

- [7] Ponticos M , Holmes A M , Shiwen X , et al . Pivotal role of connective tissue growth factor in lung fibrosis: MAPK-dependent transcriptional activation of type I collagen [J] . *Arthritis Rheum* 2009 60 (7) : 2142-2155 .
- [8] 谢艳爽,郭顺根. 血小板衍生生长因子在肝星状细胞内的信号转导 [J] . *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2004 13 (3) : 321-326 .
- [9] 牟达 何芳,张惠敏,等. ERK信号转导通路在 PDGF诱导的人动脉平滑肌细胞增殖中的作用 [J] . *石河子大学学报*, 2006 24 (2) : 154-156 .
- [10] 李晓玫,唐嘉薇,李彪,等. 丝裂素活化蛋白激酶信号转导途径对血小板源生长因子所致鼠肾系膜细胞表型转化的调控作用 [J] . *中华肾脏病杂志*, 2000 16 (6) : 347-350 .
- [11] Gavasini M A , Liao T D , Yang X P , et al . Decreased endogenous levels of ACE/SDKP promote organ fibrosis [J] . *Hypertension* 2007 50 (1) : 130-136 .
- [12] Liu Y H , D'Ambrosio M , Liao T D , et al . N-acetylserine/aspartyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by angiotensin II: a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin [J] . *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009 296 (2) : H404-412 .
- [13] Omasa M , Taniguchi H , Koya D , et al . N-acetylseryl-aspartyl-proline ameliorates the progression of renal dysfunction and fibrosis in WKY rats with established anti-glomerular basement membrane nephritis [J] . *J Am Soc Nephrol* 2006 17 (3) : 674-685 .
- [14] 杨方,陈萍,王俐波,等. N-乙酰基-丝氨酸-天门冬氨酸-赖氨酸-脯氨酸对基质金属蛋白酶-1和基质金属蛋白酶组织抑制因子-1的调节在大鼠矽肺纤维化形成中的作用 [J] . *解剖学杂志*, 2009 32 (6) : 719-723 .
- [15] 张丽娟,马文东,杨嫣,等. 细胞外信号调节激酶 1/2在抗纤维化短肽 ACE/SDKP调节大鼠心脏成纤维细胞增殖和胶原表达中的作用 [J] . *中华心血管病杂志*, 2008 36 (5) : 444-448 .

亚急性 1, 2-二氯乙烷染毒致小鼠肝组织氧化损伤的研究

石磊, 齐莹, 高岚岳, 王高阳, 李革新, 吕秀强, 金亚平

(中国医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 本研究的目的是探讨亚急性 1, 2-二氯乙烷 (1, 2-DCE) 中毒致肝脏氧化损伤情况, 为阐明 1, 2-DCE 中毒性肝损伤的机制提供参考依据。将昆明种小鼠随机分成对照组和不同剂量 1, 2-DCE 染毒组 (0.35、0.7、1.2 mg/L), 采用静式吸入方式染毒 1 周; 然后, 取血和肝组织, 分别检测血中总胆红素 (TB) 和谷胱甘肽 (GSH) 含量, 肝组织中丙二醛 (MDA)、GSH 含量及超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性。结果中、高剂量染毒组小鼠的血浆中 TB 含量显著高于对照组小鼠; 而中、高剂量染毒组小鼠的肝组织中 GSH-Px 活性和 GSH 含量及高剂量组的 SOD 活性显著低于对照组, 高剂量染毒组小鼠的肝组织中 MDA 含量显著高于对照组。提示亚急性 1, 2-DCE 中毒可引起肝组织的氧化性损伤。

关键词: 1, 2-二氯乙烷; 肝脏; 氧化损伤

中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2011)02-0110-03

Study on oxidative damage in liver of mice induced by subacute 1, 2-dichloroethane exposure

SHI Lei, QI Ying, GAO Lan-yue, WANG Gao-yang, LI Ge-xin, LYU Xiu-qiang, JIN Ya-ping

