

1-溴丙烷对两种雄性大鼠肝脏毒性的研究

黄芬^{1,2}, 黄永¹, 王海兰^{2,3}, 市原学², 市原佐保子², 叶冬青¹

(1 安徽医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系, 安徽 合肥 230032 2 日本名古屋大学医学院劳动与环境卫生学教研室; 3 广东省职业病防治院, 广东 广州 510300)

摘要: 目的 研究 1-溴丙烷对两种雄性大鼠的肝脏毒性及谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 在肝脏解毒代谢中的作用。方法 将 18 只 Fischer344 大鼠和 18 只 Wistar 大鼠分别随机分为两组, 一组给予新鲜空气, 一组给予 1 000 ppm 1-溴丙烷, 每天 8 h 连续暴露 4 周。通过血浆的生化指标和病理切片对肝脏的功能和形态进行了评价。利用化学比色法和实时定量 PCR 法对肝脏中的 GST 的活力和基因表达水平进行测量。结果 1-溴丙烷暴露可引起两种大鼠体重的下降及肝脏重量的上升; 病理发现肝脏中央静脉周围的肝细胞出现空泡样改变, 血浆中 CK、ALT 和 TBIL 和 DBL 等指标上升明显; 两种大鼠肝脏细胞胞浆的 GST 活力增强, Fischer 344 大鼠微粒体 GST 的活力也增强; 肝脏组织的 GST mRNA 表达水平升高。结论 1-溴丙烷暴露对两种雄性大鼠具有肝脏毒性, GST 在 1-溴丙烷的肝脏解毒代谢中可能起到较重要作用。

关键词: 1-溴丙烷; 肝脏毒性; 谷胱甘肽 S-转移酶 (GST); 代谢

中图分类号: O612.7; R994.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2009)01-0003-04

Study on hepatotoxicity induced by 1-bromopropane in two strains of male rats

HUANG Fen², HUANG Yong¹, WANG Hailan³, ICHIHARA Gaku², ICHIHARA Sahoko², YE Dongqing¹

(1. Department of Epidemiology and Biostatistics, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan; 3. Guangdong Provincial Prevention and Treatment Center for Occupational Diseases, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Objective To explore the hepatotoxicity of 1-bromopropane through inhalation and the role of glutathione S-transferase (GST) in the metabolism of 1-bromopropane in male rats. Methods Eighteen Fischer 344 male rats and 18 Wistar male rats were randomly divided into two groups respectively. The rats in control group were given fresh air, the rats in experimental group were exposed to 1000 ppm 1-bromopropane contaminated air 8 hours per day for 4 weeks. At the end of experiment, various biochemical parameters including plasma hepatic function indices and histopathological changes in liver were examined. Meanwhile, the activity and mRNA expression of GST in liver were also determined by colorimetric method and real-time quantitative PCR. Results After 4 week exposure, body weights of all exposed rats were decreased significantly, whereas the weights of livers were increased. Histopathological examination showed that obvious vacuolation appeared around the central veins of liver in all the exposed rats; the levels of CK, ALT, TBIL and DBL in plasma of exposed rats were increased; the cytosolic GST activity in liver of all exposed rats and the activity of microsomal GST in liver of Fischer 344 exposed rats were significantly higher than that of controls. Additionally, the expression of GST mRNA was also enhanced by exposure to 1-bromopropane. Conclusions The results showed that 1-bromopropane has definite hepatotoxicity in Fischer 344 and Wistar male rats and GST might be involved in the detoxification of 1-bromopropane.

Key words: 1-bromopropane; Hepatotoxicity; Glutathione S-transferase (GST); Metabolism

1-溴丙烷是一种有机溶剂, 在氟利昂类因对臭氧层的破坏作用而被禁止和限制使用后, 溴丙烷因其难燃、适中蒸气压和稳定性等特点而被作为替代物质, 用于金属、精密仪器、光学仪器和电子元件的清洗, 以及作为粘合剂的溶剂来使用^[1]。国外的研究提示

1-溴丙烷对动物有较强的生殖毒性作用^[2~4], 为了解 1-溴丙烷对两种雄性大鼠的肝脏毒性及其代谢机理, 特进行本次研究。

1 材料与方法

1.1 试剂

1-溴丙烷, 无色油状液体, 纯度为 99.81%, 由 Tosoh Co., Ltd. Japan 公司提供。

1.2 动物和暴露

18 只 11 周雄性健康 Fischer 344 大鼠购自 Clea

收稿日期: 2008-08-19 修回日期: 2008-10-20

基金项目: 国家自然科学基金资助 (30700656, 30571581)

