

欧俊秀,曾明华,王中宝,等. 阿德呋啉对小鼠的毒性研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):191-193.

阿德呋啉对小鼠的毒性研究

欧俊秀, 曾明华, 王中宝, 杨 娜, 阮祥春

(安徽农业大学动物科技学院,安徽合肥 230036)

摘要:为评价新型抗球虫药阿德呋啉的安全性,采用改良寇氏法和剂量递增法对小鼠进行急性、蓄积性毒性试验和小鼠骨髓细胞的微核试验。急性毒性试验结果表明,阿德呋啉对小鼠的 LD_{50} 为 43.76 mg/kg,95% 的可信限为 35.73 ~ 53.58 mg/kg;蓄积性毒性试验结果表明,阿德呋啉对小鼠蓄积系数是 3.76,为中等蓄积;小鼠骨髓细胞的微核试验结果为阴性,无骨髓细胞毒性。研究结果说明,阿德呋啉具有一定的毒性,仍须继续其他相关的毒理学研究。

关键词: 阿德呋啉;小鼠;急性毒性;蓄积性毒性;微核试验

中图分类号: S859.79⁺5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)05-0191-02

鸡球虫病分布广,发病率高,严重阻碍了养鸡业的发展。在 20 世纪 40 年代,鸡球虫病的防治一直以药物为主,但随着抗球虫药的长期使用,不可避免地导致耐药性虫株的产生,有的甚至还表现为多重耐药和交叉耐药性^[1-2]。球虫的耐药性导致抗球虫药的使用年限缩短,药效降低或丧失。解决耐药性的常用措施为轮换用药和穿梭用药,但根本解决途径还是新药的研发。阿德呋啉是一种新型、广谱的抗鸡球虫药,它属于嘌呤类化合物,主要通过干扰球虫的嘌呤代谢而发挥抗球虫的作用。药效学试验表明,阿德呋啉对各种鸡球虫病的预防和治疗效果显著^[3-4]。阿德呋啉的药理学性质和国外的阿普西特相似,在 Dilov 等的毒性试验报道中,180 mg/kg 剂量的阿普西特对鸡肝脏、肾脏、心脏、脾脏、睾丸、卵巢、肾上腺、甲状腺和骨骼肌均未造成变质性的炎症反应^[5]。在国内阿德呋啉尚未进入临床阶段,相关毒性试验也未见报道。本试验参照兽药临床前毒理学评价的试验指导原则进行^[6],旨在评价阿德呋啉的安全性,以指导其在临床上的合理用药。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

阿德呋啉(药物含量 99.7%),批号:201201025,由安徽农业大学药理实验室提供;环磷酰胺(CP),上海华联制药有限公司,批号:030503;小牛血清,浙江天杭生物有限公司,批号:110824;吉姆萨染液,上海市国药集团化学试剂有限公司,批号:F20110615;甲醇(分析纯),天津市富宇精细化工有限公司,批号:20110405。

1.2 试验动物

清洁级昆明系小鼠,体重 18 ~ 22 g,雌雄各半。由安徽医科大学实验动物中心提供。试验前饲养观察 1 周。

1.3 试验方法

1.3.1 急性毒性试验

1.3.1.1 确定剂量范围的预试验 取昆明系小鼠 28 只,雌雄各半,随机分成 7 组,每组 4 只,按 20.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80 mg/kg 7 个剂量组单剂量灌胃染毒。灌胃前禁食 8 h,自由饮水,染毒后 2 h 复食。观察记录 14 d 内小鼠的死亡数,得出阿德呋啉的 100% 致死浓度(LD_{100})和 0% 致死浓度(LD_0)。

