

- [2] 闫鹏, 郑剑, 杨元斌, 等. 壬基酚和辛基酚对小鼠遗传毒性联合作用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18 (12): 2505-2506.
- [3] 曹燕花, 王茜, 李清钊, 等. 壬基酚对雌性大鼠肝、肾及子宫的氧化损伤作用 [J]. 环境与健康杂志, 2010, 27 (3): 233-234.
- [4] 李宏辉, 金钟鸣. 壬基酚对雄性小鼠脑组织氧化损伤作用的初步研究 [J]. 宁夏医科大学学报, 2012, 34 (3): 245-247.
- [5] 楼哲丰, 金龙金, 董杰影. 单细胞凝胶电泳技术检测小鼠骨髓细胞 DNA 损伤 [J]. 温州医学院学报, 2004, 34 (3): 232-234.
- [6] 刘燕群, 陈朝霞, 胡家邵, 等. 壬基酚对泥鳅的遗传毒性效应 [J]. 环境与健康杂志, 2012, 29 (2): 187-188.

## 医药中间体三氟乙酰乙酸乙酯大鼠亚急性经口毒性试验

Study on subacute oral toxicity of ethyl 4, 4, 4-trifluoroacetate in rats

杨秀鸿, 吴军, 胡勃, 张丽娜

YANG Xiu-hong, WU Jun, HU Bo, ZHANG Li-na

(湖南省职业病防治院, 湖南 长沙 410007)

**摘要:** 按照 GB21752—2008《化学品 啮齿动物 28 天重复剂量经口毒性试验方法》, 低、中、高剂量染毒及高剂量附加组动物分别以 50、100、200 mg/kg 三氟乙酰乙酸乙酯灌胃 28 d, 对照组及对照组附加组动物给予等体积玉米油。结果显示, 高剂量组动物白细胞计数、血清总蛋白、球蛋白降低, 尿素氮明显升高, 其肝脏病变发生率增加; 中、高剂量组动物胸腺重量、胸腺/体比降低。低剂量组动物各项指标与对照组比较差异无统计学意义。高剂量附加组动物停止染毒 14 d 后, 各项指标与对照组附加组动物比较, 差异无统计学意义。提示三氟乙酰乙酸乙酯有一定的蓄积毒性作用, 毒作用部位是血液系统、肝脏、肾脏和免疫器官, 其对动物的损害在停止染毒后具有可逆性; 雌、雄大鼠亚急性经口毒性试验最大无作用剂量 (NOAEL) 为 50.0 mg/kg, 最小有作用剂量 (LOAEL) 为 100.0 mg/kg。

**关键词:** 三氟乙酰乙酸乙酯; 亚急性毒性; 最大无作用剂量; 最小有作用剂量

中图分类号: R994

文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2013)04-0271-03

三氟乙酰乙酸乙酯又称乙基-4, 4, 4-三氟乙酯, 为 2003 年国内新合成的一种医药及植物保护中间体, 是合成农药噻草啶 (thiazopyr) 的主要原药。其作用机制为在机体代谢后生成氟乙酰辅酶 A, 与草酰乙酸形成氟柠檬酸, 阻断三羧酸循环, 破坏能量合成<sup>[1]</sup>。国内仅王凤鸣等人对三氟乙酰乙酸乙酯的急性毒性进行了初步研究<sup>[2]</sup>, 国外未见相关报道。本研究对三氟乙酰乙酸乙酯进行了亚急性经口毒性实验研究, 旨在提供其亚急性毒性资料, 阐明其毒作用特点, 为其安全性评价和进一步的研究提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 受试物

三氟乙酰乙酸乙酯 (含量 98%), 无色透明液体, 不溶

于水, 由江苏新仁信精细化工有限公司提供。

#### 1.2 受试动物

SPF 级 SD 大鼠, 5 周龄, 健康。经 5 d 检疫观察合格。购自湖南斯莱克-景达实验动物有限公司 [SCXK(湘) 2009-0004]。

#### 1.3 实验方法

1.3.1 染毒剂量和方法 将 60 只清洁级 SD 大鼠, 随机分为 6 组, 每组雌、雄各 5 只。设低、中、高三个剂量组和一个对照组。为观察毒性反应的可恢复性、持续性以及迟发性, 对照组及高剂量组各设一个附加组。雌、雄鼠按 50、100 和 200 mg/kg 的剂量进行灌胃染毒。每天 1 次, 连续染毒 28 d。附加组动物染毒 28 d 后停止给药。根据动物体重变化每周调整给药量, 给药体积为 1.0 ml/100 g。对照组及对照组附加组给予等体积玉米油, 其余处理同剂量组。

