

• 实验研究 •

壬基酚致雌性大鼠遗传毒性的研究

Study of genotoxic effect of nonylphenol on female rat

曹燕花, 王茜, 李清钊, 高红霞, 陈银苹, 郝玉兰, 吕猛

CAO Yan-hua, WANG Qian, LI Qing-zhao, GAO Hong-xia, CHEN Yin-ping, HAO Yu-lan, LV Meng

(河北联合大学公共卫生学院, 河北省煤矿卫生与安全实验室, 河北 唐山 063000)

摘要: 分别取清洁级大、小鼠 24 只, 随机分为 3 组, 壬基酚 (NP) 低剂量组 (50 mg/kg), NP 高剂量组 (200 mg/kg) 及对照组, 每组 8 只。大鼠灌胃染毒不同剂量的壬基酚, 对照组给予等体积玉米油, 30 d 后处死大鼠, 采用单细胞凝胶电泳技术检测血淋巴细胞、肝、肾及子宫细胞 DNA 损伤程度; 小鼠于处死前 6 h、30 h 分别灌胃染毒不同剂量的壬基酚, 对照组给以等体积的玉米油, 采用微核实验检测骨髓细胞微核率。随着壬基酚染毒剂量的升高, 大鼠血淋巴细胞、肝、肾及子宫细胞尾部 DNA 百分率 (%)、Olive 尾距、尾长均呈升高趋势, 小鼠骨髓细胞微核率呈上升趋势。提示壬基酚染毒可致大、小鼠 DNA 损伤, 且随染毒剂量的增加, 损伤逐渐加重, 具有剂量-效应关系。

关键词: 壬基酚; 雌性; 遗传毒性

中图分类号: R994.6 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2013)04-0269-03

壬基酚 (nonylphenol, NP) 是烷基酚的典型代表, 被广泛应用于塑料增塑剂、工业用洗涤剂、涂料、清洁剂、杀虫剂等行业^[1], 其对人体健康的影响也日益受到人们关注。国内外关于壬基酚的毒理学效应研究主要集中于雌激素活性方面, 有关其对雌性大鼠遗传毒性的研究却少有报道。而 DNA 损伤是评价环境毒物遗传毒性的一个重要参数。本研究采用彗星实验和微核实验探讨 NP 对血淋巴细胞、肝、肾及子宫细胞 DNA 的损伤效应, 为预防 NP 对人类生殖、发育和遗传功能的影响提供实验资料和科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

1.1.1 仪器 KDC-4044 型低速离心机 (科大创新股份有限公司中佳分公司); 微量加样器 (德国 Eppendorf); FA2004 电子天平 (上海精科天平厂); 6511 型电动搅拌机 (上海公私合营群联文教模型厂); WMZK-02 型电热恒温水箱 (浙江省嘉兴市新胜电器厂); 水平操作台。

1.1.2 试剂 壬基酚 (纯度 99.9%, 美国 Sigma 公司), 超纯水 (艾科浦实验室超纯水系统), 玉米油 (福临门), 1% 低熔点琼脂糖, 1% 正常熔点琼脂糖, 肝素, 溴乙锭 (上海华

美生物公司) 2.5 μg/ml, 三羟甲基氨基乙烷 (Tris)。

1.2 动物选择及分组

1.2.1 彗星实验 清洁级 SD 雌性大鼠 24 只, 体重约 200 g, 由河北联合大学实验动物中心提供 [动物合格证号: XCXK (京 2005-0013), 动物房证书号: SYXK (冀 2005-003)]。随机分为 3 组, NP 低剂量组 (50 mg/kg), NP 高剂量组 (200 mg/kg) 及对照组, 每组 8 只, 自由摄食、饮水, 适应性喂养 1 周后供试。

1.2.2 微核实验 清洁级昆明种小鼠 24 只, 体重 18~22 g, 由河北联合大学实验动物中心提供。随机分为 3 组, NP 低剂量组 (50 mg/kg), NP 高剂量组 (200 mg/kg) 及对照组, 每组 8 只, 自由摄食、饮水, 适应性喂养 1 周后供试。

1.3 彗星实验

1.3.1 动物染毒及标本采集处理 大鼠灌胃染毒不同剂量的壬基酚, 对照组给以等体积的玉米油 (1 ml/100 g)。染毒 30 d 后处死大鼠, 取肝脏、肾脏、子宫及全血 (肝素抗凝) 4 ℃ 冷藏待用。取各脏器并粉碎, 加适量的 PBS 液。静置取上清置于离心管中, 2000 r/min 离心 5 min 弃上清液, 加入生理盐水, 混匀。

