

职业性射线接触者外周血淋巴细胞 DNA 损伤的动态观察

蒋晓红, 王民生, 王湘苏, 徐德州

(江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210028)

摘要: 目的 了解长期小剂量、低剂量率职业性射线接触者的细胞 DNA 损伤动态变化。方法 用单细胞微量凝胶电泳 (SCGE) 对某厂 80 名职业性射线接触人员于 1996~2000 年连续 5 次作 DNA 损伤检测。结果 在暴露的平均年当量剂量范围内, 射线接触组 DNA 受损细胞率与对照组相比, 均有显著增加, 但接触组平均 DNA 受损细胞率未见有明显逐年升高的趋势; DNA 受损细胞率与放射工龄、年龄、平均年当量剂量有明显的相关性, 随放射工龄的增加呈递增趋势。结论 长期受小剂量、低剂量率照射的职业性射线接触者会引起外周血淋巴细胞 DNA 损伤持续改变; 且 DNA 受损细胞率随放射工龄、年龄、平均年当量剂量的增加呈递增趋势。SCGE 可用于低剂量电离辐射引起的 DNA 损伤动态研究与评价。

关键词: DNA 损伤; SCGE; 射线

中图分类号: R144 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2004)06-0347-04

Dynamic observation on DNA damage in peripheral blood lymphocytes of workers occupationally exposed to ionizing radiation

JIANG Xiao-hong, WANG Min-sheng, WANG Xiang-su, XU De-zhou

(Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210028, China)

Abstract; Objective In order to investigate the dynamic change of DNA damage induced by ionizing radiation, the single cell gel electrophoresis (SCGE) was carried out in workers exposed to radiation for many years. **Method** The length and rate of DNA migration of peripheral blood lymphocytes of exposed workers were analyzed in 1996, 1997, 1998, 1999 and 2000. **Result** The significantly different length of DNA migration and DNA damage cell rate were exhibited between the observed and control groups ($P < 0.05$), and the level of DNA damage was increasing after exposed to long small dose radiation. In the mean of annual dose equivalent of exposed radiation, no elevated trend of DNA damage cell rate was observed in the continuous years. Significant associations were observed between the DNA damage cell rate and radiation service length, age, average annual dose equivalent. **Conclusion** These findings suggest that the technique of SCGE could be used to detect dynamically the earliest biological damage by ionizing radiation in exposed workers.

Key words: DNA damage; Single cell gel electrophoresis (SCGE); Ionizing radiation

随着核技术的发展, 防护条件的改善和自我保护意识的加强, 射线作业人员长期接触小剂量电离辐射的机会日益增多。由 Singh 等改进和建立的碱性单细胞凝胶电泳试验 (SCGE) (亦称彗星实验), 是一种检测哺乳动物单细胞 DNA 断裂的新技术, SCGE 在检测 DNA 损伤方面与以常用的检测 DNA 损伤方法 (如染色体分析、微核分析、双核微核分析及姐妹染色单体互换等) 相比, 具有简便、快捷、灵敏等优点^[1,2], 该技术还可用于射线诱发的原发性 DNA 损伤及修复的检测, 因此, 近几年来已被广泛用于放射生物学领域 DNA 损伤与修复等方面的检测^[3-9]。本文应用 SCGE 连续 5 年检测了从事 X 射线探伤工人的外周血淋巴细胞 DNA 单链断裂 (DNA ssb) 的动态变化情况, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

试剂和药品: 细胞培养液 RPMI1640, Gibco 公司产品。胎牛血清, 上海浦东开发区高桥兽医站生产。正常熔点琼脂糖 (NMA)、低熔点琼脂糖 (LMA) 和溴化乙锭 (EB) 均为华美公司进口分装。二甲基亚砷 (DMSO), 江苏南新助剂厂生产。曲拉通 (Triton X2100), 上海化学试剂站进口分装。主要仪器设备: 德国 HERAEUS 型 CO₂ 细胞培养箱, 日本 OLYMPUS BX260 万能落射式荧光显微镜, 重庆光学仪器厂生产的 XDS21 型倒置生物显微镜, 上海医用电子仪器厂生产的 DY2 I 型电泳仪, 水平电泳槽 (自制), 全磨砂 Dakin 载玻片。

