

锰接触工人神经行为改变与 *Parkin* 基因 7 号外显子多态性的关系

周希雷¹, 贾飞飞², 缪雪阳³, 姜慧⁴, 金泰虞⁵, 邹焰¹

摘要: [目的] 探讨锰接触工人神经行为改变与 *Parkin* 基因 7 号外显子 Gly284Arg 多态性的相关性。[方法] 选工龄在半年以上的职业性锰暴露工人 200 名和劳动强度相似, 但工作环境不接触锰工人 94 名, 按锰累积暴露指数将其分为高、低锰暴露组和对照组。利用沟槽稳定试验和拼板试验进行神经行为改变检测; 利用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 方法对 *Parkin* 基因 7 号外显子多态性位点进行基因分型。[结果] 高暴露组中, *Parkin* 基因 7 号外显子 CC 型工人的划痕长度、拼板试验得分均低于 GG 型和 GC 型, 而碰撞次数高于 GG 型和 GC 型, 其差别有统计学意义 ($P < 0.05$); 低暴露组中, *Parkin* 基因 7 号外显子 CC 型工人的划痕长度、拼板试验得分均低于 GG 型和 GC 型, 其差别有统计学意义 ($P < 0.05$), 3 个基因型工人碰撞次数间差别无统计学意义 ($P > 0.05$); 对照组中, *Parkin* 基因 7 号外显子 3 个基因型划痕长度、碰撞次数、拼板试验得分之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。[结论] 环境因素和遗传因素共同作用更易导致锰引起神经行为改变; 携带 *Parkin* 基因 7 号外显子 CC 基因型的工人是锰损伤的易感者; *Parkin* 基因 7 号外显子 G951C 突变导致 Gly284Arg 多态性有可能作为检测锰致神经行为改变以及锰中毒风险评估的指标。

关键词: 锰暴露; *Parkin* 基因; 神经行为改变; 基因多态性

Relationship between Neurobehavioral Changes and Exon 7 Polymorphism in *Parkin* Gene in Mn Exposed Workers ZHOU Xi-lei¹, JIA Fei-fei², MIAO Xue-yang³, JIANG Hui⁴, JIN Tai-yi⁵, ZOU Yan¹ (1.School of Public Health, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China; 2.Hospital of China University of Petroleum, Dongying, Shandong 257061, China; 3.Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China; 4.Department of Infectious Disease Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 5.School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China). Address correspondence to ZOU Yan, E-mail: zouyan54321@126.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To study the relationship between neurobehavioral changes and *Parkin* gene polymorphism in workers exposed to Mn. [Methods] A group of 200 Mn exposed workers having working age ≥ 0.5 year were assigned as high exposure or low exposure group according to their Mn cumulative exposure index (CEI), and another 94 workers without Mn exposure were treated as controls. Every worker was evaluated by groove type steadiness test and pegboard test for neurobehavioral changes. The genetic DNA was extracted from every worker, and the genotypes of exon 7 polymorphism were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). [Results] In the high exposure group, the subjects with CC genotype of exon 7 were significantly lower in the length of drawing and the scores of pegboard test than those with GG and GC genotypes ($P < 0.05$); however, their collision frequencies were significantly higher ($P < 0.05$). In the low exposure group, the subjects with CC genotype of exon 7 were also significantly lower in the length of drawing and the scores of pegboard test than those with GG and GC genotypes ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the collision frequency ($P > 0.05$). In the control group, no significant difference in the neurobehavioral performances were found among subjects with different genotypes of exon 7 ($P > 0.05$). [Conclusion] The combined effect of environmental and genetic factors may contribute to the neurobehavioral changes induced by Mn. Workers with CC genotype of exon 7 are susceptible to health impacts induced by Mn. The Gly284Arg polymorphism of exon 7 of *Parkin* gene shows the potential to be an indicator for manganese induced neurobehavioral changes and for risk assessment of manganese poisoning.

