

饮酒与多环芳烃职业暴露在焦炉工人外周血 *OGG1* 甲基化改变中的交互作用

牛莹莹, 张彬, 傅晔, 李学晶, 刘艳丽, 杨瑾

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

摘要:

[目的] 探讨饮酒与多环芳烃 (PAHs) 暴露在焦炉工人外周血 8-羟基鸟嘌呤糖苷酶 (*OGG1*) 甲基化变化中是否存在交互作用。

[方法] 采用现况研究, 选择某焦化厂焦炉工人 303 人作为研究对象。通过调查问卷获得工人基本信息, 并采集血样和尿液。以尿中代谢物 2-羟基萘 (2-NAP)、2-羟基芴 (2-FLU)、9-羟基菲 (9-PHE) 和 1-羟基芘 (1-OHP) 作为 PAHs 内暴露的标志物, 采用高效液相色谱-荧光检测法检测尿中 4 种代谢物的水平。采用焦磷酸测序法检测 *OGG1* 基因 4 个位点 (分别距 5' 端第一个外显子 106、121、126、142 bp) 的甲基化水平。采用多因素 logistic 回归分析 PAHs 和饮酒与 *OGG1* 甲基化的关系, 采用趋势检验和限制性立方样条分析其剂量反应关系。

[结果] 按照尿 1-OHP 水平的四分位数水平, 将研究人群分为 Q1~Q4 四组。结果发现不同尿 1-OHP 组间, 年龄分布存在差异 ($P=0.033$); 随着尿中 1-OHP 水平的增加, 2-FLU 和 9-PHE 均有上升的趋势。采用多元 logistic 回归分析, 在控制了性别、年龄、受教育时间、吸烟与否、供暖方式及其他 3 种代谢物后, 1-OHP 水平、饮酒均与 *OGG1* 基因位点 4 高甲基化密切相关, *OR* 值分别为 2.97 (95%CI: 1.20~7.38) 和 1.67 (95%CI: 1.01~2.79); 但未发现其他 3 种尿中代谢物与 *OGG1* 甲基化存在相关关系。以 1-OHP 水平处于 Q1 组且不饮酒者为参照组, 1-OHP 水平处于 Q4 组且饮酒者发生 *OGG1* 位点 4 高甲基化的风险是参照组的 4.00 倍 (95%CI: 1.19~13.47)。

[结论] 饮酒和尿 1-OHP 水平在焦炉工人外周血 *OGG1* 位点 4 的甲基化变化中存在交互作用。

关键词: 多环芳烃; 饮酒; 1-羟基芘; 8-羟基鸟嘌呤糖苷酶; 甲基化

Interaction effects of alcohol drinking and polycyclic aromatic hydrocarbons exposure on peripheral blood *OGG1* methylation in coke oven workers NIU Ying-ying, ZHANG Bin, FU Ye, LI Xue-jing, LIU Yan-li, YANG Jin (Department of Occupational Health, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract:

[Objective] To investigate whether alcohol drinking and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) exposure have interaction effects on the peripheral blood 8-oxoguanine DNA glycosylase (*OGG1*) methylation in coke oven workers.

[Methods] A total of 303 workers from a coking plant were recruited. General information was collected by questionnaire survey. Blood samples and urinary samples were collected to test the urinary concentrations of four PAHs metabolites, including 2-hydroxynaphthalene (2-NAP), 2-hydroxyfluorene (2-FLU), 9-hydroxyphenanthrene (9-PHE), and 1-hydroxypyrene (1-OHP) by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. The methylations on four sites in *OGG1* (106 bp, 121 bp, 126 bp, and 142 bp from the 5' end of the first exon) were detected by pyrosequencing. Multiple logistic regression analysis was conducted to assess the relationship of *OGG1* methylation with PAHs and alcohol drinking; trend analysis and restrictive cubic spline were adopted to analyze the dose-response relationship.

[Results] The participants were divided into four groups by quartiles (Q1-Q4) of urinary 1-OHP concentration. There was a significant difference in age distribution between different 1-OHP level groups ($P=0.033$). The levels of 2-FLU and 9-PHE showed increasing trends with higher 1-OHP levels. The results of multivariate logistic regression analysis revealed that urinary 1-OHP ($OR=2.97$, 95%CI: 1.20-7.38) and alcohol drinking ($OR=1.67$, 95%CI: 1.01-2.79) were closely

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18633

基金项目

国家自然科学基金项目 (81273041); 山西省自然科学基金项目 (201701D121146)

作者简介

牛莹莹 (1992—), 女, 硕士生;
E-mail: nyy1209@163.com

通信作者

杨瑾, E-mail: yang_jin@sxum.edu.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2018-09-28

录用日期 2018-12-05

文章编号 2095-9982(2019)03-0197-07

中图分类号 R134

文献标志码 A

►引用

牛莹莹, 张彬, 傅晔, 等. 饮酒与多环芳烃职业暴露在焦炉工人外周血 *OGG1* 甲基化改变中的交互作用 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (3): 197-203.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18633

Funding

This study was funded.