1.2 方法

1.2.1 观察对象 选择某测井队接触射线专业工龄 1 年以上的测井工 80 人为射线接触组, 均为男性, 他们的职业外照射剂量用 TLD 剂量计测得。接触射

收稿日期: 2004-08-02; 修回日期: 2004-09-20

作者简介: 蒋晓红 (1960-), 女, 副主任医师, 主要从事职业卫生工作

线组工人开始观察时(1996年)平均年龄 32.7岁 [(32.7±9.5)岁], 平均工龄 7.7年 [(7.7±6.9)年], 55%的人吸烟。另取非射线作业的健康男性 100人作对照组, 年剂量当量为 0, 平均年龄 34.1岁 [(34.1±6.8)岁], 平均工龄 10.3年 [(10.3±7.0)年], 63%的人吸烟, 两者条件基本齐同 ($P>0.05$)。

1.2.2 淋巴细胞分离 采作业工人静脉血 1 ml 肝素抗凝, 用 PRMI1640 培养液稀释后加入盛有淋巴细胞分离液的离心管中, 离心 20 min, 吸取其有核细胞层(主要为淋巴细胞), 用培养液洗涤 2 次, 制备得有核细胞悬液, 调节细胞浓度为 1×10^6 /ml 备用, 并用苔盼蓝测定细胞存活率。

1.2.3 SCGE 测试 按王民生报道的方法进行^[2], 其程序为: 单细胞悬液→于载玻片上铺制成“三明治”结构的凝胶片(总体共 230 μl 左右)→凝固后浸入碱性液中进行细胞溶解 1 h→DNA 解旋→碱性电泳(25 V, 300 mA)→EB 荧光染色→显微镜下用目镜测微尺(已标定)量取彗星尾长度(DNA 迁移距离)。每人分析 100 个细胞, 并计算 DNA 受损细胞百分率, 同时对 DNA 损伤的程度进行分级^[3], 分为无损伤(≤5%)、轻度损伤(6%~20%)、中度损伤(21%~40%)、重度损伤(41%~95%)、完全损伤(>95%)。

1.3 数据处理

所有资料处理均采用 SPSS10.0 统计软件进行 t 检验和方差分析, 率的显著性用卡方检验。

2 结果

2.1 对照组和射线接触组外周血淋巴细胞 DNA 损伤

对照组各年度测得外周血淋巴细胞 DNA 迁移距离平均值为 22.6 μm, 射线接触组各年度外周血淋巴细胞平均 DNA 迁移距离和 DNA 受损细胞率与对照组相比, 差异均有显著性 ($P<0.05$), $T-C$ 值(接触组 DNA 迁移距离-对照组 DNA 迁移距离)分别为 29.7、33.8、31.5、33.7 和 33.0。DNA 受损细胞率分别为 18.00%、18.53%、19.15%、19.56%、18.40%。射线接触组不同年度之间在暴露射线平均年当量剂量 1.46~1.83 mSv 范围内其平均 DNA 迁移距离和 DNA 受损细胞率差异均无显著性 ($P>0.05$)。见表 1、表 2。

表 1 对照组和射线接触组外周血淋巴细胞 DNA 损伤的比较

组别	例数	平均年剂量当量均数(mSv)	观察细胞数(个)	DNA 迁移距离 $\bar{x} \pm s(\mu m)$	$T-C$ 值
对照组	100	0	10 000	22.6 ± 1.9	
射线接触组					
1996 年	80	1.75	8 000	52.3 ± 7.8 *	29.7
1997 年	80	1.68	8 000	56.4 ± 5.8 *	33.8
1998 年	79	1.46	7 900	54.1 ± 6.2 *	31.5
1999 年	78	1.72	7 800	56.3 ± 8.1 *	33.7
2000 年	80	1.83	8 000	55.6 ± 7.2 *	33.0

* 与对照组相比, $P<0.05$

表 2 对照组和射线接触组外周血淋巴细胞 DNA 损伤的分布

组别	例数	观察细胞数(个)	DNA 受损细胞		DNA 受损细胞分级									
			个数	%	无损伤		轻度损伤		中度损伤		重度损伤		完全损伤	
					个数	%	个数	%	个数	%	个数	%	个数	%
对照组	100	10 000	302	3.02	9 698	96.98	284	2.84	11	0.11	7	0.07	0	0
射线接触组														
1996 年	80	8 000	1 440	18.00	6 560	82.00	976	12.20	328	4.10	88	1.10	48	0.60
1997 年	80	8 000	1 482	18.53	6 518	81.50	928	11.60	368	4.60	104	1.30	82	1.03
1998 年	79	7 900	1 513	19.15	6 387	80.10	869	11.0	387	4.90	221	2.80	36	0.45
1999 年	78	7 800	1 526	19.56	6 274	80.40	952	12.20	359	4.60	187	2.40	28	0.36
2000 年	80	8 000	1 472	18.40	6 528	81.60	832	10.40	400	5.00	232	2.90	8	0.10

