

不同价格氧化型染发剂对小鼠睾丸过氧化损伤的影响

Effects of oxidized hair dyes with different prices on testicular peroxidative injury in mice

龙苗, 邓小雪, 严秋月, 夏丽莉, 郭军, 杨天宇, 刘振中

(川北医学院预防医学系, 四川 南充 637100)

摘要: 将 40 只小鼠按体重顺序随机分为低价格 (0.2 元/g)、中价格 (0.3 元/g)、高价格 (0.4 元/g) 染发剂组和凡士林对照组, 每组 10 只。每周经皮给药 5 d, 连续 3 周, 实验结束后, 测定小鼠精子畸形率、精子数量与睾丸超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 水平。与对照组相比, 低价格组睾丸 MDA 含量、SOD 活力及 GSH 含量均显著升高 ($P < 0.05$); 高价格组精子畸形率显著高于对照组 ($P < 0.05$)。提示氧化型染发剂对小鼠睾丸可能具有一定的过氧化损伤作用, 且可导致小鼠精子畸形率升高。

关键词: 氧化型染发剂; 小鼠; 睾丸; 精子畸形率; 过氧化损伤

中图分类号: R-332 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2015)03-0198-03

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyx.2015.03.014

随着人们审美水平的提高, 染发已成为一种时尚。国内外对氧化型染发剂主要成分对苯二胺 (PPD) 与双氧水 (H_2O_2) 及其二者混合物的致突变作用报道较多^[1,2]。但氧化型染发剂对小鼠睾丸过氧化损伤的研究尚未见报道。为了进一步探讨染发剂对小鼠生殖系统的影响, 我们就染发剂对睾丸过氧化损伤和精子致畸作用进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验动物与分组 选取 SPF 级成年健康昆明种小鼠 40 只, 雄性, 体重 25~30g, 川北医学院动物实验中心提供, 动物许可证号 SYXK (川) 2008—076, 按照体重顺序随机分为低价格染发剂组、中价格染发剂组、高价格染发剂组和对照组, 每组 10 只。

1.1.2 试剂与仪器 氧化型染发剂由广州市某化妆品厂生产, 分为低价格染发剂 (0.2 元/g)、中价格染发剂 (0.3 元/g)、高价格染发剂 (0.4 元/g), 批号: 20130605, 主要成分对苯二胺、间苯二酚、氨、双氧水; 白凡士林, 南昌白云药业有限公司; 谷胱甘肽 (GSH) 测试盒、总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 测试盒、丙二醛 (MDA) 测试盒, 南京建成科技有限公司。可见光分光光度计 (WFJ-7200 型), 龙尼柯上海仪器有限公司; 恒温三用水浴箱 (HH-W420 型), 金坛市科析仪器有限公司; 显微镜 (XSP-C204 型), 重庆光电有限公司; 离心机 (Lg13 型), 北京雷勃尔离心机有限公司; 血细胞计数板 (简称血球计数板), 上海市求精生化试剂仪器有限

公司。

1.2 方法与指标测定

1.2.1 给药及解剖方法 选取市面上 3 种不同价格的染发剂作为实验材料, 白凡士林作为对照材料。将小鼠背部剃毛, 面积为 $2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ 。染发剂组的小鼠均以 $5\text{ mg}/(\text{g} \cdot \text{d})$ 的实验剂量经皮给药, 对照组用白凡士林 $5\text{ mg}/(\text{g} \cdot \text{d})$ 作为阴性对照, 每周给药 5 d, 连续 3 周。实验结束后的第 1 天用颈椎脱臼法处死小鼠, 取出主要生殖脏器 (睾丸、精囊前列腺), 除去其表面血渍并称重, 计算脏器系数 [脏器系数 (%) = 脏器湿重 (g) / 体重 (g) $\times 100\%$]。双侧附睾用于检测精子畸形率与精子计数。

1.2.2 抗氧化指标测定 将睾丸与生理盐水制得 10% 的组织匀浆, 静置 15 min, 2500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活力, 二硫代二硝基苯甲酸 (DTNB) 与巯基化合物反应进行定量测定进而得出 GSH 含量, TBA 法 (过氧化脂质降解产物中的丙二醛与硫代巴比妥酸缩合, 形成红色产物, 在 532 nm 处有最大吸收峰) 测定组织中 MDA 的含量。

1.2.3 精子畸形率测定 将双侧附睾放于装 1 ml 生理盐水的锥形尖管中, 置于 37 °C 的恒温水浴箱中恒温 20 min, 使更多的精子游离出来。取少量精液于干净的载玻片的一侧, 轻推, 待载玻片自然干燥后直接镜检。每只小鼠在 10 $\times$ 40 倍显微镜下观察结构完整的 1000 个精子, 计数其中畸形精子。畸形类型主要为不定型、胖头、小头、双尾、双头、尾折叠、无尾精子、无头精子或完全重叠的精子均不计数。精子畸形率 (%) = 精子畸形数 / 观察精子总数 (1000 个) $\times 100\%$

