

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2014.07.0365

·论著·

## 瘦肉精短期染毒对小鼠肝肾功能及遗传毒性的影响

郑艳艳, 李美筠, 谢晶, 梁丹玉

(广西壮族自治区职业病防治研究院中毒与毒理研究所, 广西 南宁 530021)

**【摘要】目的** 探讨瘦肉精短期染毒对小鼠肝肾功能的影响及遗传毒性损伤。**方法** 取 40 只 KM 小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 雌雄各半, 分别饮用含瘦肉精 1.26 mg/kg、2.52 mg/kg、12.6 mg/kg 的水(剂量组)和不含瘦肉精的水(对照组), 连续染毒 28 d, 观察染毒过程中小鼠临床表现, 结束染毒后测定肝肾功能及脏器系数。另取 50 只 KM 小鼠随机分成 5 组, 每组 10 只, 雌雄各半, 连续 5 d 分别以 6.3 mg/kg、12.6 mg/kg、25.2 mg/kg 三个剂量瘦肉精经口灌胃染毒, 阴性对照组以等量超纯水灌胃, 阳性对照以 80 mg/kg 环磷酰胺腹腔注射。末次染毒后 24 h 后处死动物, 分别应用小鼠骨髓染色体畸变试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠精原细胞畸变试验对瘦肉精的体细胞及生殖细胞遗传毒性作用进行研究。**结果** 28 d 短期染毒过程中小鼠出现呼吸加快、烦躁不安、毛发蓬松及肌肉震颤症状, 肝功能 AST 含量逐渐升高, 肾功能 SUA 含量和肝脏系数与对照组相比显著降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。小鼠骨髓染色体畸变试验、骨髓嗜多染红细胞微核、精原细胞畸变试验结果, 与阴性对照组比较, 差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 本次试验剂量 28 d 短期染毒瘦肉精对小鼠的肝肾有一定的损害; 经小鼠骨髓染色体畸变试验、骨髓嗜多染红细胞微核、精原细胞畸变试验研究, 瘦肉精体细胞和生殖细胞的遗传毒性均为阴性。

【关键词】 瘦肉精; 肝肾损害; 骨髓染色体; 嗜多染红细胞微核; 精原细胞

【中图分类号】 R-332 【文献标识码】 A 【文章编号】 1003—6350(2014)07—0937—04

**Influence of short-term exposure to Clenbuterol on the hepatic and renal functions and genetic toxicology of mice.** ZHENG Yan-yan, LI Xian-jun, XIE Jing, LIANG Dan-yu. Research Institute of Poisoning and Toxicology, The Occupational Disease Prevention and Control Institute of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi, CHINA

**【Abstract】 Objective** To explore the influence of short-term exposure to clenbuterol on the hepatic and renal functions and genetic toxicology of Mice. **Methods** 40 KM mice were randomly divided into 4 groups. There were 10 mice in each group which were half male and half female. The mice in dose groups were fed with clenbuterol solution of different concentration (1.26 mg/kg, 2.52 mg/kg, 12.6 mg/kg) respectively and the mice in control group were fed with water. Mice were fed continuously for 28 day in each group. Clinical manifestations were observed during the exposure. Hepatic and renal functions along with organic coefficients were determined after the exposure. Moreover, another 50 KM mice were randomly divided into 5 groups. There were 10 mice in each group which were half male and half female. The mice in dose groups were administered with clenbuterol of different dosage (6.3 mg/kg, 12.6 mg/kg, 25.2 mg/kg) respectively by gavage once a day for 5 days. The mice in negative control group were administered with equal volume of ultrapure water by gavage while the mice in positive control group were injected intraperitoneally with 80 mg/kg cyclophosphamide (CY). Mice were killed 24 hours after the last exposure to determine the genetic toxicology of clenbuterol on somatic cells and germ cells through chromosome aberration test, polychromatic erythrocytes (PCE) of bone marrow cells and SSCS distortion test. **Results** Mice had symptoms of breathing rapidly, dysphoria, shaggy and muscle tremors during the process of exposure to clenbuterol for 28 days. The level of AST increased gradually while the level of SUA and liver coefficient of the dose groups were significantly decreased than that of the control group ( $P<0.05$ ). There were no statistical differences between those dose groups and the control group on the results of chromosome aberration test, polychromatic erythrocytes (PCE) of bone marrow cells and SSCS distortion test ( $P>0.05$ ). **Conclusion** In short-term exposure to clenbuterol for 28 days, the hepatic and renal functions of mice were damaged. The results of chromosome aberration test, polychromatic erythrocytes

基金项目: 广西壮族自治区卫生厅医药卫生科研项目(编号: Z2007105)

通讯作者: 李美筠。E-mail:Lxjgxnn@126.com

(PCE) of bone marrow cells and SSCS distortion test showed that clenbuterol has no genetic toxicity to somatic cells and germ cells.

