

论著

应用 C57BL/6 小鼠进行丙烯酰胺的感觉和运动行为毒性的研究

马宁 支媛 冯永全 徐海滨

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:目的 用丙烯酰胺造成 C57BL/6 小鼠的感觉和运动行为损伤,应用 OECD 推荐的感觉和运动行为测试方法测试,以获得稳定而敏感的感觉 - 运动行为测试组合。方法 选用雄性 C57BL/6 小鼠分别以 5、10、20、30 mg/kg BW 剂量的丙烯酰胺灌胃,对照组给予蒸馏水,每周 5 次,连续 3 周,每周测量小鼠体重、热觉传导、转棒、抓力、后肢撑力等指标。结果 染毒后小鼠体重与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$),热觉传导加快 (10 mg/kg BW 剂量组在染毒 2 周后小鼠舔后足潜伏时间缩短了 26%,5 mg/kg BW 剂量组在染毒 3 周后潜伏时间缩短 28%)。在转棒上停留的时间缩短 (30 mg/kg BW 剂量组小鼠染毒 2 周后在转棒上的停留时间缩短了 19%,染毒 3 周后缩短了 42%),抓力下降 (20、30 mg/kg BW 两个剂量组在染毒 3 周后抓力分别降低了 19% 和 29%),后肢展开距离明显加宽 (10、20、30 mg/kg BW 小鼠后肢展开距离均加宽),与对照组相比,均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 C57BL/6 小鼠适合于感觉 - 运动行为毒性的研究,应用热板试验、转棒试验、抓力试验、后肢支撑力试验组合可以初步筛查感觉 - 运动神经损伤毒物。

关键词:丙烯酰胺;神经行为学表现;功能;感觉;运动;毒性试验

Study on Toxicity of Sensory and Motor Behavior on C57BL/6 Mice with Acrylamide

MA Ning, ZHI Yuan, FENG Yong-quan, XU Hai-bin

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To cause dysfunction of sensory and motor behavior of C56BL/6 mice with acrylamide and to use the method of sensory and motor test that was recommended by Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) to test in order to obtain a stable and sensitive test combination of sensory-motor function. **Method** Seventy five C57BL/6 male mice were randomly divided into 5 groups with 15 mice in each group. The mice in different treatment groups received distilled water (control group), 5, 10, 20 and 30 mg/kg BW of acrylamide for 3 weeks (5 days per week) by gavage. Neurobehavioral indexes including body weight, hotplate, rotarod, grip strength, hind limb landing foot splay were determined every week. **Results** The body weights of mice treated with acrylamide were not statistically different from that in the control group ($P > 0.05$). The conduction of sensory nerve to heat increased (The latency time of licking hindfeet of mice in 10 mg/kg BW dose group after 2 weeks decreased 26%, and the latency time in 5 mg/kg BW dose group after 3 weeks decreased 28%). The time staying on the rotating cylinder decreased (After 2 weeks, the time in 30 mg/kg BW dose group decreased 19%, and after 3 weeks decreased 42%). The grip strength decreased (After 3 weeks, the grip strength in 20 and 30 mg/kg BW dose group decreased 19% and 29%, respectively). The hind limb landing foot splay increased (The hind limb landing foot splay in 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg BW dose group all increased). Those indexes in each treatment group were statistically different from that in the control group ($P < 0.05$). In comparison with the previous literature, C57BL/6 mice on the toxicity of sensory and motor behavior were more sensitive. **Conclusion** C57BL/6 mice could be suitable to study toxicity of sensory and motor function. The tests of hotplate, rotarod, grip strength, measurements of hind limb landing foot splay could be screen the toxicants of sensory and motor nerve dysfunction.

