

1,3-丁二烯作业工人 DNA 修复能力与 DNA 双链断裂修复通路基因多态性

刘楠¹, 李斌², 程娟², 李云¹, 郑国颖¹, 关维俊¹

(1. 华北理工大学公共卫生学院/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 100500)

摘要: **目的** 探讨 *RAD52*、*XRCC2*、*XRCC4* 基因多态性与 1,3-丁二烯 (BD) 作业工人 DNA 修复能力的关系。**方法** 利用染色体断裂试验评价 60 名 BD 职业暴露工人和 60 名非暴露工人的外周血淋巴细胞对诱变剂博来霉素 (BLM) 所致 DNA 损伤的修复能力, 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法分析 *RAD52*、*XRCC2* 和 *XRCC4* 基因多态性。**结果** 职业 BD 暴露组染色体断裂率 [(1.06±0.41)%] 显著高于对照组 [(0.85±0.36)%] ($P<0.01$); 暴露组中 *XRCC4* A245G 位点 AA 基因型个体 b/c 率 [(1.18±0.48)%] 显著高于 GG 或 AG+GG 基因型个体 [(0.91±0.29)%] ($P=0.02$); *XRCC4* T1394G 位点 TT 基因型个体 b/c 率 [(0.75±0.36)%] 显著低于 GG 基因型个体 [(1.13±0.42)%] ($P=0.04$)。**结论** *XRCC4* 基因多态性与 BD 作业工人 DNA 修复能力存在相关性。

关键词: 1,3-丁二烯; 基因多态性; DNA 修复能力; 博来霉素

中图分类号: R99; O623.122 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2016)03-0171-04 DOI:10.13631/j.cnki.zggyyx.2016.03.003

DNA repair capacity and gene polymorphism of DNA double strand break repair pathway in 1,3-butadiene workers

LIU Nan*, LI Bin, CHENG Juan, LI Yun, ZHENG Guo-ying, GUAN Wei-jun

(* . School of Public Health, North China University of Science and Technology; Key Laboratory of Coal Mine Health and Safety of Hebei Province, Tangshan 063000, China)

Abstract: Objective To explore the relation between genetic polymorphisms of *RAD52*, *XRCC2*, *XRCC4* and DNA repair capacity (DRC) in 1,3-butadiene (BD) workers. **Methods** DRC of DNA damage caused by bleomycin in peripheral blood lymphocytes of 60 BD-exposed workers and 60 non-BD exposed workers were measured respectively, using chromatid breaks test, and the polymorphism of *RAD52*, *XRCC2*, *XRCC4* were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique. **Results** The results showed that the Chromosome breakage rate per cell (b/c) were significantly higher in BD-exposed workers than that in control group [(1.06±0.41)% vs (0.85±0.36)%, $P<0.01$], and the levels of b/c were significantly lower in BD-exposed workers with AG+GG genotype of A245G polymorphism of *XRCC4* than those with AA genotype [(0.91±0.29)% vs (1.18±0.48)%, $P=0.02$], while the levels of b/c [(1.13±0.42)%] in GG genotype of *XRCC4* T1394G polymorphism were significantly higher than that of the TT genotype [(0.75±0.36)%, $P=0.04$]. **Conclusion** The results suggested that there could be a correlation between polymorphisms of *XRCC4* and DRC of DNA damage induced by BD.

Key words: 1,3-butadiene; genetic polymorphism; DNA repair capacity; bleomycin

1,3-丁二烯 (1,3-butadiene, BD) 进入机体代谢形成单环氧化物 1,2-环氧丁烯 (EB)、双环氧化物 1,2:3,4-二环氧丁烯 (DEB) 和 3,4-环氧-1,2-丁烯二醇 (EBD) 等氧化产物^[1], 这些代谢产物作用于机体的遗传物质, 产生 DNA 损伤, 如 DNA 链断裂、氧化性碱基。近来研究发现^[2,3], 当个体 BD 暴露水平很高或者 DNA 单链断裂修复能力降低时, BD 及其环氧化物可通过氧化性 DNA 损伤途径间接造成双链

