

镍冶炼工人尿镍水平与 *p15*、*p16* 启动子甲基化的关系

杨瑾¹, 王志武¹, 郭庆峰¹, 孙建娅²

摘要: [目的] 探讨镍冶炼工人尿镍水平与抑癌基因 *p15*、*p16* 启动子甲基化的关系。[方法] 采用丁二酮肟分光光度法测定不锈钢冶炼厂 165 名镍作业工人(镍接触组)和 67 名水处理工人(对照组)尿镍浓度, 并采用甲基化特异性聚合酶链反应(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)检测抑癌基因 *p15*、*p16* 启动子的甲基化状态。[结果] 炼钢工、钢渣处理工、轧钢工的尿镍浓度中位数分别为 5.34、4.59、4.52 $\mu\text{g/L}$, 与水处理工人的尿镍浓度中位数(1.78 $\mu\text{g/L}$)比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。镍接触组的 *p15* 基因启动子甲基化检出率为 25.45%, 与对照组甲基化检出率(11.94%)相比, 差异有统计学意义($P = 0.023$); 而镍接触组 *p16* 基因启动子甲基化检出率(21.82%)与对照组(11.94%)相比, 差异无统计学意义($P = 0.082$)。多元 logistic 回归分析显示, 尿镍浓度高个体的 *p15* 甲基化发生可能性为尿镍浓度低个体的 1.47 倍。[结论] 尿镍浓度与 *p15* 启动子甲基化的发生有密切关系。

关键词: 镍; 抑癌基因; 甲基化

Correlation between Urinary Nickel and Methylation of *p15* and *p16* in Blood DNA of Workers Exposed to Nickel YANG Jin¹, WANG Zhi-wu¹, GUO Qing-feng¹, SUN Jian-ya² (1.Department of Occupational Health, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2.Department of Occupational Diseases, Center for Disease Control and Prevention, Taiyuan Iron and Steel (Group) Co. Ltd., Taiyuan, Shanxi 030003, China) • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To study the correlation between urinary nickel and methylation of anti-oncogene *p15* and *p16* in blood DNA of workers exposed to nickel. [Methods] Totally 165 nickel exposed workers and 65 water treatment workers without occupational nickel exposure were recruited in this study. The levels of urinary nickel were determined by dimethylglyoxime spectrophotometry. Methylation specific polymerase chain reaction (MSP) was used to detect the methylation of *p15* and *p16* in blood DNA. [Results] The median concentrations of urinary nickel in steel refining workers (5.34 $\mu\text{g/L}$), slaggers (4.59 $\mu\text{g/L}$) and mill men (4.52 $\mu\text{g/L}$) were significantly higher than that in the controls (1.78 $\mu\text{g/L}$) ($P < 0.01$). The methylation rate of *p15* in the exposed group (24.55%) was significantly higher than that in the control group (11.94%) ($P = 0.023$). However, no significant difference in the methylation rate of *p16* between the exposed group (21.82%) and the control group (11.94%) was found ($P = 0.082$). The multivariate logistic analysis showed that workers bearing higher urinary nickel levels were at higher risks of developing *p15* methylation ($OR = 1.47$, $P = 0.024$). [Conclusion] The level of urinary nickel is significantly correlated with the methylation of *p15* in blood DNA.

Key Words: nickel; anti-oncogene; methylation

由于镍具有耐高温和抗腐蚀的性能, 因此被广泛应用于现代工业。流行病学研究证实, 长期暴露于可溶性和不溶性镍化合物的职业工人肺癌和鼻腔癌的发病率显著升高^[1], 国际癌症研究中心(IARC)于 1990 年将镍及其化合物列为第一类致

