

氯乙烯染毒致小鼠 DNA损伤及对肝功能的影响

赵力军, 马世伟, 马晓明, 岳玉妹, 张春梅, 陈曦, 汤乃军

(天津医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 天津 300070)

摘要: 目的 研究氯乙烯 (VC) 对小鼠外周淋巴细胞 DNA 的损伤作用及对肝脏功能的影响, 探讨 VC 所致损伤的早期敏感监测指标。方法 32 只雄性小鼠随机分成 4 组, 染毒剂量分别为 0 10 20 40 mg/kg³ 连续腹腔注射染毒 4 周, 隔 2 天染毒一次。DNA 损伤采用单细胞凝胶电泳实验 (彗星实验) 法进行评价, 并测定丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP) 以反映肝功能变化。结果 染毒组小鼠外周淋巴细胞的彗星率均高于对照组 ($\chi^2 = 251.17$ $P < 0.01$), 彗星细胞尾相值 (oliver tail moment OIM 值) 亦显著高于对照组 ($\chi^2 = 557.760$ $P < 0.01$), 各染毒组与阴性对照的肝功能差异均无统计学意义。结论 本实验条件下, 在未导致肝功能变化时, VC 可导致外周淋巴细胞 DNA 损伤。彗星细胞的损伤程度及出现率可作为氯乙烯所致外周淋巴细胞 DNA 损伤的早期监测指标。

关键词: 氯乙烯; DNA 损伤; 肝功能; 彗星实验

中图分类号: R13 O623.221 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2008)04-0229-04

DNA damage and liver function effect in mice exposed to vinyl chloride

ZHAO Li-jun MA Shi-wei MA Xiao-ming YUE Yu-mei ZHANG Chun-mei CHEN Xi TANG Nai-jun

(School of Public Health Tianjin Medical University Tianjin 300070 China)

Abstract: Objective To investigate the effects of vinyl chloride (VC) on liver function tests and lymphocyte DNA in mice. Methods 32 healthy male mice were randomly divided into four groups: 10 20 40 mg/kg and control group. The mice were treated with gaseous VC by intraperitoneal injection with two day interval for 4 weeks. The single cell gel electrophoresis (SCGE), ALT, AST and ALP examinations were applied for detecting DNA damage of peripheral lymphocytes and hepatic function. Results The comet cells rates in experimental groups were significantly higher than that of control group ($\chi^2 = 251.17$ $P < 0.01$), and the difference in average OIM (Oliver tail moment) of comet in the exposed groups was significant ($\chi^2 = 557.760$ $P < 0.01$). However, there was no significant difference in changes of liver function between exposed groups and control group. Conclusions VC can cause DNA damage of lymphocytes, which might be an early monitoring index of the DNA damage induced by VC.

Key words: Vinyl chloride; DNA damage; Liver function; Comet assay

氯乙烯 (vinyl chloride, VC) 为无色略有芳香气味的气体, 在塑料工业中应用广泛。在氯乙烯的生产和使用过程中, 操作及维修人员接触 VC 后发生各种职业损伤的事件不断攀升。因此, 研究当前生产环境下氯乙烯对接触工人的损害, 制定相应的防护措施, 对保护工人健康, 提高生产效率具有重大意义。研究表明, VC 作用的主要靶器官为肝脏^[1,2]。它已是确定的人类致癌物^[3], 在体内经细胞色素 P450 2E1 (CYP2E1) 等代谢酶代谢活化, 转化为活性中间代谢产物——氧化氯乙烯和氯乙烯醛, 它们为多功能烷化剂, 可与 DNA 结合形成加合物, 导致基因突变和细胞遗传学改变^[4,5]。本实验通过研究 VC 对小鼠不同时间染毒后的外周血淋

巴细胞 DNA 的损伤^[6]和肝功能的影响, 探讨 VC 所致损伤的早期敏感监测指标。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明种雄性小鼠 32 只, 体重 25~35 g 随机分为 4 组, 每组 8 只。实验组以腹腔注射方式染毒, 剂量分别为 10 mg/kg (低剂量组), 20 mg/kg (中剂量组), 40 mg/kg (高剂量组), 染毒量 = 小鼠体重 × 染毒剂量 × 氯乙烯密度, 氯乙烯蒸气密度为 2.15 g/L。对照组给予清洁空气。每隔 2 日染毒 1 次, 持续 4 周, 于第 4 周最后一次染毒后第 3 天处死动物。

