

· 实验研究 ·

对叔丁基酚致职业性白斑的动物实验

Animal experimental study on occupational leukodema induced by 2-amino-4-tert-butylphenol

程秀荣, 王海华*, 郑敏, 薛春霄

CHENG Xiurong, WANG Haihua*, ZHENG Min, XUE Chunxiao

(中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100050)

摘要: 为探讨职业性白斑的发病机理, 用对叔基酚在豚鼠背部进行了涂皮试验, 末次涂皮 24 h 后, 于动物涂皮中心区取皮做病理切片, 并从心脏采血做胆碱酯酶及单胺氧化酶测定。动物试验及实验室结果均表明, 对叔基酚可引起色素脱失斑, 该结果为现场病例观察及制定职业性白斑防治措施提供了理论根据。

关键词: 职业性白斑; 对叔基酚; 动物试验

中图分类号: R992 O625.319 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2010)03-0208-02

接触对叔丁基酚或含有该成分的物品后发生皮肤白斑的病例, 国内外均有报道, 发病者有生产对叔丁基酚的化学工人, 使用含有对叔丁基酚粘结剂的汽车工人与皮革工人, 制造和修理皮鞋工人, 以及使用含有该物的消毒剂的医院清洁工等^[1]。为配合职业性皮肤病诊断标准的研制, 探讨职业性白斑的发病机理, 我们进行了动物实验, 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

黑色或黑花色豚鼠 20 只, 雌雄兼用, 体重 250~300 g 由北京市科宇动物养殖中心提供, 合格证号: SCXK(字)2002-005。饲养地点: 中国医学科学院实验动物研究所屏障环境动物房[许可证号为 SYXK(京)2005-0041]。

1.2 药品与仪器

对叔丁基酚(国药集团化学试剂有限公司提供, 批号 T20070316), 乙酰胆碱(SIGMA 提供, 批号 065K1081); 单胺氧化酶测试盒(南京建成生物工程研究所提供, 批号 20070318), 722 型光栅分光光度计。

1.3 方法

将 20 只豚鼠随机分为实验组与对照组, 每组 10 只, 每周 2 次用电动剃须刀剃去背毛, 剃毛面积约 4 cm×4 cm。实验组在脱毛区涂 1% 对叔丁基酚 0.5 g, 对照组涂凡士林膏 0.5 g。每日 2 次, 连续涂皮 30 d。末次涂皮 24 h 后, 分别于两组动物涂皮中心取皮做病理切片, 并从心脏采血做胆碱酯酶及单胺氧化酶测定。

2 实验结果

收稿日期: 2009-12-24 修回日期: 2010-03-10

作者简介: 程秀荣(1970-), 女, 主管技师, 研究方向: 皮肤毒理。

* 通讯作者, Email: oise@sina.com

2.1 肉眼观察

30 d 涂皮结束后实验组豚鼠黑色皮肤颜色均明显变苍白, 有的出现白斑, 与对照组相比差异显著。

2.2 组织学观察

2.2.1 实验方法 豚鼠皮肤涂布染毒后于涂皮中心区取皮, 甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 硫酸亚铁法进行黑色素染色。镜下每个视野随机观察 20 个毛囊, 计算其中含有黑色素的毛囊个数, 并了解黑色素在皮肤中的分布情况。

2.2.2 染色强度判断 表皮基层及棘层细胞均可见黑色素计为(+++), 表皮基层及棘层细胞 1/2 以上有黑色素为(++), 表皮基层及棘层 1/2~1/3 有黑色素为(+), 表皮基层及棘层偶见黑色素为(±), 表皮基层及棘层无黑色素为(-)。

2.2.3 病理结果 对叔丁基酚经皮涂布染毒后, 皮肤表皮基层、棘层可见黑染的黑色素细胞, 但数量较对照组明显减少, 毛囊内黑色素表达下降, 部分毛囊无着色, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 对叔丁基酚对皮肤黑色素的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	色素分布	有黑色素毛囊数(个)
对照组	10	+++	10.20 ± 3.08
染毒组	10	+	6.10 ± 3.78*

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

2.3 胆碱酯酶与单胺氧化酶测定

采用改良的 Ellman 法测定胆碱酯酶^[2], 显示染毒组活性下降, 而单胺氧化酶升高, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 对叔丁基酚对动物模型胆碱酯酶、

单胺氧化酶的影响 ($\bar{x} \pm s$)

U/L

组别	动物数	AChE	MAO
对照组	10	1.07 ± 0.29	6.07 ± 1.29
染毒组	10	0.76 ± 0.18**	9.42 ± 1.32**

注: 与对照组比较, * * $P < 0.01$

3 讨论

本实验结果显示对叔丁基酚连续 30 d 涂皮结束后, 实验组豚鼠黑色皮肤颜色均明显变苍白, 有的出现白斑, 甚至原有黑毛处长出白毛, 与对照组相比变化明显。生化测定显示胆碱酯酶活性下降, 单胺氧化酶升高。这与临床检测发现白癜风患者皮损区胆碱酯酶活动降低, 胆碱能活性增加, 交感神经兴奋性增高, 以及单胺氧化酶值升高相符^[3]。近年来

许多学者在探讨胆碱酯酶、单胺氧化酶等与黑色素合成的关系,提出交感神经兴奋性增加,可能导致褪黑激素等介质的释放增加,使黑色素合成减少;另一方面交感神经兴奋可能会导致单胺氧化酶活性增加,进而出现过氧化氢聚集导致黑色素合成减少。组织病理学结果显示皮肤表皮基底层、棘层可见黑染的黑色素细胞,但数量较对照组明显减少,毛囊内黑色素表达下降,部分毛囊无着色,与对照组比较,差异有统计学意义。该结果与文献中报道对叔丁基酚有脱色作用相一致,说明接触或使用含酚制品的个人中可出现色素脱失斑^[4-5]。

