

汽车喷漆涂料挥发性有机物对小鼠肝脏的损伤作用

孟春燕¹, 李清钊¹, 李太山², 陈旭峰², 程水源³, 李艳辉¹

摘要: [目的] 研究汽车喷漆涂料挥发性有机物对小鼠肝脏的损伤作用, 为了解此类涂料的安全性提供基础。[方法] 清洁级昆明种雄性小鼠 78 只, 随机分为 13 组, 每组 6 只。4 种汽车喷漆涂料分别分为低、中、高三个染毒剂量组(染毒终浓度分别为底漆: 320、600、1 110 mg/m³; 面漆: 300、580、1 080 mg/m³; 清漆: 350、680、1 280 mg/m³; 黑漆: 400、580、1 350 mg/m³), 用静式呼吸道染毒法染毒, 每天染毒 2 h; 对照组放入无喷漆涂料的染毒柜 2 h; 持续 28 d。实验期结束后, 进行肝功能血液生化检测, 并取肝制备病理切片。[结果] 4 种涂料挥发性有机物中均含有苯和苯系物、烯烃、烷烃等有机成分。肝病理切片观察表明, 4 种油漆不同剂量染毒后小鼠肝细胞均出现不同程度的损伤, 高剂量组细胞损伤较严重。各染毒组小鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)含量较对照组均有不同程度增加, 但剂量反应关系不明显。黑漆各染毒组 ALT 含量均高于对照组, 中、高剂量组 AST、ALP 含量高于对照组($P < 0.05$), 低剂量组与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$); 面漆各染毒组 ALT、ALP 含量均高于对照组($P < 0.05$), 高剂量组 ALT、AST 含量高于低剂量组和中剂量组, 高剂量组 ALP 含量高于低剂量组($P < 0.05$); 清漆各染毒组 ALT、AST、ALP 含量均高于对照组($P < 0.05$), ALP 含量随着染毒剂量的升高而增加($P < 0.05$); 底漆各染毒组 ALT 含量均高于对照组, AST、ALP 含量仅高剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$)。不同涂料同一剂量组间比较, 清漆对肝功能影响较大。[结论] 汽车喷漆涂料挥发性有机物对小鼠肝脏有明显的肝毒性, 并且染毒剂量越大毒性越明显。

关键词: 汽车喷漆涂料; 挥发性有机物; 肝损伤; 丙氨酸转氨酶; 天冬氨酸转氨酶; 碱性磷酸酶

Damage to Mouse Liver Induced by Volatile Organic Compounds in Automotive Spray Paint MENG Chun-yan¹, LI Qing-zhao¹, LI Tai-shan², CHEN Xu-feng², CHENG Shui-yuan³, LI Yan-hui¹ (1. Experimental Center, School of Public Health/Hebei Province Coal Mine Health and Safety Laboratory, North China University of Science and Technology, Hebei 063000, China; 2. Tangshan Environmental Protection Agency, Hebei 063000, China; 3. Department of Environmental Science, College of Environment and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China). Address correspondence to CHENG Shui-yuan, E-mail: haoyulan2002@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To study the mouse liver damage induced by volatile organic compounds (VOCs) in automotive spray paint, and to provide a basis for understanding the safety level of such paints. [Methods] Male Kunming mice of clean grade ($n=78$) were divided into 13 groups randomly, with 6 mice for each group. Four kinds of automotive spray paint at low, middle, and high doses (primer: 320, 600, and 1 110 mg/m³; topcoat: 300, 580, and 1 080 mg/m³; varnish: 350, 680, and 1 280 mg/m³; black paint: 400, 580, and 1 350 mg/m³) were administered to the mice by static respiratory exposure for 2 h every day for 28 d; the control mice were placed in exposure cabinet with no spray paint for 2 h every day for 28 d. Animals were sacrificed on the final day to conduct blood biochemical exams and prepare pathological sections of liver. [Results] The four kinds of VOCs paint all contained benzene and its homologues, alkenes, alkanes, and other organic components. According to the liver pathological observation, mice hepatocytes were damaged to varying degrees after exposed to the four kinds of paint at different concentrations, and the injury was more severe in the high dose groups. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase (ALP) in each exposure group were higher than those of the control group but no obvious dose-response relationships were observed. After the black paint exposure, ALT in the three dose groups as well as AST and ALP in the

