

三氯乙烯对裸鼠皮肤的刺激性损伤及维生素E的保护作用

于均峰, 周承藩, 沈彤, 朱启星*

(安徽医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系, 安徽 合肥 230032)

摘要: 目的 研究有机溶剂三氯乙烯(TCE)对BALB/c裸鼠皮肤组织的氧化损伤以及维生素E的保护作用。方法 将BALB/c裸鼠随机分成100%TCE、80%TCE、40%TCE、20%TCE、10%TCE、溶剂对照组(橄榄油)、阳性对照组(5%SLS)、空白组和5%、10%、20%维生素E保护组,背部皮肤染毒1d,观察皮肤损伤反应,取染毒皮肤进行实验,比较各组MDA含量、SOD活性。结果 各染毒剂量组皮肤组织的MDA含量、SOD活性的差异有统计学意义,TCE浓度越高,氧化应激水平越高,但维生素E保护组氧化应激水平不高。结论 TCE可通过氧化应激对皮肤组织造成损伤,维生素E在一定浓度下对皮肤组织有保护作用。

关键词: 三氯乙烯; 氧化应激; 维生素E

中图分类号: O623.221; R751 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)02-0078-04

Damaging effect of trichloroethylene on skin and the protective effect of vitamin E

YU Jun-feng, ZHOU Cheng-fan, SHEN Tong, ZHU Qi-xing*

(Department of Occupational and Environmental, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract: **Objective** To study the damaging effect of trichloroethylene, a organic solvent, on skin and the protective effect of vitamin E on it. **Method** BALB/c mice were randomly divided into several groups which were exposed to different concentrations of trichloroethylene, such as 100%TCE group, 80%TCE group, 40%TCE group, 20%TCE group, 10%TCE group, solvent (olive oil) control group, positive control (SLS) group, 5%VitE treated group, 10% VitE treated group, 20% VitE treated group and control group. The skin on the back of BALB/c mice were exposed to TCE for one day, observing the damage of the skins and detecting the level of MDA and activity of SOD in skin with kits. **Result** The MDA contents in TCE-exposed groups were gradually rose with the concentrations of TCE, the SOD activities were dropped; while the MDA levels and SOD activities in vitamin E treated groups were gradually declined and rose respectively with the increase of Vit E concentration. **Conclusion** Trichloroethylene may induce skin damage through its oxidation stress effect and vitamin E shows some protective effect on skin because of its antioxidative effect.

Key words: Trichloroethylene; Oxidative stress; Vitamin E

三氯乙烯(trichloroethylene, TCE)是一种重要的有机溶剂,常常作为金属清洗剂、脱脂剂等应用于五金、电子、玩具等行业。研究表明,TCE可以引起神经系统、肝脏、肾脏和肺脏等器官的损害甚至具有潜在的致癌作用,国际癌症研究署已将其定为2A类致癌物^[1,2]。三氯乙烯还能引起皮肤损伤,主要表现为原发性刺激、急慢性职业性皮炎,甚至可致重症多形红斑、大疱性表皮坏死松解症等^[3,4]。对于TCE引起的职业人群皮肤损害的作用机制,目前多集中于变应性接触性皮炎(allergic contact dermatitis, ACD)的研究^[5],认为是T细胞介导的IV型变态反应,然而TCE

接触的工人中常见的皮肤红斑、水肿和角质形成细胞囊泡样变等显示免疫因素并不能完全解释其发病机制^[6],而刺激性接触性皮炎(irritant contact dermatitis, ICD)占有重要的地位。

维生素E(VitE)是一族脂溶性化合物,具有很强的抗氧化作用,其中 α -生育酚(α -Tocopherol)的抗氧化活性最强。维生素E作为一种强抗氧化剂和自由基清除剂^[7],是机体内非酶性抗氧化系统的主要成员,通过捕捉氧自由基而发挥抗脂质过氧化作用,保护生物膜免受氧化损伤^[8]。本次研究拟从整体动物实验的角度研究TCE对皮肤的刺激性损伤及其引起ICD的可能途径,以及维生素E的保护作用,为职业人群皮肤TCE损伤的预防及治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

三氯乙烯(Sigma公司)、月桂硫酸钠(Sodium lauryl sulphate, SLS)、维生素E(α -生育酚, Sigma公

收稿日期: 2005-09-30; 修回日期: 2005-11-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471469); 安徽省人才开发资金资助项目(2004Z032); 安徽省高校省学术和技术带头人后备人选科学研究资助项目(2005hzz17zd)。

