基础研究 文章编号:0253-3626(2011)01-0051-03

三聚氰胺对 SD 胎鼠肾脏致病性研究

蔡仕彬[1],吴 玉[1],冯 洋[1],刘智涛[1],苏 萍[1],王继红[1],杜永洪[2]
(1. 重庆医科大学实验教学管理中心生物化学与分子生物学实验室;2. 重庆医科大学生物医学工程系,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究三聚氰胺在 SD 大鼠胚胎发育过程中对胎鼠肾的致病性。方法:将 40 只 SD 孕鼠随机分为 4 个三聚氰胺组和 1 个对照组,用浓度分别为 360、480、600、720 mg/(kg·d)三聚氰胺悬液连续灌胃,对照组灌胃 2 ml 蒸馏水。生产后采用 ELISA 法检测新生鼠血液和肾脏中三聚氰胺含量,常规 HE 染色观察新生鼠肾组织的病理变化。结果:各组新生鼠血液中均可检测到三聚氰胺;600、720 mg/(kg·d)组新生鼠肾三聚氰胺浓度显著高于对照组。病理组织学检查发现 600 mg/(kg·d)组肾小球细胞数量增多,体积增大,髓旁毛细血管扩张充血。720 mg/(kg·d)组肾小管和肾盂扩张,未见结石和明显黄色沉淀物。结论:三聚氰胺通过胎盘屏障进入胎鼠体内,沉积在肾脏,对胎鼠肾生长发育具有损伤作用,损伤主要集中在肾小管和肾间质。

【关键词】三聚氰胺;胎肾;病理学;酶联免疫吸附法
【中国图书分类法分类号】R114 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-06-08

The pathogenicity of melamine on fetal kidney in SD rats

CAI Shi-bin, et al
(*Department of Biochemistry and Molecular, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the pathogenicity of Melamine in the embryonic kidney development of SD rat. *Methods*: 40 pregnant SD rats were randomized into 4 Melamine groups and the normal control group with 8 rats per group. The rats of the 4 Melamine groups were fed the Melamine with the dosage range of 360, 480, 600, and 720 mg/(kg·d), respectively. The rats of the normal control group were given 2 ml of distilled water by oral gavage per day. The concentration of Melamine was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the blood and kidneys of the newborn rats. HE staining was used to examine the histopathological change of newborn rat kidneys. *Results*: Melamine was found in the blood of newborn rats per group. The concentration of melamine in 600, 720 mg/(kg·d) dose groups were significantly higher than that of the normal control group($P<0.05$). Pathological examination showed that hyperplasia of glomerulus in the 600 mg/(kg·d) dose group, and size enlarged, The blood capillary in the renal medulla expanded with RBCs. Kidney tubular and pelvis expanded significantly. The urinary calculus and yellow precipitates were not found in kidneys of 720 mg/(kg·d) dose group. Tubules clearly expanded. *Conclusion*: Melamine could penetrate into fetal rats through placental barrier, and accumulate in the kidney, which may result in the injury of the growth and development of fetal rat kidney.

【Key words】melamine; fetal Kidney; pathogenicity; ELISA

2008 年 9 月,我国爆发三聚氰胺污染奶粉导致婴幼儿尿路结石、肾衰竭甚至死亡等的重大公共卫生事件。2010 年三聚氰胺奶粉再现市场,再一次掀起食品安全的大讨论。本实验以 SD 胎鼠为研究对象,研究三聚氰胺对胎鼠肾脏生长发育的致病作用。

1 材料和方法

1.1 材料及药品

SD 大鼠(购自重庆医科大学实验动物中心),三聚氰胺(Alfa Aesar 纯度>99%),三聚氰胺试剂盒(Beacon 公司,美国),肌酐测定试剂盒、尿酸测定试剂盒(四川近克科技有限公司),尿素测定试剂盒(保定长城临床试剂公司)。

