

毒物代谢酶 CYP2E1 基因多态性对苯乙烯代谢的影响

张放, 邵华, 张志虎, 单永乐

(山东省职业卫生与职业病防治研究院检测科, 山东 济南 250062)

摘要: 目的 探讨 CYP2E1 基因多态性对苯乙烯代谢的影响。方法 以 56 名苯乙烯接触工人为研究对象, 应用个体采样器测定其个体接触剂量, 应用高效液相色谱法测定其尿中主要代谢产物(苯乙醇酸和苯乙醛酸)的含量, 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析技术(PCR-RFLP)检测其 CYP2E1 基因 5'端上游调节区 RsaI 位点及第六内含子区 DraI 位点的多态性。结果 CYP2E1 基因 5'端 RsaI 多态性对职业接触苯乙烯低浓度组工人尿中苯乙醇酸和苯乙醛酸含量均有显著影响($P < 0.05$)。结论 CYP2E1 基因 5'端 RsaI 多态性对苯乙烯代谢结果具有一定影响, 可能是苯乙烯职业接触遗传易感性因素。

关键词: 苯乙烯; CYP2E1; 基因多态性; 代谢产物; 遗传易感性

中图分类号: R99 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2010)06-0412-04

Effect of genetic polymorphisms of toxin metabolic enzyme CYP2E1 on metabolism of styrene

ZHANG Fang, SHAO Hua, ZHANG Zhiyu, SHAN Yongle

(Shandong Provincial Academy of Occupational Health and Occupational Medicine, Jinan 250062, China)

Abstract: Objective To explore the influence of genetic polymorphisms of CYP2E1 on the metabolism of styrene. Methods 56 styrene-exposed workers were selected as study subjects. Personal passive samplers were used for determining personal time-weighted average (TWA). HPLC was used for detecting its main metabolites (mandelic acid and phenylglyoxylic acid) in urine, and polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism technique (PCR-RFLP) was applied to detect the single nucleotide polymorphisms (SNPs) on CYP2E1 (5'-flanking region RsaI and intron 6 DraI). Results There was a significant association between urinary metabolites and genotypes of CYP2E1 (5'-flanking region RsaI) in low-exposed group ($P < 0.05$). Conclusion Styrene metabolism could be influenced by genotypes of CYP2E1 (5'-flanking region RsaI), this kind of genotypes can be regarded as susceptible factor that might be helpful in evaluating the individual susceptibility and using in screen of styrene-exposed populations.

Key words: styrene; CYP2E1; genetic polymorphism; metabolic product; genetic susceptibility

苯乙烯(styrene)是合成橡胶、合成树脂、塑料等的主要化工原料。在工作场所, 苯乙烯主要通过呼吸道吸收, 中间代谢产物为环氧苯乙烯, 终产物主要为苯乙醇酸(MA)、苯乙醛酸(PGA), 其中环氧苯乙烯很可能具有致突变及致癌作用^[1]。2002年, 国际癌症研究学会(IARC)将环氧苯乙烯定为极可能致癌物(group 2A)。因此, 可推测苯乙烯的遗传损伤机制很可能与环氧苯乙烯有关。CYP2E1 酶为苯乙烯主要的I相代谢酶。本研究同时测定苯乙烯接触工人的 CYP2E1 基因多态性、个体苯乙烯接触剂量、尿中苯乙烯代谢产物浓度, 分析探讨 CYP2E1 基因多态性对苯乙烯代谢的影响。

1 对象与方法

1.1 实验对象

采用整群抽样的方法, 选择山东省某玻璃钢游艇生产厂接触苯乙烯的工种(调漆工、喷涂工), 对工龄1年以上, 使用相同个体防护用品(防毒口罩)的工人, 共计56人进行调查。

为了探讨在相同或相似的接触条件下, CYP2E1 基因多态性对苯乙烯尿中两种代谢产物的影响, 按照我国职业接触限值(苯乙烯时间加权平均浓度为 50 mg/m^3)及本研究中苯乙烯个体接触剂量检测结果, 将研究对象分为高暴露组($> 50 \text{ mg/m}^3$)和低暴露组($\leq 50 \text{ mg/m}^3$)。两组之间一般情况比较, 年龄、工龄、吸烟、饮酒等差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 问卷调查

