

银杏叶提取物对三氯乙烯所致 BALB/c 裸鼠皮肤氧化损伤的保护作用

俞韵, 朱启星*, 周承藩, 沈彤, 于均峰

(安徽医科大学公共卫生学院, 安徽 合肥 230032)

摘要: 目的 研究银杏叶提取物 (ginkgo biloba extract GBE) 对有机溶剂三氯乙烯 (TCE) 所致 BALB/c 裸鼠皮肤组织氧化损伤的保护作用。方法 将 BALB/c 裸鼠随机分成空白对照组、橄榄油溶剂对照组、100% TCE 处理组和 0.1%、1%、10% GBE 保护组, 分别染毒 1 d 和 14 d 取染毒背部皮肤进行 MDA 含量、SOD 活性测定。结果 用 GBE 保护后, 皮肤组织中的 MDA 含量随 GBE 水平的增加呈明显下降趋势, 皮肤组织匀浆中的 SOD 活性随 GBE 剂量的增加呈上升趋势。结论 银杏叶提取物可能通过降低皮肤的氧化应激水平, 对 TCE 所致的皮肤损伤发挥保护作用, 从而有效保护三氯乙烯所致 BALB/c 裸鼠皮肤氧化损伤。

关键词: 三氯乙烯; 氧化应激; 银杏叶提取物

中图分类号: R754 O623.221 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2007)06-0363-04

Protective effect of ginkgo biloba extract on oxidative damage of skin

by trichloroethylene in BALB/c hairless mice

YU Yun, ZHU Qixing*, ZHOU Chengfan, SHEN Tong, YU Junfeng

(School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract: Objective To study the protective effect of ginkgo biloba extract (GBE) on the oxidative damage of skin by trichloroethylene. Method BALB/c hairless mice were randomly divided into several groups. The mice in treated groups were smeared with 0.1% GBE, 1% GBE, 10% GBE respectively after smearing with 100% TCE. The mice in TCE and control groups were smeared with 100% TCE and olive oil respectively, all on back skin. The TCE exposure terms were one day in 5 mice and fourteen days in 6 mice. Then detected MDA levels and SOD activities in skin with kits. Result The results showed that MDA contents in GBE treated groups were dropped and the SOD activities in GBE treated group were risen, and seemed dose-dependent on GBE concentration. Conclusion GBE shows some protective effect on skin damage by TCE in BALB/c hairless mice.

Key words: Trichloroethylene; Oxidative stress; Ginkgo biloba extract (GBE)

三氯乙烯 (trichloroethylene, TCE) 是一种常见的工业原料, 在工业上主要用于金属和电子元件的脱脂、清洗和去污等。TCE 是一种挥发性的脂溶性小分子有机化学物, 主要经皮肤和呼吸道吸收。皮肤接触三氯乙烯能引起明显的损伤, 主要表现为原发性刺激、急慢性职业性皮炎, 甚至可致重症多形红斑、大疱性表皮坏死松解症等^[1,2], 已成为近年来职业卫生研究的热点问题。对于 TCE 引起的职业人群皮肤损害的作用机制, 目前多集中于变应性接触性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD)^[3] 的研究, 认为是

T 细胞介导的 IV 型变态反应, 然而 TCE 接触工人中常见的皮肤红斑、水肿和角质形成细胞囊泡样变等显示免疫因素并不能完全解释其发病机制^[4]。本课题组前期体外研究显示氧化损伤在其中有重要作用, 而银杏叶提取物 (ginkgo biloba extract, GBE) 是一种高效的抗氧化剂和自由基清除剂, 为寻找有效的预防措施, 本研究拟从整体动物实验的角度研究 GBE 提取物对 TCE 皮肤刺激性损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物及材料

成年雌性 BALB/c 裸鼠, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 体重 20~30 g。三氯乙烯、银杏叶提取物为长江药业有限公司产品, 十二烷基硫酸钠 (SLS) 为上海化学试剂采购站从日本进口分装产品, 橄榄油为中国医药上海化学试剂公司产品, 无刺激性胶布为 Neoplas 公司产品。

