

3, 4-二氯苯胺对大鼠睾丸和附睾毒性作用的病理学研究

Pathological study of effect of 3, 4-dichloroaniline on testis and epididymis of rats

张波¹, 芦冉²

ZHANG Bo, LU Ran

(1. 北京联合大学应用文理学院生物学系, 北京 100191; 2. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

摘要: 研究 3, 4-二氯苯胺 (3, 4-DCA) 对雄性大鼠睾丸和附睾的毒性作用, 以探讨二氯苯胺的雄性生殖毒性。健康成熟洁净级 Wistar 雄性大鼠 40 只, 随机分为 5 组, 即溶剂对照组, 3, 4-DCA 4 个染毒剂量组 (39, 81, 170, 357 mg/kg)。经口灌胃染毒, 1 次/d, 连续 35 d。处死大鼠取睾丸和附睾, 光镜和透射电镜观察睾丸和副睾、生精细胞和精子结构的变化。结果显示, (1) 与对照组比较, 低剂量二氯苯胺对大鼠体重、睾丸系数以及附睾系数均无显著变化; 高剂量二氯苯胺使体重显著降低, 但睾丸系数以及附睾系数无明显变化。(2) 与对照组比较, 低剂量二氯苯胺对睾丸曲细精管及附睾结构无明显影响; 高剂量二氯苯胺使睾丸曲细精管外形不规则以及萎缩, 精原细胞显著减少, 部分生精细胞核内染色质浓集, 线粒体肿胀甚至出现空泡化改变; 附睾染色浅且不均匀, 部分曲细精管萎缩, 管壁损伤较严重, 管腔内精子数量显著减少。精子尾部中部切片部分致密纤维及线粒体鞘模糊不清或缺失。表明高剂量 3, 4-二氯苯胺显著损伤大鼠睾丸和附睾的结构从而产生雄性生殖毒性。

关键词: 3, 4-二氯苯胺; 睾丸; 附睾; 精子; 组织病理

中图分类号: R994.6 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2010)04-0279-03

3, 4-二氯苯胺 (3, 4-dichloroaniline, 3, 4-DCA) 是一种应用广泛的化学合成中间体, 用于合成多种农药, 也是一些杀虫剂在土壤中的主要降解产物^[1]。研究表明, 二氯苯胺对哺乳动物的脾脏、血液以及免疫系统具有毒性作用^[2-5]。二氯苯胺能引起大鼠血液、肝脏以及膀胱的急性毒性, 大量的研究也表明, 二氯苯胺对小鼠也具有免疫毒性。本研究旨在探讨二氯苯胺对雄性大鼠睾丸和附睾的毒性作用。

1 材料与方法

表 1 3, 4-二氯苯胺对大鼠体重以及睾丸系数和附睾系数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

剂量 (mg/kg)	动物数	体重 (g)	附睾重 (g)	附睾系数	睾丸重 (g)	睾丸系数
0	8	427.50±14.87	0.89±0.26	0.22±0.26	3.22±0.25	0.82±0.07
39	8	448.74±16.97	0.98±0.23	0.25±0.06	3.39±0.34	0.84±0.10
81	8	420.06±37.71	0.89±0.07	0.22±0.03	3.18±0.19	0.85±0.11
170	8	409.43±19.16	0.93±0.09	0.23±0.03	3.49±0.25	0.84±0.07
357	8	378.90±42.08*	0.93±0.10	0.24±0.02	3.35±0.35	0.86±0.05

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

1.1 动物分组及染毒

由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 40 只, 体重 260~270 g, 许可证号 SCXK (京) 2005-0013, 饲养条件为 SPF 级动物房 (北京联合大学应用文理学院功能食品检测中心), 温度 20~22℃, 相对湿度 40%~55%, 人工光照 8:00 至 20:00。大鼠随机分为 5 组: 玉米油溶剂对照组, 3, 4-二氯苯胺 39, 81, 170, 357 mg/kg 4 个染毒组, 每组 8 只, 等容积经口灌胃染毒 (1 ml/200 g) 1 次/d, 连续 35 d, 自由摄食饮水。

3, 4-二氯苯胺 (3, 4-dichloroaniline), Fluka 公司产品, HPLC 纯度 $\geq 97\%$, 批号: 35210。

1.2 观察指标

1.2.1 体重变化 每周定时称体重 1 次, 计算各组动物平均体重。

1.2.2 组织病理学检查 在 35 d 处死动物, 迅速取其睾丸和附睾, 固定, 常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋, 制成 5 μm 厚切片, 进行常规苏木精-2 伊红 (HE) 染色, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 软件进行实验数据统计, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 3, 4-二氯苯胺对雄性大鼠体重以及睾丸系数和附睾系数的影响