DNA 断裂, 即染色体断裂。另有研究表明 *RAD52*、*XRCC2* 和 *XRCC4* 是 DNA 双链断裂修复 (DNA double-strand break repair, DSBR) 通路的重要成员, 对维持遗传物质的完整性和稳定性具有重要意义。基于我们以往研究中发现的 DSBR 通路修复酶基因在 BD 致遗传物质损伤中的重要作用^[4,5], 推测其在 BD 暴露个体修复损伤 DNA 能力过程中可能发挥重要作用。因此, 本研究以博来霉素 (bleomycin, BLM) 作为诱变剂, 利用染色体断裂试验检测职业 BD 暴露人群及对照人群的 DNA 修复能力 (DNA repair capacity, DRC), 进一步探讨 DSBR 通路修复酶基因 (*RAD52*、*XRCC2* 和 *XRCC4*) 多态性与职业 BD 接触

收稿日期: 2015-09-02; 修回日期: 2016-12-30

基金项目: 唐山市科技支撑计划项目 (No. 13130297z)

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

者 DRC 之间的关联。

1 对象与方法

1.1 对象

研究对象为 120 名中国北方汉族人, 其中暴露组来源于某大型石化企业的 60 名暴露于 BD 1 年以上的作业工人, 非 BD 暴露人群由 60 名事业单位的行政人员组成。研究对象的剔除条件为最近接触过致突变因素 (如 X 线检查)、患有慢性病 (如自身免疫性疾病) 和有过急性感染史并使用抗生素治疗的人员。

1.2 问卷调查

采用自编统一的调查表, 经知情同意后, 由调查员对研究对象进行面对面调查, 收集所有参加者的人口学资料, 吸烟、饮酒、饮食等日常生活习惯, 职业暴露史和个体既往健康/疾病史, 并填写调查表。

1.3 血样采集和 DNA 制备

采集研究对象空腹静脉血 6 ml, 置于含肝素钠抗凝剂的真空抗凝管中, 混匀备用, 于当日分离淋巴细胞; 2 ml EDTA 抗凝, 置于冰盒中, -20°C 保存。盐析法提取 DNA。

1.4 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 *RAD52*、*XRCC2* 和 *XRCC4* 基因进行分型。见表 1。

表 1 PCR 引物及扩增片段大小

基因位点/片段	引物
<i>RAD52</i> rs11266(107bp)	5'-CTCTCTCCACAACCTCTTGGGC-3'
	5'-CTCAAAAATGCCTTTTCTGGCC-3'
<i>XRCC2</i> G4234C(251 bp)	5'-GCGCGGCCCAAGCCTCCCAATC-3'
	5'-GTGCGGACGCGCGGGTGTGAC-3'
<i>XRCC4</i> A245G(132 bp)	5'-CCAATTTGAAACAGGATTTAACTGTC-3'
	5'-AGGTAGTGAAGAATCAGGCTACAA-3'
<i>XRCC4</i> T1394G(115 bp)	5'-AAGCAGCATTTTCAAAGTTAAGAGAA-3'
	5'-GATTTTGGGGGAGTTTCTTT-3'
<i>XRCC4</i> C1475T(123 bp)	5'-TGGTGCCAAAAGAACTCCCC-3'
	5'-TGACCCCTTTGAAGCATTAGCGC-3'

1.5 BLM 诱变剂敏感性试验^[6]

将 5 ml 1640 培养基加入离心管中, 肝素抗凝血 5.5 ml 加入上述离心管中, 轻轻混匀, 5 ml 淋巴细胞分离液加入另一离心管中, 将混匀的血液缓缓加入 (沿管壁) 淋巴细胞分离液面上, 1 200 r/min 离心 30 min, 10 ml 1640 培养基加入新离心管中, 吸弃上清, 白细胞层吸入上述离心管中, 1 000 r/min 离心 10 min。用 4% 的台盼蓝染液计数细胞存活率 ($1 \times 10^6/\text{ml}$)。吸去上清液, 分装 2 份 (1 号和 2 号), 各加入含 PHA 的血液培养基, 1 号培养基作为平行本底。培养 67 h 后, 将终浓