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.14768

[基金项目] 国家环保部项目(编号: 201209003)

[作者简介] 孟春燕(1984—), 女, 硕士, 实验师; 研究方向: 卫生毒理学; E-mail: ken845@163.com

[通信作者] 程水源, E-mail: haoyulan2002@163.com

[作者单位] 1. 华北理工大学公共卫生学院实验中心, 河北省煤矿卫生与安全实验室, 河北 063000; 2. 唐山市环保局, 河北 063000; 3. 北京工业大学环境与能源工程学院环境科学系, 北京 100022

middle and high dose groups were higher than those in the control group ($P < 0.05$); no significant differences were found between the low dose group and the control group ($P > 0.05$). After the topcoat exposure, ALT and ALP in the three dose groups were higher than those in the control group ($P < 0.05$); ALT and AST in the high dose group were higher than those in the low and middle dose groups; ALP in the high dose group was higher than that in low dose group ($P < 0.05$). After the varnish exposure, ALT, AST, and ALP in the three dose groups were higher than those in the control group ($P < 0.05$), and ALP increased with higher exposure doses ($P < 0.05$). After the primer exposure, ALT in the three dose groups were higher than that in control group; differences in AST and ALP were found between the high dose group and the control group ($P < 0.05$). Comparing the four kinds of paint at the same dose, varnish presented greater damage to liver function indicators. [Conclusion] The VOCs in automotive spray paint has significant toxicity to mouse liver in a dose-dependent manner.

Key Words: automotive spray paint; volatile organic compound; liver injury; alanine aminotransferase; aspartate aminotransferase; alkaline phosphatase

汽车喷漆涂料挥发性有机物(volatile organic compounds, VOCs)含有苯系物(如苯、甲苯、二甲苯等)以及烷类(如丁烷、异戊烷)等。苯系物具有强烈的肝脏毒性效应,苯在肝脏内代谢产生的多种产物可引起不同的肝细胞代谢障碍。长期接触苯、甲苯、二甲苯将对作业工人的氧化、抗氧化系统产生一定的影响导致肝损害^[1]。

随着汽车产业蓬勃发展,汽车油漆喷涂作业工人的健康问题也逐渐引起人们的重视。在实际作业过程中,工人接触到的污染物常常是多种物质的混合物,有时甚至是有机物和无机物的混合。国家法律中规定的污染物排放标准一般只是根据单一成分毒性设置的。国内联合毒性的研究也仅限于几个相似成分的简单联合,而多种物质混合甚至接近实际工作场合的联合毒性研究较少。目前国际上低浓度混合物的毒性研究是研究热点之一,多种污染物的联合毒性表现为加和作用、独立作用、协同作用和拮抗作用等,对人类的健康存在着潜在的威胁^[2]。本实验将汽车喷漆涂料VOCs作为整体来研究,通过研究其对小鼠肝脏损伤的作用,为汽车喷漆涂料的安全性研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

KDC-1044型离心机(中国科大创新股份有限公司),显微镜、AU5400生化仪(日本OLYMPUS公司),甲醛(中国索莱宝公司);同一品牌4种不同用途的汽车喷漆均购自某汽车用品店,分别为清漆、黑漆、面漆和底漆。底漆在汽车最底层做处理,用于提高面漆和物件之间的附着力;面漆和黑漆喷涂在底漆之上,面漆是所能看到的汽车表面层,本实验所用的为白色

面漆,黑漆是黑色的面漆;清漆是为了增加面漆的光泽度以及硬度而喷涂在面漆之上的一种无色透明的液体。4种汽车喷漆涂料VOCs各种成分含量由北京工业大学环境与能源工程学院解析。

实验动物为清洁级昆明种小鼠78只,雄性,体重18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号:SCXK(京)2009-0004。采用完全随机化设计将实验动物随机分为13组,每组6只,分别为对照组,及清漆/面漆/底漆/黑漆低、中、高剂量组。