癌物^[2]。肿瘤的发生是一个复杂的生物学过程, 是多个基因的变化导致细胞增殖分化和凋亡失调的结果, 在众多基因中, 以癌基因和抑癌基因异常变化最为常见。镍作为一典型的重金属致癌物, 在多数情况下, 直接诱发 DNA 突变的活性却相对较低^[3], 即在影响基因表达时并不直接作用于编码基因, 而是通过表观遗传效应致使众多抑癌基因表达沉默, 从而发挥致癌效应。有研究发现, 抑癌基因 *p15* 和 *p16* 常在各种肿瘤和癌细胞系缺失, 而启动子甲基化是这两个基因沉默的主要机制^[4]。因此, 本研究拟采用甲基化特异性聚合酶链反应(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)检测职业性镍接触工人 *p15* 和 *p16* 基因甲基化发生率, 并探讨甲基化与镍暴露水平之间的关系。

[基金项目] 山西省青年科技研究基金资助项目(编号: 2009021044-1); 山西省高等学校优秀青年学术带头人支持计划资助(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: yi750410@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, 山西太原 030001; 2. 太原钢铁(集团)有限公司疾病预防控制中心职业病科, 山西太原 030003

1 对象与方法

1.1 对象

于 2011 年 4 月选取某钢铁集团镍作业男性工人 165 人为镍接触组,其工龄、年龄分别为 5 年以上和 20~55 岁。其中,炼钢工 60 人、钢渣处理工 65 人和轧钢工 40 人。同时选取年龄、性别相匹配的非职业镍暴露的水处理工人(67 人)作为对照组。所有调查对象均身体健康,并且近期未使用任何药物。

1.2 方法

1.2.1 问卷调查 采用统一设计的调查表,按照统一的方法及标准,由经培训的调查员对调查对象进行问卷调查,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。

1.2.2 生产环境中可溶性镍化合物监测 在炼钢炉前、轧钢机前、钢渣处理车间和水处理车间分别设置 1 个采样点,操作室内各设 1 个采样点,采样高度为人呼吸带高度,在工作时间内连续监测 3 个工作日。依据《工作场所空气中镍及其化合物的测定方法》(GBZ/T 160.16—2004)^[5],采用 CCZ-2A 型粉尘采样器(江苏省金坛市汉康电子有限公司)和微孔滤膜以 5 L/min 流量采集空气样本 15 min。样品经消化后,在 232 nm 波长下,用乙炔-空气火焰原子吸收光谱法测定。

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,肝素钠抗凝,−80℃ 保存;收集工人班后尿样 20 mL,−80℃ 保存,待测。

1.2.4 尿镍浓度测定 采用《尿中镍的分光光度测定方法》(WS/T 43—1996)^[6],收集调查对象夜班后晨尿,尿样经酸消化后,用氯仿萃取,然后,在氯仿-冰乙酸-乙醇介质中,镍离子与 2-[5-溴-吡啶偶氮]-5-二甲胺苯酚生成红色络合物,于 559 nm 波长比色定量。尿镍浓度用尿比重进行校正。

1.2.5 *p15* 和 *p16* 启动子甲基化状态 用 DNAiso[Code: D305A, 宝生物工程(大连)有限公司]提取血样中 DNA, DNA 样本使用甲基化检测试剂盒(Code: D5001, 美国 Zymo Research 公司),经亚硫酸氢盐转变后纯化,回收的 DNA 按表 1 所列引物和反

应条件进行扩增,扩增产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外照射显带。

表 1 甲基化特异性聚合酶链反应引物和反应条件

Table 1 Primer sequences and conditions for MSP analysis

基因 Gene	引物类型 Type of primer	上游引物 Forward primer (5' to 3')	下游引物 Reverse primer (5' to 3')	反应条件 Condition
<i>p15</i>	甲基化 Methylation	GCGTTCGTATTTT GCGGTT	CGTACAATAAC CGAACGACCGA	94℃ 5 min 1cycle; 94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 30s, 35 cycle; 72℃ 5 min 1cycle
	非甲基化 Non-methylation	TGTGATGTGTTTG TATTTTGTGGT	CCATACAATAAC CAAACAACCAA	
<i>p16</i>	甲基化 Methylation	TTATTAGAGGGT GGGGCGGATCGC	GACCCCGAACC GCGACCGTAA	94℃ 5 min 1cycle; 94℃ 30s, 65℃ 30s, 72℃ 30s, 35 cycle; 72℃ 5 min 1cycle
	非甲基化 Non-methylation	TTATTAGAGGGT GGGGTGGATTGT	CAACCCCAAAACC ACAACCATAA	94℃ 5 min 1cycle; 94℃ 30s, 61℃ 30s, 72℃ 30s, 35 cycle; 72℃ 5 min 1cycle

