

# 慢性苯接触工人 TNF- $\alpha$ 基因多态性的研究

上海市白血病协作组 吕玲执笔

**摘要:** 目的 探讨慢性苯接触健康工人 TNF- $\alpha$ -238 及 TNF- $\alpha$ -308 基因的多态性与正常健康人群差异有无显著性。方法 用巢式 PCR-RFLP 方法检测 73 例苯接触健康工人及 87 例正常健康人群的 TNF- $\alpha$ -238 及 TNF- $\alpha$ -308 基因的多态性。用卡方检验统计两组人群 TNF- $\alpha$ -238 及 TNF- $\alpha$ -308 基因的多态性差异是否有显著性。结果 苯接触组 TNF- $\alpha$ -238 G/G 基因型 95.9%, A/G 基因型 4.1%, A/A 基因型 0%; 正常健康组 TNF- $\alpha$ -238 G/G 基因型 96.6%, A/G 基因型 3.5%, A/A 基因型 0%; 两组差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。苯接触组 TNF- $\alpha$ -308 G/G 基因型 91.8%, A/G 基因型 8.2%, A/A 基因型 0%; 正常健康组 TNF- $\alpha$ -308 G/G 基因型 90.8%, A/G 基因型 9.2%, A/A 基因型 0%; 卡方检验两组差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。结论 慢性苯接触工人 TNF- $\alpha$ -238、TNF- $\alpha$ -308 多态性分布与正常健康人群差异无显著性。

**关键词:** 苯接触; TNF- $\alpha$  基因多态性

中图分类号: R135.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X (2006)01-0007-04

## Tumor necrosis factor- $\alpha$ cytokine promoter gene polymorphism in chronic benzene exposed workers

Shanghai leukemia association group LV Ling

**Abstract Objective** To demonstrate if the Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) -238, -308 promoter gene polymorphisms in benzene exposed workers is different from that in controls. **Method** To investigate the TNF- $\alpha$ -238, -308 polymorphisms in 73 benzene exposed workers and in 87-health controls. The DNA fragment containing this polymorphism were amplified by nested PCR and sequenced by RFLP. The data were analyzed by chi-square test. **Result** The frequency of the TNF- $\alpha$ -238 G/G, A/G in benzene exposed workers respectively was 95.9%, 4.1%, A/A: 0%. The frequency of the TNF- $\alpha$ -238 G/G, A/G in controls respectively was 96.6% and 3.5%, A/A: 0%. The frequency of the TNF- $\alpha$ -238 promoter gene polymorphisms was not significantly different between benzene exposed workers and controls. The frequency of the TNF- $\alpha$ -308 G/G, A/G in benzene exposed workers respectively was 91.8%, 8.2%, A/A: 0%. That in controls respectively was 90.8%, 9.2%, A/A: 0%. The frequency of the TNF- $\alpha$ -308 promoter gene polymorphisms was also not significantly different between benzene exposed workers and controls. **Conclusion** TNF- $\alpha$ -238, -308 polymorphisms in benzene exposed workers are the same as in health controls.

**Key words:** Benzene exposure; TNF- $\alpha$ -promoter gene polymorphism

慢性苯中毒可以造成很多造血系统疾病,包括有白细胞减少、再障、骨髓异常增生综合症 (myelodysplastic syndrome, MDS)、急性髓性白血病等<sup>[1~2]</sup>。不同的个体对苯中毒的易感性不同, Rothman 等认为,这是由于控制苯的代谢和解毒的基因多态性所造成的<sup>[3]</sup>,但这只能部分解释苯中毒的个体差异。近年来的研究发现,苯的代谢物氢醌 (hydroquinone, HQ) 改变骨髓干细胞 (HPC) 对肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的反应,使 HPC 的核转录受阻, HQ 与 TNF- $\alpha$  协同作用使 HPC 凋亡增加,从而导致造血系统一系列毒性。TNF- $\alpha$  水平有很大个体差异,基因转录、转录后及受体表达等多个环节调节 TNF- $\alpha$  水平,其中基因转录是一个很重要的调节环节<sup>[4]</sup>。控制 TNF- $\alpha$  基因转录的启动子位于 6 号染色体长臂,属于 MHC III 类分子,已

