

砷接触工人尿甲基砷酸水平与 P53 基因损伤的关系

成会荣¹, 刘华², 文卫华¹

摘要: [目的] 观察砷职业暴露人群尿甲基砷酸水平与 P53 基因损伤的关系, 深入认识砷的遗传毒性。[方法] 选取砒霜厂 95 名砷接触工人作为暴露组, 另选对照组 55 人, 采集外周血和晨尿。用氢化物发生原子吸收分光光度法检测尿中各形态砷化合物和总砷含量, 并计算一、二级甲基化指数。实时荧光定量 PCR 扩增人群外周血淋巴细胞 P53 基因外显子 5 和 8, 通过循环阈值推算损伤后扩增效率, 间接计算损伤指数。[结果] 暴露组工人尿中无机砷(iAs)、甲基砷酸(MMA)、二甲基砷酸(DMA)均明显高于对照组; 暴露组工人二级甲基化指数明显低于对照组; 暴露组工人 P53 基因外显子 5 和 8 的损伤指数均明显高于对照组; 尿中砷一级甲基化指数与 P53 基因第 5 外显子损伤指数存在明显的正相关, 尿中砷二级甲基化指数与 P53 基因第 5 外显子损伤指数存在明显的负相关。[结论] 职业砷暴露工人二级甲基化指数明显增加, 体内存在较多甲基砷酸, 可能是 P53 基因外显子 5 损伤的主要原因。

关键词: P53 基因损伤; 砷; 甲基砷酸; 甲基化指数

Relationship between P53 Gene Damage and Urinary Monomethylarsonic Acid Levels in Workers Exposed to Arsenic CHENG Hui-rong¹, LIU Hua², WEN Wei-hua¹ (1.Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Kunming, Yunnan 650022, China; 2.The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming, Yunnan 650030, China). Address correspondence to WEN Wei-hua, E-mail: dongsijiehua@sina.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To study the relationship between P53 gene damage and urinary monomethylarsonic acid levels in people occupationally exposed to arsenic, and to understand genotoxicity of arsenic. [Methods] Ninety-five workers exposed to arsenic in two arsenic plants were recruited as the exposure group, and 55 residents without arsenic exposure as the control group. Their peripheral blood and urina sanguinis were collected. Inorganic arsenic (iAs), monomethylarsonic acid (MMA) and dimethylarsinic acid (DMA) in urine were detected by hydride generation-atomic absorption spectrometry to calculate primary and secondary methylation indices. Exon 5 and 8 of P53 gene were amplified by real-time polymerase chain reaction to calculate efficiency of modified templates and damage index using cycle threshold. [Results] The concentrations of iAs, MMA and DMA in the exposure group were significantly higher than that in the controls. The secondary methylation index in the exposed population was significantly lower than in the controls. The damage index of exon 5 and 8 of P53 gene in the exposure group was significantly higher than that in the control group. A positive correlation was found between the damage index of exon 5 and the primary methylation index, and a negative one was found between the damage index of exon 5 and the secondary methylation index. [Conclusion] There is a significant effect of arsenic on secondary methylation index of arsenic-exposed workers. The results suggest that monomethylarsonic acid may play an important role in the damage of exon 5 of P53 gene.

Key Words: P53 gene damage; arsenic; monomethylarsonic acid; methylation index

砷是重要的环境毒物。细胞培养和动物实验结果均显示, 砷可以导致 DNA 氧化损伤。氧化损伤对 DNA 聚合酶有明显影响, 并可能导致错配^[1]。有研究通过计算平均损伤效率(mean modified efficiency, MME)来评估氧化损伤等对 PCR 扩增效率的影响。他们的结果显示, 通过计算 MME 可以检测到 PCR 扩

增效率的微小变化, 在评价特定范围 DNA 损伤性质及程度时非常有用^[2-3]。

砷在人体内的代谢转化存在巨大差异, 可能是其致病存在巨大差异的主要原因之一。无机砷(iAs)进入机体后, 大部分很快代谢为甲基砷酸(MMA)和二甲基砷酸(DMA)。近年来越来越多的研究揭示, 砷的代谢转化不仅仅是解毒过程, 同时也是毒性产生过程。砷的代谢转化模式与肿瘤等疾病的发生密切相关^[4]。国内、外已有研究显示, 长期砷接触人群, 可以发生多种肿瘤及癌前病变, 这些患者的 P53 基因外显子 5 和 8 突变较常见^[1, 5]。这些突变可能来源于相应位点的碱基损伤^[1]。

本研究拟选择砒霜厂的砷接触工人作为研究对象, 重点探讨无机砷进入机体后的代谢转化模式对工人 P53 基因外显子 5 和 8 损伤的影响。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 30860238, 81160343); 云南省应用基础研究项目(编号: 2011FB147)

