

文章编号: 1004-616X(2003)01-0038-05

• 检测研究 •

三氯乙烯对职业人群的细胞遗传学效应^①王家骥¹, 练海泉², 胡明霞¹, 晁斌², 朱启星³, 林丽白¹

(1. 广州医学院预防医学教研室, 广东 广州 510182; 2. 珠海市卫生防疫站劳动卫生科, 广东 珠海 519000; 3. 安徽医科大学公共卫生学院, 安徽 合肥 230032)

【摘要】目的: 探讨三氯乙烯(TCE)对职业人群有无细胞遗传损伤作用以及与接触浓度和时间的关系。方法: 采用气相色谱和吡啶化学比色法对工作场所中TCE浓度和工人尿中三氯乙酸(TCA)含量进行了测定, 采用外周血淋巴细胞微核试验、胞质分裂阻滞微核试验以及姐妹染色单体交换(SCE)试验、单细胞凝胶电泳(SCGE)试验对141名直接接触TCE的工人和39名对照者检测了有无染色体损伤和DNA损伤。结果: TCE接触组人群(车间内空气中TCE平均浓度为90.4 mg/m³, 尿中TCA平均浓度为61.79 mg/L)微核、双核微核、SCE和彗星样淋巴细胞出现率分别为1.66‰、2.73‰、4.33、7.48%, 均明显高于对照组(分别为1.13‰、1.66‰、2.95、3.74%, P<0.05或P<0.01);除SCE外, 微核、双核微核、彗星样淋巴细胞出现率与接触工龄间存在相关关系(r=0.222, 0.246, 0.320; P<0.05或P<0.01);微核、双核微核发生率、SCE和彗星样淋巴细胞出现率与尿中TCA浓度间也存在相关关系(r=0.294, 0.260, 0.229, 0.268; P<0.05或P<0.01)。结论: TCE具有遗传毒作用, 长期接触高浓度TCE可导致染色体断裂和DNA损伤。

【关键词】三氯乙烯; 遗传毒性损伤; 淋巴细胞

中图分类号: R971.2 文献标识码: A

CYTOGENETIC EFFECT OF TRICHLOROETHYLENE ON OCCUPATIONALLY EXPOSED WORKERS

WANG Jia-ji, LIAN Hai-quan, HU Ming-xia, et al.

(Department of Preventive Medicine, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

【Abstract】 Purpose: To evaluate the cytogenetic effects of trichloroethylene(TCE) on the workers, and to determine the dose-response and time-response correlations among the exposure level and duration. **Methods:** TCE concentration in the work place and TCA in urine of the workers exposed to TCE were determined using gas chromatography and pyridine spectrophotometry, respectively. Conventional micronucleus(MN), cytokinesis-block micronucleus(CB-MN), sister-chromatid exchanges(SCE), and single cell gel electrophoresis (SCGE) from 141 workers exposed to TCE and 39 controls were carried out to determine chromosomal and DNA damage. **Results:** In the TCE-exposed group(the average concentration of TCE in work place was 90.4 mg/m³, the average level of urine TCA of the workers exposed to TCE was 61.79 mg/L), the frequencies of MN, CB-MN, SCE and the percentage of lymphocytes with comet-like tail in peripheral blood lymphocytes(PBLs) were 1.66‰, 2.73‰, 4.33 and 7.48‰, respectively, and were higher than those in the control groups(1.13‰, 1.66‰, 2.95 and 3.74‰, respectively, P<0.05 or P<0.01). Except for SCE, there were positive correlations between the percentage of MN, CB-MN, the percentage of lymphocytes with comet-like tail in PBLs and the exposing time(r=0.222, 0.246, 0.320; P<0.05 or P<0.01). The positive correlations were also evident between the percentage of MN, CB-MN,

① 收稿日期: 2002-08-27; 修订日期: 2002-9-27

作者简介: 王家骥(1958-), 男, 安徽省芜湖市人, 副教授, 硕士, 研究方向: 遗传毒理。

Tel: 020-81340186; E-mail: jiajiwang@21cn.com

SCE and the percentage of lymphocytes with comet-like tail in PBLs and the average level of urine TCA of the workers exposed to TCE ($r = 0.294, 0.260, 0.229, 0.268; P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions:** TCE is genotoxic, and long term exposure to the high dose of TCE may induce chromosome breakage and DNA damage.

