

甲苯二异氰酸酯致中国仓鼠肺细胞 DNA 交联作用*

王淼, 陈文华, 吴艳萍, 张旸

摘要: 目的 研究甲苯二异氰酸酯(TDI)诱导中国仓鼠肺细胞(CHL)DNA的交联作用,探讨TDI的遗传毒性。方法 在培养的CHL细胞中分别加入浓度为0.64、1.28、2.56 $\mu\text{mol/mL}$ 的TDI进行染毒,用荧光分光光度法检测细胞内的DNA-DNA交联水平,用氯化钾-十二烷基硫酸钠(KCl-SDS)沉淀法检测细胞内的DNA-蛋白质交联水平。结果 低浓度的TDI不能致DNA-DNA交联(DDC)和DNA-蛋白质交联(DPC) ($P > 0.05$);随着染毒浓度的增加,其DDC率和DPC率也随之升高,高剂量组的DDC为54.97% ($P < 0.01$),DPC为29.06% ($P < 0.01$)。结论 一定剂量的TDI能诱导细胞内DNA交联作用。

关键词: 甲苯二异氰酸酯; DNA-DNA交联; DNA-蛋白质交联

Study on toluene diisocyanate induced DNA-DNA and DNA-protein crosslinks WANG Miao, CHEN Wen-hua, WU Yan-ping, et al College of Public Health, Harbin Medical University (Harbin 150081, China)

Abstract Objective To study the DNA-DNA and DNA-protein crosslinks induced by toluene diisocyanate (TDI) in Chinese hamster cells (CHL) for genotoxic investigation. **Methods** Chinese hamster lung (CHL) cells were treated with various concentrations of TDI (0.64, 1.28, 2.56 $\mu\text{mol/L}$). The amount of DNA-DNA crosslink (DDC) was measured by fluorescence spectrophotometry. The DNA-protein crosslink (DPC) was detected with K-SDS assay. **Results** No significant difference of DDCs and DPCs with TDI at 0.64 $\mu\text{mol/mL}$ was observed ($P > 0.05$). The percentages of DDCs and DPCs induced by TDI at 1.28 $\mu\text{mol/mL}$ and 2.56 $\mu\text{mol/mL}$ were significantly higher than that of the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Certain dose of TDI can induce DNA-protein crosslink and DNA-DNA crosslink.

Key words toluene diisocyanate; DNA-DNA crosslink; DNA-protein crosslink

甲苯二异氰酸酯 (toluene diisocyanate; TDI) 是合成聚氨酯的主要原料,工业上广泛用于氨基甲酸泡沫胶、合成橡胶、油漆、涂料、塑料等的生产。长期接触和使用,可对人体的呼吸系统、免疫系统、生殖系统等造成损害。已有研究证实,TDI对动物有致癌作用,为人类的可疑致癌物^[1]。国际癌症研究机构(IARC)体外实验显示,TDI可引起人淋巴细胞DNA损伤和染色体畸变,啮齿动物细胞基因突变和姐妹染色单体交换^[2]。DNA损伤是导致基因突变发生的一个必不可少的前提。DNA交联作为一种重要的DNA损伤,在细胞内大量存在可以干扰细胞正常的复制转录过程,从而导致肿瘤或某些严重疾病的发生^[3]。本研究以中国仓鼠肺细胞(CHL)为靶细胞,探讨甲苯二异氰酸酯(TDI)对细胞内DNA的交联作用,揭示其遗传毒性,为评价TDI类化合物潜在的生物学效应提供科学依据。

1 对象与方法

1.1 仪器与试剂 MC-20A IC型CO₂恒温培养箱(日本SANYO公司);SW-CJ-2F型生物洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);荧光分光光度计RF-540(日本岛津Shimadzu公司);PRM1-640培养基(美国Gibco公司);小牛血清(上海纬群生物技术有限公司);乙二胺四乙酸(EDTA)、三羟甲基氨基甲烷(TRIS)、十二烷基硫酸钠(SDS)、蛋白酶K、Hoechst 33258、小牛胸腺DNA(美国Sigma公司);其他试剂如氯化钾(KCl)、二甲亚砜(DMSO)等均为国产分析纯。甲苯二异氰酸酯(TDI分析纯,美国Sigma公司);中国仓鼠肺细胞(CHL,中国协和医科大学基础所细胞室)。

