

用塑料瓶处理比玻璃瓶的荧光强度降低约 5%。尿样处理过程中加的高锰酸钾溶液最好现配,放置时间不要超过 2 周,放置时间越长氧化能力降低,且分解产生的二氧化锰会吸附更多的汞,放置 1 个月的高锰酸钾测定时荧光强度降低约 10%。

3 结论

3.1 标准曲线线性范围

以试验确定的最佳试验条件为,灯电流及负高压 20 mA、200 V,载气、屏蔽气分别 400 ml/min 和 800 ml/min,原子化器高度 10 mm,读数时间 12 s 延迟 1 s,载流 5% 盐酸,还原剂为 0.1% 的硼氢化钾。于不同时间测试 6 条标准曲线,在 0 ~ 10 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性相关系数在 0.999 0 ~ 0.999 8,由于尿中汞含量不高,该范围可满足测量。

3.2 检出限及精密性

利用工作站软件测试检出限,即标准空白溶液的 11 次测量值的标准偏差 SD,按公式 $DL = 3 \times SD/K$,该方法检出限可达 0.002 $\mu\text{g/L}$,按照尿液处理方法,1 ml 尿样处理后定容为 10 ml,尿汞的最低检出浓度为 0.02 $\mu\text{g/L}$ 。利用工作站软件测试精密性为 1.8%。

参考文献:

- [1] 蔡慧华,彭速标.痕量汞的测定方法进展[J].理化检验—化学分册,2008,44(4):385-389.
- [2] 吴培华,黄文耀,刘强.原子荧光光度法测定尿中汞[J].公共卫生与预防医学,2006,17(6):63-64.

壮族人群转化生长因子- β_1 基因 C-509T 位点多态性与矽肺的相关性

Study on correlation between gene polymorphism of TGF- β_1 -C-509T locus and silicosis in the Chuang

周武旺¹, 黄小琪², 陈志强¹, 陈晶², 卢雪梅¹, 何雪明¹, 李荣娟¹

ZHOU Wu-wang¹, HUANG Xiao-qi², CHEN Zhi-qiang¹, CHEN Jing², LU Xue-mei¹, HE Xue-ming¹, LI Rong-juan¹

(1. 广西壮族自治区职业病防治研究院, 广西 南宁 530021; 2. 广西中医学院第一附属医院, 广西 南宁 530023)

摘要: 随机选择壮族健康未接尘工人 30 名, 接尘工人 58 名, 矽肺 51 例, 用 PCR-RFLP 方法进行 TGF- β_1 -C-509 位点多态性检测。接尘组 C-509T 位点上 CC 基因型的个体显著高于对照组, 也高于矽肺组。提示 C-509T 等位基因上 CC 基因型可能是壮族个体免于罹患矽肺的一种保护因素。

关键词: 壮族; 矽肺; TGF- β_1 ; C-509T 位点多态性

中图分类号: R135.2 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2012)01-0071-02

转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 不仅仅是细胞生长和分化的调节因子, 还是一个重要的致纤维化和免疫调节因子, 它可以调控肺成纤维细胞分裂、增殖及胶原蛋白的合成与降解, 在矽肺的发生转归中起着重要作用。人类 TGF- β_1 基因有 5 个明显的调控区, 其中定位于第二个负调控区的 C-509T 位点的多态性主要决定 TGF- β_1 基因的下调。我们通过采集壮族工人外周血液提取 DNA, 用 PCR-RFLP 技术检测 C-509T 位点的多态性, 观察壮族人群中 C-509T 位点的多态性与矽肺的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

以广西某矿壮族工人为研究对象。在不吸烟、不合并肺结核、确诊矽肺患者中选取 51 例为矽肺组。另选择 58 名长期接触矽尘未患 CWP 壮族工人为接尘组, 该矿无接触矽尘的壮族健康人员 30 人为正常对照组, 人员纳入遵循随机原则。

收稿日期: 2011-08-02

基金项目: 广西自然科学基金资助项目 (2010GXNSFA013234)

