

小龙虾头与尾匀浆灌胃诱发 SD 大鼠哈夫病样损害

邹旋¹, 常群群¹, 戴余雷², 陈效¹, 任晓虎¹, 梁浩¹, 胡盼盼¹, 刘建军¹, 何玲²

(1. 深圳市疾病预防控制中心, 广东深圳 518055) (2. 香港大学深圳医院, 广东深圳 518016)

摘要: 本研究拟探讨致病小龙虾头与尾匀浆在诱导 SD 大鼠发生食源性哈夫病相关重要生化指标变化中的作用。将深圳市一起食源性哈夫病人食用的同一来源小龙虾头(肝胰腺)和尾(虾肉)分开并高温处理后对 SD 大鼠进行灌胃, 不同时间点取血液后分离血清进行肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)及乳酸脱氢酶(LDH)等多种生化指标检测; 分析小龙虾头与尾匀浆在不同时间点诱导 SD 大鼠哈夫病诊断指标出现变化的情况。结果显示, 肝胰腺灌胃 24 h 后肝胰腺组大鼠血清中 CK (613±220.6)、CK-MB (509±196.1) 和 LDH (1044±672.8) 出现超过对照组 2 倍标准差的异常值, P 分别为 0.523、0.417 和 $p=0.237$ 。灌胃 48 h 后, 虾肉组大鼠血清中 CK (78±12.5)、CK-MB (78±12.5) 和 LDH (954±694.2) 出现超过对照组 2 倍标准差的异常值, p 分别为 0.11、0.11 和 0.87。通过灌胃处理后不同时间点检测相关重要生化指标, 初步鉴定出哈夫病诊断相关重要指标出现异常的大鼠, 可为食用小龙虾导致哈夫病的快速诊断及致病机理提供科学线索。

关键词: 小龙虾; 哈夫病; SD 大鼠

文章编号: 1673-9078(2020)08-373-378

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.8.0521

Induction of Haff Disease-like Injury in SD Rats by Oral Gavage

Administration of Crayfish Head and Tail Homogenates

ZOU Xuan¹, CHANG Qun-qun¹, DAI Yu-lei², CHEN Xiao¹, REN Xiao-hu¹, LIANG Hao¹, HU Pan-pan¹,
LIU Jian-jun¹, HE Ling²

(1. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China)

(2. Hongkong University Shenzhen Hospital HKU-SZH, Shenzhen 518016, China)

Abstract: Head and tail homogenates of crayfish were administered to Sprague-Dawley rats in order to investigate the changes induced in several key biochemical indicators associated with seafood-induced Haff disease; namely, creatine kinase (CK), creatine kinase MB (CK-MB), and lactate dehydrogenase (LDH). The crayfish used in this study was obtained from the same source that was responsible for a case of Haff disease in Shenzhen, China. The head (hepatopancreas) and tail (crayfish meat) of the crayfish were separately subjected to high-temperature sterilization before their administration to the rats by oral gavage. Blood samples were then collected from the rats at different time points following the oral treatment, and the serum was separated for measurement of the CK, CK-MB, and LDH levels. The rats administered the hepatopancreas homogenate had serum CK (613±220.6), CK-MB (509±196.1), and LDH (1044±672.8) levels that were higher than those of the control group by more than two standard deviations ($P = 0.523, 0.417$, and 0.237 , respectively) at 24 h after oral treatment. The rats administered the crayfish meat homogenate had serum CK (78±12.5), CK-MB (78±12.5), and LDH (954±694.2) levels that were higher than those of the control group by more than two standard deviations ($P = 0.11, 0.11$, and 0.87 , respectively) at 48 h after oral treatment. Such measurement of relevant biochemical indicators at different time points after oral gavage administration of the “pathogen” allowed for the preliminary identification of rats with Haff-like disease on the basis of abnormal indicator values. These results provide a scientific basis for the rapid

引文格式:

邹旋, 常群群, 戴余雷, 等. 小龙虾头与尾匀浆灌胃诱发 SD 大鼠哈夫病样损害[J]. 现代食品科技, 2020, 36(8): 373-378

ZOU Xuan, CHANG Qun-qun, DAI Yu-lei, et al. Induction of Haff disease-like injury in SD rats by oral gavage administration of crayfish head and tail homogenates [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 373-378

