

论著

硝酸镧对大鼠免疫功能影响

焦冰清^{1,2},梁春来²,杨辉²,毛伟峰²,雍凌²,肖潇²,贾旭东²,刘兆平²,桑亚新¹,宋雁²

(1.河北农业大学,河北 保定 071001; 2.国家食品安全风险评估中心 国家卫生健康委员会
食品安全风险评估重点实验室,北京 100022)

摘要:目的 探讨硝酸镧对大鼠免疫的影响。方法 将 160 只 SPF 级断乳大鼠随机分为两批,每批 80 只并随机分为对照、低、中、高剂量组,每组 20 只,雌雄各半,于出生后第 24 天开始灌胃给予硝酸镧溶液,剂量分别为 0、2、20、60 mg/kg BW。出生后第 51 天对第一批大鼠进行主要脏器重量及脏器比、外周血淋巴细胞分型以及血清细胞因子的检测,出生后第 54 天对第二批大鼠进行脾 T、B 淋巴细胞增殖及脾脏抗体生成细胞的测定。结果 与对照组比较,雌雄大鼠硝酸镧各剂量组周体质量和终体质量均差异无统计学意义($P>0.05$)。雄性大鼠高剂量组肾脏绝对重量和相对重量高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);雌性大鼠低剂量组脑绝对重量和相对重量均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。雄性大鼠高剂量组自然杀伤细胞数低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),且存在剂量-反应关系;与对照组比较,雄性大鼠低剂量组 CD4/CD8 比值升高,雌性大鼠 T 细胞数增加、B 细胞数降低,均差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 本试验条件下硝酸镧对大鼠具有免疫毒性作用,基于免疫毒性测试终点,其免疫毒性作用的基准剂量下限为 8.10 mg/kg BW。

关键词:硝酸镧;免疫;血清细胞因子;脾 T 淋巴细胞;脾 B 淋巴细胞;自然杀伤细胞;毒理
中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2019)02-0099-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.02.001

Effects of lanthanum nitrate on immunization in rats

JIAO Bingqing^{1,2}, LIANG Chunlai², YANG Hui², MAO Weifeng², YONG Ling²,
XIAO Xiao², JIA Xudong², LIU Zhaoping², SANG Yaxin¹, SONG Yan²

(1. Hebei Agricultural University, Hebei Baoding 071001, China; 2. NHC Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China)

Abstract: Objective To explore the effect of lanthanum nitrate on immunity in rats. **Methods** One hundred and sixty SPF weaned rats were randomly divided into two batches, 80 rats in each group and randomly divided into control, low, medium and high dose group, with 20 rats (male and female) in each group. On the 24th day after birth, lanthanum nitrate solution was administered at doses of 0, 2, 20 and 60 mg/kg BW respectively. On the 51st day after birth, the first batch of rats were tested for main organs, organ-body ratio, peripheral blood lymphocyte type and serum cytokines; splenic T and B lymphocyte proliferation and splenic antibody-producing cells were measured on the 54th day after birth to the second batch of rats. **Results** There was no significant difference of body weight among the three dose groups and the control group to the two batch of rats ($P>0.05$). The absolute and relative weight of kidney and viscera of male rats in middle and high dose groups were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). The brain weight and viscera ratio of female rats in low dose group were higher than those in control group ($P<0.05$). The number of natural killer cells in the high dose group was significantly lower than that in the control group, with dose-response relationship ($P<0.05$). The ratio of CD4/CD8 in the low dose group was significantly higher ($P<0.05$). The number of T cells in the low dose group was significantly higher ($P<0.05$), however the number of B cells in the low dose group was significantly lower ($P<0.05$). Based on the immunotoxicity test parameter. **Conclusion** In this experiment, lanthanum nitrate had immunotoxic effects on rats, based on the immunotoxicity test parameter, the baseline lower limit value of immunotoxicity was 8.10 mg/kg BW.

Key words: Lanthanum nitrate; immune; lymphokine; spleen T lymphocytes; spleen B lymphocytes; natural killer cell; toxicology

收稿日期:2019-02-03
基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81402683)
作者简介:焦冰清 女 硕士生 研究方向为食品毒理
E-mail:690255864@qq.com
通信作者:宋雁 女 研究员 研究方向为食品安全风险评估和食品毒理学 E-mail: songyan@cfsa.net.cn

稀土元素(rare earth elements, REEs)包括 15 个镧系元素及与其电子结构和化学性质相近的钪(Sc)和钇(Y)。我国是稀土元素资源最为丰富的国家,镧系元素因具有优良的理化性质被广泛运用于人们的生产生活中^[1]。研究报道^[2-3],土壤及饮

水中均可检出稀土元素,一些食品中稀土元素含量也较高。稀土元素可通过皮肤、消化道和呼吸道等多种途径进入人体,并通过血液分布于多种器官组织内,因此稀土元素的安全性问题引起广泛关注。2013年,原国家卫生和计划生育委员会将中国居民膳食中稀土元素暴露风险评估列为优先评估项目,在现有毒理学基础数据提出了稀土元素的临时健康指导值,并据此在风险评估的基础上提出了相关标准修订的建议。但专家委员会同时提出了目前稀土元素毒理学和人群流行病学研究资料仍然不够丰富、需要进一步系统开展稀土元素的毒理学研究的建议,为选择稀土元素风险防控策略、科学解决我国食品安全中的这一特有问题的提供充足证据。

