

应用血型糖蛋白 A 基因突变分析技术探讨 发生慢性苯中毒危险的相关因素

赵永成¹, 由莉¹, 李克秋², 刘强¹, 石大伟¹, 王继先¹

(1. 中国医学科学院放射医学研究所 天津市分子核医学重点实验室, 天津 300192; 2. 天津医科大学, 天津 300070)

摘要: 目的 应用血型糖蛋白 A (glycophorin A, GPA) 基因突变分析技术探讨苯作业工人发生慢性苯中毒危险的相关因素, 为苯危害的评价和慢性苯中毒的防治提供理论依据。方法 分离、固定 122 例苯作业工人外周血红细胞, 与荧光素标记的单抗结合后, 采用流式细胞术进行 GPA 变异分析, 应用统计学方法分析个体易感性与慢性苯中毒的关系。结果 GPA 基因突变频率与作为反映个体易感性的 3-氨基苯甲酰胺 (3AB) 指数之间的相关性分析显示, 慢性苯中毒组 GPA 基因突变频率与 3AB 指数之间无显著的相关性 ($P > 0.05$), 而对照组的 GPA 基因突变频率与 3AB 指数之间有非常显著的负相关关系 ($P < 0.01$)。结论 在苯接触相近的情况下, 慢性苯中毒组 GPA NP 和 GPA NN 基因突变频率均高于对照组 (P 值分别为 0.032 和 0.035), 证实了苯接触不是影响 GPA 基因突变频率、导致苯作业工人发生慢性苯中毒的惟一因素。慢性苯中毒组由于其 DNA 损伤修复能力较低, 个体易感性较强, 个体 DNA 损伤修复能力低下使其接触苯时发生慢性苯中毒的危险性增加。

关键词: 苯接触; 个体易感性; 慢性苯中毒; GPA 基因突变频率

中图分类号: R135.12 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2007)03-0147-04

Study on correlation factor of chronic benzene poisoning risk with glycophorin A gene mutation assay

ZHAO Yong-cheng¹, YOU Li¹, LI Ke-qiu², LIU Qiang¹, SHI Da-wei¹, WANG Ji-xian¹

(1. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science, Tianjin 300192, China; 2. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract: **Objective** Using glycophorin A (GPA) gene mutation assay to explore the correlation factor for the risk of chronic benzene poisoning in benzene exposed workers. **Method** The peripheral erythrocytes from 122 benzene exposed workers were bound with fluorescein-labeled monoclonal antibodies after isolating and fixing using the flow cytometry (FCM) to detect GPA gene mutation, then to analyze the relationship between individual sensitivity and chronic benzene poisoning. **Result** The results showed that the accumulative exposure score in chronic benzene poisoning group was 45.20 ± 21.62 , while the score in benzene exposed group was nearly the same 45.74 ± 17.39 , there was no difference between them ($P = 0.702$), there was also no significant correlation between 3AB (3-aminodenzamide), index and GPA gene mutation frequency in benzene poisoning group ($P > 0.05$). But there was obviously negative correlation between 3AB index and GPA gene mutation frequency in benzene exposed group ($P < 0.01$). It seems to suggest that there is some difference in DNA repair ability between these two groups. **Conclusion** Despite that the benzene exposure level in these two groups was similar, but GPA mutation frequency in benzene poisoning group was obviously higher than that of benzene exposed group, suggesting that benzene exposure level is not the only factor affected GPA gene mutation frequency and occurrence of chronic benzene poisoning. Owing to the individual genetic susceptibility in benzene poisoning group is much higher than that of benzene exposed group because of their low DNA repair ability, which might be the important cause to lead higher risk of chronic benzene poisoning.

