

粉唑醇原药的亚慢性经口毒性研究

余晓巍, 杨秀鸿, 吴军, 张丽娜
湖南省职业病防治院, 湖南 长沙 410007

摘要: **目的** 研究粉唑醇原药亚慢性经口毒性作用, 初步分析染毒后对大鼠血液、肝和肾功能的影响。 **方法** 按照 GB15670-1995《农药登记毒理学试验方法》的要求进行实验, 将 80 只清洁级 SD 大鼠按体重随机分成 4 组, 每组 20 只, 雌雄各半。分别用含 37.5、150 和 600 mg/kg 粉唑醇的饲料连续喂饲染毒 90 d。观察各组大鼠的临床表现、摄食量、体重, 实验结束时测定相关血液学指标、血液生化学指标、脏器重量、脏器系数及病理组织学改变。 **结果** 雌鼠各组实际染毒剂量分别为 2.8、12.2、47.2 mg/kg, 雄鼠各组实际染毒剂量分别为 2.8、11.3、47.1 mg/kg。试验期间, 各剂量组雌、雄鼠活动、进食、饮水基本正常, 未见明显中毒表现。与相应对照组相比, 高剂量组雄鼠白细胞计数 (WBC) 显著降低。中、高剂量组大鼠尿素氮 (BUN) 和肌酐 (CREA) 显著升高, 高剂量组雌鼠总胆红素 (TBIL) 升高; 中、高剂量组雌鼠天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 显著升高; 各剂量组雌、雄鼠各脏器重量和脏器系数与对照组相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) 或无生物学意义。大体解剖未见明显异常, 粉唑醇原药未引起 SD 大鼠各脏器病理性改变。 **结论** 粉唑醇原药长期暴露对大鼠的血液、肝、肾具有毒性作用和潜在的致病风险。其对雌、雄 SD 大鼠亚慢性经口毒性试验的最大无作用剂量均为 2.8 mg/(kg bw · d)。

关键词: 粉唑醇; 亚慢性毒性; 最大无作用剂量

中图分类号: R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)09-1040-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.09.004

Subchronic oral toxicity of flutriafol TC

YU Xiao-wei, YANG Xiu-hong, WU Jun, ZHANG Li-na

Hunan Prevention and Treatment Institute for Occupational Diseases, Changsha, Hunan 410007, China

Abstract: **Objective** To explore the subchronic oral toxicity of flutriafol TC, and to preliminarily analyze its effects on the blood system, liver and kidney functions of rats. **Methods** The experiment was performed according to the requirement of Toxicological Test Methods of Pesticides for Registration (GB15670-1995). 80 SD rats of clean grade were randomly divided into four groups based on their body weight, with 10 male and 10 female rats in each group. The rats in the three flutriafol TC treated groups were respectively fed with diet containing flutriafol TC 37.5, 150 and 600 mg/kg for 90 days. The clinical manifestations, food consumption and body weight of rats in each group were observed. Haematological parameters, clinical chemistry parameters, organ weight, organ coefficients and histopathological changes were examined at the end of the experiment. **Results** The actual doses of flutriafol TC taken by female rats in the three dose groups were 2.8, 12.2, and 47.2 mg/kg respectively, and by male rats were 2.8, 11.3 and 47.1 mg/kg. During the period of the experiment, activity, food and water consumption of male and female rats in each dose group were normal, and no obvious toxicity symptoms appeared. Compared with the control group, WBC of male rats in the high-dose group decreased significantly. Blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CREA) of rats in the medium- and high-dose groups increased significantly. Total bilirubin (TBIL) of female rats in the high-dose group increased obviously. Aspartate amino-transferase (AST) and lactic dehydrogenase (LDH) of female rats in the medium- and high-dose groups increased significantly. No statistically significant difference or biological significance was found in organ weight and organ coefficients of male and females rats between each dose group and the control group ($P > 0.05$). General anatomy indicated that no meaningful pathological changes induced by flutriafol TC were observed. **Conclusions** Long-term exposure to flutriafol TC has toxicity and potential pathogenic risk to the blood system, liver and kidney functions of rats. The maximum non-effect level of flutriafol TC is 2.8 mg/(kg bw · d) in female and male rats.