调查内容包括民族、年龄、工龄、职业史、个体防护情况、吸烟饮酒习惯。

1.3 个体检测

为每位研究对象佩戴个体采样器, 采集其一个完整班制的苯乙烯接触剂量, 检测方法参照参考文献[2]所述方法。

收稿日期: 2010-05-05 修回日期: 2010-08-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号 30471429); 山东省科技攻关计划项目(2004GG2202153)

作者简介: 张放(1973-), 男, 硕士, 助理研究员, 从事职业病危害因素检测及评价研究。

1.4 尿中代谢产物的测定

收集工人的班末尿,采用国家标准方法^[3]测定尿中苯乙醇酸及苯乙醛酸浓度,同时采用国家标准方法^[3]测定尿中肌酐含量进行浓度校正。

1.5 基因多态性分析

1.5.1 DNA提取 采集研究对象静脉血约 3 ml 采用人基因组 DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取 DNA, -80℃保存。

1.5.2 基因分型 采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析法(PCR-RFLP)分析 CYP2E1 基因 5'上游调控区 RsaI 位点及第六内含子区 DraI 位点的基因型。引物设计采用 Prime Primer5 软件。

RsaI 位点引物序列:上游引物 5'-TTCATT GT-GTCTCTAACTGG-3',下游引物 5'-CCAGTCGAGTCT-TACATTGICA-3'。反应总体积为 50 μl,内含引物各 20 pmol, 2×PCR Mix 25 μl, DNA 样品 1.0 μl, 双蒸水 20 μl。PCR 扩增条件为 95℃预变性 5 min, 然后进行 35 个循环(95℃变性 1 min, 55℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min), 最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物用 10 个单位 RsaI 内切酶 37℃消化 5 h, 消化产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

DraI 位点引物序列:上游引物 5'-TCGTCAGTTC-CTGAAAGCAGG-3',下游引物 5'-GAGCTCTGATG-GAAGTATCGC-3'。反应总体积及成分同上。PCR 扩增条件为 94℃预变性 10 min, 然后进行 35 个循环(94℃变性 1 min, 60℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min), 最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物用 10 单位 DraI 内切酶 37℃消化 8 h, 消化产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

基因分型采用盲法测定,并重复 2 次,将 2 次结果对好,检测其一致性。

1.6 统计分析

应用 SPSS 13.0 统计软件对实验结果进行统计分析。采用直线相关分析研究对象尿中 MA、PGA 含量与苯乙烯个体接触剂量的相关性;对不同暴露组工人的一般情况比较采用两独立样本 t 检验及 χ^2 检验;采用两独立样本 t 检验分析不同暴露组中 CYP2E1 基因多态性与尿中 MA、PGA 含量之间的关系,检验水准为 0.05。

2 结果

2.1 一般情况

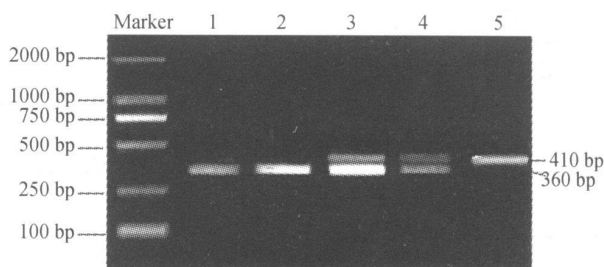
研究对象均为男性,汉族,年龄为 (32.2 ± 5.3) 岁,工龄为 (12.2 ± 6.9) 岁,吸烟比例为 89.3%,饮酒比例为 85.7%。

2.2 苯乙烯个体接触剂量与其尿中代谢产物的关系

经统计分析,工人班末尿中苯乙醇酸(MA)、苯乙醛酸(PGA)含量与工人苯乙烯 8 h 时间加权平均浓度(8 h-TWA)之间具有显著性相关关系($P < 0.05$)。

2.3 CYP2E1 (RsaI, DraI) 基因多态性检测结果

2.3.1 CYP2E1 RsaI 基因型判断 PCR 产物的片段大小为 410 bp,经 RsaI 酶切后,在紫外光下可见 3 种情况,野生纯合型(C1C1)为 360 bp 和 50 bp 2 个片段;突变纯合型(C2C2)为 410 bp 1 个片段;杂合型(C1C2)为 360 bp、50 bp 和 410 bp 3 个片段,见图 1。



1 2 C1C1 3 4 C1C2 5 C2C2

图 1 CYP2E1 RsaI 位点的酶切图谱

2.3.2 CYP2E1 (DraI) 基因型判断 PCR 产物的片段大小为 995 bp,经 DraI 酶切后,在紫外光下可见 3 种情况,野生纯合型(DD)为 572 bp、302 bp 和 121 bp 3 个片段;突变纯合型(CC)为 874 bp 和 121 bp 2 个片段;杂合型(CD)为 874 bp、572 bp、302 bp 和 121 bp 4 个片段,见图 2。