**[Key words]** Clenbuterol; Hepatic and renal damage; Bone marrow chromosome; Polychromatic erythrocytes (PCE); Spermatogenium

瘦肉精化学名为盐酸克伦特罗,是由 $\beta_2$ 肾上腺受体激动剂人工合成,在20世纪80年代被发现有显著促进瘦肉增长和减少脂肪的效果,因此曾经被作为饲料添加剂大量使用<sup>[1]</sup>。近年有瘦肉精残留的食品安全问题发生,食用含瘦肉精残留的肉及内脏引起许多不适的中毒症状,造成多器官、系统的损害,给人类健康带来危害。笔者试图通过28 d短期染毒观察瘦肉精对小鼠肝肾的短期损害效应;进行小鼠骨髓染色体畸变试验、小鼠精原细胞染色体畸变试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验研究瘦肉精对小鼠体细胞和生殖细胞的遗传毒性损伤。

## 1 材料与方法

1.1 材料 实验动物为SPF级KM小鼠,由广西医科大学实验动物中心提供(许可证号:SCXK桂2009-0002)。本实验室取得广西壮族自治区科技厅颁发的《实验动物使用许可证》,许可证号:SYXK桂2009-0003。瘦肉精(盐酸克伦特罗)对照品(批号:100072-200402)由中国药品生物制品检定所提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 28 d短期染毒毒性试验 取小鼠40只,体重( $18\pm2$ )g,按体重随机分为4组,每组10只,雌雄各半。根据瘦肉精急性经口LD<sub>50</sub>(126 mg/kg)确定染毒剂量,分别为1.26 mg/kg、2.52 mg/kg、12.6 mg/kg三个剂量组。精密称取瘦肉精对照品,稀释成相应浓度的饮用水,小鼠自由饮用,连续28 d。对照组饮用不含瘦肉精的去离子水。染毒期间观察动物一般临床表现,每周称量一次体重。染毒结束时摘眼球放取血,用全自动生化分析仪测定肝功能包括:天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转氨酶(ALT);肾功能包括尿酸(SUA)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)。处死小鼠后取肝、肾脏进行称重,计算其脏器系数。

1.2.2 遗传毒性试验 取成年小鼠50只,体重( $20\pm2$ )g,按体重随机分为5组,每组10只,雌雄各半。设6.3 mg/kg、12.6 mg/kg、25.2 mg/kg三个剂量组,阳性对照组(环磷酰胺,剂量为80 mg/kg),阴性对照组(超纯水)。试验组经口灌胃给药,亚急性染毒(1次/d,连续5 d);阳性对照组腹腔注射给药(1次/d,连续5 d);阴性对照组同时灌胃等量超纯水。末次染毒24 h后颈椎脱臼法处死小鼠,处死前4 h按6 mg/kg

体重腹腔注射秋水仙素。

1.2.2.1 小鼠骨髓染色体畸变试验<sup>[2]</sup> 取双侧股骨,用生理盐水冲取骨髓,低渗法制片。每只动物油镜下计数100个细胞,记录断片、微小体、环状体等畸变细胞数,计算畸变率。

1.2.2.2 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验<sup>[3]</sup> 取胸骨骨髓涂片,固定后Giemsa染色。每只动物计数1 000个嗜多染红细胞,计算微核率(%),同时计数500个嗜多染红细胞的同时观察到的正常红细胞数,求出PCE/NCE值。

1.2.2.3 小鼠精原细胞染色体畸变试验<sup>[4]</sup> 雄性动物取双侧睾丸,去除被膜后剪碎低渗法制片。每只动物油镜下计数100个细胞,记录断片、微小体、环状体等畸变细胞数,计算畸变率。

1.3 统计学方法 数据采用SPSS13.0软件进行统计学处理,计量资料采用单因素方差分析,计数资料采用 $\chi^2$ 进行分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 28 d短期染毒毒性效应结果

2.1.1 小鼠一般表现及肝肾脏器系数 染毒前期小鼠进食、饮水、活动等未见异常。染毒21 d后高剂量组动物出现呼吸加快、烦躁不安、毛发蓬松症状,个别动物还出现肌肉震颤症状。由表1看出,染毒28 d后各组动物体重均增加,且随剂量增大呈上升趋势,12.6 mg/kg剂量组动物体重明显高于对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );12.6 mg/kg剂量组肝脏系数明显小于对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

2.1.2 小鼠血清肝肾功能生化指标测定 随着染毒剂量的增大,小鼠肝功能指标AST呈升高趋势,其中12.6 mg/kg剂量组明显高于对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。12.6 mg/kg剂量组肾功能指标SUA明显低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表2。

