

DNA加合物作为氯乙烯接触生物标志物的研究

缪文彬^{1,2}, 王威¹, 郑盈佳¹, 冀芳¹, 夏昭林¹

(1 复旦大学公共卫生学院劳动卫生毒理学教研室与公共卫生安全教育部重点实验室, 上海 200032 2 上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

摘要: 目的 探讨 DNA加合物作为氯乙烯作业工人的暴露生物标志物的可行性。方法 采用酶联免疫吸附法对 43名氯乙烯接触工人淋巴细胞中 1-氮-6-乙烯(脱氧)腺嘌呤含量进行测定。结果 相关分析和偏相关分析结果显示, 1-氮-6-乙烯(脱氧)腺嘌呤含量与累积接触剂量存在相关关系 ($P < 0.05$)。未发现年龄、性别、吸烟和饮酒对 1-氮-6-乙烯(脱氧)腺嘌呤含量的影响。累积接触剂量 $> 23\ 740\ \text{mg}$ 组 1-氮-6-乙烯(脱氧)腺嘌呤含量显著高于 $< 8\ 150\ \text{mg}$ 组, 趋势卡方检验结果显示 1-氮-6-乙烯(脱氧)腺嘌呤的形成与累积接触剂量存在明显的剂量-反应关系。结论 1-氮-6-乙烯(脱氧)腺嘌呤可作为氯乙烯暴露的接触生物标志物。

关键词: 氯乙烯; DNA加合物; 累积接触剂量; 接触生物标志物

中图分类号: R135.1; R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2009)02-0087-04

Study on DNA adduct as the exposure biomarker to vinyl chloride monomer in workers

MIAO Wenbin^{1,2}; WANG Wei¹; ZHENG Yingjia¹; JI Fang¹; XIA Zhaojin¹

(1. Department of Occupational Health School of Public Health Fudan University Key Laboratory of Public Health and Safety of Ministry of Education Shanghai 200032 China; 2. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Shanghai 200135 China)

Abstract: Objective To explore the possibility of DNA adduct to be the exposure biomarker to vinyl chloride monomer in workers. Methods Levels of 1-N(6)-etheno (deoxy) adenosine (ϵ -dA) in the peripheral leukocytes were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 43 VCM-exposed workers. Results Significant correlation was found between ϵ -dA and VCM exposure by correlation analysis and partial correlation analysis ($P < 0.05$). Effects of gender, age, smoking and alcohol drinking on the levels of ϵ -dA were not found. Levels of ϵ -dA in workers with exposure dose more than 23 740 mg were significantly higher than that less than 8 150 mg ($P = 0.006$). DNA adduct showed significantly increase with VCM exposure doses as a dose-dependant manner. Conclusion ϵ -dA could be a biomarker of VCM exposure in workers.

Key words: Vinyl chloride monomer (VCM); DNA adduct; Cumulative exposure dose; Exposure biomarker

氯乙烯 (vinyl chloride monomer, VCM) 是一种重要的化工原料, 主要应用于合成聚氯乙烯, 用于塑料工业。氯乙烯已被确定为人类致癌物, 可导致人肝血管肉瘤。流行病学调查提示氯乙烯可能是一种多系统、多器官的致癌剂, 可诱发人类多种肿瘤, 尤其是肝细胞癌和肝脏以外的消化系统肿瘤等。

VCM在体内主要经 CYP2E1 氧化为氯乙烯环氧化物 (chloroethylene oxide, CEO)。一部分 CEO 直接重排为氯乙醛 (chloroacetaldehyde, CAA), 经乙醛脱氢酶 (ALDH) 氧化为氯乙酸, 再和谷胱甘肽硫转移酶 (glutathione S-transferases, GSTs) 结合转化成无毒物质排出体外。另一部分 CEO 在 GST 作用下失去活性, 排出体外^[1]。研究发现, CAA 和 CEO 都是

强烷化剂, 可与 DNA 和蛋白质等大分子物质结合形成加合物。目前已知可形成的 4 种 DNA 加合物^[2]: 7-(2'-氧代乙基)鸟嘌呤、1-氮-6-乙烯(脱氧)腺嘌呤、3-氮-4-乙烯(脱氧)胞嘧啶和氮-2-3-乙烯(脱氧)鸟嘌呤。这些加合物可诱导 DNA 或 RNA 合成错误, 导致遗传物质损伤, 进而启动致癌过程。研究表明, 血细胞 DNA 加合物与毒物接触剂量或靶器官内 DNA 加合物含量存在一定的相关性, 并在一定程度上反映个体暴露水平, 提供与关键的细胞大分子反应的确切剂量^[3]。同时, 尽管 1-氮-6-乙烯(脱氧)腺嘌呤 [1-N(6)-etheno (deoxy) adenosine, ϵ -dA] 含量低, 但其具有较强的前致突变性, 且半衰期较长、修复效率较低及在组织的含量有较好的稳定性的特性, 故本次研究选取血细胞中此加合物进行研究^[2]。

