

DNA 修复酶基因多态性与 1,3-丁二烯作业工人 DNA 损伤遗传易感性的关系

刘楠¹, 李斌², 程娟², 李云¹, 郑国颖¹, 关维俊¹, 崔涛², 孟会林²

(1. 河北联合大学公共卫生学院/河北省煤矿卫生与安全重点实验室, 河北 唐山 063000; 2. 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100005)

摘要: 目的 研究 DNA 修复酶基因 *XRCC1*、*XRCC2*、*XRCC4*、*RAD52* 单核苷酸多态性在 1,3-丁二烯 (BD) 致外周血淋巴细胞 DNA 损伤遗传易感性中的作用。方法 选取 171 名 BD 作业工人和 55 名行政人员作为研究对象, 采用碱性彗星试验评价个体外周血淋巴细胞 DNA 损伤, 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法分析 *XRCC1*、*XRCC2*、*XRCC4*、*RAD52* 基因多态性。结果 BD 暴露组和对照组彗星尾距分别为 4.53 (3.49~5.87) 和 2.38 (0.82~3.98), 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。暴露组中具有 *XRCC1* 基因 G28152A 位点 GG 基因型个体的彗星尾距显著低于 AA 基因型个体 [4.52 (3.43~5.64), 5.18 (4.23~6.18), $P < 0.05$]; *XRCC4*A245G 位点 AG 和 GG 基因型个体的彗星尾距显著高于 AA 基因型个体 [5.05 (3.79~6.05), 5.37 (4.29~6.36), 4.23 (3.35~5.41), $P < 0.01$]。结论 *XRCC1* G28152A 和 *XRCC4* A245G 位点的多态性可能与 BD 诱导的 DNA 损伤有关。

关键词: 1,3-丁二烯 (BD); 彗星试验; DNA 损伤修复基因; 基因多态性

中图分类号: R996 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2014)01-0017-04 DOI: 10.13631/j.cnki.zggyx.2014.01.005

Relationship between DNA repair gene polymorphisms and DNA damage susceptibility in 1,3-butadiene exposed workers

LIU Nan*, LI Bin, CHENG Juan, LI Yu, ZHENG Guo-ying, GUAN Wei-jun, CUI Tao, MENG Hui-lin

(* . Laboratory of Occupational Health and Safety for Coal Industry, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship between DNA damage susceptibility to 1,3-butadiene (BD) and polymorphisms of DNA repair gene such as *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC4* and *RAD52*. **Methods** 171 BD-exposed workers and 55 administrative personnels were selected as exposed subjects and controls respectively, in this study. DNA damage in peripheral lymphocytes was measured by alkaline comet assay, the polymorphisms of *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC4* and *RAD52* were detected by PCR-RFLP. **Results** The results showed that the comet tail moment of exposed group (4.53, 3.49—5.87) was much higher than that of control group (2.38, 0.82—3.98), there was significant difference ($P < 0.01$). Multivariate analysis of covariance further revealed that the comet tail moment of G28152A in BD exposed workers with *XRCC1* AA genotype (5.18, 4.23—6.18) was significantly higher than that of GG genotypes (4.52, 3.43—5.64, $P < 0.05$). Additionally, the comet tail moment of A245G in *XRCC4* AA genotype (4.23, 3.35—5.41) was significantly lower ($P < 0.01$) than that of AG (5.05, 3.79—6.05) and GG genotypes (5.37, 4.29—6.36). **Conclusion** The results suggested that genetic polymorphisms of *XRCC1* G28152A and *XRCC4* A245G might be related to the DNA damage induced by BD.