1.2 染毒剂量及方法

因挥发性气体浓度不易控制,且各种成分的比例固定,因此本研究采用固定挥发源质量的方法确定染毒剂量。低、中、高剂量组分别称取相应喷漆1、2、4 g于染毒柜中,2 h后减重法测量涂料挥发后各组柜内底漆/面漆/清漆/黑漆低、中、高剂量组实际暴露浓度分别为320、600、1 110 mg/m³; 300、580、1 080 mg/m³; 350、680、1 280 mg/m³; 400、580、1 350 mg/m³。

采用呼吸道染毒方法,静式染毒。染毒柜体积为63 L,将一定质量的4种喷漆滴在滤纸上,抹匀摊开,悬挂于染毒柜中。0.5 h后将小鼠放入染毒柜中,每组染毒2 h;对照组放入无喷漆涂料的染毒柜中2 h。连续染毒28 d。

1.3 生化指标测定

饲养结束后,小鼠眼球取血,置于1 mL离心管,2 500 r/min(离心半径5 cm)离心10 min后分离血清,应用全自动生化分析仪检测血清中肝功能指标丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)。

1.4 病理学检测

采血结束后,小鼠脱颈处死,取小鼠同一位置肝叶置于10%甲醛固定24 h,制作石蜡切片,经苏木精-

伊红染色后,光学显微镜下观察。

1.5 统计学分析

利用Excel 2003软件对原始数据进行录入,用SPSS 13.0统计软件进行数据分析,采用one-way ANOVA分析多组间的差异,进一步两两比较采用SNK法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 VOCs成分分析

4种汽车喷漆涂料各VOCs成分见表1。清漆中甲苯、乙苯、邻二甲苯构成比较高,其他苯系物较少;黑漆、面漆和底漆中其他苯系物含量较高,烯烃总和以及烷烃总和含量较清漆低。

表1 4种汽车喷漆涂料VOCs构成(%)

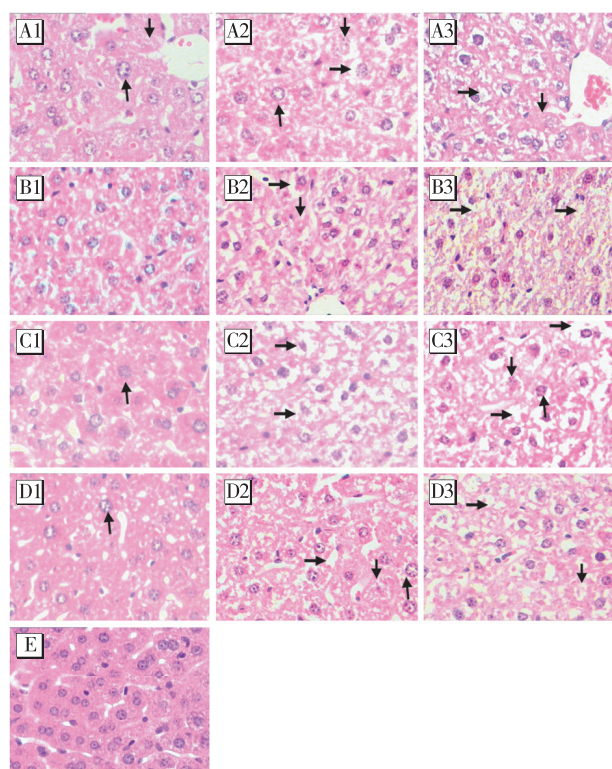
VOCs	清漆	黑漆	面漆	底漆
烷烃总和	24.31	7.97	5.34	7.29
烯烃总和	2.95	1.38	0.28	0.37
其他苯系物	3.59	50.62	49.74	52.92
邻-二甲苯	29.27	12.28	13.73	10.42
间,对-二甲苯	7.07	9.38	9.30	6.47
乙苯	17.02	7.63	9.80	13.98
甲苯	14.94	8.67	11.33	8.05
苯	0.86	2.07	0.47	0.49