免疫系统是外源因子攻击的敏感靶点,其效应变化是毒理学安全性评价中较为敏感的指标。虽然前期有研究报道^[4-5]稀土元素长期摄入会对人体的免疫系统产生毒性作用,但目前关于这方面的毒理学资料仍然比较缺乏,可能的毒性作用机制等问题还不明确。本研究将从整体、细胞、分子上的不同水平,探讨不同剂量水平条件下硝酸镧对大鼠免疫系统功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康断乳的SD大鼠(SPF级),体质量为50~70 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号:SCXK(京)2015-0001],饲养于首都医科大学附属北京口腔医院动物房[许可证号:SCXK(京)2013-0018]。试验期间大鼠摄食饲料购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[合格证号:SCXK(京)2015-0015],动物自由饮水和进食,动物房内保持安静、清洁、通风和自然光照状态,温度为21~24℃,相对湿度为40%~70%。每天观察动物的活动能力、精神状态、行为表现、被毛和粪便情况等。

1.1.2 主要仪器与试剂

酶标仪(Denley Dragon,美国 Thermo)、流式细胞仪(美国 BD FACS Calibur)、二氧化碳培养箱、超净工作台、磁力搅拌器、涡旋混匀器、精密电子秤、恒温水浴锅等。

氧化镧粉末(纯度为99.99%,北京有色金属研究总院),绵羊红细胞(SRBC,北京索莱宝科技有限公司),豚鼠血清(由购自北京华阜康生物科技股份有限公司的豚鼠提取),水杨酸(SA)缓冲液(行知生物科技有限公司),磷酸盐(PBS)缓冲液、Hank's液均购自美国 Gibco, RPMI1640 培养液、青霉素、链霉

素、胎牛血清均购自美国 HyClone,刀豆蛋白(ConA)、脂多糖(LPS)均购自美国 Sigma,自然杀伤细胞(T/B/NK)流式检测抗体、T细胞亚群(CD4/CD8/CD3)流式检测抗体、CBA Flex 检测试剂盒、染色液均购自美国 BD,琼脂糖、MTS 细胞检测试剂盒均购自美国 Promega。

硝酸镧溶液:将氧化镧粉末溶解于稀硝酸溶液中(1:1稀释),加热搅拌使其完全溶解为无色透明溶液,制备成硝酸镧储备液。使用前在加热(<60℃)状态下用去离子水稀释并缓慢滴加少量饱和氢氧化钠溶液调节pH值至6.0。ConA溶液:用1×PBS溶液将粉末溶解,配制成200 μg/ml的储存液,使用前用0.2 μm的微孔滤膜过滤除菌,并将储存液稀释至50 μg/ml。LPS溶液配制方法同ConA液。完全培养基:RPMI1640培养液加入10%胎牛血清及1%青霉素(100 U/ml)和链霉素(100 μg/L),于4℃保存,使用前过滤除菌。

1.2 方法

1.2.1 实验动物处理

将160只SD大鼠分成两批,每批80只,随机分为对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组20只,雌雄各半。适应性饲养3 d后,于大鼠出生后第24天(PND24)经灌胃给予硝酸镧溶液,剂量分别为2、20、60 mg/kg BW,对照组则由等量的蒸馏水代替,每日灌胃一次。

1.2.2 大鼠体质量及脏器系数

第一批动物于开始灌胃后记录每周体质量,在出生后第51天(PND51)记录其终体质量。采集血液标本,取两支真空采血管进行取血[一支为乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管,另一支为普通非抗凝管,分别用于进行外周血淋巴细胞分型和血清细胞因子的测定],采血后迅速取脑、肝、脾、肺、肾、胸腺并称重。

1.2.3 T细胞依赖抗体反应能力测定(空斑试验)

第二批动物于出生后第55天(PND55)进行空斑形成能力的测定。PBS对脱纤维绵羊血进行3次洗涤,2 000 r/min离心10 min,配制成2% SRBC溶液,每只大鼠腹腔注射0.6 ml。5 d后麻醉处死,取脾脏放在盛有Hank's液的小平皿内,清洗磨碎制成脾细胞悬液,悬浮在1 ml Hank's液并定容至10 ml,1 000 r/min离心10 min,再用Hank's液洗2遍,最后将细胞悬浮在完全培养液中,将细胞浓度调整为 5×10^6 个/ml。

将表层培养基(1%琼脂糖溶液)与等量pH值7.2~7.4、两倍浓度的Hank's液混合,55℃水浴分装,在1.5 ml EP管中逐一快速加入350 μl琼脂液、

25 μl SRBC、100 μl 脾细胞、25 μl 豚鼠补体,将 500 μl 液体混匀后迅速倒入 30 mm 小平皿内,每份脾细胞悬液平行做两个,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 浓度为 5% 的培养箱中培养,3 h 后用肉眼或者放大镜观察溶血空斑(PFC)的数量^[6-8]。