1.2 仪器

全自动生化分析仪(Rayto RT-200CPLUS),酶标仪(BIO-TEK INSTRUMENTS, INC ELX80),石蜡切片机(Taiva-R135),显微镜(OLYMPUS BX40F4),离心机(Eppendorf 5415R)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组和处理 将 40 只妊娠 1 d (查见阴栓确定)的孕鼠(清洁级,日龄 90 d,210~220 g)随机分成 4 个实验组和 1 个对照组,每组 8 只孕鼠。分别灌胃 2 ml 浓度为 360、480、600、720 mg/(kg·d)三聚氰胺悬液,对照组灌胃 2 ml 蒸馏水。19~21 d 孕鼠生产后停止灌药。新生鼠出生 8 h 后进行

作者介绍:蔡仕彬(1989-),男,硕士,研究方向:医学物理。
通信作者:王继红,女,副教授,Email:wjhkyh@163.com。

以下实验：从实验组和对照组中各随机取 18 只新生鼠作为检测样本，编为实验组 M_1~M_4 和对照组 M_0。

1.3.2　血液三聚氰胺含量检测　M_1 组新生鼠样本中随机取 12 只新生鼠断颈取血，离心取血清，每只 100 μl，用三聚氰胺试剂盒检测三聚氰胺含量。重复以上步骤检测实验组 M_2~M_4 和对照组 M_0 新生鼠血液三聚氰胺含量。

1.3.3　肾组织三聚氰胺含量检测　取新生鼠双肾制成匀浆，用三聚氰胺试剂盒检测实验组 M_1~M_4 和对照组 M_0 胎鼠肾组织三聚氰胺含量。

1.3.4　病理检查　从实验组 M_1 取 6 只新生鼠处以安乐死，取双肾于 Bouin's 固定液固定、石蜡包埋、切片、HE 染色、100~200 倍光镜下观察。重复相同步骤观察实验组 M_2~M_4 和对照组 M_0 病理变化。

1.3.5　统计学分析　实验数据用平均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，所有统计结果用 SPSS 13.0 统计软件包处理，对计量资料进行方差分析。

2　结　果

2.1　血液三聚氰胺浓度测定

表 1 显示三聚氰胺处理后新生鼠血液中有含量不等的三聚氰胺，且浓度与孕鼠灌胃浓度正相关，与对照组比较，实验组三聚氰胺浓度有统计学意义（$P<0.05$）。

2.2　肾组织三聚氰胺浓度测定

新生鼠肾组织中检测到不同浓度的三聚氰胺，M_3 和 M_4 组肾组织三聚氰胺浓度明显高于对照组（$P<0.05$、见表 1）。M_1 组与 M_0 组比较无明显差异（$P>0.05$）。M_1、M_2 组血液中三聚氰胺浓度明显高于肾组织中的含量（$P<0.05$）。

表 1　新生鼠血液和肾组织三聚氰胺含量测定（$\bar{x} \pm s$）

组别	样本数	三聚氰胺浓度（mg/L）	
	n	血液	肾组织
M_0	12	0.22 ± 0.19	0.39 ± 0.41
M_1	12	5.24 ± 1.14*	1.42 ± 0.56*
M_2	12	6.37 ± 0.89*	2.47 ± 0.61*
M_3	12	7.92 ± 1.08	4.26 ± 0.70
M_4	12	9.30 ± 0.98	7.10 ± 0.71

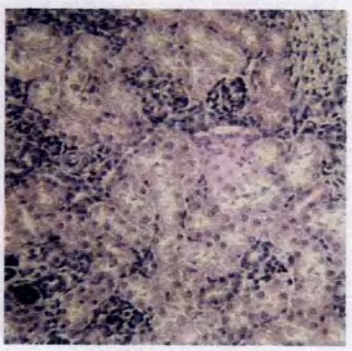
注：M_1、M_2 组三聚氰胺浓度血液和肾组织比较，*$P<0.05$

2.3　肾组织病理检查结果

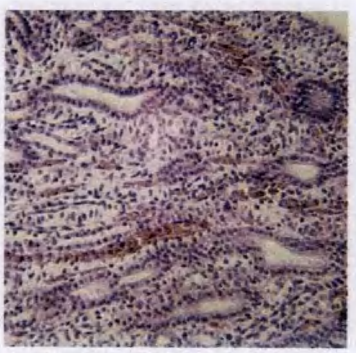
与对照组 M_0 比较，M_1、M_2 组肾小球及肾小管等结构基本正常。M_3 组肾小球细胞数量增多，体积代偿性增大，髓旁毛细血管扩张、充血。M_4 组肾小管近曲小管、远曲小管管腔显著扩张，肾盂亦可见扩大，髓质区成纤维样细胞增生，肾间质所占面积增大，肾盂内可见中量红细胞。未见结石和明显黄色沉淀物（见图 1）。

