遍后进行高内涵扫描。所有操作均在避光条件下进行。

1.2.6 数据处理 使用 SPSS 分析并处理数据，将结果表示为平均值 ± 标准差。通过 Origin 9.1 和 Excel 软件绘制图表，并应用 CompuSyn 软件分析混合农药联合毒性效应。

## 2 结果与分析

### 2.1 农药单剂及组合对 HepG2 细胞增殖毒性的影响

农药单剂及混合物对 HepG2 细胞增殖抑制毒性的剂量-效应曲线如图 1 所示。在 24 h 内，所有农药单剂及二元组合对 HepG2 细胞增殖的抑制作用随农药浓度的增大呈 S 型曲线变化，而细胞增殖抑制率先迅速升高，之后缓慢升高 (图 1A-B)。基于剂量-效应曲线拟合出 5 种农药单剂的 $EC_{50}$ 值，其中苯醚甲环唑的增殖抑制毒性最强，$EC_{50}$ 值为 (24.72 ± 4.29) μmol/L，其余农药的毒性顺序为：烯酰吗啉 ((38.14 ± 2.08) μmol/L) > 氯氟氰菊酯 ((43.04 ± 1.65) μmol/L) > 啶虫脒 ((74.27 ± 5.77) μmol/L) > 氯氰菊酯 ((127.88 ± 4.07) μmol/L)。在烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑 + 氯氰菊酯和烯酰吗啉 + 氯氰菊酯 + 啶虫脒 2 种三元组合联合暴露模式下，随着农药混合物浓度的增大，其对 HepG2 细胞增殖的抑制作用逐渐增强，表现为明显的剂量-效应关系 (图 1C)。当联合暴露农药浓度在 60 μmol/L 以下时，随着烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑 + 氯氟氰菊酯组合农药浓度增大，HepG2 细胞的增殖抑制率并未出现明显降低，但随着农药浓度增大，该农药组合对 HepG2 细胞增殖的抑制作用呈现先迅速升高，至 150 μmol/L 后再缓慢升高的趋势。

### 2.2 农药组合对细胞增殖毒性联合效应评估

2.2.1 CA、IA 和 CI 模型对农药联合毒性的预测

图 2 显示 CA、IA 和 CI 模型预测以及试验测得剂量-效应曲线。比起 CA 和 IA 模型，在混合农药

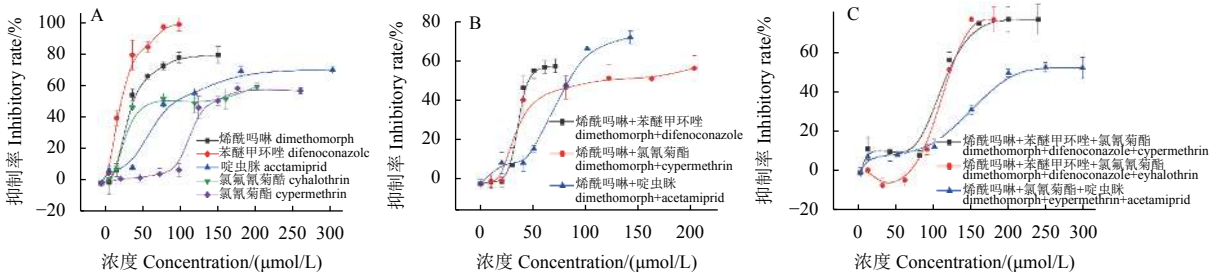



**图 1　5 种农药单剂 (A) 及二元 (B)、三元 (C) 农药组合暴露 24 h 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用**

**Fig. 1　Inhibitory effects of five individual pesticides (A), binary (B) and ternary (C) pesticides on HepG2 cell growth after 24 h treatment**

