

郑玲敏,陈 航,周泽伟,等. 饲用胆汁酸添加剂的亚慢性毒性试验[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):222-225.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.074

饲用胆汁酸添加剂的亚慢性毒性试验

郑玲敏¹, 陈 航², 周泽伟¹, 王雨晶¹, 王 凯¹, 鲁倩倩¹, 张雨梅^{1,3}

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009; 2. 扬州大学实验设备处, 江苏扬州 225009;

3. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心/扬州大学, 江苏扬州 225009)

摘要:将饲用胆汁酸按 0、60、600、3 000 mg/kg 添加于饲料中喂养 Wistar 大鼠 90 d,每周称量大鼠体质量与饲料消耗,并在喂养 45、90 d 时剖检,分别进行血液细胞学、血液生化指标检测,计算主要脏器系数并进行组织病理学检查。结果表明,大鼠饲喂低、中、高剂量胆汁酸后平均饲料消耗、体质量增重、脏器系数、血液细胞学指标、大体解剖及组织病理学检查结果与对照组无显著差异。中剂量组血液生化指标除了喂养 45 d 时 GLU、TG 以及喂养 90 d 时 TG 稍低于对照组外,其他指标与对照无显著差异。饲用胆汁酸饲料添加剂在 3 000 mg/kg 添加量时,对大鼠喂养 90 d 未观察到明显的有害作用。

关键词:大鼠;胆汁酸;饲料添加剂;亚慢性毒性;临床应用;安全剂量

中图分类号: S816.73 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0222-04

胆汁酸是在肝脏中合成的具有甾类结构的大分子,是胆汁的主要成分,在促进脂类消化、胆固醇代谢方面有着极为重要的作用^[1]。胆汁酸进入小肠后,乳化并水解脂肪为脂肪酸、甘油,并通过肝肠循环被重新吸收。胆汁酸可以促进胆汁分泌^[2]。研究发现,胆汁酸还是一类信号分子,可介导多种

细胞信号的传导,包括参与钙动员、环磷酸腺苷合成、蛋白激酶 C 易位和活性^[3]。胆汁酸的 TGR5 细胞表面受体广泛分布于褐色脂肪组织、免疫系统、骨骼肌、神经组织、肠内膜等众多组织中,参与能量代谢、炎症反应的信号传导途径^[4-6]。胆汁酸对胆固醇、具有潜在毒性的外源性物质和代谢产物的排泄和生物转化具有重要作用。饲料中添加胆汁酸不仅可以活化脂肪酶、促进脂肪乳化、提高脂肪在肠道中的消化吸收率,还可以帮助机体排出有害物质、提高动物免疫功能、促进动物摄食、提高饵料效率、降低饲养成本,从而改善动物生产性能^[7-9]。笔者通过大鼠亚慢性试验,考察胆汁酸较长时间应用时大鼠是否存在不良反应,旨在为胆汁酸作为饲料添加剂的临床应用提供依据。

收稿日期:2014-06-17

基金项目:江苏高校优势学科建设工程项目;扬州大学“新世纪人才”工程。

作者简介:郑玲敏(1987—),女,硕士研究生,从事兽医药理研究。

E-mail:330848219@qq.com。

通信作者:张雨梅,教授,从事兽医药理和毒理学研究。Tel:(0514) 87979044;E-mail:zym@yzu.edu.cn。

母狐的输精量来确定稀释倍数,确保每只母狐每次所输精子数量不少于 3 000 万个。如果在较短时间内使用,可采用常温保存,保存时间不超过 3 h。短时间内用不完或不用,应低温或冷冻保存。

4.3 输精

输精前,将输精器进行消毒处理,准备好保定架等工具。输精针每只狐 1 支,以防止交叉感染和疾病传播。鲜精可直接输精;低温或冷冻保存的精液置于 30~40℃ 的温水中升温或解冻。

