

重质芳烃的毒性及致突变性

叶林¹, 朱剑华¹, 吴刘松², 王维¹, 王安莲¹, 冯学庆¹, 王秋萍¹, 胡道华², 鲍军辉¹

(1. 安徽省职业病防治研究所, 安徽 合肥 230022; 2. 安庆石化总厂医院, 安庆 256001)

摘要: 目的 了解重质芳烃的毒性及致突变性。方法 选用大鼠、豚鼠及家兔, 采用经口、呼吸道及皮肤、粘膜染毒途径, 研究其急性毒性和蓄积性。同时用 Ames 试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、人体外周血淋巴细胞姐妹染色单体交换 (SCE) 试验及小鼠精子畸形试验进行致突变性研究。结果 重质芳烃的大鼠经口 LD₅₀ 为 3 160 mg/kg, 急性中毒表现为发抖、嗜睡、活动减少、腹泻、食欲不振直至死亡; 家兔皮肤及眼刺激强度为轻度刺激性; 豚鼠皮肤变态反应试验为中等致敏性; 大鼠蓄积系数 2.24 为强蓄积性, 病理呈现以肺出血为主要致死原因的多器官损害。Ames 试验阴性; 在 316~1 580 mg/kg 剂量范围小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率显著增高 ($P < 0.01$); 在 S9 存在下, 人外周血 SCE 频率较对照组显著增高 ($P < 0.01$); 小鼠精子畸形率在 1 580 mg/kg 下显著增高 ($P < 0.01$)。结论 重质芳烃不仅是强蓄积、中等致敏性物质, 且 3 种遗传毒性试验呈阳性反应, 具有间接致突变性, 对其职业性接触及应用的安全性应予高度重视。

关键词: 重质芳烃; 毒性; 致突变性

中图分类号: R994.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2002)01-0015-04

Studies on toxicity and mutagenicity of heavyweight aromatic hydrocarbon

YE Lin¹, ZHU Jian-hua¹, WU Liu-song², WANG Wei¹, WANG An-lian¹, FENG Xue-qing¹, WANG Qiuping¹, HU Dao-hua², BAO Jun-hui¹

(1. Anhui Institute of Occupational Health, Hefei, 230022, China; 2. Anqing Petrochemical Factory Hospital, Anqing, 256001, China)

Abstract **Objective** To understand the toxicity and mutagenicity of heavyweight aromatic hydrocarbon (HAH). **Methods** Rats, guinea pigs and rabbits were used in exposure to HAH via oral, inhalant, percutaneous route to study its acute and accumulation toxicity, as well as its mutagenicity, such as Ames test, polychromatophil micronucleus (PCMN) test, peripheral sister chromatid exchange (SCE) and deformity of sperms. **Results** Oral half lethal dose (LD₅₀) of HAH was 3 160 mg/kg in rats, and tremor, drowsiness, inactivity, diarrhea, anorexia, until death in rats, mild skin and eye irritation in rabbits, moderate skin allergy in guinea pigs with acute poisoning. Accumulation coefficient of HAH was 2.24, categorized as a strong accumulation. Autopsy for dead animals showed underlying cause of death was multiorgan damage, focused on pulmonary bleeding. Ames test was negative in all dosage groups. PCMN increased significantly in mice exposed to 316~1 580 mg/kg of HAH, and SCE in peripheral blood increased significantly in comparison with controls ($P < 0.01$) with S9. Deformity of sperms in mice increased significantly at dose of 1 580 mg/kg of HAH. **Conclusions** HAH was a toxic substance with strong accumulation, moderate sensitization and positive in three genotoxic tests reflecting its indirect mutagenicity. So, it is necessary to pay more attention to its safety in occupational exposure to HAH.