收稿日期: 2007-08-02 修回日期: 2007-09-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471469, 30671787); 安徽省人才开发资金资助项目 (2004 Z032); 安徽医科大学校科研基金资助项目 (2006kj16)

作者简介: 俞韵 (1980-), 男, 助教, 硕士研究生, 研究方向: 皮肤毒理学。

*: 通讯作者, 教授, 博士生导师。

1.2 实验方法

1.2.1 动物健康状态监测 将从上海斯莱克实验动物有限责任公司订购的成年雌性 BALB/c裸鼠饲养于 SPF级别的动物饲养中心, 采用该公司裸鼠专用饲料予以饲养, 经适应性饲养 5 d后用于实验, 用电子天平每隔 3 d检测裸鼠的体重, 以监测实验过程中裸鼠的生理健康状况。

1.2.2 剂量与分组 将成年雌性 BALB/c裸鼠随机分成空白对照组, 橄榄油溶剂对照组, 100% TCE, 0.1% GBE+100% TCE, 1% GBE+100% TCE, 10% GBE+100% TCE剂量组, 在 24 h急性皮肤刺激实验中每剂量组 5只动物, 在 14 d累积性皮肤刺激实验中每剂量组 6只动物。将 50 μ l 不同浓度银杏叶提取物先涂到 2.5 cm $\times$ 2.5 cm大小背侧皮肤上处理 1 h后, 再将 50 μ l 100% TCE涂到同样的皮肤位置, 每天染毒 2次, 敷用时间为每次 4 h 实验结束后用生理盐水除去残留受试物后处死动物, 取背部皮肤, 研究银杏叶提取物对 TCE皮肤刺激的保护作用。

1.2.3 制备皮肤组织匀浆 将裸鼠背部皮肤迅速取下后, 称重, 切成小片, 于 4 $^{\circ}$ C 的 PBS中用玻璃匀浆器制成匀浆, 1 000 r/min离心 10 min 取上清用于实验。

1.2.4 皮肤组织匀浆中 MDA含量测定 取组织匀浆离心后的上清 100 μ l, 利用皮肤过氧化脂质降解产物中的 MDA (μ mol/L) 可与硫代巴比妥酸 (TAB) 缩合, 形成红色产物, 检测其在 532 nm波长处的吸光度, 通过计算即可求出被测样品中的 MDA含量。

表 1 不同浓度 GBE对 TCE所致裸鼠皮肤中 MDA含量和 SOD活性的影响 (n=5 $\bar{x}\pm s$)

组别	24 h		14 d	
	MDA (μ mol/mg Pro)	SOD (U/mg Pro)	MDA (μ mol/mg Pro)	SOD (U/mg Pro)
空白对照	483.30 $\pm$ 122.49	3 141.65 $\pm$ 564.34	248.49 $\pm$ 41.22	2 659.73 $\pm$ 742.15
溶剂对照	487.89 $\pm$ 51.38	3 171.93 $\pm$ 160.88	250.19 $\pm$ 54.98	2 665.67 $\pm$ 298.08
100% TCE	620.32 $\pm$ 81.14*	2 589.71 $\pm$ 226.73*	304.28 $\pm$ 38.94*	3 197.81 $\pm$ 499.18*
0.1% GBE保护组	601.13 $\pm$ 35.99*	2 585.87 $\pm$ 190.92*	307.83 $\pm$ 18.38*	3 081.43 $\pm$ 456.92
1% GBE保护组	557.42 $\pm$ 76.64	2 755.75 $\pm$ 392.51	257.24 $\pm$ 12.68 Δ	3 343.83 $\pm$ 537.43*
10% GBE保护组	489.77 $\pm$ 43.86	3 001.53 $\pm$ 261.94 Δ	251.01 $\pm$ 35.73 Δ	3 365.32 $\pm$ 366.54*

