

混苯接触工人遗传损伤和代谢酶基因多态性的关系

叶云杰¹, 吕建萍², 周莉芳¹, 张静¹, 冯楠楠¹, 贺金奖¹, 孙原¹, 孙品¹, 程周祥², 夏昭林¹

摘要: [目的] 探讨混苯接触工人外周血淋巴细胞染色体损伤状况及其与代谢酶基因 *CYP2E1* 和 *NQO1* 多态性的关系。[方法] 采用胞质分裂阻滞微核实验评价 461 名混苯作业工人和 88 名对照组工人的染色体损伤水平, 应用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性检测 *CYP2E1 Pst* 和 *NQO1⁶⁰⁹* 基因多态性。[结果] 接触组和对照组淋巴细胞微核率分别为 $(2.12 \pm 1.87)\%$ 和 $(1.19 \pm 1.68)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 单因素和多因素分析结果均显示, *NQO1⁶⁰⁹* 野生纯合者 (CC) 为染色体损伤的易感人群。年龄增长是微核率增加的危险因素, 未发现性别、吸烟、饮酒与微核率之间的关系。[结论] 双核淋巴细胞微核数可以作为苯接触早期健康损害的指标。混苯中甲苯和二甲苯可能不是导致遗传损伤的主要物质。混苯接触诱导的染色体损伤与 *NQO1⁶⁰⁹* 位点多态性有关。

关键词: 混苯接触; 微核率; 细胞色素氧化酶 *P450 2E1*; 醌类氧化还原酶基因 *NQO1*; 基因多态性

Association between Polymorphisms and Chromosomal Damages of Metabolic Enzyme Genes in Benzene-Mixture-Exposed Workers YE Yun-jie¹, LÜ Jian-ping², ZHOU Li-fang¹, ZHANG Jing¹, FENG Nan-nan¹, HE Jin-jiang¹, SUN Yuan¹, SUN Pin¹, CHENG Zhou-xiang², XIA Zhao-lin¹ (1. Key Lab of Public Health Security of Ministry of Education/Department of Occupational Health, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Wuhu Center for Disease Control and Prevention, Wuhu, Anhui 241000, China). Address correspondence to XIA Zhao-lin, E-mail: zlxia@shmu.edu.cn · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore the association between chromosomal damage induced by benzene mixtures and the genetic polymorphisms of metabolic enzymes *CYP2E1* and *NQO1*. [Methods] Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay was used to detect chromosomal damage in peripheral lymphocytes of 461 benzene-mixture-exposed workers and 88 controls. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique was applied to detect polymorphisms of *CYP2E1 Pst* and *NQO1⁶⁰⁹*. [Results] The CBMN frequency in the exposed workers was significantly higher than that in the control group [$(2.12 \pm 1.87)\%$ vs. $(1.19 \pm 1.68)\%$, $P < 0.01$]. The individuals with the *NQO1⁶⁰⁹* CC genotype showed significantly higher CBMN frequencies than the individuals with TT genotype ($P < 0.05$) in either single or multiple factor analysis. Age was an effect modifier for elevated CBMN frequency, while sex, smoking, and alcohol consumption had no relationship with CBMN frequencies. [Conclusion] Methylbenzene or dimethylbenzene exposure is not a key contributor to genetic damages. Cytokinesis-block micronucleus can be used to detect the early genetic damage of benzene mixture-exposed workers. *NQO1⁶⁰⁹* polymorphisms are associated with chromosomal damage induced by benzene mixtures.

Key Words: benzene mixture exposure; cytokinesis-block micronucleus; *CYP2E1*; *NQO1*; genetic polymorphisms

苯 (benzene) 及其同系物甲苯 (methylbenzene)、二甲苯 (dimethylbenzene) 常混合存在于油漆、黏胶等原料中, 接触者常称作混苯作业者。其中苯毒性的主要靶器官为造血系统, 表现为外周血白细胞计数的下降, 甚至出现再生障碍性贫血、骨髓增生异常综合征以及各种类型的白血病^[1]。而甲苯和二甲苯慢性毒性

主要导致慢性神经衰弱^[2-3]。另外, 苯是确定的人类致癌物, 其代谢产物氢醌、苯醌能直接和体内生物大分子作用。苯在体内的初级氧化物苯酚在骨髓过氧化物酶作用下生成的半醌类物质和醌类物质能通过氧化还原循环生成氧自由基, 损伤骨髓造血细胞的遗传物质^[4-5]。虽然有关于人体外周血淋巴细胞体外培养进行二甲苯染毒后发现其姐妹染色单体交换率上升的报道^[3], 但是一般认为甲苯和二甲苯的致突变能力较弱。三苯在体内的代谢过程中均涉及细胞色素氧化酶 *P450 2E1* (*CYP2E1*), 谷胱甘肽 S-转移酶 (*GSTs*) 和还原型辅酶 I 醌类氧化还原酶 (*NQO1*) 等代谢酶^[6], 这些代谢酶基因存在基因多态性。不同的基因型可能

