

介入放射诊疗工作人员机体DNA甲基化状态与职业暴露的关系

章群¹, 闫鹏¹, 肖国兵², 李小平¹, 王爱红¹, 王永¹

摘要:

[目的] 探讨介入放射诊疗工作人员职业暴露对机体DNA甲基化状态、甲基化相关酶类及甲基化次生产物的影响。

[方法] 暴露组为120名放射工龄3年以上的介入放射诊疗工作人员, 对照组为性别相同、年龄 ± 3 岁的120名非放射诊疗医技人员。采集空腹静脉血, 前处理后通过高效液相色谱法和酶标法依次检测DNA总甲基化率、DNA甲基化转移酶(DNA methyltransferase, Dnmt)和同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)的表达水平并比较两组差异。采用偏相关和协方差分析暴露组人群DNA甲基化指标与年有效剂量监测值和介入工龄的关系。采用多元线性回归分析个人剂量监测值、介入工龄、年龄等因素对机体甲基化状态的影响。

[结果] 暴露组Dnmt为 $(0.064 \pm 0.043) \times 10^3$ U/L, Hcy为 $(10.37 \pm 3.92) \mu\text{mol/L}$, 均高于对照组 $[(0.047 \pm 0.035) \times 10^3$ U/L和 $(9.32 \pm 3.90) \mu\text{mol/L}]$ ($P < 0.05$), 但DNA总甲基化率[暴露组 $(8.10 \pm 1.53)\%$, 对照组 $(8.47 \pm 1.41)\%$]组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。暴露组年有效剂量值与Dnmt呈正相关($r=0.671$, $P=0.00$), 未发现其他指标与年累积个人剂量值存在相关性。多因素分析显示, 年龄和介入工龄(标准化回归系数分别为 -0.182 和 -0.298 , 均 $P < 0.01$)是影响介入工作者机体甲基化状态的重要因素。

[结论] 介入放射诊疗工作者职业暴露对机体DNA甲基化过程中的相关酶类及代谢产物的表达存在一定影响, 但未见对DNA甲基化状态的影响。

关键词: 介入放射诊疗工作者; DNA总甲基化率; DNA甲基化转移酶; 同型半胱氨酸

引用: 章群, 闫鹏, 肖国兵, 等. 介入放射诊疗工作人员机体DNA甲基化状态与职业暴露的关系[J]. 环境与职业医学, 2018, 35(7): 629-633. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.18170

Relationship between DNA methylation and occupational exposure among radiologists engaged in interventional treatment ZHANG Qun¹, YAN Peng¹, XIAO Guo-bing², LI Xiao-ping¹, WANG Ai-hong¹, WANG Yong¹ (1.Division of Environmental and Occupational Health, Ningbo Municipal Center for Disease Control and Prevention, Ningbo, Zhejiang 315010, China; 2.Ningbo Municipal Health Supervision Institute, Ningbo, Zhejiang 315010, China). Address correspondence to ZHANG Qun, E-mail: 786794914@qq.com
• The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To evaluate the effects of occupational exposure to radiation during interventional procedures on DNA methylation, DNA methylation related enzymes, and methylation metabolites.

[Methods] The exposure group was composed of 120 radiologists who had been engaged in interventional treatment for more than three years, and the control group included 120 non-interventional radiologists matched for sex and age (\pm three years) with the exposure group. Total methylation rate of DNA and expression levels of DNA methyltransferase (Dnmt) and homocysteine (Hcy) in fasting venous blood samples were detected and compared by high performance liquid chromatography and enzyme-linked assay, respectively. The relationships of DNA methylation related indicators with annual effective individual dose and working age for interventional radiology were analyzed by partial correlation analysis and analysis of covariance. The effects of individual dose, working age for interventional radiology, age, and other factors on the methylation levels of the subjects were analyzed by multi-factor linear regression.