Key words: Heavyweight aromatic hydrocarbon; Toxicity; Mutagenicity

重质芳烃 (HAH) 是以糠醛和溶剂油为溶剂, 应用催化裂化工艺从回炼油中抽提出来的一种产品。该催化裂化——芳烃抽提联合工艺实验装置国内首创, 其产品为抽余油、重质芳烃。HAH 用作化工原料, 其中芳烃占 83.7%, 芳烃中三环为 62.7%, 四环及四环以上占 37.3%。对多环芳烃、抽余油研究

国内外报道很多, 但重质芳烃的毒性和致突变性尚未见报道。通过急性毒性、蓄积毒性和遗传毒性部分试验对其进行初步研究, 为其安全性评价提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物 HAH 由某石化企业提供, 黄褐色粘稠性液体, 相对分子质量 342, 相对密度 1.101 2, pH7.0, 40℃饱和蒸气压为 720 Pa。石油经催化裂化

收稿日期: 2001-04-16; 修回日期: 2001-06-18

作者简介: 叶林 (1960-), 女, 安徽桐城人, 副主任医师, 主要

后的 0.3 MPa, 330~350℃的回炼油(芳烃抽提装置原料油)以糠醛和溶剂油为溶剂,通过芳烃抽提装置将 HAH 抽提出来,抽余油返回催化裂化装置回炼。抽提温度 40~220℃,出口采样温度 80~90℃。

1.1.2 Ames 菌株 组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌(TA97、TA98、TA100、TA102)及 S9 由上海市劳动卫生研究所毒理室提供,实验前对二者进行鉴定,各项特征全部合格后使用。

1.1.3 细胞 人外周血淋巴细胞采自 6 位无嗜烟、酗酒史的健康志愿者静脉血。

1.1.4 实验动物 健康昆明种小鼠及 SD 大鼠由

安徽省医学科学研究所实验动物中心提供。Ablno 白色家兔及白色豚鼠由安徽医科大学实验动物中心提供(合格证号分别是皖实验动准字第 02 号及第 01 号)。动物购入适应观察 1 周后进行试验。

1.2 方法

1.2.1 急性毒性实验 包括经口、经皮、吸入、刺激、皮肤变态反应试验均按《工业化学品毒性鉴定规范及实验方法》^[1]进行。

1.2.2 蓄积毒性试验 选用 180~200 g 健康 SD 成年大鼠 40 只,雌雄各半,采用剂量递增法^[2],按表 1 进行染毒。

表 1 定期递增染毒剂量用表

染毒日期	1~4	5~8	9~12	13~16	17~20	21~24	25~28
每日染毒剂量(LD ₅₀)	0.1	0.15	0.22	0.35	0.5	0.75	1.12
每 4 日染毒剂量(LD ₅₀)	0.4	0.6	0.9	1.4	2.0	3.0	4.5
累积总剂量(LD ₅₀)	0.4	1.0	1.9	3.3	5.3	8.3	12.8

按下式计算蓄积系数 K

$$K = \sum LD_{50} / LD_{50}$$

式中 $\sum LD_{50}$ 为蓄积试验中出现 50% 动物死亡时的受试物累积总剂量, LD₅₀ 为急性毒性试验 1 次染毒的半数致死量。蓄积系数 K 小于或等于 1, 为极强蓄积性; K 大于 1 为强蓄积性; K 等于或大于 3, 为中等蓄积性; K 大于或等于 5, 为弱蓄积性。

1.2.3 Ames 试验^[3] 采用平板掺入法, 分别用加与不加 S9 混合液条件下进行测试。剂量组分设 1 250 μg/皿、2 500 μg/皿、5 000 μg/皿, 同设阴性对照组(色拉油)和阳性对照组[分别为 2-氨基苄(2-AF)和敌克松], 每组 3 个平皿, 进行 2 次独立测试, 实验结果以回变菌落数表示。

