

彗星实验评价氯乙烯作业工人职业性 DNA 损伤的危险因素

耿广华¹, 马世伟², 汤乃军^{2*}, 张芃¹, 韩伟¹, 刘静², 马晓明², 张春梅², 陈曦²

(1. 天津市塘沽区大华医院, 天津 300455; 2. 天津医科大学劳动卫生教研室, 天津 300070)

摘要: 目的 分析氯乙烯作业工人彗星实验结果, 评价氯乙烯作业工人 DNA 损伤主要影响因素。方法 分离外周血淋巴细胞, 经彗星实验分析 DNA 损伤情况, 应用聚合酶链反应 (PCR) 检测谷胱甘肽转移酶 (*GSTT1*, *GSTM1*) 基因型; 应用 PCR 和限制性酶切片长度多态分析技术 (RFLP) 检测细胞色素 P4502E1 酶基因型 (*CYP2E1*), 收集历年体检资料, 然后对结果进行统计分析。结果 经各因素同 OTM 做秩和检验, 平均每年接触量、*CYP2E1* c1c2 c2c2、饮酒均与氯乙烯作业工人 DNA 损伤有关。结论 氯乙烯工人 DNA 损伤情况受遗传特性、生活习惯、氯乙烯作业等因素的综合影响, 故用于氯乙烯工人健康监护应作全面考量。

关键词: 氯乙烯单体; 彗星实验; 基因多态性

中图分类号: R135.1; R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2007)04-0218-04

Risk factors assessment on occupational DNA damage in vinyl chloride workers using comet assay

GENG Guang-hua¹, MA Shi-wei², TANG Nai-jun^{2*}, ZHANG Peng¹, HAN Wei¹, LIU Jing², MA Xiao-ming², ZHANG Chun-mei², CHEN Xi²

(1. Dahua Hospital, Tanggu, Tianjin 300455, China; 2. Occupational Health Department, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract; Objective Investigating the comet assay results of VCM (vinyl chloride monomer) workers to evaluate the main influencing factors of DNA damage by this method. **Method** Comet assay was used to detect the DNA damage. The genotypes of *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* were determined by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) respectively in DNA of white blood cells in the workers. **Result** Rank test showed that *CYP2E1* c1c2 c2c2, average VC exposure level and alcohol-drinking habit were all correlated with DNA damage. **Conclusion** DNA damage was affected by lifestyle, genetic character and VCM exposure. Therefore, the finding of DNA damage should be given comprehensive analysis in occupational health surveillance of vinyl chloride workers.

Key words: VCM (vinyl chloride monomer); Comet assay; Genetic polymorphism

氯乙烯能引起肝脏毒性, 并已被确定为人类致癌物。自 20 世纪 90 年代中期以来, 我国聚氯乙烯行业快速发展, 产量由 1995 年的 137.4 万吨增至 2005 年的 650 万吨, 年均增长 14.3%, 明显高于国内同期 GDP 增长率^[1]。因此, 有必要探讨氯乙烯作业工人发生 DNA 损伤状况及其影响因素, 为氯乙烯接触人群提供更好的健康监护。

1 对象与方法

1.1 对象

选择氯乙烯作业超过 1 年并完整填写调查表的 2006 年在职工人为研究对象, 获得符合条件的工人 102 名 (男 84 名、女 18 名), 平均年龄 (33.9 ± 9.3) 岁, 平均工龄 (11.7 ± 9.0) 年。

1.2 彗星实验

1.2.1 血样采集 无菌抽取在职氯乙烯作业工人静脉血 5 ml 肝素抗凝, 分装 2 ml 做彗星实验, 2 ml 提取 DNA 做基因多态性检测, 1 ml 备用。

1.2.2 淋巴细胞分离 取当天血液静置, 弃上清, 加入等体积生理盐水混匀, 加入到等体积 4 ml 淋巴细胞分离液中, 2 000 r/min (半径 15 cm 水平转子) 离心 15 min, 收集界面细胞, 光学显微镜下计数, 调整浓度为 100 个/ml。

1.2.3 淋巴细胞彗星实验检测 磨砂载玻片预热至 40℃ 左右后, 在载玻片上滴加 75 μl 0.6% 正常熔点琼脂糖, 制成第一层胶, 待凝胶固化, 75 μl 0.75% 低

