

高剂量苏氨酸锌和硫酸锌对大鼠胚胎-胎仔发育毒性的比较

冯建萍, 王光然, 胡晓波, 姜雯雯, 谢明勇*

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘要:目的: 在胎鼠器官形成期6~15 d对怀孕的Sprague-Dawley (SD) 大鼠连续灌胃高剂量锌源, 观察苏氨酸锌和硫酸锌对SD大鼠胚胎-胎仔发育毒性。方法: 将苏氨酸锌按1 200 mg/(kg·d)的剂量(以体质量计, 下同), 硫酸锌则给予相同剂量的锌(575 mg/(kg·d)), 于妊娠第6~15天连续灌胃给药, 观察孕鼠基本生活状况。每隔3 d称1次体质量, 妊娠第20天处死孕鼠, 记录子宫质量、着床数、死胎数、胎盘质量及胎鼠体质量等, 观察活胎仔外观异常与否。每窝1/2胎鼠放入Bouin's液固定两周作内脏检查, 另1/2胎鼠作骨骼畸形检查。结果: 苏氨酸锌和硫酸锌组部分孕鼠给药初期均出现食欲低下, 毛发不顺等, 且摄食量明显降低($P<0.05$), 实验结束时孕鼠体质量增加显著减少($P<0.05$)。苏氨酸锌组有18例胎鼠胸骨缺失, 与玉米油组比较有显著差异($P<0.05$)。硫酸锌组有13例胎鼠胸骨缺失, 同时有2只孕鼠死亡, 与玉米油组比较有显著差异($P<0.05$)。结论: 两种高剂量的锌源对SD孕鼠都有一定的生殖毒性, 但苏氨酸锌相对比较安全。

关键词: 苏氨酸锌; 硫酸锌; 骨骼畸形; 发育毒性

Comparison of Teratogenic Effects of Different Zinc Sources at High Dose on Fetuses of Sprague-Dawley (SD) Rats

FENG Jian-ping, WANG Guang-ran, HU Xiao-bo, JIANG Wen-wen, XIE Ming-yong*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Objective: To observe the toxic effects of zinc threoninate chelate (Thr-Zn) and zinc sulfate on the embryo-fetal development in Sprague-Dawley (SD) rats on days 6 to 15 of pregnancy when they were diluted with corn oil. Methods: The pregnant rats were administered daily with Thr-Zn at a dose of 1 200 mg/(kg·d) bw or the same zinc dose from zinc sulfate (575 mg/(kg·d)) by gavage during days 6 to 15 of pregnancy and the basic living conditions were observed. Body weights were measured on days 0, 4, 8, 12, 16 and 20 of pregnancy, respectively. On day 20, the pregnant rats were sacrificed and their uterus were collected and weighed. The numbers of corpora lutea, implantations, absorbed fetuses, dead fetuses and live fetuses were examined. Fifty percent of fetuses were examined for visceral alterations and the remaining half were examined for skeletal abnormalities. Results: For both the Thr-Zn and zinc sulfate groups on the 7th day, the food intake was significantly decreased ($P < 0.05$), and the weight gain also was significantly reduced ($P < 0.05$). The Thr-Zn group had 18 cases of sternal missing and compared with the corn oil group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The zinc sulfate group had 13 cases of sternal missing and two pregnant rats died; compared with the corn oil group, the difference was similarly statistically significant ($P < 0.05$). Conclusions: High-dose administration of the two zinc sources has certain reproductive toxicity on pregnant SD rats, but Thr-Zn is relatively safe.

Key words: zinc threoninate chelate; zinc sulfate; skeletal malformations; developmental toxicity

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)17-0241-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201417046

锌是生物所必需的一种微量元素, 对生物的生长发育、免疫功能等起着重要的作用^[1-5]。锌添加剂有3种形

式, 第1代是无机锌, 如硫酸锌; 第2代是有机酸锌, 如葡萄糖酸锌; 而氨基酸微量元素则属于第3代, 它是锌化

收稿日期: 2013-10-25

基金项目: 江西省自然科学基金项目(20132BAB204002); 江西省重大科技创新研究项目(20124ACF00400);

江西省教育厅2011年度产学研合作项目(GJJ11002)

作者简介: 冯建萍(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为营养保健与功能食品。E-mail: 415184945@qq.com

*通信作者: 谢明勇(1957—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品营养学、食品安全、功能保健食品。E-mail: myxie@ncu.edu.cn