作者简介: 黄芬 (1972-), 女, 副教授, 博士生, 主要从事职业流行病学研究。

Laboratories for Experimental Animals Japan 18只 11周雄性健康的 Wistar大鼠来自名古屋大学动物中心。购入后在吸入暴露柜内饲养一周以使其适应环境。实验环境为 16 h 8 h 明暗周期 (6:00 AM 开灯, 10:00 PM 关灯) 湿度为 57%~60%, 温度为 23~25℃, 供给充足的水和食物。两种系大鼠各自随机分为 2 组, 每组 9 只。一组暴露于 1 000 ppm 1-溴丙烷, 一组给予新鲜的空气。每天暴露 8 h 连续暴露 4 周。吸入暴露装置配有气相色谱检测 1-溴丙烷暴露浓度, 每次检测 10 s 每 40 s 循环 1 次, 计算机可自动调控将浓度控制在设定浓度的 ±5%。

1.3 动物处理

在暴露前后对大鼠进行称重; 暴露结束后的 16~19 h 内断头处死, 采血, 肝素抗凝, 分离血清; 解剖时取出各个脏器称重后, 放到液氮中, 冷冻后转移到 -80℃ 冰箱直至生化 and 分子生物学实验。每个肝脏在解剖时先在相同部位切下 2 mm 组织, 放入 10% 的中性福尔马林中, 进行病理学检查。

1.4 肝脏病理检查

取出放在 10% 中性福尔马林中的肝脏, 用石蜡进行包埋, 切成 5 μm 薄片, HE 染色, 观察组织形态。

1.5 大鼠血清生化检查

天冬氨酸转氨酶 (AST)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、肌酸激酶 (CK)、总胆红素 (TBIL)、直接胆红素 (DBIL)、间接胆红素 (IBIL)、总蛋白 (TP)、乳酸脱氢酶 (LD) 和碱性磷酸酶 (ALP) 在日立 736-10 自动分析仪上进行检测。

1.6 肝脏组织标本处理及 GST 的测定

在液氮中将肝脏组织敲成粉末, 加入 1% 的预冷

缓冲液 (0.1 mol/L Na₂HPO₄-Na₂H₂PO₄, pH=7.0 含 2 mmol/L EDTA), 进行匀浆, 4℃、10 000× 离心 15 min 取上清再 4℃、100 000× 离心 60 min 上清为胞浆溶液, 下面固体状为微粒体。使用 Cayman 化学公司提供的 GST 测定试剂盒。按照试剂盒的说明进行实验, 每份标本加 20 μl 稀释后标本, 20 μl 谷胱甘肽和 150 μl 分析缓冲液, 最后加 CDNB 10 μl 混匀几秒钟后, 在 340 nm 波长下连续 0、1、2、3、4 min 后测定 (GST) 的活力, 然后计算出每个样本每分钟 GST 的活力。实验中每样本设复孔计算平均值。

1.7 实时定量 PCR

使用 Qiagen 试剂盒提取肝脏 RNA 并运用 Invitrogen superscript II 逆转录试剂盒合成 cDNA 取 2 μl cDNA 模板、10 μl Taqman 通用 PCR 反应液、1 μl 基因表达反应液和 7 μl RNA-free 水, 在 ABI 7000 定量 PCR 仪上进行 95℃ 15 min 聚合酶激活后, 95℃ 15 s 60℃ 60 s 的 40 个循环。内标采用 AB 的 GAPDH 对照试剂盒。引物和 Taqman 探针及定量 PCR 的其他反应液均购自 ABI 公司, 引物编号为 Rm1511827_m1

1.8 统计学分析

用 SPSS 统计软件, 进行方差分析, 使用 Dunnett 方法进行各组之间的比较。

2 结果

2.1 大鼠体重和肝脏的变化

两种大鼠经过 1-溴丙烷 4 周暴露后, 体重都发生了明显的变化, 明显低于对照组, 肝脏的相对重量和绝对重量都明显高于对照组, 见表 1。

表 1 1-溴丙烷 4 周暴露后两种大鼠的体重及肝脏重量 (x±s)

