

· 综 述 ·

黑索今神经毒性研究进展

高婷, 刘志永, 高永超, 李存治, 赵彬, 李欢, 樊朋, 高俊宏

(兵器工业卫生研究所, 陕西 西安 710065)

摘要: 黑索今 (hexogen, RDX) 为一种具有高度爆炸性的化合物, 由于性能良好被广泛应用于军事和工业中, 其带来的健康损害同时也越来越受到关注。本文现对近年来 RDX 的一般毒性、毒代动力学及神经毒性机制等研究资料进行汇总, 为 RDX 神经毒性机制的深入研究奠定基础。

关键词: 黑索今 (RDX); 毒代动力学; 神经毒性; 机制

中图分类号: R994.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2022)01-0042-03 DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2022.01.013

Research progress on neurotoxicity of hexogen

GAO Ting, LIU Zhi-yong, GAO Yong-chao, LI Cun-zhi, ZHAO Bin, LI Huan, FAN Peng, GAO Jun-hong

(CNGC Institute of Industrial Health, Xi'an 710065, China)

Abstract: Hexogen (RDX) is a highly explosive compound, which is widely used in military and industries due to its good performance. With the wide use of RDX, the health damage by it has also attracted more and more attention. In this paper, the general toxicity, toxicokinetics, neurotoxicity and its mechanism of RDX were summarized, thereby to lay a foundation for the further study of the neurotoxicity mechanism of RDX.

Keywords: hexogen (RDX); toxicokinetics; neurotoxicity; mechanism

黑索今 (hexogen, RDX), 化学名环三甲基三硝胺 (hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazine), CAS 号 121-82-4, 白色晶体, 较难溶解, 仅在一定条件下溶解于有机溶剂和水。RDX 是一种快速爆轰混合型炸药, 广泛应用于军事和工业中, 如雷管、手榴弹和军事弹药的制造。RDX 制造过程中的废物排放及露天燃烧/爆炸等可使土壤和水受到污染。有研究表明, 制造过程工艺废水中 RDX 浓度高达 12 mg/ml^[1]。过度暴露 RDX 会对机体造成损伤, 急性中毒症状以神经系统障碍为主, 同时伴有血液和肝脏损害^[2]。因此, 开展 RDX 神经毒性及其机制研究可为作业人员的健康安全和生态环境安全提供技术支撑。

1 RDX 一般毒性

按照《全球化学品统一分类和标签制度》(GHS) 判定, RDX 属于三类毒性物质 (LD_{50} 50~300 mg/kg)^[3]。有学者对其进行的系列毒理学测试显示, 雄性 SD 大鼠急性经口 LD_{50} 为 71 mg/kg; 雄、雌性小鼠急性经口 LD_{50} 分别为 75、86 mg/kg, 静脉注射 LD_{50} 为 42 mg/kg^[4, 5], 表明 RDX 为中等毒性。

1.1 急性毒性 French 等^[6]发现大鼠单剂量口服 RDX 100 mg/kg, 病理结果显示肝脏超微结构发生了较大变化, 对肾脏超微结构的影响较小。Zhang 等^[7]研究表明, 大脑对 RDX 的敏感性高于肝脏。MacPhail 等^[8]将 RDX 溶于 2% 羧甲基纤维素中, 以 50 mg/kg 剂量单次灌胃 SD 大鼠, 大鼠出现惊吓反应幅度降低、惊吓反应潜伏期增加、迷宫活动减少等多种行为改变。Bannon^[9]研究发现, 幼年猪一次性灌胃 RDX 15 mg/kg, 5 min

后出现癫痫症状, 但诱导成年大鼠癫痫发作需 2 倍以上的剂量, 表明幼年猪对 RDX 的神经作用更为敏感。上述研究结果说明, 单次经口染毒 RDX 会对实验动物神经系统和肝脏造成损害, 且幼年动物比成年动物更为敏感。

1.2 亚慢性毒性 Brown^[10]报道, 在大鼠的饲料中给予 0、0.3、2.5、6.5、15、50 及 100 mg/(kg·d) 剂量的 RDX, 持续 12 周, RDX 亚慢性染毒的无害作用剂量 (NOAEL) 为 0.3 mg/(kg·d)。Crouse 等^[11]给予雄、雌性 Fischer 344 大鼠 RDX 0、4、8、10、12 和 15 mg/(kg·d) 灌胃染毒 90 d, 结果发现 RDX 的 NOAEL 为 4 mg/(kg·d)。以上两项研究结果的差异可能是由于实验动物品系、给药方式及实验期间染毒剂量不同导致。