本研究分析不同累积接触剂量工人外周血 DNA 加合物情况以及影响因素, 探讨在目前接触条件下, VCM 能否对 DNA 造成损伤, 为研究 VCM 的特异接触生物标志物以及毒作用机制提供依据。

收稿日期: 2008-09-08 修回日期: 2008-11-20

基金项目: 国家自然科学基金 (30671740), 国家 973 项目 (2002CB512909)

作者简介: 缪文彬 (1982-), 男, 硕士, 主要从事职业卫生与毒理学研究。

1 对象与方法

1.1 研究对象

从上海某氯碱化工厂接触 VCM 工人中, 选择 VCM 接触超过一年, 并完整填写调查表及抽取血样的工人为研究对象, 剔除曾患乙肝、甲肝和血吸虫肝病者, 共获得符合条件的工人 43 人, 其中男 29 名、女 14 名, 均为汉族。经知情同意, 各研究对象采静脉血 5 ml 非抗凝处理, -80℃ 冷冻保存。

1.2 问卷调查

内容包括姓名、年龄、文化程度等一般情况, 吸烟、饮酒史, 车间、工段、现工种工龄等职业史, 服药史, 肝炎和血吸虫病等病史。

1.3 个人 VCM 累积接触剂量估计

以工人每天实际接触 2 h 每月工作日平均 20 d 一个月总接触 2 400 min 计, 计算公式:

累积接触剂量 = \sum (月接触 VCM 平均浓度 \times 2400 \times 肺通气量 \times 70% \div 1000)

男性肺通气量均值 6 500 ml/min; 女性肺通气量均值 4 300 ml/min 30% 为无效腔。

1.4 DNA 加合物检测

采用酚氯仿抽提法提取淋巴细胞基因组 DNA, 参考 LY 方法^[4] 检测 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤水平, ELISA 板中每孔加入临时配制的 0.02 ng/ μ l CAA-DNA (氯乙醛-DNA) 的 PBS 液置 37℃ 培养箱 7 h 后, 加入 100 μ l I Block 封闭液, 置 37℃ 培养箱 90 min 后, 每孔加入临时配制的 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤标准溶液和 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤单克隆抗体后放置 37℃ 培养箱 90 min 后, 加入 100 μ l 抗稀释液, 最后在避光的条件下, 每孔加入 100 μ l 的底物, 避光室温放置 30 min 用 Wallace 1420 multilabel counter 检测。

1.5 统计分析

采用 SPSS 12.0 (SPSS Inc Chicago IL USA) 进行数据分析。应用单因素方差分析和多因素线性回归分析各影响因素对 DNA 加合物的影响, 应用协方差分析不同累积接触剂量分组 DNA 加合物的变化, 应用趋势卡方检验分析不同累积接触剂量分组 DNA 加合物异常率变化趋势。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 研究对象一般情况

VCM 接触工人中不吸烟者 24 人、吸烟者 19 人。不饮酒或少饮酒者 33 人、饮酒者 10 人。年龄 21 ~ 51 岁 (中位数 37 岁), 累积接触剂量 460 ~ 67 450 mg (中位数 8 150 mg)。

2.2 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤 (ϵ dA) 与氯乙烯累积接触剂量的关系

由图 1 可见, 氯乙烯职业接触工人的 ϵ dA 和累积接触剂量呈正相关 ($P < 0.01$), 随着累积接触剂量的增加, ϵ dA 含量增加。

回归方程: DNA adduct (ϵ dA) = 2.67 + 0.06 \times DOSE ($r = 0.392$ $P = 0.009$)

固定年龄、性别、饮酒和吸烟 4 项指标后, 对 ϵ dA 和累积接触剂量进行偏相关分析。结果表明, ϵ dA 与累积接触剂量正相关 ($r = 0.407$ $P = 0.010$)。

