

喹乙醇对小鼠肝脏和肾脏的毒性作用研究

尹荣焕¹,白文林¹,吴长德¹,王健民¹,刘宝山¹,邹德研¹,方和春²,刘丽霞¹,何剑斌^{1*}

(1. 沈阳农业大学畜牧兽医学院,沈阳 110161;

2. 辽宁省辽中县疾病预防控制中心,辽中 110200)

摘要:按毒理学方法给小鼠灌喂不同剂量喹乙醇,探讨喹乙醇对小鼠肝、肾脏功能的影响。结果表明:随着喹乙醇剂量的增加,血液中AST、ALT活性及BUN、Cre含量均升高,CHE活性先升高再下降,血清TP、ALB含量则明显下降。这些变化表明蛋白质合成代谢减慢,分解代谢加强,引起动物生长速度减慢。剖检时肝脏肿大、瘀血,质脆易碎,1/10LD₅₀组和1/5LD₅₀组肝细胞变性、坏死,肾小管上皮细胞高度肿胀、变性、脱落,肾小球囊腔变狭窄。电镜下1/5LD₅₀组小鼠肝细胞部分细胞质溶解,细胞器减少,线粒体受损;肾脏近曲小管上皮细胞胞质部分溶解,线粒体嵴有缺损,有液泡,肾小球足细胞部分融合,证实了喹乙醇对肝肾的器质性损害。

关键词:喹乙醇;肝功能酶;肾脏;毒性

中图分类号:S856.9

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2008)07-0974-06

Toxic Effect of Olaquinox on Liver and Kidney in Mouse

YIN Rong-huan¹, BAI Wen-lin¹, WU Chang-de¹, WANG Jian-min¹,

LIU Bao-shan¹, ZOU De-yan¹, FANG He-chun², LIU Li-xia¹, HE Jian-bin^{1*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 2. Disease Center for Prevention and Control in Liaozhong County of Liaoning Province, Liaozhong 110200, China)

Abstract: Based on the method of toxicology, mice were administered with different dosage of olaquinox by intragastric administration in order to investigate the effect of olaquinox on function of liver and kidney. The results were as follows: With the increase of olaquinox dosage, both the activity of GOT, GPT and the content of BUN, Cre in blood stepped up, the activity of CHE stepped up at first, and then stepped down, the content of TP and ALB stepped down obviously in serum. These results indicated that there was a decrease in anabolism of protein, and increase in catabolism, which resulted in a decrease in growth rates. At autopsy, the livers displayed swelling, blood stasis, and become breakable. Both denaturation and necrosis of liver cell were observed in 1/10 LD₅₀ and 1/5 LD₅₀ groups. The swelling, denaturation and desquamation was also observed in epithelia of nephridial tubule, at the same time, the glomerular capsule become incommodious. By electron microscope, plasmarrhexis, decrease of organelle, impairment of mitochondria were observed in partial liver cells in 1/5 LD₅₀ group. Plasmarrhexis occurred in epithelia of proximal convoluted tubule, and impairment, vacuole appeared in mitochondrial cristae, while, there was some part fusion in Sertoli cells of glomeruli. These results confirmed the organic impairment of olaquinox on liver and kidney in mouse.

Key words: olaquinox; enzyme of liver function; kidney; toxicity

收稿日期:2007-08-27

基金项目:辽宁省教育厅青年基金资助项目(05L404)

作者简介:尹荣焕(1976-),女,河北安国人,讲师,博士,主要从事动物性食品安全研究, E-mail:yinronghuan@163.com, Tel:88487156

* 通讯作者:何剑斌(1969-),男,仫佬族,贵州道真人,教授,博士,主要从事动物代谢病研究, E-mail:jianbinhe@163.com, Tel:88487140

药物及化学物质的原型或其代谢产物可以残留于人和动物体内,产生蓄积毒性,导致多个组织器官系统的中毒反应。亚急性毒性试验中的 30 d 喂养试验,是在较短的时间内(一般为 30 d)多次重复接毒的条件下,研究化学物质的毒性作用。喹乙醇(Olaquinoxil)是一种化学合成的药物饲料添加剂,由于价格低廉,促生长效果好,在巴西、中国、日本、韩国等国家正被广泛用于畜牧业生产,现在也有人将其用于毛皮动物或其他特种经济动物的养殖。关于喹乙醇中毒和其毒性研究的报道较多^[1-5],但目前对于其毒性研究缺乏系统性。本研究采用食品安全性毒理学评价中的短期喂养试验,选择昆明小鼠作实验动物来检测该饲料添加剂对肝脏、肾脏的蓄积毒性,为全面建立喹乙醇的食品安全性评价体系提供依据。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

