三氯乙烯致敏豚鼠肝脏 MDA含量和 SOD活力的测定

徐辉[1]，冷静[1]，沈彤[2]，王红艳[2]，朱启星[1,2*]

（1. 安徽医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生系，安徽 合肥 230032；2 安徽医科大学皮肤病研究所，安徽 合肥 230032）

摘要：目的 探讨氧化应激在三氯乙烯（trichloroethylene，TCE）致敏豚鼠肝损伤中的作用。方法 选用体重 250～300 g的白色雌性豚鼠，随机分成空白对照组，溶剂（橄榄油）对照组，TCE处理组。根据豚鼠最大值实验（guinea pig maximization test，GPMT）方法处理豚鼠。按照《化学品毒性鉴定技术规范》的评分标准对动物的皮肤反应进行评分，评分≥1的判为致敏。在终末激发后 24 h和 72 h取材，对肝组织进行病理学检查，并分别测定血清中丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天门冬氨酸氨基转移酶（AST）和白蛋白（ALB）和肝脏中的丙二醛（MDA）含量、超氧化物歧化酶（SOD）活力。结果 TCE处理组致敏率为 65.38%。TCE致敏 72 h组中见到较多肝细胞水肿，并有胞核破裂消失。TCE致敏 72 h组 ALT和 AST水平比 TCE致敏 24 h组和 TCE未致敏 72 h组升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；TCE致敏 72 h组 ALB水平比溶剂对照组和 TCE未致敏 72 h组降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）。TCE致敏 24 h和 72 h组肝 MDA含量与溶剂对照组相比明显升高，且差异有统计学意义（$P<0.05$）；TCE致敏 24 h组肝 SOD活力与溶剂对照组相比较明显降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），而 TCE致敏 72 h组肝 SOD活力与溶剂对照组相比较明显升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。结论 TCE可引起致敏豚鼠肝损伤，氧化应激在肝损伤中发挥一定的作用。

关键词：三氯乙烯；氧化应激；超氧化物歧化酶（SOD）；丙二醛（MDA）

中图分类号：R758.22；O623.221 文献标识码：A 文章编号：1002－221X(2010)06－0406－04

Determination of MDA level and SOD activity in liver of TCE sensitized guinea pig

XU Hui[1], LENG Jing, SHEN Tong, WANG Hong-yan, ZHU Qi-xing[2*]

(1. Department of Occupational and Environmental, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. Institute of Dermatology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of oxidative stress on liver damage in trichloroethylene (TCE) sensitized guinea pigs. Methods White female guinea pigs (250—300 g) were randomly divided into blank control group, solvent (olive oil) control group and TCE treatment group. Guinea pigs were treated with Guinea Pig Maximization Test (GPMT). According to "Chemical Toxicity Appraisal Technology Standard", the animal was considered as sensitized if the skin reaction score was greater than or equal to 1. The liver samples were taken at 24 h and 72 h after last stimulation respectively, then performed pathological examinations and detected AST, ALT activities and ALB levels in serum, and MDA level, SOD activity in liver with kits. Results The sensitization rate was 65.38% in TCE treatment group. Rats in TCE sensitized 72 h group could be seen more cellular edema in liver, and some nucleus rupture or effacement. The levels of ALT and AST were increased significantly ($P<0.05$) compared with TCE sensitized 24 h group and 72 h TCE un-sensitized group, while the level of ALB was decreased significantly ($P<0.05$) compared with TCE solvent control group and TCE un-sensitized 72 h group. The MDA levels in liver of both 24 h and 72 h TCE sensitized groups were significantly higher ($P<0.05$) compared with solvent control group; the SOD activity of the liver in TCE sensitized 24 h group was decreased compared with the control group, while the SOD activity of liver in TCE sensitized 72 h group was significantly higher ($P<0.05$). Conclusion TCE can cause liver injury in sensitized guinea pigs, the oxidative stress plays some role in liver injury by TCE.