2.2 病理结果

图1可见,对照组小鼠肝脏的病理切片结构清楚,肝小叶排列整齐,结构完整,可见规则的放射状排列的肝细胞索、正常血窦、中央静脉以及门管区;肝细胞呈多边形,胞浆轻度嗜酸性着色,细胞核圆形,中央位。4种涂料同一剂量组之间差异不明显,同一种涂料不同剂量组间可见肝脏损伤程度随剂量的增加而严重。低剂量组小鼠肝脏的病理切片可见肝细胞结构尚完整,肝细胞有轻微空泡变性,胞浆轻微水肿,胞浆内可见粉染匀细颗粒(↓所示),细胞体积增大(↑所示)。中剂量组病理切片可见肝细胞排列紊乱,以中央静脉为中心出现弥漫性病理改变,肝细胞肿胀伴有轻度空泡变性(→所示),且胞浆轻度水肿。高剂量组小鼠肝细胞排列紊乱,以中央静脉为中心出现弥漫性病理改变,肝细胞有中度空泡变性,肝细胞肿胀,并且胞浆中度水肿。

2.3 肝功能检测结果

2.3.1 相同涂料不同剂量组间比较 (1)清漆各剂量组小鼠血清ALT、AST、ALP含量均高于对照组,并且



[注]A:黑漆;B:面漆;C:清漆;D:底漆;E:对照组。1:低剂量;2:中剂量;3:高剂量。

图1 各组小鼠肝脏病理切片(400×)

ALP含量随着染毒剂量升高而升高(均 $P<0.05$)。(2)黑漆各剂量组小鼠血清ALT含量均高于对照组,中、高剂量组AST、ALP含量高于对照组且高于低剂量组(均 $P<0.05$)。(3)面漆各剂量组小鼠血清ALT、ALP含量均高于对照组,高剂量组ALT含量高于低、中剂量组,高剂量组ALP含量高于低剂量组(均 $P<0.05$)。高剂量组AST含量高于对照组,且高于中、低剂量组,中剂量组AST含量高于低剂量组(均 $P<0.05$)。低剂量组AST含量与对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。(4)底漆低、中、高剂量组小鼠血清ALT含量均高于对照组,且高剂量组ALT含量高于低、中剂量组(均 $P<0.05$);高剂量组AST含量高于对照组,且高于低、中剂量组(均 $P<0.05$);高剂量组ALP含量高于对照组(均 $P<0.05$),其他组间差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。见表2。

2.3.2 不同涂料相同剂量组间比较 将同一剂量组不同油漆染毒的小鼠血清中ALT、AST、ALP含量进行比较。(1)在低剂量组中,清漆组小鼠血清ALT含量高于底漆组,AST含量高于面漆、底漆和黑漆组,ALP含量高于面漆、底漆和黑漆组(均 $P<0.05$)。(2)在中剂量组中,清漆组小鼠血清ALT含量高于面漆和底漆

组,AST含量高于面漆、底漆和黑漆组,ALP含量高于面漆、底漆和黑漆组;同时,黑漆组小鼠血清AST含量高于底漆组(均 $P<0.05$)。(3)在高剂量组中,清漆组小鼠血清ALP含量高于面漆、底漆和黑漆组,且黑漆组ALP高于底漆组(均 $P<0.05$)。见表2。

表2 4种汽车喷漆涂料染毒小鼠血清中肝功能指标变化情况(U/L)

分组	低	中	高
ALT			
清漆	54.83 ± 11.07 ^a	55.71 ± 13.26 ^a	62.71 ± 11.63 ^a
黑漆	50.00 ± 8.69 ^a	52.00 ± 6.04 ^a	53.67 ± 6.51 ^a
面漆	44.75 ± 3.69 ^a	45.14 ± 4.06 ^{ab}	53.67 ± 5.03 ^{abc}
底漆	43.00 ± 3.54 ^{ab}	44.14 ± 5.43 ^{ab}	58.00 ± 5.39 ^{abc}
AST			
清漆	136.00 ± 28.99 ^a	145.83 ± 16.13 ^a	152.43 ± 33.65 ^a
黑漆	102.67 ± 11.93 [*]	119.00 ± 5.83 ^{ab*}	151.75 ± 11.95 ^{abc}
面漆	94.00 ± 7.64 [*]	106.00 ± 8.19 ^{bs}	129.50 ± 5.57 ^{abc}
底漆	96.00 ± 6.20 [*]	101.43 ± 8.42 ^{*#}	152.20 ± 9.04 ^{abc}
ALP			
清漆	139.00 ± 25.99 ^a	178.14 ± 35.14 ^{ab}	212.43 ± 33.06 ^{abc}
黑漆	87.00 ± 8.68 [*]	127.00 ± 11.69 ^{ab*}	141.75 ± 6.99 ^{ab*}
面漆	107.67 ± 16.40 ^{**}	117.00 ± 18.73 ^{**}	131.3 ± 5.51 ^{ab*}
底漆	91.00 ± 8.21 [*]	94.60 ± 10.45 [*]	106.40 ± 16.62 ^{ab*}