喹乙醇(纯度 98.5%,批号 040217,购自上海嘉辰化工有限公司),羧甲基纤维素钠(购自中国医药集团上海化学试剂公司,批号 F20011128)配成 2% 的羧甲基纤维素钠生理盐水溶液。

1.2 实验动物及分组处理

选取健康昆明小鼠(购自辽宁中医药大学),体重 20~30 g,雌雄各半。饲养 1 周后按毒理学试验的要求随机分成 6 组(按表 1)^[6],每组 12 只,分笼饲养,每天灌胃不同剂量喹乙醇(阴性组给予 2% 羧甲基纤维素钠生理盐水),自由采食、饮水,连续灌喂 30 d,30 d 后采血并剖杀小鼠检测各项指标。

表 1 实验动物的分组及处理

Table 1 Grouping and treatment of animals

序号 Sequence number	组别 Groups	动物数 Number of animal	喹乙醇灌喂剂量 Dose of olaquinoxil/(mg/kg·d)
1	正常组 Normal	12	0
2	阴性组 Control	12	0
3	1/30LD ₅₀	12	80
4	1/20LD ₅₀	12	120
5	1/10LD ₅₀	12	240
6	1/5LD ₅₀	12	480

1.3 血清中酶及相关代谢产物的检测

血清中谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、胆碱酯酶(CHE)活性,血清总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、肌酐(Cre)含量,血浆尿素氮(BUN)含量均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定。

1.4 病理学检查

1.4.1 病理学剖检 饲养 30 d 将小鼠采血后全部剖杀,剖开腹腔观察肝、肾的病理变化。

1.4.2 病理组织学检查 取小鼠肝、肾用温生理盐水漂洗以除去血液和其他污物,将脏器放入 10% 的中性福尔马林溶液固定 12 h,再经脱水、浸蜡、包埋、切片和 HE 染色等处理,光镜观察。

1.4.3 电子显微镜观察 采取剖杀小鼠的肝、肾,用 2.5% 戊二醛溶液固定,乙醇脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸铀及柠檬酸铅染色,电镜观察。

1.5 统计分析

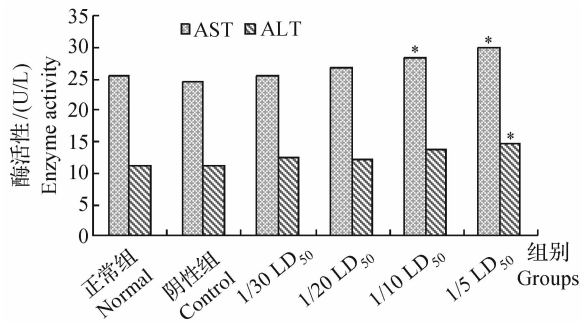
采用 SPSS12.0 统计软件中单因子方差分析进行数据统计。

2 结果与分析

2.1 喹乙醇对血清中肝功能相关酶活性的影响

从图 1、2 可知,随着灌胃喹乙醇剂量的升高,小鼠血清中 AST 的活性逐渐增强,呈明显的剂量-效应关系。各剂量组较阴性组分别升高了 3.04%、8.10%、15.63% 和 21.62%,而 1/10 LD₅₀ 和 1/5 LD₅₀ 两个高剂量组还具有显著性差异($P < 0.05$),说明喹乙醇会引起小鼠血清 AST 活性增强,而且与接毒剂量呈正相关。各用药组血清中 ALT 的活性均高于正常和阴性组,其中 1/30、1/10 和 1/5 LD₅₀ 组的 ALT 活力较阴性组分别升高了 10.31%、23.47% 和 31.73%,1/5 LD₅₀ 组差异显著($P <$

0.05),说明噻乙醇剂量增高也可以引起小鼠血清 ALT 活性增强。CHE 活性的变化是随噻乙醇灌喂剂量的增加先升高,再逐渐降低,其中,1/30 LD₅₀ 组血清胆碱酯酶活性升高了 7.78%,差异显著($P < 0.05$),而且也显著高于 1/5 LD₅₀ 组($P < 0.05$),说明不同剂量噻乙醇对小鼠血清中 CHE 的活性能够产生不同的影响。