Correspondence to

YANG Jin, E-mail: yang_jin@sxum.edu.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2018-09-28

Accepted 2018-12-05

►To cite

NIU Ying-ying, ZHANG Bin, FU Ye, et al. Interaction effects of alcohol drinking and polycyclic aromatic hydrocarbons exposure on peripheral blood *OGG1* methylation in coke oven workers[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(3): 197-203.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18633

associated with the hypermethylation on site 4 in *OGG1* after adjusting for sex, age, education, smoking, heating mode, 2-NAP, 2-FLU, and 9-PHE. However, there were no significant relationships between the other three metabolites and *OGG1* methylation. The coke oven workers with both urinary 1-OHP Q4 level and reported alcohol drinking had a higher risk of hypermethylation on site 4 in *OGG1* than the workers with urinary 1-OHP Q1 level and without alcohol consumption ($OR=4.00$, 95%CI: 1.19-13.47).

[Conclusion] Interactive effect of urinary 1-OHP levels and drinking on hypermethylation on site 4 in *OGG1* is identified among coke oven workers.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons; drinking; 1-hydroxypyrene; 8-oxoguanine DNA glycosylase; methylation

焦炉作业过程中会产生大量的焦炉逸散物,包括多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)、一氧化碳、二氧化碳、苯系物等有害物质,与人类多种不良健康结局有关。大量动物和人群流行病学研究表明,PAHs 职业暴露可增加癌症如肺癌、直肠癌及多种慢性疾病、心血管疾病发病风险^[1-3]。其中长期接触以 PAHs 为代表的焦炉逸散物所致肺癌,是我国重要的职业性肿瘤之一。

肿瘤发生的重要特征是肿瘤细胞全基因组低甲基化及特殊基因 (启动子 CpG 岛) 高甲基化。在正常人外周血中, 8-羟基鸟嘌呤糖苷酶 (8-oxoguanine DNA glycosylase, *OGG1*) 呈低甲基化状态。有研究表明^[4], *OGG1* 的甲基化状态会随时间变化,从而在致癌作用中发挥作用。Neven 等^[5]的研究发现空气细颗粒物的暴露与胎盘 *OGG1* 甲基化升高有关,但炭黑的暴露与 *OGG1* 甲基化程度无关。Alvarado-Cruz 等^[6]也发现空气颗粒物中萘的暴露能引起小学生外周血 *OGG1* 甲基化水平增加。在对乳腺癌的研究中, Fleischer 等^[7]的研究结果显示肿瘤组织 *OGG1* 的甲基化水平与预后密切相关,与正常甲基化水平的患者相比, *OGG1* 高甲基化者预后较差,这在大样本的研究中得到验证^[8]。这些研究表明 *OGG1* 甲基化水平受有害因素暴露的影响,且与疾病结局有关。

由于焦炉工职业的特殊性,工人多为男性,男性多喜饮酒。而饮酒作为一种不良的生活方式,其与疾病的关系已经被人们所熟知。流行病学研究表明,在食道癌、肝癌和大肠癌中,酒精与肿瘤抑制基因 (*HIN1*, *TFPI-2*, *DACH1* 和 *SOX17*) 启动子高甲基化和全基因组低甲基化密切相关^[9]。目前关于饮酒与 *OGG1* 的关系,多集中于饮酒与 *OGG1* 基因多态性的研究^[10],而与 *OGG1* 基因甲基化的研究甚少。

因此,本次研究将以焦炉工人为研究对象,以尿中代谢物 2-羟基萘 (2-hydroxynaphthalene, 2-NAP)、2-羟基芴 (2-hydroxyfluorene, 2-FLU)、9-羟基菲 (9-hydroxyphenanthren, 9-PHE) 和 1-羟基芘

(1-hydroxypyrene, 1-OHP) 作为 PAHs 内暴露的标志物,探讨 PAHs 职业暴露、饮酒与 *OGG1* 基因甲基化的关系,从而为阐明 PAHs 暴露及饮酒对不良健康结局的作用机制提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取太原某焦化厂焦炉工人 303 人为研究对象,男性 292 人,女性 11 人。所有参与者年龄均在 20~60 岁之间;身体健康,无急、慢性疾病或各种传染性疾病;在本工作单位工作满一年;采样前两周无发热,近三个月无药物治疗史和 X 线接触史。所有调查对象问卷调查信息完整,并成功采集血样和尿样。本研究经山西医科大学医学伦理委员会的批准,调查对象以自愿参加为原则并签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器

8-羟基脱氧鸟苷标品 (色谱纯, Sigma, 美国), 肌酐 (Cr) 测试盒 (南京建成科技有限公司, 中国), 磁珠法提取全血 (或组织) DNA 试剂盒 (康为世纪公司, 中国), EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo, 美国), 高效液相色谱仪 (LC-20A, 岛津, 日本), Agela Promosil C18 色谱柱 (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm, 博纳艾杰尔科技有限公司, 中国), PyroMark Q96 workstation (QIAGEN, 德国)。

