

## · 监测与检验 ·

桥粒斑蛋白 rs2076304 基因多态性  
与煤工尘肺发病风险的相关分析Analysis on correlation between polymorphism of DSP rs2076304  
gene and risk of coal worker's pneumoconiosis赛依旦·亚力买买提<sup>1</sup>, 布沙热木·斯迪克<sup>2</sup>, 窦红<sup>3</sup>, 刘魏<sup>3</sup>, 马新<sup>4</sup>, 柳佳彤<sup>1</sup>, 赵海莉<sup>1</sup>, 宁丽<sup>1</sup>(1. 新疆医科大学公共卫生学院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 喀什地区第二人民医院; 3. 新疆维吾尔自治区职业病医院;  
4. 乌鲁木齐市友谊医院)

**摘要:** 采用病例对照方法, 采集血液标本并提取 DNA, 分析 rs2076304 基因多态性对煤工尘肺 (CWP) 发病的影响。结果显示, rs2076304 基因型与等位基因频率分布差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 在 5 种遗传模型下未发现 rs2076304 与 CWP 发病的相关关系 (均  $P>0.05$ ); CWP 组桥粒斑蛋白 (DSP) rs2076304 位点 GG 基因型相较于 GA+AA 基因型更易表现为红细胞、肌酐升高及总蛋白水平降低 ( $P<0.05$ )。提示 rs2076304 位点单核苷酸多态性与 CWP 发病似无相关性。

**关键词:** 桥粒斑蛋白 (DSP); 基因多态性; 煤工尘肺; rs2076304

**中图分类号:** R135.2 **文献标识码:** B

**文章编号:** 1002-221X(2022)06-0550-04

**DOI:** 10.13631/j.cnki.zggyyx.2022.06.023

尘肺是以肺组织弥漫性纤维化为主的全身性疾病。煤工尘肺 (CWP) 是由于吸入含  $\text{SiO}_2$  煤矿粉尘所致的纤维化结节病变, 最终发展为进行性肺纤维化<sup>[1]</sup>。近年来, 单核苷酸多态性 (SNP) 与尘肺的相关性研究成为热点问题。桥粒斑蛋白 (desmoplakin, DSP) 是最大的桥粒蛋白, 其 N 末端与其他桥粒蛋白如 plakophilin-2 (PKP2) 和 plakoglobin (PG) 相连, C 末端则与中间丝相连, 在维持心肌细胞之间的结构和功能完整性方面发挥重要作用<sup>[2]</sup>。国外研究发现<sup>[3]</sup>, DSP 基因中 SNP 与肺纤维化风险存在显著关联。本研究采用病例对照方法探讨 DSP 基因 rs2076304 位点单核苷酸多态性与 CWP 的发病关系, 以便早期发现易感人群, 为 CWP 发病机制研究提供新的思路。

**基金项目:** 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2020D01C152); 大学生创新课题 (CX2021075)

**作者简介:** 赛依旦·亚力买买提 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 流行病学与卫生统计。

**通信作者:** 宁丽, 副教授, E-mail: nl96979@163.com

## 1 对象与方法

**1.1 对象** 采用病例对照法, 选择 2019 年 10 月至 2020 年 12 月 100 例在新疆维吾尔自治区职业病医院依据《职业性尘肺病的诊断》(GBZ 70—2015) 确诊为职业性 CWP 的住院患者作为研究对象。纳入标准: 尘肺患者病情稳定, 且处于非感染期。排除标准: 患有肺部恶性肿瘤、先天性心脏疾病、冠心病、风湿性心脏瓣膜病、自身免疫性疾病、骨折与骨质疏松、严重内分泌疾病和/或代谢疾病以及严重肝、肾疾病者。选择在同一时期进行常规体检的 100 名健康者作为对照组, 对照组排除传染性疾病, 心、脑、肝、肾、肺等器质性及纤维化性疾病。