收稿日期: 2020-06-04

基金项目: 深圳市医疗卫生三名工程项目(SZSM201611090); 广东省自然科学基金项目(2017A030310617)

作者简介: 邹旋(1972-), 男, 主治医师, 研究方向: 疾病预防控制

通讯作者: 何玲(1978-), 女, 主治医师, 研究方向: 急诊医学

diagnosis of Haff disease induced by crayfish consumption and for the elucidation of the disease pathogenesis.

Key words: crayfish; Haff disease; Sprague-Dawley rats

哈夫病 (haff disease) 是横纹肌溶解 (rhabdomyolysis, RM) 综合征的一种, 通常由于食用甲壳类食物、淡(海)水鱼等之后 24 h 内出现的不明原因的骨骼肌细胞破损, 肌酸激酶 (creatinase, CK)、肌酸激酶同工酶 (creatinase MB, CK-MB)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、肌红蛋白 (myoglobin, MYO) 等内容物进入血液中的多种病理性改变综合征^[1], 临床表现主要为肌肉疼痛、压痛、肿胀及无力等, 同时可能伴有发热、全身乏力、尿色改变、胸闷、胸痛等表现。患者的 CK 和 CK-MB 在横纹肌溶解时可大量释放进入血液, 因此被作为诊断哈夫病的重要指标^[2,3]。距离哈夫病最初于 1924 年在泻湖区被发现已有 90 多年。1924 年前后, 柯尼斯堡沿岸泻湖区 (今俄罗斯加里宁格勒) 出现了哈夫病的流行, 调查后发现患者大部分食用了鳗鱼^[4]。我国于 2000 年 8 月在北京出现第一例哈夫病病例, 同时也是首例出现在亚洲地区的病例, 其后的病例主要出现在江苏省和安徽省, 安徽省 2016 年出现该病的大暴发^[5,6]。2016 年, 广东省发现 48 例小龙虾相关哈夫病病例^[7]。此外, 针对哈夫病相关水产品生物学特性的研究提示, 哈夫病相关水产品相似的生物学特性提示致病因子存在于外环境中, 水产食物可能只是致病因子的载体或媒介^[8]。到目前为止, 除了小龙虾之外, 涉及到进食煮熟导致哈夫病的水产品还包括, 梭鱼, 大口胭脂鱼, 鳙鱼, 大西洋鲑鱼以及淡水鲢鱼等。2016 年 7 月份开始, 深圳各医院相继收治小龙虾致 RM 病例, 本研究选择深圳某医院收治患者进行回顾性分析, 并使用患者食用的同源小龙虾, 将其头尾分离后经适当处理, 分别用头部 (肝胰腺) 与虾肉对 SD 大鼠进行灌胃处理, 观察并检测相关指标, 为食用小龙虾导致哈夫病的快速诊断及其致病机理提供科学线索。

1 材料与方法

1.1 受试物与实验动物

收集某医院收治哈夫病确诊患者同一起来源的小龙虾, 高温煮熟后, 去壳得到的肝胰腺和虾肉。SPF 级 SD 大鼠 216 只, 雌雄各半, 体重 160 g~180 g, 购自广东省医学实验动物中心 (许可证号: SCXK (粤) 2018-0002); 动物饲养于深圳市疾病预防控制中心 SPF 级动物实验中心 (许可证号: SYXK (粤) 2015-0068), 房间保持 12 h 昼夜节律, 动物自由进食

和饮水, 相对湿度为 40%~70%, 温度 20~26 ℃。动物实验方案通过深圳市疾病预防控制中心实验动物福利伦理委员会的审查。

1.2 主要仪器设备

BP1211S 型电子天平, 德国 Sartorius; HVE-50 型高压灭菌锅, 日本 HIRAYAMA; 7180 全自动生化分析仪, 日立 HITACHI; SIM-F140AY65 型制冰机, 日本 SANYO; BIOCOL 超纯水系统装置, 美国 Millipore; SUT-6120 热空气消毒箱, 德国 Heraeus; 5702 小型台式离心机, 德国 Eppendorf; 超声破碎仪, 中国上海精密实验设备厂; MS2 型涡旋震荡仪, 德国 IKA Works。

