

三聚氰胺等物质给予幼年恒河猴的毒性试验

高虹, 何君, 贺晓玉, 马耀文, 孙井江, 李洋, 高洁, 秦川

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 观察三聚氰胺及其同系物给予动物后, 导致肾脏损伤、形成结石的过程, 及肾脏损伤的恢复过程。**方法** 选择 6 月龄恒河猴 6 只, 雌雄各半, 随机分为 3 组, 2 只/组, 分别为 T1 (140 mg/kg 三聚氰胺和 14 mg/kg 三聚氰酸), T2 (140 mg/kg 三聚氰胺和 50mg/kg 腺嘌呤) 和 T3 组 (140mg/kg 三聚氰胺)。连续 70 d 口服受试物, 观察动物的一般状态, 分别于不同时间点进行血液学、血生化、尿常规和肾脏 B 超的检测; 并连续观察 18 个月, 观察动物的生长发育情况。**结果** 1. 各剂量组动物在给予受试物 8 周后所有动物肾脏中均出现多个结石; 停止给予受试物后, 所有动物结石数量和大小均呈下降趋势, 至停止给予受试物 16 个月后, 全部动物肾脏均未检测出结石。2. 各剂量组, 血清中 β_2 微球蛋白 (β_2 -MG) 和尿酸 (UA) 等指标随着给药时间的延长而有所增高, 但在正常范围内。在动物的恢复期, 此两项指标的数值明显下降。**结论** 1. 单纯三聚氰胺 (相当于人体使用量 48 mg/kg·w·d) 不能造成恒河猴肾脏功能的明显损害, 可形成肾结石。2. 在三聚氰酸或腺嘌呤存在的情况下, 三聚氰胺可以造成恒河猴肾功能指标 β_2 -MG 和 UA 在正常范围内升高, 并可在肾脏形成结石;。3. 经过 16 个月的恢复所有动物结石无法检出, 其中三聚氰胺组动物恢复最快。

【关键词】 三聚氰胺; 三聚氰酸; 腺嘌呤; 恒河猴; 肾结石

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2012) 06-0001-05

doi: 10. 3969/j. issn. 1671. 7856. 2012. 06. 001

Chronic Toxicity Study of Melamine and Cyanuric Acid on Juvenile Rhesus Monkeys

GAO Hong, HE Jun, HE Xiao-yu, MA Yao-wen, SUN Jing-jiang, LI Yang, GAO Jie, QIN Chuan
(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To observe the symptoms of juvenile Rhesus monkey taking orally melamine and melamine analog. Symptoms including: kidney damage, kidney stone, process of kidney damage reversibility. **Methods** 6month old rhesus monkeys were chosen, half male and half female, randomly divided into 3 groups, each group has 2 monkeys. group T1 (melamine, 140 mg/kg; cyanuric acid, 14 mg/kg), group T2 (melamine, 140 mg/kg; adenine, 50 mg/kg), and group T3 (melamine, 140 mg/kg). Each group was given its own dose for 10 weeks. Then the animal's daily condition was observed, and their CBC, blood chemistry, urine routine and B scan were tested at different time point. The animals were kept for 18 months; their growth and development condition were observed. **Results** 1. At each group, lots of stones was found on the kidney after administering drug for 8 weeks. After stopping administration, all stones became smaller and less, and no stone could be tested till stopping test articles for 16 months. 2. At each group, β_2 -MG and UA in blood serum was

[作者简介] 高虹, 女, 副研究员, 研究方向: 药物临床前评价。E-mail: gaohongdws@yahoo.com.cn。

[通讯作者] 秦川, 教授, 博士生导师。

increased after administration, but all of them fluctuated in normal limit; and in reversibility, β 2-MG and UA were lower than before. **Conclusions** 1. melamine (48mg/kg. w. d as in human body) could not cause Rhesus monkey kidney damage ,but can cause kidney stone. 2. When cyanuric acid and adenine existed, melamine could increased β 2-MG and UA in normal range and also could cause kidney stone. 3. The stone of all animals couldn't be detected for 16 months, the animals of oral melamine recovered faster.