与空白对照组相比, * $P<0.05$ 与 100% TCE组相比, $\Delta P<0.05$

2.2 SOD活性的测定

表 1可见, 在 24 h急性皮肤刺激实验中, TCE组的 SOD活性与对照组相比明显降低, 而用 GBE保护后皮肤组织匀浆中的 SOD活性随 GBE剂量的增加呈上升趋势, 当 GBE的质量浓度达到 10%时, 皮肤组织匀浆中的 SOD活性几乎恢复到对照组水平, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。在 TCE 14 d累积性皮肤刺激实验中, TCE组的 SOD活性与对照组相比明

1.2.5 皮肤组织匀浆中 SOD活性测定 取组织匀浆离心后的上清 50 μ l, 通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基, 超氧阴离子自由基氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显色剂的作用下呈现紫红色, 用可见分光光度计测其在波长 550 nm下的吸光度。当被测样品中含 SOD时, 则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用, 使形成的亚硝酸盐减少, 比色时测定管的吸光度值低于对照管的吸光度值, 通过计算即可求出被测样品中的 SOD活性。

1.2.6 皮肤刺激评价 染毒结束后按照《化学品毒性鉴定技术规范》中的评分标准进行皮肤刺激反应视觉评分。

1.2.7 表皮厚度测定 将经不同浓度受试物处理的 BALB/c裸鼠处死后, 迅速取下染毒部位的皮肤, 去除皮下结缔组织后, 经固定、切片和 H&E染色, 采用 PAS9000病理图像分析系统进行皮肤厚度测量。

1.3 统计分析

所得数据采用 SPSS10.0软件处理, 方差分析进行组间比较。显著性水平取 $P\leq 0.05$ 。

2 结果

2.1 MDA含量的测定

结果显示, 在 24 h急性和 14 d累积性皮肤刺激实验中, TCE组的 MDA含量与对照组相比明显升高, 而用 GBE保护后皮肤组织中的 MDA含量随着 GBE水平的提高呈明显下降趋势, 且当 GBE质量浓度达到 10%时, 皮肤组织中的 MDA含量几乎达到对照组的水平。见表 1。

显升高, 用 GBE保护后皮肤组织匀浆中的 SOD活性随 GBE剂量的增加也呈上升趋势, 当 GBE质量浓度达到 1%时, 与对照组 SOD活性差异有统计学意义 ($P<0.05$), 但与 100% TCE剂量组的 SOD活性差异无统计学意义 ($P>0.05$), 这与机体在 TCE 14 d累积性皮肤刺激实验中 SOD活性代偿性升高有关。

2.3 GBE对皮肤的保护作用

表 2显示, 在 24 h急性皮肤刺激实验中, 经不

同浓度的 GBE处理后的皮肤刺激反应程度明显下降, 呈现明显的剂量 效应关系, BALB/ c裸鼠的背侧皮肤的表皮厚度 (除角质层) 随 GBE剂量的增加而与 100% TCE组差异有统计学意义。在 TCE 14 d累积性

表 2 不同浓度 GBE对 TCE所致裸鼠皮肤损伤的影响 (n=5 $\bar{x}\pm s$)

组别	刺激反应视觉评分		病理评分 (表皮厚度)	
	24 h	14 d	24 h	14 d
空白对照	0	0	43.65 $\pm$ 4.93	42.39 $\pm$ 5.96
溶剂对照	0	0	39.19 $\pm$ 2.56	49.94 $\pm$ 7.35
100% TCE	2.75 $\pm$ 0.36	7.63 $\pm$ 0.38	81.72 $\pm$ 13.54	135.40 $\pm$ 10.50
0.1% GBE保护组	2.00 $\pm$ 0.27	4.33 $\pm$ 0.47	49.05 $\pm$ 5.84*	95.14 $\pm$ 7.49
1% GBE保护组	1.33 $\pm$ 0.14*	4.17 $\pm$ 0.21*	49.82 $\pm$ 8.84*	73.94 $\pm$ 18.05*
10% GBE保护组	0.50 $\pm$ 0.22*	2.33 $\pm$ 0.35*	45.06 $\pm$ 6.52*	63.92 $\pm$ 19.71*

