

热休克蛋白 60 基因多态性与噪声性听力损失易感性的关系

谭皓¹, 杨杪¹, 郑建如², 王峰¹, 蒋长征¹, 何美安¹, 陈永文¹, 鄧堂春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 探讨热休克蛋白 60(HSP60)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; 用等位基因特异扩增法(ASA)和多聚酶链反应-限制性片断长度多态性法(PCR-RFLP)检测其 HSP60 基因上 rs11551350 和 rs2340690 两个单核苷酸位点的多态性。结果 rs11551350 位点在 93 名噪声性听力损失的工人中 GG、AA 和 AG 基因型的频率分别为 1.1%、9.7% 和 89.2%, 等位基因 G 和 A 的频率为 45.7% 和 54.3%; 在 101 名听力正常的工人中, 基因型频率分别为 5.9%(GG)、5.9%(AA) 和 88.1%(AG), 等位基因频率为 50.0%(G) 和 50.0%(A)。rs2340690 位点在噪声性听力损失组 CC、TT 和 CT 基因型的频率分别为 51.6%、7.5% 和 40.9%, 等位基因 C 和 T 的频率为 72.0% 和 28.0%; 在听力正常组的基因型频率分别为 45.5%(CC)、4.0%(TT) 和 50.5%(CT); 等位基因频率为 70.8%(C) 和 29.2%(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 HSP60 基因的 rs11551350 和 rs2340690 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: 热休克蛋白 60; 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)06-0324-04

Association of the heat shock protein 60 gene polymorphisms with noise-induced hearing loss in exposed workers

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

(1. Institute 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 Motor Co, Shiyan 442000, China)

Abstract Objective To investigate the association of the heat shock protein 60(HSP60) gene polymorphisms with development of noise-induced hearing loss(NIHL) in workers exposed to noise. **Method** In total, 194 workers occupationally exposed to noise were selected in a cross-sectional study. According to audiometric tests they were divided into two groups, NIHL group and normal group. The HSP60 gene polymorphisms in the loci of two single nucleotides rs11551350 and rs2340690 were analyzed in 93 workers with NIHL and 101 normal workers by allele specific analysis(ASA) and polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) analysis. **Result** There was no significant difference in frequencies of GG, AA and GA genotypes and G and A alleles of the rs11551350 locus between NIHL group(1.1%, 9.7% and 89.2%, and 45.7% and 54.3%, respectively) and normal group(5.9%, 5.9% and 88.1%, and 50.0% and 50.0%, respectively) ($P > 0.05$), as well as in frequencies of CC, TT and CT genotypes and C and T alleles of the rs2340690 locus between the two groups(51.6%, 7.5% and 40.9%, and 72.0% and 28.0% in NIHL group, respectively; and 45.5%, 4.0% and 50.5%, and 70.8% and 29.2% in normal group, respectively). After adjusted for age, sex, smoking status history of exposure to explosive noise and cumulative noise exposure(CNE) with multivariate logistic regression analysis, no significant higher risk for NIHL was found in those with any genotype of the two loci ($P > 0.05$). **Conclusion** It is suggested that genetic polymorphism of the rs11551350 and rs2340690 loci in the HSP60 gene might not be the genetic susceptible factor for NIHL.

Key words: Heat shock protein 60 (HSP60); Gene polymorphism; Noise-induced hearing loss; Genetic susceptibility

噪声性听力损失(noise induced hearing loss, NIHL)是最常见的职业性疾患之一。噪声性听力损失与遗传

易感性有关。从事接触噪声工作的工人, 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]。热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是一组高度保守的蛋白质, 具有广泛的生物学功能, 它们参与蛋白质的折叠、亚基的组成、细胞内运输及蛋白质降解

收稿日期: 2004-08-16; 修回日期: 2004-12-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号 30371204)

作者简介: 谭皓(1977-), 男, 硕士, 助教, 从事职业有害因素分子流行病学研究。

等过程。除了结构性的表达之外,热休克蛋白可在受热或其他理化因素(如高温、噪声、一氧化碳和紫外线照射等)的作用下被诱导合成,从而保护细胞免受各种应激的损伤^[2]。我们在之前的研究中发现,噪声暴露工人中血浆 HSP60 抗体的出现与低频噪声性听力损失有关^[3]。但 HSP60 基因多态性与人类噪声性听力损失的易感性之间是否相关,目前尚不清楚。迄今为止,国内外文献均无 HSP60 基因多态性的人群资料报道。我们选择了 HSP60 基因上的一个错义突变位点 rs11551350 和一个内含子单核苷酸位点 rs2340690,分析其在 194 名噪声暴露工人中的多态性分布情况,探讨其与噪声性听力损失易感性的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