1.3 统计学分析

用 SPSS 12.0 软件进行统计分析。吸烟率和饮酒率组间比较采用 χ^2 检验;年龄和工龄组间比较采用方差分析。环境中镍化合物和尿镍水平不服从正态分布,且经变量变换仍不呈正态分布,环境中镍化合物以中位数和全距表示;尿镍以中位数和上、下四分位数(P_{25} 和 P_{75})表示,组间比较采用秩和检验(Kruskal-Wallis 法),两两比较采用 Nemenyi 法。以全部个体的中位数作为标准,将尿镍、年龄转换为分类变量,应用多元 logistic 回归分析相关变量的关系。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

由表 2 可见,不同工种间年龄、工龄、吸烟和饮酒方面差异无统计学意义($F=2.156$, $F=1.943$, $\chi^2=8.891$, $\chi^2=1.494$; 均 $P>0.05$)。

表 2 研究对象的基本情况

Table 2 Characteristics of recruited workers

工种 Work types	例数 <i>n</i>	年龄($\bar{x} \pm s$, 岁) Age	工龄($\bar{x} \pm s$, 年) Length of service	吸烟 Smokers		饮酒 Alcohol users	
				例数 <i>n</i>	构成比(%) Percentage	例数 <i>n</i>	构成比(%) Percentage
炼钢工(Steel refining workers)	60	39.77 ± 6.13	20.55 ± 7.61	44	73.33	39	65.00
钢渣处理工(Slaggers)	65	40.67 ± 6.64	19.98 ± 7.72	53	81.53	47	78.33
轧钢工(Mill men)	40	38.55 ± 5.96	17.84 ± 6.11	33	82.50	27	57.60
水处理工(Water treatment workers)	67	40.68 ± 4.84	21.31 ± 5.10	47	70.14	39	58.20

2.2 生产环境可溶性镍化合物和工人尿镍浓度

由表 3 可见,对照组所处的水处理车间空气中未检出可溶性镍化合物,而炼钢车间、钢渣处理车间和轧钢车间空气中的可溶性镍化合物含量明显升高,经 Kruskal-Wallis 检验,4 个车间的总体分布差异有统计学意义($P<0.01$);进一步采用 Nemenyi 分析,炼钢车间、钢渣处理车间和轧钢车间与水处

理车间相比,空气中可溶性镍化合物的含量均明显升高($P<0.01$)。

炼钢工、钢渣处理工、轧钢工和水处理工尿镍水平经 Kruskal-Wallis 检验显示,总体分布差异有统计学意义($P<0.01$);进一步采用 Nemenyi 分析,炼钢工、钢渣处理工、轧钢工和水处理工相比,尿镍水平明显升高($P<0.01$),而接触镍

的各工种间相比,尿镍水平差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 3 不同工种环境监测及尿镍测定结果
Table 3 Results of environmental monitoring and urine nickel determination in various work type groups

工种 Work types	可溶性镍化合物 (mg/m ³) Soluble nickel compounds		尿镍 (μg/L) Urine nickel	
	中位数 Median	全距 Range	中位数 Median	四分位数间距 $P_{25}\sim P_{75}$
炼钢工 Steel refining workers	0.021**	0.009~0.033	5.34**	2.16~11.20
钢渣处理工 Slaggers	0.016**	0.002~0.030	4.59**	1.33~13.08
轧钢工 Mill men	0.014**	0.004~0.024	4.52**	1.91~10.68
水处理工 Water treatment workers	—	—	1.78	0.76~3.52

