

温室作业人员农药暴露致外周血淋巴细胞基因组不稳定表型

翟庆峰, 赵健, 邢杰, 邵丽军, 邱玉刚

摘要: [目的] 分析温室作业农药暴露对菜农外周血淋巴细胞基因组不稳定性的影响及其细胞毒作用。[方法] 对安丘市从事温室蔬菜大棚种植者 583 名及普通农民 576 名进行问卷调查, 根据农药暴露强度, 将蔬菜大棚种植组所有调查对象分为低($n=175$)、中($n=181$)、高($n=212$) 3 个暴露组。利用胞质分裂阻滞法微核细胞组学试验评价温室农药暴露所致菜农基因组不稳定性和细胞毒性。[结果] 随着农药暴露水平的增加, 微核率、核质桥、核芽发生率、细胞坏死率均有增加趋势(均 $P<0.01$), 双核细胞率和核分裂指数具有降低趋势($P<0.01$), 而凋亡细胞未发现明显的变化趋势。与对照组比较, 中、高暴露组上述各指标差异皆具有统计学意义(均 $P<0.05$)。[结论] 温室作业人群农药暴露会诱发基因组不稳定表型, 并具有较强的细胞毒性。

关键词: 温室作业; 农药暴露; 基因组不稳定性; 胞质分裂阻滞微核组学试验; 细胞毒性

Phenotypes of Genomic Instability in Peripheral Blood Lymphocytes of Greenhouse Workers with Exposure to Pesticides ZHAI Qing-feng, ZHAO Jian, XING Jie, SHAO Li-jun, QIU Yu-gang (School of Public Health and Management, Weifang Medical College, Shandong 261053, China). Address correspondence to QIU Yu-gang, E-mail: qiu yg@wfmc.edu.cn • The author declare he has no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To study the phenotypes of genomic instability in peripheral blood lymphocytes and the cytotoxicity for greenhouse workers with long-term exposure to pesticides. [Methods] Cluster random sampling method was used to select 583 greenhouse workers as pesticide exposure group and 576 common farmers as control group from Anqiu City and to perform a questionnaire survey. According to the level of pesticides exposure, the exposure group was divided into low ($n=175$), moderate ($n=181$), and high ($n=212$) exposure groups. Genomic instability and cytotoxicity of pesticides to peripheral blood lymphocytes were detected by cytokinesis-block micronucleus cytome (CBMN-Cyt) assay. [Results] With higher pesticides exposure level, micronucleus frequency, nucleoplasmic bridges, nuclear buds, and necrotic cell rate were increased (all $P<0.01$); whereas, binucleated cells and nuclear division index were decreased (both $P>0.01$); no significant changes in apoptosis cells were observed. Compared with the control group, all the parameters mentioned above of the moderate or high exposure groups were significantly different (all $P<0.05$). [Conclusion] Exposure of the greenhouse workers to pesticides could cause genomic instability and strong cytotoxicity.

Key Words: greenhouse worker; pesticide exposure; genomic instability; cytokinesis-block micronucleus cytome assay; cytotoxicity

本课题组前期研究发现, 在温室这一特殊的职业环境中, 湿度、温度、通风量、农药使用等是菜农健康的主要影响因素, 其中农药暴露程度相比大田作业尤为突出^[1]。有研究发现, 农药长期接触或使用不当, 可作用于遗传物质而影响自身和后代的健康, 导致癌症和一些遗传疾病的发生^[2]。为促进温室作业人员的健康, 本研究对温室环境中农药暴露的遗传毒性进行研究。

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.15130

[基金项目] 山东省自然科学基金(编号: ZR2013HQ015); 潍坊医学院科技创新基金(编号: K11QC1004); 潍坊医学院“健康山东”重大社会风险预测与治理协同创新中心重点研究方向(编号: XT1406002)

[作者简介] 翟庆峰(1979—), 男, 硕士, 副教授; 研究方向: 环境与职业医学; E-mail: zhai qf@wfmc.edu.cn

[通信作者] 邱玉刚, E-mail: qiu yg@wfmc.edu.cn

[作者单位] 潍坊医学院公共卫生与管理学院, 山东 261053

1 材料与方法

1.1 研究对象

安丘市主要有 9 个乡(镇)从事大棚种植, 从每个乡(镇)随机抽取 1 个村(居委会), 再从每个村(居委会)中随机抽取从事蔬菜大棚种植且使用农药 1 年以上的农民约 60 名组成农药暴露组, 共计 568 人。从上述每个村(居委会)随机抽取不从事蔬菜大棚种植且不使用农药的农民约 20 名组成对照组, 共计 156 人。上述研究对象皆以健康查体进行召集, 调查对象的选择以先到为准, 满额即止。

