

NER 通路基因多态与氯乙烯所致微核率改变关系的研究

徐晓文¹, 王金玮¹, 王琪¹, 张放², 孙原¹, 冯楠楠¹, 周莉芳¹, 邵华², 夏昭林¹

摘要: [目的] 探讨核苷酸切除修复(NER)通路修复基因多态与氯乙烯(vinyl chloride, VC)所致外周血淋巴细胞染色体损伤的关系。[方法] 采用胞质分裂阻滞微核试验评价 317 名氯乙烯作业工人(接触组)和 166 名对照组工人的染色体损伤水平, 利用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)检测 NER 通路中 5 个关键基因的 7 个常见位点的多态, 分析各基因多态与氯乙烯接触工人染色体损伤的关系, 以及氯乙烯暴露剂量和各基因多态之间的交互作用。[结果] 接触组的微核率为 $(3.47 \pm 2.65)\%$, 高于对照组 $(2.51 \pm 1.96)\%$ ($P < 0.05$)。接触组 *XPA Ala23Gly*, *XPC Ala499Val*, *XPC Lys939Gln*, *XPF 5'-UTR T2063A* 四个单核苷酸位点多态均与遗传易感性有关(*FR* 及其 95%*CI* 分别为 1.20、1.05~1.39, 1.17、1.04~1.32, 1.23、1.09~1.38, 0.75、0.64~0.91, 均 $P < 0.01$), 且与累积接触剂量之间存在交互作用。此外, *XPC (PAT)-(499)-(939)* 单体型分析显示, *PAT-CG/PAT-TG*, *PAT+TG/PAT+TG*, *PAT+CA/PAT+CA* 以及 *PAT+TG/PAT+TA* 微核率显著高于 *PAT-CA/PAT-CA* (*FR* 及其 95%*CI* 分别为 2.45、2.01~3.75, 1.08、1.02~1.32, 1.35、1.13~1.57, 1.57、1.02~1.96, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 而 *PAT-CA/PAT+CA* 的微核率显著低于 *PAT-CA/PAT-CA* (*FR* 为 0.25, 95%*CI* 为 0.12~0.57, $P < 0.01$)。[结论] 在工作场所空气 VC 浓度低于我国现行职业限值的情况下, VC 仍可致作业工人染色体损伤; NER 通路某些损伤修复基因多态可能与 VC 致染色体损伤有关。

关键词: 氯乙烯; 染色体损伤; 胞质分裂阻滞微核试验; DNA 损伤修复基因; 遗传易感性

Association between Polymorphisms in NER Pathway Genes and Vinyl Chloride-Induced Chromosomal Damage XU Xiao-wen¹, WANG Jin-wei¹, WANG Qi¹, ZHANG Fang², SUN Yuan¹, FENG Nan-nan¹, ZHOU Li-fang¹, SHAO Hua², XIA Zhao-lin¹ (1.Department of Occupational Health and Toxicology/Key Laboratory of Public Health and Safety of Ministry of Education, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2.Inspection and Evaluation Center of Occupational Health, Shandong Institute of Occupational Health and Occupational Disease Control, Shandong 250062, China). Address correspondence to XIA Zhao-lin, E-mail: zlxia@shmu.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore the association between polymorphisms in nucleotide excision repair (NER) pathway genes and vinyl chloride (VC)-induced chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes. [Methods] Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay was used to detect chromosomal damage in peripheral lymphocytes of 317 VC-exposed workers and 166 controls. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect 7 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of 5 critical genes in NER pathways. The associations of these polymorphisms with chromosomal damage as well as the gene-exposure interaction were then analyzed. [Results] The mean micronucleus frequency in the exposure group was $(3.47 \pm 2.65)\%$, which was higher than that of the control workers $[(2.51 \pm 1.96)\%]$ ($P < 0.01$). The SNPs of *XPA Ala23Gly*, *XPC Ala499Val*, *XPC Lys939Gln*, and *XPF 5'-UTR T2063A* were associated with the micronucleus (MN) frequency as an indicator of susceptibility (*FR* and 95%*CI*: 1.20, 1.05-1.39; 1.17, 1.04-1.32; 1.23, 1.09-1.38; 0.75, 0.64-0.91, all $P < 0.01$, respectively), and interacted with VC cumulated exposure doses. Moreover, the results of haplotype analysis showed higher MN frequencies in the workers carrying the *PAT-CG/PAT-TG*, *PAT+TG/PAT+TG*, *PAT+CA/PAT+CA* or *PAT+TG/PAT+TA* diplotype than the workers carrying the wild-type *PAT-CA/PAT-CA* (*FR* and 95%*CI*: 2.45, 2.01-3.75; 1.08, 1.02-1.32; 1.35, 1.13-1.57; 1.57, 1.02-1.96, $P < 0.01$ or $P < 0.05$, respectively); while the workers with *PAT-CA/PAT+CA* had lowered risks of the studied damage (*FR*=0.25, 95%*CI*: 0.12-0.57, $P < 0.01$). [Conclusion] VC can induce chromosomal damage even when the exposure level is lower than the national occupational health standard of China. The polymorphism of DNA repair genes in NER pathway may be associated with

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: NSFC30671740)

[作者简介] 徐晓文(1988—), 女, 硕士生; 研究方向: 职业卫生与环境卫生学; E-mail: 11211020020@fudan.edu.cn

[通信作者] 夏昭林教授; E-mail: zlxia@shmu.edu.cn

[作者单位] 1. 复旦大学公共卫生学院劳动卫生与毒理学教研室, 公共卫生安全教育部重点实验室, 上海 200032; 2. 山东省职业卫生与职业病防治研究院职业卫生检测评价中心, 山东 250062

chromosomal damage induced by VC.

