

三硝基甲苯及其代谢产物对大鼠肝细胞的毒性

王雅文¹, 刘耕陶², 刘玉瑛¹

(1. 中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所, 北京 100050; 2. 中国预防医学科学院病毒研究所, 北京 100050)

摘要: 目的 观察和比较 TNT 及其代谢产物 (2A, 4A, 4HA, 2, 4-DA, 2, 6-DA) 的细胞毒性。方法 采用大鼠肝细胞原代培养的实验模型, 观察和比较在不同浓度和不同作用时间下各种化合物的毒性, 毒性指标以细胞中所释放的 ALT, AST 和 LDH 来表示。结果 在各代谢产物中, TNT 和 4HA 使细胞释放 ALT, LDH 的量明显高于其他代谢产物。结论 TNT 细胞毒性最大, 4HA 次之, 两者有明显的剂量-效应和时间-效应关系, 其他代谢产物毒性不明显。

关键词: 三硝基甲苯; 4-羟胺-2, 6-二硝基甲苯; 4-氨基-2, 6-二硝基甲苯

中图分类号: O625.611 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2000)04-0196-03

Toxicity of trinitrotoluene and its metabolites on hepatocyte of rat

WANG Ya-wen¹, LIU Geng-tao², LIU Yu-ying¹

(1. Institute of Occupational Health, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100050, China; 2. Institute of Virus, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100050, China)

Abstract: To study the toxicity of trinitrotoluene and its metabolites——4-amino-2, 6-dinitrotoluene (4A), 2-amino-4, 6-dinitrotoluene (2A), 2, 4-diamino-6-nitrotoluene (2, 4-DA), 2, 6-diamino-4-nitrotoluene (2, 6-DA) and 4-Hydroxylamine (4HA) on hepatocyte the cultured hepatocytes of rats were used in the experiment. The activities of ALT, AST and LDH in the medium were measured as hepatic toxicity index. The results showed that TNT is the most toxic, 4HA is the next, both have clear dose-response relationship.

Key words: Trinitrotoluene; 4-amino-2, 6-dinitrotoluene; 4-Hydroxylamine

1 材料及仪器

成年 Wister 雄性大鼠, 由中国医学科学院试验动物中心提供。

TNT、4A、2A、4HA、2, 4-DA、2, 6-DA 的标准品均由中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所合成室提供。

灌流液: 采用低分子量葡聚糖 Krobs-Henseleit 溶液, 其中所含组分以 mmol/L 表示: KCl 4.8; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄ 1.2; CaCl₂ 2.4; NaHCO₃ 12.5; NaCl 118.4; 葡萄糖 10; HEPES 25 及 25%; 葡聚糖 (40000), pH7.0~7.2。

储存液: KCl 17.1g; KH₂PO₄ 3.26g; MgSO₄·7H₂O 5.87g; CaCl₂ 5.62g; NaCl 82.00g 加离子水到 1L。

工作液: 实验前一天配制 10%W/V 葡聚糖放置过夜。实验当天取 150ml10%W/V 葡聚糖 (不用沉淀部分) 加储存液 50ml, 并用 NaOH 调 pH 到 7.0~7.2。

消化液: 50ml 灌流液加 28mg CaCl₂ 和 25mg 胶原酶 (购自 Sigma 公司)。

肝洗液: 灌流液 100ml 加 CaCl₂ 0.14g; MgSO₄·7H₂O 0.205g; MgCl₂·6H₂O 0.213g。

培养液: 1640 培养基 (日本日水公司产品) 10.4g/L; NaHCO₃ 1.6g 现加 10% 小牛血清胰岛素 0.2U/ml, 青霉素 100U/ml, 链霉素 100U/ml。

胎盘蓝染液: 用 0.6% 生理盐水配制。

主要仪器: GLY-I 型脏器灌流仪、无菌操作台与 CO₂ 培养箱、低温离心机、高压锅与固定支架及手术器械, 连续分光光度计波长 520nm。

2 实验方法

2.1 肝脏离体灌流^[1]

将大鼠 (200~260g) 麻醉后, 仰放在手术瓷盘上, 进行腹部 U 型剪开, 注意不要剪破横膈以免造成开放性气胸, 将腹腔内脏移向躯体左侧。暴露下腔静脉和门静脉, 打开蠕动泵, 排出灌流循环系统中的气泡, 在门静脉剪开一小口后立即插管结扎, 固定, 开蠕动泵灌流液, 同时将下腔静脉剪断, 灌流 5 分钟约 400ml 灌流液, 洗净肝脏中的血液, 打开胸腔, 从横膈处取出肝脏, 勾出膈肌, 吊起肝脏于固定支架

