基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1362-04

三聚氰胺(酸)对肾脏毒性的实验研究

徐明灯,袁心刚,吴盛德,魏光辉
(重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究三聚氰胺(酸)对肾脏的毒理损害。方法:将新生鼠和成年鼠分别分为三聚氰胺高剂量组(NM,M),三聚氰胺低剂量组(Nm,m),三聚氰酸高剂量组(NA,A),三聚氰酸低剂量组(Na,a),三聚氰胺-三聚氰酸高剂量组(NMA,MA),三聚氰胺-三聚氰酸低剂量组(Nma,ma)和正常对照组(NN,N)。给予相应剂量三聚氰胺(酸)灌胃持续两月,于灌胃 3、15、60 d 随机处死各组大鼠,称取体重、肾重,检测血液常规生化指标;观测肾脏组织细胞形态和超微结构变化。结果:NMA 组及 Nma 组体重先增加,然后减少。MA 组及 ma 组体重持续减轻。各给药组随着灌胃时间延长,肾脏晶体不断增加。电镜显示含结石肾小管微绒毛减少或消失,粒细胞浸润等炎性反应。各给药组随着灌胃时间的延长,肾体重比、尿素氮、肌酐、尿酸值增加。结论:三聚氰胺(酸)可以在大鼠肾脏形成晶体样结石;三聚氰胺(酸)成年鼠的肾毒性大于新生鼠;三聚氰胺(酸)混合物毒性大于单体;三聚氰胺(酸)形成晶体数量与时间、剂量呈正相关;三聚氰胺(酸)毒性存在个体及窝别差异。

【关键词】三聚氰胺;三聚氰酸;结石
【中国图书分类法分类号】R114 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-27

Study the toxicology damage of melamine (cyanuric acid) to rats kidney

XU Ming-deng, et al
(*Department of Urology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Study the toxicology damage of melamine (cyanuric acid) to rats' kidney. *Methods*: Divided the newborn rats and adult rats into high dose group of melamine (NM,M), low dose group of melamine (Nm,m), high dose group of cyanuric acid (NA,A), low dose group of cyanuric acid (Na,a), high dose group of melamine-cyanuric acid (NMA,MA), low dose group of melamine-cyanuric acid (Nma,ma) and normal control group (NN,N). The corresponding dose of melamine (cyanuric acid) was given by oral gavage and lasted two months. Rats were killed at 3 day, 15 day and 60 day. The body weight and kidney weight were collected. Renal function was detected and the microscopic and ultra-microscopic renal histology structural changes were observed. *Results*: The body weight of NMA group and Nma group increased first, and then reduced. The body weight of MA group and ma group reduced gradually. The number of kidney crystal increased with the administration time extension. The electron microscope demonstrated that the tubules which contained stones microvilli reduced or disappeared, granulocyte infiltration and other inflammatory response. The kidney weight/body weight, urea nitrogen, creatinine, uric acid value increased in administration groups. *Conclusion*: Melamine (cyanuric acid) could produce insoluble crystals in rat kidney and lead to renal dysfunction. The toxicity of melamine (cyanuric acid) was greater in adult rats than in newborn. The number of melamine (cyanuric acid) crystals was positively correlated with dose and time. The toxicity of melamine was greater than cyanuric acid. Melamine (cyanuric acid) mixture toxicity was greater than the monomer. Melamine (cyanuric acid) toxicity had individual differences and brood diffenence.