1.3.2 检查项目 每天观察并记录动物临床表现。每周测定食物消耗量 2 次, 每周称重 1 次, 计算其摄食量和食物利用率。各剂量组动物于染毒 28 d 后处理。附加组动物停止给药后继续观察 14 d 后处理。处理前取动物颈静脉血, 测定血常规和血生化指标。然后处死动物, 分离脑、胸腺、心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、睾丸 (附睾) 或卵巢、子宫、脊髓及周围神经、甲状腺、淋巴结等。其中脑、心、胸腺、肝、脾、肺、肾、睾丸、子宫用电子天秤称重, 计算脏器系数。上述标本用 10% 甲醛固定, 进行病理组织学检查。

1.3.3 统计方法 采用 SPSS 统计软件 (V13.0) 对各项检测数据作单因素方差分析。显著性水平为  $\alpha=0.05$ 。

### 2 结果

#### 2.1 临床表现

染毒第 1 天开始, 高剂量组及其附加组动物于每天染毒 15~30 min 后出现少动、轻微抽搐等中毒症状, 30~45 min 后恢复。在整个试验期间, 对照组及其附加组和低、中剂量组动物活动及一般状况均正常。高剂量附加组动物在停止给药后 14 d 的观察期内, 活动及一般状况均正常。

#### 2.2 摄食量及食物利用率

各剂量组雌、雄鼠每周摄食量、食物利用率及试验期间总摄食量、总食物利用率与对照组动物比较, 均无明显差异 ( $P>0.05$ ); 高剂量组附加组动物上述指标与对照组附加组

收稿日期: 2012-10-29; 修回日期: 2013-01-05

作者简介: 杨秀鸿 (1973—), 女, 副主任医师, 从事毒理学安全性评价工作。

动物比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 体重及增重

各剂量组动物各周体重及动物总增重与对照组相比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 血液学指标

表 1 三氟乙酰乙酸乙酯对动物部分血液学检测指标的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 雌 性                     |                            |                  | 雄 性                     |                            |                  |
|---------|-------------------------|----------------------------|------------------|-------------------------|----------------------------|------------------|
|         | WBC ( $\times 10^9/L$ ) | RBC ( $\times 10^{12}/L$ ) | Hb (g/L)         | WBC ( $\times 10^9/L$ ) | RBC ( $\times 10^{12}/L$ ) | Hb (g/L)         |
| 对照组     | 18.1 $\pm$ 5.3          | 7.63 $\pm$ 0.53            | 164.0 $\pm$ 11.4 | 13.8 $\pm$ 3.3          | 8.72 $\pm$ 0.54            | 184.0 $\pm$ 7.4  |
| 低剂量组    | 13.0 $\pm$ 2.8          | 6.89 $\pm$ 0.73            | 164.0 $\pm$ 10.8 | 12.1 $\pm$ 1.0          | 8.08 $\pm$ 0.67            | 176.0 $\pm$ 10.2 |
| 中剂量组    | 14.8 $\pm$ 7.0          | 7.46 $\pm$ 0.22            | 163.8 $\pm$ 4.8  | 11.1 $\pm$ 2.9          | 8.80 $\pm$ 0.42            | 182.0 $\pm$ 6.7  |
| 高剂量组    | 7.9 $\pm$ 2.6**         | 9.00 $\pm$ 0.73**          | 183.0 $\pm$ 9.1* | 6.9 $\pm$ 2.3**         | 8.84 $\pm$ 0.75            | 178.8 $\pm$ 10.3 |
| 对照组附加组  | 15.7 $\pm$ 6.6          | 7.39 $\pm$ 1.61            | 168.0 $\pm$ 10.4 | 14.2 $\pm$ 2.6          | 8.99 $\pm$ 2.50            | 197.0 $\pm$ 14.4 |
| 高剂量组附加组 | 12.0 $\pm$ 2.7          | 8.10 $\pm$ 1.98            | 180.0 $\pm$ 12.7 | 12.5 $\pm$ 1.9          | 9.95 $\pm$ 0.43            | 194.0 $\pm$ 6.5  |