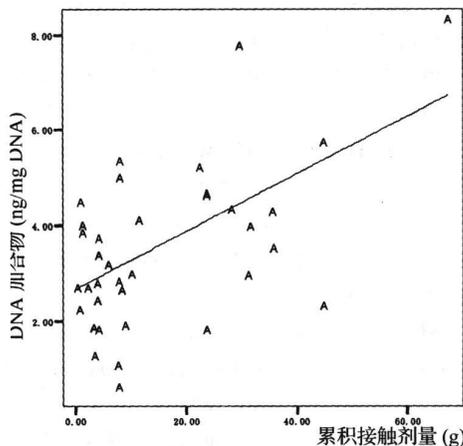


图 1 累积接触剂量和 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤相关分析

2.3 氯乙烯职业接触工人 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤影响因素分析

分别以性别、年龄、饮酒和吸烟为自变量, ϵ dA 为应变量进行单因素方差分析, 结果见表 1。

表 1 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤影响因素单因素分析

因素	人数	1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤 (ng/mg DNA)
性别 男	29	3.31 \pm 1.76
女	14	4.18 \pm 3.30
吸烟 不吸烟	24	3.70 \pm 2.89
吸烟	19	3.45 \pm 1.53
饮酒 不饮酒或少饮酒	33	3.73 \pm 2.42
经常饮酒	10	3.14 \pm 2.24
年龄 \leq 37 岁	22	3.26 \pm 1.89
$>$ 37 岁	21	3.94 \pm 2.79

女性的 ϵ dA 水平高于男性, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。年龄按中位数 37 岁划分, 分为 \leq 37 岁和 $>$ 37 岁两组, \leq 37 岁组的 ϵ dA 含量为 (3.26 \pm 1.89) ng/mg DNA, 而 $>$ 37 岁组的 ϵ dA 含量为 (3.94 \pm 2.79) ng/mg DNA, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。未发现吸烟和饮酒对 ϵ dA 的影响 ($P > 0.05$)。

以性别、年龄、饮酒和吸烟为自变量, ϵ dA为应变量进行多因素线性回归分析。结果显示性别、年龄、吸烟和饮酒未对 ϵ dA含量有显著影响 (见表 2)。

表 2 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤影响因素多因素分析

变量	β	SE (β)	t 值	P 值
常数	1.577	2.779	0.568	0.574
性别	0.907	1.072	0.845	0.403
吸烟	0.337	1.022	0.330	0.743
饮酒	-0.253	0.996	-0.254	0.801
年龄	0.430	0.804	0.534	0.596

2.4 不同累积接触剂量组 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤的变化

按照累积接触剂量将 VCM 接触工人分为 < 8 150 mg、8 150 mg~ 和 23 740 mg~ 3 组来观察不同累积接触剂量水平下 ϵ dA 的变化。从表 3 可见, 随着累积接触剂量的增加, ϵ dA 增加, 当累积接触剂量大于 23 740 mg 时, ϵ dA 明显增加 ($P=0.006$)。

表 3 不同累积接触剂量组 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤含量

累积接触剂量 (mg)	人数	1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤 (ng/mgDNA)
< 8 150	21	2.82 ± 1.26
8 150 ~	11	3.32 ± 1.77
23 740 ~	11	5.35 ± 3.53 **

与 < 8 150 mg 组比较, ** $P < 0.01$

2.5 不同累积接触剂量组 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤异常率分析

根据数据分布情况, 采用百分位数法制定各指标参考值范围, 以 < 8 150 mg 组人群 ϵ dA 水平的第 95% 位数作为正常值上限, 当个体 ϵ dA 水平小于该值时, 判为正常, 否则为异常。 ϵ dA 的正常上限值为 5.21 ng/mgDNA, 各组的异常率见表 4。随着累积接触剂量的增加, ϵ dA 含量异常率增高, 表现出明显的剂量-反应关系 ($P=0.014$)。

表 4 不同累积接触剂量组 ϵ dA 异常率比较

累积接触剂量 (mg)	正常人数	异常人数	异常率 (%)	趋势 χ^2	P 值
< 8 150	20	1	5.00		
8 150 ~	10	1	9.10	6.000	0.014
23 740 ~	7	4	36.36		

3 讨论

致癌物的接触生物标志物主要有两种: 致癌物与 DNA、RNA 或蛋白质等生物大分子的结合物和致癌物在体液如血浆或尿液中的原型或代谢物。许多化学物质在体内清除快, 血浆或尿液等化学物质及其代谢物含量只能反映近期的接触情况, 而 DNA、RNA 或蛋白质等共价结合物相对稳定, 可以反映数月或数年等较