合物和氨基酸按照一定的比例螯合成的有机微量元素螯合物。大量研究表明氨基酸螯微量元素较无机锌和有机酸锌盐比较,具有稳定性好、生物效价高、易被消化吸收等特点^[6-9]。苏氨酸锌是氧化锌和苏氨酸螯合成的一种新型的有机微量元素添加剂^[10-11],它在动物饲养方面显示了优良的补锌与促进生长发育的作用^[12-14],在控制血糖方面也表现出了降血糖作用优于硫酸锌的功效^[15]。苏氨酸锌作为第3代微量元素添加剂,因为其有适口性好、生物效价高等特点被推广使用。有文献^[16]报道,苏氨酸锌的雌性大鼠急性LD₅₀为2 710 mg/kg。

目前人们对氨基酸螯合物提高生产性能的研究比较多,而毒性方面研究的较少。丁小波等^[17]综述了微量元素锌的毒性,长期或大量地服用硫酸锌,大约有15%的人会出现不良反应,严重者可引起贫血,出现胃出血等。一般来说,有机锌会比无机锌更容易吸收,因此更容易导致机体中毒。如果补锌过多,不仅会抑制机体的生长发育和降低其免疫能力,还会引起雄性的不育。研究表明,苏氨酸锌具有吸收效率高、生物效价高等特点,实验就苏氨酸锌的胚胎毒性进行基础研究,通过对SD大鼠胚胎器官形成期连续给药,进行致畸实验,旨在比较苏氨酸锌和硫酸锌两种高剂量锌源对SD孕鼠胚胎毒性的影响,为其安全应用提供合理依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

硫酸锌,白色结晶性粉末,易溶于水,纯度≥99.5%,主要杂质为钾、镁等一些微量元素;苏氨酸锌为实验室自制,是由苏氨酸和氧化锌采用水热化学合成法制备的一种氨基酸螯合物,其化学式为C₈H₁₆N₂O₆Zn·2H₂O,锌含量为19.36%^[18]。苏氨酸锌的结构见图1。

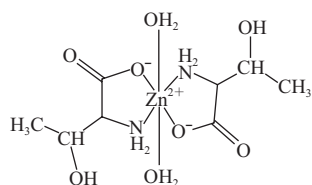


图1 苏氨酸锌的结构

Fig.1 Structure of zinc threoninate

1.1.2 试剂

氢氧化钾 天津市大茂化学试剂厂; 2,4,6-三硝基苯酚 广东省台山市化工厂; 95%冰乙酸、质量分数40%甲醛、丙三醇 西陇化工股份有限公司; 食用玉米油 益海嘉里食品营销有限公司; 茜素红 美国Sigma公司; 所用试剂除特别说明外,均为分析纯。

1.2 仪器与设备

FA1004型电子分析天平 上海上平仪器公司;
DT1000A型电子天平 常熟市意欧仪器仪表公司;
HH-4型恒温水浴锅 常州国华电器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 实验动物及处理

选用成年未经产的8周龄大小Sprague-Dawley (SD)大鼠,雌鼠24只,体质量为250~300 g;雄鼠12只,体质量为380~420 g,购自常州卡文斯实验动物有限公司,常规喂养,饲料中的锌含量为139 mg/kg,自由饮食,自由饮水,室温(20~25℃),每天12 h光照,12 h黑暗,换气次数为10~15次/h。动物健康,符合实验动物所需要的质量要求。

SPF级的SD大鼠先适应环境7 d后开始实验。选取健康的雌雄大鼠每天晚上20:00按1:1合笼,次日早晨检查阴栓。查出阴栓,则认为该大鼠已受孕,记为妊娠第0天。如果5 d内某只雌鼠未受孕,则更换雄鼠。每天检出的孕鼠随机分为4组,即苏氨酸锌组、硫酸锌组、玉米油组和空白组,每组6只。实验组大鼠于孕期第6~15天连续灌胃,苏氨酸锌组按照1 200 mg/kg(以体质量计,下同)给予苏氨酸锌,硫酸锌组则给予相同剂量的锌(575 mg/kg),每天灌胃1次,剂量为1.5 mL/100 g,玉米油组和空白组也按剂量为1.5 mL/100 g给予玉米油和双蒸水。并在受孕的0、4、8、12、16、20 d称体质量,根据体质量重新调整灌胃的剂量。

