

## 甲基叔丁基醚及其代谢物叔丁醇对人外周血淋巴细胞彗星尾矩的影响

胡大林<sup>1</sup>, 彭晓春<sup>2</sup>, 彭晓武<sup>2</sup>, 唐焕文<sup>3</sup>, 刘云岗<sup>1</sup>, 卫秦芝<sup>1</sup>, 张文娟<sup>1</sup>,  
袁建辉<sup>4</sup>, 杨建平<sup>5</sup>, 沙焱<sup>6</sup>, 方道奎<sup>4</sup>, 庄志雄<sup>4,7</sup>

**摘要:** [目的] 探讨血清中汽油添加剂甲基叔丁基醚(MTBE)及其代谢产物叔丁醇(TBA)对人外周血淋巴细胞彗星尾矩的影响。[方法] 以华南地区8家加油站作为研究现场,共抽取加油站从业人员100名作为研究对象进行流行病学横断面调查,各采集外周静脉血样5mL,分离出血清和淋巴细胞;运用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术测定血清中MTBE及其代谢产物TBA含量( $\mu\text{g}/\text{L}$ );运用彗星试验分析样本人群外周血淋巴细胞DNA彗星Olive尾矩。采用单因素和多因素非条件logistic回归分析方法,探讨样本人群外周血淋巴细胞DNA彗星Olive尾矩的主要影响因素。[结果] 单因素logistic回归分析显示,血清MTBE含量( $\mu\text{g}/\text{L}$ )、血清TBA含量( $\mu\text{g}/\text{L}$ )、工种、饮酒情况、烟龄、平均每天吸烟支数及吸烟指数等7因素对外周血淋巴细胞DNA彗星Olive尾矩的影响具有统计学意义( $P<0.05$ );多因素logistic回归分析结果显示,血清MTBE和工种2因素最终引入回归方程,其OR值(95%CI)分别为4.155(2.279~7.577)和6.949(1.305~36.990),二者P值<0.05。[结论] MTBE暴露对人外周血淋巴细胞DNA彗星尾矩影响明显,可能具有遗传毒性。

**关键词:** 甲基叔丁基醚; 叔丁醇; 遗传毒性; DNA损伤; logistic回归分析

**Effects of Serum Methyl Tert-Butyl Ether and Related Metabolite Tert-Butyl Alcohol on Olive Tail Moment of Lymphocytes in Peripheral Blood** HU Da-lin<sup>1</sup>, PENG Xiao-chun<sup>2</sup>, PENG Xiao-wu<sup>2</sup>, TANG Huan-wen<sup>3</sup>, LIU Yun-gang<sup>1</sup>, WEI Qin-zhi<sup>1</sup>, ZHANG Wen-juan<sup>1</sup>, YUAN Jian-hui<sup>4</sup>, YANG Jian-ping<sup>5</sup>, SHA Yan<sup>6</sup>, FANG Dao-kui<sup>4</sup>, ZHUANG Zhi-xiong<sup>4,7</sup> (1. Department of Toxicology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangdong 510515, China; 2. Department of Environment and Health, South China Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Guangdong 510655, China; 3. Environment and Health Institute, School of Public Health, Guangdong Medical College, Guangdong 523808, China; 4. Department of Toxicology, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Guangdong 518055, China; 5. Department of Occupational Health, Baoan District Center for Disease Control and Prevention of Shenzhen, Guangdong 518101, China; 6. Department of Occupational Health, Shenzhen Prevention and Treatment Centre for Occupational Diseases, Guangdong 518001, China; 7. Department of Preventive Medicine, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangdong 510080, China). Address correspondence to ZHUANG Zhi-xiong, E-mail: zxzhuang@szcdc.net • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

