

# gst $\mu$ 基因缺失与 TNT 白内障发病的关系

许峻峰<sup>1</sup>, 李昌吉<sup>1</sup>, 龙云芳<sup>1</sup>, 詹承烈<sup>1</sup>, 王文静<sup>2</sup>, 谯俊华<sup>3</sup>, 李凤芝<sup>4</sup>, 杨定寿<sup>5</sup>

(1. 华西医科大学劳动卫生教研室, 四川 成都 610041; 2. 上海市疾病预防控制中心环境与职业医学科, 上海 200336; 3. 四川省绵阳市卫生防疫站, 四川 绵阳 621000; 4. 河南省郑州市职业病防治研究所, 河南 郑州 450053; 5. 四川省绵阳市朝阳机械厂医院, 四川 绵阳 621000)

**摘要:** 目的 探讨谷胱甘肽 s-转移酶  $\mu$  基因 (Glutathione s-transferase  $\mu$ , gst  $\mu$ ) 缺失与三硝基甲苯 (trinitrotoluene, TNT) 白内障发病的关系。方法 采用多聚酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 方法, 对 TNT 白内障患者、其他类型白内障患者、健康人群等 3 组样本共 235 人的 DNA 进行了 gst  $\mu$  基因检测。结果 TNT 白内障患者组 gst  $\mu$  基因缺失率高达 65.6%, 与各对照组比较差异均有显著性 ( $P < 0.05$ ), 以健康人群为对照计算的 gst  $\mu$  基因缺失者发生 TNT 白内障的 OR 值为 2.33; gst  $\mu$  基因缺失与 TNT 白内障的发生呈显著相关 ( $P < 0.05$ )。结论 gst  $\mu$  基因缺失与 TNT 白内障的发病有密切关系。

**关键词:** 三硝基甲苯; TNT 白内障; gst  $\mu$  基因缺失

中图分类号: O625.611; R776.1; Q754 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2001)03-0129-04

## A study on relationship between glutathione s-transferase $\mu$ gene deletion and trinitrotoluene cataract susceptibility

XU Jun-feng<sup>1</sup>, LI Chang-ji<sup>1</sup>, LONG Yun-fang<sup>1</sup>, ZHAN Cheng-lie<sup>1</sup>, WANG Wen-jing<sup>2</sup>, QIAO Jun-hua<sup>3</sup>, LI Feng-zhi<sup>4</sup>, YANG Ding-shou<sup>5</sup>

(1. Department of Occupational Health of West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China; 2. Department of Environmental and Occupational Medicine, Shanghai Municipal Center for Prevention and Control of Diseases, Shanghai 200336, China; 3. Station of Preventional health in Mianyang City of Sichuan Province, Mianyang 621000, China; 4. Institute of Occupational Diseases in Zhengzhou City of Henan Province, Zhengzhou 450053, China; 5. Hospital of Chaoyang Mechanism Factory in Mianyang City of Sichuan Province, Mianyang 621000, China)

**Abstract:** **Objective** To study the relationship between glutathione s-transferase  $\mu$  (gst  $\mu$ ) gene deletion and trinitrotoluene cataract (TC) susceptibility. **Method** Polymerase chain reaction (PCR) method was used to examine the rates of gst  $\mu$  gene deletion in 154 cases of TC patients 41 cases of cataract patient by age or diabetes and 40 healthy persons. **Results** The rate of gst  $\mu$  gene deletion in TC group was 65.6% which was significantly higher than that of other two groups—the non-TNT cataract group (53.7%) and the healthy control group (45%) ( $P < 0.05$ ); the odds ratio (OR) value based on the healthy control group is 2.33. **Conclusion** TC correlates closely with gst  $\mu$  gene deletion, gst  $\mu$  gene deletion may be one of the important hereditary factors for TC susceptibility.