Key words: 1,3-butadiene (BD); comet assay; DNA damage repair gene; polymorphism

1,3-丁二烯 (1,3-butadiene, 简称 BD) 是一种重要的有机化工原料。2008 年国际癌症研究组织 (IARC) 已将 BD 提升为确定的人类致癌物^[1], 其进入机体后的代谢产物可作用于细胞的遗传物质, 导致 DNA/染色体损伤, 如果机体不能正确地识别和修复这些损伤, 经过一个细胞周期后, 这些损伤即可固定

下来形成突变, 造成基因组不稳定性升高, 甚至启动肿瘤的发生。因此研究 DNA 修复酶基因单核苷酸多态性 (SNPs) 与 BD 致外周血淋巴细胞 DNA/染色体损伤遗传易感性之间的关系对于保护 BD 接触人群的健康可能有重要意义。在前期工作中^[2~4], 曾使用双核淋巴细胞微核试验评价 BD 作业工人个体外周血淋巴细胞染色体损伤, 随之分析了 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 和 X 线修复交叉互补基因 4 (*XRCC4*) 基因多态性与 BD 作业工人染色体损伤易感性的关系, 发现 MTHFR A1298C 位点、*XRCC4* A245G 和 T1394G 位点的多态性可能影响 BD 作业工

收稿日期: 2013-08-08; 修回日期: 2013-10-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30471471); 唐山市科技支撑计划项目 (No. 13130297z)

作者简介: 刘楠 (1982—), 女, 助理研究员, 研究方向: 劳动卫生与职业病。

通讯作者: 李斌, 研究员。

人 DNA/染色体损伤的易感性。本研究将采用碱性彗星试验评价个体 DNA 损伤水平,进一步探讨 DNA 修复酶基因 (*XRCC1*、*XRCC2*、*XRCC4* 和 *RAD52*) 多态性对职业 BD 接触者 DNA 损伤的影响。

1 对象与方法

1.1 对象

本研究 226 名研究对象,均为北方汉族人。暴露组来源于两个大型石化企业的 171 名 BD 作业工人;对照组由事业单位的行政人员组成,共 55 人。

1.2 方法

1.2.1 职业流行病学调查 对研究对象的一般情况、BD 接触史、职业病诊断情况进行调查。暴露组工人均暴露于 BD 1 年以上。

1.2.2 血样采集和 DNA 制备 抽取研究对象的肘静脉血。0.4 ml 肝素钠抗凝用于碱性彗星试验;2 ml EDTA 抗凝,置于冰盒中, -20 ℃ 保存。盐析法提取 DNA。

1.2.3 BD 空气监测 对职业 BD 暴露作业场所空气中的 BD 浓度进行短间接接触浓度 (15 min) (STEL) 监测,根据《工作场所空气有毒物质测定 烯烃类化合物》(GBZ/T160.39—2004),采用直接进样法,使用 HP5890 气相色谱仪对样品进行检测。

1.2.4 碱性彗星试验 常规法提取淋巴细胞。使用两层凝胶电泳法,经裂解、DNA 解螺旋、电泳和中和得到湿琼脂糖凝胶片 (每人制备 2 张)。操作在采血后 8 h 内避光完成。采用乙醇脱水法^[5]将湿凝胶片脱水干燥后装于有干燥剂的载片盒中运回实验室。30 μg/ml 溴乙锭染色后,在荧光显微镜下观察 100 个细胞核,使用彗星试验图像分析软件 IM11.0^[6] 分析彗星尾矩 (Olive TM),即“彗星”头部和尾部各自分布的中心点间的距离与总体 DNA 在尾部分数的乘积。

1.2.5 基因型分析 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术对 *XRCC1*、*XRCC2*、*XRCC4* 和 *RAD52* 基因进行分型。具体见表 1。

1.2.6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。彗星尾矩不呈正态分布,且经对数变换仍不呈正态分布,以中位数 *M* (95% *CI*) 表示。采用协方差分析比较不同基因型 Olive TM 的差异,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

