

· 实验研究 ·

95% 灭菌丹原药对大鼠经口毒性试验研究*

柳云恩, 张玉彪, 施琳, 史琳, 张继存, 侯明晓

摘要:目的 确定 95% 灭菌丹原药对 SD 大鼠的毒性作用, 并探寻其可能的毒性靶器官。方法 将 80 只 SD 大鼠随机分成 4 组, 各组灭菌丹剂量为 0、4 000、8 000 及 16 000 mg/kg 饲料。试验结束后检测动物血常规及生化指标, 对解剖动物脏器进行组织病理学评价。结果 试验期间, 中、高剂量灭菌丹组大鼠体重均明显降低 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 中、高剂量灭菌丹组大鼠血液中中性粒细胞百分率升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 雄鼠中、高剂量组脑、心脏、脾脏、肝脏、肾脏及肾上腺的绝对重量均高于对照组 ($P < 0.05$); 中、高剂量灭菌丹组大鼠前胃粘膜下水肿及炎性细胞浸润的发生率均明显高于对照组 ($P < 0.05$)。结论 在本试验条件下, 前胃是 95% 灭菌丹潜在的毒性靶器官, 该农药的最大无作用剂量为 4 000 mg/kg 饲料。

关键词: 灭菌丹; 靶器官; 前胃; 黏膜下水肿; 暴露风险

中图分类号: R 114 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2013)12-1803-03 DOI: 10.11847/zgggws2013-29-12-27

Toxicity of 95% captan in rats: an oral toxicity test

LIU Yun-en, ZHANG Yu-biao, SHI Lin, et al (Laboratory of Severe and War-Related Trauma Center of People's Liberation Army, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang, Liaoning Province 110840, China)

Abstract: **Objective** To observe the toxic effects of 95% captan and to determine its possible target organ in Sprague Dawley (SD) rats. **Methods** Eighty SD rats were randomly divided into four groups and administered feeds containing 0 (control), 4 000, 8 000, and 16 000 ppm of captan for 13 weeks. At the end of the study, the blood samples of the rats were collected for hematology and serum biochemistry analyses and tissues of organs were routinely prepared and stained with hematoxylin and eosin for histopathological examination. **Results** During the experiment, the body weight of the rats in medium and high dose group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$), and the percentage of neutrophil was increased with statistical significance compared to those of the control group; the absolute organ weights of brain, heart, spleen, liver, kidney and adrenal glands in high dose group were significantly increased compared to those of the control group ($P < 0.05$ for all). The incidence of the edema of forestomach submucosa and inflammatory cell infiltration were significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Based on the study, forestomach is potential toxic target organ of 95% captan. The maximum no-effect dose of captan is estimated to be 4 000 ppm.

Key words: captan; target organ; forestomach; submucosa edema; exposure risk

灭菌丹是一种广泛用于水果和蔬菜的广谱杀菌剂, 轻度水溶性使其经常残留在被处理植物表面。研究发现, 给予小鼠 6 000 mg/kg 饲料 7 d 后, 可导致十二指肠小凹上皮增生, 且程度随时间的延长而加重^[1-2]。灭菌丹颗粒容易对人支气管上皮细胞产生毒性反应^[3]。有研究发现, 经口给予灭菌丹原药后, 并未导致小鼠十二指肠发生染色体断裂等病变^[4]。因此, 评估灭菌丹农药暴露风险有助于对健康人群的防护。目前, 国内关于灭菌丹原药的体内毒性试验研究资料较少, 尚无灭菌丹 13 周经口毒性试验的数据。本研究旨在探讨 95% 灭菌丹原药经口给予 13 周对 SD 大鼠的毒性反应, 寻找其潜在的毒性靶器官。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 大鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(沪)2008-0016)。5 周龄。动物饲养于悬吊式不锈钢饲养笼内, 温度(20 ± 2) °C, 湿度(50 ± 20)%, 照明为 12 h 明暗交替, 噪音 60 dB 以下。灭菌丹原药(CAS: 133-07-3)(北京百德公司), 纯度 95%。

