

- pigs experimentally intoxicated by paraquat [J]. Hum Exp Toxicol, 1997, 16 (12): 709-715.
- [7] 鲁新. 连续性血液灌流透析及激素冲击治疗百草枯中毒伴多器官功能衰竭 [J]. 中国危重病急救医学, 2008, 20 (7): 448-450.
- [8] 范爽, 李艳辉. 血液净化治疗在百草枯中毒中的应用 [J]. 中华急诊医学杂志, 2011, (20) 11: 1216-1217.
- [9] Yeh S T, Guo H R, Su Y S, *et al.* Protective effects of *N*-acetylcysteine treatment post acute paraquat intoxication in rats and in human lung epithelial cells [J]. Toxicology, 2006, 223 (47): 181-190.
- [10] Yoshida T, Tanaka M, Sotomatsu A, *et al.* Effect of methylprednisolone-pulse therapy on superoxide production of neutrophils [J]. Neurol Res, 1999, 21: 509-512.
- [11] Rodriguez Capote K, McCormack F X, Possmayer F. Pulmonary surfactant protein-A (SP-A) restores the surface properties of surfactant after oxidation by a mechanism that requires the Cys6 inter-chain disulfide bond and the phospholipid binding domain [J]. J Biol Chem, 2003, 278: 20461.
- [12] Ma Y T, Tian Y P, Su J L, *et al.* Influence of ambroxol on paraquat-induced lung tissue injury and change of pulmonary surfactant associated protein A in the experimental rats [J]. Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, 2006, 24: 348-351.
- [13] 夏敏, 艾伟, 孙林, 等. 大剂量氨溴索联合甲泼尼龙环磷酰胺治疗百草枯中毒的临床观察 [J]. 西部医学, 2011, 23 (10): 1924-1926.
- [14] 佟飞, 田英平, 石汉文, 等. 急性百草枯中毒大鼠肺组织中基质金属蛋白酶及其组织抑制剂表达变化的研究 [J]. 中国急救医学, 2006, 26 (1): 41-43.
- [15] 李晓岚, 高景利, 王爱田. 早期血必净联合血液灌流治疗急性百草枯中毒的疗效观察 [J]. 中国急救医学, 2008, 28 (5): 745-747.
- [16] 王泽惠, 王永进, 侯云生, 等. 阿魏酸钠对百草枯中毒大鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. 中华急诊医学杂志, 2006, 15 (7): 599-602.
- [17] 张随玉. 阿魏酸钠和思密达联合大黄对急性百草枯中毒患者器官的保护作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19 (4): 238-240.
- [18] Venkatesan N. Pulmonary protective effects of curcumin against paraquat toxicity [J]. Life Sciences, 2000, 66 (2): 19-21.
- [19] 王一镨. 积极推广盐酸戊乙奎醚 (长托宁) 在急诊领域的应用 [J]. 中华急诊医学杂志, 2006, 15 (5): 734.
- [20] 夏春秋, 仲崇俊, 张亚年. 山莨菪碱对肺缺血-再灌注损伤的保护机制 [J]. 中国微循环, 2006, 10 (3): 221-222.
- [21] Dinis Oliveira R J, Sousa C, Remiao F, *et al.* Sodium salicylate prevents paraquat-induced apoptosis in the rat lung [J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42 (1): 48-61.
- [22] Dinis Oliveira R J, Sousa C, Remiao F, *et al.* Full survival of paraquat-exposed rats after treatment with sodium salicylate [J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42 (7): 1017-1028.
- [23] Dinis Oliveira R J, Pinho P G, Ferreira A C, *et al.* Reactivity of paraquat with sodium salicylate: formation of stable complexes [J]. Toxicology, 2008, 249 (1): 130-139.
- [24] 谢东辉, 章辉, 郑兰荣. 乌司他丁对百草枯中毒全身炎症反应综合征治疗作用及其机制的研究 [J]. 实用医学杂志, 2008, 24 (4): 1339-1340.