与对照组比较, 39 mg/kg, 81 mg/kg 组动物活动、体重正常, 170 mg/kg 组体重稍有减轻但与对照组比较变化不显著 ($P > 0.05$), 357 mg/kg 组与对照组比较体重显著降低 ($P < 0.05$)。3, 4-二氯苯胺对睾丸系数以及附睾系数无明显影响。见表 1。

2.2 3, 4-二氯苯胺对大鼠睾丸和附睾组织病理学的影响

2.2.1 光学显微镜观察 对照组中的睾丸的形态表现一致, 睾丸曲细精管排列规则, 精曲小管内生精细胞排列整齐, 层次分明, 结构正常, 睾丸间质分布于精曲小管之间, 内含间

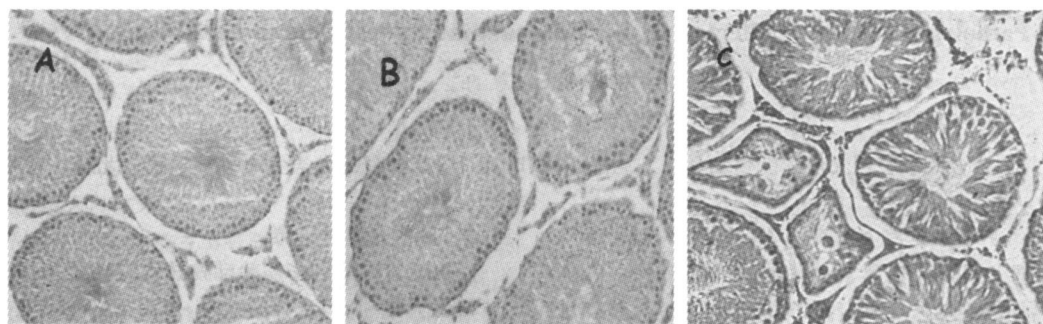
收稿日期: 2010-01-05 修回日期: 2010-03-30

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (项目编号: 7063071)

作者简介: 张波 (1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 环境毒理。

质细胞、巨噬细胞等小三角形疏松结缔组织 (图 1A)。与对照组相比, 39 mg/kg 实验组动物睾丸曲细精管排列基本规则, 精原细胞和精母细胞基本未见减少 (图 1B)。357 mg/kg 实验

组, 外形不规则的曲细精管增多, 生精上皮几乎消失殆尽, 精原细胞罕见, 仅在基底部见到少量精原细胞, 曲细精管管腔变大, 部分曲细精管已经严重萎缩 (图 1C)。



溶剂对照组

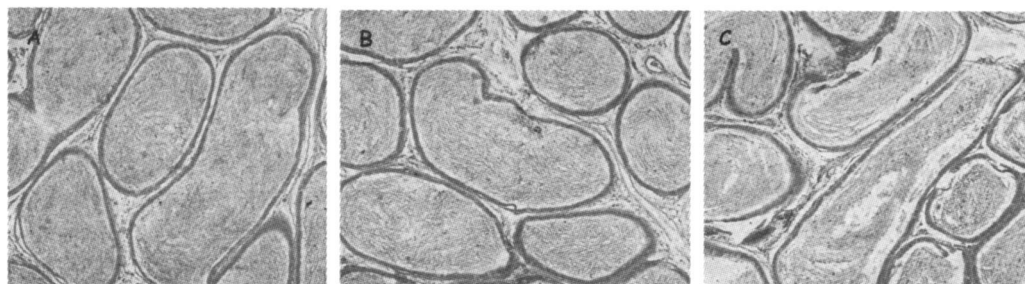
39 mg/kg 剂量组

357 mg/kg 剂量组

图 1 不同剂量 3,4-二氯苯胺对大鼠睾丸的病理组织学影响 (HE, 200×)

对照组附睾的管腔内可见大量染色均匀的精子 (图 2A)。39 mg/kg 实验组附睾管腔内精子数和管腔体积基本正常, 染色较均匀 (图 2B)。357 mg/kg 实验组附睾染色浅且不均匀,

部分曲细精管萎缩, 管腔内精子数量少。曲细精管管壁损伤较严重, 有断壁和精子漏出 (图 2C)。



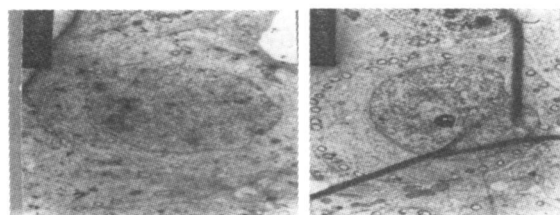
溶剂对照组

39 mg/kg 剂量组

357 mg/kg 剂量组

图 2 不同剂量 3,4-二氯苯胺对大鼠附睾的病理组织学影响 (HE, 200×)