1.2 细胞处理 将处于对数生长期的CHL细胞($10^5 \sim 10^6$)接种于培养瓶中,培养24 h后,加入不同浓度的TDI终浓度分别为0.64、1.28、2.56 $\mu\text{mol/mL}$,同时设溶剂对照组(DMSO)和紫外线照射阳性对照组;继续培养2 h,消化离心收集细胞。

1.3 DNA-DNA交联(DDC)的检测^[4]

1.3.1 细胞裂解 在制备好的细胞悬液中加入0.5 mL SDS (2%)溶液,轻微振荡,65℃水浴中加热10 min,待用。

1.3.2 游离DNA、DDC与DNA-蛋白质交联(DPC)的分离 在上述待测样品中加入100 μL 的1.0 mol/L的KCl (pH 7.5),将混合液6次穿过1 mL的聚丙烯枪头,冰上冷冻5 min后,SDS⁺沉淀(包括蛋白质和DPC形成,4℃ 10 000 r/min离心5 min,收集沉淀,将上清(DNA、DDC)转入另一5 mL离心管中。

1.3.3 DPC中结合DNA的分离 将上述沉淀重悬浮于0.5 mL的清洗缓冲液(KCl 0.1 $\mu\text{mol/L}$, EDTA 0.1 mmol/L, Tris-HCl 120 mmol/L, pH 7.5)中,加入0.5 mL的蛋白酶(0.4 mg/mL),50℃水浴消化3 h,冰上骤冷5 min,4℃ 12 000 r/min离心10 min,收集上清液,将上清液转入上述5 mL离心管中。再向沉淀中加入1 mL的清洗缓冲液重悬,65℃水浴中加热10 min,冰上骤冷5 min,4℃ 10 000 r/min离心5 min,收集沉淀,重复清洗步骤3次,每次都得上清转入上述5 mL离心管中。

1.3.4 游离DNA变性 将上述5 mL离心管中的上清液混匀后,各取1 mL分装2管作为待测样品,一管在100℃水浴中加热5 min进行热变性,随后快速冷却至23℃,使其中游离的DNA变性后不致复性。

1.3.5 染色与检测 向上述待测样品中加入1 mL新鲜配制的400 ng/mL的荧光染料Hoechst 33258,使终浓度为200 ng/mL,置于暗处30 min,用荧光分光光度计在353 nm激发光

* 基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(D2005-47)

作者单位: 哈尔滨医科大学公共卫生学院, 哈尔滨 150081

作者简介: 王淼(1982-),女,黑龙江佳木斯人,硕士,主要从事化学物对DNA损伤的研究。

通讯作者: 张旸

和 455 nm 发射光下测得其荧光值,按下式计算 DNA-DNA 交联率。

DNA-DNA 交联率: $C_t = (f_n - f_0) / (1 - f_0)$ 。式中 C_t 为 DNA-DNA 交联率, f_n 为染毒组中热变性后的荧光强度, f_0 为对照组中热变性后的荧光强度。

1.4 DPC 的检测^[5]

1.4.1 细胞裂解 在染毒后的细胞沉淀中分别加入 0.5 mL SDS(2%)溶液,轻微振荡,65℃水浴中加热 10 min,裂解细胞。

1.4.2 游离 DNA 的分离 从水浴取出裂解好的细胞,加入 1.0 mol/L KCl(pH 7.5)溶于 20 mmol/L Tris-HCl 中 100 μl 将混合液 6 次穿过 1 mL 的聚丙烯枪头,从而使 DNA 长度统一。混合液冰上冷冻 5 min,形成 SDS-K⁺沉淀,4℃ 10 000 r/min 离心 5 min,收集沉淀,将上清液转入另一 5 mL 离心管中。沉淀加 1 mL 清洗缓冲液重悬,65℃水浴加热 10 min,冰上骤冷 5 min,重复离心和清洗步骤 3 次,每次都应将上清液转入 5 mL 离心管中。