1.3 研究方法

1.3.1 问卷调查 以工人健康情况调查表开展问卷调查,主要包括性别、年龄、文化水平、吸烟/饮酒情况、供暖方式、职业史等基本情况。将平均每天吸 1 支烟,且连续 6 个月以上定义为吸烟;每周至少饮酒 2 次,且连续 1 年以上定义为饮酒。

1.3.2 尿样采集与检测 用 50 mL 离心管收集工人 20 mL 晨尿,采用高效液相色谱-荧光检测法检测尿中 4 种 PAHs 代谢物。通过测定曲线信号噪声比 (信噪比) 来确定检出限和定量限,以 3 倍信噪比为检出限 (limit of detection, LOD), LOD 为 0.04~0.12 μ g/L;以 10 倍信

噪比为定量限。低于 LOD 的用 $\text{LOD}/\sqrt{2}$ 表示。准确度用加标回收率 (71%~108%) 表示。采用标准品回归方程计算 4 种代谢物浓度, 4 种代谢物标准品曲线 R^2 均在 0.999~1 之间, 结果用尿肌酐校正, 详细步骤见文献 [11]。

1.3.3 OGG1 甲基化的测定 抽取 5 mL 空腹静脉血, 用肝素钠抗凝, -80°C 冻存。实验中, 用磁珠法提取全血 DNA, 亚硫酸化处理后进行 PCR 扩增。OGG1 扩增引物序列为: 正向引物, GGGATTATATTTTAGGAAAGT; 反向引物, ATACTATTTAACAACCTTCCTATT。后将扩增好的 DNA 采用焦磷酸测序法测定 OGG1 甲基化水平。甲基化水平以 5-甲基胞嘧啶的比例表示。测序引物为 5'-GGGATTATATTTTAGGAAAGT-3'; 分析序列为 5'-YGGAGAATTGGGGTAYGAAGYGGGGTTTTGATGATTYGT-3'; 分配序列为 5'-ATCGAGATGGCTGATCGATGTCGGTTGATGATCGT-3'。实验操作均严格按照说明书进行, 详细步骤见文献 [6]。OGG1 基因 4 个 CpG 位点分别位于距 5' 端第一个外显子 106、121、126 bp 和 142 bp 处。

1.4 统计学分析

采用 SAS 9.4 对研究数据进行分析。在对研究对象的基本描述中, 性别、吸烟、饮酒、文化水平、供暖方式等分类变量用例数 (百分比) 即 $n(\%)$ 表示, 组间比较用卡方检验; PAHs 内暴露水平及 OGG1 甲基化水平等连续型变量在转换前后均不符合正态分布, 因此用中位数 (四分位数间距) 即 $M(P_{25}\sim P_{75})$ 表示, 采用 Kruskal-Wallis 检验比较多组间差异。用线性回归分析对 4 种羟基代谢物进行共线性诊断, 结果显示条件指数均小于 10, 即不存在共线性。以尿中 PAHs 代谢物的四分位数将 4 种代谢物各分为 4 组, 分别为 Q1~Q4 组。目前 OGG1 甲基化水平尚未有公认的确切阈值, 且考虑到数据分析的客观性, 因此选择 M 作为 OGG1 甲基化水平的分组依据。以 OGG1 甲基化水平的中位数 M 为界将 OGG1 分为高甲基化组和低甲基化组。采用多元 logistic 回归分析 PAHs 代谢物和饮酒与 OGG1 甲基化的关系。采用限制性立方样条 (restricted cubic spline analysis, RCS) 分析变量间变化趋势。RCS 分析可以更好地拟合自变量与应变量的剂量反应关系 [12-13], 其优越性主要体现在: (1) 描述持续暴露与结局之间的剂量反应关系, 并得出最大和最小效应点; (2) 在视觉上或统计上检查关联的线性假设; (3) 有效降低残差偏倚。统计学检验为双侧, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 研究对象的一般情况

将研究人群按尿中 1-OHP 的水平 (P_{25} 、 P_{50} 、 P_{75}) 分为 4 组, 分别为 Q1、Q2、Q3 和 Q4 组。如表 1 所示, 不同 1-OHP 水平组间, 年龄分布存在差异 ($P=0.033$), 但在不同性别、受教育时间、吸烟/饮酒情况及供暖方式组间, 均未发现分布差异有统计学意义; 尿中 2-NAP、2-FLU 及 9-PHE 的水平在不同尿 1-OHP 组间差异有统计学意义 ($P<0.001$), 且 2-FLU、9-PHE 均有随 1-OHP 水平升高而升高的趋势; OGG1 基因 4 个位点甲基化水平及位点甲基化均值在不同尿 1-OHP 组间差异无统计学意义。

