

苯暴露对小鼠血液系统和DNA氧化损伤的影响

丁婷婷, 王茜, 郑国颖, 刘英莉, 袁聚祥, 沈福海, 蒋守芳, 冯福民, 金玉兰, 关维俊, 佟俊旺

摘要: [目的] 观察苯吸入染毒对小鼠的周围血象、尿中苯巯基尿酸(SPMA)和8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)的影响, 探讨苯暴露对血液系统和DNA氧化损伤的作用。[方法] 将120只昆明种雄性小鼠随机分为4组, 每组30只, 低、中、高组苯染毒质量浓度分别为375、750和1500 mg/m³, 对照组吸入空气。采用静式吸入染毒法, 每天2h, 每周5d, 持续染毒3个月。分别于染毒后1、2、3个月时, 每组随机处死10只小鼠, 检测周围血象、尿中SPMA和8-OHdG的水平。[结果] 白细胞、红细胞、淋巴细胞计数均随着染毒浓度的升高而降低($P<0.05$); 尿中SPMA及8-OHdG水平随着苯染毒浓度的增加而升高($P<0.05$)。高浓度组染毒3个月时尿中8-OHdG水平明显高于1、2个月($P<0.05$)。尿中SPMA及8-OHdG与白细胞计数均呈负相关($r_{\text{SPMA}}=-0.718$, $r_{\text{8-OHdG}}=-0.971$, 均 $P<0.01$)。[结论] 亚慢性苯暴露可导致小鼠血液系统和DNA氧化损伤。

关键词: 苯; 静式吸入染毒; 血象; 苯巯基尿酸; 8-羟基脱氧鸟苷

Effects of Benzene on Blood System and DNA Oxidative Damage in Mice DING Ting-ting, WANG Qian, ZHENG Guo-ying, LIU Ying-li, YUAN Ju-xiang, SHEN Fu-hai, JIANG Shou-fang, FENG Fu-min, JIN Yu-lan, GUAN Wei-jun, TONG Jun-wang (Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, North China University of Science and Technology/Hebei Laboratory of Coal Mine Health and Safety, Tangshan, Hebei 063000, China). Address correspondence to JIANG Shou-fang, E-mail: jiangshoufang@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To observe the changes of peripheral hemogram, urinary S-phenylmercapturic acid (SPMA), and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in mice as indicators of blood system and DNA oxidative damage after benzene inhalation. [Methods] A total of 120 Kunming male mice were exposed to 0, 375, 750, and 1500 mg/m³ of benzene for 2 h each day, 5 days each week, in static inhalation cabin for three months. In each group ten mice were randomly sacrificed every month. Hemogram and urinary SPMA and 8-OHdG were measured. [Results] With higher benzene exposure dose, the counts of white blood cells (WBC), red blood cells (RBC), and lymphocytes were reduced ($P<0.05$), but the levels of SPMA and 8-OHdG in urine were increased ($P<0.05$). Higher urinary 8-OHdG level was found in the mice with three months of 1500 mg/m³ benzene inhalation than those with one or two months of exposure ($P<0.05$). Urinary SPMA and 8-OHdG were negatively correlated with WBC ($r_{\text{SPMA}}=-0.718$, $r_{\text{8-OHdG}}=-0.971$, $P<0.01$). [Conclusion] Subchronic exposure to benzene might induce blood system and DNA oxidative damage in mice.

Key Words: benzene; static inhalation; hemogram; S-phenylmercapturic acid (SPMA); 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)

苯(benzene)是一种常用的挥发性有机化合物, 作为化工原料被广泛应用于工业生产, 同时它也是一种重要的环境污染物, 具有血液毒性和致癌性^[1]。周围血象作为苯接触的早期效应标志, 目前报道较多。由于血象检测简便、快速, 因此已经成为基层卫生单位检测苯接触人群的常用指标。苯巯基尿酸(S-phenylmercapturic acid, SPMA)作为苯的代谢产物之一, 其特异性在于尚未发现其它化学物或食物有类

似的代谢产物存在^[2], 因此, SPMA作为苯接触的内暴露指标可以较好地反映机体苯暴露的水平。研究表明尿中8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG)水平是反映DNA氧化损伤较为理想的生物标志^[3-4]。本实验通过观察小鼠在苯不同染毒浓度和染毒时间的情况下, 其周围血象、尿中SPMA和8-OHdG的变化, 研究苯暴露对小鼠血液系统和DNA的氧化损伤作用; 通过分析尿8-OHdG与血象和SPMA的相关性, 探讨8-OHdG作为效应指标反映苯致机体DNA氧化损伤的可能性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