	Fischer344		Wistar	
	对照	1-溴丙烷	对照	1-溴丙烷
鼠数	9	9	9	9
体重 (g)				
0 周	177.67±6.12	181.00±4.09	239.67±10.04	241.44±16.40
4 周	229.33±8.08	190.63±12.86**	304.00±24.91	267.88±17.52**
肝脏				
绝对重量 (g)	8.67±0.58	10.07±0.69**	11.00±1.55	13.44±1.17**
相对重量 (mg/g)	39.05±1.48	55.25±1.92**	37.54±2.83	51.66±1.93**

运用 Dunnett 法与对照组进行比较, ** P<0.001

2.2 两种大鼠血浆生化指标的变化

经过 4 周暴露后两种大鼠 CK 活性发生下降, Wistar 大鼠暴露后 TP、ALT、TBIL、DBIL 和 IBIL 等各项指标都明显上升, Fischer 344 大鼠的 TBIL 和 IBIL 也发生升高, 但其他指标无明显变化, 详见表 2。

2.3 大鼠肝脏的病理变化

4 周暴露后 Wistar 和 Fischer 344 暴露组大鼠的肝脏细胞都出现了空泡样改变, 见图 1。

2.4 肝脏组织的 GST 变化

1-溴丙烷暴露使两种大鼠的胞浆 GST 活力增强, Fischer 344 大鼠微粒体 GST 活力增强。见表 3。

表 2 1-溴丙烷 4周暴露后两种大鼠血浆生化指标结果 ($\bar{x} \pm s$)

指标	Fisher344		Wistar	
	对照	1-溴丙烷	对照	1-溴丙烷
CK (U/L)	8.042 ± 0.50 ± 373.19	1696.86 ± 323.66 **	4844.00 ± 1211.82	1188.14 ± 117.04 **
TP (U/L)	5.46 ± 0.13	5.64 ± 0.13	5.55 ± 0.14	5.96 ± 0.21 **
TBIL (μ g/dl)	33.75 ± 7.44	51.43 ± 0.15*	68.75 ± 8.00	107.14 ± 16.00**
DBIL (μ g/dl)	20.00 ± 7.56	40.00 ± 8.17**	36.25 ± 7.44	62.86 ± 12.54**
Ibil (μ g/dl)	13.75 ± 9.16	11.43 ± 14.39	32.50 ± 4.63	44.29 ± 9.76*
AST (U/L)	192.88 ± 46.16	327.00 ± 303.70	168.57 ± 21.13	207.63 ± 47.55
ALT (U/L)	62.50 ± 7.69	92.71 ± 113.48	53.43 ± 11.15	95.38 ± 29.62**
IDH (U/L)	725.13 ± 224.82	633.57 ± 96.40	536.63 ± 133.58	501.00 ± 108.50
ALP (U/L)	1006.75 ± 121.07	1106.00 ± 99.59	674.38 ± 51.63	658.43 ± 139.57

运用 Dunnett法与对照组进行比较, * P<0.05 ** P<0.001

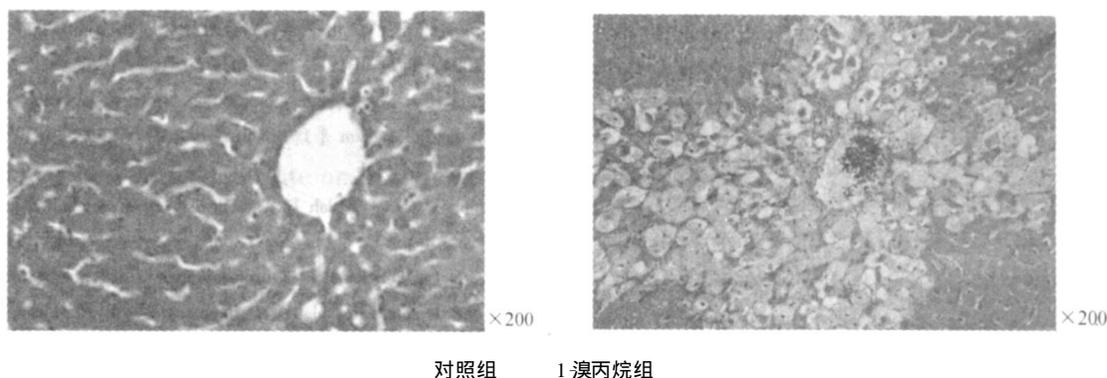


图 1 1-溴丙烷 4周暴露后大鼠肝脏的病理变化 (HE染色)