Key Words: Mn exposure; *Parkin* gene; neurobehavioral changes; gene polymorphism

[基金项目] 贵州省科技厅资助(编号: 黔科合 SY 字[2009]3067)

[作者简介] 周希雷(1962—), 男, 中专, 实验师; 研究方向: 专业卫生检验、金属毒理; E-mail: 474726436@qq.com

[通信作者] 邹焰教授, E-mail: zouyan54321@126.com

[作者单位] 1. 遵义医学院公共卫生学院, 贵州 遵义 563003; 2. 中国石油大学(华东)校医院, 山东 东营 257061; 3. 遵义医学院附属医院, 贵州 遵义 563003; 4. 中国疾病预防控制中心传染病防治处, 北京 102206; 5. 复旦大学公共卫生学院, 上海 200032

“锰是人体必需的元素之一,但过量锰进入机体会造成人体多器官的损害,神经系统的损害尤其严重而不可逆,其神经系统的受损会出现椎体外系损害的各种症状和体征,以及精神异常症状,严重的可表现为类帕金森病。锰损害的发病机制目前仍未完全清楚,曾有研究发现在同样的作业环境和接触水平的工人中仅有部分人发生中毒,提示个体对锰的敏感性或耐受性存在差异^[1],这同时提示发生锰损害的主要原因不仅仅是锰进入机体的量一个因素,可能接触者自身的遗传易感基因也是一个重要因素。帕金森病(Parkinson's disease, PD)的有关研究已发现该病与 *Parkin* 基因有关^[2],另有研究又发现锰损害与与帕金森病的发生有关^[3-5],故本研究欲采用美国普度大学提供的沟槽稳定试验(groove type steadiness test)^[6]和拼板试验(the purdue pegboard test)对锰接触工人神经行为进行检测,继续深入探讨锰损害与 *Parkin* 基因多态性的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

以贵州省龙腾锰铁合金厂工龄在半年以上的冶炼工人 200 名和环境中不接触锰但其劳动强度与龙腾锰铁合金厂工人相近的贵州省遵义市南白铁厂的工人 94 名为研究对象。根据各工种作业场所空气锰浓度测定结果,依照工人接触锰作业的工龄和工作场所平均空气锰浓度,计算每人的锰累积暴露指数(cumulative exposure index, CEI), $CEI=C \times T$, C 为工作场所平均空气锰浓度(mg/m^3), T 为在 C 水平下的锰作业工龄(年)。根据 CEI 将研究对象分为 3 组:高锰暴露组($CEI > 0.4$)、低锰暴露组($0.03 < CEI < 0.4$)和对照组($CEI < 0.03$)。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂、PCR 扩增试剂(天根生化科技北京有限公司);限制性内切酶 *Mwo*I(美国 MBI 公司);PCR 扩增仪、凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司);粉尘分散度测定仪(美国 SKC, INC, 880463);便携式个体空气采样器(美国 SKC, INC, 729861);空气采样流量校正仪(美国 SENSIDYNE, INC, 0501066-s);1.000 g/L 锰溶液标准品(上海计量测试技术研究院);Varian 火焰原子吸收仪(澳大利亚 Varian 公司, AA240FS);沟槽稳定试验测量仪(美国普度大学 32010);拼板试验测量仪(美国普度大学 32020)。

1.3 方法

1.3.1 样品采集 采集佩戴个体空气采样器工人 8h(1 个班次)的空气样本,滤膜孔径为 $PM_{2.5}$, 3 组各采集 20 个空气样本。采集班后每个工人外周静脉血 5 mL,肝素抗凝,用常规酚-氯仿法提取 DNA。

1.3.2 样品测定 空气样本用 1:9 的高氯酸和硝酸混合液消化至无色透明,置于电热板上蒸干,用 1% 硝酸定容至 10 mL,用火焰原子吸收仪测定空气中锰浓度。

1.3.3 *Parkin* 基因多态性分析 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法。美国国立生物技术信息中心(NCBI)从基因库获取人 *Parkin* 基因 DNA 序列(NM004562.1),引物采用 Primer premier 5.0 软件设计,7 号外显子上游引物序

列为 5'-TTCCACACTGACAGGTACTAG-3',下游引物序列为 5'-CCCAGAACTTTTATCTTTTG-3',所有引物均由上海生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体系为 25 μ L,包括 ddH₂O 9 μ L,PCR MasterMix 12.5 μ L,上下游引物各 1 μ L, DNA 模板 1.5 μ L。PCR 反应条件为:95℃预变性 3 min;95℃变性 30 s, 61℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72℃延伸 5 min。酶切体系为 20 μ L,含 ddH₂O 11 μ L, 10×buffer 2 μ L,内切酶 *Mwo*I 10 U,PCR 产物 6 μ L,混匀后 37℃温浴 3.5 h,然后 65℃水浴 20 min,使酶失活,酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统拍照并判读基因型。