【Key words】 Trichloroethylene; Genotoxic damage; Lymphocyte

三氯乙烯(TCE)是一种易挥发的卤代烃类有机溶剂,被广泛用于金属脱脂以及许多工业生产过程。由于使用广泛以及具有潜在的致癌作用,TCE代谢和对动物的毒性已被广泛研究^[1]。但至今,对职业接触者的致癌和致突变性及其机制的研究资料仍然有限并且未能得出一致的结论。

本研究采用可反映体内有无染色体损伤的外周血淋巴细胞微核试验和胞质分裂阻滞微核试验,以及可反映体内有无DNA损伤的人外周血淋巴细胞姐妹染色单体交换(SCE)试验和单细胞凝胶电泳(SCGE)试验等4项筛选指标对珠海市接触TCE人数较多的3家涉外企业中连续直接接触TCE3个月以上的职业人群进行了细胞遗传学评价,为确定TCE对长期职业接触人群有无遗传毒作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

珠海市接触TCE人数较多的3家涉外机电制造企业中连续直接接触TCE3个月以上的工人142名(女性121人,男性21人)作为TCE接触组,平均年龄22.87(17~39)岁,平均连续接触TCE时间20.7(4~83)个月;对照组为同厂不接触TCE的质检人员及部分保安、行政办公人员39名(女性33人,男性6人)。两组人群在年龄、性别、吸烟、饮酒等方面均具有可比性($P > 0.05$)。所有人员在从事现职业前有其他明显职业有害因素接触史者在分析时均予以剔除。

1.2 TCE接触水平测定

1.2.1 生产车间空气中TCE测定^[2] 在接触TCE作业岗位常规布点,每天上下午各采样1次,于工人呼吸带处安放气体采样器,用活性碳管采样,以0.5L/min流量采集20 min,经二硫化碳洗脱后气相色谱法测定。

1.2.2 尿中三氯乙酸(TCA)浓度测定^[3] 接触组及对照组工人分别在工作周的周末下班前1 h收集尿样,采用毗啶化学比色法在波长530 nm下测定尿中TCA浓度。

1.3 遗传损伤指标的检测

1.3.1 人外周血双核淋巴细胞微核检测 参照Fenech介绍的方法略加修改^[4]。取肝素抗凝血0.5 ml,加4 ml含15%小牛血清和终浓度为20 μg/ml PHA的RPMI 1640培养液中,置37℃5%CO₂培养箱中培养50 h后,加入细胞松弛素B(终浓度为6 μg/ml),继续培养至72 h后,收获细胞,经低渗、固定、涂片, Giemsa染色后镜检。每例标本计数1 000个双核淋巴细胞,计数双核淋巴细胞中含1个或1个以上微核的细胞数,计算双核淋巴细胞微核细胞率。

1.3.2 人外周血淋巴细胞微核检测 直接取抗凝全血0.5 ml,低渗、离心、固定、染色同双核细胞微核片的制作方法。每例标本在油镜下观察1 000个胞质完整的淋巴细胞,计数含1个或1个以上微核的淋巴细胞数,计算微核细胞率。

