· 调查报告与分析 ·

CYP1A1 和 CYP2E1 基因多态性与燃煤型砷中毒发病风险关系*

梁冰[1,2], 曹家艳[1], 张爱华[1,2]

摘　要: 目的　探讨 CYP1A1 基因和 CYP2E1 基因多态性与燃煤型砷中毒发病风险的关系。**方法**　以 130 例燃煤型砷中毒患者为病例组, 以 140 名健康居民为对照组, 应用聚合酶链反应 - 限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法检测 CYP1A1 Msp I、CYP2E1 Dra I 和 CYP2E1 Pst I 位点基因多态性, 并进行基因联合作用分析。**结果**　CYP1A1 基因 Msp I 位点 m1/m1(纯合野生型) 基因型和 m1/m2 + m2/m2(杂合型 + 纯合突变型)基因型在病例组和对照组的分布频率分别为 34.2%、65.8% 和 30.9%、69.1%; CYP2E1 基因 Pst I 位点 c1/c1(纯合野生型) 基因型和 c1/c2 + c2/c2(杂合型 + 纯合突变型)基因型在病例组和对照组的分布频率分别为 62.6%、37.4% 和 57.4%、42.6%; CYP2E1 基因 Dra I 位点 DD(纯合野生型) 和 DC + CC(杂合型 + 纯合突变型) 基因型在病例组和对照组的分布频率分别为 58.7%、41.3% 和 61.4%、42.6%; 上述 3 个多态位点各基因型在两组间的分布差异无统计学意义(P = 0.341、0.574、0.972)。未发现 CYP1A1 Msp I、CYP2E1 Pst I 和 CYP2E1 Dra I 多态位点与燃煤型砷中毒的发病风险存在统计学关联($P_{校正}$ = 0.433、0.219、0.832); 上述多态位点各基因型之间未发现存在联合作用。**结论**　CYP1A1 和 CYP2E1 基因多态性与燃煤型砷中毒的发病风险无关。

关键词: 砷中毒; 煤; CYP1A1 基因; CYP2E1 基因; 基因多态性

中图分类号: R 994.2　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2015)10-1313-04　DOI: 10.11847/zgggws2015-31-10-22

Association of CYP1A1 and CYP2E1 gene polymorphism with risk of arsenism caused by coal-burning

LIANG Bing*, CAO Jia-yan, ZHANG Ai-hua (* *Department of Toxicology, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province* 550025, China)

Abstract: Objective　To detect the distribution of *CYP1A1* and *CYP2E1* gene polymorphisms among patients with coal burning-induced arsenism and to explore the relationship between the risk of coal burning-induced arsenism and *CYP1A1* and *CYP2E1* gene polymorphism. **Methods**　*CYP1A1* and *CYP2E1* genotypes were determined with polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) among 130 arsenism patients (cases) and 140 healthy people (controls). **Results**　The distribution frequencies of *m1/m1* and *m1/m2* + *m2/m2* genotype of *CYP1A1 Msp* I polymorphism site were 34.2% and 65.8% in cases and 30.9% and 69.1% in controls. The distribution frequencies of *c1/c1* and *c1/c2* + *c2/c2* genotype of *CYP2E1 Pst* I polymorphism site were 62.6% and 37.4% in cases and 57.4% and 42.6% in controls. The distribution frequencies of *DD* and *DC* + *CC* genotype of *CYP2E1 Dra* I polymorphism site were 58.7% and 41.3% in cases and 61.4% and 42.6% in controls. The distribution frequencies of all the genotypes were not significantly different between the cases and the controls (P = 0.341, 0.574, and 0.972). This study didn't find combined effects of *CYP1A1 Msp* I, *CYP2E1 Pst* I and *CYP2E1 Dra* I polymorphisms on the risk of coal burning-induced arsenism (P_{adj} = 0.433, 0.219, and 0.832). **Conclusion**　*CYP1A1 Msp* I, *CYP2E1 Dra* I and *Pst* I polymorphism are not likely to associate with the risk of coal burning-induced arsenism.