(Department of Environmental and Occupational Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective To explore the situation of oxidative damage in liver of mice induced by 1, 2-dichloroethane (1, 2-DCE) for further disclosing the mechanism of hepatotoxicity induced by 1, 2-DCE. Methods Kunming mice were randomly divided into four groups: control group, low dose group, medium dose group and high dose group. Mice were exposed to 1, 2-DCE using static inhalation chamber, 4 h per day for 7 days. Then, take blood and liver for measuring blood levels of total bilirubin and GSH, activities of SOD and GSH-Px and contents of MDA and GSH in liver tissue. Results The results showed that the plasma levels of TB in mice of medium and high dose groups were increased significantly compared with that of control group; the liver MDA content in mice of high dose group was also increased significantly ($P < 0.05$); but the activities of GSH-Px and contents of GSH in liver of mice of medium and high dose groups were decreased significantly. Conclusion The results suggested that liver injury could be induced by 1, 2-DCE and oxidative damage was one of the possible mechanisms.

Key words: 1, 2-dichloroethane; liver; oxidative damage

二氯乙烷 (dichloroethane, DCE) 系卤代烃类化合物, 为工业上常用的有机溶剂之一, 主要用于粘合剂、溶剂和氯代烃的生产^[1]。DCE 有 1, 2-DCE (对称体) 和 1, 1-DCE (不对称体) 两种异构体。两者均为无色、易挥发、具有氯仿气味的

收稿日期: 2010-06-11 修回日期: 2010-09-20

作者简介: 石磊 (1983-) 男, 硕士在读, 研究方向: 肝脏毒理。

通讯作者: 金亚平, E-mail: jinyip@mail.cmu.edu.cn

的油状液体，工业上以 1, 2-DCE为重要，又称为氯化乙烯。1, 1-DCE属低毒类，只引起麻醉作用，但 1, 2-DCE属高毒类，职业中毒均为 1, 2-DCE引起。1, 2-DCE易经呼吸道、消化道和皮肤吸收并快速分布到全身，特别是脂肪丰富的组织器官。

迄今为止，有关 1, 2-DCE毒性的研究资料很少，且多集中在对其致癌和致突变作用的研究^[3]。近年来，随着我国经济快速发展和工业化进程的加速，新材料、新工艺不断涌现。1, 2-DCE作为工业上广泛使用的化学物质，其引发的职业中毒事故多有发生，1, 2-DCE的职业病危害已引起了劳动卫生领域的广泛关注^[3, 4]。肝脏是 1, 2-DCE中毒损害的主要靶器官之一^[5]。然而有关 1, 2-DCE致肝损伤的实验研究较少，其损伤机制尚不清楚，急需进行深入的研究。

本研究采用吸入染毒方式，探讨 1, 2-DCE中毒对小鼠肝组织氧化应激指标的影响，为阐明 1, 2-DCE致肝损伤的机制提供实验参考数据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

T6型紫外可见分光光度计，北京普析通用仪器有限责任公司；电热恒温水浴器（DK-420型），上海森信实验仪器有限公司；精密电子天平（TB-114型），德国 Sartorius公司；电动匀浆机（DIAX 900型），低速大容量离心机（DL-5-B）、高速台式离心机（TGL-16G），上海安亭科学仪器厂；漩涡混匀机（XW-80A型），上海医科大学仪器厂。1, 2-二氯乙烷（国药），谷胱甘肽标准品，偏磷酸，北京新光化学试剂厂；牛血清白蛋白，北京红星生物化学制品厂；三氯醋酸，上海青析化工科技有限公司；磷酸氢二钠、磷酸二氢钠，北京化工厂；柠檬酸钠、冰乙酸、酒石酸钾钠、碘化钾、无水硫酸铜、氢氧化钠，沈阳制剂一厂。