长时间的接触量, 因此可以作为反映机体长期接触遗传毒性物质的生物标志物^[5,6]。

大量研究表明, 氯乙烯代谢产物可与 DNA 等大分子物质结合形成加合物, 如 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤, 进而出现致突变和致癌效应。虽然 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤含量低, 但其具有较强的前致突变性, 半衰期较其他加合物长且修复效率较低, 在组织的含量稳定性较好。因此 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤相对于其他 3 种 DNA 加合物代表性较好, 故本研究选取淋巴细胞中 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤进行检测, 研究其与累积接触剂量的相关关系。结果表明随着累积接触剂量的升高, ϵ dA 含量增加, 两者存在明显的相关关系 ($P < 0.01$)。以 < 8 150 mg 组人群 ϵ dA 水平的第 95% 位数作为正常值上限, 得出 ϵ dA 正常值范围为 (0.00 ~ 5.21) ng/mgDNA, 8 150 mg~ 组和 > 23 740 mg 组分别有 9.10% 的工人和 36.36% 的工人超出该限值, 趋势卡方检验 $P < 0.05$ 说明 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤的形成与累积接触剂量存在明显的剂量-反应关系, 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤作为氯乙烯接触生物标志物, 可以较准确地评估工人氯乙烯接触剂量, 而且 DNA 加合物比血浆或尿液中的毒物或代谢物的浓度更能反映生物有效作用剂量^[7]。

本研究以氯乙烯职业接触工人为研究对象, 调查年龄、性别、吸烟、饮酒等因素对外周血淋巴细胞 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤水平的影响。结果表明, 年龄、性别、吸烟、饮酒均对 ϵ dA 水平无明显的影响。

随着年龄的增长, 人体对 DNA 损伤的修复能力下降, 以及 DNA 损伤逐渐积累, DNA 加合物水平有所升高。但本研究 < 37 岁组和 > 37 岁组 ϵ dA 含量差异无统计学意义, DNA 加合物含量主要受体内代谢状况、DNA 损伤修复能力等影响^[8-10], 可能氯乙烯实际接触量较低, DNA 损伤还未大大超出机体 DNA 损伤修复能力, 机体尚能有效地修复部分 DNA 损伤, DNA 损伤未积累到一定水平, 导致年龄对 ϵ dA 水平无明显影响。此外还可能与研究对象大多处于同一年龄段有关。

本次研究未发现吸烟和饮酒对 ϵ dA 水平产生明显影响, 可能与 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤主要是接触氯乙烯而产生的 DNA 加合物有关。大量饮酒和吸烟可导致机体某些 DNA 加合物如 8 羟基脱氧鸟苷或 ⁶ 甲基脱氧鸟苷增加, 但尚未有研究表明大量饮酒和吸烟可以导致机体 1 氮-6 乙烯 (脱氧) 腺嘌呤增加^[1,2]。此外男性和女性之间 ϵ dA 含量差异无统计学意义, 但有女性比男性含量高的趋势, 男性与女性生理功能或体内酶的表达和活性不同, 从而机体对致

癌物的代谢能力及对 DNA损伤修复能力有所不同,可能会影响活性代谢产物及 DNA加合物的含量。本研究未发现性别对 εdA水平产生明显影响,可能说明导致机体产生 1氮-6-乙烯(脱氧)腺嘌呤的氯乙烯接触作用更加明显。

综上所述,1氮-6-乙烯(脱氧)腺嘌呤与氯乙烯累积接触剂量存在相关关系,并随着累积接触剂量的升高,接触工人 DNA加合物含量和异常率均增加。本次研究初步探讨 1氮-6-乙烯(脱氧)腺嘌呤与氯乙烯暴露之间的关系,并初步表明 1氮-6-乙烯(脱氧)腺嘌呤可作为氯乙烯的接触生物标志物,但未对其他 3种加合物与氯乙烯暴露之间的关系做进一步研究。因此,应首先完善其余 DNA加合物的检测方法,同时进一步开展大规模的氯乙烯接触人群分子流行病学研究,筛选和确认可靠的接触生物标志物,更好地保护氯乙烯接触工人的健康。

参考文献:

[1] Ghissassi F, Baubín A, Bartsch H. Metabolic activation of vinyl chloride by rat liver microsomes: low-dose kinetics and involvement of cytochrome P450 2E1 [J]. *Biochem Pharmacol* 1998; 55 (9): 1445-1452

[2] Dosanjh M K, Chenna A, Kim E, et al. All four known cyclic adducts formed in DNA by the vinyl chloride metabolite chloroacetaldehyde are released by a human DNA glycosylase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91 (3): 1024-1028.

