

除虫脲亚慢性染毒对大鼠血液系统的影响

胡雄飞, 陆 丹, 熊志军, 张丽娜

(湖南省职业病防治院毒理室, 长沙 410007)

【摘要】 目的 在研究除虫脲对大鼠的亚慢性经口毒性基础上, 初步探讨染毒后对大鼠血液系统的影响。**方法** 将 80 只 SPF 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 0、25、500、10000 mg/kg 除虫脲的饲料连续喂饲染毒 3 个月, 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** 实验期间, 各剂量组雌、雄鼠进食、活动、饮水基本正常, 未见明显中毒表现。中、高剂量组大鼠血液红细胞计数(RBC)、血红蛋白浓度(HGB)和红细胞压积(HCT)降低, 高剂量组大鼠血液平均红细胞体积(MCV)和红细胞分布宽度(RDW)升高, 并且雄鼠血清总胆红素(TBIL)升高, 与对照组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 0.05)。高剂量组大鼠脾脏重量和脏器系数均增高, 雌鼠肝脏重量和脏器系数均增高, 与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。高剂量组全部动物及中剂量组部分动物脾脏明显肿大, 质地较硬, 颜色较深。病理检查结果显示其脾脏红髓髓窦高度扩张并充满大量红细胞, 髓质内含铁血黄素沉积明显。**结论** 除虫脲对大鼠血液系统有明显损害, 长期接触可能会导致脾脏肿大、机体出现慢性溶血性贫血表现。

【关键词】 除虫脲; 亚慢性毒性; 血液系统; 慢性溶血性贫血

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0077-04

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2016. 005. 012

Blood toxicity assessment of subchronic exposure to diflubenzuron in SD rats

HU Xiong-fei, LU Dan, XIONG Zhi-jun, ZHANG Li-na

(Hunan Prevention and Treatment Institute of Occupational Diseases, Changsha, 410007, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of diflubenzuron on the blood system in rats. **Methods** A total of 80 rats were randomly divided into three diflubenzuron treated groups and one negative control group. Different doses of diflubenzuron at 0, 25, 500 and 10000 mg/kg were administered continuously for 90 days to the rats by the way of feeding. Animals were observed for clinical signs of toxicity, food consumption and body weight. Haematological parameters, clinical chemistry parameters, absolute and relative organ weights and histopathological changes were examined at the end of the study. **Result** During the period of the study, the food and water consumption were all normal at all dose groups and no obvious toxicity symptoms appeared. For haematological parameters, the main changes were the decrease of red blood cell count (RBC), haemoglobin (HGB) and haematocrit (HCT) in the medium and high dose groups and the increase of mean corpuscular volume (MCV) and erythrocyte hemoglobin distribution width (RDW) in the high dose group ($P < 0.05$ or 0.01). For clinical chemistry parameters, the main change was the increase of total bilirubin (TBIL) in the high dose

group of male rats ($P < 0.05$). The absolute and relative spleen weights increased obviously in the female and male rats of the high dose group ($P < 0.01$). The absolute and relative liver weights increased obviously in the female rats of the high dose group ($P < 0.01$). The spleens were larger, harder and darker than normal in all of the rats of high dose group and part of the rats of medium dose group. For the result of histopathology examination of spleen, the main changes were a lot of red cells in the medullary sinus and hemosiderin in the medulla. **Conclusion** Diflubenzuron had toxic effect on the blood system of the rats. The spleen was intumesce and chronic hemolytic anemia may be occurred for long-term exposure.

【Key words】 Diflubenzuron; Subchronic toxicity; Blood system; Chronic hemolytic anemia

除虫脲是 20 世纪 70 年代发现的苯甲酸基苯基脲类除虫剂,是一类能抑制靶标害虫的几丁质合成而导致其死亡或不育的昆虫生长调节剂(IGRs),被誉为第三代杀虫剂或新型昆虫控制剂。由于缺乏几丁质,幼虫不能形成新表皮、化蛹受阻,成虫难以羽化、产卵以及虫卵不能正常发育,所以除虫脲的杀虫优势在于影响害虫的整个世代。因其独特的作用机制、较高的环境安全性以及广谱高效的杀虫活性而被广泛使用,国内外已有 14 家企业对其进行产品登记^[1]。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,国内未见相关报道。本研究对除虫脲原药进行了亚慢性经口毒性试验,探讨其对大鼠血液系统的影响,为全面评价其毒性及作用机制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

除虫脲(98%),类白色粉末,由国内某农用激素研究中心提供。

1.2 动物与分组

选用湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供的 SPF 级健康 SD 大鼠【SCXK(湘)2011-0003】,4~6 周龄,体重 90~108 g。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)2014-0003】。

