文章编号:1000-5404(2006)20-2037-03

论著

二苯氯胂对小白鼠和大鼠的急性毒性研究

高 川,鹿晓晶,韩维涛,王惠芳,张 靖,宋云扬 (中国人民解放军防化研究院第四研究所,北京 102205)

提 要: 目的 评估日本遗弃在华化学武器二苯氯胂(diphenylchlorarsine, DA)对环境和人畜的毒性危害。**方法** 通过DA对小白鼠灌胃,观察小白鼠的中毒症状,测定DA对小白鼠的LD_{50}值;观察DA对大鼠皮肤和眼睛的刺激作用。**结果** DA对小白鼠的LD_{50}为28.07 mg/kg;对大鼠皮肤的最大无作用剂量为8.8 mg/ml(0.44 mg);对眼睛损伤的最大无作用剂量为0.7 mg/ml (0.014 mg)。**结论** DA可造成小鼠肝、肾、胃和食道器质性的损伤,高浓度的DA可引发大鼠皮肤炎症和眼睛晶状体混浊,严重时引起失明。

关键词: 二苯氯胂;灌胃法染毒;半数致死剂量;急性毒性
中图法分类号: R827.1;R992 **文献标识码**: A

Acute toxicity of diphenylchlorarsine in mice and rats

GAO Chuan, LU Xiao-jing, HAN Wei-tao, WANG Hui-fang, ZHANG Jing, SONG Yun-yang (Fourth institute of Chemical Defense Academy of PLA, Beijing 102205, China)

Abstract: **Objective** To assess the toxicity risks of diphenylchlorarsine (DA) to environments, human beings and livestock. **Methods** Totally 120 mice were randomly divided into 6 groups and given DA by gastric gavage at the doses of 32, 30, 28, 26, 24, 22 mg/kg respectively for LD_{50} of DA in mice. The toxicity of DA in rat skin were evaluated by smearing 50 μl DA at the concentrations of 140, 70, 35, 17.5, and 8.8 mg/ml to an area of 4 cm^2, and that of eyes exposure was carried out by dropping 10 μl DA of 140.7, 70, 7, 0.7 mg/ml in rat eyes. The counterpart skin area and eyes served as control. **Results** LD_{50} of DA in mice was 28.07 mg/kg, the estimated doses for no-observed-adverse-effect levels (NOELs) were 8.8 mg/ml (0.44 mg) to the skin and 0.7 mg/ml (0.014 mg) to the eyes respectively. **Conclusion** DA can induce the injuries on the liver, kidneys, esophagus and stomach. High concentration of DA can cause inflammation of the skin and lens opacification, even blind.

Key words: diphenylchloroarsine, gastric gavage, LD_{50}, acute toxicity

第二次世界大战期间,侵华日军多次在我国使用化学武器。日本战败时,侵华日军为掩盖其用毒罪行,把大量的二苯氯胂(diphenylchlorarsine, DA)在我国各地掩埋、沉水。60多年来,日本遗弃的化学武器给我国人民的生命安全和生态环境造成了严重的伤害,更为严重的是随着时间的推移,掩埋、沉水的毒剂弹药将继续锈蚀乃至渗漏而引起土壤、水源的污染,其后果不堪设想[1]。

我们对DA的毒性了解较少,为了彻底销毁和消除DA的危害,我们研究了DA的急性毒性和刺激作用,以便为制定安全措施和环境保护标准提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物与主要试剂 DA,无色液体,纯度为98.16%,防化研究院合成;北京香油,北京市油脂公司;1,2-丙二醇、江苏无锡化学试剂厂。

1.1.2 实验动物 昆明白小白鼠120只,体质量18~22 g,维通利华实验动物有限公司提供,符合国家二级动物质量标准;Wistar大白鼠84只,体质量180~220 g,中国科学院动物中心提供,符合国家二级动物质量标准。

1.1.3 器材 BX51TR型荧光显微镜日本Olympus公司;HM340轮转切片机,德国蔡司公司;TP1020全自动组织脱水机,Leica公司;EG1140石蜡包埋机,Leica公司;HI1210摊片机,HI1220烘片机,Leica公司;ST5010自动染色机,Leica公司。

作者简介:高 川(1968-),女,吉林省吉林市人,博士研究生,工程师,主要从事生物化学和药理学方面的研究,发表论文10余篇。电话:(010)66758323-801,E-mail: g.ch.chuan@263.net

收稿日期:2005-11-15;修回日期:2006-03-29

1.2 方法

本研究的实验设计、实验方法与结果判定所依据的是国家药品监督管理局《新药审批办法》、原国家卫生部药政局《新药(西药)临床及临床前研究指导原则汇编》及其他有关的指南[2,3]。