Key words: flutriafol; subchronic toxicity; maximum non-effect level

基金项目: 湖南省卫生与计划生育委员会科研基金 (B2015-318)

作者简介: 余晓巍 (1984-), 男, 博士, 主管药师, 主要从事毒理学研究工作。

粉唑醇属于三唑类内吸杀菌剂, 它被植物根系吸收, 随着蒸腾流运输到植物体各部分, 对植物体无害, 但对致病真菌具有极高的生物毒性。因其独特的作用机制, 且具备有高效、广谱、低毒、残效期长等特性, 符

合当今农药的发展方向,因而广泛应用于水果和蔬菜等农作物^[1]。国内外已有 11 家企业对粉唑醇原药进行产品登记^[2]。但目前对其毒理学研究的报道甚少,特别是亚慢性毒性研究,国内尚未见报道。本研究对粉唑醇原药进行了亚慢性经口毒性试验,以便了解该药对大鼠的最大无作用剂量和可能的毒性作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 粉唑醇原药(95%),白色粉末,由国内某化工有限公司提供。

1.2 动物与分组 清洁级健康 SD 大鼠,4~6 周龄,体重 110~142 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,生产许可证号为 SCXK(沪)2008-0016,经 5 d 检疫观察合格。将 80 只动物按体重随机分成 4 组,每组雌、雄各 10 只。设低、中、高三个剂量组和一个对照组。动物单笼喂养,自由进食和饮用纯净水。实验动物使用许可证号为 SYXK(湘)2004-0002。

1.3 染毒方法与剂量 粉唑醇原药雌、雄大鼠急性经口 LD₅₀ 均为 681 mg/kg,各剂量组雌、雄染毒剂量均设计为 3.75、15 和 60 mg/kg。按大鼠进食量为其体重的 10% 比例将受试物直接混入饲料,配制成受试物含量分别为 37.5、150 和 600 mg/kg 的加药饲料连续喂饲染毒 90 d。对照组给予不加药的清洁级基础饲料。

1.4 观察及检测指标 试验按照 GB 15670-1995《农药登记毒理学试验方法》进行。(1)动物的一般情况、每周体重及摄食量变化;(2)试验结束时取静脉血,BC-5300Vet 全自动血液细胞分析仪测定血液学指标,检测指标包括红细胞计数(RBC)、红细胞比积(HCT)、红细胞平均体积(MCV)、红细胞分布宽度(RDW)、血红蛋白(HGB)、红细胞平均血红蛋白量(MCH)、红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC)、血小板(PLT)、血小板比积(PCT)、血小板平均体积(MPV)、血小板分布宽度(PDW)、白细胞计数(WBC)及分类;BACKMAN COULTER 全自动生化分析仪检测血清生化指标,检测指标包括血清天冬氨酸氨基转换酶(AST)、血清丙氨酸氨基转换酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、血糖(GLU)、总胆固醇(CHO)、总胆红素(TBil)、甘油三酯(TG)、乳酸脱氢酶(LDH)。(3)部分脏器重量及脏器系数。(4)病理组织学检查:将分离出的脑、心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、睾丸(附睾)或卵巢用福尔马林固定 10 d,ALS-3050 型全自动生物组织脱水机脱水、LS-100 型病理石蜡包埋机包埋,LEICA RM2235 型病理石蜡切片机切片,H.E.染色,光镜检查。