度为 3 U/L 的博莱霉素加到 2 号培养基中。71 h 后, 将秋水仙素 (终浓度为 0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 分别加入到 1 号和 2 号培养基中。72 h 后将 2 瓶培养液分别转入 15 ml 的离心管中, 用 5 ml PBS 涮洗烧瓶后再到入离心管中。1 300 r/min 离心 10 min。吸去上清液, 加入 8 ml 0.075 mol/L KCl, 用吸管轻轻混匀细胞 3 次, 室温放置 18 min。后快速加入 1.5 ml 固定液 (3:1 甲醇和冰醋酸), 轻混 3 次。1 300r/min 离心 10 min。吸去上清液, 用吸管轻轻混匀细胞 5 次, 加入 10 ml 固定液混匀, 放入 4°C 冰箱过夜。从冰箱取出固定的淋巴细胞悬浮液, 室温放置 30 min 以上。1 300 r/min 离心 10 min。吸去上清液, 加入适量固定液, 用吸管轻轻混匀细胞 5 次。在冰片上缓慢地滴 20 μl 细胞悬浮液, 自然晾干, 每个样本制作 2 份, 包括本底和 BLM 诱变。用 5% 吉姆萨染液 (pH = 6.8) 染色 5 min, 于 10×100 倍油镜下, 计数 50 个细胞分裂中期相染色体断裂的数目, 即每个样本读 100 个。计算平均每细胞染色体断裂率 (chromatid breaks per cell, b/c 率), 以断裂率 (b/c) 为统计指标。

$b/c = (\text{BLM 诱变组中所有染色体断裂的总和} - \text{本底中染色体断裂的总和}) / \text{所有观察的细胞总数}(50)$ 。

1.6 质量控制

所有的基因型图谱均进行 2 次分别阅片, 对结果不一致的样品重复试验; 血样在采集后立即编号, BLM 诱变试验在制片和读片时均严格盲法操作。

1.7 统计分析

使用 K-S 检验考查数据是否符合正态分布。b/c 率在两组研究人群中均符合正态分布。采用协方差分析比较不同基因型染色体 b/c 率的差异。本研究染色体 b/c 率按表达惯例, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学检验为双侧, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

分析结果显示两组调查对象在年龄、吸烟、饮酒、作业工龄方面差异无统计学意义 (表 2)。作业区空气中 BD 浓度为 1.8 (0.59~2.76) mg/m^3 。

表 2 研究对象一般情况

变量	对照组	BD 暴露组	检验值	P 值
人数	60	60		
年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	36.1 \pm 1.0	35.8 \pm 0.9	0.24 ^a	0.81
性别 (男/女, %)	60/0 (100)	44/16 (73)	18.46 ^b	<0.01
吸烟 (是/否, %)	30/30 (50)	36/24 (60)	1.21 ^b	0.18
饮酒 (是/否, %)	41/19 (68)	46/14 (77)	1.05 ^b	0.21
工龄 ($\bar{x} \pm s$, 年)	16.6 \pm 1.1	15.0 \pm 1.0	1.11 ^a	0.27

注: a, *t* 检验; b, χ^2 检验。

2.2 研究对象染色体 b/c 率的情况

使用 K-S 检验考查数据 b/c 在暴露组和对照组中均呈正态分布。暴露组和对照组 b/c 值的变化范围分别为 0.36~2.54 和 0.12~2.18, 使用协方差分析, 校正了年龄/工龄、性别、吸烟、饮酒等因素对 b/c 率的影响后, BD 职业暴露组 b/c 率显著高于对照组。见表 3。