工作场所化学物质 DNA 损伤的早期检测

朱超¹, 韩雪莲¹, 袁翠英², 祝海珍¹, 朱方艳¹

(1. 江苏省安全生产科学研究院, 江苏 南京 210042; 2. 南京市鼓楼医院, 江苏 南京 210008)

摘要: 化学物质的遗传毒性对人体的远期影响难以估量, 因此, 对 DNA 损伤进行及时检测, 对损伤防治具有重要意义。本文拟对目前常用的 DNA 损伤检测方法进行简介及评价。

关键词: DNA 损伤; 单细胞凝胶电泳; 微核试验; 姐妹染色体互换; 磷酸化组蛋白 (γ -H2AX)

中图分类号: R115 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2013)04-0266-03

Early detection of DNA damage by chemicals in workplace

ZHU Chao^{*}, HAN Xue-lian, YUAN Cui-ying, ZHU Hai-zhen, ZHU Fang-yan

(* . Jiangsu Provincial Research Institute of Safety Production Science, Nanjing 210042, China)

Abstract: The genetic toxicity of chemicals has long-term effects on human body, so the prompt detect of DAN damage would be very important for the prevention of the further injury. This paper will give a brief introduction and assessment on the commonly used DNA damage detection methods.

Key words: DNA damage; single cell gel electrophoresis; micronucleus test; sister chromatid exchange; phosphorylated H2AX (γ -H2AX)

收稿日期: 2012-11-30; 修回日期: 2013-01-16

作者简介: 朱超 (1966—), 男, 工程师, 研究方向: 职业卫生。

化学物质广泛存在于各行各业,遗传毒性是其对人体产生危害的重要方面^[1],因此,需要选择灵敏高度、特异性强、操作简便的 DNA 损伤检测方法,以在化学物质对人体造成不可逆损害之前终止接触。本文拟对目前常用的 DNA 损伤检测方法做一简介,以方便今后工作。

1 单细胞凝胶电泳 (SCGE)

又称彗星试验,包括中性凝胶电泳和碱性凝胶电泳,其中碱性电泳检测和应用范围更为广泛。在裂解液作用下,细胞的生物膜被破坏,蛋白质、RNA 等成分扩散到细胞外,而细胞核中的 DNA 由于分子量太大只能留在胞核中;在碱性条件下, DNA 双链解螺旋且碱变性为单链,如 DNA 受损发生断裂,则断裂产生的 DNA 单链片段可以从细胞中释放出来,向正极迁移,而未受损伤的 DNA 部分仍保留原位。经荧光染料染色后,细胞核在原位形成一个明亮的头部, DNA 碎片形成尾部,整体似彗星状。DNA 受损越严重,产生的断链和碱变性断片越多,片段也越小,电泳表现为尾长增加和尾部荧光增强。通过测定 DNA 迁移部分的光密度和迁移长度可以测定单个细胞 DNA 损伤程度,并可以确定受试物的作用剂量与 DNA 损伤效应的关系。彗星细胞率、尾部 DNA 含量、彗星尾长以及尾矩(尾部 DNA 的含量与尾长的乘积)均可作为 DNA 损伤的检测指标,目前多以尾矩作为 SCGE 定量分析的主要依据。

SCGE 的优点是灵敏、快速、操作简便,无需复杂的仪器设备,适用范围广,目前通常采用计算机图像系统对试验结果进行分析,更为准确,且更适于大样本的人群监测。但因其灵敏度高,也更易受试验条件影响,温度、凝胶浓度、细胞悬液浓度、裂解时间、染色剂种类等都可能影响彗星试验的结果。

2 微核试验 (MNT)

当 DNA 损伤发生断裂,在细胞分裂期断裂产生的断片因无纺垂体的牵引不能进入子核,可形成微核;当染色体和纺垂体连接发生障碍,或纺垂体的功能受损导致整条染色体的丢失,使细胞分裂的后期丢失的染色体仍留在子细胞质内,也可形成微核。根据不同的取材、体内试验、体外试验及不同的培养方法,现已建立了多种 MNT。目前应用于职业暴露人群监测的主要是人体外周血淋巴细胞微核试验直接测试法及人体外周血淋巴细胞微核试验培养法^[2],近年来还建立了流式细胞术 (FCM) 微核检测。

