

乙苯亚慢性吸入染毒大鼠肝毒性效应的研究

张明¹, 王延让¹, 杨德一¹, 王倩²

1. 天津市疾病预防控制中心职业病预防控制所 天津 300011 2. 天津市医药科学研究所

摘要: 目的 观察亚慢性吸入染毒乙苯对大鼠肝组织的氧化应激损伤。方法 将 40 只健康 3 周龄 SPF 级 Sprague-Dawley 雄性大鼠随机分为 4 组, 分别为对照(新鲜空气)组和低(433.5 mg/m³)、中(4 335 mg/m³)和高(6 500 mg/m³)剂量乙苯染毒组, 每组 10 只。大鼠以笼养方式放入 HOPE-MED 8050A 型动式染毒柜内, 采用吸入方式进行染毒, 每天 6 h, 每周 5 d, 连续染毒 13 周。用 Beutler 改良法测定肝组织还原型谷胱甘肽(GSH)含量, 用 TBA 比色法测定肝组织丙二醛(MDA)含量, 在常规显微镜和超显微镜下观察肝组织结构变化。结果 与对照组相比, 各剂量乙苯染毒组大鼠肝组织 MDA 含量升高, GSH 含量均降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。且随着乙苯染毒剂量的升高, 大鼠肝组织 MDA 含量呈上升趋势, GSH 含量呈下降趋势。乙苯染毒大鼠肝组织出现肿胀、坏死、部分组织溶解等病理变化, 肝细胞呈现核皱缩、线粒体空泡等凋亡形态学特征。结论 亚慢性吸入染毒乙苯可诱导大鼠肝组织氧化损伤和细胞凋亡。

关键词: 乙苯; 肝脏; 细胞凋亡; 氧化应激

中图分类号: R994.6 文献标志码: A 文章编号: 1001-5914(2012)09-0810-04

Hepatotoxic effect in rat after subchronic inhalation of ethylbenzene ZHANG Ming*, WANG Yan-rang, YANG De-yi, WANG Qian. *Institute of Occupational Disease Control and Prevention, Tianjin Centers for Disease Control and Prevention, Tianjin 300011, China

Corresponding author: WANG Yan-rang, E-mail: wangyanrang@126.com

Abstract **Objective** To investigate the effects of sub-chronic inhalation of ethylbenzene on oxidative stress in liver tissues of rat. **Methods** Forty healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups: control group, low dose group, moderate dose group and high dose group, and inhaled daily with different doses of ethylbenzene: 0, 433.5, 4 335 and 6 500 mg/m³, 6 h per day, five days per week for 13 consecutive weeks. The contents of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in liver tissues were determined, and the pathological and ultrastructure examination were conducted. **Results** Compared with the control group, the content of MDA increased and GSH content decreased significantly in ethylbenzene-treated groups ($P < 0.05$). Significant morphological abnormality was seen in liver in ethylbenzene-treated groups characterized by swelling, necrosis and lysis, as well as apoptotic morphological changes including nuclear condensation. Mitochondria appeared swollen with vacuolar structure and loss of cristae. **Conclusion** Sub-chronic inhalation of ethylbenzene can induce oxidative stress and apoptosis in rat liver tissues.

Key words: Ethylbenzene; Liver; Apoptosis; Oxidative stress

乙苯在工业上是通过苯与乙烷的烷化工序合成, 主要用于苯乙烯的生产。大量研究表明, 接触大剂量乙苯可引起听力下降、肝肾实质性损伤, 严重者可诱发肿瘤^[1-4]。国际癌症研究机构(IARC)将乙苯归为人类可疑的致癌物(2B)^[5]。目前, 乙苯诱发肿瘤的作用机制尚不清楚。但既往研究中, 凡具有良好的实验设计及剂量控制的乙苯毒作用研究, 无论体外试验、动物试验, 还是人群流行病学研究结果均显示, 其遗传毒性结果皆为阴性^[6-7]。提示乙苯可能通过非遗传毒性作用途径发挥毒效应。本研究拟通过亚慢性乙苯吸入染毒动物模型, 探讨乙苯非遗传毒作用模式(氧化损伤、凋亡等)在其肝毒性机制中的作用, 为乙苯职业暴露人群的防护和易感人群的筛选提供实验依据。

