

1, 3-丁二烯作业工人的 DNA 修复能力

刘楠¹, 李斌², 程娟², 李云¹, 郑国颖¹, 关维俊¹

摘要: [目的] 探讨 DNA 修复能力与 1, 3-丁二烯(BD)职业暴露致外周血淋巴细胞遗传学损伤的关联性。[方法] 收集个人职业史、年龄、性别、吸烟和饮酒状况等信息, 气相色谱法检测作业环境的 BD 浓度, 利用染色体断裂试验评价 60 名职业 BD 暴露工人和 60 名非暴露工人的外周血淋巴细胞对诱变剂博来霉素所致 DNA 损伤的修复能力。[结果] 作业区空气中 BD 浓度为 $1.80(0.59\sim 2.76)\text{mg}/\text{m}^3$ 。职业 BD 暴露组染色体断裂率 [$(1.06\pm 0.41)\%$] 高于对照组 [$(0.85\pm 0.36)\%$, $P<0.01$]。职业 BD 暴露人群中饮酒者的 b/c 值高于不饮酒者 ($P<0.05$)。[结论] DNA 修复能力的下降可能是 BD 致癌过程中的重要生物学事件。

关键词: 1, 3-丁二烯; 染色体断裂试验; DNA 修复能力; 博来霉素; 职业暴露

DNA Repair Capacity of Workers Exposed to 1, 3-Butadiene LIU Nan¹, LI Bin², CHENG Juan², LI Yun¹, ZHENG Guo-ying¹, GUAN Wei-jun¹ (1.Laboratory of Occupational Health and Safety of Coal Industry/School of Public Health, Hebei United University, Hebei 063000, China; 2.National Institute of Occupational Health and Poison Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100500, China) · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore the relationship between DNA repair capacity (DRC) and chromosomal damage induced by 1, 3-butadiene (BD). [Methods] Personal information including occupational history, age, gender, smoking, and drinking status was collected using questionnaires. Gas chromatography was used to detect the BD level in the selected working environment. DRC in peripheral blood lymphocytes among 60 BD-exposed workers and 60 non-exposed controls was measured by the repair rate of bleomycin-induced DNA damage using chromatid breakage assay. [Results] The average concentration of BD in the working environment was $1.80(0.59\sim 2.76)\text{mg}/\text{m}^3$. The chromatid break rates (break event per cell, b/c) were higher in the BD-exposed workers than those in the controls [$(1.06\pm 0.41)\%$ vs. $(0.85\pm 0.36)\%$, $P<0.01$]. The b/c of alcohol drinkers in the BD-exposed workers was higher than that of non-drinkers. [Conclusion] Decreased DRC may be an important biological event in BD carcinogenesis.

Key Words: 1, 3-butadien; chromatid breakage assay; DNA repair capacity; bleomycin; occupational exposure

机体遗传信息的可靠性和完整性是由多种酶促 DNA 修复过程来维护的。环境致癌物质的暴露以及个体对致癌因素的易感性都是癌症发生的重要危险因素, 其中一个重要的个体因素就是 DNA 修复能力(DNA repair capacity, DRC)。DNA 修复是机体的一个防御机制, DRC 的强弱则是维持基因组稳定性和细胞正常功能的中心环节。以往研究表明 DNA 修复能力与肿瘤关系密切, DRC 具有预测肿瘤危险性的潜在趋势^[1-2]。1, 3-丁二烯(1, 3-butadiene, BD)及其环氧化代谢产物可造成各种 DNA 损伤, 而机体具有完善的 DNA 修复系统, 能一定限度地识别并修复各种 DNA 损伤, 从而维持细胞基因组的稳定

性。如果这些 DNA 损伤被 DNA 修复系统及时修复, 就不会产生不良后果; 如果这些 DNA 损伤不能被完全修复, 则会形成基因突变或染色体畸变。分子流行病学研究已经证实, 个体之间 DNA 修复能力的差异与罹患肿瘤的危险性, 特别是与环境因素有关的肿瘤(如皮肤癌、肺癌、头颈部肿瘤等)的危险性显著相关^[3-4]。因此, DRC 的测定在肿瘤分子流行病学调查中十分重要。本研究拟用博来霉素(bleomycin, BLM)作为诱变剂, 利用染色体断裂试验检测职业 BD 暴露人群及对照人群的 DRC, 以探讨 DNA 损伤修复在 BD 遗传毒效应中的作用, 从而为寻找 BD 作业工人 DNA 损伤与修复生物标志提供参考依据。