Key words: arsenism; coal; CYP1A1 gene; CYP2E1 gene; gene polymorphism

外源化合物在体内的生物转化过程中, 代谢酶扮演着重要角色, 它能把无活性的进入体内的环境致癌物代谢转变为亲电子化学物, 后者可攻击细胞内 DNA 或蛋白质等大分子形成加合物最终引起癌基因和抑癌基因的变异而导致疾病的发生。细胞色素 P-450 是外源化学致癌物在体内生物转化第一时相最主要的代谢酶, 其编码基因亚型中有 CYP1A1 和 CYP2E1, 且具基因多态性。其多态性可引起所编码酶的活性改变, 从而影响外源化学物对不同个体可能造成的危害风险差异[1-3]。贵州省地方性砷中毒是以居民长期燃用高砷煤导致的以皮肤损害为典型临床表现的疾病, 可引起皮肤癌、肺癌等。CYP1A1 和 CYP2E1 基因多态性与砷中毒发病风险的研究鲜有报道, 本研究检测燃煤型砷中毒患者

* **基金项目**: 国家自然科学基金(30960337; 30460123); 贵州省基金(黔科合人才团队 20124003); 贵州省优秀科技教育人才省长专项基金(黔省专合字[2008]57 号); 贵州省科学技术基金(黔科合 J 字[2008]2276 号)

作者单位: 1. 贵州医科大学毒理学教研室, 贵州 贵阳 550025; 2. 环境污染与疾病监控省部共建教育部重点实验室

作者简介: 梁冰(1977 -), 女, 贵州贵阳人, 副教授, 博士, 主要从事地砷病发病机制研究。

通讯作者: 张爱华, E-mail: aihuagy@aliyun.com

数字出版日期: 2015 - 8 - 31 11:17

数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150831.1117.032.html

CYP1A1 和 CYP2E1 基因各基因型的分布情况，并分析各基因型与燃煤型砷中毒发病风险的关系，为深入阐释地方性砷中毒发病机制及筛选高危人群提供参考依据。

1　材料与方法

1.1　对象　2006 年以贵州省兴仁县交乐乡燃煤型砷中毒病区为调查点，参照地方性砷中毒诊断标准（WS/T211—2001）[4]选取经临床复查确诊 130 例燃煤型砷中毒患者为病例组。以距交乐乡 13 km 非燃用高砷煤且生活环境及习惯与病例组相似的 140 名健康居民作为对照组。调查对象均为汉族，排除既往放射线接触史、家族遗传病史及近期疾病感染史者。

1.2　主要试剂和仪器　Mastercycler gradient PCR 扩增仪（德国 eppendorf 公司）；Ultrospec2100 型核酸蛋白分析仪（美国安玛西亚中国有限公司）；Gel Doc 2000 凝胶成像分析系统（美国 Bio-RAD 公司）；dNTPs、$MgCl_2$、TaqDNA 聚合酶（大连宝生物生物工程公司）；引物（上海 Sangon 公司合成）；Msp I 内切酶、Pst I 内切酶、Dra I 内切酶（均为英国 BioLabs 公司产品）。

1.3　方法

1.3.1　采集血样及 DNA 提取　经研究对象知情同意后，收集其外周血 2 mL，乙二胺四乙酸（ethylene diamine tetraacetic acid，EDTA）抗凝，酚-氯仿法提取基因组 DNA。