作者简介: 周武旺 (1964—), 男, 主管检验师, 主要从事职业病临床检验工作。

通讯作者: 陈晶, E-mail: chenjing_gxmu@gmail.com。

研究对象均为男性, 无吸烟, 无慢性肝炎等既往病史, 近一个月内无肺部其他疾病史。

1.2 试剂及仪器

血液基因组 DNA 提取试剂盒, 2* Taq PCR MasterMix, 均购自天根生化科技有限公司; 引物合成由生工生物工程 (上海) 有限公司; 限制性内切酶 Eco81 I 由宝生物工程 (大连) 有限公司提供; 主要仪器有 Eppendorf, Mastercycler[®] 5333 原位 PCR 仪, Bio-Rad, el Dox XR 凝胶成像系统。

1.3 方法

1.3.1 样品采集 采集所有研究对象的外周血 2 ml, EDTA 抗凝, 使用血液基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 所有操作按照试剂盒说明书进行。

1.3.2 TGF- β_1 基因 C-509T 位点的多态性分析 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 方法进行检测。引物信息参照文献 [1], 其上游引物序列为 5'-GGGGACAC-CATCTACAGTG-3', 其下游引物序列为 5'-GGAGGAGGGGGCA-ACAGG-3'。PCR 反应体系为 25 μl , 包括 ddH₂O 9.5 μl , 2* Taq PCR MasterMix 12.5 μl , 上下游引物各 0.5 μl , DNA 模板 2 μl 。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 62.5 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。酶切体系为 15 μl , 包括 ddH₂O 5.2 μl , 10* buffer 1.5 μl , 内切酶 Eco81 I 0.15 μl (15 U), PCR 产物 8 μl 。体系混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜。酶切产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统拍照并判读基因。

1.4 统计方法

采用 SPSS15.0 软件对所得数据进行分析。所得行乘列表采用卡方分析, 若表格中有 1/5 频数小于 5, 则采用确切概率法计算。显著水平以双侧 $P = 0.05$ 判断。

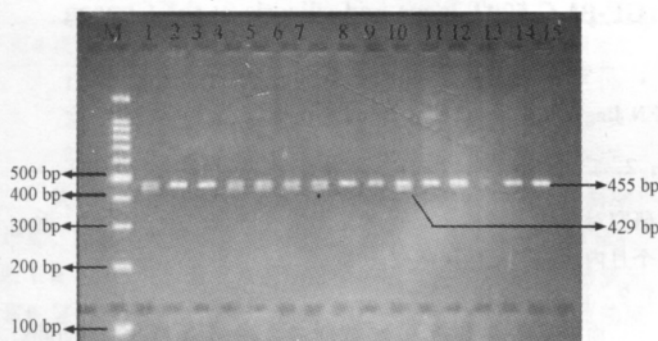
2 结果

PCR 后所得 PCR 产物原始长度为 455 bp, PCR 产物电泳结果如图 1。用限制性内切酶 *Sau* I 进行处理后, 若个体为基因型 CC, 则 PCR 产物可被切为 429 bp 和 26 bp 两种片段; 若个体为基因型 TC, 则 PCR 产物可被切为 455 bp、429 bp 和 26 bp 三种片段; 若个体基因型为 TT, 则 PCR 产物不能被限制性内切酶 *Sau* I 切动, 酶切产物电泳后仍然显示是 455 bp。具体电泳结果如图 2。



注: M-100bp DNA ladder, 1~9 样本 C-509T 位点 PCR 扩增片段

图 1 TGF-β1 基因 C-509T 位点 PCR 扩增片段



注: M-100 bp DNA ladder; 1、4、5、6、7、10 为 TC 基因型; 2、3、8、9、11、12、14、15 为 TT 基因型

图 2 TGF-β1 基因 C-509T 位点 PCR 产物 *Eco*RI 酶切片段

139 名壮族工人 C-509T 位点的基因型分布如表 1 所示, 壮族接尘组中 C-509T 位点的 CC 基因型频率最高 (41.38%), 其余依次为 TC 基因型和 TT 基因型。与之明显差别的是对照组, 其 C-509T 位点基因型频率依次为 TT、TC、CC 型; 而在壮族矽肺组, 相应的三种基因型的频率为 52.94%、23.53%、23.53%。由此可看出, 壮族接尘组 C-509T 位点上 CC 基因型的个体显著高于对照组和矽肺组。使用 SPSS15.0 软件, 对表 1 频数进行行乘列卡方检验, 得到的 P 值 = 0.008, < 0.05 , 证实上述结果具有统计学意义。