收稿日期: 1999-12-03; 修回日期: 2000-02-25

基金项目: 卫生部卫生诊断标准项目

作者简介: 王雅文 (1957-), 女, 北京人, 主管技师, 主要从事肝脏毒理学研究。

上。

2.2 细胞消化与细胞分离

胶原酶消化液做循环灌流 15 至 20 分钟, 不断加入 NaHCO₃ 溶液, 使 pH 在 7.4 左右, 保持胶原酶较强活性。观察肝脏颜色, 经过灌流消化后的肝脏应为土黄色, 肝脏先肿大后缩小, 表面呈鱼子形态。

以下细胞分离部分应在冰浴或低温条件下进行。

(1) 取下肝脏浸泡在 20 至 30ml 肝脏洗液平皿中, 将没有消化好的肝叶剪掉, 剥离肝膜, 轻轻抖落, 使肝细胞散落在肝洗液中。

(2) 用 8~10 层消毒纱布, 过滤肝细胞悬液, 放入 25ml 离心管中, 加盖离心。

(3) 离心速度 300 转/分, 温度 4℃, 时间为 4 分钟。

(4) 离心后用滴管弃掉上清, 沉淀部分为肝细胞, 加入 25ml 左右肝洗液, 滴管轻轻吹打沉淀部分, 使细胞散落在肝洗液中, 重复离心 3 次。

(5) 弃掉上清, 加 5ml 培养液, 吹打细胞成悬液。

(6) 取 0.2ml 细胞悬液, 加入肝洗液稀释至 2ml, 胎盘蓝染色, 用细胞板显微镜下计数, 计算细胞成活率 (85%~90%)。

2.3 细胞培养与毒性测定

用 1640 培养液, 细胞培养液浓度为 1×10⁶ 肝细胞数/ml, 混匀后分装 24 孔培养皿中, 每孔 1ml, 培养过程应在无菌操作台冰浴条件下进行, 放于 CO₂ 培养箱中 37℃ 培养^[2-3]。细胞贴壁 1~2h 后, 分别换 0.7ml 1640 培养液, 加入被测物培养, 肝细胞与被测物的作用时间、剂量变化根据不同实验要求而定; 实验分为: 试剂对照、正常对照、被测物 3 组, 观察各种指标对肝细胞作用, TNT 及代谢产物对大鼠肝细胞损伤将依上述方法, 对照管如同容量 DMSO, 每个剂量组肝细胞培养皿中平行标本 6 个, 培养 2h 后, 分别取 0.1ml 上清液测 ALT、AST、LDH (ALT、AST 按金氏改良法^[4], LDH 按解放军总医院临床检验方法)。

3 实验结果

3.1 TNT 及 4A 对肝细胞损伤的剂量-效应关系

分别加入 100~400μg 的 TNT 或 4A 与肝细胞混悬液孵育 2h 后, 取出 0.1ml 上清液进行 ALT 和 AST 的测定。从表 1 可看到加入 TNT 后, 肝细胞释放的 ALT 和 AST 均显著高于对照组, 且有明显的剂量-效应关系。加入 4A 后也可使 ALT 和 AST 释放增加, 但作用不如 TNT, 剂量-效应关系也不明显。

表 1 不同浓度 TNT 及 4A 对肝细胞 ALT 和 AST 的影响

TNT、4A 剂量 (μg)	ALT (U/L, $\bar{x} \pm s$)		AST (U/L, $\bar{x} \pm s$)	
	TNT	4A	TNT	4A
对照组	2 823 ± 434	2 823 ± 434	2 188 ± 657	2 188 ± 657
100	6 286 ± 1 198 **	4 555 ± 357 *	4 565 ± 855 **	2 565 ± 347
200	7 683 ± 606 **	4 400 ± 275 *	5 521 ± 565 **	3 000 ± 478
300	8 459 ± 765 **	4 015 ± 660 *	7 487 ± 169 **	3 000 ± 696
400	10 076 ± 939 **	3 905 ± 660 *	9 565 ± 1 565 **	4 869 ± 630 *

注: n=6

与对照组比较 * P<0.05 ** P<0.01。

3.2 TNT 与肝细胞损伤的时间-效应关系

各组均加入 TNT 300μg 后, 分别培养 30, 60, 90, 120 分钟并取出 0.1ml 上清液, 测定 ALT、AST。由表

2 可见, TNT 加入 30 分钟后 ALT 即明显升高。并有明显时间-效应关系, 而加入 TNT 60 分钟时, AST 才明显升高, 但无明显时间-效应关系。