2 RDX 体内毒代动力学

由于 RDX 泄漏污染环境, 对人、动物以及生态系统中植物构成潜在的毒性危害^[12]。研究表明, 植物对 RDX 的吸收最高。植物中的 RDX 对草食性陆地野生动物和人群可能是一个潜在的暴露途径。急性经口染毒 RDX 后, 在鹿鼠 (peromyscus maniculatus) 和小鼠 (B6C3F1) 的胃、脑和其他器官中发现了低浓度的 RDX 亚硝基衍生物^[13-15]。Bannon^[9]通过胶囊给予约克郡幼年母猪 10~15 mg/kg RDX, 3 h 吸收率达到峰值, 大脑皮层和海马体中 RDX 浓度最高, 其次是心脏、肾脏、肺、肌肉和肝脏, 说明大脑是 RDX 的主要靶器官。为了进一步研究 RDX 在实验动物体内的毒代动力学行为, Schneider 等^[16]给予 SD 大鼠和 Pittman-Moore 小型猪灌胃染毒 RDX 100 mg/kg, 结果仅在大鼠粪便中检测到少量的 RDX (<3%), 表明大部分 RDX 已通过胃肠道吸收屏障被转运; 给予大鼠注射 50 mg/kg

用¹⁴C 标记的 RDX, 24 h 后大部分放射性物质在肝脏和尿液中被发现, 72 h 内在其他器官中均可检测到放射性物质, 43% 的放射性物质主要以¹⁴CO₂形式排出。以上结果表明, RDX 经口服迅速吸收, 分布于肾、肝、心和脑等脏器, 未吸收的化合物主要经尿液排出。

3 RDX 诱发癫痫发作

Williams 等^[17]发现 RDX 在斑马鱼模型中具有剂量依赖性行为激活和促惊厥作用。孙世荃等^[18]将不同剂量的 RDX (质量浓度 0.05%、0.1%、0.3%、1%) 掺入 Wistar 大鼠的正常饲料中制作经口染毒模型, 发现染毒组大鼠于 2~7 d 开始处于兴奋状态, 易受惊、频频摇头, 继而互相咬斗或直立对峙, 甚至出现四肢或全身痉挛发作。赵淑杰等^[19]给予 SD 雄性大鼠 RDX 质量浓度分别为 0、0.01%、0.03%、0.05%、0.1% 的饲料, 染毒 3~7 d 后, >0.03% RDX 浓度各组大鼠出现兴奋不安、易激惹、不停游走及撕咬等症状, 高剂量组 (0.1%) 大鼠全身性癫痫样痉挛发作, 发作时动物四肢及全身抽搐, 撞击跳跃, 喘鸣尖叫, 口、鼻周可见泡沫样分泌物, 部分动物因持续痉挛致窒息死亡, 此高度兴奋状态持续 2 周后逐渐减轻。说明 RDX 染毒急性期实验动物处于神经兴奋状态, 严重时发生癫痫。

常永祯等^[20]用 0.1、0.3、0.9、2.7 mg/kg 剂量的 RDX 废水结晶物对 Wistar 大鼠经口染毒, 1 次/d, 连续 3 d, 染毒后大鼠发生行为改变, 阳性条件反射的潜伏期和运动时显著延长, 反映大鼠皮层处于抑制或超限抑制状态。这与 RDX 急性毒性试验结果相反, 是 RDX 本身作用, 还是硝基类物质所致, 抑或是联合作用的结果, 尚待进一步研究。

4 RDX 中毒表现

目前, 国内已见误食 RDX 中毒的病例报道。2000 年 1 名 27 岁男性患者因误服 RDX 致全身阵发性抽搐, 并伴有意识不清、呼吸道分泌物增加, 恶心、呕吐等症状^[21]; 2007 年 1 名 3 岁男童因 RDX 中毒导致频繁惊厥、全身抽搐^[22]; 高德海^[2]报道 11 例患者服 RDX 1~2 h 后出现不同程度的头痛、头晕、恶心、呕吐等中毒症状, 严重者出现反复抽搐。赫贵斌^[23]报道 16 例急性 RDX 中毒病例, 均出现较严重的头痛、呕吐、缺氧、抽搐症状, 其中 8 例出现昏迷。上述文献报道的 RDX 中毒病例均出现头痛、头晕、全身抽搐等神经系统症状。

