

# 聚氯乙烯粉尘职业暴露生物标志物的研究

陈斐然<sup>1</sup>, 汤乃军<sup>1</sup>, 黄德寅<sup>2</sup>, 陈曦<sup>1</sup>

(1. 天津医科大学, 天津 300071; 2. 天津渤海化工集团有限责任公司劳动卫生研究所, 天津 300051)

**摘要:** **目的** 通过对不同累积聚氯乙烯粉尘暴露浓度工人的血清蛋白量比较, 探索疾病尚未发生前粉尘暴露的生物标志物, 为预测尘肺病的风险概率及实施风险管理提供技术依据。**方法** 采用高效液相色谱分离与ESI质谱鉴定联用的方法, 对各组血清进行定性和半定量的鉴定, 通过对各组间同一蛋白表达量的比较, 以 $\pm 2.0$ 的差异倍数进行筛选, 获得差异蛋白。通过Uniprot、GO、KEGG等软件对差异蛋白进行生物信息学分析, 最终筛选理想的生物标志物。**结果** 高暴露组与对照组相比, 共计筛选出20种差异蛋白; 对20种差异蛋白GO分析显示, 差异蛋白主要参与细胞过程、生物调节、刺激反应以及新陈代谢等生物学过程; 分子功能分析中显示其主要功能多与黏附、催化活性有关。两个暴露组均显示胰蛋白酶抑制剂重链1蛋白表达下调; CD163蛋白表达均呈上调, 且具有一定的剂量-反应效应, 低暴露组为2.6倍, 高暴露组为3.1倍。**结论** 聚氯乙烯粉尘暴露工人差异蛋白中, 存在与炎症反应相关的蛋白, 甚至出现与肿瘤相关的蛋白。提示在胸片或肺功能测定中未表现出临床异常的工人, 其健康已受到影响, 差异蛋白的筛选可对聚氯乙烯粉尘暴露的界限值探讨及尘肺病的预测预警有所帮助。

**关键词:** 职业暴露; 生物标志物; 聚氯乙烯粉尘; 尘肺

中图分类号: R135.1; O632.21 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2018)01-0015-04 DOI: 10.13631/j.cnki.zggyx.2018.01.004

## Study on the biomarkers of PVC dust exposed workers

CHEN Fei-ran\*, TANG Nai-jun, HUANG De-yin, CHEN Xi

(\* . Tianjin Medical University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the biomarkers of PVC dust exposure by comparison of the serum proteins of workers with different cumulative exposure doses, and provide the technical basis for predicting pneumoconiosis and implementing risk management. **Methods** High performance liquid chromatography separation (HPLC) combined electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was used to identify serum groups in both qualitative and semi-quantitative ways. The differential proteins were screened by  $\pm 2.0$  folds change. Bioinformatics were analyzed by Uniprot, GO, KEGG to screen the ideal biomarkers. **Results** Twenty kinds of differential proteins were selected by comparison between the high-level exposure group and control group. GO analysis showed the differential proteins mainly involved in cellular process, biological regulation, stimulation reaction, metabolism and other biological processes. Molecular functional analysis showed relevance between the adhesion and catalytic activity. Two exposure groups had the down-regulation of trypsin inhibitor heavy chain 1 protein, up-regulation of CD163 proteins with a certain dose-response effect was found in two groups: 2.6 fold in low-level exposure group and 3.1 fold in high-level exposure group. **Conclusion** Inflammatory response related protein, even tumor related protein existed in the differential proteins of PVC dust exposed workers. It suggested that workers with no clinical abnormalities in X-ray diagnosis and pulmonary function testing may have certain health damage, and the differential proteins may have certain reference value in the dust exposure limits and pneumoconiosis prediction and early warning.