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目(07JCZDJC08500; 09JCZDJC20900); 天津市科技支撑重点项目(11ZCGYSY02100); 天津市疾病预防控制中心科技基金项目(CDCKY0902)
作者简介: 张明(1981-), 男, 主管医师, 从事职业毒理学研究。
通讯作者: 王延让, E-mail: wangyanrang@126.com

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 Model 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司), HOPE-MED 8050A 型动式染毒柜(天津合普公司)。

乙苯(分析纯, 天津化学试剂公司), 还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, TUNEL 试剂盒(德国 Merk-Calbiochem 公司)。

乙苯染毒气体的制备: 乙苯通过雾化器混合空气逸入 HOPE-MED 8050A 型动式染毒柜中, 后经管道收集、排放。染毒柜内保持 3 mm 水以避免毒物外泄, 每 3 h 采样 1 次, 采用气相色谱法监测染毒柜内的乙苯浓度, 适当校正气体流量以适应染毒浓度。

1.2 乙苯动式染毒动物模型的建立 选择健康 3 周龄 SPF 级 Sprague-Dawley 雄性大鼠 40 只, 体重为 60~75 g, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 动物

合格证号 SCXK-(军)2007-004。动物房温度为(22.5±1.0)℃,相对湿度为(52±3)%。试验期间,动物禁止摄食及饮水。

将实验动物随机分为 4 组,分别为对照(新鲜空气)组和低(433.5 mg/m³)、中(4 335 mg/m³)和高(6 500 mg/m³)剂量乙苯染毒组,每组 10 只。大鼠以笼养方式放入 HOPE-MED 8050A 型动式染毒柜内,采用吸入方式进行染毒,每天 6 h,每周 5 d,连续染毒 13 周。每天测量并记录大鼠体重。

1.3 肝组织重量及其脏器系数的测定 染毒结束后,颈椎脱臼处死大鼠,迅速分离肝组织,称重,并计算肝组织系数(肝组织系数=肝组织重量/体重×100%)。

1.4 肝组织内 GSH、MDA 含量的测定 将一部分肝组织匀浆加入 0.5 ml 细胞裂解液(含 0.121%的 Tris, 0.372%的 EDTA,1%的 Triton-100,0.4%的 SDS),4℃裂解 2 h 以上,以 2 000×g 离心 5 min,吸出上清,每组设 3 个平行。采用 Beutler 改良法测定 GSH 含量,采用 TBA 比色法测定 MDA 含量,采用考马斯亮蓝染色法测定蛋白含量。

1.5 肝组织病理学观察 一部分肝组织经 10%的福

尔马林固定液中固定 12 h,经上行乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后切成 5 μm 切片,进行 HE 染色后于光镜下观察肝组织病理学变化。

1.6 肝组织电镜超微结构观察 肝组织先后经质量分数为 2.5%的戊二醛、1%四氧化锇固定,上升梯度乙醇脱水,环氧丙烷过渡,Epon812 包埋,50 nm 超薄切片,乙酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色,透射电子显微镜观察肝组织超微结构,Megaview 数字化电镜摄影系统拍照。

1.7 统计学方法 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 进行表示。采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析(One Way ANOVA)。进一步进行组间两两比较时,若方差齐时,采用 SNK 检验(Student-Newman-Keuls 法);若方差不齐时,采用 Games-Howell 检验。率间的比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体重的测定结果 乙苯染毒大鼠体重的变化见表 1。

表 1 乙苯染毒对大鼠体重的影响($n=10, \bar{x} \pm s, g$)

