

α -溴代肉桂醛的毒性研究

陆敦毕 洁 贺清玉 王静 陈耀富 印木泉

第二军医大学特殊毒理学教研室 上海 200433

摘要 用急性毒性试验、亚急性毒性试验及传统致畸试验研究了 α -溴代肉桂醛(BCA)的毒性,结果表明,该物质为低毒类化学物;对皮肤和眼睛有非特异性炎性刺激作用;对SD大鼠经口亚急性毒性试验最小作用剂量为369mg/kg体重;对SD大鼠无胚胎毒性及致畸作用。

关键词 α -溴代肉桂醛;胚胎毒性;致畸作用

STUDIES ON THE TOXICITIES OF ALPHA-BROMOCINNAMALDEHYDE AND STRUCTURE-EFFECT RELATIONSHIP

Lu Dun, Bi Jie, He Qingyu, Wang Jing, Chen Yaofu, Yin Muquan.

Department of Special Toxicology, Second Military Medical University, Shanghai 200043

Abstract The toxicities of alpha-bromocinnamaldehyde were studied in acute toxicity experiments, subacute toxicity experiment and conventional teratological experiment. The results showed that the substance was a low toxic compound, with slight non-specific inflammatory irritation effects on the skin and eye. The minimum effective dose of subacute toxicity experiment (oral) was 369mg/kg bodyweight. BCA didn't show embryotoxic or teratogenic effects in Sprague-Dawley rats.

Key words alpha-bromocinnamaldehyde; embryotoxicity; teratogenic effect.

α -溴代肉桂醛(BCA)系肉桂醛 α -位碳原子溴代后产物,具有较强的防霉防蛀效应。为了推广应用,我们应用急性毒性试验、亚急性毒性试验及传统致畸胎试验研究了其毒性作用,并分析了毒效应与结构的关系。

材料和方法

1. 测试样品: α -溴代肉桂醛,淡黄色粉末,由江苏省武进县邹堰精细化工厂提供。

2. 试验方法

2.1 LD₅₀试验:霍恩氏法,选用昆明种小鼠(本校实验动物中心提供),BCA以1%羧甲基纤维素钠配成悬浮液,灌胃给药,四组剂量分别为1000,2150,4640和10000mg/kg。给受试物后即刻观察动物反应情况,连续

观察7天。

2.2 亚急性毒性试验:选用上海市计划生育研究所动物供应中心提供的健康SD大鼠,按体重随机分为4组,每组20只动物,雌雄各半。3个BCA剂量组分别为:738,369及184.5mg/kg,以1%羧甲基纤维素钠为溶剂对照。各剂量组及对照组经口给药,连续30天。实验开始前,动物在实验室适应环境一周。实验开始后,每日观察实验动物的表现,记录进食量,每周称动物体重一次。在给药结束后,处死 $\frac{1}{2}$ 动物作血液学指标及病理学检查。余下 $\frac{1}{2}$ 动物于停药后18天剖杀再作血液学指标及病理学检查。

2.3 皮肤过敏试验:选用本校实验动物中心提供的健康白色豚鼠30只,雌雄各半。

阴性对照组为凡士林。受试物 BCA 与滑石粉混合(15%BCA+85%滑石粉)后与等量凡士林混和。阳性致敏物以 2,4-二硝基氯化苯(分析纯)按上法配成 1%的致敏浓度和 0.1%的激发浓度。实验时按体重随机分成 3 组,分别为 BCA 组、阴性组、阳性组,每组 10 只动物,雌雄各半,各组分别于第 1 天、第 7 天和第 14 天取受试物 0.2 克涂在动物左侧脱毛区,每次持续固定 6 小时。于末次给受试物致敏后 14 天,将受试物 0.2 克涂于豚鼠背部右侧脱毛区,6 小时后去掉受试物,即刻观察,然后于 24,48,72 小时再次观察皮肤反应情况。按《新药(西药)毒理技术要求规范》评分。

