

· 实验研究 ·

CYP2E1基因多态与职业性锰中毒易感性关系的病例对照

Case control study on relationship between CYP2E1 polymorphisms and occupational susceptibility to chronic manganese exposure in Chinese Han population

蔡绍雷¹, 孙明霞², 何跃玲³, 张明刚³, 孙晓光⁴, 林彬⁴, 傅继华⁴, 闫永建¹

CAI Shao-lei, SUN Ming-xia, HE Yue-ling, ZHANG Ming-gang, SUN Xiao-guang, LIN Bin, FU Ji-hua, YAN Yong-jian

(1 山东省医学科学院 山东省职业卫生与职业病防治研究院, 山东 济南 250062 2 山东省卫生监督所, 山东 济南 250014; 3 泰安市职业病医院, 山东 泰安 271000 4 山东省疾病预防控制中心, 山东 济南 250014)

摘要: 采用 1:2 配对病例-对照研究的方法, 应用 PCR-RFLP 技术, 分析与比较了 200 例汉族职业性慢性锰中毒病例与 400 例汉族对照的 CYP2E1 基因 DraI 位点的基因多态性。结果显示, CYP2E1 基因 DraI 位点 D 等位基因在对照组和病例组中的分布频率分别为 59.8% 和 78.5%, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 41.778$ $P = 0.000$ $OR = 2.46$ $95\% CI = 1.86 \sim 3.25$); 具有 DD 基因型的个体发生职业性慢性锰中毒的危险性与具有非 DD 基因型的个体相比升高了 2.83 倍 ($OR = 3.83$ $95\% CI = 2.63 \sim 5.57$ $P < 0.05$)。提示 CYP2E1 基因可能是职业性慢性锰中毒的易感基因, 携带 CYP2E1 基因型 DD 者可能增加职业性慢性锰中毒的危险性。

关键词: CYP2E1 基因多态性; 职业性慢性锰中毒; 易感性
中图分类号: R135.1 O614.711 文献标识码: B
文章编号: 1002-221X(2011)03-0200-02

锰中毒的发病机制与多巴胺耗竭、能量代谢、自由基和兴奋性氨基酸及钙离子紊乱有关。长期暴露相同锰作业环境, 慢性锰中毒的发生存在明显个体差异, 提示慢性锰中毒患者可能携带某些易感致病基因, 目前对职业性慢性锰中毒遗传易感基因的研究主要集中于细胞色素氧化酶 P450 酶族的基因研究中。研究发现 CYP2D6 基因 2938^{C-T}位点多态性^[1]可能与职业性慢性锰中毒遗传易感性有关。本文在以往研究资料的基础上, 利用 1:2 配比病例对照研究的方法探讨 CYP2E1 基因 DraI 位点基因多态与职业性慢性锰中毒易感性的关系, 为锰暴露工人慢性锰中毒早期预防提供依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象

筛选职业性慢性锰中毒病例 200 例, 其中男性 179 例, 女性 21 例, 年龄 (41.67 ± 6.94) 岁, 工龄 (22.83 ± 8.03) 年, 病例组来自山东、江西、黑龙江和辽宁等地, 所有病例由专业职业病医师根据 GBZ3-2006《职业性慢性锰中毒诊断

标准》判定, 并由职业病专家组进行复检。根据同工者职工健康资料为每一个病例匹配 2 名锰暴露情况一致而未发病的正常锰作业职工 400 例为对照组, 匹配条件为同车间、同工种、同一时期作业, 锰作业工龄相差不超过 3 年, 年龄相差不超过 5 岁, 其中男性 358 例、女性 42 例, 年龄为 (45.30 ± 5.20) 岁, 工龄为 (23.70 ± 5.81) 年。研究对象均无帕金森氏症、肝豆状核变性、脑血管梗塞后遗症、脑动脉硬化、脑炎后遗症和急性一氧化碳中毒后并发症等疾病。所有研究对象均为汉族。采两组人群外周血 5 ml 于 EDTA 抗凝管中, 采用 QIAGEN 公司抗凝外周全血液基因组提取试剂盒提取 DNA 操作按照说明书进行。提取的 DNA 经紫外分光光度计测定, D260/D280 范围在 1.6~2.0 之间, 将 DNA 置 -80℃ 冰箱冷存备用。

1.2 CYP2E1 基因 DraI 位点多态性的检测

基因分型参考文献 [2] 所用方法, PCR 扩增含有 CYP2E1 基因 DraI 位点的 DNA 片段, 片段长度为 995 bp 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法 (PCR-RFLP) 分析 CYP2E1 基因 DraI 位点基因型。