浓度(mg/m ³)	染毒前	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周
0	70.85±6.88	105.23±10.02	157.46±11.40	202.20±11.05	256.83±18.30	312.69±25.88	323.72±26.39
433.5	70.69±6.71	105.52±6.89	161.56±9.64	211.89±14.11	240.89±13.87	301.44±16.65	313.94±14.21
4 335	70.89±6.08	102.93±8.32	151.18±5.66	195.33±3.74	245.37±4.95	302.76±8.40	311.30±9.11
6 500	70.33±5.47	108.99±9.58	161.62±12.84	234.21±63.11	263.79±12.60	325.60±12.44	336.27±18.27
浓度(mg/m ³)	第 7 周	第 8 周	第 9 周	第 10 周	第 11 周	第 12 周	第 13 周
0	358.47±33.51	382.53±38.93	400.98±36.15	418.28±41.67	429.16±25.10	451.97±33.03	433.61±43.32
433.5	318.34±15.07	348.89±17.08	380.80±46.34	385.82±34.76	391.42±34.91	402.53±25.21	408.04±24.17 ^a
4 335	311.96±20.57	350.50±20.91	373.82±23.31	394.84±19.23	396.79±19.19	404.98±17.75	414.24±22.87 ^a
6 500	373.64±24.58	400.90±30.78	419.92±22.16	440.32±23.14	434.21±22.52	452.53±25.21	467.20±54.98 ^a

注:^a与对照(0 mg/m³)组比较 $P < 0.05$ 。

与对照组比较,中、低剂量乙苯染毒组大鼠体重较低,高剂量乙苯染毒组体重较高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 大鼠肝组织重量及其脏器系数的测定结果 乙苯染毒大鼠肝组织重量及其脏器系数的变化见表 2。

表 2 乙苯染毒对大鼠肝组织重量及其脏器系数的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

浓度(mg/m ³)	重量(g)	脏器系数(%)
0	12.03±1.66	2.80±0.48
433.5	11.75±1.68	2.88±0.32
4 335	12.75±0.86	3.08±0.19
6 500	12.67±1.14	2.71±0.19

各剂量乙苯染毒组大鼠的肝脏重量及其脏器系数与对照组比较,差异均无统计学意义。

2.3 大鼠肝组织内 MDA、GSH 含量的测定结果 乙苯染毒大鼠肝组织 MDA、GSH 含量的变化见表 3。

表 3 乙苯染毒对大鼠肝组织 MDA、GSH 含量的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

浓度(mg/m ³)	MDA 含量(nmol/mg Pro)	GSH 含量(mg/g Pro)
0	1.99±0.92	22.72±3.95
433.5	3.97±1.55 ^a	16.00±2.51 ^a
4 335	7.74±1.95 ^a	13.80±2.94 ^a
6 500	12.85±2.64 ^a	8.43±2.04 ^a

注:^a与对照组比较 $P < 0.05$ 。

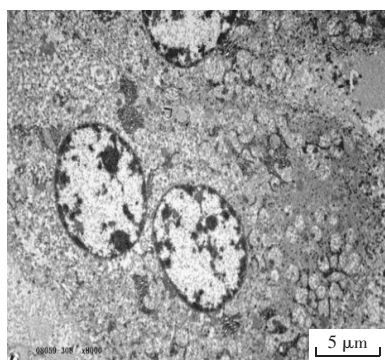
与对照组相比,各剂量乙苯染毒组大鼠肝组织 MDA 含量均升高,GSH 含量均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。且随着乙苯染毒剂量的升高,大鼠肝组织 MDA 含量呈上升趋势,GSH 含量呈下降趋势。

2.4 大鼠肝组织病理学观察结果 乙苯染毒大鼠肝组织病理变化见封三图 1。

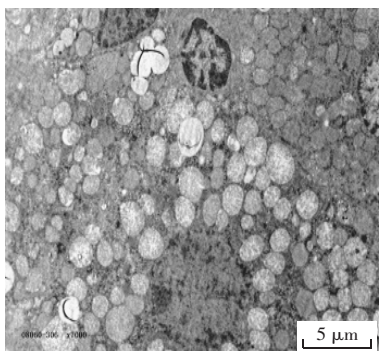
与对照组(封三图 1A)相比,高剂量乙苯染毒组大鼠肝组织出现细胞肿胀、坏死,细胞间界限不清等病理学变化(封三图 1B)。

2.5 大鼠肝组织超微结构观察结果 对照组肝细胞多边形,排列成肝细胞板,核圆形或卵圆形,居中;胞质内粗面内质网与线粒体结构清晰可辨。线粒体卵圆形,板层状嵴,基质中等偏上的电子密度。间质内可见枯否细胞和贮脂细胞。见图 2A。

