

北京市劳动卫生职业病
防治研究所
年 报

ANNUAL REPORT
BEIJING INSTITUTE OF LABOUR
HYGIENE AND OCCUPATIONAL
DISEASES

1 9 9 3

目 录

1. 云锡矿尘、青石棉尘致大鼠气管上皮细胞转化的研究.....项芒等 (1)
2. 抗坏血酸钛的毒性研究.....栗建林等 (4)
3. 田菁子叶安全性毒理学评价.....栗建林等 (8)
4. 苯乙烯在人体内的代谢动力学.....周素梅等 (14)
5. 低浓度铅作业工人健康状况的探讨.....高桂珍等 (18)
6. 提高火焰原子吸收法检测灵敏度的两种措施的研究.....陈震阳等 (22)
7. 北京市尘肺流行病学调查研究.....祖翠义等 (25)
8. 急性重度氟乙酰胺中毒抢救体会.....王涤新等 (36)
9. 乡镇工业妇女劳动卫生状况的调查研究.....陶永娴等 (38)
10. 关于控制乡镇工业职业危害对策的研讨.....陶永娴 (45)
11. 乡镇工业劳动卫生分级管理的探讨.....陶永娴等 (49)
12. 浅谈厂矿医疗卫生机构在职业病防治中的作用与任务.....陶永娴 (52)
13. 劳动卫生监督管理工作的做法与体会.....陶永娴等 (55)
14. 1993年发表文章部份题录..... (13)

云锡矿尘、青石棉尘致大鼠气管 上皮细胞转化的研究

项 芒 崔明珍 程书钧*

大鼠气管上皮细胞无血清体外培养是近些年建立的体外检测癌变细胞的短期测试手段。该系统灵敏、稳定、特异性高。云南锡业公司（以下简称云锡）的职业性高发肺癌，被列为国家“六五”攻关课题。有关病因学研究认为，云锡矿的高发肺癌主要与作业环境中长期高浓度的混合性粉尘有关^①。云锡矿的实验研究只有少数用大鼠和小鼠诱癌的报道，细胞学方面未见有关文献。石棉为国际肿瘤研究中心（IARC）确定的致癌物。但用大鼠气管上皮细胞研究其体外致细胞转化的作用未见文献报道。

由于云锡矿尘、石棉尘均为生产作业环境中产生的有害尘，本研究用云锡矿尘青石棉尘对大鼠体内染尘，取其气管上皮细胞体外培养，既保证了接触尘后体内代谢，又利用了体外短期快速的检测优点，拟探讨云锡矿尘有否致大鼠气管上皮细胞转化作用，并用已知致癌物石棉尘同时实验，以验证该系统对尘类致癌物检测是否可行。

材料和方法

1. 矿尘：采自云锡松矿、老矿井下采掘作业面沉积尘，用球磨机和玛瑙乳钵研磨，其粉尘粒径90%以上小于10 μ m。两种矿尘各半，生理盐水配成粉尘悬液，用时震荡均匀。两种矿尘的成分见表1。

表 1 云锡老矿、松矿（氧化矿）矿尘成分

	As	Fe	Co	Cr	Zn	Pb	V	Th	Ka
	(%)						(n $\times 10^{-5}$ g/g)		
老矿	0.714	41.94	0.00097	0.28	0.654	7.64	0.003	4.4	4.76 n = 4
松矿	2.347	38.65	0.00242	0.0041	3.076	6.352	123.27	1.64	41.4 n = 7

2. 青石棉尘：由国际抗癌协会（UICC）提供，经玛瑙乳钵研磨，纤维长度小于10 μ m者占80%以上。

3. 大鼠饲养及染尘：粉尘悬液分三次均量灌注，每隔四天灌注一次，最后一次灌注后第四天处死大鼠进入体外细胞培养阶段。采用雄性Wistar大鼠，体重90~100g，每组4只。大鼠经乙醚麻醉，气管内灌注。云锡矿尘总剂量为30mg/只、60mg/只、120mg/只。青石棉实验剂量为22.5mg/只。动物和饲料由卫生部药物检定所动物繁殖场和中国医学科学院肿瘤研究所动物室提供。大鼠饲料及饮水均为自由摄取，不锈钢丝笼中喂养。每次气管灌注前及处死前称体重。

4. 实验用生化试剂及生长因子均购自Sigma公司。

* 中国协和医科大学肿瘤研究所

5. 大鼠气管上皮细胞的分离和培养

参照高燕宁等^②的方法进行。处死大鼠后，取其气管灌以链蛋白酶，4℃过夜消化后收集上皮细胞，用直径5cm的平皿，每皿接种2.5万细胞，每组接种8皿。培养基为Ham's F12，补以牛脑垂体提取物（100μg/ml）、牛血清白蛋白（0.5mg/ml）、表皮生长因子（5ng/ml）、乙醇胺（1.0μm）、磷乙醇胺（1.0μm）、氢化可的松（0.1μg/ml）、胰岛素（μg/ml）、转铁蛋白（5μg/ml）、霍乱弧菌毒素（0.1μg/ml）、青链霉素（50I/ml）。培养7-10天后计数20个细胞以上的集落数，并计算出集落形成率（Colony Forming Efficiency, CFE）。

$$CFE = \frac{\text{集落数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\%$$

6. 转化细胞的选择

以上大鼠气管上皮细胞接种10天左右，换选择培养基，其成分为完全培养基中撤除牛脑垂体提取物、牛血清白蛋白和表皮生长因子等促生长成分，加入促进上皮细胞分化的胎牛血清。每周换液一次，五周左右终止实验，固定，吉姆萨染色，计数转化集落数并统计转化率（Transforming Frequency, TF）。

$$TF = \frac{\text{转化集落数}}{\text{进入选择集落数}} \times 100\%$$

结 果

实验结果为矿尘在120mg/只的剂量组体重明显下降（ $P < 0.01$ ），其余两组及石棉组与对照相比无显著差异。尸解时见矿尘组肺部主要为灶状炎性病理改变，石棉组主要为因阻塞而引起的肺不张。

