

# 用昆明小鼠定量测试河豚毒素的研究

张理<sup>1</sup> 谢克勤<sup>2</sup> 赵金山<sup>1</sup> 于丽华<sup>2</sup> 邢金川<sup>1</sup> 李培云<sup>3</sup>

(1. 山东省卫生防疫站, 山东 济南 250014; 2. 山东医科大学, 山东 济南 250012;

3. 乳山市卫生防疫站, 山东 乳山 264500)

**摘要:**为建立昆明小鼠定量测定河豚毒素(TTX)方法,选用雄性昆明小鼠进行研究,结果显示:TTX致昆明小鼠的LD<sub>50</sub>为0.165 μg,TTX剂量在0.45~2.56 μg之间与昆明小鼠平均死亡时间成线性关系;当河豚鱼样品提取液TTX浓度低于0.45 μg/ml时,腹腔注射1 ml提取液致小鼠平均死亡时间大于4 min,在此范围内与ICR小鼠进行比较,毒素检测结果基本一致。此外对该传统实验方法进行了无需小鼠体重校正、利用平均数计算等项改进。用昆明小鼠定量测试河豚毒素既方便又可靠。

**关键词:**小鼠;河豚毒素;生物学

## A study on quantitative detection of tetrodotoxin with Kunming strain male mice

Zhang Li, Xie Keqin, Zhao Jinshan, Yu Lihua, Xing Jinchuan, Li Peiyun

(Health Anti-epidemic Station of Shandong Provincial, Shandong Jinan 250014, China)

**Abstract:** To establish laboratory methodology for the quantitative detection of tetrodotoxin (TTX), a bioassay was carried out using Kunming strain male mice. The results indicated that the 50% lethal dose (LD<sub>50</sub>) of TTX for Kunming mice was 0.165 μg. A linear relationship between the TTX dose (0.45~2.56 μg) and the mean time of death in Kunming mice was observed. When TTX concentration in globefish extracts was lower than 0.45 μg/ml, the mean time of death of mice was 4~30 minutes. This coincided with the results of TTX detection using ddy mice or ICR mice. The results of the study suggest that the quantitative detection of TTX with Kunming mice is convenient and reliable.

**Key Words:** Mice; Tetrodotoxin; Biology

目前在河豚毒素(TTX)定量检测方面已进行了大量的研究,有生物、理化和免疫化学3方面的多种方法。<sup>[1]</sup>然而最具有权威的方法仍是小鼠生化试验法。与其他检测方法相比,这一方法具有直观性和可靠性,在日本被作为法定方法广泛应用。<sup>[2]</sup>在日本,TTX小鼠测试法使用的实验动物是雄性 ddy 小鼠,台湾学者于20世纪90年代初试用ICR小鼠替代,效果良好。<sup>[3]</sup>中国大陆因为禁食鲜河豚,至今尚未建立TTX小鼠测定方法,鉴于我国目前无 ddy 小鼠,ICR小鼠饲养点极少,本课题选用国内常用的昆明小鼠作为实验动物,进行TTX定量测试的研究,并与 ddy、ICR鼠进行比较。与此同时,我们对国外传统方法中关于进行小鼠体重校正的方法及使用中位数统计的方法,作了进一步探讨,提出了新的见解。

作者简介:张理 女 主任医师

## 1 材料与方法

1.1 材料 雄性昆明小鼠和雄性ICR小鼠,由中国预防医学科学院实验动物繁育中心提供。

TTX标准品 由大连奥森制药厂提供,纯度经(TLC)测定为94.4%(其衍生物毒性极小,忽略不计),测定单位中国科学院大连化学物理研究所。

TTX溶液 用0.1%的醋酸配置与稀释(醋酸为分析纯)。

### 1.2 方法

1.2.1 TTX对昆明小鼠和ICR小鼠半数致死量的测定 将鼠重(20.0±0.5)g的昆明小鼠、ICR小鼠各自随机分为4个组,每组10只,TTX浓度为0.151、0.163、0.175、0.188 μg/ml。给小鼠腹腔注射不同浓度TTX溶液1 ml,记录小鼠死亡数,用Bliss法计算TTX小鼠半数致死量(LD<sub>50</sub>)。用t检验判定两组动物LD<sub>50</sub>差别。