1.3 主要试剂

肌酸激酶 (CK) 试剂盒、肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 试剂盒、乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒、谷丙转氨酶 (ALT) 试剂盒、谷草转氨酶 (AST) 试剂盒、尿素 (UREA) 试剂盒和肌酐 (CRE) 试剂盒均购自上海科华有限公司; 玉米油, 美国 Sigma。

1.4 实验方法

1.4.1 小龙虾样品处理

哈夫病患者食用的同源小龙虾高温煮熟后, 去壳分为小龙虾头 (肝胰腺)、尾 (虾肉) 两部分, 按照最大灌胃剂量 10 g/kg 大鼠体重计算灌胃量, 按照灌胃标准 0.2 mL/10 g 加入一定量玉米油, 超声破碎使样品完全溶于玉米油中。

1.4.2 实验动物分组及处理

每次实验的 SD 大鼠 72 只 (实验重复 3 次), 雌雄各半, 常规分笼后适应性饲养 3 d, 在适应性饲养期间自由饮食。适应性饲养结束后, 随机分为 3 组, 每组 24 只, 雌、雄各半。使用经处理后的样品进行灌胃, 灌胃前大鼠禁食 16 h, 灌胃剂量为 10 g/kg, 分成肝胰腺组、虾肉组和空白对照组, 正常饲养, 观察 48 h。

1.4.3 样品收集

灌胃后, 每组分别在 6、12、24、48 h 收集血液和尿液, 每个时间点分别取各组实验大鼠 6 只, 雌、雄各半, 用 7% 水合氯醛腹腔注射麻醉。腹腔静脉取血, 每次取血 1 mL, 4000 r/min 离心 10 min, 取血清进行生化分析。

1.4.4 生化指标测定

全自动生化分析仪检测生化指标, 包括肌酸激酶

(CK)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、乳酸脱氢酶 (LDH)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、尿素 (UREA)、肌酐 (CRE)。

1.4.5 数据处理与分析

运用 Excel 表对各项测定指标和相关数据进行统计、排序、归类并转换成统计表或统计图进行分析。

2 结果与讨论

本研究旨在探讨食用小龙虾头与尾匀浆在哈夫病相关重要生化指标变化中的作用。通过采集深圳某医院哈夫病患者食用小龙虾同一来源样本，高温处理后对 SD 大鼠进行灌胃处理。分别观察灌胃后 12 h、24 h 及 48 h 后 SD 大鼠一般情况及血清中相关生化指标。结果显示，相比对照组，肝胰腺与虾肉灌胃 24 h 与 48 h 后，大鼠偶有出现精神萎靡及行为异常，尿液出现浑浊且颜色变深；血清中 CK、CK-MB 和 LDH 出现异常的大鼠数量增加。实验结果表明食用病源小龙虾可诱导 SD 大鼠出现哈夫病特征，为食用小龙虾导致哈夫病的快速诊断及其致病机理提供数据基础。

哈夫病自在我国出现以来，已在江苏、安徽等地暴发过该病的流行^[5,6]。Li 等^[7]对我国 2016-2017 年与小龙虾相关的哈夫病病例进行回顾性分析，研究结果表明我国哈夫病主要集中在长江中下游；发病具有明显的季节性，夏季为高发季节；患者年龄以 20~49 岁为主，女性多于男性。Guo 等^[9]在南京进行了一项病例对照研究，对研究对象的饮食历史、疾病史等因素进行分析，发现食用小龙虾与疾病发病风险之间存在关联。

2.1 一般情况观察

课题组前期对深圳市某医院 2016 年 7-9 月收治的哈夫病病人的基本情况总结发现，病人皆符合 RM 的诊断标准。韩丽岚等^[10]的研究发现，患者发病与否与其食用小龙虾的量相关。但是，食用小龙虾的头与