[作者简介] 成会荣(1973—), 女, 硕士, 副主任医师; 研究方向: 慢性非传染性疾病防治; E-mail: huirong999@sina.com

[通信作者] 文卫华副主任医师, E-mail: dongsijiehua@sina.com

[作者单位] 1. 云南省疾病预防控制中心, 云南 昆明 650022; 2. 昆明医学院第一附属医院, 云南 昆明 650030

1 对象与方法

1.1 研究对象及分组

研究现场选择云南省远离居民区的两个采用火法冶炼生产三氧化二砷的砒霜厂，共招募到砒霜厂从事砷冶炼的工人95人作为暴露组，入选标准是年龄18~60岁、没有明显疾病、在砒霜厂工作3个月以上；另选距离砒霜厂50 km半径范围外的居民（招募到55人）为对照组，年龄18~60岁、周围50 km半径范围内没有砒霜厂及可能导致机体砷负荷明显升高的其他污染源、没有明确的砷接触史、没有明显疾病，在当地居住1年以上。使用统一调查表收集年龄、性别、文化程度、工种、工作时间、毒物接触史、药物服用史、吸烟史、饮酒史、家族和个人疾病史等资料。在研究现场用500 mL一次性聚乙烯管收集空腹晨尿，保存在4℃，6 h内送到云南省疾病预防控制中心实验室，-20℃保存，6个月内完成尿砷化合物检测。同时，用5 mL一次性乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管采集外周血，保存在4℃，12 h内按试剂盒操作说明完成DNA抽提，-20℃保存，一年内完成P53基因损伤检测。

1.2 主要试剂及仪器

引物由宝生物(大连)公司合成，序列^[5]为P53基因第5外显子(P1): 5'-TACTCCCT GCCCTCAACAA GA-3', 5'-CGCTATCTGA GCA GCGCTCATG-3'; P53基因第8外显子(P2): 5'2 GTAGTG GTAATCTACTGGGACCGA -3', 5'2 CTCGCTTAGTGCTCCCTG GGGC-3'; β actin (P3): 5'-CGGGAAATCGTGCCTGACA T-3', 5'-GAA GGAAGGCTGGAA GAGTG-3'。

砷测定分析用冷阱捕集-氢化物发生原子分光光度计(ASA-2SP型，AA-6800型，日本岛津公司)；所有实验器具用前均以5% HNO₃浸泡24 h后，以去离子水洗净备用。氢氧化钠(日本和光纯药工业株式会社，优级纯)；盐酸(北京化学试剂研究所，优级纯)；硼氢化钠(日本和光纯药工业株式会社，优级纯)。血液基因组DNA提取试剂盒由天根生化科技(北京)有限公司提供，SYBR Green PCR Master Mix(Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit)由德国Qiagen公司生产。GeneAmp 5700型荧光定量PCR仪为ABI公司产品。

1.3 实时荧光定量PCR检测

人群P53基因第5和第8外显子损伤按试剂盒操作说明在采血后12 h内提取血液基因组DNA。

实时荧光定量PCR反应体系(25.0 μL)包括，12.5 μL SYBR Green PCR Master Mix、150.0 ng基因组DNA、0.5 μL引物(20 μmol/L)，用ddH₂O补足25.0 μL。P53基因第5外显子损伤检测的PCR反应条件为95℃ 5 min→95℃ 40 s, 58℃ 40 s, 40个循环→72℃延伸5 min；P53基因第8外显子损伤检测的PCR反应条件为95℃ 5 min→94℃ 10 s, 58℃ 40 s, 40个循环→72℃延伸5 min；β actin检测的PCR反应条件为94℃ 5 min→94℃ 10 s, 58℃ 40 s, 40个循环→72℃延伸5 min。

反应结束后，循环阈值(Ct值)由荧光PCR仪自带软件自动读出。每个样品扩增达到一定产物量需要的循环次数越多，Ct值越大，表明起始模板量越小。根据文献报道，PCR的MME与 $2^{C_{t_0}-C_{t_1}}$ 成正比(C_t₀对应β actin, C_t₁对应外显子5或外显子8)^[2-3]。本实验采用D=2^{C_{t_1}-C_{t_0}}表示P53基因第5或第8外显子损伤指数。

1.4 氢化物发生-超低温捕集-原子吸收分光光度法测定待测样品中的砷化合物含量

测定前取尿样1 mL加入2 mol/L氢氧化钠，100℃加热3 h消化，每隔1 h震荡混匀1次。iAs、MMA、DMA在上述消化处理后形态不发生改变。以1%的盐酸和10%的硼氢化钠为反应液，采用氢化物发生-超低温捕集-原子吸收分光光度法测定待测样品中的砷含量。该方法测定上述3种形态砷化合物检测限均为1 ng，变异系数<5%。标准物质为日本国立环境研究所提供。所有尿样用肌酐进行标定^[6]。