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

### 2.5 血清生化指标

试验结束后, 中、高剂量组雌鼠血清总蛋白(TP)和高剂量组雌鼠血清球蛋白(GLB)降低, 高剂量组雄鼠 TP 降低, 血清 GLB 降低、尿素氮(BUN)升高, 与对照组比较, 差异有统

高剂量组雌鼠 WBC 计数降低、RBC 及 Hb 增高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 高剂量组雄鼠 WBC 降低 ( $P < 0.01$ )。其余未观察到具有生物学意义的检测指标异常。高剂量组附加组动物停止染毒 14 d 后, 其各项血液学指标与对照组附加组动物比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。其余各组各项血液生化指标与对照组相比差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。高剂量组附加组各项血清生化指标与对照组附加组动物比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

表 2 三氟乙酰乙酸乙酯对动物部分血清生化检测指标的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 雌 性              |                |                  |                 | 雄 性              |                 |                  |                    |
|---------|------------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|--------------------|
|         | TP (g/L)         | ALB (g/L)      | GLB (g/L)        | BUN (mmol/L)    | TP (g/L)         | ALB (g/L)       | GLB (g/L)        | BUN (mmol/L)       |
| 对照组     | 75.4 $\pm$ 3.4   | 38.4 $\pm$ 2.0 | 37.0 $\pm$ 2.0   | 8.51 $\pm$ 1.47 | 68.2 $\pm$ 1.3   | 34.4 $\pm$ 1.3  | 33.8 $\pm$ 1.5   | 9.44 $\pm$ 0.91    |
| 低剂量组    | 73.8 $\pm$ 4.2   | 38.1 $\pm$ 4.2 | 35.7 $\pm$ 0.7   | 8.67 $\pm$ 1.39 | 65.8 $\pm$ 2.6   | 33.6 $\pm$ 1.2  | 32.2 $\pm$ 1.5   | 10.37 $\pm$ 0.51   |
| 中剂量组    | 69.7 $\pm$ 2.2*  | 35.1 $\pm$ 1.4 | 34.6 $\pm$ 2.6   | 9.36 $\pm$ 1.39 | 64.7 $\pm$ 2.5   | 32.9 $\pm$ 0.5  | 31.8 $\pm$ 2.1   | 10.45 $\pm$ 0.73   |
| 高剂量组    | 68.3 $\pm$ 1.8** | 35.9 $\pm$ 1.1 | 32.4 $\pm$ 1.2** | 9.12 $\pm$ 1.75 | 61.6 $\pm$ 3.2** | 31.8 $\pm$ 2.1  | 29.8 $\pm$ 1.2** | 11.50 $\pm$ 1.23** |
| 对照组附加组  | 69.5 $\pm$ 2.8   | 35.8 $\pm$ 0.8 | 33.7 $\pm$ 2.2   | 7.41 $\pm$ 0.28 | 69.9 $\pm$ 2.8   | 35.2 $\pm$ 0.8  | 34.7 $\pm$ 2.1   | 7.04 $\pm$ 0.30    |
| 高剂量组附加组 | 70.1 $\pm$ 3.5   | 35.7 $\pm$ 1.6 | 34.4 $\pm$ 2.6   | 7.38 $\pm$ 0.85 | 66.3 $\pm$ 3.3   | 40.6 $\pm$ 14.0 | 31.7 $\pm$ 3.2   | 7.20 $\pm$ 0.65    |

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

### 2.6 脏器重量与脏器系数

中、高剂量组雌、雄鼠胸腺重量、胸腺脏器系数明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 低剂量组动物各脏器重量、脏器系数及中、高剂量组动物其余各脏器重量及脏器系数与对照组相比均无明显差异 ( $P > 0.05$ )。高剂量组附加组动物各脏器重量、脏器系数与对照组附加组动物比较均无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 见表 3。

表 3 三氟乙酰乙酸乙酯对动物胸腺重量和脏器系数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 雌性                |                   | 雄性                |                   |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|         | 重量(g)             | 脏器系数              | 重量(g)             | 脏器系数              |
| 对照组     | 0.50 $\pm$ 0.04   | 0.24 $\pm$ 0.01   | 0.48 $\pm$ 0.07   | 0.17 $\pm$ 0.02   |
| 低剂量组    | 0.48 $\pm$ 0.06   | 0.22 $\pm$ 0.03   | 0.44 $\pm$ 0.03   | 0.14 $\pm$ 0.00   |
| 中剂量组    | 0.39 $\pm$ 0.07*  | 0.18 $\pm$ 0.02** | 0.37 $\pm$ 0.04** | 0.12 $\pm$ 0.02** |
| 高剂量组    | 0.34 $\pm$ 0.09** | 0.15 $\pm$ 0.03** | 0.25 $\pm$ 0.05** | 0.09 $\pm$ 0.02** |
| 对照组附加组  | 0.58 $\pm$ 0.07   | 0.24 $\pm$ 0.03   | 0.55 $\pm$ 0.10   | 2.82 $\pm$ 0.12   |
| 高剂量组附加组 | 0.52 $\pm$ 0.06   | 0.22 $\pm$ 0.00   | 0.50 $\pm$ 0.08   | 2.78 $\pm$ 0.12   |

