

· 实验研究 ·

1,2-二氯乙烷的体内代谢对小鼠脑水肿形成的影响

Effect of 1,2-dichloroethane metabolism on mice brain edema formation

杨光谦¹, 谭孝琼¹, 朴杰¹, 唐宏阁¹, 张军², 王高阳¹, 赵凤红¹, 金亚平¹

(1. 中国医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 辽宁 沈阳 110122; 2. 辽宁医药职业学院卫生管理系, 辽宁 沈阳 110101)

摘要: 通过气相色谱法对小鼠血和脑组织中 1,2-二氯乙烷(1,2-DCE) 和氯乙酸的浓度进行检测, 同时对小鼠进行脑损伤行为学观察和脑含水量的测定。结果显示小鼠血和脑组织中的 1,2-DCE 浓度在染毒结束后 20 min 内分别下降 74.16% 和 64.15%, 半减期分别为 16.2 min 和 18.7 min。血和脑组织中氯乙酸浓度在染毒期间快速升高, 在染毒结束时达到峰值, 染毒结束后 40 min 内氯乙酸浓度相对稳定, 但之后迅速下降, 至 1 h 时, 血和脑组织中氯乙酸浓度分别下降至浓度最高时的 11.45% 和 13.72%。脑损伤行为学观察异常的小鼠表现为抱爪现象, 抱爪小鼠血中氯乙酸含量明显高于不抱爪小鼠。小鼠脑含水量与氯乙酸的浓度呈显著正相关, 相关系数为 0.77。提示 1,2-DCE 的体内代谢程度是影响小鼠脑水肿形成的重要因素。

关键词: 1,2-二氯乙烷; 氯乙酸; 脑水肿; 气相色谱法

中图分类号: R994.3 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2016)04-0298-03

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2016.04.019

1,2-二氯乙烷(1,2-DCE) 主要用于粘合剂、溶剂和氯代烃的生产^[1]。属高毒类物质, 可引起以中毒性脑病为主要临床表现的亚急性职业中毒^[2,3], 其主要病理改变为脑水肿^[4]。1,2-DCE 在体内主要经肝脏 CYP2E1 进行代谢^[5], 代谢产物有 2-氯乙醇、2-氯乙醛和氯乙酸等^[6]。作为 1,2-DCE 的体内代谢终产物, 氯乙酸的浓度反映 1,2-DCE 在体内的代谢程度。本研究通过分析小鼠血和脑组织中氯乙酸水平与脑损伤的关系, 为亚急性 1,2-DCE 中毒性脑水肿机制的研究提供实验参考数据。

1 材料与与方法

1.1 动物分组与染毒

采用雌性昆明种小鼠, 由中国医科大学实验动物中心提供。体重(24±2) g。采用静式吸入方式染毒, 每天染毒 3.5 h, 1,2-DCE 的浓度为 1.2 g/m³, 染毒柜体积为 100 L。实验分 4 部分: (1) 测定小鼠体内 1,2-DCE 浓度的变化, 选取 20 只小鼠, 随机分为 4 组, 每组 5 只, 染毒 1 d。分别于染毒结束后的 0、20、40 和 80 min 取血和脑组织进行 1,2-DCE 浓度测定。(2) 染毒期间和结束后测定小鼠体内氯乙酸浓度的

变化, 选取 45 只小鼠, 随机分为 9 组, 每组 5 只, 染毒 1 d。分别于染毒的 0.5、1、2、3 和 3.5 h 以及染毒结束后的 20、40、50 和 60 min 取血和脑组织进行氯乙酸浓度测定。(3) 脑损伤行为学改变与 1,2-DCE 代谢的关系, 选取 12 只小鼠, 连续染毒 2 d, 末次染毒结束时进行脑损伤行为学观察, 并立即检测血和脑组织 1,2-DCE 和氯乙酸浓度。(4) 脑含水量与 1,2-DCE 代谢的关系, 选取 20 只小鼠, 连续染毒 3 d, 末次染毒结束时检测脑含水量及血和脑组织中 1,2-DCE 和氯乙酸浓度。