1.2.1 PCR 反应 引物由上海生工生物工程公司合成, 上游引物为 5'-TCGTCAGTTCCTGAAAGCAGG3', 下游引物为 5'-GAGCTCT-GATGGAAGTATCGCA3', 25 μl PCR 反应体系为: 10× Ex Taq buffer (含氯化镁, TaKaRa) 2.5 μl, dNTP 2.5 μl, 上下游引物各 0.5 μl, Ex Taq DNA 聚合酶 1.0 U, 模板 3 μl, 加双蒸水至 25 μl 在 PCR 扩增仪 (BIO-RAD 公司, 美国) 上进行 PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min, 于 94℃ 60 s, 60℃ 90 s, 72℃ 120 s 进行 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.2.2 RFLP 酶切反应 取 10 μl PCR 产物加入限制性核酸内切酶 DraI (NEB 公司) 10.0 U, 酶切缓冲液 2.0 μl 并加双蒸水补充总体积至 20 μl 于 37℃ 水浴 16 h, 取酶切产物 10 μl 用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 在凝胶成像仪下观察结果。野生型 DD 为 572 bp, 302 bp 和 121 bp 三条带, 纯合子突变 CC 为 874 bp 和 121 bp 两条带, 杂合子突变 CD 为 874 bp, 572 bp, 302 bp 和 121 bp 四条带。为了保证基因分型的准确性, 随机抽检其中的 10% 样品进行重新分型, 符合率达 100%。

1.3 统计分析

本文表 3 分析采用 1:2 配比病例对照研究的方法^[3], 计算 χ^2 值、P 值、OR 值及其 95% 可信区间。其余统计分析采

收稿日期: 2010-11-30 修回日期: 2011-03-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (项目编号: 30771789); 国家“十一五”科技支撑项目 (项目编号: 2006BA06B02)

作者简介: 蔡绍雷 (1984-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事职业病防治研究。

通讯作者: 闫永建, 研究员, Email: yyj82003@163.com

用 SPSS1.5 软件, 检验水准 $\alpha = 0.05$

2 结果

2.1 基因型分布频率

CYP2E1 基因 DraI 位点等位基因 D 的频率在对照组中为 59.8%, 根据 Hardy-Weinberg 平衡定律推算每种基因型的理论分布频数, 经统计分析, 各基因型的分布频率符合遗传学 Hardy-Weinberg 平衡 ($\chi^2 = 2.187$ $P = 0.335$) 提示对照组选择人群无偏倚。

2.2 CYP2E1 基因 DraI 位点等位基因和基因型频率比较

由表 1 可见, 对照组和病例组 CYP2E1 基因 DraI 位点等位基因 D 的频率分别为 59.8% 和 78.5%, D 等位基因频率在对照组和病例组分布差异有统计学意义 ($\chi^2 = 41.778$ $P = 0.000$) 等位基因 D 携带者发生职业性慢性锰中毒的危险性为 C 的 2.46 倍 (95% CI = 1.86 ~ 3.25)。

表 1 CYP2E1 基因 DraI 位点等位基因在对照组和病例组中的分布

等位基因	对照组		病例组		χ^2 值	P 值	OR(95% CI)
	例数	%	例数	%			
D	478	59.8	314	78.5			
C	322	40.2	86	21.5	41.778	0.000	2.46(1.86~3.25)

由表 2 可见, CYP2E1 基因 DraI 位点基因型在对照组和病例组的分布差异有统计学意义 ($\chi^2 = 49.687$ $P = 0.000$) 携带基因型 DD 的个体患职业性慢性锰中毒的危险性是携带基因型 (CD+CC) 个体的 3.49 倍 (95% CI = 2.45 ~ 4.98)。

表 2 CYP2E1 基因 DraI 位点基因型在对照组和病例组中的分布

基因	对照组		病例组		χ^2 值	P 值	OR (95% CI)
	例数	%	例数	%			
DD	133	33.3	127	63.5			
CD+CC	267	66.7	73	36.5	49.687	0.000	3.49(2.45~4.98)
CD	212	53.0	60	30.0			
CC	55	13.7	13	6.5			

