

· 专题交流 ·

代谢酶基因多态致氯乙烯暴露人群染色体损伤易感性研究

Study on susceptibility of chromosomal damage in vinyl chloride exposed workers owing to genetic polymorphisms of metabolizing enzymes

李磊¹, 冯晓蕾², 李国玉¹, 王威², 孙长青², 段晓冉², 王团伟², 张勇敢³, 钱吉⁴, 夏昭林⁵

(1. 郑州市职业病防治院, 河南 郑州 450000; 2. 郑州大学公共卫生学院, 河南 郑州 450000; 3. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450000; 4. 复旦大学生命科学院, 上海 200032; 5. 复旦大学公共卫生学院, 上海 200032)

摘要: 通过双核淋巴细胞微核方法评价氯乙烯暴露人群染色体损伤水平, PCR法检测 *GSTT1*、*GSTM1* 基因缺失频率, PCR-RFLP 检测 *CYP2E1* G/C、*CYP2D6* G/C 和 *GSTP1* G/A 基因多态情况, Poisson 回归分析代谢酶基因多态及其他危险因素对染色体损伤易感性的影响, 发现性别、年龄、氯乙烯暴露、*GSTP1* 和 *CYP2E1* 基因多态性可能与个体染色体损伤的发生风险有关, *GSTP1* G/A 和 *CYP2E1* G/C 基因多态性可能是氯乙烯暴露人群染色体损伤的生物标志。

关键词: 氯乙烯; 染色体损伤; 基因多态; 代谢酶

中图分类号: R135.1; O623.221 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2015)03-0182-03

DOI:10.13631/j.cnki.zgggyx.2015.03.007

氯乙烯 (vinyl chloride monomer, VCM) 是生产聚氯乙烯塑料的一种重要化工原料。VCM 在体内的代谢主要涉及到细胞色素 P450 酶系和谷胱甘肽 S 转移酶系, 毒物代谢酶 CYPs 和 GSTs 存在基因多态性^[1], 基因型不同可导致氨基酸组成发生变化, 从而影响蛋白功能。本研究旨在探讨 VCM 致 DNA 损伤的易感性因素, 探索 VCM 致 DNA 损伤和致癌的可能机制。

1 对象与方法

1.1 对象

接触组选择上海某化工厂接触氯乙烯超过 1 年, 并完整填写调查表、抽取血样及成功完成双核淋巴细胞微核试验的 185 名工人, 其中男性 117 名、女性 68 名。对照组选自复旦大学公共卫生学院教师和研究生志愿者 41 名, 其中男性 20 名、女 21 名。

1.2 方法

1.2.1 问卷调查 采取统一的健康体检表调查研究对象的一般情况、生活习惯、家族史、个人既往病史, 职业史等。

1.2.2 车间空气 VCM 浓度监测 每月测定一次该工厂各车间 VCM 浓度 (气相色谱法), 据此推算各车间 VCM 的月平均浓度。个人 VCM 累积接触剂量估算: 计每月工作日平均为 20 d, 一个月总接触时间按 2 400 min 计 (工人每天实际接触 120 min)。

累积接触剂量 (mg) = Σ (月接触 VCM 平均浓度 × 2400) × 肺通气量 × 70% ÷ 1000 (男性肺通气量均值为 6 500 ml/min, 女性肺通气量均值为 4 300 ml/min, 30% 为无效腔)

1.2.3 血样采集 经知情同意后采集研究对象静脉血样 3 ml/人, 其中 1 ml 装入肝素抗凝管内, 混匀, 置冰盒中尽快运回实验室, 用于双核淋巴细胞微核试验; 2 ml 不抗凝, -20 °C 保存, 用于基因组 DNA 提取和基因型分析。采用酚氯仿抽提法进行 DNA 的提取。

1.2.4 胞质分裂阻滞微核试验方法 将 0.5 ml 肝素抗凝血加入 4.5 ml 培养液中, 37 °C 培养 44 h, 加入细胞松弛素 B 应用液 (Sigma 公司, 终浓度为 6 μg/ml), 继续培养至 72 h 收获, 制片, 10% Giemsa 染色, 油镜下观察 1000 个双核淋巴细胞, 记录有微核的双核淋巴细胞数 (一个双核淋巴细胞中如含有一个或多个微核均按一个微核细胞计), 求出微核细胞率 (%)。

1.2.5 *GSTT1*、*GSTM1* 基因缺失检测 PCR 法检测 *GSTT1*、*GSTM1* 基因缺失情况。缺失型不显示 *GSTT1* (459 bp) 或 *GSTM1* (219 bp) 片段。