表 3 职业 BD 暴露工人和非暴露人群的 b/c 率的关系

组别	人数	b/c 率 ($\bar{x}\pm s, \%$)	P 值
对照组	60	0.85±0.36	
BD 暴露组	60	1.06±0.41	0.017

2.3 个体 DRC 水平与 DSBR 通路基因型的关系

由表 4 可见, 暴露组中 *XRCC4* A245G 位点 AA 基因型个体 b/c 率显著高于 GG 或 AG+GG 基因型个体 ($P=0.02$); *XRCC4* T1394G 位点 TT 基因型个体 b/c 率显著低于 GG 基因型个体 ($P=0.04$)。对照组中未观察到类似的关联。未发现 *RAD52* 基因 rs11266 位点、*XRCC2* 基因 G4234C 位点和 *XRCC4* 基因 C1475T 位点的变异对 b/c 率的影响。

表 4 DSBR 通路基因多态性与 b/c 率的关系

基因率	对照组			BD 暴露组		
	人数	$\bar{x}\pm s (\%)$	P 值	人数	$\bar{x}\pm s (\%)$	P 值
<i>RAD52</i> rs11266						
TT	17	0.94±0.47		11	0.98±0.32	
CT	21	0.74±0.33	0.10	23	1.19±0.52	0.16
CC	21	0.89±0.29	0.53	26	0.97±0.30	0.66
<i>XRCC2</i> G4234C						
GG	40	0.87±0.36		37	1.01±0.41	
GC	13	0.88±0.39	0.77	21	1.14±0.40	0.13
CC	—	—	—	2	0.95±0.61	0.60
<i>XRCC4</i> A245G						
AA	28	0.79±0.43		25	1.18±0.48	
AG	22	0.86±0.27	0.54	26	0.98±0.35	0.10
GG	10	0.99±0.32	0.19	9	0.91±0.29	0.02
AG+GG	32	0.90±0.29	0.27	35	0.97±0.33	0.03
<i>XRCC4</i> T1394G						
GG	42	0.88±0.38		41	1.13±0.42	
GT	14	0.82±0.31	0.66	13	0.96±0.32	0.45
TT	4	0.66±0.36	0.38	6	0.75±0.36	0.04
GT+TT	18	0.78±0.32	0.46	19	0.89±0.34	0.07
<i>XRCC4</i> C1475G						
CC	27	0.89±0.29		29	1.05±0.43	
CT	28	0.77±0.34	0.29	25	0.98±0.29	0.72
TT	5	1.07±0.70	0.35	6	1.40±0.62	0.07
CT+TT	33	0.82±0.42	0.52	31	1.06±0.40	0.86

注: —, 未检出。

3 讨论

职业流行病学调查结果显示^[7], BD 职业接触人群发生淋巴系统和造血系统肿瘤的危险性明显升高, 其致癌性引起国际社会的密切关注。BD 及其环氧化代谢产物经体内代谢活化后, 发挥生物学作用引起各

种 DNA 损伤, 本课题组之前的研究也证实 BD 作业工人 DNA/染色体损伤高于一般人群^[7]。然而, 有损伤就必然有修复, BD 作业工人在长期时间接触 BD 及长期应对 DNA 损伤的情况下, 其细胞的修复能力也可能会有所改变。本研究结果表明, 现有 BD 外暴露水平下, 职业 BD 暴露组 b/c 率 $[(1.06\pm 0.41)\%]$ 显著高于对照组 $[(0.85\pm 0.36)\%]$ ($P<0.01$), 即暴露组 DRC 水平显著低于对照组, 说明 BD 暴露不仅能导致作业工人外周血淋巴细胞遗传物质的损伤, 还能增加细胞对 BLM 损伤的敏感程度, 降低细胞对于 BLM 导致损伤的修复能力。

