

质膜 Ca^{2+} -ATP 酶异构体 2 基因多态性与噪声性听力损失易感性的关系

杨杪¹, 谭皓¹, 郑建如², 王峰¹, 蒋长征¹, 何美安¹, 陈永文¹, 邬堂春¹

(1. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系 湖北 武汉 430030; 2. 东风汽车公司职业病防治所, 湖北十堰 442000)

摘要: 目的 探讨质膜 Ca^{2+} -ATP 酶异构体 2 (PMCA2) 基因多态性与噪声性听力损失的关系。方法 采用横断面流行病学研究方法, 对 194 名噪声暴露作业工人进行调查和听力测试, 按听力学评价的结果将其分为听力损失组和听力正常组, 用多聚酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 方法和等位基因特异扩增法 (ASA) 检测其 PMCA2 基因上 rs2289274 和 rs6790640 两个单核苷酸位点的多态性。结果 在 93 名噪声性听力损失的工人中, rs2289274 位点 AA、AG 和 GG 基因型的频率分别为 16.1%、40.9% 和 43.0%, 等位基因 A 和 G 的频率为 36.6% 和 63.4%; 在 101 名听力正常的工人中, 其基因型频率分别为 15.8% (AA)、32.7% (AG) 和 51.5% (GG), 等位基因频率为 32.2% (A) 和 67.8% (G)。rs6790640 位点在噪声性听力损失组 CC、CT 和 TT 基因型的频率分别为 0.828% 和 17.2%, 等位基因 C 和 T 的频率为 41.4% 和 58.6%; 在听力正常组的基因型频率分别为 1.0% (CC)、76.2% (CT) 和 22.8% (TT); 等位基因频率为 39.1% (C) 和 60.9% (T)。两位点的基因型分布及其等位基因频率在噪声性听力损失组与听力正常组之间差异均无显著性 ($P > 0.05$)。采用多元 Logistic 回归对两组间年龄、性别、吸烟状况、爆震史和累积噪声暴露量等因素进行校正后, 未发现两位点中任一基因型的噪声性听力损失的危险度有显著性升高 ($P > 0.05$)。结论 PMCA2 基因 rs2289274 和 rs6790640 两个单核苷酸位点的多态性可能不是噪声性听力损失的遗传易感性因素。

关键词: 质膜 Ca^{2+} -ATP 酶; PMCA2; 基因多态性; 噪声; 听力损失; 易感性

中图分类号: TB53; Q34 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)01-0019-04

Association of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isomer 2 gene polymorphisms with noise-induced hearing loss

YANG Miao¹, TAN Hao¹, ZHENG Jian-ru², WANG Feng¹, JIANG Chang-zheng¹, HE Mei-an¹, CHEN Yong-wen¹, WU Tang-chun¹

(1. Department of Occupational Medicine, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Institute of Occupational Medicine, Dongfeng Automobile Co., Shiyan 442000, China)

Abstract: Objective To investigate the association of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isomer 2 gene (PMCA2) polymorphisms with the development of noise induced hearing loss (NIHL). **Method** Totally, 194 workers exposed to occupational noise were studied cross-sectionally with hearing tests. According to the results of audiometry, they were divided into two groups: NIHL group and normal-hearing group. Polymorphisms of two single nucleotide loci rs2289274 and rs6790640 in the PMCA2 gene were determined by polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP) and allele specific amplification analysis (ASA) in 93 workers with NIHL and 101 workers with normal hearing. **Result** Frequencies of genotypes AA, AG and GG in the rs2289274 locus were 16.1%, 40.9% and 43.0%, respectively, in the NIHL group and 15.8%, 32.7% and 51.5%, respectively, in the normal hearing group, and frequencies of alleles A and G in the same locus were 36.6% and 63.4%, respectively, in the NIHL group and 32.2% and 67.8%, respectively, in the normal hearing group. And, frequencies of genotypes CC, CT and TT in the rs6790640 locus were 0.828% and 17.2%, respectively, in the NIHL group and 1.0%, 76.2% and 22.8%, respectively, in the normal hearing group, and frequencies of alleles C and T in the same locus were 41.4% and 58.6%, respectively, in the NIHL group and 39.1% and 60.9%, respectively, in the normal hearing group. There was no significant difference in frequencies of the genotypes and alleles of the rs2289274 and rs6790640 loci between NIHL group and normal hearing group ($P > 0.05$). No significant higher risk for hearing loss was found in those with any of the genotypes of the two loci ($P > 0.05$), adjusted for age, gender, smoking status, history of exposure to explosive noise and cumulative noise exposure (CNE) with multivariate logistic regression analysis. **Conclusion** It is suggested that genetic polymorphism of the rs2289274 and rs6790640 loci in the PMCA2 gene might not be a susceptible factor for NIHL.

