

· 综 述 ·

苯诱发白血病动物模型的研究现状

贺今¹, 马道新², 纪春岩² (审校)

(1. 济南医院职业病科, 山东 济南 250013; 2. 山东大学齐鲁医院, 山东 济南 250012)

摘要: 苯是确认的致癌物, 持续苯暴露可引起血液系统肿瘤。流行病学研究已经证实职业苯暴露人群急性髓系白血病的高发病率。近年, 苯诱导的急性白血病动物模型的建立促进了苯致白血病机制的深入研究, 本文对苯皮下注射及吸入染毒两种方法诱导白血病动物模型的建立进行了综述。

关键词: 白血病; 苯; 动物模型

中图分类号: R994.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2016)04-0296-03 DOI: 10.13631/j.cnki.zggyx.2016.04.018

Current understanding of animal models for benzene-induced leukemia

HE Jin*, MA Dao-xin, JI Chun-yan

(*. Jinan Hospital, Jinan 250013, China)

Abstract: Benzene may eventually lead to hematopoietic neoplasms. In human with occupational exposure to benzene, acute myeloid leukemia (AML) are frequently observed in epidemiological studies. In recent years, animal models of benzene-induced acute leukemia have helped to strengthen our understanding of the mechanism of benzene-induced AML. In this review, benzene-induced acute leukemia are summarized in two parts: (1) The animal models developed by dermal administration of benzene. (2) Models developed by using airborne exposure technique.

Key words: leukemia; benzene; animal models

苯是明确的致白血病物质, 主要引起急性髓系白血病 (AML), AML 是一种以血循环中大量不成熟粒细胞增加为特征的白血病。国内外研究均已表明, 职业暴露于低浓度苯的工人可出现血液系统损伤^[1,2]。2012年 Mchale C M^[3] 等研究认为杂环芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 异常和免疫功能异常是导致白血病细胞异常克隆的重要原因, 但 AhR 依赖的信号转录通道以何种方式参与苯致白血病的发生发展目前尚不清楚。因此, 建立苯诱导白血病合适的动物模型将有助于揭示苯诱导白血病机制及靶向药物研发。由于苯为有机溶剂, 具有挥发及水溶性, 易经呼吸道吸入及皮肤接触进入体内, 所以吸入法和注射法都符合苯接触人群的实际暴露情况, 本文就吸入法及皮下注射法建立苯诱导白血病的动物模型进行综述。

1 苯诱导白血病的机制

持续暴露于苯可导致全血细胞减少、再生障碍性贫血 (再障)、白血病等血液系统损伤, Khalade A^[4] 等大规模流行病学研究表明, 慢性苯中毒诱导的白血病主要为急性髓系白血病。以 BALB/C、Kunming、CD1 小鼠采用注射和吸入苯的方法都成功地建立了再障等骨髓造血障碍的动物模型^[5-7], 但在动物中复制类似人类的苯诱导急性白血病 (benzene-induced acute leukemia, BIAL) 模型还未取得突破性进展。

