

1-溴丙烷对两种雄性大鼠生殖毒性的研究

黄芬^{1,2}, 王海兰^{2,3}, 市原学², 市原佐保子²

(1. 安徽医科大学流行病学教研室, 安徽 合肥 230032; 2. 日本名古屋大学医学院劳动与环境卫生学教研室, 日本; 3. 广东省职业病防治院, 广东 广州 510300)

摘要: 目的 研究1-溴丙烷对两种雄性大鼠的生殖毒性。方法 将18只Fischer 344大鼠和18只Wistar大鼠分别随机分为两组, 一组给予新鲜空气, 一组给予1 000 ppm 1-溴丙烷, 每天8 h, 连续暴露4周。在显微镜下对附睾的精子活动率和形态进行评价; 睾丸等生殖器官进行了病理学评价。结果 1-溴丙烷的暴露可引起大鼠的体重及生殖器官重量的下降; 附睾的精子数减少、活动率下降、形态异常的精子增多; 睾丸病理切片观察到曲精小管的精子释放延迟以及附睾的病理变化。结论 1-溴丙烷暴露对两种雄性大鼠的生殖系统产生毒性影响, 提示1-溴丙烷也可能对男性工人生殖系统产生不良影响。

关键词: 1-溴丙烷; 生殖毒性; 精子活动率; 精子排放受阻

中图分类号: O612.7 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)05-0260-04

Reproductive toxicity of 1-bromopropane to two strains of male rats by inhalation

HUANG Fen^{1,2}, WANG Hai-lan^{2,3}, ICHIHARA Gaku², ICHIHARA Sahoko²

(1. Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. Nagoya University Graduate school of Medicine, Nagoya, Japan; 3. Guangdong Prevention and Treatment Center for Occupational Diseases, Guangzhou 510300, China)

Abstract Objective To study the reproductive toxicity of 1-bromopropane to male rats by inhalation. **Method** Eighteen Fischer344 male rats and 18 Wistar male rats were randomly divided into 2 groups respectively, one subgroup of each group was exposed to fresh air and the other subgroup was exposed to 1 000 ppm of 1-bromopropane, 8h per day for 4 weeks. Then, the motility and form of sperms in epididymides, the weights and pathological changes of testes, epididymides, seminal vesicles, and other parts of reproductive organs were all examined. **Result** At the end of the experiment, the body weights and the weights of reproductive organs in exposed rats were all reduced significantly, the amount and the motility of epididymal sperms were also decreased, while the cacospermia such as tailless sperms, immature head sperms increased. Additionally, retained, elongated spermatids near the basement membrane at the spermatogenesis cycle IX-XI were found. **Conclusion** The exposure to 1-bromopropane shows definite toxic effects on the reproductive system of male rats, suggesting that this solvent may also have some adverse effects on reproductive system in male workers.

Key words: 1-bromopropane; Reproductive toxicity; Sperm motility; Spermiation failure

溴丙烷是一种有机溶剂, 有1-溴丙烷和2-溴丙烷两种同分异构体。在氟氯碳化合物和1, 1, 1-三氯乙烷等因对臭氧层的破坏作用而被禁止和限制使用后, 溴丙烷因其难燃, 适中的蒸气压和稳定性等特点而被作为替代物质, 用于金属、精密仪器、光学仪器 and 电子元件的清洗, 以及作为粘合剂的溶剂来使用。2-溴丙烷首先作为替代物被引进到工厂大量生产。然而, 引入生产后不久就发现它对人和动物具有较强的生殖和血液毒性, 其使用量很快下降, 它的同分异构体1-溴丙烷作为新的臭氧层破坏溶剂的替代溶剂开始被使用, 但自从1999年Sclar^[1]报告了第一例中毒患者后, 国内外陆续有1-溴丙烷中毒病例报道^[2]。目前我国已

有许多大型化工厂从事1-溴丙烷的生产, 但国内对1-溴丙烷毒性的研究却很少。为了解1-溴丙烷对两种大鼠的生殖系统影响, 我们进行了本次研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1-溴丙烷, 无色油状液体, 纯度为99.81%, 由Tosoh Co., Ltd, Japan公司提供。18只雄性健康Fischer344大鼠购自Clea Laboratories for Experimental Animals, Japan; 18只雄性健康的Wistar大鼠来自名古屋大学动物中心。