Key words: trichloroethylene (TCE); oxidative stress; superoxide dismutase (SOD); malondialdehyde (MDA)

近年来职业性 TCE中毒时有发生，TCE的职业暴露主要通过呼吸道吸入和皮肤的直接接触。TCE可引起皮肤、肝脏、肾脏等多脏器及神经系统的损害[1,2]，高浓度 TCE暴露可造成人体肝脏等器官的损害[3]。有研究表明，接触低浓度 TCE，可使脂质过氧化作用加强，脂质过氧化产物增多，同时刺激机体抗氧化酶系统，使机体抗氧化物酶系统反应性升高，呈现一种应激状态[4]。目前对于三氯乙烯致敏豚鼠肝损伤的机制还不太清楚，因此本研究按照豚鼠最大

收稿日期：2010－06－30

基金项目：国家自然科学基金资助项目（30872147）；教育部科学技术研究重点项目（210100）；安徽省教育厅自然科学重点科研项目（KJ2009A73）

作者简介：徐辉（1984－），男，硕士研究生，研究方向：皮肤毒理学。

*：通讯作者，教授，博士研究生导师，E-mail：zqxing@yeah.net

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

值实验 (GPMT) 建立 TCE动物致敏模型，通过对肝组织进行病理学检查，并分别测定血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、白蛋白 (ALB) 和肝脏中的 MDA含量、 SOD活力，探讨氧化应激在 TCE致敏豚鼠肝损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

三氯乙烯、弗氏完全佐剂 (FCA，美国 Sigma公司产品)，十二烷基硫酸钠 (SLS)、2,4-二硝基氯苯 (DNCB，日本产品，上海化学试剂采购站进口分装)，橄榄油 (中国医药上海化学试剂公司产品)，超氧化物歧化酶 (SOD) 测试盒和丙二醛 (MDA) 测试盒 (南京建成生物工程研究所)。低温高速离心机 (德国 Hettich Universal320/320R)，酶标仪 (美国 BioTek公司产品)，全自动生化分析仪 (瑞士 Roche公司 Modular DPP)，生物图像分析系统 (Nikon-Eclipse-80 生物显微镜)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组和处理 选用体重为 250~300 g 的白色雌性豚鼠适应性饲养 5~7 d，选取健康动物随机分成空白对照组 (5只)、溶剂对照组 (5只) 和 TCE处理组 (26只)。用 GPMT方法建立动物致敏模型，并在终末激发后依据致敏结果以及取材时点的不同 (分别在 24 h和 72 h取材)，将 TCE处理组分为 TCE致敏 24 h组、 TCE致敏 72 h组和 TCE未致敏 24 h组、 TCE未致敏 72 h组。实验前通过预实验确定 TCE诱导及激发浓度，并在实验前 24 h 用小型电动剃刀剔去豚鼠颈背部被毛，面积 4 cm×6 cm。第 1天 TCE实验组注射 5% TCE (TCE∶橄榄油 = 5∶95) 进行初次致敏，空白对照组不做任何处理，溶剂对照组注射橄榄油；第 8天，TCE组用 40% TCE涂皮，然后用两层纱布，一层玻璃纸覆盖，无刺激胶布封固 48 h进行第 2次诱导致敏，空白对照组仅用赋形剂作诱导处理，溶剂对照组涂橄榄油。48 h后用生理盐水溶液清洗；第 15天，TCE组用 20% TCE涂抹进行激发，方法同上。24 h后用生理盐水溶液清洗，观察皮肤反应。实验结束时心脏采血，处死动物无菌取肝组织。

1.2.2 视觉评分 末次激发后 24 h依据《化学品毒性鉴定技术规范》(卫监督发【2005】272号) 中皮肤致敏反应实验评分标准：无反应为 0分；散在或小块红斑为 1分；中度弥漫的红斑、轻度水肿为 2分。观察和记录受试区的皮肤反应情况并进行拍照，对皮肤反应进行评分。当受试样品组动物皮肤反应积分≥1时，应判为皮肤致敏反应阳性。

1.2.3 肝组织病理学检查 实验完毕，处死动物，迅速取下肝脏，除去脂肪以及结缔组织，浸泡于 10%福尔马林固定，脱水，石蜡包埋。组织蜡块在切片机下连续切片，厚度为 3 μm，进行 HE染色。由安徽医科大学病理教研室医师读片。

1.2.4 肝功能指标 ALT、AST、ALB的测定 心脏采血后，3 000 r/min 离心 15 min 取血清，在全自动生化分析仪上检测。

1.2.5 肝组织匀浆液的制备 取肝组织块 0.2 g，用移液管量取 0.86%冷生理盐水，生理盐水的体积总量应该是组织块重量的 9倍，将剪碎的组织倒入玻璃匀浆管中制成匀浆，将制备好的 10%匀浆用低温离心机 2 000 r/min 4 ℃，离心 10 min 将离心好的匀浆弃沉淀取上清，分装待用。

