

在细胞毒理学实验中,受试物与细胞接触时间的长短是影响实验结果的一个因素。本实验倒置显微镜下观察细胞未发现异常的形态学改变,碳化硅冶炼烟尘对体外培养的 NIH/3T3 细胞毒性作用较弱,受试物在不同染毒剂量下,随染毒浓度的增加、作用时间的延长,细胞相对存活率和增殖率总体呈上升趋势,提示碳化硅冶炼烟尘对 NIH/3T3 细胞的生长可能有促进作用,此为进一步揭示碳化硅冶炼烟尘对细胞毒性作用的研究提供了依据。

参考文献:

[1] Fþreland S, Bugge M D, Bakke B, et al. A novel strategy for retrospective exposure assessment in the Norwegian silicon carbide industry [J]. J Occup Environ Hyg, 2012, 9 (4): 230-241.
 [2] Bugge M D, Kjærheim K, Fþreland S, et al. Lung cancer incidence among Norwegian silicon carbide industry workers: associations with particulate exposure factors [J]. Occup Environ Med, 2012, 69 (8): 527-533.
 [3] 王心如,周宗灿,庄志雄. 毒理学实验方法与技术 [M]. 北京:

人民卫生出版社, 2007: 131-132.
 [4] Parajuli B, Shin S J, Kwon S H, et al. The synergistic apoptotic interaction of indole-3-carbinol and genistein with trail on endometrial cancer cells [J]. J Korean Med Sci, 2013, 82 (4): 527-533.
 [5] 黄正林. 碳化硅粉尘对工人健康危害调查 [J]. 化工劳动保护 (工业卫生与职业病分册), 1990, 11 (4): 162.
 [6] Romundstad P, Andersen A, Haldorsen T. Non-malignant mortality among Norwegian silicon carbide smelter workers [J]. Occup Environ Med, 2002, 59: 345-347.
 [7] Veerappan A, O'Connor N J, Brazin J, et al. Mast cells: a pivotal role in pulmonary fibrosis [J]. DNA Cell Biol, 2013, 32 (4): 206-218.
 [8] 章吉芳,郭晓芳,战秋岩. 加入 5% 石英的碳化硅粉尘对大鼠肺脏的致纤维化作用 [J]. 中国职业医学, 1985, 12 (6): 11-13.
 [9] Danielle F, Eliza S, Renato C, et al. Cellular and transcriptional responses of crassostrea gigas hemocytes exposed in vitro to brevetoxin (PbTx-2) [J]. Marine Drugs, 2012, 10: 583-597.

六苳基六氮杂异伍兹烷致大鼠急性经口毒性研究

Study on acute oral toxicity of hexabenzyl hexaazaisowurtzitane in rats

刘志永¹, 高俊宏¹, 王鸿¹, 岳红¹, 李江平¹, 刘黎阳¹, 孙成辉², 宋建伟³

LIU Zhi-yong¹, GAO Jun-hong¹, WANG Hong¹, YUE Hong¹, LI Jiang-ping¹, LIU Li-yang¹, SUN Cheng-hui², SONG Jian-wei³

(1. 兵器工业卫生研究所, 陕西 西安 710065; 2. 北京理工大学, 北京 100081; 3. 兵器工业集团公司 375 厂, 辽宁 辽阳 111000)

摘要: 为探讨六苳基六氮杂异伍兹烷 (HBIW) 对大鼠的急性经口毒性, 将 30 只成年 SPF 级 SD 大鼠按体重随机分为 2 组, 实验组 20 只, 给予 250 mg/ml 的 HBIW 混悬液; 对照组 10 只, 给予一定量的植物油。给药后观察动物一般表现、中毒症状和死亡情况, 隔天记录动物体重, 连续观察 14 d。实验结束后对其心、肝、脾、肺、肾等脏器进行病理检查。实验组和对照组在观察期内均未出现中毒症状和死亡, 仅实验组动物体重增长速度略低于对照组。病理检查结果显示实验组大鼠出现中度肝细胞肿胀, 其它脏器均无明显病理改变。提示 HBIW 的大鼠 LD₅₀ > 5000 mg/kg, 属于微毒物质。

关键词: 六苳基六氮杂异伍兹烷 (HBIW); 急性经口毒性; 重复测量方差分析

中图分类号: R994.6

文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2013)06-0434-03

六硝基六氮杂异伍兹烷 (CL-20) 是一种具有笼状结构的多环硝胺化合物, 于 1987 年由美国海军武器中心 (NWC) 的 Nielsen 等率先合成^[1]。其化学结构类似于某些单环硝胺类化合物, 但其能量和密度比其它单环硝胺类化合物高得多, 是