1.2 方法

1.2.1 暴露 大鼠购入后在吸入暴露柜内饲养一周使其适应环境。实验环境为16h:8h明暗周期(6:00AM开灯, 10:00PM关灯), 湿度为57%~60%, 温度为23~25℃, 供给充足的水和食物。两种系大鼠各自随机分为2组, 每组9只。一组暴露于

收稿日期: 2006-04-29; 修回日期: 2006-07-17

基金项目: 国家自然科学基金资助(30571581)

作者简介: 黄芬(1972-), 女, 副教授, 硕士生导师, 主要从事职业流行病学研究。

1000ppm 1-溴丙烷, 一组给予新鲜的空气。每天暴露8h, 连续暴露4周。吸入暴露装置配有气相色谱检测1-溴丙烷暴露浓度, 每次检测10s, 每40s循环1次, 计算机可自动调控将浓度控制在设定浓度的±5%。

1.2.2 动物处理 在暴露的过程中每天对动物的形态至少观察2次。分别在暴露前、每暴露一周后、暴露结束后对大鼠进行称重。暴露结束后的16~19h内对大鼠采用断头或其他方法处死, 取出睾丸、附睾、精囊和前列腺并称重。

1.2.3 附睾精子活动率、精子计数及异常精子率 将左侧附睾尾部取下后, 快速称重并在预热为37℃的Hank's液中剪碎, 制成附睾精子悬浊液。取少量悬浊液, 在倍率为200倍的光学显微镜下计数活动精子占全部精子的比率。另取一定数量的附睾精子悬浊液, 用0.5%福尔马林生理盐水稀释固定后放在改良Neubauer型血球计数板上, 在倍率为200倍的光学显微镜下计数1mm²面积上精子的个数, 然后推算附睾精子总数。用附睾精子悬浊液作成涂片, 多重染色后, 在显微镜下观察精子的形态。具体方法参见文献[3]。

1.2.4 病理检查 根据4周暴露后体重, 每组中选取一只体重接近于本组平均体重的大鼠, 麻醉下取出左侧附睾后, 用Zamboni's固定液经左心室全身灌流固定后, 取出其他生殖器官放在Zamboni's固定液中, 将组织用石蜡包埋, 切成5μm薄片, 过碘酸希夫氏(PAS)染色, 观察组织形态。

1.3 统计学分析

用JMP统计软件进行方差分析, 使用Dunnett方法进行各组之间的比较。

2 结果

2.1 大鼠形态和体重的变化

2d暴露后, Wistar大鼠的皮毛开始变红和变脏, 尤其是眼睛四周有许多分泌物, 眼睛难以张开。4周暴露后, Wistar大鼠皮毛变得很红很脏。而Fischer344大鼠无这样的变化, 但不愿饮水和进食, 一只Fischer344大鼠在暴露10d后虚弱而死。Wistar大鼠摄入食物和水正常。

Fischer344大鼠经暴露1周后, 体重低于对照组($P < 0.05$), 暴露2周后, 暴露组体重显著低于对照组($P < 0.01$)。Wistar大鼠暴露2周和3周后, 体重低于和显著低于对照组。见表1。

2.2 各组的生殖器官重量

4周暴露后, Fischer344大鼠附睾和精囊绝对重量明显低于对照组, 睾丸绝对重量也低于对照组。Wistar大

鼠附睾和精囊绝对重量显著低于对照组, 但睾丸绝对重量与对照组相比差异无统计学意义。见表2。

表1 1-溴丙烷4周暴露后两种大鼠的体重变化 g

| 暴露时间 | Fischer344 | | Wistar | |
|------|-------------|-----------------|--------------|-----------------|
| | 对照 (n=9) | 1-溴丙烷 (n=8) | 对照 (n=9) | 1-溴丙烷 (n=9) |
| 开始 | 177.67±6.12 | 181.00±4.09 | 239.67±10.04 | 241.44±16.40 |
| 1周 | 189.33±7.21 | 180.67±8.72 * | 264.44±15.39 | 253.33±13.73 |
| 2周 | 208.33±7.71 | 189.13±12.57 ** | 283.00±18.59 | 261.67±14.29 * |
| 3周 | 216.44±8.85 | 183.50±11.59 ** | 294.78±24.35 | 261.63±11.54 ** |
| 4周 | 229.33±8.08 | 190.63±12.86 ** | 304.00±24.91 | 267.88±17.52 ** |