1.2.6 肝组织匀浆中 MDA含量、 SOD活力测定 取肝组织匀浆离心后的上清 100 μl 按 MDA试剂盒说明书操作。将肝组织匀浆离心后的上清稀释到浓度为 1%，取 10 μl 按 SOD试剂盒说明书操作。采用考马斯亮蓝法测定肝组织蛋白含量，通过计算即可求出被测样品中 MDA含量及 SOD活力。

1.3 统计学分析

数据录入到 Excel数据库中，用 SPSS13.0软件进行分析，所有计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组间的差异用单因素方差分析，采用 LSD法，检验水准取 $\alpha = 0.05$。

2 结果

2.1 皮肤反应视觉评分结果

本次致敏实验中，空白对照组和溶剂对照组均未见红斑或水肿；TCE处理组 26只豚鼠有 17只致敏，致敏率 65.38%。

2.2 肝脏组织病理学改变

空白对照组、溶剂对照组豚鼠肝细胞排列整齐，胞质均匀，胞核大而圆，核仁明显，核膜清晰；TCE未致敏组能偶见肝细胞水肿；TCE致敏 24 h组中能够见到少量肝细胞水肿；TCE致敏 72 h组中能够见到较多肝细胞水肿，并有胞核破裂消失。见图 1 (封三)。

2.3 肝功能指标的测定

溶剂对照组肝功能各指标与空白组相比，差异无统计学意义 ($P>0.05$)；TCE致敏 24 h、72 h组 ALT水平与溶剂对照组相比升高，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；TCE致敏 72 h组 ALT和 AST水平比 TCE致敏 24 h组和 TCE未致敏 72 h组升高，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；TCE致敏 72 h组 ALB水平比溶

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

剂对照组和 TCE未致敏 72 h组降低，差异有统计学意义 （P<0.05）。见表 1。

表 1 肝功能测定结果 （$\bar{x}\pm s$）

组 别	ALT（IU/L）	AST（IU/L）	ALB（g/L）
空白对照组	58.50±5.56	61.50±3.11	28.07±3.40
溶剂对照组	60.40±6.42	62.80±3.96	28.75±2.30
TCE致敏 24 h组	87.80±6.87[a]	85.68±3.99	27.32±3.60
TCE未致敏 24 h组	62.16±5.19	64.00±3.61	28.73±2.30
TCE致敏 72 h组	107.60±6.41[abc]	114.92±9.25[abc]	24.30±4.11[ab]
TCE未致敏 72 h组	64.83±6.11	63.85±6.94	29.17±1.03[c]

注：a 与溶剂对照组相比，P<0.05；b 与相应时点 TCE未致敏组相比，P<0.05；c 与 TCE致敏 24 h组相比，P<0.05。

2.4 各组动物肝组织匀浆中 MDA含量

多个剂量组比较前先进行方差齐性检验，结果显示，溶剂对照组肝组织匀浆中 MDA含量与空白对照组相比，差异无统计学意义 （P>0.05）；TCE致敏 24 h和 72 h组肝 MDA含量与溶剂对照组相比较差异有统计学意义 （P<0.05）。在 24 h和 72 h，TCE致敏组与未致敏组比较，差异有统计学意义 （P<0.05）；未致敏组与溶剂对照组比较，差异无统计学意义 （P>0.05）。见表 2。

2.5 各组动物肝组织匀浆中 SOD活力

溶剂对照组肝组织匀浆中 SOD活力与空白对照组相比，差异无统计学意义 （P>0.05）。TCE致敏 24 h组肝 SOD活力与溶剂对照组相比较明显降低，差异有统计学意义 （P<0.05）；TCE致敏 72 h组肝 SOD活力与溶剂对照组相比较明显升高，差异有统计学意义 （P<0.05）。在 24 h和 72 h两个时点，致敏组与未致敏组比较，差异有统计学意义 （P<0.05）；未致敏组与溶剂对照组比较，差异无统计学意义 （P>0.05）。见表 2。

