

苯作业工人遗传损伤的研究

由莉¹, 范亚光², 刘强², 李克秋³, 王继先², 赵永成^{2*}

(1 天津医科大学总医院, 天津 300052 2 中国医学科学院放射医学研究所, 天津 300192 3 天津医科大学, 天津 300070)

摘要: 目的 应用单细胞凝胶电泳法和胞质阻断微核法检测苯作业工人的遗传损伤, 探讨检测苯作业工人遗传损伤和发生慢性苯中毒危险性的有效指标。方法 选用各地已经确诊的慢性苯中毒患者 40人为慢性苯中毒组, 同单位的苯作业人员 82人为对照组; 检测两组人群单细胞凝胶电泳的彗星尾长、CB微核以及 CB微核+3AB指数等指标; 选用相关的统计学方法分析相关指标。结果 两组之间 CB微核率差异具有显著的统计学意义 ($t=3.033$ $P=0.003$); 此外, 苯作业工人发生慢性苯中毒的危险性随 3AB指数降低而升高 ($\chi^2_{趋势}=9.100$ $P=0.003$)。结论 检测苯作业工人的遗传损伤应优选 CB微核作为初筛指标, 并且 3AB指数在苯作业工人发生慢性苯中毒的危险性评价中具有重要意义。

关键词: 单细胞凝胶电泳法; 胞质阻断微核法 (CB微核法); 遗传损伤; 个体易感性; 职业暴露

中图分类号: R135.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2010)03-0170-03

Study on genetic damage in workers exposed to benzene

YOU Li, FAN Ya-guang, LIU Qiang, LI Ke-qiu, WANG Ji-xian, ZHAO Yong-cheng*

(1. Department of Hematology Neoplasms General Hospital Tianjin Medical University Tianjin 300052 2. Institute of Radiation Medicine Chinese Academy of Medical Science Tianjin 300192 3. Tianjin Medical University Tianjin 300070 China)

Abstract: Objective Single Cell Gel Electrophoresis assay and Cytokinesis block micronucleus method were used to measure the genetic damage in benzene workers to find the better index of detecting genetic damage and benzene poisoning risk in workers exposed to benzene. Methods 40 definite chronic benzene poisoning patients from various benzene plants were selected as chronic benzene poisoning group. 82 benzene workers from the factories mentioned above were selected as control group. The comet tail length by single cell gel electrophoresis assay, CB micronucleus rate and CBMN+3AB index in the two groups were measured, then analyzed and compared the results using statistical methods. Results The results showed that there was some significant difference in CB micronucleus rates between benzene poisonings and their controls ($t=3.033$ $P=0.003$). Additionally, the benzene poisoning risk was also increased with decreasing of 3AB index ($\chi^2_{trend}=9.100$ $P=0.003$). Conclusions The results suggested that cytokinesis block micronucleus method should be the better choice in evaluation of genetic damage of benzene workers, and 3AB index seems to be a valuable index in evaluating benzene poisoning risk of workers.

Key words: single cell gel electrophoresis assay; cytokinesis block micronucleus method; genetic damage; individual susceptibility; occupational exposure

研究表明, 苯的主要毒性作用是造成多种遗传损伤, 如与 DNA 共价结合形成加合物^[1,2], 或产生活性氧等自由基对 DNA 造成氧化损伤^[3], 或导致 DNA 链断裂^[4-6]。机体细胞具有完善的 DNA 损伤修复机制, 这些 DNA 损伤通常能够被细胞修复而不产生不良后果, 但是如果这些 DNA 损伤不能被机体 DNA 修复系统完全修复, 就会形成基因突变或染色体畸变。

推测这些遗传损伤破坏了骨髓造血干细胞的增殖和分化, 造成造血抑制或增生异常, 从而最终导致苯中毒, 甚至苯白血病。苯的慢性毒性主要可致骨髓造血功能抑制, 长期接触一定浓度苯的工人可发生苯中毒, 但在同一作业环境中, 并非所有工人都发生苯中毒, 因此, 研究苯作业人员的遗传损伤和个体易感性, 对于慢性苯中毒的防治和保护广大苯作业人员的健康具有重要意义。