作者简介: 于均峰(1979-),男,助教,硕士生,研究方向: 皮肤毒理学。

*: 通讯作者,教授,硕士生导师。

司产品)、橄榄油、PBS 液(phosphate buffered saline)、无刺激性胶布,丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒购自南京建成生物研究所。

1.2 实验动物

成年 BALB/c 裸鼠 [购自上海市斯莱克动物实验有限责任公司,实验动物质量许可证:3CXK(沪)2003-0003],选用体重 20~30 g、7~8 周雌性成年 BALB/c 裸鼠,实验前在动物笼内观察 3~5 d,使其适应环境,并根据其健康状况决定是否进入实验。实验环境为 SPF 清洁级动物房,实验室认可编号为医动字第 010 号。

1.3 实验方法

1.3.1 剂量与分组 将符合条件的 55 只雌性 BALB/c 裸鼠,随机分成 100%TCE、80%TCE、40%TCE、20%TCE、10%TCE、溶剂对照组(橄榄油)、阳性对照组(5%SLS)和空白对照组;并另外选取 3 组用 100%TCE 染毒,研究 5%、10%和 20%维生素 E 的保护作用。

1.3.2 急性刺激染毒和维生素 E 的保护作用 用微量移液器将 100 μ l 不同浓度的 TCE、溶剂对照物和阳性对照物涂到裸鼠 2.5 cm $\times$ 2.5 cm 大小的背部皮肤上,用一层无刺激性的塑料膜覆盖,再用无刺激性胶布加以固定,24 h 后去除塑料薄膜覆盖物,用生理盐水除去受试物。VitE 处理组是将 100 μ l 不同浓度的维生素 E 先涂到裸鼠 2.5 cm $\times$ 2.5 cm 大小的背部皮肤上,1 h 后将 100 μ l 100%TCE 涂到同样的位置,24 h 实验结束后用生理盐水除去受试物。

1.3.3 皮肤刺激评价 染毒结束后用生理盐水除去背部皮肤的残留受试物,10 min 后按照国家标准 GB7919-87《化妆品安全性评价程序和方法》中的皮肤刺激评分标准进行皮肤刺激反应视觉评分和皮肤刺激强度的评价。

1.3.4 制备皮肤组织匀浆、生化比色 裸鼠处死后,迅速取下背部染毒皮肤,称重后切成小片,用少量 PBS 液冲洗,然后加入 4 ml 的 PBS 液用玻璃匀浆器制成 10%的组织匀浆,实验在冰水浴的低温环境下进行,1 000 r/min 离心 10 min,取上清。生化比色法测定皮肤 MDA 含量和 SOD 活性,并用 Lowry 法测定组织匀浆中蛋白质的含量。

1.4 统计分析

用 Excel 录入数据、绘图,用 SPSS10.0 进行分析,不同剂量组进行方差齐性检验,多组均数比较用单因素方差分析。方差一致性检验及均数比较的 P 值均取 0.05。

2 结果

2.1 裸鼠皮肤的刺激反应

除去受试物后观察发现,低剂量染毒组的皮肤反应应轻微,有少许红斑,刺激强度为轻刺激性反应;而 80%TCE 和 100%TCE 染毒组反应明显,染毒皮肤有严重的损伤,红斑、水肿,片状皮肤隆起甚至有片状焦痂形成,5%SLS 组有大量紫色焦痂形成,损伤严重,刺激强度为强刺激性。保护组的反应较轻,有轻微的红斑出现,而且保护作用逐渐增强。视觉评分结果见表 1、2。

2.2 皮肤组织氧化应激水平的改变

2.2.1 MDA 含量的测定 各染毒组实验结果见表 1。方差齐性检验 $P=0.118$,方差分析各组 MDA 含量的差异有显著性($P=0.003$)。随着 TCE 浓度的增高,组织中 MDA 含量逐渐升高,20%TCE、80%TCE、100%TCE、5%SLS 与溶剂对照组比较差异有显著性,但 40%TCE 与溶剂对照组差异无显著性,100%TCE、5%SLS 与溶剂对照组比较 $P<0.01$ 。空白组与溶剂组差异无显著性,提示溶剂对皮肤无刺激性,满足实验要求。