3　讨　论

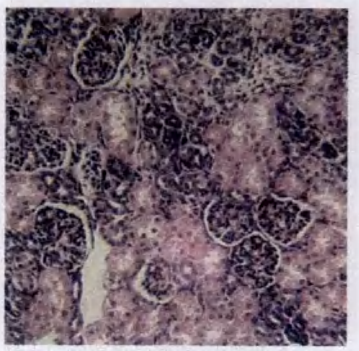
现有研究结果表明，成年小鼠、大鼠、猫及人类等服用一定剂量的三聚氰胺，其肾均会产生结石，引起肾功能衰竭[1]。



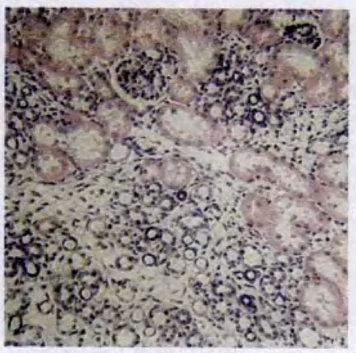
A. M_0 正常对照组（×200）



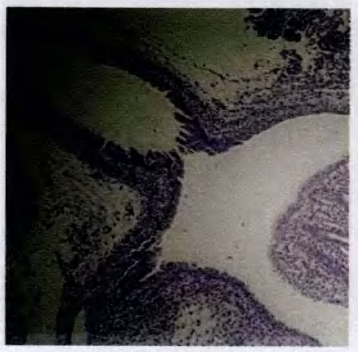
B. M_3 髓旁毛细血管扩张、充血（×200）



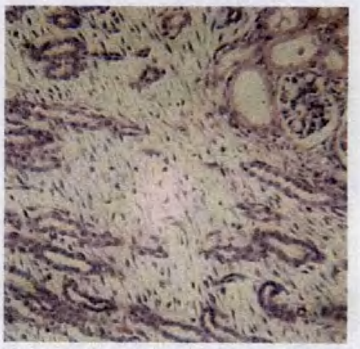
C. M_3 肾小球细胞数量增多，代偿性体积增大（×200）



D. M_4 肾小管明显扩张（×200）



E. M_4 肾盂扩张（×100）



F. M_4 髓质成纤维样细胞明显增生，间质增加（×200）

图 1　实验组新生鼠肾组织病理变化（HE）

大鼠拌料口服 14 d、28 d、13 周的无不良反应剂量分别是 417、240、63 mg/(kg·d)[2]，口服半数致死量(LD_{50})为 3.16 g/kg。

Mast 等[3]通过经口给药方式一次性给予成年雄性 Fisher 344 大鼠 0.38 mg ^{14}C 标记的三聚氰胺，实验发现给药剂量的 90%以原形的方式通过尿液进行排泄；肾脏和膀胱中含量最高。本实验结果显示：三聚氰胺可经胎盘屏障从母体进入胎鼠血液中，并以原形形式存在于胎鼠血液及肾脏中。新生鼠血液和肾脏三聚氰胺残量分析，胎鼠肾对三聚氰胺有排泄能力，但当血液三聚氰胺浓度超过(7.92 ± 1.08) mg/L 时，肾组织三聚氰胺浓度迅速上升，超过肾排泄能力，是其在肾脏沉积增多。

