

二乙氧基乙醇生殖毒性生物学标志物研究进展

Progress in studies on biomarkers of reproductive toxicity by 2-ethoxyethanol

贾娜¹, 高星²

JIA Na¹, GAO Xing²

(1. 首都医科大学公共卫生与家庭医学学院 北京 100054; 2. 北京市预防医学研究中心, 北京 100013)

二乙氧基乙醇(2-ethoxyethanol, 简称 2-EE)是 70 年代中期我国引进的一种用于合成感光液, 生产感光版(PS 版)的化合物^[1]。动物实验和人群流行病学调查都已证明 2-EE 具有生殖毒性^[2]。在职业卫生中, 常采用生物学标志物(biomarker)——暴露标志物(biomarker of exposure)、效应标志物(biomarker of effect)和易感性标志物(biomarker of susceptibility)评价其生殖毒性危险度。

1 二乙氧基乙醇暴露标志物——二乙氧基乙酸(EAA)

2-EE 极易经皮肤吸收^[3], 采用环境监测方法无法评价该途径。从 90 年代起, 采用生物监测尿中 EAA 可以反映不同吸收途径与生物利用度下 2-EE 实际暴露水平。近年来研究证明 EAA 与 2-EE 的毒性密切相关, EAA 是 2-EE 生殖毒性的主要活性物质。王三虎等研究发现暴露工人尿中 EAA 与 2-EE 暴露量之间存在剂量-反应关系^[4,5]。因此, EAA 作为 2-EE 暴露标志物既存在生物学又存在统计学意义的关联性。

Gamey 通过职业流行病学调查提出 EAA 在人体代谢的半衰期长达 57 h, 停止接触 12 d 后, 仍可检出^[6]。因此 2-EE 暴露工人尿中 EAA 不会在短时间内消失, 与非暴露工人在较长一段时间内会有显著性差异, 因此具有较高敏感性。同时 EAA 检测方法敏感性也在逐渐提高。Choi 改进了 Sakai^[7]的检测方法, 仍然采用气相色谱/氢焰离子化检测(GC/FID), 但是以简便的固相萃取代替二氯甲烷和异丙醇萃取, 回收率达到 100.2% ± 1.8%^[8], 进一步提高了 EAA 检测方法的敏感性。另一方面, 正常人尿液检测不出 EAA, 因此 EAA 作为 2-EE 暴露标志物具有高度特异性。

一般来说生物学标志物在个体的浓度常随时间变化。对 EAA 来说, 其排出有昼夜规律, EAA 清晨的排出量总是低于夜间排出量, 这种排出规律与 EAA 蛋白质结合形式在肾脏重吸收程度不一致有关^[6]。因此, 只有在相同时间段采集尿液, 监测 EAA 才更有科学价值。

王三虎等研究证明, 2-EE 代谢过程中重要代谢酶的基因多态性影响 EAA 排出量, 如细胞色素 P₄₅₀-2E1(CYP2E1)、乙醛脱氢酶(ALDH₂)不同基因型, EAA 排出量都不相同^[4,5]。Wilkinson 通过体外实验表明, 不同的皮肤实验条件, 2-EE 经皮肤吸收代谢为 EAA 的程度也不同^[9]。另外, Chung 的动物实验表明, 2-EE 与甲苯、二甲苯协同暴露和 2-EE 单独暴露相比, 血清中 EAA 达到高峰浓度的时间推迟, 高峰浓度与血清中 EAA 的总浓度

均降低^[10]。可见, 代谢酶基因多态性、皮肤状态、协同暴露等因素都可影响 2-EE 体内代谢为 EAA 的水平。

总之, 以 EAA 作为 2-EE 的暴露标志物进行生物学监测是较科学的选择, 既与 2-EE 暴露水平有很好的关联性, 又有较高的敏感性与特异性。同时注意通过匹配等方法消除或降低个体自身与个体间的变异性, 最终得出科学的生物监测结果。

2 二乙氧基乙醇效应标志物

2.1 精液

Honimoto 等以 250 mg/kg 2-EE 灌胃大鼠后发现, 染毒组附睾中精子活动度各项指标发生不同程度的改变, 以直线运动活动度指标降低最为敏感^[11]。2-EE 暴露工人精液检查显示: 接触高浓度 2-EE 组, 精子密度、精子总数、精子活动力、精子存活率明显下降, 而精子畸形率明显升高^[12]。选择精液检查作为 2-EE 效应标志物的优点是可直接地反映生殖毒性。但是由于精液标本不易获得, 工人的依从性较低, 而且精液检查结果中各参数之间常存在结论不一致的现象, 限制了此项检查评价生殖毒性的应用^[13]。