1.2.4 精子计数方法 移液枪取 10 μl 精液, 拭净枪头, 将枪头轻轻置于盖玻片边缘, 让精液悬心平稳缓慢流出, 通过毛细管作用进入计数室内。静置 5 min 后小心将计数板放于显微镜载物台上, 待精子不再浮动后计数。在低倍镜下找到计数室的中央大方格后, 在高倍镜 (40 $\times$ 物镜) 下计左上、左下、中央、右上、右下大方格的精子数, 然后求得每大方格的均数, 再求出每毫升精液中精子数。精子计数 (个/ml) = $N (1/400\text{ mm}^2 \times 0.10\text{ mm} \times 16 \times 10^{-3})$, N 为每大方格精子均数。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 系统软件包, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 总体差异用方差分析, 组间比较用 LSD 法, 检验标准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 动物一般情况

所有受试动物在整个实验期间精神活动状态无明显差异, 体重均有增长, 但给药组小鼠体重增长幅度低于对照组, 差

收稿日期: 2014-10-22; **修回日期:** 2015-03-20

作者简介: 龙苗 (1992—), 女, 2011 级本科生。

通讯作者: 刘振中 (1981—), 讲师, 主要从事毒理学教学和科研工作, E-mail: liuzhenzhong2004@163.com。

异无统计学意义 ($P>0.05$)，染发剂接触部位偶见小结痂。

2.2 不同价格氧化型染发剂对小鼠主要生殖脏器系数影响

低、高价格组小鼠睾丸脏器系数均显著低于对照组，且差异有统计学意义 ($P<0.05$)；中价格组与对照组小鼠睾丸

表 1 不同价格氧化型染发剂对小鼠主要生殖脏器系数影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	睾丸		精囊前列腺	
		重量 (g)	脏器系数 (%)	重量 (g)	脏器系数 (%)
低价格染发剂组	10	0.25±0.03	0.60±0.08 *	0.21±0.06	0.52±0.12 *
中价格染发剂组	10	0.24±0.02	0.67±0.04	0.18±0.10	0.45±0.22 *
高价格染发剂组	10	0.21±0.04	0.56±0.10 *	0.18±0.07	0.42±0.14 *
对照组	10	0.26±0.06	0.69±0.11	0.29±0.08	0.76±0.16

注：与对照组相比，* $P<0.05$ 。

2.3 不同价格氧化型染发剂对小鼠睾丸过氧化损伤作用

低价格组小鼠睾丸的 MDA、SOD、GSH 水平较对照组显著升高 ($P<0.05$)，但中、高价格组与对照组的 MDA、SOD、GSH 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 不同价格氧化型染发剂对小鼠睾丸的过氧化损伤 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MDA	SOD	GSH
		(nmol/mg prot)	(U/mg prot)	(mg/g prot)
低价格染发剂组	10	30.43±15.73 *	66.35±14.42 *	233.42±38.80 *
中价格染发剂组	10	15.64±5.81	57.36±12.01	196.00±24.15
高价格染发剂组	10	10.41±3.59	58.98±6.52	204.84±21.69
对照组	10	13.41±5.53	53.84±10.60	201.17±12.52

注：与对照组相比，* $P<0.05$ 。

2.4 精子畸形率与精子计数情况

低、中价格组的精子畸形率均高于对照组，差异无统计学意义 ($P>0.05$)；高价格组精子畸形率显著高于对照组，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。低、中、高价格组的精子数量均小于对照组，差异无统计学意义 ($P>0.05$)，见表 3。

表 3 不同价格氧化型染发剂对精子畸形率与计数的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	精子畸形率 (%)	精子计数 ($\times 10^6$ /ml)
低价格染发剂组	10	3.49±1.10	8.34±2.68
中价格染发剂组	10	3.59±1.10	11.89±4.31
高价格染发剂组	10	4.11±1.07 *	9.90±2.83
对照组	10	3.18±0.70	12.01±6.42

注：与对照组相比，* $P<0.05$ 。

3 讨论

随着染发剂的广泛使用，近年来关于染发剂的研究报道较多。关于染发剂对生殖系统的损伤，有研究者发现雌性豚鼠输卵管病理切片观察提示 50% 与 100% 浓度染发剂组均存在部分输卵管鳞状上皮化生^[3]，另有研究表明经氧化型染发剂染毒可以使小鼠生殖细胞以及仓鼠卵巢细胞染色体畸变率增高^[4,5]。王丽丽等人^[6]也发现长期使用氧化型染发剂可能导致小鼠精子畸形升高，且在人群相关流行病学调查中发现卵巢癌和膀胱癌发生危险性与染发剂的使用有关联^[7]。