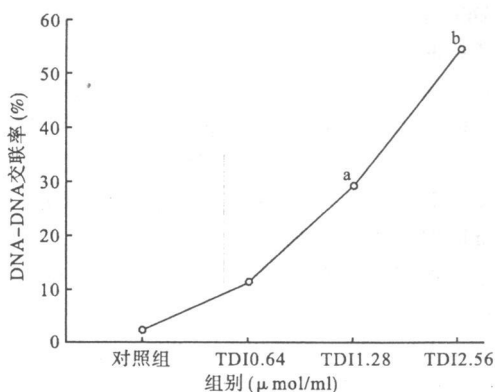
1.4.3 DPC 中结合 DNA 的分离 最终的沉淀重悬于 0.5 mL 的清洗缓冲液中,然后加入 0.5 mL 的蛋白酶 K(0.4 mg/mL),50℃水浴中消化 3 h 再在冰上骤冷 5 min,然后于 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液即为 DPC 中的 DNA。

1.4.4 DPC 的定量 制作 DNA 浓度的标准曲线,用清洗缓冲液配制终浓度为 0 100 300 500 750 1 000 1 500 2 000 3 000 5 000 ng/mL 的小牛胸腺 DNA 标准液,然后加入 1 mL 新鲜配制的 400 ng/mL 荧光染料 Hoechst33258 使荧光染料的终浓度为 200 ng/mL,置于暗处染色 30 min,用荧光分光光度计在 350 nm 激发光和 450 nm 发射光下测得各浓度的荧光值,制备标准曲线。将上述待测样品用同样方法染色,测定其荧光值,根据 DNA 标准曲线来定量 DPC 中 DNA(A)和原液中 DNA(B)的含量,按下式计算 DPC 系数: $\eta = A / (A + B) \times 100\%$ 。

1.5 统计分析 应用 SPSS 13.0 软件进行分析。

2 结果

2.1 甲苯二异氰酸酯致 CHL 细胞 DNA-DNA 交联(DDC)效应(图 1) 随着 TDI 浓度增高,染毒组细胞 DNA-DNA 交联率增加。0.64 μmol/L TDI 染毒组,CHL 细胞 DNA-



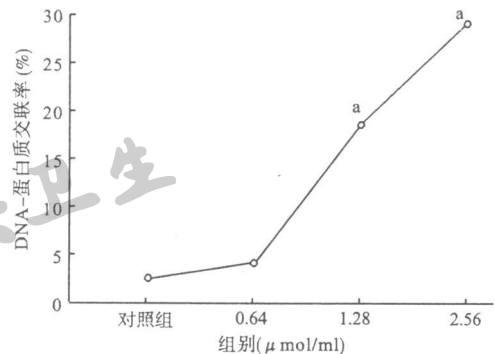
注:与对照组比较,aP < 0.05 bP < 0.01

图 1 TDI 诱导 CHL 细胞 DDC 效应

DNA 交联率与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);当浓度上升至 1.28 μmol/mL 时,DNA-DNA 交联率明显上升,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);浓度升高至

2.56 μmol/mL 时,DNA-DNA 交联率为 54.79%,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),表明 TDI 在低浓度时不能引起 DNA-DNA 交联,在较高浓度时,能够明显地诱导 DDC 的形成,并且浓度与 DNA-DNA 交联率之间存在剂量-效应关系。

2.2 甲苯二异氰酸酯致 CHL 细胞 DNA-蛋白质交联(DPC)效应(图 2) 图 2 显示,经 0.64 μmol/mL TDI 染毒处理的 CHL 细胞,DPC 系数与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);但是,当浓度上升至 1.28 和 2.56 μmol/mL 时,DPC 系数明显上升,且与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。表明 TDI 在低浓度时,不会引起 DNA-蛋白质交联;在较高浓度时,能够明显地诱导 DPC 的生成。