1.2 实验动物分组与处理

选用健康昆明种小鼠 32只，雌雄各半，体重（20.0±2.0）g，由中国医科大学实验动物中心提供。小鼠自由饮水

表 1 各组小鼠血浆中 TB、GSH含量及 GSH-Px和 SOD活性的比较（ $\bar{x}\pm s$ ）

组别	动物数	血浆 TB (mg/L)	全血 GSH (mg/g Hb)	GSH-Px活性 (U/mg Prot)	SOD活性 (U/mg Prot)
对照组	8	2.70±1.09	1.909±0.670	183.60±44.71	326.85±28.11
低剂量组	8	2.52±0.81	2.097±0.447	193.03±26.68	322.55±47.39
中剂量组	8	4.22±1.36*	1.639±0.315	130.96±20.12*	303.02±35.54
高剂量组	8	6.73±1.78**	1.638±0.433	127.47±15.83**	260.39±34.98**

注：与对照组比较，* P<0.05 ** P<0.01。

2.3 小鼠肝组织中 GSH与氧化损伤产物的检测结果（表 2）

表 2 各组小鼠肝组织中 MDA和 GSH含量的比较（ $\bar{x}\pm s$ ）

组别	动物数	MDA (nmol/mg Prot)	GSH (μ g/100 mg)
对照组	8	7.69±1.45	117.85±26.16
低剂量组	8	8.54±2.10	115.87±30.26
中剂量组	8	8.73±1.55	83.23±26.42*
高剂量组	8	9.56±1.46*	71.22±29.88**

注：与对照组相比较，* P<0.05 ** P<0.01。

随染毒剂量的增加，小鼠肝组织中 MDA含量逐渐升高，

和摄食。饲料由中国医科大学实验动物中心提供。适应性喂养 1周后随机分为 4组，对照组、低剂量组（0.35 mg/L）、中剂量组（0.7 mg/L）和高剂量组（1.2 mg/L），每组 8只小鼠（雌、雄各半）。采用静式吸入方式染毒，每天染毒 4 h（间隔 2 h更换染毒柜空气和染毒药物），连续染毒 1周。

1.3 检测指标与方法

小鼠体重：每天称量小鼠体重一次，并观察小鼠的身体状况。血浆总胆红素含量测定（TB）：咖啡因法。谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活性测定：DTNB显色法。超氧化物歧化酶（SOD）活性测定：黄嘌呤氧化酶法。MDA含量测量：TBA比色法。肝组织匀浆中蛋白含量测定：双缩脲法。

以上指标均采用南京建成生物工程研究所的检测试剂盒，按试剂盒说明书进行测定。

1.4 数据统计分析

用 SPSS13.0统计分析软件对检测数据进行处理分析，多组间比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA），两两组间比较采用 LSD法，检验水准 P<0.05。

2 结果

2.1 对小鼠体重的影响

染毒第 3天起，高剂量染毒组小鼠进食量明显减少，染毒第 4天，个别小鼠出现步态不稳，并呈卧伏状态，染毒第 6天，有 2只小鼠死亡。低、中剂量染毒组小鼠体重在染毒期间与对照组相比差异无统计学意义。

2.2 小鼠血浆中 TB、GSH含量及抗氧化酶活性的检测结果

由表 1显示，随染毒剂量的增加，中、高剂量染毒组小鼠血浆 TB含量逐渐升高，且与对照组比较差异具有统计学意义。各染毒组小鼠全血 GSH含量与对照组比较差异无统计学意义。随染毒剂量的增加，小鼠肝组织中 GSH-Px和 SOD活力下降，中、高剂量染毒组的 GSH-Px活力及高剂量染毒组的 SOD活力，与对照组比较差异具有统计学意义。

而 GSH含量逐渐下降，高剂量染毒组的 MDA含量及中、高剂量染毒组的 GSH含量与对照组比较差异有统计学意义。

3 讨论

本研究中，采用血浆 TB含量来衡量 1, 2-DCE致小鼠肝损伤的程度。血浆中总胆红素由间接胆红素和直接胆红素组成。间接胆红素来源于衰老红细胞的分解，而肝组织在间接胆红素的代谢过程中具有重要作用，它能够摄取血浆中的间接胆红素并使其与葡萄糖醛酸结合，形成直接胆红素，并通过胆汁排出体外。因此，当肝组织受到外来化学物质损伤后，将导致间接胆红素的代谢障碍和部分直接胆红素返流入血，使