1.3.1.2 正式试验 将 50 只昆明系小鼠随机分成 5 组,雌雄各半,每组 10 只。参照预试验的结果 LD_{100} 、 LD_0 计算组距,按 20.0、27.36、37.43、51.20、70.0 mg/kg 5 个剂量组进行单剂量灌胃染毒。灌胃前禁食 8 h,自由饮水,染毒后 2 h 复食。根据小鼠体重计算染毒剂量。灌胃后,观察并记录 14 d 内小鼠一般健康情况、中毒表现、死亡时间以及死亡数量。对死亡的小鼠进行剖检、病理学检查。采用改良寇氏法计算阿德呋啉对小鼠的 LD_{50} 和 95% 的可信限^[7]。

1.3.2 蓄积性毒性试验 取昆明系小鼠 30 只,雌雄各半,参照急性毒性试验的结果,以 4 d 为 1 个周期,每个周期按一定比例递增染毒剂量,采用灌胃方式染毒,染毒方案见表 1。灌胃前禁食 6 h,连续灌胃给药,当动物的数量不足一半时结束试验。观察并记录小鼠的一般健康情况、中毒表现、死亡数量。计算蓄积系数 K 和累积剂量以进行评价^[7]。其中蓄积系数公式为 $K = LD_{50(n)} / LD_{50(1)}$ 。式中: $LD_{50(n)}$ 为多次染毒使动物出现半数死亡的累积剂量; $LD_{50(1)}$ 为一次染毒使动物半数死亡的剂量。

表 1 阿德呋啉染毒方案

染毒天数 (d)	每日染 毒剂量 (LD_{50})	每日染 毒剂量 (mg/kg)	4 d 累 积剂量 (LD_{50})	4 d 累 积剂量 (mg/kg)	累积 总剂量 (LD_{50})	累积 总剂量 (mg/kg)
1 ~ 4	0.10	4.38	0.40	17.50	0.40	17.50
5 ~ 8	0.15	6.56	0.60	26.26	1.00	43.76
9 ~ 12	0.22	9.63	0.90	39.38	1.90	83.14
13 ~ 16	0.34	14.88	1.36	59.51	3.26	142.66
17 ~ 20	0.50	21.88	2.00	87.52	5.26	230.18

1.3.3 小鼠骨髓细胞的微核试验 将昆明系健康小鼠 50 只随机分成 5 组,雌雄各半。参照急性毒性试验结果,设高、中、低 3 个阿德呋啉剂量组,阴性(蒸馏水)对照组以及环磷酰胺(80 mg/kg)阳性对照组。其中阿德呋啉高剂量组为

收稿日期:2012-10-15

基金项目:安徽省教育厅重点项目(编号:KJ2012A115)。

作者简介:欧俊秀(1987—),女,安徽砀山人,硕士研究生,从事驱虫药及其作用机理研究。E-mail:oujunxiu1@126.com。

通信作者:曾明华,副教授。E-mail:zmhzmh@ahau.edu.cn。

21.88 mg/kg (1/2 LD₅₀), 中剂量组为 8.75 mg/kg (1/5 LD₅₀), 低剂量组为 4.38 mg/kg (1/10 LD₅₀)。进行灌胃染毒, 间隔 24 h, 共染毒 2 次。第 2 次染毒 6 h 后, 脱颈椎致死小鼠。用小鼠血清冲洗小鼠股骨髓并涂片, 甲醇固定后进行吉姆萨染色, 镜检嗜多染红细胞 (PCE) 和成熟正染红细胞 (NCE), 计算微核率和 PCE/NCE 比值^[7]。

1.3.4 数据分析与统计 采用 SPSS 16.0 软件对数据进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 急性毒性试验