常用的输精器有输精针和气泡式输精器。由于输精器很难对准子宫颈口,精液直接进入子宫的几率低,因此很少使用,大多采用输精针输精。先将母狐固定,一手持输精针,另一只手握住子宫颈口位置,引导输精针插入,从而直接将精液输入到子宫内,受胎率高。输精次数、间隔时间视公狐精子质量和母狐发情状况而定。精子在母狐体内能存活 24 h,母狐排卵能持续 3 d。因此,必须连日或隔日复配,连续配 3 次,才能保证受胎率。此外,也可视精液品质情况而定,品质一般的,可间隔 24 h 输 1 次,连续输 3 次;品质优良的,可间隔

48 h 输 1 次,连续输 2 次。掌握母狐的排卵时间是保证输精成功的关键。

母狐受配后,进入妊娠期。不同地区狐的妊娠期不同,平均为 51~52 d,初产母狐比经产母狐的妊娠期稍短一些。妊娠前半期胚胎发育较慢,受精卵在 12~16 d 后才着床,胚胎开始发育。30 d 后可见母狐腹部膨大、稍有下垂,胎儿各种器官已长成。胎儿后期发育很快,腹围明显增大。此时母狐对周围异物、异常声响、陌生人较为敏感,表现出惊恐状态,影响胚胎的正常发育,易造成流产等,故要注意保持外周环境安静,即便是产仔后,也要避免对母狐造成惊吓,以免出现母狐吃小崽的情况。

参考文献:

- [1] 华 盛,华树芳. 狐品种简介及选种标准[J]. 特种经济动植物, 2005(3):2.
- [2] 冯玉敏. 狐人工授精技术要点[J]. 黑龙江动物繁殖, 2007, 15(4):2.
- [3] 郭永佳. 狐的配种[J]. 特种经济动植物, 2004(2):4.

1 材料与方法

1.1 材料

4 周龄 Wistar 大鼠(清洁级),雌雄各 40 只,由扬州大学比较医学中心提供。动物生产许可证号:SCXK(苏)2012-0004,使用许可证号:SYXK(苏)2012-0029。大鼠饲喂经⁶⁰Co 照射的饲料,自由采食、饮水,所饮水为符合城市饮用水标准的自来水,试验前在试验环境中适应 5 d。饲用胆汁酸呈白色粉末状,胆汁酸总量≥95%,批号 20130428,由某动物保健品有限公司提供。

1.2 受试物剂量及染毒途径

添加饲用胆汁酸于饲料中,经饲料加工厂制成药料,饲喂 90 d。添加量分为 3 000、600、60 mg/kg 高、中、低 3 个剂量组;对照组饲喂大鼠常规饲料。大鼠随机分为 4 组,每组 20 只,雌雄各半。

1.3 观察指标

试验期间观察大鼠的行为及饮食,每周称量体质量、饲料消耗。分别在喂养 45、90 d 时进行大体解剖,每组 10 只大鼠

(雌雄各 5 只),分别取抗凝血进行血液细胞学检测。取血清样品进行谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(CHO)、葡萄糖(GLU)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、血尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)等血液生化指标的检测。称量心、肝、脾、肺、肾、卵巢子宫、睾丸附睾质量,计算脏器系数。对肝、肾、脾、肺、十二指肠、睾丸、子宫等主要脏器进行组织病理学检查。

1.4 数据处理

采用 SPSS 19.0 软件处理数据。

2 结果与分析

试验期内未发现饲用胆汁酸试验组大鼠有异常行为及表现,体质量、饲料消耗、脏器系数、血液学指标等见表 1 至表 8。大鼠饲喂低、中、高剂量胆汁酸后平均饲料消耗、体质量增量、脏器系数、血液细胞学指标、大体解剖及组织病理学检查结果与对照组无显著差异。中剂量组血液生化指标除了喂养 45 d 时 GLU、TG,喂养 90 d 时 TG 稍低于对照组外,其他指标与对照无显著差异。