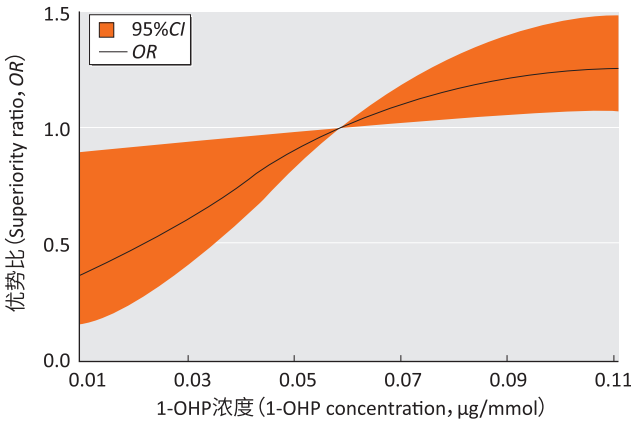
2.2 尿中 PAHs 代谢物水平与 OGG1 甲基化水平关系

以 OGG1 甲基化水平 (按 P_{50} 为界分为低甲基化组和高甲基化组) 作为应变量, 分别以 4 种 PAHs 代谢物 (按 P_{25} 、 P_{50} 、 P_{75} 分为 4 组) 作为自变量, 以性别、年龄、受教育时间、吸烟/饮酒情况、供暖方式及其他 PAHs 代谢物作为协变量, 进行 logistic 回归分析。结果显示, 未校正混杂因素和未校正尿中其他 3 种代谢物时, 均未观察到 4 种代谢物水平与 OGG1 4 个位点及位点均值的关系; 校正其他 3 种代谢物后, 发现仅尿中 1-OHP 与 OGG1 位点 4 甲基化水平关系密切, 以 Q1 组为参照, Q4 组 OGG1 位点 4 甲基化水平升高的风险是 Q1 组的 2.97 倍 (95%CI: 1.20~7.38), 趋势性检验 P 值为 0.044, 说明 1-OHP 组间与 OGG1 位点 4 甲基化水平存在线性关系。未发现尿中 2-NAP、2-FLU 和 9-PHE 与 OGG1 甲基化存在相关关系, 其中 2-NAP、2-FLU 和 9-PHE 与 OGG1 位点 4 的 OR 值分别为 0.96 (95%CI: 0.73~1.26)、1.10 (95%CI: 0.82~1.49) 和 0.76 (95%CI: 0.56~1.03)。以 1-OHP 水平的中位数 ($0.059\mu\text{g}/\text{mmol}$) 为参照, 通过散点图确定可能是 1-OHP 与 OGG1 位点 4 甲基化关系中的 3 个特殊点为节点, 即: P_5 ($0.018\mu\text{g}/\text{mmol}$)、 P_{50} ($0.059\mu\text{g}/\text{mmol}$)、 P_{75} ($0.112\mu\text{g}/\text{mmol}$), 用 RCS 曲线分析 1-OHP 与 OGG1 位点 4 甲基化水平的非线性剂量反应关系。如图 1 所示, 调整年龄、性别、受教育时间、吸烟/饮酒情况、供暖方式、2-NAP、2-FLU 及 9-PHE 后, 在尿 1-OHP 水平 $P_5\sim P_{75}$ 范围内, 随着尿中 1-OHP 水平的增加, OGG1 位点 4 发生高甲基化的风险升高 ($P_{\text{总体}}=0.013$, $P_{\text{非线性}}=0.040$)。当 1-OHP 水平为 $0.10\mu\text{g}/\text{mmol}$ 时, 发生高甲基化的风险增加趋势逐渐趋于平缓。

表1 按尿1-OHP暴露水平分层后研究对象的基本情况 [$M(P_{25} \sim P_{75})$ 或 $n(\%)$]
Table 1 Characteristics of participants stratified by urinary 1-OHP level [$M(P_{25} \sim P_{75})$ or $n(\%)$]

