

砒霜厂工人 Bcl-2 基因相对表达与尿砷甲基化产物的关系

闫婷¹⁾, 文卫华²⁾, 曾龙剑¹⁾, 何越峰¹⁾, 吴锡南¹⁾

(1) 昆明医科大学公共卫生学院, 云南昆明 650500; 2) 云南省疾病预防控制中心,
云南昆明 650022)

[摘要] **目的** 探讨砷职业暴露人群 Bcl-2 基因表达与甲基砷酸的关系, 识别砷的遗传毒性. **方法** 整群抽取砒霜厂工人 43 名作为暴露组, 对照组 23 人. 实时荧光定量 PCR 检测砒霜厂工人外周血淋巴细胞 Bcl-2 基因, 采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. **结果** 职业暴露工人尿中无机砷、甲基砷酸、二甲基砷酸均显著高于对照人群; 职业暴露工人二级甲基化指数显著低于对照人群; 职业暴露工人外周血淋巴细胞 Bcl-2 基因相对表达显著高于对照人群; 尿中总砷与 Bcl-2 相对表达量成显著正相关 ($r=0.272$, $P<0.05$), MMA 与 Bcl-2 相对表达量成显著正相关 ($r=0.252$, $P<0.05$), DMA 与 Bcl-2 相对表达量成显著正相关 ($r=0.280$, $P<0.05$); 尿中砷二级甲基化指数与 Bcl-2 基因相对表达量成显著负相关 ($r=-0.424$, $P<0.05$). **结论** 砷暴露是工人外周血淋巴细胞 Bcl-2 基因表达升高的原因, 并和甲基化过程密切相关.

[关键词] 砷; Bcl-2 基因; 甲基化指数

[中图分类号] R331.1⁺4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2013)02-0044-04

The Relationship Between Bcl-2 Expression in Peripheral Blood Lymphocytes and the Products of Arsenic Methylation in Workers in Arsenic Factory

YAN Ting¹⁾, WEN Wei-hua²⁾, ZENG Long-jian¹⁾, HE Yue-feng¹⁾, WU Xi-nan¹⁾

(1) School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Kunming Yunnan 650022, China)

[Abstract] **Objective** To study the relationship between the expression of Bcl-2 gene and monomethylarsonic acid, and study the genotoxicity of arsenic. **Methods** 43 workers of arsenic factory were selected as exposure group, and 23 people were selected as control group. Bcl-2 gene expression was detected by real-time PCR. We used hydride generation-atomic absorption spectrometry (HGAAS) to determine inorganic arsenic (iAs), monomethylarsonic acid (MMA) and dimethylarsinic acid (DMA) in urine, and calculated Primary Methylation Index (PMI) and Secondary Methylation Index (SMI). **Results** The urinary concentrations of iAs, MMA and DMA in the exposed population were significantly higher than in the control group. The SMI in the exposed population was significantly lower than in the control group. The expression level of Bcl-2 gene in the exposed population was significantly higher than in the control group. There was a significant link between the expression of Bcl-2 gene and iAs ($r=0.272$, $P<0.05$), and a significant negative correlation between the expression of Bcl-2 gene and MMA ($r=0.252$, $P<0.05$), and a significant correlation between the expression of Bcl-2 gene and DMA ($r=0.280$, $P<0.05$), and a closely negative correlation between the Bcl-2 and SMI ($r=$

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81160343)

[作者简介] 闫婷 (1987~) 女, 云南楚雄市人, 在读硕士研究生, 主要从事劳动卫生与环境卫生研究工作.

[通讯作者] 吴锡南. E-mail:wuxinan2010@gmail.com

-0.424, $P < 0.05$). **Conclusion** Arsenic exposure is an obvious reason for the upregulation of Bcl-2 gene and there is a closely correlation between the arsenic methylation products and the expression of the Bcl-2 gene in peripheral blood lymphocytes.

[**Key words**] Arsenic; Bcl-2 gene; Methylation index

无机砷是世界卫生组织 (world health organization, WHO) 及国际癌症研究所 (international agency for research on cancer, IARC) 确认的人类致癌物^[1], 在哺乳动物体内, 无机砷常常通过甲基化形成甲基砷酸 (monomethylarsinic acid, MMA₅V) 和二甲基砷酸 (dimethylarsinic acid, DMA₅V)^[2]. 有研究表明无机砷的甲基化并不完全是一个解毒过程. 砷甲基化过程的中间产物比无机砷具有更强的活性和毒性^[3]. Bcl-2 基因 (B-cell lymphoma-2) 是细胞凋亡的重要调控基因, Bcl-2 蛋白在多种肿瘤中高水平表达^[4,5]. 有细胞学实验表明砷可导致 Bcl-2 基因表达变化, 但结果不完全一致^[6,7].