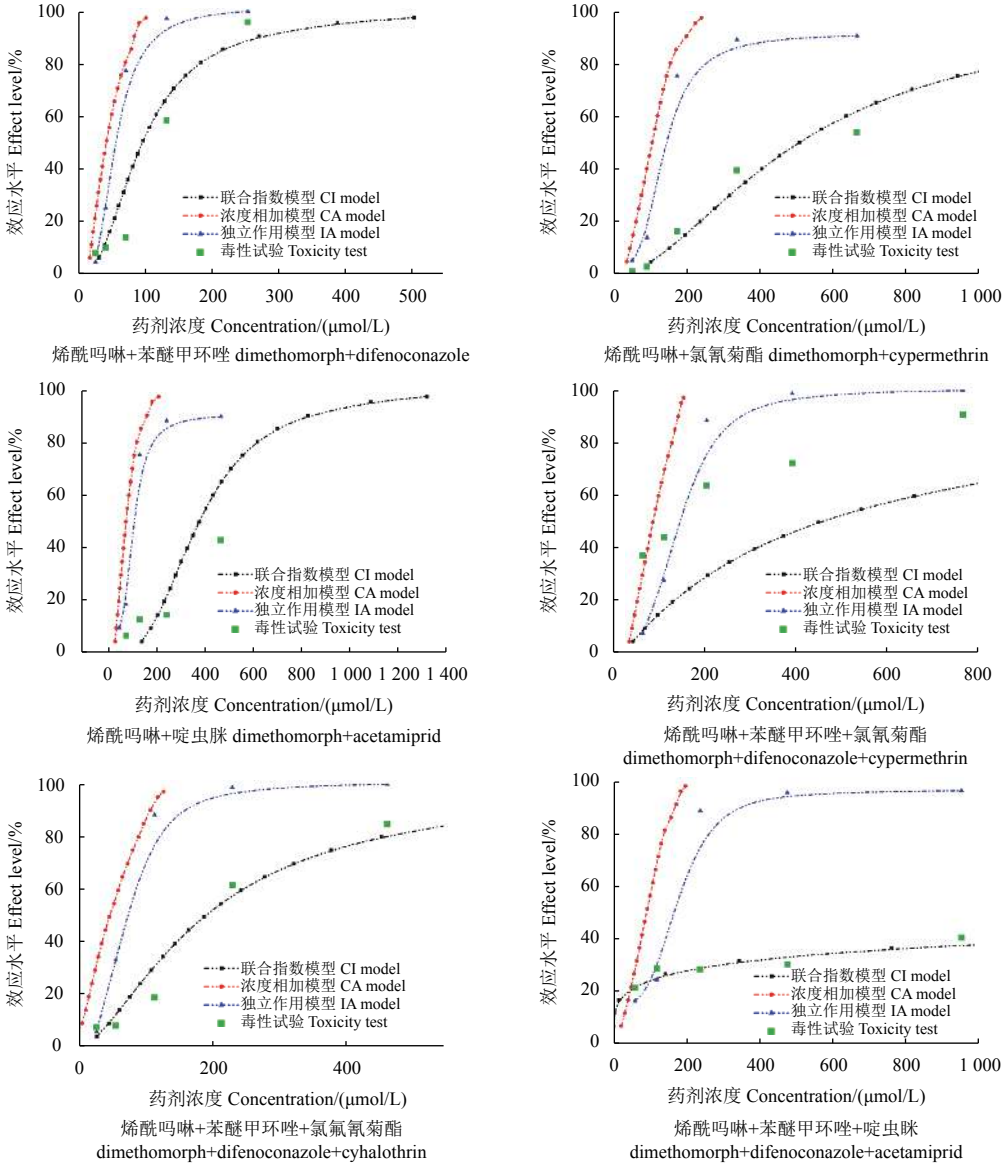



**图 2　基于联合指数、浓度相加和独立作用模型的农药混合物细胞增殖毒性试验的实际和预测所得剂量-效应曲线**

**Fig. 2　Actual and predicted concentration-response curves of cell growth inhibitory toxicity tests of pesticide mixtures based on combination index (CI), concentration addition (CA) and independent action (IA) models**

毒性预测方面，CI 模型预测值更接近实验测定值。因此 CI 方法能够更准确地预测混合物的毒性。

2.2.2　基于 CI 模型的联合效应评估　为探究农药组合之间相互作用类型 (协同作用、拮抗作用或相加作用)，根据 CI 模型评估农药组合对细胞增殖毒性效应和 CI 指数之间的关系。结果 (图 3) 表

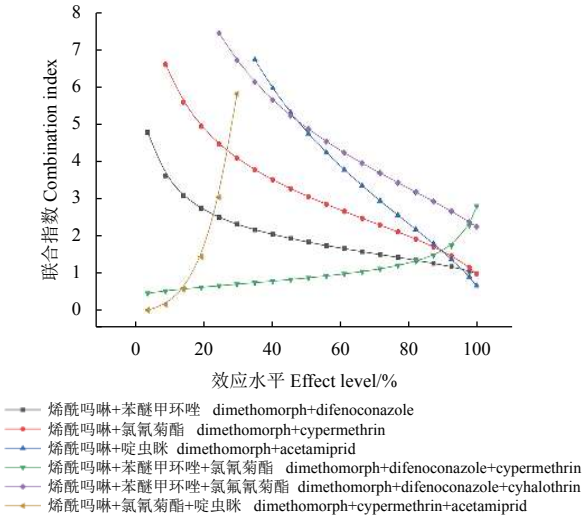



**图 3 二元、三元混合农药的联合指数图**

**Fig. 3 The combination index plot for binary and ternary pesticide mixtures**

明，在试验浓度范围内，所有二元组合在低效应区呈拮抗作用，高效应区呈协同作用；三元组合烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑 + 氯氟氰菊酯在整个浓度范围内表现为拮抗作用，而烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑 + 氯氰菊酯和烯酰吗啉 + 氯氰菊酯 + 啶虫脒联合效应为低浓度协同、高浓度拮抗。

如图 4 所示：当效应水平为 60% 时，烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑 + 氯氰菊酯混合物联合效应从协同转为拮抗；同样地，当效应水平为 18% 时，烯酰吗啉 + 氯氰菊酯 + 啶虫脒混合物联合效应从协同转为拮抗。

为量化混合农药之间的协同作用，对低毒性效应 10%、20% 水平下三元混合物中各组分的 DRI 值进行分析。如表 1 所示，对于烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑 + 氯氰菊酯和烯酰吗啉 + 氯氰菊酯 +