Key words: Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase; PMCA2 gene; Polymorphism; Noise; Hearing loss; Susceptibility

收稿日期: 2004-08-16; 修回日期: 2004-11-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30371204)

作者简介: 杨杪 (1977-), 女, 博士, 从事职业有害因素流行病学研究。

噪声性听力损失 (noise induced hearing loss, NIHL) 是最常见的职业性疾病之一, 噪声性听力损失与遗传易感性有关。接触噪声的工人, 在相同强度的噪声环境中

暴露相同的时间, 仅有部分发生噪声性听力损失, 且发生听力损失的严重程度不尽相同^[1]。Ca²⁺作为细胞内第二信使, 起着调控细胞反应的重要作用。钙与内耳毛细胞功能的维持、声电转换、内耳的频率选择性、传出神经对内耳的调控等都有密切关系。质膜 Ca²⁺-ATP 酶异构体 2 (PMCA2) 定位于耳蜗外毛细胞的静纤毛上, 在 ATP 能量的作用下将细胞内的 Ca²⁺泵出细胞外, 直接调节细胞内外的 Ca²⁺浓度, 对静纤毛正常功能的维持具有重要意义。动物实验已发现, PMCA2 基因出现空白突变的小鼠存在不同程度的听力障碍^[2]。PMCA2 基因多态性与人类噪声性听力损失的易感性是否相关, 目前国内外尚无报道。因而, 我们分析了 194 名噪声暴露工人 PMCA2 基因上 rs2289274 和 rs6790640 两个单核苷酸位点的多态性, 探讨其与噪声性听力损失易感性之间的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

采用整群抽样的方法, 选择某汽车有限公司不接触高温、毒物的工种(冲压工、铸造清理工、空压机运行工、汽机运行工), 对工龄 1 年以上, 未使用个体防护用品(耳塞或耳罩), 接触噪声前未患听觉系统疾病, 体检前 1 个月无发热的工人共计 194 人进行调查。

1.2 问卷调查和听力评价

调查内容包括询问并记录一般情况、职业史、个体防护情况、爆震史、家族史、既往史、自觉症状。体检采用 RT-150 听力计, 在工人脱离噪声 16 h 后, 测量左右耳 250~8 000 Hz 的纯音气导听阈。按 GBZ49-2002 进行年龄和性别校正后计算语频和低频听力损失。语频听损或高频听损 > 25 分贝者诊断为听力损失。按听力评价结果, 194 名工人被分为两组: 听力损失组 93 名, 听力正常组 101 名。

1.3 作业场所噪声检测

用丹麦产必凯 2231 型声级计, 在噪声作业岗位工人耳高度测定等效连续 A 声级 (LAeq); 记录工人每工作日接触时间, 参照 20 年噪声检测原始记录, 计算累积噪声暴露量 (cumulative noise exposure, CNE)^[3]以评价工人的实际噪声暴露情况。