BIAL 的机制目前认为主要为以下 5 个方面。(1) 苯通过代谢转化增强其毒效应而诱导白血病。苯由肝脏 (或肺) 经

细胞色素 P450E1 (CYP2E1) 代谢成氢醌转移到骨髓经髓过氧化物酶 (MPO) 催化成苯醌, 从而产生苯的血液毒性, 苯醌等醌类和半醌类物质还能通过 MPO、醌氧化还原酶 (NQO1) 参与的氧化还原循环生成氧自由基, 损伤骨髓造血细胞 DNA 等遗传物质。这些重要代谢酶的基因多态性与白血病遗传易感性密切相关, 已经证实儿童急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) NQO1、MPO 多态性与白血病发生密切相关^[8]; (2) 氧化应激反应。实验证明高浓度的苯单独作用于人早幼粒细胞白血病 HL60 细胞可增加反应性氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 水平导致细胞毒作用^[9]。苯的代谢物苯醌、苯酚等通过增强 ROS 水平而引起细胞毒作用增强, 从而诱导正常细胞向白血病细胞的恶性克隆。(3) 苯诱导白血病相关细胞遗传学改变。染色体异常, 包括染色体的易位、缺失和非整倍体, 苯诱导的染色体改变与治疗相关性 MDS 和急性髓系白血病 (t-MDS/t-AML) 以及原发急性 AML 相似^[10-12]。暴露于苯或其代谢物也出现相似的 5 和 7 号染色体长臂缺失和 21 号染色体长臂 t (21q) 的易位, 进一步表明苯通过多种不同的机制诱导白血病发生。(4) 苯诱导白血病是造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 生成过程中多个关键靶基因或分子通路的改变。细胞遗传学改变如非整倍体会导致基因表达或 DNA 甲基化及易位, 产生嵌合蛋白, 导致克隆性细胞遗传学异常^[13]; 关键基因也可能通过基因突变和/或表观遗传改变, 产生组蛋白及拓扑异构酶 II (topoisomerase II, topo II) 异常^[14]等, 从而引起白血病干细胞表型的表达, 最终导致白血病干细胞的生成和克隆演化。(5) 免疫系统功能障碍。异常的生长因子表达如 TNF- α 、INF- γ 、AHR 等及粘附分子受体表达异常^[15], 导致造血干细

收稿日期: 2016-01-05; 修回日期: 2016-03-01

作者简介: 贺今 (1975—), 女, 副主任医师, 博士在读, 主要从事职业病临床研究。

胞相关微环境的损伤,损伤可能在骨髓干细胞龛 (bone marrow stem cell niche),以致骨髓干细胞结构和功能的异常,引起白血病干细胞表型的表达^[16]。

2 BIAL 吸入法动物模型

Shen S 等^[17]应用小鼠胚胎干细胞 (murine embryonic stem cells, mES cells) 暴露苯的方法建模,表明空气中苯的吸收可引起胚胎毒性。2010年 Bird M G^[18]应用 CD1 小鼠联合吸入苯和甲苯证明甲苯能增强苯的遗传毒性。Albertini R J^[19]应用 p53 基因敲除的杂合子 (p53+/-) 和野生型 (p53+/+) 小鼠慢性吸入苯染毒:周一至周五吸入苯浓度为 100 ppm、暴露时间为 6 h/d,或周一、三、五吸入苯浓度为 200 ppm、暴露时间为 5 h/d,即总暴露苯浓度为 3 000 ppm/周,结果表明 (p53+/-) 和 (p53+/+) 两种小鼠对苯突变均非常敏感,发现次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HPRT) 基因突变率明显增加,苯的致癌性明确。Mullin A^[20]应用 LacI 转基因小鼠吸入苯,苯浓度为 300 ppm,暴露时间 6 h/d, 5 d/周,连续 12 周,结果表明 LacI 基因突变频率增加。Yoon B I^[21]使用芳香烃受体基因敲除小鼠的研究表明,吸入苯造成的骨髓毒性与 AhR 信号调节异常有关。Kawasaki Y^[22]对比研究了 C3H/He 小鼠和 C57BL/6 Trp53 基因缺陷小鼠吸入苯诱导造血系统肿瘤中的差别,该研究采用 Trp53 基因缺陷的杂合子、纯合子及野生型的 C57BL/6 小鼠,吸入苯浓度 300 ppm,暴露时间为 6 h/d, 5 d/周,连续 26 周,髓系白血病的发生率分别为 7.7%、0、0;而 Trp53 基因缺陷的杂合子、纯合子及野生型的 C3H/He 小鼠,同样条件下吸入苯 300 ppm 后,髓系白血病的发生率分别为 37.5%、4.6%、8.7%。表明杂合子 Trp53 基因缺陷的 C3H/He 小鼠是 BIAL 的较理想模型。Rithidech K 等^[23]采用 CBA/Ca 小鼠以吸入法慢性暴露于 300 ppm 苯,6 h/d, 5 d/周,连续 16 周,可以获得急性白血病小鼠模型。Mukhopadhyay M K^[24]应用瑞士白化小鼠 (Swiss albino mice) 吸入浓度为 300 ppm 苯,暴露时间为 6 h/d, 5 d/周,连续 2 周,累计接苯剂量为 9 000 ppm,可诱导继发性 AML。国内采用 BALB/C 小鼠以动式吸入染毒装置吸入苯 400 mg/m³ 和 40 mg/m³ 成模,6 h/d, 5 d/周,连续染毒 27 周,急性白血病的发生率仅在 8%^[25]。