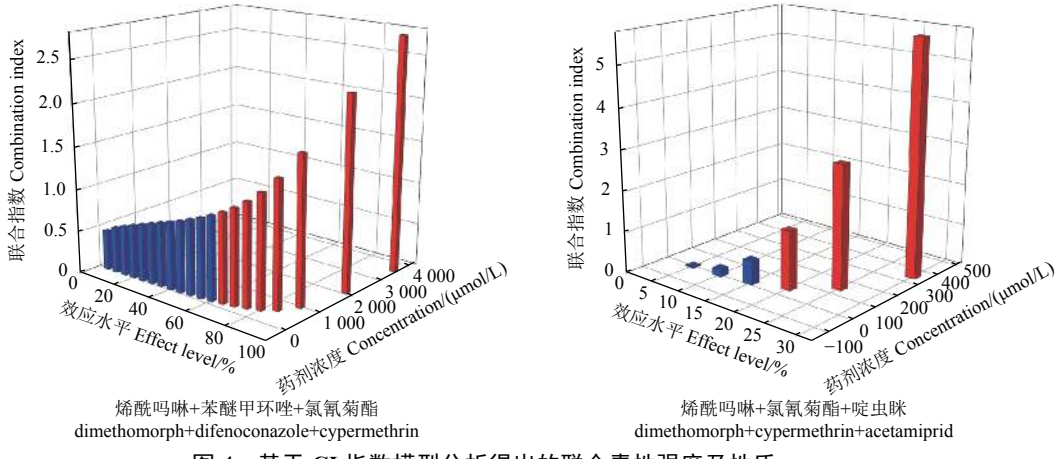



**图 4 基于 CI 指数模型分析得出的联合毒性强度及性质**

**Fig. 4 The combined toxicity intensity and properties based on the analysis of CI model**

**表 1 三元农药组合对 HepG2 细胞增殖抑制毒性的联合作用**

**Table 1 The combined effects of ternary mixtures on HepG2 cell growth inhibitory toxicity**

| 农药组合 Pesticide combination | 浓度比 Concentration ratio | 10% 毒性效应水平 10% Toxicity effect level | | 20% 毒性效应水平 20% Toxicity effect level | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | CI | DRI | CI | DRI |
| 烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑 + 氯氰菊酯 dimethomorph + difenoconazole + cypermethrin | 1.54 : 1.00: 5.17 | 0.53 | 3.36 (烯酰吗啉 dimethomorph)<br>8.42 (苯醚甲环唑 difenoconazole)<br>8.50 (氯氰菊酯 cypermethrin) | 0.63 | 3.25 (烯酰吗啉 dimethomorph)<br>5.65 (苯醚甲环唑 difenoconazole)<br>6.99 (氯氰菊酯 cypermethrin) |
| 烯酰吗啉 + 氯氰菊酯 + 啶虫脒 dimethomorph + cypermethrin + acetamiprid | 1.00 : 3.35 : 1.95 | 0.18 | 14.14 (烯酰吗啉 dimethomorph)<br>35.82 (氯氰菊酯 cypermethrin)<br>12.50 (啶虫脒 acetamiprid) | 1.43 | 1.88 (烯酰吗啉 dimethomorph)<br>4.04 (氯氰菊酯 cypermethrin)<br>1.54 (啶虫脒 acetamiprid) |

注：CI 值是根据混合物的毒性效应曲线计算出的混合物在 *x*% 毒性效应水平下的联合指标值。CI < 1、CI = 1 和 CI > 1 分别表示协同作用、相加作用和拮抗作用。DRI 值是指在给定的效应水平上，与单独使用每种农药的剂量相比，混合物中每种农药的剂量可减少的倍数。