1.2.4 淋巴细胞增殖试验

ConA 诱导脾 T 淋巴细胞增殖试验:按照 1.2.3 方法配制脾细胞悬液,并将细胞浓度调整为 1×10^6 个/ml,将其分两孔加入 96 孔培养板中,每孔 90 μl ,其中一孔加入 50 $\mu\text{g/ml}$ ConA 液 10 μl ,另一孔加入完全培养基 10 μl 作为对照,另设不加细胞的空白对照;将其放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 浓度为 5% 的培养箱中培养 72 h,结束前 4 h,于每孔加入 20 μl 四唑盐(MTS),继续培养至试验结束。培养结束后,酶标仪 490 nm 处测定吸光度值^[6-7]。LPS 诱导脾 B 淋巴细胞增殖试验与 ConA 诱导脾 T 淋巴细胞增殖试验相同。

1.2.5 血清细胞因子检测

将微球用 4 ml 样品稀释液溶解,并放置室温平衡至少 15 min,标记 8 个试管,用 500 μl 样品稀释液将最高浓度标准品做系列倍比稀释,梯度稀释为 1:2 至 1:256,另取一只加入 500 μl 稀释液作为阴性对照。将每个指标试剂盒中的捕获微球,取 1 μl 微球到 15 ml 离心管中至 50 μl 微球的用量;取 1 μl 各指标检测试剂,混合到试管中,并用检测试剂稀释液补齐最终体积为 50 μl 用量;样品管中每管加入 50 μl 待测样品,轻轻混匀捕捉混合微球,吸取 50 μl 加入样品管中,室温孵育 1 h。所有实验管中加入藻红蛋白(PE)检测试剂 50 μl ,轻轻振荡混匀。室温孵育 2 h。加入 1 ml 洗液,振荡混匀后 200 $\times g$ 离心 5 min,弃上清;加入 300 μl 洗液振荡混匀,用流式细胞仪获取 γ -干扰素(γ -IFN)、白细胞介素-2(IL-2)、IL-4、IL-1 α 、IL-10、肿瘤坏死因子(TNF)的含量。

1.2.6 外周血淋巴细胞分型

每只实验动物分别取新鲜抗凝全血 100 μl 到两支流式管,一支加入 20 μl 大鼠 T 淋巴细胞亚群检测抗体混合液(CD8a FITC/CD4 PE/CD3 APC),一支加入 20 μl 大鼠 T/B/NK 细胞亚群检测抗体混合液(CD45RA FITC/CD161a PE/CD3 APC),混匀后室温避光反应 20 min;分别加入 2 ml 1 \times 红细胞裂解液,混匀室温孵育 10 min;300 $\times g$ 离心 5 min 弃上清;加入 2 ml 细胞洗液,混匀后 300 $\times g$ 离心 5 min 弃上清;加入 500 μl 细胞洗液,混匀后上流式细胞仪检测分析。

1.3 数据处理及统计学分析

1.3.1 各组间均数比较

采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析,各

剂量组间试验结果以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,方差齐时组间均数比较采用 LSD 法,方差不齐时组间均数比较采用 Dunnett's T3 法,设定检验水准 $\alpha = 0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

1.3.2 基准剂量(BMD)法分析剂量-反应关系

使用基准剂量软件 BMDs 2.6.0.1(美国环境保护署)分析实验动物各指标的剂量-反应关系。根据数据选择指数模型、希尔模型、线性模型、多项式模型和幂模型等。基准效应(BMR)选择 5% 或 10%,拟合优度检验 $P>0.1$ 时接受该模型,当多个模型通过拟合优度检验时根据赤池信息量(AIC)准则选择 AIC 最小的模型,并获得基准剂量下限(BMDL)。

2 结果

2.1 大鼠体质量的变化

硝酸镧各剂量组雄性和雌性大鼠周体质量和终体质量与对照组比较均差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 脏器质量

雄性大鼠硝酸镧高剂量组的肾脏绝对重量和相对重量高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);雌性大鼠硝酸镧低剂量组的脑绝对重量和相对重量高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。其他脏器三个剂量组绝对重量和相对重量与对照组比较,均差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.3 T 细胞依赖抗体反应能力和淋巴细胞增殖能力

雌性大鼠硝酸镧高剂量组 PFC 细胞数高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),其他剂量组差异无统计学意义($P>0.05$)。雄性和雌性大鼠硝酸镧各剂量组淋巴细胞增殖能力与对照组比较均差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.4 血清细胞因子结果

雄性和雌性大鼠硝酸镧各剂量组血清六种细胞因子水平与对照组比较均差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

2.5 外周血淋巴细胞分型

雄性大鼠硝酸镧高剂量组 NK 细胞数低于对照组及低剂量组,均差异有统计学意义($P<0.05$);雌性大鼠硝酸镧低剂量组 CD4/CD8 比值高于其他各剂量组,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),各剂量组 T 细胞、B 细胞数与对照组比较均差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。雌性大鼠硝酸镧低剂量组 B 细胞数低于对照组、T 细胞数高于