苯、二硫化碳(优级纯, 上海市化学试剂厂, 中

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.15562

[基金项目] 河北省科技计划项目(编号: 13277709D)

[作者简介] 丁婷婷(1987—), 女, 硕士生; 研究方向: 环境有害因素与健康; E-mail: 15732519424@163.com

[通信作者] 蒋守芳, E-mail: jiangshoufang@163.com

[作者单位] 华北理工大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学科, 河北省煤矿卫生与安全实验室, 河北 唐山 063000

国)、Giemsa染料(AppliChem公司,德国)、尿肌酐试剂盒(北京伟业科创科技有限公司,中国)、小鼠8-OHdG ELISA试剂盒(北京伟业科创科技有限公司,中国)、SPMA标准品(纯度 $\geq 98\%$,上海安普实验科技股份有限公司,中国)、甲醇(色谱纯,成都市料龙化工试剂厂,中国)、十二醇(色谱纯,成都市料龙化工试剂厂,中国)、三氯甲烷(色谱纯,上海市化学试剂厂,中国)、异丙醇(分析纯,上海市化学试剂厂,中国)。

1.2 主要仪器

300 L静态染毒柜(毒理实验室自制,编号:000000000289)、KDY-B双路大气采样器(江苏盐城市科源电子仪器有限公司,中国)、GC-2010气相色谱仪(岛津公司,日本)、KT6180全自动血液细胞分析仪(深圳锦瑞电子有限公司,中国)、BH-2型光学显微镜(Olympus,日本)、1200型高效液相色谱仪(Agilent Technologies公司,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组 昆明种雄性小鼠120只,体重18~22g,随机分为对照组以及低、中、高浓度组,3组染毒浓度按照小鼠苯吸入染毒的 LC_{50} 的1/30、1/60、1/120设定,分别为375、750和1500 mg/m^3 。

1.3.2 染毒方法 染毒时间为上午8:00—10:00。将4组小鼠分别放入对应的静式染毒柜,用移液枪准确量取苯滴入到染毒柜内的纱布中,将染毒柜密闭,开启风扇,使苯挥发充分,染毒2h后取出小鼠。对照组小鼠吸入空气。每周染毒5d,连续染毒3个月。分别于染毒第1、2、3个月后,每组随机处死10只小鼠。

1.3.3 染毒柜内苯浓度测定 在染毒30、60、90min时分别用大气采样器连通活性炭管采集静式染毒柜中的空气,采样流速为0.1L/min,采样20min。苯浓度采用二硫化碳解析,气相色谱法检测,每周检测一次。

1.3.4 周围血象测定 每月染毒结束后24h(禁食12h),麻醉动物后经心脏穿刺取血1.5mL于EDTA-K2抗凝管中,用自动血液细胞分析仪测定红细胞、白细胞、淋巴细胞、血小板和血红蛋白。

1.3.5 尿中SPMA的测定 每月染毒结束时,用小鼠代谢笼收集尿液,采用混合萃取剂-悬浮固化分散液相微萃取测定小鼠尿中SPMA含量,方法参照文献[5]。采用尿肌酐ELISA试剂盒检测肌酐,计算结果采用肌酐校正。

1.3.6 尿中8-OHdG的测定 采用小鼠8-OHdG ELISA试剂盒检测(灵敏度:最低检测浓度小于0.1mmol/L),

用酶标仪在450nm波长检测光密度值,根据标准曲线,计算尿中8-OHdG的浓度。

1.4 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 19.0对数据进行统计分析,其中小鼠体重、周围血象、SPMA、8-OHdG随染毒时间的变化采用重复测量资料的方差分析,其他指标采用单因素方差分析,采用Pearson进行各指标之间的相关分析。

2 结果

2.1 染毒柜内不同染毒时间的苯浓度的检测结果

如表1所示,在小鼠暴露于苯的2h内,各染毒柜内苯的质量浓度基本在所设定染毒浓度范围内。

表1 染毒柜内不同染毒时间的苯浓度(mg/m^3 , $n=12$)

组别	染毒时间		
	30 min	60 min	90 min
低浓度组	414.61 $\pm$ 80.22	352.32 $\pm$ 58.66	330.94 $\pm$ 18.21
中浓度组	852.19 $\pm$ 115.60	756.00 $\pm$ 33.01	682.59 $\pm$ 57.08
高浓度组	1976.99 $\pm$ 74.07	1772.62 $\pm$ 158.10	1405.14 $\pm$ 61.05