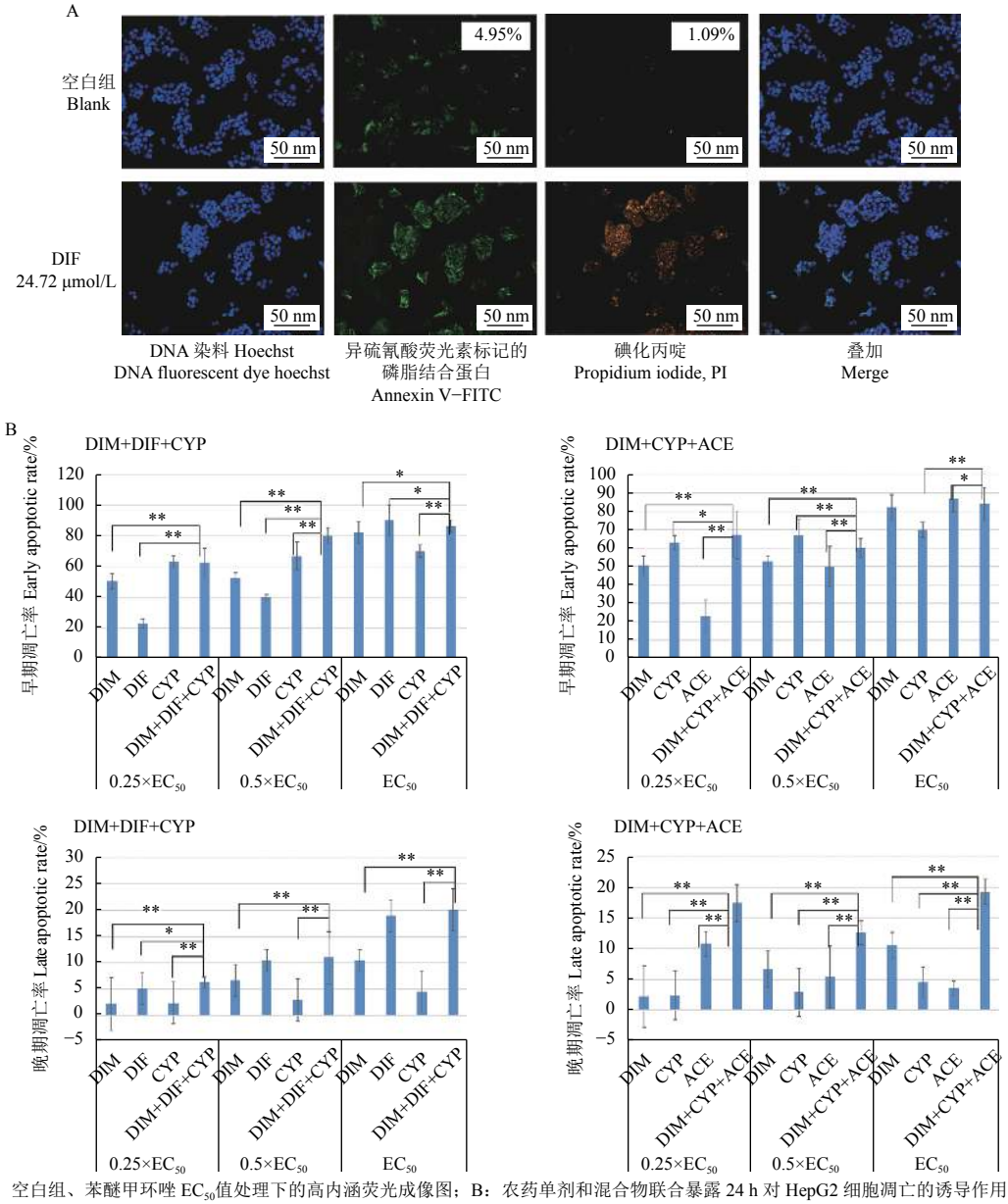
Note: CI value is the combination index value of the mixture at the *x*% toxicity effect level calculated according to the toxicity effect curve of the mixture. CI < 1, CI = 1 and CI > 1 represent synergistic effect, additive effect and antagonistic effect, respectively.

The DRI value is the number of times that the dose of each pesticide in the mixture can be reduced compared with the dose of each pesticide used alone at a given level of effect.

啶虫脒，10% 毒性水平下各农药单剂 DRI 值范围在 3.36~35.82 之间。其中农药单剂氯氰菊酯的 DRI 值显著高于其他农药，说明上述两个三元组合表现出协同效应时，起决定性作用的农药单剂是氯氰菊酯。在 20% 毒性水平下，三元组合烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑 + 氯氰菊酯 CI 值为 0.63，联合作用为协同效应，各农药单剂 DRI 值范围在 3.25~6.99 之间；而烯酰吗啉 + 氯氰菊酯 + 啶虫脒混合物 CI 值为 1.43，表现为拮抗效应，其中 3 种农药烯酰吗啉、氯氰菊酯和啶虫脒的 DRI 值分别是 1.88、4.04 和 1.54，表明啶虫脒在三元混合物中毒性较弱。

### 2.3　农药单剂及组合对 HepG2 细胞凋亡的影响

空白组及苯醚甲环唑在 $EC_{50}$ 值浓度诱导处理下的 HepG2 细胞高内涵荧光成像结果如图 5A 所示。与空白组相比，苯醚甲环唑单独处理组表现




A：空白组、苯醚甲环唑 $EC_{50}$值处理下的高内涵荧光成像图；B：农药单剂和混合物联合暴露 24 h 对 HepG2 细胞凋亡的诱导作用。

A: The HCS images of the blank and the treatment groups of difenoconazole at the concentration of $EC_{50}$,

B: Induction effects of individual pesticides and mixtures on HepG2 cell apoptosis for 24 h.

注：DIM、DIF、CYP 和 ACE 分别表示烯酰吗啉、苯醚甲环唑、氯氰菊酯和啶虫脒，

* 和 ** 分别表示与农药单剂处理组相比，差异显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$)。

Note: DIM, DIF, CYP and ACE represent dimethomorph, difenoconazole, cypermethrin and acetamiprid, respectively.

* and ** mean significant ($P < 0.05$) and extremely significant ($P < 0.01$) difference compared with the individual pesticides treatment group.