表 1 大鼠主要脏器重量($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Relative organ weight of rats							
性别	分组	肝		肾		脾	
		绝对重量/g	相对重量/%	绝对重量/g	相对重量/%	绝对重量/g	相对重量/%
雄性	对照组	6.76±0.37	2.79±0.03	2.15±0.10	0.90±0.02	0.62±0.10	0.26±0.05
	低剂量组	6.83±0.46	2.72±0.05	2.16±0.20	0.92±0.01	0.69±0.05	0.49±0.06
	中剂量组	7.08±0.42	2.76±0.02	2.30±0.08	0.93±0.02	0.56±0.09	0.21±0.06
	高剂量组	7.15±0.49	2.79±0.02	2.36±0.10 ^a	0.95±0.01 ^a	0.68±0.09	0.28±0.03
雌性	对照组	5.68±0.38	3.20±0.28	1.48±0.15	0.84±0.11	0.50±0.05	0.28±0.04
	低剂量组	5.82±0.67	3.36±0.48	1.54±0.16	0.89±0.11	0.53±0.10	0.30±0.07
	中剂量组	5.70±0.52	3.23±0.29	1.52±0.05	0.86±0.03	0.43±0.05	0.24±0.03
	高剂量组	5.39±0.24	3.11±0.16	1.50±0.08	0.87±0.05	0.48±0.08	0.28±0.05
性别	分组	肺		脑		胸腺	
		绝对重量/g	相对重量/%	绝对重量/g	相对重量/%	绝对重量/g	相对重量/%
雄性	对照组	1.29±0.11	0.54±0.05	1.95±0.05	0.81±0.02	0.73±0.10	0.30±0.05
	低剂量组	1.25±0.14	0.76±0.04	1.96±0.09	0.68±0.04	0.71±0.12	0.28±0.05
	中剂量组	1.28±0.14	0.47±0.09	1.88±0.09	0.69±0.06	0.67±0.08	0.25±0.05
	高剂量组	1.49±0.23	0.62±0.08	1.91±0.08	0.79±0.03	0.76±0.08	0.31±0.03
雌性	对照组	1.08±0.18	0.61±0.13	1.66±0.20	0.93±0.15	0.64±0.08	0.36±0.06
	低剂量组	1.04±0.09	0.60±0.05	1.84±0.05 ^a	1.06±0.04 ^a	0.58±0.13	0.34±0.09
	中剂量组	1.00±0.10	0.57±0.06	1.77±0.05	1.00±0.03	0.56±0.08	0.32±0.04
	高剂量组	1.04±0.18	0.60±0.12	1.77±0.05	1.02±0.03	0.66±0.08	0.38±0.05

注：^a表示与对照组比较, $P<0.05$

表 2 T 细胞依赖抗体反应能力和淋巴细胞增殖能力测定结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Results of PFC and cell proliferation in rats				
性别	分组	PFC/(个/10 ⁶ 脾细胞)	ConA 诱导脾 T 淋巴细胞增殖能力	LPS 诱导脾 B 淋巴细胞增殖能力
雄性	对照组	244.40±34.57	0.20±0.03	0.22±0.02
	低剂量组	238.80±14.49	0.31±0.21	0.26±0.04
	中剂量组	226.00±15.34	0.34±0.21	0.26±0.05
	高剂量组	249.60±20.56	0.22±0.07	0.24±0.02
雌性	对照组	115.40±5.03	0.22±0.02	0.24±0.01
	低剂量组	113.60±9.87	0.34±0.20	0.26±0.10
	中剂量组	124.00±1.00	0.33±0.21	0.25±0.07
	高剂量组	140.60±13.93 ^a	0.24±0.02	0.25±0.07

注：^a表示与对照组比较, $P<0.05$

表 3 大鼠血清细胞因子结果($\bar{x}\pm s, \text{pg/ml}, n=10$)

Table 3 Serum cytokines of rats							
性别	分组	IL-2	IL-4	γ -IFN	IL-1 α	TNF	IL-10
雄性	对照组	1.56±0.12	1.88±0.36	0.86±0.23	7.78±1.13	6.76±0.27	11.34±0.25
	低剂量组	0.98±0.10	1.31±0.19	0.67±0.19	7.06±0.26	6.51±0.71	10.67±0.77
	中剂量组	1.29±0.63	1.38±0.36	0.77±0.11	7.91±0.83	6.20±0.66	10.26±1.17
	高剂量组	1.46±0.57	1.81±0.69	0.91±0.26	8.27±1.19	6.78±0.80	10.04±0.81
雌性	对照组	1.01±0.21	1.20±0.12	1.35±0.07	5.90±0.36	7.01±0.17	10.57±0.29
	低剂量组	1.10±0.08	1.21±0.21	1.18±0.28	5.78±0.30	6.77±0.42	10.56±0.39
	中剂量组	0.98±0.31	0.94±0.08	1.08±0.16	5.89±0.36	6.87±0.32	10.47±0.44
	高剂量组	0.98±0.08	1.19±0.27	1.35±0.30	5.90±0.33	7.04±0.16	10.07±0.41