171 名职业 BD 暴露工人中男 122 名、女 59 名,

表 1 PCR 引物及扩增片段大小

基因位点/片段	引物
<i>XRCC1</i> C26304T (485 bp)	5'-GCC AGG GCC CCT CCT TCA A-3' 5'-TAC CCT CAG ACC CAC GAG T-3'
<i>XRCC1</i> G27466A (201 bp)	5'-CCA GTG GTA CTA ACC TAA TC-3' 5'-CAC TCA GCA CCA GTA CCA CA-3'
<i>XRCC1</i> G28152A (871 bp)	5'-CAG TGG TGC TAA CCT AAT C-3' 5'-AGT AGT CTG CTG GCT CTG G-3'
<i>XRCC1</i> G36189A (501 bp)	5'-GTC AGT GCT GAT TCC CTG ATG TGC C-3' 5'-CAG ATC TCT GAC GGA GGT GCC CAG C-3'
<i>XRCC2</i> G4234C (251 bp)	5'-GCG CCG CCC CAA GCC TCC CAA TC-3' 5'-GTG CGG ACG CGC GCG GGT GGA C-3'
<i>XRCC4</i> A245G (132 bp)	5'-CCA ATT TGA AAC AGG ATT TAA CTG TC-3' 5'-AGG TAG TGA AGA ATC AGG CCT ACA A-3'
<i>XRCC4</i> T1394G (115 bp)	5'-AAG CAG CAT TTT CAA AGT TAA GAG AA-3' 5'-GAT TTT TGG GGG GAG TTT CTT T-3'
<i>XRCC4</i> C1475T (123 bp)	5'-TGG TGC CAA AAG AAA CTC CCC-3' 5'-TGA CCC TTT GAA GCA TTA GCG C-3'
<i>RAD52</i> rs11266 (107 bp)	5'-CTC TCT CCA CAA CCT CTT GGG C-3' 5'-CTC AAA AAT GCC TTT TCT GGC C-3'

平均年龄 (36.8 ± 6.5) 岁,接触工龄 (15.4 ± 7.0) 年;对照组 55 名中男 50 名、女 5 名,平均年龄 (37.9 ± 7.8) 岁,工龄 (12.7 ± 8.8) 年。对照组的年龄、吸烟比例及生活条件与接触组均衡可比。作业区空气中 BD 浓度为 $1.80 (0.59 \sim 2.76) \text{ mg/m}^3$ 。

2.2 DNA 损伤情况

对职业 BD 暴露工人和对照人群的外周血淋巴细胞 Olive TM 进行秩和检验,比较两组间的差别 (Kruskal-Wallis Test)。结果显示,BD 暴露组和对照组 Olive TM 分别为 $4.53 (3.49 \sim 5.87)$ 和 $2.38 (0.82 \sim 3.98)$,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),提示 BD 接触可能会导致职业接触工人遗传损伤。

2.3 DNA 修复酶基因多态性的分布

本研究对象中 *XRCC1* 基因 C26304T、G27466A、G28152A 和 G36189A, *XRCC2* G4234C, *XRCC4* 基因 A245G、T1394G 和 C1475T, *RAD52* rs11266, 9 个位点变异型等位基因的频率分别是 0.37、0.12、0.35、0.15、0.17、0.32、0.22、0.27、0.54,其基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡,且 BD 暴露组和对照组的基因型分布差异无统计学意义 ($P > 0.1$),提示选择人群无偏倚。

2.4 碱基切除修复通路 DNA 修复酶基因多态性与 DNA 损伤的关系

职业 BD 暴露组中,使用多元非参数协方差分

析,校正年龄/作业工龄、性别和吸烟、饮酒后,暴露组具有 *XRCC1* 基因 G28152A 位点 GG 基因型个体的 Olive TM 显著低于 AA 和 GA + AA 基因型个体, $P < 0.05$ 。未在对照组中观察到类似的关联。未发现 *XRCC1* 其他位点的遗传变异对暴露组外周血淋巴细胞 DNA 损伤的危险度有显著性影响。见表 2。