1.4 神经行为检测

1.4.1 沟槽稳定试验 将沟槽放于被试者中央,被试者由沟槽的最宽处向最窄处移动测试笔,不用任何方法支撑手或前臂,先练习 2 次,取被试者第 1 次碰触壁缘时的划痕长度,划 2 次取其平均值;取划到 27 cm 处时碰撞边缘次数,取 2 次平均值。划痕长度和碰撞次数反映了被试者眼手协调性和手稳定性。

1.4.2 拼板试验 拼板试验是一个组合操作,器械包括 1 根针、2 个垫圈、1 个环。利手将针插入孔中,非利手将 1 个垫圈套在针上,利手再将 1 个环放在垫圈上,非利手再将另 1 个垫圈放在环上。针和空心环放在利手的一侧,垫圈放在非利手的一侧,先练习 2 个组合,操作 60 s,记录完成组合的数量。每完成 1 个组合为 4 分,未完成的组合按完成的部分加分,完成一个部分加 1 分,计算总分。拼板试验可反映手指、手和手臂整体运动协调性以及手指尖的灵巧性。

1.5 统计学方法

所有定量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件运算,差异比较用单因素方差分析,多重比较用最小显著差异法(LSD),性别比较采用卡方检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡定律吻合度检验

高、低锰暴露组和对照组中 7 号外显子 3 个基因型的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,吻合度良好($\chi^2=0.958$, 1.914, 1.780; $P=0.619$, 0.384, 0.411)。

2.2 锰累积暴露指数

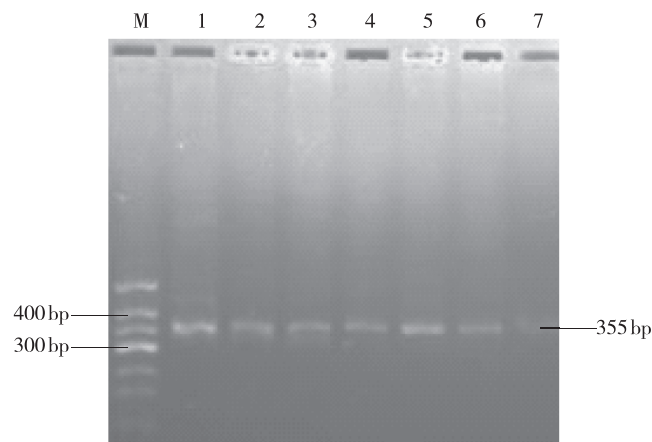
高锰暴露组工人 CEI 为 1.710 ± 0.844 ,低锰暴露组工人 CEI 为 0.165 ± 0.097 ,对照组工人 CEI 为 0.014 ± 0.009 。

2.3 *Parkin* 基因 7 号外显子 PCR 扩增及酶切产物琼脂糖凝胶电泳结果

7 号外显子 PCR 扩增产物长度为 355 bp(图 1),由于 G→C 突变使第 284 位密码子由甘氨酸(Gly)变为精氨酸(Arg),从而形成 Gly284Arg 多态性,其野生型等位基因存在 *Mwo*I 酶切位点,扩增产物可被酶切成 276 bp 和 79 bp 2 个片段;而突变型等位基因不存在此酶切位点,扩增产物不被酶切,可产生 GG 型、GC 型和 CC 型共 3 种基因型(图 2)。