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

### 2.7 病理组织学检查

高剂量组雌鼠有 1 例肝脏轻度脂肪变性, 有 2 例肝细胞

水肿变性、坏死; 该组肝细胞脂肪变性、水肿变性、坏死率明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )。对照组附加组雌鼠有 1 例肝脏轻度脂肪变性, 高剂量附加组雄鼠有 1 例一侧睾丸萎缩变性。其它动物被检脏器未见异常改变。

### 3 讨论

三氟乙酰乙酸乙酯急性中毒时主要表现为呼吸急促、肌肉颤抖、四肢抖动、惊厥、阵发性抽搐等<sup>[3]</sup>。本研究给大鼠连续染毒 28 d, 观察到高剂量组及高剂量组附加组动物于每天染毒 15~30 min 后出现少动、轻微抽搐等毒性症状, 持续 30~45 min 后中毒症状缓解, 1~2 h 后恢复正常活动。但动物脑、脊髓及周围神经病理组织学检查未见异常改变。

血液学检查可见高剂量组雌、雄鼠 WBC 降低, 同时中、高剂量组雌、雄鼠胸腺重量、胸腺体比均明显低于对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 表明三氟乙酰乙酸乙酯在一定的剂量下对动物的造血系统和免疫器官有明显的损害作用。

血液生化学检查可见 TP 和 GLB 降低, 同时肝脏病理组织学检查发现高剂量组雌鼠肝细胞脂肪变性、水肿变性、坏死率明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )。提示三氟乙酰乙酸乙酯对动物肝脏有明显的损害作用。高剂量组雄鼠 BUN 升高 ( $P <$

0.01), 但肾脏脏器重量、脏器系数及肾脏病理组织学检查未见异常改变, 三氟乙酰乙酸乙酯是否对动物肾脏产生病理损害还有待进一步的研究。

高剂量组附加组动物停止染毒 14 d 后, 各项指标与对照组附加组动物比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。提示三氟乙酰乙酸乙酯在停止染毒 14 d 后恢复正常。

综合分析, 三氟乙酰乙酸乙酯具有一定的蓄积毒性作用, 其主要毒作用部位可能是肝脏、免疫器官、造血系统和肾脏,

但对上述器官的损害在停止接触后具有可逆性; 其对雌、雄 SD 大鼠亚急性经口毒性试验的最大无作用剂量 (NOAEL) 为 50.0 mg/kg, 最小有作用剂量 (LOAEL) 为 100.0 mg/kg。

#### 参考文献:

- [1] 张国华, 郑纯智. 三氟乙酰乙酸乙酯的合成 [J]. 农药, 2007, 46 (12): 823-824.
- [2] 王凤鸣, 李慧, 程东, 等. 三氟乙酰乙酸乙酯大鼠急性经口毒性实验研究 [J]. 口岸卫生控制, 2007, 9 (4): 9-10.

## 战(创)伤失血性休克对氰类化合物毒性效应的影响

Effect of hemorrhagic shock by war wound and trauma on toxicity of cyanides

刘辉, 尹芳秋, 燕颖军, 贾庆军, 王晓红, 边巍

LIU Hui, YIN Fang-qiu, YAN Ying-jun, JIA Qing-jun, WANG Xiao-hong, BIAN Wei

(中国人民解放军白求恩医务士官学校卫勤教研室, 河北 石家庄 050081)

**摘要:** 建立大鼠失血性休克复合氰化钾急性染毒模型, 观察大鼠一般情况及肝、肾病理学改变, 测定血液氰离子 ( $\text{CN}^-$ ) 含量和肝脏细胞色素氧化酶活性。结果显示, 与单纯中毒比较, 复合损伤大鼠肝、肾出现明显病理学改变; 失血条件下血液氰离子含量升高更为显著, 且细胞色素氧化酶活性抑制程度明显加重。表明失血可明显干扰氰离子的代谢过程, 进一步增强氰类化合物的毒性效应。