1.3.2 铺片 取干净的磨砂载玻片, 置于水平放置的托盘上并编号, 铺 1% 正常熔点的琼脂糖, 4 ℃ 冷藏, 使胶凝固。再加入细胞或全血与 1% 低熔点琼脂糖的混合液, 使胶凝固后再加低熔点琼脂糖。然后将载玻片放入新鲜配制的 4 ℃ 裂解液中 30 min, 取出后电泳 40 min, 最后进行中和染色。

1.3.3 图像观察及分析 采用荧光显微镜观察并且采集图像, 每张图片采集 50 个细胞, 共采集 300 个细胞, IMI 软件分析 Olive 尾距、尾部 DNA 百分率 (尾% DNA)、尾长。

1.4 微核实验

小鼠于处死前 6 h、30 h 分别灌胃染毒不同剂量的壬基酚, 对照组给以等体积的玉米油 (0.1 ml/10 g)。用颈椎脱臼法处死动物, 暴露骨髓腔, 用止血钳夹紧胸骨, 挤出骨髓涂于载玻片上, 推片、干燥; 将干燥的骨髓片放于甲醇溶液中固定 15 min, 干燥。用新鲜配制的 3% Giemsa 染液染色 10 min, 然后用流水冲洗玻片, 自然干燥; 油镜下计数 1000 个嗜多染红细胞, 计算微核细胞出现的千分率。

1.5 统计学处理

Excel 2003 建立数据库, 采用 SAS9.1 软件进行数据处理, 结果以四分位数间距 (Q) 表示, 秩和检验 (Kruskal wallis test) 比较各组之间指标的差异, α=0.05 为检验水准。

收稿日期: 2013-01-22; 修回日期: 2013-03-30

基金项目: 河北省科技计划项目 (112761149)

作者简介: 曹燕花 (1977-), 女, 讲师, 研究方向: 分子毒理学。

2 结果

2.1 壬基酚对雌性大鼠血淋巴细胞、肝、肾及子宫细胞 DNA 损伤情况

NP 各染毒剂量组大鼠血淋巴细胞及子宫细胞彗星实验 Olive 尾距、尾% DNA 及尾长与对照组分别比较, 差异均有统

计学意义 ($P < 0.05$)。随染毒剂量的增加, 彗星细胞 Olive 尾距、尾% DNA 及尾长逐渐增加 (见表 1)。不同浓度 NP 染毒雌性大鼠, 随着染毒剂量的增加, 大鼠肝、肾细胞彗星实验 Olive 尾距、尾% DNA 及尾长呈增加趋势, 且存在剂量-效应关系 (表 2)。

表 1 壬基酚对血淋巴细胞及子宫细胞 DNA 的影响 (Q)

组别	细胞个数	血淋巴细胞			子宫细胞		
		Olive 尾距	尾% DNA	尾长	Olive 尾距	尾% DNA	尾长
对照组	300	0.88 ~ 5.95	56.78 ~ 79.10	10 ~ 36	4.81 ~ 9.75	37.84 ~ 55.90	31 ~ 42
低剂量组	300	4.41 ~ 13.03*	65.55 ~ 84.24*	24 ~ 68*	7.58 ~ 16.43*	48.48 ~ 67.97*	40 ~ 74*
高剂量组	300	11.21 ~ 30.45* #	65.29 ~ 93.17* #	31 ~ 88* #	7.22 ~ 23.65* #	51.87 ~ 70.10* #	69 ~ 93* #
χ^2 值		163.188	97.621	216.682	115.553	54.707	376.839
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与低剂量组比较, # $P < 0.05$ 。

表 2 壬基酚对肝、肾细胞 DNA 的影响 (Q)

组别	细胞个数	肝细胞			肾细胞		
		Olive 尾距	尾% DNA	尾长	Olive 尾距	尾% DNA	尾长
对照组	300	1.73 ~ 4.83	50.84 ~ 63.44	13 ~ 21	2.83 ~ 6.14	45.18 ~ 70.49	18 ~ 31
低剂量组	300	11.21 ~ 27.50*	57.43 ~ 66.70*	56 ~ 81*	4.76 ~ 8.38*	54.66 ~ 72.50*	30 ~ 61*
高剂量组	300	16.47 ~ 30.45* #	62.92 ~ 75.93* #	70 ~ 104* #	8.67 ~ 18.93* #	65.31 ~ 80.74* #	40 ~ 91* #
χ^2 值		510.893	264.274	612.274	332.077	184.392	424.592
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与低剂量组比较, # $P < 0.05$ 。

2.2 壬基酚对小鼠骨髓微核率的影响

经 Giemsa 染色, 细胞质呈灰蓝色, 细胞核和微核呈紫色。经单因素方差分析, 各组之间微核率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 壬基酚微核实验结果

组别	剂量 (mg/kg)	微核率 (%)
对照组	0	0.09 ~ 0.25
低剂量组	50	0.48 ~ 1.03*
高剂量组	200	1.37 ~ 2.81* #