尾匀浆在对哈夫病重要生化诊断指标值的变化中的作用目前仍不明晰，故本研究收集病人食用同一来源小龙虾，经处理后，肝胰腺、虾肉分别以最大灌胃剂量为 10 g/kg 进行实验。由于实验过程中存在动物打架、灌胃后出现不良反应等情况，3 次实验共意外死亡 8 只，其中对照组 1 只，肝胰腺组 7 只，动物有打架所致外伤，解剖未发现其他可能致死原因。

实验开始时，所有大鼠精神状态良好，无异常表现，对外部刺激反应正常，动作敏捷，体重正常增加，尿液颜色无异样变化。分别用小龙虾肉与肝胰腺对大鼠灌胃处理，6 h 后，所有大鼠对外部刺激反应与体重无明显变化，尿液颜色较澄清；12 h 后，小龙虾肉与肝胰腺灌胃组大鼠各有 1 只大鼠出现好动症状，其余指征无明显改变；24 h 后，肝胰腺灌胃组大鼠死亡 4 只，2 只精神萎靡，且该组大鼠出现酱色尿液，虾肉灌胃大鼠精神状态、活动量正常，尿液颜色轻微浑浊；48 h 后，肝胰腺灌胃组大鼠又死亡 3 只，尿液颜色由酱色变为轻微浑浊，虾肉灌胃组有 3 只大鼠表现出烦躁不安，在行为上出现多攀爬与跳跃的动作，体重平均增长约 3 g，尿液颜色由轻微浑浊变为酱色（图 1）。

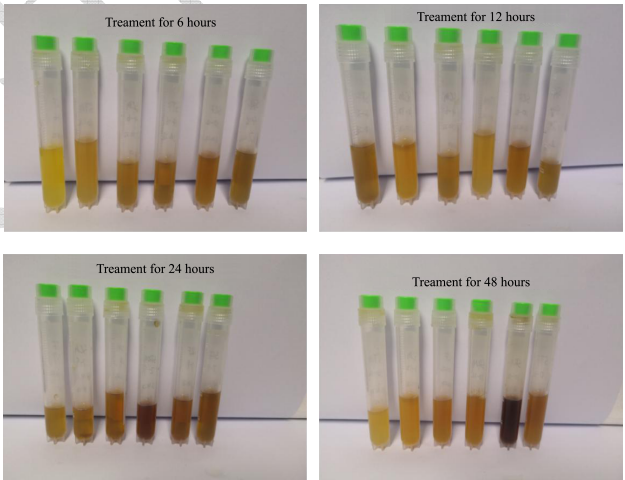


图 1 灌胃后动物尿液外观变化

Fig.1 Changes in the appearance of animal urine after gavage

表 1 灌胃 24 h 后各组大鼠部分检测指标的比较

Table 1 Comparison of partial detection indexes in serum of SD rats after gavage 24 hours (n=51, replicates=3)

检测指标/组	对照组	肝胰腺组	虾肉组	F	p value
ALT	43±9.7	40±6.5	44±10.4	0.66	0.52
AST	89±19.9	91±27.1	87±18.8	0.10	0.90
BUN	5±0.9	5±0.75	5±0.7	0.17	0.84
CREA	36±9.9	35±9.83	36±9.2	0.05	0.95
CK	613±220.6	724±401.3	623±304.5	0.66	0.52
CK-MB	509±196.1	650±491.8	520±295.3	0.89	0.42
LDH	1044±672.8	1503±1487.2	958±640.7	1.48	0.24

注：n 为参与统计的动物数量，replicates 为实验重复次数，下同。

表 2 灌胃 48 h 后各组大鼠部分检测指标的比较

Table 2 Comparison of detection indexes in serum of SD rats after gavage 48 hours (n=50, replicates=3)					
检测指标/组	对照组	肝胰腺组	虾肉组	F	p value
ALT	682±200	742±495	894±524	1.16	0.32
AST	509±205	463±258	748±559	2.93	0.06
BUN	867±529	936±605	1612±1419	3.38	0.04
CREA	32±8	35±8	35±8	0.91	0.41
CK	78±12	78±14	91±30	2.34	0.12
CK-MB	505±204	506±236	748±543	2.33	0.11
LDH	887±522	1005±590	1612±1379	2.81	0.07