1.5 统计分析 运用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计分析。定量资料采用均数±标准差进行统计描述,两组数据的组间比较采用 *t*' 检验,多组数据的组间比较采用方差分析(总体方差齐,进一步通过 Dunnett-*t* 检验进行多重比较)或 Kruskal-Wallis *H* 检验(总体方差不齐,进一步通过 Nemenyi 法进行多重比较),以评定各剂量组与对照组之间是否有明显差异;通过方差分析趋势性检验分析血液学和血生化相关指标的变化趋势。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 实际染毒剂量 根据各组雌、雄鼠试验期间摄食量计算得实际染毒剂量:雌鼠各组实际染毒剂量分别为 2.8、12.2、47.2 mg/kg,雄鼠各组实际染毒剂量分别为 2.8、11.3、47.1 mg/kg。见表 1。

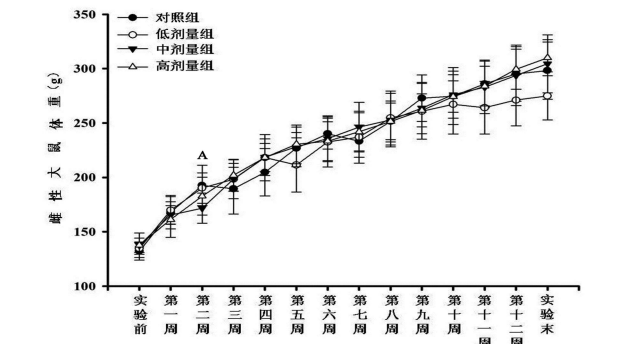
表 1 粉唑醇原药大鼠亚慢性经口毒性试验各组染毒剂量

动物性别	项目	剂量分组			
		对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
雌	饲料中受试物含量(mg/kg)	0	37.5	150	600
	摄食量[g/(kg bw·d)]	79.1	74.7	81.3	78.6
	染毒剂量[mg/(kg bw·d)]	0	2.8	12.2	47.2
雄	饲料中受试物含量(mg/kg)	0	37.5	150	600
	摄食量[g/(kg bw·d)]	79.9	74.3	75.5	78.6
	染毒剂量[mg/(kg bw·d)]	0	2.8	11.3	47.1

2.2 一般情况及临床表现 试验期间,各剂量组动物活动、进食、饮水基本正常,粪便性状正常,未见明显中毒表现。染毒后第 2 周,中剂量组雌鼠体重明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);染毒后第 2 周,高剂量组雄鼠体重明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);染毒后第 8、9、11 周,低剂量组雄鼠体重明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);染毒后第 10 周,低、高剂量组雄鼠体重明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 0.05)。低剂量组雄鼠总摄食量、总食物利用率和实验结束时体重均明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),但无剂量反应关系;其余剂量组雄鼠和各剂量组雌鼠总摄食量、总食物利用率、实验结束时体重与对照组相比差异均无统计学意义($P>0.05$)。见图 1、图 2。

2.3 血液学及血生化指标 中、高剂量雌鼠 HCT 明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。高剂量组雄鼠 WBC 明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),且有伴随染毒剂量的增加不断降低的趋势(F

= 8.697, $P=0.006$);高剂量组雄鼠 MON 明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

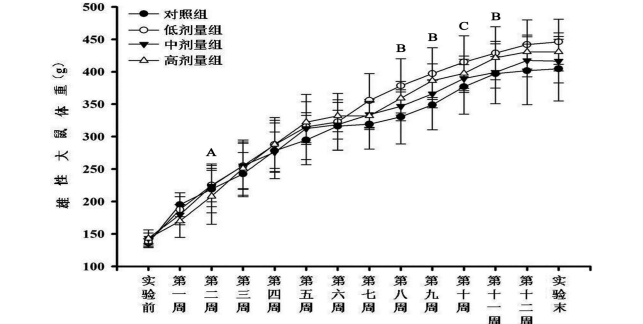


注:A、染毒后第2周,中剂量组雌鼠体重明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

图1 酚噻醇原药对雌性大鼠体重的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

中、高剂量组大鼠 BUN 和 CREA 均明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 0.05);高剂量组雌鼠 TBIL 明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$),且有伴随染毒剂量的增加不断升高的趋