发现多个 TNF- $\alpha$  启动子的多态性,其中最重要的是 -308 位点 (G $\rightarrow$ A) 的多态性<sup>[5]</sup>。其次是 -238 位点 (G $\rightarrow$ A) 的多态性、-857 (C $\rightarrow$ T) 及 -863 (C $\rightarrow$ A) 的多态性。已有研究发现 -308 位点 G/A 基因型产生的 TNF- $\alpha$  量较 G/G 型明显增高<sup>[6]</sup>。根据以上研究,推测 TNF- $\alpha$  基因的多态性也有可能造成苯中毒的个体差异。众所周知,基因的多态性是种族长期进化过程中形成的,因此在研究 TNF- $\alpha$  基因的多态性与苯中毒的关系之前,有必要弄清楚苯是否引起 TNF- $\alpha$  启动子基因的突变,也就是苯接触健康人群与正常健康人群之间 TNF- $\alpha$  基因的多态性是否有差异。本文对此问题进行了研究。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

73 例慢性苯接触工人,其中男 54 例,女 19 例,平均年龄 44 岁;平均接苯工龄 15.2 年 (SD=9.2),各作业场所平均接苯浓度见表 1。无苯接触的健康组 87 例,其中男 60 例,女 27 例,平均年龄 42 岁。两

收稿日期: 2004-10-25; 修回日期: 2005-06-06

作者简介: 吕玲 (1964-), 女, 复旦大学附属华山医院职业病科,在读博士,副教授,硕士生导师,研究方向: 苯中毒白血病。

组性别、年龄差异无显著性 ( $P>0.05$ )。两组研究对象均无结缔组织疾病、造血系统疾病及恶性肿瘤。

1.2 苯作业场所空气浓度测定

探管法区域采样, 每分钟采 200 ml 含苯空气, 共采 20 min, 连续采样 10 d, 用气相色谱法分析苯的空气浓度。

1.3 实验方法

1.3.1 试剂和仪器 Tag DNA 聚合酶、内切酶、10XPCR Buffer、MgCl<sub>2</sub>、dNTP 均购自 Takara 公司; 引物由上海生物工程中心合成; DNA 分离试剂盒购自 QIAGEN 公司。PCR 仪 (PTC-200), 基因有限公司; 电泳仪, BIO RAD PAC300; 胶成像系统, Gel Doc 2000 BIO RAD。

1.3.2 DNA 的提取 用 OIAamP DNA 试剂盒从 2ml EDTA 抗凝外周血中提取 DNA, -25℃冰箱中保存。

1.3.3 TNF-α 多态性分析 采用 PCR 方法扩增包括 -238、-308 突变位点在内的 DNA 片段, 长度为 318 bp。上游引物: 5'-CTCAAGGACTCAGCTTCTGAAG-3'。下游引物: 5'-GCCCTGCACCTTCTGTCTCG-3'。PCR 扩增体系: 10XPCR Buffer 5 μl, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4 μl, 20 μmol/L 引物 0.5 μl, 2.5 mmol/L dNTP 4 μl, 5 U/μl Taq 0.25 μl, 模板 DNA50~100 ng, 加双蒸水至总反应体积 50 μl, PCR 反应条件: 94℃预变性 5 min, 94℃45 s, 57℃45 s, 72℃45 s, 30 个循环, 72℃延伸 10 min。

以上述扩增产物稀释 100 倍为模板, 分别扩增含 -238 突变位点及 -308 突变位点的 DNA 片段, 前者长度 150 bp, 后者长度 107 bp。-238 位点上游引物: 5'-AAACAGACCACAGACCTGGTC。-238 位点下游引物: 5'-CTCAGACTCCCCATCCTCCCGGATC。-308 位点上游引物: 5'-GAGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT。-308 位点下游引物: 5'-GGGACACACAAGCATCAAG, 黑体字母为酶切位点。

采取限制性酶切片段长度多态性分析 (restriction fragment length polymorphisms, RFLP) 方法判断 TNF-α 多态性。于 5 μl 含 -238 突变位点及 -308 突变位点的 DNA 片段扩增产物中分别加入 8 U 限制性内切酶

BamHI 和 NcoI, 37℃温箱中孵育 4~6 h, 酶切产物 10 μl 在含 2%的琼脂糖凝胶中电泳分离, 溴酚蓝染色观察。

1.4 质量控制

选取 20 个样本的 PCR 产物送基康生物科技有限公司测序, 测序结果与 RFLP 方法的实验结果完全相符。

1.5 统计分析

正态分布数的均数用  $\bar{x} \pm s$  表示, 非正态分布数据的均数用中位数表示。采用成组  $t$  检验, 卡方检验, 双侧检验  $P<0.05$  有意义。统计分析由 STATA6.0 完成。