高剂量乙苯染毒组肝窦瘀血,呈放射状分布。部分肝细胞损伤明显,线粒体普遍受损,多数线粒体肿胀,体积增大,电子密度变低,嵴结构模糊不清,方向紊乱,部分线粒体膜降解,形成大空泡,呈现典型的凋亡表现。局部肝组织的膜性结构降解,使成为结构模糊。见图 2B。



A 对照组



B 高剂量组

图 2 乙苯染毒大鼠肝组织超微结构的改变

3 讨论

正常情况下,生物体拥有一套完整而复杂的抗氧化系统,可及时有效地清除各种亲水性和亲脂性自由基,保护机体免受氧化损伤,GSH 作为主要的非酶性抗氧化物质起着关键的作用。当机体处于氧化应激状态时,由于自由基生成增多,消耗大量抗氧化酶和非酶性抗氧化物质,机体组织脂质过氧化水平升高,引起多种生物大分子结构和功能的改变,对机体造成损伤^[8]。MDA 是脂质过氧化产物,是反映机体氧化损伤的最具代表性的指标之一。本试验结果显示,与对照组相比,各剂量组大鼠肝组织 MDA 含量均升高,GSH 含量均降低,差异有统计学意义($P<0.05$);且随着乙苯染毒剂量的升高,大鼠肝组织 MDA 含量呈上升趋势,GSH 含量呈下降趋势。表明一定剂量的乙苯可引起大

鼠肝组织氧化损伤。

氧化损伤与乙苯毒性作用之间的关系已见相关研究。Yuan 等^[9]研究发现,乙苯可以上调细胞色素 P450 (CYP 450) 家族的表达。Serron 等^[10]通过单次注射乙苯观察大鼠肝脏自由基的产生,发现乙苯可通过上调和阻遏 CYP 类蛋白,经过氧化氢介导,生成大量自由基。乙苯的毒作用也有可能氧化损伤对肝内代谢酶的直接诱导有关。但目前,体外遗传毒性实验由于其对 CYP 表达变化的低敏感性,不能检测到 CYP 蛋白水平变化所介导的自由基损伤效应。此外,Midorikawa 等^[11]研究认为,乙苯通过生成其他代谢产物(如 3-乙苯酚和 4-乙苯酚),进一步被代谢为环状二羟基化代谢物,从而诱发氧化损伤。本研究从抗氧化酶系统、氧化应激产物等多层次佐证了氧化损伤在乙苯诱导肝毒性中的作用。

细胞凋亡是相关基因调控下按照一定的程序进行的细胞死亡,故又称程序性死亡(programmed cell death,PCD)^[12]。线粒体是细胞生命活动的生理基础,是对各种损伤最为敏感的细胞器之一。线粒体在细胞损伤时最常见的病理改变为线粒体数量和结构的改变。本次研究发现,高剂量乙苯可导致大鼠肝细胞核皱缩,线粒体肿胀,嵴结构模糊不清,方向紊乱,部分线粒体膜降解,有的成为大空泡。这表明,线粒体为乙苯细胞毒作用的位点之一,其凋亡可能在乙苯肝损伤机制中起一定作用。

综上所述,乙苯可导致大鼠肝组织氧化损伤和细胞凋亡,这可能是其肝毒性作用机制之一,但具体作用途径有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Mellert W, Deckardt K, Kaufmann W, et al. Ethylbenzene 4- and 13-week rat oral toxicity[J]. Arch Toxicol, 2007, 81: 361-370.
- [2] Cappaert NL, Klis SF, Muijsers H, et al. The ototoxic effects of ethylbenzene in rats[J]. Hear Res, 1999, 137: 91-102.
- [3] Cappaert NL, Klis SF, Baretta AB, et al. Ethylbenzene-induced ototoxicity in rats: a dose-dependent mid-frequency hearing loss [J]. J Assoc Res Otolaryngol, 2000, 1: 292-299.
- [4] Hard GC. Significance of the renal effects of ethylbenzene in rodents for assessing human carcinogenic risk[J]. Toxicol Sci, 2002, 69: 30-41.
- [5] International Agency for Research on Cancer (IARC). Ethylbenzene: monograph on evaluation of carcinogenic risks to humans some industrial chemicals[R]. Lyon, France: IARC, 2000, 77: 227-266.
- [6] National Toxicology Program (NTP). Toxicology and carcinogenesis studies of ethylbenzene (CAS No. 100-41-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies) [J]. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser, 1999, 466: 1-231.
- [7] 王延让, 杨德一, 张明. 乙苯遗传毒性的研究概述[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2007, 25(11): 702-704.
- [8] Mates JM. Effect of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology[J]. Toxicology, 2000, 153: 83-104.
- [9] Yuan W, Serron SC, Haddican MM, et al. Ethylbenzene modulates the expression of different cytochrome P-450 isozymes by discrete multistep processes[J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1334: 361-372.
- [10] Serron SC, Dwivedi N, Backes WL. Ethylbenzene induces microsomal

