

丙烯腈对小鼠睾丸组织标志酶活性影响的研究

段志文¹, 李海山¹, 张玉敏¹, 崔金山¹, 马宝玺²

(1. 沈阳医学院卫生毒理学教研室, 辽宁 沈阳 110031; 2. 沈阳医学院流行病学教研室, 辽宁 沈阳 110031)

摘要: 目的 研究丙烯腈对小鼠睾丸组织某些标志酶活性的影响, 探讨丙烯腈对雄性小鼠生殖损伤的机制及早期敏感指标。方法 用分光光度法检测睾丸组织匀浆中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G-6-PD)、乳酸脱氢酶同工酶 (LDHx)、 β -葡萄糖苷酸酶 (β -G) 及酸性磷酸酶 (ACP) 的活性。结果 G-6-PD、LDHx、 β -G 及 ACP 各指标与对照组比较未见显著性差异 ($P > 0.05$)。结论 在本实验染毒时间和染毒剂量范围内, 丙烯腈对小鼠睾丸组织中酶活性 (G-6-PD、LDHx、 β -G 及 ACP) 未见影响。

关键词: 丙烯腈; 睾丸组织; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 乳酸脱氢酶同工酶; β -葡萄糖苷酸酶; 酸性磷酸酶

中图分类号: O623.761; Q492.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2001)01-0017-03

Effects of acrylonitrile on activity of symbolic enzyme in the testis of mice

DUAN Zhi-wen¹, LI Hai-shan¹, ZHANG Yu-min¹, CUI Jin-shan¹, MA Bao-xi²

(1. Department of Health Toxicology, Shenyang Medical College, Shenyang 110031, China; 2. Department of epidemiology, Shenyang Medical College, Shenyang 110031, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of acrylonitrile on certain symbolic enzymes in the testis of mice and to explore the mechanism and early sensitive indicators for reproductive damage in male mice caused by it. **Methods** Activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD), lactic acid dehydrogenase isoenzyme (LDHx), β -glycosidase (β -G) and acid phosphatase (ACP) in homogenate of the testis were determined with spectrophotometry. **Results** There was no significant difference in activities of G-6-PD, LDHx, β -G and ACP between the trial and control groups ($P > 0.05$). **Conclusion** No effect of acrylonitrile on the activities of G-6-PD, LDHx, β -G and ACP in the testis of mice was found within the length and concentrations of exposure to acrylonitrile in this experiment.

Key words: Acrylonitrile; Testis; Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD); Lactic acid dehydrogenase isoenzyme (LDHx); β -glycosidase (β -G); Acid phosphatase (ACP)

丙烯腈 (acrylonitrile, AN) 为高毒类化合物^[1], 小鼠经皮 LD₅₀ 为 35 ~ 70mg/kg。迄今为止, 研究的重心多集中在丙烯腈对动物和人类的致癌问题。近年来, 随着研究的深入, 丙烯腈的生殖毒性逐渐受到关注, 国内外曾报道丙烯腈对实验动物的睾丸功能存在不良影响^[2,3], 可影响实验动物精子生成, 并使精子畸形率升高; 人群流调发现接触丙烯腈男工妻子妊娠结局中, 死胎、死产和新生儿出生缺陷的发生率明显增加。为此, 本研究选择睾丸支持细胞、间质细胞和精细胞的标志酶 β -G、ACP、G-6-PD、LDHx 为观察指标, 探索丙烯腈对雄性生殖损伤的早期敏感指标, 为接触人群早期诊断及生物监测提供简便、特异、可行的评价指标。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

由沈阳医学院实验动物中心提供的健康性成熟、体质量 18 ~ 24g 雄性昆明种小鼠 40 只, 随机分为 4 组, 每组 10 只。设 3 个染毒组及 1 个对照组, 染毒组剂量分别为 5、10、15mg/kg, 对照组用生理盐水。

