

子宫增重法检测壬基酚、双酚 A 雌激素样活性及其联合作用

张玉敏, 李海山, 崔金山

(沈阳医学院毒理教研室, 辽宁 沈阳 110034)

摘要: 目的 应用子宫增重法检测壬基酚 (NP)、双酚 A (BPA) 的雌激素样活性并评价其联合作用。方法 选择性未成熟雌性昆明种小鼠 110 只, 体重 10~13 g, 按体重随机分为 11 组: NP 240 mg/kg、120 mg/kg、60 mg/kg 剂量组, BPA 480 mg/kg、240 mg/kg、120 mg/kg 剂量组, 联合 240 mg/kg BPA+120 mg/kg NP、120 mg/kg BPA+60 mg/kg NP、60 mg/kg BPA+30 mg/kg NP 剂量组, 阴性对照组、阳性对照组 (苯甲酸雌二醇 1.47 μ g/10 g), 皮下注射染毒 3 d, 称子宫湿重, 计算子宫重量系数。用金正均法评价联合作用的性质。结果 NP 和 BPA 可致子宫重量系数增大, 呈剂量-效应关系 (分别为 $r=0.8192$, $P<0.01$; $r=0.6898$, $P<0.01$); 两者联合染毒致子宫重量系数增大, 亦呈剂量-效应关系 ($r=0.5465$, $P<0.01$)。各染毒组与阴性对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 其联合作用性质在混合低剂量组呈协同作用 ($Q=1.41$), 混合中、高剂量组呈相加作用 ($Q=0.88$ $Q=0.87$)。结论 NP、BPA 具有雌激素样活性, 其联合作用性质在较低剂量呈协同作用, 较高剂量呈相加作用。

关键词: 壬基酚; 双酚 A; 子宫增重试验; 雌激素样活性; 联合作用

中图分类号: R625.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)05-0269-04

Detection of estrogen-like activities for nonylphenol and bisphenol A and assessment of their joint effect with uterotrophic assay

ZHANG Yu-min, LI Hai-shan, CUI Jin-shan

(Department of Toxicology, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China)

Abstract **Objective** Try the uterotrophic assay to measure the estrogen-like activities of nonylphenol (NP) and bisphenol A (BPA) and to assess their joint effect. **Method** One hundred and ten female Kunming mice were divided into 11 groups: control group, positive control group (estradiol 1.47 μ g/10 g), three NP groups (mice were given 60 mg/kg, 120 mg/kg and 240 mg/kg NP, s.c. respectively), three BPA groups (mice were given 120 mg/kg, 240 mg/kg and 480 mg/kg BPA, s.c. respectively), and three joint effect groups (the mice were given 60 mg/kg BPA+30 mg/kg NP, 120 mg/kg BPA+60 mg/kg NP and 240 mg/kg BPA+120 mg/kg NP, s.c. respectively) for three days, then the uteri of mice were moved and weighed, and calculated the visceral coefficient of uteri, using JIN Zheng-jun's method to assess their joint effect. **Result** The exposure of NP and BPA might induce the rise of uterus coefficient and be dose-dependent ($r=0.8192$, $P<0.01$ and $r=0.6898$, $P<0.01$ respectively). The joint administration of NP and BPA could also induce the rise of uterus coefficient and dose-dependent too ($r=0.5465$, $P<0.01$), there were significant or highly significant correlation compared with controls ($P<0.05$ or $P<0.01$). The results revealed as well that the joint administration of these two compounds at low dose was shown as a synergistic effect ($Q=1.41$), while at middle or high dose, it showed an additive effect ($Q=0.88$ or $Q=0.87$). **Conclusion** The results showed that NP and BPA have estrogen-like activities, their joint effects were synergistic or additive respectively at low dose level or at middle/high dose level.