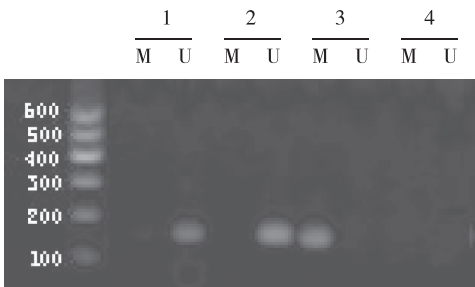
[注]—: 未检出 (Not detected); **: 与水处理工相比 (Compared with the water treatment workers), $P<0.01$ 。

2.3 p15和p16启动子甲基化状态

由表 4 可见, 165 名镍接触组工人的血液 DNA 样本甲基化检出率为 25.45%, 与对照组甲基化检出率 (11.94%) 相比, 差异有统计学意义 ($\chi^2=5.147$, $P=0.023$); 而镍接触组 p16 基因启动子甲基化的检出率 (21.82%) 与对照组 (11.94%) 相比, 差异无统计学意义 ($\chi^2=3.025$, $P=0.082$)。图 1、图 2 分别显示研究对象血样 DNA 中 p15 和 p16 的甲基化状态。

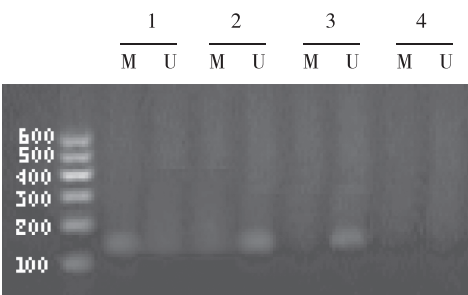
表 4 镍接触组和对照组工人 p15、p16 基因甲基化检测结果
Table 4 Methylation of p15 and p16 in blood DNA of recruited workers

组别 Groups	p15		p16	
	甲基化例数 (n) Methylated number	率 (%) Percentage	甲基化例数 (n) Methylated number	率 (%) Percentage
镍接触组 Exposed group	42	25.45	36	21.82
对照组 Control group	8	11.94	8	11.94



[注] 1~3: 研究对象血样 DNA 标本 (DNA samples of subjects); 4: 阴性对照, 以 H₂O 代替 DNA (Negative control, H₂O instead of DNA); M: 甲基化产物 (Methylated DNA) (148 bp); U: 非甲基化产物 (Non-methylated DNA) (154 bp)。

图 1 p15 启动子甲基化电泳图
Figure 1 Electropherogram of MSP of p15



[注] 1~3: 研究对象血样 DNA 标本 (DNA samples of subjects); 4: 阴性对照, 以 H₂O 代替 DNA (Negative control, H₂O instead of DNA); M: 甲基化产物 (Methylated DNA) (150 bp); U: 非甲基化产物 (Non-methylated DNA) (151 bp)。

图 2 p16 启动子甲基化电泳图
Figure 2 Electropherogram of MSP of p16

2.4 p15 甲基化与尿镍水平的关系

镍接触组和对照组研究对象共 232 名, 尿镍含量的中位数为 3.78 μg/L, 年龄的中位数为 40 岁, 将尿镍和年龄以中位数为界转换为分类变量, 应用多元 logistic 回归分析应变量 p15 启动子甲基化与自变量尿镍含量、年龄、吸烟及饮酒之间的关系。由表 5 可见, 排除年龄、吸烟和饮酒的混杂作用后, p15 甲基化发生的可能性为尿镍浓度高者是尿镍浓度低者的 1.47 倍。

表 5 p15 启动子甲基化与相关变量的多元 logistic 回归分析
Table 5 Multivariate logistic regression analysis of p15 methylation and potential risk factors

变量 (Variables)	p15 甲基化 (p15 methylation)	
	OR (95%CI)	P
尿镍 (Urine nickel)	1.47 (1.03~2.94)	0.024
年龄 (Age)	0.86 (0.43~1.72)	0.671
吸烟 (Smokers)	0.91 (0.49~1.84)	0.631
饮酒 (Alcohol users)	0.84 (0.39~1.87)	0.700

