

焦炉工人 DNA 损伤与组蛋白 H2A 单泛素化水平的关系

杨瑾¹, 李新², 郭庆峰¹, 王志武¹

摘要: [目的] 探讨焦炉工人 DNA 损伤与组蛋白 H2A 单泛素化水平的关系。[方法] 采用高效液相色谱法对焦化厂 106 名焦炉工人(接触组)和 73 名水处理厂工人(对照组)尿中 1-羟基芘(1-hydroxypyrene, 1-OHP)浓度进行测定,并采用彗星实验和蛋白质印迹法(Western blot)分别检测 DNA 损伤和组蛋白 H2A 单泛素化水平。[结果] 接触组 Olive 尾矩(Olive tail moments, OTM)和尿 1-OHP 的均值分别为 0.46 和 0.34 $\mu\text{mol/mol Cr}$, 均显著高于对照组(分别为 0.37 和 0.21 $\mu\text{mol/mol Cr}$, $P < 0.05$);而接触组单泛素化组蛋白 H2A 相对表达水平的中位数为 0.61,与对照组(0.91)相比为降低($P < 0.05$)。以 OTM 值为应变量,多元线性回归显示自变量尿 1-OHP 和单泛素化组蛋白 H2A 进入回归方程,决定系数 R^2 为 0.383。[结论] 焦炉工人 DNA 损伤程度与尿 1-OHP 含量和单泛素化组蛋白 H2A 相对表达水平关系密切。

关键词: 苯并芘; DNA 损伤; 组蛋白; 单泛素化

Relationship between DNA Damage and Monoubiquitinated Histone H2A in Coke Oven Workers
YANG Jin¹, LI Xin², GUO Qing-feng¹, WANG Zhi-wu¹ (1. Department of Occupational Health, School of Public Health, Shanxi Medical University, Shanxi 030001, China; 2. Center for Disease Control and Prevention of Taiyuan Iron and Steel (Group) Co. Ltd., Shanxi 030003, China) • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To examine the relationship between DNA damage and monoubiquitinated histone H2A in coke oven workers. [Methods] A total of 106 coke oven workers (exposed group) and 73 water treatment workers (control group) were recruited in this study. The levels of urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP) were determined using high performance liquid chromatography. Comet assay and Western blot were used to detect the DNA damage and the monoubiquitylation of histone H2A, respectively. [Results] The mean Olive tail moments (OTM) (0.46) and urinary 1-OHP concentrations (0.34 $\mu\text{mol/mol Cr}$) in the exposed group were significantly higher than those in the control group (0.37 and 0.21 $\mu\text{mol/mol Cr}$, respectively, $P < 0.05$). But the median of expression of monoubiquitinated histone H2A (0.61) in the exposed group were significantly lower than that in the control group (0.91, $P < 0.05$). By taking OTM as the dependent variable, the results of multiple linear regression analysis showed that urinary 1-OHP and the relative expressions of monoubiquitinated histone H2A fit the equation as independent variables, and the coefficient of determination R^2 was 0.383. [Conclusion] DNA damage and urinary 1-OHP are closely related with the relative expression of monoubiquitinated histone H2A in the coke oven workers.

Key Words: benzopyrene; DNA damage; histone; monoubiquitylation

焦炉生产过程中产生的以苯并(a)芘(benzo[a]pyrene, BaP)等多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)为主的焦炉逸散物,可以通过呼吸道进入人体,引起肺癌发生。流行病学研究表明, BaP 等致癌性多环芳烃导致焦炉工人的肺癌发病率比正常人高 3~7 倍^[1-3]。进入体内的 BaP 被代谢成苯并(a)芘-7, 8-二氢二醇-9, 10-环氧化物(benzo[a]

