

喹乙醇对SD大鼠亚急性经口毒性研究

王榆薇 朱邑辰 吴昕橙 陈淑贞 黄河儒 张芳芳*
杭州医学院公共卫生学院 浙江杭州 310035

摘要: 目的: 研究喹乙醇对大鼠的毒性作用, 经28天染毒实验后明确毒作用的靶器官。方法: 选用SD大鼠, 亚急性毒性试验根据大鼠急性经口毒性试验的LD₅₀设空白对照、125、500、2000 mg/kg四个组, 经口染毒28天, 并设对照附加组、高剂量附加组进行后续观察。用Western-blot检测SD大鼠肾脏组织中ALP、LDH、CYP1A1蛋白水平。结果: 雌雄大鼠LD₅₀均为1470 mg/kg, 喹乙醇属低毒级。SD雌雄大鼠的最大无作用剂量为500 mg/kg。肾脏组织中ALP、LDH、CYP1A1蛋白水平均随着喹乙醇浓度增高而增高。结论: 本实验条件下, 喹乙醇对大鼠亚急性经口染毒无明显有害作用水平的饲料中样品浓度为500 mg/kg, 转换成每日平均样品摄入量, 雄性大鼠为53.1 mg/(kg·d), 雌性大鼠为55.1 mg/(kg·d), 喹乙醇28天经口染毒对SD大鼠肾脏有损伤。
关键词: 喹乙醇; SD大鼠; 亚急性经口毒性; 肾脏毒性

Subacute transoral toxicity of quinoethanol in SD rats

Wang Yuwei, Zhu Yichen, Wu Xin Orange, Chen Shuzhen, Huang Heru, Zhang Fangfang*
School of public health, Hangzhou Medical College, Hangzhou, Zhejiang 310035

Abstract: Objective: To study the toxicity of quinethanol in rats and determine the target organs after 28 days. Methods: SD rats were selected for LD₅₀, 125, 500, 2000 mg / kg for 28 days, with control additional group and high dose additional group for follow-up observation. The protein levels of ALP, LDH and CYP1A1 in kidney tissues of SD rats were determined by Western-blot. Results: LD₅₀ was 1470 mg / kg and quinethanol was low toxicity. The maximum non-action dose in SD male and female rats was 500mg / kg. The protein levels of ALP, LDH and CYP1A1 in kidney tissues increased with increasing concentrations of quinethanol. Conclusion: The concentration of 500 mg was 50 m g / kg into average daily sample intake, 53.1mg/ (kg d) in male rats, 55.1 mg / (kg d) and 28-day oral kidney injury in SD rats.

Keywords: quinethol; SD rats; subacute transoral toxicity; renal toxicity

喹乙醇(olaquinox)是一种化学合成的抗生素生长剂^[1], 从喹恶琳-N, N-二氧杂环化合物中衍生出来, 广泛应用于兽药和饲料添加剂^[2]。喹乙醇具有广泛的抗肿瘤作用, 细菌谱强, 抑制细菌生长, 已被广泛应用于治疗细菌性^[3]。然而喹乙醇有严重的副作用^[4], 喹乙醇有蓄积毒性、致突变性、遗传毒性、致癌性、光毒性和生殖毒性的性状已被报道^[5-7]。本研究用SD大鼠进行28天经

口染毒, 为喹乙醇的安全性评价提供实验依据。

1. 实验材料

1.1 药物和大鼠

喹乙醇标准品(纯度≥98%, 上海抚生实业有限公司)。SD大鼠(SPF级别), 雌雄各半, 6~8周龄。

2. 方法

2.1 急性经口试验

雌雄性大鼠均设464、1000、2150、4640mg/kg剂量组, 每组10只, 雌雄各半。试验后观察2周, 观察不同剂量下大鼠染毒后所表现的中毒体征和死亡情况, 并计算LD₅₀。

2.2 SD大鼠28天经口染毒

根据急性经口毒性试验的LD50, 设对照、低剂量、中剂量和高剂量组, 低剂量及中剂量每组10只, 对照和

基金项目: 2021浙江省级创新创业训练项目(S202113023102)。

作者简介: 王榆薇, 2001年5月, 女, 浙江台州人, 本科在读, 研究方向: 预防医学。

通信作者简介: 张芳芳, 1980年11月, 女, 浙江浦江人, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 毒理学安全性评价。

高剂量每组 20 只, 雌雄各半。混饲法染毒, 大鼠自由进食, 每周称取摄食量, 连续染毒 28 天。对照、高、中、低剂量组观察 28 天, 高剂量和对照组大鼠各留一半, 染毒结束后继续观察 14 天并进行临床观察、尿常规检查、大体解剖和病理组织学检查、及时记录其体重与饲料消耗量、死亡情况、血液学和血清生化等重要数据。