3 讨论

本研究选取某不锈钢冶炼企业年龄、工龄、生活习惯相匹配的炼钢工、钢渣处理工和轧钢工作为镍接触工种, 水处理工为对照工种, 丁二酮肟分光光度法测得炼钢工、钢渣处理工和轧钢工尿镍浓度明显高于水处理工。MSP 检测发现, 镍作业工人 p15 基因启动子区域甲基化发生率明显高于对照组 ($P=0.023$), 但 p16 基因启动子区域甲基化发生率两组比较差异无统计学意义 ($P=0.082$)。p15 是细胞周期的重要调节因子—细胞周期蛋白—激酶抑制因子 (CKI) 家族中的重要成员。p15 的表达产物 p15 INK 4B 可与细胞周期依赖激酶 CDK6 和 CDK4 结合, 阻碍其与细胞周期蛋白 D (Cyclin D) 形成复合物, 使 Cyclin D/CDK6、Cyclin D/CDK4 激酶失活, 导致细胞周期停滞在 G1/S 期, 细胞增殖受到抑制, 呈现抑癌基因的作用^[7]。许多研究已证实, p15 启动子区的异常甲基化是其表达量降低和功能丧失的原因^[8]。本课题组前期动物实验发现, 氯化镍染毒大鼠肺组织中 p15 启动子发生甲基化, 且 mRNA 表达量随着镍染毒剂量的增加而降低^[9]。有研究表明, 不同类型和期别的肿瘤抑癌基因的甲基化是有差别的^[10], 本研究在镍接触工人血

心理健康的不良影响,此外,针对不良的职业特征因素,需要进一步采取措施提高合同制护士待遇与地位和合理安排轮班制度,更好地维护和促进护士的心理健康。

•作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] GAO Y Q, PAN B C, SUN W, et al. Depressive symptoms among Chinese nurses: prevalence and the associated factors[J]. J Adv Nurs, 2012, 68(5): 1166-1175.
- [2] KARASEK R, BRISSON C, KAWAKAMI N, et al. The Job Content Questionnaire (JCQ): an instrument for internationally comparative assessments of psychosocial job characteristics[J]. J Occup Health Psychol, 1998, 3(4): 322-355.
- [3] SILVA LS, BARRETO SM. Adverse psychosocial working conditions and minor psychiatric disorders among bank workers[J]. BMC Public Health, 2010, 10: 686.
- [4] 杨文杰, 李健. 工作场所中社会心理因素的测量——两种职业紧张检测模式的应用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2004, 22(6): 422-426.
- [5] 张继娜, 施学忠, 张华果. 护理人员职业紧张评定方法与研究现状[J]. 河南职工医学院学报, 2011, 23(6): 781-783.
- [6] LI J, YANG W, LIU P, et al. Psychometric evaluation of the Chinese (mainland) version of Job Content Questionnaire: a study in university hospitals[J]. Ind Health, 2004, 42(2): 260-267.
- [7] 汪向东, 王希林, 马弘. 心理卫生评定量表手册(增订版)[M]. 北京: 中国心理卫生杂志社, 1999: 193-197.

(上接第 487 页)

液 DNA 中仅发现 *p15* 启动子甲基化发生率明显增高,而 *p16* 未发现此类变化,可能与此原因有关,其机制尚有待于扩大样本进一步研究。

经 logistic 多元回归分析,排除年龄、吸烟和饮酒的混杂作用后,尿镍浓度高的个体 *p15* 甲基化发生的可能性为尿镍浓度低的个体的 1.47 倍。提示尿镍浓度升高是 *p15* 甲基化发生的危险因素,因此在对镍作业工人进行健康体检时需要密切关注尿镍的含量。

