

· 专题交流 ·

聚氨酯木器漆挥发物对小鼠的免疫毒性

奚清丽, 周伟, 杨明晶, 陆罗定

(江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210009)

摘要: 小鼠暴露于聚氨酯木器漆挥发物, 每天2 h, 持续28 d后检测各项免疫功能指标。结果 暴露组淋巴细胞转化率、迟发型变态反应、血清溶血素水平、抗体生成能力、腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞功能和NK细胞活性均明显低于对照组。提示在本实验浓度下聚氨酯木器漆挥发物暴露对机体免疫功能具有抑制作用; 产生免疫毒性作用的最低浓度为 61 mg/m^3 。

关键词: 聚氨酯木器漆; 挥发物; 小鼠; 免疫毒性

中图分类号: R135.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2007)04-0238-03

Study on immunotoxicity of polyurethane wood paint volatiles in mice

XI Qing-li, ZHOU Wei, YANG Ming-jing, LU Luo-ding

(Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China)

Abstract: The mice were exposed to polyurethane wood paint volatiles for 28 days, 2 hours per day, then measure various immune indices. The result showed that the lymphocyte transformation rate, delayed allergic reaction, serum hemolysin level, antibody producing ability, chicken RBC phagocytizing ability of peritoneal macrophages and the nature killer cell activity, in exposed groups were all lowered compared with control group. It is suggested that the polyurethane wood paint volatiles has definite inhibition effect on immune function of mice, the lowest effect level for immune inhibition is 61 mg/m^3 observed in this study.

Key words: Polyurethane wood paint; Paint volatile; Mouse; Immunotoxicity

在家具制作过程中, 聚氨酯木器漆释放的多种挥发性有机物是室内污染的主要来源之一, 它不但能引起急性中毒, 对造血、神经、生殖、心血管等系统造成损害, 而且可对遗传产生不良影响^[1]。本课题通过检测聚氨酯木器漆挥发物暴露对小鼠免疫功能的影响, 探讨聚氨酯木器漆的免疫毒性。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂及仪器

YAC-1 细胞、2-巯基乙醇(2-ME)、刀豆蛋白A(ConA)、MTT、2,4-二硝基氟苯(DNFB)、绵羊红细胞(SRBC)、补体(豚鼠血清)、乳酸锂、硝基氯化四氮唑(INT)、吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS)。静式染毒柜(九方公司)、显微镜(Leica351)、酶标仪(Bio RAD680)、二氧化碳培养箱。

1.2 实验动物与染毒方式

1.2.1 实验动物 雌性ICR种小鼠240只, 体重18~22 g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。随机分为4组, 即对照组及染毒低、中、高浓度组, 每组10只小鼠。

1.2.2 染毒方式 静式吸入染毒, 染毒柜容积为 0.6 m^3 , 将聚氨酯木器漆的3个组分(清漆、稀释剂、固化剂)按使用说明比例混匀后涂于玻璃板上, 放入染毒柜中使其挥发, 各浓度组涂抹面积不同, 每日涂1次, 吸入染毒2 h, 连续染毒28 d后检测各项免疫功能指标, 根据实际挥发量减重法测得高、中、低浓度组的每日平均染毒浓度。

1.3 聚氨酯漆挥发物成分分析

用安捷伦公司GC6890-MS5973气相色谱/质谱联用仪分析测定聚氨酯漆挥发物成分。色谱柱DB-5MS $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$, 色谱条件: 60°C 起按 $8^\circ\text{C}/\text{min}$ 做程序升温至 180°C , 柱流速 $1.0 \text{ mL}/\text{min}$, 进样口温度 220°C , 接口温度 280°C 。质谱条件: EI全扫描, 质量单位为 $35\sim 450 \text{ amu}$ Wiley库检索。