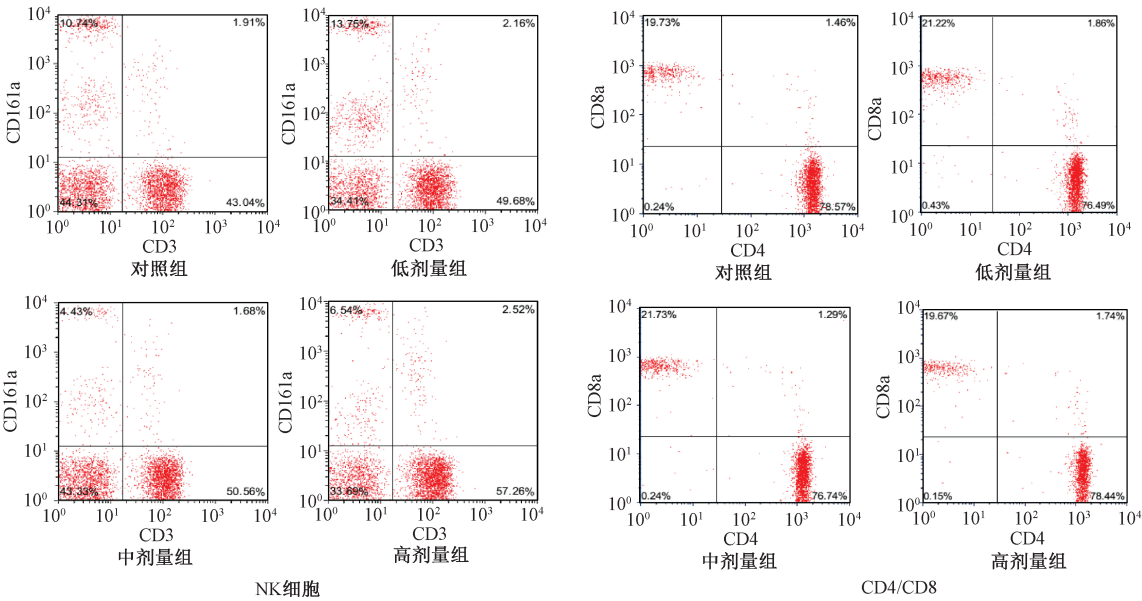
表 4 大鼠外周血淋巴细胞分型结果($\bar{x}\pm s, n=10, \%$)

Table 4 Results of peripheral blood lymphocytes in rats					
性别	分组	CD4/CD8	T 细胞	B 细胞	NK 细胞
雄性	对照组	3.56±0.77	60.58±7.38	27.65±7.32	8.57±2.05
	低剂量组	4.66±1.01 ^a	59.39±4.53	27.36±5.35	10.50±2.92
	中剂量组	3.61±0.61	59.96±4.60	27.06±4.66	9.97±3.35
	高剂量组	3.26±0.58	59.33±5.84	30.98±6.71	5.40±1.67 ^{ab}
雌性	对照组	3.70±0.97	45.71±5.68	38.88±4.93	5.93±1.50
	低剂量组	3.93±1.14	53.41±6.33 ^a	32.56±3.53 ^a	6.58±1.36
	中剂量组	3.58±0.89	51.55±4.51	32.56±4.66	5.05±1.40
	高剂量组	3.88±0.82	48.30±6.36	39.49±7.58	5.46±1.72

注：^a表示与对照组比较, $P<0.05$;^b表示与低剂量组比较, $P<0.05$

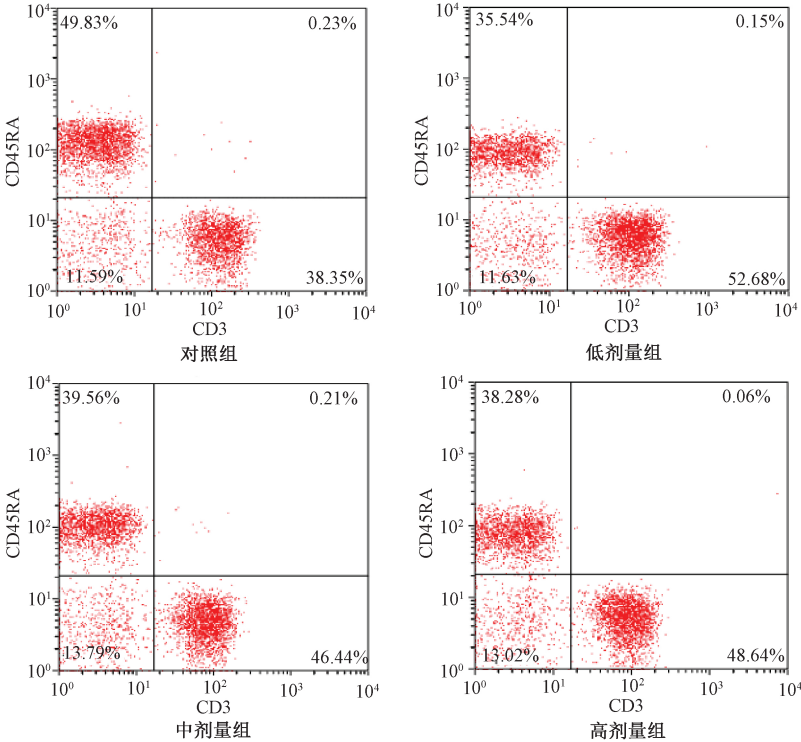
对照组,均差异有统计学意义($P<0.05$);雌性大鼠硝酸镧各剂量组 NK 细胞数、CD4/CD8 比值与对照