MDA 不仅反映自由基产生的多少，还可以衡量机体脂质过氧化和氧化应激的能力^[8]，从而间接反映细胞损伤的程度。SOD 是自由基的有效清除剂，能催化过氧自由基分解形成过

脏器系数差异无统计学意义 ($P>0.05$)。低、中、高价格组精囊前列腺脏器系数均低于对照组，且差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

氧化氢，使细胞免受氧自由基的氧化损伤，同时也反映了机体抗氧化能力与机体氧化应激水平^[9-11]。GSH 是体内重要的非酶性抗氧化物质，GSH 的多少是衡量机体抗氧化能力大小的重要标志^[12]。本次实验结果显示，低价格组 MDA 含量显著高于对照组，说明染发剂经皮吸收后可能在睾丸组织产生 MDA 的堆积，继而反映出染发剂给药后的过氧化反应造成小鼠睾丸组织的损伤；从脏器系数来看，低、中、高价格组小鼠的睾丸、精囊前列腺脏器系数均显著小于对照组，说明染发剂可能有致小鼠睾丸和精囊前列腺萎缩作用。但三个价格组 SOD 水平、GSH 含量高于对照组，机体此时可能处于自由基产生过多激增时，在自由基的诱导及机体代偿应激下，细胞或机体会诱导性地增强抗氧化能力，出现一过性 SOD、GSH 水平增高现象。这可能是导致小鼠生殖系统损伤的机制之一，尚需进一步探讨。

精子数量与精子畸形率是反映精液质量的重要指标，精子数量减少与精子畸形率增加是影响雄性小鼠生殖功能的重要因素之一。小鼠精子畸形试验是我国对食品、药品、化妆品等进行雄性生殖细胞遗传毒性的安全性评价标准方法^[13]。本次实验 3 个染发剂组的小鼠畸形率均高于对照组，这与国内同行的研究结果一致^[6]。由于实验室仪器设备条件有限，染发剂中主要成分对苯二胺、间苯二酚含量未测。本实验中高价格组的精子畸形率最高，一定程度上说明价格高的染发剂不一定毒性就小；染发剂对精子数量影响的差异不明显，这可能与染毒时间较短没有达到小鼠生精周期有关。

综上所述，氧化型染发剂的多次使用可能对小鼠睾丸有过氧化损伤作用，使小鼠生殖器官发生萎缩，增加小鼠精子畸形率，建议相关部门加强对染发剂使用安全的监管，同时建议染发者尤其是男性更要慎重。

[本文为川北医学院校重点培育项目(CBY12-A-ZP11)]

参考文献：

[1] 庄宛, 王鹭骁, 孙婷, 等. 某进口染发剂的致突变作用研究 [J]. 海峡预防医学杂志, 2011, 17 (5): 41-43.

[2] Zhang Yawei, Kathryn J Hughes, Shelia Hoar Z, et al. Genetic variations in xenobiotic metabolic pathway genes, personal hair dye Use, and risk of non-hodgkin lymphoma [J]. American Journal of Epidemiology, 2009, 170 (10): 1222-1230.

[3] 羽杰, 陈丽, 苏黠卫, 等. 氧化型染发剂对豚鼠输卵管的作用

- [J]. 泸州医学院学报, 2007, 30 (5): 373-375.
- [4] 熊习昆, 蔡玟, 谢晓萍, 等. 染发剂对小鼠胚胎毒性效应的观察 [J]. 广东卫生防疫, 1998, 24 (1): 23.
- [5] 王翀, 张宏伟, 李立, 等. 12 种染发剂对中国仓鼠卵巢细胞的染色体畸变试验 [J]. 毒理学杂志, 2011, 25 (1): 74-76.
- [6] 王丽丽, 郭营, 周彦生, 等. 氧化型染发剂对小鼠精子畸形和骨髓细胞微核的影响 [J]. 新乡医学院学报, 2010, 27 (6): 564-566.
- [7] 常春康, 张曦, 李晓, 等. 染发剂与肿瘤发生的人群流行病学 [J]. 诊断学理论与实践, 2011, 10 (4): 384-387.
- [8] Kulkarni R, Deshpande A, Saxena R, *et al.* A study of serum malondialdehyde and cytokine in tuberculosis patients [J]. J Clin Diagn Res, 2013, 7 (10): 2140-2142.