运用Dunnett法同对照组进行比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表2 1-溴丙烷4周暴露后两种大鼠生殖器官重量的变化

| 器官 | Fischer344 | | Wistar | |
|----------------------|------------|---------------|-----------|--------------|
| | 对照 (n=8) | 1-溴丙烷 (n=7) | 对照 (n=8) | 1-溴丙烷 (n=8) |
| 绝对重量 (g) | | | | |
| 附睾 | 0.67±0.02 | 0.49±0.04 ** | 0.94±0.07 | 0.79±0.09 ** |
| 睾丸 | 2.89±0.14 | 2.70±0.16 * | 2.41±0.24 | 2.38±0.14 |
| 前列腺 | 0.39±0.06 | 0.32±0.13 | 0.32±0.05 | 0.34±0.13 |
| 精囊 | 1.05±0.10 | 0.78±0.17 ** | 1.11±0.05 | 0.84±0.13 ** |
| 相对重量 (脏器重量/体重, mg/g) | | | | |
| 附睾 | 3.08±0.16 | 2.67±0.28 * | 3.23±0.23 | 3.05±0.31 |
| 睾丸 | 13.02±0.57 | 14.84±0.41 ** | 8.28±0.72 | 9.16±0.44 * |
| 前列腺 | 1.75±0.23 | 1.73±0.62 | 1.09±0.19 | 1.30±0.45 |
| 精囊 | 4.72±0.50 | 4.28±0.80 | 3.84±0.37 | 3.22±0.47 * |

运用Dunnett法同对照组进行比较, 附睾和睾丸的重量是左右重量之和, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 附睾精子检查

不管是Fischer大鼠还是Wistar大鼠, 暴露组的附睾精子数和精子活动率都低于对照组, 两者间差异有统计学意义, 见表3。精子涂片检查结果显示, 暴露组的精子数明显减少, 即使有精子存在, 精子也表现为没有头部, 或有头部但头部变粗(即香蕉样头部)及头部弯钩角度减少、变直, 见图1。

表3 1-溴丙烷暴露后精子数量、活动的变化

| 指标 | Fischer344 | | Wistar | |
|-----------------------|------------|---------------|------------|---------------|
| | 对照 (n=9) | 1-溴丙烷 (n=8) | 对照 (n=9) | 1-溴丙烷 (n=9) |
| 精子数 ($\times 10^6$) | 38.1±15.4 | 6.6±1.7 ** | 59.4±20.1 | 10.1±2.5 ** |
| 精子活动率 (%) | 83.92±5.79 | 60.00±7.46 ** | 81.59±7.37 | 63.22±6.67 ** |

与对照组比较, ** $P < 0.01$

2.4 附睾和睾丸的病理改变

病理切片中, 两种大鼠暴露组的附睾管腔直径减少, 管内精子量少并可以发现中性粒白细胞, 管壁较薄, 而对照组管内精子较多, 没有中性粒白细胞的发现, 管腔直径相对较宽, 见图2。两种大鼠暴露组的睾丸病理切片中发现, 在精子发生周期的IX~XI分期的曲细精管切面上, 观察到有19级精子的释放延迟, 见图3。