1.4 测定的免疫功能指标及实验方法

1.4.1 ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验(MTT法) 小鼠颈椎脱臼处死, 无菌取脾, 制成单细胞悬液。将细胞悬液分两孔加入培养板中, 每孔 1 mL , 一孔加 $75 \mu\text{L}$ ConA液; 另一孔作对照, 置体积分数为 $5\% \text{ CO}_2$, 37°C CO_2 孵箱中培养72 h。培养结束前4 h, 加入MTT($5 \text{ mg}/\text{mL}$) $50 \mu\text{L}$ 孔。培养结束后, 每孔加入 1 mL 酸性异丙醇, 紫色结晶完全溶解后, 用酶联免疫检测仪, 以 570 nm 波长测定光密度值。用加ConA孔的光密度值减去不加ConA孔的光密度值代表淋巴细胞的增殖能力。

1.4.2 二硝基氟苯(DNFB)诱导的小鼠迟发性变态反应(DTH) 小鼠腹部去毛, $1\% \text{ DNFB}$ 丙酮麻油溶液 $50 \mu\text{L}$ 涂抹致敏。致敏后5 d, 小鼠右耳均匀涂抹 $1\% \text{ DNFB}$ 丙酮麻油溶液 $10 \mu\text{L}$ 进行抗原攻击; 左耳涂抹丙酮麻油溶液作对照, 抗原攻击后24 h处死小鼠, 剪下左右耳壳, 于同一部位取直径 8 mm 的耳片称重, 左右耳片重量之差作为肿胀度。

1.4.3 抗体生成细胞检测(Jerne改良玻片法) 每鼠腹腔注射体积分数为 2% 压积SRBC 0.2 mL 致敏。免疫5 d后, 将小鼠颈椎脱臼处死, 取出脾脏, 制成单细胞悬液进行溶血空斑实验, 计数溶血空斑数, 用空斑数/ 10^6 脾细胞表示抗体生成细胞数。

1.4.4 血清溶血素测定 半数溶血值(HC_{50})测定法, 每鼠腹腔注射体积分数为 2% 压积SRBC 0.2 mL 致敏。免疫5 d后, 小鼠摘眼球采血, 取血清测溶血反应, SRBC半数溶血时为目标

收稿日期: 2006-08-03; 修回日期: 2006-09-19

基金项目: 江苏省卫生厅资助项目(Y2004020)

作者简介: 奚清丽(1966-), 女, 副主任技师, 主要从事卫生毒理、职业中毒检验及研究工作。

准管, 于540 nm 分别测定各管光密度值(OD), 并计算 HC_{50} , 样品 HC_{50} = 样品 OD 值 ÷ 标准管 OD 值 × 血清稀释倍数。

1.4.5 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验(滴片法) 每鼠腹腔注射 SRBC 0.2ml, 4 d 后处死, 腹腔注射 Hank's 液 4 ml/只, 吸取腹腔洗液与等量的 1% 鸡红细胞混匀后加入玻片的琼脂圈内, 37℃ 孵育 20 min, 甲醇固定, Giemsa 液染色。显微镜计数吞噬率和吞噬指数(吞噬率为每 100 个巨噬细胞中, 吞噬鸡红细胞的巨噬细胞所占的百分率; 吞噬指数为平均每个巨噬细胞吞噬鸡红细胞的个数)。

1.4.6 NK 细胞活性测定 小鼠颈椎脱臼处死, 无菌取脾, 制成单细胞悬液作为效应细胞。取靶细胞(YAC-1 细胞)和效应细胞各 $100\mu l$ (效靶比 50:1) 加入培养板中; 靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各 $100\mu l$, 靶细胞最大释放孔加靶细胞和 2.5% Triton 各 $100\mu l$; 上述各项均设 3 个重复孔, 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 4 h, 将培养板以 1500 r/min 离心 5 min, 每孔吸取上清 $100\mu l$ 加入 LDH 基质液 $100\mu l$, 反应 3 min, 加入 1 mol/L 的 HCl $30\mu l$, 在酶标仪 490 nm 处测定光密度值。NK 细胞活性% = (反应孔 OD 值 - 自然释放孔 OD 值) ÷ (最大释放孔 OD 值 - 自然释放孔 OD 值) × 100%