大鼠气管上皮细胞体外转化试验结果见表2。云锡矿尘及石棉染尘组的集落形成率与对照组均无显著差异，说明无细胞毒性。各组均可诱导细胞转化。云锡矿尘在体重与对照无显著差异的30~60mg/只剂量组同样可以明显诱导大鼠气管上皮细胞转化，说明云锡矿尘有一定的致癌作用，同时存在剂量反应关系。

表 2 云锡矿尘、青石棉致大鼠气管上皮细胞转化结果

	集落形成数N/皿	转化集落数N皿	转化集落形成率%	P 值
对照	316	3.9	1.23	
云锡矿尘:				
30mg/只	296	11.3	3.82	<0.05
60mg/只	320	18.1	5.66	<0.01
120mg/只	386	32.9	8.52	<0.01
石棉:				
22.5mg/只	238	12.3	5.17	<0.05

讨 论

关于金属矿尘、石棉尘的短期致癌研究, 仅见有成纤维细胞系统叙利亚金仓鼠胚胎细胞 (SHE) 体外转化的报道^{③④}, 在八十年代被认为是研究矿尘致癌机制的唯一体外模型。然而, 人类的癌症多源于上皮细胞的恶性病变, 而上皮细胞和成纤维细胞的生长特性相差很大, 同时体内染毒的代谢和体外细胞培养时的染毒代谢也很不一样, 因此该模型并不能很好地反映尘类所致人类癌症的发生机理。本次研究应用目前已稳定建立的大鼠气管上皮细胞体外无血清培养的细胞转化系统 (该系统的阳性转化集落细胞可使裸鼠致瘤), 并采取体内染毒的方式, 保证了受试物在体内环境的正常代谢, 消除了成纤维细胞在转化试验中的干扰, 这种模型更接近于人类因环境因素而致癌的进程。

云锡矿50、60、70、80年代作业环境矿尘的浓度依次为 $163.3\text{mg}/\text{m}^3$ 、 $16.7\text{mg}/\text{m}^3$ 、 $6.6\text{mg}/\text{m}^3$ 、 $2.9\text{mg}/\text{m}^3$ 。70年代以来注意了湿式作业, 作业场所粉尘的浓度明显下降, 发病率在以后的年代也随之下降, 说明粉尘是致肺癌的主要因素。本实验采用了云锡矿业公司中肺癌发生率最高的老矿、松矿沉积尘。结果表明, 两矿各半的混合尘有肯定的诱导大鼠气管上皮细胞转化作用, 并且注入大鼠肺中的矿尘浓度与细胞转化率存在剂量反应关系, 与现场实际情况相一致。因此, 在今后的预防工作中降低粉尘浓度是关键。

本实验应用大鼠气管上皮细胞体内一体外无血清培养的细胞转化系统测试有可疑致癌作用的云锡矿尘和已知明确致癌物石棉尘, 结果均为阳性, 云锡矿尘有剂量反应关系。此结果不但提供了云锡矿尘的致癌实验依据, 而且表明大鼠气管上皮细胞体内一体外转化系统不仅是测试化学物质是否具有致癌作用的良好模型, 在尘类研究中亦反应稳定, 可以推广使用。

参考文献

- (1) 于永中等。云南锡矿井下矿工肺癌高发的职业性病因。中华劳动卫生职业病杂志。1993, 11:73。
- (2) 高燕宁等。化学致癌物体外转化大鼠气管上皮细胞的研究 中国医学科学院学报。1990, 12:325。
- (3) Thomas W. Hesterberg and J. Carl Barrett Dependence of Asbestos and Mineral Dust-induced Transformation of Mammalian Cells in Culture on Fiber Dimension Cancer research 1984, 44:2170-2180。
- (4) 张桥 镉化物体外诱导细胞恶性转化的研究 卫生毒理学杂志 1988, 2:216。

抗坏血酸钛的毒性研究

栗建林 刘建中 金 枫 钱 伟 纪云晶

钛化合物广泛用于冶金、航天、国防、医疗、食品工业。80年代我国将抗坏血酸钛用于农牧养殖业和水产业,对动植物均有促进生长作用,并取得一定经济效益。人类食用该化合物能否产生毒害作用国内外报道不多。为此,我们进行了抗坏血酸钛络合物(TiAsA)的毒性研究。

材料与方法

受试物TiAsA由北京有色金属研究总院合成。含Ti16.3%、AsA34%、C122.1%、N9.33%,其它为H和O,为红色粉末,粒度 $<100\mu$,在水中溶解度大于 200g/L 。