MNT 快速、简便、干扰因素少,几乎所有的细胞都能观察到微核,且检测速度快,人为干扰因素较少,具有分选功能,对判定为含微核的细胞,可以分类检出并收集,人工证实其真实性并计算其可信度,但微核检出率相对较低,制片、阅片的技术要求较高,假阳性问题也未得到有效解决,限制了其应用。

3 姐妹染色单体互换 (SCE) 检测

在 DNA 半保留复制过程中,核苷类似物 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 可以取代胸腺嘧啶核苷 (T) 掺入新合成的 DNA 链。经历两个细胞分裂周期之后,中期染色体的两条姐妹染

色单体中,一条染色单体的 DNA 双链的 T 完全被 BrdU 取代,而另一条染色单体的 DNA 双链中只有一条链含有 BrdU。经吉姆萨染色,两条 DNA 链都含有 BrdU 的单体染色较浅,而只有一条含 BrdU DNA 链的单体染色较深。如姐妹染色单体之间发生了互换,在互换处可见界限明显、颜色深浅对称的互换片段。

SCE 灵敏、快速、简便,但由于其灵敏度高,影响因素也较多,目前国内还没有公认的标准化方法,故不同的论文报告中正常人对照组均值差别较大,甚至相差可达数倍。

4 γ -H2AX 检测

DNA 发生双链断裂时,组蛋白 H2AX 位于 C-端保守区域内的 139 位丝氨酸迅速磷酸化形成 γ -H2AX, γ -H2AX 伴随 DNA 双链断裂的发生而出现,是 DNA 双链断裂的一个标志。其作用是在断裂位点募集损伤修复相关蛋白,这一过程可在几分钟之内完成,当 DNA 完成修复, γ -H2AX 也随之消失。人体内 DNA 损伤和修复存在动态平衡,所以 γ -H2AX 检测 DNA 损伤具有即时性。

Toyouka 等的研究表明^[3], H2AX 磷酸化形成的 γ -H2AX 是 DNA 双链断裂的早期事件,在苯并芘和紫外线 A 共同作用下的 CHO-K1 细胞,能明显诱导形成 γ -H2AX,并具有剂量依赖关系;甚至在未改变细胞生存率的低浓度下就可以检测到 γ -H2AX。对于职业性铅接触^[4]、正己烷接触^[5]、混苯接触^[6],流式细胞术 γ -H2AX 分析法均能检测出 DNA 损伤。

FCM 检测 γ -H2AX 作为 DNA 双链断裂的早期效应指标特异性强、敏感性高、操作简单、可用于现场大样本检测,但相对上述几种方法,仪器要求较高。目前, Western blotting^[7]、免疫荧光法^[8]等也已应用于 γ -H2AX 的检测。

5 四种方法的比较

目前化学物质遗传毒性检测方法众多,但还存在许多尚未解决的问题,如不同检测方法的灵敏度与相关性、检测方法的标准化、检测效应物与致癌性之间的关系等,均有待进一步探讨。

5.1 检测方法的标准化

在目前常用的上述方法中,只有 MNT 建立了国际统一的研究方法, SCGE 及 SCE 均未建立统一的试验方法。即使对于 MNT,由于许多实验室并未采用国际标准,不同的技术条件产生的结果往往不同,因而使实验结果有很大的不确定性,不同试验室之间的记载常常难以进行比较。

5.2 灵敏度比较

对于早期检测 DNA 损伤,灵敏度尤为重要,传统的检测方法,如染色体畸变实验,已逐渐被更为敏感的方法所代替。研究证明,苯作业工人外周血 MN 增高早于白细胞的改变^[9,10]。