采用整群抽样的方法,选择湖北东风汽车有限公司汽车制造业中不接触高温、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听力损失和高频听力损失。语频听损或高频听损大于 25 分贝者诊断为听力损失。按听力学评价结果,194 名工人被分为听力损失组(93 名)和听力正常组(101 名)。

1.3 作业场所噪声检测

用丹麦产必凯 2231 型声级计,在噪声作业工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)^[4],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(Gentra 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℃保存。

1.4.2 基因分型 采用等位基因特异扩增法(ASA)和聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性法(PCR-RFLP)分析 HSP60 基因上 rs11551350 和 rs2340690 两个

单核苷酸位点的多态性。引物设计采用 Prime Premier 5 软件。rs11551350 引物序列:等位基因 G 特异性上游引物 5'-AAT TTT ACA TCT TTG GCA TAA GCC C-3',下游引物 5'-CGT CAT TCA GGC GTA GTG-3';等位基因 A 特异性上游引物 5'-AAT TTT ACA TCT TTG GCA TAA GCC T-3',下游引物 5'-CGT CAT TCA GGC GTA GTG-3'。PCR 扩增 237 bp 的目的片段:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,62℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,共 35 个循环;72℃延伸 5 min。2%琼脂糖凝胶电泳观察结果。rs2340690 引物序列:上游引物 5'-CAA ATT CCT AAC CCA ATC-3',下游引物 5'-AAG AGG ACT TAC CAG CAC-3'。PCR 扩增 336 bp 的目的片段:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,57.5℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,共 35 个循环;72℃延伸 5 min。限制性内切酶 Alu I 37℃消化 PCR 产物过夜,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 SPSS 11.5 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

如表 1 所示,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($P < 0.05$),爆震史差异无显著性($P > 0.05$)。

表 1 噪声性听力损失组和听力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($\bar{x} \pm s$)	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。

2.2 HSP60 基因多态性检测结果

如表 2 所示, rs11551350 位点在 93 名噪声性听力损失的工人中 GG、AA 和 AG 基因型的频率分别为 1.1%、9.7% 和 89.2%, 等位基因 G 和 A 的频率为 45.7% 和 54.3%; 在 101 名听力正常的工人中, 基因型频率分别为 5.9%(GG)、5.9%(AA) 和 88.1%(GA), 等位基因频率为 50%(G) 和 50%(A)。rs2340690 位点在噪声性听力损失组 CC、TT 和 CT 基因型的频率分别为 51.6%、7.5% 和 40.9%, 等位基因 C 和 T 的频率为 72.0% 和 28.0%; 在听力正常组的基因型频率分别为 45.5%(CC)、4.0%(TT) 和 50.5%(CT); 等位基因频率为 70.8%(C) 和 29.2%(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 ($P > 0.05$)。

表 2 HSP60 基因两个单核苷酸多态性位点在噪声性听力损失组和听力正常组中的基因型分布及其等位基因频率

变量	基因型			P 值	Alleles		P 值
HSP60-rs11551350	GG	AA	AG		G	A	
	(n, %)	(n, %)	(n, %)		(n, %)	(n, %)	
听力损失组	1 (1.1)	9 (9.7)	83 (89.2)	0.157	85 (45.7)	101 (54.3)	0.397
听力正常组	6 (5.9)	6 (5.9)	89 (88.1)		101 (50.0)	101 (50.0)	
HSP60-rs2340690	CC	TT	CT		C	T	
	(n, %)	(n, %)	(n, %)		(n, %)	(n, %)	
听力损失组	48 (51.6)	7 (7.5)	38 (40.9)	0.296	134 (72.0)	52 (28.0)	0.785
听力正常组	46 (45.5)	4 (4.0)	51 (50.5)		143 (70.8)	59 (29.2)	

2.3 不同基因型工人发生噪声性听力损失的危险度

如表 3 所示, 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 rs11551350 和 rs2340690 两