Key words: Benzene exposure; Individual susceptibility; Chronic benzene poisoning; GPA gene mutation frequency

长期接触一定浓度的苯可以引起慢性苯中毒。慢性苯中毒是苯造成的骨髓干细胞的遗传损伤和机体对此损伤的修复之间失去平衡的结果。苯的活性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, 能在一定限度上识别并修复各种 DNA 损伤, 以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^[1~4], 可能损害骨髓造血功能, 导致苯中毒。所以, 个体的 DNA 修复能力即个体易感性在慢性苯中毒的发病过程中应该具有重要作用^[5]。在本研究中, 我们应用血型糖蛋白 A (glycophorin,

收稿日期: 2006-11-01; 修回日期: 2007-02-12

基金项目: 天津市自然科学基金 (编号: 043610011)

作者简介: 赵永成 (1960-), 男, 研究员, 研究方向: 分子流行病学与卫生统计。

GPA) 基因突变分析技术探寻影响苯作业工人发生慢性苯中毒危险的相关因素。

1 材料与方法

1.1 样品来源

样品来源于我国天津、大连、锦州、开封、郑州等地苯作业工人, 苯中毒的诊断均由当地职业病防治院/所诊断, 对照是苯中毒患者的同事, 此人群是中国疾病预防控制中心与美国国家癌症研究所 (NCI) 合作进行的回顾性队列研究中的成员。每个研究对象采集上肢静脉血 1.5 ml 于真空肝素抗凝管内混匀, 置冰盒中, 12 h 内运回实验室进行实验。

1.2 主要试剂

MN 分型血清购自上海血液中心血型参比实验室, MN 单克隆抗体购自英国血型参比实验室 (Bristol)。

1.3 方法

1.3.1 血清分型 用 MN 分型血清鉴别血样是否为 MN 杂合子。

1.3.2 细胞处理 参照 Langlois BR6^[6, 7] 方法和本室前期工作建立起来的 BR6-1W1 方法^[8] 进行细胞处理。先用 37% 的甲醛固定红细胞, 然后用荧光抗体 6A7-PE 和 BRIC157-FITC 在暗处标记染色 1 h。上流式细胞仪检测之前加入 PI, 过目筛网, 使细胞数达到 10⁶ cell/ml。

1.3.3 样品检测 用流式细胞仪检测, 采用氩离子激光器, 激发波长 488 nm, 检测变异的红细胞。

1.3.4 变异红细胞的确定 按照 Langlois 的 BR6 方法, 设荧光标记兔抗鼠 IgG 二抗为阴性对照, 以上述 3 种抗体分别结合的 MM、MN、NN 3 种血型的红细胞混合样品为阳性对照, 设定标准窗口。用标准 MN、NN、MM 和小鼠红细胞荧光标记染色后混合, 同一样品作不同染色后混合, 测定这些混合样品, 确定仪器的补偿增益、单抗的敏感性、特异性以及变异细胞的定位。根据标准样品中 MM、MN、NN 的位置, 并视待测样品中 MN 的荧光强度范围的偏移作适当调整, 以 MN 的绿色荧光强度范围的 80% 作为 NΦ 出现区域, 红色荧光强度范围由标准 NN 细胞确定。NN 与 NΦ 相邻, 范围相同。

1.3.5 CB 微核 (胞质阻断微核 CBMN) + 3AB (3-氨基苯甲酰胺, 3-aminobenzamide) 指数实验方法 观察 1 000 个双核细胞所见的微核总数为微核率, 分别计算加入氢醌染毒后, 添加 3AB 及不添加 3AB 两组的微核率, 计算 CB 微核 + 3AB 指数 (I), 计算公式为: $I = 1 - \text{CBMN} / \text{CBMN} (+3\text{AB})$ 。

1.3.6 苯接触累积评分 按苯接触评价方法^[9] 进行苯接触水平评估, 将工人的苯接触水平 $\leq 40 \text{ mg/m}^3$ 的环境中工作 1 年其接触评分为 1, 接触水平在 40 ~ 100 mg/m^3 的环境下工作 1 年其接触评分为 2, 接触水平在 $> 100 \text{ mg/m}^3$ 的环境下工作 1 年其接触评分为 3。接苯浓度的累积接触评分计算公式为: 累积接触评分 = $\sum$ 接触评分 $\times$ 接触时间 (工龄)。