势($F=9.084, P=0.005$);中、高剂量组雌鼠 AST 和 LDH 明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);中、高剂量组雄鼠 ALP 明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。见表 3。



注:A、染毒后第2周,高剂量组雄鼠体重明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);B、染毒后第8、9、11周,低剂量组雄鼠体重明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);C、染毒后第10周,低、高剂量组雄鼠体重明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 0.05)。

图2 酚噻醇原药对雄性大鼠体重的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

表2 酚噻醇原药对部分血液学指标的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

性别	剂量组	WBC($\times 10^9/L$)	LYM(%)	MON(%)	RBC($\times 10^{12}/L$)	HGB(g/L)	HCT(%)	MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC(g/L)	MPV
雌	对照组	9.9 \pm 1.5	84.2 \pm 6.8	11.1 \pm 4.3	5.52 \pm 1.06	118.0 \pm 16.2	0.32 \pm 0.04	58.3 \pm 7.0	21.7 \pm 2.1	374.9 \pm 30.8	6.7 \pm 1.5
	低剂量	10.8 \pm 2.3	82.1 \pm 5.5	14.5 \pm 4.8	5.74 \pm 0.51	121.2 \pm 9.6	0.32 \pm 0.02	55.5 \pm 2.4	21.2 \pm 0.8	381.3 \pm 12.7	6.0 \pm 0.3
	中剂量	8.8 \pm 1.4	86.6 \pm 1.6	9.8 \pm 1.7	5.15 \pm 0.27	106.8 \pm 8.2	0.27 \pm 0.02*	52.3 \pm 1.8	20.6 \pm 0.7	387.8 \pm 12.6	6.4 \pm 0.7
	高剂量	9.0 \pm 1.4	89.7 \pm 2.3	7.6 \pm 2.1	5.13 \pm 0.82	109.2 \pm 18.9	0.28 \pm 0.05*	53.6 \pm 1.0	21.2 \pm 0.5	389.9 \pm 9.6	6.2 \pm 0.6
	F 值	3.072	5.149	6.927	1.673	2.437	5.895	4.560	1.399	1.351	0.994
	P 值	0.040	0.005	0.001	0.190	0.080	0.002	0.008	0.259	0.273	0.407
雄	对照组	11.8 \pm 1.5	87.4 \pm 4.0	9.3 \pm 4.0	5.75 \pm 1.55	119.2 \pm 27.6	0.29 \pm 0.07	53.1 \pm 0.8	21.1 \pm 1.5	397.4 \pm 26.0	7.0 \pm 0.9
	低剂量	11.6 \pm 1.2	84.4 \pm 2.3	12.6 \pm 1.9	6.35 \pm 0.76	125.6 \pm 15.1	0.34 \pm 0.04	54.0 \pm 3.3	19.7 \pm 1.1	394.6 \pm 6.7	7.2 \pm 0.8
	中剂量	11.1 \pm 3.5	84.6 \pm 5.6	11.9 \pm 4.3	6.30 \pm 1.15	126.8 \pm 23.0	0.64 \pm 0.98	52.4 \pm 0.9	38.6 \pm 58.8	380.2 \pm 18.5	6.5 \pm 0.4
	高剂量	8.7 \pm 2.6*	81.0 \pm 8.0	13.8 \pm 4.7*	6.50 \pm 0.42	130.8 \pm 9.0	0.34 \pm 0.02	52.2 \pm 1.4	20.1 \pm 0.7	386.3 \pm 6.0	6.8 \pm 0.5
	F 值	3.686	2.316	2.424	0.955	0.577	1.071	1.868	0.976	2.257	0.133
	P 值	0.021	0.573	0.032	0.424	0.080	0.374	0.153	0.415	0.098	0.133