1.5 统计方法

用 SPSS11.5 版统计软件方差分析及两两比较统计学处理。

2 结果

2.1 聚氨酯漆挥发物成分分析

经色谱/质谱联用仪测定, 聚氨酯漆挥发物主要成分为甲苯、二甲苯、乙苯、苯乙烯、醋酸乙酯、醋酸丁酯、苯、丁醇、甲苯

表 2 聚氨酯漆挥发物对抗体生成细胞功能、巨噬细胞吞噬能力、溶血素水平及 NK 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 空斑数/ 10^6 脾细胞 | 半数溶血值 (HC_{50}) | 腹腔巨噬细胞吞噬能力 | | NK 细胞活性 (%) |
|------|-----------------|---------------------|-------------|---------------|--------------|
| | | | 吞噬率 (%) | 吞噬指数 | |
| 对照组 | 127.8 ± 49.5 | 114.7 ± 1.6 | 9.5 ± 4.3 | 0.18 ± 0.09 | 36.6 ± 5.1 |
| 低浓度组 | 126.3 ± 58.2 | 113.4 ± 1.0 | 8.7 ± 3.2 | 0.15 ± 0.04 | 36.2 ± 9.1 |
| 中浓度组 | 106.2 ± 34.8 | 112.6 ± 6.3 | 8.4 ± 3.6 | 0.17 ± 0.10 | 29.6 ± 6.2 |
| 高浓度组 | 76.1 ± 21.4 * | 100.7 ± 5.8 * | 5.1 ± 2.3 * | 0.08 ± 0.04 * | 26.2 ± 7.6 * |

3 讨论

本研究通过小鼠聚氨酯漆挥发物吸入染毒, 发现小鼠淋巴细胞转化率、迟发型变态反应、血清溶血素水平、抗体生成细胞的能力、腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞功能和 NK 细胞活性均明显低于对照组。表明聚氨酯漆挥发物对小鼠机体细胞免疫、体液免疫、非特异性免疫功能均有明显抑制作用, 聚氨酯漆挥发物免疫毒性表现为免疫抑制。在正常情况下, 机体的自身免疫功能可以防御病原微生物的侵害、中和毒素、消除体内损伤或衰老的自身细胞, 处理体内经常出现的少量异常细胞, 当人体免疫监视功能失调时, 常会诱发各种疾病。免疫抑制可增加感染性疾病或肿瘤发生的危险, 或增加免疫系统产生不适当的免疫活性^[2]。家居装修是否与儿童白血病的发生正相关^[3], 是否与免疫功能的抑制有关值得进一步深入研究。

在本实验条件下观察到有免疫毒性作用的最低浓度值为 $61 mg/m^3$ 。室内空气质量标准中规定总挥发性有机物 (TVOC)

二异氰酸酯等。减重法测得高、中、低浓度组每日平均染毒浓度分别为 (1080 ± 82) 、 (206 ± 30) 、 $(61 \pm 14) mg/m^3$ 。

2.2 免疫功能指标检测结果

2.2.1 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验 (MTT 法)、DNFB 诱导的迟发性变态反应实验结果 表 1 可见, 各染毒浓度组光密度差值均低于对照组, 高、中浓度组与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示高、中浓度聚氨酯漆挥发物可抑制小鼠淋巴细胞增殖能力。各浓度组小鼠的耳廓肿胀度均低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。提示各浓度聚氨酯漆挥发物均具有抑制 DNFB 引起的小鼠迟发性变态反应作用。

表 1 聚氨酯漆挥发物对小鼠脾淋巴细胞转化及耳廓迟发性变态反应的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 光密度值 | | 光密度差 | 耳廓肿胀度 (mg) |
|------|-------------|-------------|---------------|---------------|
| | -ConA | +ConA | | |
| 对照组 | 0.36 ± 0.05 | 0.92 ± 0.06 | 0.56 ± 0.08 | 27.6 ± 6.6 |
| 低浓度组 | 0.37 ± 0.03 | 0.88 ± 0.05 | 0.51 ± 0.06 | 21.3 ± 4.5 * |
| 中浓度组 | 0.34 ± 0.04 | 0.80 ± 0.11 | 0.45 ± 0.10 * | 19.7 ± 4.4 ** |
| 高浓度组 | 0.36 ± 0.03 | 0.82 ± 0.11 | 0.46 ± 0.11 * | 19.8 ± 3.7 ** |