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2014.0206

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(编号: 30471471); 唐山市科技支撑计划项目(编号: 13130297z)

[作者简介] 刘楠(1982—), 女, 硕士, 助理研究员; 研究方向: 劳动卫生与职业病; E-mail: liunantsh@163.com

[作者单位] 1. 河北联合大学公共卫生学院/河北省煤矿卫生与安全重点实验室, 河北 063000; 2. 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100500

1 对象与方法

1.1 对象

本研究对象为 120 名中国北方汉族人, 其中暴露组来源于某大型石化企业的 60 名暴露于 BD 1 年以上的作业工人, 对照组由 60 名事业单位的行政人员组成。研究对象的剔除条件: 包括最近接触过致突变因素(如 X 线检查)、患有慢性病(如自身免疫性疾病)和最近有过急性感染史并需要使用抗生素治疗

的人员。

1.2 问卷调查

采用自编统一的调查表,经患者知情同意后,由调查员对研究对象进行面对面问卷调查,收集所有参加者的人口学资料、吸烟和饮酒史、职业暴露史和个体既往健康/疾病史。

1.3 仪器与试剂

主要仪器:37℃隔水式恒温培养箱(上海恒准仪器科技有限公司),Rotofix 32型显微镜(德国Hettich公司),MIKRO 20型台式离心机(博威兴业科技发展有限公司),HP5890气相色谱仪(上海精密科学仪器有限公司),Nikon荧光显微镜(上海长方光学仪器有限公司),DYY-6B型稳压稳流电泳仪(杭州雷琪实验器材有限公司)。

主要试剂:含植物血球凝集素的RPMI 1640培养基、胎牛血清均购自Hyclon公司,台盼蓝、博莱霉素、秋水仙素、二甲基亚砷(DMSO,细胞培养级)、青霉素-链霉素-谷氨酰胺、植物血球凝集素-M均购自美国Sigma公司,吉姆萨染液(协和基础所遗传室),淋巴细胞分离液(华美公司)。

1.4 样品采集

采集研究对象空腹静脉血6mL,置于含0.3mL肝素钠抗凝剂的真空抗凝管中,混匀备用,于当日分离淋巴细胞。

1.5 方法

1.5.1 淋巴细胞的分离与冻存 将5mL 1640培养基加入离心管中,肝素抗凝血5.5mL加入上述离心管中,轻轻混匀,5mL淋巴细胞分离液加入另一离心管中,将混匀的血液缓缓(沿管壁)加入淋巴细胞分离液面上,以1200 r/min离心(离心半径为16.7 cm)30 min,10mL 1640培养基加入新离心管中,吸弃上清,白细胞层吸入上述离心管中,以1000 r/min离心(离心半径为16.7 cm)10 min,弃上清,必要时再洗一次。每管加入冻存液3~4mL,枪头轻柔吹散,分装于两个冻存管中,4℃20~30 min,-20℃20 min,-80℃过夜,液氮储存。

1.5.2 BLM诱变剂敏感性试验^[5] 从液氮中取出冻存管迅速放入37℃水浴复苏,放入离心管中,加入9mL培养基,以1300 r/min离心(离心半径为16.7 cm)10 min。用4%的台盼蓝染液计数细胞存活率(1×10^6 /mL)。吸去上清液,分装两份,取名为1号和2号,各加入含植物血球凝集素的血液培养基,1号培养基作为平行本底。培养67h后,将终浓度为3 U/L的BLM加到2号培养基中。71h后,将秋水仙素(终浓度为0.06 μg/mL)分别加入到1号和2号培养基中。72h后将两瓶培养液分别转入15mL的离心管中,用5mL磷酸盐缓冲液冲洗培养瓶后再倒入离心管中。以1300 r/min离心(离心半径为16.7 cm)10 min。吸去上清液,加入8mL 0.1 mol/L的KCl,用吸管轻轻混匀细胞三次,室温放置18 min。18 min后快速加入1.5 mL固定液(3:1甲醇和冰醋酸),轻混三次。以1300 r/min离心(离心半径为16.7 cm)10 min。吸去上清液,用吸管轻轻混匀细胞五次,加入10mL固定液。加入固定液混匀后,放入4℃冰箱过夜。从冰箱取出固定的淋巴细胞悬浮液,室温放置30 min以上。以1300 r/min离心(离心半径为16.7 cm)10 min。吸去上清液,加入适量固定液,用吸管轻轻混匀细胞五次。在冰片上缓