变量 Variable		例数 Number	1-OHP (μg/mmol)				P
			Q1 (<0.034)	Q2 (0.034~)	Q3 (0.059~)	Q4 (≥0.112)	
年龄 (岁) (Age, years)		303	40 (31~44)	44 (35~47)	41 (37~46)	39 (33~45)	0.033 ^a
工龄 (年) (Working age, years)		303	20 (8~28)	25 (17~30)	22 (18~28)	20 (14~28)	0.051 ^a
性别 (Sex)	男 (Male)	292	72 (24.7)	72 (24.7)	75 (25.6)	73 (25.0)	0.471 ^b
	女 (Female)	11	4 (36.4)	4 (36.4)	1 (9.1)	2 (18.1)	
受教育时间 (年) (Education, years)	≤ 9	86	22 (25.6)	24 (27.9)	18 (20.9)	22 (25.6)	0.632 ^b
	9~12	110	22 (20.0)	28 (25.4)	30 (27.3)	30 (27.3)	
	>12	107	32 (29.9)	24 (22.4)	28 (26.2)	23 (21.5)	
吸烟 (Smoking)	否 (No)	101	28 (27.7)	24 (23.8)	21 (20.8)	28 (27.7)	0.536 ^b
	是 (Yes)	202	48 (23.8)	52 (25.7)	55 (27.2)	47 (23.3)	
饮酒 (Drinking)	否 (No)	155	39 (25.2)	40 (25.8)	37 (23.9)	39 (25.2)	0.965 ^b
	是 (Yes)	148	37 (25.0)	36 (24.3)	39 (26.4)	36 (24.3)	
供暖方式 (Heating mode)	集中供暖 (Central heating)	288	70 (24.3)	75 (26.0)	73 (25.3)	70 (24.3)	0.244 ^b
	其他 (Other)	15	6 (40.0)	1 (6.7)	3 (20.0)	5 (33.3)	
2-NAP (μg/mmol)		303	0.56 (0.35~0.97)	0.76 (0.46~1.17)	0.70 (0.42~1.14)	1.16 (0.59~1.91)	<0.001 ^a
2-FLU (μg/mmol)		303	0.20 (0.14~0.27)	0.29 (0.22~0.40)	0.31 (0.25~0.49)	0.53 (0.34~0.96)	<0.001 ^a
9-PHE (μg/mmol)		303	0.07 (0.05~0.09)	0.07 (0.06~0.11)	0.10 (0.07~0.15)	0.25 (0.11~0.36)	<0.001 ^a
OGG1 甲基化水平 (OGG1 methylation level, %) * 位点 1 (Site 1)		303	0.76 (0.00~1.29)	0.82 (0.00~1.29)	0.88 (0.00~1.17)	0.82 (0.00~1.19)	0.892 ^a
位点 2 (Site 2)		303	0.75 (0.00~1.94)	1.04 (0.00~2.50)	1.11 (0.00~3.63)	1.04 (0.00~2.88)	0.143 ^a
位点 3 (Site 3)		303	0.00 (0.00~0.70)	0.00 (0.00~0.00)	0.00 (0.00~0.67)	0.00 (0.00~0.49)	0.180 ^a
位点 4 (Site 4)		303	2.45 (0.40~3.10)	2.67 (0.00~3.30)	2.69 (2.01~3.25)	2.88 (2.08~3.40)	0.223 ^a
位点均值 (Average of all site)		303	1.18 (0.63~1.74)	1.20 (0.72~1.72)	1.29 (0.87~1.94)	1.32 (0.81~1.80)	0.312 ^a

[注] a : Kruskal-Wallis H 检验 ; b : 卡方检验。* : 以 5- 甲基胞嘧啶比例表示。
[Note] a: Mann-Whitney H test; b: Chi-squared test. *: Expressed as percentage of 5-methylcytosine.



[注] 校正变量 : 性别、年龄、受教育时间、吸烟 / 饮酒情况、取暖方式、2-NAP、2-FLU、9-PHE。
[Note] Adjusted for gender, age, education level, smoking, drinking, heating mode, 2-NAP, 2-FLU, 9-PHE.

图1 1-OHP与OGG1位点4甲基化水平的限制性立方样条
Figure 1 Restricted cubic spline analysis between 1-OHP and the methylation on site 4 in OGG1

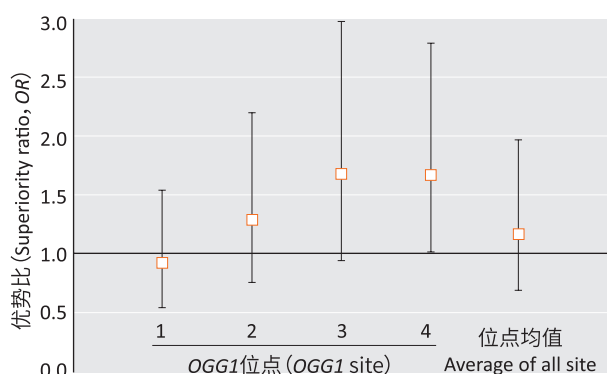
2.3 饮酒与OGG1甲基化水平的关系

以OGG1甲基化水平(按 P_{50} 为界分为低甲基化组和高甲基化组)作为应变量,以饮酒与否作为自变量,控制混杂因素性别、年龄、受教育时间、吸烟情况、供暖方式和4种PAHs代谢物,进行logistic回归分析。校正混杂因素前后,位点1、2、3甲基化水平及均值水平与饮酒均无统计学意义。校正所有混杂因素后,饮酒与位点4甲基化水平相关,OR值为1.67(95%CI: 1.01~2.79),如图2。将研究人群按饮酒量分为不饮酒、轻度饮酒($\leq 4.7\text{ L/年}$)和重度饮酒($>4.7\text{ L/年}$),分析不同程度的饮酒与OGG1甲基化的关系,结果未发现有统计学意义。

2.4 尿中1-OHP水平与饮酒对OGG1甲基化水平的交互作用

采用多因素logistic回归探讨尿1-OHP与饮酒对

OGG1 基因位点 4 甲基化影响的交互作用。以 *OGG1* 位点 4 甲基化水平 (以 P_{50} 为界分为高甲基化组和低甲基化组) 作为应变量, 将变量性别、年龄、吸烟/饮酒情况、受教育时间、供暖方式、2-NAP、2-FLU、9-PHE、1-OHP 以及饮酒与 1-OHP (分类变量) 的交互项放入模型, 发现饮酒和 1-OHP 交互项与 *OGG1* 位点 4 高甲基化的发生相关 ($OR=1.21$; $95\%CI: 1.01\sim1.43$)。如图 3 所示, 以尿 1-OHP 水平处于 Q1 组且不饮酒的工人为参照组, 尿 1-OHP 水平处于 Q4 组且饮酒的工人发生 *OGG1* 高甲基化的风险是参照组的 4.00 倍 ($95\%CI: 1.19\sim13.47$)。将尿 1-OHP 水平以连续型变量放入 logistic 方程, 发现随着 1-OHP 浓度的增加, 饮酒与不