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 下表同。

2.2.2 抗体生成细胞、血清溶血素、巨噬细胞吞噬能力及 NK 细胞活性测定 表 2 可见, 各染毒浓度组空斑数、半数溶血值、吞噬率和吞噬指数、NK 细胞活性均低于对照组, 高浓度组与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示高浓度聚氨酯漆挥发物具有抑制上述免疫功能指标的作用。

最高容许浓度为 $0.60 mg/m^3$ ^[4]。装潢过程中室内空气中的挥发性有机物主要来自各种涂料和板材, 聚氨酯涂料装修现场主要挥发性有机物浓度最高可达 $323.7 mg/m^3$ ^[5], 对施工者造成的危害是不容忽视的, 一定要适当防护。

聚氨酯漆中挥发性有机物以芳烃类为主, 并有少量的酯类、醛类和醇类。在这些挥发性有机化合物达到一定浓度的条件下, 醛类及部分酯类会损害神经系统, 芳烃及其衍生物会造成血液中毒^[6]。虽然来自室内装饰涂料中的挥发性有机化合物在装修 30 d 后释放的气体量趋于稳定, 测得其总浓度小于最大容许浓度 ($0.60 mg/m^3$)^[7], 但室内是人们生活和工作的主要场所, 长期低浓度的接触, 给健康带来的损害仍不可忽视。因此开发新型的环保涂料和对室内装饰涂料市场进行规范的监督和管理, 是涂料生产厂家和卫生部门需要解决的一个迫切问题。鉴于聚氨酯漆广泛用于室内装潢, 其中的挥发物对人体健康的潜在影响引起高度重视。它对健康损伤的作用机制及早期的分子生物学指标都值得深入研究。

参考文献:

[1] 许支农, 汤利民. 涂料作业中挥发性有机物对人体健康的影响 [J]. 职业与健康, 2000, 16 (12): 3-4.

[2] 付尚志. 肿瘤的免疫功能研究现状 [J]. 临床军医杂志, 2002, 30 (5): 95-97.

[3] 吴玉霞, 董璐, 高怡瑾, 等. 儿童急性白血病的环环境危险因素 [J]. 工业卫生与职业病, 2004, 30 (1): 16-18.

[4] GB/T18883-2002. 室内空气质量标准 [S].

[5] 王如刚, 康秉勋, 郑新河, 等. 聚氨酯涂料装修现场主要有机挥发物浓度变化调查研究 [J]. 职业卫生与应急救援, 2003, 21 (4): 186-187.

[6] Song Nian Yin, Richard BH, Martha S L, et al. A cohort study of cancer among benzene exposed workers in China overall results [J]. Amer J Ind Med, 1996, 29: 227-253.

[7] 时真男, 王冬云, 李思敏. 涂料中挥发性有机化合物对建筑室内环境污染 [J]. 环境监测管理与技术, 2005, 17 (5): 11-13.

硫酸铟生殖毒性的研究

曲波¹, 李雪飞¹, 王帆¹, 李庆辉²

(1. 辽宁省职业病防治院, 辽宁 沈阳 110005; 2. 葫芦岛锌厂医院, 辽宁 葫芦岛 125000)

摘要: 采用常规致畸实验方法, 给予妊娠大鼠 432.80 mg/kg、135.25 mg/kg、43.28 mg/kg (1/5~1/50 LD₅₀) 硫酸铟经口灌胃染毒, 以探讨硫酸铟的致畸效应以及其对雌性大鼠的生殖毒性作用。结果染毒组孕鼠孕末增重明显降低, 吸收胎数均显著高于对照组, 存活胎仔仅见个别有卷尾、波状肋、少肋等, 未见到腭裂、脑外露、器官缺失等典型畸变; 各染毒组成形胎仔的生长发育与对照组比较差异无统计学意义。提示硫酸铟具有明显早期胚胎毒性作用, 可导致早期胚胎大量死亡并形成吸收胎。其致畸作用及对成形胎仔的生长发育影响并不明显。