[Results] The expression levels of Dnmt $[(0.064 \pm 0.043) \text{ U/mL}]$ and Hcy $[(10.37 \pm 3.92) \mu\text{mol/L}]$ in the exposure group were higher than those in the control group $[(0.047 \pm 0.035) \times 10^3 \text{ U/L}]$ and $(9.32 \pm 3.90) \mu\text{mol/L}]$ ($P < 0.05$); however, the total DNA

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 浙江省医药卫生科技计划项目(编号: 2017KYB601); 宁波市自然科学基金项目(编号: 2016A610180)

[作者简介] 章群(1979—), 男, 硕士, 主管医师; 研究方向: 放射卫生; E-mail: 786794914@qq.com

[通信作者] 章群, E-mail: 786794914@qq.com

[作者单位] 1.宁波市疾病预防控制中心环境与职业卫生所, 浙江 宁波 315010; 2.宁波市卫生监督所, 浙江 宁波 315010

methylation rate was not statistically different between the two groups [exposure group: $(8.10 \pm 1.53)\%$ vs control group: $(8.47 \pm 1.41)\%$] ($P > 0.05$). Annual effective individual dose in the exposure group was positively correlated with Dnmt ($r=0.671$, $P=0.00$), but not correlated with other indicators. The results of multi-factor analysis showed that age and working age for interventional radiology were important factors affecting DNA methylation levels of interventional radiologists (standardized partial regression coefficients were -0.182 and -0.198 , respectively, $P_s < 0.01$).

[Conclusion] Occupational exposure to interventional treatment relevant radiation may affect the expression of related enzymes and metabolites in the process of DNA methylation, but has little effect on the DNA methylation of interventional radiologists.

Keywords: interventional radiologist; DNA total methylation rate; DNA methyltransferase; homocysteine

Citation: ZHANG Qun, YAN Peng, Xiao Guo-bing, et al. Relationship between DNA methylation and occupational exposure among radiologists engaged in interventional treatment[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2018, 35(7): 629-633. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.18170

近年来,随着放射防护工作的日趋完善,放射诊疗工作人员电离辐射职业剂量负担逐年降低,大多数放射诊疗工作人员职业照射年有效剂量远低于国家标准规定的剂量限值。但某些特殊的放射工种,如介入放射诊疗工作(后称“介入工作”)因无法实现隔室操作,工作环境中依然存在一定剂量的电离辐射。现有研究显示电离辐射可诱导DNA异常甲基化改变,即全基因组DNA低甲基化和基因启动子区CpG岛DNA的高甲基化,国际辐射防护委员会(International Commission on Radiological Protection, ICRP)103号报告亦指出,电离辐射存在基于表观遗传的远后效应,尤其是DNA甲基化的改变^[1]。但电离辐射诱导的异常甲基化效应是否存在剂量阈值尚无相关报道。LEE等^[2]对核电厂工作人员(年有效剂量为5.3 mSv)职业辐射暴露诱导DNA甲基化改变的队列分析提示,低剂量电离辐射职业暴露也可能造成机体DNA甲基化的改变,全基因组甲基化水平与辐射剂量呈负相关。介入工作人员年累积剂量在1~3 mSv之间,其职业暴露是否也导致机体DNA甲基化状态的改变,而DNA低甲基化可影响基因表达的稳定性,进而引起基因的异常表达。机体DNA甲基化状态主要通过DNA总甲基化率加以评价,DNA甲基化过程相关酶类如DNA甲基化转移酶(DNA methyltransferase, Dnmt),及DNA甲基化过程中的甲硫氨酸的次生产物同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)均可作为低剂量电离辐射会影响机体DNA甲基化状态的佐证。基于此,本研究拟通过检测介入工作人员生物样品中DNA甲基化相关指标的表达水平,以评估电离辐射职业暴露对研究对象机体DNA甲基化的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象

于2017年1—5月,从宁波市某三甲医院职业健

康体检中心筛选出240名医技工作人员,按工作过程是否存在电离辐射职业暴露分为暴露组(120名)和对照组(120名)。纳入标准:暴露组,从事介入工作3年以上的放射工作人员,介入工作状态稳定;对照组,与暴露组对象按1:1匹配性别相同、年龄 ± 3 岁的B超、心电图等辅助诊疗科室非放射医技人员。排除标准:患有冠心病、心肌梗死、脑卒中、高血压、糖尿病、肝肾疾病等严重影响检测指标的器质性疾病者,研究对象在静脉血采集期间无发热、服药等突发事件。研究对象年龄、性别、生活方式等基线资料来源于职业健康体检报告。