### 2.2 瘦肉精遗传毒性试验结果

2.2.1 小鼠骨髓染色体畸变试验结果 瘦肉精各剂量组小鼠骨髓染色体畸变率与阴性对照组比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。阳性对照组畸变率显著高于阴性对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),见表3。

2.2.2 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验结果 瘦

肉精各剂量组的微核率与阴性对照组比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。阳性对照组微核率高于阴性对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),见表4。

### 2.2.3 小鼠睾丸精原细胞染色体畸变试验结

果 阳性对照组畸变率高于阴性对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),瘦肉精各剂量组小鼠精母细胞染色体畸变率与阴性对照组比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),见表5。

表1 瘦肉精对小鼠体重和肝肾脏器系数的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数(只)	染毒前体重(g)	染毒第 28 d 体重(g)	肝脏系数(%)	肾脏系数(%)
对照组	10	18.0±1.8	33.7±3.0	4.03±0.44	1.22±0.22
1.26 mg/kg 组	10	17.9±1.7	35.9±5.2	3.72±0.27	1.16±0.16
2.52 mg/kg 组	10	17.9±1.6	38.2±6.6	3.92±0.25	1.17±0.15
12.6 mg/kg 组	10	17.8±1.7	39.8±5.2 <sup>a</sup>	3.43±0.42 <sup>a</sup>	1.16±0.17
<i>F</i> 值		0.026	2.640	5.621 <sup>a</sup>	0.241
<i>P</i> 值		0.994	0.064	0.003	0.867

注:与对照组比较,<sup>a</sup>  $P<0.05$ 。

表2 瘦肉精对小鼠血清生化的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数(只)	AST (U/L)	ALT (U/L)	SUA (CB/μmol/L)	BUN (CB/mmol/L)	Cr (CB/μmol/L)
对照组	10	146±28	56±21	284.47±88.06	8.34±1.36	8.3±3.0
1.26 mg/kg 组	10	162±27	50±10	237.63±84.24	8.69±2.02	9.5±2.9
2.52 mg/kg 组	10	159±49	48±10	257.97±102.02	9.86±2.12	6.1±3.6
12.6 mg/kg 组	10	211±60 <sup>a</sup>	79±12	183.80±42.38 <sup>a</sup>	9.73±2.02	6.9±6.8
<i>F</i> 值		4.412	1.829	2.708	1.565	2.294
<i>P</i> 值		0.010	0.159	0.060	0.215	0.094

注:与对照组比较,<sup>a</sup>  $P<0.05$ 。

表3 瘦肉精小鼠骨髓染色体畸变试验结果(个)

组别	观察细胞数	染色体结构畸变类型			畸变细胞数	畸变率(%)	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
		断片	微小体	环状体				
6.3 mg/kg 组	1000	2	9	0	11	11	0.897	0.344 <sup>a</sup>
12.5 mg/kg 组	1000	2	7	1	10	10	0.534	0.465 <sup>a</sup>
25.2 mg/kg 组	1000	3	7	0	10	10	0.534	0.465 <sup>a</sup>
阳性对照组	1000	9	34	6	49	49	32.407	0.000 <sup>b</sup>
阴性对照组	1000	1	6	0	7	7		

注:与阴性对照组比较,<sup>a</sup>  $P>0.05$ ,<sup>b</sup>  $P<0.05$ 。

表4 瘦肉精小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验结果(个)

组别	观察嗜多染红细胞数	微核数	微核率(%)	PCE/NCE	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
6.3 mg/kg 组	10 000	6	0.6	1.13	0.000	1.000 <sup>a</sup>
12.5 mg/kg 组	10 000	10	1.0	1.18	1.008	0.315 <sup>a</sup>
25.2 mg/kg 组	10 000	9	0.9	1.04	0.605	0.437 <sup>a</sup>
阳性对照组	10 000	268	26.8	0.80	290.296	0.000 <sup>b</sup>
阴性对照组	10 000	6	0.6	1.09		

注:与阴性对照组比较,<sup>a</sup>  $P>0.05$ ,<sup>b</sup>  $P<0.05$ 。

表5 瘦肉精小鼠睾丸精原细胞染色体畸变试验结果(个)

组别	观察细胞数	染色体结构畸变类型			畸变细胞数	畸变率(%)	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
		断片	微小体	环状体				
6.3 mg/kg 组	500	1	2	0	3	0.6	0.000	1.000 <sup>a</sup>
12.5 mg/kg 组	500	1	1	0	2	0.4	0.025	1.000 <sup>a</sup>
25.2 mg/kg 组	500	2	2	1	5	1.0	0.311	0.726 <sup>a</sup>
阳性对照组	500	6	10	5	21	4.2	13.664	0.000 <sup>b</sup>
阴性对照组	500	1	2	0	3	0.6		