将TiAsA制成片剂,每片重0.08g,相当40mgTiAsA,空白片用淀粉和糖,供鸡服用。

实验动物 纯种62DQ大型溞,为出生6~24小时幼溞,由中国预防科学院提供。Wistar大鼠,体重170~200g,军事医学科学院提供。昆明种小鼠,体重18~22g,中国生物制品研究所提供。大耳白家兔,体重1.5~2kg,北京动物中心提供。黄羽肉鸡,体重0.5~1kg,北京农业科学院畜牧兽医研究所提供。

急性毒性实验

大型溞 LC_{50} 测定:用国际标准组织的配方制成水溞用水,用此水配成不同浓度,10倍连续稀释,设3个平行实验组。水温为 $21\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 保持最佳pH值和溶解氧,以溞心脏停止跳动为死亡标准,求 LC_{50} 值。大鼠、小鼠经口、腹腔和静脉注射 LD_{50} 测定:按寇氏法计算,鸡经口 LD_{50} 按霍恩氏法计算。将大鼠分成100、25mg/kg TiAsA组,以及与100mg/kg组含相当的AsA和氯化铵组,每组4只动物,一次尾静脉注射上述物质的水溶液后,观察凝血时间、网织红细胞、血小板、血清GPT、磷及钙变化。

皮肤粘膜刺激实验:以50mg/ml的TiAsA水溶液对家兔健康和划痕皮肤进行斑贴,观察对皮肤的刺激反应,同时观察对兔粘膜刺激作用。

蓄积实验

蓄积毒性实验:按定期递增法给大鼠连续灌胃染毒20天,求蓄积系数。TiAsA LD_{50} 定为 10g/kg 。*

钛在组织中的含量测定:以500mg/kg的TiAsA给大鼠每日灌胃1次,共30天。于停毒后不同时间每次处死6只动物,取组织分别测定其中钛的含量。另将亚慢性实验中染毒90天后的鸡,取其组织测定钛的含量。

亚慢性毒性实验:鸡分成1000、200、40mg/kg及对照4组,每组7只(雌3雄4),分笼喂养,食用蛋鸡饲料。自由饮水。染毒组每日给予相应剂量TiAsA片剂。对照组给空

*食品安全性毒理学评价程序规定:凡 $LD_{50}>10\text{g/kg}$ 者,则可以不进行蓄积毒性实验。本实验 $LD_{50}>15\text{g/kg}$,为了安全起见,观察以 10g/kg 为 LD_{50} 的蓄积毒性。

白片,连续90天。实验期间观察动物的一般状况、体重、血清GPT、总巯基(-SH)、碱性磷酸酶(AKP)、甘油三酯、胆固醇、总蛋白、磷、钙、过氧化氢酶、红细胞超氧化物歧化酶(SOD)及血色素和凝血时间。90天时颈动脉放血处死动物,取脏器称重,计算脏器系数,并作病理观察。

表 1 大鼠、小鼠和鸡TiAsA的LD₅₀测定值(mg/kg)

动物	染毒方式	LD ₅₀	95%可信限
大鼠	灌胃	>15000	
小鼠	灌胃	>12000	
	腹腔	850.0	700~1030
	静脉	150.2	121.3~186.0
鸡	灌胃	14000	11399~17204

结果与讨论

急性毒性实验: TiAsA大型蚤24、48、72小时的LC₅₀均大于100mg/L,属微毒。大鼠、小鼠和鸡的急性灌胃毒性LD₅₀均>12000mg/kg,属基本无毒,见表1。动物灌胃后萎靡不振,俯卧少动,一般24小时后恢复。个别死亡动物胃肠被棕红色粥状物充盈,胃粘膜消失,胃壁变薄并充血。小鼠静脉注射后,烦躁不安、抽搐、后肢呈迟缓性瘫痪。死亡时间多在15分钟到12小时,解剖后动物血液不凝固。大鼠静脉注射后4小时,100、25mg/kg组凝血时间延长,血清GPT、磷比实验前及对照组均明显升高($P<0.05$)钙升高不明显。48小时后各项指标恢复正常,见表2。其它指标未见明显改变。NH₄Cl组GPT升高。

皮肤粘膜刺激实验: 用50mg/ml TiAsA给兔皮肤进行斑贴,未发现红斑和水肿等损伤。滴眼后仅有轻微眨眼和流泪,5~20分钟恢复正常。

蓄积毒性实验: 染毒总剂量达5.3倍设定的LD₅₀时,20只动物死亡8只, TiAsA的蓄积系数>5.0,属于弱蓄积毒性。

钛在组织中的含量: 大鼠以500mg/kg TiAsA灌胃30天,不同时间组织中钛的含量见表3。鸡每日分别给以TiAsA90天后组织中钛的含量见表4。由表3、4可见动物长期口服TiAsA后,组中钛含量升高,大鼠除骨和脑外,与对照组比差异显著($P<0.05$),其中肾的含量最高,其次为脾。大鼠停止给药后60天,心、肾、脑、睾丸中含量已恢复到正常水平。说明长时间服TiAsA后组织中钛水平升高,但停止接触后可自然排出。鸡则以肝的含量最高,最低为肌肉,1000mg/kg组各组织中的含量明显高于对照组($P<0.05$)。