慢地滴20 μL细胞悬浮液,自然晾干,每个样本制作两份,包括本底和BLM诱变。用5%吉姆萨染液(pH=6.8)染色5 min,于10×100倍油镜下,计数50个细胞分裂中期相染色体断裂的数目,即每个样本读100个。计算平均每细胞染色体断裂率(chromatid breaks per cell, b/c值),以断裂率(b/c)为统计指标。 $b/c = (\text{BLM诱变组中所有染色体断裂的总和} - \text{本底中染色体断裂的总和}) / \text{所有观察的细胞总数}(50)$ 。

1.5.3 分裂相的选择标准 阅片时分析符合以下特征的中期分裂相:①细胞完整,即显微镜下可见淡淡的细胞轮廓,并且染色体分布呈圆形;②染色体来自同一细胞,即各条染色体染色深浅、形态特征基本一致;③染色体数目 ≥ 40 ;④染色体之间无过多重叠和交叉,如有少许重叠或交叉,能够清楚区分每一条染色体;⑤染色体粗细、长短适中,边缘不毛糙。

1.5.4 染色体断裂的判断标准 ①染色单体断裂:一条染色单体出现不连续的两段,分开的两段染色单体不在一条直线(或一条平滑的曲线)上(即未染色区域两端的染色单体明显不对准);②染色体断裂:两条染色单体对应的位置均出现不连续的两段,分开的两条染色体不在一条直线(或一条平滑的曲线)上(即不连续的两段染色体明显不对准)。

1.6 BD空气监测

对职业BD暴露作业场所空气中的BD浓度进行短时间(15 min)接触容许浓度(STEL)监测,根据GBZ/T 160.39—2004《中华人民共和国国家职业卫生标准》,采用直接进样法,使用HP5890气相色谱仪对样品进行检测。

1.7 质量控制

血样在采集后立即编号,BLM诱变试验在制片和读片时均严格盲法操作。

1.8 统计学分析

使用K-S检验考察数据是否符合正态分布。b/c值在两组研究人群中均符合正态分布。使用Student's *t*检验比较吸烟者和非吸烟者、不同性别和不同饮酒状况工人染色体b/c值的差异;使用方差分析比较不同工种、作业工龄和年龄工人染色体b/c值的差异,两两比较时采用Bonferroni法校正。本研究染色体b/c值按表达惯例,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学检验为双侧,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

分析结果显示,两组调查对象在年龄、吸烟、饮酒、作业工龄方面无明显差异(表1)。作业区空气中BD浓度为1.8(0.59~2.76)mg/m³。

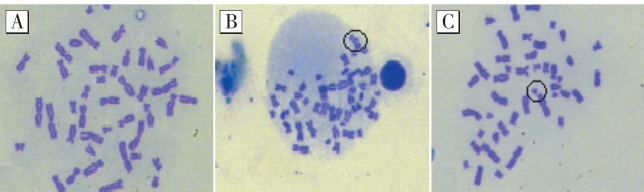
表1 研究对象一般情况

组别	年龄(岁)	性别		吸烟		饮酒		工龄(年)
		男	女	是	否	是	否	
对照组(<i>n</i> =60)	36.1±1.0	60	0	30	30	41	19	16.6±1.1
BD暴露组(<i>n</i> =60)	35.8±0.9	44	16	36	24	46	14	15.0±1.0
统计量值	0.24	18.46		1.21		1.05		1.11
<i>P</i>	0.81 ^a	<0.01 ^b		0.18 ^b		0.21 ^b		0.27 ^a