表 3 HSP60 不同基因型噪声性听力损失的危险度

基因型	Crude OR (CI)	P 值	Adjusted OR (CI) ^b	P 值
HSP60-rs11551350				
GG	0.179 (0.021 ~ 1.516)	0.123	0.228 (0.025 ~ 2.119)	0.194
AA	1.608 (0.549 ~ 4.715)	0.383	1.796 (0.537 ~ 6.010)	0.342
AG	1.00		1.00	
HSP60-rs2340690				
CC	1.400 (0.782 ~ 2.509)	0.257	1.559 (0.810 ~ 2.999)	0.183
TT	2.349 (0.641 ~ 8.603)	0.214	2.096 (0.495 ~ 8.875)	0.315
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。

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显著升高 ($P > 0.05$)。

3 讨论

HSP60 是热休克蛋白家族的成员之一, 它存在于原核生物和真核生物细胞的线粒体内, 参与细胞内蛋白跨线粒膜转运后的正确折叠和装配, 在完善线粒体结构和功能方面起重要作用。HSP60 是一种主要的结构性表达的分子伴侣, 也可在高温、噪声、一氧化碳和紫外线照射等应激条件下表现出诱导性合成, 保护细胞免受各种应激的损伤。作为分子伴侣, HSP60 在许多自身免疫性疾病和病原体感染中可能作为重要的自身抗原参与了自身免疫性反应^[5-9]。HSP60 在进化上高度保守, 细菌 HSP60 有 55% 与人类 HSP60 相同, 这可能是其参与交叉免疫反应的分子基础。

噪声性听力损失 (NIHL) 是现代工业中最为普遍的职业危害。患者通常有 (10±15) 年以上的职业性噪声暴露史, 且病情进展缓慢。研究结果表明, 中等水平的噪声暴露诱导产生的热休克蛋白有助于提高耳对高水平噪声的耐受性^[7]; 抗热休克蛋白自身抗体的出现也可能在自身免疫性内耳疾病的发生发展过程中起一定作用^[8]。我们曾研究 399 名噪声暴露工人血浆抗 HSP60 抗体水平与噪声性听力损失的关系, 发现抗 HSP60 抗体的出现是 NIHL 的危险因子之一, 上升的血浆抗 HSP60 抗体的水平与低频听力损伤显著相关^[3]。但 HSP60 抗体产生的具体机制目前仍不清楚。

人类热休克蛋白 60 基因定位于 2 号染色体 2q33.1 区, 有数十个单核苷酸多态性 (SNP) 位点, 绝大多数位于未转录区和内含子上; 另外还有 1 个位点存在无义突变, 1 个位点存在错义突变。HSP60 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。我们所检测的 rs11551350 位点为错义突变位点, 存在 A/G 多态性, A 到 G 的碱基转换导致对应的编码产物 24 位的谷氨酰胺 (Gln) 被精氨酸 (Arg) 替换。另一位点 rs2340690 位于内含子区, 存在 C/T 多态性, 无编码产物。对两位点的多态性进行分析后发现, 二者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: rs11551350 位点以 AG 杂合子基因型为主, AA 和 GG 纯合子基因型只占很小部分; rs2340690 位点的 CT 杂合子基因型和 CC 纯合子基因型均较多见, TT 纯合子基因型比例较小, 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显著升高 ($P > 0.05$)。研究结果说明 rs11551350 和 rs2340690 这两个 SNP 位点的多态性可能并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对疾病的发生可能只产生微弱影响;进一步的研究应深入分析 HSP60 基因上其他 SNP 位点的多态性,筛选可能的易感性位点,并探索它们与其他基因之间可能的交互作用。

参考文献:

- [1] Henderson D, Hamemik RP. Biologic bases of noise-induced hearing loss [J]. *Occup Med State of the Art Reviews*, 1995, 10: 513-534.
- [2] Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C. Progress and perspectives on the biology of heat shock proteins and molecular chaperones [A]. In: *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones* [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. 1-30.