1.2 试剂与器材

正常熔点和低熔点琼脂糖 (Sigma 公司)、小鼠淋巴细胞分离液、Triton-100 裂解液、EB 溶液、蛋白酶 K、EDTA 等。电泳仪 (DYY-7C 型)、倒置荧光显微镜 (IX-71, Olympus)、Vitalab Selectra 2 型全自

动生化分析仪。

1.3 彗星实验

1.3.1 细胞悬液的制备 染毒结束后,以摘眼球法取血 1 ml 低速离心分离血清并于 -20℃ 保存备用,300 μl 血清用作肝功能检查,剩余血液用生理盐水稀释 1 倍后,加入到 2 ml 小鼠淋巴细胞分离液中经离心提取淋巴细胞,所得淋巴细胞用 PBS 制备成细胞悬液,4℃ 保存备用。

1.3.2 玻片制备 吸取 0.6% 正常熔点琼脂糖 75 μl 滴于预处理过的磨砂载玻片上,此为第一层;将 25 μl 细胞悬液 (100 个 /μl) 和 75 μl 低熔点琼脂糖混匀,吸取此混合液 50 μl 滴在第一层胶上,盖上盖玻片,4℃ 冷藏 15 min 后揭去盖玻片。

1.3.3 电泳和染色 待胶凝固后,在避光条件下将胶板置于 4℃ 的细胞裂解液中 1.5 h 裂解后胶板用 PBS 冲洗 2 次,25 V 250 mA 低温避光电泳 20 min 电泳后胶板经中和液浸洗 10 min × 2 次,用 20 μg/ml EB 染色。

1.3.4 镜检和结果评价 染色胶板用蒸馏水冲洗后,在倒置荧光显微镜下加以观察,未受损的细胞表现为圆形荧光核心 (有头无尾),受损细胞有彗尾伸向阳极,形成一个亮的头部和尾部。每张胶板随机拍摄 100 个彗星图像。由于电泳过程中胶片脱落,造成低剂量组能计数的样本仅为 6 个,其余组均为 8 个。用 CASP 软件分析彗星图像,每张胶板计数 100 个细胞,计算出 OIM 值 (即尾部 DNA 占总 DNA 的百分比与头、尾部中心间距的乘积,用来评价 DNA 损伤程度) 和彗星细胞率。

1.4 肝功能的测定

测定丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP) 的活性,所用试剂盒均购自北京中生北控生物科技股份有限公司。

1.5 统计分析

SPSS1.5 软件包处理数据,数据的分析采用秩和检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 VC 对小鼠外周血淋巴细胞 DNA 的损伤作用

彗星实验结果显示,小鼠外周血淋巴细胞 DNA 未受损的细胞表现为圆形荧光核心 (有头无尾),受损细胞有彗尾伸向阳极,形成一个亮的头部和尾部 (如图 1 箭头所指)。

实验结果表明,外周血淋巴细胞彗星细胞的出现率分别为对照组 3%、低剂量组 11%、中剂量组 16%、高剂量组 31%,经统计,各染毒组与对照

间的差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见表 1。

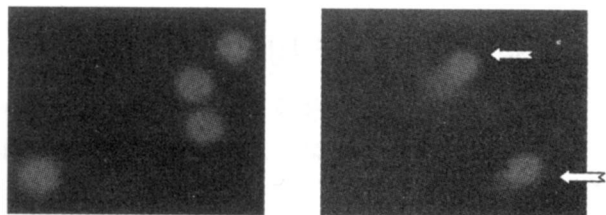


图 1 倒置荧光显微镜拍摄的彗星图片 (×200)

表 1 不同染毒剂量小鼠外周血淋巴细胞 DNA 损伤细胞数及百分率 (%)

组别	例数	细胞数 (n)	彗星细胞	彗星出现率 (%)	χ^2 值	P 值
对照组	8	800	24	3	251.17	0.0001
低剂量组	6	600	66	11*		
中剂量组	8	800	128	16*		
高剂量组	8	800	248	31*		

与对照组比较, * $P < 0.01$ 表 2 同。

OIM 值与染毒剂量相关分析表明,彗星细胞的出现率与染毒剂量呈正相关 ($r = 0.602$ $P < 0.01$)。与对照组相比,低、中、高剂量组 OIM 值均高于对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),见表 2。

表 2 不同染毒剂量小鼠淋巴细胞 DNA 损伤程度

组别	例数	OIM 值		χ^2 值	P 值
		中位数	$P_{25} \sim P_{75}$		
对照组	8	0.7874	0.5215 ~ 1.1683	557.760	0.001
低剂量组	6	1.6797	0.8914 ~ 3.4759*		
中剂量组	8	2.0058	1.0321 ~ 3.7045*		
高剂量组	8	5.2123	2.8050 ~ 9.7125*		