## 1.2 方法

**1.2.1 一般情况** 采用自行设计的调查表, 内容: (1) 人口学指标, 包括姓名、民族、年龄、身高、体质量等; (2) 职业特征, 包括工种类型、日工作时间、接尘时间、尘肺分期; (3) 临床指标, 包括血常规和生化指标。

**1.2.2 DNA 提取与引物合成** 统一采集患者空腹外周静脉血 3~5 ml, 置于乙二胺四乙酸 (EDTA) 处理过的抗凝血管, 低温运输标本, 置 -80 ℃ 冰箱保存。采用血液基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司), 按照说明书要求进行全血基因组 DNA 提取, 进行浓度和纯度检测, 纯度 OD260/280 为 1.7~1.9。采用 MassARRAY Assay Design 3.1 软件对 rs2076304 进行引物设计, 设计完成后由北京擎科新业生物科技有限公司进行引物合成。引物序列见表 1。

**1.2.3 SNP 位点选择与分型** 在 NCBI HapMap 公布的汉族居民 (CHB) 和维吾尔族居民 (CEU) 数据 (<http://www.hapmap.org>) 及 1000Genomes 两个数据

表 1 DSP 基因 rs2076304 位点引物序列

| 基因位点      | 正向引物序列                         | 反向引物序列                          | 延伸引物序列            |
|-----------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| rs2076304 | GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTCAAAAAC | GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTCAAAAACC | TAACCAGGCAAAATACT |
|           | CTCCCTCTAGCAGACCAGGGA          | TCCCTCTAGCAGACCAGGGG            | AGCAGATACCTA      |

库中进行 DSP SNP 位点筛选, 核实候选基因在相关文献中的研究状态, 将筛选得到的 SNPs 在 HapMap 及 1000Genomes 数据库中进行最小等位基因频率 (MAF) 在 CHB 和 CEU 的信息核实。根据最终计划检测位点数量, 候选基因及 SNP 位点综合其他因素进行优化, 确定检测位点的信息, 最终选择 DSP rs2076304 位点。采用过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (MALDI-TOF MS 技术) 对 rs2076304 位点基因型进行测定。具体步骤: (1) 多重 PCR 反应扩增; (2) 虾碱酶消化反应; (3) 单碱基延伸反应; (4) 树脂纯化; (5) 点样及质谱检测, 对 DSP 基因的 SNP 位点的分型结果进行分析。

1.3 统计分析 采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组比较采用 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析, 计数资料组间比较采用  $\chi^2$  检验。采用 Hardy-Weinberg 平衡检测所选 rs2076304 位点分型数据是否具有人群代表性。使用遗传模式分析软件 SNPStats<sup>[4]</sup> 分析该位点与煤工尘肺的相关关系, 每个位点分析的遗传模式包括共显性遗传模式 (codominant model)、显性遗传模式 (dominant model)、隐性遗传模式 (recessive model)、超显性遗传模式 (overdominant model) 及加性模式 (Log-additive model)。检验水准为  $\alpha=0.05$  (双侧)。

2 结 果

2.1 一般资料 CWP 组中壹期 78 例、贰期 15 例、叁期 7 例; 平均年龄 (62.5±10.4) 岁, ≥60 岁 63 例; 体质量指数 (BMI) (24.14±3.63) kg/m<sup>2</sup>。对

照组平均年龄 (59.7±10.0) 岁, ≥60 岁 66 例, BMI (23.68±3.22) kg/m<sup>2</sup>。两组人员在年龄及 BMI 指数等方面差异均无统计学意义 (*P*>0.05), 具有可比性。

2.2 DSP 基因 rs2076304 位点的 Hardy-Weinberg 平衡性检验 rs2076304 位点满足 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验 (*P*>0.05), 表明所选择群体具有代表性。见表 2。

表 2 DSP 基因 rs2076304 位点的 Hardy-Weinberg 平衡性检验 [例]

| 组别    | 基因型 |    |    | <i>P</i> 值 |
|-------|-----|----|----|------------|
|       | GG  | GA | AA |            |
| CWP 组 | 66  | 32 | 2  | 0.730      |
| 对照组   | 62  | 32 | 6  | 0.560      |