1.2 研究方法

1.2.1 样品的采集及前处理 采集研究对象晨起空腹EDTA抗凝静脉血5 mL,取400 μ L使用全血DNA小量试剂盒(Simgen,德国)提取DNA,通过NanoDrop 2000C型核酸蛋白检测仪(Thermo,美国)测定DNA浓度后储存于 -20°C 冰箱备用。其余血样在1~14型高速离心机(Sigma,德国)3000 r/min(离心半径19.2 cm)离心30 min分离血清后置于 -80°C 冰箱备检。

1.2.2 高效液相色谱法检测DNA总甲基化率 按照一步法DNA水解试剂盒(EpiQuik,美国)说明书要求水解DNA样品。确定高效液相色谱仪(安捷伦,美国)的检测条件:色谱柱为Kromasil C18 250 mm \times 4.6 mm,流动相为水:甲醇(体积比)=7:3,流速1 mL/min,进样量20 μ L,波长285 nm,柱温30 $^{\circ}\text{C}$ 。检测不同浓度的2-脱氧胞苷(2-dc; TCI,日本)和5-甲基脱氧胞苷(5-dmc; Sigma,美国)标准品确定标准方程,DNA水解样品进样检测并计算2-dc和5-dmc的浓度,根据公式 $C_{5-dmc}/(C_{2-dc}+C_{5-dmc}) \times 100\%$,计算样品中的DNA总甲基化率。

1.2.3 酶标法检测Dnmt及Hcy 按照人Hcy ELISA检测试剂盒(杭州新景生物试剂开发有限公司,中国)和DNA甲基化转移酶活性/抑制分析试剂盒

(Epigentek, 美国)说明书要求处理标准品和血清样品, 酶标仪按照试剂盒要求设定 450 nm 波长并检测 Dnmt 和 Hcy 的光密度 D 值, 按说明书标准曲线计算样品指标的浓度。

1.3 统计学分析

实验数据及研究对象基线资料录入 Excel 2010 后, 导入 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 采用 χ^2 检验进行分类变量间的比较, 变量赋值见表 1; 采用成组 t 检验进行暴露组和对照组间 DNA 甲基化指标的差异性比较; 考虑年龄是 DNA 甲基化相关指标的混杂因素, 采用偏相关和协方差分析暴露组 DNA 甲基化指标与年有效剂量监测值和介入工龄的关系。偏相关分析时年龄为控制因素, 协方差分析前采用一般线性模型中的单因素分析进行斜率同质性检验, 再通过协方差分析比较不同介入工龄组指标间的差异, 不同工龄组间两两比较采用 LSD 法。采用多元线性回归进行研究对象 DNA 甲基化影响因素的分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

表 1 分类变量赋值情况

变量名称	赋值情况
电离辐射职业暴露	1=职业暴露, 2=无职业暴露
性别	1=男, 2=女
年龄	1= ≤ 34 岁, 2=35~44岁, 3= ≥ 45 岁
介入操作年限	0=0年(对照), 1=1~5年, 2=6~10年, 3= ≥ 11 年
年有效剂量	0=0mSv(对照), 1= ≤ 1 mSv, 2= >1 mSv
吸烟	1=不吸烟, 2=偶尔吸烟, 3=经常吸烟
饮酒	1=不饮酒, 2=偶尔饮酒, 3=经常饮酒

2 结果

2.1 基本情况

暴露组: 120名, 男性 89名(74.2%), 女性 31名(25.8%)。年龄范围为 28~50(38.98 \pm 5.87)岁, 从事介

入放射诊疗工作平均年限为(8.17 \pm 3.49)年, 其 2016 年度职业照射年有效剂量为(1.037 \pm 0.609)mSv。对照组: 120名, 性别匹配, 年龄范围为 27~53(40.08 \pm 6.87)岁。两组人群在吸烟($\chi^2=2.771$, $P=0.250$)和饮酒($\chi^2=3.294$, $P=0.193$)分布差异无统计学意义。

2.2 两组间 DNA 甲基化指标的比较

暴露组 Hcy 和 Dnmt 的表达水平高于对照组 ($P < 0.05$), 两组 DNA 总甲基化率差异不存在统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 暴露组和对照组间 DNA 甲基化相关指标的比较