本研究以单细胞凝胶电泳法 (SCGE) 和胞质阻断微核法 (CB微核法) 检测苯作业工人的遗传损伤; 同时应用 CB微核+3AB指数实验在分子水平上测定修复后剩余 DNA 损伤, 间接反映个体的 DNA 修复能力, 探讨 DNA 修复能力及个体敏感性与慢性苯

收稿日期: 2009-03-02 修回日期: 2010-01-03

基金项目: 天津市自然科学基金 (编号: 043610011), 中国医学科学院所发展基金 (SF0629 SF0824)

作者简介: 由莉 (1979-) 女, 主要研究方向: 遗传流行病学研究, 现任职于天津医科大学总医院血液肿瘤科。

* 通讯作者, E-mail: zhaoyg00@yahoo.com.cn

中毒的关系。

1 材料与方法

1.1 对象

慢性苯中毒组 40 名患者系经我国天津、大连、锦州、开封、郑州等当地职业病防治院(所)确诊的慢性苯中毒患者, 82 名对照均系慢性苯中毒患者同单位的苯作业人员。采集研究对象上肢静脉血 1.5 ml 于真空肝素抗凝管内混匀, 置冰盒中, 12 h 内运回实验室。

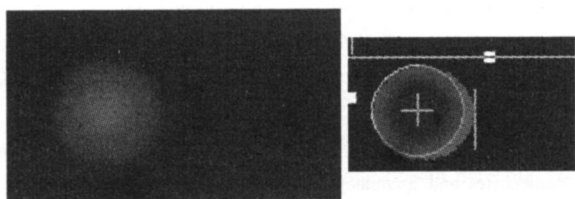
1.2 方法

(1) 采用波兰弗罗茨瓦夫 (Wrocław) 大学提供的 CASP⁷ 自动分析系统分析拖尾细胞的平均彗星尾长。(2) 观察 1 000 个双核细胞所见的微核总数为微核率, 计算 CB 微核 + 3AB 指数, 3AB 指数 $I = 1 - \text{CBMN} / \text{CBMN}^{(+3\text{AB})}$ 。(3) 统计分析采用 SAS 6.12 和 SPSS 11.0 分析软件。

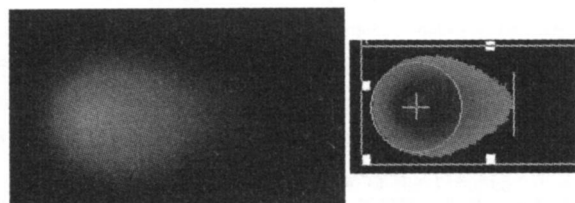
2 结果

2.1 两种方法检测苯作业工人淋巴细胞损伤情况

2.1.1 单细胞凝胶电泳实验 (图 1)



未经化学染毒的淋巴细胞“彗星”图像



经化学染毒后的淋巴细胞“彗星”图像

图 1 单细胞凝胶电泳实验图像

苯中毒组和对照组的彗星尾长和 CB 微核率见表 1。

表 1 苯作业工人淋巴细胞的 SCGE 尾长和 CB 微核率检测结果

组别	人数	SCGE 尾长 (μm)	CB 微核率 (%)	t 值	P 值
苯中毒组	40	10.75 ± 4.46	37.30 ± 9.71	0.194	0.846
对照组	82	10.59 ± 4.01	30.52 ± 12.38	3.033	0.003

2.1.2 按工龄分组, 两种方法检测苯作业工人的淋巴细胞损伤 按工龄将苯中毒组和对照组分为 ≤ 10 年、11~19 年和 ≥ 20 年 3 组。彗星尾长在各工龄组间均未见差异有统计学意义 (P > 0.05)。彗星尾长与工龄回归分析结果见表 2。

表 2 彗星尾长与工龄的回归分析结果

模型		未标准化系数		标准化系数	
		系数 b	系数标准误	系数 β	值 P 值
1	常数	8.514	1.115	7.634	0.000
	工龄	0.126	0.062	0.182	2.025

彗星尾长 (Y) 与工龄 (X) 的直线回归方程: $Y = 8.514 + 0.126X$

苯中毒组和对照组 CB 微核率与工龄的统计分析结果见表 3。

表 3 苯作业工人 CB 微核率与工龄的关系

工龄 (年)	例数	苯中毒组		对照组		
		CB 微核率	F 值 P 值	CB 微核率	χ ² 值 P 值	
≤ 10	8	23.75 ± 6.48	42.674 0.000	9	14.67 ± 2.12	34.928 0.000
11~19	19	36.74 ± 3.05		48	21.82 ± 15.22	
≥ 20	13	46.45 ± 7.37		25	44.08 ± 10.95	