**Abstract:** [Objective] To evaluate the effects of methyl tert-butyl ether (MTBE) and its metabolite tert-butyl alcohol (TBA) on comet tail moment of lymphocytes in human peripheral blood. [Methods] Employees ( $n=100$ ) from eight gas stations were enrolled in an epidemiological cross-sectional study. Serum and lymphocytes were isolated from the peripheral venous blood sample (5 mL) of each subject, and analyzed for the content of serum MTBE and TBA using gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) and the Olive tail moment (OTM) of lymphocytes by comet assay. Univariate and multivariate non-conditional logistic regression analyses were used to evaluate the effects of MTBE and TBA on OTM of human lymphocytes. [Results] The results of univariate logistic regression analysis showed that the contents of MTBE and TBA in serum, type of work, drinking, smoking, average number of cigarettes smoked per day, and smoking index, were associated with the OTM of lymphocytes ( $P<0.05$ ). The results of multivariate non-conditional logistic regression analysis showed that serum MTBE content and type of work were associated with the OTM of lymphocytes, and the values of odds ratio (OR) were 4.155 (95%CI: 2.279-7.577) and 6.949 (1.305-36.990), respectively.

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2014.0053

[基金项目] 国家环保部公益性行业科研专项基金项目(编号: 201009008)

[作者简介] 胡大林(1971—),男,博士,教授;研究方向:生化与分子毒理学;E-mail: smuhdl@126.com

[通信作者] 庄志雄, E-mail: zxzhuang@szcdc.net

[作者单位] 1. 南方医科大学公共卫生与热带医学学院毒理学系, 广东 510515; 2. 环保部华南环境科学研究所环境与健康室, 广东 510655; 3. 广东医学院公共卫生学院环境与健康研究所, 广东 523808; 4. 深圳市疾病预防控制中心毒理室, 广东 518055; 5. 深圳市宝安区疾病预防控制中心职业卫生科, 广东 518101; 6. 深圳市职业病防治院职业卫生科, 广东 518001; 7. 中山大学公共卫生学院预防医学系, 广东 510080

(both  $P < 0.05$ )。[Conclusion] MTBE shows an obvious effect on the OTM of human peripheral blood lymphocytes, and may have genetic toxicity to human body.

**Key Words:** methyl tert-butyl ether; tert-butyl alcohol; genetic toxicity; DNA damage; logistic regression analysis

为防止铅的环境污染对人群健康的损害, 我国大陆于1997年开始使用甲基叔丁基醚(methyl tertiary butyl ether, MTBE,  $C_5H_{12}O$ )替代汽油添加剂中的四乙基铅。MTBE在工业上由异丁烯和甲醇化合而成, 为无色透明的液体, 相对分子质量为88, 相对密度0.741, 沸点55℃, 具有较强的水溶性, 其在不同环境介质当中的迁移作用迅速且广泛。蓄油罐泄漏的汽油MTBE可迅速进入环境水体(包括地表水及地下水), 当水中MTBE的含量达40~95 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时, 水质在感观性状上就有比较难闻的气味。MTBE可通过呼吸道、皮肤和消化道进入人体, 体外和动物实验证明, MTBE及其代谢物叔丁醇(tert-butyl alcohol, TBA)可对实验动物产生遗传毒性<sup>[1-2]</sup>。为探讨MTBE及TBA对人体的遗传毒性作用, 本研究拟采用流行病学现况调查的方法及彗星试验, 观察暴露人群血清中MTBE及其代谢物TBA含量对人外周血淋巴细胞彗星Olive尾矩的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

QP2010 plus气相色谱-质谱分析仪(岛津, 日本); SPME手动进样手柄、50/30UM DVB/CAR on PDMS萃取头(Supelco, 美国); 20mL透明玻璃顶空瓶、中空铝盖与硅胶隔垫(CNW Technologies, 德国); 3-CCD彩色图像摄录输入仪(JVC, 日本); Mini-PROTEAN II电泳槽(BIO-RAD, 美国); RCT basic磁力搅拌器(IKA, 德国); IBAS2.0全自动图象分析系统(KONTRON, 德国); 37XAZ型倒置光学显微镜(上海光学仪器厂); GS 15G型低温高速离心机(Beckman, 美国)。