用MMA/iAs表示一级甲基化指数，即iAs转化为MMA的量与未转化的比例，表示进行甲基化代谢转化iAs的比例。用DMA/MMA表示二级甲基化指数，即MMA转化为DMA的量与未转化的比例，表示进入甲基化代谢转化的砷化合物完成代谢转化，成为代谢终产物DMA的砷化合物的比例^[7-8]。

1.5 统计方法

因3种砷化合物的分布均不符合正态分布，故将其对数转化后用于统计分析。P53基因第5和第8外显子损伤指数、尿中iAs、MMA、DMA和总砷含量及一、二级甲基化指数的组间比较采用t检验，P53基因第5和第8外显子损伤指数和一、二级甲基化指数的相关性采用等级相关(Spearman相关系数)分析。检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 一般情况

职业砷接触工人95人，平均年龄(38.3±8.1)岁，男性63人，女性32人，平均工龄(69.5±13.8)月；对照组55人，年龄(36.4±3.2)岁，男性31人，女性24人。两组在年龄、性别、文化程度、药物服用史、吸烟史、饮酒史、家族和个人疾病史等方面的差异无统计学意义(P>0.05)。

2.2 尿中iAs、MMA、DMA和总砷水平

尿砷测定结果见表1。暴露组尿中iAs、MMA和DMA浓度的中位数(最小值，最大值)分别为102.3(2.61, 1434.01) μg/mL、111.65(0.69, 1096.72) μg/mL和454.33(11.38, 3181.91) μg/mL；对照组分别为1.37(0.23, 8.40) μg/mL、1.5(0, 5.36) μg/mL和15.58(0.87, 41.67) μg/mL。暴露组尿中iAs、MMA、DMA和总砷经正态检验呈偏态分布，经对数转化后呈正态分布。对数转化后进行统计学分析，暴露组尿中iAs、MMA、DMA浓度均明显高于对照组，差异有统计学意义(P<0.01)。

表1 研究对象尿中iAs、MMA、DMA含量(μg/mL)

Table 1 Concentration of iAs, MMA and DMA in the urine of research objects

参数 Parameter	暴露组中位数 (最小值, 最大值) Median of exposure group (max, min)	对照组中位数 (最小值, 最大值) Median of control group (max, min)	t	P
iAs	102.30(2.61, 1434.01)	1.37(0.23, 8.40)	22.57	0.00
MMA	111.65(0.69, 1096.72)	1.50(0.00, 5.36)	19.90	0.00
DMA	454.33(11.38, 3181.91)	15.58(0.87, 41.67)	17.74	0.00

2.3 尿砷一级甲基化指数和二级甲基化指数

由表2可见，暴露组一级甲基化指数与对照组相比，差异

无统计学意义 ($P < 0.01$)；暴露组二级甲基化指数明显低于对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 2 研究对象尿砷一级甲基化指数和二级甲基化指数

Table 2 Primary methylation index and secondary methylation index of research objects

参数 Parameter	暴露组 Exposure group	对照组 Control group	t	P
一级甲基化指数 Primary methylation index	1.17 ± 0.59	1.51 ± 1.84	-1.26	0.22
二级甲基化指数 Secondary methylation index	4.06 ± 2.12	13.83 ± 15.41	-4.32	0.00

2.4 P53 基因第 5、8 外显子损伤指数

由表 3 可见，暴露组工人的 *P53* 基因第 5、8 外显子损伤指数均明显高于对照组 ($P < 0.05$)。

表 3 研究对象 *P53* 基因第 5、8 外显子损伤指数

Table 3 Damage index of exon 5 and 8 of *P53* gene in research objects

参数 Parameter	暴露组 Exposure group	对照组 Control group	t	P
外显子 5 损伤指数 Exon 5 damage index	134.28 ± 199.89	85.09 ± 75.63	2.07	0.04
外显子 8 损伤指数 Exon 8 damage index	391.36 ± 969.61	123.73 ± 146.27	2.55	0.01

2.5 尿中砷一级甲基化指数、二级甲基化指数与 *P53* 基因第 5、8 外显子损伤指数的等级相关分析

尿中砷一级甲基化指数与 *P53* 基因第 5 外显子损伤指数存在明显的正相关 ($r=2.86$, $P=0.00$)，尿中砷二级甲基化指数与 *P53* 基因第 5 外显子损伤指数存在明显的负相关 ($r=-0.198$, $P=0.02$)。第 8 外显子与两个甲基化指数的相关性均无统计学意义。