1.3.3 单细胞凝胶电泳(SCGE)试验 参照Singh等方法^[5]。将1.0%正常熔点琼脂糖(NMA)凝胶100 μl滴在磨沙玻片上,盖上盖玻片,低温使其凝结后,拔除盖玻片;用0.65%低熔点琼脂糖(LMA)凝胶100 μl在37℃下与静脉抗凝全血20 μl混合后迅速铺在第一层凝胶上,轻轻盖上盖玻片,低温使其凝结;将玻片浸入新鲜配制的碱性裂解液(2.5 mol/L NaCl、100 mmol/L EDTA、10 mmol/L Tris, 临用前加1% Triton X100)4℃裂解1.5 h;将新鲜配制的电泳缓冲液(300 mmol/L NaOH、1 mmol/L EDTA)事先置入冰箱预冷,将裂解后的玻片放入电泳槽中,倒入冷的电泳缓冲液使液面高于凝胶约2 mm,静置约20 min,使DNA双链打开,电泳30 min(25 V、300 mA);用pH 7.4的Tris-HCl缓冲液4℃条件下中和凝胶3次,每次5 min;用45 μl溴化乙啶(EB, 20 μg/ml)染片,盖上盖玻片,在VANOX万能荧光显微镜下,每例标本观察200个淋巴细胞,计算彗星样淋巴细胞出现率,作为估计DNA损伤程度的指标。

1.3.4 人外周血淋巴细胞SCE 取抗凝静脉全血0.5 ml,加入含15%小牛血清的RPMI 1640培养液中(含PHA 1 mg/ml),37℃密闭培养24 h后,加入BuDR(终浓度15 μg/ml),避光条件下37℃培养60 h,收获前2.5 h加入秋水仙素(终浓度为0.4 μg/ml);收获细胞,常规方法低渗、固定、滴片,室温

下老化4 d后，在玻片上加2×SSC液，用30 W紫外灯距玻片6 cm处垂直照射30 min，Giemsa染色，漂洗晾干后油镜下每例计数50个中期细胞，计算SCE交换频率。

1.4 统计分析

所有资料应用SPSS 10.0 for Windows软件建立数据库，并进行t检验、 χ^2 检验等分析。

2 结果与分析

2.1 劳动卫生学调查结果

选择的3家被调查企业，直接接触TCE的工人操作方式，大多为用TCE手工刷洗金属零部件表面的油脂，个别岗位采用超声波机械清洗。直接接触TCE的岗位均安装有局部抽排风装置。作业工人除佩带乳胶指套或棉纱手套外，未使用其它个人防护用品，生产过程中同时存在经呼吸道和手部皮肤吸收TCE的机会。直接接触TCE的作业岗位均无苯、甲苯、二甲苯等有机溶剂混合使用情况。

在生产第一线工作的人员，大多数为从内地农村招聘来的青年女工，多数作业人员缺乏基本的职业卫生和防护知识，每天实际工作时间大多数情况下为10 h以上。

2.2 TCE接触水平

被调查的3间企业生产车间内空气中TCE平均浓度为90.4(50.3~230.8)mg/m³，最高浓度达230.8 mg/m³，均明显超过TCE的职业接触限值(30 mg/m³)。

对照组人群尿中TCA平均浓度为1.92(0~21.84) mg/L，而接触组达61.79(5.03~227.5)mg/L，是对照组人群平均浓度的32倍，有47%的工人已超过职业接触生物限值(50 mg/L或0.3 mmol/L)。

2.3 接触TCE对遗传毒性指标的影响

鉴于毒理学各项检测指标同时受性别、年龄以及连续接触TCE的工龄或尿中TCA浓度的影响，本研究采用了完全随机设计多因素协方差分析，以消除上述不可控混杂因素的影响。

表1. 职业接触TCE对遗传毒性指标的影响

Table 1. Influences of TCE on genotoxic indices in workers occupationally exposed to TCE