表 1 胆汁酸饲喂 90 d 大鼠饲料平均消耗量

喂养时间	饲料平均消耗量[g/(只·d)]							
	高剂量		中剂量		低剂量		对照	
	公	母	公	母	公	母	公	母
第 1 周	13.79	12.03	14.29	12.37	13.87	12.50	14.29	12.70
第 2 周	16.40	7.31	17.53	10.91	16.71	9.63	22.40	12.86
第 3 周	27.04	9.44	19.74	10.30	23.84	16.07	25.76	21.36
第 4 周	17.43	12.46	17.04	14.31	17.26	14.79	18.27	13.74
第 5 周	25.97	16.71	22.54	17.20	24.10	18.24	25.11	19.03
第 6 周	27.59	19.89	25.37	22.33	28.39	22.66	27.31	25.51
第 7 周	20.11	13.57	16.97	15.14	22.63	15.03	22.11	16.91
第 8 周	22.26	15.03	21.54	16.83	23.86	17.91	23.91	18.03
第 9 周	24.54	15.14	23.26	17.63	25.60	18.74	25.89	19.77
第 10 周	24.74	15.74	23.09	18.14	26.40	19.43	20.14	18.20
第 11 周	22.40	14.71	22.31	16.40	25.66	18.66	17.66	18.69
第 12 周	22.90	21.14	22.70	23.30	23.82	24.04	22.64	22.56
平均值	22.10	14.43	20.53	15.82	22.68	17.36	22.12	18.28

表 2 胆汁酸饲喂 90 d 大鼠平均增质量

喂养时间	平均增质量[g/(只·d)]							
	高剂量		中剂量		低剂量		对照	
	公	母	公	母	公	母	公	母
第 1 周	3.23±0.81	3.41±0.81	3.36±0.76	3.97±0.81	3.30±0.90	4.90±0.56	3.41±0.73	3.17±1.12
第 2 周	1.50±0.80	4.34±1.05	0.90±0.37	4.87±1.73	2.27±1.39	6.01±0.75	3.76±0.79	6.16±1.01
第 3 周	1.49±0.29	0.90±0.81	0.54±0.29	1.54±0.83	0.57±0.09	0.41±0.41	0.57±0.66	0.89±1.06
第 4 周	1.00±0.20	6.10±2.00	1.64±0.56	2.40±2.13	1.73±1.16	4.79±1.14	2.79±0.89	5.39±1.57
第 5 周	5.20±1.09	7.11±1.99	5.90±0.63	6.16±1.90	5.69±1.43	6.74±1.67	2.81±0.59	6.69±0.69
第 6 周	1.77±0.85	4.94±1.27	2.47±1.24	3.64±1.83	0.94±0.71	3.06±1.27	2.53±2.50	4.99±0.67
第 7 周	1.93±0.57	2.20±0.58	1.54±0.54	2.86±1.20	1.74±0.14	3.86±0.23	1.74±0.72	3.29±0.57
第 8 周	0.89±0.32	1.09±0.58	0.89±0.21	2.63±0.47	1.03±0.31	2.54±0.38	1.17±0.32	1.83±0.61
第 9 周	1.11±0.46	4.14±0.91	0.60±0.15	2.71±0.46	0.66±0.30	1.54±0.37	0.31±0.27	0.71±0.97
第 10 周	1.61±0.48	1.97±0.48	0.74±0.15	2.03±1.13	0.80±0.53	1.60±0.43	0.49±0.24	2.29±0.43
第 11 周	1.21±0.36	1.63±0.33	0.14±0.03	1.23±0.22	0.60±0.48	1.91±0.50	1.09±0.27	0.11±0.50
第 12 周	1.07±0.46	2.40±2.23	1.51±0.30	2.46±0.54	0.49±0.58	3.03±0.22	1.23±0.35	3.71±0.22
平均值	1.72±0.84	3.35±1.66	1.66±1.12	3.04±1.08	1.66±1.11	3.37±1.14	1.82±1.03	3.27±1.64