关键词: 硫酸铟; 致畸性; 胚胎毒性

中图分类号: R135.1; O612.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2007)04-0240-02

Experimental study on reproduction toxicity of indium sulfate

QU Bo¹, LI Xue-fei¹, WANG Fan¹, LI Qing-hui²

(1. Liaoning Provincial Center for Occupational Disease Prevention & Treatment, Shenyang 110005, China; 2. Worker and Staff Hospital of Huludao Zinc Factory, Huludao 125000, China)

Abstract: To study reproduction toxicity of indium sulfate. The routine method of teratogenicity test was used in the study. The pregnancy rats were separately given 432.80 mg/kg, 135.25 mg/kg and 43.28 mg/kg of indium sulfate (1/5-1/50 LD₅₀) by oral. The result showed that at the end of pregnancy, the increase of body-weight in Indium sulfate exposed rats was markedly lowered compared with the controls ($P < 0.01$), the absorption rate of embryos was markedly higher than that of controls ($P < 0.01$); but the survived embryos had no typical malformation in indium sulfate exposed group. There was no significant difference among indium sulfate exposed groups and control group in growth and development of embryos ($P > 0.05$). It is suggested indium sulfate has definite embryo toxicity during the early stage of pregnancy, which might lead to large amount of embryos died and absorbed, but the teratogenic effect and development toxicity were not so distinct.

Key words: Indium sulfate; Teratogenicity; Embryo toxicity

铟是一种稀有金属元素, 相对原子质量 114.82, 相对密度 7.3 g/cm³, 沸点 2 080 ℃, 属于第 IIIA 族, 与铊同属一族。铟及其化合物主要用于特殊合金的制造和半导体材料合成, 并被广泛应用于航空航天、原子能工业及医疗等领域。尽管目前铟及其化合物职业中毒少见报道^[1], 但个别国外资料提示铟及其化合物可能具有胚胎毒性^[2]。本文通过致畸实验研究铟化合物对大鼠生殖过程及结局的影响, 为加强对职业接触者的健康保护提供科学依据。

1 材料与与方法

1.1 实验动物

健康性成熟 Wistar 大鼠, 雌性 120 只、雄性 40 只, 体重 160~250 g, 由沈阳双义实验动物研究所提供。饲养室温度 17

~19 ℃, 相对湿度 43%~57%, 12 h 明暗交替, 机械通风。

1.2 受试物

硫酸铟 [In₂(SO₄)₃] 纯度 > 99.86%, 由葫芦岛锌厂提供。硫酸铟设 3 个染毒剂量组, 分别为高剂量组 (432.80 mg/kg)、中剂量组 (135.25 mg/kg)、低剂量组 (43.28 mg/kg)。高剂量组与低剂量组分别为 1/5LD₅₀ 和 1/50LD₅₀^[3]。另设溶剂对照组 (蒸馏水) 和阳性对照组 (维生素 A)。硫酸铟各剂量组用蒸馏水配制所需浓度溶液, 维生素 A 用色拉油配制。

1.3 方法

取符合要求的 Wistar 大鼠, 每日 20:00 时按雌雄 2:1 合笼交配, 次日晨取出雄鼠, 雌鼠阴道涂片检查精子。将孕鼠按受孕时间先后, 随机分为 5 组, 每组孕鼠 17 只。各实验组雌鼠检出精子的当天作为受孕第 0 天, 孕鼠在妊娠第 6~15 天 (组织分化和器官形成期) 1 次/d 经口灌胃给药, 每 3 d 称体重 1 次, 并按体重变化调整灌胃剂量, 同时观察记录动物活

收稿日期: 2006-11-01; 修回日期: 2006-12-01

作者简介: 曲波 (1965-), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事卫生毒理学研究。