表 2 不同组别豚鼠肝组织匀浆中 MDA含量和 SOD活力 （$\bar{x}\pm s$）

组 别	MDA（nmol/mg prot）	SOD（U/mg prot）
空白对照组	0.305±0.061	12.633±0.594
溶剂对照组	0.306±0.019	12.429±1.136
TCE致敏 24 h组	0.409±0.025[ab]	8.277±0.278[ab]
TCE未致敏 24 h组	0.318±0.024	12.553±2.408
TCE致敏 72 h组	0.522±0.096[ab]	17.122±2.525[ab]
TCE未致敏 72 h组	0.315±0.071	12.611±2.221

注：a 与溶剂对照组相比，P<0.05；b 与相应时点 TCE未致敏组比较，P<0.05。

3 讨论

TCE作为一种常用的工业有机溶剂，其对机体的毒性很早就被学者们发现和研究证实，TCE所致的接触工人皮肤损伤的报道也越来越多，其中个别病例甚至会发生严重的 TCE药疹样皮炎 （dermatitis medicamentosa-like of trichloroethylene，DMLT）。同时近年来还发现不少死亡病例的病因与严重的肝损伤引起的多脏器功能衰竭有关，因此由 TCE致敏引起的肝损伤引起了人们的高度重视。根据对 TCE药疹样皮炎病例的资料调查发现，TCE药疹样皮炎的病人常常伴有严重肝损伤，而肝损伤是引起多脏器衰竭导致死亡的主要原因。有资料表明长期接触低剂量 TCE对作业工人有脂质过氧化作用[5]。本课题组[6~8]前期通过体外实验研究 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。已有资料表明 TCE可引起肝脏脂质过氧化并造成肝损害[9,10]。所以在 TCE所致的肝损伤中，可能是多种因素共同作用的结果，氧化应激在其中可能也起到一定的作用。

脂质过氧化 （LPO）是指在不饱和脂肪酸（PFUA）中发生的一系列自由基反应，与某些疾病的发生发展及衰老等有很大关系。当环境中的物理因素或外源化学物质直接或间接诱导产生的大量自由基超过了机体的清除能力，或内源性自由基产生和清除失去平衡，就会使机体处于氧化应激，进而造成机体的损害。SOD是一种重要的抗氧化酶，它对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要作用，SOD活力的高低间接反映了机体清除自由基的能力。而 MDA是重要的脂质过氧化产物之一，测定 MDA的量可以反映机体内脂质过氧化反应的程度，间接反映出细胞损伤的程度。

本研究结果显示，TCE致敏 72 h组 ALT和 AST水平比 TCE致敏 24 h组和 TCE未致敏 72 h组升高，差异有统计学意义 （P<0.05）；TCE致敏 72 h组 ALB水平比溶剂对照组和 TCE未致敏 72 h组降低，差异有统计学意义 （P<0.05）。转氨酶是反映肝细胞损伤的指标，白蛋白水平则代表肝脏的合成功能，这说明 TCE致敏组出现肝损伤且肝损伤的程度在末次激发到致敏后 72 h是逐步加重的。此外，肝组织病理检查结果显示，TCE致敏 24 h组中能够见到少量肝细胞水肿，而 TCE致敏 72 h组中则见到较多肝细胞水肿，并有胞核破裂消失，进一步说明了 TCE致敏豚鼠肝损伤的程度是逐步加重的。但肝损伤的程度在 TCE致敏 72 h后会不会减轻，这将是本课题组下一步的研究方向。TCE致敏 24 h和 72 h组肝 MDA含量与溶剂对照组相比明显升高，（下转第 450页）

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

度的去人格化、52.32%的医护人员存在高度的低个人成就感，表明该医院护士体验了高度的职业倦怠，印证了护士属于高压力职业的结论[5]。护理工作的性质及特点决定了护士的巨大工作压力，而高强度的工作压力会使护士产生职业倦怠。随着社会对护理工作的要求不断提高，她们每天除了付出大量的体力与脑力劳动外，还得不到足够的理解和支持，加之医院每个月对护士业务素质进行考核测评，使原本工作压力较大的护士感到更加紧张，加重了职业倦怠的体验。