Kasuske 等^[24]报道多例现役军人由于接触含 C-4 型弹药后陆续发生全身性癫痫发作、呕吐等症状。C-4 型弹药含有 91% RDX, 是一种高度爆炸性材料。摄入或吸入 C-4 型弹药会产生中枢神经系统、肾脏和胃肠道毒性。还有学者^[25、26]报道了因误食含 RDX 食物的患者于 4~16 h 后出现中枢神经系统障碍, 主要表现为反复发作的强直阵挛性抽搐、癫痫及惊厥, 但 CT 扫描未见大脑皮层异常, 提示 RDX 引起的神经系统损伤不是由器质性病变造成的。

综上, 急性 RDX 中毒可导致神经功能障碍, 主要症状是癫痫发作和抽搐。

5 RDX 神经毒性机制

对于 RDX 神经毒性机制的研究大多集中在缺氧、钙信号

增强、 γ -氨基丁酸 A 型 (GABAA) 受体抑制、基因水平改变等几个方面。高德海^[2]认为 RDX 进入血液后与血红蛋白 (Hb) 作用, 使正常的 Fe²⁺氧化成 Fe³⁺, 形成高铁血红蛋白 (MetHb), 使其失去携氧能力; 同时阻止正常的氧合血红蛋白释放, 导致组织缺氧, 尤其中枢神经系统对缺氧更为敏感, 从而产生一系列临床表现。缺氧可能是 RDX 神经毒性机制之一。

体外研究表明, RDX 可能影响神经元的钙信号^[27], 瞬时增加细胞内 Ca²⁺水平, 引起膜兴奋和神经递质的分泌^[28]。兴奋性神经递质或者 Ca²⁺介导的中枢神经系统电特性的快速变化与癫痫发作有较大关系^[29]。Ehrich 等^[27]用钙螯合剂、钙通道阻滞剂、Ca²⁺-ATP 酶抑制剂和膜稳定剂对体外培养的细胞经预处理加入 RDX 后检测细胞内的 Ca²⁺浓度, 发现可以部分减弱 RDX 诱导的 Ca²⁺增加。钙螯合剂可以与 Ca²⁺形成稳定的复合物, 从而降低细胞内 Ca²⁺水平; 钙通道阻滞剂通过阻断细胞膜上的 Ca²⁺通道, 抑制细胞外的 Ca²⁺内流, 使细胞内 Ca²⁺水平降低; Ca²⁺-ATP 酶抑制剂和膜稳定剂是通过抑制 Ca²⁺转运达到降低细胞内 Ca²⁺水平的作用。但 RDX 体内诱导的癫痫发作并未被钙通道阻滞剂维拉帕米阻断^[30], 说明阻断 Ca²⁺通道并不能完全减少 RDX 诱导的 Ca²⁺增加。上述药剂对 RDX 诱导的 Ca²⁺增加均有一定的效果, 可能涉及多种机制。

与 GABAA 受体惊厥部位结合是 RDX 诱发癫痫发作的主要机制之一。Williams 等^[31]发现 RDX 与大脑杏仁核中 GABAA 受体 (抑制性神经元输入的主要受体) 上的惊厥部位结合, 导致 GABAA 受体介导的突触传递减少可能会诱导癫痫发作。其具体机制可能是 RDX 对 GABAA 受体的抑制阻断了 GABAA Cl⁻通道, 减少了 GABAA 抑制性传递, 使兴奋性神经元失去抑制性输入, 兴奋性活动加剧, 导致癫痫发作。