2.2 一般情况观察灌胃后 SD 大鼠血清中 ALT、AST 以及 CREA 生化指标明显改变

灌胃 24 h 及 48 h 后，分别取血样检测生化指标。结果表明，虾肉灌胃组与肝胰腺灌胃组大鼠中，ALT、AST 以及 CREA 相比对照组均无明显改变。如表 1、表 2。

2.3 肝胰腺灌胃 24 h、虾肉灌胃 48 h 后血清 CK

水平异常的大鼠数量增加

对各组大鼠的肌酸激酶（CK）水平进行检测，结果显示，24 h 肝胰腺组大鼠血清中 CK 值出现超过对照组 2 倍标准差（613±220.6）的异常值（ $p=0.52$ ）；48 h 虾肉组大鼠血清中 CK 值出现超过对照组 2 倍标准差（78±12.5）的异常值（ $p=0.11$ ）。其余组的指标变化不规律，如图 2。

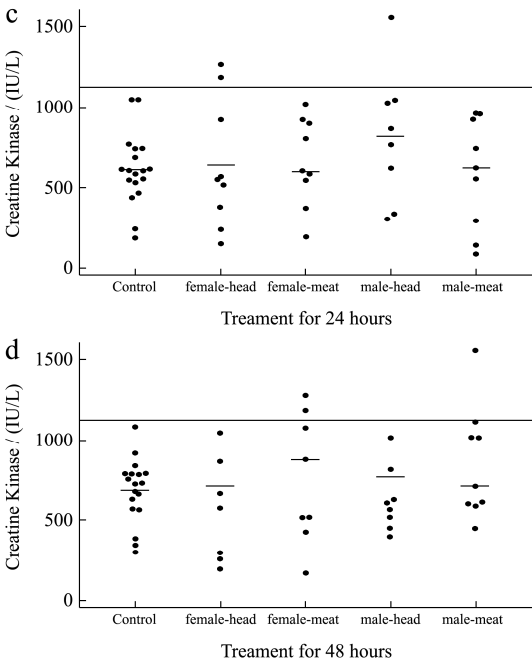
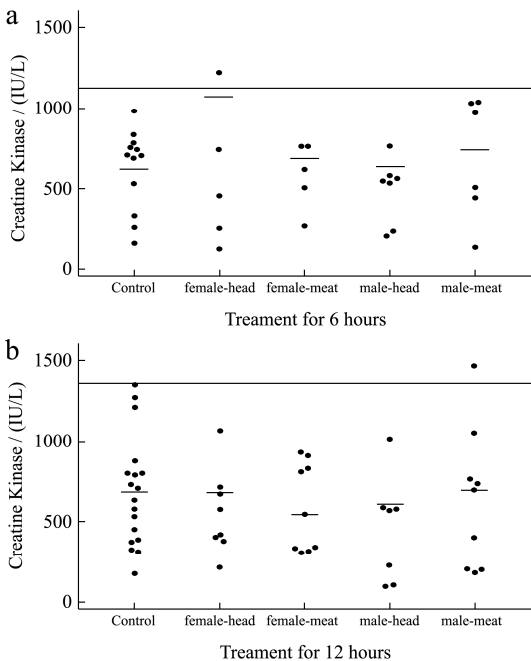


图 2 用小龙虾灌胃后 SD 大鼠血清中 CK 值变化
Fig.2 Changes of CK in serum of SD rats after gavage with crayfish

注：红色横线为对照组 2 倍标准差，蓝色线代表每组平均值。X 轴顺序，Control：对照组；female-head：肝胰腺组雌性大鼠；female-meat：虾肉组雌性大鼠；male-head：肝胰腺组雄性大鼠；male-meat：虾肉组雄性大鼠。Treatment for 6 hours: n=36; Traement for 12 hours n=53; Traement for 24 hours n=51; Traement for 48 hours n=50。