与 100% TCE组相比 * P<0.05

3 讨论

近年来有关 TCE中毒的案例时有报道, 尤其以南部沿海地区为多, 中毒的靶器官主要是肝脏、肾脏、神经、皮肤等^[5-6], 甚至有死亡病例的报道。有资料表明长期接触 TCE的工人其体内血清氧化应激水平明显升高^[7], 致肝、肾功能不全。动物实验表明肝脏、肾脏内的氧化应激水平升高, 且与 TCE的浓度有关联; 体外实验也提示氧化应激在 TCE引起的皮肤损伤中有很重要的作用^[8]。本次采用了整体动物实验的方法选用银杏叶提取物作为保护性因素, 研究 TCE引起的刺激性皮炎的可能作用机制。选用成年 BALB/ c裸鼠进行皮肤刺激实验, 裸鼠皮肤的结构特点以及对毒物的吸收数据与豚鼠、昆明小鼠、兔相比更接近于人^[9], 并且实验在 SPF级别的环境中进行, 保证了实验结果的可靠性。

近年来, 越来越多的证据表明氧化应激在刺激性接触性皮炎 (ICD) 病理机制中可能发挥作用。Wil lis等^[10]通过定量免疫细胞化学法研究局部使用二羟基蒽酚和 SL对皮肤中抗氧化酶 Cu/Zn SOD的影响, 结果发现, 两种刺激物都能降低表皮中 Cu/Zn SOD的含量。使用同样的方法也发现该两种刺激物能降低表皮中谷胱甘肽-S转移酶的含量^[11]。本课题组^[8-12-13]通过体外实验研究 TCE对正常人角质形成细胞 (normal human epidermal keratinocytes NHEK) 氧化应激的影响, 结果发现 NHEK细胞内的氧化应激代谢产物 MDA含量随着 TCE浓度的增加也明显上升, 而超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性随 TCE浓度的增加则明显下降, 银杏叶提取物能有效地保护 NHEK细胞免受氧化应激改变所致的损伤, 维持 NHEK细胞处于较低的氧化应激状态。由于银杏叶提取物是高效抗氧化剂和自由基清除剂, 还能通过稳定细胞膜保护机体细胞免受氧化损伤。本实验发现在

皮肤刺激实验中, 经不同浓度的 GBE处理后的皮肤刺激反应程度也明显下降, 呈现明显的剂量 效应关系, BALB/ c裸鼠的背侧皮肤的表皮厚度随着 GBE剂量的增加而逐渐向阴性对照组水平恢复。

24 h急性皮肤刺激实验中, TCE组的 MDA含量与对照组相比明显升高, 而 SOD活性与对照组相比明显降低, 采用 GBE保护后皮肤组织中的 MDA含量随着 GBE水平的提高呈明显下降趋势, 且当 GBE质量浓度达到 10%时, 皮肤组织中的 MDA含量几乎达到对照组的水平。SOD活性则随着 GBE剂量的增加呈上升趋势。同时, 裸鼠皮肤刺激反应程度也明显下降, 表皮厚度随着 GBE水平的提高而降低, 从而与阳性对照组差异呈现统计学意义, 这表明 GBE能有效地拮抗 100% TCE所致的皮肤损伤, 该拮抗作用可能与其抑制皮肤内氧化应激水平的改变有关。在 14 d累积性皮肤刺激实验中, TCE组的 MDA含量与对照组相比明显升高, 皮肤组织中的 MDA含量随 GBE剂量的增加呈明显下降趋势, 这可能与 GBE的拮抗作用有关, 从而改变了皮肤的氧化应激水平。而 TCE组的 SOD活性与对照组相比也明显升高, 这提示与皮肤组织的抗脂质过氧化水平代偿性升高有关, 导致 SOD活性水平的提高, 而用 GBE保护后皮肤组织匀浆中的 SOD活性随着 GBE剂量的增加呈上升趋势, 裸鼠皮肤刺激反应程度也明显下降, 表皮厚度逐渐向阴性对照组水平恢复, 这表明在累积性皮肤刺激实验中, GBE能拮抗 TCE所致的皮肤损伤, 但 SOD活性差异不太明显。综上所述, 银杏叶提取物对三氯乙烯所致的急性皮肤刺激性损伤具有较好的保护作用。