迄今为止研制出的综合性能最好的单质炸药。国内外研究机构对 CL-20 的合成已达到一定规模, 而六苳基六氮杂异伍兹烷 (HBIW) 作为其合成过程中必不可少的一种中间产物^[2], 有必要对其急性毒性进行研究, 为科研和生产人员的职业安全防护提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 受试物、主要仪器与试剂

六苳基六氮杂异伍兹烷为白色结晶粉末状固体, 样品来自于兵器工业集团 375 厂。溶剂选用金龙鱼牌玉米胚芽油。

JJ2000 天平 (常熟双杰测试仪器厂), MP1002 天平 (上海恒平科学仪器有限公司), TS-42U 生物组织自动脱水机、BM-VIII 生物组织包埋机和 CS-VI 摊片烤片机均产自孝感市宏业医用仪器有限公司, HM325 切片机 (美国 Thermo 公司), CX-21 显微镜 (奥林巴斯)。

二甲苯、95% 乙醇、无水乙醇、冰醋酸和盐酸均产自西安化学试剂厂, 苏木色精和伊红均产自上海蓝季科技发展有限公司。

HBIW 染毒液配制方法: 准确称取适量 HBIW 药品, 加入少量植物油研碎后, 再加入一定量植物油配制成 250 mg/ml 的混悬液。

苏木素配制方法: 准确称取适量苏木色精、硫酸铝钾和红色氧化汞, 量取一定量无水乙醇、冰醋酸和蒸馏水, 配制成 Harris 苏木素溶液。

收稿日期: 2013-03-20

作者简介: 刘志永 (1985—), 男, 硕士, 医师, 主要从事生物效应与毒理学研究工作。

盐酸配制方法: 准确量取适量盐酸, 加入蒸馏水, 配制成 1% 盐酸溶液。

伊红液配制方法: 准确称取适量伊红, 加入蒸馏水, 配制成 1% 伊红液。

1.2 实验动物

选择健康 SPF 级成年 SD 大鼠 30 只, 雌雄各半, 体重 180 ~ 220 g, 由西安交通大学实验动物中心提供, 合格证号为 XK (陕) 2007-001。分笼饲养于空调室内, 室温 (23 ± 3) °C, 相对湿度 55% ~ 65%, 每天光照 12 h, 灭菌全价营养颗粒饲料喂食, 自由饮用自来水。

1.3 染毒与观察

根据预实验结果, 采用限量法进行实验, 实验组染毒剂量为 5000 mg/kg。取 30 只 SD 大鼠, 雌雄各半, 给药前适应性饲养 3 d, 实验前 24 h 禁食但不禁水。将大鼠随机分为两组, 实验组 20 只, 给予 250 mg/ml 的 HBIW 混悬液灌胃, 对照组 10 只, 按照体重给予一定量植物油灌胃。单次给药 <

1.0 ml/100 g, 6 h 内分 2 次给药。观察动物一般表现、中毒症状和死亡情况, 隔天记录动物体重, 连续观察 14 d。实验结束后对其心、肝、脾、肺、肾等脏器进行组织病理学检查。

1.4 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。定量资料统计描述采用 $\bar{x} \pm s$, 两组间体重随时间变化趋势采用重复测量方差分析。若不满足球形对称性检验, 则对自由度进行 Greenhouse-Geisser 校正。

2 结果

2.1 体重变化

隔天记录一次大鼠体重, 结果见表 1。对两组大鼠体重进行重复测量方差分析。由表 2 可见, 两组之间差异尚不能认为有统计学意义 ($P > 0.05$), 但时间效应以及时间和分组的交互作用均有统计学意义, 表明两组大鼠体重随染毒时间延长呈上升趋势 ($P < 0.05$), 而各组随时间的增长速度则不同 ($P < 0.05$)。实验组大鼠体重增长速度略低于对照组。

表 1 大鼠体重变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 9 天	第 11 天	第 14 天
实验组	20	212.24 ± 30.65	222.35 ± 34.24	228.49 ± 37.92	225.55 ± 35.11	244.58 ± 40.18	253.65 ± 42.91	262.44 ± 47.81
对照组	10	193.08 ± 19.58	221.83 ± 21.34	230.64 ± 24.96	236.64 ± 28.99	248.11 ± 32.62	260.73 ± 39.16	270.15 ± 39.04

表 2 大鼠体重变化重复测量方差分析

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
分组	134.75	1	134.75	0.016	0.901
时间*	75 807.79	2.17	34 871.17	124.123	<0.001
分组 × 时间*	3 980.06	2.17	1 830.80	6.517	0.002

注: * 经球形对称性检验, $P < 0.05$, 采用 Greenhouse-Geisser 法校正自由度。

2.2 急性毒性结果

实验组和对照组在染毒后 6 h 内均出现少动、少食等一般行为改变。染毒后 14 d 内未观察到中毒症状和死亡等毒性效应。根据化学品毒性分级标准, HBIW 的大鼠 $LD_{50} > 5000$ mg/kg, 属于微毒。