Key word: Acrylamide; Neurobehavioral Manifestations; Function; Sensation; Motor; Toxicity Tests

神经行为试验是反映中枢及外周神经系统早期损害比较敏感的试验,且操作简便、对受试者无创伤

性损害,可反复多次测定,故在环境毒物和食品污染物的筛查中广泛应用。丙烯酰胺 (Acrylamide ACR),是近年来国际上比较关注的一种食品中化学物质,它可引起感觉 - 运动型周围神经病^[1],中毒症状为四肢疼痛及麻木、肌肉无力、深反射减弱或消失及小脑性共济失调等。1995 年经济合作与发展组

课题来源:“十一五”国家科技支撑计划(2006BAK02A07)

作者简介:马宁 男 实习研究员

通讯作者:徐海滨 男 研究员



织 (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) 制定了动物神经毒性测试规范^[2], 推荐将感觉、运动、认知等试验综合起来评价被测化学物质的神经行为毒性。WHO 推荐了人神经行为毒性测试试验组合。动物神经行为测试还没有一套推荐标准, 只是 OECD 在感觉、运动、认知等方面推荐了一些测试方法。动物的选择对神经行为学试验非常重要, Deacon R M J 研究^[3]表明 C57BL/6 小鼠更适合行为学的研究。以往丙烯酰胺毒性的研究都采用腹腔注射的方式对啮齿类动物进行染毒, 这与丙烯酰胺作为食品污染物的暴露途径不符, 本文用丙烯酰胺经口亚急性染毒雄性 C57BL/6 小鼠, 观察小鼠中毒后的感觉-运动神经行为功能的改变。通过相关的指标检测, 以期获得稳定而敏感的行为测试组合。

1 材料与与方法

1.1 材料

丙烯酰胺由北京利科生化科贸有限公司提供, 纯度为 99.9%。

选用军事医学科学院实验动物中心 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 75 只, 18~22 g。试验期在中国医学科学院实验动物研究所动物房饲养, 室温 (22 ± 2), 湿度 50% ± 10%。

YLS-6B 型智能热板仪、YLS-4C 型转棒式疲劳仪、YLS-13A 型大小鼠抓力测定仪, 均购自山东省医学科学院设备站。

1.2 方法

体重为 18~22 g 的 C57BL/6 雄性小鼠适应性饲养 7 d 后, 以热板试验小鼠添后足的潜伏时间随机分组, 设一个对照组和 4 个剂量组, 每组 15 只。将丙烯酰胺溶解于蒸馏水中, 按 20 ml/kg BW 给予小鼠受试物。丙烯酰胺染毒剂量分别为 5、10、20 和 30 mg/kg BW, 每周 5 次, 连续 3 周, 对照组灌胃给予蒸馏水, 自由饮食。每周测量 1 次体重和各项神经行为指标。每天观察动物一般中毒表现, 主要是毛发、四肢、呼吸、尾部的位置等状态, 以及动物的活动、姿势、步态等日常行为状况。

1.3 行为学测试指标

伤害性知觉测试 将小鼠放在 YLS-6B 型智

能热板仪的恒温电热板 (55 ± 0.1) 上, 以小鼠舔后爪动作出现为终点, 记录时间。平衡能力测试 YLS-4C 型转棒式疲劳仪的转棒直径为 30 mm, 按 20 r/min 转动, 规定时间 300 s, 记录其落地时间, 若 300 s 仍未落地者记录为 300 s。抓力测试 用 YLS-13A 型大小鼠抓力测定仪来测定, 记录动物的最大抓力。运动神经能力测试 选用后肢撑力试验, 使小鼠从距地面 15 cm 处自由落下, 准确测量着地时其后肢爪尖滑开的最远距离。以上所有试验测试 3 次, 每次间隔 30 min, 取平均值。

1.4 统计分析

所有数据采用 SPSS11.0 进行 ANOVA 分析, 检验水准为 0.05。

2 结果与讨论

2.1 中毒症状及体征的观察 在整个试验过程中, 给予各剂量丙烯酰胺的动物无死亡, 体重与对照组相比差异无统计学意义。临床观察未发现各剂量组动物出现躁动、激惹、步态摇摆不稳等中毒症状。

2.2 行为学测试

因神经行为指标的复杂性和敏感性, 对试验进行质量控制尤为重要, 在首次给予小鼠蒸馏水和丙烯酰胺前, 测试所有组别动物的各项行为学指标的基线值, 与对照组比较, 各组间差异无统计学意义。表明各项行为指标在染毒测试前条件均衡, 试验中获得的测量结果可信。见表 2。