- [3] Miao Yang, Jianru Zheng, Qiaoling Yang, et al. Frequency-specific association of antibodies against heat shock proteins 60 and 70 with noise induced hearing loss in Chinese workers [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2004, 9 (2): 207-213.
- [4] Talbott 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.
- [5] Van Eden W. Heat-shock proteins as immunogenic bacterial antigens with the potential to induce and regulate autoimmune arthritis [J]. *Immunol Rev*, 1991, 121: 5-28.
- [6] Kaufmann SH, Schoel B, van Embden JD, et al. Heat-shock protein 60: implications for pathogenesis of and protection against bacterial infections [J]. *Immunol Rev*, 1991, 121: 67-90.
- [7] Fairfield DA, Kanicki AC, Lomax MI, et al. Expression and localization of heat shock factor (Hsf) 1 in the rodent cochlea [A]. *Hear Res [M]*, 2002.
- [8] Bilings PB, Keithley EM, Harris JP. Evidence linking the 68 kildaton antigen identified in progressive sensorineural hearing loss patient sera with heat shock protein 70 [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1995, 104: 181-188.

有机磷中毒后迟发性多发性神经病 16 例临床分析

Delayed polyneuropathy caused by organophosphate: A report of 16 cases

陈维¹, 包晓岩¹, 李彤²

(1. 沈阳市第九人民医院, 辽宁 沈阳 110024; 2. 辽宁省人民医院, 辽宁 沈阳 110015)

1 临床资料

本组有机磷中毒后迟发性多发性神经病 (organophosphate induced delayed polyneuropathy, OPIDP) 病例 16 例, 男性 3 例, 女性 13 例, 年龄 20~45 岁, 其中敌敌畏 (DDV) 中毒 6 例, 敌百虫 (美曲磷酯) 中毒 9 例, 马拉硫磷中毒 1 例。除 1 例误服敌百虫、1 例 DDV 皮肤接触中毒外, 其余 14 例均为主动服用。全部病人中毒后曾在医院抢救治疗, 其中 5 例出现过昏迷。出现感觉异常、运动障碍时间, DDV 中毒后 4~21 d, 平均 8 d; 敌百虫中毒后 7~21 d, 平均 14 d; DDV 出现时间最早, 依次为敌百虫、马拉硫磷。所有病人均有主观感觉异常, 四肢麻木、疼痛感, 浅感觉障碍表现为痛觉减退。皮肤痛觉过敏 3 例, 8 例出现腓肠肌压痛。1 例 DDV 中毒后出现深感觉障碍。手腿麻痛、无力后出现肌肉萎缩 13 例, 病程 1 个月~1.5 年, 表现为手骨间肌、鱼际肌及小腿肌萎缩, 肌力 II~IV 级, 肌张力下降, 肢体远端套式感觉障碍, 跟腱反射减弱或消失。出现下垂足 6 例, 其中 DDV 1 例, 敌百虫 5 例。经常出现尿潴留 1 例。全部病例无脑神经损害, 病理反射未引出。

· 病例报道 ·

1 例敌百虫中毒后脑脊液常规及生化检查无异常。所有病例肌电图均呈现周围神经元性损伤, 跟踪随访 1~1.5 年, 预后较差。

2 讨论

有机磷杀虫剂急性中毒的毒性主要表现在抑制胆碱酯酶 (ChE)^[1]。在中毒 2~3 周胆碱能症状消失后出现感觉运动型多发性周围神经病, 表现为感觉异常、肢体末端的肌萎缩等神经系统症状, 目前认为与有机磷对 ChE 的抑制效应无关^[2], 可能是由于有机磷杀虫剂抑制神经靶酯酶 (NTE) 并使其老化导致周围神经远端轴索肿胀变性; 而 Abou-Donia 等认为 OPIDP 的发生可能由于有机磷干扰了钙离子/钙调蛋白激酶 II, 使神经轴突内的骨架蛋白分解导致轴突变性的发生^[3]。本组病例提示, 有机磷迟发性毒性作用早期表现为浅感觉异常, 末梢型感觉障碍, 肢体无力, 逐渐出现肢体远端肌萎缩, 以下运动神经元纤维受损为主, 深感觉障碍及侧索受损少见, 无病理征。全部病例无脑神经受累值得探讨。DDV 毒性大且神经症状出现早且不可逆, 是否为有机磷中毒后导致某些酶失活的同时显露抗原产生迟发变态反应, 有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈灏珠. 内科学 [M]. 第四版. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 852-857.
- [2] 何凤生, 薛启萱. 神经病学. 第 12 卷 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2002. 108-115.
- [3] Abou-Donia MB, Lapadula DM. Mechanisms of organophosphorus ester induced delayed neurotoxicity: Type I and Type II [J]. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1990, 30: 405-440.