1.2 样品的制备

各组按 0.1ml/10g 皮下注射染毒, 每天 1 次, 连续 35 天。染毒 35 天后, 摘眼球取血, 静置凝固后离心, 取血清进行 G-6-PD、LDHx、 β -G 及 ACP 活性测定; 处死后摘取睾丸立即称质量, 除去被膜后以 0.05mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 按 1:20 (m:V) 低温制成匀浆, 离心后, 取上清液进行各项测定。

1.3 实验试剂

丙烯腈系上海试剂三厂生产, 批号 941210, 丙烯腈含量不少于 99% (g/v); 试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

收稿日期: 2000-09-01; 修回日期: 2000-10-19

作者简介: 段志文 (1965-), 男, 河北兴隆人, 副教授, 主要从事尘肺流行病学和生殖毒理学研究。

1. 4 实验方法

G-6-PD 的测定: 应用 2, 6-二氯酚靛酚连续比色法^[4]。β-G、ACP 和 LDH 活性的测定: 按南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书进行。LDHx 的测定: 先将 1:20 (g:ml) 睾丸组织匀浆和用生理盐水 5 倍稀释后的血清置于 65℃水浴 30min 后, 再测定 LDHx 活性, 方法同 LDH 测定。

1. 5 统计分析

用 Foxbase 建立数据库, 采用 SAS 统计软件进行统计分析。

2 结果

2. 1 一般状况

10、15mg/kg 剂量组动物染毒后 10 分钟内出现兴奋症状, 持续约 15~20 分钟; 染毒期间动物进食和饮水正常, 体质量增长与对照组比较差异无显著意义。

2. 2 丙烯腈对小鼠睾丸及血清中 G-6-PD 活性的影响

低、中剂量染毒组小鼠睾丸及血清 G-6-PD 活性略高于对照组, 而高剂量组略低于对照组, 但差异均无显著性 ($P>0.05$), 见表 1。

表 1 丙烯腈染毒后小鼠睾丸及血清 G-6-PD 的活性 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (n)	组织酶活性 (U/g)	血清酶活性 (U/L)
对照组	10	1 105.41±256.48	43.92±30.49
5mg/kg	10	1 233.61±246.45	45.47±37.81
10mg/kg	9	1 139.43±320.04	55.71±27.88
15mg/kg	10	1 039.36±205.74	42.83±12.91

表 4 丙烯腈对睾丸组织及血清 LDH、LDHx 活性的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (n)	LDH (U/g)	LDHx (U/g)	LDHx/LDH
睾丸组织				
对照组	10	2 790.69±180.38	335.90±38.40	0.15±0.02
5mg/kg	10	2 785.44±285.12	311.36±71.43	0.14±0.03
10mg/kg	9	2 804.65±77.29	315.86±52.93	0.14±0.02
15mg/kg	9	2 744.86±108.68	292.10±75.72	0.14±0.03
血清				
对照组	10	2 564.52±766.10	353.06±168.22	0.14±0.06
5mg/kg	10	3 367.74±1 278.91	388.49±143.34	0.13±0.04
10mg/kg	9	3 513.86±1 246.82	361.37±164.32	0.11±0.06
15mg/kg	9	2 918.88±872.16	302.20±84.17	0.11±0.05

注: 各组出现 9 只小鼠的均因样品量不够, 有的血清量不够, 有的组织匀浆不够, 有的两者都不够。

3 讨论

睾丸组织内 G-6-PD 主要存在于生精小管的间质细胞、支持细胞和精细胞内, 尤以间质细胞中活性最强。因而, G-6-PD 能够作为反映间质细胞功能的指标, 若间质细胞受损, 则 G-6-PD 的活性就会发生改变。本研究 3 个剂量组小鼠睾丸及血液中 G-6-PD 活