2.4 眼刺激试验:选用本校实验动物中心提供的成年健康家兔 4 只,空白对照为橄榄油(分析纯)。试验时将 BCA 溶于橄榄油中配成浓度为 15%的滴眼剂。取 0.1ml 滴入动物右侧眼结膜囊内;左侧滴入 0.1ml 橄榄油,给受试物后眼睛被动闭合 5~10 秒,记录给受试物 1,6,24,48,72 小时后眼局部反应情况。按《新药(西药)毒理技术要求规范》评分。

2.5 微核试验:选用本校实验动物中心提供的成年健康 ICR 小鼠。BCA 设 3 个剂量组,分别为 1845,369 和 184.5mg/kg。BCA 及 1%羧甲基纤维素钠(阴性对照物),按每 10 克体重一次灌胃给药。阳性对照物为环磷酰胺(CP),按 100mg/kg 体重一次腹腔注射给药。通过预试,确定给药后 24 小时采样。取股骨骨髓、涂片、Giemsa 染色,每只动物计数 10000 个嗜多染红细胞,观察微核出现的频率及嗜多染红细胞与正常红细胞的比率。

2.6 传统致畸胎试验:SD 大鼠由上海市计划生育研究所动物供应中心提供,BCA 3 个剂量组分别为:738,369 及 184.5mg/kg,以 1%羧甲基纤维素钠为溶剂对照。由于 SD 大鼠为致畸胎试验敏感动物,按《新药(西药)毒理技术要求规范》可不作阳性对照,查见阴道栓之日作为妊娠的第 0 天(D₀),各剂量组

和阴性对照组从孕期第 6 天起,以灌胃方式投予相应剂量的受试物直至孕期第 15 天止。

于孕期第 20 天,处死孕鼠,取出胎鼠,检测受试物的胚胎毒性、致畸胎作用及其对母体的毒性。检查指标:母体增重,胎鼠的生长发育指标,外观畸形,内脏畸形(staples 法),头部畸形(wilson 切片法)和骨骼畸形。

结 果

1. LD₅₀试验:给药后仅前四天内有动物死亡,四剂量组 1000,2150,4640 和 10000mg/kg 动物死亡数分别为 0,1,3,5,查 Horn 表得:LD₅₀=3690mg/kg,95%可信区间为 2170~6280mg/kg。

2. 亚急性毒性试验:给药前后各剂量组、对照组动物临床表现无异常;血液学指标均在正常范围内。剂量在 184.5mg/kg 体重以下时,无明显病理改变。369mg/kg 组和 738mg/kg 组病理检查分别发现 2 只和 1 只大鼠患肺支气管癌。该 2 剂量组大部分大鼠肝细胞出现浊肿,停药后 18 天恢复正常。

3. 皮肤过敏试验 受试物所致过敏反应根据红斑和水肿形成程度予以评分,结果见表 1。

表 1 不同时间红斑得分和水肿得分

组 别	红 斑				水 肿			
	6h	24h	48h	72h	6h	24h	48h	72h
样品组	9	14	3	0	5	9	0	0
阴性对照组	0	0	0	0	0	0	0	0
阳性对照组	19	29	12	0	8	18	0	0

经致敏程度(%) [平均反应值/7,其中平均反应值=(红斑得分+水肿得分)/合计动物数] 计算,阳性物 72h 内致敏程度为 30.71%,属中度致敏性;阴性受试物 72h 为内致敏程度为 0,无致敏性;BCA72h 致敏程度为 14.29%,属轻度致敏性。

4. 眼刺激试验 BCA 滴入兔眼 1h 的刺激作用最强,随作用时间延长刺激作用减轻,72h 后,刺激作用基本消失。根据《新药(西药)毒理技术要求规范》,将每只动物的眼角

膜、虹膜和结膜的眼刺激反应分值相加,即是一只动物眼刺激反应的得分。1h, 6h, 24h, 48h, 72h 时眼刺激反应的平均分值为 5.25, 4.25, 3.75, 2.75, 1.00, 72h 内眼刺激反应的最后分值为: 3.8。

