

• 研究论文 •

乙烯利对小鼠的免疫毒性研究

赵文*, 刘一峰, 孟玉彩, 郭潇, 李慧玲, 张会彦

(河北农业大学 食品科技学院 河北 保定 071000)

摘要: 为了探讨乙烯利对人体健康的影响, 选用溶血空斑试验、血清溶血素检测试验、迟发型变态反应试验和碳粒廓清试验, 分别从体液免疫、细胞免疫和非特异性免疫功能等不同角度研究了乙烯利对小鼠的免疫毒性。结果表明, 乙烯利 67~268 mg/kg bw 各剂量组的小鼠足跖肿胀程度、溶血空斑对数值以及半数溶血值均显著低于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 巨噬细胞吞噬指数在 268 mg/kg bw 剂量时明显降低 ($P < 0.05$)。结果提示, 乙烯利对小鼠的免疫功能具有一定的抑制作用。

关键词: 乙烯利; 小鼠; 免疫功能

中图分类号: R994.4

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2008)02-0217-04

Effects of Ethephon on Immuno competence in Mice

ZHAO Wen*, LU Yifeng MENG Yucui GUO Xia LIHuiling ZHANG Huiyan

(College of Food Science, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei Province, China)

Abstract The effects of ethephon on immunity in mice was investigated. The assay on plaque forming cell (PFC) of spleen, content of serum hemolysin, delayed hypersensitivity and macrophage function were carried out. The results showed that the thickness of footpad, the numbers of plaque forming cell and the serum HC₅₀ of mice when treated with ethephon at 67~268 mg/kg bw, were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the macrophagocyte index was lower than that in the control group at 268 mg/kg bw dose level ($P < 0.05$). The results suggested that there were inhibitive effects of ethephon on immunity in mice.

Key words ethephon; mice; immunity function

乙烯利 (ethephon), 化学名称为 2-氯代乙基膦酸, 作为植物生长调节剂具有用量小、见效快、残留少等特点, 广泛用于保护地反季节早熟植物栽培^[1]。它可经叶片、树皮、果实或种子进入植物体内, 经传导到靶标部位, 释放出乙烯, 进而促进果实成熟^[2]。

通过对乙烯利的使用状况调查^[2]、残留量测定^[3]、一般毒性及其致突变性^[4-13]等的研究发现,

乙烯利具有一定的神经毒性、致突变性和弱的激素样作用, 因此国外对果蔬中残留的乙烯利具有严格的限量要求, 欧盟最新规定其最高残留限量为 0.02 mg/kg^[14]。但是, 关于乙烯利对机体免疫功能的影响还未见相关报道。而化学物质引起机体免疫毒性作用的剂量往往低于他们的一般毒性作用剂量, 因此, 机体的免疫系统对外来化学物的反应更加敏感^[15]。根据此特点, 常常以免疫学指

收稿日期: 2008-01-08; 修回日期: 2008-03-31.

作者简介: * 赵文 (1964-), 女, 上海市人, 通讯作者 (Author for correspondence), 医学硕士, 教授, 主要从事食品营养与安全方面的研究.

联系电话: 13582820221; E-mail: zwgy@yahoo.com.cn

基金项目: 河北农业大学科研发展基金资助.

标作为外来化学物质对机体毒性作用的早期指标。笔者利用免疫毒理学研究方法,初步评价了乙烯利对机体免疫机能的影响,旨在为进一步为明确乙烯利的安全性提供科学依据,同时也为制定人群的允许暴露水平提供有价值的信息。

1 材料与方法

1.1 药剂及实验动物

乙烯利纯度 $\geq 95\%$,北京索来宝科技有限公司提供。设低、中、高3个染毒剂量。分别为:67、134和268 mg/kg bw。以蒸馏水为溶剂,现用现配。其中高剂量为乙烯利的1/16 LD₅₀。

雌性昆明种小鼠,清洁级,体重18~22 g,由河北医科大学实验动物学部提供。许可证号:SCXK(冀)2003-1-003。

1.2 试剂及仪器

印度墨汁,北京笃信精细制剂厂产品,生理盐水配制;琼脂糖,北京夏斯生物有限公司产品,用Hanks液配制;Hanks液、SA缓冲液和都氏试剂,参照文献[16]中的方法配制;绵羊血,采自中国人民解放军第二五二医院实验动物室;补体,由北京大学医学部提供。所有试剂均为分析纯。