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与低剂量组比较, # $P < 0.05$ 。

3 讨论

在彗星实验中, 受损伤的细胞 DNA 断裂, 其超螺旋结构受到破坏, 由于 DNA 片段分子量很小, 所以在电泳场中可以离开核 DNA 在凝胶分子筛向阳极移动, 形成彗星状图像。DNA 受损伤越严重, 产生的断链和易变性片段就越多, 断链也越小; 在相同电泳条件下迁移的 DNA 量就越多, 迁移的距离就越长。闫鹏^[2] 等研究发现, 壬基酚 (NP) 及辛基酚 (OP) 单独染毒和联合染毒对小鼠睾丸细胞 DNA 具有氧化损伤效应, 且损伤程度与染毒剂量存在剂量-反应关系, 提示 NP 和 OP 均能够透过血睾屏障, 对生殖细胞 DNA 有一定毒性。另有研究发现, NP 对大、小鼠肝、肾及子宫及脑组织具有氧化损伤作用^[3,4]。有关 NP 对哺乳动物肝、肾及子宫细胞 DNA 损伤作用尚未见报道。本次实验通过灌胃染毒不同剂量 NP, 结果表明, 壬基酚可致大鼠肝、肾、子宫细胞及血淋巴细胞 DNA 损伤, 且具有剂量-效应关系。

DNA 是机体中携带遗传信息的重要物质, 也是最易受到

氧自由基攻击的生物大分子之一。一旦氧化与抗氧化失衡, 自由基除直接损伤膜结构外, 更重要的是造成 DNA 损伤, 使超螺旋结构解旋, DNA 降解。DNA 的损伤程度与化学结构有一定的关系。由于 NP 为烷基酚类化合物, 含有活泼的羟基, 在体内以氧化代谢为主, 产生的活性中间产物可能与 DNA 结合形成配位体, 引起 DNA 单链断裂, 或致染色体断裂, 形成彗星细胞。正常情况下, 机体可通过自身修复机制及时修补受损的 DNA 分子, 从而维持遗传物质的稳定性^[5]。但是, 当机体抗氧化防御体系不健全、DNA 分子受到严重损伤或反复遭到损害时, 机体细胞的自身修复系统不能及时地对损伤加以修复, 最终可导致疾病的发生, 如肿瘤、心血管疾病、关节炎、加速人的衰老等。

微核实验是一种快速检测染色体异常的试验。其实验原理是分裂间期细胞染色体受到某种损伤引起染色单体或染色体断裂, 形成无着丝点的断片或环, 从而在分裂末期形成胞浆中主核之外的一个或数个微核。刘燕群等^[6] 研究发现较高浓度的壬基酚对泥鳅具有遗传毒性, 随着壬基酚染毒浓度的升高, 泥鳅红细胞的微核率和核异常率呈升高的趋势。本次研究发现, 壬基酚对小鼠具有遗传毒性, 且随着染毒剂量的增加, 微核率呈上升的趋势。其毒性效应可能与壬基酚的活性、剂量及细胞有丝分裂的速率有关。

本研究结果显示 NP 对雌性大鼠具有明显的 DNA 损伤效应, 有关具体分子机制还有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] 覃忠书. 酚类环境雌激素的生殖毒性研究进展 [J]. 中国现代医生, 2008, 46 (13): 42-43.

- [2] 闫鹏, 郑剑, 杨元斌, 等. 壬基酚和辛基酚对小鼠遗传毒性联合作用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18 (12): 2505-2506.
- [3] 曹燕花, 王茜, 李清钊, 等. 壬基酚对雌性大鼠肝、肾及子宫的氧化损伤作用 [J]. 环境与健康杂志, 2010, 27 (3): 233-234.
- [4] 李宏辉, 金钟鸣. 壬基酚对雄性小鼠脑组织氧化损伤作用的初步研究 [J]. 宁夏医科大学学报, 2012, 34 (3): 245-247.
- [5] 楼哲丰, 金龙金, 董杰影. 单细胞凝胶电泳技术检测小鼠骨髓细胞 DNA 损伤 [J]. 温州医学院学报, 2004, 34 (3): 232-234.
- [6] 刘燕群, 陈朝霞, 胡家邵, 等. 壬基酚对泥鳅的遗传毒性效应 [J]. 环境与健康杂志, 2012, 29 (2): 187-188.