2 结果与分析

2.1 基本情况及 GPA 突变频率

研究对象均为汉族, 平均年龄为 54.9 岁。研究对象中, 男性 37 例, 占 30.3%; 女性 85 例, 占 69.7%; 平均苯作业工龄为 16.9 年, 详见表 1。

表 1 两组间的基本情况和 GPA 突变频率结果比较

项 目	组 别		检验统计量		P 值
	苯中毒组	对照组	t 值	Wilcoxon W	
例数	40	82			
年龄 (岁)	56.6 $\pm$ 10.8	54.2 $\pm$ 9.6	1.259		0.211
性别	男	10 (25.0%)	0.799 (χ^2)		0.371
	女	30 (75.0%)			
工龄 (年)	16.7 $\pm$ 7.3	17.0 $\pm$ 5.3	-0.300 [#]	2.339.50	0.765 [#] / 0.510
累积评分	45.20 $\pm$ 21.62	45.74 $\pm$ 17.39	-0.139 [#]	2.390.00	0.890 [#] / 0.702
GPA NΦ ($\times 10^{-6}$)	48.48 $\pm$ 31.52	29.50, 25.25 ^{**}		4.650.00	0.032
GPA NN ($\times 10^{-6}$)	86.83 $\pm$ 54.33	52.50, 36.50 ^{**}		4.656.00	0.035
GPA NΦ + NN ($\times 10^{-6}$)	135.30 $\pm$ 83.35	82.00, 65.75 ^{**}		4.631.00	0.025

注: * 该指标经正态性检验, 不符合正态分布, 用中位数和四分位间距进行统计描述;

该指标因方差不齐 ($F = 8.006$ $P = 0.005$; $F = 5.291$ $P = 0.023$) 而采用 t' 检验。同时采用了非参数检验 (Wilcoxon 两样本比较的秩和检验) 方法来进一步验证。

由表 1 可见, 两组间的年龄和工龄都很相近 ($P > 0.05$), 慢性苯中毒组的累积接触评分为 45.20 $\pm$ 21.62, 对照组的累积接触评分为 45.74 $\pm$ 17.39, 两组间差异无统计学意义 (Wilcoxon 秩和检验, $P = 0.702$), 揭示本次研究慢性苯中毒组和对照组的苯接触情况非常接近。但是从表 1 中同样可以看出, 在苯接触相近的情况下, 慢性苯中毒组的 GPA NΦ 突变频率 (48.48 $\pm$ 31.52) 高于对照组 (29.50, 25.25), 两组之间的差异具有统计学意义 (Wilcoxon 秩和检验, $P = 0.032$); 慢性苯中毒组的 GPA NN 突变频率 (86.83 $\pm$ 54.33) 与对照组 (52.50, 36.50) 差异也有统计学意义 (Wilcoxon 秩和检验, $P = 0.035$); 而且慢性苯中毒组的总突变频率 (135.30 $\pm$ 83.35) 明显高于对照组 (82.00, 65.75) (Wilcoxon 秩和检验, $P = 0.025$)。说明长期接触一定浓度的苯能够导致苯作业工人发生慢性苯中毒, 但同时也证实了苯接触不是影响 GPA 基因突变频率, 导致苯作业工人发生慢性

苯中毒的惟一因素。

2.2 GPA 突变频率及相关因素的相关分析

CB 微核+3AB 指数^[10,11]是从细胞水平上,通过检测细胞在接受相同剂量化学染毒、用 3AB 来抑制 DNA 修复酶活性,并经过相同时间的细胞培养后所形成的微核数量来判断个体的遗传易感性;3AB 指数越大,则说明个体的 DNA 修复能力越强,它反映的