1.2.1 DA溶液的配制 根据DA的溶解性采用芝麻油或丙二醇助溶后再以生理盐水作为溶剂,油溶液:准确称取所需量的DA,加入适量芝麻油配成2 mg/ml浓度,装入棕色瓶中,再将瓶放入专用干燥器中。盐水溶液:配制DA时先用丙二醇溶解,再用生理盐水稀释。

1.2.2 动物饲养和管理 实验前饲养小白鼠3~7 d,直到完成健康评价。把小白鼠按体质量分开,分组饲养在塑料笼箱中,随意自由饮水,动物房温度保持在(22±2)℃,相对湿度保持(50±10)%,12 h明暗交替。

1.2.3 小白鼠半数致死剂量的测定 在预实验的基础上选择6个剂量组,分别为32、30、28、26、24、22 mg/kg,每组20只小白鼠,雌雄各半,一次性灌胃法(ig)染毒,连续观察14 d,记录小白鼠的死亡情况,用Bliss法计算DA对小白鼠的LD_{50}。剖检死亡动物及到期处死动物,取组织切片进行病理学检查。

1.2.4 DA对大白鼠皮肤的刺激作用 在预实验的基础上,将大白鼠分为5组,每组12只,用脱毛剂脱去背部毛,每只大白鼠前后脱2块,一块给药,以另一块为对照,面积大约为4 cm^2。在脱毛24 h后,分别把浓度为140、70、35、17.5和8.8 mg/ml浓度的DA各50 μl均匀地涂于脱毛处。分别于染毒后4、24、48、72、96 h及染毒2周后观察大鼠皮肤的变化情况并各处死2只大白鼠,观察皮下组织的变化情况。

1.2.5 DA对大白鼠眼睛的刺激作用 在预实验的基础上,将大白鼠分为4组,每组6只,每只动物的右眼染毒,左眼作为对照,分别滴入140.7、70、7、0.7 mg/ml的DA各10 μl,观察大白鼠在染毒后DA对眼睛的损伤情况。

1.2.6 观察记录指标 一般体征观察:实验期间,观察动物的一般状况,包括毒性反应、发病及死亡情况。病理学检查:解剖小白鼠,肉眼观察各个脏器的外观颜色、大小、硬度和有无病变。取出动物心、肝、肺、肾、脾、脑、睾丸、前列腺、卵巢、子宫、胸腺、肾上腺等脏器及食管、胃、空肠、回肠、结肠、胰腺、肠系膜淋巴结、气管、膀胱、胸骨骨髓、垂体、脊髓、视神经等组织,放于4%中性甲醛溶液中,固定1周后削片,切取组织块2 mm厚度,按常规脱水、透明、包埋、制石蜡切片,厚4 μm,苏木精-伊红(HE)染色,在光学显微镜下观察组织病理学变化。

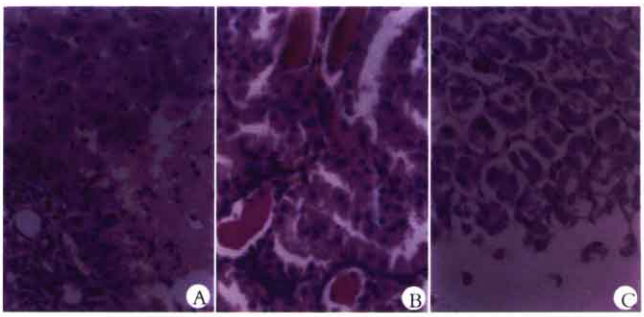
2 结果

2.1 小白鼠灌胃法染毒的毒性

DA给药后小白鼠中毒症状出现较慢,一般3 d后方出现症状,动物毛色无光、不顺,弓背,精神不振,口鼻出血,抽搐,对声音及外界物理刺激有剧烈抽搐反应,不思饮食并抽搐几日后死亡,个别动物可至给药10 d后死亡。

2.1.1 小白鼠灌胃法染毒的LD_{50}值 32、30、28、26、24、22 mg/kg 6个组的小白鼠死亡数分别为20、16、8、3、1、0只,据此采用Bliss法以死亡(E)对剂量的对数(lgD)作图,拟合出直线方程为:$E=30.57\times lgD-39.27$,据此计算出DA对小白鼠的半数致死剂量为28.07 mg/kg(95%可信限范围:27.12~29.05 mg/kg,$r=0.981$)。

2.1.2 病理学变化 裸眼观察:死亡小鼠尸检可见肝脏肿大,有白色斑点,胆囊肿大且内容物颜色深,胃部肿大。动物脏器的病理检查:DA中毒小鼠肝脏有点状坏死,肝汇管区增生,见图1A。肾中可见蛋白管型增多,见图1B。与对照组相比,中毒小鼠的胃粘膜脱落,食道表皮细胞损坏,细胞脱落,固有层水肿,见图1C。



