

接触 2-乙氧基乙醇对 LDH-C₄ 活性影响与精子毒性的关系*

高 星 陈冰铨 张 鹏 申玉英

提 要 为研究 EE 精子毒性及生物效应标志物, 对 PS 版作业男工 LDH-C₄ 活性/精子毒性进行调查, 同时对小鼠附睾组织匀浆 LDH-C₄ 活性测定。结果表明接触 EE 在 77mg/m³ 以上男工精液 LDH-C₄ 活性受到抑制。随着接触水平增加, LDH-C₄ 活性下降越明显, 呈明显的剂量-反应关系。在 243mg/kg 剂量以上, 小鼠 LDH-C₄ 活性也显著下降, 亦有相同的规律, 提示 LDH-C₄ 活性降低可以作为精子毒效应评价指标。

关键词 2-乙氧基乙醇 LDH-C₄ 活性 精子毒性

Effects of 2-ethoxyethanol on activity of LDH-C₄ and relationship between its exposure and sperm toxicity Gao Xing, Chen Bingquan, Zhang Peng, et al. Beijing municipal institute of labor hygiene and occupational diseases 100020

Abstract Activity of LDH-C₄ was determined for male workers exposed to 2-ethoxyethanol (EE) in a PS plate manufacturing workshop to study its sperm toxicity and biological effect markers, as well as activity of LDH-C₄ in epididymis homogenate of mice. Results showed that activity of LDH-C₄ in the sperm of workers exposed to EE of more than 77 mg/m³ was inhibited, and it reduced gradually with increase of exposure level, presenting a dose-response relationship. Activity of LDH-C₄ in mice epididymis also decreased significantly with exposure to more than 243 mg/m³ of EE, presenting a same law as in the exposed workers. It suggests that decrease of activity of LDH-C₄ can be regarded as a biological marker in evaluation of sperm toxicity.

Key words 2-Ethoxyethanol Activity of LDH-C₄ Sperm toxicity

2-乙氧基乙醇 (2-Ethoxyethanol, EE), 别名乙烯乙二醇独乙醚 (EGEE), 化学结构式为 CH₂—CH₂—O—(CH₂)₂—OH。我国于 70 年代中期开始从国外引进该种产品及生产技术与工艺, 用于合成感光液, 生产感光 (PS) 版。有研究认为, EE 具有精子毒性^[1]。我国此方面的研究尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 调查对象

分别在甲、乙、丙三个工厂 PS 版车间选择工龄在两年以上, 年龄在 45 岁以下的男工作为接触组。另以该厂不接触任何毒物的从事后勤供应和管理的男工作人员作为对照组。两

组工人在年龄、接触工龄、烟酒嗜好、药物、辐射、遗传性疾病等方面无显著性差异。

1.2 作业环境监测方法

选用 100mg 活性炭管和 TMP-1500 型个体采样器, 用 GC-9A 型气相色谱仪 (日本岛津) 进行分析。

1.3 精子检查方法

用按摩法采集精液标本。全份精液置于清洁干燥的专用塑料管中, 放置在 37℃ 水浴中, 待精液完全液化后再进行精液常规分析^[2]。检查指标包括: 精子密度、精子总数、精子活动力、精子存活率和精子畸形。

1.4 男工精液 LDH-C₄ (乳酸脱氢酶-C₄) 活性测定方法

试剂: (1) 100mmol/L 缓冲液 (pH8.9); (2) 0.23mmol/L NADH 溶液; (3) 10mmol/L

* 作者单位: 100020 北京市劳动卫生职业病防治研究所

2-酮基乙酸溶液; (4) 1mmol/L 丙酮酸溶液。

操作程序: 将新鲜液化的精液置-20℃冰箱中冷冻1小时, 取出融化, 再重复冻融1次, 使精子裂释出 LDH-C₄。取融化后的精液, 以 12 000r/min 离心10分钟, 留取上清液待测。

分光光度法测定 LDH-C₄活性: 在杯内分别加入 NADH 溶液与 2-酮基乙酸溶液各 1.5ml, 于 37℃ 预温 5 分钟, 加入待测上清液 10μl, 记录反应液在 340nm 吸光度数值。精确地于 1、2、3 分钟时, 分别读取吸光度, 计算每分钟平均吸光度变化 (ΔA/min):

$$\text{LDH-C}_4 (\text{U/L}) = \Delta A / \text{min} \times \frac{2.55}{0.05 \times 6.3} \times 1000$$