本研究进一步分析了 DSBR 通路中重要的基因型与染色体断裂试验检出的 DRC 表型之间的关系, 结果表明暴露组中 *XRCC4* A245G 位点 G 等位基因携带者其 DRC 水平显著高于 A 等位基因携带者; 同时发现 *XRCC4* T1394G 位点 TT 基因型个体的 DRC 水平显著高于 GG 基因型个体。*XRCC4* 是 DSBR 通路的重要修复基因, 在 DSBR 过程中发挥重要作用。在 DNA 的非同源末端连接 (NHEJ) 通路中, 最后实际连接双链末端的功能是由 LIG4-*XRCC4* 复合体来完成的, *XRCC4* 是 LIG4 的辅助因子, 能增强 LIG4 的活性, 它们形成复合体一起作用于连接点, 在修复途径的最后阶段对 DNA 双链断裂的完善修复起着关键的作用。以往研究中^[4], 我们发现 *XRCC4* 基因 A245G 位点 A→G 的变异, 只有当个体携带 GG 基因型时其 NPB 率才显著降低, 也就是其修复能力会明显提高, 但具有 AA 基因型或 AG 基因型的个体其修复能力相似, 说明在我们所研究的人群中等位基因 A 的表型是显性的。另外, 有关台湾人乳腺癌的病例对照研究发现, *XRCC4* 基因 T1394G 位点多态性与乳腺癌危险性显著相关^[8], 提示 *XRCC4* 基因 A245G 和 T1394G 位点变异可能导致 DSBR 修复能力降低, 遗传损伤水平增高, 这些都有力地支持了我们的结果。

在 DSBR 通路中, 除了 NHEJ 外, 同源重组 (HR) 修复通路也起着重要的作用。*RAD52* 是 HR 修复途径中的一个关键蛋白, 其在维持基因组稳定性、抑制肿瘤发生等方面具有重要作用, 发现其与乳腺癌、卵巢癌、白血病、肺癌等肿瘤的易感性有关^[9-11]。而 *XRCC2* 通过参与 HR 来修复 DNA 链的断裂和交联损伤, 在维持细胞分裂过程中染色体的稳定性方面具有重要作用。*XRCC2* 基因的单核苷酸多态性可能影响 *XRCC2* 基因的表达, 降低 DNA 修复能力, 与某些肿瘤的易感性相关^[12]。本次研究没有发

(下转第 204 页)

降低血压、促进消化等多重功能。二是美食调节,美味食物不仅是一种享受,还可以弥补心理的疲劳,帮助人忘记烦恼,恢复信心。三是幽默调节,适度与同事开开玩笑,阅读幽默笑话书籍或观看喜剧电影等,让生活丰富起来,可以有效地避免过劳的危害。

参考文献:

- [1] 赵金龙. “过劳死”是异化劳动的恶果 [J]. 考试周刊, 2011, 30 (23): 54-55.
- [2] 邵晴芳. 高校教师“过劳死”问题研究 [D]. 青岛大学, 2012, 40-41.
- [3] 罗财喜. 论知识分子过劳死的法律性质及劳动法的完善 [J]. 经纪大学学报, 2005, 20 (1): 70-73.
- [4] 罗财喜. 农民工“过劳死”呼唤政策特殊保护 [J]. 世纪桥, 2006, 15 (11): 31-32.
- [5] 王丹. 中国知识工作者过度劳动的理论与实证研究 [J]. 经济经纬, 2011, 10 (2): 87-89.
- [6] 王秀云. “过劳死”问题现状及成因研究 [J]. 中国城市经济, 2010, 16 (11): 79-81.
- [7] 杨菊贤, 张阳. 心理行为因素与心血管疾病的发生发展 [J]. 中国行为医学科学, 2002, 17 (11): 121-122.
- [8] CDC of USA. The role of public health in mental health promotion [J]. Morb Mortal Wkly Rep, 2005, 54 (34): 841-842.
- [9] 杨河清, 韩飞雪. 北京地区员工过度劳动状况的调查研究 [J]. 人口与经济, 2009, 10 (2): 33-41.
- [10] 张雨薇. 中国西部地区劳动者过劳现象探析 [D]. 西安交通大学, 2013, 49-51.