1.3.2 观测指标

于妊娠第20天断颈处死孕鼠,取出子宫并称质量,记录着床数、活胎数、吸收胎数,逐个检查胎鼠有无外观异常,称胎鼠体质量、胎盘质量,量体长。在胚胎-胎仔发育毒性实验中,着床数、活胎数、吸收胎数等指标通常是衡量胚胎早、晚期发育毒性的指标,胎鼠、胎盘的质量以及胎鼠的身长、尾长数值等也是评价外来受试物对胎鼠是否产生毒性的指标。将1/2胎鼠放于Bouin's液中固定,两周后切片进行内脏切片检查。另外1/2胎鼠剥皮后用茜素红液染色,并经透明液脱色透明后检查骨骼发育情况。

1.4 数据处理

以Excel软件建立数据库,SPSS 19.0软件统计分析。胎鼠体质量及每窝产仔数采用单因素方差分析和LSD-*t*法两两比较;胎鼠骨骼畸形率采用多个样本比较及两两比较的秩和检验(Kruskal Wallis检验)。

2 结果与分析

2.1 对孕鼠一般状况及体质量的影响

灌胃期间,苏氨酸锌组和硫酸锌组孕鼠都有一定程

度的精神萎靡,食量下降,毛发凌乱等,玉米油组少量的孕鼠出现了一定程度的腹泻,而空白组则精神状况良好,没有明显的异常症状。如表1所示,苏氨酸锌组、硫酸锌组及玉米油组和空白组的孕鼠初始体质量比较,没有显著性差异($P>0.05$)。实验结束后,苏氨酸锌组、硫酸锌组孕鼠体质量增加量和玉米油组及空白组比较,差异显著($P<0.05$),玉米油组孕鼠和空白组体质量增加量比较,没有显著性差异($P>0.05$)。

表1 孕鼠孕期体质量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 1 Body weight of pregnant rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	灌胃剂量/ (mg/(kg·d))	体质量/g						母体增质量/g
		妊娠0 d	妊娠4 d	妊娠8 d	妊娠12 d	妊娠16 d	妊娠20 d	
苏氨酸锌组	1 200	272.09±21.96	303.37±27.73	354.96±29.54	314.61±34.17	334.91±30.18	367.24±27.14	106.67±9.99 ^a
硫酸锌组	575	278.10±20.77	315.43±23.11	302.34±20.75	312.19±15.04	325.53±19.19	395.43±16.69	101.08±11.87 ^a
玉米油组	0	281.64±28.03	307.01±25.74	317.43±25.83	346.46±21.82	377.52±16.47	437.67±26.49	147.37±15.32 ^a
空白组	0	280.59±20.75	293.96±20.98	324.35±25.65	334.65±22.51	369.89±30.64	422.84±36.67	136.67±18.34 ^a

注:同列小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。下同。

2.2 对孕鼠及胎鼠发育的影响

表2 孕鼠孕期生殖功能指标 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 2 Reproductive parameters of pregnant rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	灌胃剂量/ (mg/(kg·d))	子宫质量/g	着床个数	着床总 个数	活胎数	活胎 率/%	吸收 胎数	吸收 胎率/%
苏氨酸锌组	1 200	70.34±15.98 ^{ab}	14.0±1.7 ^a	84	76 ^{ab}	90.48	8	9.53
硫酸锌组	575	55.08±5.57 ^b	12.2±1.2 ^{ab}	49	44 ^b	89.80	5	10.21
玉米油组	0	77.58±9.94 ^a	14.5±1.6 ^a	87	87 ^a	100	0	0
空白组	0	61.22±20.65 ^b	10.3±3.7 ^b	62	62 ^b	100	0	0

如表2所示,玉米油组与空白组比较,孕鼠的子宫质量、着床数及活胎数差异显著($P<0.05$);与玉米油组相比,苏氨酸锌组和硫酸锌组的着床数,无显著性差异($P>0.05$),但玉米油组和空白组相比,差异显著($P<0.05$);与空白组比较,苏氨酸锌组的着床数差异显著($P<0.05$),但苏氨酸锌组的子宫质量和活胎数与空白组比较,则无显著性差异($P>0.05$);硫酸锌组与空白组比较,着床数、活胎数和子宫质量均无显著性差异($P>0.05$)。苏氨酸锌组和硫酸锌组均出现了吸收胎,但差异无统计学意义,而玉米油组和空白组则正常。