2.2 苯染毒对小鼠体重的影响

如表2所示,与对照组比较,染毒2、3个月时,低、中、高浓度组小鼠体重均降低($P<0.05$);与染毒前比较,各组小鼠体重均增加($P<0.05$);与染毒1个月比较,染毒2、3个月各染毒浓度组体重增加($P<0.05$)。与染毒2个月比较,染毒3个月,低、中和高浓度组体重增加($P<0.05$)。

2.3 苯染毒对小鼠周围血象的影响

表3、表4可见,高浓度组小鼠白细胞计数均随染毒时间的延长而降低($P<0.05$),与染毒1个月相比,染毒2个月和3个月白细胞及红细胞计数明显降低($P<0.05$)。3个染毒时间白细胞计数均随着染毒浓度的增加而减少,与对照组相比,中、高浓度组明显降低($P<0.05$);红细胞计数与对照组相比,染毒1个月时中、高浓度组、第2个月和第3个月低、中、高浓度组红细胞计数降低($P<0.05$)。表5可见,白细胞分型中淋巴细胞计数随染毒浓度增加而降低,与对照组相比,第1个月高浓度组、第2个月和第3个月低、中、高浓度组淋巴细胞计数降低($P<0.05$)。4组血小板和血红蛋白差异均无统计学意义(数据未显示)。

表2 不同苯染毒时间各组对小鼠体重的变化(g, n=10)

组别	染毒时间				F	P
	染毒前	1个月	2个月	3个月		
对照组	21.69 ± 1.96	36.56 ± 3.61 ^a	42.04 ± 2.95 ^{ab}	46.00 ± 2.71 ^{ab}	4089.94	0.000
低浓度组	21.91 ± 2.00	32.70 ± 6.83 ^{ab}	38.24 ± 2.77 ^{ab}	43.62 ± 3.33 ^{abc}	4464.40	0.000
中浓度组	22.22 ± 2.17	31.75 ± 7.00 ^{ab}	38.08 ± 3.01 ^{ab}	43.07 ± 2.50 ^{abc}	6285.67	0.000
高浓度组	22.86 ± 2.46	35.79 ± 2.75 ^{ab}	37.90 ± 3.07 ^{ab}	42.02 ± 2.79 ^{abc}	5578.00	0.000
F	1.654	5.659	8.915	3.463		
P	0.181	0.001	0.000	0.026		

[注]*: 与对照组相比, $P<0.05$; a: 与染毒前相比, $P<0.05$; b: 与染毒1个月相比, $P<0.05$; c: 与染毒2个月相比, $P<0.05$ 。

表3 不同苯染毒时间各组小鼠白细胞计数的变化($\times 10^{12}/L$, n=10)

组别	染毒时间			F	P
	1个月	2个月	3个月		
对照组	2.31 ± 1.03	2.67 ± 1.52	2.59 ± 0.88	0.157	0.703
低浓度组	1.73 ± 0.50 [*]	1.52 ± 0.46 [*]	1.62 ± 0.62 [*]	0.128	0.731
中浓度组	1.76 ± 0.41 [*]	1.16 ± 0.35 ^{*△}	1.70 ± 0.58 [*]	2.572	0.147
高浓度组	1.31 ± 0.47 ^{*△□}	0.90 ± 0.28 ^{*△□a}	0.65 ± 0.14 ^{*ab}	17.498	0.002
F	4.352	8.932	5.603		
P	0.010	0.000	0.003		

[注]*: 与对照组相比, $P<0.05$; △: 与低浓度组相比, $P<0.05$; □: 与中浓度组比较, $P<0.05$ 。a: 与染毒1个月相比, $P<0.05$; b: 与染毒2个月相比, $P<0.05$ 。

表4 不同苯染毒时间各组小鼠红细胞计数的变化($\times 10^9/L$, n=10)

组别	染毒时间			F	P
	1个月	2个月	3个月		
对照组	10.60 ± 0.62	10.27 ± 0.23	10.11 ± 0.45	2.442	0.162
低浓度组	10.23 ± 0.25	9.04 ± 0.57 [*]	8.98 ± 0.77 [*]	4.580	0.070
中浓度组	9.17 ± 0.27 ^{*△}	8.70 ± 0.37 [*]	8.89 ± 0.53 [*]	0.454	0.519
高浓度组	8.98 ± 0.82 ^{*△}	8.71 ± 0.37 ^{*a}	8.36 ± 0.71 ^{*a}	5.130	0.049
F	20.670	19.390	13.507		
P	0.000	0.000	0.000		