2.3.3 CYP2E1 基因多态性检测结果

经统计分析,可知在两组中基因型分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 CYP2E1 基因多态性位点在不同苯乙烯暴露组中的基因型分布情况

基因型	高暴露组		低暴露组		P值
	人数	%	人数	%	
CYP2E1 RsaI位点					
C1C1	17	65.4	20	66.7	0.70
C1C2	8	30.8	10	33.3	
C2C2	1	3.8	—	—	
CYP2E1 DraI位点					
DD	18	69.2	21	70.0	0.86
CD	8	30.8	9	30.0	

注:因 CYP2E1 RsaI 位点 C2C2 基因型只发现 1 例,故将其与 C1C2 合并进行统计分析,统计方法采用双侧卡方检验。

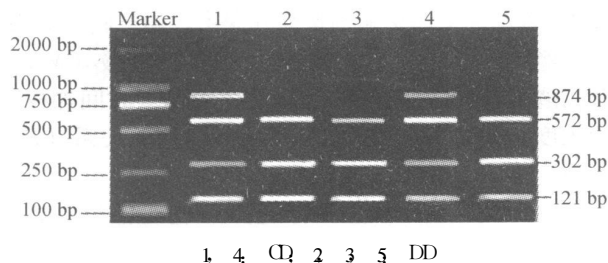


图 2 CYP2E1 DraI 位点的酶切图谱

表 2 不同苯乙烯暴露组中 CYP2E1 RsaI 不同基因型对工人尿中 MA、PGA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$) mg/g 肌酐

基因型	低暴露组				高暴露组			
	人数	MA	PGA	MA+PGA	人数	MA	PGA	MA+PGA
C1C1	17	72.55±32.64	57.16±26.40	129.70±58.62	20	266.99±126.99	219.60±100.51	486.59±223.06
C1C2及 C2C2	9	112.28±33.43	87.70±26.70	199.98±57.28	10	232.99±93.34	194.93±73.84	427.50±156.16

2.4.2 CYP2E1 DraI 位点多态性 在低暴露组与高暴露组中, CYP2E1 DraI DD 基因型受试工人尿中的 MA、PGA、MA+PGA 含量与 CD 基因型受试工人无显著差别。结果见表 3。

表 3 不同苯乙烯暴露组中 CYP2E1 基因 DraI 多态性与工人苯乙烯代谢产物含量的关系 ($\bar{x} \pm s$) mg/g 肌酐

基因型	低暴露组				高暴露组			
	人数	MA	PGA	MA+PGA	人数	MA	PGA	MA+PGA
DD	18	90.67±40.40	71.82±32.38	162.49±71.62	21	248.59±111.41	214.85±95.01	463.43±200.50
CD	8	76.47±30.28	58.53±22.52	135.00±51.97	9	271.69±132.81	203.28±89.22	474.97±218.88

3 讨论

目前, 随着大规模基因测序工作的相继完成, 基因组学的研究也从结构基因组学转向功能基因组学。功能基因组学以揭示基因功能及调控机制为目标, 关键是功能标志及其研究模型体系的确立。环境基因组计划作为功能基因组的重要组成部分, 重点探索环境应答基因和环境毒物之间的相互作用及其与疾病发生的关系, 其中代谢酶多态结构对毒物功能及与毒效应相关的基因表达的调控是研究的重点之一。

细胞色素 P4502E1 (CYP2E1) 基因编码的氧化酶是环境前致癌物活化的关键酶之一, 是体内重要的 I 相代谢酶, 在苯乙烯代谢过程中, 主要催化苯乙烯生成极可能具有遗传毒性和致癌作用的中间代谢产物——环氧苯乙烯, 后者继续代谢, 主要生成代谢终产物——苯乙醇酸和苯乙醛酸, 最终随尿排出。人体接触苯乙烯量越多, 产生的代谢产物也相应增加。本研究结果也证实, 苯乙烯个体接触剂量与其尿中代谢产物浓度呈直线相关关系, 具有显著统计学意义。在接触苯乙烯浓度相同或相似条件下, CYP2E1 酶活性越强, 生成的环氧苯乙烯量越多, 代谢终产物含量也相应增多。由于目前技术尚无法直接测定人体内的环氧苯乙烯含量, 在本次研究中, 我们测定了苯乙烯代谢产物含量, 该指标可间接反映体内的环氧苯乙烯含量。