1.2.4 小鼠骨髓细胞微核试验^[4] 昆明种小鼠 60 只, 雌雄各半, 体质量 18~24g, 随机分 6 组, 每组 10 只, 灌胃给药, 设 4 个剂量组为 158、316、632、1 580 mg/kg (分别相当于 1/20LD₅₀、1/10LD₅₀、1/5LD₅₀、1/2LD₅₀), 另设阴性对照组(色拉油)和阳性对照组环磷酰胺 30mg/kg (腹腔注射)。受试物以色拉油调配, 采用 30 h 给药法, 即 2 次灌胃间隔 24 h, 以 0.01ml/g 灌胃, 于第二次染毒后 6 h 将小鼠脱椎处死, 取胸骨骨髓常规制片。Giemsa 染色, 双盲法阅片。每只动物计数 1 000 个嗜多染红细胞, 记录含有微核的细胞数, 计算微核率, 数据处理用卡方检验。

1.2.5 人外周血淋巴细胞姐妹染色单体交换试

验^[3] 分别用加与不加 S9 两种方法培养。活化培养: 培养基 RPMI 1640 5 ml (含小牛血清 15% 及 PHA 200 μg/ml), 加抗凝血 0.4 ml, 37℃ 培养 24 h, 离心去上清液, 将沉淀的细胞置 5ml 无血清的 RPMI 1640 培养液中, 加受试物和 S9 混合液培养 2 h, 离心去上清液, 将细胞悬浮于有血清培养液中, 加 BrdU (终浓度 20 μg/ml) 继续 37℃ 避光培养 48 h。非活化培养: 不需第一次离心及无血清培养。收获前 5 h 加秋水仙素。常规法制片, Giemsa 染色, 油镜下计数 25 个分散良好、差别染色清晰、完整的中期分裂相的淋巴细胞, 计数 SCE/细胞, 计算 SCE 频率。数据处理用双侧 t 检验方法。

1.2.6 小鼠精子畸形试验^[4] 选用性成熟雄性昆明种小鼠 44 只, 体质量 25~35 g, 随机分 6 组, 每组 5~10 只, 设受试物 4 个剂量组同微核试验, 另设阴性对照组(蒸馏水及色拉油)、阳性对照组(CP), 染毒方式为连续经口 5 天, 剂量按 0.01ml/g 给予, 于末次染毒 4 周后处死动物, 取双侧附睾制片, 2% 伊红染色, 于高倍镜下每只动物计数 1 000 只完整精子, 计数精子畸形率, 用 Wilcoxon 秩和检验进行统计分析。

2 结果

2.1 急性毒性试验

大鼠经口 LD₅₀ 为 3 160 mg/kg (霍恩氏法)。染毒动物出现发抖、嗜睡、活动减少、毛发黄染、腹泻、食欲不振。死亡动物大体解剖见肺呈鲜红色至深紫色

充血,胃充盈,肝、肾包膜肿胀。组织学检查:胃粘膜明显变性、坏死、脱落;肺出血明显;肝、脾亦见出血,肝细胞浊肿、坏死、气球样变不同程度存在;肾小球固化、坏死、髓质出血;心肌少量出血。

