

- exposed to amended natural soils [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2004, 23: 1026-1034.
- [4] Trott S, Nishino S F, Hawari J, *et al.* Biodegradation of the nitramine explosive CL-20 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 1871-1874.
- [5] Bardai G, Sunahara G, Spear P, *et al.* Effects of dietary administration of CL-20 on Japanese quail *Coturnix coturnix japonica* [J]. *Ar-*

- chives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2005, 49: 215-222.
- [6] Ivan Boyer, John K M, Rebecca E W, *et al.* Evaluation of the relative risk of China Lake 20 (CL-20) based on current toxicity, fate and transport, and other technical information [R]. *Noblis Technical Report*, 2007.

## 着色性干皮病基因 D 多态性与二甲基甲酰胺致肝功能损伤易感性的关系

### Relationship between polymorphisms of gene *XPD* and hepatic susceptibility to dimethylformamide toxicity

吴京颖<sup>1</sup>, 许旭艳<sup>1</sup>, 刘祥铨<sup>1</sup>, 何颖荣<sup>1</sup>, 张伟<sup>1</sup>, 刘合焯<sup>2</sup>

WU Jing-ying<sup>1</sup>, XU Xu-yan<sup>1</sup>, LIU Xiang-quan<sup>1</sup>, HE Ying-rong<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, LIU He-kun<sup>2</sup>

(1. 福州市疾病预防控制中心, 福建 福州 350004; 2. 福建医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学系, 福建 福州 350004)

**摘要:** 采用随机整群抽样方法抽取 296 名二甲基甲酰胺作业工人为研究对象, 采集外周静脉血样品, 检测血 ALT、AST、 $\gamma$ -GT 水平, 采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析技术 (PCR-RFLP) 检测 *XPD* 基因 Asp312Asn、Lys751Gln 多态性, 分析二甲基甲酰胺作业工人不同基因型与二甲基甲酰胺肝毒性易感性的关系。结果显示, *XPD*-312GG/GA+AA、*XPD*-751AA/AC+CC 基因型组工人血 ALT、AST、 $\gamma$ -GT 水平比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 肝功能指标异常以 ALT  $\geq 50$  IU/L、AST  $\geq 40$  IU/L、 $\gamma$ -GT  $\geq 54$  IU/L 一项或一项以上为界, 经  $\chi^2$  检验、logistic 回归分析显示, 不同基因型组工人肝功能异常率差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 校正  $OR_j$  分别为 0.70、1.03, 95% *CI* 分别为 0.38 ~ 1.41、0.51 ~ 2.05。说明 *XPD* 基因 Asp312Asn 和 Lys751Gln 多态性可能与二甲基甲酰胺肝毒性易感性无关。

**关键词:** *XPD* 基因; 多态性; 二甲基甲酰胺; 肝毒性; 易感性

中图分类号: R994.6 文献标识码: B  
文章编号: 1002-221X(2013)06-0436-03

二甲基甲酰胺 (*N,N*-dimethylformamide, DMF) 会引起职业接触者的肝功能损害<sup>[1]</sup>。随着职业接触二甲基甲酰胺人员的日益增多, 加强二甲基甲酰胺危害的防治研究日益引起职业卫生工作者重视。本研究应用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析技术 (PCR-RFLP) 检测人类着色性干皮病基因 D (xeroderma pigmentosum complementary group D, *XPD*) Asp312Asn、Lys751Gln 单核苷酸多态性, 分析其在二甲基甲酰胺作业人群中的分布情况, 探讨二甲基甲酰胺作业工人不同基因型与二甲基甲酰胺肝毒性易感性的关系。

### 1 对象与方法

#### 1.1 研究对象

收稿日期: 2013-02-04; 修回日期: 2013-04-20  
基金项目: 福建省卫生厅青年科研课题 (2010-2-82)  
作者简介: 吴京颖 (1975-), 女, 主治医师, 主要从事职业病防治工作。