2.3 肾脏组织 Western-blot

按常规步骤进行, 裂解组织, 提取蛋白, 收集上清液, 测蛋白浓度, 蛋白变性, 凝胶电泳, 转移封闭, 分别加入一抗和二抗, 显影后计算相对蛋白量。

2.4 统计学分析

采用单因素方差分析及 t 检验进行参数检验, 非参数检验采用秩和检验。P>0.05 为无统计学意义, P<0.05 有统计学意义。

3. 结果

3.1 急性经口试验

染毒后, 2150、4640mg/kg 剂量组雌雄性大鼠均见不同程度鼻血、毛发污秽等中毒症状。喹乙醇雌雄性大鼠急性经口 LD50 值均为 1470mg/kg。

3.2 亚急性经口试验

3.2.1 样品摄入量

大鼠在整个染毒时期每日平均样品摄入量详见表 1。

表 1 各剂量组染毒期间每日平均样品摄入量

剂量组	饲料中 样品浓度 (mg/kg)	每日平均样品摄入量 (mg/(kg·d))	
		雌性大鼠	雄性大鼠
对照	0	0.0	0.0
低剂量	125	13.0	13.6
中剂量	500	55.1	53.1
高剂量	2000	188.7	188.5

3.2.2 死亡情况和中毒症状

各剂量组均未出现死亡, 无明显中毒症状。

3.2.3 体重及体重增加量

对照组雌性大鼠第 1~6 周体重和染毒期 (第 1~4 周) 体重增加量高于高剂量组, 高剂量雄性大鼠第 1~6 周体重、染毒期 (第 1~4 周) 体重增加量、附加观察期 (第 5、6 周) 体重增加量低于对照组, 差异均有统计学意义 (p<0.05)。

3.2.4 摄食量

高剂量组雄性大鼠染毒期 (第 1~4 周) 及附加观察期 (第 5、6 周) 平均相对摄食量低于对照组, 有统计学意义 (p<0.05)。

3.2.5 食物利用率

高剂量组食物平均利用率低于对照组, 差异有统计学意义 (p<0.05)。

3.2.6 血液学检查结果

与对照组相比, 高剂量组雌性大鼠染毒期末 WBC、RBC、HGB、HCT 降低, RDW 升高, 附加观察期 RBC、HGB、HCT 降低, RDW 升高; 高剂量组雄性大鼠 WBC、RBC、HGB、HCT、PLT 降低, RDW 升高, 附加观察期末 WBC、RBC、HGB、HCT 降低, RDW 升高, 差异均有统计学意义 (p<0.05)。

3.2.7 血清生化和尿液检查结果

与对照组相比, 各染毒组雌雄性大鼠血清生化检查结果和尿检查各指标未见明显异常。

3.2.8 大体解剖和病理组织检查

均未见明显异常。

3.2.9 脏器重量及脏器系数

与对照相比, 高剂量组雌性大鼠脑、肾、脾脏器系数升高, 高剂量组雄性大鼠脑、脾、胸腺、睾丸、附睾脏器系数升高; 附加观察组与对照组相比, 高剂量组雌性大鼠脑、肾、脾、肾、胸腺脏器系数升高, 肾上腺脏器系数降低, 高剂量组雄性大鼠脑、心、肾、脾、胸腺、睾丸、附睾脏器系数升高。差异均有统计学意义 (p<0.05)。

表 2 大鼠亚急性 (28 天) 经口毒性试验大鼠脏器系数 (% , 平均数 ± 标准差)

