

听力对噪声敏感与不敏感者随机扩增 DNA 多态性初步分析

张 颖 赵一鸣 鲁凤鸣 张贵成 杨群勇 王初英 曹泽仁 任 冰

摘 要 目的 探讨听力对噪声敏感者与不敏感者在 DNA 水平是否存在差异。方法 按病例-对照的研究设计在噪声作业工人中收集典型的听力对噪声敏感者与不敏感者, 采用随机扩增多态 DNA (RAPD) 指纹图技术分析 DNA 的多态性, 观察 DNA 多态性在两组间分布的差异。结果 19 名敏感工人与 20 名不敏感工人的年龄、性别、噪声暴露水平和噪声作业工龄均衡, 而敏感组工人的听力改变明显高于不敏感组。敏感组工人 800bp 的 RAPD 扩增片段阳性出现的频率 (18/19) 明显高于不敏感组 (13/20), $P < 0.05$, 而 1000bp RAPD 扩增片段的阳性分布频率在两组间无显著差异 (14/19 vs 18/20)。结论 噪声敏感个体和不敏感个体的 DNA 存在差异, RAPD 是寻找这种差异的途径之一。

关键词 DNA 敏感性 RAPD 听力 噪声

The Analysis of Randomly Amplified Polymorphic DNA in Workers of Super-and Non-sensitive Hearing to Noise Exposure Zhang Ying, Zhao Yiming, Lu Fengming, et al. The Third Hospital of Beijing Medical University. Beijing 100083

Abstract Object To investigate the difference of DNA between the workers with super-sensitive and non-sensitive hearing to noise exposure. **Method** A case-control study was applied in the workers whose hearing were typically super-sensitive to noise exposure or nonsensitive to noise exposure. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to observe the distribution of RAPD in these two groups. Nineteen super-sensitive workers and twenty non-sensitive workers were selected from hundreds workers with long-term exposed to industrial noise. Balance analysis showed there was no significant difference in age, sex, noise exposure level and noise-work years between these two groups. **Results** The results showed that under 800 bp level positive frequency of RAPD in super-sensitive group (18/19) was significant higher than that of non-sensitive group (13/20), but under 1000 bp level these two groups (14/19 vs 18/20) had no significant difference. **Conclusion** The result suggested that there was some difference in DNA between super-sensitive and non-sensitive individuals, and RAPD might be one of the ways to find the difference.

Key words DNA, Hearing Noise, RAPD, Sensitivant

我们的前期工作已经发现, 接触相同剂量噪声工人的听力存在明显的差异^[1]。随之而来的问题是, 决定每个工人听觉系统对噪声危害敏感性个体差异的物质基础是什么, 从现有的知识和经验推测可能与某些效应分子, 如与某些酶、受体、内源性激动剂或拮抗剂等的功能和结构在个体间存在差异有关, 而所有蛋白类效应分子的结构都由体内 DNA 的序列决定。因此, 在 DNA 水平探讨导致出现个体敏感性差异的物质基础具有重要意义。本文采用随机扩增多态 DNA

(Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 指纹图技术^[2]在噪声作业工人中探讨能否在敏感个体和不敏感个体中检测出 DNA 多态性分布的差异。

1 对象与方法

以噪声作业工龄 1 年以上的纺织工人和制罐工人为预选对象, 收集每个工人既往登记的个人资料、职业史和听力测定记录, 用自行编制的软件 (模型见文献 [1]) 确定其听力对噪声的个体敏感性, 选择敏感者与不敏感者进行复查并筛选出研究对象。复查内容包括职业流行病学问卷 (收集个人资料、职业史、既往个人和父母病史等), 听力测定 (用 NTB-40 听力计按 GB7583—87 测定工人脱离噪声作业 16 小时后左右耳 125Hz ~ 8kHz 纯音气导听阈), 并取静脉血

本研究受国家自然科学基金资助

作者单位: 100083 北京医科大学第三医院 (张颖、赵一鸣、鲁凤鸣), 河南省新乡市职业病防治院 (张贵成、杨群勇、王初英、曹泽仁、任冰)

6ml, EDTA-Na 抗凝, -20℃冻存, 用 ND-2 和 HS 5670 声级计在现场工人工作位测定噪声的声压级 (SPL), 并按等能量原理计算每个工人的累积噪声暴露量 (CNE)^[3]。

DNA 提取采用常规酚-氯仿法。随机引物序列为 5'GTTAGGATTAGCCGCATTCA^{3'}, PCR 反应体系见表 1。反应条件: 第 1 步为非严谨扩增, 95℃预变性 5min、94℃1min、45℃2min 和 72℃2min, 共 4 个循环; 第 2 步为常规 PCR 扩增, 94℃ 55s、55℃ 50s、72℃ 100s, 共 30 个循环。每个样本取 10μl 反应产物, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后在紫外透射仪上观察结果, 并照相保留结果。