表 2 GPA 基因突变频率 ($\times 10^{-6}$) 及相关因素的 Spearman 相关分析

组别	因素	GPA NΦ		GPA NN		GPA NΦ+GPA NN	
		r_s	P 值	r_s	P 值	r_s	P 值
中毒组	CB 微核+3AB 指数	-0.073	0.655	-0.146	0.367	-0.124	0.447
对照组	CB 微核+3AB 指数	-0.752	0.000	-0.793	0.000	-0.782	0.000

提示,慢性苯中毒组与对照组的 DNA 损伤修复能力不同。在苯接触相近的情况下,慢性苯中毒组由于其 DNA 损伤修复能力较低,个体易感性较强,导致 GPA 基因突变频率高于对照组。

3 讨论

GPA 是分布于人类红细胞 (RBC) 表面的一种重要的血型糖蛋白, GPA 分子在人群中共有 3 种血型表现型 MM、NN、MN。在诱变剂的作用下,骨髓干细胞 MN 基因发生突变, M 基因不表达或突变为 N 基因, N 基因不表达或突变为 M 基因,因此在 MN 个体外周血 RBC 中存在 4 种 GPA 变异体细胞: MΦ、NΦ、MM、NN。随着诱变剂剂量的增加,骨髓干细胞突变体增加,外周血 RBC 突变体亦增加。由于 GPA 基因突变没有明显的选择优势,所产生的突变体在体内微环境选择过程中可免受不利因素的干扰而在体内长期存活。通过检测由骨髓干细胞分化而来的外周血 RBC 的 GPA 基因突变体频率,就可以真实地反映干细胞基因突变的累积情况。骨髓是苯的靶器官,但在实际工作中,直接采集研究对象的骨髓来测定干细胞的遗传损伤是不可行的。GPA 基因突变可通过采集外周血红细胞就能进行测定^[12],并且反映了骨髓干细胞的遗传损伤水平,是骨髓干细胞遗传损伤的良好的替代性生物标志物 (surrogate biomarker)。因此, GPA 基因突变分析可用于人类遗传损伤的生物监测,特别是作为职业有害因素对健康影响的监测指标有着广阔的应用前景。

GPA 基因突变分析是体细胞突变检测方法之一,它用于慢性苯中毒研究的优越性主要有:(1)外周血红细胞 GPA 基因突变频率反应的主要是骨髓干细胞的基因突变水平,而骨髓干细胞正是苯毒性作用的靶细胞;(2)GPA 基因突变是中性突变,发生 GPA 基因突变的干细胞能在体内长期存在,因此 GPA 基因突变水

是个体细胞水平的修复,反映的是包括 DNA 损伤修复在内的更为综合的修复。

GPA 基因突变频率与作为反映个体易感性的 3AB 指数之间的相关性分析显示,苯中毒组的 GPA 基因突变频率与 3AB 指数之间无显著的相关性 ($P>0.05$),而对照组的 GPA 基因突变频率与 3AB 指数之间有非常显著的负相关关系 ($P<0.01$)。详见表 2。

平反应了个体长期接触苯造成的累积的遗传损伤,而慢性苯中毒正是苯毒性作用长期不断积累的后果。

应用 GPA 基因突变分析技术,通过相应的统计学分析方法分析苯接触、个体易感性与慢性苯中毒的关系揭示了苯接触和个体易感性因素是影响苯作业工人发生慢性苯中毒危险的重要因素。一方面,长期接触一定浓度的苯可以导致苯作业工人发生慢性苯中毒。另一方面, DNA 修复能力的高低是判别损害预后及对损害作用敏感性程度的重要依据。DNA 损伤修复能力低下即个体易感性强导致发生慢性苯中毒的危险增加。苯接触和个体易感性的共同作用增加了机体发生苯中毒的风险。在苯接触相近的情况下,个体易感性是苯作业工人发生苯中毒与否的决定因素。评价苯作业工人的个体易感性,可以揭示在同一职业接触条件下,有些人中毒而有些人不中毒的本质,从而更好地评估苯对人类的危险度和评价预防措施的效果。