MTBE甲醇标准溶液(2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )(Supelco, 美国); TBA标准水溶液(10 mg/mL)(Accu Standard, 美国); 氯化钠购自国药集团化学试剂有限公司; EZ-Sep人淋巴细胞分离液(中国科大公司)。

### 1.2 人群流行病学调查

选择华南地区的加油站工作人员100名为调查对象, 由疾控中心具有丰富的流行病学调查经验的临床医师和公共卫生医师进行流行病学现况调查。调查表为自制, 共分为4大部分, 调查内容分别为被调查对象的基本情况、吸烟情况、饮酒情况、既往疾病信息。根据《职业健康监护技术规范》等相关标准的要求, 对样本人群进行内科、外科、皮肤、神经系统及血液系统等的健康检查。抽取下班后外周静脉血样5 mL, 以作血清MTBE和TBA测定及淋巴细胞DNA损伤分析用。

### 1.3 血清、淋巴细胞分离

运用EZ-Sep人淋巴细胞分离液对上述样本的淋巴细胞进行分离, 具体步骤按操作说明进行。

### 1.4 彗星试验

按SINGH<sup>[7]</sup>等的彗星试验操作步骤进行。彗星尾矩分析采用Casp软件进行彗星图像分析<sup>[8]</sup>, 每个样本观察50个细胞, 分析各组彗星的Olive尾矩。同时, 作普通健康人血样的阴性对照及 $H_2O_2$ 染毒后的细胞阳性对照各2份。

### 1.5 血清MTBE和TBA的测定

参考蔡智鸣<sup>[9]</sup>等方法, 运用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术测定血清MTBE和TBA浓度。血清中MTBE或TBA浓度计算公式为:  $C = (A - b)/k$ 。式中: C-血清中MTBE或TBA的浓度,  $\mu\text{g}/\text{L}$ ; A-MTBE或TBA的峰面积; b-MTBE或TBA标准曲线的截距; k-MTBE或TBA标准曲线的斜率。

### 1.6 统计学分析

数据资料采用SPSS 12.0统计软件进行处理, 运用单因素和多因素的logistic回归分析方法探讨包括MTBE及其代谢产物TBA在内的13个因素对彗星尾矩的影响。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

本次调查共回收有效问卷100份。男性61名, 女性39名; 平均年龄( $27.62 \pm 3.63$ )岁; 平均工龄( $5.04 \pm 4.25$ )年; 外周血清MTBE含量平均值为( $5.82 \pm 2.33$ ) $\mu\text{g}/\text{L}$ ; 外周血清TBA含量平均值为( $185.38 \pm 175.02$ ) $\mu\text{g}/\text{L}$ ; Olive尾矩平均值为( $0.052 \pm 0.044$ ) $\mu\text{m}$ , 同阳性对照组相比, 总体损伤程度轻微。

### 2.2 资料的量化

以Olive尾矩算术均值作为临界值, 各样本测定值转换为0或1(小于或大于临界值)的二分变量(应变量), 依据logistic回归模型的要求, 按一定逻辑关系将被调查的可能影响因素(自变量)进行量化处理, 赋值见表1。

表1 Olive尾矩影响因素logistic回归分析量化赋值

变量	量化赋值
Olive尾矩	小于平均值=0; 大于平均值=1
血清甲基叔丁基醚( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	取原始测定值
血清叔丁醇TBA( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	取原始测定值
年龄(岁)	取原始值
性别	男=0; 女=1
受教育程度	小学及以下=1; 初中=2; 高中(中专)=3; 大专及本科=4; 研究生=5
工种	行政、后勤人员=1; 加油工、油车司机=2
工龄(年)	取原始值
饮酒情况	很少饮酒=1; 偶尔饮酒=2; 经常饮酒=3
烟龄(年)	取原始值
平均每天吸烟支数	取原始值
吸烟指数	不吸=1; <100=2; 100~3; 300~4; 500~5
有无慢性疾病	无=1; 有=2
个人防护措施(口罩)	无=1; 偶尔实施=2; 经常实施=3