1.3.2　PCR-RFLP 法检测各多态位点基因型　运用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性（polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism，PCR-RFLP）法检测 CYP1A1 Msp I、CYP2E1 Pst I 和 CYP2E1 Dra I 多态位点基因型。PCR 扩增引物序列及片段长度见表 1。PCR 扩增体系：10 × PCR 反应缓冲液、0.25 mmol $MgCl_2$ 1.5 mmol、10 μmol 上下游引物各 0.2 μmol、Taq DNA 聚合酶 1.25U，扩增总体积 25 μL。PCR 扩增条件为：94 ℃ 7 min 后 94 ℃ 50 s，62 ℃ 50 s（CYP1A1 Msp I）；57 ℃ 30 s（CYP2E1 Pst I）；60 ℃ 50 s（CYP2E1 Dra I）；72 ℃ 1 min，35 个循环后 72 ℃ 10 min。PCR 产物 10、7、8 μL 分别与限制性内切酶 Msp I（6U）、Pst I（8U）、Dra I（6 U）在 37 ℃条件下消化 6、4、16 h，酶切产物经 2.0% 琼脂糖凝胶在 140 V 电压下电泳 40 min，凝胶成像系统观察结果并拍照。

1.4　统计分析　采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析，χ^2 检验比较各组基因型构成比，比值比（odds ratio，*OR*）及其 95% 可信区间（95% confidence interval，95% *CI*）估计相对危险度，非条件 logistic 回归计算校正后的 OR_{adj} 值及 95% *CI*。

表 1　PCR 扩增引物序列及片段长度

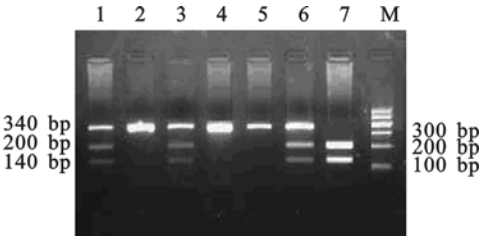
多态位点	引物序列	扩增片段长度（bp）
CYP1A1 Msp I[5]	F：5′－CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT－3′	340
	R：5′－TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT－3′	
CYP2E1 Pst I[6]	F：5′－CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA－3′	410
	R：5′－TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG－3′	
CYP2E1 Dra I[7]	F：5′－TCG TCA GTT CCT GAA AGC AGG－3′	995
	R：5′－GAG CTC TGA TGC AAG TAT CGC A－3′	

2　结 果

2.1　一般情况　病例组男性 90 例，女性 40 例，平均年龄（48.3 ± 11.0）岁；对照组男性 99 人，女性 41 人，平均年龄（35.0 ± 7.5）岁。经 χ^2 检验，病例组与对照组性别构成差异无统计学意义（$\chi^2 = 0.07$，$P = 0.79$），但年龄构成差异有统计学意义（$\chi^2 = 88.88$，$P = 0.00$），实验结果经非条件 logistic 回归分析校正。

2.2　基因型判断

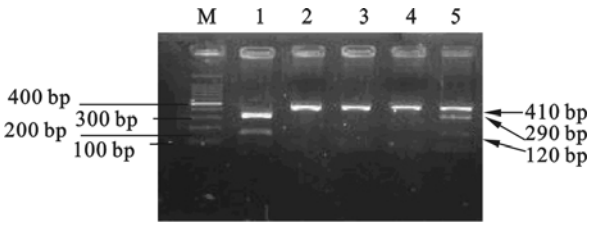
2.2.1　CYP1A1 Msp I 多态位点（图 1）　经 Msp I 酶切后出现 340、200 和 140 bp 3 个片段，其中 m1/m1 基因型（纯合野生型）仅 340 bp 1 个片段，m1/m2 基因型（杂合型）为 340、200 和 140 bp 3 个片段，m2/m2 基因型（纯合突变型）为 200 和 140 bp 2 个片段。



注：M：100bp DNA Marker；2，4，5：m1/m1 基因型；1，3，6：m1/m2 基因型；7：m2/m2 基因型。

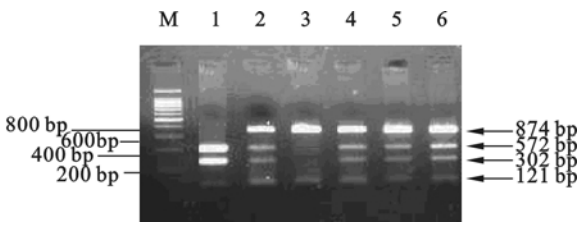
图 1　CYP1A1 基因 PCR 扩增产物经 Msp I 限制性内切酶酶切后的琼脂凝胶电泳图