2.2.2 SOD 活性的测定 实验结果见表 1。方差齐性检验 $P=0.09$,方差分析各剂量组 SOD 的活性差异有显著性($P=0.023$)。随着 TCE 浓度的增高,组织中 SOD 的活性逐渐降低,20%TCE、40%TCE、80%TCE、100%TCE、5%SLS 与溶剂对照组的比较差异有显著性,而且 80%TCE、100%TCE、5%SLS 剂量组与溶剂对照组的差异 $P<0.01$,空白组与溶剂组差异无统计学意义。对 SOD 和 MDA 作相关分析, $r=-0.276(P=0.041)$,SOD 活性与 MDA 含量呈负相关。

2.3 维生素 E 的保护作用

3 组不同 VitE 剂量组的 MDA 含量与溶剂对照组比较差异无统计学意义,当 VitE 浓度在 5%时对皮肤损伤有保护作用,而且 20%VitE 保护组与 100%TCE 组的差异有显著性。5%VitE 保护组的 SOD 活性低于溶剂对照组,差异有统计学意义。但是 10%VitE 保护组的 SOD 水平恢复明显,与溶剂对照组的差异无显著性,SOD 的活性得到有效的保护;20%VitE 保护组与 100%TCE 组相比差异有显著性($P<0.05$),提示 SOD 活力达到与溶剂对照组相近的水平。见表 2。

3 讨论

近年来有关 TCE 中毒的案例时有报道,尤其以南部沿海地区为多,中毒的靶器官主要是肝脏、肾脏、神经、皮肤等^[9,10],甚至有死亡病例的报道。有资料表明长期接触 TCE 的工人其体内血清氧化应激

表 1 不同浓度 TCE 对皮肤组织氧化应激 2 项指标的影响 ($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	皮肤反应评分	皮肤刺激程度	MDA (nmol/mg pro)	SOD (U/mg pro)
空白对照	0	无红斑、无水肿	483.30±92.49	3 141.65±364.34
溶剂对照	0.20±0.45	无红斑、无水肿	487.39±51.38	3 171.93±160.88
10%TCE	0.40±0.55	红斑不明显	516.38±93.53	2 876.00±145.92
20%TCE	1.80±0.45	轻微红斑、水肿	577.92±75.35 *	2 711.26±244.84 *
40%TCE	3.80±0.44	大片红斑、皮肤略隆起	586.28±52.94	2 619.09±207.06 *
80%TCE	6.20±0.84	有严重的红斑、水肿	624.38±53.18 *	2 362.50±352.50 **
100%TCE	7.20±0.87	有片状焦痂形成	680.20±81.14 **	2 589.71±226.73 **
5%SLS	7.60±0.54	大量紫色焦痂形成, 皮肤隆起	769.57±77.51 **	2 400.24±273.46 **

与溶剂对照组比较, * $P<0.05$ ** $P<0.01$

表 2 不同浓度维生素 E 对 TCE 染毒皮肤组织氧化应激的影响 ($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	皮肤反应评分	皮肤刺激程度	MDA (nmol/mg pro)	SOD (U/mg pro)
溶剂对照	0.20±0.45	无红斑、无水肿	487.39±51.38	3 171.93±160.88
100%TCE	7.20±0.87	有片状焦痂形成	680.20±81.14	2 589.71±226.73
5%VitE+100%TCE	3.60±0.55	有片状红斑、水肿	598.45±52.18	2 470.74±69.76 **
10%VitE+100%TCE	2.40±0.66	少量红斑、水肿不明显	548.66±64.99	2 936.51±322.37
20%VitE+100%TCE	0.60±0.84	红斑、水肿不明显	467.01±57.87 #	3 115.34±124.52 #

与溶剂对照组比较, * $P<0.01$; 与 100%TCE 组比, # $P<0.05$

水平明显升高^[8-11], 致肝、肾功能不全。动物实验表明肝脏、肾脏内的氧化应激水平升高, 且与 TCE 的浓度有关联, 体外实验也提示氧化应激在 TCE 引起的皮肤损伤中有很重要的作用^[12]。本次采用了整体动物实验的方法选用非酶性抗氧化剂维生素 E 作为保护性因素^[13], 研究 TCE 引起的刺激性皮炎的可能作用机制, 选用成年 BALB/c 裸鼠进行皮肤刺激实验, 裸鼠皮肤的结构特点以及对毒物的吸收数据与豚鼠、昆明小鼠、兔相比更接近于人^[14], 并且实验在 SPF 级别的环境中进行, 保证了实验结果的可靠性。