Okumura 等[4]给 F344 雄性大鼠喂不同浓度的三聚氰胺 36 周，1%和 3%浓度三聚氰胺组大鼠的结石发生率分别是 100%(10/10)和 70%(7/10)。2007 年美国对死于三聚氰胺污染猫的解剖结果证实，三聚氰胺主要对泌尿系统造成损害，病理解剖发现远曲小管损伤，并在远曲小管和集合管内出现条纹状结晶，近曲小管未见明显影响，部分可观察到间质纤维化和炎症[5]。本实验发现，孕鼠口服低剂量三聚氰胺，新生鼠肾小球及肾小管等组织结构基本正常。高剂量组新生鼠肾小球细胞数量增多，体积代偿性增大。髓旁毛细血管充血，近曲小管、远曲小管以及肾盂明显扩张，提示存在轻微肾盂积水。三聚氰胺刺激肾小管及间质，使间质成纤维样细胞增生，肾小管发育不良、分布少，间质面积增加。

根据以上结论分析，孕鼠在孕期持续服用浓度超过 600 mg/(kg·d)的三聚氰胺，胎肾中三聚氰胺超过(4.26 ± 0.70) mg/L。三聚氰胺进入体内后不能在肝脏代谢，肾脏是其排泄的主要器官。孕鼠妊娠期间，母血中的三聚氰胺经过胎盘转移到胎鼠体内，早期胎鼠肾脏不具有排泄能力，后期肾脏具备排泄能力，但十分有限。血液中的三聚氰胺持续刺激尚未发育完全的肾脏，致使胎鼠肾脏发育异常，肾小球体积增大，滤过膜通透性增加，肾小管、肾盂均扩张，间质纤维化，组织病理显著改变。

徐明灯等[6]对 SD 新生大鼠和成年鼠不同剂量的染毒实验表明，三聚氰胺低剂量在新生组和成年组不同染毒时间均无明显晶体形成；三聚氰胺高剂量在新生鼠 60 d 时有少量晶体形成，在成年组 15 d 时有少量晶体形成，60 d 时有大量晶体形成。本实验新生鼠肾脏常规石蜡切片 HE 染色观察未发现结石和明显黄色沉淀物，远曲小管和集合管均未发现三聚氰胺晶体形成。分析未形成结晶的原因是肾脏中三聚氰胺浓度尚不足以形成可见晶体沉积于肾小管。但是依据肾脏的损伤变化和使用 ELISA 法检测到肾脏中含有三聚氰胺，表明三聚氰胺没有形成晶体之前已经对胎肾发育产生了轻微的损伤。

综上所述，孕鼠服用超过 600 mg/(kg·d)的三聚氰胺对胎鼠肾脏生长发育具有损伤作用，然而三聚氰胺在孕鼠和胎鼠血液中的分布及其对胎鼠肾生长发育的损伤机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 佘永新，柳江英，马晓玲，等.三聚氰胺的毒性及其危害[J].食品与药品，2009，11(3)：71-74.

[2] US Food and Drug Administration.Interim Melamine and Analogues Safety/ Risk Assessment[J/OL]，2007.http://www.fda.gov/Food/Food Safety/Food Contaminants Adulteration/Chemical Contamnants/Melamine/ucm 164658.htm.

[3] Mast R W，Jeffcoat A R，Sadler B M，et al.Metabolism，disposition and excretion of [^{14}C]melamine in male Fisher 344 rats[J].Food and Chem ical Toxicology，1983，21(6)：807-810.

[4] Okumura M，Hasegawa R，Shirai T，et al.Relationship between calculus formation and carcinogenesis in the urinary bladder of rats administered the non-genotoxic agents，thymine or melamine[J].Carcinogenesis，1992，13(6)：1043-1045.

[5] Cianciolo R E，Bischoff K，Ebel J G，et al.Clinicopathologic，histologic，and toxicologic findings in 70 cats inadvertently exposed to pet food contaminated with melamine and cyanuric acid[J].American Veterinary Medical Association，2008，233(5)：729-737.

[6] 徐明灯，袁心刚，吴盛德，等.三聚氰胺(酸)对肾脏毒性的实验研究[J].重庆医科大学学报，2009，34(10)：1362-1366.

(责任编辑：冉明会)