UV-2802H型紫外可见分光光度计;SPS202F型电子天平(灵敏度0.01 g);SPX-150S-II型生化培养箱;TDL-5型低速大容量离心机。

1.3 实验方法

1.3.1 迟发型变态反应、脾脏抗体形成细胞数及淋巴器官相对质量的测定 在文献[17]方法上稍加改良。选用雌性昆明种小鼠40只,随机分为4组,每组10只。其中包括3个乙烯利剂量组和一个阴性对照组(蒸馏水)。采用等体积灌胃法(0.2 mL/10 g bw),每天定时给予各剂量的乙烯利溶液,连续染毒28 d第29 d进行下述指标的测定。

用脏/体比值表示淋巴器官相对质量;采用足跖增厚法^[16]测定迟发型变态反应(DTH);采用Jeme改良玻片法^[16]进行脾脏抗体生成细胞检测;采用半数溶血值(HC₅₀)法^[16]测定血清溶血素。

1.3.2 巨噬细胞吞噬功能检测 参照文献[16]方法。选用雌性昆明种小鼠40只,动物分组、剂量、灌胃时间及方法均同1.3.1。采用小鼠碳粒廓清试验,通过观察各组动物机体的平均吞噬指数检测小鼠巨噬细胞吞噬功能。

1.4 统计方法 双侧t检验。

2 结果与分析

2.1 乙烯利对小鼠胸腺和脾脏质量的影响

结果(见表1)表明,各染毒组小鼠的免疫器官质量均低于对照组,且随乙烯利剂量的增加呈下降趋势。其中,高剂量组脾脏的相对质量与对照组相比存在显著差异。

表1 乙烯利对小鼠胸腺和脾脏质量的影响

Table 1 Effects of ethephon on relative weight of Thymus and spleen

组别 Groups	剂量 Dose /(mg/kg bw)	动物数 n	胸腺/体重 Thymus/Body/(mg/g)	脾脏/体重 Spleen/Body/(mg/g)
对照组 Control	0	10	3.95±0.54	5.76±1.23
低剂量组 Low dose	67	10	3.87±0.61	5.22±1.26
中剂量组 Medium dose	134	10	3.84±0.68	5.15±1.26
高剂量组 High dose	268	10	3.46±0.68	4.45±1.50*

* 与对照组比较, $P < 0.05$ 。* Compare to control $P < 0.05$

2.2 乙烯利对小鼠免疫功能的影响

2.2.1 乙烯利对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响

结果(见表2)表明,各染毒组小鼠的吞噬指数(a)均低于对照组,且随受试物剂量的增加呈下降趋势。其中,高剂量组的吞噬指数与对照组比较差异显著($P < 0.05$)。

2.2.2 乙烯利对小鼠细胞免疫功能的影响

结果(表2)表明,各染毒组小鼠的足跖肿胀程度均低于对照组,且随受试物剂量的增加呈下降趋势。三个剂量组的足跖肿胀程度与对照组相比存在显著或极显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2 2 3 乙烯利对小鼠体液免疫功能的影响 结果

(表 2)表明, 各染毒组的空斑形成数 (PFC)对数值和 HC₅₀值均低于对照组, 且随受试物剂量的增加

呈下降趋势。三个剂量组的 PFC 对数值和 HC₅₀值与对照组相比均存在显著或极显著性差异 (P < 0.05, P > 0.01)。

表 2 乙烯利对小鼠免疫功能的影响

Table 2 Effect of ethephon on the immunity function in mice

组别 Groups	剂量 Dose (mg/kg bw)	动物数 n	空斑形成数 Plaque forming cell(PFC) ($\times 10^4$ / spleen)	半数溶血值 HC ₅₀	足跖厚度 Thickness of footpud /mm	吞噬指数 (a) Macrophagocyte index
对照组 Control	0	10	5.88±1.05	83.94±16.81	0.41±0.19	4.88±0.32
低剂量组 Low dose	67	10	5.50±1.04*	67.23±14.49	0.20±0.07*	4.62±0.42
中剂量组 Medium dose	134	10	5.02±1.04**	54.30±13.94*	0.14±0.07**	4.63±0.62
高剂量组 High dose	268	10	4.22±1.07**	36.89±10.51**	0.10±0.04**	4.46±0.31*

与对照组比较 Compare to control * P < 0.05 ** P < 0.01.