对于目前常用的检测方法,哪种方法灵敏度更高,还存在着不同意见。例如, SCE 检测的是姐妹染色体片段发生交换, SCGE 检测的是 DNA 链断裂, MNT 检测的是至少持续一个有丝分裂周期的 DNA 断裂或者丢失,因此,前两者应较微核试验更为敏感。而 γ -H2AX 产生于 DNA 链断裂时,检测敏

感性似更高。此外,对于不同的化学物质,引起的 DNA 损伤不同,试验方法的敏感性也不同。施健等^[11]对职业接触甲醛人群的研究发现,在低浓度(0.5 mg/m³) 甲醛接触情况下,SCGE 检测较 MNT 具有更高的灵敏度。在苯的体内遗传毒性研究中,SCGE 比 MNT、姐妹 SCE 敏感。检测由吸烟、过度体育活动引起 DNA 改变的研究中发现,SCGE 比 SCE 和 MNT 敏感。在对废品处理站工人进行比较性的生物监测研究中,彗星参数显著增加,而 SCE 率没有改变;对检测接触苯并(a) 芘人群遗传损伤时,SCE 是首选指标,其次是 MNT 和染色体畸变率;而在检测环磷酸胺引起的人淋巴细胞 DNA 损伤时,SCGE 的敏感性仅为 SCE 试验的 1%^[12,13]。胡小军等^[14]的研究发现,FCM 检测 γ -H2AX 对铅低暴露组 DNA 损伤水平敏感性高,DNA 损伤水平与铅暴露工龄无相关性,说明 γ -H2AX 抗体识别 FCM 检测 DNA 损伤具有即时性。刁汇玲等^[15]的研究表明,0.1、1、5 和 20 mg/L 的 2-乙酰氨基苄都可使中国仓鼠 CHL 细胞核内 γ -H2AX 焦点数量及有 γ -H2AX 焦点生成的细胞数量增加,但只有 20 mg/L 2-乙酰氨基苄处理的细胞才出现明显的彗尾增长及有彗尾的细胞数量增加。Yu 等^[16]实验发现,与 SCGE 相比, γ -H2AX 抗体识别 FCM 可以检测更低剂量毒物所致 DNA 损伤。因此,对于不同的化学物质,按照其毒性作用,采用不同的检测方法或者几种方法结合,可能更加准确有效地检测其引起的 DNA 损伤。

5.3 检测效应物与致癌的相关性

根据实验原理不同,不同的试验方法检测 DNA 损伤类型不同,其致癌性也不同。而检测化学物质的遗传毒性,最终目的是为了防止其致癌。例如,有观点认为不产生断片的稳定染色体结构改变(如平衡易位)对致癌更有意义。近年的观点认为,突变并不是致癌的充分条件,稳定的突变也不一定致癌。此外,DNA 损伤大部分能够进行修复,如王怡净等^[17]的研究发现,WTK1 和人外周血淋巴细胞两种细胞表达培养 20 h 后,甲磺酸甲酯和叠氮钠诱发的 DNA 损伤程度明显下降,说明修复有效,DNA 双链断裂的遗传信息将不会传递。吸烟、过度体育运动^[18]等也可以引起 DNA 损伤。因此,并不能以灵敏度作为考察化学物质遗传毒性早期效应检测方法的唯一标准,检测效应物与致癌的相关性也是重要指标。

目前,科学家们正在探索新的 DNA 损伤检测方法。例如,荧光原位杂交技术(FISH)与彗星实验或微核实验结合研究彗星和微核的形成,能检测有毒物质是引起染色体断裂还是丢失,并判断哪条染色体断裂或哪段产生微核。抗着丝粒抗体染色技术,FISH 与 MNT 结合,能更准确、经济地分析微核及其来源,获取诱导微核的化合物性质^[19]。此外,碱性磷酸酶、8-氢脱氧鸟苷、热应激蛋白 Q 及其抗体、抗氧化物酶系统、苯氧化物-血红蛋白加合物等^[20,21]生化指标的检测也被认为是职业接触化学物质遗传毒性早期效应可能的检测方法^[20]。多种方法的结合,对于分析化学物质所致 DNA 损伤、阐明肿瘤发生机制和危险度评价等将产生重要影响。

参考文献:

[1] 苗丽壮,傅华. 11 年来国内相关期刊指导苯白血病例分析

[J]. 环境与职业医学,2002,19(1): 61-62.