血浆中直接胆红素与间接胆红素含量升高。有文献表明, 血浆总胆红素水平可作为评价肝损伤的检测指标^[6]。但胆红素作为评价肝损伤的指标确实存在一定局限性, 不如肝功转氨酶。虽然如此, 其血浆中水平的升高也具有一定的临床指导意义, 也可从另一角度证明 1,2-DCE染毒可引起肝损害。本研究结果显示, 随染毒剂量的增加, 小鼠血浆中总胆红素含量逐渐升高, 说明中、高剂量 1,2-DCE染毒对小鼠肝组织有明显损伤作用。职业中毒的病例报道显示, 1,2-DCE职业中毒患者可出现肝脏肿大, 血清乳酸脱氢酶升高, 肝穿刺结果显示肝细胞肿胀, 有局灶性坏死, 肝窦充血, 汇管区及小叶内有炎性细胞浸润等^[7-8]。动物实验结果表明, 亚急性和慢性实验中, 高剂量摄入 1,2-DCE的大鼠表现为肝脏肿大, 并且在肝脏局部出现肝细胞脂肪变性和肝细胞坏死, 血清中谷氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 有明显升高^[9]。我们实验中以血浆 TB为检测指标也显示 1,2-DCE能致肝组织损伤, 这与前期的病例报道和实验研究结果相一致。

肝脏是生物体最主要的解毒器官, 氧化还原是生物体代谢外来化学物质的主要途径。在氧化还原过程中会产生大量的自由基, 损伤生物体内的生物大分子, 导致组织器官的氧化损伤。生物体内存在氧化与抗氧化的平衡调节系统, 一方面, 机体产生的活性氧自由基可与生物膜磷脂中的多不饱和脂肪酸发生反应, 产生脂质过氧化物, 造成机体的损伤; 另一方面, 机体可通过由抗氧化酶和抗氧化物组成的抗氧化防御体系清除自由基, 防止自由基在机体内的积聚而产生对组织细胞的损伤。然而, 当自由基的生成速度和数量超过机体的清除能力时, 则会导致组织器官的氧化损伤。

MDA是最具代表性的脂质过氧化终产物之一, 其在肝组织中含量的高低反映了肝组织受氧化损伤的程度。本次研究结果显示, 高剂量 1,2-DCE染毒组的 MDA含量明显升高, 提示高剂量 1,2-DCE能导致肝组织的氧化损伤。国外有研究显示, 1,2-DCE染毒后细胞中对氧化损伤敏感的多萜醇含量下降^[10], 提示 1,2-DCE可以引起肝组织的氧化损伤。GSH-Px和 SOD是机体抗氧化系统中最重要的抗氧化酶类^[11], SOD可特异性清除超氧阴离子自由基 (O_2^-), 保护细胞免受 O_2^- 的损伤。GSH-Px几乎存在于机体的所有组织中, 能特异性地催化还原性谷胱甘肽对过氧化氢 (H_2O_2) 的还原反应, 对组织中产生的 H_2O_2 有较强的清除能力, 可保护细胞免受过氧化物的损伤。GSH是细胞内主要的抗氧化物质, 能直接参与对自由基的清除。它们在维持细胞内自由基的代谢平衡方面发挥着重要作用, 在一定程度上也反映了机体抗氧化的能力^[12]。本次研究结果显示, 高剂量染毒组小鼠的肝组织中 GSH-Px和 SOD活力及中、高剂量染毒组的 GSH含量明显下降, 提示中、高剂量 1,2-DCE染毒能明显抑制肝组织的抗氧化能力, 从而使自由基的清除发生障碍, 这可能是 1,2-DCE导致肝组织氧化损伤的主要机制之一。