表 1 随机扩增多态 DNA 的反应体系

Ingredient	第 1 步 (μl)	第 2 步 (μl)
引物	1	—
DNA 模板 (50ng/μl)	2	—
10× PCR 缓冲液 (Mg ⁺⁺ free)	0.5	4.5
MgCl ₂ (25mmol)	1	2.6
4× dNTP (2.5mmol)	0.5	4.5
Taq 酶 (5U/μl)	0.5U	1U
纯水	—	33.4
总反应体积 (μl)	5	50

将研究结果输入 IBM 微机, 用 SPSS PC+V3.0 软件包做单因素分析, 计算均数 ± 标准差、分组例数, 做 *t* 检验和卡方检验, 用 EpiInfo 软件计算 Fisher 精确概率。

2 结果

经统计检验, 敏感组 (男 6 人, 女 13 人) 与不敏感组 (男 5 人, 女 15 人) 工人的性别、年龄、噪声作业工龄、噪声暴露水平和噪声暴露剂量在 2 组间均衡, 差异无显著意义 (见表 2)。

表 2 听力对噪声敏感组与不敏感组工人年龄及噪声暴露的比较

项 目	敏感组 (n=19)	不敏感组 (n=20)
年 龄	32.2±4.5	34.0±10.5
SPL [dB (A)]	91.2±8.2	93.3±6.0
CNE [dB (A)]	100.0±9.9	101.3±8.2
噪声作业工龄	12.0±4.9	10.6±8.8

由图 1 可见, 敏感组工人左右耳的平均听阈在高频段 (3~8kHz) 明显升高, 呈典型的噪声性听力损伤改变; 敏感组各频段听阈水平明显高于不敏感组。

除左耳 125Hz 的听阈均值在 2 组间尚未达到显著性界值 (*P*=0.0713) 外, 其余各频段听阈在 2 组间均存在显著差异, *P*<0.05 或 *P*<0.01。上述结果表明, 这些观察对象的听觉系统对噪声的敏感性确实存在明显的差异, 符合本研究工作的要求。

图 2 为 RAPD 电泳的结果, 可见每个工人有 4~5 条 RAPD 扩增片段, 其中部分人的 800 bp 或 1000bp 处未出现扩增片段。敏感组工人 800 bp 的 RAPD 扩增片段阳性出现的频率 (18/19) 明显高于不敏感组 (13/20), *P*<0.05; 而 1000 bp RAPD 扩增片段的阳性分布频率在 2 组间无显著差异 (见表 3)。

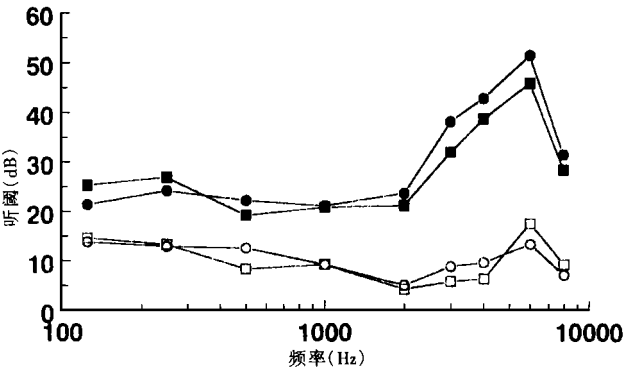


图 1 敏感组与不敏感组工人平均听阈水平的比较

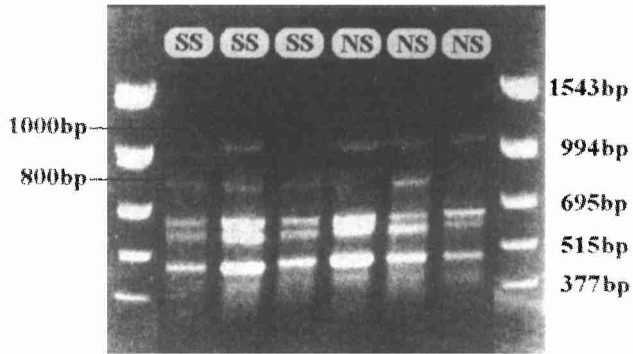


图 2 听力对噪声敏感工人 (SS) 和不敏感工人 (NS) RAPD 扩增片段电泳结果的比较

表 3 RAPD 800 bp 和 1000 bp 扩增片段阳性与工人听力对噪声的个体敏感性差异的关系

分 组	800 bp		1 000 bp	
	+	-	+	-
敏感组	18	1	14	5
不敏感组	13	7	18	2
Fisher 精确概率	0.0436		0.2351	