pyrene-7, 8-dihydrodiol-9, 10-epoxide, BPDE)。BPDE 可与 DNA 亲核位点共价结合形成加合物,导致 DNA 损伤^[4]。当机体不能及时有效地修复 DNA 损伤,损伤积累至一定程度导致基因组不稳定性增高,可引起细胞增殖和分化失控,导致肿瘤的发生。因此 DNA 修复与肿瘤发生有着密不可分的联系。近年来的研究表明,表观遗传可能在 DNA 修复过程中发挥重要的调节作用,其中组蛋白修饰在 DNA 修复过程中发挥的作用日益受到人们的重视。本课题组先期体外研究发现, BaP 染毒致人支气管上皮细胞(16HBE)DNA 损伤与组蛋白 H2A 单泛素化水平之间存在密切关系^[5]。本研究拟通过分析焦炉工人 DNA 损伤与组蛋白 H2A 单泛素化水平之间的关系,为寻找焦炉工人肺癌早期监测指标提供实验室依据。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 30901180); 山西省高等学校优秀青年学术带头人支持计划(编号: 晋教科[2010]4号)

[作者简介] 杨瑾(1975—), 女, 博士, 副教授; 研究方向: 分子毒理学; E-mail: yj750410@163.com

[作者单位] 1. 山西医科大学公共卫生学院劳动卫生学教研室, 山西 030001; 2. 太原钢铁(集团)有限公司疾病预防控制中心, 山西 030003

1 对象和方法

1.1 对象

本研究选取某钢铁集团焦炉工人 106 人作为接触组,均为男性,年龄为 23~52 岁,同时选取年龄为 32~51 岁的供水厂男性工人 73 人作为对照组;所有调查对象均身体健康,近期末使用任何药物。

1.2 方法

1.2.1 问卷调查 对调查对象采用统一设计的调查表进行问卷调查,按照统一的方法及标准,由经培训的调查员进行面对面询问调查。调查内容包括年龄、工龄、职业史、既往史、生活习惯和吸烟饮酒情况等。其中吸烟定义为“每天吸卷烟 1 支以上,连续或累计 6 个月”;饮酒定义为“每天饮用酒精量超过 25 g,相当于啤酒 750 mL,或葡萄酒 250 mL,或高度白酒 50 g,或 38° 白酒 75 g,连续或累计 6 个月”。

1.2.2 生产环境监测 在炼焦作业区(焦炉炉顶、炉侧和炉底位置)以及供水厂的水泵房分别设立 3 个有代表性的采样点,用 HY-100 智能采样器(青岛恒远仪器有限公司)以 100 L/min 的流量在每个采样点平行采样 15 min,同时记录当时的气温、气压以便换算成标准状态下的采样体积。干燥后的滤膜用环己烷超声萃取 4 次,吹氮浓缩并用环己烷定容至 2 mL,4℃ 避光保存。样品 24 h 内由 0.22 μm 的有机滤膜过滤后取 20 μL 用高效液相色谱仪检测 BaP 水平。以保留时间定性,峰面积定量。

1.2.3 血样和尿样采集 经知情同意,采集班后工人的外周肘静脉血 5 mL,乙二胺四乙酸二钠抗凝,-80℃ 保存。另外收集工人班后尿样 20 mL,-80℃ 保存待测。

1.2.4 尿 1-羟基芘(1-hydroxypyrene, 1-OHP)的测定参照李晓华等^[6]建立的方法,采用碱水解-高效液相色谱法测定尿 1-OHP 浓度,并用肌酐含量进行校正。

1.2.5 彗星实验检测 DNA 损伤 采集研究对象的空腹抗凝血,用人淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限公司)分离淋巴细胞,参照 OLIVE 等^[7]建立的方法以碱性彗星实验检测 DNA 损伤情况,在荧光显微镜(Olympus 公司)下观察并拍照,用 CASP 彗星图像分析软件测定细胞的 Olive 尾矩(Olive tail moments, OTM),以 OTM 的平均值代表 DNA 损伤程度。

1.2.6 蛋白质印迹(Western blot)法检测组蛋白 H2A 单泛素化水平 取收集的细胞,用裂解液[0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris/HCl (pH 7.6), 1 mmol/L 二乙胺四乙酸(EDTA) (pH 8.0), 100 μg/mL 苯甲基磺酰氟