注:与阴性对照组比较,<sup>a</sup>  $P>0.05$ ,<sup>b</sup>  $P<0.05$ 。

### 3 讨 论

盐酸克伦特罗是一种平喘药,1984年美国研究者发现其具有明显提高瘦肉率及减少脂肪率的效果,其后被广泛应用于畜禽生产中,2002年起中国境内禁止在动物饮用水及饲料总使用,但有些不良商家为经济利益,违规使用瘦肉精,瘦肉精的潜在危害不容忽视。有报道指出慢性中毒小鼠毛发、肝肾和肌肉中盐酸克伦特罗残留量按浓度大小依次为:毛发>肝肾>肌肉<sup>[5]</sup>。本研究的28 d短期染毒主要探讨肝肾功能的损害,肝脏是机体的代谢中枢,进入体内的营养物质在肝脏中被代谢、转化和处理;肾脏是一个重要的排泄器官,大部分代谢产物通过肾脏排出体外。研究发现肝功能中高剂量组天冬氨酸氨基转移酶结果明显高于对照组而肝脏脏系数明显低于对照组,提示该剂量下的瘦肉精对小鼠的肝脏已造成一定的影响。肾功能高剂量组SUA降低,但Cr和BUN变化不明显。严蕾等<sup>[6]</sup>对大鼠灌胃染毒30 d后,血清AST含量及肝、肾脏系数亦有类似的效果。由于该药在家畜肝、肾中蓄积量较大,人若经常食用瘦肉精残留量高的动物内脏,易产生慢性中毒反应,对肝脏、肾脏、神经系统等都会产生一定的不良作用,出现肌肉震颤、心慌、战栗、头痛、恶心、呕吐等症状,特别对高血压、心脏病、甲亢、前列腺肥大等疾病患者危害更大,严重者可致人死亡。本研究在染毒28 d时体重增加表现出剂量反应关系,高剂量组体重明显高于对照组,提示在该剂量作用下,瘦肉精对机体物质代谢和营养再分配可能有一定的影响,国内亦有类似的报道<sup>[7]</sup>,但其作用机制有待进一步确证研究。

哺乳动物骨髓染色体畸变试验用于检测受试物诱发啮齿类动物骨髓染色体结构畸变作用,微核试验通过分析啮齿类动物骨髓中的嗜多染红细胞,在染毒动物中有微核的嗜多染红细胞出现频率的增加,是引起染色体损伤的指证,这两项试验均是检测体细胞的

遗传损伤。多代精原细胞对化学品染毒后具有广泛的敏感性各不相同,当染毒的精原细胞变为精母细胞时,通过对处于终变期分裂中期I相的染色体型畸变进行减数分裂的染色体分析,可从染毒后的精原干细胞中获得更多信息。检测精原细胞染色单体型畸变,应检查染毒后细胞的第一次有丝分裂,以免有些损伤在其后的细胞分裂中丢失,因此本研究采用染毒后24 h采样。

瘦肉精对机体的毒性进行了较多的研究,主要集中在近期毒性效应比较多,对其致突变的研究较少,本研究以1/5LD<sub>50</sub>作为最高染毒剂量连续5 d对小鼠进行灌胃染毒以观察瘦肉精对骨髓细胞和生殖细胞遗传毒性的影响,结果发现在25.2 mg/kg剂量下其畸变率均无显著增加,表明在本试验剂量下,盐酸克伦特罗对体细胞和生殖细胞无遗传作用,这一结果与国内同类研究结果相一致<sup>[8]</sup>。这为瘦肉精对机体健康影响以及遗传毒性评价提供依据,但其长期低剂量反复接触的远期效应还需要进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] 李美筠. 瘦肉精的毒性和致突变性研究进展[J]. 广西医科大学学报, 2009, 26(4): 653-655.
- [2] GB/T 21772-2008 化学品 哺乳动物骨髓染色体畸变试验方法[S].
- [3] GB/T 21773-2008 化学品 体内哺乳动物红细胞微核试验方法[S].
- [4] GB/T 21751-2008 化学品 哺乳动物精原细胞染色体畸变试验方法[S].
- [5] 赵晶晶, 李云兰, 梁晋琼, 等. 盐酸克伦特罗在小鼠毛发与肝肾和肌肉中残留量关系的研究[J]. 药物分析杂志, 2009, 28(9): 1277-1281.
- [6] 严 蕾, 孙高峰, 杨浩峰, 等.“瘦肉精”危害的实验研究[J]. 疾病控制杂志, 2005, 9(6): 596-599.
- [7] 王恩峰, 张 霞, 庞全海. 盐酸克伦特罗对小鼠体重及心脏组织形态学的影响[J]. 中国动物检疫, 2010, 27(8): 37-40.
- [8] 贾 强, 张振玲, 王筱芬, 等. 盐酸克伦特罗的急性毒性和致突变试验[J]. 毒理学杂志, 2005, 19(2): 75-76.

(收稿日期:2014-02-07)