A:肝汇管区;B:肾蛋白管型;C:胃黏膜

图1 DA中毒小鼠肝、肾、胃病理改变 (HE×350)

检查染毒小鼠的其他组织:心、脑、脾、肺、胸腺、肠道、睾丸、前列腺、卵巢、甲状腺等,与对照组相比未见异常变化。

2.2 DA对大鼠皮肤的损伤作用

DA浓度为140 mg/ml时,4 h内12只大鼠皮肤出现红肿,水肿超过1 mm并扩大,24 h出现炎性分泌物;48 h时虽然皮肤外观已经消肿,但皮下有大量出血和炎性物质;72 h时皮肤外观为紫红色,已完全消肿,但炎症依然存在,96 h外观皮肤发紫、发硬,炎症存在,直到2周时炎症仍然存在,染毒处形成了紫红色不可逆的焦痂。

DA浓度为70 mg/ml时,大鼠所出现的刺激症状和发展趋势与140 mg/ml时的症状基本相同,只是相对较轻;DA浓度为35 mg/ml时,只出现了皮肤红肿和较微的炎性反应,并且在染毒后72 h,皮肤基本恢复正常;DA浓度为17.6 mg/ml时,仅出现了皮肤红肿,并很快恢复;DA浓度为8.8 mg/ml时,未出现明显的皮肤刺激反应。低浓度DA(8.8 mg/ml,50 μl),不会对大白鼠皮肤造成损伤。

2.3 DA对大鼠眼睛的损伤作用

14 mg(140.7 mg/ml,10 μl)的DA滴入大白鼠眼内,大白鼠眼睛立即紧闭,流泪,大约20 min后,可睁开眼,分泌物使整个眼睑和睫毛潮湿;染毒1 h后,结膜水肿至眼睑半闭合,血管充血,整个上下眼睑成鲜红色;3 h后反应达到高峰,大白鼠角膜混浊,虹膜细节不清,勉强看清瞳孔,脸部肿大,鼻孔发红;给药24 h后老鼠的脸部水肿已有缓解,眼眶下有紫色的凝血块,角膜灰白,虹膜不清,出现白内障。给药48~96 h后老鼠面部水肿逐渐消失,但角膜仍旧为灰白色,虹膜,角膜不透明,无法辨认,瞳孔对光无反应。由此可以认为,DA的强烈刺激可导致大白鼠失明。

1.4 mg(70 mg/ml,20 μl)DA滴入动物眼中,开始症状与染毒14 mg症状相同,给药后第3天,大白鼠眼睛出现了晶状体混浊。4/6较轻,2/6较重;给药后第20天观察,除较严重的

晶状体混浊依然存在,较轻的稍有好转外,其他症状已基本消失。0.14 mg DA(7 mg/ml,20 μl)滴入动物眼中,有 3 只动物出现了眼眶出血,但较轻微,很快恢复,有 3 的动物出现晶状体混浊,但较轻,给药后 20 d 观察,混浊仍旧存在。0.014 mg(0.7 mg/ml,20 μl)DA 滴入动物眼中,动物虽然当时出现了刺激症状,但很快消失。

3　讨论

DA 是一种刺激剂,能强烈刺激人体器官,大剂量可造成人员伤亡,小剂量会造成轻度充血,很少或不会造成组织伤害,但对呼吸系统有较大的影响。此外还造成鼻、喉、支气管中的黏膜肿胀[1]。有文献报道由于沾染 DA 迅速窒息而死的豚鼠,其肾上腺激素有所增加[4]。浓度为 1 ~2 mg/L 的 DA 在 30 min 内即可将暴露其中的狗致死。

DA 的主要中毒症状为引起鼻急性疼痛、头胀和头痛、喉部有烧灼感、胸部闷痛,还有强烈的喷嚏和无法控制的咳嗽、眼睛疼痛、流泪,鼻涕、唾液大量增加,恶心和呕吐,严重中毒者有明显的精神抑郁。

DA 是有效的细胞呼吸抑制剂[5],对含巯基的酶有抑制作用,丙酮酸脱氢酶对其特别敏感[6]。DA 也是一种有效的烷基化剂,与巯基基团有高度的亲和力,能够进入红细胞内,以 1∶2 的方式与谷胱甘肽形成加合物,每 1×10^9 个红细胞仅需 0.02 ~0.03 μmol 就可达到饱和。