鸡亚慢性毒性实验: 实验期间,多数动物活动及进食正常,羽毛丰满有光泽。各组体重增长高于其它各组,但差异不显著。70天时,1000mg/kg组体重开始下降,90天时体重明显低于其它各组($P<0.01$);血清AKP、胆固醇、甘油三酯、磷、-SH、凝血时间、血色素、脏器系数与对照组比无明显差异。90天时1000mg/kg GPT升高($P<0.01$),且超过正常值,见表5。SOD升高($P<0.05$)。血钙及总蛋白下降,但差异不显著。对心、肝、脾、肺、肾、胃各组织的病理组织学观察40、200mg/kg组和对照组间无明显差异。现1000mg/kg组出现肝细胞灶状和片状坏死(3例),及肝细胞脂肪变性(1例)。

表 2

大鼠静脉注射TjAsA后血清GPT、磷、钙变化 ($\bar{x} \pm S$)

组别	GPT(U)			P(mmol/L)			Ca(mmol/L)		
	前	4小时	48小时	7天	前	4小时	48小时	7天	
100mg/Kg(TjAsA)	203 ±43	393** ±270	238 ±217	176 ±23	69 ±0.3	3.2* ±0.3	2.1 ±0.2	2.5 ±0.1	2.42 ±0.28
	197 ±38	375* ±150	157 ±57	120 ±48	2.3 ±0.3	2.6 ±0.4	2.3 ±0.1	2.55 ±0.18	2.42 ±0.08
AsA	160 ±50	166 ±83	190 ±57	末 测	2.3 ±0.3	1.9 ±0.4	2.2 ±0.2	2.38 ±2.12	2.45 ±0.08
	203 ±33	3.27** ±205	290 ±209	213 ±28	2.7 ±0.2	2.3 ±0.3	2.5 ±0.3	2.35 ±0.12	2.38 ±0.08
NH ₄ Cl	208 ±45	175 ±39	200 ±27	120 ±95	1.9 ±0.4	2.3 ±0.4	2.4 ±0.2	2.42 ±0.05	2.48 ±0.05
对照									

表 3

TjAsA灌胃后大鼠组织中的含量 ($\mu\text{g/g}$) ($\bar{x} \pm S$)

时 间	心	肝	脾	肺	肾	脑	胃	睾丸	骨
对 照 组	0.04 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.18 ± 0.14	0.09 ± 0.07	0.26 ± 0.2	0.06 ± 0.06	0.14 ± 0.04	0.04 ± 0.03	0.46 ± 0.28
染毒第30天	0.3* ± 0.24	0.77** ± 0.57	1.36** ± 0.89	0.89** ± 0.24	1.56** ± 0.93	0.13 ± 0.13	1.08** ± 0.4	0.17* ± 0.09	0.72 ± 0.42
停药后第30天	0.06 ± 0.06	0.27* ± 0.19	0.32 ± 0.19	0.73* ± 0.64	0.46 ± 0.22		0.62* ± 0.23	0.06 ± 0.04	0.19 ± 0.08
停药后第60天	0.09 ± 0.04	0.24* ± 0.09	0.34 ± 0.3	0.36 ± 0.18	0.29 ± 0.13	0.05 ± 0.03	0.42 ± 0.08	0.09 ± 0.02	0.36 ± 0.27

n = 6

与对照组比

*p<0.05

**p<0.01

表 4 90天鸡染毒组织中钛的含量 ($\mu\text{g/g}$) ($\bar{X} \pm S$)

组 别	心	肝	脾	肺	肾	肌胃	肠	肌肉
对 照	0.07 ± 0.07	0.07 ± 0.04	0.09 ± 0.04	1.52 ± 0.14	0.17 ± 0.14	0.15 ± 0.06	0.10 ± 0.06	0.09 ± 0.04
200mg/kg	0.22 ± 0.11	2.07* ± 1.03	0.46* ± 0.32	1.24 ± 0.42	0.29 ± 0.08	0.11 ± 0.04	1.73* ± 0.5	0.17 ± 0.09
1000mg/kg	0.79** ± 0.6	36.52** ± 20.8	1.12** ± 0.04	2.7 ± 0.17	0.88* ± 0.22	0.56* ± 0.23	5.52** ± 1.31	0.29 ± 0.17
n = 7	与对照组比			*p < 0.05		**p < 0.01		

表5 TiAsA对鸡亚慢性实验血清GPT测定结果 (U)

组 别	染毒前	染毒30天	60天	90天
对照	21.3 $\pm$ 6.6	14 $\pm$ 2.0	22.3 $\pm$ 6.4	27.5 $\pm$ 4.5
40mg/kg	25.8 $\pm$ 2.6	15.7 $\pm$ 4.3	30.6 $\pm$ 13.2	33.0 $\pm$ 9.7
200mg/kg	26.3 $\pm$ 1.9	12.9 $\pm$ 3.1	26.7 $\pm$ 4.5	26.8 $\pm$ 12.3
1000mg/kg	27.8 $\pm$ 6.2	13.4 $\pm$ 2.5	24.1 $\pm$ 4.3	40.7 $\pm$ 6.4
n = 7	与对照组比		*P < 0.05	**P < 0.01