1.2.6 *GSTP1*、*CYP2E1* 和 *CYP2D6* 基因多态 采用 PCR-RFLP 方法检测基因型, 根据 gene bank 提供的 DNA 碱基序列信息, 使用 Primer premier 5.0 软件设计含 *GSTP1* 基因的 PCR 引物。*CYP2E1* 和 *CYP2D6* 基因扩增引物引自参考文献 [2]。

GSTP1 基因第 5 外显子 105 位氨基酸 Val/Ile (G/A, rs1695) 变异, 使用 Alw26I 酶切分型, 电泳后出现 3 种图谱, 即 Ile/Ile 型为 289 bp, Ile/Val 型为 289、218 和 71 bp, Val/Val 型为 218 和 71 bp。

1.3 统计学分析

计量资料描述采用均数、中位数或四分位数, 分类资料采用百分比。统计分析采用 SAS9.13 软件。危险因素的分析采用广义线性模型中的 Poisson 回归分析。

2 结果

2.1 基本情况

接触组和对照组年龄分别为 (33.91±0.484) 岁和 (35.3±11.057) 岁, 两组间年龄差异无统计学意义; 其他人口学特征中, 两组间吸烟状况差异有统计学意义 ($\chi^2 = 16.828$, $P < 0.001$)。

2.2 微核率情况

氯乙烯接触组外周血淋巴细胞微核率在 0~14‰, 均数为

收稿日期: 2015-01-16; 修回日期: 2015-04-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30671740)

作者简介: 李磊 (1967—), 男, 副主任医师, 主要从事疾病控制与管理工作。

通讯作者: 夏昭林, 教授, E-mail: zlxia@shmu.edu.cn。

(3.64±2.36)%；对照组外周血淋巴细胞微核率在0~5%，均数为(1.22±1.19)%。Poisson回归分析显示两组外周血淋巴微核细胞率差异有统计学意义(P<0.0001，暴露组微核发生率是对照组的2.99(95%CI 2.27~4.037)倍。

对微核率潜在的影响因素年龄、性别、吸烟、饮酒、VCM暴露和基因多态进行单因素Poisson回归分析，结果发现

高龄组微核率为低龄组的1.321(1.142~1.528)倍，女性微核率为男性的1.089(0.938~1.262)倍，暴露组微核率高于对照组，GSTP1 GG基因型微核率高于GSTP1 AA基因型(P=0.008)，CYP2E1等位基因C微核率高于等位基因G，CYP2D6 CC基因型微核率高于CYP2D6 GG基因型(P=0.046)。其他因素微核率差异无统计学意义，见表1。

表1 不同年龄、性别、生活习惯和基因型氯乙烯工人微核率分布

影响因素	变量	例数	比例(%)	微核率(‰)	频率比(95%CI)	χ ² 值	P 值
性别	男	137	60.6	3.09±2.117	1		
	女	89	39.4	3.37±2.748	1.089 (0.938~1.262)	1.28	0.258
年龄	<36	132	58.4	2.83±2.124	1		
	≥36*	94	41.6	3.73±2.628	1.321 (1.142~1.528)	14.05	<0.001
吸烟	-	147	65.0	3.08±2.568	1		
	+	79	35.0	3.43±1.992	1.113 (0.957~1.293)	1.95	0.163
饮酒	-	195	86.3	3.16±2.442	1		
	+	31	13.7	3.45±1.997	1.091 (0.884~1.333)	0.69	0.406
暴露剂量	0	41	18.1	1.22±1.194	1		
	<21 809*	89	39.4	3.55±2.195	2.912 (2.183~3.969)	49.30	<0.001
	≥21 809*	96	42.5	3.73±2.511	3.058 (2.298~4.159)	54.81	<0.001
GSTM1	-	62	27.4	2.98±1.954	1		
	+	164	72.6	3.29±2.528	1.101 (0.934~1.305)	1.29	0.2568
GSTT1	-	120	53.1	3.06±2.360	1		
	+	106	46.9	3.37±2.412	1.101 (0.952~1.274)	1.68	0.195
GSTP1	AA	152	67.3	3.21±2.289	1		
	AG	65	28.8	2.95±2.294	0.920 (0.777~1.085)	0.96	0.328
	GG*	9	3.98	4.89±3.887	1.523 (1.103~2.047)	7.14	0.008
CYP2E1	GG	144	64.9	3.00±2.222	1		
	CG*	67	30.2	3.58±2.692	1.194 (1.018~1.397)	4.85	0.028
	CC*	11	4.95	4.09±2.427	1.364 (0.990~1.831)	3.92	0.048
CYP2D6	GG	10	4.42	4.20±2.486	1		
	GC	109	48.2	3.28±2.381	0.782 (0.575~1.092)	2.27	0.132
	CC*	107	47.3	3.03±2.373	0.721 (0.529~1.008)	3.98	0.046