2.2.2 透射电镜观察 对照组大鼠睾丸组织精原细胞结构完整, 形态规则, 细胞界限清楚, 核膜结构正常, 核质分布均匀无固缩。内质网均匀散布, 结构完整。线粒体无肿胀及空泡等现象, 染毒 357 mg/kg 组部分精原细胞核内染色质浓集, 内质网分布不均匀, 结构不完整。线粒体中度肿胀甚至出现空泡化改变。见图 3。



对照组

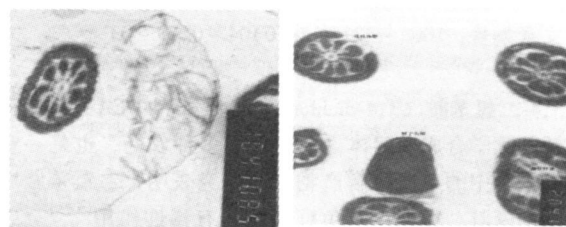
染毒 357 mg/kg 组

图 3 3,4-二氯苯胺对大鼠睾丸组织病理学影响的透射电镜观察 (10 000×)

对照组附睾精子尾部外周致密纤维中央微管 9+2 结构、线粒体鞘结构以及外周致密纤维清晰可见。染毒 357 mg/kg 组部分尾部中央微管 9+2 结构排列混乱、缺失, 致密纤维及线粒体鞘模糊不清或缺失。见图 4。

3 讨论

生精作用是从精原细胞发育成为成熟精子的过程。在此



溶剂对照组

染毒 357 mg/kg 剂量组

图 4 不同剂量 3,4-二氯苯胺对大鼠附睾精子尾部超微结构的透射电镜观察 (10 000×)

过程中任何一个环节受到影响都可能引起精子的发生、成熟以及形态和功能的异常。生殖毒物无论是直接作用于睾丸组织, 还是通过影响酶活性的间接作用, 最终都会导致睾丸组织的病理学改变。由于精子的发生是一个复杂而有规律性、周期性同步发育的过程, 故本研究中采取了连续灌胃 35 d 的染毒期限。结果表明, 低剂量染毒组大鼠睾丸生精细胞结构的改变不明显, 但随着 3,4-二氯苯胺剂量的增加, 其病理变化也随之显著。说明连续灌胃 3,4-二氯苯胺 35 d 对大鼠睾丸和附睾产生了明显的毒性。已往的研究表明, 二氯苯胺染毒对机体免疫功能造成一定程度的影响^[9], 能减少小鼠睾丸 GSH 含量以及抑制 SOD 酶的活性等^[7], 使大鼠睾丸特征性酶

活性发生显著变化并引起精子顶体酶活性以及精子顶体反应率显著下降^[8-9]。综合分析提示,高剂量二氯苯胺进入机体后可能通过影响机体免疫功能以及抑制睾丸中重要酶的活性,影响睾丸以及附睾的结构,最终降低精子的生成和质量。

参考文献:

- [1] Giacomazzi S, Cochet N. Environmental impact of dioxin transformation: a review [J]. *Chemosphere*, 2004, 56 (11): 1021-1032.
- [2] Khan M F, Boor P J, Abock N W, et al. Oxidative stress in the splenotoxicity of aniline [J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1997, 35 (1): 22-30.
- [3] Guilhemino L, Soares A M, Carvalho A P, et al. Acute effects of 3,4-dichloroaniline on blood of male Wistar rats [J]. *Chemosphere*, 1998, 37 (4): 619-632.
- [4] Hong SK, Anestis DK, Ball JG, et al. In vitro nephrotoxicity induced by chlorinated benzenes in renal cortical slices from Fischer 344

rats [J]. *Toxicology Letters*, 2002, 129 (1-2): 133-141.

- [5] Avilova GG, Tkatcheva TA, Kapukhina EA, et al. Glucuronides: a possible urinary marker of nephrotoxicity and an indicator of exposure to 2,6-dichloroaniline in rats [J]. *Toxicology Letters*, 1998, 95 (Supplement 1): 189.
- [6] 张波. 二氯苯胺对小鼠免疫功能的影响 [J]. *毒理学杂志*, 2006, 20 (6): 394-396.
- [7] 张波. 二氯苯胺对小鼠睾丸毒作用酶学研究 [J]. *中国工业医学杂志*, 2006, 19 (6): 365-366.
- [8] 卢冉, 张波, 张鑫等. 3,4-二氯苯胺对雄性大鼠顶体酶活性和顶体反应的影响 [J]. *中国工业医学杂志*, 2008, 21 (2): 99-101.
- [9] Zhang Bo, Lin Sen. Effect of 3,4-dichloroaniline on marker testicular enzymes of rats [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2009, 22: 40-43.