注:第 1 至 6 周 n=20;其他时间 n=10。

表3 胆汁酸饲喂 45 d 对大鼠血液细胞学指标的影响

组别	WBC (× 10 ⁹ /L)	NEU (%)	LYMPH (%)	MONO (%)	EO (%)
对照	8.31 ± 1.45	17.84 ± 4.74	72.05 ± 4.45	5.09 ± 1.68	0.36 ± 0.27
低剂量组	8.00 ± 1.17	16.69 ± 2.27	72.49 ± 2.75	5.98 ± 1.71	0.38 ± 0.06
中剂量组	7.49 ± 0.64	17.13 ± 6.81	72.13 ± 9.38	5.54 ± 1.92	0.41 ± 0.21
高剂量组	7.52 ± 1.61	16.84 ± 3.42	71.93 ± 3.61	6.13 ± 2.33	0.36 ± 0.23

组别	BASO (%)	RBC (× 10 ¹² /L)	HGB (g/L)	HCT (%)	PLT (× 10 ⁹ /L)
对照	0.10 ± 0.10	7.23 ± 0.23	127.7 ± 4.5	38.38 ± 1.15	725.8 ± 38.9
低剂量组	0.08 ± 0.06	6.83 ± 0.20	119.8 ± 4.5	37.41 ± 1.15	763.7 ± 47.3
中剂量组	0.12 ± 0.10	6.70 ± 0.32	116.1 ± 4.9	36.60 ± 1.09	729.9 ± 38.7
高剂量组	0.08 ± 0.08	7.00 ± 0.25	126.6 ± 3.8	39.55 ± 1.59	673.6 ± 81.7

注: $n=10$ 。WBC 代表白细胞;NEU 代表中性白细胞;LYMPH 代表淋巴细胞;MONO 代表单核细胞;EO 代表嗜酸性粒细胞;BASO 代表嗜碱性粒细胞;RBC 代表红细胞;HGB 代表血红蛋白;HCT 代表红细胞压积;PLT 代表血小板。“*”表示与对照组差异显著($P<0.05$)。下表同。

表4 胆汁酸饲喂 90 d 对大鼠血液细胞学指标的影响

组别	WBC (× 10 ⁹ /L)	NEU (%)	LYMPH (%)	MONO (%)	EO (%)
对照	6.65 ± 1.30	15.20 ± 2.93	78.51 ± 2.53	2.57 ± 1.04	1.07 ± 0.27
低剂量组	6.06 ± 1.00	19.27 ± 3.00	76.89 ± 2.96	3.24 ± 0.74	1.27 ± 0.27
中剂量组	5.72 ± 1.30	17.68 ± 4.19	74.98 ± 5.59	4.95 ± 1.06	3.51 ± 3.54
高剂量组	7.58 ± 0.80	17.66 ± 5.05	74.97 ± 3.31	2.99 ± 0.90	1.97 ± 1.33

组别	BASO (%)	RBC (× 10 ¹² /L)	HGB (g/L)	HCT (%)	PLT (× 10 ⁹ /L)
对照	0.01 ± 0.02	8.00 ± 0.50	141.0 ± 5.6	41.93 ± 1.34	761.0 ± 69.6
低剂量组	0.03 ± 0.05	7.67 ± 0.28	132.0 ± 5.1	39.49 ± 1.33	728.6 ± 58.1
中剂量组	0	7.69 ± 0.45	132.5 ± 2.8	39.90 ± 0.90	665.9 ± 104.9
高剂量组	0.01 ± 0.02	7.88 ± 0.19	136.9 ± 3.4	40.44 ± 1.11	657.0 ± 61.4