- [2] 高广花,徐厚恩,符绍莲. 苯作业工人外周血淋巴细胞的细胞遗传学分析 [J]. 中国环境科学,1994,14(4): 318-320.
- [3] Toyooka T, Ibuki Y. Coexposure to benzo [a] pyrene and UVA induces phosphorylation of histone H2AX [J]. FEBS Letters, 2005, 579: 6338-6342.
- [4] 李雪芝,胡小军,夏追平,等. 流式细胞术检测职业铅接触工人的 DNA 损伤 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2009,(5): 266-269.
- [5] 胡璐璐,宋巧武,王菁,等. 职业接触正己烷对淋巴细胞 DNA 损伤的研究 [J]. 浙江预防医学,2012,24(3): 45-46.
- [6] 宣志强,黎君,赵尧贤,等. 流式细胞术检测家具企业混苯接触工人 DNA 损伤 [J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(11): 2662-2664.
- [7] 任精华,林菊生,刘瑶,等. γ -H2AX 分析用于检测电离辐射致 HepG2 细胞 DNA 双链断裂的研究 [J]. 中华放射医学与防护杂志,2007,27(5): 450-454.
- [8] 陆明康,李明,张保国. γ -H2AX 识别抗体免疫荧光法:一种检测 DNA 双链断裂的新方法 [J]. 放射防护通讯,2006,26(3): 25-28.
- [9] 谢秀珍,粟学军. 低浓度混合苯对细胞遗传学影响的探讨 [J]. 中国工业医学杂志,1993,6(2): 83-84.
- [10] 程子英,王秋枫,火忠礼. 空气苯、血象与微核的关系 [J]. 卫生毒理学杂志,1997,11(2): 112.
- [11] 施健,童志敏,杨红,等. 甲醛对职业人群健康效应的影响 [J]. 中国工业医学杂志,2006,19(3): 176-178.
- [12] 闵海涛. 单细胞凝胶电泳诱变检测系统的研究及应用 [D]. 北京: 中国农业大学,2004.
- [13] 徐厚恩. 生物标志和人群毒理学研究进展 [J]. 中华预防医学杂志,2005,39(2): 149-150.
- [14] 胡小军,骆名进,黎君,等. 职业性铅暴露与 DNA 损伤关系的对照研究 [J]. 浙江预防医学,2011,23(4): 8-10.
- [15] 刁汇玲,周春仙,余艳柯,等. 2-乙酰氨基苄诱导 γ -H2AX 焦点的形成 [J]. 中国药理学与毒理学杂志,2006,20(2): 131-137.
- [16] Yu Y K, Zhu W, Diao H L, et al. A comparative study of using comet assay and γ -H2AX foci formation in the detection of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced DNA damage [J]. Toxicology in Vitro, 2006, 20(6): 959-965.
- [17] 王怡净. 人类细胞体外多终点致突变试验系统的建立 [D]. 成都: 四川大学华西公共卫生学院,2005.
- [18] 陈佩杰,董静梅. 过度运动激活中性粒细胞产生的活性氧对淋巴细胞 DNA 损伤及干预研究 [J]. 体育科学,2011,31(1): 29-38.
- [19] 龚婧婧,黄涛涛. 米其利,等. 微核技术研究进展 [J]. 生物技术通报,2012,3: 49-56.
- [20] 蒙进怀,李少旦. 苯接触人群的生物标志物研究进展 [J]. 中国职业医学,2008,35(4): 327-328.
- [21] 张忠彬,夏昭林. 苯接触的生物标志物研究进展 [J]. 工业卫生与职业病,2003,29(5): 312-315.