**图 5　农药单剂及混合物对 HepG2 细胞凋亡的影响**

**Fig. 5　Effect of individual pesticides and mixtures on HepG2 cell apoptosis**

出明显的细胞凋亡诱导作用 ($P < 0.01$)，当浓度为 24.72 μmol/L 时，细胞早期凋亡率高达 90.11%，晚期凋亡率高达 19.20%。如图 5B 所示，其余农药单剂同样可以造成 HepG2 细胞凋亡率显著提高 ($P < 0.01$)，浓度越高，诱导作用越强，呈剂量依赖性。三元组合烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑 + 氯氰菊酯、烯酰吗啉 + 氯氰菊酯 + 啶虫脒与空白组相比同样表现出显著的凋亡诱导作用。随着药物浓度增大，烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑 + 氯氰菊酯对 HepG2 细胞的凋亡毒性明显增强，即该农药组合对 HepG2 细胞凋亡的诱导作用表现出明显的剂量-效应关系。对于三元组合烯酰吗啉 + 氯氰菊酯 + 啶虫脒，在 20.02~80.10 μmol/L 浓度范围内，其诱导凋亡水平对比于农药单剂显著提升 ($P < 0.01$)，表现出协同效应，这与 CI 模型预测的混合物联合效应相同。

## 3 结论与讨论

近年来，农产品中多种农药共存的现象频繁出现，因其可能会产生难以预测的毒性效应而引起人们的广泛关注。本研究测定生菜中高频检出的农药混合物在 HepG2 细胞内的毒性，以确定它们在体外相互作用的性质。CCK-8 测定结果表明，不同农药对细胞存活率的影响存在较大差异，其中苯醚甲环唑具有最强的增殖抑制毒性。Zhuang 等研究结果同样证明苯醚甲环唑可以剂量依赖的方式强烈地影响 HepG2 细胞的存活率[33]。苯醚甲环唑是一种广谱性的三唑类杀菌剂，广泛应用于各种农作物[34]，但其在食品、水果和农田土壤中已广泛检出，可能造成的潜在风险引起公众日益关注[35-36]。Pan 等研究发现，苯醚甲环唑可以下调 HepG2 细胞中 CYP3A4 酶的 mRNA 表达水平，并且以剂量依赖的方式抑制酶的活性[37]。此外，苯醚甲环唑还可以显著激活 HepG2 细胞中的凋亡相关蛋白 caspase-8 和 caspase-9，并以剂量依赖的方式裂解 DNA 修复酶，同时对线粒体和内质网造成损伤[33]。因此，苯醚甲环唑作为一种重要的毒性化合物，其毒性作用的分子机制值得深入探究。

为探究农药混合物的细胞毒性，本研究进行了等效应联合暴露试验。结果显示：随着农药浓度增大，二元、三元农药组合对细胞增殖毒性作用增强。已有研究表明，混合物联合毒性可以通过单个组分的毒性效应进行预测评估。CA 模型适用于具有相似作用模式的混合物体系，而 IA 模型则适用于具有相异作用模式的混合物体系[38]。近年来，CI 指数法在环境中混合污染物风险评估方面得到了广泛应用。Chen 等应用这 3 类模型研究了丁草胺、莠去津和氯氰菊酯对蚯蚓 *Eisenia fetida* 的联合毒性，发现 CI 法可以更准确地预测联合毒性[39]。本研究也得到相同结果，表明 CI 模型可以作为生态毒理风险评估的有用工具。本研究基于 CI 指数分析发现，除烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑 + 氯氰菊酯和烯酰吗啉 + 氯氰菊酯 + 啶虫脒两个三元组合外，其他农药组合随农药剂量增大联合效应具有拮抗转为协同的趋势。烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑 + 氯氰菊酯在 5%~60% 毒性效应下 CI 值为 0.47~0.98，表明其联合效应由协同作用逐渐转为相加作用[40]。Tóth 等评估了多种除草剂混合物对 *Aliivibrio fischeri*的急性毒性，发现在 $EC_{50}$ 值浓度下，各农药组合的 CI 值为 0.12~0.77，说明待测混合物在急性毒性试验中都产生协同的联合作用，且作用强度从强到弱[41]。DRI 值表示单独与联合暴露以达到相同毒性水平时所需农药浓度的比值，可量化混合农药之间的协同作用。本研究发现，低毒性水平下三元组合烯酰吗啉 + 苯醚甲环唑 + 氯氰菊酯和烯酰吗啉 + 氯氰菊酯 + 啶虫脒协同效应产生中氯氰菊酯发挥了较大作用。Alassane-Kpembi 等基于 DRI 值量化真菌毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇、雪腐镰刀菌醇、镰刀菌烯酮-X 混合物对肠道上皮细胞的协同效应，结果表明：10% 毒性效应水平下所有二元组合的剂量减少指数均高于 30% 毒性效应水平的，说明低毒性效应下二元组合协同作用更强；通过对三元组合中各组分在低毒性效应下的 DRI 值进行分析，发现镰刀菌烯酮-X 在混合物联合效应中毒性较弱[30]。因此，DRI值有助于量化农药单剂在混合物协同作用产生中的作用，对农药联合毒性评价具有重要意义。