[注]a: Student's *t*检验; b: χ^2 检验。

2.2 职业 BD 暴露工人和非暴露人群的 b/c 值

两组人群外周血淋巴细胞染色体断裂情况见图 1。



[注]A: 对照组正常人外周血淋巴细胞染色体; B: 暴露组人外周血淋巴细胞染色单体断裂; C: 暴露组人外周血淋巴细胞染色体断裂。

图 1 对照组与 BD 暴露组人外周血淋巴细胞染色体损伤状况

使用 K-S 检验考察数据 b/c 值在暴露组 and 对照组中均呈正态分布。暴露组和对照组 b/c 值的变化范围分别为 0.36~2.54 和 0.12~2.18, 使用协方差分析, 校正年龄/工龄、性别、吸烟、饮酒等因素对 b/c 值的影响后, 职业 BD 暴露组 b/c 值与对照组 b/c 值之间的差异有统计学意义[(1.06 ± 0.41)% vs. (0.85 ± 0.36)%, *P*=0.017]。

2.3 年龄、作业工龄、性别、吸烟和饮酒对 b/c 值的影响

职业 BD 暴露人群中饮酒者的 b/c 值高于不饮酒者 (*P* < 0.05)。未发现年龄、作业工龄、性别、吸烟会引起 b/c 值的变化 (表 2)。

表 2 年龄、作业工龄、性别、吸烟和饮酒对 b/c 值的影响 ($\bar{x} \pm s$)						
变量	对照组			BD 暴露组		
	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>P</i> ^a	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>P</i> ^a
年龄						
<35	23	0.95 ± 0.35	—	23	0.99 ± 0.38	—
35~40	16	0.72 ± 0.34	0.10	23	1.04 ± 0.35	0.75
40~	21	0.84 ± 0.38	0.45	14	1.18 ± 0.53	0.17
工龄						
1~	24	0.93 ± 0.36	—	20	1.00 ± 0.35	—
14~	5	0.90 ± 0.45	0.97	25	1.05 ± 0.37	0.38
20~	31	0.78 ± 0.35	0.66	15	1.14 ± 0.54	0.42
性别						
女	0	—	—	16	1.09 ± 0.37	—
男	60	0.85 ± 0.36	0.28	44	1.04 ± 0.43	0.13
吸烟						
否	30	0.83 ± 0.39	—	36	1.01 ± 0.36	—
是	30	0.86 ± 0.34	0.67	24	1.12 ± 0.48	0.69
饮酒						
否	41	0.89 ± 0.35	—	46	0.99 ± 0.36	—
是	19	0.75 ± 0.38	0.20	14	1.26 ± 0.50	0.04

[注]a: 协方差分析。

3 讨论

BLM 是一种拟辐射剂, 它可通过与铁离子及分子氧结合, 使 DNA 松弛甚至发生超螺旋的逆转, 释放自由基, 引发 DNA 氧化性损伤、单链和双链断裂^[6]。本研究使用 BLM 作为诱变剂, 主要目的是反映个体碱基切除修复、DNA 双链断裂修复通路的修复能力^[7-8]。

BD 及其环氧化物代谢产物除与 DNA 共价结合形成稳定的大

分子 DNA 加合物外, 在代谢过程中可形成大量的反应活性氧, 作用于机体的遗传物质, 形成类似 DNA 链断裂和氧化性碱基的 DNA 损伤。由于 BD 造成的氧化性碱基损伤可在碱基切除修复过程中转变为 DNA 单链断裂, 如果 DNA 双链的一条链存在单链断裂, 另一条链邻近位置存在碱基损伤, 或者均存在碱基损伤, 在碱基切除修复过程中可形成双链 DNA 断裂^[9]。因此, 如果个体 BD 暴露水平很高和 (或) DNA 单链断裂修复能力降低, BD 及其环氧化物氧化性损伤的积累也可间接造成 DNA 双链断裂。近来研究还发现, 存在于复制叉附近的 DNA 单链断裂或其他类型的 DNA 损伤也可造成双链 DNA 损伤^[10]。因此, 尽管 BD 及其环氧化物造成直接的双链 DNA 断裂的能力较低, 但当个体 BD 暴露水平很高或者 DNA 单链断裂修复能力降低时, BD 及其环氧化物可通过氧化性 DNA 损伤途径间接地造成双链 DNA 断裂, 即染色体断裂。因此, 以 BLM 作为诱变剂诱导细胞染色体断裂作为 DRC 标记的方法是适用于 BD 作业工人的。