与阴性组相比,*. $P < 0.05$, ** . $P < 0.01$. 下同
Compared with control, *. $P < 0.05$, ** . $P < 0.01$.
The same as below

图1 噻乙醇对小鼠血清中 AST 和 ALT 活性的影响
Fig. 1 The effect of olaquinox on activity of ALT and AST in mice serum

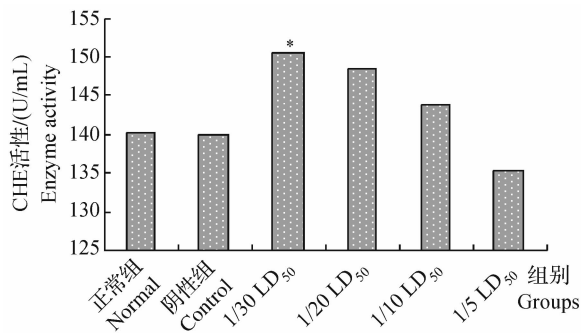


图2 噻乙醇对小鼠血清 CHE 活性的影响
Fig. 2 The effect of olaquinox on cholinesterase activity in mice serum

2.2 噻乙醇对血液中肝、肾相关代谢产物的影响

图3表明随着灌胃噻乙醇剂量的升高,小鼠血浆 BUN 含量呈明显的剂量一效应关系,各用药组较阴性组分别升高了 1.93%、11.66%、21.06%和 24.05%,1/10 和 1/5LD₅₀ 两个剂量组达到显著水平($P < 0.05$),说明噻乙醇剂量过高会引起小鼠血浆尿素氮增多。灌胃不同剂量的噻乙醇对血清中 Cre 含量影响显著($P < 0.05$),较阴性组分别升高了 14.6%、9.42%、23.73%和 29.29%。其中 1/5LD₅₀

组较正常组升高显著($P < 0.05$),说明噻乙醇会引起小鼠血清中 Cre 含量增多。

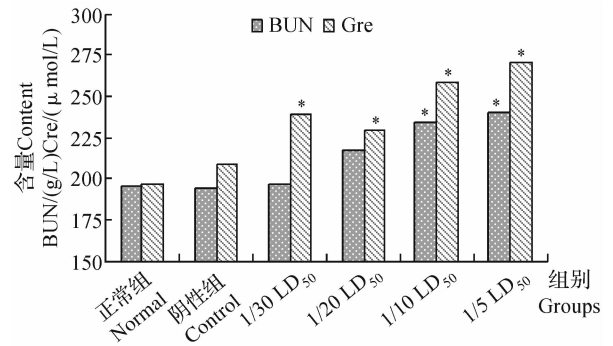


图3 噻乙醇对小鼠血液中 BUN 和 Cre 含量的影响
Fig. 3 The effect of olaquinox on content of BUN and Cre in mice blood

小鼠血清 TP 和 ALB 含量随噻乙醇灌喂剂量的增加而逐渐降低(图4)。TP 表现出明显的剂量一效应关系,其中,1/5LD₅₀ 组血清 TP 含量最低,降低了 23.43% ($P < 0.01$);1/10LD₅₀ 组与正常组间差异显著($P < 0.05$),较阴性对照组和两个噻乙醇低浓度组差异极显著($P < 0.01$),说明噻乙醇浓度过高会抑制小鼠血清中 TP 的合成;1/10 和 1/5 LD₅₀ 两个剂量组 ALB 的含量降低显著($P < 0.05$),分别下降了 21.26%和 24.14%,说明噻乙醇浓度增高会使小鼠血清中 ALB 的生成减少。

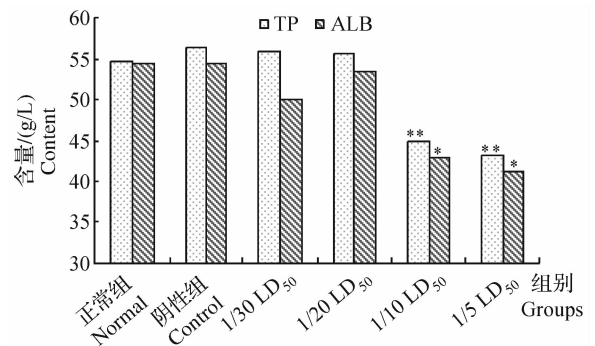


图4 噻乙醇对小鼠血清中 TP 和 ALB 含量的影响
Fig. 4 The effect of olaquinox on content of TP and ALB in mouse serum