(上接第 173 页)

现 *XRCC2* G4234C 和 *RAD52* rs11266 这两个多态位点基因型与染色体损伤易感性的关联,提示这两个位点的变异对 BD 及其代谢产物对遗传物质造成损伤的调节修复并不起主导作用。或者本次实验还没有足够的能力检测出不同基因型个体 CBMN 率的微小差异。

本研究是首次开展的关于 BD 作业工人 DSB 通路 *RAD52* rs11266、*XRCC2* G4234C 及 *XRCC4* A245G、T1394G、C1475T 基因多态性与 DRC 关系的研究,初步研究发现 *XRCC4* 基因可能在应对 BD 所致遗传物质损伤和/或 DNA 修复能力改变过程中发挥一定作用,但目前的样本量还不足以得出最后结论,有待于在更大样本量以及前瞻性研究中进一步验证。

参考文献:

- [1] 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 (1-3): 93-103.
- [2] Harrison L, Hatahet Z, Purnal A A, *et al.* Multiply damaged sites

- [11] Uehata T, Karoshi. Death by overwork [J]. Nippon Rinsho, 2005, 63 (7): 1249-1253.
- [12] Uehata T. Long working hours and occupational stress-related cardiovascular attacks among middle aged workers in Japan [J]. J Hum Ergol, 2003, 32 (4): 147-153.
- [13] 杨菊贤, 卓杨. 过劳死的发生和预防 [J]. 中国行为医学科学, 2006, 13 (7): 577-579.
- [14] Taggart P, Sutton P, Redfern C, *et al.* The effect of mental stress on the non-dipolar components of the Twave [J]. Psychosom Med, 2005, 67 (3): 376-383.
- [15] Brunckhorst C B, Holzmeister J, Scharf C, *et al.* Stress, depression and cardiac arrhythmias [J]. Ther Umsch, 2004, 61 (11): 673-681.
- [16] Nahskomi E, Gur S, Marom S, *et al.* QT dispersion in patients with social phobia [J]. Journal of Affective Disorder, 2004, 78 (1): 21-26.
- [17] 杨菊贤, 殷兆芳. 心理因素和急诊环境对急性冠脉综合征的影响 [J]. 临床急诊杂志, 2005, 6 (1): 3-5.
- [18] 杨菊贤. 现代生活方式与亚健康 [J]. 中国全科医学杂志, 2001, 4 (7): 545-547.
- [19] Nolan R P, Kamath M V, Floras J S, *et al.* Heart rate variability biofeed-back as a behavioral neurocardiac intervention to enhance vagal heart rate control [J]. Am Heart J, 2005, 14 (9): 1137-1138.
- [20] 伍兴阶. 知识分子过劳死原因及三级预防措施 [J]. 中国卫生事业管理, 2006, 20 (9): 572-573.

in DNA; interactions with Escherichia coli endonucleases III and VIII [J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26 (4): 932-941.

- [3] Khanna K K, Jackson S P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection [J]. Nat Genet, 2001, 27 (3): 247-254.
- [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] 刘楠, 李斌, 程娟, 等. 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 [J]. 中国工业医学杂志, 2014, 27 (1): 17-20.
- [6] Cherry L M, Hsu T C. Bleomycin-induced chromosome damage in lymphocytes of medullary thyroid carcinoma patients and their family members [J]. Anticancer Res, 1983, 3 (6): 367-372.
- [7] Robert L S, Ciriaco V F, Michael L G. Cancer risk assessment for 1,3-butadiene: Dose-response modeling from an epidemiological perspective [J]. Hemico-Biological Interactions, 2007, 166: 140-149.
- [8] Allen K, Cannon L A, Neuhausen S L, *et al.* A Role for *XRCC4* in age at diagnosis and breast cancer risk [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006, 15 (7): 1306-1310.