1.5 小鼠附睾组织匀浆 LDH-C₄活性测定方法

1.5.1 动物选择 由军事医学科学院实验动物中心提供的昆明种雄性小白鼠 50 只, 观察 1 周, 体重 18~22g。分组: 将受试实验动物分为实验组和对照组。对照组分为阳性对照组 (环磷酰胺 50mg/kg) 和阴性对照组 (生理盐水); 实验组分为高 (485mg/kg)、中 (243mg/kg)、低 (122mg/kg) 三个亚浓度组。每组动物 10 只, 共 50 只。

1.5.2 染毒方式与时间 按高、中、低浓度剂量每天腹腔注射 1 次, 连续 5 天。1 个月后, 将小鼠脊椎脱臼处死, 取一侧附睾。

1.5.3 LDH-C₄测定前处理 将附睾剪碎后, 加 2ml 生理盐水, 混匀离心, 弃去上清液。用沉淀物再加生理盐水至 2ml 混匀, 作为测定用标本。测定时取标本 0.15 毫升进样分析。

2 结果

2.1 职业接触人群的一般情况

2.1.1 接触组 甲厂 34 人, 平均年龄 37.5 岁 (26~44 岁); 乙厂 32 人, 平均 35.9 岁 (29~45 岁); 丙厂 35 人, 平均 36.1 岁 (31~42 岁)。平均接触工龄甲厂 12.5 年 (2~20 年), 乙厂 9.6 年 (2~15 年), 丙厂 10.5 年 (2~18 年)。

2.1.2 对照组 甲厂 40 人, 平均年龄 36.1 岁

(24~45 岁); 乙厂 40 人, 平均 34.5 岁 (23~44 岁); 丙厂 40 人, 平均 37.4 岁 (26~45 岁)。平均工龄甲厂 13.4 年 (2~20 年); 乙厂 11.6 年 (2~16 年), 丙厂 12.5 年 (2~19 年)。两组工人在年龄、接触工龄方面均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.2 作业环境监测结果

甲厂空气 EE 平均浓度最低, 为 18.7mg/m³; 乙厂居中, 为 77mg/m³; 丙厂最高, 为 203mg/m³。不同工厂 PS 版作业车间空气中 EE 浓度之间相互比较, 均有极显著性差异 ($P < 0.01$)。

2.3 男工精液 LDH-C₄活性测定结果

接触组甲厂男工精液 LDH-C₄活性平均值最高 (606.12U/L), 乙厂居中 (435.88U/L), 丙厂最低 (268.29U/L)。除甲厂比对照组 (626.23U/L) 略低外, 乙厂和丙厂明显下降, 分别与各自对照组 (646.26U/L 和 642.28U/L) 及甲厂比较, 结果差异均有极显著性意义 ($P < 0.01$)。

2.4 小鼠附睾组织匀浆 LDH-C₄活性测定结果

由下表可见, 除低浓度组与阴性对照组差异无显著意义外, 中、高浓度组分别与阴性对照组和低浓度组比较, 差异均有显著意义 ($P < 0.05$)。中浓度组与阳性对照组相近似; 高浓度组比中浓度组和阳性对照组下降更明显 ($P < 0.05$), 呈明显的剂量-反应关系。

小鼠附睾组织匀浆 LDH-C₄活性测定结果 (U/L)

染毒浓度 (mg/kg)	时间 (d)	动物数	精液 LDH-C ₄ 活性 $\bar{x} \pm s$
485 (1/4LD ₅₀)	5	10	17.14 ± 6.19 _{a,c}
243 (1/8LD ₅₀)	5	10	20.54 ± 6.44 _b
122 (1/16LD ₅₀)	5	10	29.32 ± 4.15
阴性对照	5	10	31.68 ± 5.78
阳性对照 (50mg/kg)	5	10	20.62 ± 8.15 _b

a: 中、高浓度组、阳性对照组分别与阴性对照组比较, $P < 0.05$; b: 中、高浓度组、阳性对照组分别与低浓度组比较, $P < 0.05$; c: 高浓度组分别与阳性对照组和中浓度组比较, $P < 0.05$

2.5 男工精子检查结果

接触组精子密度检查, 甲厂平均值最高, 为 $16.5 \times 10^7/\text{ml}$; 乙厂居中 $4.7 \times 10^8/\text{ml}$; 丙厂最低 $7 \times 10^5/\text{ml}$; 接触组精子总数也随着 EE 水平的升高, 而显著下降; 精子 a 级和 b 级活动力, 甲厂平均值分别为 35.6% 和 32.4%; 乙厂 28.4% 和 23.5%; 丙厂 17.6% 和 15.7%, 也随着接触 EE 水平的升高而显著下降。精子存活率甲厂 67.90%, 乙厂 51.90%, 丙厂 37.3%; 精子畸形发生率甲厂 33.5%, 乙厂 52.6%, 丙厂 70.5%。以上各项指标乙厂、丙厂分别与对照组和甲厂比较, 差异均有极显著意义 ($P < 0.01$), 丙厂比乙厂下降更为明显, 两者之间差异也有极显著意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 LDH-C₄活性下降与精子毒性关系