2 结果

2.1 作业场所苯空气浓度测定结果

本研究对象的苯接触岗位共有 10 个, 连续采样 10 d, 各岗位平均空气苯浓度见表 1。

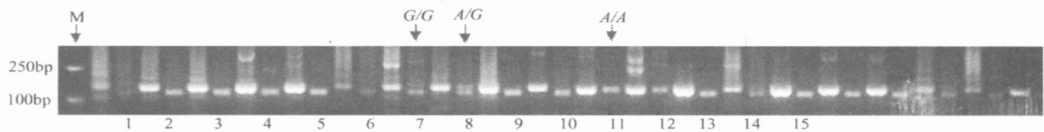
表 1 各岗位苯空气浓度测定结果 mg/m<sup>3</sup>

| 岗位 | 苯的空气浓度     | 岗位 | 苯的空气浓度     |
|----|------------|----|------------|
| 1  | 191.4±36.2 | 6  | 6.0        |
| 2  | 46.9       | 7  | 1.0        |
| 3  | 0.4        | 8  | 23.5       |
| 4  | 2.7±2.17   | 9  | 108.5      |
| 5  | 4.1        | 10 | 144.4±72.3 |

注: 正态分布数的均数用  $\bar{x} \pm s$  表示, 非正态分布数的均数用中位数表示。

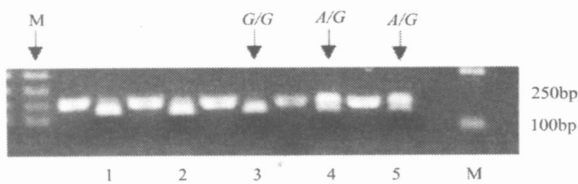
2.2 TNF-α 多态性分析

用巢式 PCR-RFLP 方法 TNF1/1 (-238 G/G) 纯合子的 PCR 产物被内切酶 BamHI 完全切断, 形成 130 bp 和 20 bp 2 条片段; TNF1/2 (-238 A/G) 杂合子的 PCR 产物被部分切断形成 3 条片段 150 bp、130 bp 和 20 bp; TNF2/2 (-238 A/A) 纯合子的 PCR 产物不能被切断形成 150 bp 一个片段。见图 1。TNF1/1 (-308 G/G) 纯合子的 PCR 产物被内切酶 NcoI 完全切断, 形成 87 bp、20 bp 2 条片段; TNF1/2 (-308 A/G) 杂合子的 PCR 产物被部分切断形成 107 bp、87 bp、20 bp 3 条片段; TNF2/2 (-308 A/A) 纯合子的 PCR 产物不能被切断形成 107 bp 一个片段。见图 2。



每个样本占 2 个电泳跑道, 一个 PCR 跑道, 一个 PCR 产物酶切跑道。其中第 8 个样本为 TNF-α-A/G 杂合子, 第 11 样本为 A/A 纯合子, 其余为 G/G 纯合子。M: DNA 分子量标准。

图 1 TNF-α-238 巢式 PCR-RFLP 2% 琼脂糖凝胶电泳结果



每个样本占据 2 个电泳跑道, 一个 PCR 跑道, 一个 PCR 产物酶切跑道。其中第 4、第 5 个样本为  $\text{TNF-}\alpha$  A/G 杂合子, 其余为 G/G 纯合子。M: DNA 分子量标准。

图 2  $\text{TNF-}\alpha$ -308 巢式 PCR-RFLP 2% 琼脂糖凝胶电泳结果

本研究发现, 苯健康接触组-238 G/G 95.9%, A/G 4.1%, A/A 0%; 正常健康组-238 G/G 96.6%, A/G 3.5%, A/A 0%; 卡方检验两组  $\text{TNF-}\alpha$ -238 多态性差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。苯接触健康组-308 G/G 91.78%, A/G 8.2%, A/A 0%; 正常健康组-308 G/G 90.8%, A/G 9.2%, A/A 0%; 卡方检验两组  $\text{TNF-}\alpha$ -308 多态性差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2  $\text{TNF-}\alpha$ -238 位点及-308 位点基因多态性分析