**Key words:** occupational exposure; biomarkers; polyvinyl chloride dust; pneumoconiosis

职业性粉尘种类多、接触情况复杂, 对机体的损伤多以长期慢性损伤为主, 以肺损伤最常见。有大量研究表明多数的粉尘暴露工人体检或细胞实验发现TNF- $\alpha$ 、白介素-1 $\beta$ 水平明显升高, 可能与机体对外来物质的内吞、氧化应激导致的细胞凋亡、炎性细胞

因子前体的感应等有关<sup>[1]</sup>。俄罗斯的一项研究发现<sup>[2]</sup>, 尘肺病或职业性粉尘支气管炎患者的金属蛋白酶水平受到影响, 进而导致纤维化的发生。以往对惰性粉尘如聚氯乙烯多认为无毒、无臭, 但其动物实验证实有致肺纤维化作用。锯木屑等在长期接触下依旧具有低毒性, 能够导致慢性阻塞性肺疾病(COPD), 甚至是肺癌, 已有研究建议降低此类粉尘的接触限值以保护工人的健康<sup>[3]</sup>。

本文对接触聚氯乙烯作业工人的血清进行定性和半定量的鉴定, 筛选差异蛋白并进行生物信息学分

收稿日期: 2017-09-29; 修回日期: 2017-11-25

基金项目: 天津市科技支撑计划重点项目(13ZCZDSY02300); 天津市科委应用基础与前沿青年项目(14JCQNJC11300)

作者简介: 陈斐然(1992—), 男, 硕士研究生。

通信作者: 黄德寅, 主任医师, 研究方向: 职业卫生与风险分析, E-mail: huang\_deyin@126.com。

析,以期筛选出理想的生物标志物,可能对职业暴露的界限值探讨及尘肺病的预测预警有所帮助。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

选择某企业聚氯乙烯包装车间女工,按照接尘工龄进行分组。以接尘时间<1年的工人为对照组,接尘时间满1~3年为低暴露组,>3年为高暴露组。排除既往工作史有肺部损伤者,共获得对照组15名,低暴露组22名,高暴露组12名。

### 1.2 方法

1.2.1 问卷调查与一般体检 对研究对象饮食习惯、既往工作史、家族史、工作情况等方面进行问卷调查和一般体检。

1.2.2 血清样品处理 分别抽取各组成员各100  $\mu$ l血清,组内混合后利用Agilent H-14依次去除各组高丰度蛋白质,进行BCA定量,分别取100  $\mu$ g样品, FASP酶解。14 000 g离心10 min,取滤液, C18-SD Extraction Disk Cartridge脱盐,真空冷冻干燥。0.1% FA复溶沉淀, OD280肽段定量。

1.2.3 毛细管高效液相色谱分离与ESI质谱鉴定 采用纳升流速HPLC液相系统Easy nLC进行分离。样品经毛细管高效液相色谱分离后用Q-Exactive质谱仪(Thermo Finnigan)进行质谱分析。

1.2.4 质谱数据分析 原始数据经过Maxquant1.3.0.5软件进行数据库检索。数据库uniprot\_human\_151619\_20160222.fasta(共151 619条蛋白序列,下载日期2016-02-22)。FDR<0.01。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

本次实验筛选的研究对象均为汉族女性工人,年龄23~50岁。其中对照组15人,年龄26~46岁,平均年龄(36.07 $\pm$ 6.39)岁;低暴露组22人,年龄24~50岁,平均年龄(43.00 $\pm$ 5.82)岁;高暴露组12人,年龄32~48岁,平均年龄(41.25 $\pm$ 4.63)岁。

### 2.2 血清蛋白质鉴定

本次研究共计鉴定3 740种肽段,非重复性蛋白410种,其中定量的蛋白共计383种;对照组共计334种,低暴露组定量345种,高暴露组定量333种;对照组与低暴露组共同鉴定到377种蛋白,其中定量301种;高暴露组与对照组共同鉴定到382种蛋白,其中定量307种。本次实验的筛选标准为ratio $\geq$ 2.0,且 $P$ <0.05筛选差异蛋白。筛选结果显示,高暴露组与对照组相比,共计筛选出20种差异蛋白,其中下调10种、上调10种。低暴露组与对照组相比,共计筛选出

16种差异蛋白,下调4种、上调12种。两个暴露组共同下调的蛋白有2种,共同上调的5种。

### 2.3 血清蛋白表达谱

利用GO软件从细胞组分、生物学过程和分子功能三方面对本次实验鉴定并定量的蛋白进行分析,以了解不同组间血清蛋白的差异。低暴露组与对照组共同鉴定到的16种差异蛋白的细胞组分、生物学过程和分子功能情况组成如图1(封三)所示。差异蛋白中参与生物调节、细胞生理过程、刺激反应以及新陈代谢等生物学过程的蛋白较多。分子功能方面的分析显示,黏附功能和分子功能调节方面的蛋白较多。在细胞组分的分类中,这些差异蛋白多分布于细胞外、细胞器内。高暴露组与对照组共同鉴定到的20种差异蛋白GO分析显示,差异蛋白主要参与细胞过程、生物调节、刺激反应以及新陈代谢等生物学过程;分子功能分析显示其主要功能多与黏附、催化活性有关,在细胞组分的分类中,差异蛋白同样多分布于细胞外、细胞器内。见图2(封三)。