1.4 基因多态性分析

1.4.1 DNA 提取 采集肘静脉血 5 ml, 肝素抗凝, 用密度梯度离心法分离淋巴细胞, 按照试剂盒 (Genra 公司, 德国) 提供的方法从淋巴细胞中提取基因组 DNA, 溶解于 100 μl TE 溶液中, -20 °C 保存。

1.4.2 基因分型 采用聚合酶链式反应-限制性片段长

度多态性 (PCR-RFLP) 和等位基因特异扩增法 (ASA) 分析 PMCA2 基因上 rs2289274 和 rs6790640 两个单核苷酸位点的多态性。引物设计采用 Prime Premier 5 软件。rs2289274 引物序列: 上游引物 5'-GGT CAG CGT GCC TGT CTT-3', 下游引物 5'-GGT GGC TCT GCC TTA TTT ACT-3'。PCR 扩增 204 bp 的目的片段: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。限制性内切酶 BstN I 60 °C 消化 PCR 产物过夜, 2% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。rs6790640 引物序列: 等位基因 C 特异性上游引物 5'-GCT GTG GAT GGG GCT CCC TGG ACT C-3', 下游引物 5'-CAT TGA TGA CAC CGA CCT G-3', 等位基因 T 特异性上游引物 5'-GCT GTG GAT GGG GCT CCC TGG ACT T-3', 下游引物 5'-CAT TGA TGA CAC CGA CCT G-3'。PCR 扩增 169 bp 的目的片段: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 63 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。2% 琼脂糖凝胶电泳观察结果, 通过紫外线成像系统进行区别。基因分型采用盲法测定, 并重复 2 次, 将 2 次结果对照, 检测其一致性。

1.5 统计分析

研究样本的群体代表性予以 Hardy-Weiberg 平衡检验确认; 应用 SPSS11.5 软件包进行统计分析, 基因型频率和等位基因频率的组间比较采用卡方检验, 采用多元 Logistic 回归分析对个体间年龄、性别、吸烟状况、爆震史和累积噪声暴露量等因素进行校正, 计算不同基因型工人发生噪声性听力损失的 OR 值。

2 结果

2.1 一般情况 (见表 1)

表 1 噪声性听力损失组与正常组之间一般情况比较

变量	听力损失 (n=93)	听力正常 (n=101)	P 值
年龄 ($\bar{x} \pm s$)	35.2 ± 6.9	33.0 ± 6.1	0.022 ^a
性别 (n, %)			
男性	77 (82.8)	55 (54.5)	0.000 ^b
女性	16 (17.2)	46 (45.5)	
吸烟状况 (n, %)			
吸烟	45 (48.4)	33 (32.7)	0.026 ^b
不吸烟	48 (51.6)	68 (67.3)	
爆震史 (n, %)			
有	29 (31.2)	23 (22.8)	0.186 ^b
无	64 (68.8)	78 (77.2)	
累积噪声暴露量 ($\bar{x} \pm s$, dB)	93.17 ± 9.99	88.12 ± 7.67	0.000 ^a

注: a 两独立样本的 t 检验, b 双侧卡方检验。

两组之间年龄、性别、吸烟状况和累积噪声暴露量差异有显著性 ($P < 0.05$), 爆震史差异不显著 ($P >$

0.05)。

2.2 PMCA2 基因多态性检测结果

如表 2 所示 (1) rs2289274 位点在噪声性听力损失组 AA、AG 和 GG 基因型频率分别为 16.1%、40.9% 和 43.0%，等位基因 A 和 G 的频率为 36.6% 和 63.4%；在听力正常组 3 种基因型的频率分别为 15.8%、32.7% 和 51.5%，等位基因频率为 32.2% 和 67.8%。(2) rs6790640

位点在噪声性听力损失组 CC、CT 和 TT 基因型的频率分别为 0、82.8% 和 17.2%，等位基因 C 和 T 的频率为 41.4% 和 58.6%，在听力正常组的基因型频率分别为 1.0%、76.2% 和 22.8%；等位基因频率为 39.1% 和 60.9%。两位点的基因型分布及其等位基因频率在噪声性听力损失组与听力正常组之间差异均无显著性 ($P > 0.05$)。