1.2 动物分组 将动物随机分成 4 组, 每组 20 只, 雌雄各半, 分别为对照组、低、中、高剂量组。各组灭菌丹剂量依次为 0、4 000、8 000 及 16 000 mg/kg 饲料, 给药后, 连续观察 13 周。

1.3 动物解剖及处理 在试验第 13 周, 对动物进行乙醚麻醉后, 腹主动脉采血。剖取动物组织脏器,

* 基金项目: 国家“十一五”重大新药创制资助(2008ZX09305-001)

作者单位: 沈阳军区总医院全军重症战创伤中心实验室及辽宁省重症创伤和器官保护重点实验室, 辽宁 沈阳 110016

作者简介: 柳云恩(1979-)男, 辽宁沈阳人, 主治医师, 医学博士后, 研究方向: 重症创伤器官保护。

通讯作者: 侯明晓, E-mail: houmingxiao188@126.com

数字出版日期: 2013-11-16 12:33

数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20131116.1233.003.html>

制成切片,用于组织病理学检测。

1.4 血常规与血液生化指标检测 采用日本 Sysmex XT-2000i 自动血液分析仪检测血常规。采用日立-7180 型自动生化分析仪测定血液生化指标。

1.5 脏器称重 取大鼠脑、脾脏、心脏、肝脏、肺脏、肾脏、肾上腺和睾丸称重,计算相应脏器系数。

1.6 统计分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析;不同组间组织病变发生率采用 Fisher's 确切概论法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状况 整个试验期间,未发现死亡或处于濒死状态的动物。高、中剂量灭菌丹组雄雌大鼠体重均明显下降,与对照组比较,差异均有统计学

意义($P < 0.05$)。

2.2 血液常规指标变化(表 1) 结果表明,中、高剂量灭菌丹组大鼠血液中性粒细胞百分率逐渐升高,呈剂量反应关系,与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各剂量灭菌丹组大鼠血液血小板含量降低,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其他指标与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 血液生化指标变化(表 2) 中、高剂量灭菌丹组雄鼠总蛋白及球蛋白升高,白蛋白及白蛋白/球蛋白比值降低,尿素升高,与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);中、高剂量灭菌丹组雌鼠总蛋白及尿素水平升高,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);其他指标与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 灭菌丹处理 13 周后大鼠血常规指标变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

性别	指标	灭菌丹剂量 (mg/kg 饲料)			
		0	4 000	8 000	16 000
雄性	白细胞总数($\times 10^9/L$)	11.62 ± 1.79	10.67 ± 2.00	8.32 ± 2.29 ^a	8.66 ± 2.09 ^a
	中性粒细胞(%)	10.88 ± 3.00	13.18 ± 5.27	17.19 ± 6.16 ^a	22.62 ± 7.21 ^a
	淋巴细胞(%)	82.55 ± 3.53	80.12 ± 35.71	77.63 ± 5.70	70.60 ± 5.24 ^a
	血红蛋白浓度(g/L)	153.00 ± 5.56	152.90 ± 6.33	158.80 ± 4.66 ^a	159.70 ± 4.37 ^a
	血小板总数($\times 10^9/L$)	1222 ± 114	1065 ± 92 ^a	1003 ± 89 ^a	1048 ± 163 ^a
雌性	中性粒细胞(%)	11.22 ± 3.87	11.79 ± 5.17	15.27 ± 3.84 ^a	16.19 ± 4.28 ^a
	红细胞总数($\times 10^{12}/L$)	7.33 ± 0.51	7.88 ± 0.45 ^a	7.82 ± 0.45	7.83 ± 0.42 ^a
	血红蛋白浓度(g/L)	136.00 ± 7.28	138.80 ± 5.88	144.80 ± 4.94 ^a	146.90 ± 4.36 ^a
	红细胞压积(%)	38.88 ± 1.90	38.36 ± 1.26	41.20 ± 1.48 ^a	41.37 ± 1.27 ^a
	平均血红蛋白浓度(g/L)	350.00 ± 4.24	350.00 ± 6.88	351.50 ± 4.33	351.5 ± 2.45 ^a