表 3 两种大鼠肝脏细胞胞浆和微粒体 GST的活性 ($\bar{x} \pm s$)

项目	Fisher344		Wistar	
	对照	1-溴丙烷	对照	1-溴丙烷
胞浆 GST活力				
GST活力 [nmol (min ⁻¹ mg ⁻¹ μg) liver]	95.06 ± 14.21	159.98 ± 38.14**	112.97 ± 17.03	158.14 ± 16.82**
GST活力 [nmol (min ⁻¹ mg ⁻¹ μg) Protein]	1397.05 ± 135.23	2339.67 ± 473.01**	1730.24 ± 448.84	2253.50 ± 331.99*
微粒体 GST活力				
GST活力 [nmol (min ⁻¹ mg ⁻¹ μg) liver]	2.08 ± 0.47	4.48 ± 0.02*	2.30 ± 1.06	3.78 ± 1.85
GST活力 [nmol (min ⁻¹ mg ⁻¹ μg) Protein]	3984.01 ± 1561.98	5858.79 ± 965.44*	5352.09 ± 1569.87	5230.04 ± 1821.27

运用 Dunnett法与对照组进行比较, * P<0.05 ** P<0.001

2.5 GST mRNA的表达水平

1-溴丙烷的暴露使两种大鼠的 GST mRNA的表达量增加。Wistar大鼠的暴露组 mRNA表达量是非暴露组的 7倍多，Fisher344暴露组的水平是非暴露组的 2倍多，见图 2。

3 讨论

20世纪 90年代中期，韩国和日本首先使用 2-溴丙烷作为臭氧层破坏溶剂的替代物质。但病例报告和动物实验表明 2-溴丙烷具有较强的毒性，其使用量很快下降，它的同分异构体 1-溴丙烷作为新的替代物开始使用。目前在美国和日本等国都有 1-溴丙烷接触者发病的报告^[1,6]，动物实验也提示 1-溴丙烷具有较强的生殖和神经毒性^[1~6]。

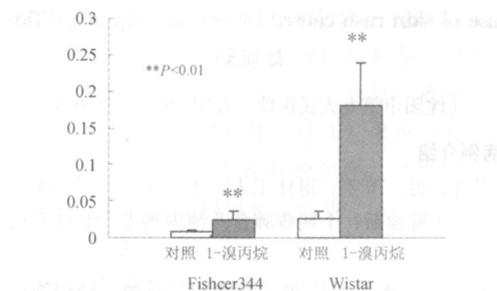


图 2 两种大鼠 4周暴露后肝脏 mRNA的表达水平

明显低于对照组，肝脏重量高于对照组。两种大鼠 1-溴丙烷暴露后，在肝脏中心静脉附近出现许多肝细胞空泡样变，提示这些空泡区可能是肝糖原。肝脏是人体内唯一合成胆汁酸的场所，胆汁酸在肝细胞由胆固醇分解代谢产生，本研究提示 1-溴丙烷暴露后血清

胆固醇和胆汁酸都升高,且 ALT和 AST也都升高,提示 1 溴丙烷对大鼠具有一定的肝脏毒性。

Johr等^[7]认为 1 溴丙烷的代谢同一般的卤烃类化学物质代谢相同,主要通过氧化、环氧化和结合反应,生成硫醚氨酸。但 Khan等^[8]研究发现,1 溴丙烷的解毒代谢主要是通过谷胱甘肽的结合,通过多功能氧化酶进行的解毒能力是很有限的,而且很容易饱和。Wang等^[9,10]研究也发现在 1 溴丙烷暴露的各组长鼠的生殖器官和大脑组织中,谷胱甘肽含量发生下降,GST活性增加。谷胱甘肽主要在 GST的作用下,与外界化合物进行结合,形成亲水物质排出体外。GST是一组具有多种生理功能的蛋白质,是参与机体解毒作用的超基因家族,不仅可以催化亲电物质与 GSH结合,而且其自身也可与亲脂性药物结合增加其水溶性,对许多环境毒物进行代谢和解毒。本研究发现,1 溴丙烷的暴露使两种大鼠胞浆中的 GST活力增加,Fischer344 大鼠微粒体中的 GST活力也发生增加;肝脏中 GST的 mRNA表达水平在两种大鼠中都明显的升高,这些提示 GST在 1 溴丙烷的肝脏解毒代谢中可能起着重要的作用。