[基金项目] 上海市公共卫生重点学科建设项目 (编号: 08GW2X0402)

[作者简介] 叶云杰 (1986—) 男, 硕士生; 研究方向: 职业卫生与环境卫生学; E-mail: 0457004@fudan.edu.cn

[通信作者] 夏昭林教授, E-mail: zlxia@shmu.edu.cn

[作者单位] 1. 复旦大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 公共卫生安全教育部重点实验室, 上海 200032; 2. 安徽省芜湖市疾病预防控制中心, 安徽 芜湖 241000

导致代谢酶氨基酸序列的改变,从而影响代谢酶的活性^[7]。已有研究报道代谢酶基因多态性可能影响工人血液系统损伤的易感性^[8]。本研究旨在探讨混苯接触工人的染色体损伤状况及其与 *CYP2E1*、*NQO1* 基因多态性的关系,为研究混苯的毒性作用和保护混苯接触易感人群提供依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

调查现场为某大型汽车制造公司,主要工艺流程分为冲压、焊装、涂装和总装4个部分,并且各部分工艺流程在单独的车间内进行。其中,涂装车间的面漆、喷涂室、调漆室和总装车间的补漆点,均需要使用油漆。空气中苯系物浓度依据 GBZ/T 160.43—2004《工作场所空气有毒物质测定 多苯类化合物》^[9]规定的方法进行检测。各个车间空气苯系物浓度检测数据由当地疾病预防控制中心提供。

接触组工人在该厂工作时间超过1年,近2周无X射线照射史,既往无肿瘤等重大病史,共计461人,平均年龄为 (25.30 ± 6.45) 岁。对照组为88名当地相近规模的一家机械加工公司的工人,其生产工艺不涉及化学有害因素,平均年龄为 (27.08 ± 5.45) 岁。

1.2 问卷调查和血样收集

接触组和对照组均在同一职业体检中心接受血、尿常规检查,并接受统一的问卷调查。其中血常规包括红细胞(RBC)、白细胞(WBC)和血小板计数及血红蛋白(Hb)浓度。血常规检测WBC计数低于 $4.5 \times 10^9/L$ 的工人在2周后再次接受同样检测。问卷内容包括研究对象的一般情况、职业史、生活行为习惯、生产中的个人防护措施实施情况、既往病史、X线照射史以及用药史和个人自觉症状等。

研究对象签署知情同意书,在进行血常规检查时采集静脉血3 mL,置于肝素锂抗凝无菌管内混匀,其中0.5 mL在当日用于双核淋巴细胞微核检测,剩余血样在分离血浆后,使用DNA提取试剂盒提取DNA,随机抽取提取的DNA样本在260 nm和280 nm处测定样本的光密度值,合格提取的DNA在 -80°C 保存。

1.3 胞质分裂阻滞微核试验

参考 FENECH 等^[10-11]方法并且略加以改进。将0.5 mL抗凝血加入含4.5 mL 1640培养基的培养瓶中,培养箱中以 37°C 、5% CO_2 条件培养44 h后,加入细胞松弛素B(美国Sigma公司),使终浓度为6 mg/L,

继续培养72 h收获。每个样本滴片2张,10%姬姆萨(Giemsa)染色。1 000倍显微镜下观察计数1 000个双核淋巴细胞,记录微核数并摄影保存,计算微核发生率(%)。

1.4 代谢酶基因位点多态性检测

限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)检测 *CYP2E1* *Pst* 和 *NQO1*⁶⁰⁹ 基因多态性。*CYP2E1* *Pst*引物序列为F: 5'-ACATTGTCAGTTCTCA CCTC-3', R: 5'-ATACCTATGGACTACCTTC-3'。与2 × PCR mix、去离子水和底物模板组成25 μL PCR体系,反应条件为 95°C 变性3 min,35个循环: 94°C 变性1 s, 58°C 退火1 min, 72°C 延伸65 s,循环结束后 72°C 延伸10 min。PCR扩增产物与限制性内切酶 *Pst*I 在 37°C 、16 h条件下消化后,2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色,紫外灯下拍照。其中野生纯合型 *CYP2E1* GG仅单条片段453 bp;杂合基因型 *CYP2E1* CG为453、330、123 bp 3条片段;突变纯合型 *CYP2E1* CC为330和123 bp 2条片段。*NQO1*⁶⁰⁹引物序列为F: 5'-GAGACG CTAGCTCTGAACTGAT-3', R: 5'-ATTTGAATTCGGGC GTCTGCTG-3'。25 μL PCR反应体系, 95°C 变性3 min,35个循环: 94°C 变性1 s, 58°C 退火1 min, 72°C 延伸1 min,循环结束后 72°C 延伸10 min。PCR扩增产物与限制性内切酶 *Hinf*I 在 37°C 、16 h条件下消化后,2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色,紫外灯下拍照。其中野生纯合型 *NQO1*⁶⁰⁹ CC仅单条片段220 bp;杂合基因型 *NQO1*⁶⁰⁹ CT为220、166和54 bp 3条片段;突变纯合型 *NQO1*⁶⁰⁹ TT为166和54 bp 2条片段。由于DNA提取损失及部分DNA样本未能成功酶切,实际获得的基因分型样本数少于总样本数。