### 2.3 单因素logistic回归分析

以Olive尾矩分类二分变量为应变量, 分别以上述13个因素为自变量, 采用强制方式(Enter)进行单因素的logistic回归分析, 结果发现, 血清MTBE含量、血清TBA含量、工种、饮酒情况、烟龄、平均每天吸烟支数及吸烟指数等因素对Olive尾矩分类的影响明显( $P < 0.05$ ), 由于被调查对象均未报告有慢

性疾病和均未采取防护措施, 所以二者未参与分析, 见表2。

表 2 Olive 尾矩影响因素的单因素 logistic 回归分析结果

变量	<i>b</i>	<i>S<sub>b</sub></i>	Wald $\chi^2$	OR	<i>P</i>
血清甲基叔丁基醚	1.392	0.279	24.943	4.023	<0.001
血清叔丁醇	0.013	0.003	18.434	1.013	<0.001
年龄	0.018	0.033	0.300	1.018	0.584
性别	0.378	0.435	0.756	1.459	0.385
受教育程度	-0.112	0.594	0.035	0.894	0.851
工种	1.421	0.490	8.423	4.142	0.004
工龄	0.012	0.039	0.101	1.012	0.751
饮酒情况	0.671	0.270	6.194	1.956	0.013
烟龄	0.184	0.093	3.926	1.202	0.048
平均每天吸烟支数	0.152	0.062	6.077	1.164	0.014
吸烟指数	0.045	0.019	5.535	1.046	0.019

#### 2.4 多因素 logistic 回归分析

对上述单因素分析有意义的7个因素进行多因素的 logistic 回归分析, 引入协变量的概率设为0.2, 删去协变量的概率设为0.1, 最大迭代次数设为20, 结果发现, 血清 MTBE 含量、工种 2 个影响因素最终引入回归方程 ( $OR > 1$ ,  $P < 0.05$ ), 见表3。

表 3 Olive 尾矩影响因素的多因素 logistic 回归分析结果

变量	<i>b</i>	<i>S<sub>b</sub></i>	Wald $\chi^2$	OR (95%CI)	<i>P</i>
血清甲基叔丁基醚	1.424	0.307	21.591	4.155 (2.279~7.577)	<0.001
工种	1.939	0.853	5.164	6.949 (1.305~36.990)	0.023
常数	-13.012	2.848	20.877	0.000	<0.001

#### 3 讨论

近年来, 汽油添加剂 MTBE 的环境污染及其毒性作用倍受关注。MTBE 在工业上由异丁烯和甲醇化合而成, 为无色透明的液体, 具有极强的挥发性。在生产和生活环境条件下, MTBE 通常经呼吸道、消化道和皮肤进入体内, 其中以呼吸道进入体内为最主要的途径, 在体内主要分布于肝脏和肾脏当中。MTBE 在体内主要通过细胞色素 P450 氧化酶体系氧化生成 TBA、甲醛和  $\alpha$ -羟基异丁酸<sup>[1]</sup>。

动物体内和体外实验研究发现, MTBE 可以引起实验动物明显的毒性效应<sup>[2-6]</sup>, 且有报道称 MTBE 浓度与遗传毒性效应存在剂量-反应关系<sup>[1]</sup>。有学者提出, MTBE 的毒作用可能与其在体内的代谢产物 TBA 等的共同作用有关<sup>[1]</sup>。为进一步寻找 MTBE 毒性作用的人群流行病学证据, 本研究对密切接触 MTBE 的加油站职工进行了健康调查, 运用 GC-MS 方法, 对样本人群外周血清 MTBE 及其代谢物 TBA 含量进行定量分析, 对样本人群淋巴细胞 DNA 损伤情况进行检测, 并以 Olive 尾矩作为 DNA 损伤的考察指标, 由于引起淋巴细胞 DNA 损伤的因素复杂多样, 故对可能的混杂因素进行了问卷调查, 并以单因素和多因素 logistic 回归分析模型排除混杂因素的影响, 探索 MTBE 及其代谢物 TBA 对 Olive 尾矩的影响。单因素 logistic 回归分析显示, 血清 MTBE 含量、血清 TBA 含量、工种、饮酒情况、烟龄、平均每天吸烟支数及吸烟指数等 7 个因素对 Olive 尾矩的影响明显 ( $P < 0.05$ ), 即该 7 因素对 Olive 尾矩的贡献均较大, 可见, MTBE 及 TBA 应列为遗传损伤预防和控制工作的防