2. 3 丙烯腈对小鼠睾丸及血清中 ACP 活性的影响

无论是血清还是睾丸组织中, 与对照组相比 ACP 活性变化均无显著性 ($P>0.05$), 见表 2。

表 2 丙烯腈对小鼠睾丸组织及血清中 ACP 活性的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (n)	组织酶活性 (U/g)	血清酶活性 (U/L)
对照组	10	9.03±1.13	13.21±3.08
5mg/kg	10	8.72±0.97	14.22±2.56
10mg/kg	9	9.03±0.94	13.27±3.08
15mg/kg	9	9.12±0.92	12.72±2.04

2. 4 丙烯腈对小鼠睾丸组织及血清中 β-G 活性的影响

睾丸组织及血清中 β-G 活性各染毒组与对照组相比改变均无显著意义 ($P>0.05$), 见表 3。

表 3 丙烯腈对小鼠睾丸组织及血清中 β-G 活性影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (n)	组织酶活性 (U/g)	血清酶活性 (U/L)
对照组	10	1.48±0.38	26.37±2.99
5mg/kg	10	1.82±0.67	31.32±3.90
10mg/kg	9	1.45±0.59	31.27±3.98
15mg/kg	9	1.49±0.69	24.81±3.41

2. 5 丙烯腈对小鼠睾丸组织及血清中 LDH 和 LDHx 活性的影响

由表 4 可见, LDH 及 LDHx 活性各染毒组与对照组相比, 无论是睾丸组织还是血清, 差异均无显著性 ($P>0.05$), LDHx 与 LDH 比值也没有变化。

性与对照组相比虽有轻微改变, 但差异无显著性, 说明小鼠睾丸间质细胞功能未受到明显损害。

β-G 和 ACP 主要在睾丸组织中支持细胞的溶酶体内, 是支持细胞标志酶。ACP 可在性激素诱导下参与蛋白质合成, 其活性降低与生精上皮变性有关; β-G 参与各种葡萄糖苷酸的水解, 还可与其他溶酶共同参

与细胞器的降解及细胞更新。本实验各剂量组与对照组比较两种酶均没有显著性变化,说明此染毒剂量对该品系小鼠在本次实验期间内睾丸支持细胞没有产生直接或间接的毒作用。

睾丸中 LDH 存在于生精细胞内,参与能量代谢并和生精上皮成熟有关。LDH_x 是 LDH 同工酶之一,是精子的一种特异酶,其活性与精子的成熟发育有关,为精子的生存和活动提供能量,从而影响精子的数量和活动力。本实验不同剂量组小鼠睾丸及血清中 LDH 及 LDH_x 活性与对照组比较虽有所下降,但差异未见显著性,说明精子能量代谢未受到明显影响。

王振全等^[9]在研究丙烯腈吸入对雄性小鼠睾丸毒作用时发现,不同浓度丙烯腈(60、90、120mg/m³ 2h/d) 28 天及不同时间(7、14、28 天,浓度为 120mg/m³)染毒后,不同浓度丙烯腈均使小鼠精子畸形率增高,畸形精子以无定形为主;染毒时间仅 28 天即可使精子畸形率增高。Ahmed 等研究表明,丙烯腈可与大鼠睾丸组织中的 DNA 发生共价结合,染毒 0.5h 时其活性达最高点,此时 DNA 的合成明显降低,染毒 24h 时, DNA 合成受到严重的抑制。这些研究表明,丙烯腈直接损害睾丸组织,并可作为多效的毒因子使睾丸组织的 DNA 发生烷化,通过干扰睾丸组织 DNA 的合成和修复功能,进而影响雄性大鼠生殖功能^[6]。同时吴维咄^[7]等通过人群流行病学调查研究发现,接触丙烯腈的男工,其妻子的妊娠结局中死胎、死产和新生儿出生缺陷的发生率明显增加,通过分层分析发现,其妻子自然流产发生率明显增加。