采用随机整群抽样方法, 选择福州市 3 家人造革生产企业 296 名 (男 94 名、女 202 名) 二甲基甲酰胺作业人员为研究对象, 年龄 18 ~ 39 (23.7  $\pm$  3.2) 岁; 工龄 1 ~ 12 (3.6  $\pm$  1.9) 年。以肝功能指标为界, 分为肝功能异常组 (78 人) 和肝功能正常组 (对照组, 218 人)。

#### 1.2 血样采集

采静脉血 6 ml, 2 ml 存于装有乙二胺四乙酸 (EDTA) 的抗凝管中, -20  $^{\circ}$ C 冰箱冻存, 用于基因多态性检测分析; 4 ml 血样装于促凝管 (带分离胶) 用于肝功能检验, 在 24 h 内完成所有待检项目。

#### 1.3 肝功能检测

用速率法检测丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶 ( $\gamma$ -GT), 分析仪器为贝克曼 CX5 全自动生化分析仪 (美国贝克曼库尔特公司)。每项肝功能指标正常参考值为 ALT 5 ~ 50 IU/L, AST 4 ~ 40 IU/L,  $\gamma$ -GT 0 ~ 54 IU/L, 其中任一项指标高于参考值即定义为异常。

#### 1.4 *XPD* 基因型测定

采用 TIANamp Blood DNA Kit 血液基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 提取基因组 DNA, 根据 GenBank 中 *XPD* 基因的序列用 Primer Premier 5.0 软件自行设计引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成, PCR 反应总体积 25  $\mu$ l, 含 2  $\times$  Taq PCR MasterMix 12.5  $\mu$ l、上游引物 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ l、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ l、模板 DNA 2  $\mu$ l, 加双蒸水至总体积, 扩增参数: 冷启动, 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 38 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。酶切反应总体积 15  $\mu$ l, 其中含 PCR 产物 10  $\mu$ l, 内切酶 1.0  $\mu$ l (Sty I 10 U 或 Pst I 10 U), 10  $\times$  Buffer 2  $\mu$ l, 加双蒸水至总体积, 37  $^{\circ}$ C 孵育 3 h 使样品完全酶切。扩增产物酶切片段用 3% 琼脂糖凝胶电泳分离, 核酸染料 GoldView 染色, 用 Gel Doc 2000 凝胶成像分析系统观察确定基因型: 野生纯合型 *XPD*-312GG 为 507 bp 和 244 bp, 杂合型 *XPD*-312GA 为 507 bp、474 bp、244 bp 和 33 bp, 突变纯合型 *XPD*-312AA 为 474 bp、244 bp 和 33 bp; 野生纯合型 *XPD*-751AA 为 290 bp 和 146 bp, 杂合型 *XPD*-751AC 为 290 bp、277 bp、146 bp 和

63 bp, 突变纯合型 XPD-751CC 为 277 bp、146 bp 和 63 bp。 见表 1。

表 1 XPD 基因 PCR-RFLP 引物序列、扩增片段长度、限制性内切酶( RE) 及酶切片大小

XPD 基因 SNP 位点	Prime Sequences (5'→3')	扩增片段 长度 (bp)	退火 温度	RE 及工 作温度	等位基因片段长度 (bp)
G23591A (Asp312Asn)	F: 5-CTGTTGGTGGGCTGCCCGTATCTGTTGGTCT-3 R: 5-TAATATCGGGGCTCACCCCTGCAGCACTTCTC-3	751	60 °C	<i>Sty</i> I 37 °C	Asp/Asp: 507、244 Asn/Asn: 474、244、33 Asp/Asn: 507、474、244、33
A35931C (Lys751Gln)	F: 5-GCCCGCTCTGGATTATACG-3 R: 5-CTATCATCTCTGGCCCCC-3	436	60 °C	<i>Pst</i> I 37 °C	Lys/Lys: 290、146 Gln/Gln: 277、146、63 Lys/Gln: 290、277、146、63