3 讨论

人们在长期的劳动卫生实践中早已发现了个体听力对噪声的敏感性存在个体差异的问题^[4~6], 但一直没有进行系统深入的研究。个体敏感性差异的物质基础可以归结为不同个体的DNA结构存在差异, 但寻找这种DNA结构的差异在技术上存在很多困难。如人的DNA由 3×10^9 个碱基对组成, 在如此众多的碱基序列中找到我们所关心的DNA结构差异犹如大海捞针, 难度很大。RAPD采用单个随意选择的寡核苷酸(10~20个碱基对)引物, 在较低退火温度条件下, 引物与待测基因组序列中的互补或不完全互补部分结合, 产生DNA扩增片段。用不同的引物可以区分5万~30亿个碱基对基因指纹图。该方法不必预先知道待测基因组的碱基序列, 仅需少量基因组DNA即可检测, 是该研究比较容易实现的途径。已知正常人体中各种体细胞DNA的结构是完全相同的, 因此人外周淋巴细胞的DNA可用来代表内耳组织中DNA的结构。DNA在体内分布的这一特点使我们有可能在职业人群中开展DNA水平的研究。

本研究采用经典的职业流行病学研究方法, 在噪声作业工人中筛选出敏感者和不敏感者并予以证实。RAPD分析发现, 800 bp扩增片段的分布在两组工人之间存在明显的差异。该结果表明, 听力对噪声敏感个体和不敏感个体之间在DNA水平上可以找到差异, RAPD是寻找这种差异的可行途径之一。

4 参考文献

- 1 赵一鸣, 刘和平. 噪声作业工人听力改变模型的探讨. 中华劳动卫生职业病杂志, 1997, 15: 80-82.
- 2 Williams JGK, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 1990, 18: 6531
- 3 丁茂平, 赵一鸣, 穆玉梅, 等. 脉冲与稳态噪声引起工人听力损伤的差异. 中华劳动卫生职业病杂志, 1995, 13: 72-74
- 4 王建新. 噪声易感者2例报告. 工业卫生与职业病, 1991, 17: 293
- 5 张曰灵, 张仲平. 噪声对敏感者损害1例报告. 中国工业医学杂志, 1995, 8: 119
- 6 北京协和医院耳鼻喉科. 纺织工职业性耳聋初步调查报告. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1959, 7: 241-250

(收稿: 1998-11-22 修回: 1999-03-02)

· 作者须知 ·

本刊将执行《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》(I)

本刊为《中国学术期刊(光盘版)》入编期刊, 根据新闻出版署文件(新出音[1999]17号), 本刊将于今年第5期开始执行《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》, 现将有关内容介绍如下, 望作者遵照执行。

1 文献标识码 每一篇文章或资料应标识一个文献标识码。本规范共设5种: A——理论与应用研究学术论文(包括综述报告); B——实用性技术成果报告; C——业务指导与技术管理性文章(包括领导讲话、特约评论等); D——一般动态性信息(通讯、报道、会议活动、专访等); E——文件资料(包括历史资料, 统计资料, 机构、人物、书刊、知识介绍等)。不属于上述各类的文章以及文摘、零讯、补白、广告、启事等不加文献标识码。

2 题名 题名应简明、具体、确切, 概括文章的要旨, 并有助于选择关键词。中文题名一般不超过20个汉字, 必要时可加副题名。文献标识码为A、B、C三类的文章还须有英文题名。题名中应避免使用非公知公用的缩略语、字符、代号及结构式和公式。

3 作者及其工作单位 文献标识码为A、B、C的文章, 均应有作者署名、作者工作单位, 包括单位全称、所在省市及邮政编码。多位作者的署名之间应用逗号“,”隔开, 不同工作单位的作者, 应在姓名的右上角加注不同的阿拉伯数字序号, 并在其工作单位名称之前加与作者姓名序号相同的数字。例:

韩英铎¹, 王仲鸿¹, 林孔兴², 杨永康², 黄其励³

(1. 清华大学电机工程与应用电子技术系, 北京100084; 2. 华中电力集团公司, 湖北武汉430027; 3. 东北电力集团公司, 辽宁沈阳110006)

4 作者简介 文章的主要作者可按以下顺序给出简介

姓名(出生年), 性别(民族——汉族可略), 籍贯, 职称, 学位, 简历及研究方向(任选)。作者简介应置于文章首页地脚。

5 摘要及关键词 凡文献标识码为A、B、C三类的文章均应附中文摘要及关键词, 其中A类文章还应附英文摘要及关键词。摘要中不应出现非公知公用的符号、缩略语及数学公式。中文摘要篇幅为50~300字。英文摘要应与中文摘要相对应。