【Key words】Melamine; Cyanuric acid; Crystal

2007 年北美出现三聚氰胺和三聚氰酸污染宠物饲料,大量宠物出现泌尿系结石、肾衰竭以致死亡;2008 年三聚氰胺污染奶粉导致婴幼儿尿路结石、肾衰竭、甚至死亡等重大公共卫生事件,更加引起国内外学者广泛关注。至今,有关三聚氰胺、三聚氰酸、三聚氰胺-三聚氰酸混合物对不同日龄大鼠的肾脏毒性损害尚无深入研究。

作者介绍:徐明灯(1983-),男,硕士,
研究方向:小儿尿路疾病。
通讯作者:魏光辉,男,教授,E-mail:ghwei@mail.cbcmu.com。

1 材料及方法

1.1 实验用动物及试剂

21 窝 179 只 7 日龄 SD 新生大鼠及 84 只成年健康 SD 大鼠(购于重庆医科大学实验动物中心),新生鼠 10 ~ 12 g,成年鼠 200 ~ 250 g,常规喂养于塑料笼内,自由进食饮水,室

温 23℃ ± 1℃，相对湿度 50% ± 10%，光照周期为 12 h/d。

三聚氰胺（纯度 >99%），三聚氰酸（纯度 >98%）从 Sigma-Aldrich（China）公司购得。

1.2 方法

21 窝 179 只新生鼠随机分为 7 组，每组 3 窝；成年鼠分为与新生鼠给药剂量相对应的 7 组，每组 12 只。即三聚氰胺高剂量组，400 mg/（kg·d），NM，M；三聚氰胺低剂量组，40 mg/（kg·d），Nm，m；三聚氰酸高剂量组，400 mg/（kg·d），NA，A；三聚氰酸低剂量组，40 mg（kg·d）/，Na，a；三聚氰胺 - 三聚氰酸高剂量组，400/400 mg/（kg·d），NMA，MA；三聚氰胺 - 三聚氰酸低剂量组，40/40 mg/（kg·d），Nma，ma；和正常对照组，0 mg/（kg·d），NN，N；NN 组及 N 组给予自来水 1 ml/（kg·d）灌胃。每天给予相应剂量的三聚氰胺（酸）灌胃，持续两个月，每日定时称取记录大鼠体重并观察一般表现。分别于灌胃 3、15、60 d 麻醉后，经下腔静脉取血后处死，切取双侧肾脏并称重，在解剖显微镜下观察肾脏纵切面晶体分布情况，4% 中性甲醛固定肾脏后常规石蜡包埋切片，HE 染色后光镜观察。应用电镜观测肾脏超显微结构。日立 717 自动分析仪测量血液尿素氮、肌酐及尿酸值。

1.3 统计学分析

实验数据用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，对体重、肾体重比、尿素氮值、肌酐值、尿酸值进行方差分析，$P<0.05$，具有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组体重变化及一般表现

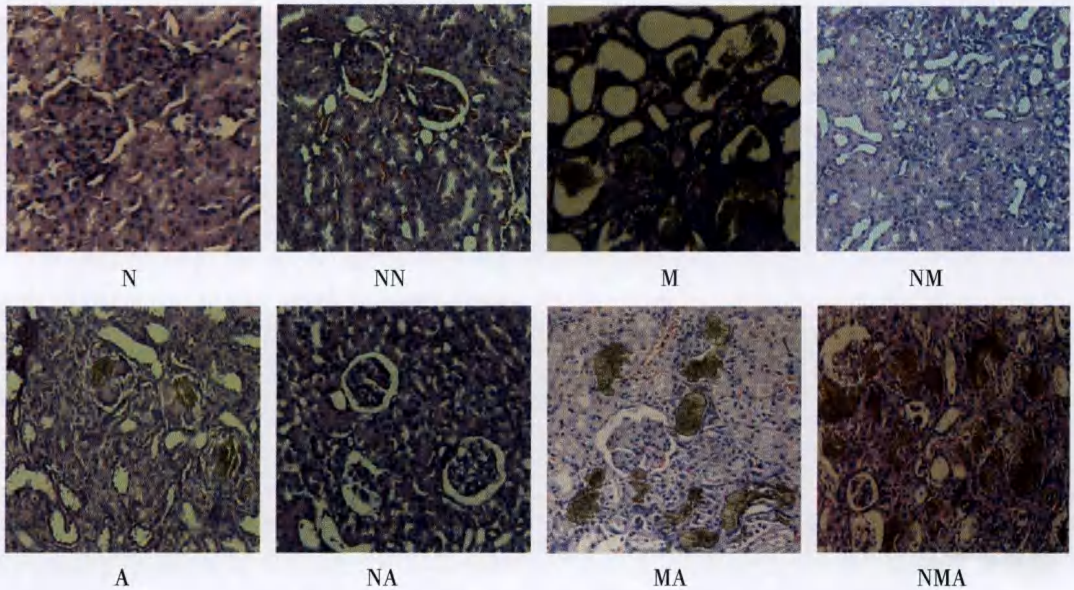
灌胃前各新生鼠组食欲、活动度及平均体重没有明显差异（$P>0.05$）；NMA 及 Nma 组体重先增加，NMA 组 4 d 时体重开始下降，其中一窝在 35 d 出现体重下降，Nma 组在近 60 d 时体重开始下降；其余新生鼠组体重持续增加。成年鼠各组食欲、活动度及平均体重在灌胃前也无明显差异（$P>0.05$）；MA 组、ma 组体重持续呈下降趋势，其余各成年组体重显示缓慢增加，然后维持上下波动，其中 M 组在近 60 d 时体重开始下降。NMA 组在 3 d 时开始死亡，存活时间小于 15 d；MA 组全部在 10 d 内死亡，ma 组 2 只存活时间超过 15 d，并表现毛发凌乱，可见鼻部出血；M 组灌胃 50 d 之后出现毛发凌乱，未见鼻部出血；其余成年鼠组未见明显异常表现。