1.3 染毒方法与剂量

根据除虫脲对 SD 大鼠相关毒性资料^[2],本次实验雌、雄鼠各组设计剂量均为 2.5、50、1000 mg/kg bw·d。按大鼠进食量为其体重的 10% 比例将受试物直接混入饲料,分别用含 25、500、10000 mg/kg 除虫脲的饲料连续喂饲染毒 3 个月。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

(1)动物的一般状况、每周体重及摄食量变化。

(2)染毒结束时取静脉血,BC-5300Vet 全自动血液细胞分析仪和 BACKMAN COULTER 全自动生化分析仪分别测定血液学指标和血液生化学指标。(3)试验结束时处死动物,小心分离肝、脾、肾,对其称重并计算脏器系数。(4)将分离出的所有器官和组织用福尔马林固定,进行石蜡包埋、切片、HE 染色,光镜下病理组织学检查。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 统计软件(V11.5)对各项检测数据作单因素方差分析或 t 检验。以评定各剂量组与对照组之间是否有明显差异。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 动物的一般状况

各剂量组雌、雄鼠在整个染毒期间摄食、活动、饮水基本正常,未见明显中毒表现。染毒期间各剂量组雌、雄鼠体重及摄食量较对照组无明显变化(表 1)。

2.2 染毒剂量

根据各组雌、雄大鼠试验期间摄食量计算得出各组实际染毒剂量:雌性大鼠分别为 0、1.7、36.0 和 736.0 mg/kg,雄性大鼠分别为 0、1.6、32.6 和 658.0 mg/kg。

2.3 血液学及血生化指标

中、高剂量组大鼠血液红细胞计数(RBC)、血红蛋白浓度(HGB)和红细胞压积(HCT)降低,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$ 和 0.01),并且随着染毒剂量的增加而不断下降;高剂量组大鼠血液平均红细胞体积(MCV)和红细胞分布宽度(RDW)升高,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。高剂量组雄鼠血清总胆红素(TBIL)明显升高,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),且随着染毒剂量的增加而不断升高。各剂量组血小板计数(PLT)与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 2)。

2.4 白细胞及分类

各剂量组雌、雄鼠白细胞计数(WBC)与对照组比较无显著变化。中剂量组雄鼠中性粒细胞比例(Neu)明显高于对照组、淋巴细胞比例(Lym)明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$ 和 0.01),但均无剂量反应关系。各剂量组单核细胞(MON)和嗜酸性粒细胞比例与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表3)。

2.5 脏器重量及脏器系数

高剂量组雌、雄鼠脾脏重量和脏器系数均增高,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),且随着染毒剂量的增加而不断升高。高剂量组雌

鼠肝脏重量和脏器系数均增高,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。各剂量组大鼠其余脏器重量及脏器系数均无明显异常(表4)。

2.6 病理组织学检查

大体解剖发现,高剂量组全部雌、雄鼠及中剂量组6只雌鼠、4只雄鼠脾脏明显肿大,质地较硬,颜色较深。普通光学显微镜下可见脾脏红髓髓窦高度扩张并充满大量红细胞,髓质内含铁血黄素沉积明显。其它主要脏器未见明显病理学改变(图1)。

表1 除虫脲对大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.1 The effect on body weight of rats caused by diflubenzuron($\bar{x} \pm s, n = 10$)

剂量组 (Group)		染毒前(g) (Before administration)	第1个月(g) (The first month)	第2个月(g) (The second month)	第3个月(g) (The third month)
对照组 (Control group)	♀	95.7 ± 4.3	210.5 ± 9.7	262.1 ± 19.9	288.1 ± 25.7
	♂	100.1 ± 4.1	313.3 ± 22.6	415.0 ± 38.6	444.8 ± 54.6
低剂量组 (Low-dose group)	♀	95.4 ± 3.3	208.8 ± 14.8	260.6 ± 21.7	280.1 ± 32.8
	♂	100.0 ± 3.4	301.2 ± 21.8	422.9 ± 33.5	454.9 ± 27.3
中剂量组 (Moderate-dose group)	♀	95.5 ± 4.0	206.8 ± 22.3	264.2 ± 16.7	284.6 ± 27.2
	♂	100.2 ± 4.3	293.7 ± 24.6	416.5 ± 31.6	471.9 ± 55.2
高剂量组 (High-dose group)	♀	94.9 ± 3.2	207.6 ± 29.5	274.7 ± 21.5	310.1 ± 14.4
	♂	99.7 ± 3.4	299.4 ± 16.7	415.8 ± 44.4	441.0 ± 91.8