Key Words: vinyl chloride; chromosomal damage; cytokinesis-block micronucleus assay; DNA repair genes; genetic susceptibility

氯乙烯(vinyl chloride, VC)是一种重要的化工原料,用于合成聚氯乙烯。VC是一种多系统、多器官的致癌剂,20世纪70年代首次报道VC对实验大鼠的致癌作用,1974年首次报道VC接触工人中发现多例罕见的肝血管肉瘤(ASL),在随后的流行病学调查中又不断有新病例报道^[1]。1987年国际癌症研究机构(IARC)把VC列为人类确定致癌物。

核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)是一种重要的DNA损伤修复途径,能够修复一些不同的、非特异的DNA加合物,几种重要的基因参与了NER修复过程,这些基因共有40余种非同义突变,但只有一些常见的潜在功能性单核苷酸多态(*XPC PAT*, *XPC Ala499Val*, *XPC Lys939Gln*, *XPF 5'-UTR T2063A*, *XPG Exon15 G-C*, *ERCC1 3'-UTR C8092A*)曾被报道与癌症风险相关^[2-4]。

胞质阻滞微核试验是一种致突变检测方法,双核微核(micronucleus, MN)作为染色体损伤和肿瘤易感表型生物标志物已被多项研究证实。计算双核淋巴细胞微核细胞率,仅计数分裂一次的细胞中的微核数,解决了由于个体间细胞动力学差异导致的结果差异,可排除未经过有丝分裂或分裂1次以上的细胞对试验结果的影响,不仅能反映从干细胞分化到终末淋巴细胞过程中产生和保留的染色体损伤,还能反映终末分化淋巴细胞在外周血循环时受化学物损伤的情况,该类损伤意味着细胞已发生了严重的基因突变或该细胞基因组已处于不稳定状态。本课题组已将双核淋巴细胞微核应用于VC作业工人外周血淋巴细胞的遗传损伤追踪检测^[5]。

本次研究拟选择NER通路中比较关键的5个基因的7个常见多态位点,以外周血淋巴细胞双核微核率作为染色体损伤的标志,分析这些基因多态及其单体型与双核微核的关系,同时研究不同暴露水平与基因多态的交互作用,以探讨该通路上这些多态位点在VC暴露引起的遗传损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择山东某聚氯乙烯工厂接触VC>1年的317名

工人作为接触组,其中男性257名,女性60名,平均年龄(36.74 ± 7.83)岁。选择该厂无VC及其他毒物职业接触史的行政和后勤管理人员136名作为对照组(男性98名,女性38名),平均年龄(39.43 ± 7.67)岁。

对上述研究对象采集5 mL外周血并进行问卷调查,内容包括姓名、年龄、文化程度等一般情况,吸烟、饮酒史,车间、工段、现工种工龄等职业史,服药史,肝炎等病史。所有研究对象都签署知情同意书。

1.2 氯乙烯职业接触评估

按《工作场所空气中有害物质监测的采样规范》(GBZ-159—2004),用短时间采样方法采样。选定有代表性的、空气中VC浓度最高的工作地点作为重点采样点,在VC浓度不同的早、中、晚三个时段分别进行采样,并记录每个时段劳动者的工作时间;每次采样15 min,计算空气中VC 8 h时间加权平均浓度: $TWA = (C_1T_1 + C_2T_2 + C_3T_3) / 8$ 。式中: TWA—空气中有害物质8 h时间加权平均浓度, mg/m³; C_1 、 C_2 、 C_3 —测得空气中有害物质浓度, mg/m³; T_1 、 T_2 、 T_3 —劳动者在相应的有害物质浓度下的工作时间, h; 8—时间加权平均容许浓度规定的8 h。

根据上式计算得出各车间VC的TWA均低于国家标准[时间加权平均容许浓度(PC-TWA): 10 mg/m³]^[6]。

各车间每月VC浓度均由该厂安全科根据国家标准^[7]进行定点和定时测定,据此参考本组以往关于累积接触剂量(CED)的评估^[5],工人的工作时间为四班三轮转,每月工作23 d,每天工作8 h,工作时每2 h巡检一次,每次巡检需约30 min,故以工人一个月总接触2 760 min计,计算公式为: 累积接触剂量(CED) = $\Sigma[(C_{\text{月接触VC}} \times 2760 \times VE \times 70\%) / 10^6]$, 式中, $C_{\text{月接触VC}}$ 为月接触VC平均浓度; VE为肺通气量。男性肺通气量均值为6 500 mL/min; 女性肺通气量均值为4 300 mL/min, 30%为无效腔。

据此,本研究VC暴露组个体CED在30.09~339 278.01 mg之间。按CED的中位数(14 198.55 mg)将接触组分为高剂量接触组和低剂量接触组。