口服活性炭对溴敌隆急性中毒的疗效研究

Study of therapeutic effect of oral activated charcoal on acute bromadiolone poisoning

王明良¹, 张宏顺², 孟聪申², 谢立璟², 孙承业^{2*}

WANG Ming-liang¹, ZHANG Hong-shun², MENG Cong-shen², XIE Li-jing², SUN Cheng-ye^{2*}

(1 北京市石景山区疾病预防控制中心, 北京 100043; 2 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100050)

摘要: 为探索口服活性炭对溴敌隆急性中毒的治疗效果, 将家兔随机分为 4 组, 给予相应处理后观察其死亡情况, 测定血浆溴敌隆含量、PT 和 APTT。结果发现活性炭可显著降低染毒动物血中溴敌隆浓度, 但不能明显改善其中毒症状和死亡情况。

关键词: 溴敌隆; 活性炭; 中毒; 治疗

中图分类号: R595.4 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2010)04-0281-03

活性炭因其具有对多种有毒物质较好的吸附效能、使用方便、无明显副作用、可院前给药等优点^[1-3], 被作为胃肠道毒物清除的主要措施之一。国际化学品安全组织 (IPCS) 针对溴敌隆急性中毒制作的《健康与安全指南》(HSG) 建议, 中毒早期应给予活性炭治疗^[4], 但缺乏相关研究资料的支持。为此, 本课题组通过动物实验, 研究活性炭对溴敌隆急性中毒的疗效。

1 材料与方

1.1 材料与仪器

溴敌隆母粉, 纯度 98%, 天津市天庆化工有限公司提供, 取 0.2 g 与 DMF 和曲拉通-100 各 2 mL 充分溶解后加蒸馏水稀释成 0.25 g/L 浓度, 染毒备用; 溴敌隆标准品, 纯度 98.5%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司生产, 供制定色谱标准曲线用; GH101 型活性炭粉末, 北京光华晶科活性炭有限公司生

产, 灌胃时加水调制成 10% 悬浊液; 枸橼酸钠, 分析纯, 北京化学试剂公司生产, 配制 109 mmol/L 水溶液; 乙腈, HPLC 色谱纯, 美国 FISHER SCIENTIFIC 公司生产; PT/APTT 试剂盒 (液体) 及质控血浆, 德国美创公司生产。

雄性家兔, 体重 2.0~2.5 kg, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供 [许可证编号: SCXK (京) 2005-0002], 实验前在中国医学科学院药物研究所一级动物房常规饲养 3 d 以适应实验室环境, 动物可自由饮水和进食, 染毒前 24 h 禁食、禁水, 所有动物待染毒和给活性炭 (或清水) 结束后统一恢复饮水和进食。低速台式离心机 DI5-2 (北京时代北利离心机有限公司生产); Coatron M2 双通道全自动凝血仪 (德国德高 TECO 公司生产)。

1.2 溴敌隆染毒剂量的确定

通过预实验确定溴敌隆染毒剂量为 0.5 mg/kg。在该剂量下, 家兔染毒后 24 h 开始出现凝血功能障碍, 5~10 d 出现大量死亡。通过测定家兔血中溴敌隆浓度和凝血功能 (PT 和 APTT), 观察其死亡情况。

1.3 方法与步骤

将 20 只家兔随机分成 4 组, A、B、C 组均给予溴敌隆灌胃染毒 (0.5 mg/kg), 每组 6 只; D 组 2 只, 给予 0.5% 的 DMF 曲拉通水溶液灌胃 (2 mL/kg) 作为溶剂对照组。A 组为早期治疗组, 家兔染毒 15 min 后给予活性炭灌胃治疗; B 组为延迟治疗组, 家兔染毒 2.5 h 后给予活性炭灌胃治疗; C 组为未治疗组, 家兔染毒 2.5 h 后给予等量清水灌胃。

所有家兔分别于染毒前 0.5 h、染毒后 3 d 和 16 d 经耳中央动脉采血测定凝血酶原时间 (PT) 和部分凝血活酶时间 (APTT), 染毒后 24 h 经耳中央动脉采血测定血中溴敌隆浓

收稿日期: 2010-03-10

基金项目: 科技部卫生行业科研专项突发化学中毒事件第一现场处置关键技术研究 (200802020)

作者简介: 王明良 (1982-) 女, 硕士, 医师, 从事职业卫生工作。

* 通讯作者, 研究员, E-mail: pccsun@163.com