## 3 讨论

本次研究各暴露组工人在高千伏DR胸片中肺部均未显示出纤维化,但本次血清蛋白质组学研究结果显示在差异蛋白中,存在与炎症反应相关的蛋白,甚至出现与肿瘤相关的蛋白。提示在胸片或肺功能测定中未表现出临床异常的工人,其健康也受到影响。在低、高暴露组中均显示出差异表达的蛋白有胰蛋白酶抑制剂重链1(ITIH1)、细胞粘素X(Tenascin-X)、CD163、IGLV3-25以及A1BG。其中,前2种为下调蛋白,后3种为上调蛋白。

胰蛋白酶抑制剂(Inter-alpha-trypsin inhibitor)能够与透明质酸结合形成SHAP-HA复合物,与炎症反应有关<sup>[4]</sup>。胰蛋白酶抑制剂由ITIH1、ITIH2、ITIH3、ITIH4重链中的3种和AMBIP、SPINT2中1种轻链组成。Lee等<sup>[5]</sup>发现ITIH4的下调可能与炎症的发生有关,能够作为PM10在COPD中的生物标志物。针对吸烟人群COPD相关的蛋白质组学研究发现,ITIH3下调可能与COPD有关<sup>[6]</sup>。本研究发现暴露组中均显示胰蛋白酶抑制剂重链1蛋白表达下调,可能也与早期的COPD发生有关。

细胞粘素X是细胞外基质糖蛋白,在发育中的脊椎动物体内含量高,同时,也存在于修复中的创伤处以及一些肿瘤的基质中。在促进肌细胞生长及抑制分化方面有重要作用<sup>[7]</sup>。通过对TGF- $\beta$ 信号通路的作用,影响纤维原细胞和上皮细胞分化成肌成纤维细胞,同时细胞粘素X还可以调节胶原蛋白的机

械性能<sup>[8]</sup>。细胞粘素 X 表达量下调可能破坏机体肺部纤维原细胞等的平衡, 预示纤维化的发生。

CD163 是单核细胞系表面的受体<sup>[9]</sup>, 为清道夫受体家族中的一员, 在急性期对血红蛋白或触珠蛋白进行清除或内吞<sup>[10]</sup>, 以避免氧化损伤。脱落后, 可溶解的部分 (sCD163) 可能起到抗炎作用, 是监测炎症性环境中细胞活化的重要参数。本研究显示暴露组中 CD163 蛋白表达均呈上调, 且具有一定的剂量-反应效应 (低暴露组为 2.6 倍, 高暴露组为 3.1 倍), 可能与粉尘进入机体后引起巨噬细胞吞噬清除有关。

A1BG 与 IGLV3-25 是两种免疫相关的蛋白, A1BG 是一种分泌型蛋白, 在乳腺癌等蛋白组学的研究中也显示出升高的趋势<sup>[11]</sup>。本研究结果显示两种免疫相关的蛋白均呈现上调, 低暴露组和高暴露组 IGLV3-25 上调 2.7 倍和 4.2 倍, A1BG 上调 3.8 倍和 5.8 倍。提示生产性粉尘进入机体后被巨噬细胞吞噬, 引发炎症激活免疫系统。

本研究通过对不同累积聚氯乙炔粉尘暴露浓度工人的血清蛋白量比较, 采用非标记定量蛋白质组学技术, 克服了 iTRAQ 等标记蛋白质组学中标记率的问题, 提高了蛋白鉴定的效率, 同时能够鉴定到某一组特有的蛋白, 可能对聚氯乙炔粉尘及矽尘等生产性粉尘职业暴露的界限值探讨有所帮助, 为预测尘肺病的风险概率及实施风险管理提供技术依据。

#### 参考文献:

[1] Ogunbileje JO, Nawgiri RS, Anetor JI, *et al.* Particles internalization, oxidative stress, apoptosis and pro-inflammatory cytokines in alveolar macrophages exposed to cement dust [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 37 (3): 1060-1070.