2.2 肝功能的测定

如表 3 所示,经方差分析,各实验组的代谢酶 ALT、AST、ALP 活性与对照组相比,差异均无统计学意义。

表 3 不同染毒剂量组小鼠肝功能测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	ALT	AST	ALP
对照组	8	45.63 ± 4.39	118.50 ± 19.33	21.25 ± 5.40
低剂量组	8	51.50 ± 12.39	130.63 ± 12.79	22.38 ± 13.52
中剂量组	8	56.00 ± 10.21	132.38 ± 12.47	22.63 ± 5.31
高剂量组	8	54.57 ± 13.77	131.29 ± 16.37	21.71 ± 9.85
		F = 5.19	F = 1.35	F = 3.78

注: $F_{0.05(3,28)} = 8.62$ $P > 0.05$ 。

3 讨论

氯乙烯是重要的化工原料,是一种肝毒类物质,现已肯定为致癌物。氯乙烯慢性中毒时由于在肝内解毒而损害肝脏,并可引起中毒性肝病^[7,8],如长期接触,可引起肝纤维化 (肝硬化)^[9],少数病例可诱发肝癌或肝血管肉瘤^[10,11]。有报道 VC 与肝炎病毒对肝

损伤有协同作用, 易导致肝癌的发生^[12-13]。长期接触氯乙烯, 可以发生肝功能异常^[14]、神经衰弱综合征、雷诺综合征、周围性神经病、肢端溶骨征、肝脾肿大、血小板减少, 少数出现肝血管瘤等^[15-16]。

VC在肝微粒体 CYP2E1^[17]作用下发生环氧化反应, 转化为氧化氯乙烯。部分氧化氯乙烯可直接转化成氯乙醛, 氧化氯乙烯和氯乙醛均为强烷化剂, 在代谢过程中可与肝脏内蛋白质、DNA等大分子形成加合物, 引起DNA碱基错配, 使DNA单链和双链断裂。正常情况下, 机体具有一定的修复能力。若损伤较轻, 机体细胞可代偿修复DNA损伤; 如果损伤超出机体的修复能力, 则可导致DNA损伤发生^[18-19]。

彗星实验也称单细胞凝胶电泳技术, 是一种在单细胞水平上检测DNA损伤与修复的方法, 已被广泛应用于生物学、临床和毒理学等科研领域^[20]。其中, 尾距(OTM)作为彗星实验的评价指标能够更全面地评价DNA损伤程度, 而单独以尾长或尾部DNA%作为分析指标则往往不能真实反映致损伤剂的剂量-效应关系^[21]。VijaYajam等^[22]认为DNA损伤程度直接与辐射剂量、接触时间、电泳长度有关, 因此将尾距作指标具有一定价值。

本次实验发现, 低、中、高剂量染毒组彗星细胞的出现率与对照组相比差异有统计学意义, 彗星细胞出现率随染毒剂量的增加而增加。各染毒剂量组与对照组间DNA的损伤程度差异有统计学意义, 表明氯乙烯可导致DNA损伤, 彗星实验可作为氯乙烯健康损害较为灵敏的筛检方法。

另外, 血清酶学检查是用来了解肝细胞是否受到损害的最经济、实用的检测手段。因为肝脏是人体含酶最丰富的脏器, 酶蛋白含量约占肝脏总蛋白量的2/3。肝损伤后肝细胞内的酶类可释放到血液中, 造成血清或血浆中酶活性的异常升高, ALT和AST能敏感地反映肝细胞损伤与否及损伤程度。因为肝脏中转氨酶的浓度比血中高1000~5000倍, 在肝细胞坏死、细胞膜损伤时, 转氨酶从肝细胞向血中释放。在肝细胞内ALT主要分布于细胞浆水溶相中, 而AST主要分布于线粒体, 少数分布于胞浆水溶相。当肝细胞变性、细胞膜通透性增加时, 从细胞内逸出的主要是ALT而当肝细胞严重病变、坏死时, 线粒体内AST便释放出来^[23]。然而, 本次亚急性染毒实验, 各染毒剂量组的肝功能指标与对照组间差异无统计学意义, 提示肝功能临床指标尚不能很好地反映氯乙烯引起的早期损伤。

本次实验为亚急性染毒, 在肝功能指标尚未发生

明显改变时, 外周血淋巴细胞DNA已经出现损伤表现, 外周血淋巴细胞彗星细胞率及DNA损伤程度检测可考虑作为氯乙烯损害的早期检测指标。

参考文献:

- [1] 任雪峰, 柴尚健, 夏昭林, 等. 氯乙烯暴露工人职业接触评估与健康危害的调查研究 [J]. 劳动医学, 2001 18 (1): 15-17
- [2] Taizo Sanjo Nobuaki Nishi Shuzo Kusumai et al. Photocatalytic mineralization of vinyl chloride on TiO₂ [J]. J Molecular Catalysis 2001 (168): 233-240
- [3] IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: chemicals in industrial processes and industries associated with cancer in humans [A]. IARC Monographs Suppl 4 Lyon France 1982 7-22
- [4] Cheng T J, Chou P Y, Huang M L, et al. Increased lymphocyte sister chromatid exchange frequency in workers with exposure to low level of ethylene dichloride [J]. Mut Res 2000 470 (2): 109-114
- [5] Wong R H, Wang J D, Hsieh L L, et al. Effects on sister chromatid exchange frequency of aldehyde dehydrogenase 2 genotype and smoking in vinyl chloride workers [J]. Mut Res 1998 420 99-107
- [6] 王民生, 蒋晓红, 王湘苏, 等. 氯乙烯致大鼠肝细胞DNA损伤的立体实验研究 [J]. 工业卫生与职业病, 1998 24 (4): 219-221
- [7] 全国化工系统氯乙烯职业危害科研写作组. 氯乙烯慢性职业危害的调查 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1995 13 (6): 343-344
- [8] 顾祖维, 陈自强, 王移兰. 氯乙烯对职业人群和居民健康危害评价的进展 [J]. 职业医学, 1990 17 (3): 173-174
- [9] Tun Jen Hsiao Jung Der Wang Pei Ming et al. Liver fibrosis in a symptomatic polyvinyl chloride workers [J]. Occup Environ Med 2004 61: 962-966
- [10] Marini M, Moccia F, Visentini S, et al. Peritoneal fibrosis and other liver ultrasonography findings in vinyl chloride workers [J]. Occup Environ Med 2003 60 (1): 60-65
- [11] 王炳森, 王敬钦. 氯乙烯中毒性肝病 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2003 12 (21): 486
- [12] Masranje G, Fedeli U, Fadda E, et al. Increased risk of hepato cellular carcinoma and liver cirrhosis in vinyl chloride workers. Synergistic effect of occupational exposure with alcohol intake [J]. Environ Health Perspect 2004 112 (11): 1188-1192
- [13] Ruey Hong Wong Pau Chung Chen Jung Der Wang et al. Interaction of vinyl chloride monomer exposure and hepatitis B viral infection on liver cancer [J]. Occup Environ Med 2003 60 379-383
- [14] 马世伟, 张芾, 汤乃军, 等. 氯乙烯作业工人肝脏功能损伤的影响因素研究 [J]. 中国工业医学杂志, 2008 21 (1): 10-13
- [15] Mundt K A, Dell D, Austin R P, et al. Historical cohort study of 10109 men in the North American vinyl chloride industry 1942-1972: update of cancer mortality to December 31, 1995 [J]. Occup Environ Med 2000 57: 774-781
- [16] Ward E, Boffetta P, Andersen A, et al. Update of the follow-up of mortality and cancer incidence among European workers employed in the vinyl chloride industry [J]. Epidemiology 2001 12 710-718

[17] 任雪峰, 夏昭林. 氯乙烯的基因毒性 [J]. 国外医学卫生学分册, 2000 27 (4): 239-242

[18] Tomas L, Richard DW. Quality control by DNA repair [J]. Sci ence 1999 286 (3): 1897-1904

[19] Singh N, McCoy M, Tice R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damages in individual cells [J]. Exper Cell Res 1998 175: 184-191.

[20] 耿广华, 马世伟, 汤乃军, 等. 彗星实验评价氯乙烯作业工人职业性 DNA损伤的危险因素 [J]. 中国工业医学, 2007 20

(4): 218-220

[21] 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

[22] Vijayarani Tice R R, Strauss G H. Assessment of radiation induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis technique [J]. Mutat Res 1992 271 (3): 243-252.