【Key words】 Melamine; Cyanuric acid; Rhesus monkey; Kidney stone

近期内,我国发生了婴幼儿乳品中含有三聚氰胺致数千名婴幼儿罹患肾结石的事件,随着事件的进一步调查,成人饮用奶制品中也发现了不同程度的三聚氰胺污染现象。该事件产生了很大的社会影响,引起了政府的高度重视。明确三聚氰胺对人体的毒性及中毒人群的治疗原则是该事件处理的当务之急。社会各界普遍关注的是三聚氰胺污染的奶粉是否会导致患病人群近期肾功能的损伤,有无远期慢性肾病的发生,但目前还没有证据来客观地回答。这些需要通过动物实验产生的科学数据和指标来分析该疾病的近期和远期身体危害,以及科学评价治疗效果及预后。

三聚氰胺(melamine)是一种三嗪类含氮杂环有机化合物,在一般情况下较稳定,但在高温下可能会分解放出氰化物。1994 年国际化学品安全规划署和欧洲联盟委员会合编的《国际化学品安全手册》第三卷和国际化学品安全卡片^[1]也只说明:长期或反复大量摄入三聚氰胺可能对肾脏、膀胱产生影响,产生结石。目前已有研究资料表明动物长期摄入三聚氰胺会造成生殖、泌尿系统的损害,膀胱、肾部结石,并可进一步诱发膀胱癌。但是,三聚氰胺不同摄入剂量和摄入时间的长短对人体危害的程度,以及人体中毒后的治疗仍需要进一步的基础研究。

1 材料与方法

1.1 动物来源和饲养环境

健康恒河猴 6 只,6 月龄,普通级[SCXK(京)-2005-0005],雌雄各半。购自北京协尔鑫生物资源研究所,动物饲喂普通级猴饲料[SCXK-(军)2002-018],饲养在普通级非啮齿类动物设施中[SYXK(京)2005-0042]。

1.2 主要试剂

三聚氰胺(melamine),分析纯(批号 20090106),国药集团化学试剂有限公司生产;三聚氰酸(cyanuric acid),化学纯(批号 20090422),国药集团化学试剂有限公司生产;腺嘌呤(adenine),北

京化学试剂公司生产(批号 20090107)。羧甲基纤维素钠,化学纯(批号 05-08-03),广东汕头市西陇化工厂生产。

1.3 主要仪器

全自动血细胞计数仪(5 diff),美国贝克曼公司生产;全自动生化分析仪(7020 型),日本日立公司生产;电解质分析仪(9180),美国罗氏公司生产;全自动尿液分析仪(Miditron M),美国罗氏公司生产;B 超仪(VEVO770),加拿大 VISUAL SONICS 公司生产。

1.4 动物分组

动物随机分成 T1、T2 和 T3 组,剂量组分别给予三聚氰胺、三聚氰酸和腺嘌呤。动物口服剂量见表 1。口服灌胃,10 mL/kg 体重/次,一日一次,共 70 日。

表 1 动物口服剂量表(mg/kg)

Tab.1 Dose of animals(mg/kg)

组别 Group	数量 Number	三聚氰胺 Melamine	三聚氰酸 Cyanuric acid	腺嘌呤 Adenine
T1	2	140	14	
T2	2	140		50
T3	2	140		

1.5 检测频率

1.5.1 尿液和血液检测:分别在试验前,给予受试物后 4 周、6 周、8 周、10 周、恢复期 2 周、恢复期 6 周、恢复期 8 个月、恢复期 13 个月和恢复期 16 个月。

1.5.2 肾脏 B 超检查:分别在试验前、给予受试物后 8 周、恢复期 1 个月、恢复期 10 个月、恢复期 16 个月。

1.6 观察指标

1.6.1 一般症状观察:每天观察一次,观察指标包括动物外观和行为(包括动物的皮肤毛发,眼和粘膜的变化,呼吸,中枢神经系统,四肢活动及其他表现)、分泌物和排泄物等。

1.6.2 血液学指标:包括红细胞计数(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)、平均红细胞体积

(MCV)、平均红细胞血红蛋白(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、白细胞计数(WBC)及其分类,血小板计数(PLT)等。

1.6.3 血液生化指标:包括丙氨酸转氨酶(ALT),天门冬氨酸转氨酶(AST),总蛋白(TP),白蛋白(Alb),碱性磷酸酶(ALP),尿酸(UA),尿素氮(BUN),肌酐(CR),钠离子浓度(Na^+), β_2 -微球蛋白($\beta_2\text{-MG}$),钾离子浓度(K^+)和氯离子浓度(Cl^+)。