本研究表明 1 溴丙烷对两种雄性大鼠都具有一定的肝脏毒性,但其毒性作用机制仍不明确。随着臭氧层破坏溶剂的禁止使用,我国 1 溴丙烷的生产和使用量必将进一步扩大。因此,我们急需进一步研究 1 溴丙烷的毒性作用及其机理,进而达到保护劳动者健康的目的。

参考文献:

[1] Takeuchi Y Control of hazardous substances at small workplaces [J. Industrial Health 2006 44 48-52
 [2] Ichihara G Neuroreproductive toxicities of 1-bromopropane and 2-bromopropane [J. Int Arch Occup Environ Health 2005 78 79-96
 [3] Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction NTP-CERHR Expert Panel report on the reproductive and developmental toxicity of 1-bromopropane [J. Reproductive Toxicology 2004 18 157-188
 [4] 黄芬,王海兰,市原学,等. 1 溴丙烷对两种雄性大鼠生殖毒性的研究 [J. 中国工业医学杂志, 2006 19 (5) 260-263
 [5] Ichihara G Li W, Shibata E et al Neurologic abnormalities in workers of a 1-bromopropane factory [J. Environ Health Perspect 2004 112 1319-1325.
 [6] Selvar G Encephalomyeloid neurotoxicity following exposure to an industrial solvent [J. Clin Neuro Neurosurg 1999 101 199-202
 [7] Jones A R, Walsh D A The oxidative metabolism of 1-bromopropane in the rat [J. Xenobiotica 1979 9 (12): 763-772
 [8] Khan S, O'Brien P J 1-bromopropanes as new potent neurotoxic glutathione depleters in isolated rat hepatocytes [J. Biochem Biophys Res Commun 1991 179 436-441.
 [9] Wang H, Ichihara G, Ito H et al Biochemical changes in the central nervous system of rats exposed to 1-bromopropane for seven days [J. Toxicol Sci 2002 67 114-120
 [10] Kim H Y, Chung Y H, Jeong J H et al Acute and repeated inhalation toxicity of 1-bromopropane in SD rats [J. J Occup Health 1999 41 121-128.

。 病例报道。

加替沙星静脉滴注致皮疹 1 例报告

A case of skin rash caused by venous drip of gatifloxacin

赵丽娟

(沈阳市第九人民医院, 辽宁 沈阳 110024)

1 病例介绍

患者,男,70岁,退休工人,于 2007年 7月 15日入我院住院。入院诊断: I 期矽肺合并肺内感染。既往无药物过敏史。

患者于 2008年 3月 20日因着凉后咳嗽,咳痰为白色粘痰,日量约 20 ml 无咳痰带血,无咯血,气促,活动后加重。查体: T 36.5℃, P 80 次 /min R 20 次 /min PB 130/80 mm Hg 意识清,呼吸略促,口唇略发绀,双肺呼吸音粗,双肺下野闻及散在湿啰音,心率 80 次 /min 律齐,腹软,双

下肢无水肿。实验室检查,血 WBC 10.5 × 10⁹ /L N 0.80 胸片示 I 期矽肺合并肺内感染。

考虑患者为老年长期住院矽肺患者,机体抵抗力弱,易发生院内感染,而对院内感染较敏感药物为喹诺酮类,故予加替沙星 0.4 g 加入 0.9% 氯化钠注射液 250 ml 1 次 /d 静脉滴注,20 滴 /min 避光。于静脉滴注第 2 天患者前胸、后背、双上肢、脸颊部出现 5 分钱币大小紫红色散在斑片,个别斑片上有水疱,瘙痒明显,无痛感,无呼吸困难。追问患者既往呈应用过此类药物,未出现过类似症状。请皮肤科医师会诊,考虑可能为药物过敏所致。予停加替沙星静脉滴注,给予维生素 C 1.0 g 加入 5% 葡萄糖注射液 500 ml 1 次 /d 静脉滴注,30 滴 /min 扑尔敏 4 mg 3 次 /d 口服,脱敏治疗。7 d 后斑片、瘙痒消失,换用红霉素静脉滴注后无上述症状发生,说明斑片为加替沙星过敏所致。

2 讨论

近几年,出现一些关于喹诺酮类药物过敏病例。患者可出现皮疹、跟腱断裂、精神神经症状。为此,建议用药前应详细询问患者有无过敏史,用药期间应注意观察患者病情,静脉用药开始时滴速宜慢,一旦发现异常,立即停药,及时处理。