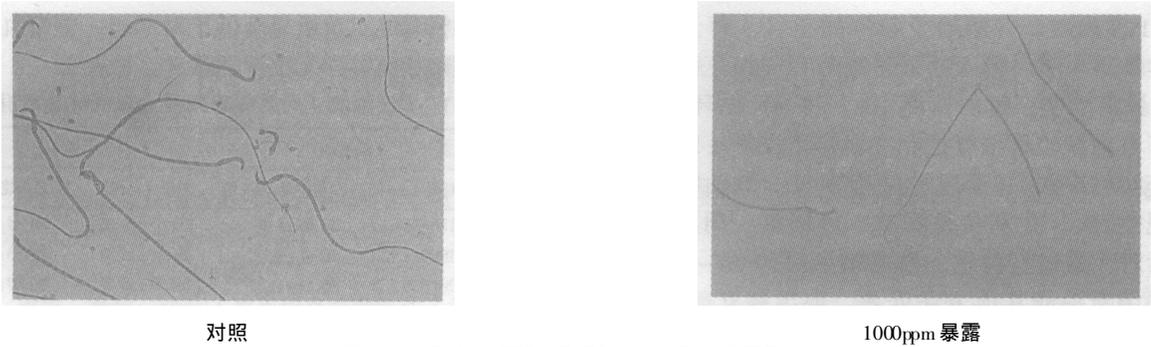


图1 多重染色下对照组和暴露组的精子形态

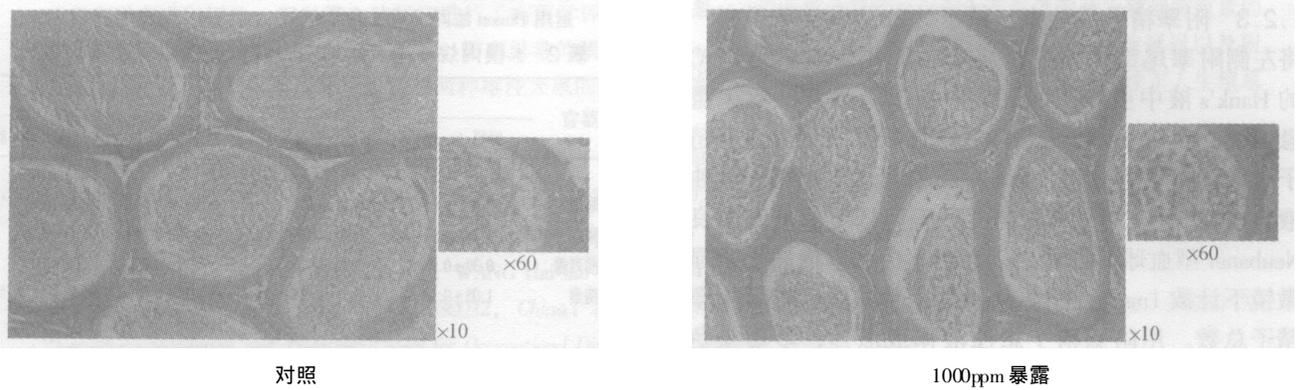


图2 1-溴丙烷4周暴露后大鼠附睾的病理变化

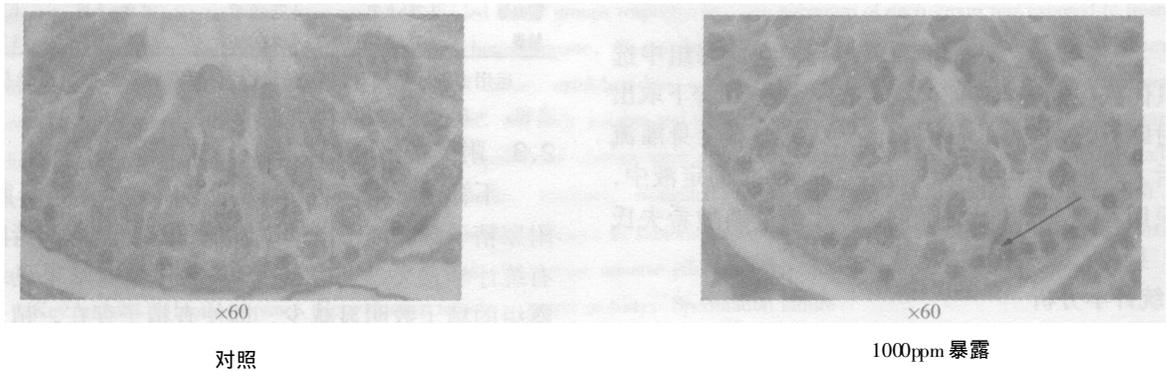


图3 1-溴丙烷4周暴露后大鼠睾丸的病理变化 (PAS 染色, 箭头表示释放延迟的精子)