[注]*: 与对照组相比, $P<0.05$; △: 与低浓度组相比, $P<0.05$; □: 与中浓度组比较, $P<0.05$ 。a: 与染毒1个月相比, $P<0.05$ 。

表5 不同苯染毒时间各组小鼠淋巴细胞计数的变化($\times 10^9/L$, n=10)

组别	染毒时间			F	P
	1个月	2个月	3个月		
对照组	2.08 ± 0.87	2.42 ± 1.42	2.27 ± 0.81	0.108	0.752
低浓度组	1.70 ± 0.63	1.41 ± 0.49 [*]	1.29 ± 0.59 [*]	0.328	0.607
中浓度组	1.20 ± 0.25	1.34 ± 0.57 [*]	1.36 ± 0.38 [*]	0.036	0.860
高浓度组	1.28 ± 0.23 ^{*△}	1.07 ± 0.42 [*]	0.83 ± 0.49 [*]	2.787	0.146
F	4.349	4.452	10.390		
P	0.012	0.011	0.000		

[注]*: 与对照组相比, $P<0.05$; △: 与低浓度组相比, $P<0.05$ 。

2.4 苯染毒对小鼠尿中SPMA的影响

表6可见,第1、2、3个月,高浓度组与其他浓度组相比,尿SPMA含量明显升高($P<0.05$);染毒第2、

3个月,与低浓度组相比,中浓度组尿SPMA的量增加($P<0.05$)。

表6 不同苯染毒时间各组尿中苯巯基尿酸的变化(mg/gCr, n=6)

组别	染毒时间		
	1个月	2个月	3个月
对照组	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.00
低浓度组	0.53 ± 1.32	0.70 ± 0.28	0.54 ± 0.50
中浓度组	0.92 ± 0.27 [*]	1.92 ± 1.14 ^{*△}	1.72 ± 0.54 ^{*△}
高浓度组	8.89 ± 3.67 ^{*△□}	6.57 ± 1.56 ^{*△□}	6.58 ± 0.52 ^{*△□}
F	24.891	37.927	34.119
P	0.000	0.000	0.000

[注]*: 与对照组相比, $P<0.05$; △: 与低浓度组相比, $P<0.05$; □: 与中浓度组比较 $P<0.05$ 。

2.5 苯染毒对小鼠尿中8-OHdG的影响

表7可见,染毒第1、2、3个月,小鼠尿中8-OHdG含量均随染毒浓度的增加而增加,与对照组相比,低、中、高浓度组8-OHdG含量升高($P<0.05$)。染毒第1个月时,高浓度组8-OHdG含量高于低、中浓度组;染毒第2个月时,高浓度组8-OHdG含量高于低浓度组;染毒第3个月时,高浓度组8-OHdG含量高于低、中浓度组。随着染毒时间的延长,高浓度组染毒第2、3个月与第1个月相比,尿中8-OHdG含量有增加趋势($P<0.05$),其他3组未见明显改变。

表7 不同苯染毒时间各组尿中8-羟基脱氧鸟苷的变化(mg/L, n=6)

组别	染毒时间			F	P
	1个月	2个月	3个月		
对照组	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	4.455	0.089
低浓度组	0.74 ± 0.03 [*]	0.66 ± 0.09 [*]	0.93 ± 0.49 [*]	1.836	0.233
中浓度组	0.81 ± 0.20 [*]	1.02 ± 0.09 [*]	0.94 ± 0.48 [*]	2.648	0.165
高浓度组	1.29 ± 0.05 ^{*△□}	1.14 ± 0.07 ^{*△}	1.83 ± 0.13 ^{*△□b}	10.193	0.024
F	147.321	438.540	34.237		
P	0.000	0.000	0.000		

[注]*: 与对照组相比, $P<0.05$; △: 与低浓度组相比, $P<0.05$; □: 与中浓度组比较, $P<0.05$ 。a: 与染毒1个月相比, $P<0.05$; b: 与染毒2个月相比, $P<0.05$ 。

2.6 相关性分析

表8可见,尿8-OHdG与尿SPMA呈正相关($P < 0.01$),与白细胞计数呈负相关($P < 0.01$)。尿SPMA与白细胞计数呈负相关($P < 0.01$)。

表8 各检测指标间相关性分析结果

项目	WBC($\times 10^{12}/L$)	SPMA [#] (mg/g)	8-OHdG(mg/L)
WBC($\times 10^{12}/L$)	1.000	-0.718*	-0.971*
SPMA [#] (mg/g)	—	1.000	0.792*
8-OHdG(mg/L)	—	—	1.000