Creasy 等用 100mg/kg EE 对小鼠染毒发现, 早期和粗线期精母细胞最敏感。当剂量增加到 500mg/kg 时, 各期初级精母细胞都受到影响^[3]。Chapin 等给大鼠口服染毒, 测量睾丸组织匀浆酶的活性, 结果表明, 损害量与组织酶活性改变有联系^[4]。为了进一步搞清组织学与生物化学之间的相关关系, Goldberg 和 Moslen 等多种动物进行实验, 结果表明, 初级精母细胞、精细胞、精子和精液中的 LDH-C₄ 约占 LDH-C₄ 总量的 80%~90%, 并确定其为精子糖代谢的必需酶, 主要为精子活动提供能量, 在初级精母细胞减数分裂(早期和晚期)期起到重要作用^[5,6]。此时, 如果该酶活性受到抑制, 将会影响精细胞的生成与成熟, 使精子数量减少, 活动力下降, 甚至引起畸形, 造成不育。本调查结果显示, 接触 EE 在 77mg/m³ 以上, 男工精液 LDH-C₄ 活性可受到抑制; 随着接触水平的增加, LDH-C₄ 活性逐渐下降, 呈明显的剂量-反应关系。在 243mg/kg 剂量上, 小鼠 LDH-C₄ 活性也明显下降, 亦有相同的规律, 提示 LDH-C₄ 活性降低可以作为精子毒性的评价指标。

3.2 LDH-C₄活性降低导致精子损害机理的

探讨

Sohnlein 和 David 等对接触 EE 作业工人危险度评估和动物药代动力学实验研究认为, 由于 EE 具有低蒸气压和高皮肤吸收率特性, 可经呼吸道和皮肤吸收, 并以后者为主。其吸收速率在实验动物 t_{1/2} 约为 0.3~0.6 小时, 人体则为数分钟~1 小时左右可通过血睾屏障^[7,8]。Illing 和 Stuart 等研究表明, EE 在肝脏和睾丸乙醇脱氢酶 (ADH) 的作用下可代谢为 2-乙氧基乙醛 (Eald), 后者又在乙醛脱氢酶的作用下转化为 2-乙氧基乙酸 (EAA)^[9,10]; Sohnlein 和 David 等研究认为, EAA 主要由尿排泄, 其清除速度实验动物 t_{1/2} 为 19.7 小时, 人体则长达 57.4 小时^[7,8]。如果连续接触(染毒), 则 EAA 可以在机体内蓄积。Sumner 等用核磁共振光谱法检测组织内 EAA 的作用剂量, 并通过生理药理动力学 (PBPK) 技术观察到, EAA 可选择性竞争甘氨酸、丝氨酸、甲酸盐和乙酸, 从而抑制 LDH-C₄ 活性^[11]。Medinsky 等进行的酶动力学研究发现, EE 对 LDH-C₄ 有高度亲和力, 使酶促反应速度下降, 从而干扰三羧酸和脂肪酸合成, 最终导致初级精母细胞生命物质合成障碍^[12], 表现为精子密度下降, 精子总数减少, 精子活动力和存活率下降, 精子畸形率增加。这些研究为揭示 EE 对精子损伤机理, 研制卫生标准提供科学依据。

3.3 EE 对 LDH-C₄活性影响的评价

由 EE 对 LDH-C₄ 活性影响的机制可知, LDH-C₄ 活性的抑制是可逆的, 存在着剂量-反应关系, 由此推测, LDH-C₄ 活性降低引起的精子毒作用也是可逆的, 属于有阈剂量范畴之内, 为进行危险度评估和研制职业接触限值奠定了理论基础。本次调查结果显示, 使接触 EE 男工亚急性精子中毒浓度为 203mg/m³, 精子中毒的亚临床浓度为 77mg/m³, LDH-C₄ 活性降低阈浓度为 18.7mg/m³ (0.26mg/kg); 小鼠附睾组织匀浆 LDH-C₄ 活性降低的阈浓度为 122mg/m³。