1.2 检测方法

1.2.1 血和脑组织中 1,2-DCE 浓度的测定 分别取 0.25 ml 血液和 0.15 g 脑组织放入 Ep 管中, 加入 0.5 ml 正己烷。脑组织匀浆后, 将样品振荡萃取 3 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 取上层萃取液 1 μl 进行气相色谱分析。

1.2.2 血和脑组织中氯乙酸浓度的测定 在样本瓶中加入 0.25 ml 血和 0.25 ml 去离子水, 另取样本瓶加入 0.15 g 脑组织和 0.5 ml 去离子水, 匀浆 1 min。在血和脑组织匀浆液中分别依次加入 0.4 ml 硫酸和 0.8 ml 甲醇, 混匀, 60℃ 恒温水浴 1 h, 加入 1.0 ml 正己烷振荡萃取 3 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上层萃取液 1 μl 进行气相色谱分析。

1.2.3 小鼠脑损伤行为学观察 将小鼠尾巴轻轻提起使小鼠头朝下悬空, 观察小鼠四肢伸展情况。正常小鼠四肢能够自然伸展。脑损伤小鼠四肢不能完全伸展, 出现双前肢或双后肢相互交叉的抱爪现象^[7]。

1.2.4 脑含水量测定 取一侧脑组织新鲜称重(湿重)后, 置于 100℃ 恒温器中 24 h, 取出后立即称重(干重)。

脑含水量 = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%。

1.3 统计分析

所有实验数据均经 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。正态分布数据用算术均数表示, 经对数转换符合正态分布实验数据用几何均数表示。组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 方法。相关性分析采用 Pearson 相关性检验。

2 结果

2.1 染毒结束后小鼠血和脑组织中 1,2-DCE 浓度变化

表 1 所示, 小鼠血和脑组织中 1,2-DCE 浓度在染毒结束后迅速下降。1,2-DCE 在小鼠血和脑组织中的半减期分别为 16.2 min 和 18.7 min。

2.2 染毒期间和染毒结束后不同时间点小鼠血和脑组织中氯乙酸浓度的变化

收稿日期: 2016-01-14; 修回日期: 2016-03-20

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81172644, 81573105); 辽宁省高等学校优秀人才支持计划(LR2013038)

作者简介: 杨光谦(1988—), 男, 硕士在读, 研究方向: 职业卫生与防护。

通讯作者: 金亚平, 教授, E-mail: jinyp@mail.cmu.edu.cn。

表 1 染毒结束后不同时间点的血和脑组织中 1,2-DCE 检测结果 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

时间 (min)	血		脑组织	
	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	下降比例 (%)	浓度 ($\mu\text{g/g}$)	下降比例 (%)
0	1.780±0.339	—	0.993±0.265	—
20	0.460±0.117*	74.16	0.356±0.019*	64.15
40	0.208±0.026**	88.31	0.130±0.038**	86.91
80	0.052±0.015** Δ	97.08	0.050±0.009** Δ	94.96

注：与 0 min 组比较，* $P<0.05$ ；与 20 min 组比较，# $P<0.05$ ；与 40 min 组比较， $\Delta P<0.05$ 。

表 2 显示，染毒期间小鼠血和脑组织中氯乙酸浓度呈现不断增加趋势，并在染毒结束时达到最大值。

表 2 染毒不同时间点血和脑组织中氯乙酸浓度检测结果 ($G\pm s$, $n=5$)

时间 (h)	血中氯乙酸 ($\mu\text{g/ml}$)	脑组织中氯乙酸 ($\mu\text{g/g}$)
0.5	0.03±0.42	3.66±1.57
1	0.28±1.09*	2.32±2.92
2	3.16±2.56**	4.83±2.10#
3	7.42±2.09**	10.72±1.17**
3.5	22.87±4.36** Δ \blacktriangle	15.53±1.51** Δ

注：与染毒 0.5 h 组比，* $P<0.05$ ；与染毒 1 h 组比，# $P<0.05$ ；与染毒 2 h 组比， $\Delta P<0.05$ ；与染毒 3 h 组比， $\blacktriangle P<0.05$ 。G—几何均数。