组别	n	DNA 总甲基化率(%)	Hcy($\mu\text{mol/L}$)	Dnmt($\times 10^3 \text{U/L}$)
暴露组	120	8.10 \pm 1.53	10.37 \pm 3.92	0.064 \pm 0.043
对照组	120	8.47 \pm 1.41	9.32 \pm 3.90	0.047 \pm 0.035
t		-1.940	2.037	2.249
P		0.054	0.043	0.026

2.3 不同年有效剂量暴露者的 DNA 甲基化指标

暴露组中, 年有效剂量 ≤ 1 mSv 者 Dnmt 表达水平均低于 > 1 mSv 者 ($P < 0.05$), 未发现其他指标在两类研究对象间存在差异 ($P > 0.05$), 见表 3。DNA 甲基化指标与年有效剂量的偏相关分析显示, 暴露组年有效剂量与 Dnmt 表达水平呈正相关 ($r=0.671$, $P=0.00$), 未发现 DNA 总甲基化率和 Hcy 表达水平与有效剂量间存在相关 ($P > 0.05$), 见图 1。

表 3 不同年有效剂量的暴露组间 DNA 甲基化相关指标的比较 ($n=120$)

年有效剂量(mSv)	n	DNA 总甲基化率(%)	Hcy($\mu\text{mol/L}$)	Dnmt($\times 10^3 \text{U/L}$)
≤ 1	80	8.12 \pm 1.54	10.15 \pm 3.77	0.049 \pm 0.029
> 1	40	8.06 \pm 1.54	10.84 \pm 4.23	0.093 \pm 0.053
t		0.208	-0.910	-4.896
P		0.835	0.365	0.000

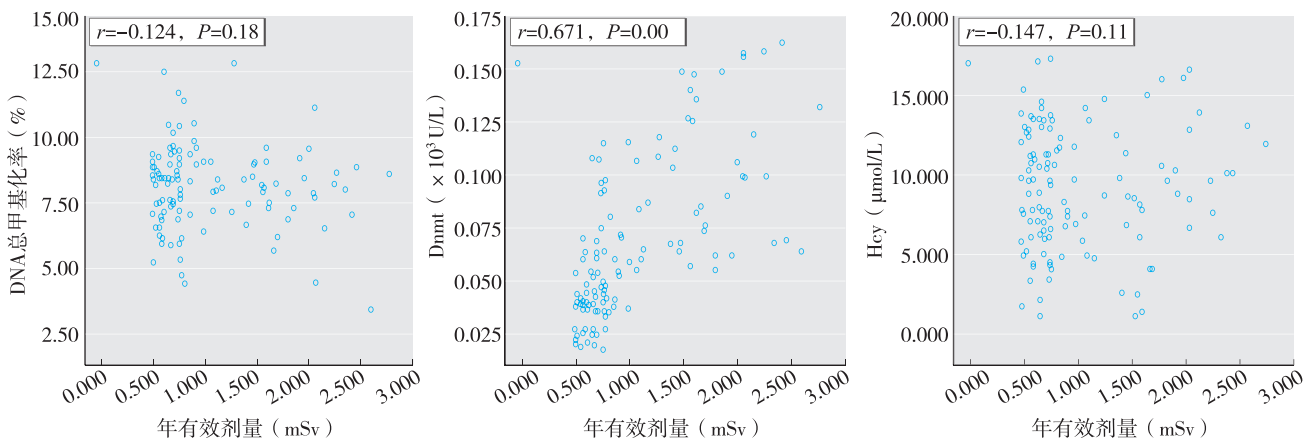


图 1 暴露组年有效剂量与 DNA 甲基化相关指标的相关性

2.4 不同介入工作年限暴露者的DNA甲基化指标

不同介入操作年限的研究对象间DNA总甲基化率存在差异($P < 0.05$),但未发现Hcy和Dnmt表达水平存在差异($P > 0.05$),见表4。不同介入操作年限组间均数两两比较显示,在控制年龄因素后,介入操作年限三组间DNA总甲基化率均存在差异($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.042$),随操作年限的增加,DNA总甲基化率降低。

表4 不同介入工作年限的暴露组间DNA甲基化相关指标的比较($n = 120$)