本研究, 鸡1000mg/kg组染毒90天体重明显下降, GPT升高, 病理发现肝脏也有病理变化, 而40和200mg/kg组的各项观察指标与对照组接近, 据此认为, 200mg/kg为最大无作用剂量。本协作组研究发现, 90天大鼠喂养致畸实验TiAsA在0.16~1%浓度时未发现对动物生长繁殖有不良影响, 此外TiAsA并不具有致突变作用(另文报告)。因此在农牧养殖业上应用是较安全的。

文献报道[1,2], 钛化合物对肝脏的损害并不多见, 但本研究鸡1000mg/kg染毒90天后, 出现肝功能及病理改变。大鼠静脉注射后, TiAsA组和氯化铵组GPT升高, 而AsA组与对照组却未发生明显改变。因此引起肝功能障碍是否为混于其中的氯化铵造成的, 有待进一步研究。

参考文献

1. WHO. Environmental Health Criteria 1982; 24.
2. 陈德荣等编译. 金属毒理学手册. 四川: 科技出版社, 1985: 448.

田菁子叶安全性毒理学评价

栗建林 刘建中 钱 伟 彭少华

卢庆生 张希架 王淑惠 桥志华

半乳甘露糖聚糖类型的植物胶，是从豆科植物种子中的胚乳里提取的一种胶性物质。广泛用于石油开采，金属选矿、炸药制造、造纸、纺织印染、森林灭火、化妆品、医药、食品等几十种生产中。分别作增粘剂、增稠剂、胶凝剂、交联剂的胶体原料等。国外广泛使用从印度和巴基斯坦产的瓜尔豆提出的瓜尔胶。1972年美国食品保护委员会作出使用该物质是安全的决定。^①但进口该物价格十分昂贵。目前我国从豆科植物田菁的种子的子叶中提取田菁胶，它的化学组成，分子结构与生理化性能均与瓜尔胶相近。拟以取代之，为工农业生产服务，并争取进入国际市场。但田菁种子的除胚乳后，占种子绝大部分的子叶作为废弃物无疑会造成极大的浪费。为此对其子叶粉进行分析检测，发现其主要成份与豆饼相似，蛋白质含量高，而且氨基酸的种类齐全，其氨基酸含量比鱼粉还高见附表^②，因此用田菁子叶粉代替部分豆类饲料，用于喂饲猪、鸡、鱼解决当前饲料严重不足，同时制作一些豆类食品如酱油，其应用前景十分广泛。但人类长期少量服用该物质是否产生不良影响人们十分关心，为此本课按照1984年卫生部颁布的“食品安全性毒理学评价程序”的推荐方法，^③对田菁子叶粉进行广泛的研究，为在生产中推广使用提供科学依据。

材料与方法

一、受试物

田菁子叶粉呈灰白色粉末。粒度为200目。不溶于水。主要成份：粗蛋白48.49%、粗脂肪8.05%、粗淀粉21.63%、灰分2.87%。内含天门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、结氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、胱氨酸、苯丙氨酸及组氨酸等15种氨基酸。由北京矿冶研究总院提供。

二、受试对象

1. Wistar大鼠 180—220g，由军事医学院提供。
2. 昆明种小鼠 18—20g，卫生部生物制品研究所及中日友好医院提供。
3. Ames 实验菌种 TA97、TA98、TA100、TA102，由中国医科院药物研究所提供。

三、实验方法

1. 急性毒性实验将大鼠随机分成若干组，用水将田菁子叶粉配成不同浓度。经口灌胃，找出LD₀和LD₁₀₀后，根据该数据设计剂量组。染毒后，根据死亡率用寇氏法测定动物的半数致死量LD₅₀值。

2. 蓄积毒性试验 将大鼠分成实验组与对照组，按定期递增法连续染毒20天，根据动物死亡数求出蓄积系数。

3. 亚慢性毒性试验将大鼠随机分成4000、1000、250mg/kg组及对照组，每组30只，雌

雄各半。各组动物每日分别喂饲含相当40000、10000、2500PPm田菁子叶粉的饲料,对照组给予基础饲料,连续喂饲90天。观察一般状况,生长发育,血色素、血清中葡萄糖、总蛋白、尿素氮、谷丙转氨酶、甘油三脂、胆固醇、钙、磷值,以及心、肝、脾、肺、肾的脏体比和病理组织学观察。

4. 致突变实验和致畸实验

(1) 小鼠骨髓细胞微核实验 将动物分成 12000mg/kg (80%LD₅₀)、6000mg/kg (40%LD₅₀) 组、阳性对照组,阴性对照组,油镜观察每只小鼠骨髓细胞中1000个嗜多染红细胞,统计微核数及微核率(%)。

(2) 小鼠精子畸形实验将小鼠分成3000、1500、750mg/kg组,阳性对照组(40mg/kg 环磷酰胺)以及阴性对照组,镜下观察1000个精子中发生畸变的数目及畸变率(%)数。

(3) 鼠伤寒沙门氏菌回变实验(Amess实验),用四种菌观察培养皿中的回变菌落数。

(4) 小鼠致畸实验 将小鼠分成3000、500mg/kg及对照组,以雌,雄2:1比例交配,子胎鼠器官发生期(怀孕后第6—16天)染毒共10天,子怀孕后第18天—19天解剖取胎,观察死胎、活胎、吸收胎数以及胚胎有无外观畸形,骨骼及内脏畸变,和颅尾长。