本研究首次在细胞染色体水平上测定了研究对象的 DNA 修复能力, 染色体断裂数代表不同个体的细胞接受相同剂量的 BLM 刺激和经过相同时间的修复后所剩余的 DNA 损伤, 间接反映了 DNA 修复能力; b/c 值代表不同个体的细胞接受相同剂量的 BLM 刺激和经过相同时间的修复后所剩余的 DNA 损伤的比率, 染色体断裂数或 b/c 值越高, 则说明个体的 DNA 修复能力越差。

本研究结果表明, 现有 BD 外暴露水平下, 职业 BD 暴露组 b/c 值高于对照组[(1.06 ± 0.41)% vs. (0.85 ± 0.36)%, *P* < 0.01], 即暴露组 DRC 水平低于对照组, 说明 BD 暴露不仅能导致作业工人外周血淋巴细胞遗传物质的损伤, 还能增加细胞对 BLM 损伤的敏感程度, 降低细胞对于 BLM 导致损伤的修复能力。BD 及其环氧化物致机体 DRC 降低的机理尚需进一步探讨。推测可能是由于 BD 作业工人长期接触 BD, 其 DNA 修复基因表达水平及蛋白活性受到抑制, 或者由于体内 DNA 损伤水平较高, 机体一直处于不断的修复高水平 DNA 损伤的紧张状态中所致。

尽管 BD 在香烟烟雾中普遍存在, 并且曾检测到一支香烟产生的烟雾中 BD 含量可达到 0.4 mg^[11], 但本研究并未发现吸烟与 b/c 值间存在关联, SORMA 等^[12]在对职业 BD 暴露工人的研究中也只是发现吸烟仅对微核率有轻微影响, 可能这与烟雾中的 BD 浓度过低对染色体造成的损伤不能被 BLM 诱导的染色体断裂试验检出有关, 但我们发现饮酒会对 b/c 值产生影响, 可能在我们所选职业 BD 暴露人群中饮酒对 b/c 值的影响较之吸烟更易引起变化。

本研究是首次开展的关于 BD 作业工人 DRC 的研究, 其结果还需在更大样本的研究中加以验证。除此之外, DNA 损伤修复通路基因多态性与 DRC 关系的探讨以及细胞碱基切除修复及 DNA 双链断裂修复通路的修复能力还有待进一步探讨。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

[1] PALIWAL S, KANAGARAJ R, STURZENEGGER A, et al. Human RECQ5 helicase promotes repair of DNA double-strand breaks by (下转第 857 页)

作业工人没有佩戴呼吸系统防护用品,或仅佩戴简单的纱布口罩,工人个人防护意识不高。可见,现有铬及其化合物的采样、检测、评价标准已经不能完全匹配和满足当前保护铬作业工人健康的需要。为更大程度地保护车间里一线工人的身体健康,有必要对现有标准进行探究,以获取更有效的采样、检测技术,以及更合理的接触限值。当前,除了提高铬及其化合物的检测能力外,企业也应本着合理、可行、尽量低的原则,采取有力措施尽可能降低环境中铬的浓度;在此基础上,还应提高作业工人的自我防护意识和做好个人防护措施,定期进行职业健康检查,做到早发现、早诊断、早治疗。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] 赵翔. 作业场所铬暴露劳动者尿铬排除情形探讨[J]. 现代预防医学, 2007, 34(3): 504-508.
- [2] 金泰虞. 职业卫生与职业医学[M]. 6版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 94.
- [3] 张旭慧, 张轩, 杨章萍, 等. 25 家电镀企业中铬污染现状和作业者接触情况[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2012, 30(8): 584-586.
- [4] 陈立新. 二家电镀厂作业工人鼻中隔损害调查[D]. 杭州: 浙江大

学医学院, 2010.