Key words: Nonylphenol (NP); Bisphenol A (BPA); Uterotrophic assay; Estrogenic activities; Joint effect

壬基酚 (nonylphenol, NP) 是合成壬基酚聚氧乙烯醚 (NPEs) 所需的基本成分, 而 NPEs 作为非离子表面活性剂被广泛应用于化工、医药等行业, 并在环境中降解产生 NP, 由于 NP 的高度疏水性及稳定性, 使其易于在水体下的淤泥中蓄积, 造成其在环境中广泛分布, 并能通过食物链进行生物富集, 对某些水体

生物、动物以及人类造成危害^[1]。双酚 A (bisphenol A, BPA) 广泛用于生产各种碳酸聚酯塑料、环氧树脂、聚氧乙烯树脂以及杀真菌剂、抗氧化剂、染料等, 并不断开发新的用途。随着塑料制品广泛的应用, 双酚 A 造成了严重的环境污染^[2]。

环境中存在不少雌激素样作用的化学物, 包括双酚 A、苯乙烯、多氯联苯、壬基酚等。Anina 等^[3]实验表明, 聚碳酸酯瓶在高压灭菌后, 瓶中所释放的 BPA 具有雌激素活性。在日常生活中所接触的涂料、

收稿日期: 2005-09-30; 修回日期: 2006-01-05

作者简介: 张玉敏 (1963—), 女, 高级实验师, 从事生殖毒理

洗衣粉、洗涤剂、可塑剂中均含有环境激素类物质, 并多种物质共存环境中, 但对其是否产生联合作用及其联合作用类型报道很少。本研究旨在用经典的子宫增重法检测联合皮下注射 NP 和 BPA 的雌激素样活性, 并用子宫增重率来探讨评价 NP 和 BPA 的联合作用及其类型。

1 材料与方法

1.1 材料

壬基酚, 大庆石油公司产品, 纯度 98.4%; 双酚 A, 上海市试剂一厂生产, 分析纯试剂; 苯甲酸雌二醇, 上海第九制药厂生产, 临床药品。溶剂为青岛嘉里植物油有限公司的金龙鱼纯正花生油 (批号: 370213-2681-2001)。

昆明种清洁级健康性未成熟雌性小鼠 110 只, 体重 10~13g, 由沈阳医学院实验动物中心提供, 动物合格号为 SYXK (辽) 2003-0026。将 110 只小鼠按体重随机分为 11 组, 每组 10 只, 分为 240 mg/kg、120 mg/kg、60 mg/kg NP 剂量组, 480 mg/kg、240 mg/kg、120 mg/kg BPA 剂量组, 240 mg/kg BPA + 120 mg/kg NP、120 mg/kg BPA + 60 mg/kg NP、60 mg/kg BPA + 30 mg/kg NP 联合剂量组, 阴性对照组为花生油, 阳性对照组为苯甲酸雌二醇 1.47 μ g/10 g。上述各组按等容积 0.1 ml/10 g 皮下注射染毒 1 次/d, 连续染毒 3 d, 于最末一次染毒的次晨处死小鼠。

1.2 观测指标与方法

1.2.1 子宫重量系数的测定 参照范奇元^[4]方法, 处死小鼠前称重, 颈椎脱臼处死后取子宫, 于阴道穹隆处剪断, 注意勿使子宫液外漏, 迅速去除脂肪及结缔组织, 用滤纸将染有血液的子宫蘸净, 称重, 计算重量系数。

子宫重量系数 (mg/10g 体重) = 子宫重 (mg) $\times$ 10/体重 (g)