注:与对照组比较,a $P < 0.05$ 。

表 2 灭菌丹处理 13 周后大鼠血液生化指标变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

性别	指标	灭菌丹剂量 (mg/kg 饲料)			
		0	4 000	8 000	16 000
雄性	总蛋白(g/L)	56.83 ± 2.02	57.55 ± 1.80	57.91 ± 1.28 ^a	57.94 ± 1.61 ^a
	白蛋白(g/L)	37.54 ± 1.09	37.46 ± 0.84	36.37 ± 1.01 ^a	36.37 ± 0.84 ^a
	球蛋白(g/L)	19.29 ± 1.10	20.09 ± 1.31	21.54 ± 0.86 ^a	20.57 ± 1.45 ^a
	白蛋白/球蛋白	1.99 ± 0.09	1.95 ± 0.10	1.69 ± 0.10 ^a	1.77 ± 0.13 ^a
	尿素 (mmol/L)	8.04 ± 0.71	8.60 ± 1.45	9.64 ± 1.09 ^a	9.31 ± 0.99 ^a
雌性	总蛋白(g/L)	61.33 ± 3.41	61.49 ± 2.12	58.52 ± 1.80 ^a	58.53 ± 1.74 ^a
	白蛋白(g/L)	40.35 ± 1.34	39.15 ± 1.24	37.93 ± 1.09 ^a	37.70 ± 1.49 ^a
	尿素 (mmol/L)	8.25 ± 1.73	10.29 ± 1.78	11.81 ± 3.75 ^a	11.86 ± 1.38 ^a

注:与对照组比较,a $P < 0.05$ 。

2.4 脏器重量变化 中、高剂量灭菌丹组大鼠体重均明显低于对照组($P < 0.05$)。中、高剂量灭菌丹组大鼠脑、心脏、脾脏、肝脏、肾脏及肾上腺的绝对重量明显降低,与对照组比较,差异均有统计学意义

($P < 0.05$)。中、高剂量灭菌丹组大鼠仅肝脏及肾脏的相对脏器重量降低,与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。中、高剂量灭菌丹组雌鼠脑、心脏及脾脏的绝对重量明显低于对照组($P < 0.05$),

肝脏及肾脏的相对重量升高,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其他指标与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 大鼠前胃组织病理学改变 中、高剂量组雄鼠前胃粘膜下水肿及炎性细胞浸润的发生率均明显高于对照组;中、高剂量灭菌丹组雌鼠前胃粘膜下水肿及炎性细胞浸润的发生率亦明显高于对照组,其他病变如肾脏囊泡、肺脏钙盐沉着及睾丸萎缩等发生率较低,与灭菌丹毒性无关,系动物的偶发性病变。