2.2 肾脏解剖显微镜、光镜及电镜表现

各实验组随着观测时间的延长，肾脏逐渐变大变白，肾皮质分布着黄白色的小点，以混合组更为明显，在解剖显微镜下，晶体数量从阴性到以肾盂为中心呈扇形分部逐渐增加；HE 染色后显示各组肾小球形态基本正常，肾小管内出现不同程度棕褐色的结晶，肾小管及肾小球的鲍曼氏囊明显扩张，肾小管上皮细胞及间质细胞明显水肿，炎症细胞浸润（见图 1）。电镜下显示各给药组肾小管微绒毛减少或消失、粒细胞浸润等炎症反应（见图 2），与光镜观测相似，对照组肾小管正常。

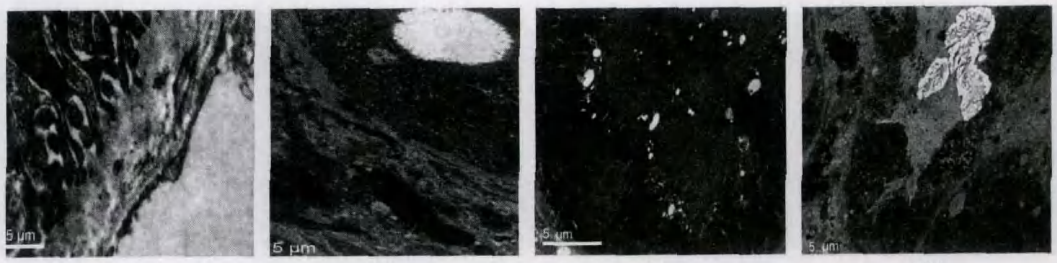
2.3 各组肾体重比情况

各组随着三聚氰胺（酸）给药时间延长肾体重比增加，3 d 时各新生组肾体重比：NMA 组>NA 组>NN 组>NM 组>Nma 组>Nm 组>Na 组，$P<0.05$；各成年组：MA 组>ma 组>M 组≈m 组≈A 组≈a 组≈N



M，A，MA 和 NMA 含有大量晶体；NM 含有少量晶体

图 1 各组肾脏光镜图像（×100）



N M A MA

M、A 及 MA 肾小管微弱毛消失或减少，粒细胞浸润等炎症反应，以 MA 最为严重。

图 2 肾脏电镜表现(×5 000)

表 1 各组不同染毒时间肾体重比($\bar{x}\pm s$)