5. 微核试验: BCA 3 个剂量组 1845, 369, 184.5mg/kg 体重, 阴性对照组及阳性对照组的微核率(%)分别为: 4.75 ± 0.36 ; 1.70 ± 1.66 ; 1.30 ± 0.87 ; 2.10 ± 1.17 ; 40.7 ± 9.08 。BCA 3 个不同剂量组与阴性对照组比较, 微核率无显著差别($P > 0.05$); 阳性对照组与阴性对照组比较, 微核率相差非常显著($P < 0.01$)。

6. 传统致畸胎试验: 结果见表 2。实验用孕鼠 69 只, 每组 17~18 只, 检查胎鼠共 689 只。

6.1 母体效应 各组孕鼠妊娠后体重增加(妊娠第 20 天母体重-妊娠第 0 天母体重), 与阴性组相比, 经统计分析, 无显著性差异($P > 0.05$), BCA 对孕鼠体重没有影响。

6.2 胚胎效应: 活胎率、死胎率、吸收胎率, BCA 各剂量组与阴性照组相比, 均无显著性差异($P > 0.05$)。

6.3 对胎鼠生长发育的影响: 胎鼠身长、体重、尾长, BCA 各剂量组与阴性对照组相比, 均无显著性差异。

表 2 BCA 对孕鼠和胚胎的影响

目 标	阴性对照组	738mg/kg	368mg/kg	184.5mg/kg
孕鼠数(只)	15	15	15	15
孕鼠增重(克/只)	130.6 ± 28.87	109.8 ± 34.65	112.07 ± 24.05	121.87 ± 19.43
着床数(只)	149	168	188	184
活胎				
数目(只)	148	166	185	182
百分率(%)	99.33	98.81	98.40	98.91
体重(克/只)	4.12 ± 0.38	4.16 ± 0.58	4.18 ± 0.60	4.08 ± 0.41
身长(cm/只)	3.67 ± 0.51	3.53 ± 0.46	3.71 ± 0.54	3.46 ± 0.48
尾长(cm/只)	1.27 ± 0.34	1.32 ± 0.51	1.31 ± 0.42	1.26 ± 0.39
死胎				
数目(只)	0	0	1	0
百分率(%)	0	0	0.53	0
吸收胎				
数目(只)	1	2	2	2
百分率(%)	0.67	1.19	1.06	1.09
畸形				
数目(只)	0	0	0	0
百分率(%)	0	0	0	0

6.4 对胎鼠致畸胎作用: BCA 各剂量组与阴性对照组胎鼠均无外观、内脏和骨骼畸形发现。

369mg/kg 剂量组肺支气管癌发生率分别为 5% 和 10%, 均无统计学意义($P > 0.05$)。因本试验为非致癌试验, 随试验时间延长、剂量加大, 肺支气管癌发生率可能会出现有统计学意义的结果。BCA 能引起轻度皮肤过敏反应, 对眼有轻度刺激作用; 微核试验阴性; 无母体毒性、胚胎毒性和致畸胎作用。BCA 曾报道长期皮肤用药后, 可引起小鼠体重增加减少, 存活率轻度降低, 血液中非酯化脂肪酸和磷脂下降、表皮坏死、结痂、非炎性浸润、脾髓外造血和淀粉样退变; 肺腺瘤形成⁽¹⁾。α-溴

讨 论

用急性毒性试验、亚急性毒性试验及传统致畸胎试验较全面地评价了 BCA 的毒性, 结果表明 BCA 为低毒类化学物质($LD_{50} = 3690\text{mg/kg}$), 亚急性毒性试验剂量在 369mg/kg 以上时可出现有意义的肝细胞浊肿($P < 0.01$), 停药后 18 天恢复正常。BCA738,