2.1.1 预试验结果 染毒后得出阿德呋啉的 LD₁₀₀ 为 70.0 mg/kg, LD₀ 为 20.0 mg/kg。

2.1.2 正式试验结果 一般临床观察发现, 高剂量组

(70 mg/kg) 小鼠染毒 4 h 后出现中毒症状, 主要表现为精神沉郁, 闭眼, 弓背, 静卧, 对刺激反应减弱, 食欲减退或废绝。随着时间的延长, 其他染毒组的部分小鼠也出现中毒症状, 低剂量组 (20 mg/kg) 小鼠无明显中毒状况。可以看出染毒剂量越大, 小鼠出现中毒症状越早。小鼠的中毒强度和死亡率均与染毒剂量呈正相关。小鼠死亡情况详见表 2, 可以看出小鼠最早死亡时间为染毒后 20 h 左右, 96 h 后不再出现死亡。未死亡的小鼠 4 d 后恢复正常状态。剖检死亡的小鼠, 发现其胃气胀, 病理学检查其主要组织器官, 在大小、色泽、质地上未见明显的病理变化。14 d 后解剖未死亡的小鼠, 病理学检查主要组织器官, 在大小、色泽、质地上均未见明显的病理变化。根据表 2 的小鼠染毒剂量以及死亡数目, 采用改良寇氏法计算阿德呋啉对小鼠的 LD₅₀ 为 43.76 mg/kg; S_{X50} = 0.045; 95% 可信限为 35.73 ~ 53.58 mg/kg。

表 2 阿德呋啉对小鼠的急性毒性试验结果

组别	染毒剂量 (mg/kg)	试验数 (只)	不同时间的死亡数(只)				死亡数 (只)	死亡率 <i>p</i> (%)	存活率 <i>q</i> (%)	<i>p</i> × <i>q</i>
			1 ~ 24 h	25 ~ 48 h	49 ~ 72 h	73 ~ 96 h				
1	20.00	10	0	0	0	0	0	0	100	0
2	27.36	10	0	1	0	0	1	10	90	0.09
3	37.43	10	1	1	1	0	3	30	70	0.21
4	51.20	10	2	3	1	0	6	60	40	0.24
5	70.00	10	5	5			10	100	0	0

2.2 阿德呋啉对小鼠的蓄积性毒性试验结果

小鼠从染毒 5 d 起出现个体死亡现象, 随后陆续发生死亡。在第 2、第 3 个染毒周期小鼠精神萎靡, 静卧少动, 对刺激反应减弱。在第 4 个染毒周期小鼠精神较差, 双目无神, 对刺激反应减弱, 皮肤松弛, 被毛凌乱, 大量死亡。在第 5 个染毒周期 (染毒后 17 d), 小鼠死亡数达到 15 只, 为试验动物的 50%, 此时结束试验。此时累积剂量为 3.76 LD₅₀, 即 164.54 mg/kg。蓄积系数 *K* 为 3.76。小鼠死亡情况详见表 3。

2.3 小鼠骨髓细胞微核试验结果

由表 4 数据可以得出, 不同剂量阿德呋啉组与环磷酰胺阳性对照组之间的微核率差异均极显著 (*P* < 0.01), 而与阴

性对照组之间差异均不显著; 不同剂量阿德呋啉组 PCE/NCE 值与环磷酰胺阳性对照组之间差异均显著 (*P* < 0.05), 与阴性对照组之间差异均不显著。

表 3 阿德呋啉蓄积性毒性试验的小鼠死亡情况

染毒天数 (d)	死亡数 (只)	累积死亡数 (只)	累积总剂量 (mg/kg)
1 ~ 4	0	0	17.50
5 ~ 8	4	4	43.76
9 ~ 12	4	8	83.14
13 ~ 16	5	13	142.66
17	2	15	164.54

表 4 阿德呋啉对小鼠的骨髓细胞微核试验结果

组别	剂量 (mg/kg)	PCE 细胞数 (个)	微核率 (%)	PCE/NCE
阴性对照组	0	10 000	0.10 ± 0.12	1.05 ± 0.06
阿德呋啉低剂量组	4.38	10 000	0.12 ± 0.08	1.04 ± 0.03
阿德呋啉中剂量组	8.75	10 000	0.14 ± 0.08	1.04 ± 0.01
阿德呋啉高剂量组	21.88	10 000	0.13 ± 0.15	1.05 ± 0.01
阳性对照组	80.00	10 000	2.13 ± 0.38 **	0.94 ± 0.01 *