从表 3 中可以看出, 苯中毒组和对照组不同工龄组间的 CB 微核率差异均有统计学意义 (P < 0.01)。

相关性分析表明, CB 微核率和工龄的相关系数 $r = 0.807$ $P = 0.000$ 即 CB 微核率与工龄之间呈显著正相关。二者之间的回归分析见表 4。

表 4 CB 微核与工龄的回归分析结果

模型		未标准化系数		标准化系数	
		系数	系数标准误	系数 β	值 P 值
1	常数	5.469	1.933	2.829	0.005
	工龄	1.613	0.108	0.807	14.960

由表 4 可知, 随着苯作业工人的工龄延长, 其外周血淋巴细胞微核率水平亦升高, 呈明显的时间效应关系, $r = 0.807$ (P < 0.01), 线性方程为 $Y = 5.469 + 1.613X$

2.2 CB 微核 + 3AB 指数与苯中毒危险性分析

以对照组的 3AB 指数的中位数 (0.590) 作为分割点, 将研究对象分为 3AB 指数 ≥ 0.590 和 3AB 指数 < 0.590 以 3AB 指数 ≥ 0.590 的研究对象作为参照, 分析 3AB 指数 < 0.590 的研究对象的慢性苯中毒的相对危险性, 结果见表 5。

表 5 3AB 指数与慢性苯中毒危险性分析

3AB 指数	对照组	苯中毒组	OR (95% CI)
≥ 0.590	42	5	7.350
< 0.590	40	35	(2.618 ~ 20.634)

以对照组 3AB 指数的中位数 (0.590) 和第 25 百分位数 (0.388) 作为分割点, 将研究对象分为 3 组, 以 3AB 指数 ≥ 0.590 的研究对象作为参照, 分析苯中毒的相对危险性与 3AB 指数之间的趋势关系, 结果见表 6。

表 6 苯中毒危险性与 3AB指数的趋势关系

3AB指数	对照组	苯中毒组	OR	95% CI
≥ 0.590	42	5	1.000	
0.388~0.590	20	22	9.240	3.053~27.966
< 0.388	20	13	5.460	1.710~17.430
$\chi^2 = 18.433$ $P = 0.000$ $\chi^2_{趋势} = 9.100$ $P_{趋势} = 0.003$				

3 讨论

近年来, 苯污染及其对健康的危害已成为亟待解决的重要的公共卫生安全和健康问题之一。虽然骨髓是苯的靶器官, 但在实际工作中, 直接采集研究对象的骨髓以测定干细胞的遗传损伤是不可行的。淋巴细胞微核率的变化是监测苯接触作业人群是否有慢性苯中毒较敏感的指标^[8]。胞质阻断微核法+3氨基苯甲酰胺指数实验(即CB微核+3AB指数实验)^[9]也是在此基础上发展起来的, 它从染色体水平检测DNA损伤情况, 并且在联合DNA修复酶抑制剂后可检测DNA损伤修复能力。近年来以快速、简便、灵敏为目的的遗传毒性检测方法正在广泛地开展, 其中作为检测DNA链断裂的单细胞凝胶电泳技术是测定DNA损伤程度并判定生物遗传毒性的有效手段。有研究表明, 彗星尾长、尾相(tail moment)变化可作为检测污染物遗传毒性效应的生物标记物。因此本研究选用CB微核法和SCGE检测苯作业工人的遗传损伤; 选用CB微核+3AB指数作为诱变敏感性指数定量地反映个体DNA的损伤修复能力, 从而反映个体的敏感性。

本研究应用CB微核实验方法检测的苯中毒组和对照组之间的CB微核率差异有统计学意义($P < 0.05$); 通过接苯时间效应之间的关系分析可以发现, 随着苯作业工人的工龄延长(即接触时间增加), 其外周血淋巴细胞微核率水平亦升高, 呈明显的时间-效应关系。再一次提示在检测苯作业工人的遗传损伤方面应优先选择操作简便、方法灵敏、易于观察的胞质分裂阻断法检测微核, 作为体内遗传毒性效应的初筛指标。