注:* 与对照组比较, $P<0.05$; ** 与对照组比较, $P<0.01$ 。

表3 酚噻醇原药对部分血生化指标的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

性别	剂量组	TBIL($\mu\text{mol/L}$)	AST(IU/L)	ALT(U/L)	ALP(U/L)	CHO(mmol/L)	BUN(mmol/L)	CREA(mmol/L)	LDH(U/L)
雌	对照组	2.77 \pm 1.29	166.8 \pm 25.7	48.8 \pm 5.9	130.6 \pm 33.8	2.02 \pm 0.19	6.41 \pm 0.87	55.9 \pm 8.6	722.6 \pm 268.6
	低剂量	2.92 \pm 0.69	188.0 \pm 20.5	51.8 \pm 7.6	193.0 \pm 97.2	2.14 \pm 0.42	7.50 \pm 0.94	61.5 \pm 10.1	863.9 \pm 333.3
	中剂量	3.79 \pm 0.96	260.3 \pm 60.8**	49.2 \pm 17.4	166.9 \pm 68.2	2.20 \pm 0.46	9.70 \pm 1.16**	89.3 \pm 13.8**	2133.7 \pm 790.4**
	高剂量	4.12 \pm 1.52*	235.4 \pm 60.0*	50.2 \pm 11.6	143.4 \pm 43.0	2.06 \pm 0.27	9.43 \pm 1.19**	86.8 \pm 14.2**	1768.9 \pm 735.3**
	F 值	3.249	8.750	0.140	1.770	0.579	22.345	20.636	14.015
	P 值	0.033	0.000	0.935	0.170	0.632	0.000	0.000	0.000
雄	对照组	4.44 \pm 1.8	203.2 \pm 17.3	49.5 \pm 5.2	149.0 \pm 37.4	2.16 \pm 0.27	7.10 \pm 0.82	65.1 \pm 9.0	1333.0 \pm 400.4
	低剂量	4.43 \pm 1.13	224.4 \pm 38.1	59.7 \pm 13.9	181.6 \pm 44.9	2.04 \pm 0.53	7.31 \pm 0.91	70.7 \pm 13.0	1254.7 \pm 570.3

续表 3									
性别	剂量组	TBIL(μmol/L)	AST(IU/L)	ALT(U/L)	ALP(U/L)	CHO(mmol/L)	BUN(mmol/L)	CREA(mmol/L)	LDH(U/L)
	中剂量	5.13±1.92	211.0±27.2	68.2±18.8	245.0±63.1**	2.14±0.28	8.94±1.76**	94.0±15.3**	1 872.9±401.3
	高剂量	5.63±1.52	229.4±40.2	48.7±6.8	212.9±38.9*	2.03±0.17	8.87±1.38*	97.1±8.6**	1 770.7±673.6
	F 值	1.297	0.388	0.003	0.000	0.762	0.002	0.000	0.260
	P 值	0.290	0.388	0.003	0.000	0.762	0.002	0.000	0.026

注: * 与对照组比较, $P<0.05$; ** 与对照组比较, $P<0.01$ 。

2.4 脏器重量及脏器系数 各剂量组雌、雄鼠各脏器重量与对照组相比差异均无统计学意义($P>0.05$)。低剂量组雌鼠脾体比值明显高于对照组,差异有统计

学意义($P<0.05$),但无剂量反应关系。雌、雄鼠其余各组各脏器体比与对照组相比差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

表 4 脏器比值计算结果($\bar{x}\pm s,n=10$)