1.2.2 大体外观 将各组子宫称重后随机每组取 4 个子宫, 先经 Bouin 液固定, 再用 70%乙醇固定, 应用数码相机拍照、观察。

1.2.3 联合作用的评价方法 用金正均^[3]的等概率和曲线法求出概率比值进行联合染毒 NP 和 BPA 对小

鼠生殖能力联合作用的评价。

$$Q = E_{A+B} / (E_A + E_B - E_A E_B) = O_m / P_m$$

E_{A+B} ——实测联合毒效应, E_A ——A 实测产生的效应, E_B ——B 实测产生的效应, O_m ——实测阳性概率, P_m ——预期阳性概率。

本实验的阳性概率均为以阴性对照组子宫重量系数平均值为基础的增重率。求 NP、BPA 各剂量组中率的实测值 P_A , P_B (A 为 NP, B 为 BPA), 然后应用 Finney (1961) 的概率相加公式^[6]来估计联合染毒双酚 A、壬基酚毒作用的预期阳性概率。

$$P_m = 1 - (1 - P_A)(1 - P_B) \cdots (1 - P_n)$$

以联合作用的实测阳性概率 O_m 与预期阳性概率 P_m 之比即概率比值用如下分级标准评价联合作用方式。

分级标准^[7]: $Q < 0.55$ 为明显拮抗, (—); $0.55 \leq Q < 0.85$ 为拮抗, (—); $0.85 \leq Q < 1.15$ 为单纯相加, (+); $1.15 \leq Q \leq 2.00$ 为增强, (++) ; $Q > 2.00$ 为明显增强, (+++)。

1.3 统计方法

用 SPSS 软件进行实验数据统计, 计算指标的均数和标准差, 进行 F 检验、 q 检验及相关分析。

2 结果

2.1 一般状况及动物体重

各组动物状态良好, 未出现中毒症状。各染毒组动物的体重与阴性对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1~3。

2.2 大体剖检

阳性对照组子宫明显增大, 尤如刚发好的豆芽, 阴性对照组子宫尤如细丝, 各染毒组相对阴性对照组均有增大, 但都不及阳性对照组。

2.3 染毒 NP 小鼠子宫重量及重量系数

随着染毒剂量的增加, 子宫重量系数增加, 呈剂量-效应关系 ($r = 0.8192$, $P < 0.01$), 与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 高剂量组与中、低剂量组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 中剂量组与低剂量组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 小鼠染毒 NP 对子宫重量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	体重 (g)	平均子宫重量 (mg)	子宫重量系数 (mg/10 g)	子宫增重率 (%)
阴性对照组	13.66 $\pm$ 1.58	10.66 $\pm$ 3.41	7.74 $\pm$ 1.99	—
NP 60 mg/kg	13.62 $\pm$ 1.38	15.66 $\pm$ 4.12 *	11.79 $\pm$ 4.11 *	52.3 (4.05/7.74)
NP 120 mg/kg	13.50 $\pm$ 0.95	19.06 $\pm$ 4.11 **	14.27 $\pm$ 3.73 **	84.4 (6.53/7.74)
NP 240 mg/kg	12.92 $\pm$ 1.47	29.77 $\pm$ 6.46 **	23.28 $\pm$ 5.82 **	200.8 (15.54/7.74)
阳性对照组	13.46 $\pm$ 1.83	57.43 $\pm$ 29.98 **	41.48 $\pm$ 18.36 **	435.9 (33.74/7.74)

与阴性对照组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

2 4 染毒 BPA 小鼠子宫重量及重量系数
各染毒组与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.01$), 随着染毒剂量的增加, 子宫重量系数增

加, 且呈剂量-效应关系 ($r=0.6898$, $P<0.01$), 低剂量组与高剂量组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 小鼠染毒 BPA 对子宫重量的影响测定结果 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	体重 (g)	平均子宫重量 (mg)	子宫重量系数 (mg/10 g)	子宫增重率 (%)
阴性对照组	13.66±1.58	10.66±3.41	7.74±1.99	—
BPA 120 mg/kg	14.26±1.31	15.74±2.62 **	11.02±1.32 **	42.4 (3.28/7.74)
BPA 240 mg/kg	13.26±2.15	15.96±2.52 **	12.20±1.21 **	57.6 (4.46/7.74)
BPA 480 mg/kg	12.21±1.41	16.32±3.24 **	13.29±1.82 **	71.7 (5.55/7.74)
阳性对照组	13.46±1.83	57.43±29.98 **	41.48±18.36 **	435.9 (33.74/7.74)