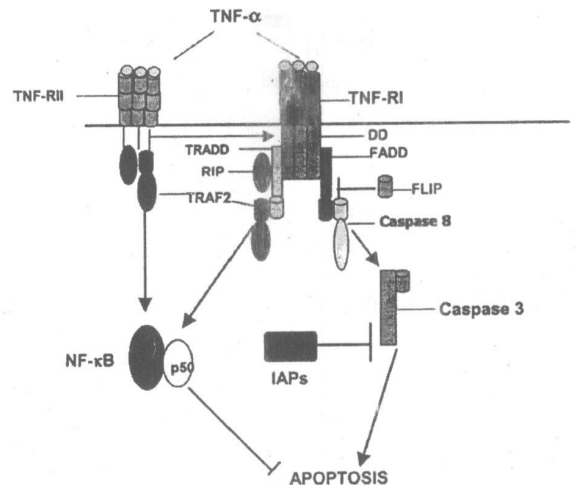
| 基因多态性    | 苯接触健康组 |       | 正常健康组 |       |
|----------|--------|-------|-------|-------|
|          | 例数     | %     | 例数    | %     |
| -238 G/G | 70     | 95.9% | 84    | 96.6% |
| A/G      | 3      | 4.1%  | 3     | 3.4%  |
| A/A      | 0      |       | 0     |       |
| -308 G/G | 67     | 91.8% | 79    | 90.8% |
| A/G      | 6      | 8.2%  | 8     | 9.2%  |
| A/A      | 0      |       | 0     |       |

### 3 讨论

苯中毒的机制至今还未阐明, 可能的机制包括生长因子的调节、细胞内超氧化压力、DNA 损伤、细胞循环的调节以及程序性的细胞死亡<sup>[7]</sup>。已有研究证实,  $\text{TNF-}\alpha$  抑制 HPC 集落活性, 诱发不同类型造血细胞的凋亡<sup>[8~9]</sup>。

肿瘤坏死因子主要由激活的淋巴细胞和单核细胞产生, 参与抗病毒及免疫调节反应<sup>[10]</sup>。肿瘤坏死因子有 20 个不同的超家族成员,  $\text{TNF-}\alpha$  是其家族成员之一。 $\text{TNF-}\alpha$  有 2 个独立的细胞表面受体, 即  $\text{TNF-R I}$  和  $\text{TNF-R II}$ 。 $\text{TNF-R I}$  包含死亡结构域, 而  $\text{TNF-R II}$  缺少死亡结构域。如图 3 所示,  $\text{TNF-}\alpha$  与  $\text{TNF-R I}$  结合, 激活死亡结构域 DD 以及受体相关死亡结构域 TRADD。TRADD 起一个平台作用, 能调节多种信号分子, 激活 Fas-相关死亡结构域 (FADD)、 $\text{TNF-R}$  相关因子 (TRAF2) 以及受体间作用蛋白 (RIP)。其中 TRAF2 与 RIP 受刺激导致核转录因子 ( $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ) 激活, 使细胞增殖; 而 FADD 导致 Caspase 8 激联反应, 最终导致细胞凋亡。 $\text{TNF-}\alpha$  与  $\text{TNF-R II}$  结合激活 TRAF2 导致  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  激活,  $\text{TNF-R II}$  受体本身并不引起细胞凋

亡, 但通过  $\text{TNF-R I}$  对凋亡起重要的调节作用<sup>[11]</sup>。以上  $\text{TNF-}\alpha$  信号途径说明  $\text{TNF-}\alpha$  是调节细胞增殖、凋亡的一个重要细胞因子。



DD: 死亡结构域; FADD: Fas-相关死亡结构域; RIP: 受体间作用蛋白; TRADD:  $\text{TNF-}$ 受体相关死亡结构域; TRAF-2:  $\text{TNF-}$ 受体相关因子 2; IAP: 凋亡抑制蛋白; FLIP: Flice 抑制蛋白

