豚鼠最大值试验法研究二氯乙酰氯皮肤致敏作用的初步报告

黄永顺[1], 陈嘉斌[1], 谢植伟[1], 金佳纯[1], 睢罡[2], 符传东[2], 刘成武[3], 李娟[3]

(1. 广东省职业病防治院, 广东 广州 510300; 2. 山西医科大学公共卫生学院, 山西 太原 030001; 3. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510080)

摘要: 目的 探讨二氯乙酰氯 (DCAC) 是否在三氯乙烯药疹样皮炎发病过程中起到半抗原的作用。方法 按豚鼠最大值试验 (GPMT) 法, 用 DCAC对白色豚鼠进行皮内和涂皮结合法致敏试验, 并设阳性对照组 (二硝基氯苯)、阴性对照组 (橄榄油和福氏完全佐剂), 观察各组动物皮肤的红斑和水肿等情况, 求出致敏率和平均反应值, 并且检测 ALT和 AST以及计算各脏器系数。结果 DCAC实验组、阳性对照组和阴性对照组的致敏率分别为 0%、100%和 0%; 平均反应值分别为 0、6.0和 0, 各实验组豚鼠的 ALT和 AST以及脏器系数差异无统计学意义。结论 DCAC可能在三氯乙烯药疹样皮炎发病过程中没有起到半抗原的作用, 并且对实验动物没有明显肝功能损害。

关键词: 豚鼠最大值试验; 二氯乙酰氯; 致敏

中图分类号: R758.22 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2011)04-0253-03

Study on skin sensitization effect caused by dichloroacetyl chloride in guinea pigs using GPMT method

HUANG Yong-shun*, CHEN Jia-bin, XIE Zhi-wei, JIN Jia-chun, SUI Gang, FU Chuan-dong, LIU Cheng-wu, LI Juan

(*: Guangdong Provicial Prevention and Treatment Center for Occupational Diseases, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Objective To explore whether the trichloroethylene induced medicamentosa-like dermatitis is initiated by DCAC as hapten or not. Methods A modified guinea pig maximization test (GPMT) was used, and the skin signs, such as edema and erythema were carefully examined in guinea pigs treated with DCAC, 2,4-dinitrochlorobenzene (positive control) and olive oil (negative control group), respectively. Meanwhile, the activities of ALT and AST in serum were also determined. Results The results showed that the sensitizing rates and mean response scores in DCAC treated group, positive control group and negative control group were 0%, 100%, 0%; and 0, 6.0, 0, respectively. The differences of ALT and AST as well as the organ coefficients among these groups were also not significant. Conclusion It was suggested that DCAC may not play a role of hapten during the onset of medicamentosa-like dermatitis caused by TCE.

Key words: guinea pig maximization test (GPMT); dichloroacetyl chloride; sensitization effect

广东从 1988年在国内首次发现三氯乙烯 (trichloroethylene, TCE) 引起的药疹样皮炎至今, 根据各级诊断机构的诊断结果, 该组病例已达 394例[1]。该病有较高的死亡率, 已引起人们的高度重视[2], 主要以皮肤变应性损害和肝损害为主要表现, 可能是 TCE或其代谢产物所致的变应性接触性皮炎, 与机体异常的免疫应答过程有关, 但发病机制尚不清楚。基于传统的半抗原理论[3], 作为小分子物质的 TCE, 无法直接作为抗原引发变应反应, TCE需通过 TCE和/或其代谢产物 (半抗原) 与体内某些物质 (尤其蛋白质等大分子物质) 结合形成全抗原引发变应反应。据国外报道, 二氯乙酰氯 (dichloroacetyl chloride, DCAC) 具有强烈的酰化作用, 能与机体内生物大分子物质发生加合作用, 可能发挥半抗原作用诱发自身免疫反应[4], DCAC能否作为半抗原诱发三氯乙烯药疹样皮炎值得研究。目前, 国内未见 DCAC致敏的相关报道, 本文通过豚鼠最大值试验研究 DCAC的皮肤致敏性以及肝功能损害情况, 明确 DCAC在三氯乙烯药疹样皮炎发病过程中是否起到半抗原的作用, 为探索三氯乙烯药疹样皮炎致病机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验中使用的均为进口高纯度试剂。动物采用 FMMU白色豚鼠 (合格证号: 粤监证字第 2008A027号, SCXK (粤) 2003-0002), 购于广东省实验动物中心, 体重 280~310 g, 雌雄各半; DCAC (≥98.5%) 为上海富蔗化工有限公司产品, 橄榄油 (olive oil)、福氏万全佐剂 (Freund's complete adjuvant, FCA) 为 Sigma公司产品; 2,4-二硝基氯苯 (2,4-dinitrochlorobenzene, DNTB) 购自日本东京化成工业株式会社。