1.5 统计分析

运用Excel表格建立数据库并进行整理和初步分析,应用Stata 12.0统计分析。微核率符合Poisson分布,以微核率作为应变量,各种影响因素作为自变量,采用Poisson回归分析。结果使用FR及其95%可信区间表示。 $FR=e^\beta$ ($e=2.71828$, β =回归系数),检验水准 $\alpha=0.05$ 。逐步回归时筛选影响变量进入方程概率为0.05,排除概率为0.10。血常规数据为连续性数据,使用方差分析其各组之间均数差异。

2 结果

2.1 苯系物检测结果及接触组分组

根据最近2年当地疾控中心提供的涂装和总装车

间空气中三苯浓度的检测结果, 2 个车间所有监测点任意时点监测结果均显示苯浓度 $<0.6\text{mg}/\text{m}^3$, 低于仪器检测限。涂装车间面漆喷漆检测点检出甲苯的 8h 时间加权平均浓度 (TWA) 为 $4.0\text{mg}/\text{m}^3$, 二甲苯为 $13.7\text{mg}/\text{m}^3$, 车间内其余检测点甲苯 TWA 均小于 $1.2\text{mg}/\text{m}^3$, 二甲苯浓度为 $3.3\sim 6.2\text{mg}/\text{m}^3$ 。总装车间返工区二甲苯浓度较高, TWA 为 $8.6\text{mg}/\text{m}^3$, 其余点均小于 $3.3\text{mg}/\text{m}^3$; 同时总装车间各检测点甲苯 TWA 均小于 $1.2\text{mg}/\text{m}^3$ 。但该厂接苯职工曾有白血病发生, 并且首次体检发现近 20% 工人的 WBC 计数低于 $4.5 \times 10^9/\text{L}$, 工人中明显的血液系统损伤提示存在苯接触。由于检测结果仅反映近 2 年车间空气中三苯的浓度, 不排除既往工作场所中存在较高浓度苯接触的可能。

根据提供的车间甲苯、二甲苯浓度, 由于涂装车间的面漆喷漆点和总装车间返工区甲苯和二甲苯浓度较高, 相对于其余区域浓度倍数在 3~4 之间, 因此将在该区域作业的工种甲苯-二甲苯接触强度赋值为 8, 2 个车间内其余的工种接触强度赋值为 2, 不在这两个车间中工作的工种, 考虑到在厂区依旧可能存在低暴露, 依照倍数赋值为 0.5。将接触强度赋值与工人接触工龄相乘计算累计接触剂量, 得累计接触剂量区间为 0.1~82.6。以该数值 25% 和 75% 位数 2 和 17 作为划分低、中、高接触的限值, 将接触组工人分为 3 组。其中甲苯-二甲苯低接触组 123 人, 中接触组 223 人, 高接触组 115 人。

由于苯浓度在各检测点均未获取确切数据, 且由于工艺中使用的油漆存在差异, 因此不能使用甲苯-二甲苯分组来完全代表工人苯接触程度。但由于苯的血液毒性, 而甲苯和二甲苯不具有血液毒性, 因此采用外周血 WBC 计数分组来间接反映工人苯接触等级。考虑前后 2 次血常规检查, 将接触组中首次检查 WBC 计数大于 $4.5 \times 10^9/\text{L}$ 的工人视作 WBC 正常组, 首次计数低于 $4.5 \times 10^9/\text{L}$, 第二次高于 $4.5 \times 10^9/\text{L}$ 的视作波动组, 两次计数均低于 $4.5 \times 10^9/\text{L}$ 的视作降低组。

2.2 一般情况

接触组女性 55 人 (11.9%), 对照组女性 10 人 (11.4%), 经卡方检验, 两组性别分布差异无统计学意义 ($\chi^2=0.42, P>0.05$)。吸烟程度按吸烟指数 2 包/(d·年)和 5 包/(d·年)分为 3 组, 饮酒程度按调查问卷分为很少饮酒、经常饮酒和频繁饮酒 3 组, 经过卡方检验, 对照组和接触组吸烟和饮酒行为分布差异均无统计学意义 (吸烟 $\chi^2=0.44, P>0.05$; 饮酒 $\chi^2=4.11, P>0.05$)。