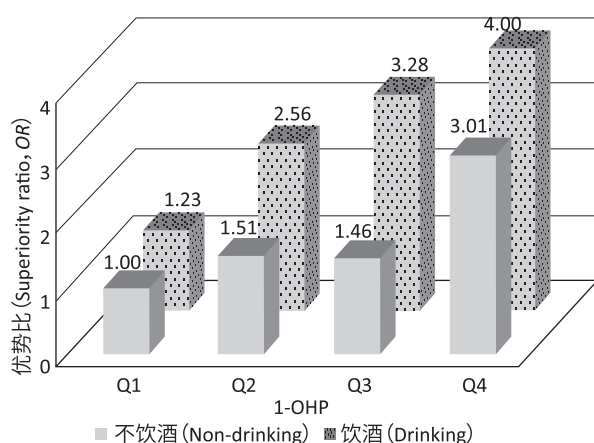


[注] 调整变量: 性别、年龄、受教育时间、吸烟情况、供暖方式、2-NAP、2-FLU、9-PHE 和 1-OHP。

[Note] Adjusting for sex, age, education, smoking, heating mode, 2-NAP, 2-FLU, 9-PHE, and 1-OHP.

图 2 饮酒与 *OGG1* 高甲基化水平的关系 (OR 及 $95\%CI$)

Figure 2 Association of drinking with *OGG1* hyper methylation level



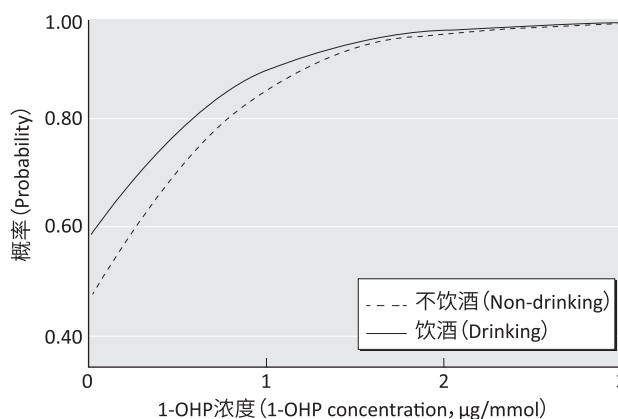
[注] 校正变量: 性别、年龄、受教育时间、吸烟/饮酒情况、供暖方式、2-NAP、2-FLU、9-PHE 和 1-OHP。

[Note] Adjusting for sex, age, education, smoking, drinking, heating mode, 2-NAP, 2-FLU, 9-PHE, and 1-OHP.

图 3 饮酒与尿 1-OHP 对 *OGG1* 位点 4 甲基化的交互作用

Figure 3 The interaction effects of drinking and urinary 1-OHP level on methylation on site 4 in *OGG1*

饮酒者发生外周血 *OGG1* 位点 4 高甲基化的概率均以不同幅度呈现增加的趋势; 相同尿 1-OHP 浓度下, 饮酒者发生此变化的概率始终高于不饮酒者; 尿 1-OHP 浓度较高且伴随饮酒者发生高甲基化的概率明显高于尿 1-OHP 浓度较低且不饮酒者。当尿 1-OHP 水平接近 $3.00\mu\text{g}/\text{mmol}$ 时, 饮酒与不饮酒者发生高甲基化的概率都接近 1。见图 4。



[注] 校正变量: 性别、年龄、受教育时间、吸烟/饮酒情况、供暖方式、2-NAP、2-FLU 和 9-PHE。

[Note] Adjusting for sex, age, education, smoking, drinking, heating mode, 2-NAP, 2-FLU, and 9-PHE.

图 4 1-OHP 与饮酒对 *OGG1* 位点 4 甲基化的交互作用

Figure 4 The interaction effects of drinking and urinary 1-OHP level on methylation on site 4 in *OGG1*

3 讨论

本研究以焦化厂焦炉工人为研究对象, 探讨饮酒这种生活习惯与 PAHs 暴露对 DNA 氧化损伤修复基因 *OGG1* 甲基化水平的影响。结果表明, 饮酒和尿中 1-OHP 水平均为焦炉工人外周血 *OGG1* 位点 4 高甲基化的危险因素, 且存在交互作用。

PAHs 进入人体内经代谢产生羟基代谢物, 随尿排出, 因此尿中的羟基代谢物可反映近期 PAHs 的暴露情况。PAHs 是一类复杂的混合物, 其代谢物众多, 本次选择 4 种具有代表性的物质 (2-NAP, 2-FLU, 9-PHE, 1-OHP) 作为 PAHs 的内暴露指标。根据 PAHs 暴露的大量研究结果及课题组前期研究成果^[14-15], 表明尿中 1-OHP 水平可以作为 PAHs 职业暴露的主要生物标志物。因此在本次研究中, 将研究人群按照尿中 1-OHP 水平的四分位数分为四组进行描述。