1.6.4 尿液指标:包括尿常规 10 项测定。

1.6.5 肾脏 B 超检测:检查动物肾脏有无积水及结石。

2 结果

2.1 一般症状

各剂量组动物的生长发育正常,体重平稳增长,没有死亡。

2.2 血常规指标

各剂量组与对照组比较个别指标有所增高,但均在正常范围内,没有临床意义。

2.3 血生化指标

各剂量组,血清中 $\beta_2\text{-MG}$ 和 UA 等指标在正常范围内随着给药时间的延长而有所增高,明显高于本中心的历史数据。其中 T1 组处于正常指标的上限。在动物恢复期,此两项指标的数值明显下降。结果见表 2,表 3。肾脏的其它指标 BUN、CR 均在正常范围内波动。以上结果提示动物在给予受试物期肾脏有轻微损伤,在恢复期时有所恢复。

2.4 尿液指标

各剂量组动物尿常规检测没有显著异常。

2.5 肾脏 B 超检查

各剂量组动物在给予受试物前,均未观察到肾脏结石。在给予受试物 56 d 后所有动物左右侧肾脏中均出现多个结石,大小介于 0.9 ~ 1.7 mm;停止给予受试物 10 个月后,所有动物结石数量和大小均呈下降趋势,其中单纯三聚氰胺组动物右侧肾脏未检出结石;停止给予受试物 16 个月后,全部动物肾脏均未检测出结石。具体数据见表 4。提示动物在给予受试物期各剂量组肾脏均可以形成结石,在恢复期随着时间的延长,结石可以自行消除,其中单纯三聚氰胺组动物恢复较快。

表 2 各组动物给药期和恢复期血清 $\beta_2\text{-MG}$ 的改变 (mg/L)
Tab. 2 Change of $\beta_2\text{-MG}$ of animals during period of contact test article and reversibility (mg/L)

组别 Group	性别 Sex	实验前 Pre-experiment	给药期 Period of contact test article					恢复期 Reversibility				
			2 周 2 wks	4 周 4 wks	6 周 6 wks	8 周 8 wks	10 周 10 wks	1 月 1 mo	2 月 2 mos	8 月 8 mos	13 月 13 mos	16 月 16 mos
T1	♀	1.97	2.82	1.8	1.56	2.03	2.78	1.56	1.20	1.32	1.06	1.24
	♂	1.34	1.56	1.82	1.98	2.21	2.13	1.40	1.29	1.03	0.94	1.15
T2	♀	1.81	1.51	2.23	1.85	2.05	1.71	1.70	1.28	0.98	0.99	1.11
	♂	1.43	1.63	1.42	1.79	1.81	1.49	1.66	1.23	0.76	0.87	0.85
T3	♀	1.05	0.82	0.98	1.80	0.70	0.85	1.01	0.59	0.75	0.68	0.80
	♂	2.14	1.97	1.65	1.84	1.20	1.13	1.21	1.03	1.00	1.04	1.01

表 3 各组动物给药期和恢复期血清 UA 的改变 ($\mu\text{mol/L}$)
Tab. 3 Change of UA of animals during period of contact test article and reversibility ($\mu\text{mol/L}$)

组别 Group	性别 Sex	实验前 Pre-experiment	接触受试物期 Period of contact test article					恢复期 Reversibility				
			2 周 2 wks	4 周 4 wks	6 周 6 wks	8 周 8 wks	10 周 10 wks	1 月 1 mo	2 月 2 mos	8 月 8 mos	13 月 13 mos	16 月 16 mos
T1	♀	16	28	24	14	14	33	3	3	0	2	9
	♂	14	26	26	16	14	13	2	7	4	4	11
T2	♀	14	28	25	13	15	28	6	3	2	3	16
	♂	13	26	21	14	11	6	4	4	3	1	5
T3	♀	17	16	9	6	4	3	1	3	1	2	16
	♂	15	6	77	4	5	16	5	3	3	2	7

表 4 各组动物给药期和恢复期肾脏 B 超检测结果

Tab. 4 Result of kidney B-mode ultrasonography of animals during period of contact test article and reversibility