**Key words:** Trinitrotoluene; Cataract; gst  $\mu$  gene deletion

三硝基甲苯 (trinitrotoluene, TNT) 所致白内障 (以下简称 TNT 白内障) 以其混浊形态和分布上的特异性, 已得到公认, 然而发病机制至今尚无定论<sup>[1]</sup>。为此人们进行了大量的研究, 并提出了一些学说, 这些学说虽未得到公认, 但实验中所得出的一些共性结论, 为在该领域的进一步深入研究给予了有益的提示。尤其是晶体氧化损伤理论的提出, 使得人们越来

越重视谷胱甘肽转移酶 (glutathione s-transferase, GSTs) 在 TNT 白内障发生中所起的作用<sup>[2]</sup>。GSTs 作为机体内重要的解毒酶系, 在代谢内、外源性亲电子化合物尤其是脂质过氧化物, 保护晶体蛋白免受超氧化损伤的过程中起着重要作用。而 GSTs 同工酶中的 GST  $\mu$  酶的底物特异性最强<sup>[3]</sup>。研究中发现, GST  $\mu$  酶并非存在于每一个体, 它的存在与否受着 gst  $\mu$  基因的控制, 即携带 gst  $\mu$  基因者能合成 GST  $\mu$  酶, 否则该酶缺失<sup>[4,5]</sup>。此次研究采用多聚酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 方法, 分别对 TNT 白内障

收稿日期: 2000-12-25; 修回日期: 2001-02-26

作者简介: 许峻峰 (1965-), 男, 山东人, 博士研究生, 研究方向: 环境与职业医学

患者、其他类型白内障患者和健康人群进行了 *gst*  $\mu$  基因检测, 以探讨 *gst*  $\mu$  基因缺失与 TNT 白内障发病的关系。

1 对象和方法

1.1 研究对象

TNT 白内障患者组 (A 组): 共 154 例, 均为以 5% 新福林或托品卡胺充分散瞳后, 由眼科专业医师检查, 并经市级以上职业病诊断组, 按照国家 GB11502-89《职业性白内障诊断标准及处理原则》进行确诊的 TNT 白内障患者。该组病例分别来源于河南郑州、四川绵阳、山东淄博等炸药生产企业。其他类型白内障患者组 (B 组), 41 人, 其中老年性白内障 31 例, 糖尿病性白内障 10 例; 样本来源于华西医科大学附属第一医院和山东省济宁市第一人民医院眼科住院病人。健康人群组 (C 组), 指既无 TNT 接触史, 又无白内障发生者, 共 40 人。调查项目包括年龄、性别、TNT 接触史、家族史、吸烟饮酒史, 白内障类型及确诊机构、作业环境 TNT 浓度、接触方式、卫生保健条件等。抽取研究对象静脉血 4~5ml 抗凝, 供 *gst*  $\mu$  基因检测。

1.2 方法

1.2.1 制备 DNA 模板 取用 TT 液 (1% Triton X-100, 2mmol/L Tris-HCl pH8.3) 溶解后的全血 750 $\mu$ l, 加入裂解缓冲液 A (蔗糖、Tris-HCl、MgCl<sub>2</sub>、Triton X-100) 750 $\mu$ l, 离心后, 弃上清液, 用裂解缓冲液 B (SDS、Tris-HCl) 117 $\mu$ l 溶解沉淀, 加入 3 $\mu$ l 蛋白酶 K 溶液, 55℃ 保温 60min 后, 迅速降温灭活, 加入 2mmol/L KCl 30 $\mu$ l, 冰浴离心后, 弃上清液, 置-70℃ 储存。蛋白酶 K 购于 GIBCO/BRL 公司。

1.2.2 PCR 检测 *gst*  $\mu$  基因 总反应体积为 100 $\mu$ l。各成分体积分别为: 两对引物各 2 $\mu$ l (引物包含外显子 4 和 5), 10 $\times$  buffer 10 $\mu$ l, dNTP 10 $\mu$ l, 模板 5 $\mu$ l, 去离子水 71 $\mu$ l。冰浴冷却后, 加 Tag 酶 2~5 $\mu$ l, 短暂离心后, 开始扩增。条件: 变性 94℃ 60s, 退火 52℃ 60s, 延伸 72℃ 90s, 共 30 个循环。引物及  $\lambda$ DNA/Hind III Marker, 由 LIFE TECHNOLOGIES GIBCOBRL, CO 合成, dNTP 和 Tag 酶购于 Promegag 公司, PCR 试剂购于 SIGMA 公司, PCR 扩增仪为 BIO-RAD 公司生产。