2.4 神经行为检测改变和基因多态性的关系

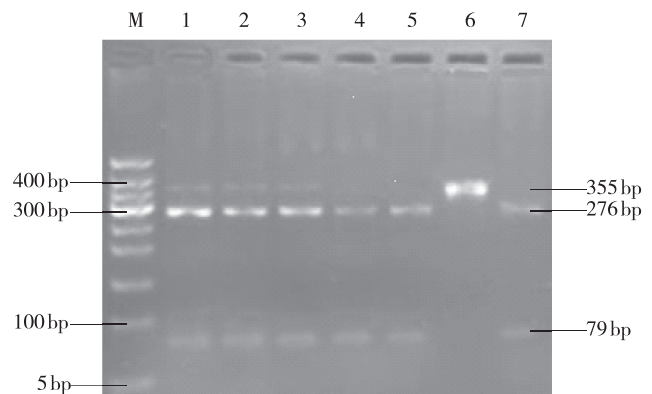
2.4.1 工人基本情况 各暴露组携带 *Parkin* 基因 7 号外显子各基因型的工人之间年龄、文化和性别差异无统计学意义($P > 0.05$),结果见表 1。



[注]M: 50 bp DNA 阶梯(50 bp DNA ladder); 1~7: 样本 DNA7 号外显子 PCR 扩增产物片段(Amplification product fragment of sample DAN exon 7)。

图 1 7 号外显子 PCR 扩增产物片段

Figure 1 Exon 7 fragments of PCR products



[注]M: 50 bp DNA 阶梯(50 bp DNA ladder); 1、2、3: GC; 4、5、7: GG; 6: CC。

图 2 7 号外显子 PCR 产物 Mwo I 酶切片段

Figure 2 Mwo I digestion of exon 7 PCR products

表 1 各组工人基本情况

Table 1 The basic information of the three groups of subjects

组别 Group	基因型 Gene type	N	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁) Age ($\bar{x} \pm s$, years)	文化水平 ($\bar{x} \pm s$, 年) Education ($\bar{x} \pm s$, years)	性别 (男/女) Gender (Male/Female)
对照组 Control	GG	36	35.268 $\pm$ 6.079	7.136 $\pm$ 2.550	31/5
	GC	51	36.510 $\pm$ 7.951	7.844 $\pm$ 2.398	38/13
	CC	7	38.450 $\pm$ 7.427	7.455 $\pm$ 2.326	5/2
$F(\chi^2)$			0.093	1.078	1.936
P			0.275	0.304	0.380
低锰暴露组 Low exposure	GG	39	34.692 $\pm$ 6.887	10.405 $\pm$ 3.500	26/13
	GC	53	35.789 $\pm$ 7.345	10.571 $\pm$ 3.474	39/14
	CC	7	30.250 $\pm$ 6.397	9.000 $\pm$ 5.477	6/1
$F(\chi^2)$			1.250	0.008	1.258
P			0.291	0.694	0.533
高锰暴露组 High exposure	GG	43	35.558 $\pm$ 6.867	7.884 $\pm$ 3.057	38/5
	GC	50	34.100 $\pm$ 6.683	8.314 $\pm$ 3.121	40/10
	CC	8	35.125 $\pm$ 4.581	7.125 $\pm$ 2.100	7/1
$F(\chi^2)$			0.568	0.721	1.288
P			0.568	0.535	0.525

2.4.2 神经行为检测结果 高锰暴露组中,7号外显子各基因型垂直沟槽稳定试验的划痕长度、碰撞次数、拼板试验得分间差异均有统计学意义(F 值分别为6.889, 3.558, 7.954; P 值分别为0.002, 0.032, 0.001), CC 基因型的划痕长度、拼板试验得分均低于 GG 和 GC 型($P<0.05$), 碰撞次数则高于 GG 、 GC 这2个基因型($P<0.05$); 低锰暴露组中,各基因型在划痕长度、拼板试验得分间差异有统计学意义(F 值分别为3.486, 3.516; P 值分别为0.035, 0.034), 碰撞次数间差异则无统计学意义($F=1.889$, $P=0.157$), CC 基因型的划痕长度、拼板试验得分均低于 GG 和 GC 型($P<0.05$); 对照组中,各基因型在垂直沟槽稳定试验和拼板试验得分间差异均无统计学意义(F 值分别为1.375, 0.144, 1.448; P 值分别为0.258, 0.886, 0.240), 结果见表2。

表 2 各组 *Parkin* 基因 7 号外显子各基因型与神经行为改变的比较
($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The neurobehavioral test results against varied Mn exposure and exon 7 genotypes