3 皮下注射法建立 BIAL 动物模型

Hoffmann^[26]研究证明,可以用转基因 Tg.AC 小鼠 (v-Ha-ras 基因改造的 FVB 小鼠) 通过皮下注射苯,每次剂量 220 mg/kg,连续注射 26 周的方法建立 BIAL 模型,而同样剂量在口服法或应用其母系 FVB 小鼠均无法成模。国内近期研究^[27]采用雄性 C3H/He 小鼠皮下注射苯油混合物染毒 (苯浓度分别为 150 mg/kg 和 300 mg/kg), 5 d/周,连续注射 3 个月,结果表明在 300mg/kg 小鼠组注射 30 d 后出现红系不成熟前体细胞,但造血异常可在停止注射后逐渐恢复。

虽然目前尚无理想的 BIAL 模型,但根据以上的动物实验可以看出,建立 BIAL 模型在基因缺陷小鼠和转基因小鼠成功率较高。因此,以后 BIAL 动物模型的建立可优先采用 Trp53 基因缺陷的 C3H/He 小鼠和转基因 Tg.AC 小鼠,成模率较高。为更好地模拟人类苯致 AML 的吸收途径及有效地控制吸收剂

量,建议染毒方式首先考虑皮下注射和吸入法,而不宜采用口服法。

参考文献:

- [1] 王芳,师伟,魏云芳.低浓度苯对作业工人血液系统的影响 [J].中国工业医学杂志,2014,27(3):202-204.
- [2] Moro A M, Brucker N, Charão M F, et al. Early hematological and immunological alterations in gasoline station attendants exposed to benzene [J]. Environmental Research, 2015, 137: 349-356.
- [3] Mchale C M, Zhang Luoping, Smith M T. Current understanding of the mechanism of benzene-induced leukemia in humans: implications for risk assessment [J]. Carcinogenesis, 2012, 33(4): 240-252.
- [4] Khalade A, Jaakkola M S, Pukkala E, et al. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis [J]. Environmental Health, 2010, 9(14): 1539-1558.
- [5] Li Rui, Chen Wenna. Pathological change of bone marrow and the number of peripheral blood cells in benzene-induced aplastic anemia model mice [J]. China Medical Herald, 2010, 7(12): 34-36.
- [6] Velasco Lezama R, Barrera Escorcía E, Torres A M, et al. A model for the induction of aplastic anemia by subcutaneous administration of benzene in mice [J]. Toxicology, 2001, 162(3): 179-191.
- [7] Chen Jichun. Animal models for acquired bone marrow failure syndromes [J]. Clinical Medicine and Research, 2005, 3(2): 102-108.
- [8] Silveira V S, Canalle R, Scrideli C A, et al. Role of the CYP2D6, EPHX1, MPO, and NQO1 genes in the susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Brazilian children [J]. Environmental & Molecular Mutagenesis, 2010, 51(1): 48-56.
- [9] Shen Y, Shen H M, Shi C Y, et al. Benzene metabolites enhance reactive oxygen species generation in HL60 human leukemia cells [J]. Human & Experimental Toxicology, 1996, 15(5): 422-427.
- [10] Vardiman J W. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms [J]. Chemico-Biological Interactions, 2010, 184(1-2): 16-20.
- [11] Qing Lan, Zhang Luoping, Jo W J, et al. Large-scale evaluation of candidate genes identifies associations between DNA repair and genomic maintenance and development of benzene hematotoxicity [J]. Carcinogenesis, 2009, 30(1): 50-58.
- [12] Irons R D, Yan Chen, Wang Xiaoqin, et al. Acute myeloid leukemia following exposure to benzene more closely resembles de novo than therapy related-disease [J]. Genes Chromosomes & Cancer, 2013, 52(10): 887-894.
- [13] Hartwig A. The role of DNA repair in benzene-induced carcinogenesis [J]. Chemico-Biological Interactions, 2010, 184(s1-2): 269-272.
- [14] Baker R K, Kurz E U, Pyatt D W, et al. Benzene metabolites antagonize etoposide-stabilized cleavable complexes of DNA topoisomerase Ialpha [J]. Blood, 2001, 98(3): 830-833.
- [15] Sha Yan, Li Zhi-min. Review on the mechanism of benzene-induced leukemia [J]. Occupational Health and Emergency Rescue, 2013, 31(3): 122-125.