1.5 统计学方法

用 SPSS13.0 软件进行统计分析。人群 Hardy-Weinberg (H-W) 平衡遗传吻合度分析采用  $\chi^2$  检验,  $P \geq 0.05$  为 H-W 平衡; 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 经检验呈正态性分布者, 两组间比较采用 *t* 检验; 基因型频率和等位基因频率比较采用  $\chi^2$  检验。采用非条件 logistic 回归计算校正后的 OR 值及其 95% CI; 以  $\alpha = 0.05$  为检验水准。

2 结果

2.1 研究人群 H-W 平衡检验

296 名二甲基甲酰胺作业工人中, 224 人 (75.67%) 为 XPD-312GG 型, 63 人 (21.28%) 为 XPD-312GA 型, 9 人 (3.04%) 为 XPD-312AA 型, 等位基因 XPD-312G 的频率为 0.87, XPD-312A 的频率为 0.14; 239 人 (80.74%) 为 XPD-751AA 型, 50 人 (16.89%) 为 XPD-751AC 型, 7 人 (2.36%) 为 XPD-751CC 型, 等位基因 XPD-751A 的频率为 0.89, XPD-751C 的频率为 0.11。各基因型的频率分布均符合 H-W 平衡 ( $\chi^2$  分别为 1.13、1.46,  $P$  值分别为 0.57、0.48), 说明此次研究选择的人群有代表性。

2.2 不同基因型组二甲基甲酰胺作业工人年龄、作业工龄 (DMF 工龄) 比较

由于 XPD-312A、XPD-751C 等位基因频率较低, 将 XPD-312GA 和 XPD-312AA 合并、XPD-751AC 和 XPD-751CC 合并成组进行分析处理。不同基因型组 (XPD-312GG/GA + AA、XPD-751AA/AC + CC) 工人的年龄、DMF 工龄比较, 经 *t* 检验显示, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

表 2 XPD 不同基因型二甲基甲酰胺作业工人年龄、DMF 工龄比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	XPD-312			XPD-751		
	GG(n=224)	GA+AA(n=72)	P 值	AA(n=239)	AC+CC(n=57)	P 值
年龄 (岁)	23.9±3.2	23.3±2.9	0.14	24.1±3.3	23.5±2.8	0.17
DMF 工龄 (年)	3.6±2.1	3.2±1.7	0.10	3.6±2.1	3.4±1.8	0.47

2.3 不同基因型组二甲基甲酰胺作业工人血 ALT、AST、 $\gamma$ -GT 水平比较

296 名二甲基甲酰胺接触工人平均血 ALT 为 (41.6 ± 7.6) IU/L, AST 为 (33.7 ± 6.2) IU/L,  $\gamma$ -GT 为 (43.4 ± 7.9) IU/L。经 *t* 检验显示, 不同基因型组 (XPD-312GG/GA + AA、XPD-751AA/AC + CC) 工人的上述指标比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 3。

表 3 XPD 不同基因型二甲基甲酰胺作业工人血 ALT、AST、 $\gamma$ -GT 水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	XPD-312			XPD-751		
	GG(n=224)	GA+AA(n=72)	P 值	AA(n=239)	AC+CC(n=57)	P 值
ALT(IU/L)	42.8±7.8	41.1±7.3	0.09	42.5±7.6	41.2±6.8	0.19
AST(IU/L)	34.4±6.5	33.1±6.1	0.12	33.8±5.8	32.3±6.6	0.11
$\gamma$ -GT(IU/L)	43.6±8.0	42.1±7.6	0.15	43.6±7.4	41.9±8.1	0.14

2.4 不同基因型二甲基甲酰胺作业工人肝功能异常率比较

经  $\chi^2$  检验显示, 肝功能正常组和肝功能异常组不同基因型组基因型频率分别比较, 差异均无统计学意义 ( $\chi^2$  值分别为 1.49、0.11,  $P$  值分别为 0.22、0.74)。

以各基因型野生型纯合子人群为参照组, 以年龄、二甲基甲酰胺工龄、二甲基甲酰胺接触水平、个体防护为校正因素, 经 logistic 回归分析显示, 2 组不同基因型组基因型频率分别比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 4。