图 3  $\text{TNF-R I}$  和  $\text{TNF-R II}$  受体介导的  $\text{TNF-}\alpha$  信号途径

已有研究发现 MDS 病人周围血  $\text{TNF-}\alpha$  水平显著升高并伴有骨髓细胞凋亡增加<sup>[12]</sup>。Patrick 发现 HQ 抑制由  $\text{TNF-}\alpha$  诱导的造血干细胞 (HPC)  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  (核转录因子) 的激活, HQ 与  $\text{TNF-}\alpha$  协同作用使 HPC 凋亡增加。Pyatt 发现 HQ 抑制成熟 B 淋巴细胞内  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  的激活, 导致 B 淋巴细胞凋亡增加<sup>[13]</sup>。还有文献认为苯引起白细胞减少的原因可能是 HQ 抑制前 B 淋巴细胞的核转录, 导致前 B 淋巴细胞成熟障碍<sup>[14]</sup>。

上述研究证实造血细胞内  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  的激活受阻、凋亡增加是导致苯中毒造血系统毒性的一个重要机制,  $\text{TNF-}\alpha$  作为调节细胞增殖、凋亡的一个细胞因子在其中起非常重要作用。为此本文选择 73 例苯接触健康工人, 另选择 87 例正常健康对照, 比较两组人群  $\text{TNF-}\alpha$  的基因多态性。

在多态性研究中, 选择能准确辨别多态性的方法非常重要。本研究用巢式 PCR-RFLP 方法检测基因的多态性。巢式 PCR 首先用一对引物进行 PCR 扩增, 然后用所扩增的 DNA 片段内侧的第二对引物进行第二次 PCR 反应, 用这种方法得到的 PCR 产物多, 并仅限于第二对引物的扩增范围, 因而可以明显提高反应的特异性, 增加扩增效率<sup>[15]</sup>。

本研究正常健康人群  $\text{TNF-}\alpha$ -238 G/G 96.6%, A/G 3.5%,  $\text{TNF-}\alpha$ -308 G/G 90.8%, A/G 9.2%, 与文献报道中国汉族-308 $\text{TNF-}\alpha$  G/G 83.2%, A/G 15.7%<sup>[10]</sup> 有差异, 两者的差异可能是实验方法不同

所致, 本文用的是巢式 PCR-RFLP, 而文献用的是 PCR-RFLP。本文首次发现苯接触健康人群与正常健康人群之间 TNF- $\alpha$ -238 及 TNF- $\alpha$ -308 的基因多态性差异无显著性, 今后期待有更多这方面的研究进行探讨, 在这基础上有必要进一步研究 TNF- $\alpha$ -238 及 TNF- $\alpha$ -308 的基因多态性与慢性苯中毒的关系。

(致谢: 复旦大学上海医学院中美分子实验室提供部分资料。)

## 参考文献:

- [1] Wierda D, Irons RD. Hydroquinone and catechol reduce the frequency of progenitor B lymphocytes in mouse spleen and bone marrow [J]. Immunopharmacology, 1982, 4: 41-54.
- [2] Hayes RB, Yin SN, Dosemeci M, et al. Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China [J]. J Natl Cancer Inst, 1997, 89 (14): 1065-1072.
- [3] Rothman N, Smith MT, Hayes RB, et al. Benzene poisonings, a risk factor for hematological malignancy is associated with the NQO1 609C $\rightarrow$ T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone [J]. Cancer Res, 1997, 57 (14): 2839-2842.
- [4] Patrick J, David W, Ryatt, et al. Inhibition of NF- $\kappa$ B by hydroquinone sensitizes human bone marrow progenitor cells to TNF- $\alpha$ -induced apoptosis [J]. Toxicology, 2003, 187: 127-137.
- [5] Tiina Skoog, Ferdinand M, Van't Hooft. A common functional polymorphism (C $\rightarrow$ A) substitution at position-863 in the promoter region of the tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gene associated with reduced circulating levels of TNF- $\alpha$  [J]. Human Molecular Genetics, 1999, 8: 1443-1449.
- [6] Ali H, Hajeer, Ian V. Influence of TNF- $\alpha$  gene polymorphisms on TNF- $\alpha$

production and disease [J]. Human Immunology, 2001, 62: 1191-1199.