2.3 病理学检查

2.3.1 肝肾病理变化 1/20、1/30 LD₅₀ 组剖检时不明显,偶尔可见到 1/20 LD₅₀ 组小鼠有出血点;1/10 LD₅₀ 组部分鼠肝、肾脏也可见到小出血点;1/5 LD₅₀ 组肾、肝肿大,肝发黄,质脆易碎,个别小鼠胆囊扩张,胆汁充盈。

2.3.2 肝肾组织学变化 1/20、1/30 LD₅₀ 组小鼠肝细胞多边形依然可见, 肾小体和肾小管等均正常。1/10LD₅₀ 组小鼠有 4 只呈现肝脏的水泡变性和肾脏的颗粒变性。1/5 LD₅₀ 组肝脏呈局部颗粒变性、水泡变性, 瘀血, 窦内膜细胞脱落, 肝细胞体积增大、数量减少, 个别鼠肝细胞核固缩、坏死, 肝间质增生使肝窦变得狭窄(图 5); 肾脏除肾小管上皮细胞高度肿胀、变性、脱落, 使管腔闭塞以外, 还见有肾小球毛细血管内间质细胞增生, 肾小球体积明显增大, 以至于填充整个肾小囊, 使囊腔变狭窄, 乃至闭锁(图 6)。

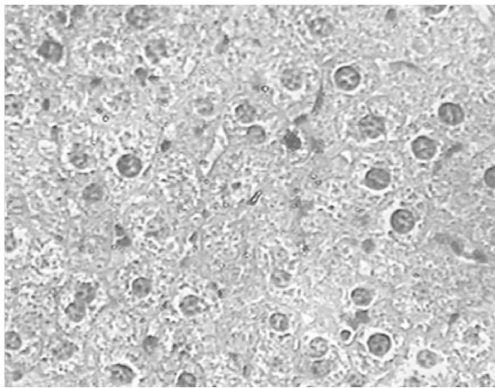


图 5 1/5 LD₅₀ 组小鼠肝脏病理切片(400×)

Fig. 5 Pathological section of liver from 1/5 LD₅₀ group mice

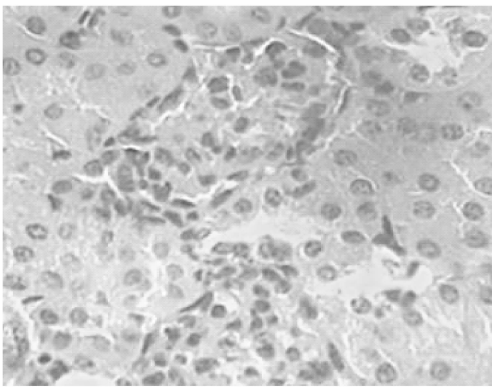
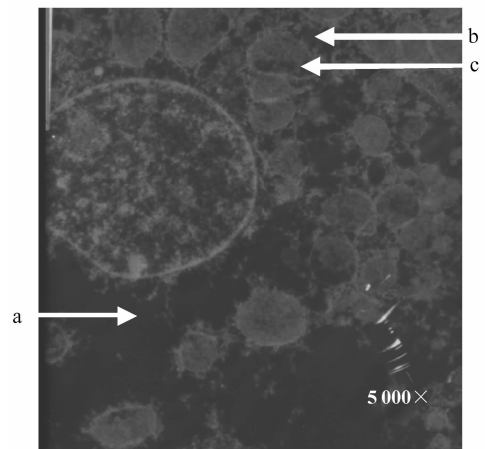


图 6 1/5 LD₅₀ 组小鼠肾脏病理切片(400×)

Fig. 6 Pathological section of kidney from 1/5 LD₅₀ group mice

2.3.3 电子显微镜观察 1/5 LD₅₀ 组小鼠肝细胞(图 7)内有部分细胞质发生溶解, 细胞器减少, 线粒体外膜有破损, 嵴有溶解。肾脏近曲小管(图 8)上皮细胞胞质有部分溶解, 线粒体嵴有缺损, 部分模糊消失, 可见到一些液泡。肾小球(见图 9)足细胞有