表 4 不同基因型二甲基甲酰胺作业工人肝功能异常率分布比较

基因型	肝功能		合计	$\chi^2$ 值	P 值	OR (95% CI)	
	正常组	异常组				校正前	校正后
	XPD-312GG	161				63	224
XPD-312GA+AA	57	15	72	0.67	(0.35-1.27)	0.70	(0.38-1.41)
XPD-751AA	177	62	239	1.00		1.00	
XPD-751AC+CC	41	16	57	1.11	(0.58-2.12)	1.03	(0.51-2.05)

注: 调整因素包括年龄、二甲基甲酰胺工龄、二甲基甲酰胺接触水平、个体防护。

3 讨论

二甲基甲酰胺是亲肝性毒物, 其对接触者的毒性作用主要表现为肝功能损害, 但是在同样的作业环境, 同样接触二甲基甲酰胺水平的人群中, 也仅有部分个体发生肝功能损害, 且肝功能损害程度存在明显差别。提示在二甲基甲酰胺肝功能损害的机制中除了环境因素外, 遗传因素包括基因多态性也发挥重要作用。目前关于二甲基甲酰胺毒性遗传易感性的研究主要集中在代谢酶基因如细胞色素 P450 (CYPs) 基因和谷胱甘肽-S 转移酶 (GST) 基因多态性方面<sup>[2-4]</sup>, 但关于二甲基甲酰胺毒性与 DNA 损伤修复基因 XPD 基因单核苷酸多态性的研究未见文献报道。事实上毒物的代谢、活化和对机体的损伤是由个体整体的遗传背景所决定, 可能涉及与之相关的代谢、损伤通路的所有基因。

二甲基甲酰胺会引起职业接触者的遗传物质损伤<sup>[5,6]</sup>, 个体修复基因与修复能力关系密切, 是影响机体易感性的重要

因素<sup>[7]</sup>。XPD 基因是人的一种 DNA 修复基因, 也称作核苷酸切除修复交叉互补 (excision repair cross complementing, ERCC) 基因。XPD 定位于人类染色体 19q 13.2-13.3, 转录产物大小为 2283 bp, 由 760 个核苷酸组成, 包含 23 个外显子。XPD 是一种 ATP 依赖的 DNA 解螺旋酶, 参与核苷酸切除修复 (nucleotide excision repair, NER) 途径, 同时还参与组成 II 型转录因子 H (TF II H) 复合物及 p53 介导的凋亡反应, 是一个多功能的基因<sup>[8]</sup>。

本研究发现 296 名二甲基甲酰胺接触工人不同基因组 (XPD-312GG/GA + AA, XPD-751AA/AC + CC) 工人血 ALT、AST、 $\gamma$ -GT 水平比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。以肝功能正常与否考察基因型分布, 结果显示, 在不同基因组间工人肝功能异常率比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 校正  $OR_j$  分别为 0.70、1.03, 95%  $CI$  分别为 0.38 ~ 1.41、0.51 ~ 2.05。因此推测 XPD 基因 Asp312Asn 和 Lys751Gln 多态性可能与二甲基甲酰胺毒性易感性无关。

参考文献:

[1] 刘祥铨, 张忠, 吴长汉, 等. 职业接触二甲基甲酰胺对青年女工肝损害研究 [J]. 中国职业医学, 2012, 39 (2): 141-142.

[2] 徐承敏, 钱亚玲, 张幸. CYP2E1 和 GST 基因多态性对二甲基甲酰胺代谢及毒性的影响 [J]. 中国工业医学杂志, 2007, 20 (1): 38-41.

[3] Amato G, Grasso E, Longo V, et al. Oxidation of *N,N*-dimethylformamide and *N,N*-diethylformamide by human liver microsomes and human recombinant P450s [J]. Toxicol Letters, 2001, 124: 11-19.

[4] J Luo J C, Cheng T J, Kuo H W, et al. Abnormal liver function associated with occupational exposure to dimethylformamide and glutathione S-transferase polymorphisms [J]. Biomarkers, 2005, 10 (6): 464-474.