组比较均差异无统计学意义($P>0.05$)。淋巴细胞分型结果见图 1 和 2。



注:CD3 为脾 T 淋巴细胞表面标志物;CD161a 为 NK 细胞表面标志物; CD4 和 CD8a 为脾 T 淋巴细胞亚群表面标志物

图 1 雄性大鼠淋巴细胞分型结果
Figure 1 Results of lymphocyte typing in male rats



脾 T 淋巴细胞 (CD3)/脾 B 淋巴细胞 (CD45RA)

注:CD3 为脾 T 淋巴细胞的表面标志物;CD45RA 为脾 B 淋巴细胞的表面标志物

图 2 雌性大鼠淋巴细胞分型结果

Figure 2 Results of lymphocyte typing in female rats

2.6 大鼠各剂量组剂量-反应关系

根据本试验数据,选取肾脏相对重量、肾脏绝对重量及 NK 细胞数进行 BMD 分析,见表 5。雄性大鼠硝酸镧高剂量组肾脏绝对重量和相对重量高

于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),且存在剂量-反应关系;雄性大鼠硝酸镧高剂量组 NK 细胞数低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),且存在剂量-反应关系,见图 3。结果得出本试验硝酸镧

表 5 BMD 分析硝酸镧对肾脏绝对和相对重量、NK 细胞数的剂量-反应曲线拟合优度检验及剂量-反应结果

Table 5 BMD analysis of the fit test for the dose response curve of lanthanum nitrate on absolute and relative weight of kidney and number of NK cells and dose-effect result

名称	指数模型		希尔模型		线性模型		多项式模型		幂模型		BMD	
	P	AIC	P	AIC	P	AIC	P	AIC	P	AIC	/(mg/kg BW)	/(mg/kg BW)
肾脏相对重量	N/A	-143.06	N/A	-149.55	<0.001	-148.57	<0.001	-149.06	<0.001	-151.54	57.38	39.96
肾脏绝对重量	0.80	-95.36	N/A	-93.42	0.29	-94.94	0.29	-94.94	0.29	-94.94	53.83	8.77
NK 细胞数	N/A	124.96	N/A	124.96	0.03	124.61	0.19	121.13	0.07	122.96	28.99	8.10

注：N/A 表示指标在此模型下运行错误

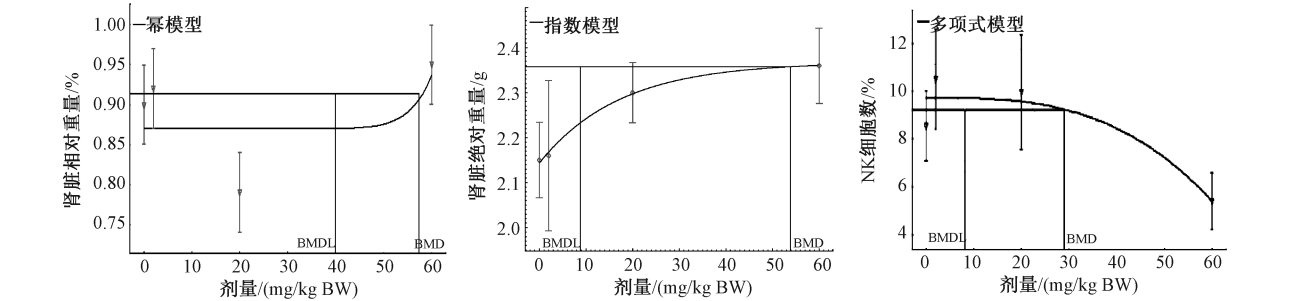


图 3 雄性大鼠肾脏相对重量、肾脏绝对重量、NK 细胞数剂量-反应关系曲线

Figure 3 Dose-response curve of relative weight of kidney, absolute weight of kidney and number of NK cells in male rats

最敏感的免疫毒性参考值为 8.10 mg/kg BW。

3 讨论

近年来,随着国内众多学者对稀土元素及其化合物的深入研究,稀土元素在农业及医药领域具有广泛的应用,因此对于安全剂量的确定显得尤其重要^[9]。免疫毒性物质可能对免疫系统的发育造成短期或者长期的影响^[10]。NK 细胞是一类无需预先致敏即可快速直接杀伤靶细胞效应的淋巴细胞,具有非特异性杀伤作用,又称为天然杀伤细胞。NK 细胞主要分布于外周血、脾脏和肝脏等部位,具有免疫调节等功能。本试验结果显示,雄性大鼠硝酸镧高剂量组 NK 细胞数低于对照组,其产生免疫毒性的分离点 BMDL 为 8.10 mg/kg BW。雄性大鼠硝酸镧高剂量组肾脏绝对重量和相对重量均高于对照组 ($P<0.05$),具有免疫毒性,其 BMDL 分别为 8.77 和 39.96 mg/kg BW。也有文献报道^[11]一次腹腔注射硝酸稀土后,500 mg/kg BW 剂量组小鼠的脾和胸腺重量下降。