组别 Group	性别 Sex	部位 Position	8 周 8 weeks	恢复期 Reversibility		
				1 月 1 mo	10 月 10 mos	16 月 16mos
T1	♀	左	3 块结石, 1.1 – 1.4 mm	2 块结石, 1.1 mm 和 1.3 mm	1 块结石, 0.9 mm	–
		右	3 块结石, 1.1 – 1.4 mm	2 块结石, 1.0 mm, 1.3 mm	1 块结石, 0.8 mm	–
	♂	左	1 块结石, 1.1 mm。	2 块结石, 1.3 mm, 1.4 mm	1 块结石, 0.8 mm	–
		右	–	2 块结石, 1.1 mm, 1.2mm	1 块结石, 0.7 mm	–
T2	♀	左	1 块结石, 2.3 mm	2 块结石, 0.9 mm, 1.1 mm	1 块结石, 1.5 mm	–
		右	4 块结石, 0.9 – 1.4 mm	1 块结石, 0.9 mm	1 块结石, 1.3 mm	–
	♂	左	3 块结石 0.9 – 1.4 mm	3 块结石, 1.1 – 1.6 mm	1 块结石, 0.7 mm	–
		右	4 块结石, 0.5 – 1.4 mm	1 块, 1.5 mm	1 块结石, 1.3 mm	–
T3	♀	左	3 块结石, 0.9 – 1.4 mm	2 块结石, 1.7 mm	1 块结石, 1 mm	–
		右	3 块结石, 0.9 – 1.4 mm	–	–	–
	♂	左	1 块结石, 1.0 mm	1 块结石, 1.1 mm	1 块结石, 0.6 mm	–
		右	1 块结石, 1.0 mm	3 块结石, 0.8 – 1.1 mm	–	–

注: – 为未见结石
Note: no stone was seen

3 讨论

据报道三聚氰酸与三聚氰胺结构比较类似,并且二者在化工生产过程中常常同时存在。如果在奶粉生产过程中直接加入化工原料的三聚氰胺,有可能也同时掺入了混在三聚氰胺当中的三聚氰酸;对三鹿奶粉患儿结石的分析中,主要成份为三聚氰胺和尿酸,考虑体内高尿酸环境是否会促进结石的形成,本试验 T2 组模拟了人类体内的高嘌呤环境。基于以上的考虑,本研究设立三聚氰胺和三聚氰酸组,三聚氰胺和腺嘌呤组及三聚氰胺组。

根据大鼠长期毒性试验结果,300 mg/kg·w·d 的三聚氰胺,连续 56 d 给予动物,对动物的生长发育、肝肾功能没有明显损害,在肾脏中不能形成结石。大鼠三聚氰胺的给予剂量,换算到猴为 140 mg/kg·w·d,相当于人体使用量 48 mg/kg·w·d。在本研究的剂量设置下,动物生长发育正常,肾功能指标在正常范围内波动,提示本研究较好地模拟了患儿三聚氰胺引起肾结石的过程,与临床大部分出现结石的患儿没有血液学和尿液指标异常的情况类似,恒河猴的实验结果,可以为患儿的预后提供参考。

本研究所进行的肾脏指标检测,包括了血清尿素氮(BUN)、血清肌酐(CR)、血清尿酸(UA)和血清 $\beta 2$ 微球蛋白($\beta 2$ -MG)。指标选择时考虑到在肾功能减退时,一般伴有血清 UA 增高,当食用富含嘌呤的食物可致 UA 升高。血清 CR 反应肾脏损害、肾小球滤过率及尿路通畅性等肾功能,是一项比 BUN,UA 更特异的肾功能指标。但肾脏的储备及

代偿能力较强,只有肾功能明显受损,才能使 CR 浓度升高,一般伴随 BUN 一起进行检测。 $\beta 2$ -MG 能较好地了解肾小球滤过功能和肾小管的重吸收功能,并且较血清 CR 浓度增高更早、更显著⁽⁶⁾。本结果显示在所有检测点,BUN,CR 均在正常范围内波动。动物口服给予受试物 10 周内, $\beta 2$ -MG 和 UA 的数值均处于正常指标的上限,明显高于本中心的历史数据。各剂量组之间没有明显差异。在动物的恢复期,此两项指标的数值明显下降。以上结果提示在动物接触受试物阶段,动物的肾小管受到了轻微损害,此损伤不严重,且为可逆的。

本实验在动物口服给予受试物后,通过 B 超定期观察肾结石的大小和数量,对结石的发生、发展和消退情况进行了动态检测。各剂量组给予受试物 8 周时,所有动物均能检出结石,结石的大小介于 0.9 ~ 1.7 mm 之间;停止给予受试物 1 个月后,结石的大小和数量没有明显变化;停止给予受试物 10 个月后,所有动物结石数量和大小均呈下降趋势,至停止给予受试物 16 个月后,全部动物肾脏均未检测出结石。提示三聚氰胺等物质形成的肾结石,在没有引起血液和尿液指标异常的情况下,停止接触受试物后,结石的大小和数量均能减少,最终无法检出。在本试验条件下,在三聚氰酸或腺嘌呤存在的情况下,三聚氰胺在体内形成的肾结石数量和大小均较单纯三聚氰胺严重。各剂量组经过 16 个月的恢复,结石可以自行排出,其中单纯三聚氰胺组动物恢复较快。提示当饮食中含有高嘌呤物质或三聚氰酸时,三聚氰胺在肾脏形成的结石更多。