注:与对照组比较,aP < 0.01

图 2 TDI 诱导 CHL 细胞 DPC 效应

3 讨论

DNA 交联包括 DNA-DNA 交联(DDC)和 DNA-蛋白质交联(DPC)2 种,是外来化学物作用于 DNA 所致的重要遗传损伤形式。与其他类型 DNA 损伤相比,DNA 交联较难修复或易于发生易错修复,在细胞周期中维持时间较长,导致染色体断裂、缺失,基因突变和细胞的死亡^[6]。

本研究结果表明,低浓度的 TDI(0.64 μmol/L)不能致 DNA-DNA 交联(DDC)率和 DNA-蛋白质交联(DPC)率发生明显变化($P > 0.05$);随着染毒浓度的增加(1.28 2.56 μmol/mL),其 DDC 交联率和 DPC 交联率也随之升高,可导致明显的 DDC 效应($P < 0.01$)和 DPC 效应($P < 0.01$)。提示一定剂量的 TDI 能诱导细胞内 DNA 交联。Peele 等研究发现,经 TDI 处理的 DNA 形状与对照不同,且复性后 14% DNA 发生重构^[7],与本实验结果相似。

随着人们生活水平的提高,各种涂料已成为美化环境不可缺少的装饰材料,大量聚氨酯油漆、防水涂料、聚氨酯密封的使用,使 TDI 成为室内主要空气污染物之一。因此,应加强环境空气监测和作业人群健康监护,降低和限制各种装饰材料中游离 TDI 含量,避免长期接触对机体健康造成危害。

参考文献

- [1] Bilban M. Mutagenic testing of workers exposed to toluene diisocyanates during plastics production process[J]. Am J Ind Med, 2004, 45(5): 468-474.
- [2] Sabbioni G. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans[M]. Lyon: IARC Press, 1999: 865-879.
- [3] Shahan J, Bernstein Y, Gurvich R, et al. DNA-protein crosslinks and p53 protein expression in relation to occupational exposure to formaldehyde[J]. Occup Environ Med, 2003, 60(6): 403-409.
- [4] Liu YS, Lu ZS, Chang ML, et al. Studies on formation and repair of formaldehyde damaged DNA by detection of DNA-protein crosslinks and DNA breaks[J]. Frontiers in Bioscience, 2006, 11: 991-997.

- [5] Zhikovich A, Costa M. A simple sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and vivo [J]. Carcinogenesis 1992 13 (8): 1485-1489
- [6] Merk O, Reiser K, Speit G, et al. Analysis of chromate induced DNA-protein crosslinks with comet assay [J]. Mutation Research 2000 47(1): 71-80.

- [7] Peelm, Marczynski B, Baur X. Comparison of the binding potential of various diisocyanates on DNA in vitro [J]. J Toxicol Environ Health 1997, 52(6): 517-526.

收稿日期: 2009-02-09

(宋艳萍编辑 蔡天德校对)

文章编号: 1001-0580(2009)06-0675-01

中图分类号: R 192

文献标志码: A

【调查研究与分析】

沈阳市苏家屯区医护人员针刺伤调查

刘素凤¹, 于淼², 刘雅芬¹

关键词: 医护人员; 针刺伤; 意外事件

针刺伤是指医护人员在工作中被针头、手术器械、玻璃制品、医疗仪器设备、医疗废弃物及其他锐利物品刺伤和割伤皮肤而导致被病原微生物感染风险的意外事件。为了解医护人员针刺伤发生的频次及容易发生针刺伤的主要环节, 以采取相应预防控制措施, 减少针刺伤的发生。为此, 2008年4月~6月, 沈阳市苏家屯区疾病预防控制中心对辖区内医院进行了抽样调查。结果报告如下。