部分融合, 系膜区基膜增厚。



a. 部分细胞质发生溶解, 细胞器减少; b. 线粒体外膜有破损; c. 嵴溶解

a. Plasmarrhexis, decrease of organelle; b. Impairment of mitochondrial outer membrane; c. Dissolution of mitochondrial cristae

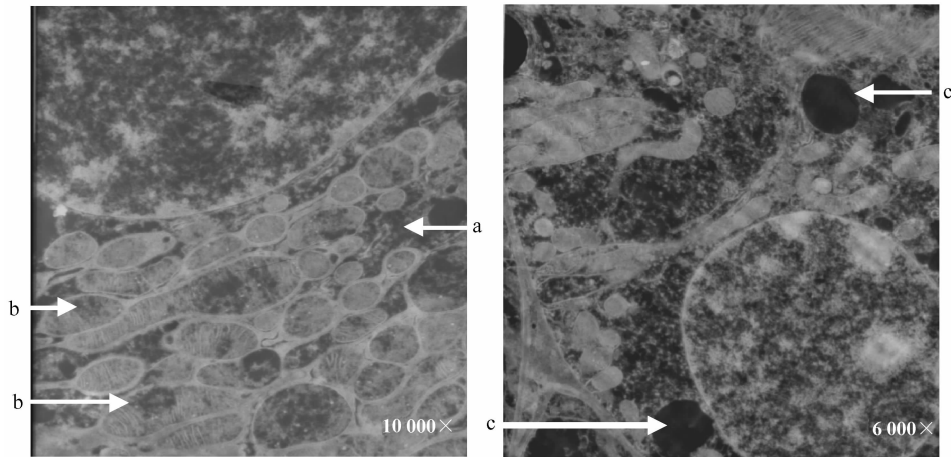
图 7 1/5 LD₅₀ 组肝细胞超微结构

Fig. 7 The electron microscope picture of liver cell from 1/5 LD₅₀ group

3 讨论

3.1 喹乙醇所致的肝脏损伤

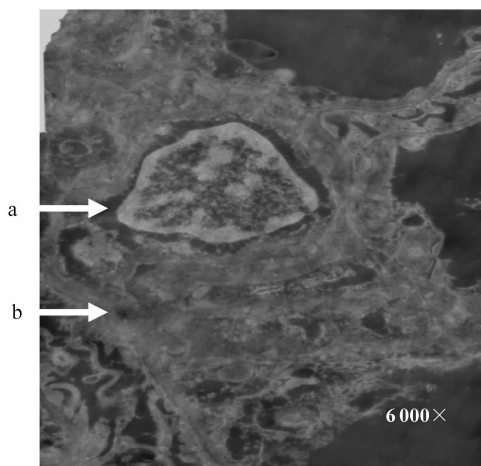
肝脏是动物体内参与消化的最大腺体, 行使主要的代谢、储存、解毒功能。各种有害因子和物质, 如病毒、药物、乙醇、缺氧、内毒素、免疫等, 能以肝细胞作为靶细胞, 激发肝细胞损伤。肝细胞损伤的机制很复杂, 可分为化学性和免疫性肝损伤两类^[7]。喹乙醇在较低的适宜浓度使用时, 具有促进畜禽生长和蛋白质同化作用, 提高饲料利用率的效果较好^[8-9], 本试验中即低于 1/20LD₅₀ 时, CHE 活性较强, 即肝脏的储备能力强, 无明显的临床症状和病理学损害, 而喹乙醇浓度高于 1/10 LD₅₀ 组时, 大部分鼠肝脏开始出现以实质器官变性为主的病理学变化。喹乙醇剂量增大会不同程度抑制小鼠的增重^[10]。总蛋白和白蛋白均由肝细胞合成分泌进入血液, 喹乙醇致肝细胞损伤后会引发动物体代谢紊乱, 血清中 AST 和 ALT 的活性均升高, 使小鼠蛋白质合成代谢水平下降, 同时连续大剂量使用喹乙醇会使 CHE 活性减弱。据 Malmolfk 等^[11] 和 Holecck 等^[12] 报道血清 BUN 浓度可以较准确地反映动物体内蛋白质代谢和氨基酸之间的平衡状况, Coma 等^[13] 和 Torrallardona 等^[14] 认为血清中 BUN



a. 上皮细胞胞质部分溶解; b. 线粒体嵴缺损, 部分模糊消失; c. 液泡
a. Plasmarrhexis of epithelial cells; b. Impairment of mitochondrial cristae; c. Vacuole