3 讨论

本研究利用免疫毒理学实验方法, 以小鼠为实验动物, 分别从其胸腺和脾脏相对质量、巨噬细胞吞噬功能、细胞免疫功能和体液免疫功能等方面进行了较全面的实验观察。结果表明, 乙烯利在 67~ 268 mg/kg bw 的剂量条件下, 对小鼠的脾脏相对质量、脾脏溶血空斑数以及半数溶血值、巨噬细胞吞噬指数、足跖肿胀程度等均呈现不同程度的降低。

胸腺和脾脏是机体重要的免疫器官。胸腺是 T 淋巴细胞分化成熟的场所, T 淋巴细胞主要参与机体的细胞免疫功能。而脾脏的免疫细胞则以 B 淋巴细胞为主, B 淋巴细胞是参与体液免疫的主要细胞。本试验结果表明, 乙烯利能使胸腺和脾脏的相对质量下降, 说明乙烯利对动物机体的免疫器官造成了一定的损伤。

当致敏 T 淋巴细胞再次接触相同的抗原后, T 淋巴细胞活化, 释放出多种淋巴因子, 产生以单核细胞浸润为主的炎症, 表现为皮肤红肿、硬结, 这种反应一般在抗原激发后的 24~ 48 h 达到高峰, 因此称之为迟发型过敏反应, 此反应是观察细胞免疫功能的敏感指标^[13]。本试验结果表明, 乙烯利导致小鼠足跖肿胀程度下降, 可能与其使动物机体 T 淋巴细胞活化发生障碍, 分泌淋巴因子的功能下降有关。

溶血空斑试验 (PFC) 是体外检查和计数产生免疫球蛋白 M (IgM) 等抗体生成细胞的一种方法。由于溶血空斑试验具有特异性高、筛检力强、不需要特殊的仪器设备等优点, 所以可作为判断机体体液免疫功能的指标^[13]。用绵羊红细胞 (SRBC) 免疫动物后, 其淋巴细胞产生抗 SRBC 抗体, 在体外与 SRBC 一起温育, 在补体参与下, 可发生溶血反应释放血红蛋白, 通过测定血红蛋白量可以反映动物血清中溶血素的含量。本试验结果表明, 经乙烯利染毒的小鼠脾脏抗体生成细胞数量及血清溶血素含量均表现下降, 说明乙烯利可致动物机体体液免疫功能下降。

巨噬细胞是免疫反应的重要参与者, 不仅担负着机体的非特异性防御功能, 而且具有抗肿瘤作用和参与调节免疫应答等多种重要功能。动物机体经静脉注射一定大小的颗粒物质 (印度墨汁) 后, 可被肝、脾内的巨噬细胞及整个单核巨噬细胞系统内的其他细胞吞噬。所以通过血中异物颗粒浓度的降低可以了解单核巨噬细胞系统的吞噬功能^[13]。在一定范围内, 体内碳粒被清除速率与血碳浓度呈指数函数关系。以血碳浓度的对数值为纵坐标, 以时间为横坐标, 两者呈直线关系。此直线斜率可表示吞噬速率。而动物的肝、脾质量会影响吞噬速率, 一般以校正吞噬指数 a 表示。本试验结果表明, 一定剂量的乙烯利染毒组动物单核巨