收稿日期: 2007-04-10; 修回日期: 2007-06-18

基金项目: 天津市塘沽区科技兴区计划资助项目 (2005-XQ33-32)

作者简介: 耿广华 (1951-), 男, 副主任医师, 主要从事职业病临床工作。

*: 通讯作者, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 劳动卫生与工业毒理。

熔点琼脂糖预热至 37℃后与 25 μl 细胞悬液混匀制成 0.5% 低熔点琼脂糖制备第二层凝胶。待胶固化后将载玻片放入裂解液 (2.5 mol/L NaCl、100 mmol/L Na₂EDTA、10 mmol/L Tris、pH10, 用前加入 1% Triton X 100 和 10% DMSO) 中裂解 1 h。然后将载玻片放入电泳槽, 在电泳缓冲液 (10 mol/L NaOH、200 mmol/L EDTA) 中静置 20 min 使 DNA 解链, 恒压 25 V 300 mA 低温避光电泳 20 min, 取出载玻片放入缓冲液 (400 mmol/L Tris-HCl, pH7.4) 中和 2 次, 每次 10 min。成中性后晾干载玻片, 10~15 μl 溴化乙锭 (20 μl/ml) 染色, 双蒸水冲去多余染液。盖上盖玻片后倒置荧光显微镜下拍照, 激发光为绿色, 波长 515~560 nm, 每个样品随即选取 100 个彗星图像, CASP 彗星分析软件分析彗星图像, 统计 OTM 值 (OTM = 彗星细胞尾部 DNA % × 头部中心到尾部中心的距离), 此指标比单纯用头长、尾长等长度指标更能全面地反映 DNA 的损伤程度。

1.3 氯乙烯代谢酶基因多态性

采用 Biospin 全血基因组 DNA 提取试剂盒, 提取 DNA, 分光光度法在 260 nm、280 nm 处测定其含量和质量, -20℃保存备用。基因多态性测定见表 1。

表 1 基因多态性测定

基因	引物序列	退火温度	限制性内切酶	产物长度
CYP2E1	5'-CCAGTCGAGCTCAATGTCA-3'	58℃	Pst I	cl e1 410 bp
	5'-TTCATTCTCTCTCTCAACTGG-3'			cl e2 410 bp/290 bp/120 bp cl e2 290 bp/120 bp
GSTT1	5'-TTCCTTACTCGTCCCTCACATCTC-3'	56℃		有 480 bp
	5'-TCACGGGATCATGGCCAGCA-3'			无
GSTM1	5'-GAACTCCCTGAAAGCTAAAGC-3'	56℃		有 219 bp
	5'-GTTCGGCTCAATATACTGGT-3'			无
β-actin	5'-GTGGGGGGCCACAGGCAACA-3'	58℃		540 bp
	5'-AAAAGCTATTAAGCGAAGAT-3'			

1.4 统计分析

数据由 SPSS11.5 统计包处理, 采用秩和检验, 分析各个因素对彗星实验 OTM 值的影响。

2 结果

2.1 吸烟对 OTM 值的影响

本次实验将烟龄 < 10 年且每天 < 10 支定为轻度吸烟, 烟龄 > 10 年或每天 > 10 支者定为重度吸烟。本次研究未发现吸烟与氯乙烯作业工人 DNA 损伤有关。见表 2。

2.2 饮酒对 OTM 值的影响

平均每天饮酒 < 60 g 者定义为轻度饮酒, ≥ 60 g

者定义为重度饮酒, 经成组设计多样本比较秩和检验, $P < 0.01$ 差异有统计学意义, 提示饮酒可能为 DNA 损伤的影响因素。见表 3。

表 2 吸烟与 OTM 值的关系

吸烟分级	n	M	$P_{25} \sim P_{75}$	χ^2 值	P 值
不吸烟	45	1.183	0.818~2.206	2.776	0.25
轻度吸烟	22	0.965	0.588~2.164		
重度吸烟	35	2.048	0.812~6.199		

表 3 饮酒与 OTM 值的关系

饮酒分级	n	M	$P_{25} \sim P_{75}$	χ^2 值	P 值
不饮酒	36	1.027	0.730~1.847	10.347	0.006
轻度饮酒	52	1.213	0.715~2.114		
重度饮酒	14	5.018 ^{*#}	1.562~14.726		