[23] 路博玉, 杨永芬, 赵子辰. 氯乙烯中毒性肝病的临床观察 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1992 10 (3): 166

· 病例报道 ·

药物及慢性乙醇中毒致铁粒幼红细胞贫血 2例报告

Two cases of sideroblastic anemia caused by drugs and chronic alcoholism

王小清, 岳宏微

(阜新矿业集团劳动卫生职业病防治所, 辽宁 阜新 123000)

1 一般情况

2例均为男性, 采煤工人, 年龄分别为 30岁、45岁。例1在井下采煤多年患有类风湿关节炎 9年余, 常年服用各种抗风湿类药物, 曾大量服用保泰松及氯霉素、止痛片等, 长达 2~3年。例2自 20岁开始大量饮酒, 每日 400~500ml 持续 25年。

2 临床表现

2.1 2例均感头晕、嗜睡、耳鸣、乏力, 稍动即感心悸、气短, 低热 (37℃左右), 食欲欠佳。例2有慢性胃炎, 常伴胃痛、腹胀, 餐后明显, 时而伴牙龈出血。

2.2 查体: 呈慢性贫血貌, 精神欠佳, 眼睑结膜及牙龈苍白呈贫血状态。浅表淋巴结不大, 无黄染, 呼吸平稳, BP120/80mm Hg 100/60mm Hg 心音纯、心律齐, 心率 98~110次/mi。两肺呼吸音正常, 腹软, 肝脾不大, 未见其他异常体征。

实验室检查: 入院时查血象, [例1] WBC4.4×10⁹/L, Hb47g/L, Plt23×10⁹/L, 骨髓象改变, 有核细胞增生明显活跃, 杆状核细胞及晚幼红细胞有巨幼样改变, 内铁 91%、环铁 65% (有畸形, 无核红细胞呈泪滴状及椭圆形)。染色体: 非整倍体化染色体断裂 (5号、7号及 19号)。 [例2] WBC2.6×10⁹/L, Hb20g/L, Plt18×10⁹/L, 骨髓象有核细胞增生活跃, 晚幼及杆状细胞可见巨幼样改变, 内铁 94%、环铁 30%。染色体: 46,XY同时存在整倍体改变, 45~48偶见 8号一体现象。

3 治疗

2例患者确诊为继发铁粒幼红细胞贫血。入院后给予维生素 B₆30mg 每日 3次口服治疗, 同时静脉滴注维生素 B₆300mg 每日 1次, 15~20d为一疗程。给予地塞米松 5mg 氨肽素、康力龙及维生素 D₃0.5μg 每日 3次口服, 予输血治疗。治疗 2个月后复查血象, 血红蛋白稍有回升, 曾达 55g/L

及 85g/L, 但远期疗效较差。

4 讨论

4.1 铁粒幼红细胞性贫血分为遗传性及继发性, 其外周血象及骨髓中存在两种形态学不同的细胞群, 本病可能是基因突变的细胞膜增殖造成染色体异常。继发性铁粒幼红细胞性贫血可由于各种药物、慢性乙醇中毒以及慢性炎症、肿瘤、白血病、多发性骨髓瘤及 MDS等因素引起, 多在中老年中发病。本文 2例均在 30岁以后发病, 且有长期服药和饮酒史, 故可排除遗传性因素。

4.2 铁粒幼红细胞性贫血是由于各种毒物损伤幼红细胞内的线粒体, 导致血红素合成障碍和对铁不能利用; 同时因没有足够的原卟啉与血红素结合而无法生成血红蛋白, 造成骨髓幼红细胞内铁增高, 环铁出现。氯霉素可抑制骨髓细胞 RNA及线粒体蛋白的合成, 使血色素氧化酶合成发生障碍, 因而引起低色素性铁粒幼细胞贫血。一般单纯由药物引起本病少见, 可能因机体遗传或营养因素参与使药物与吡哆醇的拮抗作用异常敏感而致基因突变, 影响幼红细胞和铁粒幼细胞, 但淋巴细胞可不受影响^[1]。严重的慢性乙醇 (酒精) 中毒可能因乙醇影响维生素 B₆代谢及磷酸吡哆醛转化不足, 而引起铁粒幼红细胞性贫血^[2]。

4.3 对本病的诊断必须做血清铁的检查, 结果增高及骨髓内细胞铁染色有细胞内铁及环铁超过 50%以上方可诊断。但需与缺铁性贫血、混合性贫血、其他增生性贫血、溶血性贫血加以鉴别。

4.4 本病在治疗过程中应大量使用维生素 B₆, 因在合成血红素时需要一定量的维生素 B₆, 它可使磷酸吡哆醇和磷酸吡哆胺转变为磷酸吡哆醛。

参考文献:

[1] 沈迪. 临床血液学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1980 231.

[2] 何凤生, 黄金祥. 职业病医师培训教材——职业中毒篇 [M]. 北京: 人民日报出版社, 2004 138