大鼠急性经皮涂敷剂量达4 000 mg/kg、10 mg/L吸入2小时均未出现死亡,故未进行更高剂量试验。

2.2 急性皮肤、眼刺激试验

家兔急性皮肤刺激反应积分为1.5分,急性眼刺激积分指数为7,眼刺激平均指数<5(48 h后),按皮肤、眼刺激强度评价标准均为轻度刺激性。

2.3 皮肤变态反应试验

豚鼠实验组有50%出现反应,仅发生红斑(对照组则无红斑和水肿),按皮肤反应致敏分级标准判定,HAH为中度致敏物。

2.4 蓄积毒性试验

大鼠蓄积毒性按K值计算方法得出K值为2.24,按方法介绍蓄积强度判定表得出HAH属强蓄积性物

质。试验中,部分大鼠陆续死亡。死亡动物进行病理解剖,结果同急性毒性改变。未死亡大鼠于实验结束后全部颈动脉放血处死,进行病理检查。大体所见:胃充盈或排空,深暗色;肺、肝、睾丸等脏器可见肿胀、出血。镜下所见:心肌纤维萎缩变细,胞核深染;肝细胞浊肿变性,周边部较重,气球样变,以小叶中心向外呈放射状脂肪变性,部分肝细胞点片状坏死;脾出血、淤血多见,红骨髓结构破坏,脾小梁增生;肺出血淤血,或肺泡壁增厚,肺不张;大部分肾小球固化,少量出现肾小球坏死、脱落,亦可见肾梗塞淀粉样变性;睾丸可见间质内出血,间质消失,曲精细管变形,部分无精子生成,精原细胞和精母细胞变性;胃呈明显退化和增生改变。

2.5 Ames 试验

表2示受试物各剂量组对实验菌株在加与不加S9代谢活化系统条件下,回变菌落数与阴性对照相比略有增加但均未超过2倍,且无剂量-反应关系。

表2 HAH的Ames试验结果

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	TA97		TA98		TA100		TA102	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
自发回变		165	126	38	46	149	175	191	318
色拉油		170	134	34	47	139	160	233	328
HAH	1 250	168	116	46	74	195	159	173	360
	2 500	193	142	44	60	162	160	210	304
	5 000	216	133	43	41	196	179	317	392
敌克松	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	> 2 000		804		1 561		> 2 000	
2-AF	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$		278		158		420		448

2.6 小鼠微核试验

同程度增高($P<0.05\sim0.001$),但未见剂量-反应关系,结果见表3。

受试物各剂量组的微核率与阴性对照相比均有不

表3 HAH小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验结果($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	动物数	PCE数	微核细胞数($\bar{x}$)	微核细胞率(%)
色拉油	100	10	10 000	19	2.38 $\pm$ 1.69
HAH	158	10	10 000	31	3.88 $\pm$ 1.64 *
	316	10	10 000	68	8.50 $\pm$ 3.89 **
	632	10	10 000	50	6.25 $\pm$ 2.60 **
	1 580	10	10 000	80	10.00 $\pm$ 4.84 ***
CP	30	10	10 000	150	18.75 $\pm$ 5.23 ***

与阴性对照组比较, * $P<0.05$ ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 下表同。

2.7 人外周血淋巴细胞SCE试验

S9活化系统下,SCE频率未见明显增高,提示HAH可疑为间接致突变物,见表4。

HAH从0.5mg/ml起在加S9代谢活化系统条件下,SCE频率显著增高且随剂量增加而增高。而未加

表 4 HAH 对 SCE 频率的影响

组 别	剂 量 (mg/ml)	观察细胞数	SCE 数		SCE 频率	
			-S9	+S9	-S9	+S9
H ₂ O		25	33	62	1.32±1.80	2.48±1.61
色拉油		25	24	27	0.96±1.10	1.08±0.90
HAH	0.05	25	12	23	0.48±0.60	0.92±0.60
	0.50	25	25	87	1.00±0.90	3.48±1.90**
	5.00	25	31	121	1.23±1.08	4.84±3.85**
EMS	15.00	25	89	145	3.57±3.22**	5.80±3.53**

2. 8 小鼠精子畸形试验

随染毒剂量增加, 小鼠精子畸形率逐渐增高, 但仅高剂量 (1 580 mg/kg) 组差异有显著性 ($P<0.05$)。HAH 所致精子畸形主要以无定形、香蕉形、无钩、小头和胖头等头部畸形为主, 但随 HAH 浓度增加致精子尾部膨胀畸形也有所增加, 见表 5。

表 5 HAH 对小鼠精子畸形率的影响

组 别	剂 量 (mg/kg)	动物数	计数 精子数	精子 畸形数	畸形率 (%)
H ₂ O		3	3 000	97	3.23
色拉油		7	7 000	233	3.33
HAH	158	7	7 000	241	3.44
	316	7	7 000	255	3.64
	632	7	7 000	276	3.94
	1 580	8	8 000	685	8.56*
CP	50	5	5 000	450	9.16**