联合作用的概念最早由 Bliss 提出，后经 Hewlett 等补充研究。根据混合物中不同组分的作用靶点和作用机制，联合作用主要包括相加作用、独立作用和相互作用。区别在于：当各组分作用靶点相同且作用机制相似时发生相加作用；各组分作用靶点和作用机制均不同时发生独立作用；当各组分作用靶点相同且作用机制会互相影响时会发生相互作用，从而产生更强 (协同) 或更弱 (拮抗) 的毒性[42-43]。因此确定混合体系中各农

药的作用靶点有助于更准确地判定农药混合物的联合效应。

细胞凋亡最初由 Kerr 于 1972 年提出，是多细胞生物程序性细胞死亡的一种形式，其中涉及多个基因的复杂调控[44-45]。细胞凋亡在维持机体稳态以及神经系统的发展中发挥着重要作用。一些证据表明，凋亡细胞的死亡可能导致各种病理问题和神经退行性病变，如脑缺血、阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症等[46]。因此，识别一些可能导致细胞凋亡的环境化合物至关重要。本研究中，对具有协同效应的两个三元农药混合物及相关单剂对细胞凋亡的诱导作用进行分析，结果表明各处理组均以剂量依赖的方式强烈地诱导细胞凋亡。Li 等同样发现，氨基甲酸酯类农药会以时间和剂量依赖的方式诱导人 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞凋亡[47-48]。据报道，Annexin-V 染色可以根据细胞膜的改变在早期检测细胞凋亡，常与 PI 联合使用，利用成像流式细胞仪测定药物对细胞凋亡的影响[49-50]。本研究采用高内涵筛选系统检测能更直观地观察细胞状态，适合高通量、多指标检测，具有操作优势[51]。细胞凋亡主要分为线粒体通路、死亡受体通路和内质网通路，这 3 条路径相互关联，一个通路上的某些因子可能会影响另一个通路[52]。包凌玲研究发现，苯醚甲环唑可以通过线粒体途径和内质网应激途径共同诱导 HepG2 细胞调亡[53]；Huang 等探究了氯氰菊酯对巨噬细胞的毒性作用，结果表明，氯氰菊酯以剂量依赖的方式通过 JNK/ERK 途径诱导巨噬细胞周期阻滞和凋亡而导致免疫细胞死亡[54]。目前对混合农药的凋亡通路研究较少。本研究发现，在 $0.25\times EC_{50}$~$EC_{50}$ 值浓度范围内，相比于农药单剂，三元组合烯酰吗啉 + 氯氰菊酯 + 啶虫脒可显著诱导细胞凋亡，表现出协同效应，这与 CI 模型预测结果相同，证明该模型的可靠性。同样地，Jia 等发现，与单独使用硫丹和代森锌相比，暴露于混合物会增强细胞凋亡水平[55]。因此探究混合农药的凋亡毒性及机制对污染物风险评估具有重要意义。

综上所述，各农药单剂和组合可以抑制 HepG2 细胞增殖，显著诱导 HepG2 细胞产生凋亡作用，但是混合农药诱导凋亡的作用机制尚不清楚，需要进一步通过细胞体外实验和动物体内实验探究其凋亡靶点和通路，为评估农药多残留联合毒性机制提供科学依据。

## 参考文献 (References):


[1] VAINIO H. Public health and evidence-informed policy-making: the case of a commonly used herbicide[J]. Scand J Work Environ Health, 2020, 46(1): 105-109.

[2] YU W. Agricultural and agri-environment policy and sustainable agricultural development in China[J]. Population Report, 2016(No. 247).

[3] FU L, LU X, TAN J, et al. Multiresidue determination and potential risks of emerging pesticides in aquatic products from Northeast China by LC-MS/MS[J]. J Environ Sci (China), 2018, 63: 116-125.

[4] TONG Z, DUAN J, WU Y, et al. A survey of multiple pesticide residues in pollen and beebread collected in China[J]. Sci Total Environ, 2018, 640-641: 1578-1586.

[5] ADENIYI O, HERNANDEZ A, LEBLANC M, et al. Quantitation of pesticide residue in water and food in louisiana, USA[J]. J Water Resour Prot, 2016, 8(12): 1145-1157.

[6] HVĚZDOVÁ M, KOSUBOVÁ P, KOŠÍKOVÁ M, et al. Currently and recently used pesticides in Central European arable soils[J]. Sci Total Environ, 2018, 613-614: 361-370.

[7] ŁOZOWICKA B, HRYNKO I, KACZYŃSKI P, et al. Occurrence of pesticide residues in fruit from Podlasie (Poland) in 2012[J]. J Plant Prot Res, 2015, 55(2): 142-150.

[8] FOSU P O, DONKOR A, ZIWU C, et al. Surveillance of pesticide residues in fruits and vegetables from Accra Metropolis markets, Ghana, 2010-2012: a case study in Sub-Saharan Africa[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2017, 24(20): 17187-17205.

[9] BAKıRCı G T, YAMAN ACAY D B, BAKıRCı F, et al. Pesticide residues in fruits and vegetables from the Aegean region, Turkey[J]. Food Chem, 2014, 160: 379-392.