控因素。多因素 logistic 回归分析发现, 在多因素的交互作用中, 血清 MTBE 含量和工种 2 个影响因素最终被引入了回归方程, 结果提示, 血清 MTBE 可能为引起外周血淋巴细胞 DNA 损伤的主要危险因素之一。

世界上发达国家如美国, 早在 2005 年就通过了可再生燃料标准 (RFS), 禁止 MTBE 作为汽油添加剂继续使用, 在汽油中以乙醇替代 MTBE 作为含氧化合物。大批 MTBE 生产装置陆续关闭, 或转产异丁烷或用于其他用途, 从 2006 年起, 美国从 MTBE 的净进口国变为了净出口国<sup>[10-11]</sup>。目前世界上正在加快开发纤维素乙醇技术, 并不断有中型和验证性纤维素乙醇装置建设和投产, 预计在不久的将来, 这种生产技术可能会取得全面的突破, 成为 MTBE 的主要替代品和汽油的重要组分<sup>[10]</sup>。因此, 我们应尽快寻找更安全、实用的 MTBE 替代品。

由于本次横断面调查方法的局限性, 加上汽油成分的复杂性, 以及可造成遗传毒性效应的因素不仅局限于本次调查所涉及的因素, 因此, MTBE 的人群遗传毒性效应还有待于进一步探索。

· 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

#### 参考文献:

- [1] 杨红, 孔璐, 赵进顺, 等. 甲基叔丁基醚致 DNA 损伤的体内和体外研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2005, 23(5): 362-365.
- [2] 江淑仪, 陈小玲, 方昌勇, 等. 甲基叔丁基醚对小鼠外周血淋巴细胞的遗传毒性 [J]. 卫生研究, 2011, 40(3): 391-393.
- [3] 杨红, 赵进顺, 高锦伍, 等. 甲基叔丁基醚无铅汽油肝脏毒性的实验研究 [J]. 环境与职业医学, 2003, 20(1): 38-40.
- [4] BERMUDEZ E, WILLSON G, PARKINSON H, et al. Toxicity of methyl tertiary-butyl ether (MTBE) following exposure of Wistar Rats for 13 weeks or one year via drinking water [J]. J Appl Toxicol, 2012, 32(9): 687-706.
- [5] BURNS K M, MELNICK R L. MTBE: recent carcinogenicity studies [J]. Int J Occup Environ Health, 2012, 18(1): 66-69.
- [6] SGAMBATO A, IAVICOLI I, DE PAOLA B, et al. Differential toxic effects of methyl tertiary butyl ether and tert-butanol on rat fibroblasts in vitro [J]. Toxicol Ind Health, 2009, 25(2): 141-151.
- [7] SINGH N P, MCCOY M T, TICE R R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. Exp Cell Res, 1988, 175(1): 184-191.
- [8] BOWDEN R D, BUCKWALTER M R, MCBRIDE J F, et al. Tail profile: a more accurate system for analyzing DNA damage using the Comet assay [J]. Mutat Res, 2003, 537(1): 1-9.
- [9] 蔡智鸣, 史馨, 张前龙, 等. GC-MS 测定人血清中酞酸酯类环境污染物 [J]. 理化检验: 化学分册, 2006, 42(2): 115-119.
- [10] 于春梅, 刘丽娟. 甲基叔丁基醚产业发展趋势分析及建议 [J]. 化学工业, 2011, 29(9): 12-15.
- [11] 付静. MTBE 市场现状及趋势分析 [J]. 齐鲁石油化工, 2011, 39(4): 352-355.

(收稿日期: 2013-06-26)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 洪琪)