- [5] 方积乾. 卫生统计学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 108-126.
- [6] 何家洪, 高志强, 蒋欢, 等. 分光光度法测定铬(VI)的研究进展[J]. 冶金分析, 2008, 28(8): 52-59.
- [7] 尤铁学, 王楠. 二苯碳酰二肼分光光度法测定水中铬(VI)的改进[J]. 冶金分析, 2006, 26(6): 84-85.
- [8] 王琪, 晋丽丽. 二苯碳酰二肼光度法测定水中六价铬方法的改进[J]. 化工环保, 2004, 24(z1): 389-390.
- [9] 林韶玉, 高文华, 刘晓暄, 等. 吡咯红 Y-过氧化氢-铬(VI)体系催化荧光法测定痕量铬(VI)[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(1): 113-115.
- [10] 刘素香. 低浓度铬对作业工人鼻部损害的调查[J]. 职业卫生与应急救援, 2004, 22(3): 151.
- [11] 周珍, 王卫, 孟敏华, 等. 职业性鼻铬病 37 例临床分析[J]. 临床耳鼻喉头颈外科杂志, 2010, 24(8): 373.
- [12] 傅红, 袁伟明, 陈立新, 等. 某市电镀行业铬作业工人鼻部损害的调查[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2009, 27(3): 154-155.

(收稿日期: 2014-01-14)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 何蓉; 校对: 葛宏妍)

(上接第 854 页)

- synthesis-dependent strand annealing[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(4): 2380-2390.
- [2] CHEN X, ZHAO Y, LI G M, et al. Proteomic analysis of mismatch repair-mediated alkylating agent-induced DNA damage response[J]. Cell Biosci, 2013, 3(1): 37.
- [3] ASSIS J, PEREIRA D, MEDEIROS R. Ovarian cancer and DNA repair: DNA ligase IV as a potential key[J]. World J Clin Oncol, 2013, 4(1): 14-24.
- [4] BERWICK M, VINEIS P. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(11): 874-897.
- [5] CLOOS J, NIEUWENHUIS E J, BOOMSMA D I, et al. Inherited susceptibility to bleomycin-induced chromatid breaks in cultured peripheral blood lymphocytes[J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91(13): 1125-1130.
- [6] LIM S T, JUE C K, MOORE C W, et al. Oxidative cell wall damage mediated by bleomycin-Fe(II) in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Bacteriol, 1995, 177(12): 3534-3539.
- [7] ROSE J L, REEVES K C, LIKHOTVORIK R I, et al. Base excision repair proteins are required for integrin-mediated suppression of

bleomycin-induced DNA breakage in murine lung endothelial cells[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 321(1): 318-326.

- [8] OKUDELA K, ITO T, MITSUI H, et al. The role of p53 in bleomycin-induced DNA damage in the lung. A comparative study with the small intestine[J]. Am J Pathol, 1999, 155(4): 1341-1351.
- [9] HARRISON L, HATAHET Z, PURMAL A A, et al. Multiply damaged sites in DNA: interactions with *Escherichia coli* endonucleases III and VIII[J]. Nucleic Acids Res., 1998, 26(4): 932-941.
- [10] HAWKINS A J, GOLDING S E, KHALIL A, et al. DNA double-strand break-induced pro-survival signaling[J]. Radiother Oncol, 2011, 101(1): 13-17.
- [11] FLORESCU A, FERRENCE R, EINARSON T, et al. Methods for quantification of exposure to cigarette smoking and environmental tobacco smoke: focus on developmental toxicology[J]. Ther Drug Monit, 2009, 31(1): 14-30.
- [12] SORSA M, AUTIO K, DEMOPOULOS N A. Human cytogenetic biomonitoring of occupational exposure to 1, 3-butadiene[J]. Mutat Res, 1994, 309(2): 321-326.

(收稿日期: 2014-06-03)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 徐新春)