表3 风险评估结果

评价单元	M	E	S		R		风险水平	
			正常	特殊	正常	特殊	正常	特殊
线路板处理线	1	6	1	10	6	60	5级	3级
废铜覆板处理线	1	6	1	10	6	60	5级	3级
无铅焊锡处理线	1	6	1	1	6	6	5级	5级
塑料生产线	1	6	1	10	6	60	5级	3级
氰化液处理线	1	6	1	10	6	60	5级	3级
废包装材料处理线	1	6	1	10	6	60	5级	3级
酸碱废液处理线	1	6	1	8	6	48	5级	4级
含镍废物处理线	1	6	1	8	6	48	5级	4级
含锌废物处理线	1	6	1	10	6	48	5级	4级
贵金属精炼线	1	6	1	10	6	60	5级	3级
废锂电池处理线	1	6	1	10	6	60	5级	3级
家电拆解线	1	6	1	10	6	60	5级	3级
含铅焊锡处理线	1	6	1	8	6	48	5级	4级
辅助设施	1	6	1	10	6	60	5级	3级

表4 职业病危害关键控制点及危害等级

工作场所	主要职业病危害因素	关键控制点	危害等级
线路板处理线	聚乙烯粉尘、铁尘	投料、锤磨、出料、磁选	3级
废铜覆板处理线	聚乙烯粉尘	破碎	3级
塑料生产线	聚乙烯粉尘、聚丙烯粉尘	喂料、混料	3级
氰化液处理线	氰化物(氰化钠)	破氰处理	3级
废包装材料处理线	氰化物(氰化钠)	清洗	3级
贵金属精炼线	氰化物(氰化钠)	脱镀	3级
废锂电池处理线	聚乙烯粉尘	拆解	3级
含铅焊锡处理线	铅烟	焊锡	4级
剧毒品库	氰化物(氰化钠)	巡检	3级

害风险等级5级,稍有危害。特殊工况下,产生氰化物、金属粉尘、聚乙烯/聚丙烯粉尘岗位职业病危害风险等级3级,显著危害;其余岗位职业病危害风险等级4级,一般危害。综合分析确定为职业病危害严重的建设项目。

3 讨论

MES法是一种定性的风险评估方法,有助于职业病危害

关键控制点的确定,有助于职业卫生管理部门对某项目的职业病危害关键控制点的宏观把握,但也存在一定的不足:(1)不能将关键控制点的危害程度具体量化;(2)该方法仅考虑了一次性的直接事故后果,未考虑长期累积的事故后果,不能全面反映风险产生的真实后果。

本项目关键控制因素为氰化钠、铅烟及金属粉尘。氰化钠属于《国家安全监管总局关于公布首批重点监管的危险化学品名录的通知》中公布的首批重点监管的危险化学品,应按照《重点监管的危险化学品安全措施和事故应急处置原则》的要求采取相应的安全措施。而氰化钠又属于高毒物品,对高毒物品氰化钠的管理应执行“五双”制度,即:双人验收、双人保管、双人发货、双把锁、双账本。应在氰化钠使用岗位附近储备特效解毒药物,如硫代硫酸钠、亚硝酸盐类、亚甲蓝等。