2.4 肝胰腺灌胃 24 h、虾肉灌胃 48 h 后血清

CK-MB 水平异常的大鼠数量增加

对各组大鼠的肌酸激酶同工酶（CK-MB）水平进行检测，结果显示，24 h 肝胰腺组大鼠血清中 CK-MB 值出现超过对照组 2 倍标准差（509±196.1）的异常值（ $p=0.42$ ）；48 h 虾肉组大鼠血清中 CK-MB 值出现超过对照组 2 倍标准差（78±12.5）的异常值（ $p=0.11$ ）。

其余组的指标变化不规律。如图 3。

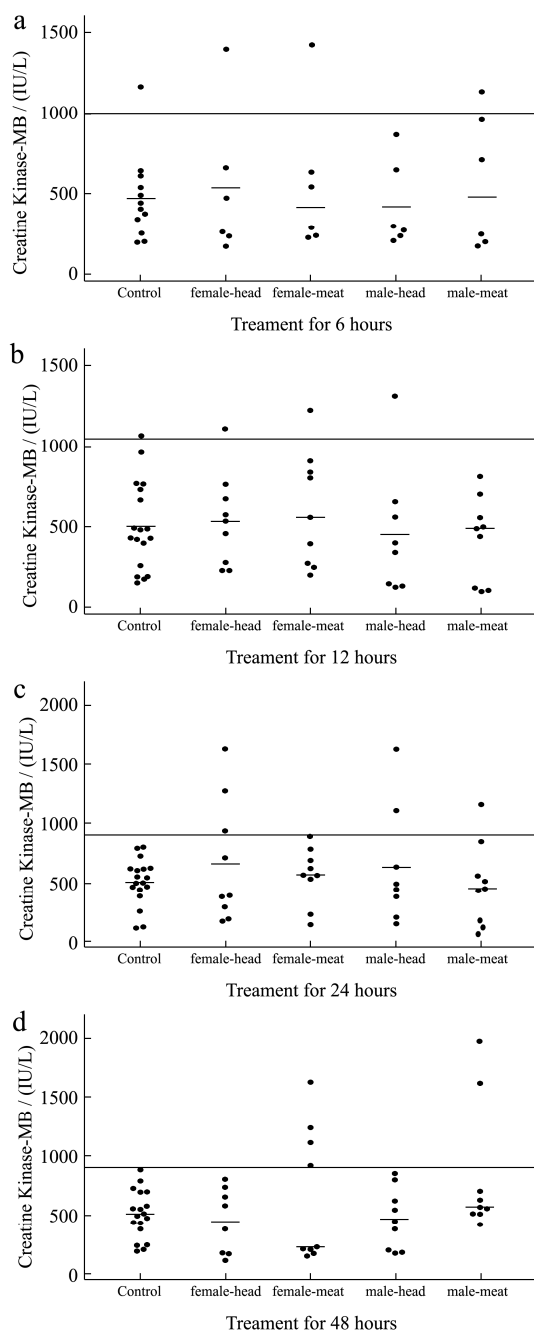


图 3 用小龙虾灌胃后 SD 大鼠血清中 CK-MB 值变化

Fig.3 Changes of CK-MB in serum of SD rats after gavage with crayfish

注：红色横线为对照组 2 倍标准差，蓝色线代表每组平均值。X 轴顺序同上图。Treatment for 6 hours, n=36; Treatment for 12 hours, n=53; Treatment for 24 hours, n=51; Treatment for 48 hours, n=50。

2.5 肝胰腺灌胃 24 h、虾肉灌胃 48 h 后血清

LHD 水平异常的大鼠数量增加

对各组大鼠乳酸脱氢酶 (LDH) 水平进行检测，

结果显示，24 h 肝胰腺组大鼠血清中 LDH 值出现超过对照组 2 倍标准差(1044±672.8)的异常值($p=0.24$)；48 h 虾肉组大鼠血清中 LDH 值出现超过对照组 2 倍标准差 (954±694.2) 的异常值 ($p=0.87$)。其余组的指标变化不规律。如图 4。