1.2.2 昆明小鼠死亡时间与体重关系分析 用昆明小鼠59只,体重为17~27 g,腹腔注射同一剂量

TTX 溶液 (0.45 μg/ml)。掌握注射时间在 15 s 左右,从注射结束开始计时,至小鼠呼吸停止为止,记录小鼠死亡时间,用相关分析统计小鼠死亡与鼠重的相关关系。另取昆明小鼠 30 只,鼠重为 19~21 g,用如上方法和浓度实验,观察小鼠死亡时间与鼠重的相关关系。

### 1.2.3 不同 TTX 剂量致小鼠平均死亡时间的测定

随机将昆明小鼠、ICR 小鼠分成 12 组,每组 10 只,鼠重为 (20 ± 0.5) g。TTX 浓度为 0.139、0.151、0.163、0.175、0.188、0.200、0.212、0.224、0.45、0.64、1.28、2.56 μg/ml,每鼠腹腔注射 1 ml。记录每组小鼠的平均死亡时间,与所用 TTX 的剂量相对应,绘制剂量 - 平均死亡时间关系曲线。

### 1.2.4 河鲀鱼不同组织 TTX 毒力的检测

于山东青岛、威海两市分别采集养殖、海捕两种资源的 5 种河鲀鱼样品进行检验。取 5 g 样品,参照传统的提毒方法<sup>[4]</sup>制备河鲀鱼组织提取液,测试昆明小鼠平均死亡时间。对于毒力较高的溶液要进行稀释,至能够反映 TTX 剂量与小鼠平均死亡时间两变量关系的最佳浓度。从剂量与平均死亡时间关系曲线查得 TTX 浓度,乘以稀释倍数,除以样品重量 (g),得所测河鲀鱼组织 TTX 毒力 (μg/g)。

国际上习惯用鼠单位 (MU) 表示河鲀鱼毒力,<sup>[2,3]</sup>以 TTX 对实验小鼠的半数致死量为 1 MU 将本实验测得结果用鼠单位表示,<sup>[3]</sup>并与以往文献报道进行比较。

对毒力较强的样品提取液同时作 ICR 小鼠的对照实验,观察其差异性。

## 2 结果

### 2.1 TTX 对昆明小鼠、ICR 小鼠 LD<sub>50</sub> 的测定和比较

用 (20.0 ± 0.5) g 昆明小鼠和 ICR 小鼠测得的 LD<sub>50</sub> 及 95% 的可信限分别为 0.165 μg (0.160 ~ 0.170 μg)、0.159 μg (0.155 ~ 0.163 μg)。见表 1 和表 2。对

表 1 TTX 对昆明小鼠半数致死量的测定 μg

剂量	动物数	死亡数	死亡率 %	LD <sub>50</sub> 及 95% 可信限
0.188	10	10	100	0.165
0.175	10	9	90	(0.160 ~ 0.170)
0.163	10	8	80	
0.151	10	1	10	

表 2 TTX 对 ICR 小鼠半数致死量的测定 μg

剂量	动物数	死亡数	死亡率 %	LD <sub>50</sub> 及 95% 可信区间
0.175	10	10	100	0.159
0.163	10	8	80	(0.155 ~ 0.163)
0.151	10	1	10	

昆明小鼠、ICR 小鼠的 LD<sub>50</sub> 结果进行比较,差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。昆明小鼠和 ICR 小鼠 TTX 半数致死量比较见表 3。