按照甲苯-二甲苯分组, 自觉症状中, 随着接触强度增加, 常出现失眠多梦、食欲减退和疲乏无力 3 项症状的工人比例亦随之增加, 经线性趋势检验具有统计学意义 ($P<0.05$)。同样按照甲苯-二甲苯分组, 经方差分析, 4 组 WBC、RBC 计数和 Hb 均数不全相同, 两两比较发现各接触组 WBC、RBC 计数和 Hb 均数均低于对照组 ($P<0.05$), 见表 1。

表 1 混苯接触组血常规检测结果 (甲苯-二甲苯接触分组)

Table 1 Comparison of blood test results among the benzene-mixture-exposed groups and the control group						
项目 (Items)	对照 (Control)	低接触 (Low exposure)	中接触 (Medium exposure)	高接触 (High exposure)	F	P
例数 (n)	88	123	223	115		
WBC ($\times 10^9/\text{L}$)	6.7 $\pm$ 1.7	4.8 $\pm$ 1.4*	4.6 $\pm$ 1.3*	4.5 $\pm$ 1.2*	54.90	<0.001
Hb (g/L)	146.7 $\pm$ 13.4	137.0 $\pm$ 17.0*	138.5 $\pm$ 15.2*	139.6 $\pm$ 13.8*	8.12	<0.001
RBC ($\times 10^{12}/\text{L}$)	4.7 $\pm$ 0.5	4.03 $\pm$ 0.48*	4.15 $\pm$ 0.40*	4.16 $\pm$ 0.40*	49.81	<0.001
血小板 (Platelet, $\times 10^9/\text{L}$)	181.2 $\pm$ 39.7	180.5 $\pm$ 41.4	181.9 $\pm$ 45.6	173.7 $\pm$ 36.4	0.99	0.40

[注]*: 与对照组比较 (Compared with the control group), $P<0.05$ 。

2.3 接触组和对照组微核率

混苯接触组和对照组的淋巴细胞微核率分别为 $(2.12 \pm 1.87)\%$ 和 $(1.19 \pm 1.68)\%$, 见表 2, 以微核率作为应变量, 各种因素作为自变量, 进行 Poisson 回归分析, 两组微核率差别具有统计学意义 ($FR=1.71, 95\%CI=1.45\sim 2.17, P<0.01$)。年龄在 25~35 岁和 35 岁以上的人群微核率均高于年龄低于 25 岁的人群 ($P<0.05$), 未发现性别、接苯作业工龄、吸烟和饮酒与微核率有关联。

无论是依据甲苯-二甲苯接触分组还是依据 WBC 计数分组, 各接触组微核率均高于对照组 (表 2)。分析比较接触组内各组的微核率, 进行两两比较。以甲苯-二甲苯分组, 低-中、低-高、中-高接触组比较后 χ^2 分别为 0.32、0.01、0.46, 相应 P 值为 0.57、0.91、0.49, 即 3 组间微核率差异无统计学意义。以 WBC 计数分组, 正常组-波动组、正常组-降低组、波动组-降低组比较后, χ^2 分别为 4.48、7.05、0.62, 相应 P 值为 0.03、0.01、0.43, 即接触工人中, WBC 波

动组和降低组的微核率均高于正常组,但是波动组和降低组之间微核率差异,可认为首次检查 WBC 计数正常的人群。

表 2 混苯接触组和对照组微核率与一般情况的关系

Table 2 Micronucleus frequency of benzene-mixture-exposed workers and controls by demographic characteristics