1.2.3 电泳及照相 取 10 $\mu$ l PCR 扩增产物, 用 8% 聚丙烯酰胺凝胶进行垂直电泳。电压 120V, 时间 3h, EB 染色 30min 后, 置于 UVP 成像仪中观察结果和进行拍照。垂直电泳槽及 UVP 成像仪系美国 BIO-RAD 产品。

1.2.4 *gst*  $\mu$  基因缺失的界定 人类 *gst* 基因至少有 6 个基因位点, 即 *gst*<sub>1</sub>~*gst*<sub>6</sub>。其中 *gst*<sub>1</sub>、*gst*<sub>4</sub> 和 *gst*<sub>5</sub> 编码 *gst*  $\mu$  基因, 但 *gst*<sub>4</sub> 和 *gst*<sub>5</sub> 分别仅在肌肉和脑中表达, 对外来化合物的作用不大, 而 *gst*<sub>1</sub> 在许多器官和组织中均有表达。*gst*<sub>1</sub> 有 3 个等位基因, 即编码 *gst*  $\mu$  基因的 *gst*<sub>1-1</sub>, 编码 *gst*  $\psi$  基因的 *gst*<sub>1-2</sub> 及一个无效等位基因 *gst*<sub>1-0</sub>。因 *gst*<sub>1-1</sub> 与 *gst*<sub>1-2</sub> 仅在第 7 外显子上的第 534 个核苷酸上有差别 (G 变成了 C), 从而导致合成的第 172 个氨基酸残基不同, *gst*  $\mu$  为赖氨酸, *gst*  $\psi$  为天门冬氨酸, 但两者的功能几乎完全一致, 因此常把 *gst*  $\psi$  包括在 *gst*  $\mu$  之内。由于 *gst*<sub>1</sub> 基因呈常染色体显性遗传, 因此, 只有在两个染色体均为 *gst*<sub>1-0</sub> 的纯合子时, 才表现为 *gst*  $\mu$  缺失, 即本次研究所界定 *gst*  $\mu$  基因缺失为两个染色体均为 *gst*<sub>1-0</sub> 的纯合子。在扩增产物聚丙烯酰胺电泳图谱上表现为在 219bp 处无光带。

1.2.5 扩增引物 这次在检测 *gst*<sub>1</sub> 基因时, 引物选择于包括外显子 4 和 5 之间, 即 *gst*<sub>1-1</sub> 和 *gst*<sub>1-2</sub> 均有扩增产物, 而 *gst*<sub>1-0</sub> 无扩增产物, 扩增引物的序列为:

5'-GAAGTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'  
OD: 12.74 29 $\mu$ g/OD MW: 51.2mmol  
5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'  
OD: 9.72 28 $\mu$ g/OD MW: 37.8mmol

1.2.6 统计分析 所有数据录入 Celeron Pentium II 计算机, 采用 SPSS10.0 for Windows 统计分析软件进行统计分析。

2 结果

2.1 研究对象基本情况

此次研究共搜集样本 235 名, 其中男性 173 名, 女性 62 名, 平均年龄 54.0 岁。3 组研究对象在男女比例、平均年龄、吸烟比例、饮酒比例等调查项目中虽略有差异, 但均无显著性 ( $P>0.05$ ) (表 1)。

劳动卫生学调查结果显示, 154 例 TNT 白内障患者的白内障程度随 TNT 浓度和接触 TNT 工龄的增加而加重, 且差异均有显著性 ( $P<0.05$ ) (表 2)。

表 1 研究对象基本情况

| 组别          | 性别  |    | 年龄 (岁) |     |      | 吸烟史 |    | 酗酒史 |     |
|-------------|-----|----|--------|-----|------|-----|----|-----|-----|
|             | 男   | 女  | 最大值    | 最小值 | 平均值  | 有   | 无  | 有   | 无   |
| A 组 (n=154) | 117 | 37 | 68     | 27  | 53.1 | 63  | 91 | 51  | 103 |
| B 组 (n=41)  | 27  | 14 | 71     | 40  | 55.2 | 17  | 24 | 13  | 28  |
| C 组 (n=40)  | 29  | 11 | 62     | 25  | 51.8 | 15  | 25 | 11  | 29  |