参考文献:

[1] 张坤海. 三氯乙烯对人体健康的影响 [J]. 职业与健康, 2003 19 (3): 5-6

[2] 吴昆. 深圳市 1993~1997年三氯乙烯中毒分析 [J]. 职业与健康, 2002 18 (5): 24-25

[3] Kimber I, Deamara R J. Allergic contact dermatitis: the cellular effects of contact dermatitis [J]. Contact Dermatitis 2002 46 (1): 1-5

[4] Tang X J, Li L Y, Huang J X, et al. Guinea pig maximization test for trichloroethylene and its metabolites [J]. Biomed Environ Sci

- 2002 15 (2): 113-118
- [5] Huang H L, Chen L J. New problems caused by occupational triethyleneglycol exposure [J]. J Immunopathol Pharmacol 2002 15: 30-32
- [6] Nakajima T, Yamanoshita O, Kamijima M, et al. Generalized skin reactions in relation to triethyleneglycol exposure: a review from the viewpoint of drug-metabolizing enzymes [J]. J Occup Health 2003 45 (1): 8-14
- [7] 邹志方, 李伯灵, 杨翠婵, 等. 低剂量三氯乙烯对作业工人脂质过氧化作用的影响 [J]. 华南预防医学, 2002 28 (3): 23-24
- [8] Zhu Q, Xi X, Shen Tong, Ding Rui, et al. Cytotoxicity of triethyleneglycol on normal human epidermal keratinocytes and protective role of vitamin E [J]. Toxicology 2005 209: 55-67
- [9] Klüßman A M, Klüßman L H. A hairless mouse model for assessing the chronic toxicity of topically applied chemicals [J]. Food and Chemical Toxicology 1998 36: 867-878

- [10] Willis CM, Reiche L, Wilkinson JD. Immunocytochemical demonstration of reduced Cu, Zn-superoxide dismutase levels following topical application of diethanol and sodium lauryl sulphate: an indication of the role of oxidative stress in acute irritant contact dermatitis [J]. Eur J Dermatol 1998 8 (1): 8-12
- [11] Willis CM, Britton LE, Reiche L, et al. Reduced levels of glutathione S-transferases in patch test reactions to diethanol and sodium lauryl sulphate as demonstrated by quantitative immunocytochemistry: evidence for oxidative stress in acute irritant contact dermatitis [J]. Eur J Dermatol 2001 11 (2): 99-104
- [12] 周承藩, 丁锐, 沈彤, 等. 三种氯代烯烃对人角质形成细胞的细胞毒性作用 [J]. 中国工业医学杂志 2005 18 (2): 76-79
- [13] 沈彤, 丁锐, 涂登云, 等. 银杏叶提取物对三氯乙烯诱导的人角质形成细胞凋亡的影响 [J]. 毒理学杂志, 2006 20 (4): 212-215

· 病例报道 ·

石棉肺并发胃腺癌 1例病理观察

Pathological observation on a case of asbestosis complicated with gastric adenocarcinoma

兰海燕

(沈阳市第九人民医院, 辽宁 沈阳 110024)

石棉可引起职业性肺癌和间皮瘤举世公认, 并且国内外学者发现接触石棉者的胃肠道肿瘤死亡率逐渐增高。现将 1例死于胃癌的石棉工人的病理观察报告如下。

1 临床资料

1.1 病例资料

患者, 男, 56岁, 石棉制品厂工人, 接尘工龄 26年, 粉尘性质为温石棉, 粉尘浓度 125 mg/m³, 已诊断石棉肺Ⅰ期。病人以间断性咳嗽、咳痰、呼吸困难、乏力入院, 入院后经超声、CT等检查, 确诊为“石棉肺Ⅰ期合并胃癌肝转移”。4个月后因脏器衰竭而死亡。