1.3 主要仪器与试剂

PCR仪(9600型PCR仪, PE公司); 核酸蛋白测试仪(Smartspec TM 3000, BIO-RAD公司); 电泳仪

(Pharmacia Biotech, EPS1000); Gel Doc 2000 凝胶成像仪(Bio-RAD 公司); RPMI1640 培养基(中国协和医科大学基础医学院); 细胞松弛素 B(美国 Sigma 公司); SDS(十二烷基磺酸钠)、琼脂糖、Tris 缓冲液(上海生工生物工程中心); 蛋白酶 K、平衡酚(上海鼎国生物工程公司); EDTA(乙二胺四乙酸二钠)、氯仿、无水乙醇、无水乙酸钠、异戊醇、氯化钠、甲醇、冰醋酸、硼酸、溴酚蓝、甘油、曲拉通 X-100(TritonX-100)均为市售分析纯; 2×PCR mix(包含 Taq DNA 聚合酶、Buffer、dNTP、MgCl₂, MBI 公司); 限制性内切酶: BsrB I、Mbo I、Rsa I(MBI 公司), Msp I(Bfa I, Takara 公司); 琼脂糖(BBI 公司); 5×TBE 缓冲液、溴化乙啶(AR, 上海化学试剂公司), 引物均由上海 Sangon 公司合成。

1.4 胞质阻滞微核试验

采用 FENECH^[8]发明的国际胞质阻滞微核试验标准操作, 将 0.5 mL 肝素抗凝处理的外周血加入 4.5 mL 培养基(RMPI1640)中, 37℃, 5%CO₂培养 44 h, 加细胞松弛素 B 应用液继续培养至 72 h 收获。甲醇和冰醋酸 3:1 固定, 制片, 晾干, Giemsa 染色。低倍镜下寻找细胞分散均匀的视野, 转油镜观察。选择胞浆完整的双核淋巴细胞, 微核位于细胞质中, 与细胞核相切或完全分开, 边缘光滑, 嗜色性与主核一致, 大小为主核的 1/16~1/3。计数 1000 个双核淋巴细胞中的微核数, 即双核细胞微核率[以下简称微核率(‰)]。

1.5 修复基因多态检测

新鲜血或冻存血室温解冻后, 饱和酚-氯仿抽提法提取外周血 DNA, 取 50 ng 的基因组 DNA, 每个引物 0.2 μmol/L, 1×PCR mix, ddH₂O 组成 25 μL 反应体系。根据既往研究, PCR 反应条件为: 首先 95℃预变性 5 min, 然后 94℃变性 40 s, 根据引物 T_m 值分别取不同退火温度(*XPA A23G*: 57℃; *XPC Ala499Val*、*XPC Lys939Gln*: 60℃; *XPF T2063A*: 63℃; *ERCC1 Cys8092Ala*: 63℃), 72℃延伸 60 s, 共 35 个循环后 72℃延伸 10 min。取 PCR 产物 8.0~8.5 μL, 加入 5.0~10.0 U 限制性内切酶及终浓度为 1×酶切缓冲液, 于 37℃水浴中酶切 12 h, 应用不同浓度的琼脂糖凝胶进行电泳, 电泳结束后于凝胶成像仪紫外灯下观察并拍照。

1.6 统计分析方法

Excel 建立数据库, 使用 SAS 9.13 软件包统计分析。采用单因素 Poisson 回归模型分析基因型和 VCM

接触对微核率的影响, 结果用 *FR*(frequency ratio) 及其 95% 可信区间和相应的 *P* 值表示($\alpha=0.1$)。采用 *SHI*^[9]的方法检验 Hardy-Winberg 平衡和连锁不平衡。应用 PHASE 2.0.2 分析软件(University of Washington, Seattle, USA)进行单体型分析。

2 结果

2.1 两组人群的基本特征

接触组 317 名, 年龄为 23~57 岁, 平均(36.74±7.83)岁。对照组 136 名, 年龄为 24~60 岁, 平均(39.43±7.67)岁。以 35 岁为界值将其划分为高年龄组和低年龄组。吸烟者定义为 ≥1 支/d, 饮酒者定义为 ≥1 次/月。经比较, 两组在年龄、性别和饮酒比例上差异均有统计学意义, *P*<0.05(表 1)。

表 1 研究对象的基本特征					
Table 1 Characteristics of the participated workers					
基本情况 (Characteristics)		对照组 (Control)		接触组 (Exposure)	
		人数 (n)	%	人数 (n)	%
性别 (Gender)	男 (Male)	98	72.1	257	81.1*
	女 (Female)	38	27.9	60	18.9
年龄 (Age, years)	≤ 35	17	12.5	128	40.4*
	>35	119	87.5	189	59.6
吸烟 (Smoking)	不吸 (No)	74	54.4	158	49.8
	吸 (Yes)	62	45.6	159	50.2
饮酒 (Drinking)	不饮 (No)	61	44.9	202	63.7*
	饮 (Yes)	75	55.1	115	36.3
合计 (Total)		136	100.0	317	100.0

[注]*: χ^2 检验, *P*<0.05。

2.2 氯乙烯接触与微核率的关系

不考虑年龄等影响因素, 表 2 显示单因素 Poisson 回归分析结果, 接触组的微核率为 (3.47±2.65)‰, 高于对照组 (2.51±1.96)‰(*P*<0.01)。由于两组基本情况存在统计学差异, 分层分析结果显示, 对同一危险因素而言, 微核率在接触组和对照组间差异有统计学意义。

2.3 NER 通路基因多态与微核率的关系

所有的基因位点均符合 Hardy-Winberg 平衡。表 3 显示, 微核率与 *XPA Ala23Gly*, *XPC Ala499Val*, *XPC Lys939Gln*, *XPF 5'-UTR T2063A* 四个单核苷酸多态位点的基因型有关。其中 *XPA Ala23Gly*, *XPC Ala499Val*, *XPC Lys939Gln* 不同基因型微核率有随突变等位基因个数增加而增加的趋势。而 *XPF 5'-UTR Thr2063Ala* 突变等位基因在接触组中是微核的保护因素。