温室土壤有机物提取物分析及其致 DNA 损伤作用

翟庆峰¹ 李媛媛² 邢杰¹ 邵丽军¹ 任有勋¹ 闫绍妹¹ 邱玉刚¹

1. 潍坊医学院公共卫生学院, 山东 潍坊 261042 2. 潍坊市妇幼保健院新生儿科

摘要:目的 评价温室土壤有机物污染情况,并探讨其致 DNA 损伤作用。方法 于 2010 年 5 月,采用气相色谱-质谱(GC-MS)法对某蔬菜大棚土壤和对照(非污染)区土壤样品中有机提取物(extractable organic matter, EOM)的主要成分进行检测分析。将 40 只健康 10 周龄清洁级雄性昆明小鼠随机分为 5 组,分别为阴性对照(DMSO-植物油体积比为 6:4)组、阳性对照(100 mg/kg 环磷酰胺腹腔注射)组和温室土壤 EOM 低剂量(0.5 g/ml)、中剂量(1.5 g/ml)和高剂量(3.0 g/ml)染毒组,每组 8 只。采用经口灌胃方式,每天一次,连续染毒 4 周。采用彗星试验检测小鼠外周血淋巴细胞 DNA 损伤。结果 温室土壤样品检出的主要污染物为胺类、烷烃类、苯系物、多环芳烃和邻苯二甲酸酯类,其种类及含量均多于对照区土壤。与阴性对照组比较,1.5、3.0 g/ml EOM 染毒组小鼠外周血淋巴细胞头尾光密度比以及各剂量 EOM 染毒组小鼠外周血淋巴细胞尾长和 Olive 尾矩均较高,差异有统计学意义($P < 0.05$);且随着 EOM 染毒剂量的升高,小鼠外周血淋巴细胞尾长、头尾光密度比和 Olive 尾矩均呈剂量依赖性升高($P < 0.05$)。结论 温室土壤除受烷烃类和胺类等有机污染外,其多环芳烃、苯系物、烯烃类和邻苯二甲酸酯类等污染亦较严重。温室土壤 EOM 具有致 DNA 损伤作用。

关键词: 土壤; 温室; 有机污染物; 彗星试验; DNA 损伤

中图分类号: R994.6 文献标志码: A 文章编号: 1001-5914(2012)09-0813-03

Chemical analysis of extractable organic matter from vegetable greenhouse soil and DNA damage in mice ZHAI Qing-feng*, LI Yuan-yuan, XING Jie, SHAO Li-jun, REN You-xun, YAN Shao-mei, QIU Yu-gang. *Faculty of Public Health, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China

Corresponding author: QIU Yu-gang, E-mail: qiyug@wfmc.edu.cn

Abstract Objective To evaluate the organic pollution levels in the vegetable greenhouse soil and to study DNA damage induced by the extractable organic matter (EOM) from the soil. **Methods** EOM were obtained by the method of soxhlet extraction from greenhouse soil and the control soil with no pollution in May, 2010, and were analyzed with GC-MS. The EOM from greenhouse soil were fed to mice via gavage with the final concentration of 0, 0.5, 1.5 and 3.0 g/ml respectively per day for four weeks. DMSO was used as a negative control and cyclophosphamide (CP) as the positive control. After treatment, DNA damage of peripheral blood lymphocyte induced by EOM was detected by the comet assay. **Results** The amines, alkanes, benzene series, polycyclic aromatic hydrocarbon and phthalates were detected in the EOM of greenhouse soil, and the levels of which were several times as higher as those of control soil. The tail length, tail DNA percent and Olive tail moment increased significantly in the groups exposed to the 1.5 g/ml or 3.0 g/ml EOM compared with the control group with a dose-dependent manner. **Conclusion** The vegetable greenhouse soil in the investigated area is polluted by amines, alkanes, benzene series, polycyclic aromatic hydrocarbon and phthalates, which may induce the DNA damage.