2.2 放射工龄与外周血淋巴细胞 DNA 损伤的关系

各放射工龄分组外周血淋巴细胞平均 DNA 迁移距离和 DNA 受损细胞率与对照组比较差异均有显著性 ($P<0.05$), 各放射工龄分组间差异也均有显著性 ($P<0.05$)。DNA 受损细胞率与放射工龄呈线性相关, 其回归方程为: $y(\%) = 11.616 + 0.403D$, $r = 0.967$, $P<0.05$ (其中 y 为 DNA 受损细胞率, D

为放射工龄、年龄、平均年当量剂量, r 为相关系数, 以下相同)。见表 3。

2.3 年龄与外周血淋巴细胞 DNA 损伤的关系

各年龄分组外周血淋巴细胞平均 DNA 迁移距离和 DNA 受损细胞率与对照组比较差异均有显著性 ($P<0.05$); DNA 受损细胞率与年龄呈线性相关, 其回归方程为: $y(\%) = 14.365 + 0.130D$, $r = 0.968$,

$P < 0.05$ 。见表 3。

2.4 平均年当量剂量与外周血淋巴细胞 DNA 损伤的关系

平均年当量剂量分组外周血淋巴细胞平均 DNA 迁移距离和 DNA 受损细胞率与对照组比较差异均有显著性 ($P < 0.05$)，平均年当量剂量为 3.00 mSv 以上组与其他各组间差异也均有显著性 ($P < 0.05$)。DNA 受损细胞率与平均年当量剂量呈线性相关，其回归方程为： $y (\%) = 15.927 + 2.298D$ ， $r = 0.980$ ， $P < 0.05$ 。见表 3。

表 3 放射工龄、年龄、平均年当量剂量与 DNA 损伤的关系

组别	均数	入次数	DNA 迁移距离 $\bar{x} \pm s (\mu m)$	DNA 受损细胞 (%)
放射工龄 (年)				
<5	2.60 ± 1.50	95	42.20 ± 2.34 *	11.45 *
5~	5.67 ± 2.12	200	51.60 ± 4.26 *	14.60 *
10~	13.85 ± 3.15	65	54.04 ± 5.38 *	18.38 *
20~	26.17 ± 3.07	40	60.14 ± 6.20 *	21.52 *
年龄 (岁)				
20~	25.67 ± 2.32	195	47.20 ± 4.36 *	18.08 *
30~	33.57 ± 2.50	105	49.82 ± 6.02 *	18.12 *
40~	43.85 ± 2.47	65	51.36 ± 5.12 *	20.26 *
50~60	55.10 ± 2.12	35	53.14 ± 7.08 *	21.58 *
年均当量剂量 (mSv)				
<1.00	0.69 ± 0.04	210	48.12 ± 3.80 *	17.26 *
1.00~	1.16 ± 0.12	105	53.62 ± 2.46 *	19.16 *
2.00~	2.32 ± 0.26	55	52.82 ± 4.68 *	20.66 *
3.00~	3.18 ± 0.16	30	56.60 ± 4.12 *	23.52 *

* $P < 0.05$ ，下表同。

2.5 吸烟与外周血淋巴细胞 DNA 损伤的关系

按吸烟与否对两组进行分层，对照组中吸烟者平均 DNA 迁移距离大于非吸烟者，提示吸烟可引起 DNA 损伤，但射线接触组中吸烟者平均 DNA 迁移距离略大于非吸烟者，差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 4)。

表 4 对照组和射线接触组工人吸烟与外周血淋巴细胞 DNA 损伤的关系

组别	是否吸烟	例数	观察细胞数 (个)	DNA 迁移距离 $\bar{x} \pm s (\mu m)$	T-C 值
对照组	吸烟	63	6 300	25.6 ± 2.3 *	
	不吸烟	37	3 700	19.5 ± 1.5	
射线接触组	吸烟	44	4 400	56.4 ± 6.5	30.8
	不吸烟	36	3 600	53.1 ± 7.2	33.6