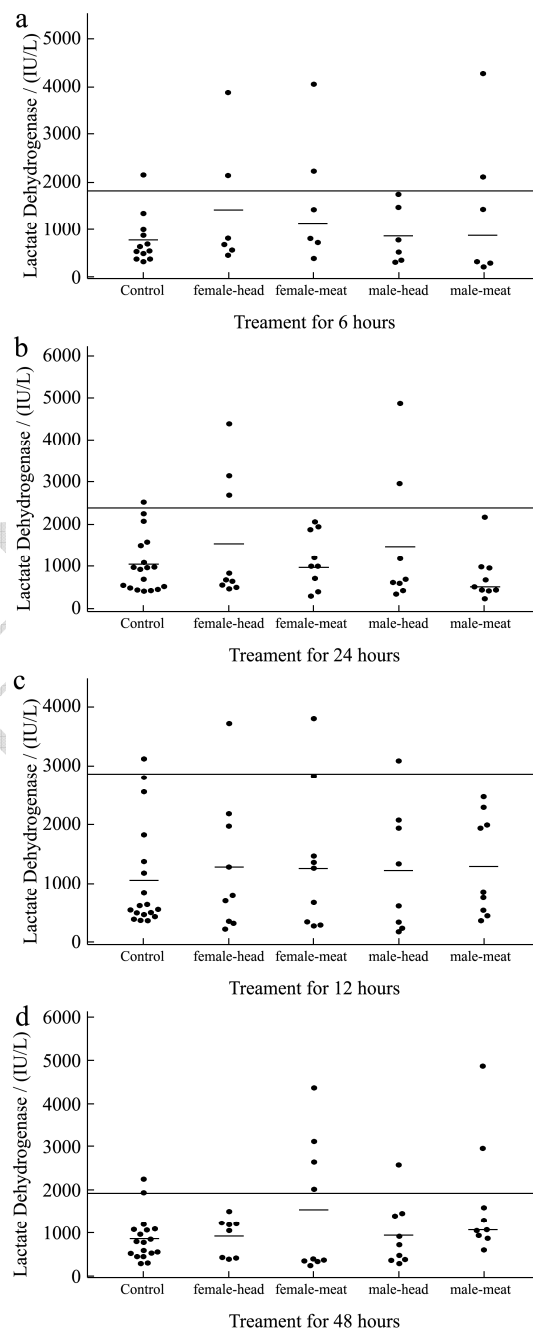


图 4 用小龙虾灌胃后 SD 大鼠血清中 LDH 变化

Fig.4 Changes of LDH in serum of SD rats after gavage with crayfish

注：红色横线为对照组 2 倍标准差，蓝色线代表每组平均值。X 轴顺序同上图。Treatment for 6 hours, n=36; Treatment for 12 hours, n=53; Treatment for 24 hours, n=51; Treatment for 48 hours, n=50。

实验数据分析显示哈夫病重要诊断指标 CK、

CK-MB、LDH 的变化具有规律性,即 24 h 肝胰腺组雌、雄鼠均出现异常值,48 h 后虾肉组雌、雄鼠亦均发现有指标异常的大鼠,表明食用小龙虾肝胰腺和虾肉均可在 SD 大鼠体内引起哈夫病相关生化指标的变化,但二者指标出现差异的时间不同,肝胰腺会更早在大鼠体内引起相关指标升高。病人一般情况调查发现,所有患者均有进食“虾黄”(肝胰腺)史,食用小龙虾至发病时间为 2~24 h;动物实验发现,虾肝胰腺灌胃大鼠 24 h 后可在其体内引起相关指标异常升高,与病例回顾分析结果存在一定的一致性。而梁婕等^[11]以最大灌胃剂量进行对 SD 大鼠分别进行虾肝胰腺与虾肉处理后分析其急性毒性作用,结果显示部分生化指标改变,但未发现超出对照组参考范围的指标。与之相比,本研究发现虾肝胰腺与虾肉均可导致少数个体 CK、CK-MB 以及 LDH 等指标超出对照组 2 倍标准差范围,因此具有一定现实意义。黄琼等^[12]的流行病学调查结果亦表明,大量进食小龙虾肝胰腺引起的发病更为常见,但本研究中研究结果显示不同性别动物在食用小龙虾头与尾匀浆后一般情况观察和生化指标均无明显差异。据报道,2010 年南京鼓楼医院、江苏省人民医院等陆续收治多名因食用小龙虾致哈夫病患者,并在 4~13 h 内出现一过性的临床症状,是当时受到南京市政府高度重视的一起食品安全事故^[13]。而通过此次事件食品安全近期再次成为社会焦点,甚至有学者建议将食品安全保障纳入刑法^[14]。