项目 Items	对照组 Control(<i>n</i> =88)		接触组 Exposed workers(<i>n</i> =461)		FR(95%CI)	<i>P</i>
	例数(<i>n</i>)	微核率($\bar{x} \pm s, \%o$) Micronucleus frequency	例数(<i>n</i>)	微核率($\bar{x} \pm s, \%o$) Micronucleus frequency		
年龄(Age, years)						
<25	43	0.60 ± 0.88	258	1.94 ± 1.63	1.00	
25~35	34	1.53 ± 1.54	153	2.14 ± 1.83	1.18(1.03~1.35)	0.01
>35	11	2.45 ± 3.14	50	3.00 ± 2.76	1.69(1.43~2.00)	<0.001
性别(Gender)						
男(Male)	78	1.04 ± 1.29	406	2.11 ± 1.81	1.00	
女(Female)	10	2.40 ± 3.34	55	2.18 ± 2.29	1.14(0.95~1.36)	0.15
吸烟(Smoking, pack/d · a)						
<2	82	1.23 ± 1.73	450	2.10 ± 1.86	1.00	
2~5	4	0.75 ± 0.50	29	2.00 ± 1.60	0.92(0.71~1.20)	0.54
>5	2	0.50 ± 0.71	12	3.00 ± 2.63	1.33(0.96~1.85)	0.09
饮酒(Drinking)						
极少(Seldom)	50	1.43 ± 1.92	243	2.12 ± 1.81	1.00	
偶尔(Occasionally)	23	0.91 ± 1.20	155	2.09 ± 1.87	0.95(0.83~1.08)	0.45
经常(Often)	9	0.50 ± 0.53	63	2.22 ± 2.13	0.98(0.82~1.18)	0.88
接触组甲苯-二甲苯暴露水平 Methylbenzene-dimethylbenzene exposure level						
低暴露(Low exposure)	—	—	123	2.08 ± 2.02	1.74(1.39~2.19)	<0.001
中暴露(Medium exposure)	—	—	223	2.17 ± 1.85	1.82(1.47~2.25)	<0.001
高暴露(High exposure)	—	—	115	2.06 ± 1.75	1.73(1.37~2.17)	<0.001
接苯作业工龄(Sencority, years)						
<2	—	—	143	2.09 ± 1.81	1.00	<0.001
2~5	—	—	176	1.91 ± 1.57	0.92(0.78~1.07)	0.27
>5	—	—	142	2.41 ± 2.22	1.15(0.99~1.35)	0.08
接触组 WBC 计数(WBC Count in exposed workers)						
正常(Normal)	—	—	134	1.84 ± 1.98	1.54(1.23~1.94)	<0.001
波动(Unstable)	—	—	197	2.18 ± 1.73	1.83(1.48~2.26)	<0.001
降低(Low)	—	—	130	2.31 ± 1.94	1.94(1.55~2.42)	<0.001
合计(Total)	88	1.19 ± 1.68	461	2.12 ± 1.87	1.77(1.45~2.17)	<0.001

2.4 CYP2E1 和 NQO1⁶⁰⁹ 位点多态性与微核率关系的单因素分析

多态性结果检测显示, CYP2E1 GC 等位基因频率为 0.80/0.20, NQO1⁶⁰⁹ CT 基因频率为 0.54/0.46, 经过 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验的 χ^2 分别为 0.63 和 0.06, 相应 *P* 值为 0.43 和 0.81, 符合遗传平衡法则 (*P* > 0.05)。

由表 3 可见, CYP2E1 *Pst* 3 种基因型的微核率分别是 GG(2.02 ± 1.95) %o, CG(1.88 ± 1.79) %o, CC(1.75 ± 1.51) %o。虽然随着突变程度的增加, 微核率均数相对减少, 但是 Poisson 回归检验其差别不具有统计学意义; NQO1⁶⁰⁹ 3 种基因型的微核率分别是 CC(2.04 ± 2.05) %o, CT(2.08 ± 1.82) %o, TT(1.63 ±

1.73) %o。其中突变纯合型(TT)的微核率低于野生纯合型(CC)。

2.5 混苯接触组微核率影响因素的 Poisson 回归分析

以微核率作为应变变量, 将甲苯-二甲苯接触、年龄、性别、代谢酶基因型、吸烟和饮酒等可能的影响因素作为自变量放入 Poisson 回归方程, 并且各个自变量均以哑变量进入方程。使用逐步后退法, 参照进入概率 0.05, 排除概率 0.10 筛选对微核率的影响因素。最后进入回归方程的因素为 NQO1⁶⁰⁹ 基因型和年龄, 见表 4, 甲苯-二甲苯接触程度被排除; 同样以 WBC 计数分组和其他影响因素进入方程, 以同样方式筛选, 发现 NQO1⁶⁰⁹ 基因型、年龄和 WBC 计数与接触组工人微核率变化相关, 见表 5。

表 3 微核率与 CYP2E1 和 NQO1⁶⁰⁹ 位点多态性的关系

Table 3 Associations between micronucleus frequency and CYP2E1 and NQO1 ⁶⁰⁹ gene polymorphisms							
基因 (Gene)	基因型 (Genotype)	例数 (n)	微核率 (Micronucleus frequency, $\bar{x} \pm s, \%$)	β	Z	P	FR (95%CI)
CYP2E1	GG	353	2.02 $\pm$ 1.95	0			
	CG	166	1.88 $\pm$ 1.79	-0.07	-1.06	0.29	0.93 (0.82~1.06)
	CC	24	1.75 $\pm$ 1.51	-0.14	-0.92	0.36	0.86 (0.63~1.17)
NQO1 ⁶⁰⁹ *	CC	157	2.04 $\pm$ 2.05	0			
	CT	272	2.08 $\pm$ 1.82	0.02	0.30	0.76	1.02 (0.89~1.17)
	TT	113	1.63 $\pm$ 1.73	-0.22	-2.46	0.01	0.79 (0.66~0.95)