RDX 可以轻松穿越血脑屏障, 改变大脑中多种基因的表达, 引发明显的癫痫样反应^[24、25]。RDX 暴露后小鼠大脑中 84 个 miRNAs 表达水平发生显著改变^[7], 异常表达的 miRNA 与神经毒性有关, 可以直接诱导癫痫发作^[32、33], miR-206 在 RDX 染毒小鼠大脑中表现出最显著的上调。脑源性神经营养因子 (BDNF) 基因是 miR-206 的潜在靶点之一。BDNF 是神经营养因子家族中最重要的成员之一, 广泛表达于哺乳动物 (包括人类) 的中枢和外周神经系统, 被认为在支持神经元存活和分化、神经突生长和突触可塑性等方面发挥重要作用, 与多种神经系统疾病相关^[34]。Zhang 等^[7]还发现两种被证实的 BDNF 靶向 miRNAs (miR-30a 和 miR-195) 在 RDX 染毒小鼠大脑和肝脏中显著上调。也有学者发现, RDX 染毒后与神经递质传递过程相关的 mRNA 表达降低^[35]。以上研究提示, miR-206、miR-30a、miR-195 等 BDNF 相关基因表达升高及与神经递质相关 mRNA 表达降低可能是 RDX 致神经系统损害的机制, 具体的信号通路仍需进一步深入研究。

神经毒性机制的研究有助于 RDX 的防护及早期诊断, 但体外试验对 RDX 神经系统毒性的研究有限, 其机制研究尚不充分。我们可通过对哺乳动物进行 RDX 慢性染毒, 同时结合体外试验, 从基因、蛋白等分子生物学水平深入探讨 RDX 神经毒性机制。