注: $n=10$ 。

表5 胆汁酸饲喂 45 d 对大鼠血液生化指标的影响

组别	ALT 含量 (U/L)	AST 含量 (U/L)	TP 含量 (g/L)	ALB 含量 (g/L)	GLU 含量 (mmol/L)
对照	42.60 ± 7.36	151.30 ± 18.50	61.06 ± 3.92	30.89 ± 1.73	8.08 ± 1.47
低剂量组	44.70 ± 8.12	171.90 ± 37.88	63.31 ± 5.05	31.63 ± 1.28	7.01 ± 1.28
中剂量组	42.60 ± 6.08	161.60 ± 41.32	60.54 ± 2.07	30.72 ± 1.44	6.62 ± 0.54 *
高剂量组	45.00 ± 6.40	177.30 ± 61.04	66.38 ± 3.72	31.93 ± 1.66	7.37 ± 1.24

组别	BUN 含量 (mmol/L)	CRE 含量 (μmol/L)	CHO 含量 (mmol/L)	TG 含量 (mmol/L)
对照	6.68 ± 0.54	30.00 ± 7.00	1.53 ± 0.17	0.93 ± 0.25
低剂量组	6.44 ± 0.80	32.70 ± 3.38	1.65 ± 0.25	0.75 ± 0.28
中剂量组	6.26 ± 0.57	29.20 ± 2.48	1.66 ± 0.39	0.61 ± 0.14 *
高剂量组	6.55 ± 0.36	32.80 ± 4.36	1.67 ± 0.29	0.76 ± 0.19

注: $n=10$ 。ALT 代表谷丙转氨酶,AST 代表谷草转氨酶,TG 代表甘油三酯,CHO 代表总胆,固醇,GLU 代表葡萄糖,TP 代表总蛋白,ALB 代表白蛋白,BUN 代表血尿素氮,CRE 代表肌酐。

3 结论与讨论

本研究表明,饲用胆汁酸饲料添加剂在 3 000 mg/kg 添加量时,对大鼠喂养 90 d 未观察到明显的有害作用。如果在 60 mg/kg 推荐水平使用,临床应用应该是安全的。亚慢性毒性是指试验动物连续多日接触较大剂量的外来化合物所出现的中毒效应,试验目的是观察不同剂量外源物质长期饲喂动物产生的毒性作用性质及靶器官,并制定安全使用剂量^[6-9]。

正常情况下动物血液生理生化指标维持动态平衡,当动物受生物、化学、应激等因素影响时,血液生理生化指标就会发生相应的变化。血液生理生化指标是反映外来物质对机体毒性作用程度的关键指标。本研究表明,中剂量组血液生化指标除了喂养 45 d 时 GLU、TG,喂养 90 d 时 TG 稍低于对照组外,其他指标与对照无显著差异。胆汁酸中剂量组的 GLU、TG 数值均在 Wistar 大鼠正常生理指标范围内。

表 6 胆汁酸饲喂 90 d 对大鼠血液生化指标的影响

组别	ALT 含量 (U/L)	AST 含量 (U/L)	TP 含量 (g/L)	ALB 含量 (g/L)	GLU 含量 (mmol/L)
对照	71.60 ± 14.00	160.50 ± 24.50	60.17 ± 1.57	32.75 ± 1.09	9.43 ± 1.12
低剂量组	66.11 ± 12.28	129.89 ± 16.35	61.77 ± 1.84	31.83 ± 1.32	8.21 ± 0.81
中剂量组	67.10 ± 13.30	139.50 ± 35.70	62.94 ± 2.25	31.55 ± 1.31	8.43 ± 1.26
高剂量组	62.30 ± 12.62	126.30 ± 22.50	63.30 ± 3.70	32.05 ± 1.88	8.56 ± 0.60

组别	BUN 含量 (mmol/L)	CRE 含量 (μmol/L)	CHO 含量 (mmol/L)	TG 含量 (mmol/L)
对照	7.25 ± 0.88	34.80 ± 2.84	1.69 ± 0.09	1.15 ± 0.39
低剂量组	7.14 ± 0.80	32.44 ± 3.26	1.49 ± 0.10	0.72 ± 0.35
中剂量组	6.83 ± 0.42	36.50 ± 5.40	1.48 ± 0.13	0.68 ± 0.30 *
高剂量组	7.22 ± 0.32	34.00 ± 3.00	1.61 ± 0.18	1.16 ± 0.11