医药中间体三氟乙酰乙酸乙酯大鼠亚急性经口毒性试验

Study on subacute oral toxicity of ethyl 4, 4, 4-trifluoroacetate in rats

杨秀鸿, 吴军, 胡勃, 张丽娜

YANG Xiu-hong, WU Jun, HU Bo, ZHANG Li-na

(湖南省职业病防治院, 湖南 长沙 410007)

摘要: 按照 GB21752—2008《化学品 啮齿动物 28 天重复剂量经口毒性试验方法》, 低、中、高剂量染毒及高剂量附加组动物分别以 50、100、200 mg/kg 三氟乙酰乙酸乙酯灌胃 28 d, 对照组及对照组附加组动物给予等体积玉米油。结果显示, 高剂量组动物白细胞计数、血清总蛋白、球蛋白降低, 尿素氮明显升高, 其肝脏病变发生率增加; 中、高剂量组动物胸腺重量、胸腺/体比降低。低剂量组动物各项指标与对照组比较差异无统计学意义。高剂量附加组动物停止染毒 14 d 后, 各项指标与对照组附加组动物比较, 差异无统计学意义。提示三氟乙酰乙酸乙酯有一定的蓄积毒性作用, 毒作用部位是血液系统、肝脏、肾脏和免疫器官, 其对动物的损害在停止染毒后具有可逆性; 雌、雄大鼠亚急性经口毒性试验最大无作用剂量 (NOAEL) 为 50.0 mg/kg, 最小有作用剂量 (LOAEL) 为 100.0 mg/kg。

关键词: 三氟乙酰乙酸乙酯; 亚急性毒性; 最大无作用剂量; 最小有作用剂量

中图分类号: R994 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2013)04-0271-03

三氟乙酰乙酸乙酯又称乙基-4, 4, 4-三氟乙酯, 为 2003 年国内新合成的一种医药及植物保护中间体, 是合成农药噻草啶 (thiazopyr) 的主要原药。其作用机制为在机体代谢后生成氟乙酰辅酶 A, 与草酰乙酸形成氟柠檬酸, 阻断三羧酸循环, 破坏能量合成^[1]。国内仅王凤鸣等人对三氟乙酰乙酸乙酯的急性毒性进行了初步研究^[2], 国外未见相关报道。本研究对三氟乙酰乙酸乙酯进行了亚急性经口毒性实验研究, 旨在提供其亚急性毒性资料, 阐明其毒作用特点, 为其安全性评价和进一步的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 受试物

三氟乙酰乙酸乙酯 (含量 98%), 无色透明液体, 不溶

于水, 由江苏新仁信精细化工有限公司提供。

1.2 受试动物

SPF 级 SD 大鼠, 5 周龄, 健康。经 5 d 检疫观察合格。购自湖南斯莱克-景达实验动物有限公司 [SCXK(湘) 2009-0004]。

1.3 实验方法

1.3.1 染毒剂量和方法 将 60 只清洁级 SD 大鼠, 随机分为 6 组, 每组雌、雄各 5 只。设低、中、高三个剂量组和一个对照组。为观察毒性反应的可恢复性、持续性以及迟发性, 对照组及高剂量组各设一个附加组。雌、雄鼠按 50、100 和 200 mg/kg 的剂量进行灌胃染毒。每天 1 次, 连续染毒 28 d。附加组动物染毒 28 d 后停止给药。根据动物体重变化每周调整给药量, 给药体积为 1.0 ml/100 g。对照组及对照组附加组给予等体积玉米油, 其余处理同剂量组。

1.3.2 检查项目 每天观察并记录动物临床表现。每周测定食物消耗量 2 次, 每周称重 1 次, 计算其摄食量和食物利用率。各剂量组动物于染毒 28 d 后处理。附加组动物停止给药后继续观察 14 d 后处理。处理前取动物颈静脉血, 测定血常规和血生化指标。然后处死动物, 分离脑、胸腺、心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、睾丸 (附睾) 或卵巢、子宫、脊髓及周围神经、甲状腺、淋巴结等。其中脑、心、胸腺、肝、脾、肺、肾、睾丸、子宫用电子天秤称重, 计算脏器系数。上述标本用 10% 甲醛固定, 进行病理组织学检查。

1.3.3 统计方法 采用 SPSS 统计软件 (V13.0) 对各项检测数据作单因素方差分析。显著性水平为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 临床表现

染毒第 1 天开始, 高剂量组及其附加组动物于每天染毒 15~30 min 后出现少动、轻微抽搐等中毒症状, 30~45 min 后恢复。在整个试验期间, 对照组及其附加组和低、中剂量组动物活动及一般状况均正常。高剂量附加组动物在停止给药后 14 d 的观察期内, 活动及一般状况均正常。

2.2 摄食量及食物利用率

各剂量组雌、雄鼠每周摄食量、食物利用率及试验期间总摄食量、总食物利用率与对照组动物比较, 均无明显差异 ($P > 0.05$); 高剂量组附加组动物上述指标与对照组附加组

收稿日期: 2012-10-29; 修回日期: 2013-01-05

作者简介: 杨秀鸿 (1973—), 女, 副主任医师, 从事毒理学安全性评价工作。