与阴性对照组比较 ** $P<0.01$

2 5 联合染毒 NP、BPA 小鼠子宫重量及重量系数 ($P<0.01$), 且存在剂量-效应关系 ($r=0.5465$, $P<0.01$)。见表 3。
各染毒组与阴性对照组比较差异有统计学意义

表 3 小鼠联合染毒 NP、BPA 对子宫重量的影响测定结果 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	体重 (g)	平均子宫重量 (mg)	子宫重量系数 (mg/10 g)	子宫增重率 (%)
阴性对照组	13.66±1.58	10.66±3.41	7.74±1.99	—
BPA 60 mg/kg+NP 30 mg/kg	13.83±1.56	21.21±4.88 **	15.65±4.67 **	102.2 (7.91/7.74)
BPA 120 mg/kg+NP 60 mg/kg	14.46±1.21	20.06±4.10 **	14.12±3.98 **	82.4 (6.38/7.74)
BPA 240 mg/kg+NP 120 mg/kg	13.57±1.61	22.08±2.50 **	16.38±1.95 **	111.6 (8.64/7.74)
阳性对照组	13.46±1.83	57.43±29.98 **	41.48±18.36 **	435.9 (33.7/7.74)

与阴性对照组比较 ** $P<0.01$

2 6 联合作用的评价 (见表 4)

表 4 NP、BPA 联合毒效应评价表 (%)

组别	NP 子宫增重率	BPA 子宫增重率	NP+BPA 子宫增重率	Q 值	联合作用类型
低剂量组	52.3	42.4	102.2	1.41	++增强
中剂量组	84.4	57.6	82.4	0.88	+相加
高剂量组	200.8	71.7	11.6	0.87	+相加

3 讨论

国内外文献报道, 子宫增重试验^[4]、MCF-7 细胞增殖试验和重组酵母等试验中^[8-9], NP 均显示雌激素样活性, 其活性在不同的试验中强弱不一, 分别相当于雌二醇的千分之一到万分之一之间, 在子宫增重试验中^[10], BPA 亦显示出弱雌激素样效应。子宫增重试验是体内试验的一种, 是经典的药理学检测化学物雌激素样作用的试验^[11]。本实验结果表明, NP 各剂量组的子宫增重是比较明显的, 尤以高剂量组最为明显, 证实了 NP 具有雌激素样活性, 这与范奇元等^[4]的报道一致。BPA 亦能使小鼠子宫增重, 证实了 BPA 具有雌激素样活性, 这与黄毅娜等^[10]的报道一致。与阳性对照组比较, 60~240 mg/kgNP 的雌激素活性相当于 100 μ g/kg 雌二醇的 1/2435~1/4929; 120~480 mg/kgBPA 相当于 100 μ g/kg 雌二醇的 1/5115~1/16886。以上说明, NP、BPA 确实具有雌激素样活性, 且需要相当高的剂量才能表现出它们的雌激素样作用, 同时也说明 BPA 的雌激素样活性弱于 NP。此

结果与朱毅^[12]的 MCF-7 细胞增殖试验结果 BPA 雌激素样活性大于 NP 不同。MCF-7 细胞增殖试验是细胞与受试物体外直接接触。本实验属于体内试验, 受试物在体内经过机体吸收、分布、代谢等过程。说明体外实验与整体试验有差异, 以体外实验测定环境雌激素的活性有一定的局限性。