表 2 *XRCC1* 基因多态性与 Olive TM 的关系

基因型	对照组			暴露组		
	例数	GM(95% CI)	P 值	例数	GM(95% CI)	P 值
<i>XRCC1</i> C26304T						
CC	33	2.38(1.13~3.99)		80	4.63(3.43~5.82)	
CT	18	2.21(0.52~4.17)	0.95	65	4.62(3.49~6.13)	0.86
TT	4	2.20(1.41~3.61)	0.89	26	5.01(3.52~5.87)	0.40
<i>XRCC1</i> G27466A						
GG	46	2.36(0.80~4.00)		142	4.68(3.49~5.97)	
GA	8	2.14(1.59~3.38)	0.70	26	4.63(3.49~6.30)	0.46
AA	1	2.63	0.48	3	4.24(4.18~4.38)	0.20
<i>XRCC1</i> G28152A						
GG	33	2.33(0.89~4.06)		85	4.52(3.43~5.64)	
GA	21	2.39(0.79~3.63)	0.69	73	4.91(3.49~6.15)	0.22
AA	1	1.90	0.43	13	5.18(4.23~6.18)	0.01
GA + AA	22	2.38(0.79~3.63)	0.55	86	4.96(3.50~6.17)	0.03
<i>XRCC1</i> G36189A						
GG	33	2.39(0.81~4.06)		134	4.61(3.50~6.01)	
GA	20	2.08(0.56~3.63)	0.62	36	4.80(3.20~6.00)	0.43
AA	2	2.14(1.72~2.56)	0.59	1	5.66	0.29

2.5 DNA 双链断裂修复通路 DNA 修复酶基因多态性与 DNA 损伤的关系

由表 3 可见,职业 BD 暴露组中具有 *XRCC4* 基因 A245G 位点 AG 和 GG 基因型个体的 Olive TM 显著高于 AA 基因型个体, $P < 0.01$ 。未发现暴露组和对照组中 *XRCC2*、*RAD52* 和 *XRCC4* 基因其他位点的遗传变异对暴露组外周血淋巴细胞 DNA 损伤的危险度有显著性影响。

3 讨论

BD 及其环氧化物对 DNA 造成的损伤包括稳定的大分子加合物、氧化性 DNA 损伤和 DNA 双链的断裂,碱性彗星试验可检测个体 DNA 链断裂、碱性不稳定位点和不完全剪切修复位点的数量,除了 BD 暴露造成的氧化性 DNA 损伤外,还包括一部分凋亡和坏死细胞。本课题组前期研究提示了 BD 暴露工人外周血淋巴细胞 DNA 损伤与 BD 暴露的关联性^[3],但数据显示具有相似 BD 暴露的个体之间 DNA 损伤的变异很大,提示个体遗传易感性的可能作用。而 DNA 修复基因的 SNPs 可能改变修复酶活性而导致不

表 3 *XRCC2*、*XRCC4* 和 *RAD52* 基因多态性与 Olive TM 的关系

基因型	对照组			暴露组		
	例数	GM(95% CI)	P 值	例数	GM(95% CI)	P 值
<i>XRCC2</i> G4234C						
GG	41	2.38(0.79~4.01)		112	4.66(3.50~6.11)	
GC	14	2.36(1.05~2.90)	0.34	56	4.59(3.34~5.73)	0.27
CC	0	—	—	3	5.24(4.34~5.82)	0.71
<i>XRCC4</i> A245G						
AA	28	2.34(0.64~4.10)		79	4.23(3.35~5.41)	
AG	17	2.72(1.05~3.96)	0.37	76	5.05(3.79~6.05)	0.01
GG	10	1.99(0.83~3.61)	0.29	16	5.37(4.29~6.36)	0.01
AG + GG	27	2.39(0.91~3.84)	0.34	92	5.08(3.82~6.16)	0.001
<i>XRCC4</i> T1394G						
GG	43	2.38(0.79~4.00)		109	4.67(3.49~6.11)	
GT	8	2.37(1.41~2.84)	0.55	48	4.67(3.84~5.89)	0.28
TT	4	1.96(1.05~2.63)	0.61	14	4.45(3.35~5.98)	0.54
<i>XRCC4</i> C1475T						
CC	22	2.05(0.79~3.61)		96	4.57(3.49~6.12)	
CT	31	2.49(0.85~4.07)	0.21	65	4.82(3.44~5.44)	0.83
TT	2	1.98(1.41~2.94)	0.23	10	4.77(3.49~5.44)	0.49
<i>RAD52</i> rs11266						
CC	12	2.08(0.78~4.01)		25	5.03(3.18~6.42)	
CT	24	2.36(1.14~3.57)	0.90	88	4.63(3.45~6.05)	0.33
TT	19	2.41(0.52~4.17)	0.52	56	4.55(3.62~5.75)	0.52