组别	n	3 d	n	15 d	n	60 d
NN	8	0.013 0 ± 0.000 7	9	0.013 7 ± 0.000 8	8	0.007 5 ± 0.000 8
Nm	9	0.012 3 ± 0.000 3	8	0.011 4 ± 0.000 8	10	0.008 6 ± 0.000 5
NM	7	0.012 9 ± 0.002 8	9	0.014 6 ± 0.002 4	8	0.009 3 ± 0.000 8
Na	8	0.010 7 ± 0.000 8	10	0.013 7 ± 0.001 9	8	0.009 3 ± 0.006 9
NA	8	0.014 2 ± 0.002 6	8	0.014 2 ± 0.001 9	9	0.008 7 ± 0.001 0
Nma	10	0.012 8 ± 0.001 0	7	0.014 2 ± 0.001 9	8	0.021 4 ± 0.006 3●
NMA	9	0.023 9 ± 0.002 0◇	11	0.023 2 ± 0.004 0◇	7	0.027 7 ± 0.004 6◇
N	4	0.007 0 ± 0.000 2	4	0.007 1 ± 0.001 5	4	0.006 3 ± 0.000 9
m	4	0.007 6 ± 0.000 4	4	0.010 9 ± 0.002 8	4	0.011 5 ± 0.006 4
M	4	0.007 5 ± 0.001 5	4	0.010 5 ± 0.001 8	4	0.016 6 ± 0.000 8▲
a	4	0.008 0 ± 0.002 0	4	0.007 8 ± 0.000 8	4	0.006 9 ± 0.000 9
A	4	0.007 5 ± 0.001 0	4	0.011 8 ± 0.002 4	4	0.009 7 ± 0.001 1
ma	4	0.013 6 ± 0.004 0*	8	0.017 7 ± 0.004 0△	–	–
MA	4	0.016 0 ± 0.001 3*	8	0.014 5 ± 0.003 0△	–	–

–：大鼠存活时间未达 60 d，●：Nma 组 60 d 与其余 60 d 新生鼠组比较 $P<0.05$，◇：NMA 组 3、15、60 d 与其余新生鼠 3、15、60 d 比较 $P<0.05$，*MA 组及 ma 组 3 d 与其余 3 d 成年组比较 $P<0.05$，△：MA 组及 ma 组 15 d 与其余 15 d 成年组比较 $P<0.05$，▲M 组 60 d 与其余 60 d 成年组比较 $P<0.05$。

组，$P<0.05$。15 d 时各新生组肾体重比：NMA 组>Nma 组>NM 组>NA 组>Na 组=NN 组>Nm 组，$P<0.05$；各成年组：ma 组>MA 组>m 组>M 组>A 组>a 组>N 组，$P<0.05$；60 d 时各新生组肾体重比：NMA 组>Nma 组>NM 组=Na 组>NA 组>Nm 组>NN 组，$P<0.05$；各成年组：M 组>m 组>A 组>a 组>N 组(见表 1)，$P<0.05$。

2.4 各组尿素氮、肌酐、尿酸值情况

新生鼠染毒 3 d 及 15 d 时采血较少，检测不准确，本实验未予纳入结果分析。新生鼠染毒 60 d 时，Nma 组尿素氮、肌酐值明显高于其余新生鼠组(见表 2)，$P<0.05$；尿酸值在各新生鼠组中无明显差异，$P>0.05$。各成年组中：M 组、ma 组尿素氮、肌酐、尿酸值随着三聚氰胺(酸)灌胃时间的延长而增加，m 组、A 组及 a 组随着时间延长，无明显变化；N 组在各时间点尿素氮、肌酐、尿酸相似；从组间可以看出 MA 组尿素氮、肌酐、尿酸值大于 ma 组，并且这两组尿素氮、肌酐、尿酸值明显大于其余成年组，$P<0.05$。