结 果

一、急性毒性实验 大鼠经口灌胃后,行动迟缓、倦怠、不思饮食、俯卧不动、48小时后恢复正常,实验期间无一只动物死亡,其半数致死量大于15000mg/kg。属于相对无毒物质。

二、蓄积毒性实验 给大鼠按定期递增法连续染毒20天后,总的染毒剂量大于5.3倍的LD₅₀值,而无一例动物死亡,表明田菁子叶粉无明显的蓄积作用。(食品安全性毒性学评价程序中规定:当LD₅₀值大于10000mg/kg时,可以不必进行蓄积毒性试验,为了进一步观察是否有蓄积毒性,本次实验设15000mg/kg为田菁子叶粉的LD₅₀值)。

三、亚慢性毒性实验 整个实验期间,大多数动物活动正常、饮食未见明显异常、动物体重增长,各剂量组体重增长基本与对照组平行,喂饲到84天以后,高剂量组体重开始下降,但经统计学处理,与对照组比无显著性差别。见表1。

表 1 90天喂饲大鼠体重变化情况 (g)

组 别	动物数	0周	2周	4周	8周	10周	12周
4000mg/kg	30	190 ± 40	217 ± 51	226 ± 48	276 ± 45	290 ± 48	278 ± 46
1000mg/kg	30	188 ± 33	224 ± 38	229 ± 39	266 ± 45	282 ± 45	282 ± 40
250mg/kg	30	190 ± 37	231 ± 34	238 ± 32	266 ± 39	281 ± 38	294 ± 41
对照组	30	188 ± 44	225 ± 52	231 ± 50	276 ± 56	293 ± 56	302 ± 60

表 2 每只动物平均食物利用率 (%)

组别 (mg/kg)	2周	4周	6周	8周	10周	12周
4000	4.6	5.3	6.3	4.6	5.2	4.5
1000	5.4	5.7	5.0	4.1	4.7	4.8
250	4.5	5.1	5.2	4.4	4.6	4.3
对照组	5.2	5.0	5.2	4.6	5.1	5.0

实验期间对各组动物的血色素, 血清中葡萄糖、总蛋白、谷丙转氨酶、甘油三脂、胆固醇、钙、磷进行测定, 结果与对照组之间未见明显差异, 且在正常值范围 (详见亚慢性实验报告)。而4000mg/kg组动物的尿素氮于90天明显低于对照组 ($P < 0.05$), 但在正常值范围, 见表3。

表3 血清中尿素氮测定结果 (mg%ml) (n=30)

时间 (天)	0	30	60	90
4000mg/kg	22.0 ± 3.2	27.0 ± 5.0	33.5 ± 7.0	24.9 ± 8.0*
1000mg/kg	22.0 ± 5.0	25.0 ± 4.7	35.0 ± 4.8	29.0 ± 10.8
250mg/kg	23.5 ± 4.8	24.5 ± 5.8	33.0 ± 6.1	28.0 ± 6.9
对照组	22.5 ± 4.2	24.0 ± 4.4	37.0 ± 9.4	30.0 ± 4.9

* $P < 0.05$

动物解剖后, 各主要脏器外观未见明显异常, 其脏器比计算结果见表4, 高剂量肾体比高于其它组, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

表4 各组动物脏器系数 (%) (n=10)

组别	心	肝	脾	肺	肾
(mg/kg)					
4000	0.33 ± 0.05	3.34 ± 0.42	0.37 ± 0.10	0.66 ± 0.16	0.82 ± 0.21
1000	0.31 ± 0.03	3.00 ± 0.50	0.33 ± 0.07	0.63 ± 0.14	0.73 ± 0.06
250	0.31 ± 0.03	3.33 ± 0.30	0.31 ± 0.11	0.67 ± 0.15	0.71 ± 0.12
对照组	0.30 ± 0.05	3.43 ± 0.38	0.32 ± 0.09	0.70 ± 0.20	0.73 ± 0.12

病理结果发现对照组及高剂量组各有一只肺脓肿, 镜下可见炎性肉芽组织及小血管扩张充血, 脓腔内可见脓细胞及坏死组织。高剂量对照组各一只, 低剂量2只肝脏有小灶性散在分布的轻度颗粒性变。病变动物的数量及病变程度在各组之间差异不显著, 亦无剂量效应关系。

四、致突变试验

1. 小鼠骨髓细胞微核试验结果见表5。经用泊松检验, 各实验组与阴性对照组比无显著差异 ($P > 0.05$), 而实验组及阴性对照组比差异高度显著 ($P < 0.01$), 表明受试物在小鼠微核实验中未见明显致突变作用。

表5 小鼠骨髓细胞微核实验结果

受试物	细胞数	微核数	微核率 (%)
阴性对照组 (水)	8000	13	1.6
阳性对照 (环磷酰胺50mg/kg)	7000	220	31.4**
田菁子叶粉600mg/kg	6000	12	2.0
田菁子叶粉12000mg/kg	7000	18	2.6

** $P < 0.01$

2. 小鼠精子畸形实验 结果见表 6

表 6 动物精子畸形结果

受试物	细胞数	畸变数	畸变率 (%)
阴性对照组 (水)	5000	9	1.8
阳性对照 (环磷酰胺 40mg/kg)	5000	118**	23.6**
田菁子叶粉 3000mg/kg	5000	16	3.2
1500mg/kg	5000	15	3.0
750mg/kg	5000	17	3.4