注: 同列数据后 “*” “**” 分别表示差异显著 (*P* < 0.05)、极显著 (*P* < 0.01)。

3 讨论

急性毒性试验结果表明, 阿德呋啉对小鼠的 LD₅₀ 为 43.76 mg/kg, 95% 可信限为 35.73 ~ 53.58 mg/kg。根据 WHO 的外源化学物急性毒性分级标准 (5 级)^[7], 得出阿德呋啉对小鼠为高毒物质。本试验中的 LD₅₀ 与 Dilov 等报道的火鸡中毒剂量为 18 mg/kg^[5] 差异较大, 这是由于 LD₅₀ 是一个统计学上的参数, 会受到动物的品系、性别等多种环境因素的影

响^[8-10], 所以同一种化合物的 LD₅₀ 值需要进行靶动物的试验验证。从临床症状上来看, 部分小鼠在染毒后表现为精神沉郁, 闭眼, 弓背, 静卧, 对刺激反应减弱, 食欲减退或废绝, 剖检发现小鼠胃气胀, 可能是一次大剂量摄入阿德呋啉对小鼠机体造成的急性损伤。从病理学上看, 小鼠的主要组织器官在大小、色泽、质地上均未见明显的病理变化, 这与 Dilov 等报道的 180 mg/kg 剂量的阿普西特对鸡肝脏、肾脏、心脏、脾脏、均未造成变质性炎症反应的结果^[5] 相一致。

黎江,蒙翠萍,周悦,等. 2 种奶牛隐性乳房炎检测方法的对比[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):193-195.

2 种奶牛隐性乳房炎检测方法的对比

黎江¹, 蒙翠萍^{1,2}, 周悦¹, 卢俊求¹, 王晓丽¹

(1. 广西大学动物科学技术学院,广西南宁 530005; 2. 广西壮族自治区南宁市小宝宠物诊所,广西南宁 530005)

摘要: 通过苛性钠凝乳检验、BTB 检验对广西大学奶牛场的 44 头处于泌乳期的奶牛进行隐性乳房炎的检测,统计分析各种因素与隐性乳房炎发病率的关系,并对这 2 种检验方法的结果进行比较分析。结果显示,苛性钠凝乳检验的头数阳性率为 40.91%,而 BTB 检验检出的是 22.73%;苛性钠凝乳检验的乳区阳性率为 15.88%,而 BTB 检验检出的是 10.59%。这 2 种检验法的结果经 t 检验差异不显著,检验结果相近,苛性钠凝乳检验的检出率和灵敏度略高。

关键词: 隐性乳房炎;奶牛;苛性钠凝乳检验;BTB 检验

中图分类号: S858.237.2⁺6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)05-0193-03

奶牛乳房炎是奶牛最常见的疾病,常会引起奶牛产奶量下降,改变乳汁中的成分,影响牛乳的质量,使产后发情和妊娠时间延长,严重时还能使奶牛泌乳机能丧失而被淘汰,给奶牛业带来了严重危害^[1-4]。奶牛乳房炎根据临床表现可分为

收稿日期:2012-11-15

基金项目:广西壮族自治区高等学校重点资助科研项目(编号:201202ZD003);2011 年新世纪广西高等教育教改工程项目(编号:2011JGB006);2011 年广西高等学校特色专业及课程一体化建设项目(编号:GXTSZY141)。

作者简介:黎江(1971—),男,广西那坡人,硕士,讲师,主要从事兽医产科学相关的研究。E-mail:lijiangll@126.com。

通信作者:王晓丽,教授,主要从事细胞学、组织学以及胚胎工程的研究。E-mail:lili-fly@126.com。

蓄积性毒性试验结果表明,阿德呋啉对小鼠的蓄积系数是 3.76,累积剂量为 164.54 mg/kg,按常用蓄积系数评价标准,阿德呋啉属于中等蓄积毒性物质,说明其在小鼠体内的排泄速度比较慢。染毒剂量、染毒时间和小鼠的死亡数量呈正相关。短时间内经口多次染毒之后,阿德呋啉在小鼠体内蓄积,最终导致中毒,这是小鼠致死的主要原因。因此在治疗鸡球虫病过程中,需要严格遵守阿德呋啉的休药期。