对象与方法 (1)对象: 采用整群抽样方法抽取2家区医院, 4家乡镇级医院的医护人员437人, 其中男性20~55岁60人, 女性377人。(2)方法: 采用沈阳市医院感染控制中心设计的调查问卷自填。(3)统计分析: 采用Excel软件进行分析, 率的比较采用 χ^2 检验。

结果 (1)发放问卷437份, 有效问卷433份。有420人在从事医疗过程中有针刺伤的经历, 针刺伤率为97%。其中区级医院239人, 针刺伤率99.16%; 乡镇级医院194人, 针刺伤率94.33%, 两者差异有统计学意义($\chi^2 = 8.59, P < 0.01$)。(2)有针刺伤的人发生针刺次数最多的为2~4次的占47.8%; 其次为1次的占16.6%; 11次~的占13.6%; 5~7次的占12.5%; 8~10次的占6.5%; 0次的占3.0%。(3)不同操作环节针刺伤的构成情况不同, 在毁形或收废弃针或清洗器械时, 被刺伤及人均次数最多, 其次是在拔针时和在取下针头时(表1)。(4)被污染的针头刺伤占70.24%, 伤前不知病人有无经血传播疾病的占76.90%, 刺伤后不报告医院相关部门的占79.29%, 伤后自行挤出伤口血并消毒占88.81%。

表1 医护人员针刺伤发生环节及构成比

刺伤环节	针刺伤人数	构成比 (%)	刺伤人次	平均人次
吸取药液、配药加药时	50	11.90	120	2.40
给抽好的动脉血气针头封上胶塞时	7	1.67	20	2.86
抽血时将血注入试管	16	3.81	30	1.88
拔针时	63	15.00	145	2.3
取下针头时	59	14.05	135	2.29
肌肉注射时	6	1.43	15	2.50
重套针帽时	29	6.90	51	1.76
毁形或收废弃针或清洗器械时	171	40.71	482	2.82
静脉穿刺时	9	2.14	33	3.67
不详	10	2.38	24	2.40
合计	420	100	1 055	2.51

讨论 医护人员要增强针刺伤防护意识。医护人员被锐器刺伤是职业暴露感染乙肝病毒(HBV)、丙肝病毒(HCV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)等血源性疾病的主要传播途径。针刺伤只需0.004 mL带有HBV的血液就足以使受伤者感染HBV^[1]。调查结果表明, 苏家屯区医院医护人员针刺伤率较高, 特别是患者量较大的区级医疗机构的医护人员针刺伤率更高。针刺伤中被污染的针头占70%, 极易发生职业感染。因此, 医护人员在工作中, 应注意避免针刺伤; 加强针刺伤等相关职业暴露防护知识培训; 要让医务人员掌握暴露后首先要做的是立即用水清洗后消毒包扎, 紧急处理后再报告的原则^[2]。

改进废弃一次性医疗用品的处理方法。针刺伤发生的主要环节多在毁型和回收废弃针头时。因此, 对一次性无菌医疗用品的回收需设计出一种防漏、耐刺、密封能固定在治疗车或治疗室的锐物收集箱, 锐物可收入但不能取出, 可使医护人员的针刺伤率明显下降^[3]。

参考文献

- [1] 孙月梅, 索士敏. 医院工作人员针刺伤调查及发生原因分析 [J]. 医院感染控制, 2008, 25(1): 78
- [2] 邱兴庆, 孟丽丽. 医务人员艾滋病职业暴露防护知识调查 [J]. 中国公共卫生, 2007, 23(12): 1439-1440.
- [3] 徐韬, 董亚璐, 曾岩. 医务人员院内针刺伤的调查分析 [J]. 中国卫生统计, 2005, 22(1): 39-41.

作者单位: 1. 沈阳市苏家屯区疾病预防控制中心, 110101; 2 中国医科大学实验技术中心

收稿日期: 2009-01-04

(刘铁编辑 蔡天德校对)

作者简介: 刘素凤(1965-), 女, 辽宁沈阳人, 副主任医师, 本科, 主要从事传染病防制和医院感染控制工作。