** ($P < 0.01$)

经用泊松统计, 实验组与阴性对照组间未见明显差异 ($P > 0.05$)。本实验在 3000mg/kg 剂量以下未见田菁子叶有明显致精子畸形的作用。

3. 鼠伤寒沙门氏菌回变试验 (Amess 实验) 其结果见表 7

表 7-1 Amess 实验结果

受试物	TA97		TA98	
	—S— 9	+S— 9	—S— 9	+S— 9
1000	101.5 ± 2.5	107.5 ± 16	8 ± 2	17.0 ± 9
500	91.5 ± 9.5	94.0 ± 7	26 ± 2	22.5 ± 7.5
100	163 ± 10	125.0 ± 9	24 ± 1	32.5 ± 11.5
空白对照	119.5 ± 4.5	119.0 ± 4	25 ± 11	36.0 ± 11.0
(自发回变)	*	*	*	*
阳性对照	2472 ± 136	1121 ± 9	3344 ± 208	1154.0 ± 206

* ($P < 0.05$)

** ($P < 0.01$)

表 7-2 Amess 实验结果

受试物	TA100		TA102	
	—S— 9	+S— 9	—S— 9	+S— 9
1000	94.5 ± 17.5	69.5 ± 2.5	132.5 ± 28.5	151.5 ± 36.5
500	79.5 ± 9.5	72.5 ± 15.5	169.0 ± 12.0	240.0 ± 28.0
100	85.0 ± 17	86.0 ± 12	276.5 ± 5.5	320.5 ± 59.5
空白对照				
(自发回变)	126.5 ± 2.5	111.0 ± 19	277.0 ± 26	336.0 ± 58
阳性对照	12195.0 ± 242*	1400.0 ± 184*	1324.0 ± 196*	1600.0 ± 242*

* ($P < 0.05$)

当每皿的田菁子叶粉的浓度在 1000μg/皿以下, 无论加或不加活化系统, 各菌种均未见诱变作用。

4. 致畸实验 实验期间孕鼠体重进行测量, 各组孕鼠体重无明显差异, 见表 8, 说明田菁子叶对孕鼠体重增长无不良影响。

表 8 孕期母鼠体重增长状况 (g)

剂量 (mg/kg)	孕鼠数 (只)	时间 (天)				纯增长体重
		0	7	14	19	
对照	12	33.83±3.04	34.48±3.43	46.46±7.15	52.8±9.14	18.97±7.79
500	13	33.73±3.6	36.05±4.18	42.42±5.32	47.65±7.43	13.85±6.94
3000	17	33.68±3.12	36.15±3.8	44.71±4.74	54.51±7.2	20.90±5.88

对胚胎的影响 在500mg/kg组吸收胎数低于对照组, 而3000mg/kg组吸收胎数略高于对照组, 经统计, 实验组与对照组比均无显著性差异。而胎鼠颅尾长度500mg/kg组 低于对照组, 而3000mg/kg组与对照比无显著差异。死胎数500mg/kg组有 2 只, 3000mg/kg组有 1 只, 对照组 1 只, 见表 9。尽管有上述情况, 但未见明显剂量效应关系。胎鼠骨髓发育, 如胸骨、枕骨的骨化程度、实验组与对照组比未见异常。两个实验组均未发现外观、骨骼及内脏畸形。因此在3000mg/kg剂量未见致畸作用。

表 9 田菁子叶对小鼠生殖的影响

分 组	活胎	死胎	吸收胎	存活率	吸收胎	死亡率	颅尾长度(mm)
对照	115	1	14	89.15%	10.85%	0.87%	36.06±2.5
500mg/kg	100	2	11	89.5%	9.74%	1.77%	34.08±3.98
3000mg/kg	159	1	20	88.31%	11.31%	0.56%	35.59±1.67

讨 论

关于田菁子叶毒理学评价问题, 本研究根据“食品安全毒理学评价程序”的要求进行了三个阶段的实验, 在急性毒性实验中大鼠经口灌胃剂量达15000mg/kg时, 无一只动物死亡, 其LD₅₀值大于15000mg/kg, 属相对无害物质。其蓄积系数大于 5.3, 表明田菁子叶基本无蓄积作用。通常判定真正阳性结果首先看是否有剂量反应关系, 其次数据超过正常范围后, 经统计有显著差异, 才予肯定。在致突变实验中小鼠骨髓细胞微核实验、小鼠精子畸形实验、Ames实验的剂量分别在12000mg/kg、3000mg/kg、1000ug/皿以下未发现致突变作用。在传统致畸实验中, 小鼠的吸收率、存活率、死亡率、孕鼠体重增长与对照组比差异不显著, 并未见到胚胎外观, 骨骼及内脏畸形。在亚慢性实验中给大鼠分别喂饲40000、10000、2500PPm的田菁子叶后, 各组动物间的食物利用率、生长发育、脏器比与对照组无明显差异, 各项生化指标均在正常值范围。病理结果也未见异常改变, 为此在本试验条件下, 最大无作用剂量为4000mg/kg。