表 2 氯乙烯接触与微核率关系的分层分析

Table 2 Stratification analysis of associations between VC exposure and MN frequency

影响因素 (Influencing factor)		对照组 (Control)		接触组 (Exposure)		FR (95%CI)
		例数 (<i>n</i>)	微核率 (MN frequency, % <i>c</i>)	例数 (<i>n</i>)	微核率 (MN frequency, % <i>c</i>)	
性别 (Gender)	男 (Male)	98	2.46 ± 1.80	257	3.39 ± 2.67**	1.08 (1.02~1.31)
	女 (Female)	38	2.63 ± 2.34	60	3.82 ± 2.52**	1.12 (1.07~1.30)
年龄 (Age, years)	≤ 35	17	1.47 ± 1.37	128	2.91 ± 2.44*	2.31 (1.34~3.56)
	> 35	119	2.66 ± 1.99	189	3.85 ± 2.72*	1.32 (1.17~1.50)
吸烟 (Smoking)	不吸 (No)	74	2.49 ± 2.02	158	3.44 ± 2.56**	1.97 (1.29~2.37)
	吸 (Yes)	62	2.53 ± 1.90	159	3.50 ± 2.74	1.13 (0.98~2.21)
饮酒 (Drinking)	不饮 (No)	61	2.31 ± 2.11	202	3.46 ± 2.77**	2.21 (1.79~3.07)
	饮 (Yes)	75	2.67 ± 1.83	115	3.48 ± 2.43*	1.11 (1.01~2.14)
合计 (Total)		136	2.51 ± 1.96	317	3.47 ± 2.65**	2.31 (1.81~3.01)

[注]*: 对某一因子分层分析, 接触组与对照组相比 (Stratification analysis for certain influencing factor, compared with the control group), $P < 0.05$;

** $P < 0.01$ 。

表 3 接触组NER通路各基因的基因型分布与微核率

Table 3 MN frequency and genotype distribution in NER pathway among VC exposed workers

基因型 Genotype	人数 n	微核率 (‰) MN frequency	β	χ^2	FR (95%CI)
XPA 23					
Ala/Ala	84	3.01 ± 2.44	—	—	1.00
Ala/Gly	154	3.32 ± 2.60	0.0969	1.59	1.10 (0.95~1.28)
Gly/Gly	78	4.26 ± 2.82**	0.3459	17.17	1.14 (1.20~1.67)
Ala/Gly and Gly/Gly	232	3.95 ± 2.77**	0.1877	6.85	1.20 (1.05~1.39)
XPC.PAT					
PAT-/-	136	3.46 ± 2.69	—	—	1.00
PAT+/-	148	3.61 ± 2.67	0.0471	0.55	1.05 (0.93~1.19)
PAT+/+	33	2.94 ± 2.37	-0.1597	2.05	0.85 (0.68~1.06)
PAT+/- + PAT+/+	181	3.34 ± 2.41	0.0124	0.04	1.01 (0.90~1.14)
XPC 499					
Ala/Ala	158	3.20 ± 2.64	—	—	1.00
Ala/Val	126	3.69 ± 2.56*	0.1438	5.01	1.15 (1.02~1.31)
Val/Val	33	3.97 ± 2.92*	0.2167	4.89	1.24 (1.02~1.50)
Ala/Val+Val/Val	159	3.71 ± 2.63**	0.1594	6.94	1.17 (1.04~1.32)
XPC 939					
Lys/Lys	170	3.15 ± 2.54	—	—	1.00
Lys/Gln	121	3.84 ± 2.74**	0.1979	9.75	1.22 (1.08~1.38)
Gln/Gln	25	4.00 ± 2.66*	0.2380	4.77	1.27 (1.02~1.56)
Lys/Gln+Gln/Gln	146	3.91 ± 2.67**	0.2049	11.55	1.23 (1.09~1.38)
XPF 2063					
Thr/Thr	254	3.65 ± 2.70	—	—	1.00
Thr/Ala	55	2.91 ± 2.43**	-0.2257	6.95	0.79 (0.67~0.94)
Ala/Ala	7	1.57 ± 0.79**	-0.8461	7.70	0.43 (0.22~0.74)
Thr/Ala+Ala/Ala	62	2.74 ± 2.22**	-0.2790	11.24	0.75 (0.64~0.91)
XPG 15					
Gly/Gly	65	3.72 ± 2.93	—	—	1.00
Gly/Cys	159	3.44 ± 2.73	-0.0790	1.05	0.92 (0.80~1.08)
Cys/Cys	92	3.37 ± 2.30	-0.0980	1.35	0.91 (0.77~1.07)
Gly/Cys+Cys/Cys	241	3.40 ± 2.54	-0.0866	1.41	0.91 (0.79~1.06)
ERCC1 8092					
Cys/Cys	159	3.35 ± 2.55	—	—	1.00
Cys/Ala	124	3.81 ± 2.86*	0.1271	4.04	1.14 (1.00~1.29)
Ala/Ala	29	2.83 ± 2.24	-0.1702	2.06	0.84 (0.66~1.06)
Cys/Ala+Ala/Ala	153	3.51 ± 2.57	0.0771	1.62	1.08 (0.95~1.21)

[注]*: 与接触组野生型相比 (Compared with the wild-type in the exposed group), $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。FR (Frequency ratio): 校正了年龄、性别、吸烟、饮酒 (Adjusted for age, gender, smoking, and drinking)。