注：同一影响因素变量间比较，*P<0.05。

GSTP1以GG型为参照，分别检验AA和AG型，差异均有统计学意义，将GSTP1 AA和AG型合并后进行Poisson检验，发现GSTP1 GG基因型携带者微核率为AA和AG型携带者的1.6471(1.2009~2.2587)倍(χ²=9.59, P=0.002)。CYP2E1微核率随等位基因C的增加呈上升趋势，按CYP2E1有序分类资料进行Poisson检验，结果发现等位基因C微核率为G的1.172(1.036~1.326)倍(χ²=6.34, P=0.012)。

2.3 微核率影响因素分析

采用多元Poisson回归方法分析氯乙烯暴露组人群微核率影响因素，包括性别、年龄、吸烟、饮酒、暴露量和GSTT1、GSTM1、GSTP1、CYP2E1、CYP2D6基因多态性。GSTP1 AA和GSTP1 AG基因型合并后与GSTP1 GG型比较，而CYP2E1和CYP2D6按照有序分类资料进行分析。将各因素全部进入Poisson回归模型，结果显示性别、年龄、氯乙烯暴露、GSTP1和CYP2E1多态是氯乙烯暴露工人微核率发生的主要影响因素，见表2。逐步多元Poisson回归显示同样现象，见表3。

表2 各因素Poisson回归分析氯乙烯暴露人群微核损伤影响因素

影响因素	β 值	β 95%CI		χ ² 值	P 值
		下限	上限		
常量	-0.70	-1.406	-0.070	4.61	0.032
性别	0.17	-0.022	0.370	2.97	0.085
年龄	0.22	0.068	0.375	7.98	0.005
吸烟	-0.03	-0.239	0.185	0.07	0.797
饮酒	0.12	-0.117	0.353	1.02	0.313
GSTT1	0.09	-0.055	0.241	1.52	0.218
GSTM1	0.11	-0.056	0.285	1.66	0.197
GSTP1 (GG)	0.41	0.088	0.710	6.76	0.009
CYP2E1	0.13	0.004	0.250	4.19	0.041
CYP2D6	-0.10	-0.218	0.034	2.10	0.148
VCM暴露	1.16	0.859	1.487	52.60	<0.001

表3 多元逐步 Poisson 回归分析氯乙烯暴露人群微核损伤影响因素

影响因素	β 值	β 95%CI		χ^2 值	P值	频率比 (95%CI)
		下限	上限			
常量	-0.764 0	-1.295 1	-0.234 9	8.00	0.005	—
性别	0.140 8	-0.009 6	0.289 8	3.40	0.065	1.151 (0.990~1.336)
年龄	0.223 2	0.072 3	0.373 5	8.44	0.004	1.250 (1.075~1.453)
CYP2E1	0.114 1	-0.008 3	0.233 9	3.41	0.065	1.121 (0.992~1.264)
GSTP1(GG)	0.410 2	0.086 8	0.707 0	6.75	0.009	1.507 (1.091~2.028)
VCM暴露	1.168 3	0.871 6	1.492 6	54.65	<0.001	3.217 (2.391~4.449)

3 讨论

该研究以氯乙烯接触工人为研究对象,探讨 *GSTT1*、*GSTM1*、*GSTP1*、*CYP2E1*、*CYP2D6* 等代谢酶基因多态与氯乙烯致染色体损伤易感性之间的关系。该研究采用胞质分裂阻滞微核试验方法,可排除未经过有丝分裂或分裂1次以上的细胞对试验结果的影响,而且镜下阅片时比常规微核试验更易于识别,更适用于低诱变性化学物遗传损伤的检测。

多项研究证实,氯乙烯接触工人外周血淋巴细胞染色体畸变率和微核率升高。来自12个意大利实验室监测结果表明过去十几年淋巴细胞微核率有随年龄增高的趋势^[3]。另有研究^[4]认为40岁以上人员微核率高于40岁以下年龄组,氯乙烯职业暴露人群中35岁以上者微核率高于35岁以下者。本研究发现女性氯乙烯职业暴露者微核率高于男性职业人群,此结果与有关研究一致^[5]。该研究未发现生活习惯如吸烟和饮酒对微核率的影响。