等概率和曲线法既适合基础理论研究, 又适合联合作用性质的估计, 运算简便, 有一定的理论基础^[13]。但此法评价本实验所得资料尚有缺点, 现行的联合作用评价方法有许多, 一般采用 LD₅₀或 ED₅₀作为评价指标, 特别是 LD₅₀指标肯定、客观, 但实际存在环境中化学物联合作用时, 表现出的毒作用是某些和/或某种非死亡效应, 因此这种以某种效应出现时联合毒作用的评价, 尚无统一、公认的评价方法。本文应用金正均的等概率和曲线法评价, 而等概率和曲线法是用死亡概率求比值, 本实验用以阴性对照组子宫重量系数的平均值为基础的增重率求比值, 仅通过一个剂量点求出的比值, 变化范围较大, 因此在应用时有一定的局限性, 仅为一个初步评价, 所以还需进一步研究比较适合此类实验结果的评价方法。

利用金正均^[5]方法评价 NP、BPA 混合物的联合作用性质, 初步认为较低剂量联合作用呈增强 (协同) 作用, 较高剂量其联合作用呈相加作用。人类实际生活中接触环境雌激素类化学物是长期低剂量的接触, 因此应特别注意 NP、BPA 同时存在环境中对人

的雌激素样作用,可能表现为协同作用,应引起人们的高度关注。

参考文献:

- [1] 范奇元,李卫华,申立军,等. 壬基酚对 SD 雄性大鼠生殖功能的影响 [J]. 卫生毒理学杂志, 2001, 15 (4): 225-226.
- [2] 邓茂先,吴德生,詹立. 环境雌激素双酚 A 的生殖毒理研究 [J]. 环境与健康杂志, 2001, 16 (3): 134-136.
- [3] Krishoom AV. Bisphenol A an estrogen substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving [J]. Endocrinology, 1997, 13 (4): 251-252.
- [4] 范奇元,申立军,丁训诚,等. 用子宫增重实验检测壬基酚的雌激素样作用 [J]. 劳动医学, 2000, 17 (4): 196-197.
- [5] 戴体俊. 合并用药的定量分析 [J]. 中国药理学通报, 1998, 14 (5): 479-480.
- [6] 李寿祺,董奇男,程微波,等. 毒理实验原理与方法 [M]. 第 2 版. 四川: 四川大学出版社, 2003. 88-90.
- [7] 朱心强,黄幸纾,钱军程,等. 两种农药联合毒性评价方法的比

较 [J]. 卫生毒理学杂志, 1993, 7 (1): 60-61.

- [8] Balaguer P, Francois F, Comunale F, et al. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens [J]. Sci Total Environ, 1999, 233 (1-3): 47-56.
- [9] Petit F, Le Coff P, Cravedi JP, et al. Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures [J]. J Mol Endocrinol, 1997, 19 (3): 321-335.
- [10] 黄毅娜,程微波,徐培渝,等. 子宫营养试验检测双酚 A 的雌激素样活性 [J]. 癌变·畸变·突变, 2002, 14 (4): 234-237.
- [11] 高尔生,陈海林. 计划生育与生殖健康研究导论 [M]. 北京: 中国人口出版社, 1999. 73.
- [12] 朱毅. 烷基酚的类雌激素活性评价及其作用机制的初步研究 [A]. 第三军医大学硕士研究生论文. <http://www.cnki.net>. 2002. 11-13.
- [13] 顾兵,王心如. 联合作用特征的评价 [J]. 中国工业医学杂志, 2000, 13 (1): 55-58.

· 病例报道 ·

误服氟乙酰胺鼠药中毒 1 例报告

An accidental case of fluoroacetamide poisoning

王群

(沈阳市第九人民医院, 辽宁 沈阳 110024)