噬细胞系统的吞噬功能明显下降,说明乙烯利亦会造成机体非特性免疫功能的损伤。

综合本次实验结果,剂量为 67 mg/kg bw 的乙烯利,连续染毒 28 d 即对小鼠的免疫功能呈现明显的抑制作用。乙烯利对动物机体的免疫损伤可能是通过其原形或代谢产物直接作用于机体的免疫器官和免疫细胞,引起免疫器官萎缩,免疫细胞死亡、数目减少,或免疫细胞功能下降所致。但其对淋巴细胞的成熟过程有无影响,以及免疫抑制作用的分子学机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] TIAN Li-li(田丽丽). 几类常用的蔬菜生长调节剂 [J]. North west Horticulture (西北园艺), 2005 11: 41-46.
- [2] CHU Xiao-gang(储晓刚), YONG Wei(雍伟), CAI Hu-xia(蔡慧霞), et al 顶空气相色谱法快速测定浓缩菠萝汁中乙烯利的残留量 [J]. Chin J Chromatog (色谱), 2001, 19(3): 286-288.
- [3] LU Shu-yan(刘淑艳), HU Xi-zhen(胡喜珍), QI Hong-ye(齐宏业), et al 市售水果中乙烯利残留量调查 [J]. Chin J Public Health Engin(中国卫生工程学), 2000 3(4): 221-222.
- [4] HAUX J E. Phosphobutyl Cholinesterase: Phosphorylation of the Esteratic Site of Butyrylcholinesterase by Ethephon [(2-chloroethyl) phosphonic Acid] Dianion [J]. Chem Res Toxicol, 2000, 13: 646-651.
- [5] HAUX J E, LOCKRIDGE O, CASIDA J E. Effects of Currently Used Pesticides in Assays for Estrogenicity, Androgenicity, and Aromatase Activity in vitro [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2002, 179(1): 1-12.
- [6] CHEN Yu-sheng(陈裕盛). 植物刺激剂乙烯利急性中毒三例报告 [J]. Chin J Prev Med (中华预防医学杂志), 1989, 14(2): 113.
- [7] ZHAO Su(赵肃), DUAN Zhi-wen(段志文), JIN Huan-rong(金焕荣), et al 乙烯利的致突变作用研究 [J]. Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis (癌变·畸变·突变), 1999, 11(2): 91-93.
- [8] YU Wen-hui(于文辉), GAO Yong-quan(高永泉), ZHAO Wen(赵文), et al 乙烯利体内致突变性研究 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2006 8(2): 184-186.
- [9] HE Rui(何瑞), LIU Ai-ping(刘艾平), CAO Yu-guang(曹玉广). 植物生长调节剂使用中的安全问题 [J]. Chinese Journal of Health Inspection (中国卫生监督杂志), 2003 10(2): 99-101.
- [10] MPR Evaluation Pesticide residues in food Part II. Toxicology [R]. Ethephon, 1993.
- [11] MPR Evaluation Pesticide residues in food Part II. Toxicology [R]. Ethephon, 2002.
- [12] SPARKS S E, QUISTAD G B, CASIDA J E. Organophosphorus Pesticide-induced Butyrylcholinesterase Inhibition and Potentiation of Succinylcholine Toxicity in Mice [J]. J Biochem Mol Toxicol, 1999, 13(2): 113-118.
- [13] ZHANG Xian-hui(张先慧). 乙烯利对大鼠生殖和行为发育毒性的影响及机制探讨 [D]. Ji nan (济南): Shandong University (山东大学), 2006.
- [14] ZHAO Er-cheng(赵尔成), WANG Xiang-yun(王祥云), HAN Li-jun(韩丽君), et al 常用植物生长调节剂残留分析研究进展 [J]. J Anhui Agric Sci (安徽农业科学), 2005, 33(9): 1709-1711.
- [15] ZHOU Zong-can(周综灿). Foundations of Toxicology (2nd) (毒理学基础, 第二版) [M]. Beijing (北京): Beijing Medical University Press(北京医科大学出版社), 2000: 157.
- [16] XUE Bin (薛彬). The Experimental Technology of Immunotoxicology (免疫毒理学实验技术) [M]. Beijing (北京): Beijing Medical University and Chinese Union Medical College Press(北京医科大学中国协和医科大学联合出版社), 1995: 58-59.
- [17] LEI Zhi-ming(雷志明), XUE Bin(薛彬), TIAN Xi-jie(田秀杰), et al 单个动物多项免疫功能检测研究 [J]. J Beijing Med Univ (北京医科大学学报), 1991, 23(5): 399.

(Ed JN SH)