某些有害物质及致癌物活化产生的活性氧自由基可以造成 DNA 氧化损伤, 并在体内累积, 引起肿瘤的发生。大量研究表明尿 1-OHP 水平及饮酒均与 DNA 氧化损伤密切相关^[16-17]。*OGG1* 作为一种 DNA 损伤修复

因子,主要通过编码的 *OGG1* 修复受损的碱基从而在 DNA 损伤修复中发挥作用,并在一定程度上抑制肿瘤发生^[18]。DNA 甲基化可以调控基因表达,已经证明 *OGG1* 在细胞周期中的表达受 DNA 甲基化的调控^[19]。Singh 等^[20]通过使用去甲基化药物干预人类乳腺癌细胞株发现 *OGG1* 表达上调,进一步表明 *OGG1* 高甲基化可以下调 *OGG1* 基因表达。目前 *OGG1* 与肺癌关系的研究较少,但有研究显示 *OGG1* 活性降低与肺癌发病风险有关^[21]。Gao 等^[4]研究发现外周血 *OGG1* 高甲基化与多种癌症的发病风险呈正相关,提示 *OGG1* 甲基化异常可能是多种癌症类型的标志。目前还没有研究表明 *OGG1* 甲基化可以作为某种特定癌症类型早期的生物标志。肿瘤的发生是多阶段多因素参与的复杂过程,*OGG1* 的表观遗传变化可能是肿瘤发生机制中的某个重要环节。本研究探讨 PAHs 暴露和饮酒与 *OGG1* 甲基化之间的关系,为揭示 PAHs 暴露和饮酒在职业工人肿瘤发展过程中的表观遗传机制提供了线索。本次研究仅发现尿 1-OHP 水平与 *OGG1* 位点 4 高甲基化呈正相关关系,未发现其他 PAHs 暴露与 *OGG1* 甲基化存在关系,该结果与 Alvarado-Cruz 等^[6]的研究结果一致,说明 1-OHP 可以作为 PAHs 职业暴露的标志,并且与 *OGG1* 的甲基化存在关联。而 Alvarado-Cruz^[6]研究同时也发现空气颗粒物中萘暴露引起小学生外周血 *OGG1* 位点 2 甲基化水平升高,未发现 1-OHP 与 *OGG1* 甲基化的关系。考虑此差异可能是由于研究人群和 *OGG1* 甲基化检测位点不同所致。另外此次研究人群中饮酒者人均年摄入约 8.3 L 纯酒精,超过 2018 年 WHO 发布的我国人均 7.2 L 的年摄入量^[22]。饮酒能增加口腔癌、肝癌和食管癌等多种癌症的发病风险,目前饮酒与抑癌基因 *OGG1* 的关系探究多限于基因多态性,与 *OGG1* 甲基化的关系鲜少有人研究。本次研究结果显示:与不饮酒者相比,饮酒者更容易发生外周血 *OGG1* 高甲基化。在不同程度饮酒中,未发现存在此关系。分析原因可能是在饮酒量中存在回忆偏倚。通常人们对于是否饮酒的记忆很明确,而对于定量,可能难以估计或回忆。因此在本研究中相对于定量分析,定性分析的结果更可信。疾病的发生发展是一个复杂的过程,是多种因素共同作用的结果。进一步研究发现,饮酒与尿 1-OHP 水平在对 *OGG1* 甲基化变化的影响中存在交互作用。结果说明饮酒和职业暴露能共同影响 *OGG1* 甲基化的水平,这也提示焦炉工人在注意个人防护的情况下,应尽早戒酒,养成良好的生

活习惯。

另外,我们也意识到本次研究存在一定的局限性。本研究中采用焦磷酸测序法虽然能够对基因甲基化水平进行定量检测,但此方法仅能检测基因的某一片段,不能代表整个基因的甲基化水平,可考虑采用基因芯片或高效液相色谱法来检测 *OGG1* 基因整体甲基化水平来弥补该方法的不足;本次研究未检测 *OGG1* 基因 mRNA 表达水平,在后续的研究中,我们将采用实时荧光定量 PCR 技术检测 *OGG1* 4 个甲基化位点的 mRNA 水平,分析 PAHs 暴露与 *OGG1* 表达的关系。疾病的发生和发展与 DNA 损伤密切相关,*OGG1* 编码的酶能修复 DNA 的损伤,因此我们将进一步深入研究 *OGG1* 基因在 PAHs 致 DNA 损伤中的中介作用。