- [7] Martyn T Smith. The mechanism of benzene-induced leukemia: A hypothesis and speculations on the causes of leukemia [J]. Environmental Health Perspectives, 1996, 104 (supplement 6): 1219-1225.
- [8] Mundle SD, Ali A, Cartledge JD, et al. Evidence for involvement of tumor necrosis factor- $\alpha$  in apoptosis death of bone marrow cells in myelodysplastic syndromes [J]. Am J Hematol, 1999, 60: 36-47.
- [9] Zheng LX, Fisher G, Miller RE. Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor [J]. Nature, 1995, 377: 348-351.
- [10] Jimena C, Claudio A, Perez A, et al. Genetic polymorphism at position-308 in the promoter region of the tumor necrosis factor (TNF): Implications of its allelic distribution on susceptibility or resistance to diseases in the Chilean population [J]. Biol Res, 2001, 34: 237-241.
- [11] Xuezhong Y, Carol JT. Targeting the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand path in neuroblastoma [J]. Cancer Letters, 2003, 197: 137-143.
- [12] Tsudiya H, Adachi N, Asou N. Increased levels of soluble interleukin- $\alpha$  receptors myelodysplastic syndromes [J]. Blood, 1991, 77: 413-414.
- [13] D W Pyatt, Y Yang, W S Stillman, et al. Hydroquinone inhibits PMA-induced activation of NF- $\kappa$ B in primary human CD19<sup>+</sup> B lymphocytes [J]. Cell biology and Toxicology, 2000, 16: 41-51.
- [14] Wu M, Lee H, Bellas RE, et al. Inhibition of NF- $\kappa$ B/rel induces apoptosis of murine B cells [J]. EMBOJ, 1996, 15: 4682-4690.
- [15] Hummel M, Baust C, Kretschmar M, et al. Detection of Aspergillus DNA by a nested PCR assay is superior to blood culture in an experimental murine model of invasive aspergillosis [J]. J Med Microbiol, 2004, 53 (Pt8): 803-806.

## ·短篇报道·

### 自激式除尘器治理滑石粉效果评价

杨苏晋, 刘天敏

(胜利石油管理局职防所, 山东 东营 257036)

某电缆厂橡胶车间生产皮带所使用的主要原料为滑石粉。在配料振动过程中粉尘四处逸散, 污染严重。现对该厂自激式除尘系统治理滑石粉尘的效果进行评价, 供借鉴。

#### 1 基本情况

该配料间占地面积 16 m<sup>2</sup>, 日产量为 275 kg, 其主要工序是筛选粉料。筛选粉料工序位于车间偏中部。无任何机械通风除尘设施。

#### 2 治理方案

经有关专家多方考察、论证, 并根据作业场所工艺布局及粉尘性质等情况综合分析, 决定采用隔离上吸式自激水力除尘系统。首先对车间内的工艺布局进行重新调整, 将振动筛由车间偏中部移到东南角, 借两面靠墙的优势, 用铝合金玻璃窗隔离, 并留拉门; 在振动筛上方 1.2 m 处安装伞式吸尘罩; 排尘管路采用合理变径, 加阻尼, 硬连接方式; 风机

采用 4-72-4<sup>#</sup>, 并且安装有 FB-3.6 消声器; 除尘系统采用 DTSH-11 自激式水力除尘器。

#### 3 评价内容、方法和效果

治理前共采集样品 6 个, 测定值 10~17 mg/m<sup>3</sup>, 平均浓度为 13.5 mg/m<sup>3</sup>; 治理后采集样品数同治理前, 测定值 2.3~3.8 mg/m<sup>3</sup>, 平均浓度为 2.7 mg/m<sup>3</sup>。经统计学处理, 治理前后粉尘浓度差异有显著性 ( $t=4.35$ ,  $P<0.01$ ), 并且治理后作业场所的粉尘浓度达到国家卫生标准。

用 QDF 热球式风速计测量罩口风速并计算应用风量: 应用风量 (m<sup>3</sup>/h) = 3 600 × 罩口风速 × 罩口面积。罩口风速 1.5 m/s, 面积 0.52 m × 1m, 经计算风量为 2 808 m<sup>3</sup>/h。

#### 4 评价与分析

重新调整工艺布局后, 将污染源控制在一定范围内, 采取上吸隔离振动筛措施, 即挡、排除了粉尘又达到了隔声作用。采用自激式水力除尘器, 捕捉粉尘效率高, 并将捕捉的粉尘沉淀处理, 符合环保要求。根据治理前后结果显示除尘效果显著, 达到了国家卫生标准。

滑石粉所引起的主要病理改变是肺组织纤维化及肉芽肿, 同时滑石尘肺合并肺癌的发病率较高, 因此对工人身体健康危害极大。该厂通过对振动筛隔离、排尘、水幕除尘等多项措施, 成功地控制了滑石粉尘的污染, 改善了作业环境, 保护了工人的身体健康。