参考文献

- [1] Sheremata TW, Halasz A, Paquet L, *et al.* The fate of the cyclic nitramine explosive RDX in natural soil [J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35 (6): 1037-1040.
- [2] 高德海. 黑索今中毒 11 例报告 [J]. *临床急诊杂志*, 2008, 9 (5): 274.
- [3] 魏桐, 周阳, 杨治林, 等. 典型炸药的毒性效应及其作用机制研究进展 [J]. *含能材料*, 2019, 27 (7): 558-568.
- [4] Meyer SA, Marchand AJ, Hight JL, *et al.* Up-and-down procedure (UDP) determinations of acute oral toxicity of nitroso degradation products of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2005, 25 (5): 427-434.
- [5] 沈志松. 国内外黑索今毒性试验概况 [J]. *火炸药*, 1991 (1): 55-57.
- [6] French JE, Bradley SL, Schneider NR. Cyclotrimethylenetrinitramine (RDX) induced ultrastructural changes in rat liver and kidney [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1976 (37): 122.
- [7] Zhang BH, Pan XP. RDX induces aberrant expression of microRNAs in mouse brain and liver [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2009, 117 (2): 231-240.
- [8] MacPhail RC, Walker QD, Cook LC. Neurotoxicity of cyclotrimethylenetrinitramine (RDX) [R]. Research Triangle Park (NC): US Environmental Protection Agency, Neurotoxicology Division, Health Effects Research Laboratory, 1985.
- [9] Bannon DI. Biomarkers of RDX (trinitro hexahydro 1,3,5-trinitro-1,3,5 triazone) exposure in breath of swine [R]. Aberdeen Proving Ground (MD): US Army Public Health Command Directorate of Toxicology Health Effects Research Program, 2010.
- [10] Brown D. The acute and chronic biochemical and behavioral effects of cyclotrimethylenetrinitramine [R]. Baltimore (MD): University of Maryland School of Pharmacy, 1975.
- [11] Crouse LCB, Michie MW, Major M, *et al.* Subchronic oral toxicity of RDX in rats [R]. Aberdeen Proving Ground (MD): US Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine, 2006.
- [12] Bannon DI, Williams LR. Wildlife toxicity assessment for 1,3,5-trinitrohexahydro-1,3,5-triazine (RDX) [M].//Williams MA, Reddy G, Quinn Jr MJ, *et al.* Wildlife Toxicity Assessments for Chemicals of Military Concern. 2015: 53-86.
- [13] Pan XP, Zhang BH, Smith JN, *et al.* N-Nitroso compounds produced in deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) GI tracts following hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) exposure [J]. *Chemosphere*, 2007, 67 (6): 1164-1170.
- [14] Pan XP, Ochoa KM, Francisco MJS, *et al.* Absorption, distribution, and biotransformation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine in B6C3F1 mice (*Mus musculus*) [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2013, 32 (6): 1295-1303.
- [15] Pan XP. Determination of the N-Nitroso compounds in mouse following RDX exposure [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021 (2326): 315-325.
- [16] Schneider NR, Bradley SL, Andersen ME. Toxicology of cyclotrimethylenetrinitramine: Distribution and metabolism in the rat and the miniature swine [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1977, 39 (3): 531-541.
- [17] Williams LR, Wong K, Stewart A, *et al.* Behavioral and physiological effects of RDX on adult zebrafish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2012, 155 (1): 33-38.
- [18] 孙世荃, 张思仲, 王守华, 等. 黑索金 (Hexogen) 对大白鼠毒性作用的病理学研究 [J]. *卫生研究*, 1976, 5 (1): 30-38.
- [19] 赵淑杰, 沈松筠, 孙天佑. 黑索金对大鼠中枢神经系统形态和生化指标的影响 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 1992, 10 (1): 39-41.
- [20] 常永祯, 王心宽. 黑索金废水结晶物对大鼠食物运动条件反射的影响 [J]. *辐射防护通讯*, 1984 (4): 42-44.
- [21] 仲月霞, 赵丽文, 倪小琴. 1 例黑索金中毒的急救与护理 [J]. *现代护理*, 2001, 7 (4): 68.
- [22] 林燕, 王宝西, 王玲, 等. 黑索金中毒 1 例 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2007, 22 (12): 915.
- [23] 赫贵斌. 16 例急性黑索金中毒病例报告 [J]. *工业卫生与职业病*, 1986, 12 (6): 343.
- [24] Kasuske L, Schofer JM, Hasegawa K. Two marines with generalized seizure activity [J]. *Journal of Emergency Nursing*, 2009, 35 (6): 542-543.
- [25] Küçükardali Y, Acar HV, Ozkan S, *et al.* Accidental oral poisoning caused by RDX (cyclonite): A report of 5 cases [J]. *J Intensive Care Med*, 2003, 18 (1): 42-46.
- [26] Garcia R, Karimian A, Donaldson C, *et al.* Status epilepticus after C-4 ingestion: Using liquid chromatography to quantify toxicity [J]. *Clinical Toxicology (Phila)*, 2019, 57 (9): 819-821.
- [27] Ehrich M, Wu XH, Werre SR, *et al.* Calcium signaling in neuronal cells exposed to the munitions compound cyclotrimethylenetrinitramine (RDX) [J]. *International Journal of Toxicology*, 2009, 28 (5): 425-435.
- [28] Catoni C, Cali T, Brini M. Calcium, dopamine and neuronal calcium sensor 1: Their contribution to parkinson's disease [J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2019 (12): 55.
- [29] Jones DL, Mcnamara JO. The epilepsies: Phenotypes and mechanisms [M]. *Basic Neurochemistry*, 2012: 705-718.
- [30] Way MR, McCain WC. Protective effects of the calcium channel blocker, verapamil in rats exposed to RDX [R]. Aberdeen Proving Ground (MD): US Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine, 2007.
- [31] Williams LR, Aroniadou-Anderjaska V, Qashu F, *et al.* RDX binds to the GABA (A) receptor-convulsant site and blocks GABA (A) receptor-mediated currents in the amygdala: A mechanism for RDX-induced seizures [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2011, 119 (3): 357-363.
- [32] Bannon DI, Johnson M, Williams L, *et al.* RDX and miRNA expression in B6C3F1 mice [J]. *Environ Health Perspect*, 2009, 117 (3): A98.
- [33] Gust KA, Pirooznia M, Quinn Jr MJ, *et al.* Neurotoxicogenomic investigations to assess mechanisms of action of the munitions constituents RDX and 2,6-DNT in Northern Bobwhite (*Colinus virginianus*) [J]. *Toxicological Sciences*, 2009, 110 (1): 168-180.
- [34] Paredes DA, Jollah A, Catlow BJ, *et al.* Bdnf deficiency in the neonatal hippocampus contributes to global DNA hypomethylation and adult behavioral changes [J]. *Brain Research*, 2021 (1754): 147254.
- [35] Bannon DI, Dillman JF, Hable MA, *et al.* Global gene expression in rat brain and liver after oral exposure to the explosive hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2009, 22 (4): 620-625.

(收稿日期: 2021-04-26; 修回日期: 2021-11-15)