小鼠骨髓细胞微核试验可以反映受试药物对哺乳动物骨髓细胞染色体的作用能力,用以检测致突变物对遗传物质的损伤情况^[11]。本试验的阿德呋啉剂量组(4.38~21.88 mg/kg)中,微核率、PCE/NCE 值均与阴性对照组之间差异不显著,初步说明阿德呋啉对骨髓细胞无毒性 and 致突变作用。

随着我国人民生活水平的提高,食品安全越来越多地受到人们的重视,人们更加关注新兽药的安全性。本试验结果说明,阿德呋啉具有一定的毒性,但为了客观地评价其安全性仍须进行小鼠的血清学、生化指标检查和病理组织切片的观察,以进一步确定中毒靶器官;此外须要做靶动物的毒性研究,以确定靶动物的 LD₅₀ 以及是否对靶动物存在蓄积毒性,为食品安全带来保障。

参考文献:

[1] Chapman H D. Drug resistance in avian coccidia(a review)[J]. Vet-

clinical type and latent type 2 types. Latent mastitis of the mammary glands and milk of dairy cows have no visible changes, there are no clinical symptoms, but the milk conductivity, somatic cell count, pH value and other理化性质 have changed, must use special理化方法 to detect, its incidence is much higher than clinical mastitis^[5-7]. This study through the application of caustic soda凝乳检验、BTB 检验对广西大学奶牛场的 44 头处于泌乳期的奶牛进行隐性乳房炎的检测,统计分析各种因素与隐性乳房炎发病率的关系,并对这 2 种检验方法的结果进行了比较分析,为奶牛隐性乳房炎的检测提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为广西大学奶牛场提供的处于产奶期的奶牛,乳汁无肉眼可见的异常变化,被检牛胎次 1~7 胎,均为机器挤奶,

erinary Parasitology,1984,15(1):11-27.

[2] Chapman H D. Evaluation of the efficacy of anticoccidial drugs against Eimeria species in the fowl[J]. International Journal for Parasitology, 1998,28(7):1141-1144.

[3] 吴丽君,曾明华,江善祥,等. 阿德呋啉对人工感染鸡球虫病的疗效试验[J]. 中国兽药杂志,2011,45(9):29-31.

[4] 杨娜,曾明华,吴丽君,等. 三种抗球虫药对鸡球虫病的对比疗效[J]. 中国兽药杂志,2011,46(2):16-18.

[5] Dilov P, Chaleva E, Dzhurov A, et al. Species-specific toxicity of arprinocid in mammals and birds[J]. Veterinarno-meditsinski Nauki,1983,20(9):59-67.

[6] 农业部兽药评审中心. 兽药研究技术指导原则汇编[M]. 北京:化学工业出版社,2012:81-109.

[7] 沈建忠. 动物毒理学[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,2012:83-103.

[8] 袁伯俊,廖明阳,李波. 药物毒理学实验方法与技术[M]. 北京:化学工业出版社,2006:155-203.

[9] 陈爽,侯振中,管延杰,等. 亚硝酸钠对小鼠的半数致死量测定[J]. 东北农业大学学报,2012,43(3):91-94.

[10] Aune T, Aasen J A B, Miles C O, et al. Effect of mouse strain and gender on LD₅₀ of yessotoxin[J]. Toxicon,2008,52(4):535-540.

[11] 张奕,董英,周兴华,等. 转 GL 融合蛋白基因水稻的急性毒性与遗传毒性[J]. 江苏农业科学,2012,40(3):268-271.