[10] LAETZ C A, BALDWIN D H, COLLIER T K, et al. The synergistic toxicity of pesticide mixtures: implications for risk assessment and the conservation of endangered Pacific salmon[J]. Environ Health Perspect, 2009, 117(3): 348-353.

[11] MOSTAFALOU S, ABDOLLAHI M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 268(2): 157-177.

[12] CHRISTEN V, RUSCONI M, CRETTAZ P, et al. Developmental neurotoxicity of different pesticides in PC-12 cells *in vitro*[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2017, 325: 25-36.

[13] POUCHIEU C, PIEL C, CARLES C, et al. Pesticide use in agriculture and Parkinson's disease in the AGRICAN cohort study[J]. Int J Epidemiol, 2018, 47(1): 299-310.

[14] TENG M, QI S, ZHU W, et al. Effects of the bioconcentration and parental transfer of environmentally relevant concentrations of difenoconazole on endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Environ Pollut, 2018, 233: 208-217.

[15] MOKARIZADEH A, FARYABI M R, REZVANFAR M A, et al. A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: mechanisms, evidence and consequences[J]. Toxicol Mech Methods, 2015, 25(4): 258-278.

[16] KIM K, JEON H J, CHOI S D, et al. Combined toxicity of endosulfan and phenanthrene mixtures and induced molecular changes in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Chemosphere, 2018, 194: 30-41.

[17] DU L, LI S, QI L, et al. Metabonomic analysis of the joint toxic action of long-term low-level exposure to a mixture of four organophosphate pesticides in rat plasma[J]. Mol Biosyst, 2014, 10(5): 1153-1161.

[18] WANG Y, CANG T, YU R, et al. Joint acute toxicity of the herbicide butachlor and three insecticides to the terrestrial earthworm, *Eisenia fetida*[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2016, 23(12): 11766-11776.

[19] 张思远, 方琪, 焦必宁. 果品中有机磷农药联合毒性研究进展[J]. 果树学报, 2017, 34(1): 94-105.
ZHANG S Y, FANG Q, JIAO B N. Research progress of combined toxicity induced by organophosphorus pesticides in fruits[J]. J Fruit