表 2 TNT 白内障患者平均 TNT 工龄和作业场所空气中 TNT 平均浓度

| 分期           | 监测点数<br>(处) | TNT 浓度<br>(mg/m <sup>3</sup> ) | 平均 TNT 工龄<br>(年) |
|--------------|-------------|--------------------------------|------------------|
| 观察对象 (n=50)  | 4           | 6.54                           | 11.72            |
| 一期白内障 (n=50) | 3           | 8.24                           | 16.20            |
| 二期白内障 (n=33) | 4           | 12.95                          | 23.48            |
| 三期白内障 (n=21) | 3           | 21.72                          | 28.00            |

2.2 TNT 白内障组与各对照组之间 *gst μ* 基因缺失情况比较

在对各组 *gst μ* 基因缺失情况的检测中, TNT 白内障组的 *gst μ* 基因缺失率达 65.6%, 经  $\chi^2$  分析, 在  $\alpha=0.05$  检验水准上, 得出 TNT 白内障组的 *gst μ* 基因缺失率显著高于健康人群组和其他类型白内障组的结论 ( $P<0.05$ )。而其他类型白内障组和健康人群组之间 *gst μ* 基因缺失率虽有差异, 但在  $\alpha=0.05$  检验水准上差异无显著性 ( $P>0.05$ ) (表 3)。表中 OR 值是以健康人群为参照计算出的, TNT 白内障组的相对危险度以比值比 OR 表示为 2.33, 提示 *gst μ* 基因缺失者患 TNT 白内障的危险性是 *gst μ* 基因携带者的 2.33 倍。

表 3 各组人群 *gst μ* 基因缺失比较

| 组别          | 携带 |      | 缺失  |       | OR 值 |
|-------------|----|------|-----|-------|------|
|             | 人数 | %    | 人数  | %     |      |
| A 组 (n=154) | 53 | 34.4 | 101 | 65.6  | 2.33 |
| B 组 (n=41)  | 19 | 46.3 | 22  | 53.7* | 1.41 |
| C 组 (n=40)  | 22 | 55.0 | 18  | 45.0* |      |

与 A 组比较 \*  $P<0.05$

2.3 TNT 白内障组各期间 *gst μ* 基因缺失情况比较

从观察对象到三期病例, 基因缺失率存有差异, 呈逐渐增加趋势。其中三期白内障病例的基因缺失率最高, 达 76.2% (表 4), 但运用  $\chi^2$  分析进行两两比较, 各期间 *gst μ* 基因缺失率差异并无显著性 ( $P>0.05$ )。

表 4 不同程度 TNT 白内障患者基因缺失情况比较

| 期别          | 携带 |      | 缺失 |      |
|-------------|----|------|----|------|
|             | 人数 | %    | 人数 | %    |
| 观察对象 (n=50) | 19 | 38.0 | 31 | 62.0 |
| 一期 (n=50)   | 18 | 36.0 | 32 | 64.0 |
| 二期 (n=33)   | 10 | 30.3 | 23 | 69.7 |
| 三期 (n=21)   | 5  | 23.8 | 16 | 76.2 |