3 讨论

20世纪90年代中期,韩国和日本首先使用2-溴丙烷作为臭氧层破坏溶剂的替代物质。1995年在韩国工厂首先发现接触2-溴丙烷的工人精子数减少、闭经和贫血等症状^[4]。病例发现后一系列的研究揭示2-溴丙烷的毒性,其使用量很快下降,它的同分异构体1-溴丙烷作为新的替代物开始使用。目前在美国和日本等国都有1-溴丙烷接触者发病的报告,患者的主要症状表现为神经和生殖系统的损伤^[1,4]。生产车间的1-溴丙烷浓度约为20~400ppm,浓度的高低与生产工艺及生产过程有关^[5]。与此同时1-溴丙烷毒性的动物实验也陆续开展起来,国外的众多研究者选择了Wistar大鼠进行动物实验,发现暴露浓度大于400ppm可产生毒性作用,大于1500ppm可产生较强的毒性作用^[3],我们的预实验也证实了这一点,因此,在国

外文献和预实验的基础上,我们选择了1000ppm作为暴露组浓度,来研究1-溴丙烷对两种大鼠的生殖毒性。发现1-溴丙烷对大鼠的生殖器的重量、精子数、精子活动率、精子的发育和释放有较强的影响。

1-溴丙烷的暴露使两种大鼠的行为都发生了变化,Fischer344大鼠变得温顺,不愿摄入食物,在1周暴露后体重就显著低于对照组,并有1只大鼠死亡。而Wistar大鼠的自洁能力发生了变化,4周暴露后,Wistar大鼠变得很脏。两种大鼠的行为变化,可能是因1-溴丙烷对中枢神经系统的损害。Wang等^[9]研究发现1-溴丙烷暴露可引起大鼠脑组织的肌酸激酶活性下降和神经元特异蛋白 γ -烯醇酶含量的降低,另外也提示1-溴丙烷可能对两种大鼠中枢系统作用有所不同。

2周暴露后,Wistar大鼠的体重也显著低于对照组。Fischer大鼠和Wistar大鼠4周暴露后,前列腺和

精囊的重量明显低于对照组。Fischer 大鼠暴露组的睾丸重量低于对照组, 但 Wistar 大鼠暴露组睾丸重量与对照组差异无统计学意义。这表明 1-溴丙烷对两种大鼠都具有一定的生殖毒性。

1-溴丙烷的暴露减少了精子的数量和精子的活动率, 并且增加了无头的精子或者有异常头部的精子数量。在睾丸曲细精管的病理中发现应在 VIII 期释放的精子延迟到 IX ~ XI 期才释放, 这可能是精子数量变少的原因。精子释放延迟的原因目前尚不太清楚, 可能与激素水平低下和长型精子形态异常有关, 也可能与睾丸支持细胞功能紊乱有关, 提示 1-溴丙烷对睾丸支持细胞的功能可能有影响^[9]。附睾精子活动率的下降, 可能与精子在附睾中的成熟、获能有关, 形态异常精子的增加, 特别是香蕉形头部、无头部精子的出现, 显示附睾中未成熟精子数量的增加^[7, 8]。

本研究表明, 1-溴丙烷的暴露对两种雄性大鼠都具有一定的生殖毒性作用, 但其毒性作用机制仍不明确。随着臭氧层破坏溶剂的禁止使用, 我国 1-溴丙烷的生产和使用量必将进一步扩大。因此, 我们亟须进一步研究 1-溴丙烷的毒性作用, 进而达到保护劳

动者健康的目的。

参考文献:

- [1] Sclar G. Encephalomyelodradiculoneuropathy following exposure to an industrial solvent [J]. Clin Neurol Neurosurg 1999, 101: 199-202
- [2] Idihara G, Miller JK, Ziolkowska A, et al. Neurological disorders in three workers exposed to 1-bromopropane [J]. J Occup Health, 2002, 44: 1-7.
- [3] Idihara G, Asaeda N, Kumazawa T, et al. Testicular and hematopoietic toxicity of 2-bromopropane, a substitute for ozone layer-depleting chlorofluorocarbons [J]. J Occup Health, 1997, 39: 57-63.
- [4] Kim Y, Jung K, Hwang T, et al. Hematopoietic and reproductive hazards of Korean electronic workers exposed to solvents containing 2-bromopropane [J]. Scand J Work Environ Health, 1996, 22: 387-391.
- [5] Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction. NTP-CERHR Expert Panel report on the reproductive and developmental toxicity of 1-bromopropane [J]. Reproductive Toxicology, 2004, 18: 157-188.
- [6] Wang H, Ichihara G, Ito H, et al. Dose-dependent biochemical changes in rat nervous system after 12-week exposure to 1-bromopropane [J]. Neurotoxicology, 2003, 24: 199-206.
- [7] 丁训诚, 蒋学之, 顾祖维, 等. 男性生殖毒理学 [M]. 北京: 中国人口出版社, 1997. 7-26 127-135.
- [8] Russel L, Ein R, Sinha-Hikim A, et al. Histological and histopathological evaluation of the testis [M]. United States: Cache River Press, 1990. 62-118.