2.4 不同接触水平与基因型的交互作用

根据单因素分析, CED 和某些多态位点均对微核率有影响, 因此将研究个体按照 CED 和基因型重新分组, 低剂量接触组和高剂量接触组微核率与对照组相比均显著增加, FR 为 1.94 (95%CI: 1.50~2.54) 和 FR 为 2.68 (95%CI: 1.23~3.56)。

表 4 显示, 各位点变异基因型与累积接触剂量对微核率联合效应分析表明, 对 XPA Ala23Gly、XPC Ala499Val、XPC Lys939Gln 基因位点, 与低剂量接触组野生型相比, 携带突变等位基因的低、高剂量接触者以及野生型高剂量接触者发生染色体损伤的风险均增加, 提示基因型-环境暴露可能存在联合作用。而对 XPF 5'-UTRT2063A 基因位点, 与低剂量组野生纯合子比较, 低剂量组突变纯合子和杂合子微核率降低, FR=0.75 (95%CI: 0.58~0.96, $P < 0.05$); 而高剂量组突变型携带者及野生纯合子的微核率升高, FR 及其 95% 可信区间分别为 1.10, 0.82~1.41, $P < 0.01$; 1.37, 1.10~1.71, $P < 0.01$ 。提示 XPF 5'-UTRT2063A 突变纯合子和杂合子在不同暴露水平效应不同。

2.5 XPC 基因单体型对染色体损伤的影响

进一步分析了 XPC 三个基因多态位点 (XPC PAT+/-、Ala499Val 和 Lys939Gln) 的连锁不平衡并重新构建双体型。XPC 三个基因位点的 D' 值分别为 0.871 (XPC 499 vs PAT)、0.803 (XPC 939 vs PAT) 和 0.849 (XPC 499 vs 939), 存在强连锁不平衡。

通过 PHASE 2.0.2 确定每个个体的单体型对。其中频率在 5 例以下的双体型对合并为其他组。以野生双体型 PAT-CA/PAT-CA 作为参比, 分析较为常见的 8 种单体型对与微核率的关系, 结果显示 PAT-CG/PAT-TG、PAT+TG/PAT+TG、PAT+CA/PAT+CA、PAT+TG/

PAT+TA 及其他类型的微核率显著高于 *PAT-CA/PAT-CA* 型的; *PAT-CA/PAT+CA* 的微核率显著低于 *PAT-CA/PAT-CA* 型的。各双体型相较于对照组的频数比 (*FR*) 及其 95%*CI* 详见表 5。

表 4 不同接触水平基因型与微核率
Table 4 MN frequency and genotypes by cumulative exposure dose groups

基因型 (Genotype)	低剂量组 (Low exposure group)			高剂量组 (High exposure group)		
	人数 (n)	微核率 (MN frequency, %)	FR (95%CI)	人数 (n)	微核率 (MN frequency, %)	FR (95%CI)
<i>XPA23</i>						
<i>Ala/Ala</i>	43	2.06 ± 2.26	1.00	42	3.86 ± 2.37**	1.61 (1.16~2.24)
<i>Ala/Gly+Gly/Gly</i>	114	3.13 ± 2.45**	1.34 (1.02~1.63)	118	4.12 ± 2.86**	1.81 (1.35~2.47)
<i>XPC499</i>						
<i>Ala/Ala</i>	83	2.81 ± 2.57	1.00	75	3.63 ± 2.68*	1.31 (1.01~1.71)
<i>Ala/Val+Val/Val</i>	74	3.03 ± 2.15	1.12 (0.92~1.36)	85	4.38 ± 2.85**	1.59 (1.23~2.07)
<i>XPC939</i>						
<i>Lys/Lys</i>	89	2.87 ± 2.63	1.00	81	3.38 ± 2.23	1.24 (0.97~1.71)
<i>Lys/Gln+Gln/Gln</i>	68	3.03 ± 2.16	1.14 (0.92~1.36)	79	4.60 ± 2.95**	1.65 (1.29~2.15)
<i>XPF2063</i>						
<i>Thr/Thr</i>	124	3.10 ± 2.37	1.00	130	4.17 ± 2.89**	1.37 (1.10~1.73)
<i>Thr/Ala+Ala/Ala</i>	33	2.21 ± 2.30*	0.75 (0.58~0.96)	30	3.38 ± 2.26	1.10 (0.82~1.47)

[注]*: 与低剂量组野生型相比 (Compared with the wild-type in the low cumulative group), $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。FR (Frequency ratio): 校正年龄、性别、吸烟、饮酒和累积接触剂量 (Adjusted for age, gender, drinking, smoking, and cumulative exposure dose)。

表 5 *XPC* 双体型与微核率的关系
Table 5 Associations between diplotypes of *XPC* and MN frequency

双体型 Diplotypes	例数 <i>n</i>	微核率 (%) MN frequency	χ^2	<i>P</i>	FR (95%CI)
<i>PAT-CA/PAT-CA</i>	114	2.93 ± 2.28	—	—	1.00
<i>PAT-CG/PAT-TG</i>	5	8.80 ± 1.92**	33.15	<0.0001	2.45 (2.01~3.75)
<i>PAT+TG/PAT+TG</i>	97	3.56 ± 2.55*	5.35	0.0330	1.08 (1.02~1.32)
<i>PAT+TA/PAT+TA</i>	13	3.07 ± 2.17	0.07	0.6345	1.01 (0.64~1.63)
<i>PAT+CA/PAT+CA</i>	27	4.25 ± 3.33**	8.34	0.0043	1.35 (1.13~1.57)
<i>PAT-CA/PAT+TG</i>	12	2.83 ± 2.20	0.02	0.7356	0.83 (0.57~1.27)
<i>PAT+TG/PAT+TA</i>	5	4.60 ± 1.67*	3.23	0.0246	1.57 (1.02~1.96)
<i>PAT-TG/PAT+TG</i>	5	3.60 ± 2.79	0.47	0.3778	1.19 (0.73~1.91)
<i>PAT-CA/PAT+CA</i>	8	1.00 ± 1.41**	7.58	0.0084	0.25 (0.12~0.57)
其他 (Other)	31	4.45 ± 2.86**	13.48	<0.0001	1.43 (1.19~1.69)