2.2.1 伤害性知觉改变 热板试验显示, 小鼠在不同的累积剂量下热觉变化有所不同, 10 mg/kg BW 剂量组在染毒 2 周后, 累积剂量 (cumulative dose, CD) 达到 100 mg/kg BW 时, 小鼠舔后爪潜伏时间与对照组相比时间缩短了 26% ($P < 0.05$), 在染毒 3 周后 (CD = 150 mg/kg BW) 与对照组相比, 小鼠舔后爪潜伏时间差异消失。5 mg/kg BW 剂量组小鼠从染毒 2 周后舔后爪潜伏时间开始缩短, 在染毒 3 周后 (CD = 75 mg/kg BW) 舔后爪时间缩短了 28% ($P < 0.05$)。而 20 mg/kg BW 和 30 mg/kg BW 剂量组小鼠舔后爪潜伏时间呈增加趋势, 但与对照组相比差异无统计学意义。这一结果与李闪霞等报道^[4]的大鼠在不同的染毒剂量下热觉变化不同这一结论相似。本实验中出现热传导增快的累计剂量为 75 mg/kg BW, 比李闪霞

表 1 丙烯酰胺对小鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

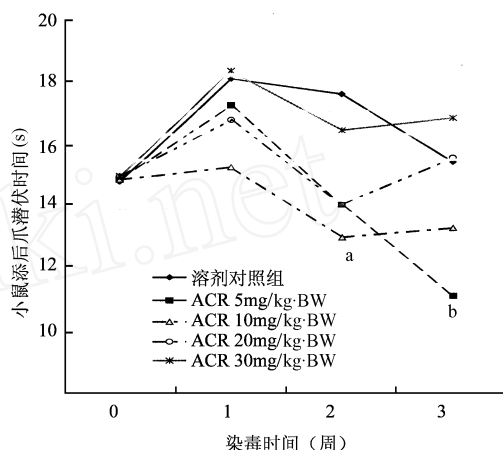
组别	第 0 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周
0 mg/kg BW	21.70 ± 1.22	22.33 ± 1.34	23.19 ± 1.44	24.27 ± 1.70
5 mg/kg BW	22.17 ± 1.32	22.78 ± 1.51	23.39 ± 1.58	24.08 ± 1.88
10 mg/kg BW	22.25 ± 1.03	22.95 ± 1.07	23.53 ± 1.21	24.13 ± 1.03
20 mg/kg BW	22.39 ± 0.85	23.11 ± 0.98	23.74 ± 1.14	24.69 ± 1.45
30 mg/kg BW	22.07 ± 1.03	23.11 ± 1.02	23.75 ± 1.02	24.53 ± 1.06

表2 各实验组行为学指标基线值($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	热板测验 (舔后爪潜伏时间, s)	转棒试验 (转棒上停留时间, s)	抓力试验 (前肢抓力, g)	支撑力 (后肢展开距离, cm)
0 mg/kg BW	14.80 ± 0.07	207.60 ± 103.31	162.89 ± 20.59	3.65 ± 0.18
5 mg/kg BW	14.86 ± 0.15	174.36 ± 85.52	152.85 ± 16.75	3.60 ± 0.23
10 mg/kg BW	14.86 ± 0.12	189.93 ± 68.93	156.04 ± 18.43	3.65 ± 0.17
20 mg/kg BW	14.96 ± 0.17	221.47 ± 66.36	152.97 ± 23.19	3.69 ± 0.20
30 mg/kg BW	14.98 ± 0.10	205.27 ± 78.46	152.25 ± 13.00	3.65 ± 0.21