1.2 主要试剂与仪器

植物血凝素、细胞松弛素-B、二甲基亚砜(DMSO)、Gimsa 染液(美国 Sigma 公司), 专用细胞培养基(80% RFMI 1640; 20% 胎牛血清; 250 mg/L 谷氨酰胺; 植

物血凝素和肝素适量(协和基础研究所遗传室),胎牛血清(美国Gibco公司),其他化学试剂均为化学分析纯。细胞离心涂片机Shandon Cytospin 4(英国Thermo Scientific)公司,荧光倒置显微镜IX71(日本Olympus公司)。

1.3 研究方法

1.3.1 农药暴露评价 根据漆骏^[3]、Dosemeci等^[4]的研究,并综合流行病、卫生统计、职业卫生等相关领域专家的意见制定统一调查问卷,调查内容包括:一

般情况、蔬菜大棚种植情况、农药使用情况、农药的防护情况等。农药暴露计算公式:累积暴露强度=种植面积系数×农药使用年限系数×每年使用农药天数系数×防护措施使用系数×使用农药卫生习惯系数×农药污染衣服后更衣系数,文中涉及的主要变量赋值方法见表1。该农药暴露评价方法是一种适用于混配农药、接触多种农药的半定量评估方法。有关农药使用基本情况见《温室作业人员长期农药暴露相关生物学标志物研究》^[1]。

表1 研究指标及赋值

变量	因素	赋值
X1	年龄	1=[0, 30]; 2=(30, 40]; 3=(40, 50]; 4=(50, 60]; 5=(60+∞)
X2	收入(万元)	1=[0, 1]; 2=(1, 5]; 3=(5, 10]; 4=(10, +∞)
X5	文化程度	1=小学以下; 2=小学; 3=初中; 4=高中及以上
X6	长期服药史	0=否; 1=是
X10	大棚面积(m ²)	1=(0, 666.7)(<1亩); 2=[666.7, 1333.3)(<2亩); 3=[1333.3, 3333.3)(<5亩); 4=[3333.3, +∞)(>5亩)
X15	从事施药	0=否; 1=是
X20	每年工作时间(h)	1=[0, 1000]; 2=(1000, 2000]; 3=(2000, 3000]; 4=(3000, +∞)
X21	每年打药时间(h)	1=[0, 10]; 2=(10, 50]; 3=(50, 100]; 4=(100, 300]; 5=(300, +∞)
X28	喷完农药进入大棚的间隔时间	1=同一天; 2=第2天; 3=>2d
X29	农药配置	1=低于推荐浓度; 2=推荐浓度; 3=高于推荐浓度
X30	是否会亲自混匀农药	1=经常; 2=有时; 3=从不
X31	混匀农药的方式	1=手,戴手套; 2=手,不戴手套; 3=其他如木棍
X34	没有采取任何防护措施	0=否; 1=是
X36	戴口罩	0=否; 1=是
X43	喷洒完农药是否立即洗手	1=经常; 2=有时; 3=从不
X44	夏季喷洒完农药洗澡的间隔时间	1=立即; 2=回家当天; 3=回家第2天或几天以后
X45	冬季喷洒完农药洗澡的间隔时间	1=立即; 2=回家当天; 3=回家第2天或几天以后

1.3.2 胞质分裂阻滞法微核细胞组学试验 由医务人员抽取肘静脉血于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝血(粉盖)管中,随后立即将0.4 mL的抗凝全血注入5 mL专用细胞培养基中,混匀,于37℃温箱中培养42~44 h。加入细胞松弛素B,终浓度为6 μg/mL,继续培养70~72 h收获细胞。细胞经0.075 mol/L氯化钾低渗和4:1的甲醇:冰醋酸固定后,用细胞离心涂片机甩片,10%Gimsa染色^[5]。参照Fenech^[6]的判定标准,计数1000个双核细胞中的微核、核质桥数和核芽数,计数500个细胞中的凋亡细胞和坏死细胞数目及核分裂指数(nuclear division index, NDI)。NDI=(M₁+2M₂+3M₃+4M₄)/N,其中M₁~M₄分别代表具有1个至4个核的细胞数目,N为计数的活细胞总数。

1.4 统计学分析

调查问卷数据采用EpiData 3.1软件录入,实验部分数据采用Excel 2010录入,并由专业人员进行逻

辑检错。使用SPSS 15.0统计软件包进行数据分析。低、中、高农药暴露组之间均衡性检验采用 χ^2 检验和Fisher确切概率法。实验中微核、核质桥数和核芽数、凋亡细胞和坏死细胞数目及核分裂指数属于正态分布,各组比较用方差分析;各组间两两比较应用Dunnett-*t*检验。检验水准取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 农药暴露分组

农药暴露强度最低为4.33分,最高为92.75分,平均分为27.17±15.38。按百分位数33%(14.83),67%(32.27),将农药暴露组按暴露水平分为低、中、高暴露3个组,例数分别为175、181、212。