表 3 昆明小鼠和 ICR 小鼠 TTX 半数致死量比较

剂量 μg	平均死亡时间		中位死亡时间	
	昆明鼠 40 只	ICR 鼠 30 只	昆明鼠 40 只	ICR 鼠 30 只
2.560	2.21 ± 0.24	1.49 ± 0.09	2.30	1.50
1.280	3.11 ± 0.36	2.14 ± 0.19	3.07	2.17
0.640	4.41 ± 0.56	3.88 ± 0.36	4.32	3.37
0.450	6.73 ± 0.84	4.48 ± 0.47	6.72	4.58
0.320	—	6.70 ± 0.61	—	6.64
0.224	13.64 ± 1.77	10.92 ± 0.98	13.67	11.08
0.212	15.10 ± 2.34	11.14 ± 0.89	15.57	11.20
0.200	18.36 ± 3.56	12.22 ± 2.10	18.20	12.00
0.188	22.76 ± 3.75	17.04 ± 3.14	22.28	16.43
0.175	23.84 ± 6.13	17.79 ± 3.15	20.22	17.17
0.163	27.47 ± 5.73	20.62 ± 4.61	25.17	19.83
	LD <sub>50</sub> μg	65 ± 0.050	LD <sub>50</sub> μg	0.159 ± 0.031

注:  $P > 0.05$

### 2.2 TTX 致小鼠死亡时间与小鼠体重相关关系

分别用 17~27 g 体重昆明小鼠 59 只,19~21 g 体重昆明小鼠 30 只,腹腔注射 0.45 μg/ml 浓度的 TTX 各 1 ml。17~27 g 体重范围的昆明小鼠,其体重与死亡时间有正相关关系,  $r = 0.5328$ ,  $P < 0.01$ ;而在 19~21 g 范围内,昆明小鼠体重与死亡时间无相关关系,  $r = 0.1651$ ,  $P > 0.05$ 。见表 4。

表 4 昆明小鼠体重与死亡时间的相关关系

体重 g	动物数	回归方程	r	P
17~27	59	$y = 2.2413 + 0.2115x$	0.5328	0.0001
19~21	30	$y = 2.7021 + 0.1982x$	0.1651	0.4515

### 2.3 TTX 剂量与小鼠死亡时间的关系

选用 (20.0 ± 0.5) g 小鼠,每组 10 只进行死亡时间测定,得出每组的平均死亡时间和中位死亡时间,结果显示同组小鼠的平均死亡时间和中位死亡时间差异没有显著性,见表 5。

表 5 不同剂量致昆明小鼠、ICR 小鼠死亡时间对比 min

剂量 μg	平均死亡时间		中位死亡时间	
	昆明小鼠	ICR 小鼠	昆明小鼠	ICR 小鼠
2.560	2.21 ± 0.24	1.49 ± 0.09	2.30	1.50
1.280	3.11 ± 0.36	2.14 ± 0.19	3.07	2.17
0.640	4.41 ± 0.56	3.88 ± 0.36	4.32	3.37
0.450	6.73 ± 0.84	4.48 ± 0.47	6.72	4.58
0.320	—	6.70 ± 0.61	—	6.64
0.224	13.64 ± 1.77	10.92 ± 0.98	13.67	11.08
0.212	15.10 ± 2.34	11.14 ± 0.89	15.57	11.20
0.200	18.36 ± 3.56	12.22 ± 2.10	18.20	12.00
0.188	22.76 ± 3.75	17.04 ± 3.14	22.28	16.43
0.175	23.84 ± 6.13	17.79 ± 3.15	20.22	17.17
0.163	27.47 ± 5.73	20.62 ± 4.61	25.17	19.83