2.2.2　CYP2E1 Pst I 多态位点（图 2）　经 Pst I 酶切后出现 410、290 和 120 bp 3 个片段，其中 c1/c1 基因型（纯合野生型）仅 410 bp 1 个片段，c1/c2 基因型（杂合型）为 410、290 和 120 bp 3 个片段，c2/c2 基因型（纯合突变型）为 290 和 120 bp 2 个片段。



注：M：100bp DNA Marker；2，3，4：c1/c1 基因型；5：c1/c2 基因型；1：c2/c2 基因型。

图 2　CYP2E1 基因 PCR 扩增产物经 Pst I 限制性内切酶酶切后的琼脂凝胶电泳图



注：M：100bp DNA marker；1：DD 基因型；2，4，5，6：DC 基因型；3：CC 基因型。

图 3　CYP2E1 基因 PCR 扩增产物经 Dra I 限制性内切酶酶切后的琼脂凝胶电泳图

2.2.3　CYP2E1 Dra I 多态位点（图 3）　经 Dra I 酶切出现 874、572、302 和 121 bp 4 个片段，其中 DD 基因型（纯合野生型）为 572、302 和 121 bp 3 个片段，DC 基因型（杂合型）为 874、572、302 和 121 bp 4 个片段，CC 基因型（纯合突变型）为 874 和 121 bp 2 个片段。

2.2.4　各多态位点基因型分布频率（表 2）　CYP1A1 Msp I 多态位点 m1/m1、（m1/m2 + m2/m2）基因型；CYP2E1 Pst I 多态位点 c1/c1、（c1/c2 + c2/c2）基因型；CYP2E1 Dra I 多态位点 DD、（DC + CC）基因型在病例组和对照组间的频率，上述基因型在病例组与对照组之间的分布均无统计学差异（*P* 值分别为 0.341、0.574、0.972）；各多态位点与燃煤型砷中毒的发病风险无统计学关联（经年龄性别校正后 *P* 值分别为 0.433、0.219、0.832）。

2.2.5　各基因多态位点不同基因型之间的联合作用分析（表 3）　CYP1A1 Msp I 和 CYP2E1 Pst I、CYP1A1 Msp I 和 CYP2E1 Dra I、CYP2E1 Pst I 和 CYP2E1 Dra I 不同基因型联合在病例组与对照组中的分布差异无统计学意义。

表 2　各基因多态位点与燃煤型砷中毒发病风险的关系

基因型	病例组		对照组		χ^2 值	*P* 值	OR_{adj}	95% CI^a	χ^2 值	*P* 值
	例数	构成比（%）	例数	构成比（%）						
CYP1A1 Msp I					2.183	0.341				
m1/m1	39	34.2	43	30.9			1.00		0.616	0.433
m1/m2 + m2/m2	75	65.8	96	69.1			1.27	0.66 ~ 2.47		
CYP2E1 Pst I					1.994	0.574				
c1/c1	77	62.6	78	57.4			1.00		1.511	0.219
c1/c2 + c2/c2	46	37.4	58	42.6			0.95	0.52 ~ 1.73		
CYP2E1 Dra I					0.235	0.972				
DD	71	58.7	81	61.4			1.00		0.045	0.832
DC + CC	50	41.3	51	38.6			0.72	0.38 ~ 1.50		