2.2 生精上皮细胞

多项动物学实验表明, 雄性大鼠生精上皮粗线期初级精母细胞和精子细胞对 2-EE 损伤敏感。2-EE 对生精上皮细胞的损伤具有细胞特异性和时期(stage)特异性。病理学表现为初级精母细胞皱缩、细胞浆嗜酸粒细胞增多、空泡形成、细胞核浓缩、核溶解, 精子细胞出现染色质“边缘效应”等^[14]。以生精上皮细胞病理学结果作为效应标志物可以明确地反映生殖毒性, 但是只适合于动物实验, 不适合应用于人群研究。

2.3 精液乳酸脱氢酶-C₄活性

高星等研究发现 2-EE 暴露工人精液中乳酸脱氢酶-C₄(LDH-C₄)活性降低, 随着暴露水平增加, LDH-C₄活性逐渐下降, 呈剂量-反应关系。由于 LDH-C₄为精子糖代谢所必需的酶, 为精子活动提供能量, 如果该酶受到抑制, 将影响精细胞的生成, 使精子数量减少, 活力下降。因此, 可将 LDH-C₄活性作为 2-EE 精子毒性的效应标志物^[15]。

从理想效应标志物的标准来看, 上述效应标志物都存在不同程度的缺点。当前困扰 2-EE 生殖毒性效应标志物的研究一方面来源于生物样品(精液)不易取得, 另一方面是 2-EE 生殖毒性机制还不清楚, 因此, 应加强这些方面的研究。

3 二乙氧基乙醇易感性标志物

常见的一种易感性标志物是代谢酶的基因多态性标记^[16]。对于 2-EE 代谢酶基因多态性的研究已取得较大进展。

3.1 细胞色素 P₄₅₀-2E1(CYP2E1)基因多态性

收稿日期: 2005-01-18; 修回日期: 2005-04-01

作者简介: 贾娜(1979-), 女, 北京人, 在读硕士研究生, 主要从事分子毒理学研究。

P₄₅₀是一组内质网酶,主要催化氧化反应。CYP2E1 是外源性化合物在体内生物转化第一时相酶,可以被多种化学物质诱导,参与 2-EE 代谢为乙氧基乙醛。

对 CYP2E1 基因 5' 读码框区与 DnaI 区相连的-1019bp 位多态性的研究较多^[17]。在高加索人群中-1019 位的多态性与-1259 位的突变完全连锁,应用 2 种限制性内切酶 RsaI 和 PstI 区将其多态性分为 c1 (RsaI+PstI-) 和 c2 (RsaI-PstI+), 并且 c2 为少见的等位基因。人群基因多态性分为 3 类: A (c1/c1)、B (c1/c2) 和 C (c2/c2)。该基因的多态性与转录水平差别显著相关,使 CYP2E1 基因的转录活性不同,且各基因型在外周淋巴细胞中 mRNA 水平存在差异^[18]。

人群分子流行病学调查显示,2-EE 暴露工人中 A 基因型个体与 B、C 基因型个体在接触相同浓度的 2-EE 时,尿中 EAA 浓度差异存在显著性。携带突变基因 C₂ 的个体代谢产生的 EAA 高于携带 C₁ 基因的个体^[19]。

3.2 乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 基因多态性

ADH 是 2-EE 代谢为 EAA 的限速酶。在睾丸间质细胞内存在特异性,其在肝脏中含量最丰富。ADH 同工酶包括 ADH-1、ADH-2、ADH-3 和 ADH-4。ADH-1 主要存在于与外源化合物首先接触的组织中,因此可能是外源醇或醛的第一道代谢屏障^[20]。ADH-2 主要参与内源性醇和醛的代谢。不同碳链长度的醇醚类化合物经皮肤吸收代谢时,诱导皮肤中不同的 ADH 同工酶,如短链醇醚类化合物主要诱导 ADH-1,而长链醇醚类化合物主要诱导 ADH-3 和 ADH-4。同时 ADH 的活性存在性别差异,雌鼠肝中 ADH 活性强于雄鼠,而雄鼠胃肠中 ADH 活性强于雌鼠^[21]。

3.3 乙醛脱氢酶 2 (aldehyde dehydrogenase 2, ALDH₂) 基因多态性

ALDH₂ 参与 2-EE 代谢为 EAA。研究表明,位于 ALDH₂ 基因-487 位点处 G→A 突变,产生突变基因 ALDH₂^{*2},该基因为显性基因^[22]。携带 ALDH₂^{*2} 基因的个体,其代谢乙醛的能力较正常基因 ALDH₂^{*1} 下降,所以,在饮酒后会导致体内乙醛浓度上升,引起面红、脉搏加快等。2-EE 相同暴露水平下,正常基因型 ALDH₂ 代谢 EAA 能力高于突变型^[3]。