与不饮酒组比较 * $P = 0.002$, 与轻度饮酒比较 # $P = 0.004$, 有统计学意义

2.3 平均每年接触量与 OTM 值关系

以工人每天实际接触 7 h, 每月工作平均约为 23 d (四班三运转, 即上 3 d 休息 1 d), 一个月总接触 9 660 min 计。

累积接触剂量 = \sum (年接触氯乙烯平均浓度 × 当年接触月数 × 9 660) × 肺通气量 × 70% / 10^6 (男肺通气量均值 6 500 ml/min, 女肺通气量均值 4 300 ml/min, 30% 为无效腔)

平均年接触剂量 = 累积接触剂量 / 工龄

由表 4 可看出高剂量与低剂量接触工人相比 DNA 损伤较为严重, 提示氯乙烯平均每年的接触量与氯乙烯作业工人 DNA 损伤有关。

表 4 平均每年接触量与 OTM 值关系

平均年接触量 (mg/m ³)	n	M	$P_{25} \sim P_{75}$	χ^2 值	P 值
0	32	0.818	0.525~1.629	12.860	0.002
10 000~	11	0.964	0.642~1.470		
≥ 30 000	59	1.647 [*]	0.922~5.342		

与 0 mg/m³ 比较 * $P = 0.001$, 有统计学意义

2.4 工龄、年龄对 OTM 值的影响

由表 5 可看出工龄、年龄并不是引起 DNA 损伤的影响因素。可能由于氯乙烯在体内的代谢速度很快, 蓄积性不明显, 且 DNA 损伤后机体存在修复机制, DNA 损伤仅反映即时的情况, 因而未发现 DNA 损伤与工龄有统计学关系。

2.5 氯乙烯代谢酶细胞色素 P450 2E1 (CYP 2E1) 基因型与 OTM 值关系

由于 CYP 2E1 c2c2 基因型仅为 5 例, 将其与

c1c2合并进行统计分析。表6表明具有氯乙烯I代谢酶CYP2E1c1c2c2比c1c1型的工人更易发生DNA的损伤。

表5 工龄、年龄与OTM值的关系

Table with 6 columns: 工龄/年龄, n, M, P25~P75, χ²值, P值. Rows include 工龄分级 (1-5年, 6-10年, >10年) and 年龄分级 (20-30岁, 31-40岁, >40岁).

表6 CYP2E1基因型与OTM值关系

Table with 6 columns: CYP2E1基因型, n, M, P25~P75, Z值, P值. Rows for c1c1 and c1c2c2 genotypes.

2.6 氯乙烯代谢酶谷胱甘肽-S-转移酶(GSTT1, GSTM1)基因型与OTM值关系(表7)

表7 GSTT1、GSTM1基因型与OTM值关系

Table with 6 columns: 基因型, n, M, P25~P75, Z值, P值. Rows for GSTT1 and GSTM1 genotypes (野生型, 缺失型).

本研究显示, GSTT1基因缺失型频率为47.06%, GSTM1基因缺失型频率为44.17%, 与相关文献报道相符(GSTT1 29.1%~54.0%, GSTM1 42.5%~47.5%)^[2-4], 未见其与肝损伤有明显关系。CYP2E1c1c1基因频率为68.63%, c2c2基因频率为26.47%, c1c2基因频率4.90%, 与相关报道相符^[5]。本次实验未发现谷胱甘肽-S-转移酶基因型(GSTT1、GSTM1)与彗星实验OTM值即DNA损伤有关。

2.7 引起DNA损害的各因素组间比较

引起DNA损害的各因素组间可比性分析, 由表8可看出CYP2E1基因型(c1c1、c1c2c2)两组之间年接触VCM量、饮酒因素分布未发现差异; 饮酒(不饮酒、轻度饮酒、重度饮酒)3组之间年接触VCM量、CYP2E1基因型因素分布未发现差异; 年接触VCM量(0mg/m³~、10000mg/m³~、≥30000mg/m³)3组之间饮酒、CYP2E1基因型因素分布未发现差异。说明组间其他DNA损伤影响因素具有可比性。

表8 各影响因素均衡性秩和检验比较

Table with 5 columns: 对照组, 影响因素, Z值, χ²值, P值. Rows for CYP2E1 genotypes and drinking factors.