**关键词:** 失血性休克; 氰化钾; 细胞色素氧化酶; 毒性效应

中图分类号: R349.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2013)04-0273-02

氰类化合物(如氢氰酸、氰化钾等)是一种典型的双用途毒剂, 平时作为化工原料大量贮存, 战时即可转化成军用毒剂使用。中毒后解离出的氰根离子抑制线粒体呼吸链细胞色素氧化酶活性, 使细胞氧化磷酸化过程受阻<sup>[1]</sup>。失血性休克是战(创)伤的主要表现, 若同时发生化学中毒会对机体产生更为严重的损害<sup>[2]</sup>。本研究观察失血条件下氰化物毒性效应的变化特点, 以期为化学复合伤救治提供毒理学依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂和仪器

氰化钾 (KCN, 分析纯, 石家庄博海生物公司), 细胞色素 C、盐酸吡哆醛 (美国 Sigma 公司), 其他试剂为国产分析纯; RM6240 多通道生理记录仪 (成都仪表厂), 荧光分光光度计 (上海圣科仪器设备公司), 康维氏微量扩散皿 (武汉华威公司)。

#### 1.2 动物模型的建立

收稿日期: 2012-07-31; 修回日期: 2012-09-27

基金项目: 全军医学科技“十二五”科研基金面上项目 (CWS11J156)

作者简介: 刘辉 (1974—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 化学毒剂复合伤防治。

健康成年 SD 大鼠, SPF 级, 体重 ( $220 \pm 20$ ) g, 由河北医科大学实验动物中心提供。实验动物分为假手术组 (sham operation, SO)、失血性休克组 (hemorrhagic shock, HS)、KCN 中毒组 (potassium cyanide intoxication, KCN)、失血性休克复合 KCN 中毒组 (hemorrhagic shock combined potassium cyanide intoxication, HS + KCN), 每组设 6 只动物。采用 Wiggers 改良法建立失血性休克模型<sup>[3]</sup>, 大鼠经 2% 戊巴比妥腹腔注射麻醉后, 固定于手术平台上行左侧颈总动脉插管术, 经三通管分别连接多通道生理监测仪 (监测动脉血压) 和 10 ml 注射器 (内含 125 U/ml 肝素盐水), 反复缓慢放血至平均动脉压 40 mm Hg, 并维持 0.5 h。手术后, SO 组不作处理, HS 组维持平均动脉压 40 mm Hg, KCN 组腹腔注射 KCN (3.0 mg/kg), HS + KCN 组失血休克后腹腔注射 KCN。各组分别于处理后 15、30、60 和 120 min 采样。

#### 1.3 血液氰离子含量的测定

各实验组大鼠于不同时间点采集血液标本, 以微量扩散法测定氰离子含量<sup>[4]</sup>。首先取 0.0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 和 20.0  $\mu\text{g/ml}$  共 7 个浓度 KCN 标准液制定标准曲线。康维氏微量扩散皿中央池加入 2.0 ml 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液, 外池加入 1.0 ml 氰化钾标准液, 再加入 4.0 ml 50% 硫酸溶液, 室温扩散 3 h。从中央池吸取 1.0 ml 加入到测试管中, 测试管中包含 3.5 ml 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液, 振荡混匀, 加入 0.5 ml  $6 \times 10^{-3}$  mol/L 盐酸吡哆醛。50  $^{\circ}\text{C}$  保温 1 h, 加入  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止反应。最后用荧光分光光度计于激发波长 365 nm、发射波长 432 nm 进行检测。

#### 1.4 细胞色素氧化酶活力的测定

实验步骤参照文献<sup>[5]</sup>。冰浴条件下分离肝组织, 按 5% ( $m/V$ ) 加入 10 mmol/L 预冷的 PBS 匀浆备用。在 1 cm 光径比色皿中加入 10 mmol/L PBS 2.4 ml ( $45^{\circ}\text{C}$ ), 并加入还原纯化好的 0.15 mmol/L 细胞色素 C 0.5 ml, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、550 nm 波长下测 A 值, 再加入之前制备的 0.1 ml 肝组织匀浆液, 摇匀, 立即开始计时, 随后每隔 10 s 测定一次 A 值, 共测定 3 min。