参考文献:

- [1] Rothman N, Haas R, Hayes R B, et al. Benzene induces gene-duplicating but not gene-inactivating mutations at the glycophorin A locus in exposed humans [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92 (9): 4069-4073.
- [2] 李桂兰, 李凌凇, 郭卫红, 等. 苯接触工人外周血染色体损伤研究 [J]. 卫生研究, 2002, 31: 410-413.
- [3] 高耘, 邢彩虹, 戴宇飞, 等. 苯中毒病人外周血淋巴细胞染色体畸变分析 [J]. 中国卫生监督, 2002, 9 (2): 81-83.
- [4] Bogadi-Sare A, Bruinen V, Turk R, et al. Genotoxic effects in workers exposed to benzene: with special reference to exposure biomarkers and confounding factors [J]. Ind Health, 1997, 35 (3): 367-373.
- [5] 桂红星, 程文英, 麦智广. GPA 突变分析在辐射生物剂量学中的研究现状 [J]. 国外医学·放射医学核医学分册, 1996, 20 (5): 227-230.
- [6] Langlois R G, Nisbet B A, Bigbee W L, et al. An improved flow cytometric assay for somatic mutation at the glycophorin A locus in humans [J]. Cytometry, 1990, 11: 513.

- [7] Langois R G, Bigbee W L, Jensen R H. Flow cytometric characterization of normal and variant cells with monoclonal antibodies specific for gly-cophorin A [J]. J Immunol, 1995 134: 4009.
- [8] 于文儒, 陈振军, 樊体强, 等. 简易血型糖蛋白 A 基因位点突变检测方法建立 [J]. 中国学术期刊 (科技快报), 1997 4: 491.
- [9] Dosemeci M, Yin S N, Linet M, et al. Indirect validation of benzene exposure assessment by association with benene poisoning [J]. Environ Health Perspect, 1996 104 (Suppl 6): 1343-1347.
- [10] Kasid U N, Stefanik D F, Lubet R A, et al. Relationship between

DNA strand breaks and inhibition of poly (ADP-ribosylation): enhance-ment of carcinogen-induced transformation [J]. Carcinogenesis 1986, 7 (2): 327-330.

- [11] Catena C, Conti D, Villani P, et al. Micronuclei and 3AB index in human and canine lymphocytes after X-irradiation [J]. Mutat Res. 1994, 312 (1): 1-8.

- [12] 王继先, 金瑾珍, 白玉书, 等. 放射生物剂量学 [M]. 北京: 原子能出版社, 1997: 111-113.

· 事故调查 ·

一起有机溶剂急性中毒事故的调查

朱旭 施健, 杜成, 张建新

(昆山市疾病预防控制中心, 江苏 昆山 215301)

2006 年 3 月 27 日, 昆山市某机电公司发生一起急性有机溶剂中毒事故, 1 名职工中毒, 现将调查结果报告如下。

1 事发经过

2006 年 3 月 27 日 8:40 某机电公司整装车间, 因设备冷冻液、机油泄漏, 派一名员工用“香蕉水”溶解油污后, 用抹布擦干, 以清洗漏在地面上的油污 (面积约 10m^2)。整个清洗过程持续约 2 h, 共用“香蕉水”约 10 kg。作业期间, 员工仅佩戴普通纱布口罩和手套。清洗过程中, 员工感觉头晕、胸闷、心悸, 中午未进餐, 后决定离厂休息。13:20 该员工在厂区外晕倒, 14:00 被送入附近医院抢救。