(PMSF), 2 μg/mL 亮抑肽酶(leupeptin)]裂解细胞,4℃, 14 000 × g 离心 10 min,取上清,以考马斯亮蓝法测定蛋白含量,调节蛋白浓度一致。用 Western-blot 法检测蛋白表达水平。组蛋白 H2A 单泛素化抗体(mouse anti-ubiquitinyl-histone H2A, uH2A)购自美国 Millipore 公司,内参和相应二抗均购自北京康为世纪生物有限公司。用化学发光剂(ECL)法检测蛋白质表达,胶片扫描保存。用捷达 801 专业数码凝胶成像与分析系统 3.3 软件对 Western blot 蛋白质条带进行定量,用目的蛋白与内参磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)的灰度值比作为目的蛋白表达的相对含量。

1.3 统计分析

用 SPSS 12.0 软件进行统计分析。吸烟和饮酒率组间比较采用 χ^2 检验;年龄组间比较采用 *t* 检验。尿 1-OHP 和 OTM 值不服从正态分布,经对数变换后呈正态分布;uH2A 相对表达水平不服从正态分布,且经数据变换后仍不呈正态分布,以中位数和上、下四分位数(P_{25} 和 P_{75})表示,环境中 BaP 浓度以中位数和全距表示,组间比较采用秩和检验(Wilcoxon 法)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

由表 1 可见,对照组和接触组吸烟和饮酒习惯差异无统计学意义($P>0.05$),但是接触组年龄较对照组年轻($P<0.01$)。

表 1 研究对象的一般情况
Table 1 Characteristics of the subjects

组别 Group	例数 <i>n</i>	年龄($\bar{x} \pm s$, 岁) Age($\bar{x} \pm s$, years)	吸烟 Smokers		饮酒 Alcohol users	
			例数 <i>n</i>	率(%) Rate	例数 <i>n</i>	率(%) Rate
对照组 Control group	73	41.42 ± 4.39	51	69.86	43	58.90
接触组 Exposed group	106	37.99 ± 6.59	69	65.09	49	46.23
<i>P</i>		0.000		0.566		0.124

2.2 工作环境监测结果

在炼焦作业区(焦炉炉顶、炉侧与炉底)和非炼焦作业区(供水厂水泵房)进行空气粉尘采样,由表 2 可见,接触组作业区 BaP 浓度范围为 0.009~1.770 μg/m³(中位数为 0.214 μg/m³),而对照组工作场所中 BaP 浓度范围为 0.003~0.016 μg/m³(中位数为 0.009 μg/m³),

经 Wilcoxon 检验发现, 两组浓度总体分布不同, 接触组作业区 BaP 浓度高于对照组 ($P<0.01$)。

表 2 接触组和对照组环境监测和生物监测结果

Table 2 The results of environmental and biological monitoring of the exposed group and the controls

组别 Group	苯并(a)芘 Benzo[a]pyrene ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)		Olive 尾矩 Olive tail moments	1-羟基芘 1-hydroxypyrene ($\mu\text{mol}/\text{molCr}$)	单泛素化组蛋白 Monoubiquitylation of histone H2A	
	全距 Range	中位数 Median	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$P_{25} \sim P_{75}$	中位数 Median
对照组 Control group	0.003~0.016	0.009	0.37 ± 0.12	0.21 ± 0.16	0.61~1.55	0.91
接触组 Exposed group	0.009~1.770	0.214	0.46 ± 0.27	0.34 ± 0.20	0.33~1.28	0.61
<i>P</i>	0.000		0.030	0.000	0.014	

2.3 两组 Olive 尾矩、尿 1-羟基芘和组蛋白单泛素化水平

所有研究对象的 OTM 值和尿 1-OHP 均呈偏态分布, 经对数转换后符合正态分布。由表 2 可见, 接触组 OTM 值高于对照组 ($P<0.05$), 提示接触组 DNA 损伤程度重于对照组。接触组尿 1-OHP [$(0.34 \pm 0.20) \mu\text{mol}/\text{molCr}$] 与对照组 [$(0.21 \pm 0.16) \mu\text{mol}/\text{molCr}$] 相比, 明显增高 ($P<0.01$)。研究对象的单泛素化组蛋白 H2A 的相对表达水平呈偏态分布, 经数据转换后仍不符合正态分布, 经 Wilcoxon 检验发现, 两组蛋白相对表达水平分布不同, 接触组单泛素化组蛋白 H2A 的相对表达水平低于对照组 ($P<0.05$)。