Key words: Soil; Greenhouse; Organic pollutants; Comet assay; DNA damage

土壤是多种环境污染物的最终蓄积和净化场所,诸多微量有机污染物通过污水灌溉、污泥施肥、农药化肥施用、大气污染物沉降以及生活垃圾农用等途径污染土壤并在土壤中蓄积,再加上温室空间小,封闭性强,有机污染物不易扩散挥发,使得温室土壤中的

有机污染物污染尤其严重。为制定温室土壤有机污染物相关的卫生质量标准,积极推进温室蔬菜生产科学管理,本研究将对温室土壤有机污染情况进行评价,并探讨温室土壤有机提取物(extractable organic matter, EOM)对小鼠 DNA 损伤作用。

1 材料与方法

1.1 土壤样品的采集及有机物的提取^[1] 根据土壤卫

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(2009QZ029)

作者简介: 翟庆峰(1978-)男,讲师,从事环境医学研究。

通讯作者: 邱玉刚, E-mail: qiyug@wfmc.edu.cn

oxygen free radical generation antibody-directed characterization of the responsible cytochrome P450 enzymes[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2000, 164: 305-311.

[11] Midorikawa K, Uchida T, Okamoto Y, et al. Metabolic activation of carcinogenic ethylbenzene leads to oxidative DNA damage [J]. Chem

Biol Interact, 2004, 150: 271-281.

[12] Chalah A, Khosravi-Far R. The mitochondrial death pathway [J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 615: 25-45.

收稿日期: 2012-02-24 责任编辑: 韩威

白英龙 ,等.反油酸对人脂肪细胞因子表达的影响

(正文见第 771 页)

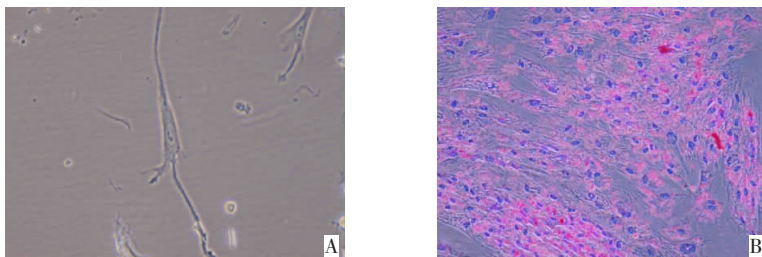


图 1 A(hATSCs 细胞体外培养 48 h)、B(hATSCs 细胞向脂肪细胞分化 油红 O 苏木精染色)分别为 hATSCs 细胞体外成脂诱导分化情况($\times 400$)

朱振平 ,等.二烯丙基一硫化物对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用

(正文见第 789 页)

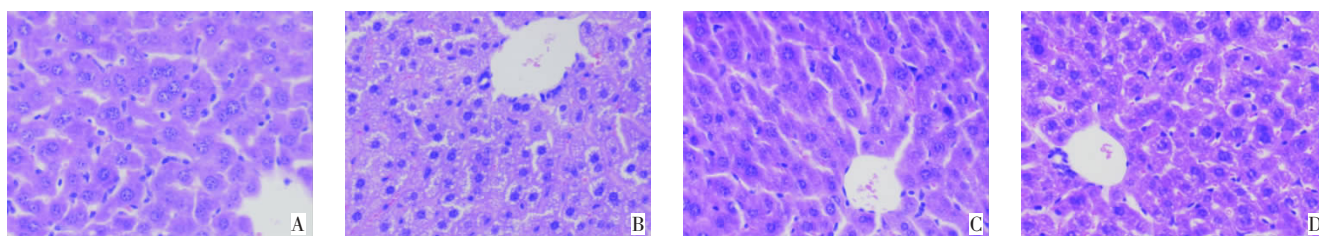


图 1 A(对照组)、B(模型组)、C(DAS 干预组)、D(DAS 对照组)分别为 DAS 暴露急性酒精性肝损伤小鼠肝组织的病理学改变(HE $\times 400$)