综上所述,随着工业的繁荣,大量化学物质(包括 2-EE)进入我们工作、生活的环境,其中一些在不同程度上损害人类生殖功能。而且大多数外源化合物损伤粗线期精母细胞,由于这类细胞中染色体已完成交换,大量重要的 RNA 和蛋白质已合成,并且它们对精子发生过程亦极其重要。2-EE 作用的敏感细胞同样为粗线期精母细胞,因此对 2-EE 生殖毒性危险度评价的研究可以为其他生殖毒物的评价过程提供参考,以达到更好地保护工人生殖健康的目的。

参考文献:

- [1] 高星,李祖瑶,周素梅,等. PS 版作业工人健康影响的调查 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1999, 16 (4): 228-230.
- [2] Johnson W Jr. Final report on the safety assessment of ethoxyethanol and ethoxyethanol acetate [J]. Int J Toxicol, 2002, 21 (Suppl 1): 9-62.
- [3] Lockley DJ, Howes D, Williams FM. Percutaneous penetration and metabolism of 2-ethoxyethanol [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2002, 15, 21994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>
- [4] 王三虎,高星,坂井公. 细胞色素 P450-2E1 基因型对 2-乙氧基乙醇代谢影响的研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2001, 28 (6): 19-20.
- [5] 王三虎,高星,坂井公. 乙醛脱氢酶基因型对 2-乙氧基乙醇代谢影响的研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2001, 19(6): 450-452.
- [6] Garney EW. An integrated perspective on the development at toxicity of ethylene glycol [J]. Reprod Toxicol, 1994, 2 (suppl8): 99-105.
- [7] Sakai T, Araki T, Masuyama Y. Determination of urinary alkoxyacetic acids by a rapid and simple method for biological monitoring of workers exposed to glycol ethers and their acetates [J]. Int Arch Occup Environ Health, 1993, 64: 495-498.
- [8] Choi HS, Park JH, Song JS, et al. Determination of urinary metabolites of alkyl cellosolves by solid phase extraction and GC/FID [J]. J Occup Health, 2004, 46 (4): 260-265.
- [9] Wilkinson SG, Williams FM. Effects of experimental conditions on absorption of glycol ethers through human skin in vitro [J]. Int Arch Occup Environ Health, 2002, 75 (8): 519-527.
- [10] Chung WG, Yu IJ, Park CS, et al. Decreased formation of ethoxyacetic acid from ethyleneglycol monoethyl ether and reduced atrophy of testes in male rats upon combined administration with toluene and xylene [J]. Toxicol Lett, 1999, 11, 104 (1-2): 143-145.
- [11] Horimoto M, Isobe Y, Isogai Y, et al. Rat epididymal sperm motion changes induced by ethylene glycol monoethyl ether, sulfasalazine, and 2, 5-hexanedione [J]. Reprod Toxicol, 2000, 14 (1): 55-63.
- [12] 周素梅,高星. 用健康危险度评价方法探讨溶剂剂的卫生标准 [J]. 中国工业医学杂志, 2000, 13 (2): 80-83.
- [13] Ong CN, Shen HM, Chia SE. Biomarkers for male reproductive health hazards: are they available? [J]. Toxicol Lett, 2002, 134(1-3): 17-30.
- [14] Chang Yong YOON, Choong Man HONG, Yong-Yeon CHO, et al. Flow cytometric assessment of ethylene glycol monoethyl ether on spermatogenesis in rats [J]. J Vet Med Sci, 2003, 65 (2): 207-212.
- [15] 高星,陈冰铨,张鹏,等. 接触 2-乙氧基乙醇对 IDH-C4 活性影响与精子毒性关系 [J]. 中国工业医学杂志, 1997, 10: 72-75.
- [16] Thier R, Golka K, Bruning T, et al. Genetic susceptibility to environmental toxicants: the interface between human and experimental studies in the development of new toxicological concepts [J]. Toxicology Letters, 2002, 127: 321-327.
- [17] Rannug A, Alexandrie AK, persson L, et al. Genetic polymorphism of cytochromes P450 1A1, 2D6 and 2E1: regulation and toxicological significance [J]. JOEM, 1995, 37 (1): 25-36.
- [18] Watanabe J. Different regulation and expression of the human CYP2E1 gene due to the RsaI polymorphism in the 5-flanking region [J]. J Biochem, 1994, 116: 321-326.
- [19] 坂井公,牛尾耕一,荒木高明. CYP2E1 および GSTM1 多型とエチレングリコールモ、エチルろ、テート尿中代謝物との関係 [J]. 产卫志, 1995, 37: 460-465.
- [20] Aasmoe L, Winberg JO, Aarbakke J. The role of liver alcohol dehydrogenase isoenzymes in the oxidation of glycol ethers in male and female rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1998, 150: 86-90.
- [21] Aasmoe L, Aarbakke J. Sex-dependent induction of alcohol dehydrogenase activity in rats [J]. Biochem Pharmacol, 1999, 57 (9): 1067-1072.