3个农药暴露组及1个对照组在年龄、家庭总人口数、文化程度、长期服药史、家族病史、抽烟、喝酒等方面差异均无统计学意义(χ^2 检验和Fisher确切概

率法, $P>0.05$), 表明4个组之间均具有可比性。

2.2 温室农药暴露对细胞基因组不稳定性的影响

用胞质分裂阻滞法微核细胞组学试验检测温室作业人员外周血淋巴细胞的基因组不稳定性, 发现随农药暴露水平的增加, 微核率、核质桥和核芽发生率均有增加趋势(均 $P<0.01$)。与对照组比较, 中、高暴露组各指标差异皆具有统计学意义($P<0.05$), 见表2。

表2 温室农药暴露对菜农外周血淋巴细胞基因组不稳定性的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	微核细胞率 (%)	微核率 (%)	核质桥 (%)	核芽 (%)
对照组	156	2.75 ± 1.81 ^a	3.72 ± 1.89 ^a	1.96 ± 1.15 ^a	2.71 ± 0.99 ^a
低暴露组	175	3.25 ± 1.57 ^b	4.00 ± 1.93 ^a	3.91 ± 1.11 ^b	3.63 ± 1.06 ^b
中暴露组	181	3.82 ± 1.21 ^c	5.75 ± 1.87 ^b	6.50 ± 1.33 ^c	6.32 ± 1.14 ^c
高暴露组	212	4.07 ± 1.35 ^c	6.36 ± 1.65 ^c	8.75 ± 1.27 ^d	6.43 ± 1.19 ^c
<i>F</i>		28.12	91.90	1071.99	515.71
<i>P</i>		$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$

[注]表中纵列a、b、c、d不同字母标识的数据之间具有统计学差异($P<0.05$)。

2.3 温室农药暴露的细胞毒性作用

用胞质分裂阻滞法微核细胞组学试验检测温室农药暴露的细胞毒性, 发现随农药暴露水平的增加, 双核细胞率和核分裂指数具有降低趋势, 细胞坏死率则有增高趋势。而凋亡细胞则未发现明显的变化趋势(均 $P<0.01$)。与对照组比较, 中、高暴露组各指标差异皆具有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 温室农药暴露对菜农外周血淋巴细胞的细胞毒性($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	双核细胞(%)	核分裂指数	凋亡细胞(%)	坏死细胞(%)
对照组	156	81.75 ± 11.69 ^a	2.18 ± 1.34 ^a	3.25 ± 1.53 ^a	2.87 ± 1.96 ^a
低暴露组	175	77.75 ± 18.38 ^b	1.88 ± 1.21 ^b	4.53 ± 1.32 ^b	4.79 ± 1.83 ^b
中暴露组	181	75.98 ± 13.34 ^b	1.75 ± 1.10 ^b	4.32 ± 1.75 ^b	6.62 ± 2.05 ^c
高暴露组	212	75.46 ± 16.61 ^b	1.52 ± 1.03 ^c	4.58 ± 1.16 ^b	9.30 ± 2.19 ^d
<i>F</i>		5.82	10.02	30.84	337.65
<i>P</i>		$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$

[注]表中纵列a、b、c、d不同字母标识的数据之间具有统计学差异($P<0.05$)。

3 讨论

相对于农药急性中毒和内分泌毒性的防治研究, 农药致遗传损伤属长期持续暴露, 危害性更大。有资料表明^[2], 农药暴露与非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、软组织肉瘤、肺癌、胰腺癌、胃癌、肝癌、膀胱癌、胆囊癌、帕金森病、阿尔茨海默病和生殖异常结局等有密切关联。因此, 开展对农药生产和使用者的遗传

毒性监测是一个至关重要的命题。

基因组不稳定性是肿瘤发生发展过程中的重要环节。微核是基因组不稳定性的标志物之一, 通常被认为是染色体断裂和丢失的标志。本研究结果发现, 农药中、高暴露组微核率显著高于对照组。而Pastor等^[7]对欧洲4国温室作业农药暴露人员的研究, 并未发现农药暴露组与对照组微核率有显著差异, 原因可能在于温室作业人员的农药暴露种类、农药暴露方式或年龄存在差异。核质桥和核芽来源于双着丝粒和着丝粒环染色体, 是测量染色体断裂重组/基因扩增的有效方法^[6]。国内学者对这一指标的应用还很有限^[8]。本研究结果发现, 温室作业人员农药暴露组核质桥和核芽显著高于对照组。