T 淋巴细胞作为免疫效应细胞和免疫调节细胞,在机体的细胞免疫和体液免疫诱导中均有重要作用。根据 T 细胞表面分化抗原的不同,T 细胞可以分为 CD3、CD4 和 CD8,其中 T 细胞表面的 CD4 抗原代表辅助 T 细胞(Th 细胞),主要功能是帮助其他细胞提升其免疫应答,帮助 B 淋巴细胞分裂、分化和产生抗体;细胞毒性 T 细胞(T_s 细胞)表达 CD8 抗原,具有细胞毒性和杀死靶细胞的特性。CD4 和 CD8 细胞是机体免疫调节的枢纽,CD4/CD8 值可作为免疫状态的重要指标。本试验

发现,硝酸镧对免疫系统的影响表现为毒性兴奋效应,低剂量组出现免疫增强作用:雄性大鼠硝酸镧低剂量组 CD4/CD8 比值高于其他各剂量组,T 细胞数升高,而 B 细胞数降低。雌性大鼠高剂量组 PFC 细胞生成能力高于对照组,低剂量组 B 细胞数低于对照组,与报道^[2]所提到的,小鼠一次性腹腔注射 0.1、0.2、2.0、10 和 20 mg/kg BW 混合稀土常乐,小剂量对小鼠特异性抗体的形成、淋巴细胞转化及腹腔巨噬细胞吞噬功能具有明显促进作用,而大剂量(10、20 mg/kg BW)有明显抑制作用的结果相一致。

综上所述,硝酸镧对大鼠具有一定的免疫毒性作用,试验出现免疫毒性的指标,反映硝酸镧对大鼠有一定的免疫毒性影响,但整体呈现低剂量促进、高剂量抑制的趋势,与报道^[12-13]镧元素存在一定的免疫毒性、低剂量对免疫功能具有促进作用、高剂量则有抑制作用相一致。

参考文献

[1] 宋雁,刘兆平,贾旭东.稀土元素的毒理学安全性研究进展[J].卫生研究,2013,42(5):885-892.

[2] 汪伟,李冬梅,黄可欣,等.混合稀土染毒对小鼠免疫功能的影响[J].毒理学杂志,2012,26(6):458-459.

[3] 胡爱武,刘小阳,秦宜德.硝酸镧对大鼠甲状腺和胰岛分泌功能的影响[J].毒理学杂志,2009,23(1):56-57.

[4] 马文强,冯杰.稀土元素对动物免疫功能的影响[J].饲料工业,2006,27(4):52-54.

[5] 宋宇,黄可欣,李冬梅,等.硝酸镧对小鼠特异性抗体的形成、淋巴细胞转化和腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响[J].吉林大学学报(医学版),2012,38(6):1048-1051.

[6] 刘丹丹,杨辉,张文众,等.孕期硝酸镧暴露对子代大鼠免疫

的影响[J].中国食品卫生杂志,2017,29(3):257-263.

[7] 刘丹丹.孕期硝酸镧暴露对仔代大鼠免疫功能的影响[D].太原:山西医科大学,2017.

[8] 宋雁,贾旭东,崔文明,等.不同途径和剂量环磷酸胺建立小鼠免疫抑制模型的对比研究[J].中国食品卫生杂志,2013,25(3):218-225.

[9] 李冬梅,黄可欣.长期服用低剂量硝酸镧对大鼠肾脏的影响[J].军医进修学院学报,2008,29(5):418-419.

[10] 胡爱武.元素镧和氟对动物免疫和内分泌的影响[D].合肥:安徽医科大学,2007.

[11] 陈兴安,贺秋晨,关腾,等.小剂量柠檬酸稀土对小鼠中性多形核白细胞吞噬功能的影响[J].中国稀土学报,1995,13(1):70-73.

[12] 孙静,秦新英,刘会芳.氯化铈和氯化镧对小鼠免疫细胞作用的体外实验[J].河北大学学报(自然科学版),2012,32(3):281-285.

[13] 崔焕波,艾金霞.SBHL对小鼠免疫功能影响的实验研究[J].中国实验诊断学,2011,15(11):1804-1806.