•作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] GRIMSRUD TK, BERGE SR, MARTINSEN JJ, et al. Lung cancer incidence among Norwegian nickel-refinery workers 1953-2000[J]. J Environ Monit, 2003, 5(2): 190-197.
- [2] KASPRZAK KS, SUNDERMAN FW Jr, SALNIKOW K. Nickel carcinogenesis[J]. Mutat Res, 2003, 533(1/2): 67-97.
- [3] ARITA A, COSTA M. Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium[J]. Metallomics, 2009, 1(3): 222-228.
- [4] LEE SH, SHIAO YH, PLISOV SY, et al. Nickel(II) acetate-treated Chinese hamster ovary cells differentially express Vimentin, hSNF2H

- [8] 王文菁, 谭文艳. Zung 抑郁自评量表的因子分析[J]. 广东医学, 2011, 32(16): 2191-2193.
- [9] 余善法, 姚三巧, 丁辉, 等. 抑郁症状与职业紧张的关系[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006, 24(3): 129-133.
- [10] 徐清芝, 徐敏, 乔元, 等. 精神科护理人员焦虑抑郁情绪与工作压力的关系[J]. 精神医学杂志, 2010, 23(4): 250-252.
- [11] 杨晓芳, 胡绍云. 护士社会支持及应对方式与焦虑、抑郁的关系研究[J]. 中国健康心理学杂志, 2011, 19(3): 300-301.
- [12] 周月艳. 急诊护士的社会支持与抑郁心理及从业感的调查[J]. 当代护士(学术版), 2004, 7(6): 5-7.
- [13] 吴金贵, 唐传喜, 庄祖嘉, 等. 职业紧张对不同职业人群抑郁症状的影响[J]. 环境与职业医学, 2012, 29(1): 13-17.
- [14] ABUALRUB RF. Job stress, job performance, and social support among hospital nurses[J]. J Nurs Scholarsh, 2004, 36(1): 73-78.
- [15] 江爱玉, 李明, 苏雅芳. 合同制护士焦虑抑郁状况与社会支持的调查分析[J]. 中国实用护理杂志, 2007, 23(15): 61-62.
- [16] 李占敏, 卢春爱, 董爱英, 等. 精神科三班倒护士与非三班倒护士生活质量比较研究[J]. 中国健康心理学杂志, 2011, 19(5): 559-560.
- [17] 谢震宇, 杨黎明, 戴俊明, 等. 上海市某区社区卫生服务中心医务人员职业紧张现状调查[J]. 环境与职业医学, 2010, 27(3): 146-149.
- [18] 韩旭, 范里莉, 曹颖俐, 等. 军队医院合同制护士心理健康问题分析[J]. 中国医药导刊, 2010, 12(7): 1278-1279.

(收稿日期: 2011-12-26)

(英文编审: 薛寿征; 编辑: 洪琪; 校对: 张晶)

homologue, and H ferritin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 258(3): 592-595.

- [5] 中华人民共和国卫生部. GBZ/T 160.16—2004 工作场所空气中镍及其化合物的测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [6] 中华人民共和国卫生部. WST 43—1996 尿中镍的分光光度测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1996.
- [7] RODRIGUES EF, SANTOS-REBOUÇAS CB, GONÇALVES PIMENTEL MM, et al. Epigenetic alterations of *p15* (INK4B) and *p16* (INK4A) genes in pediatric primary myelodysplastic syndrome[J]. Leuk Lymphoma, 2010, 51(10): 1887-1894.
- [8] XING C, WANG QF, LI B, et al. Methylation and expression analysis of tumor suppressor genes *p15* and *p16* in benzene poisoning[J]. Chem Biol Interact, 2010, 184(1/2): 306-309.
- [9] 杨瑾, 王志武, 刘承芸, 等. 维生素 E 对氯化镍染毒大鼠肺组织 *p15* 基因甲基化过程的影响[J]. 环境与职业医学, 2011, 28(7): 409-413.
- [10] ESTELLER M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future[J]. Oncogene, 2002, 21(35): 5427-5440.

(收稿日期: 2011-11-11)

(英文编审: 薛寿征; 编辑: 张晶; 校对: 郭薇薇)