在本次研究中发现, 在苯乙烯低浓度暴露组中,

2.4 CYP2E1 基因多态性与受试工人尿中苯乙烯代谢产物含量的关系

2.4.1 CYP2E1 RsaI 位点多态性 在低暴露组中, CYP2E1 RsaI 位点 C1C1 基因型受试工人尿中的 MA、PGA、MA+PGA 含量显著低于 C1C2/C2C2 基因型 ($P < 0.05$), 高暴露组中未发现两者差异有统计学意义。结果见表 2。

携带 CYP2E1 RsaI C1C2 和 / 或 C2C2 基因型个体尿中两种代谢产物含量均显著高于携带 C1C1 基因型个体。考虑为 CYP2E1 基因 5' 端上游调节区 RsaI 位点变异会增强基因表达, 从而增加酶的水平 and 活性。有研究表明, C2C2 基因型转录活性大约是 C1C1 基因型的 10 倍^[4]。但是在苯乙烯高暴露组, 并没有发现这种差异, 除了考虑误差因素外, 还有可能是由于当工人接触高浓度苯乙烯时, CYP2E1 的作用减弱。有研究表明, 当人接触较高浓度苯乙烯时, CYP2B6 酶可能发挥更主要的催化作用^[5]。CYP2E1 基因第 6 内含子区 DraI 位点多态性也可以影响基因表达, 但在本实验中无论是高暴露组还是低暴露组, 未发现携带 CYP2E1 DraI 不同基因型的工人尿中苯乙烯代谢产物含量有显著性差别。因此, 我们推测, CYP2E1 基因 5' 端上游调节区 RsaI 多态性与苯乙烯代谢活化过程相关性更高, 但由于本实验样本较少, 所取得的结果仍需加大样本, 进一步深入研究证实。

本研究系统地探讨了 CYP2E1 基因多态性与苯乙烯职业接触后尿中两种主要代谢产物含量的关系, 得到了具有一定意义的结果, 提示代谢酶基因多态性可以通过对酶活性的影响进而影响到毒物体内代谢过程。结果表明, 携带 CYP2E1 RsaI 位点 C2C2 和 C1C2 基因型个体在接触相同或相似浓度苯乙烯情况下, 可能会生成更多的中间代谢产物环氧苯乙烯, 就可能导致毒性效应的产生或加剧。

(下转第 417 页)

表 2 血、尿硅分别与Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、羟脯氨酸直线回归相关参数

模型		未标化β	标化β	t值	P值
Ⅰ型胶原	常数	0.005		0.260	0.797
	血硅	0.039	0.959	17.202	0.000
Ⅲ型胶原	常数	-0.064		-1.479	0.151
	血硅	0.116	0.977	23.271	0.000
羟脯氨酸	常数	624.943		13.353	0.000
	血硅	6.834	0.241	1.265	0.271
Ⅰ型胶原	常数	-0.100		-8.881	0.000
	尿硅	0.001	0.991	38.057	0.000
Ⅲ型胶原	常数	-0.351		-8.461	0.000
	尿硅	0.003	0.986	29.997	0.000
羟脯氨酸	常数	638.760		10.909	0.000
	尿硅	0.103	0.123	0.633	0.532

细胞进一步受损，最终导致弥漫性肺间质纤维化和矽结节的形成^[3]。SiO₂化学性质稳定，难溶于水，也不与一般的酸起作用，故通常认为 SiO₂在肺内只是被巨噬细胞吞噬或在病灶内沉积下来。但实际上，SiO₂只是难溶，进入机体后，其表面和体液还是会产生产生反应生成硅酸，微量的硅元素仍可进入体内血液和组织进行代谢，并发挥作用，待累积到一定的“阈值”才能“触发”不断发展的纤维化过程^[4]。本实验血硅和尿硅处理组和对照组比较有统计学意义，说明 SiO₂颗粒进入机体后有一部分被代谢出去。但处理组尿液中的硅除了处理因素外还包括体内正常代谢的硅。