2.3 职业性慢性锰中毒与 CYP2E1 基因 DraI 位点基因型的关系

将携带 CYP2E1 基因 DD 基因型记为 (+), 携带 CC 记为 (-), 携带 CD 也记为 (-), 统计每个对子 (包括一个病例和与其配对的两个对照) 携带基因型的情况, 则 (-) 表示两名对照基因型均不为 DD, (+) 表示两名对照中有一名基因型为 DD, (++) 表示两名对照基因型均为 DD, 如表 3 所示, 按照 1:2 配比病例对照研究的分析方法对对子数情况进行统计学检验, $\chi^2 = 52.59$ $P < 0.05$ 差异有统计学意义, 具有 DD 基因型的个体发生职业性慢性锰中毒的危险性与具有 CC 或 CD 基因型的个体相比升高了 2.83 倍 (OR = 3.83 95% CI = 2.63 ~ 5.57)。

表 3 慢性锰中毒和 CYP2E1 基因 DraI 位点基因型关系的 1:2 配比病例对照研究结果

病例组	对照组		
	--	+-	++
+ (DD)	58	60	9
- (CD 或 CC)	34	32	7

3 讨论

疾病的遗传易感性受疾病发生发展相关基因的多态性影

响, 与基因功能相关的多态性可能会导致 mRNA 转录水平的改变或者基因转录产物的改变而最终影响该基因编码的酶的活性。本研究在以往研究资料基础上采用 1:2 配比病例对照研究的方法, 加大了研究样本的数量, 通过对 CYP2E1 基因 DraI 酶切位点的基因多态性与职业性慢性锰中毒易感性关系进行相关分析, 携带 CYP2E1 基因 DD 基因型发生职业性慢性锰中毒的危险性比携带非 DD 基因型的个体高, 进一步验证了 WANG 等^[4]的研究结果。

细胞色素 P450 属于血红蛋白类酶, 主要亚族包括 CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C, 2D6, 2E1 和 3A, CYP2E1 基因位于第 10 号染色体, 有 11 413 bp 上游 2 788 bp 下游 599 bp 有 9 个外显子, 8 个内含子和 1 个典型的 TATA 盒, 翻译产物为由 493 个氨基酸组成的功能蛋白质^[5]。CYP2E1 基因存在 6 种限制性片段长度多态性, 其中 DraI 位点多态性影响 CYP2E1 的表达^[6]。人体细胞色素氧化酶 P450 在锰中毒的发生过程中起着重要作用, 过量的锰可激活细胞色素氧化酶 P450, CYP2E1 存在于黑质富含多巴胺的神经元中, CYP2E1 基因突变可引起产生活性氧 (ROS) 的酶的能力改变^[7], 同时引起多巴胺递质释放的改变^[8], 多巴胺代谢与锰中毒密切相关。因此, CYP2E1 基因 DraI 位点多态性可能引起黑质神经元对自由基敏感性的变化, 从而引起职业性慢性锰中毒。

进一步研究 CYP2E1 不同基因型对细胞色素 P450 功能的影响, 尤其是在锰诱导时细胞色素 P450 活性与表达的改变, 可以对 CYP2E1 基因多态性与职业性慢性锰中毒的易感性提供有力的证据。

(致谢: 本课题实验室工作部分在山东省传染病预防控制重点实验室完成, 得到实验室领导和人员的大力支持和帮助。)

参考文献:

- [1] 郑玉新, 何凤生, 陈彪, 等. 慢性锰中毒易感性与基因多态性的病例对照研究 [J]. 中华预防医学杂志, 1999, 33 (2): 78-80
- [2] Kao S, Shields P G, Caporaso N E, et al. Cytochrome P450II E1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk [J]. Cancer Res, 1992, 52 (23): 6712-6715.
- [3] 倪宗瓌. 医学统计学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 152-154
- [4] 王静雯, 张灏, 周伟, 等. CYP2E1 5'侧翼区基因多态性与职业性慢性锰中毒易感性病例对照研究 [J]. 预防医学论坛, 2007, 13 (8): 673-678
- [5] Munio A W, Girvan H M, McLean K J. Cytochrome P450-reductase and its oxidoreductase enzymes [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1770 (3): 345-359
- [6] 王建, 刘焯, 黎锦如, 等. 中国广东籍汉族人细胞色素 P450E1 基因 5'侧翼区多态性 [J]. 中山医科大学学报, 1999, 20 (1): 29-31.
- [7] Shahab N, Andersson D R, Nisbrandt H. Cytochrome P450E1 in the substantia nigra: relevance for dopaminergic neurotransmission and free radical production [J]. Synapse, 2008, 62 (5): 379-388
- [8] Nisbrandt H, Bergquist F, Jonason J, et al. Inhibition of cytochrome P450E1 induces an increase in extracellular dopamine in rat substantia nigra: a new metabolic pathway [J]. Synapse, 2001, 40 (4): 294-301.