- [9] 刘小兵, 朴建华. 生物活性物质的抗氧化能力评价方法及其研究进展 [J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20 (5): 440-444.
- [10] 刘振中, 冯华强, 周政华, 等. 三甲基氯化锡致中毒大鼠血清、肾脏和肝脏过氧化损伤研究 [J]. 川北医学院学报, 2013, 28 (5): 468-471.
- [11] Elza Dvan D, Lu Zhongbing, Xu Xin. Extracellular SOD protects the heart against oxidative stress and hypertrophy after myocardial infarction [J]. Free Radic Biol Med, 2008, 44 (7): 1305-1313.
- [12] 季宇彬, 蒋晖, 郎朗, 等. 甲苯二异氰酸酯致小鼠睾丸脂质过氧化损伤及标志酶活力的变化 [J]. 毒理学杂志, 2005, 19 (3): 225-226.
- [13] GB 15193.7—2003, 小鼠精子畸形试验 [S].

六苄基六氮杂异伍兹烷大鼠 28 天重复剂量经口毒性

Repeated dose 28-days oral toxicity of hexabenzylhexaazaisowurtzitane in rats

刘志永¹, 高俊宏¹, 王鸿¹, 卢青¹, 岳红¹, 张盼红¹, 孙成辉², 宋建伟³

(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. 辽宁庆阳化学工业公司, 辽宁 辽阳 111000)

摘要: 将 40 只成年 SPF 级 SD 大鼠按体重随机分为 4 组, 分别给予淀粉溶液及 250 mg/kg、500 mg/kg 和 1000 mg/kg 的六苄基六氮杂异伍兹烷 (HBIW) 混悬液, 连续给药 28 d, 进行重复剂量经口毒性试验。结果实验组和对照组大鼠在观察期内均未出现中毒症状和死亡, 四组间二氧化碳 (CO₂)、平均血小板体积 (MPV)、血小板分布宽度 (PDW)、凝血酶原时间 (PT) 和国际标准化比值 (INR) 差异均有统计学意义, 且实验组均高于对照组。组织病理学检查未发现明显改变。提示 HBIW 对大鼠凝血系统可能有损害作用。

关键词: 六苄基六氮杂异伍兹烷 (HBIW); CL-20 中间体; 亚急性经口毒性试验

中图分类号: R-332 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2015)03-0200-03

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyx.2015.03.015

六苄基六氮杂异伍兹烷 (hexabenzylhexaazaisowurtzitane, HBIW) 是合成新型含能材料 CL-20 的中间体物质, 是一种具有笼状结构的化合物^[1]。CL-20 具有良好的爆炸性能, 在军事和民用领域均有较好的应用前景, 目前许多国家都已具备大规模的生产能力, 北京理工大学现已研制出多种合成方法, 并开始进行批量生产的研发工作^[2]。由于 HBIW 为粉末状晶体, 主要以粉尘形式大量存在于生产车间空气中, 为了解长期接触该物质对科研生产人员的职业健康危害情况, 有必要对其蓄积毒性进行研究, 为接触人员的防护措施和进一步批量生产提供科学依据。

1 材料与方法

收稿日期: 2014-03-16; **修回日期:** 2015-03-23

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

1.1 受试物、主要仪器与试剂

HBIW, 白色或略带黄色结晶粉末, 样品来自于辽宁庆阳化学工业公司, 溶剂采用 3% 淀粉溶液。

1.2 实验动物

SPF 级成年 SD 大鼠 40 只, 雌雄各半, 体重 150 g 左右, 由西安交通大学实验动物中心提供, 合格证号: XK (陕) 2007—001。分笼饲养于 SPF 级动物房内, 室温 (23±3)℃, 相对湿度 55%~65%, 每天光照 12 h, 灭菌全价营养颗粒饲料喂食, 自由饮用灭菌饮用水。

1.3 染毒与观察

根据预实验结果, 染毒剂量分别设为 1000 mg/kg、500 mg/kg 和 250 mg/kg。取 40 只 SD 大鼠, 雌雄各半, 给药前适应性饲养 3 d, 试验前 24 h 禁食但不禁水。将大鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 雌雄各半, 3 个染毒组给予相应剂量的 HBIW 混悬液灌胃, 对照组给予 3% 淀粉溶液灌胃。每天给药 1 次, 连续给药 28 d。

每天观察动物的一般表现, 每周测量动物体重和饲料消耗量。实验结束后采用 10% 水合氯醛麻醉动物, 腹主动脉采血处死。3000 r/min 离心血液 10 min 后取血清进行生化指标分析; 凝血指标测试采用枸橼酸钠抗凝管 3500 r/min 离心 10 min 后进行分析, 血液指标测试则采用 EDTA-K2 抗凝管进行全血分析。动物处死后摘取其心、肝、脾、肾、脑、睾丸、附睾 (雌性取子宫)、胸腺进行称重, 高剂量组和对照组的组织放入 10% 甲醛溶液中固定, 2 周后用蜡块包埋组织, 切片后进行 HE 染色, 镜下观察组织病变情况。

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 $\bar{x} \pm s$ 。两组间比较采用 *t* 检验, 体重随时间变化趋势采用