3 讨论

本研究通过VCM接触工人淋巴细胞彗星实验(单细胞凝胶电泳), 评价VCM所致的DNA损伤, 并通过接触工人累积接触剂量的准确计算, 评估累积接触剂量和职业危害间的关系, 综合探讨氯乙烯作业工人发生主要职业危害的影响因素。

彗星实验(comet assay)是一种在单细胞水平上检测DNA损伤与修复的方法。传统的DNA电泳理论认为, DNA迁移距离是与其片段大小成比例的, 但是彗星实验有着与传统的电泳不同的机制。在细胞核中, DNA环状附着在核基质上, 在细胞裂解过程中, 核基质被溶解、抽提, DNA仍保留核样结构; 如果DNA链上存在缺口, 则使DNA超螺旋变得松弛, DNA环将向外伸展, 同时由于缺口暴露了负电荷, 在电场力作用下, 松动的DNA环向阳极迁移。但这种松动的DNA环其一端仍附着于核DNA, 迁移距离受到限制, 因此, 迁移的远近(即尾长)与松动释放的DNA环量的多少并不完全一致。事实上, 反映DNA损伤程度的因素还包括尾部DNA的含量, DNA损伤越严重, 进入尾部的DNA越多, 表现为尾长和尾部荧光强度的增加。所以, 尾矩指标能够更全面地评价DNA的损伤程度, 而单独以尾长或尾部DNA含量作为分析指标则不能真实反映致损伤剂的剂量-效应关系^[6]。因此本实验采用Olive尾矩(OTM)作为彗星实验的分析数据。

采用CASP彗星图像分析软件分析彗星图像可以克服由于主观因素和定量标准不统一而产生的误差, 而且能简化操作, 节省人力, 精确度较高。根据数码相机能够测出的指标有: 头部和尾部的DNA量、头部和尾部的DNA%、头部半径、尾长、彗星全长、尾矩和Olive尾矩等。可将分析所得数据以文本格式保存为一张表格, 便于统计软件进行分析^[7]。

本实验显示彗星实验OTM值能较好地反映DNA损伤的情况, 为较为灵敏的指标, 可作为氯乙烯作业工人健康状况的体检指标。对代谢酶基因型与氯乙烯致DNA损伤关系的研究显示, CYP2E1c1c2c2基因型在长期接触毒物时, 可能是氯乙烯致DNA损伤

(下转第224页)

性,肺及肾间质出现炎性细胞浸润,另有1只雌鼠肾盂肾炎,高剂量组有1只雌鼠出现肝点状坏死及肝间质少量炎细胞浸润。其他动物被检脏器未见改变。

3 讨论

致突变试验通常采用反映基因突变、体细胞突变和遗传危害(生殖细胞突变)的配套试验来检测外来化合物的诱变性。以往报道利用微核试验、Ames 试验及小鼠精子畸形试验评价甲氨基阿维菌素苯甲酸原药的致突变性,结果表明甲氨基阿维菌素苯甲酸原药无明显致突变作用^[3]。因不少非诱变性因素如变态反应、缺血、体温升高、感染都可引起精子畸形,增加了试验结果的不确定性。而小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验主要是检测生殖细胞染色体结构和数目的改变,对遗传危害评价意义较大^[4]。本研究中微核试验、Ames 试验结果均为阴性,与文献报道一致^[3]。小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验结果亦为阴性,更进一步证实了甲氨基阿维菌素苯甲酸没有遗传危害。

甲氨基阿维菌素苯甲酸具有明显的神经毒性作用,急性中毒时主要表现为乏力、运动失调、肌肉颤动等^[5]。发育神经毒理学研究亦显示该农药对动物子代具有明显的神经毒副作用^[6]。本研究给大鼠连续灌胃染毒3个月,观察到高剂量组部分动物在实验末期出现全身震颤、精神不振等神经毒性症状。雄鼠脑的脏器系数增加,但脑的病理组织学检查未见改变。

在亚慢性经口染毒毒理学研究中,血液学检查发现高剂量组雌鼠及中、高剂量组雄鼠淋巴细胞比例降低,中间细胞比例增高。各剂量组的白细胞计数与对照组比较尽管无统计学意义,但却呈现出随着剂量的

增加而下降的趋势。提示甲氨基阿维菌素苯甲酸对动物的造血系统及免疫功能有一定的影响。

血生化检查结果显示雄鼠总蛋白及白蛋白增加且有剂量-反应关系。高剂量组肝脏脏器系数明显增加,但肝脏的病理组织学检查与对照组比较未见明显改变。甲氨基阿维菌素苯甲酸是否影响肝脏的蛋白代谢及其机制有待进一步探讨。有文献报道,甲氨基阿维菌素苯甲酸原药能引起动物肾功能及肾脏脏器系数改变^[7]。研究结果显示雄鼠高剂量组肾脏脏器系数明显增加,但肾功能指标与病理检查未见改变。