Groups	CB-MN(%)		MN(%)		SCE		SCGE(%)	
	n	($\bar{x} \pm s$)	n	($\bar{x} \pm s$)	n	($\bar{x} \pm s$)	n	($\bar{x} \pm s$)
control [☆]	38	1.66±1.62	39	1.13±1.08	38	2.95±1.63	35	3.74±2.96
exposed [☆]	139	2.73±2.47 [*]	140	1.66±1.15 ^{**}	93	4.33±3.05 ^{**}	141	7.48±7.64 [*]
female [☆]	118	2.53±2.41	120	1.68±1.15	75	4.19±3.08	121	7.07±7.64
male [☆]	21	3.81±2.58 [#]	20	1.60±1.23	18	4.94±2.90 [#]	20	9.95±7.39 [#]
control	38	1.705±0.417	39	1.258±0.202	38	3.072±0.514	35	3.701±1.315
duration exposed to TCE (months)								
<12	47	2.535±0.345	47	1.565±0.170	26	3.933±0.555	55	6.323±0.992
12~36	66	2.593±0.290	67	1.666±0.141	45	4.465±0.420 [*]	61	8.791±0.893 ^{**}
≥36	26	3.343±0.455 ^{**}	26	1.646±0.224	22	4.321±0.591	25	6.899±1.392
r value [◇]		0.246		0.222		0.188		0.320
P value		0.016		0.030		0.066		0.002
control	38	1.796±0.423	39	1.139±0.207	38	2.997±0.515	35	4.477±1.303
level of TCA in urine (mg/L)								
<25	41	2.866±0.370	42	1.519±0.182	21	4.026±0.609	34	5.998±1.211
25~50	41	2.071±0.362	41	1.559±0.179	28	4.154±0.534	35	5.907±1.211
≥50	57	3.006±0.306 [*]	57	1.840±0.153 ^{**}	44	4.551±0.423 [*]	72	7.648±0.823 [*]
r value [◇]		0.260		0.294		0.229		0.268
P value		0.011		0.004		0.025		0.008

note: 1. ☆ value in table is $\bar{x} \pm s$, other value is adjusted mean $\bar{x} \pm s$

2. completely random design multi-way ANOVA compared with the control group * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

3. ◇ exclude age and sex partial correlations, Pearson coefficient.

4. compared with the female by t test # $P < 0.05$

由表1可见，TCE接触组人群外周血淋巴细胞微核细胞率、双核淋巴细胞微核细胞率、SCE和彗

星样淋巴细胞发生率均不同程度的高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。TCE接触组内除微核细胞率

外男性双核微核细胞率、SCE 和彗星样淋巴细胞发生率均高于女性 ($P < 0.05$)，其中仅双核淋巴细胞微核细胞率的差别具有统计学意义 ($P < 0.05$)。对同一个体而言，双核淋巴细胞微核细胞率高于淋巴细胞微核细胞率 ($t = 5.82$, $P < 0.01$)，两者间具有良好的相关性 (Pearson $r = 0.406$, $P < 0.001$)。

TCE 接触组人群外周血双核淋巴细胞微核细胞率呈现随工龄延长而逐渐升高的趋势。除 SCE 外，微核细胞率、双核淋巴细胞微核细胞率和彗星样淋巴细胞发生率与 TCE 接触工龄之间均存在统计学意义的相关关系 ($r = 0.222, 0.246, 0.320$; $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

接触组人群外周血淋巴细胞微核细胞率、双核淋巴细胞微核细胞率、SCE 以及彗星样淋巴细胞发生率均存在随尿中 TCA 浓度的增加而逐渐升高的趋势，采用偏相关分析控制年龄、性别的影响后，与尿 TCA 浓度之间也存在良好的相关关系 ($r = 0.294, 0.260, 0.229, 0.268$; $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

TCE 是一种工业上应用十分广泛的有机溶剂。与 TCE 化学结构相似的氯乙烯已证实是人类和动物的间接致癌物。在动物致癌实验中 TCE 已被证实可导致小鼠肝脏肿瘤和肺腺癌以及大鼠肾脏肿瘤^[1]。国际癌症研究机构 (IARC) 1995 年已将 TCE 致癌性分类列入第 2A 类 (对动物致癌，对人类可能致癌)，而且国外已有学者报道了 TCE 可能与人类某些肿瘤发生有关。然而 TCE 暴露人群的职业流行病学研究因样本数不够、观察期限短或对 TCE 接触剂量估计不足等因素，故尚不能充分证实 TCE 暴露与人类任何一种类型癌症之间有明显的相关性。