同个体 DNA 损伤修复能力的差异。DNA 损伤修复主要有碱基切除修复、核苷酸切除修复、DNA 错配修复和 DNA 双链断裂修复等多种途径。*XRCC1* 和 *XRCC2*、*XRCC4*、*RAD52* 分别是碱基切除修复和 DNA 双链断裂修复通路的重要成员。

XRCC1 基因是第一个分离到的影响细胞对电离辐射敏感性的哺乳动物基因,是碱基切除修复系统的核心蛋白成员,它在一系列内、外氧化剂包括烟草成分导致的 DNA 单链断裂和碱基损伤修复中起重要作用^[7]。*XRCC1* 基因 G28152A 位点 G→A 变异,导致第 399 密码子编码氨基酸 Arg→Gln 改变,从而改变 *XRCC1* 的功能并影响个体肿瘤易感性。本研究结果显示,校正年龄/作业工龄、性别、吸烟、饮酒后,具有 399Gln/Gln 基因型的个体 DNA 损伤程度降低,先前有关食管癌和头颈癌的研究中发现携带变异型等位基因 399Gln 个体的肿瘤发生危险明显低于野生型携带个体^[8],间接支持了本次研究结果。

XRCC4 是 DNA 双链断裂修复过程中重要的酶,*XRCC4* 基因所翻译的 *XRCC4* 蛋白是一种核磷酸蛋白,直接与 DNA 连接酶作用,在双链断裂位点可以使连接酶活性增加数倍。如果 *XRCC4* 基因在正常人的 DNA 修复途径中发生缺陷,或是编码基因发生突变,就会造成蛋白功能缺失或翻译量明显降低,其主要的特征就是 DNA 中断裂的双链不能正常地连接,

或者连接发生错误,造成 DNA 双链断裂不能被修复,从而引起染色体的不稳定。本课题组前期研究发现 XRCC4 A245G 位点的多态性能够影响 BD 作业工人的 NPB 率,也从一个侧面证实了这一生物学基础^[4]。本次研究进一步分析了 XRCC4 基因 A245G、T1394G、C1474T 位点多态性与 BD 作业工人 DNA 损伤易感性的关系,结果发现 XRCC4A245G 位点的多态性能够影响 BD 作业工人的 Olive TM,提示变异等位基因 A 携带者的 DNA 损伤程度较野生等位基因 G 携带者相对低一些。

本次研究没有发现 XRCC2 和 RAD52 这两个多态位点基因型与 DNA 损伤易感性的关联,提示这两个位点的变异在修复 BD 作业工人 DNA 损伤过程中可能没有发挥作用,或者本研究还没有足够的能力检测出不同基因型个体 Olive TM 的微小差异。

参考文献:

- [1] Grosse Y, Baan R, Straif K, *et al.* Carcinogenicity of 1,3-butadiene, ethylene oxide, vinyl chloride, vinyl fluoride, and vinyl bromide. [J]. *Lancet Oncol*, 2007, 8 (8): 679-680.

- [2] 刘楠,崔涛,孟会林,等. MTHFR 基因多态性与 1,3-丁二烯作业工人染色体损伤的关系 [J]. *毒理学杂志*, 2008, 22 (2): 84-87.
- [3] 刘楠,王学生,崔涛,等. MTHFR 基因多态性对 1,3-丁二烯作业工人 DNA 损伤的影响 [J]. *毒理学杂志*, 2011, 25 (1): 13-16.
- [4] 刘楠,关维俊,孟会林,等. 1,3-丁二烯作业工人 XRCC4 基因多态性与染色体损伤的关系 [J]. *卫生研究*, 2010, 39 (4): 407-411.
- [5] Filser J G, Hutzler C, Meischner V, *et al.* Metabolism of 1,3-butadiene to toxicologically relevant metabolites in single-exposed mice and rats [J]. *Chem Biol Interact*, 2007, 166: 93-103.
- [6] 朱志良,庄志雄,黄钰,等. 单细胞凝胶电泳图像分析系统的研制与应用 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2001, 19 (4): 298-300.
- [7] Sai-mei Hou, Charlotta Ryk, Annamaria Kannio, *et al.* Influence of commo XPD and XRCC1 variant alleles on P53 mutations in lung tumors [J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2003, 41: 37-42.
- [8] Olshan A F, Watson M A, Weissler M C, *et al.* XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer [J]. *Cancer Lett*, 2002, 178: 181-186.