表 3 显示，在染毒结束后的 40 min 内，小鼠血和脑组织中氯乙酸浓度保持相对稳定；其后氯乙酸浓度快速下降。至 60 min 时，血和脑组织中氯乙酸浓度分别下降至最高浓度时的 11.45% 和 13.72%。

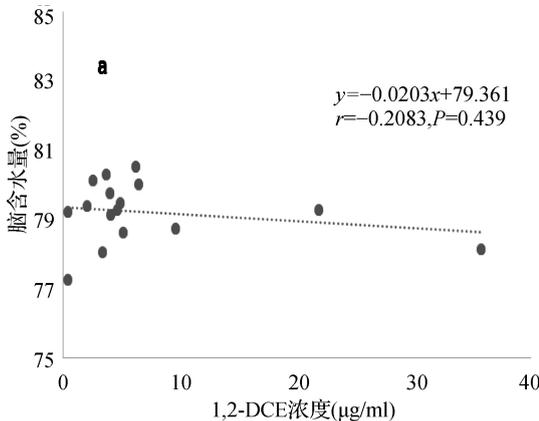


表 3 染毒结束后不同时间点血和脑组织中氯乙酸浓度检测结果 ($G\pm s$, $n=5$)

时间 (min)	血中氯乙酸 ($\mu\text{g/ml}$)	脑组织中氯乙酸 ($\mu\text{g/g}$)
0	22.87±4.36	15.53±1.51
20	26.14±1.31	18.21±2.26
40	41.24±1.25*	20.99±1.11
50	10.29±1.34** Δ	4.70±1.56** Δ
60	4.72±1.91** Δ \blacktriangle	2.89±2.88** Δ

注：与 0 min 组比，* $P<0.05$ ；与 20 min 组比，# $P<0.05$ ；与 40 min 组比， $\Delta P<0.05$ ；与 50 min 组比， $\blacktriangle P<0.05$ 。

2.3 小鼠脑损伤的行为学异常与 1,2-DCE 代谢的关系

表 4 可见，12 只小鼠经过连续 2 d 的染毒后，有 6 只小鼠出现脑损伤的行为学异常，即抱爪现象。抱爪组小鼠血中氯乙酸浓度显著高于不抱爪组。

表 4 脑损伤行为学改变与小鼠体内 1,2-DCE 和氯乙酸浓度的关系 ($\bar{x}\pm s$)

行为学表现	样本数	血中 1,2-DCE ($\mu\text{g/ml}$)	血中氯乙酸 ($\mu\text{g/ml}$)	脑中氯乙酸 ($\mu\text{g/g}$)
不抱爪	6	12.41±6.16	18.07±7.81	17.23±9.24
抱爪	6	7.18±3.34	30.10±7.73*	27.19±9.65

注：与不抱爪组相比，* $P<0.05$ 。

2.4 小鼠脑含水量与血中 1,2-DCE 和氯乙酸浓度的相关关系

小鼠脑含水量与血 1,2-DCE 的线性关系较差，相关系数 $r = -0.2083$, $P = 0.439$ ，无统计学意义；而小鼠脑含水量与血中氯乙酸浓度的相关关系较好， $r = 0.7712$, $P < 0.001$ ，有统计学意义。见图 1。

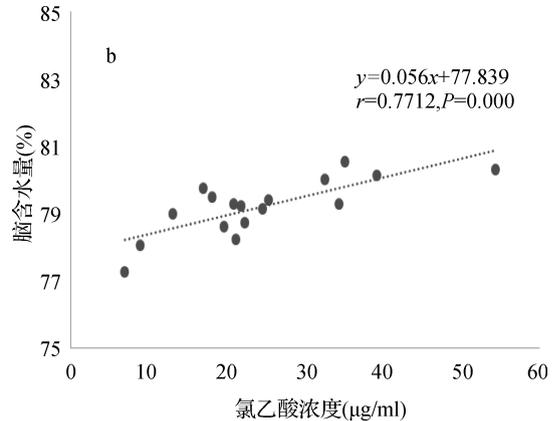


图 1 小鼠脑含水量与血中 1,2-DCE 和氯乙酸浓度的相关关系 ($n=20$)