[注]*: 由于 DNA 提取损失和部分 DNA 样本未能成功酶切, 实际获得的基因分型样本数 CYP2E1 为 543 例, NQO1 为 542 例 (543 CYP2E1 and 542 NQO1 genotyped results with successful DNA extraction and enzyme digestion are used in this table)。

表 4 多因素 Poisson 回归分析混苯接触组微核率影响因素 (甲苯-二甲苯接触分组)

Table 4 Multivariate Poisson regression analysis of micronucleus frequency in benzene-mixture-exposed workers with methylbenzene-dimethylbenzene exposure ranking					
因素 (Factors)	分类 (Sub-type)	β	Z	P	FR (95%CI)
NQO1 ⁶⁰⁹	常数项 (Intercept)	0.67	10.09	0.00	
	CC	0			1
	CT	0.04	0.52	0.60	1.04 (0.90~1.20)
	TT	-0.19	-1.93	0.05	0.82 (0.68~1.00)
年龄 (Age, years)	< 25	0			1
	25~35	0.09	1.27	0.21	1.10 (0.95~1.26)
	> 35	0.44	4.75	0.00	1.56 (1.29~1.88)

表 5 多因素 Poisson 回归分析混苯接触组微核率影响因素 (WBC 计数分组)

Table 5 Multivariate Poisson regression analysis of micronucleus frequency in benzene-mixture-exposed workers with WBC counts ranking					
因素 (Factors)	分类 (Sub-type)	β	Z	P	FR (95%CI)
WBC 计数 (WBC counts)	常数项 (Intercept)	0.47		0.00	
	正常组 (Normal)	0			1.00
	波动组 (Unstable)	0.25	3.00	0.003	1.28 (1.09~1.50)
	降低组 (Low)	0.26	2.93	0.003	1.29 (1.09~1.53)
NQO1 ⁶⁰⁹	CC	0			1.00
	CT	0.05	0.61	0.543	1.03 (0.90~1.18)
	TT	-0.18	-1.81	0.071	0.83 (0.69~0.99)
	< 25	0			1.00
年龄 (Age, years)	25~35	0.12	1.67	0.094	1.16 (1.02~1.34)
	> 35	0.49	5.19	0.000	1.67 (1.41~1.98)

两表 (表 4、表 5) 共同显示年龄增长是导致微核率增加的显著因素, 尤其是 35 岁以上人群微核率较高 ($P<0.01$); 而携带 NQO1⁶⁰⁹ 突变纯合型的工人是混苯接触所致遗传损伤的耐受人群 ($P<0.01$)。两表相互比较发现, 在该厂工作的工人, 虽然微核率高于对照组, 但是引起微核率升高的原因很可能不是由于甲苯-二甲苯接触引起; 根据 WBC 降低和微核率的

关系, 以及既往研究提示 WBC 降低是苯接触的敏感效应指标, 提示该厂中, 虽然近 2 年苯浓度低于检测限, 但是其浓度差异依旧能够导致工人微核率的显著变化; 同时也不排除以往的接触中存在较高浓度苯的可能。

3 讨论

苯接触可以导致职业人群健康损害, 1982 年苯被国际癌症研究机构 (IARC) 确定为 I 类致癌物, 因此在工业生产中常用甲苯和二甲苯替代苯作为各种黏胶和油漆的溶剂, 因而纯苯接触在工业生产中比较少见, 主要是混苯接触。

在本次现场调查中, 所得的各车间近 2 年各检测点苯浓度数据均小于仪器检测限, 因此难以直接比较各岗位苯接触程度大小, 但此数据不能代表该厂既往车间空气中苯浓度均低于国家职业卫生标准。由于外周血 WBC 计数是反映慢性苯接触程度的敏感性效应指标, 因此使用 WBC 计数分组间接反映工人苯接触程度。甲苯和二甲苯的接触程度依据在不同检测点的浓度比例予以赋值, 结合工龄计算工人的累积接触程度。本次研究显示接触组的 WBC、RBC 计数和 Hb 浓度均低于对照组, 且差别有统计学意义。提示工厂工人存在血液系统损伤, 也客观证明了该工作场所空气中有苯存在。

胞质分裂阻滞微核试验被广泛用于环境中致突变物的筛选^[12]。既往有报道在苯接触人群中微核率高于对照人群, 本次研究显示接触组淋巴细胞微核率高于对照组。但若依据甲苯-二甲苯接触程度分组, 3 个接触组之间微核率差异无统计学意义。如若按照接触组 WBC 计数进行分组, 则显示首次血常规低于 $4.5 \times 10^9/L$ 的接触工人, 微核率高于正常者。接触组微核发生率高于对照组, 显示职业混苯接触可能会导