• 病例报道 •

二巯丙磺钠治疗汞中毒引起 过敏性休克 1 例报告

王春花

(沈阳市第九人民医院, 辽宁 沈阳 110024)

二巯丙磺钠 (Na-DMPS) 是重金属络合剂,能与金属离子形成不易解离的络合物,临床上常作为治疗汞中毒的首选药物^[1]。我院成功抢救了 1 例使用二巯丙磺钠治疗汞中毒过程中出现过敏性休克的病例,现报告如下。

1 临床资料

患者,男,44 岁,接汞作业 7 年,近 3 年出现睡眠障碍。入院查体: T 36.7 °C, P 74 次/min, R 18 次/min, BP 130/70 mm Hg,发育正常,意识清楚,心肺无异常,肝脾肋下未触及,三颤征阳性;实验室检查:尿汞 66 μg/g 肌酐。诊断为汞中毒。给予二巯丙磺钠 0.25 g 每日 1 次肌内注射。患者于第一次肌内注射二巯丙磺钠后 3 min 突然出现面色苍白、周身冷汗。查体: BP 60/40 mm Hg, P 96 次/min, R 16 次/min,意识模糊,双侧瞳孔等大正圆、直径 3.0 mm,双肺未闻及干湿啰音,心率 96 次/min。考虑患者为二巯丙磺钠所致过敏性休克^[2]。

2 救治经过

立即停用二巯丙磺钠,吸氧 3 L/min,静脉注射地塞米松

10 mg、盐酸肾上腺素 1 mg,静脉滴注生理盐水 250 ml + 多巴胺 60 mg + 地塞米松 10 mg、生理盐水 500 ml + 维生素 C 2.5 g;并给予心电监护,心电图示窦性心律、非特异性 T 波异常;心肌酶谱检测 CPK-P 64 mmol/L、CKMB-P 3 U/L, TTX 阴性;血离子检查 K⁺ 2.5 mmol/L、Na⁺ 147 mmol/L、Cl⁻ 108 mmol/L。立即给予补钾、静脉滴注丹参川芎注射液改善微循环,测量体温、予以保暖,防止因休克发生体温降低。经上述救治,患者意识转清, BP 85/50 mm Hg, P 100 次/min, R 18 次/min;同时给予心理护理以缓解休克引起的心理紧张。

3 讨论

二巯丙磺钠是一种含巯基的络合剂,常用于汞、砷、铅等急、慢性中毒的治疗。我院使用二巯丙磺钠治疗了 1000 多例汞作业观察对象和汞中毒患者,发生过过敏性休克的患者仅此 1 例。该药过敏性休克的特点为周围血管扩张导致有效循环血量不足,患者脉搏细弱,血压下降,脑缺氧导致意识丧失。治疗上迅速按照过敏性休克处理,给予糖皮质激素、盐酸肾上腺素;早期在保证血容量充足的前提下使用多巴胺升压效果良好,休克纠正后血压平稳。使用二巯丙磺钠致过敏性休克的发生率虽低,但发生、发展迅猛,可因抢救不及时而死于严重的呼吸困难和循环衰竭,危及生命。因此在注射二巯丙磺钠前要详细询问过敏史,即使患者无药物过敏史,也要提前做好抢救准备工作,注射药物后要专人守护、密切用药观察、倾听患者主诉,及时予以有效救治,预防不良反应的发生。

参考文献:

- [1] 何凤生,王世俊,任引津. 中华职业医学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 199-200.
- [2] 陈世铭,高连永. 急性中毒的诊断与救治 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1995: 1080-1081.

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2014.01.006

收稿日期: 2013-06-14; 修回日期: 2013-08-26

作者简介: 王春花 (1976—),女,副主任护师。