环境致癌剂通过I相和II相代谢酶转化为DNA活性代谢物从而参与外来化学物的激活和解毒过程。DNA代谢酶类GSTs和CYPs的活性具有很大的个体差异。因此,氯乙烯暴露个体易感性差异可能与GSTs和CYPs的活性有关,有报道认为疾病易感性与GSTs和CYPs的多态性有关^[6],本研究结果提示GSTs和CYPs基因多态性与氯乙烯的代谢有关,GSTs和CYPs基因多态性可能影响氯乙烯诱导的微核损伤。

Huang等^[7]研究认为低剂量氯乙烯暴露*GSTT1*非缺失型与谷氨酸氨基转移酶异常率增高有关($OR=3.8$, $95\%CI=1.2\sim14.5$),而*CYP2E1*基因型则与其无关;高剂量氯乙烯暴露时*CYP2E1*CC基因型则与谷氨酸氨基转移酶异常率增高有关($OR=5.4$, $95\%CI=0.7\sim35.1$),且*GSTT1*非缺失型与谷氨酸氨基转移酶异常率降低有关($OR=0.3$, $95\%CI=0.1\sim0.9$);多元线性和Logistic回归分析也显示氯乙烯暴露与*CYP2E1*和*GSTT1*基因型的交互作用。Li等^[8]认为,以GG基因型为参照,则CG和CC基因型个体氯乙烯诱导突变生物标志(p53 and p21)阳性率的调整年龄、吸烟、饮酒和累计氯乙烯暴露剂量后OR值达到2.3($95\%CI=1.2\sim4.1$)。这些证据均表明

*CYP2E1*C等位基因可能是氯乙烯暴露工人的危险因素,我们的研究结果($OR=1.121$, $95\%CI=0.992\sim1.264$)与之相似。

Xiang等^[9]研究发现,*GSTP*在肿瘤组织中的表达高于癌旁正常组织,其过表达是遗传毒性化学物引起细胞变异的重要特征,*GSTP1*GG型个体相比GA和AA型个体具有较高的微核率,可能是氯乙烯暴露工人的危险因素($OR=1.507$, $95\%CI=1.091\sim2.028$)。然而,有关*GSTP1*多态与染色体损伤的研究较少,其确切作用仍需要进一步研究来证实。

综上所述,性别、年龄、氯乙烯暴露、*CYP2E1*和*GSTP1*基因多态可能与个体染色体损伤的发生风险有关。应对氯乙烯致染色体损伤的易感人群加强健康监护,及早发现健康损害并采取有效预防措施。

参考文献:

- [1] Neha S, Dheeraj G, Niti B, et al. Association of NAT2, GST and CYP2E1 polymorphisms and anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity [J]. Tuberculosis, 2014, 94 (3): 293-298.
- [2] Gu S Y, Zhang Z B, Wan X, et al. Genetic polymorphisms in CYP1A1, CYP2D6, UGT1A6, UGT1A7, and SULT1A1 genes and correlation with benzene exposure in a Chinese occupational population [J]. J Toxicol Environ Health A, 2007, 70 (11): 916-924.
- [3] Abbondandolo A, Bolognesi C, Barale R, et al. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1997, 6: 249-256.
- [4] Ishikawa H. Evidence of association of the CYP2E1 genetic polymorphism with micronuclei frequency in human peripheral blood [J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2004, 546 (1-2): 45-53.
- [5] Micheline K V, Raluca A M, Françoise M R, et al. The effects of *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms on micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006, 15 (5): 1038-1042.
- [6] Hassan R D, Loulou K. Toxicogenetic profile and cancer risk in Lebanese [J]. Journal of Toxicology & Environmental Health: Part B, 2014, 17 (2): 95-125.
- [7] Huang C Y, Huang K L, Cheng S J, et al. The *GSTT1* and *CYP2E1* genotypes are possible factors causing vinyl chloride induced abnormal liver function [J]. Arch Toxicol, 1997, 71: 482-488.
- [8] Schindler J, Li Y, Marion M J, et al. The effect of genetic polymorphisms in the vinyl chloride metabolic pathway on mutagenic risk [J]. J Hum Genet, 2007, 52 (5): 448-455.
- [9] Xiang Z D, John N S, Martina K, et al. Mice lacking three loci encoding 14 glutathione transferase genes: A novel tool for assigning function to the *GSTP*, *GSTM*, and *GSTT* families [J]. Drug Metabolism and Disposition, 2014, 42 (6): 1074-1083.