组别 Group	基因型 Gene type	N	划痕长度(cm) Length of drawing	碰撞次数(次) Collision frequency	拼板试验(分数) Pegboard test
对照组 Control	GG	36	20.344 $\pm$ 1.465	2.876 $\pm$ 0.687	34.833 $\pm$ 7.026
	GC	51	20.252 $\pm$ 1.988	2.849 $\pm$ 0.437	32.981 $\pm$ 9.674
	CC	7	19.087 $\pm$ 2.649	3.534 $\pm$ 0.141	30.257 $\pm$ 0.228
F			1.375	0.144	1.448
P			0.258	0.866	0.240
低锰暴露组 Low exposure	GG	39	20.903 $\pm$ 1.576*	2.872 $\pm$ 0.559	32.737 $\pm$ 8.073*
	GC	53	20.848 $\pm$ 1.445*	2.718 $\pm$ 0.753	33.86 $\pm$ 6.952*
	CC	7	18.875 $\pm$ 0.829	4.625 $\pm$ 0.119	23.750 $\pm$ 7.411
F			3.486	1.889	3.516
P			0.035	0.157	0.034
高锰暴露组 High exposure	GG	43	20.966 $\pm$ 1.637*	2.354 $\pm$ 0.131*	30.275 $\pm$ 6.579*
	GC	50	20.886 $\pm$ 1.578*	3.059 $\pm$ 0.198*	31.854 $\pm$ 6.504*
	CC	8	18.744 $\pm$ 1.474	5.625 $\pm$ 0.441	21.750 $\pm$ 7.741
F			6.889	3.558	7.954
P			0.002	0.032	0.001

[注]*: 与 CC 基因型比较(Compared with CC genotype), $P<0.05$ 。

3 讨论

“*Parkin*基因早在1998年就被发现是一个与帕金森综合征有关的基因^[7], 定位于人类染色体6q25.2-27, 含有12个外显子, 该基因的突变被认为可能与散发性PD的发病有关^[8], 其外显子的突变多态性被人们所关注, 宁玉萍等^[9]发现7号外显子的多态性与PD的发病有关。

*Parkin*基因可翻译合成*Parkin*蛋白, 该蛋白对中枢神经系统的多巴胺神经元的代谢产物有着重要影响, 参与其异常蛋白质的降解^[10], 当*Parkin*基因发生突变后其降解异常蛋白质的功能丧失, 过多的异常蛋白质就会聚集在黑质等多巴胺能神经元中, 阻碍正常多巴胺神经递质释放和运输, 导致多巴胺神经递质无法正常发挥作用, 最终发生PD^[11]。

遗传基因的特殊性决定了人们对很多疾病的敏感性, 疾病的发生多属遗传因素与环境因素共同作用的结果^[12]。锰暴露

者所发生的锰损害也有敏感性的问题,郑玉新等^[1]已发现同样程度的锰职业接触者神经损害却不一样,贾飞飞等^[13]对职业锰接触者 *Parkin* 基因 4 号外显子的多态性与其神经行为学改变的研究也提示该基因的多态性可能与人对锰损害的敏感性有关。”

该研究所得结果显示,高锰暴露组中,携带 7 号外显子 *CC* 基因型的工人划痕长度、拼板试验得分均低于携带 *GG* 型和 *GC* 型的工人,碰撞次数高于携带 *GG* 型和 *GC* 型的工人;低锰暴露组中,携带 *CC* 型的工人划痕长度、拼板试验得分均低于携带 *GG* 型和 *GC* 型的工人;对照组中,携带各基因型的工人划痕长度、碰撞次数、拼板试验得分之间差异无统计学意义。而 *C* 是突变基因,提示在高锰暴露和低锰暴露环境中,携带突变基因型的工人更易发生锰引起的神经行为改变,即环境因素和遗传因素共同作用更易导致锰引起神经行为改变的发生。

此结果与其他研究结果类似,即同样的锰作业环境,同样锰接触水平的工人中仅有部分人发生神经行为改变。提示在高锰和低锰暴露环境中,携带 *Parkin* 基因 7 号外显子突变纯合基因 *CC* 型的工人更可能发生锰引起的神经行为改变,是锰暴露环境中锰损伤的易感者,这对筛选在职业性锰暴露中易发生锰损伤者提供了有价值的资料。但此研究仅是一个横断面调查的初步结果,还需进一步深入的研究加以验证,如果得到验证,将来在职工上岗体检和在岗定期体检等过程中就需更加关注携带 *Parkin* 基因 7 号外显子突变纯合基因型的工人,对他们进行早期神经行为学改变的密切观察,以便将不可逆转的锰损伤阻断在发生之前。