3 讨论

本研究结果显示,中、高剂量灭菌丹可导致雄、雌大鼠体重及摄食量明显减少,中、高剂量灭菌丹组大鼠脑、心脏、脾脏、肝脏、肾脏及肾上腺的绝对重量明显降低,中、高剂量灭菌丹组雌鼠脑、心脏及脾脏的绝对重量明显低于对照组,除肝及肾外,上述脏器的相对重量变化不明显。提示脑、心脏及脾脏重量的降低可能与动物体重下降有关。有研究表明,灭菌丹对啮齿类和犬的主要毒性反应是导致动物体重降低及摄食减少^[5],与本研究结果相似。本研究结果显示,中、高剂量灭菌丹组大鼠血液尿素水平升高,而肌酐变化不明显,未见相关的病理改变。单个指标的变化不足以说明灭菌丹具有肾毒性。有研究发现,给予 F344 大鼠敌菌丹 13 周,部分肾小管出现蛋白管型,小管增生及间质淋巴细胞灶性浸润等病理改变^[6]。这些病变通常与大鼠的饲养环境、周龄和高蛋白饮食有关,是大鼠常见的自发性病变。本研究结果显示,中、高剂量灭菌丹组大鼠前胃粘膜下水肿和炎性细胞浸润发生率明显高于对照组,同时中性粒细胞百分数亦明显高于对照组($P < 0.05$)。研究发现,给予 F344 大鼠 0.15% 灭菌丹导致前胃粘膜下层水肿和上皮细胞增生^[6],与本研究结果相似。此外,近期报道对乙酰氨基酚^[7],聚乙二醇^[8]和邻苯二酚^[9]等化学品可诱发前胃粘膜下水肿。提示,前胃可能是灭菌丹农药毒性作用靶器官。然而,有研究认为,前胃病变可能是部分十二指肠腔梗

阻的后遗或间接结果^[10]。目前关于灭菌丹导致前胃粘膜水肿和炎症反应的机制尚不清楚,推测灭菌丹可能与其家族成员敌菌丹一样,通过干扰上皮基底膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 泵活性,导致钠和水在细胞内蓄积,进而导致粘膜水肿^[11]。总之,在本试验条件下,前胃是 95% 灭菌丹的潜在毒性靶器官,该农药的最大无作用剂量为 4 000 mg/kg 饲料。

参考文献

- [1] Cohen SM, Gordon EB, Singh P, et al. Carcinogenic mode of action of folpet in mice and evaluation of its relevance to humans [J]. Crit Rev Toxicol, 2010, 40(6): 531 - 545.
- [2] Gordon E, Cohen SM, Singh P. Folpet-induced short term cytotoxic and proliferative changes in the mouse duodenum [J]. Toxicol Mech Methods, 2012, 22(1): 54 - 59.
- [3] Mireille CR, Beatrice A, Joana J, et al. Cytotoxicity of folpet fungicide on human bronchial epithelial cells [J]. Toxicology, 2008, 249(2-3): 160 - 166.
- [4] Gudi R, Krsmanovic L. Nuclear aberration test in the mouse duodenum (folpet) and photomicrographs [R]. Rockville, MD: BioReliance Corporation, 2001. Report no. AA31S K. 123005.
- [5] European Food Safety Authority. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance folpet [J]. EFSA Scientific Report, 2009, 297: 1 - 80.
- [6] Tamano S, Kurata Y, Shibata M. 13-Week oral toxicity study of captafol in F344/DuCrj rats [J]. Fundam Appl Toxicol, 1991, 17(2): 390 - 398.
- [7] Jeff SM, Jerome HG. Acetaminophen-induced forestomach lesion in normal rats following intravenous exposure [J]. Toxicol Pathol, 2011, 39(5): 861 - 866.
- [8] Yoshihide U, Masaru T, Yasufumi O, et al. Gastric mucosal changes induced by polyethylene glycol 400 administered by gavage in rats [J]. J Toxicol Sci, 2011, 36(6): 811 - 815.
- [9] Tomoyuki S, Masao H, Kazuo H, et al. Sequential morphological and biological changes in the glandular stomach induced by oral administration of catechol to male F344 rats [J]. Toxicol Pathol, 1999, 27(4): 448 - 455.
- [10] Nyska A, Waner T, Paster Z, et al. Induction of gastrointestinal tumors in mice fed the fungicide folpet: possible mechanisms [J]. Jpn J Cancer Res, 1990, 81(6-7): 545 - 549.
- [11] Iturri SJ, Soto J. Inhibitory Effect of folpet in the small intestine absorption capacity of the mouse [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1994, 53: 648 - 654.

收稿日期: 2013-09-24

(周欣琳编辑 解学魁校对)