本试验使用的田菁子叶粉的主要成份, 以及氨基酸的种类和含量与豆饼相似。胰蛋白酶抑制剂的含量比国家规定的合格豆饼的含量还要低。同时实验证明田菁子叶确属相对无害物

质, 无明显的蓄积和致畸致突变作用。因此在畜牧业和水产养殖业及其它工业生产过程中使用是较安全的。特别是在实际应用中, 田菁子叶是取代部分豆类做为饲料或通过发酵成酱油, 均经过代谢或转化, 直接食用机会并不多, 因此更为安全。

参 考 文 献

1. Subcommittee on Routes of Hul GRAS List (Phase H) 1973. National Academy of Scientific Washington D.C.
2. 山东省产品质量监督检验所 检验报告 1988.5.19
3. 纪云晶 实用毒理学手册 中国环境出版社 1991.8.24

1993年发表文章部分题录

1. 崔明珍等 抗坏血酸钛促生长和抗致突变性的体外试验研究 稀有金属
17 (5): 339, 1993
2. 戴日英等 苯系化合物作业工人记忆力的调查研究
天津劳动卫生职业病情报 4: 15, 1993
3. 王淑芬 急性重酪酸钠中毒致多脏器损害一例报告
职业医学 20 (2): 90, 1993

苯乙烯在人体内的代谢动力学

周素梅 徐 莱 杜立华 宋景平 张丽娟 陈震阳

苯乙烯 (styrene) 被广泛地应用于玻璃钢生产等制造聚苯乙烯的工业生产中。多年来, 人们对苯乙烯在动物体内的动力学作了大量研究, 但对人体的研究报导甚少。本文对人体呼出气中的苯乙烯及尿中代谢产物作了动态观察, 为研究能快速、准确地反映机体反应与接触剂量关系的苯乙烯生物阈值 (BEI) 提供理论依据。

研究对象与方法

本所健康人员12人 (男 女 各半, 年龄 28~58岁) 作志愿吸入试验。在模拟的苯乙烯 $40\text{mg}/\text{M}^3$ 的环境中自由活动 8 小时, 采集受试者接触结束后 0, 0.25, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 16, 22 小时的呼出气和 0, 4, 16, 40, 64 小时的尿进行分析。

呼气用 100ml 注射器采集, 注入 Tenax GC (80~100目) 吸收管中液集吸附, 经浓缩进样器热解吸和气相色谱氢火焰检测器测定。呼出气标准曲线见表 1。

表 1 呼出气苯乙烯标准曲线

浓度 (ng/ml)	$\bar{X}$ (cm)	S
2	2.12	0.06
4	3.96	0.11
6	6.12	0.17
8	8.19	0.26

$\hat{y} = 0.5 \times - 1.019$, $r = 0.999$, 线性关系良好

尿中扁桃酸和苯酐甲酸的含量用高效液相色谱测定^③。

结果与讨论

一、苯乙烯在呼出气中消除的动力学

志愿者在模拟苯乙烯的环境中吸入的苯乙烯浓度平均为 $39.24/\text{mgM}^3$ (接近我国规定的 $\text{MAC}40\text{mg}/\text{M}^3$), 呼出气中苯乙烯浓度与时间关系见表 2。

经拟合分析, 呈三室开放模型, 其经时过程可用式 (1) 表达:

$$C = \text{Pe}^{-\alpha t} + \text{Ae}^{-\beta t} + \text{Be}^{-\gamma t} \quad (1)$$

式 (1) 中有关参数见表 3。苯乙烯环境浓度实测值: $39.24\text{mg}/\text{M}^3 \pm 0.983$

有学者^①认为, 在人和大鼠苯乙烯的呼出气呈二室型, 但本实验结果表明人呼出气中苯乙烯排出以三室型更合乎实际, 经统计曲线拟合良好。实测值与理论值之间的相关系数 $r = 0.9944$, $P < 0.001$ 。数据表明苯乙烯在呼出气中的排出属三室型。消除常数为 $0.05 \sim 0.1\text{h}^{-1}$ 。

表 2

呼出气中苯乙烯与时间的关系

时间 (h)	呼出气中苯乙烯浓度 (mg/M ³)	
	C ± SD	$\hat{C}$
0	1.89 ± 1.31	1.70
0.25	0.82 ± 0.61	0.89
0.5	0.65 ± 0.56	0.64
0.75	0.52 ± 0.35	0.53
1.00	0.41 ± 0.33	0.47
1.50	0.38 ± 0.30	0.38
2.00	0.31 ± 0.35	0.32
4.00	0.18 ± 0.15	0.19
16.00	0.64 ± 0.03	0.064
22.00	0.041 ± 0.03	0.041

注: n = 7, CC为实测值, $\hat{C}$ 为理论值

表 3

苯乙烯在呼出气中排出的有关参数

符号	单位	参数值
P	mg/M ³	0.9703
π	h ⁻¹	5.5580
$t^{1/2*}$	h	0.1247
A	mg/M ³	0.5238
α	h ⁻¹	0.6631
$t^{1/2*}$	h	1.0451
B	mg/M ³	0.2098
β	h ⁻¹	0.0742
$t^{1/2*}$	h	9.3396

表 4

苯乙烯的呼出动力学参数

符号	单位	参数值
K31	h ⁻¹	0.2262
K21	h ⁻¹	2.6911
K10	h ⁻¹	0.4492
K12	h ⁻¹	5.4892
K13	h ⁻¹	-2.5604
AUC	mg/M ³ h	3.7920
Vc/vb		0.1655