根据昆明小鼠和 ICR 小鼠不同 TTX 剂量所致的不同平均死亡时间作图 (图 1),可以看出,两曲线

趋势相似,低剂量时二者差异小,高剂量(尤其是剂量大于 0.45 μg)时死亡时间有所不同,ICR 小鼠死亡时间早。表明 ICR 小鼠较昆明小鼠敏感。

以不同 TTX 剂量所致昆明小鼠和 ICR 小鼠死亡时间作图(图 2),其曲线形态与图 1 相似。

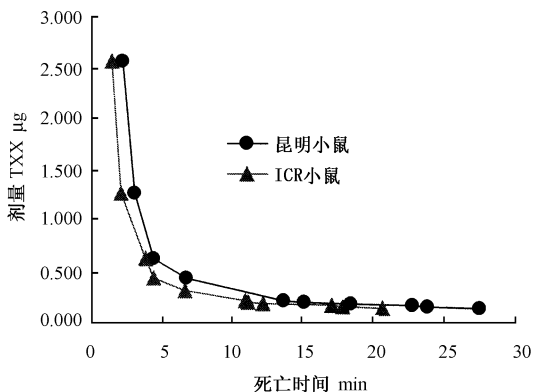


图 1 2 种小鼠平均死亡时间与 TTX 剂量关系的比较

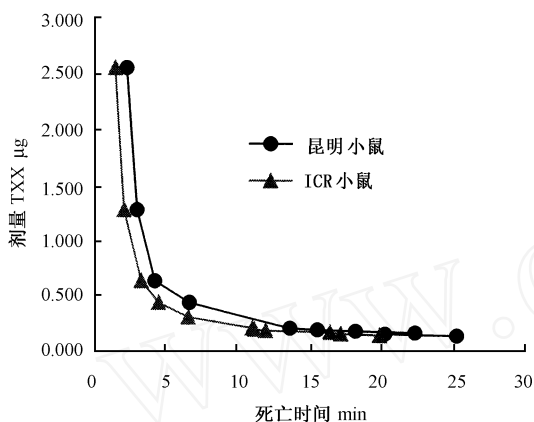


图 2 2 种小鼠中位死亡时间与 TTX 剂量关系的比较

将实验结果用传统的鼠单位(MU)表示,<sup>[2,3]</sup>分别与 ddy 小鼠及 ICR 小鼠比较,结果见表 6 及图 3。

表 6 小鼠死亡时间与鼠单位关系的实验动物比较 MU

致死时间 min	MU		
	昆明小鼠	ddy 小鼠	ICR 小鼠
4	5.03	5.62	4.85
5	3.64	3.77	3.75
6	2.85	2.89	2.90
7	2.30	2.39	2.50
8	2.10	2.08	2.20
9	1.94	1.86	1.95
10	1.52	1.70	1.80
11	1.45	1.58	1.60
30	1.00	1.00	1.00

由表 6、图 3 可见对于昆明小鼠、ddy 小鼠、ICR 小鼠相同致死时间指示 TTX 毒力值(MU)差异较小。

## 2.4 河豚鱼组织 TTX 毒力的测定

2.4.1 用昆明小鼠测定河豚鱼组织 TTX 毒力 选用(20 ± 0.5) g 体重昆明小鼠,每组 5 只,腹腔注射

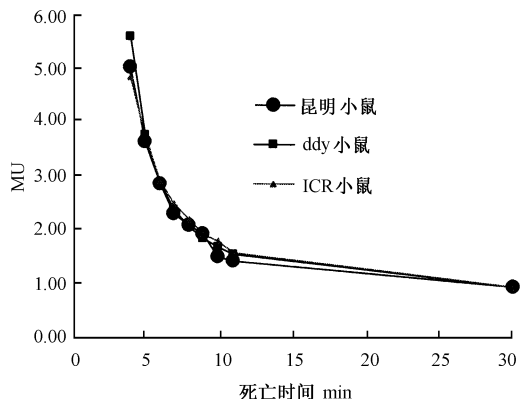


图 3 3 种小鼠死亡时间与样品毒力(MU)关系的比较

待测河豚鱼组织样品提取液(或其稀释液),记录小鼠死亡时间并统计其平均值。通过 TTX 剂量与昆明小鼠平均死亡时间的关系曲线(见图 1)得到相应的 TTX 剂量值,以鼠单位(MU)表示,结果见表 7。