3 讨 论

三聚氰胺是一种用途广泛的三嗪类含氮杂环有机化合物，常用于制造日用器皿、装饰贴面板等；三聚氰酸是在三聚氰胺生产过程中产生的与之结构相似的衍生物，常用作除草剂、染料、树脂、水池消毒剂等。

早期的动物实验表明三聚氰胺毒性轻微，大剂量口服有利尿作用但无肾毒性；慢性和亚慢性毒理实验也证明其没有肾毒性，但能致泌尿系结石；另有证据显示三聚氰胺在哺乳动物体内不能被转化

表 2 各组不同时间点尿素氮、肌酐、尿酸值($\bar{x}\pm s$)

组别	3 d			15 d				60 d		
	n	尿素氮	肌酐	尿酸	n	尿素氮	肌酐	尿酸	n	尿素氮	肌酐	尿酸
NN	-	-	-	-	-	-	-	-	8	7.64±1.92	28.53±4.32	221.8±35.66
Nm	-	-	-	-	-	-	-	-	10	8.45±1.72	19.85±2.95	332.9±32.4
NM	-	-	-	-		-	-	-	8	9.17±2.77	32.43±2.05	203.1±103.9
Na	-	-	-	-	-	-	-	-	8	12.21±6.53	61.63±14.36	277.2±110.3
NA	-	-	-	-	-	-	-	-	9	7.03±0.68	32.21±5.79	381.7±159.1
Nma	-	-	-	-	-	-	-	-	8	56.12±27.58●	146.83±155.43○	239.5±140.3
N	4	8.56±2.19	63.70±7.65	108.3±4.1	4	7.31±0.74	52.13±11.27	87.4±22.3	4	8.31±0.29	54.75±3.04	94.2±19.9
m	4	8.52±1.63	44.10±10.18	159.1±18.9	4	7.77±0.39	49.85±16.62	131.2±29.8	3	9.67±1.76	76.60±5.83	264.5±56.3
M	4	7.69±1.19	73.83±20.39	131.9±28.0	4	14.42±0.68	73.15±16.48	161.4±15.6	4	43.93±1.23*	244.81±25.12*	176.5±45.7
a	4	8.62±1.20	66.37±15.56	121.1±35.0	4	8.22±1.55	43.03±19.57	116.7±30.6	4	9.51±2.88	85.10±10.47	161.±87.6
A	4	8.85±1.61	62.47±15.04	116.6±32.9	4	18.99± 3.56	89.80±31.54	139.1±10.3	4	13.21±0.78	74.10±20.36	117.5±23.6
ma	4	77.60±26.10*	545.02±158.19▲	256.3±24.3◆	2	48.38±15.37	185.95±37.41#	105.5±6.0	-	-	-	-
MA	4	112.65±17.92*	605.91±145.95▲	295.8±3.8◆	-	-	-	-	-	-	-	-

注:-:血液太少,检测不准确或大鼠存活时间较短,未纳入统计学分析,●:Nma 组 60 d 与其余60 d新生鼠组尿素氮比较 $P<0.05$,○:Nma 组 60 d 与其余 60 d新生鼠组肌酐比较 $P<0.05$,*:ma 组及 ma 组 3 d与其余 3 d成年组尿素比较 $P<0.05$,▲:mA 组及 ma 组 3 d 与其余 3 d 成年组肌酐比较 $P<0.05$,◆:mA 组及 ma 组 3 d 与其余 3 d 成年组尿酸比较 $P<0.05$,▽:ma 组 15 d 与其余15 d 成年组尿素氮比较 $P<0.05$,#:ma15 d 组与其余 15 d 成年组肌酐比较 $P<0.05$,*:M 组 60 d 与其余 60 d 成年组尿素氮、肌酐比较 $P<0.05$。