3.2 压力源对护士职业倦怠状况的影响

多因素分析结果显示，工作压力源（工作量大、角色模糊、人际关系紧张等）与职业倦怠状况有关，工作压力越大，护士的情绪耗竭和去人格化程度越高，即个体倦怠感越重。李晓雯等[6]、吴惠娟[7]等研究也得出了相同的结果。在护理工作中，如果护士对自己角色存在不确切的感知，对工作的要求、自己的职责不太清楚，加上工作量大，平时还要常常面对病人、家属的过高要求，则极易产生职业倦怠。再如儿科护士面对患儿哭闹、配合差、家长溺爱和焦急心理，急诊科护士面对的多为危重病人，加重了护士的紧张感和消极心理，再者患者家属在紧急危重情况下常提出一些无理要求和出现语言过激的情况，这会使护士产生消极情绪，表现为工作效率低、情绪低下、个体无成就感等，且加重护士的职业倦怠程度。李小光[8]等研究显示角色模糊对情绪衰竭有较强的预测作用。

3.3 人格特征和应对方式对职业倦怠的影响

护士人格特征（认为护理工作有意义、把复杂工作看作个人能力的挑战、坚信努力可改变现状）越积极，越不易产生职业倦怠或倦怠水平降低。积极人格特征和收入满意度、社会支持、护理工作认可度高，会使其积极投身工作中，缓解护士的情感衰竭；积极人格特征、社会支持、积极的应对、收入满意度的提升可降低去人格化程度，如果工作的目的除了实现个人价值外，就是获得工资养家糊口，再面对较低的收入，没有家人和朋友的支持鼓励和开导，就会产生离职想法，对工作产生倦怠感，影响工作效率和质量。积极的人格特征和应对方式可提升个人成就感。

本研究结果显示，该医院护理人员职业倦怠情况较为普遍，管理者应采取相应措施缓解护士的职业倦怠程度。为此提出如下措施，护理人员应正确评估自己，不断加强学习，提升职业心理素质；医院加强科学管理，建立规范的工作流程，减少护士的超负荷工作。同时应采取各种措施提高护士对工作的满意度，以降低护士工作倦怠的程度。

参考文献：

[1] Maslach C, Schaufeli W B, Leiter M P. Job burnout[J]. Annual Review of Psychology, 2001, 52(1): 397-422.

[2] 王晓春，甘怡群. 国外关于工作倦怠研究的现状述评[J]. 心理科学进展，2003, 11(5): 567-572.

[3] 唐颖，Eva Garrosa 雷玲，等. 护士职业倦怠量表（NBS）简介[J]. 中国职业医学，2007, 34(2): 151-153.

[4] 李超平，时勘，罗正学，等. 医护人员工作倦怠的调查[J]. 中国临床心理学杂志，2003, 11(3): 170-172.

[5] 华小芬. 美国护士职业压力与护士短缺危机的最新研究[J]. 护理与康复，2003, 3(2): 133-135.

[6] 李晓雯，谷金君，徐广益，等. 综合医院护士职业倦怠与工作压力、自尊及控制点的关系研究[J]. 护理学杂志（外科版），2007, 22(14): 1-3.

[7] 吴惠娟，沈鉴清，章秋萍. 护士职业倦怠情况与压力源的关系分析[J]. 护理学报，2007, 14(8): 83-85.

[8] 李小光，徐娅霞. 角色冲突和角色模糊对护士工作倦怠的影响[J]. 长江大学学报，2006, 29(4): 110-112.

（上接第 408页）

差异有统计学意义（P<0.05）；TCE致敏 24 h组肝 SOD活力与溶剂对照组相比较明显降低（P<0.05），而 TCE致敏 72 h组肝 SOD活力与溶剂对照组相比较明显升高（P<0.05），说明 TCE可引起致敏豚鼠肝脏发生氧化应激反应，这与张锦周等[9]研究结果一致。至于 TCE致敏 72 h组肝 SOD的活力升高，可能是三氯乙烯在肝脏被代谢形成的自由基的刺激而表现出来的一种反应性升高。本次实验可以说明，TCE可引起致敏豚鼠肝损伤，氧化应激在三氯乙烯致敏豚鼠肝损伤中发挥一定的作用。

参考文献：

[1] Michihiro Kamijima, Hailan Wang, Tamie Nakajima, et al. Trichloroethylene causes generalized hyperesensitivity skin disorders complicated by hepatitis[J]. J Occup Health, 2008, 50(4): 328-338.