图 8 1/5 LD₅₀组肾脏近曲小管超微结构

Fig. 8 The electron microscope picture of kidney proximal convoluted tubule from 1/5 LD₅₀ group



a. 足细胞部分融合; b. 系膜区基膜增厚
a. Fusion in Sertoli cells; b. Enlargement of basal lamina

图 9 1/5 LD₅₀组肾脏肾小球超微结构

Fig. 9 The electron microscope picture of kidney glomerulus from 1/5 LD₅₀ group

水平下降意味着蛋白质分解速度降低, 本研究中血清中 BUN 含量上升, 意味着蛋白质分解速度增强, 必然会影响其沉积, 导致白蛋白生成减少, 从而影响到总蛋白, 使之含量降低, 引起动物生长速度减慢, 生长被抑制。

喹乙醇是以邻硝基苯胺为原料制成的一种药物饲料添加剂, 而邻硝基苯胺是一种有毒物质, 它的过量使用以及在产品中少量长期地残留都可能引起动物中毒, 所以喹乙醇在体内积累引起的是化学性肝

细胞损伤。在蓄积毒性试验中, 较低剂量的喹乙醇若长期不断地进入动物体甚至人体, 不能迅速排出体外, 残留于肝脏, 肝细胞在其长期作用下引起浊肿、脂变及坏死, 最终会导致结缔组织增生。向兰^[15]选用鸡作为实验动物, 发现喹乙醇会引起门静脉系周围静脉血及淋巴回流受阻, 从而引起血浆和淋巴液从肝脏被膜漏出进入腹腔形成腹水, 所以中毒的禽类会在腹腔形成腹水, 本试验中小鼠未发现类似病变, 这可能是动物种属差异所致。

3.2 喹乙醇对小鼠肝细胞超微结构的影响

肝细胞是一种高度分化、功能比较复杂的细胞, 在电镜下观察时正常小鼠在胞质内有数量较多的细胞器和各种内含物, 如线粒体、内质网、高尔基复合体、溶酶体、过氧化物酶体、糖原颗粒等, 细胞质均匀。小鼠灌胃 1/5 LD₅₀ 喹乙醇会使线粒体、内质网变性, 肝细胞坏死。其中线粒体和核糖体的损伤较为严重。线粒体在超薄切片上见到的典型结构是由外膜、内膜、嵴或嵴突、外周间隙、嵴间隙和基质 6 部分组成。它是肝细胞功能活动的能量来源, 在细胞质内数量较多, 每个肝细胞约有 2 000 个, 它的主要功能是将氧化过程中所释放出来的能量贮存于 ATP 的高能磷酸键中, 所以其形象地被称为细胞的“动力站”。细胞内线粒体的数量与分布跟细胞的生理功能密切相关, 根据本研究可推测喹乙醇进入肝脏后, 作用于线粒体酶系统, 致使线粒体嵴溶解或消失, 这样必然阻断生物氧化反应的进行, 抑制其呼吸, 使肝脏的解毒功能减弱或消失, 能量代谢障碍。

内质网(ER)有两种,粗面内质网上含有大量的核蛋白体,控制着细胞内蛋白质的合成,滑面内质网膜上分布着多种酶系,具有合成胆汁、解毒、参与脂肪、糖原等的代谢。喹乙醇可以使内质网受损,导致蛋白质及糖原的合成降低,细胞的代谢功能受阻,从而使肝细胞出现颗粒变性,脂肪变性^[15]。