1.2 受试物配制

1.2.1 最高耐受浓度试验受试物 先加入橄缆油, 后加入 DCAC, 按体积分数为 0.25%、1.0%、2.5%、5.0%、10.0%配制 DCAC溶液, 立即用玻璃

收稿日期: 2011-03-08; 修回日期: 2011-05-08
基金项目: 广东省医学科研基金立项课题 (A2009057)
作者简介: 黄永顺 (1982-), 男, 硕士, 主管医师, 主要从事职业病防治工作。

棒搅匀，然后用超声波振荡器混匀，用于皮内注射；根据以上方法，按体积分数为 5.0%、7.5%、10%和 15%配制 DCAC溶液，用于涂皮组。

1.2.2 豚鼠最大值试验受试物

1.2.2.1 DCAC实验组 （1）0.25% DCAC（用于皮内注射）：称取 9.975 g橄榄油，加入 DCAC至 10.0 g，迅速摇匀，用超声波振荡器混匀；（2）0.25% DCAC和 FCA（1∶1）混合物（用于皮内注射）：取 4.0 ml FCA注入灭菌离心管中，加入 0.25% DCAC 4.0 ml，超声波振荡器混匀；（3）7.5% DCAC（用于致敏和激发）：取 1个干净烧杯，称取 9.25 g药用凡士林，加入 DCAC至 10.0 g，用玻璃棒混匀备用。

1.2.2.2 阳性对照组 （1）0.1% DNTB（用于皮内注射）：称取 0.01 g DNTB，加入 1.0 ml丙酮溶解 DNTB后快速加入橄榄油至 10.0 g，立即用玻璃棒搅匀，然后用超声波振荡器混匀；（2）0.1% DNTB和 FCA（1∶1）混合物（用于皮内注射）：使用一次性注射器抽取 2.0 ml FCA注入灭菌离心管中，加入 2 ml已灭菌 0.1% DNTB，超声波振荡器混匀；（3）1.0% DNTB（用于致敏）：称取 0.05 g DNTB，加入 1 ml丙酮溶解 DNTB后快速加入 2.0 ml橄榄油，用超声波振荡器混匀后加入药用凡士林至 5.0 g，用玻璃棒混匀备用；（4）0.1% DNTB（用于激发）：称取 0.01 g DNTB，加入 1.0 ml丙酮溶解 DNTB后快速加入 2.0 ml橄榄油，用超声波振荡器混匀加入药用凡士林至 10.0 g，用玻璃棒混匀备用。

1.2.2.3 阴性对照组 （1）橄榄油，经紫外线照射灭菌用于皮内注射；（2）橄榄油和 FCA（1∶1）混合物（用于皮内注射）：取 4.0 ml FCA注入灭菌离心管中，加入 4.0 ml已灭菌橄榄油，超声波振荡器混匀；（3）凡士林，用于激发。

1.2.2.4 10% SLS 取 1个干净烧杯，称取 5.0 g SLS，加入蒸馏水至 50.0 g，溶解备用。

1.3 方法

1.3.1 豚鼠最大值试验（guinea pig maximization test, GPMT） 豚鼠购入在本实验室观察 1周后，选择健康动物随机分组供试，每笼 10只动物。用电动剃刀去除背部毛，约为 4 cm×6 cm，24 h后取皮肤完整无损伤的动物随机分组供试，DCAC实验组动物为 20只，阳性对照组、阴性对照组各为 10只（雌雄各半）。DCAC实验组、阳性对照组和阴性对照组等 4组分别皮内注射最高耐受浓度，从头部向尾部成对进行 A、B、C、D、E、F共 3对 6个点。各点间距 1.5 cm，各对间距 3 cm。A、B两点注射 0.1 ml FCA；C、D两点注射 0.1 ml受试物；E、F两点注射 0.1 ml FCA与受试物的等量混合物。阴性对照组分别仅注射 A、B两点。第 7天，在注射部位涂抹 10%十二烷基硫酸钠。第 8天，用 3 cm×5 cm滤纸涂以用适当的凡士林配制的受试物（涂皮法最高耐受浓度），敷在注射部位，封闭固定 48 h。阴性对照组用橄榄油涂抹。第 15天，分别用 2 cm×2 cm滤纸涂以用凡士林配制的受试物（激发），再次敷在去毛区，持续封闭固定 24 h。阴性对照组用凡士林。去除斑贴后 24、48和 72 h观察和记录受试区皮肤反应情况。