某服装厂急性二甲基甲酰胺中毒事故调查

王兴仙

(义乌市卫生监督所, 浙江 义乌 322000)

自 2004 年 12 月 27 日起, 某服装厂工人陆续出现头晕、胸闷、恶心、呕吐、腹胀、腹痛、食欲不振、口干、皮肤灼痛及肝区不适等症状, 部分工人肝功能异常。接到报告后, 2005 年 1 月 4 日卫生监督所对现场进行调查。

1 现场劳动卫生学调查

该服装厂有作业工人 24 人 (其中女工 16 人), 自 2004 年 10 月 29 日起开始加工仿皮革服装, 皮革产自温州地区。工艺流程: 裁剪→绣花→分料→缝制→包装, 各工序均在 168m² 房子内操作, 无机械排风设施, 主要靠门窗自然通风, 作业工人无任何个人防护, 工人每天连续工作 14~16h, 自 12 月 27 日起陆续出现不良反应, 工厂被迫停止生产。工厂停产后的第 7 天, 作业现场空气中的二甲基甲酰胺 (DMF) 浓度瞬间测定, 浓度范围为 0.043~0.060mg/m³ (TWA 为 20 mg/m³, STEL 为 40 mg/m³), 在现场采集 2 份仿皮革面料, 检测 DMF 含量分别为 157.73mg/cm² 和 35.58mg/cm²。

2 临床资料

出现不良反应的有 19 例, 男 6 例, 女 13 例, 年龄 18~36 岁。主要临床表现, 腹痛、腹胀 19 例, 头晕、恶心 14 例, 食欲不振 10 例, 胸闷 9 例, 口干 7 例, 乏力 6 例, 肝区压痛 5 例, 呕吐 3 例, 皮肤灼痛 2 例, 急性胆红素升高 8 例, ALT 升高 9 例。根据《职业性急性二甲基甲酰胺中毒诊断标准》(GBZ85-2002),

· 短篇报道 ·

经金华市职业病防治所诊断急性重度二甲基甲酰胺中毒 1 例, 急性中度中毒 2 例, 轻度中毒 16 例。19 例病人经护肝等对症治疗均痊愈。

3 典型病例

患者, 女, 43 岁, 从事仿皮革裁剪 3 个月, 操作时无个人防护。2004 年 12 月 28 日出现恶心、呕吐 3 次, 腹胀、上腹疼痛, 乏力, 食欲不振。实验室检查, 总胆红素 115.0mmol/L, ALT 197 U/L, AST 133 U/L, 诊断为急性中度二甲基甲酰胺中毒, 经护肝治疗, 40 d 后痊愈。

4 讨论

二甲基甲酰胺属中等偏低的有毒物质, 可经呼吸道、皮肤和消化道侵入机体, 对眼、皮肤和呼吸道有刺激作用, 急性中毒时肝脏损害常较为突出, 制衣工作时存在吸入、皮肤接触的双重污染。本次事故现场检测二甲基甲酰胺浓度低是因为停产 7 d 测定的结果。

本次急性 DMF 中毒事故主要原因: (1) 生产车间拥挤, 各道工序无间隔, 作业场所自然通风不良, 无机械通风排毒装置, 适逢雨雪低温天气, 门窗紧闭造成 DMF 在车间内大量积聚; (2) 因制衣任务紧, 工作量大, 长时间连续工作致使工人短接触大剂量 DMF; (3) 制衣工人直接接触皮革, 使 DMF 经皮肤、呼吸道双重吸收; (4) 用人单位和劳动者不了解 DMF 的毒性及防护措施, 自我保护意识差。

调查结果表明, 仿皮革服装业是二甲基甲酰胺职业危害的重要行业之一, 卫生部门要加强对皮革制衣行业的卫生监督监测, 加强宣传教育, 使用用人单位和工人了解其毒性, 掌握防护措施, 使临床医师掌握 DMF 中毒的临床表现, 提高早期诊断的质量。