2.3 DSP 基因 rs2076304 位点基因型及等位基因分布 两组之间 rs2076304 位点基因型及等位基因的分布差异无统计学意义 ( $\chi^2=2.125$ , *P*=0.346;  $\chi^2=1.000$ , *P*=0.317)。见表 3。

表 3 DSP 基因 rs2076304 位点基因型及等位基因分布 [例(%)]

| 组别    | 基因型        |            |          | 等位基因       |             |
|-------|------------|------------|----------|------------|-------------|
|       | GG         | GA         | AA       | A          | G           |
| CWP 组 | 66 (66.00) | 32 (32.00) | 2 (2.00) | 36 (18.00) | 164 (82.00) |
| 对照组   | 62 (62.00) | 32 (32.00) | 6 (6.00) | 44 (22.00) | 156 (78.00) |

2.4 不同期别 CWP 患者中 DSP 基因 rs2076304 位点基因型及等位基因分布 CWP 不同期别患者间 rs2076304 位点基因型及等位基因分布差异无统计学意义 (*P*>0.05)。见表 4。

表 4 不同期别 CWP DSP 基因 rs2076304 位点基因型及等位基因分布 [例(%)]

| 组别       | 基因型        |            |                     | 等位基因       |             |                     |
|----------|------------|------------|---------------------|------------|-------------|---------------------|
|          | GG         | GA+AA      | OR (95%CI)          | A          | G           | OR (95%CI)          |
| 对照组      | 62 (62.00) | 38 (38.00) | 1.000               | 44 (22.00) | 156 (78.00) | 1.000               |
| CWP 组 壹期 | 51 (65.40) | 27 (34.60) | 1.158 (0.625~2.146) | 38 (19.00) | 162 (81.00) | 0.832 (0.511~1.353) |
| 贰期+叁期    | 15 (68.20) | 7 (31.80)  | 1.313 (0.491~3.513) | 32 (16.00) | 168 (84.00) | 0.675 (0.408~1.119) |

2.5 不同遗传模型下 DSP 基因 rs2076304 位点与 CWP 的相关性 在 5 种遗传模型下未发现 rs2076304 位点与 CWP 的相关关系 (均 *P*>0.05)。见表 5。

2.6 不同临床检测指标 CWP 患者中 rs2076304 位点

基因型及等位基因分布 CWP 组 rs2076304 位点 GG 基因型的 RBC 及肌酐水平高于 GA+AA 基因型, 总蛋白水平低于 GA+AA 基因型, 均 *P*<0.05; 其他指标差异无统计学意义 (*P*>0.05)。见表 6。

表 5 不同遗传模型下 *DSP* 基因 rs2076304 位点与 CWP 的相关性

| 遗传模型 | 基因型   | CWP 组 [例(%)] | 对照组 [例(%)] | <i>OR</i> (95% <i>CI</i> ) | <i>P</i> 值 | <i>AIC</i> |
|------|-------|--------------|------------|----------------------------|------------|------------|
| 共显性  | GG    | 66 (66.00)   | 62 (62.00) | 1.000                      | 0.330      | 281.0      |
|      | GA    | 32 (32.00)   | 32 (32.00) | 1.060 (0.58~1.94)          |            |            |
|      | AA    | 2 (2.00)     | 6 (6.00)   | 3.190 (0.62~16.42)         |            |            |
| 显性   | GG    | 66 (66.00)   | 62 (62.00) | 1.000                      | 0.560      | 280.9      |
|      | GA+AA | 34 (34.00)   | 38 (38.00) | 1.190 (0.67~2.12)          |            |            |
| 隐性   | GG+GA | 98 (98.00)   | 94 (94.00) | 1.000                      | 0.140      | 279.1      |
|      | AA    | 2 (2.00)     | 6 (6.00)   | 3.130 (0.62~15.89)         |            |            |
| 超显性  | GG+AA | 68 (68.00)   | 68 (68.00) | 1.000                      | 1.000      | 281.3      |
|      | GA    | 32 (32.00)   | 32 (32.00) | 1.000 (0.55~1.81)          |            |            |
| 加性   | —     | —            | —          | 1.290 (0.78~2.11)          | 0.320      | 280.3      |