年限(年)	<i>n</i>	DNA总甲基化率(%) ^a	Hcy($\mu\text{mol/L}$) ^b	Dnmt($\times 10^3 \text{U/L}$) ^c
<6	50	8.91 ± 1.55	8.73 ± 3.27	0.073 ± 0.048
6~	38	7.90 ± 1.22	10.91 ± 4.49	0.071 ± 0.048
>10	32	7.08 ± 1.11	12.31 ± 3.10	0.041 ± 0.016
<i>F</i>		11.151	0.022	1.956
<i>P</i>		0.000	0.978	0.146

[注]斜率同质性检验, a: $F = 0.084$, $P = 0.920$; b: $F = 0.611$, $P = 0.544$; c: $F = 0.491$, $P = 0.614$; 均符合协方差分析斜率相同的条件。

2.5 多元线性回归分析DNA甲基化的影响因素

将年龄分组、性别、介入操作年限分组、年有效剂量分组、吸烟和饮酒纳入以DNA总甲基化率为应变量的多元线性回归方程,按逐步法($\alpha_{\text{入}} = 0.05$, $\alpha_{\text{出}} = 0.10$)逐个剔除无统计学差异的自变量。结果显示年龄和介入操作年限分组进入回归模型,而年累积剂量分组未进入回归方程,见表5。

表5 以DNA总甲基化率为应变量的多元线性回归分析($n = 240$)

常数和自变量	偏回归系数	标准误	标准化回归系数	<i>t</i>	<i>P</i>
常数项	9.691	0.294	—	32.977	0.000
年龄分组	-0.423	0.143	-0.182	-2.948	0.004
介入操作年限分组	0.454	0.094	-0.298	-4.842	0.000

3 讨论

介入工作人员长期暴露于低剂量电离辐射工作环境,虽有铅屏风、铅衣等防护措施,但年有效剂量仍高于其他隔室操作的放射工作者。电离辐射可改变机体的DNA甲基化状态,本研究未发现介入工作人员与对照组间在DNA总甲基化率上存在差异,且未发现暴露组内不同年有效剂量受照对象总甲基化率和Hcy表达水平存在差异。这一结果提示电离辐射的甲基化效应可能存在剂量阈值。电离辐射剂量阈值的相关研究较多,确定性效应明确的剂量阈值为长期连续或间断超剂量受照年有效剂量150mSv^[3],而长期

小剂量($< 150 \text{mSv/年}$)照射主要为随机性效应。现有文献提示年有效剂量在100~500mSv,随机性效应如造血系统慢性损伤、白血病、甲状腺癌、慢性心血管损伤等发病率增加^[4-7]。亦有文献提示年有效剂量在20~100mSv,眼晶体浑浊率、微核率和染色体畸变率增加^[8-9]。而电离辐射DNA甲基化效应的剂量阈值未见相关文献阐述,放射工作者DNA甲基化存在差异的最小年有效剂量为5.3mSv^[2]。本次研究组间和组内比较均发现电离辐射与Dnmt表达存在关联,提示微小剂量电离辐射持续暴露对机体DNA甲基化循环仍存在一定影响,但未发现DNA总甲基化率存在差异。这一结果可能与介入工作者因职业照射导致的年有效剂量较小[(1.037 ± 0.609)mSv],尚不足以导致机体甲基供体消耗与补给的失代偿,从而打破机体全基因组DNA甲基化循环稳态有关。此外,本研究通过控制年龄的协方差分析,发现DNA甲基化率随介入工龄的增加呈下降趋势,提示长期微量电离辐射职业暴露对机体DNA甲基化率存在影响,而工龄的长短对短期效应指标Dnmt和Hcy影响不大。

在甲基化相关指标的多元线性回归分析中发现,年龄是改变机体DNA甲基化状态的重要影响因素,随着年龄的增大,机体DNA总甲基化率缓慢下降。这与国内外众多年龄与DNA甲基化的研究结果相符。如RICHARDSON等^[10]的研究表明,Dnmt1和Dnmt3a表达水平均随年龄的增加而下降。ALISCH等^[11]对27578例研究对象的外周血Dnmt的表达水平检测结果显示,Dnmt表达水平与年龄呈线性负相关。尹慧等^[12]检测不同年龄段研究对象外周血5-dmc含量显示,5-dmc含量随着年龄的增长以年均-0.014%的速度下降。本研究中对照人群是以年龄±3岁匹配的,其样本均值较暴露组稍大,对DNA总甲基化率的差异性比较是否存在细微影响尚需进一步论证。本次研究还发现随着介入操作年限的增加,DNA总甲基化率缓慢下降。提示电离辐射致全基因组DNA甲基化改变可能是一个长期的过程,介入操作年限和年龄的叠加作用可能影响DNA甲基化状态的恢复,进而使机体处于总甲基化相对较低水平。本研究未发现年有效剂量进入以DNA总甲基化率为应变量的多元线性回归方程,提示电离辐射对机体DNA甲基化的改变是一个复杂而又长期的过程,机体存在强大的平衡修复能力,短期电离辐射职业暴露尚不足以快速改变机体的DNA甲基化状态。