矽尘可以启动脂质过氧化反应，该反应的产物可以造成巨噬细胞损伤，释放一系列致纤维化细胞因子，同时也促使成纤维细胞合成过量胶原蛋白、弹性蛋白和蛋白多糖，是矽肺纤维化发病过程中的重要环节之一^[5]。矽肺纤维化时有多型胶原的分泌增多，如Ⅰ型胶原、Ⅱ型胶原、透明质酸和层粘连蛋白等。有文献报道^[6]，染矽尘大鼠第28天肺组织Ⅰ型胶原、Ⅱ型胶原含量明显升高，且显著高于对照组。本次实

验结果与文献报道相符。

张海英等^[7]的实验中，羟脯氨酸在矽肺0⁺期、Ⅰ期含量明显高于对照组。但本次实验中对对照组与处理组的羟脯氨酸含量没有统计学意义，可能是染矽尘28d时羟脯氨酸含量尚无改变，有待于进一步研究。

肺泡巨噬细胞吞噬进入肺部而不能被排除的大量游离 SiO₂，因呼吸爆发和坏死崩解产生大量的超氧阴离子和羟自由基等氧自由基，引起膜脂质过氧化化的增加。巨噬细胞膜的脂质过氧化损伤激活了巨噬细胞，触发其释放大细胞因子，同时胶原的合成也会增加，促进肺纤维化发生^[8]。所以认为随着 SiO₂在肺组织内的增加，其进入血液、组织液代谢也会增加，同时导致胶原的合成增加。本实验血硅、尿硅分别与Ⅰ型、Ⅱ型胶原有正相关关系，提示二者对早期矽肺纤维化程度有一定的指示意义。

参考文献:

[1] 胡永斌, 曾庆富. 矽肺纤维化细胞分子机制研究的进展 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2003, 21 (3): 219

[2] Zhai R, Ge X, Li H, et al. Differences in cellular and inflammatory cytokine profiles in the bronchoalveolar lavage fluid in bagassosis and silicosis [J]. Am J Ind Med 2004, 46 (4): 338-344.

[3] 胡缘, 赵金垣, 白玉萍, 等. 血清硅元素水平对矽肺早期诊断意义的探讨 [J]. 中国工业医学杂志, 2009, 22 (4): 250-252

[4] Porter DW, Hubbs AF, Mercer R, et al. Progression of lung inflammation and damage in rats after cessation of silica inhalation [J]. Toxicological Science 2004, 79 (2): 370-380.

[5] Fenu G, Prandi L, Tomatis M, et al. Free radical generation in the toxicity of inhaled mineral particles: the role of iron speciation at the surface of asbestos and silica [J]. Redox Rep 2001, 6 (4): 235-241.

[6] 李宏伟, 高秀霞, 杜海科, 等. 染矽尘大鼠肺组织Ⅰ、Ⅱ型胶原表达的变化 [J]. 武警医学院学报, 2005, 14 (6): 457-460

[7] 张海英, 杨莉, 袁秀玲, 等. 纤维蛋白降解产物、D-二聚体等生化指标用于矽肺早期诊断的探讨 [J]. 中国职业医学, 2000, 27 (5): 19-20

[8] 高衍新, 王瑞. 矽尘致肺纤维化机制及细胞因子在矽肺纤维化中的作用 [J]. 中国工业医学杂志, 2008, 21 (1): 31-35

(上接第 414 页)

具有该类基因型的个体可以认为是苯乙烯毒性作用的易感人群，不适合在苯乙烯暴露岗位工作。因此，CYP2E1 5'端上游调节区 RsaI位点基因多态性可考虑作为苯乙烯职业接触遗传易感性因素，用于评价苯乙烯接触工人职业健康损害的遗传易感性。

参考文献:

[1] P Corsi, A Aprile, B Nicot, et al. Synaptic contacts impaired by styrene-7, 8-oxide toxicity [J]. Toxicology and Applied Pharmacology

2007, 253 (17): 143-157.

[2] 崔蓉, 吕妹清, 杨林. GJ-1型无泵型采样器用于苯乙烯的性能评价 [J]. 中国卫生检验杂志, 1997, 7 (5): 149-150

[3] 徐伯洪, 闫慧芳. 工作场所有害物质检测方法 [M]. 北京: 中国人民公安大学出版社, 2003: 362-363, 386

[4] Ve Mina A, Galati R, Fafasca G, et al. Metabolic polymorphisms and urinary biomarkers in subjects with low benzene exposure [J]. Toxicol Environ Health 2001, 64: 607-618

[5] Kim H, Wang R, S, Elvaara E, et al. Cytochrome P450 isoenzymes responsible for the metabolism of toluene and styrene in human liver microsomes [J]. Xenobiotica 1997, 27: 657-665