DA 对存放地点的环境具有明显的危害性。例如,1945 年,德国军队在接近德国和波兰的一个军事基地贮藏了大约 3 000 吨有机砷喷嚏剂,其中包括 DA。20 世纪 90 年代初,该地区的一些地方 1 kg 土壤中可发现超过 250 g 的砷[7]。1992 年,从这一地区 5 个不同的地方取了地下 0 ~40 cm 处的 16 种土壤样品分析砷的含量,结果表明,土壤中砷的含量平均为 923 mg/kg。

有文献报道,砷对酶蛋白的巯基有特殊的亲和力,尤其是与丙酮酸氧化酶的巯基结合形成丙酮酸氧化酶与砷的复合物,使酶失去活性[8,9],而晶状体中含有大量蛋白质,有些物质进入晶状体中的,也可与晶状体中含巯基的蛋白质结合,使酶的生物活性降低,功能受损,表现为氨基酸残基化,细胞质内蛋白和某些酶交联形成二聚体或更大聚合物,直接损伤蛋白质,呈现出纤维肿胀、断裂,空泡形成,逐渐发展为白内障[10],这也就是实验中 DA 染毒大鼠眼睛出现白内障甚至失明的原因,但由于白内障发生机制较为复杂,更深的机制有待于进一步研究。

DA 是一种作用于呼吸道和消化道的刺激剂或称为呕吐剂,从实验结果来看,死亡小鼠的肺及气管无明显病变,可以认为 DA 对小鼠的呼吸道的刺激作用是一过性的,没有造成器质性损伤,但可引起小鼠食道、肝、肾和胃的实质性病变;另外,小鼠染毒后出现抽搐反应,对声音和触动有强烈抽搐现象,提示 DA 可能还具有神经毒作用,此作用尚少见报道,需进一步研究。

DA 对小白鼠灌胃染毒的 LD_{50} 值为 28.07 mg/kg,染毒后 DA 可引起胃、肝及肾部病变,主要为胃表皮细胞脱落,颗粒层和角质层增厚,真皮下层充血和水肿,胃底细胞脱落。另外,DA 中毒小鼠的肝小叶有点状坏死及汇管区胆管增生,肾小管蛋白管型增多及肾萎缩现象。

高浓度的 DA 能够对皮肤造成重度损伤,可以导致皮肤红、肿并有焦痂形成。DA 对皮肤损伤的最大无作用剂量为 8.8 mg/ml(0.44 mg)。高浓度的 DA 可造成眼睛的水肿、充血,出现晶状体混浊,并有可能造成长期失明,浓度稍低时,可形成白内障,长期影响视觉。DA 对眼睛损伤的最大无作用剂量为 0.7 mg/ml (0.014 mg)。

参考文献:

[1] MEZA M M, KOPPLIN M J, BURGESS J L, *et al*. Arsenic drinking water exposure and urinary excretion among adults in the Yaqui Valley, Sonora, Mexico[J]. Environ Res, 2004, 96(2): 119 - 126.

[2] 袁伯俊,王治乔. 新药临床前安全性评价与实践[M]. 北京:军事医学科学出版社, 1997: 117 - 150.

[3] 中华人民共和国卫生部药政管理局. 新药(西药)临床及临床前研究指导原则汇编(药学、药理学、毒理学)[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部药政局,1993: 116 - 218.

[4] UCHINO T, ROYCHOWDHURY T, ANDO M, *et al*. Intake of arsenic from water, food composites and excretion through urine, hair from a studied population in West Bengal, India[J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44(4): 455 - 461.

[5] CUI X, WAKAI T, SHIRAI Y, *et al*. Arsenic trioxide inhibits DNA methyltransferase and restores methylation-silenced genes in human liver cancer cells[J]. Human Pathol, 2006, 37(3): 298 - 311.

[6] WEBB J L. Enzyme and Metabolic Inhibitors[M]//Vol 3. New York: Academic Press, 1966.

[7] PITTEN F A, MULLER G, KONIG P, *et al*. Risk assessment of a former military base contaminated with organoarsenic-based warfare agents: uptake of arsenic by terrestrial plants[J]. Sci Total Environ, 1999, 226(2-3): 237 - 245.

[8] KITCHIN K T, WALLACE K. Arsenite binding to synthetic peptides based on the Zn finger region and the estrogen binding region of the human estrogen receptor-alpha[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 206 (1): 66 - 72.

[9] DILL K, ADAMS E R, O'CONNOR R J, *et al*. One-dimensional and two-dimensional nuclear magnetic resonance studies of the reaction of phenyldichloroarsine with glutathione[J]. Arch Biochem Biophys, 1987, 257(2): 293 - 301.

[10] 杨水平, 黄秀榕, 祁明信. 糖皮质激素性白内障的分子生物学机制研究进展[J],国外医学: 眼科学分册,2004,28(4): 248 - 251.

(编辑　栾　嘉)