[注]*: 与 *PAT-CA/PAT-CA* 野生双体型比较 (Compared with wild diplotypes *PAT-CA/PAT-CA*), $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。其他: 出现频率小于 5 的双体型对集合 (Other: the grouping of all diplotypes with frequency less than 5)。

3 讨论

本研究显示, VC 可致作业工人染色体损伤风险升高。在中国 VC 接触工人中, NER 途径的某些修复基因多态与微核率存在相关性, 并且基因型与累积接触剂量之间存在交互作用。

对照组与接触组在年龄、性别和饮酒方面均存在统计学差异, $P<0.05$; 而年龄、性别、饮酒为可能

的混杂因素, 因此在结果分析中进行了分层分析, 并使用校正年龄、性别、吸烟、饮酒后的 *FR* 值。本研究单因素 Poisson 回归及分层分析结果均提示, 氯乙烯接触可导致作业工人微核率显著升高, 说明当前生产环境条件不足以保护作业工人健康, 与既往研究结果一致^[5]。

值得注意的是本次研究中对照组的微核率较本课题组在其他地区开展的研究高^[5], 原因可能是文献[5]所研究的工厂对空气中 VC 的监测和控制措施较为完善, 而本次研究工厂的资金投入与支持不足, 受条件所限对 VC 的控制相对较差, 导致对照组有少量被动接触。对此在确立对照组时已尽量选取少有机会进入车间的办公室人员。此外, 双核淋巴细胞微核率升高受很多因素影响, 被动 VC 接触仅是一种可能的原因, 还有可能与地区差异、个人生活习惯、个体敏感性、大气颗粒物浓度等有关。

机体自身 DNA 的不稳定性和外源化合物均可造成机体 DNA 损伤, 这些内、外源性因素造成的损伤具有致突变效应和细胞毒效应, DNA 修复系统可逆转这类突变。NER 是人类最重要的 DNA 损伤修复途径, 本次针对中国氯乙烯工人 NER 通路基因多态的研究发现, *XPA 23 Gly/Gly*、*XPC499 Ala/Val* 和 *Val/Val*、*XPC939 Lys/Gln* 基因型个体发生染色体损伤的风险增加, 而 *XPF 5'-UTR 2063T* 突变等位基因是微核的保护

因素。

作为一种 DNA 修复酶, *XPA* 可识别受损的 DNA, 已证实 *XPA* 基因 5' 端非编码区 ATG 启动子上游 4 个核苷酸位置的 *A23G* 多态位点可通过转录及转录后的调控机制来调节基因的表达^[10]进而改变个体 DNA 损伤修复的能力。本次研究发现, *XPA A23G* 基因突变可致 VC 致染色体损伤加重。一项病例-对照研究发现 *XPA A23G* 位点的 *G* 等位基因是基底细胞癌和鳞状细胞癌的危险因素^[11]。PAN 等^[12]近年发现 *XPA* 突变位点可增加食管癌的发病风险。

XPC 蛋白表达水平可影响细胞识别损伤的能力, 体内、外实验均证实, XPC 在 DNA 损伤识别和修复中起重要作用。KHAN 等^[13]发现, *XPC* 基因第 9 内含子的 *PAT+* 或 *PAT-* 多态可能与肿瘤易感性有关。QIU 等^[14]对 2004 至 2008 年间进行的该位点与多种癌症易感性关系的研究结果进行 meta 分析显示, *XPC PAT+/+* 基因型可能与胰腺癌的风险下降有关。但亦有研究显示, 该基因多态与人非黑色素瘤皮肤癌不相关^[15]。本研究结果显示, *XPC PAT* 多态与 VC 致染色体损伤的易感性之间没有显著的关系。得到以上不一致研究结果的原因, 可能是不同种族及不同毒物接触存在不同修复途径, 同时和其他修复基因的交互作用有关。*XPC* 第 8 外显子第 499 位密码子和第 15 外显子第 939 位密码子均存在 SNP 位点。一项在 320 名肺癌病人和 322 名对照中开展的调查显示, 携带 499Val 突变等位基因的个体患肺癌的风险增加^[16]。相似的结论在膀胱癌中也可得出^[17]。另有研究提示 *XPC 939Gln* 等位基因可能与大肠癌的风险有关^[18]。本次研究显示 *XPC 499* 与 939 位点的突变均增加了 VC 致染色体损伤的风险。

本研究发现, *XPF 5'-UTR T2063A* 次要等位基因对染色体损伤具有保护效应。一项针对胰腺癌的研究认为该核苷酸多态能够降低患癌风险。一个大规模、两阶段的研究也未见 *XPF 5'-UTR T2063A* 次要等位基因携带者的患病风险增加, 并且其可能对某内含子单核苷酸多态起保护作用^[19]。