等报道的累计剂量在300 mg/kg BW时出现增快要低, 这一结果提示 C57BL/6 小鼠对伤害性刺激更敏感, 更适合此类神经行为的指标的检测。见图 1。

2.2.2 平衡能力改变 转棒试验作为一个灵敏性平衡运动功能测试, 可说明椎体外系、小脑及周围运动神经是否受到损伤, 30 mg/kg BW剂量组小鼠于染毒2周后(CD = 300 mg/kg BW)在转棒上的停留时间低于对照组, 停留时间缩短了 19% ($P < 0.05$), 在染毒3周后(CD = 450 mg/kg BW)二者的差异更加明显, 在转棒上的停留时间比对照组小鼠缩短了 42% ($P < 0.01$), 结果见表 3。这与 Kesson C M 等报道^[5]的丙烯酰胺亚急性中毒, 临床患者可表现为小脑功能障碍, 椎体外系、中脑及脊髓的损害一致。见表 3。



a 与对照组相比, $P < 0.05$, b 与对照组相比, $P < 0.01$
图 1 丙烯酰胺对小鼠舔后爪潜伏时间的影响

表3 丙烯酰胺对小鼠在转棒上停留时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	第0周	第1周	第2周	第3周
0 mg/kg BW	207.60 ± 103.31	255.67 ± 67.90	291.87 ± 21.49	290.80 ± 35.63
5 mg/kg BW	174.36 ± 85.52	246.53 ± 87.65	274.67 ± 40.78	281.87 ± 29.18
10 mg/kg BW	189.93 ± 68.93	265.00 ± 53.62	272.07 ± 38.89	280.07 ± 28.87
20 mg/kg BW	221.47 ± 66.36	274.20 ± 45.86	251.80 ± 67.09	242.93 ± 79.65
30 mg/kg BW	205.27 ± 78.46	258.27 ± 52.87	235.13 ± 65.28 ^a	167.53 ± 80.90 ^b

注:与对照组相比, a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$

2.2.3 抓力改变 试验第一、二周丙烯酰胺各剂量组与对照组相比抓力均无明显改变, 但各剂量组均有下降趋势。20、30 mg/kg BW剂量组染毒3周后(累计剂量分别为 300、450 mg/kg BW)抓力出现明显下降, 与对照组相比各降低了 19% ($P < 0.05$) 和 29%

($P < 0.01$), 同期染毒组动物的体重与对照组相比差异无统计学意义, 排除了动物体重对抓力的影响, 这说明丙烯酰胺导致了肌力下降, 与文献报道基本一致^[6], 见表 4。

表4 丙烯酰胺对小鼠抓力的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

剂量组	第0周	第1周	第2周	第3周
0 mg/kg BW	162.89 ± 20.59	161.11 ± 24.16	179.93 ± 31.50	170.71 ± 38.03
5 mg/kg BW	152.85 ± 16.75	150.95 ± 30.16	159.61 ± 27.57	149.61 ± 25.49
10 mg/kg BW	156.04 ± 18.43	147.26 ± 22.65	166.67 ± 38.21	151.65 ± 28.86
20 mg/kg BW	152.97 ± 23.19	140.65 ± 23.20	160.59 ± 28.73	138.33 ± 23.73 ^a
30 mg/kg BW	152.25 ± 13.00	144.37 ± 37.19	160.46 ± 21.61	121.33 ± 26.52 ^b

注:与对照组相比, a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$

2.2.4 运动神经能力改变 丙烯酰胺具有高度蓄积性, 染毒小鼠坐骨神经末端的蓄积量高于其他部位^[1], 故后肢无力是主要的中毒体征, 本研究后肢支撑力试验结果显示, 30 mg/kg BW丙烯酰胺剂量组在染毒第一周后(CD = 150 mg/kg BW)后肢展开距离明显大于对照组 ($P < 0.05$)。染毒第二周后, 20、

30 mg/kg BW两个剂量组(累计剂量分别为 200 和 300 mg/kg BW)与对照组相比后肢展开距离明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。随着染毒时间的延长, 较低的10 mg/kg BW剂量组后肢展开距离增加, 与对照组比较差异也出现统计学意义 ($P < 0.05$), 证实了丙烯酰胺的蓄积毒性, 但本次研究小

论著

《中华人民共和国食品安全法(草案)》存在问题分析

陈卫东¹ 李旭才²

(1. 广东省卫生监督所, 广东 广州 510300; 2. 中山市卫生监督所, 广东 中山 528403)

摘要:从内容、主体、从业人员培训教育、保健食品与食品添加剂监管等六个方面分析《食品安全法(草案)》存在的问题。提出以预防控制食源性疾病为立法宗旨;明确执法主体,体现权责统一;着重宏观管理原则,明确区分法律责任;明确食品安全标准范畴和制定原则;调整规范相关内容;强化食品生产经营者的社会责任,明确政府经费保障责任等建议。