表 2 孵育不同时间对肝细胞释放 ALT、AST

孵育时间 (min)	ALT (U/L, $\bar{x} \pm s$)		AST (U/L, $\bar{x} \pm s$)	
	TNT	对照	TNT	对照
30	4 409 ± 756 **	1 622 ± 349	1 398 ± 566	790 ± 591
60	4 904 ± 321 **	1 576 ± 179	2 072 ± 462 **	492 ± 365
90	4 904 ± 391 **	1 356 ± 306	1 731 ± 383 *	673 ± 581
120	5 362 ± 634 **	2 016 ± 186	2 529 ± 468 **	572 ± 299

注: n=6

与对照组比较 * P<0.05 ** P<0.01。

3. 3 TNT 及其各主要代谢产物对肝细胞损伤的影响
各测试物均为 300 μ g 与肝细胞孵育 2h 后, 取上清液测定 ALT、AST 及 LDH 含量以示对肝细胞损害程度。表 3 所示, 在各代谢产物中, TNT 和 4HA 使细胞释放 ALT、LDH 的量明显高于其他代谢物。说明它们的毒性较大。

4 TNT 及主要代谢物对 LDH 的剂量-效应和时间-效应关系

主要观察 TNT、4HA、2A、4A 四种代谢物, 每种测试物给以 1, 2, 4mmol/L 三种不同剂量水平, 并且与肝细胞孵育 0, 4, 17, 24h 不同时间, 以 LDH 为指标, 观察测试物的剂量-效应和时间-效应关系。表 4 结果显示, TNT 和 4HA 对 LDH 释放量有明显影响,

且有明显剂量-效应和时间-效应关系, 而 4A、2A 作用不明显。

表 3 TNT 及其代谢产物对细胞释放 ALT 及 LDH 的影响

测试物 (300 μ g)	ALT (U/L)	LDH (U/L)
TNT	1 221	1 502
4HA	1 113	1 564
2, 4-DA	1 054	1 455
2A	1 009	1 460
4A	1 011	1 232
2, 6-DA	1 002	1 122
对照	1 001	1 001

表 4 TNT 及主要代谢产物对 LDH 的影响

测试物及剂量 (mmol/L)	孵 育 时 间 (h)				
	0	4	17	24	
TNT	1	2 150 \pm 25 *	5 542 \pm 40 **	7 730 \pm 189 **	8 521 \pm 110 **
	2	2 201 \pm 107	5 900 \pm 91 **	8 194 \pm 147 **	8 930 \pm 50 **
	4	2 488 \pm 283	6 211 \pm 219 **	8 169 \pm 51 **	8 932 \pm 126 **
4HA	1	1 171 \pm 57	3 755 \pm 228 **	5 024 \pm 198 **	6 014 \pm 290 **
	2	1 690 \pm 70	5 125 \pm 386 **	6 601 \pm 128 **	7 145 \pm 164 **
	4	1 722 \pm 88	5 650 \pm 301 **	6 712 \pm 82 **	7 201 \pm 170 **
4A	1	1 603 \pm 112	2 861 \pm 88 *	—	—
	2	1 552 \pm 90	3 124 \pm 252 *	—	—
	4	1 621 \pm 35	3 630 \pm 196 **	—	—
2A	1	1 358 \pm 108	2 254 \pm 120	—	—
	2	1 476 \pm 81	2 339 \pm 90	—	—
	4	1 555 \pm 63	2 448 \pm 17	—	—
对 照		2 025	2 632	3 840	4 481

与对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

5 讨论

我们试图采用肝细胞原代培养的模型, 观察 TNT 及其代谢产物对肝细胞的损伤程度以探讨毒性代谢产物, 实验证实这种模型还是切实可行的, 但要求能熟练掌握肝细胞分离培养技术, 并有较高的成活率 (一般不低于 75%), 本研究基本能达到 85% 以上成活率, 故结果比较可信。

本实验以测定肝细胞释放 ALT、AST 和 LDH 的水平来表示肝细胞受损的程度, 根据本实验结果, ALT 与 LDH 两个指标比较, AST 更敏感。

根据我们的研究看到 TNT 细胞毒性最大, 4HA 次之, 有明显的剂量-效应和时间-效应关系, 其他代谢

产物毒性不明显。

参考文献:

- [1] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells [A]. In: Prescott DM (Ed) Method in Cell Biology. Vol XIII. New York: Academic Press. 1976. 29-78.
- [2] 刘玉瑛, 郑琼, 孙大琦. 离体肝灌注方法及其活性的测定 [J]. 卫生研究, 1984, 13 (6): 1-4.
- [3] 刘玉瑛. 离体肝灌注在毒理及药理学上的应用 [J]. 卫生研究, 1984, 13 (6): 4-7.
- [4] 上海市立医学化验所. 实验临床检验 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1965. 401.
- [5] 四川医学院. 卫生统计学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979. 15.