TCE 的遗传毒作用已受到人们的广泛关注，但国内外已有的报道主要为动物试验或体外试验的结果^[6-9]，并且未能得到一致的结论；少数有关 TCE 作业人群的遗传学研究结果也大多因研究对象人数较少、接触剂量较低、接触时间较短等原因未能得出明确的结论。TCE 对职业人群是否具有遗传毒性及其毒作用机制迄今仍尚无定论。此外，至今尚未见国内外有学者采用双核微核试验对接触 TCE 职业人群的遗传学损伤进行研究。

已证实，微核试验能很好地反映细胞染色体受损情况，并已被有关国际组织推荐为检测致瘤物和诱变剂的常用方法之一^[10]。人淋巴细胞胞质分裂阻

滞双核微核实验（简称 CB 微核实验）可排除未经过有丝分裂或分裂 1 次以上细胞对试验结果的影响，而且镜下阅片时比常规微核试验更易于识别，更适用于低诱变性化学物遗传损伤的检测^[4]。单细胞凝胶电泳可根据彗星样细胞所占的比例，估计细胞 DNA 大致损伤情况，并可检测 DNA 切除修复缺陷与 DNA 交联、氧化性损伤等多种类型 DNA 损伤，加之所需血量少 (10~20 μl) 等特点，已成为近年来最流行的 DNA 损害检测方法，非常适合于接触遗传毒物人群的生物监测^[11]。SCE 频率因可反映细胞在 S 期受损伤后修复的程度，并能很好地检出产生 DNA 加合物的化合物，已被作为一种灵敏指标用于监测职业人群的遗传毒性效应，并主要用于评价受检者近期接触遗传毒物的程度^[12]。

本研究将上述多项遗传毒性筛选方法组合用于直接接触 TCE 的职业人群，无论是研究对象的数量、接触的剂量和工龄都高于已有的研究。结果显示，TCE 职业接触人群在连续接触剂量（尿中 TCA ≥ 50 mg/L）组外周血双核淋巴细胞微核细胞率、常规淋巴细胞微核细胞率、SCE 以及彗星样细胞发生率均比对照组增高。而且双核淋巴细胞微核及常规微核两种测试方法均得到了基本一致的结果，其微核细胞率均随接触工龄或接触剂量的增加而上升，呈现剂量和时间 - 反应关系 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。TCE 接触组人群外周血彗星样淋巴细胞发生率以及 SCE 均存在随着接触 TCE 工龄和剂量的增加而逐渐升高的趋势，彗星样淋巴细胞发生率与 TCE 接触工龄和剂量之间还呈现出有统计学意义的剂量和时间 - 反应关系 ($P < 0.01$)。本研究与 Gu 等^[13] 报道的接触 TCE 人群 SCE 明显增加、Robbiano 等^[14] 报道的 TCE 可诱发大小鼠骨髓多染红细胞和体外培养细胞微核率增加并呈剂量 - 效应关系、Nelson MA 和唐国慧等^[9,15] 报道的 TCE 可致大小鼠 DNA 单链断裂等结果相符，说明 TCE 对职业接触人群具有一定的遗传损伤作用，长期高浓度接触可导致染色体断裂和 DNA 损伤。但 TCE 导致的微核率增加是由于染色体断裂还是细胞分裂过程中纺锤体损伤所致？这种统计学关联性的因果关系及其实际意义还有待进一步深入研究。

本研究结果与 Nagaya T 等^[16] 报道的 TCE 职业接触人群 SCE 无增加、Kligerman AD 等^[18] 报道的大、小鼠外周血双核淋巴细胞微核、SCE 阴性等结果不符，推测可能与上述研究观察对象样本数较少、动物与人代谢反应的差异以及接触 TCE 的剂量与时间等差