表3 胎鼠生长发育指标 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 3 Indexes of fetal development ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	灌胃剂量/ (mg/(kg·d))	胎鼠体质量/g	胎盘质量/g	胎鼠身长/cm
苏氨酸锌组	1 200	2.8639±1.08 ^b	0.5483±0.11 ^b	3.33±0.66 ^a
硫酸锌组	575	2.9696±0.43 ^{ab}	0.5567±0.05 ^{ab}	3.23±0.24 ^a
玉米油组	0	3.3209±0.68 ^{ab}	0.5991±0.07 ^{ab}	3.44±0.37 ^a
空白组	0	3.8714±0.22 ^a	0.6703±0.07 ^a	3.59±0.07 ^a

如表3所示,玉米油组和空白组比较,孕鼠的胎盘质量、胎鼠体质量及身长,无显著性差异($P>0.05$);苏氨酸锌组和硫酸锌组的胎盘质量、胎鼠体质量及身长与玉米油组相比,无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 对胎鼠内脏和骨骼畸形的影响

表4 胎鼠骨骼发育情况
Table 4 Skeleton development in the fetuses

组别	灌胃剂量/ (mg/(kg·d))	胎鼠数	胸骨 畸形数	胸骨缺失数			肋骨 畸形数
				2、5缺失	2、5、6缺失	其他	
苏氨酸锌	1 200	45	18 ^a	12	5	1	3
硫酸锌组	575	24	13 ^a	2	3	8	2
玉米油组	0	47	13 ^b	7	6	0	0
空白组	0	30	6 ^c	0	0	6	0

采用徒手切片的方法观察胎鼠内脏,只有硫酸锌组胎鼠发现有胃肠道松弛,肝、肺充血等状态,其他组均未检查出内脏畸形或变异。如表4所示,玉米油组出现了13例胸骨畸形,其中第2、5、6胸骨缺失的有6例,第2、5胸骨缺失的有7例,与空白组相比,差异显著($P<0.05$)。苏氨酸锌组胎鼠胸骨畸形18例,其中第2、5、6胸骨缺失5例,第2、5胸骨缺失12例,第4胸骨缺失1例,另有3例胎鼠第13肋骨出现了发育不全同时还出现了8个吸收胎,与玉米油组相比,差异显著($P<0.05$)。硫酸锌组在实验过程中有两只孕鼠死亡,胎鼠胸骨缺失有13例,其中第2、5、6胸骨缺失3例,第2、5胸骨缺失2例,第6胸骨缺失的有1例,第4胸骨缺失的有3例,同时胸骨数量少于3的有4例,还有2例第13根肋骨发育不全,与玉米油组相比,差异显著($P<0.05$,胎鼠总数不同)。空白组出现了6例胸骨缺失,主要是第5、6胸骨缺失。各组均未见头骨、尾骨、椎骨等畸形。

3 讨论

由于苏氨酸锌的溶解度比较小,实验采用玉米油作溶剂,配制成乳浊液进行灌胃,溶剂对照组(玉米油组)给予相同剂量的玉米油,发现玉米油组出现了13例胸骨畸形(畸形率27.7%),与空白组6例胸骨畸形(畸形率20.0%)比较,差异显著($P<0.05$)。实验结果表明用玉米油作溶剂时,会对大鼠胚胎-胎仔发育毒性实验产生干扰作用,这与文献报道一致^[19]。蔡鸣等^[20]也研究发现,将玉米油按5 mL/kg于SD大鼠妊娠第6~15天连续灌胃给药,发现玉米油组出现摄食量下降,吸收胎数明显增加,且玉米油组出现了34例胸骨畸形,与空白组比,差异显著($P<0.05$)。上述结果表明玉米油组胎鼠胸骨畸形数显著多于空白组,故推测玉米油对实验结果有叠加的作用,在后期的实验当中建议更改溶剂,使实验结果更具有参考性。

实验过程中发现,苏氨酸锌组从第6天灌胃开始,孕鼠活动受抑制,自由活动减少,毛发凌乱,同时摄食量

也明显降低,大约4~5 d后会慢慢恢复正常。硫酸锌组从第6天开始灌胃后也出现了孕鼠活动减少,毛发凌乱,同时伴有一定程度的腹泻,实验过程中灌胃的剂量和文献报道中的半致死剂量很相近^[21],出现了两只孕鼠死亡。而摄食量的减少,直接影响到孕鼠的体质量,两组相比较,孕鼠体质量的增加没有显著性差异($P>0.05$),孕鼠的着床数、活胎数、子宫质量、胎鼠体质量和胎盘质量等也无显著性差异($P>0.05$)。在胎鼠骨骼方面,硫酸锌组(畸形率为62.5%)的骨骼畸形显著多于苏氨酸锌组(畸形率46.7%),可见苏氨酸锌与硫酸锌相比毒性较低,相对安全。另外实验中还发现硫酸锌组和玉米油组都出现了不同程度的腹泻,而苏氨酸锌组只有很轻微的腹泻,由此推测苏氨酸锌可能在一定程度上能降低SD大鼠的腹泻率。