3.3 喹乙醇对小鼠肾脏毒性作用的探讨

喹乙醇内服经肠道吸收,再经过肝脏解毒作用后,喹乙醇及其代谢产物主要从肾脏中排出体外。由此可推测,若喹乙醇具有毒性作用,就可能对肾脏产生损伤作用。由病理学检查发现肾小管上皮细胞、肾小球等均受到损害。在电镜下也可见到肾脏近曲小管上皮细胞胞质部分溶解,线粒体受到损伤,肾小球足细胞部分融合,系膜区基膜增厚等,证实了喹乙醇对肾脏的毒性。低剂量组在本试验中虽然没有表现出明显的临床症状,但不能排除长期饲喂喹乙醇产生的蓄积作用而造成的危害,因此若要确定药物的慢性毒性最好再延长饲喂时间。在徐彦波等^[16]实验性大鼠喹乙醇中毒的病理组织学观察中,发现 1 500 mg/kg 组大鼠比 500 mg/kg 组大鼠肾脏的损伤严重,而且造成的病理变化随着饲喂时间的延长而加重。

肾脏是动物体内代谢产物排泄的主要器官,无论是在医学界还是兽医学领域,评价一种药物的毒性时,必须要对肾脏功能进行监测,除了直接观察到的病理变化外,还常根据血液中肌酐和尿素氮的含量来评定。在本研究中肌酐和尿素氮的含量均随着喹乙醇剂量的增加而增多,尤其高剂量组增加显著,说明此时,由于肾小管上皮细胞变性和肾小球病变,肾功能已发生异常,出现了排泄障碍,使体内电解质平衡紊乱^[17],造成了肌酐和尿素氮在体内蓄积。

参考文献:

- [1] 王德成,高洪,范泉水,等. 喹乙醇致线粒体 DNA 基因损伤的 SSCP 分析[J]. 吉林农业大学学报, 2007,29(1):95-101.
- [2] 尹荣焕,白文林,张文亮,等. 喹乙醇对小鼠血细胞及骨髓微核率的影响[J]. 湖北农业科学, 2007,(1): 107-108.
- [3] 耿毅,汪开毓. 动物喹乙醇中毒研究进展[J]. 畜禽业, 2000,5:31-32.
- [4] 曹随忠,张力,梁剑平,等. 喹噁啉-1,4-二氧化物类抗菌促生长剂特殊毒理学研究进展[J]. 动物医学进展, 2001,22(2):17-20.
- [5] 王树槐. 喹乙醇诱发 CHL 细胞染色体畸变试验[J]. 中国兽药杂志, 1993. 27(4):27-29.
- [6] 史志诚. 动物毒物学[M]. 北京:中国农业出版社, 2001:920-923.
- [7] LASSER M R, PAYEN D. Mechanisms of liver damage[J]. Semin-Liver-Dis, 1996,16(4):357-367.
- [8] 孟宪平,王军. 喹乙醇在北方冬季对肥育猪生长性能的影响[J]. 饲料工业, 2000,21(3):39.
- [9] 李同洲. 喹乙醇在不同蛋白水平下对仔猪生产性能的影响[J]. 饲料研究, 2000,(4):11-12.
- [10] 尹荣焕,程玉来,王丽,等. 小鼠喹乙醇中毒的实验病理学研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2007,(5):78-79.
- [11] MALMOLFK. Amino acid in farm animal nutrition metabolism, partition and consequences of imbalance[J]. Journal of Agriculture Tesearch, 1988,18(4):191-193.
- [12] HOLECEK M. Relation between glutamine, branched-chain amino acids, and protein metabolism [J]. Nutrition, 2002,18(2):130-133.
- [13] COMA J, CARRION D, ZIMMEMAN D R. Use of plasma urea nitrogen as a rapid response criterion to deremine the lysine requirement of pigs[J]. Journal of Animal Science, 1995,73:472-481.
- [14] TORRALLARDONA D, CONDER, ESTEVE-GAREIA E, et al. Use of spray dried animal plasma as an alternative to antimicrobial medication in weanling pigs[J]. Animal Feed Science and Technology, 2002, 99(1):119-129.
- [15] 向兰. 实验性肉用雏鸡喹乙醇急性、亚急性中毒的病理形态学研究[J]. 西南民族大学学报, 1996, 22(2):169-173.
- [16] 徐彦波,王树怀,王明志. 实验性大鼠喹乙醇中毒的病理组织学观察[J]. 中国兽医科技, 1992,22(1):31-32.
- [17] VANDER MOLEN E J. Comparative study of the effect of carbadox, Olaquinox and cyadox on aldosterone, sodiurn and potassium plasma levels in weaned pigs[J]. Research in Veterinary Science, 1989, 47:11-16.