[2] Sanz P, Nogue S, Vilchez D, et al. Myoclonic encephalopathy after exposure to trichloroethylene[J]. Industrial Health, 2008, 46(6): 635-637.

[3] Chiu W A, Caldwell J C, Keshava N, et al. Key scientific issues in the health risk assessment of trichloroethylene[J]. Environ Health Perspect, 2006, 114: 1445-1449.

[4] 黄锦生，陈惠珍. 低浓度三氯乙烯对人体抗氧化物酶系统影响[J]. 中国公共卫生，2002, 18(3): 282-283.

[5] 杨翠婵，李伯灵，邹志方. 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.

[6] Zhu Q X, Shen T, Ding R, et al. Cytotoxicity of trichloroethylene and perchloroethylene on normal human epidermal keratinocytes and protective role of vitamin E[J]. Toxicology, 2005, 209(1): 55-67.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 张锦周，黄海雄，庄志雄，等. 三氯乙烯急性染毒对大鼠肝脂质过氧化的影响[J]. 中国公共卫生，2000, 16(4): 308-309.

[10] 黄海燕，庄志雄，刘建军. 三氯乙烯中毒表现及其作用机制研究进展[J]. 环境与职业医学，2006, 23(1): 79-81.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

高温对睾丸细胞内活性氧水平的影响及川芎嗪保护作用的研究(正文见 403～405 页)