表 7 昆明鼠对河豚鱼样品 TTX 毒力测定结果

组织	鱼种	类别	样品数 份	毒力范围	检样毒力最大值
				MU	毒性表示
肌肉	红鳍东方鲀	养殖	8	<10	无毒
	假睛东方鲀	养殖	7	<10	无毒
	虫纹东方鲀	海捕	3	<10	无毒
皮肤	红鳍东方鲀	养殖	8	<10	无毒
	假睛东方鲀	养殖	7	<10	无毒
	虫纹东方鲀	海捕	3	<10~14	弱毒
肝脏	红鳍东方鲀	养殖	8	<10	无毒
	假睛东方鲀	养殖	7	<10	无毒
	虫纹东方鲀	海捕	12	12~1120	猛毒

2.4.2 用于河豚鱼组织 TTX 毒力测定的实验动物对比 选取 5 份 TTX 阳性的虫纹东方鲀样品提取液,在同样的实验条件下与 ICR 小鼠进行对比,结果见表 8。

表 8 5 份虫纹东方鲀组织样品毒力测定的实验动物对比结果

样品编号	组织	小鼠平均死亡时间 min		动物数	t	P
		昆明小鼠	ICR 小鼠			
1	皮肤	10.55	9.98	6	1.072	>0.05
2	肝脏	3.58	3.05	8	1.705	>0.05
3	肝脏	4.71	4.27	6	2.469	<0.05
4	肝脏	5.02	4.68	8	1.016	>0.05
5	肝脏	8.50	8.44	8	0.038	>0.05

## 3 讨论

3.1 中国昆明小鼠作为实验动物进行 TTX 定量检测的可行性 本实验结果表明,TTX 对昆明小鼠的半数致死量为 0.165 μg,对北京 ICR 小鼠的半数致死量为 0.159 μg。Deng-Fwu Huang 等报道,TTX 对台湾 ICR 小鼠的 LD<sub>50</sub> 为 0.178 μg,对日本 ddy 小鼠的 LD<sub>50</sub> 为 0.220 μg,<sup>[3]</sup>均高于本实验结果,表明昆明小鼠对 TTX 的敏感性稍高于日本 ddy 小鼠及台湾 ICR

小鼠。该结果可能存在异地实验的某些影响因素。我们把昆明小鼠与北京 ICR 小鼠进行了比较,结果北京 ICR 小鼠比昆明小鼠稍敏感一些。

3.2 关于剂量效应曲线 本课题选用(20.0 ±0.5) g 体重的小鼠进行不同剂量 TTX 与小鼠死亡时间的测定,确定了 TTX 校正曲线,依此进行样品测定。由曲线可以看出,TTX 在 0.45 ~ 2.56 μg 剂量范围内与小鼠的平均死亡时间成线性关系,较小的时间差异对应着较大的剂量差异。因此,不宜根据此段曲线进行 TTX 含量测定,图线显示,小鼠平均死亡时间在 5 ~ 8 min 范围是观察 TTX 剂量与小鼠平均死亡时间两变量关系的最佳阶段。这与日本 ddy 小鼠,台湾 ICR 小鼠该实验剂量效应曲线的特点相一致。

3.3 关于对实验小鼠的体重校正问题 本研究选用 17 ~ 27 g 体重的昆明小鼠,在 0.45 μg 剂量下,进行了体重与死亡时间的相关分析。结果发现,17 ~ 27 g 体重范围内的小鼠与死亡时间有非常显著的正相关关系,而 19 ~ 21 g 体重范围的小鼠则无相关关系。因此,日常测定样品时,如选用 19 ~ 21 g 体重范围的小鼠不需要进行校正。这与日本、台湾报道的不同。<sup>[3]</sup>