(上接第 5 页)

#### 参考文献:

[1] 余晓俊, 吴铭权. 噪声对心脏影响的研究进展 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2005, 23 (2): 146-148.

[2] 郭继鸿. 窦性心率震荡现象 [J]. *临床心电图杂志*, 2003, 12 (1): 49-51.

[3] 刘茜, 时晓迟. 心率震荡的相关研究及进展 [J]. *中华老年心血管病杂志*, 2016, 18 (9): 999-1002.

[4] Barthel P, Schneider R, Bauer A, *et al.* Risk stratification after acute myocardial infarction by heart rate turbulence [J]. *Circulation*, 2003 (108): 1221-1226.

[5] Schmidt G, Malik M, Barthel P, *et al.* Heart rate turbulence after ventricular premature beats as a predictor of mortality after acute myocardial infarction [J]. *Lancet*, 1999 (353): 1390-1396.

[6] 朱玉华, 田月秋, 娄菊妹, 等. 噪声作业对工人心血管影响的调查 [J]. *中国职业医学*, 2010, 37 (1): 84-85.

[2] Fomina VS, Kuz'mina LP. Evaluation of matrix metalloproteinases (pro-MMP-1, MMP-2, 8) and their inhibitor (TIMP-1) contents in patients with occupational lung diseases [J]. *Med Tr Prom Ekol*, 2010 (7): 29-33.

[3] Cherrie JW, Brosseau LM, Hay A, *et al.* Low-toxicity dusts; current exposure guidelines are not sufficiently protective [J]. *Ann Occup Hyg*, 2013, 57 (6): 685-691.

[4] Zhuo L, Hascall VC, Kimata K. Inter-alpha-trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (37): 38079-38082.

[5] Lee KY, Feng PH, Ho SC, *et al.* Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4: a novel biomarker for environmental exposure to particulate air pollution in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2015, 30 (10): 831-841.

[6] Bortner JD Jr, Richie JP Jr, Das A, *et al.* Pteomic profiling of human plasma by iTRAQ reveals down-regulation of ITI-HC3 and VDBP by cigarette smoking [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10 (3): 1151-1159.

[7] Hagios C, Brown-Luedi M, Chiquet-Ehrismann R, *et al.* A component of distinctive connective tissues, supports muscle cell growth [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 253 (2): 607-617.

[8] Kasprzycka M, Hammarström C, Haraldsen G. Tenascins in fibrotic disorders-from bench to bedside [J]. *Cell Adh Migr*, 2015, 9 (1-2): 83-89.

[9] Van Gorp H, Delputte PL, Nauwynck HJ. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy [J]. *Mol Immunol*, 2010, 47 (7-8): 1650-1660.

[10] Yang L, Wang F, Wang L, *et al.* CD163+ tumor-associated macrophage is a prognostic biomarker and is associated with therapeutic effect on malignant pleural effusion of lung cancer patients [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (12): 10592-10603.

[11] Dutta M, Subramani E, Taunk K, *et al.* Investigation of serum proteome alterations in human endometriosis [J]. *J Proteomics*, 2015 (114): 182-196.

[7] 傅旭瑛, 杨恩明, 段哲辉, 等. 职业性噪声接触对心血管系统影响彩色多普勒超声检查指标探讨 [J]. *中国职业医学*, 2011, 38 (5): 84-85.

[8] Stockholm ZA, Bonde JP, Christensen KL, *et al.* Occupational noise expose and the risk of hypertension [J]. *Epidemiology*, 2013, 24 (1): 135-142.

[9] 谭强, 陈馥, 郭垚, 等. 职业性噪声接触对工人心率影响的 Meta 分析 [J]. *中国预防医学杂志*, 2016, 17 (9): 659-662.

[10] Dinges DF. Stress, fatigue and behavioral energy [J]. *Nutrition Reviews*, 2001, 59 (1): 30-32.

[11] 闫若玉, 郑小红, 王伟慧, 等. 噪声对作业工人心率变异性的影响 [J]. *职业卫生与应急救援*, 2017, 35 (3): 25-28.

[12] 余慧珠, 马爱英, 黄世超. 噪声对作业工人血循环功能及心率变异性的影响 [J]. *环境与职业医学*, 2003, 20 (3): 226-229.