3 讨论

作为易挥发的有机溶剂，染毒结束后小鼠体内的 1,2-DCE 可以随呼气迅速排出体外，使血和脑组织中 1,2-DCE 浓度迅速下降。Take 等人的检测结果显示^[8]，染毒后大鼠的血、脑、肝脏等组织中的 1,2-DCE 也出现迅速降低，其半减期介于 27 min 和 34 min 之间，本研究中，小鼠血和脑组织中 1,2-DCE 的半减期分别为 16.2 min 和 18.7 min。

染毒期间小鼠血和脑组织中氯乙酸的浓度随着 1,2-DCE 暴露时间的延长快速上升，在染毒结束后的 40 min 内仍保持

比较高的浓度。该研究结果提示，随着小鼠体内 1,2-DCE 浓度的不断升高，肝组织中 CYP2E1 对 1,2-DCE 的代谢能力不断增强，产生大量氯乙酸进入血液。这也表明氯乙酸是 1,2-DCE 在体内的主要代谢产物。而脑组织中氯乙酸浓度的快速升高有两种可能，一是血液中的氯乙酸透过血脑屏障进入脑组织，二是 1,2-DCE 在脑组织中 CYP2E1 的代谢下产生。迄今的研究显示，脑组织的多个部位有 CYP2E1 的表达^[9]，由于 1,2-DCE 具有良好的脂溶性，易透过血脑屏障进入脑组织，并在脑组织中 CYP2E1 的代谢下产生氯乙酸。另一方面，由于

1,2-DCE 在 CYP2E1 的代谢过程中产生大量的活性氧自由基及 2-氯乙醇和 2-氯乙醛等高活性中间代谢产物^[10], 对脑组织细胞和血脑屏障等产生损伤, 进而引起脑水肿。

虽然, 血和脑组织中 1,2-DCE 的浓度在染毒结束后的 20 min 内下降程度分别超过 70% 和 60%, 但氯乙酸浓度在染毒结束后的 40 min 内却基本保持稳定或略有升高。这表明作为水溶性较高的代谢产物, 氯乙酸主要通过尿液排出体外, 而由脑组织到血液再到尿液的转运过程需要较长的时间。

小鼠的抱爪现象(腕关节、肘关节屈曲和肩内收屈曲)是 Berderson 等评价缺血性脑损伤引起小鼠行为学改变的重要指征^[7], 小鼠一侧肢体屈曲表明对侧脑组织的损伤, 而双侧肢体屈曲即出现抱爪时, 说明双侧脑组织出现明显的损伤。在 1,2-DCE 中毒性脑水肿形成过程中, 小鼠出现抱爪现象是我们的首次发现。该行为学改变一般早于脑水肿的发生。根据我们建立的亚急性 1,2-DCE 中毒性脑水肿实验动物模型, 实验小鼠暴露 1.2 g/m³ 1,2-DCE、3.5 h/d 连续 3 d 才能出现明显的脑含水量升高。但部分小鼠在连续染毒的第 2 天就可以出现抱爪现象, 本研究结果显示, 小鼠对 1,2-DCE 的代谢能力可能与其引起的脑损伤有关。小鼠暴露的 1,2-DCE 浓度相同, 血和脑组织中氯乙酸的浓度越高, 表明该小鼠对 1,2-DCE 的代谢能力越强, 产生的活性氧和活性中间代谢产物越多, 对脑组织的损伤就越明显。另一方面, 由于部分摄入的 1,2-DCE 被代谢成氯乙酸, 所以血液中 1,2-DCE 的浓度会有所减少。

脑含水量是反映脑水肿严重程度的重要客观指标之一, 脑含水量越多表明脑水肿程度越重。本研究中, 小鼠血中氯乙酸浓度与脑含水量高度相关。进一步提示 1,2-DCE 体内代谢过程中产生的活性氧自由基和中间代谢产物是引起脑损伤和诱发脑水肿的重要因素。