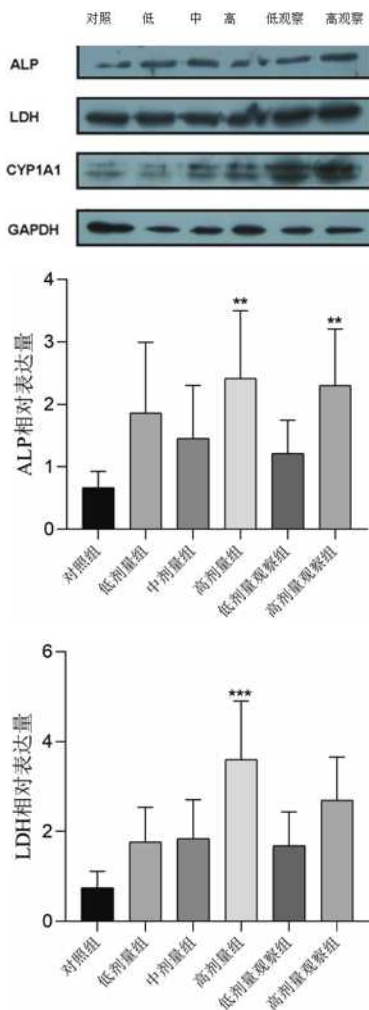
性别	剂量组	动物数	脑	心	肝	肾	肾上腺	脾	胸腺	子宫/睾丸	卵巢/附睾
雌	对照	5	0.76 ± 0.05	0.37 ± 0.03	4.64 ± 0.32	0.81 ± 0.04	0.036 ± 0.007	0.226 ± 0.034	0.238 ± 0.027	0.158 ± 0.011	0.059 ± 0.008
	低	5	0.76 ± 0.05	0.35 ± 0.02	4.15 ± 0.52	0.80 ± 0.06	0.041 ± 0.006	0.232 ± 0.024	0.259 ± 0.024	0.205 ± 0.055	0.063 ± 0.007
	中	5	0.80 ± 0.07	0.36 ± 0.04	4.90 ± 0.48	0.84 ± 0.05	0.041 ± 0.004	0.269 ± 0.025	0.248 ± 0.023	0.193 ± 0.068	0.067 ± 0.011
	高	5	0.95 ± 0.11*	0.40 ± 0.03	4.77 ± 0.85	0.95 ± 0.14*	0.035 ± 0.006	0.286 ± 0.048*	0.262 ± 0.054	0.210 ± 0.058	0.068 ± 0.021
	对照 (附加)	5	0.80 ± 0.05	0.39 ± 0.03	3.29 ± 0.33	0.82 ± 0.08	0.029 ± 0.001	0.265 ± 0.029	0.222 ± 0.036	0.194 ± 0.029	0.071 ± 0.006
	高 (附加)	5	1.07 ± 0.05#	0.50 ± 0.03#	3.50 ± 0.60	0.95 ± 0.08#	0.017 ± 0.011#	0.323 ± 0.024#	0.359 ± 0.028#	0.229 ± 0.056	0.077 ± 0.017

性别	剂量组	动物数	脑	心	肝	肾	肾上腺	脾	胸腺	子宫/睾丸	卵巢/附睾
雄	对照	5	0.55 ± 0.03	0.36 ± 0.04	3.09 ± 0.14	0.75 ± 0.05	0.018 ± 0.007	0.206 ± 0.026	0.177 ± 0.023	0.799 ± 0.031	0.218 ± 0.013
	低	5	0.75 ± 0.10*	0.34 ± 0.02	2.78 ± 0.28	0.85 ± 0.05	0.019 ± 0.005	0.237 ± 0.029*	0.140 ± 0.041*	1.072 ± 0.077*	0.257 ± 0.035*
	中	5	0.55 ± 0.02	0.33 ± 0.07	3.09 ± 0.25	0.77 ± 0.07	0.017 ± 0.006	0.219 ± 0.022	0.145 ± 0.022	0.818 ± 0.033	0.284 ± 0.010
	高	5	0.77 ± 0.03#	0.36 ± 0.01	4.56 ± 0.38#	0.82 ± 0.02	0.039 ± 0.003#	0.242 ± 0.023	0.248 ± 0.011#	0.185 ± 0.024#	0.063 ± 0.004#
	对照 (附加)	5	0.76 ± 0.05	0.37 ± 0.03	4.64 ± 0.32	0.81 ± 0.04	0.036 ± 0.007	0.226 ± 0.034	0.238 ± 0.027	0.158 ± 0.011	0.059 ± 0.008
	高 (附加)	5	0.76 ± 0.05	0.35 ± 0.02	4.15 ± 0.52	0.80 ± 0.06	0.041 ± 0.006	0.232 ± 0.024	0.259 ± 0.024	0.205 ± 0.055	0.063 ± 0.007

注: *与对照组相比 $P < 0.05$, #与对照附加组相比 $P < 0.05$ 。

3.3 喹乙醇对大鼠肾脏组织蛋白表达影响

Western blot 检测肾脏 ALP、LDH 和 CYP1A1 蛋白表达水平, 结果如图所示。与对照组相比, 肾脏组织中 ALP、LDH、CYP1A1 蛋白均随着剂量增大而增多, 高剂量组和高剂量对照组 ALP 水平都有明显上升 ($P < 0.05$), 低剂量观察组有明显的回复 ($P < 0.05$), 高剂量观察组有一定程度的恢复, 但没有统计学意义, 高剂量组 LDH 水平明显低于对照组 ($P < 0.01$)。