1.2 病理观察

1.2.1 大体观察 (1) 肺脏大体: 两肺弥漫中重度纤维化, 小叶中心型肺气肿。胸膜斑: 两侧胸壁两膈肌最长 13.5 cm, 背部 23.0 cm×22.0 cm。(2) 胃肿瘤大体: 肿瘤位于胃窦部 7.0 cm×6.0 cm, 肿物灰白色略隆起于黏膜表面, 轮廓不甚规则, 边缘高起外翻, 呈盘状。(3) 肝脏肿物灰白色灶状。

1.2.2 镜下观察 (1) 肺脏镜检: 肺泡上皮细胞增生, 肺泡壁增厚, 肺泡壁纤维化中度, 血管及支气管周围明显纤维化, 细支气管及系统性支气管周围粉尘沉着, 肺内可见石棉小体和石棉纤维。(2) 胃部肿瘤镜检: 胃黏膜全层均可见癌细胞, 癌细胞腺状结构排列, 癌细胞高柱状或立方形。细胞核椭圆形深色较染, 异型性明显。腺管腔大小不一, 部分腔内充满黏液, 黏液内尚见部分腺管上皮细胞残留或脱落的癌细胞漂浮。癌组织之间见纤维组织间隔及少量的炎性细胞。

1.2.3 病理诊断 石棉肺Ⅰ期合并胃腺癌肝转移。

2 讨论

有研究表明, 石棉工人的癌症发生率是非接触石棉人群的 3倍。石棉与胃癌关系的研究已逐渐受到国内外学者的关注。国外文献报道石棉致胃癌的 RR为 2.7, 95%可信区间为 (0.9~3.8)^[1]。国内张忠群等调查了 1977~1999年接触青石棉的工人, 其胃癌死亡率为 440.96/10万, 显示长期接触青石棉的工人患胃癌危险性增加^[2]。本例发病部位为胃窦部, 组织学类型为腺癌, 石棉类型为温石棉, 均与国外报道较一致^[3]。石棉与胃癌是否存在剂量-反应关系, 是否为直接导致胃癌的致癌物质, 尚有待深入研究。

调查表明, 在接触石棉的车间, 管理者要比直接接触石棉的工人患胃癌的风险性高^[4]。这提醒我们应建立健全的劳动保护预防保健制度。例如改革生产工艺, 减少粉尘, 降低环境中有害物质浓度, 不断提高生产自动化、机械化、密闭化的程度, 生产者避免或减少直接接触已知的致癌因素。加强个人防护, 规范操作, 班后及时更换工作服, 洗淋浴。定期监测生产环境中有害物质浓度, 及时采取有效防护措施。定期查体, 如发现与职业有关的癌前病变或早期癌, 应及时治疗并脱离致癌因素。以此减少石棉接触者恶性肿瘤的发生机会。

参考文献:

- [1] Suai K, Keil U, Täger I, et al. Exposure to nitrosamines, carbon black, asbestos talc and moralin from stomach, lung and laryngeal cancer in a cohort of rubberworkers [J]. Am J Epidemiol 2000 152 (4): 297-306
- [2] 张忠群, 李桂荣, 王元林. 石棉接触与胃癌发病的关系探讨 [J]. 中国工业医学杂志, 2002 15 (2): 111-112
- [3] Kogan FM, Vanchkova NN, Frasch VN. Possibility of inducing glandular stomach cancer in rats exposed to asbestos [J]. Br J Ind Med 1987 44 (10): 682
- [4] Kang SK, Burnett CA, Freund E, et al. Gastrointestinal cancer mortality of workers in occupations with high asbestos exposures [J]. Am J Ind Med 1997 31 (6): 713