LI 等^[20]报道, *XPA Ala23Gly*、*XPF Thr2063Ala* 和 *ERCC1 3'-UTR C8092A* 基因多态与染色体损伤在对照组无统计学相关性, 然而某些基因位点多态在接触组能使微核率显著增加, 可能的原因是基因与环境暴露存在交互作用, 不同暴露水平基因型-微核关系的研究证实了这一假设。随着累积接触计量的增加,

野生纯合子、突变纯合子和杂合子呈现明显不同的染色体损伤水平。如果某一等位基因对 VC 所致的 DNA 损伤有潜在易感性, 那么随着该等位基因数量的增加及暴露水平的升高, 发生染色体损伤的风险亦随之增高, 反之亦然。此外, *XPF 5'-UTR T2063A* 基因-环境交互作用结果显示, 暴露水平对 DNA 损伤的影响更大, 这一关联为基因-环境的交互作用提供了进一步的证据。

XPF 和 *ERCC1* 基因的表达产物形成的杂合二聚体 *ERCC1-XPF* 可参与 DNA 损伤加合物 5' 端的识别及切割。英国恶性黑色素瘤群体研究报道 *XPF* 基因 *5'UTR T2063A* 多态为其保护因素, *TA/AA* 与 *TT* 野生型相比, $OR=0.6$, $95\%CI: 0.4\sim1.0$ ^[21]。本次研究发现 *XPF 5'UTR T2063A* 基因突变可降低 VC 致染色体损伤的风险, 与以上研究结果一致。本次研究在单因素 Poisson 分析时发现 *ERCC13'-UTR C8092A* 位点突变杂合子和 VC 致染色体损伤间有关联性, 但 LI 等^[22]对该位点和多种癌症易感性关系的研究结果进行 meta 分析显示该位点与癌症风险无关, 与本次研究的结果不一致, 这也可能是由于年龄、性别等因素的混杂作用之故。

本次研究还探讨了基因型与环境暴露的交互作用, 随着累积接触剂量的增加, 野生纯合子、突变纯合子和杂合子呈现明显不同的染色体损伤水平。如果某一等位基因对 VC 所致的 DNA 损伤有潜在易感性, 那么随着该等位基因数量的增加及暴露水平的升高, 发生染色体损伤的风险亦随之增高, 反之亦然。此外, *XPF 5'-UTR T2063A* 基因-环境交互作用结果显示, 暴露水平对 DNA 损伤的影响更大, 这一关联为基因-环境的交互作用提供了进一步的证据。

连锁不平衡 (linkage disequilibrium, LD) 是指不同遗传标记间存在非随机组合, 根据 LD 分析的结果, 可进一步进行单体型分析。从理论上讲, 在单体型水平上研究基因的功能意义及其与遗传易感性的关系, 能真实反映各功能 SNP 间的遗传学联系并有效提高 SNP 研究的效率。*XPCPAT*、*XPC499* 和 *XPC939* 等位基因单倍型分析结果显示这三个多态位点两两之间强连锁不平衡, 与以往的结果一致^[13]。某些单体型对可使染色体损伤风险增加, 但尚无证据表明这种单体型比单个位点基因多态对 XPC 活性改变的影响更大, 如果得到证实, 单体型将可用于肿瘤风险预测及职业健康监护。

本研究存在的主要局限性是样本量较小,因此经过分层后进行交互作用分析的可信度受限。为了进一步阐明 NER 通路基因多态与 VC 致染色体损伤之间的关系,我们还需要在以后的研究中扩大样本量进行更深入的研究。

综上所述,VC 可致作业工人微核率增加,提示 VC 具有明显的细胞遗传毒性。在中国氯乙烯接触工人中, *XPA 23 Gly/Gly*、*XPC499 Ala/Val* 和 *Val/Val*、*XPC939 Lys/Gln* 以及 *XPF 5'-UTR 2063T* 基因多态均与染色体损伤水平存在一定相关性。此外,本研究发现 *XPA Ala23Gly*、*XPC Ala499Val*、*XPC Lys939Gln*、*XPF 5'-UTR T2063A* 基因多态与累积接触剂量之间存在交互作用。这些结论对进一步阐明氯乙烯的致癌机制及筛选适宜于 VC 作业工人健康监护的易感性生物标志物具有重要作用。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] CREECH JL, JOHNSON MN. Angiosarcoma of liver in the manufacture of polyvinyl chloride[J]. J Occup Med, 1974, 16(3): 150-151.
- [2] JIANG X, ZHOU LT, ZHANG SC, et al. XPC Polymorphism Increases Risk of Digestive System Cancers: Current Evidence from A Meta-Analysis[J]. Chin J Cancer Res, 2012, 24(3): 181-189.
- [3] LIU Y, WANG H, LIN T, et al. Interactions between cigarette smoking and XPC-PAT genetic polymorphism enhance bladder cancer risk[J]. Oncol Rep, 2012, 28(1): 337-345.
- [4] YANG Z, FANG X, PEI X, et al. Polymorphisms in the ERCC1 and XPF Genes and Risk of Breast Cancer in a Chinese Population[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2013, 17(9): 700-706.
- [5] JI F, WANG W, XIA ZL, et al. Prevalence and persistence of chromosomal damage and susceptible genotypes of metabolic and DNA repair genes in Chinese vinyl chloride-exposed workers[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(4): 648-653.
- [6] 中华人民共和国卫生部. GBZ 159—2004 工作场所空气中有害物质监测的采样规范[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [7] 中华人民共和国卫生部. GBZ 2.1—2007 工作场所有害因素职业接触限值第 1 部分: 化学有害因素[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [8] FENECH M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations[J]. Mutat Res, 1993, 285(1): 35-44.
- [9] SHI YY, HE L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci[J]. Cell Res, 2005, 15(2): 97-98.
- [10] LARSEN LK, AMRI EZ, MANDRUP S, et al. Genomic organization of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta gene: alternative promoter usage and splicing yield transcripts exhibiting differential translational efficiency[J]. Biochem J, 2002, 366(Pt 3): 767-775.
- [11] MILLER KL, KARAGAS MR, KRAFT P, et al. XPA, haplotypes, and risk of basal and squamous cell carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2006, 27(8): 1670-1675.
- [12] PAN J, LIN J, IZZO JG, et al. Genetic susceptibility to esophageal cancer: the role of the nucleotide excision repair pathway[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(5): 785-792.
- [13] KHAN SG, METTER EJ, TARONE RE, et al. A new xeroderma pigmentosum group C poly(AT) insertion/deletion polymorphism[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(10): 1821-1825.
- [14] QIU L, WANG Z, SHI X, et al. Associations between XPC polymorphisms and risk of cancers: A meta-analysis[J]. Eur J Cancer, 2008, 44(15): 2241-2253.
- [15] NELSON HH, CHRISTENSEN B, KARAGAS MR. The XPC poly-AT polymorphism in non-melanoma skin cancer[J]. Cancer Lett, 2005, 222(2): 205-209.
- [16] HU Z, WANG Y, WANG X, et al. DNA repair gene XPC genotypes/haplotypes and risk of lung cancer in a Chinese population[J]. Int J Cancer, 2005, 115(3): 478-483.
- [17] STERN MC, LIN J, FIGUEROA JD, et al. Polymorphisms in DNA repair genes, smoking, and bladder cancer risk: findings from the international consortium of bladder cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(17): 6857-6864.
- [18] HUANG WY, BERNDT SI, KANG D, et al. Nucleotide excision repair gene polymorphisms and risk of advanced colorectal adenoma: XPC polymorphisms modify smoking-related risk[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006, 15(2): 306-311.
- [19] MCWILLIAMS RR, BAMLET WR, Cunningham JM, et al.