异有关,尚有待进一步研究证实。

(致谢:本研究现场调查及测试工作是在珠海市卫生防疫站劳动卫生科全体工作人员的直接帮助下完成,广州医学院预防医学教研室宾晓农、杨巧媛、冯苏妹、陈永忠、易菲以及99级研究生陈传德、黄勇等协助参加了大量的现场调查及实验室测试工作,在此一并表示感谢。)

参考文献:

- [1] 胡明霞.三氯乙烯的毒理学研究新进展[J].国外医学卫生学分册,2001,28(3):155-158.
- [2] 关世忠,孟庆兰,王建礼.车间空气中TCE的气相色谱测定[J].中国卫生检验杂志,1996,6(6):18-20.
- [3] 线引林.生物材料中有毒物质分析方法手册[M].北京:人民卫生出版社,1994.318-323.
- [4] Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations[J]. *Mutat Res.*, 1993, 285(1): 35-44.
- [5] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. *Exp Cell Res.*, 1988, 175(1): 184-191.
- [6] Fahrig R, Madle S, Baumann H. Genetic toxicology of trichloroethylene(TCE)[J]. *Mutat Res.*, 1995, 340: 1-36.
- [7] Brandom WF, McGavran L, Bistline RW, et al. Sister chromatid exchanges and chromosome aberration frequencies in plutonium workers[J]. *Int J Radiat Biol.*, 1990, 58(1): 195-207.
- [8] Kligerman AD, Bryant MF, Doerr CL, et al. Inhalation studies of the genotoxicity of trichloroethylene to rodents[J]. *Mutat Res.*, 1994, 322(2): 87-96.
- [9] 唐国慧,庄志雄,张锦周.三氯乙烯诱发小鼠及人外周血有核细胞DNA链断裂[J].中华劳动卫生职业病杂志,1997,15(3):146-149.
- [10] 蒋东方.微核试验在职业人群接触危害评价应用中的研究[J].中国职业医学,2000,27(4):43-44.
- [11] 王小红,江洪.单细胞凝胶电泳技术的研究进展及其应用[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,2001,22(1):5-8.
- [12] 顾祖维.职业毒物的遗传毒性效应(二)——姐妹染色单体交换[J].职业卫生与应急救援,1994,11(1):9-10.
- [13] Gu ZW, Sele B, Jallert P, et al. Induction of sister chromatid exchange by trichloroethylene and its metabolites[J]. *Toxicol Eur Res.*, 1981, 3(2): 63-67.
- [14] Robbiano L, Mereto E, Migliazza MA, et al. Increased frequency of micronucleated kidney cells in rats exposed to halogenated anaesthetics[J]. *Mutat Res.*, 1998, 23, 413(1): 1-6.
- [15] Nelson MA, Bull RJ. Induction of strand breaks in DNA by trichloroethylene and metabolites in rat and mouse liver in vivo [J]. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 1988, 94(1): 45-54.
- [16] Nagaya T, Ishikawa N, Hata H. Sister-chromatid exchanges in lymphocytes of workers exposed to trichloroethylene[J]. *Mutat Res.*, 1989, 222(3): 279-282.

致作者——关于计量单位

1985年9月6日制定的《中华人民共和国计量法》规定:“国家采用国际单位制,国际单位制计量单位和国家选定的其他计量单位,为国家法定计量单位,非国家计量单位应当废除。”

本刊常用的国际基本单位及其符号:长度单位名称为“米”,符号为m;质量单位为“千克”,符号为kg;时间单位为“秒”,符号为s(不是sec);物质的量单位为“摩[尔]”,符号为mol。本刊常用的一些不属于国际单位的国家法定计量单位符号:时间单位“小时”的符号为h(不是hr),时间单位“日(天)”的符号为d(不是day),旋转速度的单位符号为r/min(不是rpm)。

单位符号一律用正体字母,一般用小写体;来源与人名的单位,其符号首字母用大写体,如电压的单位符号(V),吸收剂量单位的符号(Gy)等。

《癌变·畸变·突变》编辑部