过量锰引起神经行为改变的机制很多^[13],但是 *Parkin* 基因突变在锰引起神经行为改变的机制中如何发挥作用目前还不清楚,可能与过量锰引起异常蛋白质增多而不能被有效清除有关,但是尚有待于进一步研究揭示。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] 郑玉新,何凤生,陈彪,等.慢性锰中毒易感性与基因多态性的病例对照研究[J].中华预防医学杂志,1999,33(2):78-80.

- [2] CHUNG SJ, ARMASU SM, BIERNACKA JM, et al. Common variants in *PARK* loci and related genes and Parkinson's disease[J]. *Mov Disord*, 2011, 26(2): 280-288.
- [3] OLANOW CW. Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1012: 209-223.
- [4] ASCHNER M. Manganese: brain transport and emerging research needs[J]. *Environ Health Perspect*, 2000, 108(Suppl 3): 429-432.
- [5] WANG JD, HUANG CC, HWANG YH, et al. Manganese induced parkinsonism: an outbreak due to an unrepaired ventilation control system in a ferromanganese smelter[J]. *Br J Ind Med*, 1989, 46(12): 856-859.
- [6] LOUIS ED, YOUSEFZADEH E, BARNES LF, et al. Validation of a portable instrument for assessing tremor severity in epidemiologic field studies[J]. *Mov Disord*, 2000, 15(1): 95-102.
- [7] KITADA T, ASAKAWA S, HATTORI N, et al. Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism[J]. *Nature*, 1998, 392(6676): 605-608.
- [8] 刘珂,腾继军,王修海.散发性帕金森病 *Parkin* 基因突变检测[J].青岛大学医学院学报,2009,45(2):104-106.
- [9] 宁玉萍,徐严明,王玉凯,等. *Parkin* 基因 R/W366 及 V/L380 多态性与散发性帕金森病[J].中国神经精神疾病杂志,2002,28(1):17-19.
- [10] SHIMURA H, HATTORI N, KUBO S, et al. Familial Parkinson disease gene product, *parkin*, is a ubiquitin-protein ligase[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(3): 302-305.
- [11] 洪雁,张本恕,马温良. *Parkin* 基因和帕金森病[J].国外医学:神经病学神经外科分册,2004,31(3):283-286.
- [12] 金泰虞.现代毒理学[M].上海:复旦大学出版社,2004:18-20.
- [13] 贾飞飞,姜慧,申旭波,等.锰接触工人神经行为改变与 *Parkin* 基因 4 号外显子多态性的关系.工业卫生与职业病,2011,37(1):17-21.
- [14] 孙明霞,闫永建.锰的神经毒性研究进展[J].工业卫生与职业病,2010,36(2):121-123.

(收稿日期:2012-03-16)

(英文编审:金克峙;编辑:张晶;校对:王晓宇)

【精彩预告】

用膳食平衡指数评价京沪穗学龄前儿童膳食结构

杨硕,郭红卫

为了解北京、上海、广州三地 4~7 岁学龄前儿童膳食摄入情况,评价其膳食结构,为合理指导饮食,制定、评价和修订营养干预措施提供科学依据。研究人员采用食物频率问卷收集 3 098 名调查对象过去 6 个月 21 种常见食物的摄入状况,以膳食平衡指数 (DBI) 对其膳食结构进行评分和评价。结果显示,三地学龄前儿童膳食模式 A 的占 70.5%,膳食模式 B 的占 28.3%,膳食模式 C、D、E 的共占 1.2%,本样本人群没有人为模式 F、G、H 和 I。三地学龄前儿童总体膳食摄入低度不足,膳食摄入过量的问题较轻,膳食结构不尽合理。建议通过加强学龄前儿童、家长及相关人员的营养教育等多种途径培养学龄前儿童良好膳食习惯,改善学龄前儿童营养状况。

此文将于近期刊出,敬请关注!