甲氨基阿维菌素苯甲酸原药对雄鼠体重、临床表现、血液及生化指标的影响比雌鼠明显,说明其对动物的毒性作用存在性别差异。经对实验结果的综合分析,甲氨基阿维菌素苯甲酸原药SD大鼠亚慢性经口毒性的最大无作用剂量为0.89 mg·kg⁻¹·d⁻¹。

参考文献:

- [1] 倪珏萍, 侯华民, 曾霞, 等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸与阿维菌素生物活性比较 [J]. 现代农药, 2003, (3): 38.
- [2] GB 15670-1995 农药登记毒理学试验方法 [S]. 1995: 13-18.
- [3] 邢彩虹, 戴宇飞, 常平, 等. 甲氨基阿维菌素的致突变性、致畸性及亚慢性毒性的研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2000, 12 (3): 156-161.
- [4] 李寿祺. 毒理学原理与方法 [M]. 四川大学出版社, 2003: 164-165.
- [5] 吴强恩, 周志俊. 甲氨基阿维菌素的毒理学研究概况 [J]. 中国公共卫生, 2003, 19 (9): 1129-1131.
- [6] Wise L D, Allen H L, Hoe C M, et al. Developmental neurotoxicity evaluation of the avermectin pesticide emamectin benzoate in Sprague-Dawley rats [J]. Neurotoxicol Teratol, 1997, 19 (4): 315-326.
- [7] 邢彩虹, 常平, 张林林, 等. 甲氨基阿维菌素的毒性试验 [J]. 卫生毒理学杂志, 2001, 15 (1): 45-46.

(上接第220页)

的主要原因之一,与以往报道相一致^[5]。

本次实验表明氯乙烯代谢酶 CYP 2E 1 基因型、饮酒、平均每年接触剂量是作业工人发生DNA损伤的影响因素。接触氯乙烯浓度越高、饮酒较为严重以及具有 CYP 2E 1 c 1c 2c 2c 2 基因型者容易发生DNA损伤。提示对VCM接触工人的健康监护应综合考虑,企业注重改进工艺流程,更新设备,减少跑冒滴漏,降低工作场所氯乙烯浓度,同时提高对具有 CYP 2E 1 c 1c 2c 2c 2 基因型者的监护水平,及早发现易感者,达到一级预防的目的。

参考文献:

- [1] 邵冰燃, 张英民, 郎需霞, 等. 国内聚氯乙烯产业现状和发展趋势分析 [J]. 中国氯碱, 2004, (4): 1-5.
- [2] Christine B A, Carol S, Brian F C, et al. Polymorphisms in glutathione

S-transferases (GSTM and GSTT 1) and survival after treatment for breast cancer [J]. Cancer Res, 2001, 61 (19): 7130-7135.

- [3] Huang C Y, Huang K L, Cheng T J, et al. The GSTT 1 and CYP 2E 1 genotypes are possible factors causing vinyl chloride induced abnormal liver function [J]. Arch Toxicol, 1997, 71 (8): 482-485.
- [4] Wan J, Shi J, Hui L, et al. Association of genetic polymorphisms in CYP 2E 1, MPO, NQO 1, GSTM1 and GSTT1 genes with benzene poisoning [J]. Environ Heal Pers, 2002, 110 (12): 1213-1218.
- [5] Rucy H W, Chung L D, Jung D W, et al. XRCC 1 and CYP 2E 1 polymorphisms as susceptibility factors of plasma mutant p53 protein and anti-p53 antibody expression in vinyl chloride monomer-exposed polyvinyl chloride workers [J]. Cancer Epid Bio & Pre, 2002, 11: 475-482.
- [6] Xiangde Liu, Heather Conner, Tetsu Kobayashi, et al. Cigarette smoke extract induces DNA damage but not apoptosis in human bronchial epithelial cells [J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2005, 33: 121-129.
- [7] 乔琰, 鲁志松, 姚汉超, 等. 彗星试验分析指标的进展和应用 [J]. 卫生毒理学杂志, 2004, 3 (18): 190-192.