代谢并通过尿液直接排出[1,2]。三聚氰酸大剂量口服也有利尿作用;慢性和亚慢性毒理实验证明高浓度能致膀胱结石,但肾脏中无沉积物,无肾毒性[3]。

实验显示:三聚氰胺低剂量在新生组及成年组不同染毒时间均无明显晶体形成;不同染毒时间的肾体重比、尿素氮、肌酐、尿酸值也与对照组无明显差异。三聚氰胺高剂量在新生组 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。成年组肾体重比、尿素氮、肌酐、尿酸值与对照组比较有显著性差异。三聚氰酸低剂量新生组及成年组均无明显晶体形成,与对照组比较肾体重比、尿素氮、肌酐、尿酸值无显著差异。三聚氰酸高剂量在新生组 60 d 时有少量晶体形成,肾体重比约高于对照组,尿素氮、肌酐、尿酸值与对照组无明显差异;成年组 60 d 时有较多晶体形成,肾体重比明显高于对照组,尿素氮、肌酐、尿酸值与对照组无显著差异。以上结果提示三聚氰胺(酸)毒性轻微,但易致泌尿系结石,最终引起肾功能损害,其致结石程度与染毒时间、剂量等因素存在相关性,染毒剂量越大、时间越长,结石形成越多,肾功能损害越重。并与早期三聚氰酸研究在肾脏无晶体形成存在差异。实验中也发现三聚氰胺或三聚氰酸在相同剂量相同染毒时间时成年组形成的晶体比新生组明显增加,提示三聚氰胺或三聚氰酸对成年鼠的毒性大于新生鼠。

实验也发现在同组内相同染毒时间每只大鼠形成的晶体数量、肾体重比、尿素氮、肌酐及尿酸值等并不完全一致, 其中三聚氰胺-三聚氰酸高剂量新生鼠组中, 一窝老鼠在灌胃 32 d 后出现死亡,而同组中另外两窝大鼠存活时间均未超过 15 d;另三聚氰胺低剂量成年组一只大鼠在染毒 52 d 后死亡,解剖发现肾脏出现大量晶体。推测三聚氰胺(酸)毒性反应存在窝别差异和个体差异。

2008 年的研究报道进食污染奶粉的尿液中检出含有三聚氰胺和三聚氰酸,并发现患儿出现结石[4]。早期研究表明三聚氰胺-三聚氰酸混合物致鼠的半数致死量(LD50)为 4.1 g/kg,三聚氰胺(LD50)为 6.0 g/kg,三聚氰酸(LD50)为 7.7 g/kg[5]。通过动物实验证实当两者单独投放时显示较低的毒性,而投放混合物时在肾小管中产生晶体,进一步引起类似于人的急性尿酸性肾病而导致肾衰[6,7]。我们的研究结果与其一致,单独三聚氰胺或三聚氰酸大剂量染毒 15 d 以上才缓慢形成结石,染毒 3 d 和 15 d 的肾体重比、尿素氮、肌酐、尿酸值与对照组比较无显著性差异; 但小剂量的三聚氰胺-三聚氰酸混合物染毒 3 d 即形成大量结石,染毒 3 d 及 15 d 的肾体重比、尿素氮、肌酐、尿酸值与对照组存在显著性差异,并继发肾功能损害,表现为大鼠体重下降,毛发凌乱,食欲下降,精神萎靡,部分出现鼻部出血等肾功能严重损害表现。然而,三聚氰胺与三聚氰胺结合形

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1366-05

极限门静脉结扎后增生肝脏组织中 NF-κB 和 IL-6 表达变化的实验研究

代雪梅[1],李可洲[2],姚豫桐[2],杨淑霞[3],张 晓[4]

(1. 成都军区总医院麻醉科;2. 成都军区总医院肝胆科;3. 成都医学院科研实验中心;4. 成都医学院实验技术教研室,成都 610083)