参考文献

- [1] ARMSTRONG B G, GIBBS G. Exposure-response relationship between lung cancer and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [J]. *Occupat Environ Med*, 2009, 66 (11): 740-746.
- [2] JIANG G, LUN L, CONG L. Association between polycyclic aromatic hydrocarbons and human rectal tumor or liver cancer [J]. *Chin-German J Clin Oncol*, 2012, 11 (7): 391-394.
- [3] HENNERICI M G, PERFORM Study Investigators. Rationale and design of the prevention of cerebrovascular and cardiovascular events of ischemic origin with Terutroban in patients with a history of ischemic stroke or transient ischemic attack (PERFORM) study [J]. *Cerebrovasc Dise*, 2009, 27 (Suppl 3): 28-32.
- [4] GAO T, JOYCE B T, LIU L, et al. DNA methylation of oxidative stress genes and cancer risk in the Normative Aging Study [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6 (2): 553-561.
- [5] NEVEN K Y, SAENEN N D, TARANTINI L, et al. Placental promoter methylation of DNA repair genes and prenatal exposure to particulate air pollution: an ENVIR ONAGE cohort study [J]. *Lancet Planet Health*, 2018, 2 (4): e174-e183.
- [6] ALVARADO-CRUZ I, SÁNCHEZ-GUERRA M, HERNÁNDEZ-CADENA L, et al. Increased methylation of repetitive elements and DNA repair genes is associated with higher DNA oxidation in children in an urbanized, industrial environment [J]. *Mutat Res/Genet Toxicol Environ*, 2017,

- 813 : 27-36.
- [7] FLEISCHER T, EDVARDSEN H, SOLVANG H K, et al. Integrated analysis of high-resolution DNA methylation profiles, gene expression, germline genotypes and clinical end points in breast cancer patients [J] . Int J Cancer, 2014, 134 (11) : 2615-2625.
- [8] RØNNEBERG J A, FLEISCHER T, SOLVANG H K, et al. Methylation profiling with a panel of cancer related genes : association with estrogen receptor, TP53 mutation status and expression subtypes in sporadic breast cancer [J] . Mol Oncol, 2011, 5 (1) : 61-76.
- [9] DUMITRESCU R G. Alcohol-induced epigenetic changes in cancer [M] //DUMITRESCU R, VERMA M. Cancer Epigenetics for Precision Medicine. New York : Humana Press, 2018, 1856 : 157-172.
- [10] SONGSERM N, PROMTHET S, PIENTONG C, et al. Gene–environment interaction involved in cholangiocarcinoma in the Thai population : polymorphisms of DNA repair genes, smoking and use of alcohol [J] . BMJ Open, 2014, 4 (10) : e005447.
- [11] 张慧涛, 张红杰, 范燕峰, 等. 焦化厂工人尿中多环芳烃代谢物浓度的影响因素 [J] . 环境与职业医学, 2016, 33 (4) : 345-349.
- [12] 罗剑锋, 金欢, 李宝月, 等. 限制性立方样条在非线性回归中的应用研究 [J] . 中国卫生统计, 2010, 27 (3) : 229-232.
- [13] DESQUILBET L, MARIOTTI F. Dose-response analyses using restricted cubic spline functions in public health research [J] . Stat Med, 2010, 29 (9) : 1037-1057.
- [14] 刘艳丽, 张红杰, 张慧涛, 等. 芳烃受体表达在焦炉工多环芳烃暴露致DNA氧化损伤中的作用 [J] . 环境与职业医学, 2018, 35 (5) : 400-405.
- [15] SÁNCHEZ-GUERRA M, PELALLO-MARTÍNEZ N, DÍAZ-BARRIGA F, et al. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA damage in Mexican children [J] . Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen, 2012, 742 (1-2) : 66-71.
- [16] RANA S V S, VERMA Y, Singh G D. Assessment of genotoxicity amongst smokers, alcoholics, and tobacco chewers of North India using micronucleus assay and urinary 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine, as biomarkers [J] . Environ Monitor Assess, 2017, 189 : 391.
- [17] LIU Y, ZHANG H, ZHANG H, et al. Mediation effect of AhR expression between polycyclic aromatic hydrocarbons exposure and oxidative DNA damage among Chinese occupational workers [J] . Environ Pollut, 2018, 243 : 972-977.
- [18] CHENG Y, REN X, GOWDA A S, et al. Interaction of Sirt3 with OGG1 contributes to repair of mitochondrial DNA and protects from apoptotic cell death under oxidative stress [J] . Cell Death Dis, 2013, 4 (7) : e731.
- [19] DU TOIT J, VAN DER WESTHUIZEN F H, PRETORIUS P J. Investigating the effects of the presence of foreign DNA on DNA methylation and DNA repair events in cultured eukaryotic cells [J] . Gene, 2013, 512 (1) : 117-122.
- [20] SINGH K P, TREAS J, TYAGI T, et al. DNA demethylation by 5-aza-2-deoxycytidine treatment abrogates 17 beta-estradiol-induced cell growth and restores expression of DNA repair genes in human breast cancer cells [J] . Cancer Lett, 2012, 316 (1) : 62-69.
- [21] PAZ-ELIZUR T, KRUPSKY M, BLUMENSTEIN S, et al. DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer [J] . J Natl Cancer Inst, 2003, 95 (17) : 1312-1319.
- [22] WHO. Global status report on alcohol and health 2018 [R] . Geneva : WHO, 2018.

(英文编辑：汪源；编辑：邱丹萍；校对：丁瑾瑜)