注: $n = 10$ 。

表 7 胆汁酸饲喂 45 d 对大鼠脏器系数的影响

组别	心	肝	脾	肺	肾	子宫卵巢	睾丸
对照	0.345 ± 0.047	4.254 ± 0.406	0.264 ± 0.028	0.727 ± 0.141	0.708 ± 0.080	0.312 ± 0.150	1.363 ± 0.085
低剂量组	0.343 ± 0.027	4.258 ± 0.236	0.315 ± 0.055	0.735 ± 0.118	0.673 ± 0.035	0.339 ± 0.057	1.576 ± 0.184
中剂量组	0.333 ± 0.017	3.829 ± 0.380	0.305 ± 0.032	0.726 ± 0.067	0.602 ± 0.042	0.274 ± 0.184	1.516 ± 0.173
高剂量组	0.413 ± 0.099	4.223 ± 0.484	0.290 ± 0.037	0.823 ± 0.183	0.723 ± 0.064	0.285 ± 0.174	1.696 ± 0.278

表 8 胆汁酸饲喂 90 d 对大鼠脏器系数的影响

组别	脏器系数(%)						
	心	肝	脾	肺	肾	子宫卵巢	睾丸
对照	0.345 ± 0.042	4.052 ± 0.237	0.218 ± 0.026	0.543 ± 0.055	0.645 ± 0.058	0.327 ± 0.139	0.984 ± 0.094
低剂量组	0.346 ± 0.030	3.869 ± 0.110	0.254 ± 0.030	0.585 ± 0.091	0.741 ± 0.062	0.340 ± 0.165	0.924 ± 0.094
中剂量组	0.337 ± 0.040	3.513 ± 0.097	0.215 ± 0.023	0.619 ± 0.060	0.653 ± 0.039	0.275 ± 0.117	1.065 ± 0.035
高剂量组	0.343 ± 0.067	3.495 ± 0.395	0.204 ± 0.029	0.509 ± 0.069	0.584 ± 0.127	0.275 ± 0.174	0.983 ± 0.095

参考文献:

[1] 张久聪, 聂青和. 胆汁酸代谢及相关进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2008, 17(11): 953-956.

[2] Keitel V, Kubitz R, Haussinger D. Endocrine and paracrine role of bile acids[J]. World Journal of Gastroenterology, 2008, 14(37): 5620-5629.

[3] Nguyen A, Bouscarel B. Bile acids and signal transduction: role in glucose homeostasis[J]. Cell Signal, 2008, 20: 2180-2197.

[4] Poole D P, Godfrey C, Cattaruzza F, et al. Expression and function of the bile acid receptor GpBAR1 (TGR5) in the murine enteric nervous system [J]. Neurogastroenterology and Motility, 2010, 22(7): 814-825.

[5] Keitel V, Goerg B, Bidmon H J, et al. The bile acid receptor TGR5 (gpbar-1) acts as a neurosteroid receptor in brain[J]. Glia, 2010, 58(15): 1794-1805.

[6] Olefsky J M, Glass C K. Macrophages, inflammation and insulin resistance[J]. Annu Rev Physiol, 2010, 72: 219-246.

[7] 周书耘, 刘永坚, 梁海鸥, 等. 饲料中添加胆汁酸对军曹鱼生长及体组成的影响[J]. 南方水产, 2010, 6(4): 20-25.

[8] 唐俊英. 胆汁酸在动物营养中的应用[J]. 养殖技术顾问, 2011(9): 47.

[9] 曾端, 李力, 王群初, 等. 胆汁酸在动物营养研究中的应用[J]. 饲料研究, 2002(5): 19-20.