由此可见,丙烯腈对雄性生殖功能具有一定影响,钟先玖等^[8]用 10、20、40mg/kg 给雄性大鼠连续染毒 13 周,发现 40mg/kg 组睾丸组织中 LDH、LDH_x、ACP 酶活性下降;本次实验所得结果可能与动物种属差异、染毒方式、时间和染毒剂量等因素有关,因为本研究所用动物为小鼠,且为皮下染毒,染毒时间仅为 5 周,且染毒最高剂量不足 1/4 LD₅₀。而钟先玖等的染毒最高剂量为 1/2 LD₅₀(大鼠经口 LD₅₀ 为 78mg/kg),所以,有必要增加染毒剂量、延长染毒时间,在实验过程中增加动态观察次数,来研究丙烯腈对雄性生殖毒性的敏感指标和敏感时间,或进一步选择其他观察指标,来探寻丙烯腈雄性生殖毒性关键环节。

参考文献:

- [1] 温玉麟. 药物与化学物质毒性数据 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1989. 10.
- [2] 邵静, 关静坤. 丙烯腈对生殖机能影响的研究 [A]. 东北三省卫生毒理学术会议文集 [C]. 哈尔滨: 1991. 6.
- [3] Tandon R, Saxena DK, Chandra SV, et al. Testicular effects of acrylonitrile in mice [J]. Toxicol Lett, 1988, 42 (1): 55.
- [4] King J. Practical clinical enzymology [M]. Dan Nostrand Company L T d London, 1965. 55-66.
- [5] 王振全, 李芝兰, 肖卫. 丙烯腈对小鼠精子致畸的研究 [J]. 兰州医学院学报, 1995, 21 (3): 130.
- [6] Ahmed AE, Abdel SZ, Nour AM. Acrylonitrile interaction with testicular DNA in rats [J]. J Bohem Toxicol, 1992, 7 (1): 5.
- [7] 吴维咄, 苏江, 黄美媛, 等. 接触丙烯腈男工的生殖结局流行病学调查 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1994, 12 (5): 261.
- [8] 钟先玖, 吴鑫, 范卫. 丙烯腈对雄性大鼠生殖功能的影响 [A]. 中国工业毒理学会第四次学术会议 WHO 化学中毒与安全防护研讨会论文集 [C]. 兰州: 2000. 43.

· 短篇报道 ·

一起球磨机检修发生急性一氧化碳中毒事故调查

吉林市职业病防治院 曾庆昌, 李光浩

2000 年 4 月 15 日 13 时, 某热电厂在进行球磨机罐内钢瓦复位检修时, 因球磨机内壁钢瓦上残留有煤粉, 加之电焊作业, 而引起煤粉自燃不完全, 致使罐内 CO 浓度增高。于 14 时罐内工作的 6 名工人均出现不同程度的头晕、头痛、恶心、胸闷、四肢无力、步态不稳、手足麻木。有 3 人意识不清, 在本厂卫生所进行简单处置后于当日 16 点 30 分 6 人均被送至我院, 经抢救治疗 2 周后 5 人痊愈, 1 人好转出院。

于发生中毒后 21 小时在球磨机罐内工人操作点采用 CO 检气管测定空气中 CO 浓度为 80mg/m³。

讨论 CO 是工业生产中常见的一种窒息性有害气体, 其吸收与排出取决于空气中 CO 的浓度和血液中 HbCO 的饱和度。同时, 中毒与劳动强度有直接关系, 在接触 CO 的浓度和时间相同时, 活动者与静止者碳氧血红蛋白之比为 3:1。此次中毒 6 名患者均在球磨机罐内检修, 作业的强度与环境是造成中毒的一个原因。

根据事故发生后 21 小时监测结果 CO 的浓度为 80mg/m²(明显超标)和工人中毒后的症状体征推断, 当时发生急性中毒现场 CO 浓度估计为 300mg/m³左右。

此事故提示对进入 CO 浓度较高的环境如在检修贮存 CO 设备时, 应采取有效的个人防护并要求同时有 2 人操作及有 1 人待岗, 万一发生意外, 能即时互救; 同时要加强安全教育, 严格执行安全操作规程。