4 讨论

本研究目的在于探讨兽药喹乙醇对大鼠的亚急性毒性作用和对肾脏 ALP、LDH、CYP1A1 蛋白水平的影响。喹乙醇剂量选用 125、500、2000 mg/kg 进行 28 天反复经口染毒, 试验结果表明高剂量组雌大鼠均出现不同程度毒作用效应。14 天附加观察期高剂量附加组大鼠仍可见部分血液学指标异常, 部分脏器脏器系数升高; 但未见明显的迟发性毒性作用。在本试验条件下, 喹乙醇大鼠亚急性经口毒性试验无明显有害作用水平的饲料中样品浓度为 500 mg/kg, 雌性大鼠 NOAEL 为 55.1 mg/(kg·d), 雄性大鼠 53.1 mg/(kg·d)。喹乙醇对肾脏等脏器在病理观察中未发现明显异常, 但在蛋白水平已经发生变化, 肾脏组织中 ALP、LDH、CYP1A1 蛋白水平均随着喹乙醇剂量增大而增多。

肾脏组织的病变坏死会使 LDH 释放入组织液中, 可作为肾细胞膜受损的检测指标。碱性磷酸酶 (ALP) 常见于肾脏组织^[8]。这种酶能催化核酸分子脱掉 5' - 磷酸基团, 从而使 DNA 或 RNA 片段的 5' - 磷酸末端转换成 5' - 羟基末端^[9, 10]。碱性磷酸酶升高预示着肾脏功能出现异常, 它主要分布于人体各脏器器官中, 当肝脏功能受到损伤, 碱性磷酸酶也会明显升高^[11]。喹乙醇染毒后, 明显可见大鼠肾脏中的 ALP 增加, 在 14 天观察期内, 低剂量组有一定程度的恢复, 但在高剂量喹乙醇作用下, ALP 水平不容易回复。试验结果表明, CYP1A1 的蛋白水平明显可见随剂量递增且不可恢复。CYP1A1 主要分布于肝脏之外, 与药物代谢相关, 如多环芳烃类的代谢。CYP1A1 的代谢过程可能产生高度亲电性代谢中间产物, 这些代谢产物与生物大分子共价结合, 会导致基因表达改变、染色质形态、和蛋白质分子功能失常以及氧化应激等^[12], 最终可导致肿瘤的发生。

综上所述, 本实验条件下, 喹乙醇对 SD 大鼠有蓄积毒性, 对肾脏有潜在的损伤作用, 应谨慎使用。

参考文献:

- [1]Wang X, Fang GJ, Wang YL, et al. Two generation reproduction and teratogenicity studies of feeding cyadox in Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 2011. 49(5): 1068-79.
- [2]杨彦宁, 欧海军, 谭美英, 隆雪明, 周灿, 陈福华. 高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中啉乙醇的不确定度评估. *饲料博览.* 2020. (09): 41-45.
- [3]张鹤营. 具有抗菌活性的新型啉-N~1, N~4-二氧化物的设计、合成和作用机制研究. 见: 袁宗辉, 主编. (02), 2021.
- [4]Li D, Zhang Y, Pei X, et al. Molecular mechanism of olaquinox-induced hepatotoxicity and the hepatic protective role of curcumin. *Food Chem Toxicol.* 2020. 145: 111727.
- [5]高雨晴. 啉乙醇降低小鼠配子质量及生殖力相关研究. 见: 梁成光, 主编. (09), 2019.
- [6]蒋慧, 程林丽, 扶晓, 张鑫. 啉烯酮及其代谢物的毒性预测及验证. *饲料工业.* 2016.37 (24): 44-50.
- [7]张君宜, 吐尔逊阿依·买买提, 刘瑞鑫, 谭翕元, 李晓丹. 啉乙醇检测方法研究. *河南农业.* 2019. (23): 62+64.
- [8]伍金秋, 钟清. 血清碱性磷酸酶在慢性肾脏病矿物质和骨代谢紊乱发生发展中作用的研究进展. *山东医药.* 2018.58 (21): 102-105.
- [9]胡亦然, 杨国强. 基于苾荧光体系的碱性磷酸酶探针, 2019.
- [10]曹冶, 于吉峰, 谢晶等. 中药提取物对小鼠维生素A急性中毒中晚期的影响. *西南农业学报.* 2020.33 (12): 2800-2806.
- [11]Wang X, Zhang W, Wang Y, et al. Acute and sub-chronic oral toxicological evaluations of quinocetone in Wistar rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010. 58(3): 421-7.
- [12]侯健, 孙娥, 宋捷等. 肝脏药物代谢酶CYP450与中药肝毒性的关系. *中国中药杂志.* 2016.41 (15): 2774-2780.