表 2 PMCA2 基因 2 个单核苷酸多态性位点在两组中的基因型分布及其等位基因频率 (n, %)

组别	PMCA2 rs2289274 位点					PMCA2 rs6790640 位点								
	基因型			P 值	等位基因		P 值	基因型			P 值	等位基因		P 值
	AA	AG	GG		A	G		CC	CT	TT		C	T	
听力损失组	15 (16.1)	38 (40.9)	40 (43.0)	0.444	68 (36.6)	118 (63.4)	0.364	0	77 (82.8)	16 (17.2)	0.376	77 (41.4)	109 (58.6)	0.646
听力正常组	16 (15.8)	33 (32.7)	52 (51.5)		65 (32.2)	137 (67.8)		1 (1.0)	77 (76.2)	23 (22.8)		79 (39.1)	123 (60.9)	

2.3 不同基因型工人发生噪声性听力损失的危险度

采用多元 Logistic 回归分析对两组间年龄、性别、吸烟状况、爆震史和累积噪声暴露量等因素进行校正后，未发现 rs2289274 和 rs6790640 两个单核苷酸位点的任一基因型的噪声性听力损失的危险度有显著性升高 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 PMCA2 不同基因型噪声性听力损失的危险度

基因型	粗 OR (CI)	P 值	调整 OR (G ^b)	P 值
PMCA2 rs2289274 位点				
AA	0.821 (0.363~1.856)	0.634	0.905 (0.354~2.319)	0.836
AG	1.497 (0.803~2.790)	0.203	1.430 (0.715~2.860)	0.312
GG	1.00		1.00	
PMCA2 rs6790640 位点				
CC	—	1.000	0.000 (0.000~)	1.000
TT	0.696 (0.341~1.418)	0.316	0.743 (0.338~1.634)	0.460
CT	1.00		1.00	

注：b 采用多元 Logistic 回归分析校正两组间年龄、性别、吸烟状况、爆震史和累积噪声暴露量等因素的差异后计算 OR 值。

3 讨论

质膜 Ca²⁺-ATP 酶异构体 2 (PMCA2) 在维持毛细胞静纤毛的功能完整性过程中起重要作用。Yamoh 等的研究表明，静纤毛正常功能的实现需要一个高钙浓度的微环境⁴，钙离子的缺乏会导致静纤毛排列紊乱，功能失调。当静纤毛的微环境——内淋巴中的钙离子浓度降低时，定位于毛细胞静纤毛上的质膜 Ca²⁺-ATP 酶异构体 2 能够在 ATP 能量的作用下将静纤毛中的钙离子泵入内淋巴，保持微环境中较高的钙离子浓度。PMCA2 的另一重要作用是清除对细胞可能产生毒性作用的胞内钙。Fridberger 等发现过度的噪声暴露可以导致毛细胞和静纤毛内的钙离子浓度过高而对细胞造成损伤³，PMCA2 可将胞内过多的钙离子泵出而起到保护细胞的作用。