鳕鱼及其制品中裸盖鱼、油鱼和南极犬牙鱼源性成分检测

BJS 201907

1 范围

本方法规定了鳕鱼及其制品中裸盖鱼(*Anoplopoma fimbria*)、油鱼(*Lepidocybium flavobrunneum*, *Ruvettus pretiosus*)和南极犬牙鱼(*Dissostichus eleginoides*, *Dissostichus mawsoni*)源性成分的实时荧光 PCR 检测方法。

本方法适用于鳕鱼、鳕鱼片、鳕鱼扒等生鲜或速冻鳕鱼产品(不包含鱼丸、鱼糕、鱼饼、鱼肠、鱼豆腐、鱼肝油等加工产品)中裸盖鱼、油鱼和南极犬牙鱼源性成分的定性检测。

2 原理

使用商业化 DNA 提取试剂盒,获得适用于实时荧光 PCR 检测的 DNA。分别使用裸盖鱼、油鱼或南极犬牙鱼特异性引物探针,通过实时荧光 PCR 反应,获得 Ct 值,根据 Ct 值判断样品是否检出裸盖鱼、油鱼或南极犬牙鱼源性成分。

3 试剂和材料

除另有规定外,本方法中所用试剂均为分析纯,水应符合 GB/T 6682 的一级水要求。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

3.1 引物探针序列

3.1.1 裸盖鱼源性成分 *NADH₂* 基因

裸盖鱼源成分 5'端引物:5'-AGGGACCACCCTAACATTCG-3'

裸盖鱼源性成分 3'端引物:5'-GTGGGTGCTGATGCTGTGCT-3'

裸盖鱼源性成分探针:5'-FAM-CAGCTCTCACTGACTACTCGCATGA-BHQ1-3'

3.1.2 油鱼源性成分 *Cytb* 基因

油鱼源性成分 5'端引物:5'-TAACTTCGGATGACTCATCCG-3'

油鱼源性成分 3'端引物:5'-AGTAAAGGCCTCGTCCAATGT-3'

油鱼源性成分探针:5'-FAM-CATCCGAAACCTTCATGCAAACGGC-BHQ1-3'

3.1.3 南极犬牙鱼源性成分 *CK* 基因

南极犬牙鱼源性成分 5'端引物:5'-CTGAATATGTAGGTGCATACG-3'

南极犬牙鱼源性成分 3'端引物:5'-TTGCTCTTTGTGTTTCGGTT-3'

南极犬牙鱼源性成分探针:5'-FAM-TCCATTAGGTAAGCGAGCGGAAGA-BHQ1-3'

3.1.4 内参照基因真核生物 18SrRNA

内参照 5'端引物:5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA-3'

内参照 3'端引物:5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3'

内参照探针:5'-FAM-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAAC-BHQ1-3'

3.2 商业化 DNA 提取试剂盒。

[8]

HOFF R B, RÜBENSAM G, JANK L, et al. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis [J]. Talanta, 2015, 132(3): 443-450.

[9]

沈斐, 许燕娟, 姜晟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水华样品中微囊藻毒素及其基质效应的消除 [J]. 色谱, 2017, 35(7): 772-777.

[10]

刘进玺, 秦珊珊, 冯书惠, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食用菌中农药多残留的基质效应 [J]. 食品科学, 2016, 37(18): 171-177.

[11]

LEE S, KIM B, KIM J. Development of isotope dilution-liquid chromatography tandem mass spectrometry for the accurate determination of fluoroquinolones in animal meat products: optimization of chromatographic separation for eliminating matrix effects on isotope ratio measurements [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1277(12): 35-41.

(上接第 105 页)

3.3 商业化 PCR 反应预混液。

4 仪器和设备

- 4.1 实时荧光 PCR 仪。
- 4.2 微量紫外分光光度计。
- 4.3 恒温水浴锅。
- 4.4 高速冷冻离心机:离心力 18 000 g 以上。
- 4.5 微量移液器(0.5 μL~10 μL, 10 μL~100 μL, 20 μL~200 μL, 100 μL~1 000 μL)。
- 4.6 涡旋振荡器。
- 4.7 天平:感量 0.001 g。

5 分析步骤

5.1 样品前处理

- (1)样品只有单块鱼肉组成:使用灭菌剪刀适量剪取中心部位鱼肉。
- (2)样品有五块以下鱼肉组成:使用灭菌剪刀适量剪取每个组成部分的中心部位鱼肉。
- (3)样品有五块以上鱼肉组成:随机挑选 5 块鱼肉,使用灭菌剪刀适量剪取每个组成部分的中心部位鱼肉。

将所取得的鱼肉使用灭菌去离子水洗涤,离心去除上清液,尽可能剪碎并混匀。
注:速冻鳕鱼产品应在完全解冻后再取样。

5.2 DNA 提取

按照商业化 DNA 提取试剂盒说明书中要求的取样量称取样品,每个样品设置两个平行,按照商业化 DNA 提取试剂盒说明书操作。

5.3 DNA 浓度测定

取 1 μL DNA 溶液,使用微量紫外分光光度计按照 dsDNA(双链 DNA)计算方式检测其浓度。

5.4 实时荧光 PCR 扩增

实时荧光 PCR 反应体系见表 1。

表 1 实时荧光 PCR 反应体系	
PCR 预混液(2×)	10 μL
10 μmol/L 上游引物	0.4 μL
10 μmol/L 下游引物	0.4 μL
10 μmol/L 探针	0.2 μL
DNA	20-50 ng
灭菌去离子水	补充至总体积 20 μL

PCR 反应程序:95 ℃ 15 s; 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 34 s(读取荧光),40 个循环。

5.5 实验对照

分别设置阳性对照、阴性对照、PCR 空白对照、空白提取对照各一个。
阳性对照:含相应物种的 DNA。