关键词:立法,食品,组织和管理;责任,法律;参考标准;规范;安全

鼠出现后肢支撑力损伤的累计剂量(CD 150 ~ 450 mg/kg BW),要低于文献[4]报道的累计剂量,说明了C57BL/6小鼠对行为毒性的敏感性。结果见图2。

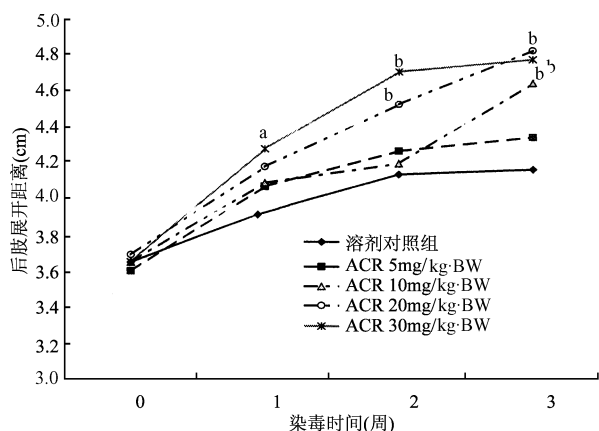


图2 丙烯酰胺对小鼠后肢展开距离的影响

研究发现,丙烯酰胺的累计剂量在75、150和300 mg/kg BW时分别出现了热觉神经的损伤、后肢支撑能力的改变、平衡能力和抓力的改变,因此丙烯酰胺对感觉神经的损伤要先于其它运动神经,与已有文献[4,6]报道一致,但动物染毒后在不同累积剂量下热觉神经损伤表现不一致的原因一直未能解释。本次研究发现,10 mg/kg BW剂量组在染毒2周后(CD = 100 mg/kg BW)与对照组相比小鼠舔后爪潜伏时间缩短;在染毒3周后(CD = 150 mg/kg BW)与对照组相比小鼠舔后爪潜伏时间差异消失,但在该累计剂量下出现了后肢展开距离增加,另外在染毒3

周后20和30 mg/kg BW剂量组均出现小鼠后肢展开距离增加,未出现小鼠舔后爪潜伏时间的缩短;5 mg/kg BW剂量组未出现后肢展开距离增加,但出现舔后爪潜伏时间的缩短。这一结果提示这两个指标间存在着某种关系,这可能是由于热觉测试终点是由运动行为来体现的,而丙烯酰胺对运动功能的影响,可能造成对热觉测试的干扰,导致热觉传导在不同剂量及累积剂量下表现不一致,因此在评价毒物对感觉行为的影响时,要注意结合毒物对运动功能的影响。

参考文献

- [1] 郝秋月,韩漫夫,饶明利. 丙烧酰胺中毒后小鼠周围神经逆行性坏死的实验病理研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2001, 19: 436-38.
- [2] OECD. Series on testing and assessment No. 20 guidance document for neurotoxicity testing. OECD Environment, Health and Safety Publications, 2004, 11.
- [3] DEACON R M J, THOMASA C L, RAWLINS J N P, et al. A comparison of the behavior of C57BL/6 and C57BL/10 mice [J]. Behavioural Brain Research, 2007, 179: 239-247.
- [4] 李闪霞,崔宁,谢勤,等. 大鼠亚慢性丙烯酰胺中毒神经行为功能的改变[J]. 中国公共卫生杂志, 2004, 12: 1458-1459.
- [5] KESSON C M, BAIRD A W, LAWSON D H. Acrylamide poisoning [J]. Postgrad Med, 1977, 53: 16-17.
- [6] BING LING, NICOLAS AUTHIER, DAVID BALAYSSAC, et al. Assessment of nociception in acrylamide induced neuropathy in rats [J]. Pain, 2005, 119: 104-112.

[收稿日期: 2008-12-05]

中图分类号: R15; Q189; Q99-33; R99

文献标识码: A

文章编号: 1004-8456(2009)02-0120-04

作者简介: 陈卫东 男 主任医师