1.3.2 仪器 日立 7080生化仪检测肝脏功能指标。

1.3.3 病理学检查 取 DCAC实验组、阳性对照组和阴性对照组激发部位皮肤 HE染色进行常规病理学检查，心脏、肝、脾、肺和肾等脏器进行称重，并计算脏器系数。

2 结果

2.1 皮肤最大耐受浓度

DCAC豚鼠最大可耐受体积分数为 7.5%，以该浓度涂皮，皮肤未出现红斑和坏死；体积分数为 0.25%时，皮内注射处皮肤无红斑、水肿等变化出现；橄榄油对豚鼠皮肤无刺激作用。

2.2 皮肤致敏试验

试验过程中 DCAC实验组共有 2只豚鼠死亡，经解剖没有发现异常死亡情况。实验结束时，观察和记录实验动物皮肤的红斑和水肿情况。按标准方法，记录皮肤反应强度评价的积分，统计平均反应值和致敏率（阳性动物数占试验动物数的百分比）平均反应值：DCAC实验组为 0，阳性对照组为 6.0，阴性对照组为 0。致敏率：DCAC实验组为 0，阳性对照组为 100%，阴性对照组为 0。各组实验动物皮肤表现：DCAC实验组及阴性对照组豚鼠斑贴部位皮肤未出现红斑和水肿；阳性对照组，斑贴部位皮肤出现明显红斑和水肿，并扩展到周围皮肤。

2.3 各实验组豚鼠肝功能主要生化结果

DCAC实验组、阳性对照性、阴性对照组各指标差异均无统计学意义（$P>0.05$），见表 1。

表 1 各实验组豚鼠肝功能主要生化指标的比较　U/L

组别	动物数	ALT	AST
DCAC实验组	18	128.00±32.09	316.67±108.88
阳性对照组	10	131.90±29.68	394.30±128.01
阴性对照组	10	130.20±43.70	375.30±172.21

2.4 DCAC对动物脏器指数的影响

3组各指标差异均无统计学意义（$P>0.05$），具体结果见表 2。

表 2 各实验组豚鼠脏器指数的影响 %

组别	动物数	体重 (g)	心指数	肝指数	脾指数	肺指数	肾指数	脑指数
DCAC实验组	18	316±35	0.36±0.04	2.95±0.23	0.17±0.04	0.86±0.16	0.95±0.07	1.06±0.12
阳性对照组	10	307±54	0.37±0.06	2.95±0.14	0.13±0.01	0.90±0.16	0.97±0.06	1.12±0.15
阴性对照组	10	319±48	0.38±0.04	2.88±0.22	0.15±0.03	0.83±0.16	0.92±0.08	1.07±0.12

2.5 皮肤病理组织学检查

阳性对照组角质层、粒细胞层中炎症细胞浸润，粒细胞轻度肿胀，基底层细胞未见异常，真皮层也有散在炎症细胞浸润，毛细血管扩张，水肿。DCAC实验组、阴性对照组角质层角化完全，棘层无增厚，真皮内未见毛细管扩张、水肿和炎症细胞浸润。

3 讨论

小分子化学物诱导的变应性接触性皮炎被认为是一种由T淋巴细胞介导的迟发型超敏反应，是以细胞免疫为主的过程[5,6]。Boerrigter G H等和Scheper R J等分别在DNCB致敏的豚鼠体内检测到了半抗原特异性抗体和特异性T淋巴细胞，证明了T、B淋巴细胞同时参与了机体的过敏性反应[7,8]。TCE在体内的代谢过程非常复杂，中间活性代谢产物较多，目前尚不清楚哪一种代谢产物作为半抗原引发了机体的变应反应。通过本研究发现DCAC可能在TCE诱发变应性皮炎过程中，没有发挥中间活性代谢产物作用。而李来玉等[9]用该方法评价三氯乙烯对豚鼠的致敏率为71.14%，属于强致敏物，皮肤病理组织学检查也发现了表皮棘细胞层增厚，真皮内毛细血管扩张、水肿，以及单核细胞浸润，TCE代谢产物三氯乙酸致敏率为58.13%，为中度致敏物，而三氯乙醇及水合三氯乙醛的致敏率为0。本次研究DCAC实验的致敏率为0，结果暂不支持DCAC在TCE诱发变应性皮炎中的作用。