注：a 经年龄、性别调整。

表 3　各基因多态位点不同基因型之间联合作用与燃煤型砷中毒发病风险的关系

基因型	病例组		对照组		OR_{adj}	95% CI^a	χ^2 值	*P* 值
	例数	构成比（%）	例数	构成比（%）				
CYP1A1 Msp I m1/m1							0.000	0.989
CYP2E1 Pst I c1/c1	24	66.7	17	56.7	1.00			
CYP2E1 Pst I c1/c2 + c2/c2	12	33.3	13	43.3	1.01	0.28 ~ 3.65		
CYP1A1 Msp I m1/m2 + m2/							0.817	0.366
CYP2E1 Pst I c1/c1	41	57.7	36	56.2	1.00			
CYP2E1 Pst I c2/c2 + c2/c2	30	42.3	28	43.8	1.47	0.64 ~ 3.38		
CYP1A1 Msp I m1/m1							0.195	0.659
CYP2E1 Dra I DD	20	55.6	20	66.7	1.00			
CYP2E1 Dra I DC + CC	16	44.4	10	33.3	0.74	0.19 ~ 2.86		
CYP1A1 Msp I m1/m2 + m2/m2							0.000	0.983
CYP2E1 Dra I DD	41	56.9	36	58.1	1.00			
CYP2E1 Dra I DC + CC	31	43.1	26	41.9	1.01	0.44 ~ 2.32		
CYP2E1 Pst I c1/c1								
CYP2E1 Dra I DD	60	84.5	43	82.7	1.00		0.034	0.853
CYP2E1 Dra I DC + CC	11	15.5	9	17.3	1.12	0.34 ~ 3.63		
CYP2E1 Pst I c1/c2 + c2/c2							0.643,	0.423
CYP2E1 Dra I DD	10	22.2	12	30.8	1.00			
CYP2E1 Dra I DC + CC	35	77.8	27	69.2	0.59	0.16 ~ 2.15		

注：a 经年龄、性别调整。

中国公共卫生 CPH

3 讨　论

燃煤型砷中毒是中国特有的地方病,虽然政府采取了改炉改灶等措施减少了燃煤砷对村民的健康危害,但砷对机体的远期效应致病区病人病情有加重趋势,癌症患者增多[5-7]。研究表明,砷在体内的活化代谢产物是导致机体发生砷中毒的重要因素之一,而与遗传背景有关的基因多态性成为近年来砷中毒研究的热点[8-9],其中代谢酶基因多态性被认为与砷在体内的活化代谢密切相关。本课题组前期研究发现[10-12],燃煤型砷中毒患者的发病风险与Ⅱ相代谢酶谷胱甘肽硫转移酶的基因多态性有关,在此研究基础上,课题组进一步对Ⅰ相代谢酶——细胞色素 P-450 与燃煤型砷中毒发病风险的关系进行研究。

CYP1A1 是一种肝外氧化代谢酶,主要在肺组织内表达,编码芳烃羟化酶。CYP1A1 基因主要存在四种基因多态位点,即 Msp I 位点、exon 7 位点、AA 位点和 CYP1A1 ∗4 位点,目前以 Msp I 位点多态性与疾病易感性的关系研究较多。CYP2E1 主要分布于肝脏,人肝微粒体 CYP2E1 催化能力有较大差异,其主要原因是来源于该基因 5'-端上游调节区 Pst I 多态改变了该基因的转录活性、第六内含子区 Dra I 多态影响其酶的表达。在 CYP1A1 基因多态性与砷中毒关系研究方面,Adonis 等[13-14]报道,在智利高砷水接触人群中,CYP1A1 Msp I m2/m2 基因型能引起吸烟者患肺癌的危险性增加(OR = 2.08,95% CI = 1.04 ~ 4.03)。目前未见 CYP2E1 基因多态性与砷中毒关系的报道。通过本研究,未发现 CYP1A1 Msp I 多态位点、CYP2E1 Pst I 和 CYP2E1 Dra I 多态位点与燃煤型砷中毒发病风险有关,在基因-基因的联合作用分析时亦未观察到上述多态位点之间与燃煤型砷中毒的发病风险存在联合作用。分析原因可能与下列因素有关。其一,砷致癌机制复杂,代谢酶作用后真正底物及作用机制目前尚不完全明确,代谢酶基因多态性对燃煤型砷中毒或饮水型砷中毒发病风险的影响是否一致还有待更多研究证实。其二,不同种族的遗传背景不同,人种、个体及生活方式的差异可能导致对砷中毒反应不一致。其三,本研究为单中心的队列研究,因研究样本数量有限,未考虑基因-基因及基因-环境之间的作用对研究结果的影响。