[5] 刘祥铨, 郑能雄, 张忠, 等. 二甲基甲酰胺对青年女性工人遗传毒性的研究 [J]. 预防医学论坛, 2010, 16 (8): 673-675.

[6] 刘祥铨, 郑能雄, 张忠, 等. 二甲基甲酰胺对青年女工外周血淋巴细胞的遗传毒性 [J]. 中国工业医学杂志, 2012, 25 (2): 135-137.

[7] 朱守民, 夏昭林. DNA 损伤修复基因与遗传易感性 [J]. 环境与职业医学, 2003, 20 (1): 50-52.

[8] Lunn R M, Helzlsouer K J, Parshad R, et al. XPD polymorphisms: effects on DNA Repair proficiency [J]. Carcinogenesis, 2000, 21 (4): 551-555.

## 2,4-二氯苯氧乙酸对仔代大鼠早期神经行为发育的影响

### Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on early neurobehavioral development in offspring of rats

薄存香, 张振玲, 郭启明, 谢琳, 刘永霞, 戈扬, 赛林霖, 张放

BO Cun-xiang, ZHANG Zhen-ling, GUO Qi-ming, XIE Lin, LIU Yong-xia, GE Yang, SAI Lin-lin, ZHANG Fang

(山东省职业卫生与职业病防治研究院, 山东 济南 250002)

摘要: 探讨孕哺期暴露 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 对仔代大鼠早期神经行为发育的影响。大鼠于受孕后第 2 天开始经口灌胃染毒 2,4-D 0、25、50、100 mg/kg 直到仔鼠出生后第 21 天。结果显示各染毒组仔鼠出生后张耳、门牙萌出、开眼、睾丸下降、阴道开启等生理发育指标与对照组比较差异无统计学意义。仔鼠早期神经行为测试中 100 mg/kg 染毒组断崖回避、空中翻正及听觉惊愕的阳性发生率明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 出现神经行为发育迟缓。提示 2,4-二氯苯氧乙酸对早期神经行为发育具有一定毒性作用。

关键词: 2,4-二氯苯氧乙酸; 神经行为; 发育毒性

中图分类号: R994.6 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2013)06-0438-03

2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D) 属于苯氧羧酸类除草剂, 具有较强的神经毒性作用<sup>[1]</sup>,

能通过胎盘和乳汁影响胎儿的发育<sup>[2]</sup>。发育中的脑由于血脑屏障尚未发育成熟更容易受到侵害, 目前对仔代神经系统发育影响未见任何报道。本研究通过孕鼠妊娠期和哺乳期染毒 2,4-D, 观察其仔代大鼠出生后早期神经行为的发育, 探讨 2,4-D 的神经行为发育毒性作用。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 受试物

2,4-二氯苯氧乙酸, 白色粉末 (纯度 > 98%), 不溶于水, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司提供。用少量吐温 80 助溶配制所需浓度 (2.5、5.0、10.0 mg/ml)。阴性组给予等量的吐温水溶液。

##### 1.2 实验动物与染毒

选用清洁级 Wistar 大鼠雌 40 只, 体重 230 ~ 250 g, 雄 20 只, 体重 280 ~ 320 g。由山东大学实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK (鲁) 20090001。动物适应 1 周后, 按雌: 雄 = 1:1 于每晚 16:00 时合笼, 次日 8:00 检查阴栓, 以查见阴栓的当天作为妊娠 0 d, 将孕鼠随机分为 4 组, 于妊娠第 2 天开始灌胃染毒至仔鼠出生后第 21 天, 2,4-D 染毒剂量分别为 0、25、50、100 mg/kg。实验在 SPF 级动物房内进行, 动物房温度 20 ~ 24  $^{\circ}C$ , 湿度 40% ~ 50%。

##### 1.3 观测指标及方法

收稿日期: 2013-03-26; 修回日期: 2013-05-14

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2012CL12, ZR2009CM114); 东省医学科学院科技项目 (2011013)

作者简介: 薄存香 (1979-), 女, 硕士研究生, 助理研究员, 主要从事卫生毒理学研究。

通讯作者: 赛林霖, 博士在读, 从事卫生毒理学研究。