此外, 研究资料显示, GSH在 1,2-DCE的代谢中也起重要作用, 1,2-DCE在体内可与 GSH结合生成 S-(2-氯乙基) -

谷胱甘肽, 并经非酶系统转化与水结合生成 S-(2-羟乙基) 谷胱甘肽, 或与巯基化合物结合生成乙烯双谷胱甘肽加合物^[13], 故 1,2-DCE在体内代谢过程中会消耗大量 GSH, 因此, GSH含量可成为反映 1,2-DCE暴露与毒性损伤的重要检测指标^[14]。

通过本研究证实, 1,2-DCE染毒可以致肝组织的氧化损伤, 引起了肝组织损害。肝组织的损害可能是由氧化损伤引起的, 也可能是由其他损伤机制引起的。氧化损伤可能是 1,2-DCE致肝损伤的主要机制之一。

参考文献:

- [1] 张寿林. 急性职业性有机溶剂——二氯乙烷、正己烷 [J]. 劳动保护, 2002 16 (11): 50-51.
- [2] 王秀玲. 1,2-二氯乙烷的卫生毒理学研究进展 [J]. 国外医学, 1999 26 (5): 289-291.
- [3] 张勤丽, 王林平, 郭小丽, 等. 1,2-二氯乙烷对血脑屏障的损伤作用 [J]. 中华劳动卫生与职业病杂志, 2006 24 (4): 239-242.
- [4] 王静, 高茂龙, 石樱桃, 等. N-甲基-D天门冬氨酸受体和 Ca^{2+} 在 1,2-二氯乙烷致急性中毒性脑病中的作用 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2007 25 (12): 726-729.
- [5] 刘喜林, 王立军. 急性 1,2-二氯乙烷中毒 126例临床分析 [J]. 急诊医学, 1999 8 (4): 265.
- [6] 金晔, 陈珣, 苏建荣. 肝病患者血清前蛋白和总胆汁酸测定的临床价值 [J]. 中国实验诊断学, 2007 11 (10): 1341-1342.
- [7] 李来玉, 陈秉勋. 职业性二氯乙烷亚急性中毒的研究概况 [J]. 中国工业医学杂志, 1996 9 (1): 45-47.
- [8] 李来玉, 陈炳炯. 1,2-二氯乙烷职业中毒近十年的研究概况 [J]. 中国职业医学, 1999 26 (6): 44-46.
- [9] Cottalasso D, Barisone G, Fontana L. Impairment of lipoprotein metabolism in rat liver cells induced by 1,2-dichloroethane [J]. Occup Environ Med 1994 51 (4): 281-285.
- [10] Holbovska K J, Sobekova A, Holbovska K, et al. Antioxidant and detoxifying enzymes in the liver of rats after sub-chronic inhalation of the mixture of cyclic hydrocarbons [J]. Exp Toxicol Pathol 2005 56 (6): 377-383.
- [11] 程元恺. 谷胱甘肽的解毒作用与毒性代谢物 [J]. 生物化学与生物物理学进展, 1994 21 (5): 395-399.
- [12] Cottalasso D, Domenicotti C, Travaso N, et al. Influence of chronic ethanol consumption on toxic effects of 1,2-dichloroethane: glycolipoprotein retention and impairment of dolichol concentration in rat liver microsomes and Golgi apparatus [J]. Toxicology 2002 178 (3): 229-240.
- [13] Richard R D, Storer N M. In vivo genotoxicity and acute hepatotoxicity of 1,2-dichloroethane in mice: comparison of oral, intraperitoneal and inhalation routes of exposure [J]. Cancer Research 1984 44 (10): 4267-4271.
- [14] Lisa M, Sweeney, Shakil A. Physiologically based pharmacokinetic model development and simulations for ethylene dichloride (1,2-dichloroethane) in rats [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2008 51 (3): 311-323.