Sci, 2017, 34(1): 94-105.
[20] YANG G, CHEN C, YU Y, et al. Combined effects of four pesticides and heavy metal chromium (Ⅵ) on the earthworm using avoidance behavior as an endpoint[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2018, 157: 191-200.
[21] TAKAKURA N, SANDERS P, FESSARD V, et al. *In vitro* combined cytotoxic effects of pesticide cocktails simultaneously found in the French diet[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 52: 153-162.
[22] HUANG T, HUANG Y, HUANG Y, et al. Toxicity assessment of the herbicide acetochlor in the human liver carcinoma (HepG2) cell line[J]. Chemosphere, 2020, 243: 125345.
[23] LIAO J, ZHENG H, FEI Z, et al. Tumor-targeting and pH-responsive nanoparticles from hyaluronic acid for the enhanced delivery of doxorubicin[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 113: 737-747.
[24] LIU Z, LI G, LONG C, et al. The antioxidant activity and genotoxicity of isogarcinol[J]. Food Chem, 2018, 253: 5-12.
[25] CAI L, QIN X, XU Z, et al. Comparison of cytotoxicity evaluation of anticancer drugs between real-time cell analysis and CCK-8 method[J]. ACS Omega, 2019, 4(7): 12036-12042.
[26] FAUST M, ALTENBURGER R, BACKHAUS T, et al. Predicting the joint algal toxicity of multi-component S-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants[J]. Aquat Toxicol, 2001, 56(1): 13-32.
[27] WANG Y, CHEN C, QIAN Y, et al. Ternary toxicological interactions of insecticides, herbicides, and a heavy metal on the earthworm *Eisenia fetida*[J]. J Hazard Mater, 2015, 284: 233-240.
[28] CHOU T C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies[J]. Pharmacol Rev, 2006, 58(3): 621-681.
[29] SOBRAL M M C, FARIA M A, CUNHA S C, et al. Toxicological interactions between mycotoxins from ubiquitous fungi: impact on hepatic and intestinal human epithelial cells[J]. Chemosphere, 2018, 202: 538-548.
[30] ALASSANE-KPEMBI I, KOLF-CLAUW M, GAUTHIER T, et al. New insights into mycotoxin mixtures: the toxicity of low doses of Type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 272(1): 191-198.
[31] ZHANG W, LIANG Z. Comparison between annexin V-FITC/PI and Hoechst33342/PI double stainings in the detection of apoptosis by flow cytometry[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2014, 30(11): 1209-1212.
[32] RAHABI-LAYACHI H, OUROUDA R, BOULLIER A, et al. Distinct effects of inorganic phosphate on cell cycle and apoptosis in human vascular smooth muscle cells[J]. J Cell Physiol, 2015, 230(2): 347-355.
[33] ZHUANG S L, BAO L L, WANG H F, et al. The involvement of ER-stress and ROS generation in difenoconazole-induced hepatocellular toxicity[J]. Toxicol Res, 2015, 4(5): 1195-1203.
[34] 洪霞, 钱滢文, 冯玉升, 等. 苯醚甲环唑农药残留检测技术的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(24): 190-197.
HONG X, QIAN Y W, FENG Y S, et al. Review on detection techniques of difenoconazole pesticide residues[J]. Food Res Dev, 2018, 39(24): 190-197.
[35] 陈源, 陈昂, 蒋桂芳, 等. 苯醚甲环唑对水生生物急性毒性评价[J]. 农药, 2014, 53(12): 900-903.
CHEN Y, CHEN A, JIANG G F, et al. Acute toxicity of difenoconazole on aquatic organism[J]. Agrochemicals, 2014, 53(12): 900-903.
[36] 张国福, 李本杰, 王金花, 等. 不同剂型苯醚甲环唑和嘧菌酯及其原药对斑马鱼的急性毒性评价[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(11): 2125-2130.
ZHANG G F, LI B J, WANG J H, et al. Acute toxicity of technical material and different formulations of difenoconazole and azoxystrobin to zebrafish[J]. J Agro-Environ Sci, 2014, 33(11): 2125-2130.
[37] PAN L, LU L, WANG J, et al. The fungicide difenoconazole alters mRNA expression levels of human CYP3A4 in HepG2 cells[J]. Environ Chem Lett, 2017, 15(4): 673-678.
[38] MA M, CHEN C, YANG G, et al. Combined cytotoxic effects of pesticide mixtures present in the Chinese diet on human hepatocarcinoma cell line[J]. Chemosphere, 2016, 159: 256-266.
[39] CHEN C, WANG Y, ZHAO X, et al. Combined toxicity of butachlor, atrazine and *lambda*-cyhalothrin on the earthworm *Eisenia fetida* by combination index (CI)-isobologram method[J]. Chemosphere, 2014, 112: 393-401.
[40] LI Y, WANG T, WU J, et al. Multi-parameter analysis of combined hepatotoxicity induced by mycotoxin mixtures in HepG2 cells[J]. World Mycotoxin J, 2018, 11(2): 225-235.
[41] TÓTH G, HÁHN J, KRISZT B, et al. Acute and chronic toxicity of herbicides and their mixtures measured by *Aliivibrio fischeri* ecotoxicological assay[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2019, 185: 109702.
[42] BLISS C I. The toxicity of poisons applied jointly1[J]. Ann Appl Biol, 1939, 26(3): 585-615.
[43] SIMILAR joint action of insecticides[J]. Nature, 1952, 169(4292): 198-199.
[44] YE K, WEI Q, GONG Z, et al. Effect of norcantharidin on the proliferation, apoptosis, and cell cycle of human mesangial cells[J]. Ren Fail, 2017, 39(1): 458-464.
[45] KERR J F, WYLLIE A H, CURRIE A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239-257.
[46] THOMPSON C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. Science, 1995, 267(5203): 1456-1462.
[47] LI Q, KOBAYASHI M, KAWADA T. Carbamate pesticide-induced apoptosis in human T lymphocytes[J]. Int J Environ Res Public Health, 2015, 12(4): 3633-3645.
[48] LI Q, KOBAYASHI M, KAWADA T. Carbamate pesticide-induced apoptosis and necrosis in human natural killer cells[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2014, 28(1): 23-32.
[49] NAKADAI A, LI Q, KAWADA T. Chlorpyrifos induces apoptosis in human monocyte cell line U937[J]. Toxicology, 2006, 224(3): 202-209.
[50] DONG C, LI Q, LYU S C, et al. A novel apoptosis pathway activated by the carboxyl terminus of p21[J]. Blood, 2005, 105(3): 1187-1194.
[51] 张晨, 王哲, 王保和, 等. 高内涵技术检测 $H_2O_2$ 诱导心肌细胞凋亡实验方法的探讨[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(2): 196-199.
ZHANG C, WANG Z, WANG B H, et al. Experimental study on the detection of cardiomyocytes apoptosis induced by $H_2O_2$ based on high-content screening[J]. Chin J Integr Med Cardio - Cerebrovasc Dis, 2019, 17(2): 196-199.
[52] 胡媛媛. 三种微生物发酵液诱导 Sf9 细胞凋亡的初步探究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
HU Y Y. Study on apoptosis of Sf9 cells induced by three kinds of microbial fermentation filtrates[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.
[53] 包凌玲. 苯醚甲环唑诱导 HepG2 细胞毒性及其与 CYP3A4 相互作用机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
BAO L L. Investigation of difenoconazole-induced HepG2 cell apoptosis and the molecular mechanism of its interactions with CYP3A4[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.
[54] HUANG F, LIU Q, XIE S, et al. Cypermethrin induces macrophages death through cell cycle arrest and oxidative stress-mediated JNK/ERK signaling regulated apoptosis[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6).
[55] JIA Z, MISRA H P. Exposure to mixtures of endosulfan and zineb induces apoptotic and necrotic cell death in SH-$SY_5Y$ neuroblastoma cells, *in vitro*[J]. J Appl Toxicol, 2007, 27(5): 434-446.

(责任编辑: 金淑惠)