表 6 *DSP* 基因 rs2076304 位点基因型临床检测指标的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 检测指标                        | 基因型          |              | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|-----------------------------|--------------|--------------|------------|------------|
|                             | GG           | GA+AA        |            |            |
| WBC( $\times 10^9/L$ )      | 6.45±2.03    | 6.82±2.35    | -0.820     | 0.414      |
| RBC( $\times 10^{12}/L$ )   | 4.91±0.64    | 4.63±0.63    | 2.098      | 0.039      |
| Hb(g/L)                     | 150.11±15.61 | 145.62±20.90 | 1.210      | 0.229      |
| PLT( $\times 10^9/L$ )      | 207.68±55.36 | 207.15±58.57 | 0.045      | 0.964      |
| 尿素 (mmol/L)                 | 5.90±1.48    | 6.04±1.24    | -0.478     | 0.634      |
| 尿酸 ( $\mu\text{mol/L}$ )    | 363.80±61.29 | 373.44±76.79 | -0.682     | 0.497      |
| 肌酐 ( $\mu\text{mol/L}$ )    | 79.48±20.61  | 70.86±19.28  | 2.024      | 0.046      |
| 葡萄糖 (mmol/L)                | 6.89±3.62    | 5.88±2.04    | 1.514      | 0.133      |
| ALT(U/L)                    | 25.77±12.30  | 26.82±13.29  | -0.394     | 0.695      |
| AST(U/L)                    | 24.45±9.57   | 26.47±10.02  | -0.982     | 0.329      |
| ALT/AST                     | 1.19±0.75    | 1.16±0.72    | 0.197      | 0.845      |
| 总胆红素 ( $\mu\text{mol/L}$ )  | 15.81±7.81   | 15.01±7.52   | 0.495      | 0.622      |
| 直接胆红素 ( $\mu\text{mol/L}$ ) | 3.70±2.15    | 3.50±2.14    | 0.457      | 0.649      |
| 碱性磷酸酶(U/L)                  | 85.64±75.25  | 75.55±19.05  | 0.767      | 0.445      |
| 总蛋白 (g/L)                   | 70.05±11.55  | 74.95±9.56   | -2.128     | 0.036      |
| 白蛋白 (g/L)                   | 43.91±8.23   | 43.49±7.52   | 0.245      | 0.807      |
| 甘油三酯 (mmol/L)               | 2.24±0.97    | 2.21±1.12    | 0.175      | 0.861      |
| 总胆固醇 (mmol/L)               | 5.52±1.47    | 5.32±1.87    | 0.579      | 0.564      |
| 高密度脂蛋白 (mmol/L)             | 1.23±0.46    | 1.13±0.38    | 1.129      | 0.261      |
| 低密度脂蛋白 (mmol/L)             | 2.89±0.77    | 2.87±0.78    | 0.125      | 0.901      |

3 讨 论

CWP 是一种慢性炎症性肺病，虽然其病理生理机制尚未完全确定，但遗传与环境因素共同作用可以影响机体对粉尘的易感性而改变患病风险<sup>[5]</sup>。寻找 CWP 筛检生物标志物，做到早发现、早诊断和早治疗，对降低 CWP 发病率有重要意义。

DSP 为桥粒的一部分，桥粒是一种机械连接细胞、稳定组织的结构，在细胞迁移、增殖和分化中必不可少<sup>[6]</sup>。*DSP* 基因编码产物为桥粒斑蛋白，编码基因位于 6p24，包含 24 个外显子。*DSP* 作为一种缝