1 病例介绍

患者,男,48 岁,因反复抽搐伴意识障碍 2 d 来我院就诊。于 2004 年 3 月 20 日患者家属发现该患动作笨拙,言语不清,手颤。1 d 后出现意识模糊,不能言语,烦躁,四肢、面部、颈部肌肉强直性抽搐,持续约 1~2 min 后自行缓解,但反复频繁发作,严重时隔 15~20 min 发作 1 次,曾于当地医院经头 CT 检查,可疑脑水肿的迹象,腰穿检查均正常,病情逐渐加重,3 月 22 日转至我院就诊。入院查体: T 36.8℃, P 118 次/min, R 20 次/min, BP 110/60 mm Hg, 意识恍惚,烦躁不安,查体不合作,全身皮肤及巩膜无黄染及出血点,双瞳孔等大等圆,直径约 3 mm,对光反射存在,口角无偏斜,额纹、鼻唇沟对称,无变浅,唇色苍白,无发绀,颈软,颈静脉无怒张,甲状腺不大,双肺布满湿啰音及痰鸣音,心律规整,心率 118 次/min,腹软,肝脾肋下未触及,双肘、双髋、双膝关节屈曲,双踝关节呈伸直位,全身肌张力增高,呈痉挛性,四肢有时发抖,无明显震颤,腱反射亢进,双上肢霍夫曼氏征(+),双下肢巴彬斯基氏征(-)。实验室检查,血 WBC $14.8 \times 10^9/L$, 心肌酶谱 AST 78 U/L, CK 1 046 U/L, CK-MB 24 U/L, LDH 273 U/L, HBDH 274 U/L, 血 $K^{+} 2.9$ mmol/L, $Na^{+} 130$ mmol/L, $Cl^{-} 95$ mmol/L, 肝功能、BUN、尿常规正常。ECG 示 II、III、aVF T 波低平,胸片示双肺炎症性病变,脑电图示异常脑电图(慢波为主),头 CT 示两侧基底节区低密度影改变。

入院后进一步完善各项检查,给予甘露醇、地塞米松、能量合剂、营养脑细胞药物及抗菌药物对症、支持治疗,并按癫痫病治疗,症状未见改善,且逐渐加重,故考虑诊断是否正确,详细追问病史。其妻儿在其发病后相继出现四肢麻木、头晕、恶心、呕吐、胸闷、心悸症状,因此怀疑是否有食物中毒之可能。发病前一天该患曾进食死鸭。因家中老鼠较多,故投放氟乙酰胺鼠药灭鼠,狗不慎误食鼠药污染的食物而死去,狗的内脏曾喂给鸭子吃,鸭子也死去。患者曾将鸭子内脏弃掉,炖食鸭肉,其妻儿吃得较少,故推断为鼠药中毒。经与省疾病预防控制中心联系,将患者本人及家属的血和尿做毒物鉴定,均检测出氟乙酰胺成分,确认为氟乙酰胺中毒。因此立即给予特效解毒剂解氟灵 50 g, 肌内注射每 8 h 1 次,连续 3 d 以后减量,并行血液灌流排除体内残余的氟乙酰胺,积极控制感染及其他营养、支持、对症治疗,病情迅速得到控制。3 d 后患者意识逐渐转清,1 周后全身营养状况改善,肌力提高,肌张力减低,逐渐可坐、行走,记忆力、计算能力逐渐恢复。4 周后已接近正常,血尿中基本测不到氟乙酰胺,尿氟正常,于 4 月 21 日治愈出院。

2 讨论

氟乙酰胺是一种内吸收性极强的高毒类鼠药,在体内代谢缓慢,易蓄积,可直接刺激和损害中枢神经系统,并可引起心肌损害等。本病例以神经系统损害临床表现为主,在没有毒物监测的情况下,易误诊为脑血管病变及癫痫病发作。若不详细追问病史误诊误治会带来严重的不良后果。本病例在明确诊断后及时使用特效解毒药物解氟灵,同时进行血液灌流治疗,迅速吸附毒物排除体外。另外,及时应用脱水剂,早期、足量、短期应用糖皮质激素,有利于改善脑循环,减轻脑水肿,促进脑细胞恢复。并注意营养心肌、保肝、保肾,同时让病人卧床休息,烦躁时给予镇静剂,以减少耗氧量,病人很快康复,未留后遗症。

收稿日期: 2005-08-16; 修回日期: 2005-10-20