3AB指数作为个体易感性指标反映了DNA损伤

修复能力, 分析3AB指数与慢性苯中毒危险性的关系发现, 3AB指数<0.590(对照组3AB指数的中位数)的研究对象慢性苯中毒的相对危险性显著高于3AB指数≥0.590的研究对象($OR = 7.350$ $95\% CI$ 2.618~20.634 $P = 0.000$), 而且慢性苯中毒危险性与3AB指数之间存在显著的趋势关系($\chi^2_{趋势} = 9.100$ $P = 0.003$)。从本次研究结果看, 细胞染色体水平的修复能力与慢性苯中毒的发生关系密切; 修复能力越差, 发生慢性苯中毒的危险性越高。提示苯中毒的发生与DNA损伤修复能力之间有关系, 3AB指数对苯作业工人发生苯中毒的危险性评价有意义。

参考文献:

- [1] 常平, 戴宇飞, 李桂兰. 苯及其代谢产物在小鼠骨髓中形成DNA加合物的实验研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1999, 17(4): 196-199.
- [2] Creek M R, Mani C, Vogel J S et al. Tissue distribution and macromolecular binding of extremely low doses of [¹⁴C]-benzene in B6C3F1 mice [J]. Carcinogenesis 1997, 18(12): 2421-2427.
- [3] Okawa S, Hirohata J, Hirakawa K et al. Site specificity and mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic catechol [J]. Carcinogenesis 2001, 22(8): 1239-1245.
- [4] 邢彩虹, 李桂兰, 李玉英, 等. 单细胞凝胶电泳技术检测苯作业工人淋巴细胞DNA损伤 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2000, 18(5): 257-259.
- [5] Sul D, Lee D, In H et al. Single strand DNA breaks in T and B lymphocytes and granulocytes in workers exposed to benzene [J]. Toxicol Lett 2002, 134(1-3): 87-95.
- [6] Li A S, Bandy B, Tsang S et al. DNA breakage induced by 1,2,4-benzene[ol] relative contributions of oxygen derived active species and transition metal ions [J]. Free Radic Biol Med 2001, 30(9): 943-956.
- [7] Konca K, Lanckoff A, Banasik A et al. A cross-platform public domain PC image analysis program for the comet assay [J]. Mutat Res 2003, 534(1): 15-20.
- [8] 叶玲丽, 林增, 刘晓红, 等. 作业场所苯浓度与工人外周血淋巴细胞微核形成相关性调查分析 [J]. 江西医学检验, 2004, 22(1): 43-45.
- [9] Catena C, Conti D, Villani P et al. Micronuclei and 3AB index in human and canine lymphocytes after X-irradiation [J]. Mutat Res 1994, 312(1): 1-8.

(上接第 165 页)

- [3] 李海龙, 刘庆斌, 王五一, 等. 饮茶型氟中毒危险因素探讨 [J]. 地方病通报, 2008, 23(2): 1-2.
- [4] 刘建军, 徐洪兰. 氟斑牙的危险因素研究进展 [J]. 中国地方病学杂志, 2001, 20(2): 151-153.
- [5] 张生军. 电解铝作业工人工业性氟病患病情况的调查 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2007, 25(2): 107-108.
- [6] 张秀丽, 唐红艳, 郑照霞, 等. 改水不同时间地方性氟中毒病区居民尿氟含量变化 [J]. 中国地方病学杂志, 2006, 21(5): 300.

- [7] 王空军, 张瑞琴, 连轶伟, 等. 氟作业工人的尿氟调查 [J]. 工业卫生与职业病, 1997, 23(6): 380.
- [8] 万桂敏, 莫志亚, 刘忠杰, 等. 地方性氟中毒患者多项检验指标的测定及分析 [J]. 中国地方病学杂志, 2000, 20(2): 137-139.
- [9] 刘克俭, 余达林, 陈荣安, 等. 氟暴露对机体骨外系统的研究(二)兼与《现行工业性氟病诊断标准及处理原则》的商榷 [J]. 工业卫生与职业病, 1996, 22(6): 350-352.
- [10] 谭皓, 刘克俭, 鲁翠荣, 等. 氟致骨相损伤早期诊断指标的实验研究 [J]. 工业卫生与职业病, 2005, 31(3): 149-152.