隙连接蛋白，维持细胞组织结构，可以表达于肺组织上皮细胞<sup>[7]</sup>。*DSP* 对细胞—细胞粘附<sup>[8]</sup>、伤口修复和上皮屏障功能<sup>[9]</sup>至关重要。*DSP* 通过 wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的改变在肺纤维化中发挥作用<sup>[10]</sup>。*DSP* 基因多态性研究以 rs2076295 位点多见，国外研究发现<sup>[3]</sup>，rs2076295 位点与肺纤维化具有关联性 ( $OR=1.43$ ,  $P=1.14\times 10^{-16}$ )，且 T 等位基因与肺组织 *DSP* 高表达相关。但 Wang<sup>[11]</sup> 的研究未发现 rs2076295 位点与矽肺的相关关系。

Hao 等<sup>[12]</sup>研究表明，rs2076295 调控人气道上皮细胞 *DSP* 表达。*DSP* 的缺失增强了细胞外基质相关基因的表达，促进了细胞迁移，可能参与 IPF 发病过程。在 IPF 患者的肺组织中可见 *DSP* 表达显著高于对照组，rs2076304 位点位于 *DSP* 基因的第 15 外显子，通常，*DSP* 在 IPF 和肺癌患者中表达水平较高<sup>[13]</sup>。Wang 等<sup>[11]</sup> 研究结果表明，变异等位基因 rs2076304 与矽肺发病风险显著相关，且 rs2076304 基因型与 *DSP* 表达显著相关，rs2076304 的变异 A 等位基因可能增加转录因子 RHOXF1 与 *DSP* 的结合，而 *DSP* 表达的增加可能与矽肺发生有关。

本次研究结果显示，*DSP* 基因 rs2076304 位点 GG 基因型 RBC、肌酐高于 GA+AA 基因型，总蛋白低于 GA+AA 基因型，提示 CWP 该位点 GG 基因型更易表现为较高的 RBC、肌酐水平和较低的总蛋白水平。rs2076304 位点野生型 GG、纯合突变型 AA、杂合突变型 GA 基因型和等位基因在 CWP 组和对照组的分布频率差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )，即在不同遗传模型下未发现 *DSP* rs2076304 位点与 CWP 发病的相关关系 ( $P>0.05$ )。本文结论与前述文献不一致，可能与不同人群、不同地域、不同种族之间的遗传异质性、遗传背景存在差异有关，也可能与本研究样本量较少有关，后续需进一步增大样本量，在多人群和大样本的研究中加以验证。

## 参考文献

- [1] Ji XM, Hou ZG, Wang T, *et al.* Polymorphisms in inflammasome genes and risk of coal workers' pneumoconiosis in a Chinese population [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (10): e47949.
- [2] 武彤彤, 吕丹. 右室心病动物模型研究进展 [J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2019, 19 (1): 2785-2788.
- [3] Fingerlin TE, Murphy E, Zhang WM, *et al.* Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis [J]. *Nat Genet*, 2013, 45 (6): 613-620.
- [4] Solé X, Guinó E, Valls J, *et al.* SNPStats: A web tool for the analysis of association studies [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22 (15): 1928-1929.
- [5] Gaffney A, Christiani DC. Gene-environment interaction from international cohorts: Impact on development and evolution of occupational and environmental lung and airway disease [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2015, 36 (3): 347-357.
- [6] Asimaki A, Saffitz JE. Remodeling of cell-cell junctions in arrhythmogenic cardiomyopathy [J]. *Cell Commun Adhes*, 2014, 21 (1): 13-23.
- [7] 吴维, 郑璐瑶, 潘超兰, 等. Carvajal 综合征一例伴桥粒斑蛋白基因新突变 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2020, 53 (4): 271-274.
- [8] McAleer MA, Pohler E, Smith FJ, *et al.* Severe dermatitis, multiple allergies, and metabolic wasting syndrome caused by a novel mutation in the N-terminal plakin domain of desmoplakin [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 136 (5): 1268-1276.
- [9] Huber O, Petersen I. 150th anniversary series: Desmosomes and the hallmarks of cancer [J]. *Cell Commun Adhes*, 2015, 22 (1): 15-28.
- [10] Henderson WR Jr, Chi EY, Ye X, *et al.* Inhibition of Wnt/beta-catenin/CREB binding protein (CBP) signaling reverses pulmonary fibrosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107 (32): 14309-14314.
- [11] Wang W, Yu YH, Xiao J, *et al.* A novel variant of desmoplakin is potentially associated with silicosis risk [J]. *DNA and Cell Biology*, 2018, 37 (11): 925-931.
- [12] Hao Y, Bates S, Mou H, *et al.* Genome-wide association study: Functional variant rs2076295 regulates desmoplakin expression in airway epithelial cells [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 202 (9): 1225-1236.
- [13] Zaizen Y, Tachibana Y, Kashima Y, *et al.* Alveolar epithelial denudation is a major factor in the pathogenesis of pleuroparenchymal fibroelastosis [J]. *J Clin Med*, 2021, 10 (5): 895.