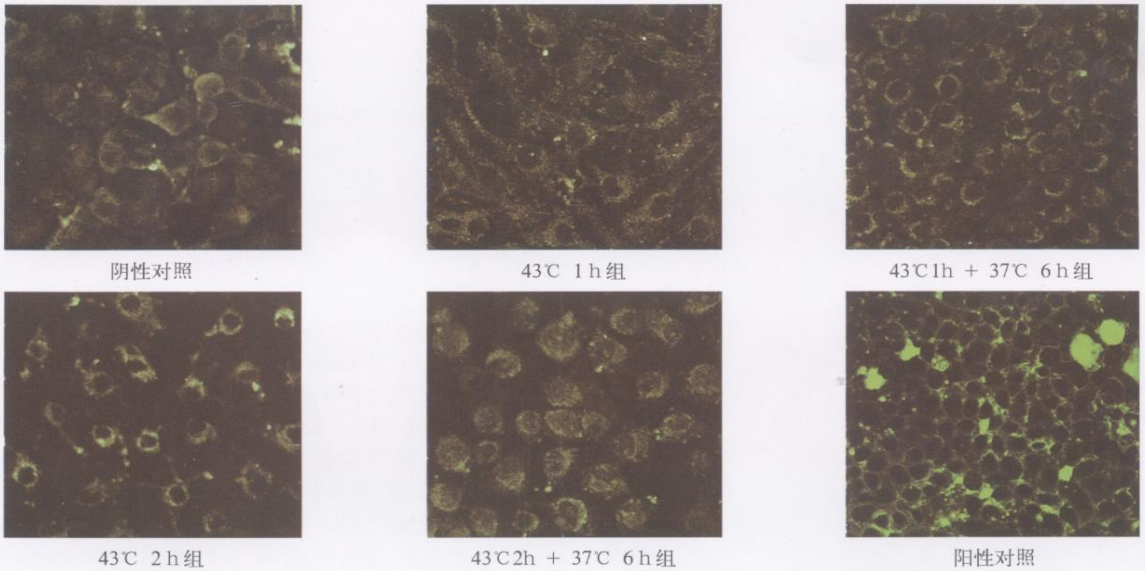

图 1 高温对睾丸细胞内活性氧水平的影响（激光共聚焦显微镜，600 ×）

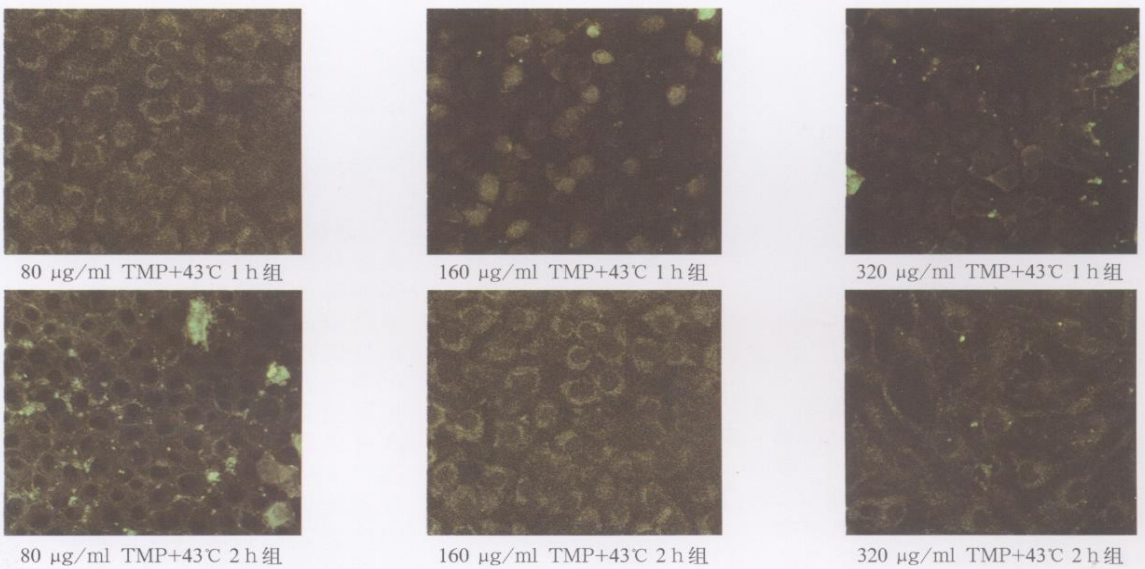

图 2 高温 +TMP 对睾丸细胞内活性氧水平的影响（激光共聚焦显微镜，600 ×）

三氯乙烯致敏豚鼠肝脏 MDA 含量和 SOD 活力的测定(正文见 406～408 页)

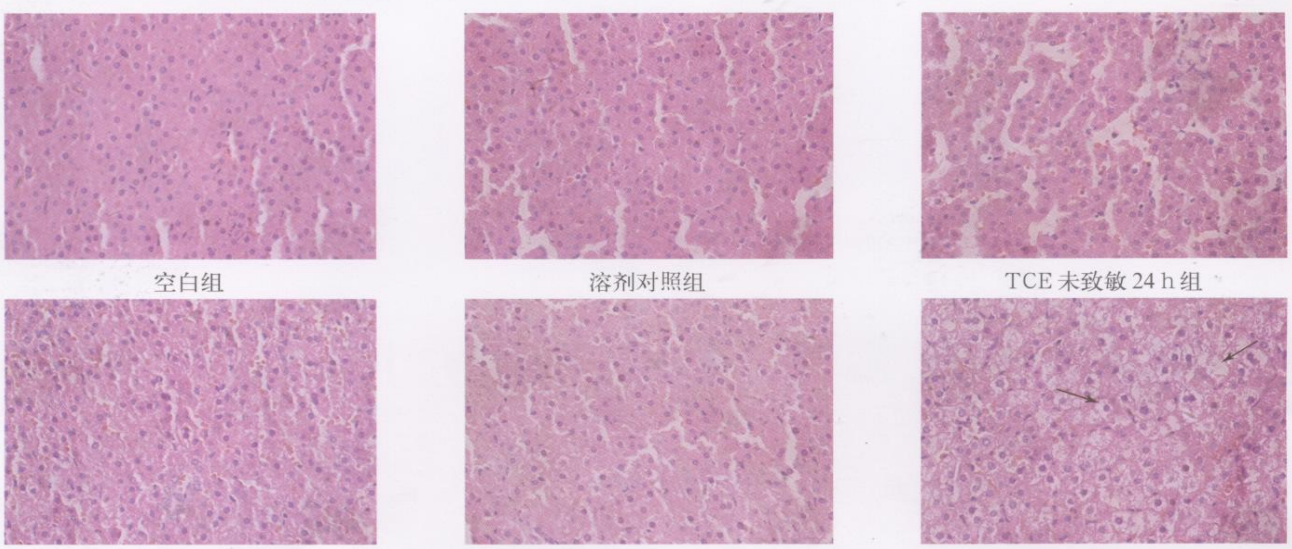

图 1 各组肝脏组织病理学改变（HE，200 ×）

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net