2.4 暴露因素与 TNT 白内障的相关和回归分析

Kendall's tau-b 二元变量相关分析的结果显示, 在所分析 5 种暴露因素中, 有 3 种与 TNT 白内障发病具有显著相关性。其中相关系数最高的是 *gst μ* 基因缺失 ( $r=0.658$ ), 其次为 TNT 工龄 ( $r=0.637$ ) 和 TNT 浓度 ( $r=0.624$ ), 且对于相关系数的假设检验三者均得出拒绝  $\rho=0$  无效假设的结论 ( $P<0.01$ )。而性别因素和吸烟因素与 TNT 白内障的相关系数均较小。通过控制混杂因素以后对 *gst μ* 基因缺失、TNT 工龄、TNT 浓度暴露因素进行的偏相关分析显示, 三者的偏相关系数由大到小依次为 *gst μ* 基因缺失、TNT 工龄、TNT 浓度。对 5 种暴露因素与 TNT 白内障的回归分析结果和相关分析结果一致。单因素条件 Logistic 回归分析结果表明, *gst μ* 基因缺失、TNT 工龄、TNT 浓度与 TNT 白内障的回归系数较高, 且假设检验  $P<0.05$ 。其中 *gst μ* 基因缺失与 TNT 白内障的回归系数最高,  $b=3.240$ 。而性别因素、吸烟因素与 TNT 白内障的回归系数较低, 假设检验结果  $P>0.05$ 。在单因素条件 Logistic 回归分析的基础上, 对 *gst μ* 基因缺失、TNT 工龄、TNT 浓度与 TNT 白内障进一步进行了多因素条件 Logistic 回归分析, 首先进入方程的是 *gst μ* 基因缺失, 随后的分别为 TNT 工龄和 TNT 浓度, 回归系数假设检验结果  $P<0.05$  (表 5)。

表 5 TNT 白内障与暴露因素的相关、回归分析

| 分析方法          | 基因缺失     | TNT 工龄  | TNT 浓度  | 性别    | 吸烟    |
|---------------|----------|---------|---------|-------|-------|
| 肯德尔相关系数       | 0.658**  | 0.637** | 0.624** | 0.039 | 0.087 |
| 偏相关系数         | 0.719*   | 0.326*  | 0.303*  |       |       |
| 单因素条件         | 3.240**  | 1.204*  | 1.338*  | 0.000 | 0.393 |
| Logistic 回归系数 |          |         |         |       |       |
| 回归方程常数        | 1.897*   | 3.480*  | 2.557*  | 0.000 | 0.105 |
| 多因素条件         | 2.820*   | 1.180*  | 1.212*  |       |       |
| Logistic 回归系数 |          |         |         |       |       |
| 回归方程常数        | 20.088** |         |         |       |       |

\*\*  $P<0.01$ , \*  $P<0.05$

3 讨论

文献报道<sup>[7]</sup>, 关于 *gst μ* 基因缺失率在不同种族有差异, 国内汉族 *gst μ* 基因缺失率为 40%~50%。关于 *gst μ* 基因缺失与 TNT 白内障发病关系方面的研

究, 国内外尚未见报道。但从目前对白内障发生机制研究所得出的结论来看, 白内障的发生与自由基对晶体损伤后, 晶体发生脂质过氧化有关<sup>[3]</sup>。正常情况下, 晶体本身有一个较为完善的抗氧化防御系统, 可

以有效地清除各种原因产生的自由基, 其中还原型谷胱甘肽 (GSH) 是晶体中重要的抗氧化剂之一, 但其解毒作用的发挥很大程度上依赖于 GSTs 同工酶的催化作用<sup>[3]</sup>。如果该酶活性下降或缺失, 则会大大削弱晶体的抗氧化作用, 从而增加发生白内障的危险性。黄莉莉等<sup>[4]</sup> (1989) 在亚硒酸钠诱发大鼠白内障实验中发现, 晶体尚未出现混浊之前, GSTs 同工酶活性即明显下降, 说明 GST 同工酶的活性下降可能是导致白内障发生的原因之一; 皮静波、白禹诗等<sup>[3]</sup> (1996) 在谷胱甘肽  $\gamma$ -转移酶  $\mu$  基因缺失与老年性白内障发病关系的研究中也发现, 老年性白内障患者的  $\text{gst } \mu$  基因缺失率明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )。以上研究结果都提示, 由于  $\text{gst } \mu$  基因的缺失造成 GST  $\mu$  酶活性缺乏, 从而使得 GSTs 酶活性下降, 可能是个体易患白内障的遗传因素。此次研究结果显示, TNT 白内障患者组  $\text{gst } \mu$  基因缺失率高达 65.6%, 显著高于两个对照组, 说明 TNT 白内障的发生与  $\text{gst } \mu$  基因缺失有密切的关系。而以健康人群为参考计算出的 OR 值, 进一步说明对于  $\text{gst } \mu$  基因缺失者来讲, 其 TNT 白内障发生的危险性是  $\text{gst } \mu$  基因携带者的 2.33 倍。这与  $\text{gst } \mu$  基因在代谢芳香烃类化合物, 解除其毒性中特异性最强的特点相吻合。所进行的暴露因素与 TNT 白内障的相关和回归分析结果进一步证实,  $\text{gst } \mu$  基因缺失、TNT 工龄、TNT 空气浓度是导致 TNT 白内障发生的 3 个相关因素, 其中  $\text{gst } \mu$  基因相关性最高。