动物性别	剂量组	心/体(%)	肝/体(%)	脾/体(%)	肺/体(%)	肾/体(%)	脑/体(%)	睾丸/体(%)	附睾/体(%)
雌	对照组	0.28±0.10	2.37±0.14	0.16±0.03	0.50±0.06	0.55±0.06	0.61±0.06	—	—
	低剂量	0.27±0.04	2.42±0.32	0.20±0.04*	0.54±0.07	0.57±0.09	0.63±0.06	—	—
	中剂量	0.27±0.03	2.36±0.20	0.12±0.03	0.49±0.09	0.60±0.12	0.60±0.04	—	—
	高剂量	0.25±0.03	2.48±0.25	0.13±0.05	0.47±0.07	0.54±0.04	0.58±0.04	—	—
	P 值	0.771	0.670	0.000	0.247	0.382	0.415	—	—
雄	对照组	0.26±0.02	2.33±0.17	0.18±0.03	0.52±0.08	0.60±0.04	0.48±0.05	0.81±0.08	0.17±0.02
	低剂量	0.25±0.03	2.25±0.28	0.17±0.03	0.49±0.07	0.57±0.08	0.45±0.04	0.75±0.08	0.16±0.02
	中剂量	0.27±0.03	2.44±0.29	0.18±0.04	0.48±0.08	0.61±0.06	0.47±0.05	0.81±0.11	0.15±0.01
	高剂量	0.27±0.03	2.33±0.21	0.15±0.05	0.46±0.07*	0.61±0.05	0.44±0.03	0.80±0.06	0.16±0.03
	P 值	0.282	0.106	0.081	0.052	0.102	0.112	0.265	0.351

2.5 病理组织学检查 大体解剖未见明显异常,对照组和高剂量组雌、雄鼠主要脏器进行病理组织学检查,对照组雌鼠有 1 例肾间质炎细胞浸润,高剂量组雄鼠有 1 例部分肾小球萎缩。其余各动物各脏器均未见明显病理组织学改变。

3 讨论

体重是一项能够综合反映动物生长一般状况的非特异性指标,也可反映毒物毒性效应对机体的综合影响^[3]。实验期间各剂量组大鼠最终体重与对照组比较差异无统计学意义或无生物学意义,表明动物的生长、发育均未受粉唑醇的影响。

试验结束后,高剂量组雄鼠白细胞计数(WBC)明显降低,且伴随着染毒剂量的增加有不断降低的趋势,提示粉唑醇原药长期接触能引起动物外周血白细胞数目减少,具体原因及机制还有待进一步的实验研究。

文献资料表明,三唑类杀菌剂暴露在体内和体外实验均能诱导肝毒性^[4-5]。在本次试验研究中,尽管肝脏和肾脏病理组织学检查未发现明显异常,但血生化检查结果显示粉唑醇原药对动物的肝、肾功能指标有明显的影

响。中、高剂量组雌鼠天冬氨酸氨基转换酶(AST)和乳酸脱氢酶(LDH)以及雄鼠碱性磷酸酶(ALP)均明显升高,这些指标的异常则提示粉唑醇对动物肝功能有一定影响,与文献报道相符。此外实验还发现高剂量组大鼠尿素氮(BUN)和肌酐(CREA)均明显升高,表明动物肾功能已损伤。因此,粉唑醇对大鼠血液、肝、肾功能潜在的风险,应引起重视。对于这些异常在后期的相关实验中也应该多关注。

试验期间,低剂量组大鼠各项检查指标均未出现异常,对动物不会产生明显的毒性作用。在本试验条件下,90 d 喂养粉唑醇原药对雄、雌性大鼠经口毒性的最大无作用剂量均为 2.8 mg/(kg bw·d)。

参考文献

[1] 周子燕,李昌春,高同春,等. 三唑类杀菌剂的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(27):11842-11844.

[2] 刘刚. 已有 11 家企业登记粉唑醇原药产品[J]. 农药市场信息, 2011, 26(1):26.

[3] 何国平,杨慎华,徐宇萍,等. 长期低剂量摄入烯草酮原药对大鼠的毒性作用[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(1):23-27.

[4] Fard JK,Hamzeiy H,Sattari M, et al. Triazole rizatriptan induces liver toxicity through lysosomal/mitochondrial dysfunction[J]. Drug Res, 2016, 66(9):470-478.

[5] Xu C, Liu Q, Huan F, et al. Changes in gut microbiota may be early signs of liver toxicity induced by epoxiconazole in rats[J]. Chemotherapy, 2014, 60(2):135-142.

收稿日期:2017-02-15