表2 除虫脲对大鼠部分血液学及生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.2 The effect of diflubenzuron on the haematological and serum biochemical parameters in the rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

剂量组 (Group)		RBC ($\times 10^{12}/L$)	HGB (g/L)	HCT (%)	MCV (fL)	RDW (%)	PLT ($\times 10^9/L$)	TBIL ($\mu\text{mol/L}$)
对照组 (Control group)	♀	8.08 ± 0.22	167 ± 4	46.2 ± 1.3	57.1 ± 1.1	12.3 ± 0.8	455 ± 411	5.86 ± 1.91
	♂	9.32 ± 0.60	177 ± 10	49.1 ± 2.9	52.7 ± 1.4	13.2 ± 0.4	395 ± 242	6.15 ± 2.09
低剂量组 (Low-dose group)	♀	7.95 ± 0.51	163 ± 7	45.2 ± 2.6	57.0 ± 1.3	12.6 ± 0.5	393 ± 345	5.80 ± 2.34
	♂	9.08 ± 0.51	176 ± 4	48.6 ± 1.8	53.6 ± 1.9	13.0 ± 0.9	368 ± 254	7.24 ± 3.08
中剂量组 (Moderate-dose group)	♀	7.06 ± 0.54 **	152 ± 6 **	42.2 ± 2.0 **	59.9 ± 3.4	12.9 ± 1.8	511 ± 295	6.49 ± 4.60
	♂	8.68 ± 0.27 *	169 ± 7 *	46.9 ± 2.2 *	54.0 ± 2.0	13.6 ± 0.6	329 ± 226	7.96 ± 5.13
高剂量组 (High-dose group)	♀	6.54 ± 0.40 **	148 ± 6 **	42.1 ± 2.1 **	64.5 ± 4.8 **	13.8 ± 0.8 **	404 ± 367	5.76 ± 1.20
	♂	7.53 ± 0.29 **	157 ± 4 **	45.0 ± 1.6 **	59.9 ± 3.0 **	14.7 ± 1.1 **	272 ± 263	12.28 ± 10.17 *

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

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表3 除虫脲对大鼠血液白细胞及分类的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.3 The effect of diflubenzuron on the WBC and its classification in the rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

剂量组 (Group)		WBC ($\times 10^9/L$)	白细胞分类(%) Leukocyte differential count			
			NEU	LYM	MON	EOS
对照组 (Control group)	♀	7.08 ± 1.42	21.5 ± 5.9	66.3 ± 9.9	4.0 ± 1.9	8.1 ± 5.6
	♂	13.41 ± 3.22	16.2 ± 5.9	73.9 ± 8.2	4.2 ± 2.0	5.1 ± 2.4
低剂量组 (Low-dose group)	♀	8.13 ± 1.78	22.5 ± 7.7	66.3 ± 9.2	3.6 ± 1.4	7.3 ± 3.3
	♂	14.90 ± 4.34	22.6 ± 7.9	66.2 ± 9.3	3.8 ± 1.8	6.6 ± 3.7
中剂量组 (Moderate-dose group)	♀	8.27 ± 1.76	23.8 ± 6.4	63.9 ± 10.2	3.8 ± 1.5	8.1 ± 4.6
	♂	13.46 ± 3.14	24.7 ± 5.5 *	62.2 ± 9.0 **	4.3 ± 1.3	8.2 ± 3.9
高剂量组 (High-dose group)	♀	10.09 ± 6.16	18.0 ± 8.4	65.9 ± 7.8	6.1 ± 5.4	9.6 ± 5.2
	♂	15.67 ± 6.26	19.4 ± 3.3	69.4 ± 4.9	3.8 ± 2.9	6.4 ± 4.1

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

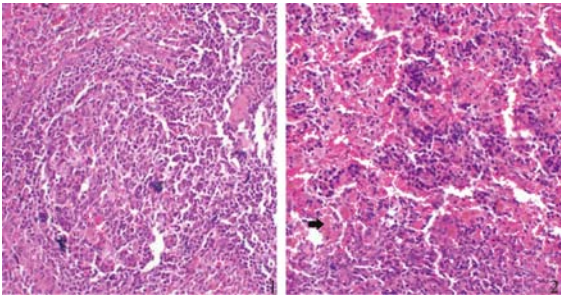
Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 4 除虫脲对大鼠部分脏器重量和脏器系数影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 4 The effect of diflubenzuron on the organ weight and coefficient in the rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