2.3 病理检查结果

观察结束后处死实验动物, 分别对其心、肝、脾、肺、肾等脏器进行组织病理学检查, 实验组大鼠出现中度肝细胞肿胀 (图 1), 而对照组大鼠以及实验组大鼠其他脏器均未出现明显病理改变。

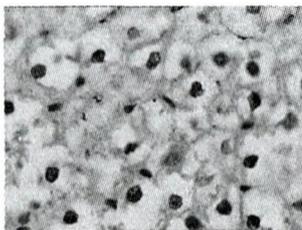


图 1 实验组大鼠肝细胞肿胀病理结果 (HE, ×400)

3 讨论

国内外关于 CL-20 的毒性研究主要以其成品作为研究对象, 尤以在生态学研究领域取得较大突破。有研究者发现 0.02 mg/

kg 的 CL-20 就可造成土壤中蚯蚓密度大量减少, 较 RDX 毒性更大^[3]。然而通过对 CL-20 的降解性能研究发现, 其在土壤中可被微生物、光、Fe⁰ 等降解为 CO₂ 等对人体健康无害的产物^[4], 因此对其危险度评价应结合两方面因素综合考虑。2005 年 Bar-dai 开展了 CL-20 对鹌鹑的经口急性和亚急性毒性研究, 给鹌鹑喂食不同浓度的 CL-20, 发现前期动物体重与染毒量呈明显剂量-效应关系, 且肝脏脏器系数随剂量呈一定变化趋势^[5]。国外某研究机构发布的关于 CL-20 的危险度评价技术报告指出, 目前尚缺乏人类和哺乳动物的毒理学相关资料^[6]。

本研究对 CL-20 生产过程的中间物质 HBIW 进行了急性经口毒性研究, 该物质对大鼠体重增长速度有一定影响, 可能会影响其生长发育。病理结果也显示实验组大鼠与对照组相比出现明显肝细胞肿胀, 表明该物质可能具有肝脏毒性。本研究所采用的是最经典的毒理学评价方法, 所得结论较为准确地反映受试物的急性毒性。然而, 由于人体在实际接触过程中既包含消化道, 还存在皮肤和呼吸道吸入等多种接触途径, 并且实验动物与人体存在种属差异, 不能将研究结果简单外推, 还应结合职业流行病学调查才能得出可靠结论。此外, 本次仅为急性毒性研究, 若对 HBIW 的健康危险度进行评价, 还需进一步开展蓄积毒性和致突变性等相关研究。

参考文献:

- [1] Nielsen A T, Chan M L, Kraeutle C K, et al. Polynitropolyazacaged explosives, Part 7, NWC TP7200 [R]. China Lake: Naval Weapons Center, 1989.
- [2] 宋振伟, 李笑江. 高能密度化合物 HNIW 的最新研究进展及其应用前景 [J]. 化学推进剂与高分子材料, 2011, 9 (1): 40-45.
- [3] Robidoux P Y, Sunahara G I, Savard K, et al. Acute and chronic toxicity of the new explosive CL-20 to the earthworm (Eisenia andrei)

- exposed to amended natural soils [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2004, 23: 1026-1034.
- [4] Trott S, Nishino S F, Hawari J, *et al.* Biodegradation of the nitramine explosive CL-20 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 1871-1874.
- [5] Bardai G, Sunahara G, Spear P, *et al.* Effects of dietary administration of CL-20 on Japanese quail *Coturnix coturnix japonica* [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2005, 49: 215-222.
- [6] Ivan Boyer, John K M, Rebecca E W, *et al.* Evaluation of the relative risk of China Lake 20 (CL-20) based on current toxicity, fate and transport, and other technical information [R]. *Noblis Technical Report*, 2007.

着色性干皮病基因 D 多态性与二甲基甲酰胺致肝功能损伤易感性的关系

Relationship between polymorphisms of gene *XPD* and hepatic susceptibility to dimethylformamide toxicity

吴京颖¹, 许旭艳¹, 刘祥铨¹, 何颖荣¹, 张伟¹, 刘合焯²

WU Jing-ying¹, XU Xu-yan¹, LIU Xiang-quan¹, HE Ying-rong¹, ZHANG Wei¹, LIU He-kun²

(1. 福州市疾病预防控制中心, 福建 福州 350004; 2. 福建医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学系, 福建 福州 350004)