(收稿日期: 2022-05-24; 修回日期: 2022-07-28)

## 自动顶空气相色谱-质谱联用法测定血中甲酸

## Determination of formic acid in blood by automatic headspace gas chromatography-mass spectrometry

郭冠浩, 阮燕梅, 杨雪姬, 徐绍雄, 曾文锋, 吴诗华

(广州市第十二人民医院, 广东 广州 510620)

**摘要:** 于血浆中加入硫酸异丙醇溶液, 在自动顶空进样器中加热, 甲酸与异丙醇发生酯化反应生成甲酸异丙酯经气相色谱分离, 以质谱检测, 外标法定量。结果显示, 血中甲酸浓度在 0.00~97.60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时线性关系良好, 相关系数  $r=0.9999$ , 方法检出限为 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 定量下限 0.75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 加标回收率为 97.1%~99.3%, 批内精密度 0.8%~6.9%, 批间精密度 1.3%~5.6%。该方法前处理简单, 自动化程度高, 特异性好, 灵敏度、准确度、精密度高, 可用于血中甲酸的测定。

**关键词:** 血; 甲酸; 甲酸异丙酯; 自动顶空; 气相色谱-质谱联用法

中图分类号: O622.3; R595.6 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2022)06-0553-04

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2022.06.024

**基金项目:** 广州市卫生健康科技一般引导项目 (20221A010035)

**作者简介:** 郭冠浩 (1982—), 男, 检验技师, 研究方向: 职业病危害因素检测与评价。

**通信作者:** 吴诗华, 副主任医师, E-mail: wush0706@126.com

近年来由于工业乙醇使用不当或在生产中使用甲醇溶剂而导致的甲醇中毒事件时有发生。甲酸是甲醇在人体的代谢产物, 血液中甲酸浓度升高是甲醇中毒导致代谢性酸中毒和眼部损害的根本原因<sup>[1,2]</sup>, 通过检测血中甲酸水平可以指导甲醇中毒的临床尤其是血液透析的治疗<sup>[3,4]</sup>。目前国内暂无血中甲酸的测定方法, 本研究对 Bursová 等<sup>[5]</sup>采用的顶空气相色谱法的前处理和检测条件等进行了优化, 现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器和试剂** 安捷伦 7890A-5977C 气相色谱-质谱联用仪 (美国 Agilent 公司), RESTEK Rxi-624Sil 中等极性色谱柱 (60 m  $\times$  320  $\mu\text{m}$   $\times$  1.8  $\mu\text{m}$ , 美国 RESTEK 公司), Headspace Turbomatrix40 顶空进样器 (美国 PerkinElmer 公司), Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。甲酸 (纯度 98.90%, DR. Ehrenstorfer 公司); 异丙醇 (UPLC/LC-MS, CNW Technologies