2.4 Olive 尾矩和尿 1-羟基芘、组蛋白单泛素化水平的关系

将研究对象 OTM 值作为应变量, 尿 1-OHP、uH2A 的相对表达水平、年龄和量化后的吸烟、饮酒作为自变量进行逐步法多元线性回归。结果显示, 自变量尿 1-OHP 和 uH2A 相对表达水平进入方程, 模型中决定系数 R^2 为 0.383, 模型经方差分析表明, 此模型有统计学意义 ($F=35.035$, $P<0.01$)。自变量尿 1-OHP 和单泛素化组蛋白 H2A 的相对表达水平的标准化系数 β 分别为 0.168 和 -0.575, 经统计学检验, P 值分别为 0.026 和小于 0.01。说明 OTM 值随着尿中 1-OHP 含量的增高而增高, 但随着 uH2A 相对表达水平的增高而降低。

3 讨论

BaP 的活性代谢产物 BPDE 具有亲电子性, 可与 DNA 亲核位点共价结合形成加合物。目前研究认为 DNA 加合物可导致碱基错配、移码突变、缺失、链断裂和各种染色体的变化^[8]。碱性单细胞凝胶电泳实验

可以灵敏地在单个细胞中评价由遗传毒物所致 DNA 损伤。本研究结果也提示接触组 OTM 值高于对照组。OTM 值的大小与多种因素有关, 如机体的内暴露水平、DNA 损伤修复能力以及生活习惯 (吸烟、饮酒) 等。

本次实验选取的焦化厂工人岗位分布于炉顶、炉侧和炉底, 在进行数据预分析时, 发现外暴露与效应指标之间有明显剂量-效应关系。因此在统计分析时将各岗位焦炉工人作为接触组来讨论。在对 106 名焦炉作业工人和 73 名对照工人的研究中发现, 将研究对象 OTM 值作为应变量, 尿 1-OHP、uH2A 的相对表达水平、年龄和量化后的吸烟、饮酒行为作为自变量进行逐步法多元线性回归, 最终尿 1-OHP 和 uH2A 的相对表达水平进入方程, 且决定系数 R^2 为 0.383, 意味着研究对象 OTM 值总变异的 38.3% 是由尿 1-OHP 和 uH2A 的相对表达水平所引起。

PAHs 进入人体后约 95% 的芘代谢成为 1-OHP, 研究表明 PAHs 暴露工人尿中 1-OHP 与外暴露水平显著相关^[9-10]。本研究中尿 1-OHP 作为自变量进入方程反映了 BaP 暴露与 DNA 损伤关系密切。

当 DNA 受到各种内源性或外源性有害因素损伤时, 机体 DNA 修复系统根据损伤类型来启动相应的修复机制。正常情况下组蛋白包裹超螺旋 DNA 形成致密的染色质, 这种结构可以对 DNA 起到保护作用, 但是也极大地妨碍了细胞核内许多重要的生理进程, 包括 DNA 损伤的检测与修复。DNA 损伤修复机器要想接近 DNA, 对损伤信号做出应答, 就必须首先逾越染色质这一天然屏障, 调节 DNA 的可接近性, 以利于 DNA 的修复。组蛋白的共价修饰可通过影响组蛋白与 DNA 双链的亲合性, 从而改变染色质的松散或凝集状态。组蛋白泛素化是组蛋白修饰的一种重要类型, 且其与 DNA 修复的关系更是受到人们的重视^[11-12]。本课题组在体外研究中也证实 DNA 损伤与组蛋白 H2A 单泛素化水平之间存在密切关系。在本次人群研究中同样发现 OTM 值与 uH2A 的相对表达水平有密切关系。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] BOFFETTA P, JOURENKOVA N, GUSTAVSSON P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Cancer Causes Control, 1997, 8(3): 444-472.
- [2] BOSETTI C, BOFFETTA P, La VECCHIA C. Occupational

- exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005 [J]. Ann Oncol, 2007, 18(3): 431-446.
- [3] BROWN T, DARNTON A, FORTUNATO L, et al. Occupational cancer in Britain. Respiratory cancer sites: larynx, lung and mesothelioma [J]. Br J Cancer, 2012, 107 Suppl 1: S56-S70.
- [4] RAGIN AD, CRAWFORD KE, ETHEREDGE AA, et al. A gas chromatography-isotope dilution high-resolution mass spectrometry method for quantification of isomeric benzo[a]pyrene diol epoxide hemoglobin adducts in humans [J]. J Anal Toxicol, 2008, 32(9): 728-736.
- [5] 王志武, 贾利娜, 牛侨, 等. 苯并(a)芘致人支气管上皮细胞 DNA 损伤及与组蛋白 H2A 单泛素化水平的关系 [J]. 环境与职业医学, 2012, 29(3): 136-138.
- [6] 李晓华, 冷曙光, 郭君, 等. 改良的高效液相色谱法测定尿中 1-羟基芘 [J]. 卫生研究, 2003, 32(6): 616-617.
- [7] OLIVE PL, WLODEK D, DURAND RE, et al. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis [J]. Exp Cell Res, 1992, 198(2): 259-267.
- [8] BAIRD WM, HOOVEN LA, MAHADEVAN B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action [J]. Environ Mol Mutagen, 2005, 45(2-3): 106-114.
- [9] BURATTI M, CAMPO L, FUSTINONI S, et al. Urinary hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons as biomarkers of exposure in asphalt workers [J]. Biomarkers, 2007, 12(3): 221-239.
- [10] JONGENELEN FJ, BOS RP, ANZION RB, et al. Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons. Metabolites in urine [J]. Scand J Work Environ Health, 1986, 12(2): 137-143.
- [11] BERGINK S, SALOMONS FA, HOOGSTRATEN D, et al. DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A [J]. Genes Dev, 2006, 20(10): 1343-1352.
- [12] HOFMANN K. Ubiquitin-binding domains and their role in the DNA damage response [J]. DNA Repair (Amst), 2009, 8(4): 544-556.

(收稿日期: 2012-10-15)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 张晶; 校对: 徐新春)

【EHP 专栏】

长期交通噪声暴露与糖尿病发生率：一项队列研究

Mette Sørensen, Zorana J. Andersen, Rikke B. Nordsborg, Thomas Becker,
Anne Tjønneland, Kim Overvad, Ole Raaschou-Nielsen

摘要: [背景] 正常城市水平的道路交通噪声会导致紧张和睡眠障碍。过多的紧张激素和睡眠质量及持续时间的下降均可能增加患 2 型糖尿病的风险。[目的] 研究长期暴露于住宅道路交通噪声是否与糖尿病风险增加有关联。[方法] 以人口为基础的丹麦饮食、癌症与健康队列研究于 1993—1997 年纳入 57 053 名 50~64 岁的参加者。从入组到 2006 年期间, 从全国糖尿病登记系统中确定有 3 869 例发生糖尿病, 平均随访时间为 9.6 年。通过国家登记册, 确定这些患者在 1988 年至 2006 年间的现有及既往居住地址, 并且对所有住址的道路交通噪声进行评估。以 Cox 回归模型分析道路交通噪声暴露与糖尿病发病之间的关联。[结果] 糖尿病诊断时及诊断前的 5 年期间, 道路交通噪声平均水平每增加 10 dB, 糖尿病发病风险增加, 校正包括年龄、身体质量指数、腰围、教育、空气污染(氮氧化物)以及生活方式特点等潜在的混杂因素后, 发病率比 (IRR) 分别为 1.08 (95%CI: 1.02~1.14) 和 1.11 (95%CI: 1.05~1.18)。使用更严格的糖尿病诊断定义 (2 752 例) 后, 发现在诊断时和诊断前 5 年中, 道路交通噪声每增加 10 dB, IRRs 分别为 1.11 (95%CI: 1.03~1.19) 和 1.14 (95%CI: 1.06~1.22)。[总结] 住宅道路交通噪声与糖尿病风险较高相关。该研究为城市噪声可能对人类健康产生不利影响提供了更多的证据。

关键词: 空气污染; 队列; 糖尿病; 流行病学; 交通噪声

原文详见 *Environmental Health Perspectives*, 2013, 121(2): 217-222.