表 1 壮族工人 C-509T 位点的基因型分布

组别	例数	基因型		
		TT	TC	CC
对照组	30	13 (43.33%)	13 (43.33%)	4 (13.33%)
接尘组	58	15 (25.86%)	19 (32.76%)	24 (41.38%)
矽肺组	51	27 (52.94%)	12 (23.53%)	12 (23.53%)

3 讨论

人类 TGF-β1 基因的 5' 侧翼区共有 5 个明显的调控区, 一个是类增强子活性区 (-1132 ~ -731), 两个负调控区 (-1362 ~ -1132)、(-731 ~ -453), 两个启动子区。其中 TGF-β1 基因的两个负调控区主要抑制转录单元的活性, 而定位于第二个负调控区 (-731 ~ -453) 的 C-509T 位点的多态

性主要决定 TGF-β1 基因的下调。

研究发现^[2], C-509T 等位基因 T 的个体比等位基因 C 的个体会具有较高的 TGF-β1 血浆水平, 并且等位基因 T 有“剂量-效应”, 意即 C-509T 等位基因上 TT 基因型的个体与 CT 基因型、CC 基因型的个体相比, 其 TGF-β1 血浆水平相对要高。相应的是, 携带有等位基因 T 的个体, 其 TGF-β1 基因转录子的活性也较高, TGF-β1 mRNA 的表达水平同样较高。这意味着 TGF-β1 基因多态性可能决定 TGF-β1 的血浆水平。

曾有研究证实, 汉族人群 TGF-β1-509 位点的多态性可能与矽肺有密切关系^[3], 提示 TGF-β1 基因的多态性可能造成 TGF-β1 表达的差异, 并进而导致矽肺的易感性不同。

本次研究发现, 在 51 例壮族矽肺患者中, C-509T 等位基因上 TT、TC、CC 基因型的频数分别为 27、12、12, 相应的频率则是 52.94%、23.53%、23.53%, 与对照组相比较, 差异并无统计学意义。然而在接尘组中, C-509T 等位基因上 TT、TC、CC 基因型的频数分别为 15、19、24, 其相应的频率为 25.86%、32.76%、41.37%, CC 基因型频率明显高于对照组及矽肺组。

由于 C-509T 等位基因上 TT 基因型的个体与 CT 基因型、CC 基因型的个体相比, 其 TGF-β1 血浆水平相对要高, 因此推测, 在 3 种基因型中, CC 基因型的个体其体内 TGF-β1 血浆水平将是最低的。由于 TGF-β1 能够趋化肺脏巨噬细胞, 并刺激使之产生 IL-1、PDGF、TNF-α 等细胞因子, 进而引发炎症反应; TGF-β1 还能趋化成纤维细胞, 对上皮细胞有强大的抗增殖作用, 诱导上皮细胞形态和生物学功能向间质细胞表型转化^[4,5]。基于上述结果, 我们认为 C-509T 等位基因上 CC 基因型可能是壮族个体免于罹患矽肺的一种保护因素。然而, 尽管基因多态性检测支持这种说法, 本文的研究结果仍然需要相应人群 TGF-β1 血浆水平检测结果的支持, 须进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] Lario S, Inigo P, Campistol J M, *et al.* Restriction enzyme-based method for transforming growth factor-beta (1) genotyping: nonisotopic detection of polymorphisms in codons 10 and 25 and the 5'-flanking region [J]. Clin Chem, 1999, 45 (8): 1290-1292.
- [2] Luedeking E K, DeKosky S T, Mehdi H, *et al.* Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor-beta1 gene and the risk of Alzheimer's disease [J]. Hum Genet, 2000, 106 (5): 565-569.
- [3] 李娟, 范雪云, 马立人. 转化生长因子-β 基因多态性与矽肺相关性研究 [J]. 华北煤炭医学院院报, 2009, 11 (1): 1-4.
- [4] Pelton R W, Moses H L. The beta-type transforming: mediator of cell regulation in the lung [J]. Am Rev Respir Dis, 1990, 142 (2): 31-35.
- [5] Khalil N, O'Connell R N, Flanders K C, *et al.* TGF-beta 1 but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis an immunohistochemical study [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996, 14 (2): 131-138.