3 讨论

iAs 通过一系列代谢转化产生 MMA、DMA 等产物，过去认为砷的代谢转化是解毒过程。然而越来越多的研究揭示，砷的代谢转化同时又是增毒过程，可能是某些毒性，尤其是遗传毒性产生的关键阶段。HUANG 等^[7]采用一级甲基化指数和二级甲基化指数评估砷的代谢转化模式，其研究结果显示，有明确砷接触史的高血压患者与非高血压者比较，高血压患者体内有更高含量的 MMA、更低的二级甲基化指数。CHEN 等^[8]研究显示，低二级甲基化指数 (≤ 4.8) 者更容易患膀胱癌。

本研究选择职业砷接触工人作为研究人群，职业砷接触水平较高。环境普遍存在的是五价 iAs，而砒霜厂存在的主要是三价砷。在 pH 4~10 的范围，三价砷明显比五价砷更容易通过细胞膜^[9]。一般情况下，随着砷浓度的增高，砷代谢转化的比例减少，即砷代谢转化能力有限。但大量三价砷的存在，可能导致 iAs 代谢转化比例增加。而人群砷的代谢转化过程，各个阶段影响因素可能不同，即存在多种砷代谢转化模式。这些代谢转化模式很可能与疾病发生密切相关。

本研究结果显示，砷接触工人尿中 iAs、MMA、DMA 均明显高于对照人群。因砒霜厂普遍存在的是三价砷，工人体内 iAs 大部分很容易转化为 MMA。同时，因体内存在较多的 MMA，MMA 转化为 DMA 的比例严重受限，导致二级甲基化指

数明显低于对照人群。

砷的代谢转化过程很容易产生氧化损伤，包括攻击遗传物质。已有研究显示，砷的代谢转化中间产物三价 MMA 可以导致 DNA 损伤，活性氧可能具有关键作用^[9-10]。砷接触工人体内存在大量的 MMA，肯定存在较多三价 MMA。

有研究认为，DNA 损伤明显影响 PCR 反应的聚合过程，可以通过检测 PCR 反应效率而间接研究 DNA 损伤的性质和程度，研究采用 MME 来检测受损 DNA 的扩增效率，结果认为，MME 可以检测到扩增效率的微小变化^[2]。

本研究结果显示，砷接触工人，*P53* 基因第 5、8 外显子均存在明显的损伤。而第 5 外显子损伤与人群体内的一级甲基化指数存在正相关关系，与二级甲基化指数存在负相关关系。可以认为，容易将 iAs 转化为 MMA 而不容易将 MMA 转化为 DMA 的人群，体内可能存在较多的三价 MMA。三价 MMA 可能在 *P53* 基因第 5 外显子损伤中具有关键作用。

· 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献：

- [1] WEN W, CHE W, LU L, et al. Increased damage of exon 5 of *p53* gene in workers from an arsenic plant [J]. Mutat Res, 2008, 643 (1/2): 36-40.
- [2] SIKORSKY JA, PRIMERANO DA, FENGER TW, et al. DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 355(2): 431-437.
- [3] SIKORSKY JA, PRIMERANO DA, FENGER TW, et al. Effect of DNA damage on PCR amplification efficiency with the relative threshold cycle method [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 323(3): 823-830.
- [4] FUJIHARA J, SOEJIMA M, YASUDA T, et al. Global analysis of genetic variation in human arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase (AS3MT) [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 243(3): 292-299.
- [5] 潘雪莉, 张爱华, 黄晓欣, 等. PCR-SSCP 及克隆测序法研究燃煤型砷中毒患者 *p53* 基因突变与皮肤癌的关系 [J]. 环境与职业医学, 2004, 21(5): 360-363.
- [6] SUN G, XU Y, LI X, et al. Urinary arsenic metabolites in children and adults exposed to arsenic in drinking water in inner Mongolia, China [J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(4): 648-652.
- [7] HUANG YK, TSENG CH, HUANG YL, et al. Arsenic methylation capability and hypertension risk in subjects living in arseniasis-hyperendemic areas in southwestern Taiwan [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 218(2): 135-142.
- [8] CHEN YC, SU HJ, GUO YL, et al. Arsenic methylation and bladder cancer risk in Taiwan [J]. Cancer Causes Control, 2003, 14(4): 303-310.
- [9] TSENG CH. A review on environmental factors regulating arsenic methylation in humans [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 235(3): 338-350.
- [10] YAMANAKA K, KATO K, MIZOI M, et al. The role of active arsenic species produced by metabolic reduction of dimethylarsinic acid in genotoxicity and tumorigenesis [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 198(3): 385-393.

(收稿日期：2011-03-25)

(英文编审：金克峙；编辑：洪琪；校对：王晓宇)