相关。PMCA2 基因突变在耳聋蹒跚综合征小鼠 (deafwaddler mice, Dfw) 和另一种听力障碍小鼠 (wriggle mouse sagami, Wri) 中已有报道。Dfw 小鼠 PMCA2 基因上一个高度保守氨基酸位点上的 A 转换为 G 导致编码产物甘氨酸 (Gly) 到丝氨酸 (Ser) 的替换；在另一个等位基因 Dfw2J 上，两个碱基对的缺失引起的移码突变可导致所编码蛋白的长度缩短。在正常野生型小鼠的耳蜗中，可观察到毛细胞静纤毛和基底侧壁中 PMCA2 的表达；但在基因突变小鼠中，静纤毛和基底侧壁中的 PMCA2 表达缺失⁹。与此相似，Wri 小鼠 PMCA2 基因的一段保守跨膜区域上的 G 转换为 A 导致了编码产物谷氨酸 (Glu) 到赖氨酸 (Lys) 的替换，免疫组化结果显示该种突变小鼠耳蜗静纤毛上的 PMCA2 也存在缺失⁷。这提示 PMCA2 基因突变可能通过影响静纤毛上的感觉转换和基底膜神经递质的释放而导致耳聋和平衡失调。对 PMCA2 空白基因型小鼠的进一步研究发现，PMCA2 空白基因型纯合小鼠较杂合子和野生型小鼠生长缓慢，步态不稳并且保持平衡困难；听觉脑干反应 (ABR) 的分析结果提示，PMCA2 空白突变纯合子小鼠耳聋，杂合子小鼠有显著性的听力损失²。将 Pmca2^{+/+} 和 Pmca2^{+/-} 两种子代小鼠暴露于不同强度和频谱的噪声下，并计算它们的 ABR 阈值的变化。经过每天 8 h 113 dB 的噪声暴露 15 d 后，Pmca2^{+/-} 小鼠在 16 和 32 kHz 出现了较其同窝出生小鼠升高 15 或 25 dB 的永久性听阈位移，差异具有极显著性 ($P \leq 0.0007$)⁸。这说明 PMCA2 基因的缺失可能影响了噪声性听力损失的易感性。

人类 PMCA2 基因定位于 3 号染色体 (3p25.3)，单核苷酸多态性 (SNP) 位点众多，但大多数位于未转录区和内含子上，只有 8 个位点存在无义突变、无错义突变位点。PMCA2 基因多态性与人类噪声性听力损失的易

动物实验的结果提示 PMCA2 基因与听力损失密切

感性是否相关, 目前国内外尚无报道。我们检测的 2 个 SNP 位点——rs2289274 位点存在 A/G 多态性, 对应的编码产物为 434 位的天冬酰胺 (Asn); rs6790640 位点存在 C/T 多态性, 对应的编码产物为 1185 位的丝氨酸 (Ser), 均为编码区的无义突变^[9]。对其多态性进行分析后发现, 两位点的基因型分布及其等位基因频率在噪声性听力损失组与听力正常组之间较为接近。rs2289274 位点以 AG 杂合子基因型和 GG 纯合子基因型为主; rs6790640 位点则以 CT 杂合子基因型占大多数, CC 基因型非常稀有。两组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。采用多元 Logistic 回归对两组间年龄、性别、吸烟状况、爆震史和累积噪声暴露量等因素进行校正后, 未发现两位点中任一基因型的噪声性听力损失的危险度有显著性升高 ($P > 0.05$)。这说明 rs2289274 和 rs6790640 这两个 SNP 位点的多态性可能不是影响噪声性听力损失的遗传易感性因素。噪声性听力损失是一种受环境因素和多基因影响的疾病, 单基因的某一个或某几个位点的作用可能只产生微弱影响, 且所分析的两位点均为无义突变, 氨基酸的种类没有发生改变, 因此可能并没有影响 PMCA2 的正常功能。进一步的研究应深入分析 PMCA2 上其他 SNP 位点的多态性, 筛选可能的易感性位点, 并探索其与其他基因可能的交互作用。

参考文献:

- [1] Henderson D, Hamernik RP. Biologic bases of noise-induced hearing loss [J]. *Occup Med State of the Art Reviews*, 1995, 10: 513-534.
- [2] Kozel PJ, Friedman RA, Enway LC, et al. Balance and hearing deficits in mice with a null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 2 [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (30): 18693-18696.
- [3] Talbot EO, Gibson LB, Burks A, et al. Evidence for a dose-response relationship between occupational noise and blood pressure [J]. *Arch Environ Health*, 1999, 54: 71-78.
- [4] Yamoah EN, Lumpkin EA, Dumont RA, et al. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase extrudes Ca^{2+} from hair cell stereocilia [J]. *J Neurosci*, 1998, 18 (2): 610-624.
- [5] Fridberger A, Flock A, Ulfendahl M, et al. Acoustic overstimulation increases outer hair cell Ca^{2+} concentrations and causes dynamic contractions of the hearing organ [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 (12): 7127-7132.
- [6] Street VA, McKee Johnson JW, Fonseca RC, et al. Mutations in a plasma membrane Ca^{2+} -ATPase gene cause deafness in deafwaddler mice [J]. *Nat Genet*, 1998, 19 (4): 390-394.
- [7] Takahashi K, Kitamura K. A point mutation in a plasma membrane Ca^{2+} -ATPase gene causes deafness in wriggle mouse sagami [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 261 (3): 773-778.
- [8] Kozel PJ, Davis RR, Krieg EF, et al. Deficiency in plasma membrane calcium ATPase isoform 2 increases susceptibility to noise-induced hearing loss in mice [J]. *Hear Res*, 2002, 164 (1-2): 231-239.
- [9] www.ncbi.nlm.nih.gov/snp.

·短篇报道·

安尼平治疗 II 型糖尿病临床观察

王福莉

(沈阳市第九人民医院内分泌科, 辽宁 沈阳 110024)

安尼平的主要成分是格列美脲, 为第二代磺脲类口服降糖药。其主要作用于 β 细胞受体, 通过 ATP 调节的钾通道引起膜的去极化, 从而释放胰岛素。降糖作用较强, 与磺脲类受体结合后离解较快, 很少发生低血糖, 且口服方便, 每日一次给药, 作用时间长, 病人依从性较好, 是治疗 II 型糖尿病患者较为理想的口服降糖药。近一年来, 我院应用安尼平治疗 II 型糖尿病患者 50 例, 报道如下。

1 对象与方法

根据 1999 年 WHO 标准确诊的 II 型糖尿病 50 例, 男性 31 例, 女性 19 例, 平均年龄 54.1 岁 (38~72 岁), 排除肝肾功能异常者, 按空腹血糖分为两组, 血糖 ≤ 11.1 mmol/L 为甲组, 29 例; 血糖 > 11.1 mmol/L 为乙组, 21 例。

两组病人在饮食、运动疗法的基础上口服二甲双胍 0.25 g tid, 安尼平初始剂量 1 mg, 1 次/d, 然后根据血糖水平逐渐加量,

最大量为 6 mg/d, 观察 6 个月, 监测血糖 (FBG、PBG)、糖化血红蛋白 (HbA1C)、血胰岛素及 C 肽水平。统计学数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验。

2 结果

治疗后两组血糖及 HbA1C 均显著下降, 甲组较乙组更为明显, 胰岛素及 C 肽无明显变化 (见表 1)。

表 1 各组患者治疗前后血糖及 HbA1C 变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	<i>n</i>	FBG (mmol/L)	PBG (mmol/L)	HbA1C (%)
甲组	治疗前	29	7.6 \pm 2.5	13.9 \pm 4.1	7.3 \pm 1.3
	治疗后		6.4 \pm 1.5	8.4 \pm 3.6	5.3 \pm 1.1
乙组	治疗前	21	13.9 \pm 3.7	16.3 \pm 4.5	9.5 \pm 3.3
	治疗后		8.3 \pm 2.7	12.2 \pm 2.6	8.8 \pm 3.1

观察的 50 例患者口服安尼平治疗 6 个月后, 血糖均有不同程度下降, 甲组较乙组下降明显。在各组中, 血糖下降幅度和空腹血糖值呈负相关, 考虑与病人的胰岛 β 细胞分泌功能有关。此外, 虽然乙组患者治疗后血糖下降, 但效果不甚理想, 因此建议选择胰岛功能尚可、空腹血糖不是过高的患者口服安尼平治疗。对于血糖 (FBG) > 11.1 mmol/L, 胰岛素分泌明显缺乏的患者, 应及时使用胰岛素治疗。