3 讨论

抽余油是一种含多种单体烃的混合溶剂, 相对密度 0.73, 常温下易挥发, 早在 80 年代我国就已进行大量研究, 制订出相应的车间空气中最高容许浓度。因其挥发性, 主要是吸入造成急性中毒, 大鼠吸入 LC₅₀ 为 66 000 mg/m³, 主要表现麻醉症状, 早期兴奋后进入麻醉状态直至死亡, 病理有肝、肾损害, 无蓄积性。特殊毒性试验中 Ames 试验、微核试验、染色体畸变试验、致畸试验等均呈阴性结果。而 HAH 则是粘稠性液体, 相对密度 1.101 2, 常温下不易挥发, 虽有类似抽余油的急性麻醉表现, 病理提示有相同的

肝、肾损害等, 但毕竟其化学组成二者不同, HAH 主要是经口急性毒性 LD₅₀ 为 3 160 mg/kg, 按工业毒物急性毒性分级标准属低毒类物质, 但具有强蓄积性, 中等致敏, 同时引起小鼠的微核和精子畸形率升高。在活化系统存在下, 一定剂量的 HAH 可引起人体外周血淋巴细胞 SCE 频率增高, 提示其具有潜在的间接致突变性, 故应引起高度重视。

综上所述研究结果, 结合现场生产调查, HAH 采样出口温度达 80~90℃, 故仍有部分 HAH 挥发至车间空气中, 另其出厂为手工装车, 仍有接触可能。HAH 作为化工原料, 应用前景广阔; 由于催化裂化——芳烃抽提装置能提高原油处理量和经济效益, 目前处于工业放大阶段。因此, HAH 的职业危害不容忽视, 故应进一步加强 HAH 的深入研究和劳动卫生防护及健康监护。

(王炳青主管医师承担病理分析工作, 王心箴主任医师对本课题研究给予指导, 在此一并表示感谢。)

参考文献:

- [1] 尹松年, 王淑洁, 毕文芳. 工业化学品毒性鉴定规范及实验方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 10, 15, 32, 40-52.
- [2] 卫生部. 消毒技术规范 [Z]. 1991. 136.
- [3] 秦椿华. 化学物致突变致癌检测技术 [M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1996. 59-67, 120.
- [4] 黄幸纾, 陈星若. 环境化学物致突变致畸致癌试验方法 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1985. 220-229, 264-270.

(上接第 14 页)

参考文献:

- [1] 李汇华. 苯乙烯生物监测研究进展 [J]. 国外医学卫生学分册, 1990 (5): 267-270.
- [2] Hogmar L, et al. Cytogenetic and hematological effects in plastics workers exposed to styrene [J]. Scand J Work Health 1989, 15: 136.
- [3] Maki-paakkanen J. Chromosome aberrations, Micronuclei and sister-chromatid exchanges in blood lymphocytes after occupational exposure to low level of styrene [J]. Mutat Res. 1987, 189: 399-406.
- [4] 陈自强, 于继慧. 苯乙烯致癌、致突变和致畸研究近况 [J].

职业医学, 1991, 18 (1): 49-51.

- [5] 吴维皓. 苯乙烯致癌性研究的最新结论 [J]. 国外医学卫生学分册, 1993, (6): 321-325.
- [6] Stich H F, Rosin M P. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosacells [J]. Int J Cancer, 1983, 31: 305-308.
- [7] 王新生. 吸烟与不吸烟者外周血淋巴细胞 SCE 及微核的比较研究 [J]. 卫生毒理学杂志, 1992, 6 (4): 272.
- [8] Schottenfeld D. Alcohol as a co-factor in the etiology of cancer [J]. Cancer, 1979, 43: 1962-1966.