参考文献:

- [1] 夏元洵. 化学物质毒性全书 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 307.
- [2] 李来玉, 陈秉炯, 黄建勋, 等. 1,2-二氯乙烷职业中毒近十年的研究概况 [J]. 中国职业医学, 1999, 26 (6): 44.
- [3] Liu J R, Fang S, Ding M P, *et al.* Toxic encephalopathy caused by occupational exposure to 1,2-dichloroethane [J]. J Neurol Sci, 2010, 292 (1-2): 111-113.
- [4] 杨晓波, 胡海涛, 张艳, 等. 二氯乙烷中毒性脑病 5 例临床及头颅 MRI 分析 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2009, 27 (12): 744-746.
- [5] Davidson I W, Sumner D D, Parker J C. Ethylene dichloride: a review of its metabolism, mutagenic and carcinogenic potential [J]. Drug Chem Toxicol, 1982, 5 (4): 319-388.
- [6] Guengerich F P, Crawford W M Jr, Domoradzki J Y, *et al.* In vitro activation of 1,2-dichloroethane by microsomal and cytosolic enzymes [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1980, 55 (2): 303-317.
- [7] Berderson J B, Pitts L H, Tsuji M, *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. Stroke, 1986, 17 (3): 472-476.
- [8] Take M, Takanobu K, Takeuchi T, *et al.* Distribution of blood and tissue concentrations in rats by inhalation exposure to 1,2-dichloroethane [J]. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 2013, 48 (9): 1031-1036.
- [9] Ledesma J C, Miquel M, Pascual M, *et al.* Induction of brain cytochrome P450 2E1 boosts the locomotor-stimulating effects of ethanol in mice [J]. Neuropharmacology, 2014, 85 (5): 36-44.
- [10] Sweeney L M, Saghir S A, Gargas M L. Physiologically based pharmacokinetic model development and simulations for ethylene dichloride (1,2-dichloroethane) in rats [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2008, 51 (3): 311-323.

砷暴露对不同发育阶段仔鼠海马 SR 水平的影响

Effects of arsenic exposure on the level of SR in the hippocampus of offspring mice at different developmental stages

杨晓霞¹, 栾敏¹, 马越娇², 吴竞¹, 冯旭³, 王艳¹

(1. 沈阳医学院公共卫生学院职业卫生与职业医学教研室, 辽宁 沈阳 110034; 2. 辽宁医药职业学院形态学教研室, 辽宁 沈阳 110101; 3. 沈阳医学院公共卫生学院卫生统计学教研室, 辽宁 沈阳 110034)

摘要: 建立不同发育阶段仔鼠砷暴露模型, 记录体重, 采用水迷宫检测砷暴露对仔鼠学习记忆能力的影响, 取脑组

织并分离海马, 采用 Real-time RT-PCR 检测 SR mRNA 水平。结果显示, 仔鼠出生后 (PND) 20 天, 60 mg/L NaAsO₂ 组仔鼠体重显著低于对照组和 15 mg/L NaAsO₂ 组; PND 40 时 30 和 60 mg/L NaAsO₂ 组仔鼠体重显著低于对照组, 60 mg/L NaAsO₂ 组仔鼠体重显著低于 15 和 30 mg/L NaAsO₂ 组; 水迷宫实验训练第 5 天, 不同剂量砷暴露组仔鼠寻找平台的潜伏期均显著高于对照组; 60 mg/L NaAsO₂ 组仔鼠在撤台后第 II 象限停留时间显著低于对照组; PND20 时, 60 mg/L NaAsO₂

收稿日期: 2015-11-13; 修回日期: 2015-12-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81202158); 辽宁省教育厅资助项目 (No. LJQ2014115)

作者简介: 杨晓霞 (1991—), 女, 硕士研究生, 从事神经毒理学研究。

通讯作者: 王艳, 副教授, 硕士生导师, E-mail: zijing15@tom.com。