[注]*: $P < 0.01$; #: SPMA单位为每g肌酐为计量单位。

3 讨论

近年来,职业接触苯对健康影响的报道较多,但应用实验动物研究苯对血液系统及DNA氧化损伤的较少。由于职业人群接触的环境因素复杂,干扰因素多,并不能准确反映苯对职业接触人群的健康损害,为了更准确地探讨苯对血液系统及DNA氧化损伤的影响,本研究借助实验动物进行研究。

血象分析作为苯接触的效应生物标志,检测方法简便快速,因此目前已成为苯接触人群最常用的检测指标^[6]。有研究发现长期低浓度苯接触可造成神经细胞及血液细胞的损害^[7],白细胞、红细胞、血红蛋白及血小板计数降低^[8-9]。关于周围血象和尿中SPMA的相关性研究报道尚少。本研究发现,白细胞计数与内暴露指标尿SPMA呈较好的负相关,提示本研究苯染毒剂量对小鼠血象产生了影响,并且随着苯染毒浓度的升高及时间的延长,对小鼠的血液系统损伤加重。

尿SPMA作为苯接触的暴露生物标志可以反映机体接触苯的内暴露水平。人群研究表明:随着苯接触浓度的增加,尿中SPMA有增加趋势^[3,10],这与本研究结果一致。本研究通过动物实验,严格控制苯暴露的环境,相比人群研究,干扰因素较少,因此SPMA较能准确的反应能较好地反映苯接触的内暴露水平。

苯促进自由基形成、导致体内氧化-抗氧化失衡是苯系物毒性作用机制之一^[11]。人群研究表明,长时间苯接触致尿中8-OHdG增加^[3,8],尿中8-OHdG可作为苯致遗传损伤的效应标志,与苯暴露浓度有一定的剂量-反应关系^[12]。本研究结果与文献报道一致。提示尿中8-OHdG水平可作为苯接触后体内氧化损伤的效应标志。但由于本研究为动物实验研究,结论还需

人群研究加以验证。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] Smith MT, Zhang L, McHale CM, et al. The exposome and future investigations of leukemia etiology[J]. Chem Biol Interact, 2011, 192(1/2): 155-159.
- [2] Farmer P, Kaur B, Roach J, et al. The use of S-phenylmercapturic acid as a biomarker in molecular epidemiology studies of benzene[J]. Chem Biol Interact, 2005, 153-154: 97-102.
- [3] Wu LL, Chiou CC, Chang PY, et al. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetes[J]. Clin Chim Acta, 2004, 339(1/2): 1-9.
- [4] Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis[J]. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2009, 27(2): 120-139.
- [5] 王宇, 邹晓莉, 张文滔, 等. 混合萃取剂-悬浮固化分散液相微萃取测定尿中的苯巯基尿酸[J]. 分析化学, 2013, 41(5): 749-753.
- [6] 郭颖燕, 陈坤. 职业苯暴露生物标志物的研究现状[J]. 中国工业医学杂志, 2008, 21(1): 58-60.
- [7] 周莉芳. 苯作业工人染色体损伤与细胞周期调控基因多态性关系[D]. 上海: 复旦大学, 2012.
- [8] 刘洋, 张巧耘, 韩磊, 等. 低浓度苯作业工人外周血象及尿中苯代谢产物分析[J]. 中国工业医学杂志, 2013, 26(5): 347-349.
- [9] 熊晓芸, 姜秋霞, 韩磊, 等. 长期低浓度苯接触的遗传损伤作用[J]. 环境与职业医学, 2014, 31(2): 98-103.
- [10] 成兴群, 徐爱国, 徐华, 等. 苯暴露工人尿中8-OHdG、tt-MA和S-PMA含量的测定[J]. 职业与健康, 2014, 30(24): 3513-3515.
- [11] 张喆, 袁衡, 朱武, 等. 还原型谷胱甘肽对甲醛和苯诱导的小鼠胚胎发育毒性的影响[J]. 环境与健康杂志, 2012, 29(7): 597-600.
- [12] 刘仁平, 刘华良, 周建华, 等. 高效液相色谱三重串联四级杆质谱法同时测定尿中8-羟基脱氧鸟苷、反-反式粘糠酸和苯巯基尿酸[J]. 工业卫生与职业病, 2013, 39(5): 310-315.

(收稿日期: 2015-09-22)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 汪源)