胞质分裂阻滞法微核细胞组学试验是很好的细胞毒性检测工具。核分裂指数和双核细胞率是研究受试细胞有丝分裂反应和毒物抑制细胞分裂增殖效应中非常重要的参数^[6]。本研究结果发现, 农药中、高暴露组双核细胞率和NDI较对照组显著降低并且随农药暴露水平的增高呈现降低趋势, 表明温室农药暴露具有抑制细胞增殖作用。这一结果同Pastor等^[7]的研究结果基本一致。随农药暴露水平的增加, 细胞坏死率有增高趋势, 而凋亡细胞则未发现明显的变化趋势, 但两者较对照组皆具有显著性差异, 原因可能是农药高剂量暴露后干扰细胞进入凋亡途径, 抑制细胞的凋亡, 同时使细胞急性坏死率增加^[9]。

综上所述, 温室作业农药长期高暴露可以诱使菜农产生基因组不稳定性, 并具有较强的细胞毒性。因此, 一方面有必要指导温室作业人员正确使用农药, 减少农药暴露, 另一方面做好目标人群的遗传毒性效应监测工作, 并提供行之有效的健康监护措施。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

[1] 邢杰, 赵键, 孙毅莹, 等. 温室作业人群长期农药暴露相关生物学标志物研究[J]. 环境与健康杂志, 2014, 31(8): 710-712.

[2] Weichenthal S, Moase C, Chan P. A review of pesticide exposure and cancer incidence in the agricultural health study cohort[J]. Cien Saude Colet, 2012, 17(1): 255-270.

[3] 漆骏. 大棚花卉种植业者农药暴露与健康状况的研究[D]. 昆明: 昆明医学院, 2007.

[4] Dosemeci M, Alavanja MC, Rowland AS, et al. A quantitative (下转第1057页)

前监测单位量较少(如候车室覆盖率仅40%),建议扩大日常监测范围、频次,对合格率低场所(如昆山南站、普通列车)可增加监测频次,建议将PM_{2.5}、甲醛等纳入日常监测。此外,应探索建立适宜铁路卫生质量指标体系。现有日常监测指标单一,建议探索建立铁路综合评价指标(如热舒适度、列车负离子浓度、气味、列车空气品质新型评价方法^[3]等),以全面评价卫生质量。

铁路部门照明设备配备较充足,尤其是新型客运站,由于上海铁路局节能环保要求,许多照明设备未启用,造成照度较低,而部分旅客列车存在照明设备老化现象。所有车站和旅客列车都未开展集中空调清洗、消毒、监测,与要求不符。集中空调卫生状况并不理想,如深圳某区检测结果送风中细菌总数合格率仅64%^[4],而旅客列车由于结构问题,对集中空调进行监测存在一定困难,今后新车型设计应将此纳入考虑。另可通过普及环保建筑材料,绿化候车大厅,试点集中空调内部装置净化系统,及时更换年久空调系统等措施可提高空气质量。部分车站和列车尚无专职卫生管理人员,培训制度缺失,可尝试将卫生质量考核奖惩纳入日常工作。建议实施旅客列车许可证备案制。建议列车全面禁烟,全封闭车厢增开通风窗口,

减少站票出售,减少超员,减少列车地毯,探索空气净化装置(如紫外C空气消毒器^[5]等),开展相关课题研究提高列车空气质量。建议铁路总公司按国家要求出台文件支持集中空调卫生监测,铁路公共场所禁烟应明确主体地位(有执法权)。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] 杨克敌, 郑玉建. 环境卫生学[M]. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 85-303.
- [2] 尹先仁, 秦珏慧. 环境卫生国家标准应用手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 2000: 9-11.
- [3] 王方, 陈雪影. 紫外C空气消毒器对25K型旅客列车空气消毒效果观察[J]. 铁道劳动安全卫生与环保, 2004, 31(4): 195-196.
- [4] 严燕, 姜立民, 严宙宇, 等. 深圳深圳市某区公共场所集中空调通风系统卫生现况调查[J]. 环境与职业医学, 2012, 29(5): 315-317.
- [5] 屈睿瑰. 列车空气品质与净化装置研究[J]. 广西轻工业, 2008, 11(1): 79-85.

(收稿日期: 2014-12-26)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 葛宏妍)

(上接第1053页)

approach for estimating exposure to pesticides in the Agricultural Health Study[J]. Ann Occup Hyg, 2002, 46(2): 245-260.

- [5] 刘建文, 高祥春, 邢杰, 等. 温室土壤有机提取物遗传毒性研究[J]. 环境与职业医学, 2012, 29(11): 684-685.
- [6] Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay[J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1084-1104.
- [7] Pastor S, Creus A, Parron T, et al. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers[J]. Mutagenesis, 2003, 18

(3): 249-258.

- [8] Zhai Q, Duan H, Wang Y, et al. Genetic damage induced by organic extract of coke oven emissions on human bronchial epithelial cells[J]. Toxicol In Vitro, 2012, 26(5): 752-758.
- [9] Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012[J]. Cell Death Differ, 2012, 19(1): 107-120.

(收稿日期: 2015-01-16)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 汪源; 校对: 张晶)