Polymorphisms in DNA repair genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(12): 4928-4935.

- [20] LI Y, MARION MJ, ZIPPRICH J, et al. Gene-environment interactions between DNA repair polymorphisms and exposure to the carcinogen vinyl chloride [J]. *Biomarkers*, 2009, 14(3): 148-155.

- [21] MILLIKAN RC, HUMMER A, BEGG C, et al. Polymorphisms

in nucleotide excision repair genes and risk of multiple primary melanoma: the Genes Environment and Melanoma Study [J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(3): 610-618.

- [22] LI Y, GU S, WU Q, et al. No association of ERCC1 C8092A and T19007C polymorphisms to cancer risk: a meta-analysis [J]. *Eur J Hum Genet*, 2007, 15(9): 967-973.

(收稿日期: 2013-06-21)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 洪琪; 校对: 丁瑾瑜)

【告知栏】

《环境与职业医学》杂志 2014 年征订通知

创刊于 1984 年的《环境与职业医学》杂志, 为中华预防医学会系列杂志优秀期刊, 系由上海市疾病预防控制中心、中华预防医学会主办, 上海市预防医学研究院、华东区域劳动卫生职业病防治中心协办的国内外公开发行的专业性学术期刊 (ISSN 1006-3617, CN 31-1879/R, CODEN HYZYAZ)。本刊为中国科技论文统计源期刊, 已连续多次被评为中国中文核心期刊、中国生物医学核心期刊和中国科技核心期刊; 并被美国化学文摘 (CA)、美国乌利希国际期刊指南 (UIPD)、英国国际农业与生物科学研究中心 (CABI)、波兰哥白尼索引 (IC)、美国剑桥科学文摘 (自然科学) [CSA(NS)] 等著名国际数据库所收录。2012 年荣获“华东地区优秀期刊”称号。

本刊内容主要介绍国内外劳动卫生与职业病防治工作、环境危害因素及其治理, 以及有关环境卫生学的学术研究、科研成果和实践经验。包括环境卫生、环境与健康、环境流行病学、环境检测、环境毒理、生态与健康、职业病临床、化学应急救援、卫生管理、环境污染与治理、职业病防治实践等方面的论著、实验研究、调查报告、综述、文摘、短篇报道、病例报告等。可供广大疾病控制、卫生监督部门, 厂矿劳动安全、卫生与职业病防治, 环境保护、环境科学研究等相关单位专业人员, 医学院校教学、科研等人员参考, 欢迎订阅。

本刊为月刊, 大 16 开, 80 页, 每月 25 日出版, 每期定价 15 元, 全年定价 180 元 (含包装及平邮邮资, 需挂号或速递者邮资另计)。由邮局及自办结合发行, 本刊邮发代号: 4-568, 邮局可办理 2014 年征订工作。

1. 银行汇款 户名: 上海市疾病预防控制中心; 账号: 31663803001665382; 开户: 上海银行白玉支行;

2. 邮局汇款 上海市延安西路 1326 号生物大厦 22 楼《环境与职业医学》杂志编辑部, 邮编: 200052

读者如需单本或合订本, 可直接向编辑部联系邮购。对历年本刊所出的专题专刊 (含会议论文集), 需要者亦可联系邮购。联系人: 郑轻舟。电话: (021) 61957517; 传真: (021) 62084529; E-mail: zazhi2@scdc.sh.cn; 网址: <http://jeom.scdc.sh.cn:8081>。

《环境与职业医学》杂志编辑部