本次研究还发现DCAC实验组与其他两个组别ALT、AST检测值差异无统计学意义，没有发现DCAC对豚鼠产生肝损害作用。有研究[10]证明了TCE氧化通路的代谢产物是产生细胞毒性和肝损伤的主要物质，DCAC也是三氯乙烯经细胞色素P450途径中间的活性代谢产物，但本研究认为DCAC可能不是TCE产生细胞毒性和肝损伤的中间代谢产物。

本研究缺乏TCE对照组对比资料，无法进一步深入分析。在未来的研究中，应同时设立TCE以及其他代谢产物作为对照，以进一步阐明DCAC以及其他代谢产物在TCE致敏以及造成肝损害过程中的作用。

参考文献：

[1] 黄永顺，黄汉林．职业性三氯乙烯药疹样皮炎免疫损伤研究进展[J]．中国职业医学，2010，37(2)：157-159．
[2] 李来玉，陈秉炯，黄先青，等．广东省职业性三氯乙烯皮肤损害的发病情况及分析[J]．中国工业医学杂志，1998，11(6)：349-351．
[3] Park B K，Naisbitt D J，Gordon S F，et al．Metabolic activation in drug allergies[J]．Toxicology，2001，158(1-2)：11-23．
[4] Khan M F，Kaphalia B S，Ansari G A．Time-dependent autoimmune response of dichloroacetyl chloride in female MRL+/+ mice[J]．Immunopharmacol Immunotoxicol，1997，19(2)：265-277．
[5] Enk A H，Katz S I．Contact sensitivity as a model for T cell activation in skin[J]．J Invest Dermatol，1995，105(Suppl)：80-83．
[6] Cavani A，Hackett C J，Wilson K J，et al．Characterization of epitopes recognized by hapten specific CD4+ T cells[J]．J Immunol，1995，154(3)：1232-1238．
[7] Boerrigter G H，Bril H，Scheper R J．Hapten-specific antibodies in allergic contact dermatitis in the guinea pig[J]．Int Arch Allergy Appl Immunol，1988，85(4)：385-391．
[8] Scheper R J，von Blomberg M，Boerrigter G H，et al．Induction of immunological memory in the skin role of local T cell retention[J]．Clin Exp Immunol，1983，51(1)：141-148．
[9] 李来玉，唐小江，黄建勋，等．三氯乙烯及其代谢产物的豚鼠皮肤致敏试验[J]．中国职业医学，2000，27(5)：6-8．
[10] 戴宇飞，李海山，孙耀峰，等．代谢活化在三氯乙烯对小鼠致敏及肝毒性中的作用[J]．中国药理学与毒理学杂志，2005，19(5)：378-382．

(上接第249页)

参考文献：

[1] Huang J，Liu H，Gu W，et al．A delivery strategy for rotenone microspheres in an animal model of Parkinson's disease[J]．Biomaterials，2006，27(6)：937-946．
[2] Lapointe N，St-Hilaire M，Martinoli M G，et al．Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity[J]．FASEB J，2004，18(6)：717-719．
[3] Jeffrey D R，Margaret D H，Carlos A P．Knockout of glutamate transporters reveals a major role of Astroglia transport in excitotoxicity and clearance of glutamate[J]．Neuron，1996，16(3)：675-686．
[4] McCarthy K D，De Vellis J．Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue[J]．J Cell Biol，1980，85(3)：890-902．
[5] 吴强恩，郑力行，谢芳，等．反相高效液相色谱荧光法测定脑组织中氨基酸类神经递质[J]．复旦学报(医学版)，2005，32(3)：355-358．
[6] Ossowska K，Konieczny J，Wardas J，et al．An influence of ligands of metabotropic glutamate receptor subtypes on Parkinsonian-like symptoms and the striatopallidal pathway in rats[J]．Amino Acids，2007，32(2)：179-188．
[7] 刘辉，郭魁亮，吴强，等．鱼藤酮对大鼠纹状体谷氨酸-谷氨酰胺环路的影响[J]．环境与职业医学杂志，2009，26(2)：159-161．
[8] 刘辉，李云鹏，董兆君，等．鱼藤酮对大鼠纹状体谷氨酸转运体及谷氨酰胺合成酶的影响[J]．第三军医大学学报，2007，29(9)：831-833．