通过对 TNT 白内障患者各期间  $\text{gst } \mu$  基因缺失率情况的比较, 可以看出, 各期之间  $\text{gst } \mu$  基因缺失率虽差异无显著性, 但由观察对象到三期病例的缺失率已出现明显的上升趋势, 因此不能排除  $\text{gst } \mu$  基因缺失对 TNT 白内障患者病情产生影响的可能性。即  $\text{gst } \mu$  基因缺失者与  $\text{gst } \mu$  基因携带者相比, 前者不仅患 TNT 白内障的危险性高, 而且病情也可能较后者严重。

此次研究结果提示, 在 TNT 白内障防治工作中, 首要的任务是降低作业场所 TNT 空气浓度, 同时还应通过基因检测发现高危人群 ( $\text{gst } \mu$  基因缺失者), 并控制其与 TNT 的接触, 对于降低 TNT 白内障的发生将更为有效。

#### 参考文献:

- [1] 梁友信. 劳动卫生与职业病学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 111.
- [2] 李凤鸣. 眼科全书 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 1554.
- [3] 皮静波, 白禹诗, 郑全美, 等. 谷胱甘肽转移酶  $\mu$  基因缺失与老年性白内障发病关系的探讨 [J]. 中华眼科杂志, 1996, 3: 224-226.
- [4] Spector A, Caner W H. Hydrogen peroxide and human cataract [J]. Exp Eye Res. 1981, 33: 673.
- [5] McGlynn K A. GSTM1 gene deletion determined by polymerase chain reaction [J]. Cancer Bull. 1994, 46: 207-213.
- [6] 黄莉莉, 贾维红, 张昌颖. AC<sub>1</sub> 及 AC<sub>3</sub> 抗白内障形成中晶状体谷胱甘肽转移酶  $\mu$  基因代谢相关酶活性的变化 [J]. 生物化学杂志, 1989, 5: 390.
- [7] 孙贵范, 皮静波, 郑美权, 等. 中国汉族谷胱甘肽转移酶  $\mu$  基因缺损频率及其遗传特性 [J]. 中国医科大学学报, 1994, 23 (2): 104-107.

## 华东区域职业卫生服务与管理新模式研讨会征文通知

为适应当前卫生改革新形势的需求, 最大限度地保护厂矿企业职工的身体健康和生命安全, 拟定于今年 9 月初在上海召开“华东区域职业卫生服务与管理新模式研讨会”。欢迎华东区域及境内外各类厂矿企业、职业卫生安全机构及有关教学科研单位的专业技术人员和各级有关管理者, 积极报名参会研讨与交流。

大会征文的主要议题包括: ①目前企业职业卫生工作现状调查及其改善对策; ②基层保健站改革对职业卫生工作带来的影响; ③厂矿企业内职业卫生服务的需求、实施及管理; ④县、市、省级卫生和工业主管部门或工业行业的新的职业卫生管理体制; ⑤专业卫生机构对企业提供职业卫生服务和进行协调管理的经验; ⑥职业安全卫生新理念; ⑦我国有关法规、标准的执行体会; ⑧国外相关先进模式介绍等。

征文请一律寄至《劳动医学》杂志编辑部, 忻霞萍女士收。邮编: 200336; 地址: 上海市中山西路 1380 号; 电话: (021) 62758710-198 传真: (021) 62957458; Email: ldyxzz@online.sh.cn. 征文上务请注明详细地址及邮编, 以便及时通知具体会期、会址及报到事项。

截稿日期: 2001 年 8 月 10 日。

大会届时将设展台, 欢迎各企事业单位参展介绍。

上海市预防医学会 华东区域劳动卫生职业病防治中心  
上海市疾病预防控制中心 《劳动医学》杂志编辑部