[注] 对照组ALT、AST、ALP分别为(36.20 ± 7.04)、(94.80 ± 10.99)、(80.80 ± 10.78)U/L。a: 与对照组相比, $P<0.05$; b: 与同类喷漆低剂量组相比, $P<0.05$; c: 与同类喷漆中剂量相比, $P<0.05$ 。*: 与同剂量清漆组相比, $P<0.05$ 。#: 与同剂量黑漆组相比, $P<0.05$ 。

3 讨论

肝脏是体内最大的解毒器官,有机物进入机体后主要由肝脏完成代谢解毒的过程。而具有亚慢性蓄积性的化合物在进入机体后一般都会引起肝脏不同程度的损伤。ALT、AST和ALP是检测肝脏受损伤的重要指标,在临床上具有重要诊断意义^[3-5]。有机气体被机体吸入后约40%在肝脏被氧化,大部分代谢物约在2h内排出体外,少部分约在48h后排出,经反复多次吸入后蓄积量增加,排出的时间也相应增长^[6]。本研究采用2h/d染毒,动物大剂量吸入导致蓄积或排泄障碍,肝脏负担增加,出现肝组织功能异常。

本研究结果显示,4种涂料挥发物对小鼠肝脏转氨酶(ALT和AST)及ALP都有不同程度的影响,并且随着剂量升高肝脏损伤严重,但剂量效应关系不明显。病理切片观察表明,不同染毒剂量的小鼠病理切片与对照组比较,有不同程度的肝损伤,且表现为随

着染毒剂量的增加,肝损伤程度越来越严重。4种油漆虽然有害物质实际暴露剂量有所差异,但是初始重量一致,在实际使用中用相同质量的油漆将产生不同的毒性作用。因此,将同一剂量组不同油漆染毒的小鼠血清中ALT、AST、ALP含量进行比较具有一定的实际意义。综合比较4种汽车喷漆涂料肝功能指标,结果提示清漆毒性大于其他3种油漆,黑漆的毒性略大于底漆,可能与清漆与黑漆中二甲苯和乙苯的含量较高有关。血清中ALP在正常情况下主要来源于肝脏和骨骼各半,主要用于肝胆疾病的诊断和反映成骨细胞活性及骨盐代谢的状况^[4]。本研究结果中清漆各染毒组小鼠血清中ALP含量高于其他各组,清漆是否对骨细胞有损害,有待进一步研究。

本研究结果提示,汽车喷漆涂料VOCs大量暴露对机体具有明显的肝毒性,进行相关工作的工人以及使用者要注意防范和保护。但由于静式染毒存在染毒时间短、浓度大等缺点,因此本研究与实际暴露情况存在较大差异。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

[1] 黄丽丽,肖吕武,吴琳,等.某汽车制造企业油漆涂料接触工人健康状况分析[J].中华劳动卫生职业病杂志,2014,32(4): 271-273.

[2] 黄伟英,陈鸿汉,刘菲,等.低浓度下4个取代苯污染物与硝酸铅的混合对发光菌的联合毒性[J].生态环境学报,2010,19(1): 57-62.

[3] 张丽杰.血清转氨酶的测定及临床意义[J].中国医药指南,2012,10(9): 298-299.

[4] Merk S, Hentschel M, Talazko J, et al. Unusual bilateral Tc-99 Mdpd uptake on bone scan[J]. Clin Nucl Med, 2003, 28(11): 929-930.

[5] 郑铁生,叶立新,薛锦,等.实验大鼠胆汁淤积型肝病血清碱性磷酸酶的测定[J].中国现代医学杂志,2007,17(7): 800-802.

[6] Wiland P, Szechcinski J. Proximal tubule damage in patients treated with gentamicin or amikacin[J]. Pol J Pharmacol, 2003, 55(4): 631-637.

(收稿日期: 2014-12-12)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 葛宏妍)