本研究虽未发现 CYP1A1 和 CYP2E1 基因多态性与燃煤型砷中毒的发病风险有关,但本研究从遗传背景角度考虑砷中毒对机体的影响,为深入阐明砷中毒的分子机理研究积累了实验数据。本研究将有待于加大样本量,剔除某些影响因素后进一步深入研究。

参考文献

[1] Ghisari M, Eiberg H, Long M, et al. Polymorphisms in phase I and phase II genes and breast cancer risk and relations to persistent organic pollutant exposure: a case-control study in Inuit women[J]. Environmental Health, 2014, 13(1): 19.

[2] Agundez JA. Cytochrome P450 gene polymorphism and cancer[J]. Curr Drug Metab, 2004, 5(3): 211-224.

[3] Bhat GA, Shah IA, Makhdoomi MA, et al. CYP1A1 and CYP2E1 genotypes and risk of esophageal squamous cell carcinoma in a high-incidence region, Kashmir[J]. Tumour Biol, 2014, 35(6): 5323-5330.

[4] 《中华人民共和国卫生行业标准:地方性砷中毒诊断标准(WS/T211-2001)》[M]. 1 版. 北京:中国标准出版社, 2002, 1-2.

[5] Song N, Tan W, Xing D, et al. CYP 1A1 polymorphism and risk of lung cancer in relation to tobacco smoking: a case-control study in China[J]. Carcinogenesis, 2001, 22(1): 11-16.

[6] Hong YC, Park HS, Ha EH. Influence of genetic susceptibility on the urinary excretion of 8-hydroxydeoxyguanosine of fire fighters[J]. Occupational and Environmental Medicine, 2000, 7(6): 370-375.

[7] Kato S, Shields PG, Caporaso NE, et al. Analysis of cytochrome P450 2E1 genetic polymorphisms in relation to human lung cancer[J]. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, 1994, 3(6): 515-518.

[8] 张爱华. 生物标志物在地方性砷中毒研究中的应用及展望[J]. 中国地方病学杂志, 2005, 24(2): 119-120.

[9] 秦秀军, 裴秋玲. 几种砷代谢相关酶和转运蛋白及其遗传多态性的研究进展[J]. 中国地方病学杂志, 2005, 24(2): 232-234.

[10] 梁冰, 张爱华, 奚绪光, 等. 谷胱甘肽硫转移酶 M1 和 T1 基因多态性与燃煤型砷中毒发病的关系[J]. 中国地方病学杂志, 2007, 26(1): 71-74.

[11] 梁冰, 张爱华, 奚绪光, 等. GSTO 基因多态性与燃煤污染型砷中毒易感性的关系[J]. 环境与职业医学, 2007, 24(2): 129-132.

[12] 梁冰, 张爱华, 董学新. GSTO1 Glu155△Glu 基因多态性与燃煤污染型地方性砷中毒的关系[J]. 中国地方病学杂志, 2012, 3(1): 132-135.

[13] Adonis M, Martinez V, Marin P, et al. Smoking habit and genetic factors associated with lung cancer in a population highly exposed to arsenic[J]. Toxicol Lett, 2005, 159(1): 32-37.

[14] Adonis M, Martine V, Marin P, et al. CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms in lung cancer populations exposed to arsenic in drinking water[J]. Xenobiotica, 2005, 35(5): 519-530.

收稿日期: 2014-10-27　　(吴少慧编辑　周欣琳校对)