对叔丁基酚作为重要的精细化工中间体,广泛用于制造表面活性剂、紫外线吸收剂、农药以及油性酚醛树脂等产品,市场的需求量很大。此外,本品还可用于光气法制碳酸酯反应的终止剂、环氧树脂的改进、二甲苯树脂改性、聚氯乙烯稳定剂的原料、紫外线吸收剂、表面活性剂等^[6]。因

涉及行业广泛,接触人员众多,故职业危害也比较大,本实验结果为现场病例观察及制定防御措施提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 赵辩. 皮肤病学 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2001: 638-639
- [2] Katsumaro T, Tohru H. Cholinesterase activities in the blood and brain of rats and mice as determined by a rapid colorimetric method [J]. Industrial Health 1985; 23 (2): 75-80
- [3] 王靓, 龙子江, 陈明, 等. 祛白凝胶对实验性白癜风模型豚鼠的治疗作用 [J]. 中药药理与临床, 2006; 22 (5): 49-50
- [4] 贾会林, 沈丽光, 杨荷载, 等. 对叔丁基酚致职业性白斑 2例临床分析 [J]. 工业卫生与职业病, 2005; 31 (3): 133
- [5] Boissy RE, Manga P. On the etiology of contact occupational vitiligo [J]. Pigment Cell Res 2004; 17 (3): 208-214
- [6] 霍稳周. 耐高温树脂催化剂催化合成对叔丁基酚的研究 [J]. 工业催化, 2005 增刊: 382-385

甲醛免疫毒性的体外实验

Study on immunotoxicity of formaldehyde in vitro

翟玲玲, 徐兆发*, 徐斌, 邓宇, 辛辛

ZHAILingling XU Zhao-fa*, XU Bin DENG Yu XIN Xin

(中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 甲醛在人群的暴露非常普遍, 国内外已经有许多证据证实, 甲醛可以通过直接或者间接的作用, 造成免疫系统的损害。本文通过体外实验方法, 观察甲醛对 T B淋巴细胞和细胞因子的毒性效应, 探讨甲醛免疫毒性机制。

关键词: 甲醛; 免疫毒性

中图分类号: R996 O623.511 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2010)03-0209-02

甲醛是室内空气污染首要污染物, 众多研究证实甲醛对其暴露者的健康危害很多, 国内外已经有许多证据表明, 甲醛可以通过直接或者间接的作用, 造成免疫系统的损害。Wanke等研究表明, 甲醛可以增加学龄儿童 IgE的产生^[1], 动物实验也证实甲醛可能对免疫器官、免疫细胞执行应答的功能产生影响^[2]。本文拟通过体外实验方法, 观察甲醛对体外培养小鼠脾脏 T B淋巴细胞和细胞因子的毒性效应, 进一步探讨甲醛免疫毒性机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂: 甲醛 (分析纯) 用双蒸水配制成 0.016 0.8 4. 20. 100. 500 $\mu\text{mol/L}$ 浓度备用, Hanks液 (pH7.2), 1640完全培养液 (含 10%小牛血清、青霉素 100 U/ml 链霉

素 100 $\mu\text{g/ml}$)。IL-4和 IFN- γ ELISA试剂盒为国外分装。主要仪器: CO₂培养箱 (德国 Heraeus公司 HERAcell 150), 超净工作台 (苏州净化设备有限公司 SW-CJ1D), 倒置显微镜 (Nikon公司 T5100), 酶标仪 (美国伯乐 BD-RAD 680型)。

1.2 动物分组与染毒

实验动物: 健康成年 ICR清洁级昆明种小鼠 15只, 体重 (20 $\pm$ 2) g 由中国医科大学实验动物中心提供, 自由饮食进水, 自然光照。实验分组: 培养液中加入终浓度分别为 0 (对照组), 0.16 0.8 4. 20. 100. 500 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛, 处理细胞至实验结束。

1.3 测定指标

1.3.1 T B淋巴细胞转化实验 拉颈处死小鼠, 打开腹腔, 无菌取出小鼠脾脏, 收集分离脾细胞, 加入 ConA使每孔最终浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 和 LPS使每孔最终浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ (ConA和 LPS分别刺激 T B淋巴细胞增殖) 并加入甲醛使其最终浓度为 0.016 0.8 4. 20. 100. 500 $\mu\text{mol/L}$ 。每组平行做 6孔, 置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 48 h 在培养细胞中加入 MTT液 (10 $\mu\text{l/well}$) 继续培养 4 h 小心吸弃上清, 每孔加入二甲基亚砜 (DMSO) 液 (100 $\mu\text{l/well}$) 将培养板置于微孔板振荡器上振荡 10 min 酶标仪 570 nm波长检测各孔 OD值, 计算淋巴细胞增殖指数:

增殖指数 (SI) = 染毒孔的 A值 / 对照孔的 A值

1.3.2 NF- γ 和 IL-4分泌水平测定 收集分离脾细胞, 加入甲醛使其最终浓度为 0.016 0.8 4. 20. 100. 500 $\mu\text{mol/L}$ 加入 ConA使每孔最终浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 48 h 离心收集上清液, 用双抗体夹心

收稿日期: 2010-01-15 修回日期: 2010-03-16

作者简介: 翟玲玲 (1977-), 女, 讲师, 博士在读, 从事室内空气污染对人群健康影响研究。

*: 通讯作者, E-mail: zha@mail.smu.edu.cn