于功昌 ,等.苯并咪唑对雄性大鼠生育力的影响

(正文见第 795 页)

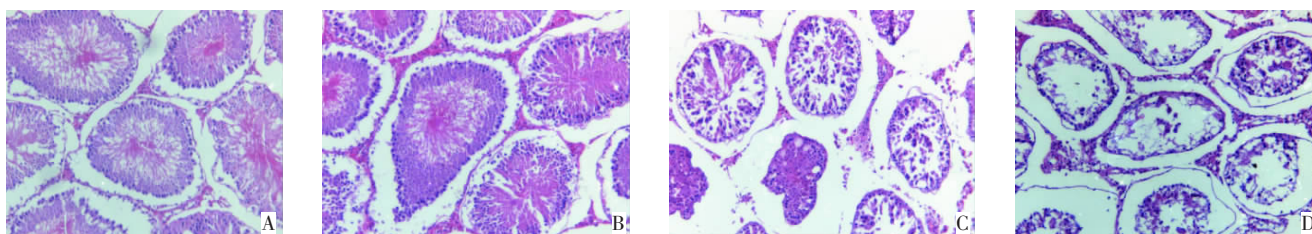


图 1 A(对照组)、B(低剂量组)、C(中剂量组)、D(高剂量组)分别为苯并咪唑染毒大鼠睾丸组织的病理学改变(HE $\times 100$)

李玲 ,等.低剂量西维因与氰戊菊酯联合染毒对雌性大鼠卵巢细胞凋亡的影响

(正文见第 799 页)

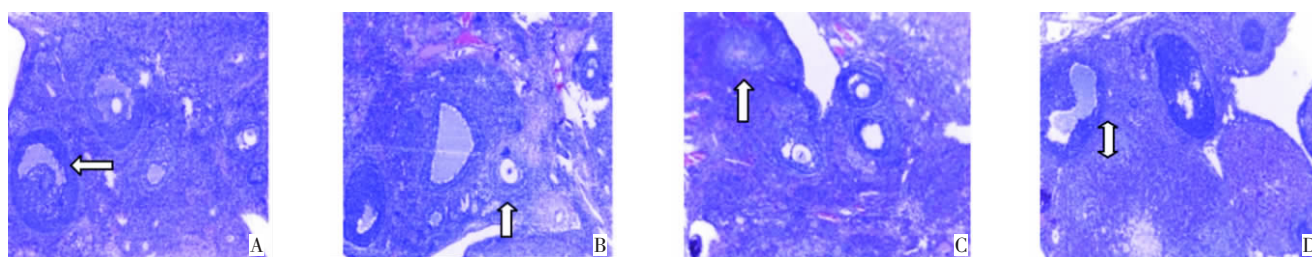


图 1 A(对照组)、B(西维因染毒组)、C(氰戊菊酯染毒组)、D(西维因 + 氰戊菊酯)分别为西维因和氰戊菊酯染毒大鼠卵巢组织的病理形态观察(HE $\times 100$)

张明 ,等.乙苯亚慢性吸入染毒大鼠肝毒性效应的研究

(正文见第 810 页)

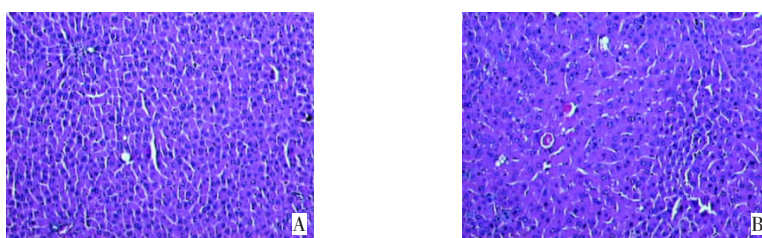


图 1 A(对照组)、B(高剂量组)分别为乙苯染毒大鼠肝组织病理变化(HE $\times 200$)