化肉桂醛为肉桂醛 α 碳原子溴化后产物,肉桂醛常用作调味品和香料,无刺激作用,毒性小;而溴是一种对粘膜有强烈刺激性和腐蚀性的物质,组织损害程度较明显^[2]。实验中注现的眼刺激反应、皮肤过敏反应及病理组织损害可能与BCA中溴原子的存在有关。曾有人报道 α -溴代肉桂醛是较强烈的直接致突变物^[3,4]。肉桂酸 α 碳原子溴化后, α / β 位烯键键打开, β 碳原子带有正电荷,氧原子带有负电荷,如下图所示:



β 碳原子具有亲电子性,可与DNA直接作用引起损伤,故BCA对小白鼠骨髓细胞DNA有直接致突性。 α 碳原子取代物极性愈强, β 碳原子亲电子性愈强,DNA损伤作用也就愈

(承接第32页)

基因表达的促进作用。此外,DBA-CL在自来水浓缩液代谢诱导实验中的尝试还表明,S₉诱导CL强度可以作为反映该浓缩液的诱变性强弱的指标。所以,DBA-CL不仅对于毒物代谢中的自由基作用的研究,而且对于毒理学检测评价中的实验应用也有一定意义。

参考文献

1. Vatanen T, et al. Relations between drinking water mutagenicity and water quality parameters. *Chemosphere* 1980; 9: 17-189.
2. Maron DP, et al. Kinetic determination of enzymatic activity and modification of metabolic activation systems in the SOS chromotest. *Mut Res* 1986; 164: 355.
3. Maron DM, et al. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mut Res* 1983; 113: 173.
4. Johanneson KAM, et al. Measurement of cytochrome P-450 in the presence of large amounts of contaminating hemoglobin and methemoglobin. *Anal Biochem* 1978; 86: 725.

强,这已被Ames试验证实^[5]。 α -溴代肉桂醛可被体外代谢系统直接分解(酶性)或与GSH类物质直接作用(非酶性),其毒性作用逐健或消失,故体内微核试验和致畸胎试验为阴性结果。

BCA为低毒类物质,其毒性在体内可部分降解。

参考文献

1. Morima T, et al. Combined long term toxicity carcinogenicity test of alpha bromocinnamic aldehyde (BCA) applied to female mouse skin. *Eisei Shikenjo Hokoku* 1989; 107: 29.
2. 余元瀚主编. 化学物质毒性全书(第一版). 上海: 上海科学技术文献出版社, 1991: 154-195.
3. Soudecker T, et al. Effect of methyl and halogen substituents in the alpha C position on the mutagenicity of cinnamaldehyde. *Mutat Res* 1983; 116: 1.
4. Oguma S, et al. Alpha bromocinnaminaldehyde, its mutagenicity and contents in commercial products. *Eisei Shikenjo Hokoku* 1989; 107: 21.
5. Brien RJ. In: *Methods in enzymes*. V. 11B, 1978: 407.
6. Jarnat AW, et al. Induction of microsomal drug metabolism in man and in the rat by exposure to petroleum. *Brit J Indust Med* 1981; 38: 91.
7. Greene WE, et al. An improved assay of E. coli. *J Pharm Exper Therap* 1982; 205: 596.
8. Tashiro GS, et al. Spontaneous and luminol chemiluminescence from tissue preparations. *Natr Sci* 1980; 30: 569.
9. Rakkonen L. Genotoxic effects of various chlorinated butenoic acid in chlorinated drinking water. *Mut Res* 1990; 240: 109.
10. Backlund P, et al. Influence of chlorination pH and chlorine dose on the formation of the strong mutagen MX in water. *Chemosphere* 1989; 18: 1903.
11. Järnatainen A, et al. Chlorinated drinking water: Genotoxicity and induction of hepatic monooxygenase. In: Schuster L, ed. *Proceedings of the international conference on biochemistry and biophysics of cytochrome P-450*. London: Taylor, 1989: 726.
12. 陈波林,等. 煮沸对自来水有机浓缩物致突变性的影响. *环境与健康杂志* 1992; 9(3): 97.