致工人遗传损伤。而两种分组产生的结果差异,提示甲苯和二甲苯接触不是导致接触组工人微核率变化的主要因素;苯浓度虽然未在各个检测点取得准确数值,但其浓度和接触程度的差异可能导致不同岗位工人的微核率差异,也提示该厂既往可能有比较高的车间空气苯浓度接触。

由于在正常人群中 WBC 计数低于限值的比例较少,在选择未接触混苯对照时并未获得该类对象的样本。同时,在未接触混苯但 WBC 减少的人群中,不能排除是由于其他疾病或者毒物造成的影响,因此不宜纳入本次研究的对照人群。通过接触组和对照组 WBC 计数的比较,可以认为接触组的 WBC 减少主要由作业过程中混苯接触引起,同时在接触组中,2 次 WBC 计数正常的对象,其微核率已高于对照组。认为微核率在接触组升高,应主要归因于苯接触而不是 WBC 数的减少。WBC 数减少是苯的一个比较明确的效应,在本研究中作为衡量苯接触程度的一个替代指标来分析苯接触和微核率的统计学关系,但是从生物学意义上难以确定 WBC 数减少和微核率上升的因果关系。

研究未发现性别、工龄、吸烟和饮酒与微核率的关系,可能是由于所选人群女性所占比例较小,且关于吸烟和饮酒的回答主要集中在很少吸烟和很少饮酒上,经常吸烟和经常饮酒者在所选人群中所占比例很少,难以实现各组间人数的均衡,从而影响统计学的效率,可以考虑在以后的研究中扩大研究样本量;但是也有可能是混苯接触掩盖了吸烟和饮酒的影响;或者是混苯接触程度可能在各个工龄组分布不一致,因此未发现工龄与微核率增长之间的统计学关联;再者年龄增长是导致微核率升高的一个重要因素,反映了机体随着时间变化体内积累的遗传损伤程度增加。

毒物代谢酶 CYP2E1 和 NQO1 参与三苯在体内的代谢,本研究中 CYP2E1 GC 等位基因频率为 0.80/0.20, NQO1⁶⁰⁹ CT 等位基因频率为 0.54/0.46,与相关文献的报道基本一致^[7, 13-14]。且在本项研究中,等位基因频率分布达到了遗传平衡。

苯通过肺脏进入人体后在肝脏被 CYP2E1 氧化生成苯氧化物(BO),BO 可以自发转化为苯酚,苯酚经过 CYP2E1 进一步氧化代谢生成苯的多羟基化合物,如苯三醇(BT)、邻苯二酚(CAT)等^[5]。甲苯也主要通过 CYP2E1 代谢,氧化成为苯甲酸,再与甘氨酸结合生成马尿酸。二甲苯则氧化生成相应的甲基苯甲酸,再与葡萄糖醛酸或者甘氨酸反应。后两者的产物

在 24~48 h 之内几乎完全排除体外,且不具有血液毒性。而其中苯的代谢物转运至骨髓,在髓性过氧化物酶(MPO)作用下生成苯酚(BQ)、醛类和半醌类物质,同时一部分苯酚在 NQO1 作用下还原成氢醌(HQ)或 CAT,而 BQ、HQ 和 CAT 是苯导致机体损伤的重要代谢产物。因此 CYP2E1 基因突变,酶活性下降,生成苯氧化物的量减少,可能使机体所受损伤减少,既往有关于该基因位点与血液系统损伤水平相关性的研究,虽然提示一定的保护作用,但是其统计学意义不明显。同样在本研究中,虽然显示突变型微核率相对于野生型微核率偏低,但是均值之间差异无统计学意义。

NQO1 可以将还原型辅酶 I (NADH) 或还原型辅酶 II (NADPH) 的电子传递给半醌类化合物,使之还原成为氢醌类物质,从而降低具有致癌性和致畸性醌类化合物的危害^[15]。NQO1 个体酶活力的差异主要是由其基因的 609 位点的突变(C→T)引起,基因型为 TT 的突变纯合子的个体体内检测不到 NQO1 酶活性^[8]。但在本次研究中发现不论是单因素或多因素分析, NQO1⁶⁰⁹ 突变纯合的个体其遗传损伤程度均较野生纯合的个体为低,这与既往的研究结果相悖。考虑到本研究现场中,使用的油漆不仅含有苯,还含有甲苯、二甲苯等同系物,并且有研究报道甲苯可以通过减少苯代谢物的生成来抑制苯的骨髓毒性,且甲苯对苯代谢的抑制强于苯对甲苯的抑制^[6]。推测由于混苯接触情况下 NQO1 突变纯合个体由于不能代谢苯和甲苯的代谢物,造成该环节前代谢物的增多,由于甲苯的代谢物能抑制苯代谢物的生成,且本次现场甲苯检测浓度高于苯浓度,造成苯在体内代谢产物的进一步减少。由于苯的致突变性主要依赖于酚类和环氧化物,纯苯本身致突变性较小,因此出现在该厂混苯接触条件下, NQO1⁶⁰⁹ 突变纯合的个体是遗传损伤的耐受人。考虑到本次研究结果与既往纯苯接触下结果的差异,并求证推断的真实性,建议可以分别建立苯和甲苯、苯和二甲苯混合接触的动物接触模型,评价 NQO1 位点多态性对于 3 种物质毒性作用的修饰作用,从而进一步评价在混苯接触下,代谢酶基因多态性与接触工人遗传损伤易感性的关系,以及这种关系与纯苯接触时的差异。