3 讨论

3.1 调查结果显示对照组各年度 DNA 受损细胞率的平均值为 6.02%，射线接触组 1996~2000 年连续 5 次 DNA 损伤动态观察结果显示 DNA 受损细胞率分别

为 18.00%、18.53%、19.15%、19.56%、18.40%，与对照组相比均有显著增加 ($P < 0.05$)，表明长期受小剂量、低剂量率照射可引起外周血淋巴细胞 DNA 损伤明显改变，但结果显示 DNA 受损细胞率逐年递增趋势不明显，这可能与辐射适应性反应有关。近几年来，国内外都在大量研究低剂量电离辐射引起的 DNA 损伤，尤其在电离辐射引起的刺激效应或辐射适应性反应方面的研究，SCGE 得到广泛的应用。目前检测 DNA 损伤最敏感的终端就是检测单链断裂，DNA 损伤越重，断片越多，形成的彗尾越长^[4]。日本学者^[7]采用中国仓鼠 V79 细胞 (CHV79)，先给培养的 CHV79 细胞进行 5cGy 的 γ 射线照射，37℃ 培养 4 h，此时检测组与对照组比较差异未见显著性；经过上述适应性照射 2 h 后再分别用 γ 射线 1.5 Gy 和 5 Gy 照射，发现经过适应性照射的细胞，DNA 损伤后的修复能力要明显好于未经适应性照射的细胞，而 DNA 损伤程度要比未经适应性照射的细胞轻得多，这种差异通过 SCGE 方法得到了充分的证明。本次调查亦表明 SCGE 在检测低剂量电离辐射引起的 DNA 损伤方面的作用。

3.2 本次调查结果提示，DNA 受损细胞率随放射工龄、年龄、平均年当量剂量分组的增加呈递增趋势，呈明显的相关性。表明长期受小剂量、低剂量率照射引起的外周血淋巴细胞 DNA 损伤改变是非随机性的。但递增趋势逐渐变缓，曲线斜率逐渐下降，可能与工作人员机体的修复功能有关^[8,9]。

3.3 Betti 等报道吸烟可显著增加健康人群外周血淋巴细胞 DNA 链断裂^[10]，考虑吸烟是混杂因素，按吸烟与否对两组进行分层，对照组中吸烟者平均 DNA 迁移距离大于非吸烟者，提示吸烟可引起 DNA 损伤，但射线接触组中吸烟者平均 DNA 迁移距离略大于非吸烟者，差异无显著性 ($P > 0.05$)，因此尚不能证实吸烟对射线引起的 DNA 损伤有协同作用，这与文献报道相一致^[11]。

参考文献：

- [1] Singh B P. Technical report modification of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage [J]. Int Radiat Biol, 1994, 66: 23-28.
- [2] 王民生, Schmezer P. 碱性单细胞微量凝胶电泳技术简介 [J]. 癌变·畸变·突变, 1996, 8 (2): 112-113.
- [3] 蒋晓红, 王民生, 王湘苏. 职业接触射线者外周血有核细胞 DNA 损伤的研究 [J]. 职业卫生与应急救援, 1998, 16 (1): 9-10.
- [4] 王友顺, 朱勇飞, 李华青, 等. 单细胞凝胶电泳在电离辐射 DNA

(下转第 362 页)

取24支活性炭管,每管加入2 μl 丙酮、丁酮、甲基异丁酮,室温放置,分别在当天、第3天、第5天、第7天各测定6支炭管,分别计算损失率,见表4。

表4 丙酮、丁酮、甲基异丁酮稳定时间试验

待测物	放置时间	样本数	加入量 (mg)	平均测得量 (mg)	损失率 (%)
丙酮	当天	6	1.5796	1.5433	-2.3
	第3天	6	1.5796	1.5559	-1.5
	第5天	6	1.5796	1.5369	-2.7
	第7天	6	1.5796	1.5069	-4.6
丁酮	当天	6	1.6122	1.5799	-2.0
	第3天	6	1.6122	1.5525	-3.7
	第5天	6	1.6122	1.5348	-4.8
	第7天	6	1.6122	1.5203	-5.7
甲基异丁酮	当天	6	1.5956	1.5732	-1.4
	第3天	6	1.5956	1.5589	-2.3
	第5天	6	1.5956	1.5142	-5.1
	第7天	6	1.5956	1.5206	-4.7