铅烟主要产生于本项目含铅焊锡处理线,在高温熔融状态下形成,在设备封闭性或吸风排毒设施效果不佳时,部分铅烟逸散,如果工人个人防护缺失极易引起职业性铅中毒,应做好该岗位的工程和个体防护工作。

电子废弃物具有很高的回收利用价值,电子废弃物资源再利用行业因此也被称为“阳光产业”。我国电子垃圾回收、资源化产业刚刚起步,尽管目前仍处于无序回收状态,但距离分类回收、集中处理、综合利用的格局已经不远。我们期望通过对该新兴产业的职业病危害风险评估,能够为类似行业的职业卫生评价提供参考。

参考文献:

[1] 宋大成. 风险评估方法——MES法 [S]. 中国职业安全卫生管理体系认证. 2002, 5: 34-35.
 [2] 邹华, 栾俞清, 周莉, 等. 油品码头职业病危害工程防护措施分析及风险评估 [J]. 浙江预防医学, 2004, 26 (9): 884-892.

(上接第297页)

[16] Madhurima D, Samaresh C, Sujata L. Benzene exposure——an experimental machinery for induction of myelodysplastic syndrome; stem cell and stem cell niche analysis in the bone marrow [J]. Journal of Stem Cells, 2012, 7 (1): 43-59.
 [17] Shen S, Yuan L, Zeng S. An effort to test the embryotoxicity of benzene, toluene, xylene, and formaldehyde to murine embryonic stem cells using airborne exposure technique [J]. Inhalation Toxicology, 2009, 21 (12): 973-978.
 [18] Bird M G, Wetmore B A, Letinski D J, et al. Influence of toluene co-exposure on the metabolism and genotoxicity of benzene in mice using continuous and intermittent exposures [J]. Chemico-Biological Interactions, 2010, 184 (1-2): 233-239.
 [19] Albertini R J, Judice S A, Recio L, et al. Hprt mutant frequency and p53 gene status in mice chronically exposed by inhalation to benzene [J]. Chemico-Biological Interactions, 2010, 184 (s1-2): 77-85.
 [20] Mullin A H, Rando R, Esmundo F, et al. Inhalation of benzene leads to an increase in the mutant frequencies of a lacI transgene in lung and spleen tissues of mice [J]. Mutation Research/fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1995, 327 (s1-2): 121-129.
 [21] Yoon B I, Hirabayashi Y Y, Kodama Y, et al. Aryl hydrocarbon

receptor mediates benzene-induced hematotoxicity [J]. Toxicological Sciences, 2002, 70 (1): 150-156.
 [22] Kawasaki Y, Hirabayashi Y, Kaneko T, et al. Benzene-induced hematopoietic neoplasms including myeloid leukemia in Trp53-deficient C57BL/6 and C3H/He mice [J]. Toxicol Sci, 2009, 110 (2): 293-306.
 [23] Rithidech K, Dunn J J, Bond V P, et al. Characterization of genetic instability in radiation-and benzene-induced murine acute leukemia [J]. Mutation Research, 1999, 428 (s1-2): 33-39.
 [24] Mukhopadhyay M K, Nath D. Physiologically based toxicokinetic modeling of secondary acute myelolytic leukemia [J]. Environmental Toxicology Pharmacology, 2014, 37 (1): 378-389.
 [25] 夏昭林, 金锡鹏, 许祖德, 等. 苯吸入染毒对BALB/C小鼠的诱癌作用 [J]. 工业卫生与职业病, 1994, 20 (5): 283-285.
 [26] Hoffmann M J, Sinko P J, Meeker R J, et al. Pharmacokinetics of benzene following an oral or intradermal dose in FVB and Tg. AC mice [J]. Advances in Experimental Medicine & Biology, 2001, 500: 455-458.
 [27] Sun R, Zhang J, Xiong M, et al. Altered expression of genes in signaling pathways regulating proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells in mice with subchronic benzene exposure [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2015, 12 (8): 9298-9313.