2 现场调查

该公司主要生产和组装中央空调系列产品, 整装车间面积约有 $4\,000\text{m}^2$, 现有员工 250 人, 生产工艺过程中存在的职业病危害因素主要为噪声, 2005 年检测冲压作业点噪声为 89.3 dB (每天作业时间为 8 h), 超过国家职业卫生标准, 该企业在无法进行技术改革的情况下, 着重加强了对员工的劳动保护, 为噪声作业岗位的员工佩戴了耳塞等有效的防护用品。有时设备冷冻液、机油滴漏在地面上, 采用“香蕉水”清洗, 但未发生过类似事件。

调查时现场已被破坏, 车间无系统通风装置, 清洗处因设备密集而空间狭小, 通风不良。

3 临床资料

患者, 男, 24 岁。在直接接触“香蕉水”的工作中出现头晕、胸闷、心悸, 随后晕倒, 送达医院经抢救苏醒后, 出现烦躁不安及在医院大厅随地小便等精神异常行为。患者既往体格健康, 无精神病史, 进入该公司前未曾接触过“香蕉水”及类似化学物品, 家族成员中无精神病史者。入院体检: $T\,36.8^\circ\text{C}$, $P\,108\text{次}/\text{min}$, $R\,23\text{次}/\text{min}$, $BP\,86/59\text{mm Hg}$ 。急性病容, 全身皮肤黏膜无瘀点、瘀斑, 无黄染。意识模糊, 言语表达能力差, 检查欠配合。双侧瞳孔等大等圆, 直径 3 mm, 对光反应尚灵敏, 唇无发绀, 呼吸稍促, 双肺呼吸音粗, 未

闻及明显干性啰音, 双肺底部可及少许湿性啰音。心率 108 次/min, 心音较强, 各瓣膜听诊区未闻及病理性杂音。腹平软, 无明显压痛, 肝脾肋下未触及, 肝区无叩击痛。眼球、舌、双手无震颤, 指指实验、指鼻实验、轮替实验不准确。四肢肌力及肌张力正常, 角膜反射、膝反射等生理反射存在, 巴彬斯基征、奥本海姆征等病理反射未引出。实验室检查: $WBC\,10.8\times 10^9/\text{L}$, 尿常规、肝功能、电解质、凝血功能异常, 肌酐 $90.9\text{U}/\text{L}$ (正常参考值 $18\sim 88\text{U}/\text{L}$), 肌酸激酶 $240\text{U}/\text{L}$ (正常参考值 $25\sim 175\text{U}/\text{L}$)。脑 CT、脑电图检查未见异常。经精神科会诊, 排除“精神病”, 初步诊断为“急性香蕉水中毒”, 后经职业病机构诊断为“职业性急性轻度甲苯中毒”。经对症、防治感染、支持等治疗, 5 d 后症状明显好转, 精神症状消失, 8 d 后痊愈出院。

4 讨论

“香蕉水”为混合有机溶剂, 以二甲苯和甲苯为主。二甲苯和甲苯主要用于油漆、喷漆、橡胶、皮革等行业, 有较强的挥发性和毒性, 急性毒作用主要为中枢神经系统的麻醉作用, 短时间大量接触可出现意识模糊、意识障碍, 重者可致呼吸、心跳停止^[1]。

分析本次事故发生的主要原因: (1) 该公司生产管理人员职业病防治观念意识淡薄, 对有机溶剂可能引起中毒缺乏必要的常识, 在该患者已经出现头晕、胸闷、心悸等中毒症状后仍未能及时采取有效的防治措施。(2) 短时间内大量使用“香蕉水”, 且车间内无机械通风设施, 导致车间内有机溶剂大量挥发到空气中使浓度急剧升高。(3) 工人作业时未佩戴有效的防毒面具和手套, 在高浓度环境中持续工作约 2 h, 导致吸入大量有毒气体。故只有对企业有机溶剂加强监管, 及时发现生产活动中的职业隐患, 通过宣教及培训, 提高企业管理层及员工本人的职业防护意识, 才能杜绝此类中毒事件的再次发生。

参考文献:

- [1] 金泰罗. 职业卫生与职业医学 [M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 209-210.