4 参考文献

- 1 Morrissey RE, et al. Evaluation of rodent sperm, vaginal cytology, and reproductive organ weight data from National Toxicology Program 13-week study. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1988, 11:343
- 2 张秀成. 编著. 精液分析. 精子检查与分离. 1993
- 3 Creasy DM, et al. A quantitative study of stage-specific spermatocyte damage following administration of ethylene glycol monoethyl ether in the rat. *Exp Mol Pathol*, 1985, 43:321
- 4 Chapin, et al. Are mouse strains differentially susceptible to the reproductive toxicity of ethylene glycol monomethyl ether? A study of three strains, *Fundamental and Applied Toxicology*, 1993, 21:8
- 5 Goldberg E, et al. Reproductive implications of LDH-C₄ and t-testis-specific isozymes, *Exp. Clin. Immunogenet.* 1985, 2:120
- 6 Moslen MT, et al. Species differences in testicular and hepatic biotransformation of 2-methoxyethanol, *Toxicology*, 1995, 96:217
- 7 Sohlein B, et al. Occupational chronic exposure to organic solvents, XIV. Examinations concerning the evaluation of a limit value for 2-ethoxyethanol and 2-ethoxyethyl acetate and the genotoxic effects of these glycol ethers, *Int Arch Occup Environ Health*, 1993, 64:495
- 8 David O, et al. Pharmacokinetics of 2-methoxyethanol-Induced teratogenicity CIIT ACTIVITIES, 1991, 11:1
- 9 Illing HPA, et al. Glycol ether. Health and safety Executive, Toxicity review, 1985, 10.
- 10 Stuart. C, et al. Acute Testicular toxicity of 1, 3-dinitrobenzene and ethylene glycol monomethyl ether in the rat; Evaluation of biochemical effect markers and hormonal responses, *Fundamental and Applied Toxicology* 16. 61-70, 1991.
- 11 Sumner et al. Urinary metabolites of 2-methoxyethanol determined by NMR spectroscopy. *Toxicologist*, 1991, 22:50
- 12 Medinsky MA, et al. Disposition of three glycol ethers administered in drinking water to male F344/N rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1990, 102:443

(收稿: 1996-09-16 修回: 1996-11-04)

急性过氧乙酸中毒致急性肺水肿1例报告

王 群 王 爽

徐某, 女, 30岁, 农民。1月20日下午2时许自服过氧乙酸100毫升, 当时即感口腔、咽部、胸骨后灼热性疼痛, 伴恶心、呕吐两次。被家人发现后送至县医院, 给予蛋清口服, 未洗胃。6时许出现烦躁不安, 面色苍白, 皮肤湿冷等休克症状, 给予升压药等治疗, 维持血压13.3/8.0kPa。8时许又出现胸闷、咳嗽, 咯粉红色泡沫样痰, 呼吸急促, 于次日凌晨转入我院。

体检: T36.8℃, P110次/分, R22次/分, BP9.3/6.6kPa。急性病容, 颜面苍白, 意识模糊, 双瞳孔等大正圆, 对光反应存在, 口唇发绀, 有大量痰液堵塞咽部, 咽部严重充血, 粘膜表面糜烂、水肿, 两肺布满湿罗音, 心音低, 心率稍快, 律齐, 腹软, 肝脾未触及。实验室检查: WBC $18.8 \times 10^9/L$, RBC $4.05 \times 10^{12}/L$, Hb123g/L, 血K⁺3.6mmol/L, Na⁺142mmol/L, Cl⁻104mmol/L, 余正常。入院诊断: 急性过氧乙酸中毒, 中毒性休克, 急性肺水肿。

治疗经过: 鼻塞吸氧, 给予多巴胺40mg、间羟胺20mg加入10%葡萄糖液静滴, 调整滴数以维持血压。25%葡萄糖液+速尿40mg静注, 地塞米松20mg、甘露醇125ml, 50%葡萄糖液间断静注以减轻肺水肿, 并给予鸡蛋清等口服保护胃粘膜, 因大量分泌物堵塞气管, 用吸痰器吸引, 给予磷霉素钠、能量合剂静滴等治疗, 并纠正水、电解质及酸碱失衡。次日觉粉红色泡沫样痰明显减少, 血压维持在10.6/8.0kPa, 但口腔、咽部灼痛, 并出现声音嘶哑, 舌面多处伪膜, 部分脱落, 咽后壁有伪膜, 双肺水泡音减少。给予地塞米松5mg、庆大霉素4万单位雾化吸入等治疗。症状逐渐减轻, 29日患者精神状态良好, 偶有咳嗽, 咯少量白痰, 呼吸平稳, 发音正常。于31日痊愈出院。

讨论

过氧乙酸是一种有机过氧化物, 为强氧化剂, 具有腐蚀性, 接触后对皮肤、粘膜有刺激作用。本病例系口服过氧乙酸, 主要是对消化道的直接损伤, 可导致中毒性休克。该患者在发病后6小时出现急性肺水肿的表

(下转第126页)

作者单位: 110024 沈阳市劳动卫生职业病研究所(王群), 沈阳医学院附属中心医院(王爽)