由表4可见,待测物在炭管中至少可保存7d,损失率在1.5%~5.7%之间。

2.7 采样效率试验

在实验室毒气柜中模拟现场,加入适量丙酮、丁酮、甲基异丁酮,用溶剂解吸型活性炭管分别以200 ml/min和30 ml/min的流速采样,按分析步骤测定前后两段活性炭管中丙酮、丁酮、甲基异丁酮浓度,并计算活性炭管的采样效率,见表5。结果表明,当空气中待测物浓度在48.5~217.6 mg/m³时,活性炭的采样效率为99.81%~100%,均符合规范要求。

2.8 现场应用

用本法对某方向盘厂生产场所内的3个不同作业点进行了定点TWA监测,8h TWA浓度范围分别为:丙酮64.5~83.1 mg/m³,丁酮17.3~19.2 mg/m³,甲

基异丁酮未检出,测得的结果与现场实际情况相符。

表5 丙酮、丁酮、甲基异丁酮的采样效率

采样流速 (ml/min)	采样时间 (min)	待测物	前段浓度 (mg/m ³)	后段浓度 (mg/m ³)	采样效率 (%)
30	480	丙酮	48.5	0	100
		丁酮	74.3	0	100
		甲基异丁酮	69.7	0	100
200	20	丙酮	217.6	0.24	99.89
		丁酮	179.7	0.30	99.84
		甲基异丁酮	193.3	0.35	99.81

3 小结

本文研制的用活性炭管采集空气中丙酮、丁酮、甲基异丁酮,样品经二硫化碳解吸,经FFAP柱分离气相色谱测定,其检出限、线性范围、精密性、采样效率、解吸效率、穿透容量、样品保存稳定性等检测性能指标均符合工作场所空气中毒物检测方法的研制规范要求,可作为工作场所空气中丙酮、丁酮、甲基异丁酮的时间加权平均浓度(TWA)检测方法应用。

参考文献:

- [1] 杨磊, 易桂林. 我国劳动卫生标准接触限值的研究进展和问题 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2003, 21 (4): 317-319.
- [2] 庞应发, 刚葆琪. 关于卫生标准编写中一些问题的商榷 [J]. 工业卫生与职业病, 2002, 28 (1): 50-51.
- [3] GBZ 2-2002, 工作场所有害因素职业接触限值 [S].
- [4] 夏元洵. 化学物质毒性全书 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1991. 369-394.
- [5] NIOSH Manual of analytical methods [M/CD]. Fourth Edition. 1994. METHOD 1300.
- [6] 徐伯洪, 闫慧芳. 工作场所有害物质监测方法 [M]. 北京: 中国人民公安大学出版社, 2003. 197-199, 398-402.
- [7] 于秀兰, 李王杰, 王应欣. 一种测定固体吸附剂穿透容量的简便方法 [J]. 工业卫生与职业病, 1989, 15 (6): 369-370.
- [8] 陈卫, 刘桂华. 工作场所空气中丁酮的热解吸气相色谱测定方法 [J]. 劳动医学, 2001, 18 (1): 45-46.

(上接第349页)

损伤中的应用研究 [J]. 海军医学杂志, 2003, 24 (2): 184-186.

- [5] 顾勤明, 汪雪生, 徐燕英. γ-射线对淋巴细胞DNA的损伤 [J]. 职业与健康, 2003, 19(10): 3-5.
- [6] 洪承皎, 童建, 王静, 等. 碱性单细胞凝胶电泳检测辐射诱发的外周血淋巴细胞DNA损伤 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2001, 21 (1): 28-29.
- [7] Ikushima T, Aritomi H, Morisue J, et al. Radioadaptive response: efficient repair of radiation induced DNA damage in adapted cells [J]. Mutat Res, 1996, (2): 193-198.
- [8] McCurdy D, Tail Q, Frias S, et al. Delayed repair of DNA damage by ionizing radiation in cells from patients with juvenile systemic lupus

erythematous and rheumatoid arthritis [J]. Radiat Res, 1997, (1): 48-54.

- [9] Lankinen MH, VIL POIM, VIL FO JA, et al. UV and gamma irradiation induced DNA single strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes [J]. Mutat Res, 1996, (1-2): 31-38.
- [10] Betti C, Davini T, Giannessi L, et al. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects [J]. Mutat Res 1994, 307: 323-333.
- [11] 范雪云, 李全开, 姚三巧, 等. 射线对人体淋巴细胞DNA损伤效应的研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2002, 20 (6): 306-307.