摘要: 采用随机整群抽样方法抽取 296 名二甲基甲酰胺作业工人为研究对象, 采集外周静脉血样品, 检测血 ALT、AST、 γ -GT 水平, 采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析技术 (PCR-RFLP) 检测 *XPD* 基因 Asp312Asn、Lys751Gln 多态性, 分析二甲基甲酰胺作业工人不同基因型与二甲基甲酰胺肝毒性易感性的关系。结果显示, *XPD*-312GG/GA+AA、*XPD*-751AA/AC+CC 基因型组工人血 ALT、AST、 γ -GT 水平比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 肝功能指标异常以 ALT ≥ 50 IU/L、AST ≥ 40 IU/L、 γ -GT ≥ 54 IU/L 一项或一项以上为界, 经 χ^2 检验、logistic 回归分析显示, 不同基因型组工人肝功能异常率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 校正 OR_j 分别为 0.70、1.03, 95% *CI* 分别为 0.38 ~ 1.41、0.51 ~ 2.05。说明 *XPD* 基因 Asp312Asn 和 Lys751Gln 多态性可能与二甲基甲酰胺肝毒性易感性无关。

关键词: *XPD* 基因; 多态性; 二甲基甲酰胺; 肝毒性; 易感性

中图分类号: R994.6 文献标识码: B
文章编号: 1002-221X(2013)06-0436-03

二甲基甲酰胺 (*N,N*-dimethylformamide, DMF) 会引起职业接触者的肝功能损害^[1]。随着职业接触二甲基甲酰胺人员的日益增多, 加强二甲基甲酰胺危害的防治研究日益引起职业卫生工作者重视。本研究应用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析技术 (PCR-RFLP) 检测人类着色性干皮病基因 D (xeroderma pigmentosum complementary group D, *XPD*) Asp312Asn、Lys751Gln 单核苷酸多态性, 分析其在二甲基甲酰胺作业人群中的分布情况, 探讨二甲基甲酰胺作业工人不同基因型与二甲基甲酰胺肝毒性易感性的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收稿日期: 2013-02-04; 修回日期: 2013-04-20
基金项目: 福建省卫生厅青年科研课题 (2010-2-82)
作者简介: 吴京颖 (1975-), 女, 主治医师, 主要从事职业病防治工作。

采用随机整群抽样方法, 选择福州市 3 家人造革生产企业 296 名 (男 94 名、女 202 名) 二甲基甲酰胺作业人员为研究对象, 年龄 18 ~ 39 (23.7 \pm 3.2) 岁; 工龄 1 ~ 12 (3.6 \pm 1.9) 年。以肝功能指标为界, 分为肝功能异常组 (78 人) 和肝功能正常组 (对照组, 218 人)。

1.2 血样采集

采静脉血 6 ml, 2 ml 存于装有乙二胺四乙酸 (EDTA) 的抗凝管中, -20 $^{\circ}$ C 冰箱冻存, 用于基因多态性检测分析; 4 ml 血样装于促凝管 (带分离胶) 用于肝功能检验, 在 24 h 内完成所有待检项目。

1.3 肝功能检测

用速率法检测丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT), 分析仪器为贝克曼 CX5 全自动生化分析仪 (美国贝克曼库尔特公司)。每项肝功能指标正常参考值为 ALT 5 ~ 50 IU/L, AST 4 ~ 40 IU/L, γ -GT 0 ~ 54 IU/L, 其中任一项指标高于参考值即定义为异常。

1.4 *XPD* 基因型测定

采用 TIANamp Blood DNA Kit 血液基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 提取基因组 DNA, 根据 GenBank 中 *XPD* 基因的序列用 Primer Premier 5.0 软件自行设计引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成, PCR 反应总体积 25 μ l, 含 2 \times Taq PCR MasterMix 12.5 μ l、上游引物 (10 μ mol/L) 1 μ l、下游引物 (10 μ mol/L) 1 μ l、模板 DNA 2 μ l, 加双蒸水至总体积, 扩增参数: 冷启动, 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 38 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。酶切反应总体积 15 μ l, 其中含 PCR 产物 10 μ l, 内切酶 1.0 μ l (Sty I 10 U 或 Pst I 10 U), 10 \times Buffer 2 μ l, 加双蒸水至总体积, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h 使样品完全酶切。扩增产物酶切片段用 3% 琼脂糖凝胶电泳分离, 核酸染料 GoldView 染色, 用 Gel Doc 2000 凝胶成像分析系统观察确定基因型: 野生纯合型 *XPD*-312GG 为 507 bp 和 244 bp, 杂合型 *XPD*-312GA 为 507 bp、474 bp、244 bp 和 33 bp, 突变纯合型 *XPD*-312AA 为 474 bp、244 bp 和 33 bp; 野生纯合型 *XPD*-751AA 为 290 bp 和 146 bp, 杂合型 *XPD*-751AC 为 290 bp、277 bp、146 bp 和