本次研究的效应指标为血常规指标和双核淋巴细胞微核率,均与血液系统相关。在苯、甲苯与二甲苯中,以苯的血液毒性比较显著,甲苯和二甲苯不具有血液毒性作用。但是在近 2 年车间空气监测数据

中,苯在各车间各个点的浓度均没有具体数据,工人接触分组主要依据甲苯和二甲苯的浓度或是血常规 WBC 计数,在分组时可能存在错分的情况,最终对效应和易感性的解释均会由此产生偏差。在以后的研究中,应当尽可能获得研究对象工作地点的确切接触数据,从而更加准确地进行接触评估。

混苯接触除可能导致接触工人血液系统损伤外,也可导致接触工人遗传学损伤,但其遗传损伤主要是由于混苯中苯造成,甲苯和二甲苯接触对接触工人微核率变化影响极小。胞质分裂阻滞微核试验可以作为反映低浓度混苯接触遗传损伤程度的敏感指标。年龄增长是微核率升高的危险因素。本次现场发现 *NQO1* 基因位点多态性与混苯诱导的遗传损伤有关,并提示具有 *NQO1*⁶⁰⁹ 野生纯合者可能为混苯致染色体损伤的易感人群,应加强对这部分人群的健康监护,及早发现健康损害并采取有效预防措施。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] KHALADE A, JAAKKOLA MS, PUKKALA E, et al. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis[J]. Environ Health, 2010, 9: 31.
- [2] 张德恩, 马芳. 皮鞋制作工人甲苯接触水平与毒性反应关系 22 年观察[J]. 职业卫生与应急救援, 2003, 21(3): 128-129.
- [3] 刘金成, 苏爱. 二甲苯对正常人外周血淋巴细胞 SCE 频率的影响[J]. 青岛大学医学院学报, 2006, 42(3): 262/264.
- [4] 肖芸, 姚耿东, 张幸. 苯及其代谢物血液毒性机制研究进展[J]. 中国工业医学杂志, 2008, 21(4): 247-250.
- [5] 叶细标, 傅华. 苯致白血病机制研究的进展[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2005, 23(5): 392-395.
- [6] 周彤, 金锡鹏. 苯的毒性作用的影响因素研究[J]. 中国工业医学杂志, 1994, 7(1): 31-33.
- [7] DOUGHERTY D, GARTE S, BARCHOWSKY A, et al. *NQO1*, *MPO*, *CYP2E1*, *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms and biological effects of benzene exposure-A literature review[J]. Toxicol Lett, 2008, 182(1-3): 7-17.
- [8] 万俊香, 夏昭林, 金锡鹏. 与苯血液毒性易感性相关的几种毒物代谢酶多态性研究进展[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2001, 19(1): 76-78.
- [9] 中华人民共和国卫生部. GBZ/T 160.53—2004 工作场所空气有毒物质测定 多苯类化合物[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [10] FENECH M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry[J]. Health Phys, 2010, 98(2): 234-243.
- [11] FENECH M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations[J]. Environ Health Perspect, 1993, 101(Suppl 3): 101-107.
- [12] BONASSI S, COSKUN E, CEPPI M, et al. The human micronucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN (XL)): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol[J]. Mutat Res, 2011, 728(3): 88-97.
- [13] SMITH MT, ZHANG LP. Biomarkers of leukemia risk: benzene as a model[J]. Environ Health Perspect, 1998, 106(Suppl 4): 937-946.
- [14] 瞿永华, 石于波, 钟礼杰, 等. 华人 *GSTM1*, *CYP 1A1* 与 *2E1* 和 *APOE* 等等位基因的基因型[J]. 肿瘤, 1998, 18(1): 17-20.
- [15] PUGA A, NEBERT DW, MCKINNON RA, et al. Genetic polymorphisms in human drug-metabolizing enzymes: potential uses of reverse genetics to identify genes of toxicological relevance[J]. Crit Rev Toxicol, 1999, 27(2): 199-222.

(收稿日期: 2012-05-31)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 张晶; 校对: 王晓宇)