【摘 要】目的:探讨核转录因子(Nuclear factor-kappa B,NF-κB)和白介素-6(Interleukin 6,IL-6)在 90%极限门静脉分支结扎大鼠增生肝脏组织中的表达及其与肝再生的关系。方法:96 只 Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠随机分成假手术对照组和门静脉结扎实验组。观察术后 0.5、1、3、5、7、14、21 和 28 d 保留侧肝脏重量变化,光学显微镜下观察保留侧肝细胞的形态变化,用免疫组化方法检测保留侧肝细胞的增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen,PCNA)及 NF-κB 和 IL-6 的表达,并进行统计分析。结果:①90%极限门静脉分支结扎后,结扎侧肝叶呈进行性萎缩变小,保留侧肝叶占总肝质重的比例与假手术对照组比较 1~5 d 升高,7 d 达"平台期";②PCNA 阳性细胞计数与假手术对照组比较,0.5~7 d 表达增强($P<0.05$),以后逐渐恢复正常;③保留侧肝叶 NF-κB 和 IL-6 的表达量与假手术对照组比较 0.5 ~5 d 表达增强,术后 7~28 d 差异无统计学意义($P>0.05$);保留侧肝叶 IL-6 的表达量 0.5 d 开始呈显著增加,并迅速达到高峰,随后 1~5 d 表达逐渐下降,但仍高于正常水平,术后 7~28 d 与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。④大鼠肝脏 PCNA 的表达在术后 0.5、1、14、21、28 d 组与肝内 NF-κB 表达呈正相关,在术后 1、14、21 d 组与肝内 IL-6 表达呈正相关,NF-κB 的表达在术后 1、7、21、28d 组与肝脏 IL-6 表达呈正相关。结论:NF-κB 和 IL-6 蛋白在 90%极限门静脉分支结扎后大鼠肝脏再生过程中发挥重要作用。

【关键词】肝再生;门静脉;结扎;核转录因子;白介素-6

【中国图书分类法分类号】R657.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-6-09

A study on expression of nuclear factory-kappa B and IL-6 after 90% portal vein ligation in rats

DAI Xue-mei, et al

(*Department of Anesthesiology, General Hospital, Chengdu Military Command*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the expression of NF-κB and IL-6 and its relationship with liver regeneration after 90% portal branch ligation in rats. *Methods*: Ninety-six SD rats were randomly divided into Sham-PBL group and portal vein branches ligation group. The weight of both ligated and unligated lobes of liver were

作者介绍:代雪梅(1971-),女,主治医师,第三军医大学在读硕士,研究方向:肝损伤与保护。

通讯作者:张 晓,男,教授,E-mail:zhangxiao1985007@yahoo.com.cn。

成结石,以及三聚氰胺(酸)在成年鼠肾毒性损害大于新生鼠都有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Roy L. M. Dobson, Safa Motlagh, Mike Quijano, et al. Identification and Characterization of Toxicity of Contaminants in Pet Food Leading to an Outbreak of Renal Toxicity in Cats and Dogs[J]. Toxicological Sciences, 2008, 106(1): 251 - 262.

[2] Melnick R L, Boorman G A, Haseman J K, et al. Urolithiasis and bladder carcinogenicity of melamine in rodents[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1984, 72 (2): 292-303.

[3] Mast R W, Jeffcoat A R, Sadler B M, et al. Metabolism, disposition and excretion of [14C] melamine in male Fischer 344 rats [J]. Food Chem Toxicol, 1983, 21 (6): s807- 810.

[4] Lam C W, Lan L, Che X, Tam S, et al. Diagnosis and spectrum of melamine-related renal disease: Plausible mechanism of stone formation in humans[J]. Clin Chim Acta, 2009, 402(1-2): 150-155.

[5] Hammond B G, Barbee S J, Inoue T, et al. A review of toxicology studies on cyanurate and its chlorinated derivatives [J]. Environ Health Perspect, 1986, 69(10): 287-292.

[6] Brown C A, Jeong K S, Poppenga R H, et al. Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007[J]. J Vet Diagn sInvest., 2007, 19(5): 525-531.

[7] SAleksandrian A V. Toxicity and sanitay standardization of melamine cyanurate (experimental data) [J]. Gig Tr Prof Zabol, 1986, 1(1): 44-45.

(责任编辑:关蕴良)