剂量组 (Group)		肝(g) Liver(g)	脾(g) Spleen(g)	肾(g) Kidney(g)	肝/体(%) Liver coefficient	脾/体(%) Spleen coefficient	肾/体(%) Kidney coefficient
对照组 (Control group)	♀	6.47 ± 0.50	0.46 ± 0.08	1.74 ± 0.14	2.40 ± 0.14	0.17 ± 0.02	0.65 ± 0.05
	♂	9.35 ± 1.21	0.64 ± 0.13	2.77 ± 0.36	2.19 ± 0.12	0.15 ± 0.02	0.65 ± 0.07
低剂量组 (Low-dose group)	♀	6.53 ± 0.54	0.44 ± 0.05	1.69 ± 0.21	2.53 ± 0.21	0.17 ± 0.03	0.65 ± 0.07
	♂	10.07 ± 1.78	0.63 ± 0.11	2.86 ± 0.26	2.37 ± 0.35	0.15 ± 0.03	0.67 ± 0.04
中剂量组 (Moderate-dose group)	♀	6.75 ± 0.72	0.59 ± 0.11	1.69 ± 0.12	2.55 ± 0.26	0.22 ± 0.05 *	0.64 ± 0.05
	♂	10.58 ± 1.27	0.75 ± 0.15	2.97 ± 0.39	2.40 ± 0.11	0.17 ± 0.02	0.67 ± 0.06
高剂量组 (High-dose group)	♀	7.81 ± 0.82 **	0.88 ± 0.22 **	1.84 ± 0.06	2.68 ± 0.20 **	0.30 ± 0.06 **	0.63 ± 0.04
	♂	10.76 ± 0.89	1.14 ± 0.26 **	2.84 ± 0.49	2.44 ± 0.16	0.26 ± 0.06 **	0.65 ± 0.12

注:与对照组比较,*与对照组比较 $P < 0.05$,**与对照组比较 $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.



注:1. 对照组大鼠脾脏组织切片;2. 高剂量组大鼠脾脏组织切片;箭头所指为含铁血黄素。

图 1 病理组织学检查(HE × 40)

Note:1. The histological section of spleen from the rat of the control group;2. The histological section of spleen from the rat of the high dose group.
The arrow point out haemosiderin.

Fig. 1 Pathology pictures(HE × 40)

3 讨论

体重是动物实验中一个重要的非特异性指标,可综合反映动物机体中毒效应,也可反映外来化合物对机体的综合影响^[3-4]。本次研究结果显示,各剂量组大鼠体重差异无统计学意义,表明在本实验条件下,除虫脲对大鼠体重增长、发育均未发生明显影响。

流行病学调查研究显示^[5],多种农药(包括有机磷农药、有机氯农药、合成除虫菊酯、氨基甲酸酯等)暴露的易感性和高暴露水平等,会使儿童患血液病的发病风险增大。我们在实验中发现,除虫脲作为苯甲酸苯基脲类除虫剂,中、高剂量组大鼠血液 RBC、HGB 和 HCT 均降低,表明大鼠已出现贫血。红细胞形成过程中,晚幼红细胞脱核释放入外周血后,变成含有 RNA 和少量 DNA 碎片的网织红细胞(reticulocytes, Ret),这种细胞在血管内进一步

成熟,24 ~ 36 h 后变成成熟红细胞^[6]。溶血性贫血(hemolytic anemia, HA)是指红细胞破坏速率增加(寿命缩短),并且超过骨髓造血的代偿能力而发生的一类贫血。根据 HA 诊断依据^[7],HA 不仅出现血液 RBC、HGB 和 HCT 降低,一般还会伴有 Ret 和 TBIL 的升高。本次研究中高剂量组雄鼠血清 TBIL 明显升高,血液 WBC 及其分类无明显变化,符合 HA 特征。国外曾有报道,13 周持续染毒除虫脲后大鼠外周血红细胞计数下降、网织红细胞明显上升,可以作为佐证。血液 MCV 和 RDW 对不同贫血的鉴别诊断有重要参考价值。有报道显示^[8],溶血性贫血(HA)患者 MCV 与 RDW 均升高,属大细胞性贫血。本次实验结果显示高剂量组大鼠血液 MCV 与 RDW 均明显高于对照组,考虑该贫血可能为 HA。