实验结果表明, 裸鼠接触低剂量 TCE 有轻微的红斑、无水肿, 损伤不明显, 而高剂量组、阳性对照组损伤较重, 皮肤有明显的结痂, 广泛的水肿、隆起, 表明 TCE 对皮肤有刺激性损伤, 且随着剂量的增加, 损伤逐渐加重。组织中 MDA 是自由基攻击生物膜的多不饱和脂肪酸引起脂质过氧化后形成的产物, 可以衡量体内脂质过氧化的水平, 实验中不同剂量组的裸鼠皮肤中 MDA 含量的差异有统计学意义, 低剂量组与溶剂对照无差异, 氧化应激水平不高, 然而高剂量组和阳性对照组的皮肤 MDA 含量明显升高, 提示高浓度 TCE 染毒裸鼠的皮肤组织内自由基生成增多, 氧化应激水平升高, 脂质过氧化产物生成增多。SOD 是体内的酶性抗氧化剂, 其通过清除超氧阴离子保护细胞免受自由基的过氧化损伤, 但若组织中有过量的氧自由基, 则可消耗 SOD, 其活性降低, SOD 活性的变化可间接地反映体内自由基产生的多少及体内氧化应激水平的高低。实验中裸鼠皮肤组织的 SOD 活性测定显示 20%TCE、40%TCE、80%TCE、

100%TCE 染毒组及 5%SLS 阳性对照组与溶剂对照组的差异均有统计学意义, 表明 TCE 能够引起皮肤组织的氧自由基产生增多, SOD 活力降低, 并且随着 TCE 浓度的升高皮肤组织氧化应激的水平逐渐增高, MDA 含量逐渐增多, SOD 的活性与 MDA 含量呈负相关。3 组维生素 E 保护组皮肤组织的 MDA 含量与溶剂对照组相比差异无显著性, 提示维生素 E 可拮抗 TCE 对皮肤生物膜的氧化性损伤, 降低组织内的自由基含量, 而且 20%VitE 保护组与 100%TCE 染毒组相比差异有显著性, 提示该组得到了有效的保护。5%VitE 保护组的 SOD 活性与溶剂对照组差异有显著性, 表明有过量自由基生成, SOD 活性降低, 该剂量组没有得到有效的保护, 但是 10%VitE、20%VitE 保护组与溶剂对照组的差异无统计学意义, 对皮肤组织的保护作用增强, 实验结果提示随着维生素 E 浓度的增高, 维生素 E 拮抗 TCE 的作用逐渐增强, 实验动物的皮肤反应减轻。综上, 三氯乙烯对皮肤组织有急性刺激毒性, 脂质过氧化在三氯乙烯引起的皮肤损害中起了重要作用。同时, 维生素 E 对三氯乙烯所致的皮肤刺激性损伤具有较好的保护作用。

参考文献:

- [1] International Agency for Research on Cancer. Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals [M]. IRAC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1995, 63: 75-158.
- [2] Maull EA, Lash LH. Trichloroethylene: A current review of metabolism, mode of action, and regulatory considerations [J]. Toxic Subst Mech. 1998, 17: 153-169.
- [3] 张坤海. 三氯乙烯对人体健康的影响 [J]. 职业与健康, 2003, 19 (3): 5-6.

(下转第 83 页)

皮肤刺激性检测是化学品安全性评价的一项重要内容。皮肤对化学物质的屏障部位主要在角质层, 其次是皮肤表面的氢离子浓度对酸、碱的缓冲能力。化学品接触皮肤表面后穿透皮肤的角质层到达深层组织, 对皮肤结构的破坏产生了对皮肤的刺激作用。本实验室构建的检测模型是利用组织工程学方法, 以牛胶原为支架, 人体正常皮肤作为细胞来源而构建的三维立体皮肤替代物。光镜下观察含有基底层、棘层、颗粒层和角质层。透射电镜观察结果显示, 生物活性皮肤表皮层中, 棘层细胞之间以桥粒连接, 并具有天然皮肤中的板层体、张力纤维和脂滴等结构, 具有与天然皮肤类似的各种超微结构^[10]。如化学品具有刺激性, 则能在一定的接触时间和面积范围内通过扩散穿过皮肤的角质层到达深层组织, 影响细胞的活性, 测定细胞活力便可以界定它的刺激性。本实验设计的检测用组织工程皮肤模型应用 MTT 实验定量细胞活力, 以相对细胞活力值为标准, 能判定所选 10 种化学品中 7 种的刺激性。有 3 种非刺激性的化学品羟基香茅醛、甲基棕榈酸盐、1-溴戊烷错判为刺激性物质。与 EpiDerm 和 Episkin 评价结果相比, 我们的检测模型敏感性较低, 准确性也与上述两种产品有差距, 考虑与我们测试的化学品种类较少和不同批次的检测结果差异较大有关, 其构建工艺的稳定性还有待改进。