### 3.4 对实验动物组别死亡时间平均数的指标选择

表 5 结果显示,平均死亡时间与中位死亡时间差异无明显性。因此,我们采用平均死亡时间绘制 TTX 剂量与死亡时间关系的校正曲线,目的是方便计算、更好地显示变量值的变异度、便于对两组资料进行比较。这与传统的用中位死亡时间制作曲线的方法有所不同。<sup>[2,3]</sup>需要说明的是:当样品毒力低时,实验组可能有小鼠存活。TTX 毒力为 1 MU 左右时,可能出现存活鼠低于半数的情况。此时,可用调和均数处理,不影响结果。

3.5 方法验证 将本实验结果用鼠单位方法表示,<sup>[3]</sup>与日本 ddy 小鼠,台湾 ICR 小鼠的实验结果进

行比较,显示结果基本一致,符合情况良好。根据鼠单位的定义,1 MU 系指在 30 min 内杀死 1 只 20 g 体重的雄性 ddy 小鼠的毒素量、给药途径为腹腔注射,<sup>[2,3]</sup>因敏感性的不同,不同实验动物 1 MU 所表示的 TTX 含量不同。如何进行换算,未见明确报道,但见台湾学者以 LD<sub>50</sub> 作为 1 MU,<sup>[3]</sup>日本也是如此应用(学术会交流)。由于昆明小鼠敏感性较强,在筛选可食河鱼时对于一定 TTX 含量的样品,昆明小鼠死亡时间较短。

用本研究方法测定了 63 份河鱼组织样品,昆明小鼠与 ICR 小鼠对河鱼组织 TTX 毒力检测结果基本一致,养殖的红鳍东方等品种不仅肌肉无毒,肝脏一般也不带毒;而虫纹东方肝脏含毒量高,可达猛毒水平。说明我国的昆明小鼠和 ICR 小鼠对 TTX 非常敏感,均可作为筛选可食河鱼生物试验的实验动物,ICR 小鼠虽可应用,但鉴于饲养条件不易普及,当前,在我国使用昆明小鼠更为实际。本实验结果与报道<sup>[4-6]</sup>相一致。由此也验证了本课题研究结果的可行性。

### 参考文献:

- [1] 王健伟. 河豚毒素的定量检测方法进展[J]. 国外医学(卫生学分册),1995,(2): 86—89.
- [2] 厚生省生活卫生局监修. 食品卫生检查指针(理化学编)[Z]. 东京:日本食品卫生协会,1991,296—299.
- [3] Huang D F. Bioassay of tetrodotoxin using ICR mouse strain [J]. J Chin Biochem Soc, 1991, 20(2): 80—86.
- [4] 山口县环境保健部生活卫生课. ふく[M]. 第 5 版. 山口市:瞬报社写真印刷株式会社,平成 6 年,51—55.
- [5] 野口玉雄. フグはなぜ毒をもつのか海洋生物の不思議[M]. 东京:日本发送出版协会,1998,36—40.
- [6] 斋藤俊郎. 日本水产会志(日本)[Z]. 1984,50: 1573—1575.

[收稿日期:2004 - 08 - 08]

中图分类号:R15;S965.225 文献标识码:A 文章编号:1004 - 8456(2004)03 - 0497 - 04

SALATRIM(short and long acyl triglyceride molecule):是一类结构重组三甘油酯的通称。这类独特的三甘油酯分子中至少包含一个低热量短链脂肪酸(SCFA)和一个不被吸收的长链脂肪酸(LCFA)。SALATRIM 具有与普通食用油脂相似的物化性质,可以以任何比例代替普通油脂,用于低含水或高脂肪体系食品中,以满足不同的需要。SALATRIM 的热值低(20.9 kJ/g)、安全性好(1994 年获美国 FDA 安全性审查,批准为 GRAS 食品)、高氧化稳定性(AOM 值达 300 hr 以上)、口感和物理性质与天然油脂相类似,具有非常好的应用前景。