造成红细胞破坏过多的因素分为内在和外在两部分,内在因素主要为红细胞先天性缺陷,外在因素中很多种类,其中很重要一种就是接触药物^[9-11]及化学品所致的溶血性贫血。可引起溶血性贫血的化学物质主要有氧化剂类,如芳香族有机物、氧原子以及有氧化作用的铜、砷、铅等^[12]。除虫脲从结构上看属于芳香族有机物,为外来化学物致 HA 的敏感物质。慢性 HA 临床表现一般为贫血、黄疸和脾大。我们也在试验中发现,高剂量组雌、雄鼠脾脏重量和脾脏脏器系数均明显增高,其脾脏重量均接近于对照组 2 倍。可以推测大鼠由于长期一定剂量摄入除虫脲,导致机体血液红细胞被快速破坏,当红细胞破坏的速度超过了骨髓造血的代偿能力,致使脾脏恢复造血功能,进一步导致增生性脾大。大体解剖发现,高剂量组全部大鼠及中剂量组部分大鼠脾脏明显肿大,质地较硬,颜色较深。病

(上转第 18 页)

- [11] Cristina B, Addolorata A, Maria G, *et al.* A high affinity hepatocyte growth factor-binding site in the immunoglobulin-like region of Met[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(30):21267–21277.
- [12] Holmes O, Pillozzi S, Deakin JA, *et al.* Insights into the structure/function of hepatocyte growth factor/scatter factor from studies with individual domains [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 367(2):395–408.
- [13] W David T, Jennifer DH, Ermanno G, *et al.* Structural basis for agonism and antagonism of hepatocyte growth factor [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(30):13264–13269.
- [14] Youles M, Holmes OM, Nessen M, *et al.* Engineering the NK1 fragment of hepatocyte growth factor/scatter factor as a MET receptor antagonist[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 377(3):616–622.
- [15] Chan AM, Rubin JS, Bottaro DP, *et al.* Identification of a competitive HGF antagonist encoded by an alternative transcript [J]. *Science*, 1991, 254(5036):1382–1385.
- [16] Lietha D, Chirgadze DY, Mulloy B, *et al.* Crystal structures of NK1 – heparin complexes reveal the basis for NK1 activity and enable engineering of potent agonists of the MET receptor[J]. *Embo Journal*, 2001, 20(20):5543–5555.
- [17] Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, *et al.* Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor[J]. *Embo Journal*, 1992, 11(11):4825–4833.
- [18] Daniel K, Xiaoyi Y, Mark P, *et al.* Structural and functional basis of the serine protease-like hepatocyte growth factor beta-chain in Met binding and signaling [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(38):39915–39924.
- [19] Enrique DL, Srinivasan N, Sowdhamini R, *et al.* Molecular evolution and domain structure of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP)[J]. *Protein Science*, 1994, 3(12):2378–2394.

[修回日期]2016-03-30

(下接第 80 页)

理检查结果显示其脾脏红髓髓窦高度扩张并充满大量红细胞,髓质内含铁血黄素沉积明显。本次研究可见,除虫脲对大鼠血液系统可造成明显损害。

参考文献:

- [1] 刘刚. 除虫脲原药产品登记企业达到 14 家. 农化市场十日讯, 2013, (19):38–38.
- [2] Cornell University. Pesticide Management Education Program PMEP [DB/OL]. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/dienochlor-glyphosate/diflubenzuron-ext.html>, 1993–9.
- [3] 刘英华, 张静姝, 邸金茹, 等. 三聚氰胺对大鼠的亚慢性毒性研究[J]. *环境与健康杂志*, 2010, 27(5):422–425.
- [4] 李本长, 邓磊, 周宁, 等. 噻唑膦原药对大鼠的亚慢性毒性作用[J]. *中国比较医学杂志*, 2014, (6):49–53.
- [5] 张妍, 朱莎, 高宇, 等. 农药暴露与儿童急性白血病关系的病例-对照研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2011, 45(1):41–46.
- [6] Gronowicz G, Swift H, Steck T L. Maturation of the reticulocyte in vitro[J]. *Journal of Cell Science*, 1984, 71(1):177–197.
- [7] 李津婴. 溶血性贫血的诊断与实验室检查[J]. *继续医学教育*, 2006, 20(4):66–71.
- [8] 卢焕兴, 余艳云. 血液细胞学参数在贫血诊断中的应用[J]. *现代预防医学*, 2005, 32(6):698–700.
- [9] Salama A. Drug-induced immune hemolytic anemia. [J]. *Expert opinion on drug safety*, 2009, 8:73–79.
- [10] Garratty, G. Immune hemolytic anemia caused by drugs [J]. *Expert opinion on drug safety*, 2012, 11(4):63–67.
- [11] 李晓晶, 陈旭岩, 汪波, 等. 药物导致溶血性贫血 18 例分析[J]. *中华内科杂志*, 2007, 46(2):146–147.
- [12] 付蓉. 后天获得性溶血性贫血[J]. *中国实用内科杂志*, 2009, (7):596–599.

[修回日期]2016-02-01