综上,介入工作者电离辐射职业暴露对机体的DNA甲基化状态影响较小,但DNA甲基化次生产物Hcy高于对照人群,而Hcy是心血管损伤的独立危险因素^[13]。有研究提示,电离辐射对心血管系统存在慢性损伤效应^[4,14],这是否与电离辐射过程中DNA甲基化代偿机制产生的Hcy有关,尚需进一步深入研究。DNA甲基化影响因素较多,本研究仅考虑了工作环境、年龄、吸烟和饮酒对DNA甲基化检测值的影响。因样本来源偏少,遗传、生活环境、饮食等因素均未纳入,这对研究结果的外推可能存在一定的影响,在今后的研究中仍待进一步完善和改进。

参考文献

- [1] ICRP. ICRP Publication 103: The 2007 recommendations of the international commission on radiological protection [R]. New York: Elsevier Science, 2007.
- [2] LEE Y, KIM YJ, CHOI YJ, et al. Radiation-induced changes in DNA methylation and their relationship to chromosome aberrations in nuclear power plant workers [J]. Int J Radiat Biol, 2015, 91(2): 142-149.
- [3] 外照射慢性放射病诊断标准: GBZ 105—2002[S]. 北京: 法律出版社, 2002.
- [4] YENTRAPALLI R, AZIMZADEH O, BARJAKTAROVIC Z, et al. Quantitative proteomic analysis reveals induction of premature senescence in human umbilical vein endothelial cells exposed to chronic low-dose rate gamma radiation [J]. Proteomics, 2013, 13(7): 1096-1107.
- [5] ANTWIH DA, GABBARA KM, LANCASTER WD, et al. Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways [J]. Epigenetics, 2013, 8(8): 839-848.
- [6] ICRP. ICRP Publication 60: 1990 recommendations of the International Commission on Radiological Protection [R]. New York: Elsevier Science, 1991.
- [7] ICRP. ICRP Publication 118: 2012 ICRP statement on tissue reactions/early and late effects of radiation in normal tissues and organs-threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context [R]. New York: Elsevier Science, 2012.
- [8] 李南春, 陈瑞梅, 陈朝军, 等. 清远市放射工作人员健康状况调查 [J]. 中国职业医学, 2010, 37(4): 303-305, 307.
- [9] 张其波, 焦永法, 刘京伟, 等. 长期低剂量职业照射对放射工作者健康影响 [J]. 中国公共卫生, 2015, 31(3): 362-364.
- [10] RICHARDSON BC. Role of DNA methylation in the regulation of cell function: autoimmunity, aging and cancer [J]. J Nutr, 2002, 132(8): 2401S-2405S.
- [11] ALISCH RS, BARWICK BG, CHOPRA P, et al. Age-associated DNA methylation in pediatric populations [J]. Genome Res, 2012, 22(4): 623-632.
- [12] 尹慧, 黄代新, 翟仙敦, 等. HPLC法检测人外周血5mC含量及其与年龄相关性研究 [J]. 中国法医学杂志, 2007, 22(1): 8-11.
- [13] 陈健, 张金枝. 高同型半胱氨酸血症: 心脑血管疾病的独立危险因素 [J]. 心血管病学进展, 2000, 21(2): 75-78.
- [14] LITTLE MP, TAWN EJ, TZOULAKI I, et al. A systematic review of epidemiological associations between low and moderate doses of ionizing radiation and late cardiovascular effects, and their possible mechanisms [J]. Radiat Res, 2008, 169(1): 99-109.

(收稿日期: 2018-02-22; 录用日期: 2018-05-10)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 王晓宇)

尘肺病治疗中国专家共识将于本刊近期刊出,
敬请期待!