[3] Mustonen R, Seltoket B, Hemminki K. Smoking-related DNA adducts: 32P-postlabeling analysis of 7-methylguanine in human bronchial and lymphocyte DNA [J]. *Carcinogenesis* 1993; 14 (1): 151-154

[4] Li Y, Maron M J, Zipporich J, et al. The role of XRCC1 polymorphisms in base excision repair of ethenoDNA adducts in French vinyl chloride workers [J]. *Int J Occup Med Environ Health* 2006; 19 (1): 45-52

[5] 谭祥林, 徐顺清, 陈剑, 等. 利用生物发光法测定人群外周淋巴细胞 DNA加合物水平 [J]. *中华预防医学杂志* 2002; 36 (6): 363-365

[6] Chaudhary A K, Nookubom R, Reddy G R, et al. Detection of endogenous methylaldehyde-deoxyguanosine adducts in human liver [J]. *Science* 1994; 265 (5178): 1580-1582

[7] Rundle A. Carcinogen-DNA adducts as a biomarker for cancer risk [J]. *Mutat Res* 2006; 600 (1-2): 23-36

[8] Cheng Y W, Chen C Y, Lin P, et al. DNA adduct level in lung tissue may act as a risk biomarker of lung cancer [J]. *Eur J Cancer* 2000; 36 (11): 1381-1388

[9] Gyorfy E, Anna L, Kovacs K, et al. Correlation between biomarkers of human exposure to genotoxins with focus on carcinogen-DNA adducts [J]. *Mutagenesis* 2008; 23 (1): 1-18

[10] Bond J A, Maudeiry J L, Wolff R K. Concentration-dependent and time-dependent formation of DNA adducts in lungs of rats exposed to diesel exhaust [J]. *Toxicology* 1990; 60 (1-2): 127-135

[11] Ogawa M, Oyama T, Ise T, et al. A comparison of covalent binding of ethanol metabolites to DNA according to A1h2 genotype [J]. *Toxicol Lett* 2007; 168 (2): 148-154

[12] Hecht S S. Progress and challenges in selected areas of tobacco carcinogenesis [J]. *Chem Res Toxicol* 2008; 21 (1): 160.

(上接第 86页)

参考文献:

[1] TOPPING D C, Bernard L G, O'Donoghue J L, et al. Hydroquinone: acute and subchronic toxicity studies with emphasis on neurobehavioral and nephrotoxic effects [J]. *Food Chem Toxicol* 2007; 45 (1): 70-78

[2] Macedo S M, Vaz S C, Lourenco E L, et al. In vivo hydroquinone exposure impairs allergic lung inflammation in rats [J]. *Toxicology* 2007; 41 (1-2): 47-57

[3] McGREGOR D. Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties [J]. *Crit Rev Toxicol* 2007; 37 (10): 887-914

[4] Gaskell M, McLuckie K, I Famer P B. Comparison of the mutagenic activity of the benzene metabolites hydroquinone and parabenzoquinone in the supF forward mutation assay: a role for minor DNA adducts formed from hydroquinone in benzene mutagenicity [J]. *Mutat Res* 2004; 554 (1-2): 387-398

[5] Gaskell M, McLuckie K, I Famer P B. Comparison of the repair of DNA damage induced by the benzene metabolites hydroquinone and parabenzoquinone: a role for hydroquinone in benzene genotoxicity [J]. *Carcinogenesis* 2005; 26 (3): 673-680

[6] Kannuché P L, Wang J, Lehmann A R. Interaction of human DNA polymerase ϵ with monoubiquitinated PCNA: A possible mechanism

for the polymerase switch in response to DNA damage [J]. *Mol Cell* 2004; 14 (4): 491-500

[7] Xin H, Lin W, Sunanasekera W, et al. The human RAD18 gene product interacts with HHR6A and HHR6B [J]. *Nucleic Acids Res* 2000; 28 (14): 2847-2854

[8] Tsuji Y, Watanabe K, Araki K, et al. Recognition of forked and single stranded DNA structures by human RAD18 complexed with RAD6B protein triggers its recruitment to stalled replication forks [J]. *Genes Cells* 2008; 13 (4): 343-354

[9] Miyase S, Tateishi S, Watanabe K, et al. Differential regulation of Rad18 through Rad6-dependent mono and polyubiquitination [J]. *J Biol Chem* 2005; 280 (1): 515-524

[10] Watanabe K, Tateishi S, Kawasumi M, et al. Rad18 guides Pol η to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination [J]. *EMBO J* 2004; 23 (19): 3886-3896

[11] Nikiforov A, Svetlova M, Solovjeva L, et al. DNA damage-induced accumulation of Rad18 protein at stalled replication forks in mammalian cells involves upstream protein phosphorylation [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323 (3): 831-837

[12] 胡恭华, 庄志雄, 夏芳莲, 等. 氢醌对 L-02肝细胞 DNA损伤及细胞周期的影响 [J]. *环境与健康杂志*, 2007; 24 (4): 201-203.