(下转第 8 页)

- immunodeficiency virus – associated dementia : An Evolving Disease[J]. J Neurovirol 2003; 9(2):205 – 221.
- [2] Albright AV, Soldan SS, Gonzalez – Scarano F, et al. Pathogenesis of human immunodeficiency virus – induced neurological disease[J]. J NeuroVirol 2003;9(2):222 – 227.
- [3] Williams R, Bokhari S, Silverstein P, et al. Nonhuman primate models of neuro AIDS [J]. J Neurovirol 2008; 14 (4): 292 – 300.
- [4] 卢耀增, 吴小闲, 李国桥等. 猴免疫缺陷病毒急性及慢性感染淋巴结的病理变化[J]. 广州中医药大学学报 2003;20 (3):191 – 194.
- [5] 卢耀增, 吴小闲, 涂新明等. 猴免疫缺陷病毒(SIV)猴模型的建立[J]. 中国实验动物学报 1994;2(2):94 – 101.
- [6] 黄海, 袁昆龙, 郑永唐. 人类艾滋病动物模型的研究现状 [J]. 动物学研究 1997;18(1):121 – 128.
- [7] Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease [J]. Nature 1993; 362 (6418):355 – 358.
- [8] Lackner AA, Smith MO, Munn RJ, et al. Localization of simian immunodeficiency virus in the central nervous system of rhesus monkeys[J]. Amer J Pathol 1991;139(3):609 – 621.
- [9] Tan SV and Guilloff RJ. Hypothesis on the pathogenesis of vacuolar myelopathy, dementia, and peripheral neuropathy in AIDS[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1998; 65 (1):23 – 28.
- [10] Orandle MS, MacLean AG, Sasseville VG, et al. Enhanced expression of proinflammatory cytokines in the central nervous system is associated with neuroinvasion by simian immunodeficiency virus and the development of encephalitis [J]. J Virol 2002; 76(11): 5797 – 5802.

[修回日期]2012-03-05

(上接第 4 页)

本研究历时 18 个月,观察了动物口服给予受试物后不同时间点(2 周、4 周、6 周、8 周和 10 周)和恢复期不同时间点(恢复期 1 个月、恢复期 2 个月、恢复期 8 个月、恢复期 13 个月和恢复期 16 个月),系统进行了尿液、血液和 B 超的检测。观察到不同受试物(三聚氰胺、三聚氰胺和三聚氰酸、三聚氰胺和腺嘌呤)对动物肾脏损伤及转归的情况。因本研究使用的动物数量较少,没有定期进行肾脏组织的病理学检查,若将三聚氰胺等物质对非人灵长类动物的损伤外推到人类,还需要进行大样本、长时间的动物试验。

4 结论

4.1 单纯三聚氰胺(相当于人体使用量 48 mg/kg·w·d)不能造成恒河猴的肾脏功能的明显损害,可形成肾结石。

4.2 在三聚氰酸或腺嘌呤存在的情况下,三聚氰胺可以使恒河猴肾功能各项指标在正常范围内升高,并可在肾脏形成结石;经过较长时间的恢复后结石

可以自行排出。

参考文献:

- [1] Melamine and Cyanuric acid: Toxicity, Preliminary Risk Assessment and Guidance on Levels in Food[S]. 25 September 2008, WHO.
- [2] The European Federation of Sea Anglers. EFSA's provisioned statement on a request from the European Commission on related to melamine and structurally related compounds such as cyanuric acid in protein-rich ingredients used for feed and food [EB/OL]. Parma;EFSA, 2007.
- [3] Burns K., Recall shines spotlight on pet foodsI [J]. Am Vet Med Assoc 2007 230: 1285 – 1288.
- [4] Roy L. et al. Identification and Characterization of Toxicity of Contaminants in Pet Food Leading to an Outbreak of Renal Toxicity in Cats and Dogs [J]. TOXICOLOGICAL SCIENCES 106(1), 251 – 262(2008).
- [5] 国家食品药品监督管理局.《药物研究技术指导原则》(2005)[M]. 中国医药科技出版社 2006 年 8 月,94 – 102.
- [6] 张秀明,温冬梅,袁勇.《临床生物化学检验质量管理与标准操作程序》[M]. 人民军医出版社,2010 年 1 月,252 – 275.

[修回日期]2012-04-20