组织工程皮肤作为检测模型具有构建工艺固定、性质稳定、应用范围广、一致性强的优点, 且组织工程皮肤中含有来源于人体、能够代谢的活细胞, 因而能够更加真实地模拟人皮肤受到各种刺激后的反应, 其检测结果应更具有说服力。与传统的检测方法相比成本低、可信度高、更符合伦理学要求。下一步拟扩大化学品的检测范围, 稳定构建工艺, 同时进行实验

室内评价、实验室间评价、实验数据库开发、实验方法评价四个阶段的研究, 以进一步验证该组织工程皮肤用于化学品刺激性检测的可靠性。

参考文献:

- [1] Kandarova H, Liebsch M, Genschow E et al. Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests [J]. ALTEX, 2004, 21 (3): 107-114.
- [2] 金岩, 吕红兵, 刘源, 等. 人全层组织工程皮肤的研制 [J]. 实用口腔医学杂志, 2002, 18 (2): 163-166.
- [3] Portes P, Grandidier MH, Cohen C, et al. Refinement of the Episkin protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study [J]. Toxicol In Vitro, 2002, 16 (6): 765-770.
- [4] Liebsch M, Spielmann H. Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology [J]. Toxicol Lett, 2002, 127 (1-3): 127-134.
- [5] Portes P, Pygnafion MJ, Popovic E, et al. Use of human reconstituted epidermis Episkin for assessment of weak phototoxic potential of chemical compounds [J]. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2002, 18 (2): 96-102.
- [6] Jirova D, Kejova K, Brabec M, et al. The benefits of the 3T3 NRU test in the safety assessment of cosmetics: long-term experience from pre-marketing testing in the Czech Republic [J]. Toxicol In Vitro, 2003, 17 (5-6): 791-796.
- [7] 李继平, 贺争鸣, 李冠民, 等. 我国开展动物实验替代方法工作的前景研究 (一) ——我国动物实验替代方法研究的现状 [J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12 (4): 236-238.
- [8] 贺争鸣, 李冠民, 岳秉飞, 等. 我国开展动物实验替代方法工作的前景研究 (二) ——我国动物实验替代方法研究的问题 [J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12 (6): 362-363.
- [9] 贺争鸣, 李冠民, 岳秉飞, 等. 我国开展动物实验替代方法工作的前景研究 (三) ——我国开展动物实验替代方法研究的思路及对策 [J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13 (1): 42-44.
- [10] 吕红兵, 金岩, 刘源, 等. 生物活性皮肤替代物的超微结构观察 [J]. 实用口腔医学杂志, 2003, 19 (5): 424-427.
- tri chloroethylene exposure [J]. J Immunopathol Pharmacol, 2002, 15: 30-32.
- [10] Nakajima T, Yamanoshita O, Kanijima M, et al. Generalized skin reactions in relation to tri chloroethylene exposure: a review from the viewpoint of drug-metabolizing enzymes [J]. J Occup Health, 2003, 45(1): 8-14.
- [11] 邹志方, 李伯灵, 杨翠婷, 等. 低剂量三氯乙烯对作业工人脂质过氧化作用的影响 [J]. 华南预防医学, 2002, 28(3): 23-24.
- [12] Zhu Qi-Xing, Shen Tong, Ding Rui, et al. Cytotoxicity of trichloroethylene on normal human epidermal keratinocytes and protective role of vitamin E [J]. Toxicology, 2005, 209: 55-67.
- [13] Shvedova AA, Kinsin E, Murray A, et al. Enhanced oxidative stress in the skin of vitamin E deficient mice exposed to semisynthetic metal working fluids [J]. J Toxicology, 2002, 176: 135-143.
- [14] Kligman AM, Kligman LH. A hairless mouse model for assessing the chronic toxicity of topically applied chemicals [J]. Food and Chemical Toxicology, 1998, 36: 867-878.