2009 年颁布的《中华人民共和国食品安全法》规定了食品安全风险评估制度,对食品、食品添加剂中化学性、物理性和生物性危害进行风险评估。因此,对于哈夫病的防治,我们应该运用科学方法,根据食品安全风险监测信息、科学数据以及其他有关信息来开展工作。而食品安全风险评估的结果是用来制定、修订食品安全标准(包括哈夫病相关因素)和对食品安全实施监督管理的科学依据。从该意义上讲,如果食品中尽管含有一定量的有毒污染物,但其水平在国家食品安全标准以下的话,就说明这种食品是相对安全的,其风险可以接受。

3 结论

本研究通过给 SD 大鼠灌胃哈夫病患者食用的同来源小龙虾,部分大鼠的哈夫病重要诊断指标 CK、CK-MB、LDH 出现上升,该结果与临床病人特征类似,可为后续进行疾病生物标志物筛选和分子机制研究提供基础。

参考文献

- [1] Herman L L, Bies C. Haff disease: rhabdomyolysis after eating buffalo fish [J]. West J Emerg Med, 2014, 15(6): 664-666
- [2] 唐吉刚.横纹肌溶解症及其研究进展[J].实用医药杂志, 2011,28(10):937-939
TANG Ji-gang. Rhabdomyolysis and its research progress [J]. Prac J Med & Pharm, 2011, 28(10): 937-939
- [3] Luck RP, Verbin S. Rhabdomyolysis: a review of clinical presentation, etiology, diagnosis, and management [J]. Pediatr Emerg Care, 2008, 24(4): 262-268
- [4] Assmann H, Bielenstein H, Habs H, et al. Beobachtungen und untersuchungen bei der haffkrankheit 1932 [J]. Dtsch Med Wochenschr, 1933, 59(4): 122-126
- [5] 袁云,陈清棠.蜷蛄致 Haff 病 6 例临床分析[J].中华医学杂志,2001,81(24):1530-1531
YUAN Yun, CHEN Qing-tang. Clinical analysis of 6 cases of Haff disease caused by craycricket [J]. Natl Med J China, 2001, 81(24): 1530-1531
- [6] 唐晓飞,沈馨茹,钱光荣,等.小龙虾相关横纹肌溶解综合征 90 例临床分析[J].安徽医学,2017,38(5):595-597
TANG Xiao-fei, SHEN Xin-ru, QIAN Guang-rong, et al. Rhabdomyolysis after cooked crayfish consumption: clinical analysis of 90 cases [J]. Anhui Medical Journal, 2017, 38(5): 595-597
- [7] Li Bai, Mingjing Xu, Weiwei Li, et al. Retrospective case analysis of crayfish-transmitted Haff disease in China during 2016-2017 [J]. Food Control, 2019, 104: 181-186
- [8] 黄诗淳,欧阳英英,李阳.哈夫病相关水产品及其生物学特性[J].公共卫生与预防医学杂志,2019,30(1):92-95
HUANG Shi-chun, OUYANG Ying-ying, LI Yang. Biological characteristics of aquatic products associated with Haff disease [J]. J of Pub Health and Prev Med, 2019, 30(1): 92-95
- [9] Guo B, Xie G, Li X, et al. Outbreak of Haff disease caused by consumption of crayfish (*Procambarus clarkii*) in Nanjing, China [J]. Clin Toxicol (Phila), 2019, 57(5): 331-337
- [10] 韩丽岚,徐荣靖.南京“小龙虾事件”调查处理分析[J].中国卫生监督杂志,2012,19(1):75-78
HAN Li-lan, XU Rong-jing. Investigation and analysis of "Crayfish Incident" in Nanjing [J]. Journal of Chinese Health Supervision, 2012, 19(1): 75-78

(下转第 233 页)