骨骼的发育存在广泛的可塑性,一般情况下,自然发生率相对高的群体所发生的变异趋势通常是可逆的,对动物不产生或产生很小的有害性后果^[22]。综合以上实验结果推测,苏氨酸锌对健康育龄的SD大鼠胚胎-胎仔发育毒性相对硫酸锌而言较小,比较安全。后续实验还将探讨更换溶剂后高剂量锌源对胎鼠胸骨发育的影响及其行为致畸学研究。

参考文献:

- [1] 沈慧,秦海宏,王福梯. 锌营养状况评价指标研究进展[J]. 国外医学:卫生学分册, 2006, 33(5): 291-296.
- [2] 龚毅,胡晓波,彭丽霞,等. 锌氨基酸螯合物的抑菌活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(17): 84-87.
- [3] 李川,朱科学,聂少平,等. 苏氨酸锌对糖尿病大鼠肝脏损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2011, 32(19): 198-200.
- [4] van HEUGTEN E, SPEARS J W, KEGLEY E B, et al. Effects of organic forms of zinc on growth performance, tissue zinc distribution, and immune response of weanling pigs[J]. Journal of Animal Science, 2003, 81(8): 2063-2071.
- [5] CASE C L, CARLSON M S. Effect of feeding organic and inorganic sources of additional zinc growth performance and zinc balance in nursery pigs[J]. Journal of Animal Science, 2002, 80(7): 1917-1924.
- [6] 江素梅. 氨基酸螯合物在食品安全及饲料中的应用前景[J]. 饲料研究, 2012(2): 30-32.
- [7] 胡亮,张明. 微量元素氨基酸螯合物在动物营养中的应用[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2012(3): 61-63.
- [8] 李聚才,张春珍,庞琪艳. 动物微量元素锌营养研究进展[J]. 宁夏农林科技, 2007(6): 30-33.
- [9] 于昱. 不同形态锌在肉仔鸡小肠中的吸收特点及机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
- [10] 董晓慧. 氨基酸螯合锌吸收、转运特点和影响因素的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2001.
- [11] 虞泽鹏. 锌及锌源对动物的生长、免疫功能调节及其分子机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- [12] van der AAR P, 金立志. 猪配合饲料中铜和锌的需要量的最新研究进展[J]. 饲料工业, 2013, 34(12): 1-5.
- [13] 黄艳玲. 肉仔鸡实用饲料中锌适宜水平及有机锌源相对生物学利用率研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [14] 庞全海,张莉,张春有,等. 微量元素锌在动物健康及营养中的研究进展[J]. 动物医学进展, 2002, 23(2): 41-43.
- [15] YOSHIKAWA Y, UEDA E, SUZUKI Y, et al. New insulinomimetic zinc (II) complexes of α -amino acids and their derivatives with Zn (N_2O_2) coordination mode[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2001, 49(5): 652-654.
- [16] HU Xiaobo, GONG Yi, LI Lei, et al. Safety evaluation of zinc threoninate chelate[J]. International Journal of Toxicology, 2010, 29(4): 372-379.
- [17] 丁小波,文利新,牛同利. 微量元素锌的毒性研究[J]. 微量元素与健康研究, 2007, 24(6): 64-66.
- [18] 胡晓波,乔李娜,龚毅,等. 苏氨酸锌的制备与表征[J]. 食品工业科技, 2012, 33(24): 355-357.
- [19] SINGH A, SINGH J K, NATH A, et al. Effects of corn oil as a vehicle on liver of female Swiss albino mice *Mus musculus*[J]. Journal of Ecophysiology & Occupational Health, 2010, 10(3/4): 203-209.
- [20] 蔡鸣,岳鹏,刘晶,等. 玉米油对大鼠胚胎-胎仔发育毒性试验的干扰作用[J]. 毒理学杂志, 2011, 25(2): 114-116.
- [21] 罗水花,魏碧蓉,陈良儿,等. 硫酸锌对小鼠半数致死量测定的可行性分析[J]. 临床合理用药杂志, 2011, 4(9): 31-32.
- [22] 叶向锋,刘芷含,王灵芝,等. SD大鼠胚胎-胎仔发育毒性试验的基础数据[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(10): 162-164.