本研究选择砒霜厂工人作为研究对象, 探讨无机砷进入机体后的代谢转化模式对工人外周血淋巴细胞中 Bcl-2 蛋白表达的影响.

1 对象和方法

1.1 对象

在取得知情同意后, 收集云南某砒霜厂 43 名工人 (男性) 为暴露组, 非职业性砷暴露人群 23 人 (男性) 为对照组, 采集外周血及尿液. 入选标准是, 暴露组年龄 18~60 岁、没有明显疾病、在砒霜厂工作 3 个月以上; 对照组年龄 18~60 岁、周围 50 公里没有砒霜厂及可能导致机体砷负荷明显升高的其它污染源、没有明确的砷接触史、没有明显疾病, 在当地居住 1 a 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、家族史和个人疾病史等资料.

1.2 实验方法

用磷酸盐缓冲液提取淋巴细胞, TRIzol 法提取外周血淋巴细胞的总 RNA, 通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA, 最后检查提取的 RNA 质量及浓度并做好记录, 相对表达量用 $-\Delta\Delta Ct$ 值来表示.

Bcl-2 荧光定量的引物: 5'-CCTGTGGATGACTGAGTACC-3'; 5'-GAGACAGCCAGGAGAAATCA-3'. 用 20 μ L 体系的 RT-PCR 反应 (购自宝生物), 10 μ L 体系的实时荧光定量 PCR 反应 (购自

invitrogen), 操作按试剂盒说明书进行.

尿砷 (iAs) 测定前取尿样 1 mL 加入 2 mol/L 氢氧化钠, 100 $^{\circ}$ C 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 3 种形态砷化物检测限均为 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.

用 MMA/iAs 表示一级甲基化指数, 即无机砷转化为甲基砷酸的量与未转化的比例, 表示进行甲基化代谢转化无机砷的比例. 用 DMA/MMA 表示二级甲基化指数, 即甲基砷酸转化为二甲基砷酸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, 成为代谢终产物二甲基砷酸的砷化合物含量和比例.

1.3 统计学分析

数据用 SPSS 统计软件包进行两独立样本 t 检验及 Pearson 相关性分析.

2 结果

2.1 一般情况

共调查 66 人, 对照组为 23 人, 砒霜厂工人为 43 人. 各组在年龄和性别分布上差异无统计学意义 ($P > 0.05$).

2.2 尿中无机砷、甲基砷酸和二甲基砷酸

砒霜厂工人尿中无机砷、甲基砷酸和二甲基砷酸浓度算术均数分别为 227.74 μ g/mL、337.68 μ g/mL 和 1 173.20 μ g/mL, 而对照组分别为 2.18 μ g/mL、1.47 μ g/mL 和 15.65 μ g/mL. 砒霜厂工人均显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$).

2.3 尿砷一级甲基化指数和二级甲基化指数

砒霜厂工人一级甲基化指数略高于对照人群, 但差异没有统计学意义 ($P < 0.05$). 同时, 二级甲基化指数低于对照人群, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1.

2.4 Bcl-2 基因相对表达量比较

砒霜厂工人和对照人群 Bcl-2 基因相对表达量分别为 (6.11 ± 2.13) 和 (3.96 ± 1.42)，暴露组 Bcl-2 相对表达量约为对照组的 4.44 倍，具有显著差异 ($P < 0.05$)。

经 Pearson 相关法分析可见，Bcl-2 相对表达量与总砷正相关 ($r = 0.272$, $P < 0.05$)，见图 1。与

MMA 正相关 ($r = 0.252$, $P < 0.05$)，与 DMA 正相关 ($r = 0.280$, $P < 0.05$)，与二级甲基化指数 (DMA/MMA) 负相关 ($r = -0.424$, $P < 0.05$)，见图 2；但与一级甲基化指数 (MMA/iAs) 相关无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 尿砷一级甲基化指数和二级甲基化指数 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Primary Methylation Index (PMI) and Secondary Methylation Index (SMI) of exposure group and control group ($\bar{x} \pm s$)

参数	暴露组	对照组	t	P
一级甲基化指数 (MMA/iAs)	1.80 ± 1.34	1.38 ± 1.43	1.11	0.27
二级甲基化指数 (DMA/MMA)	4.65 ± 2.46*	10.69 ± 3.32	-8.40	0.00

与对照组比较, * $P < 0.05$.

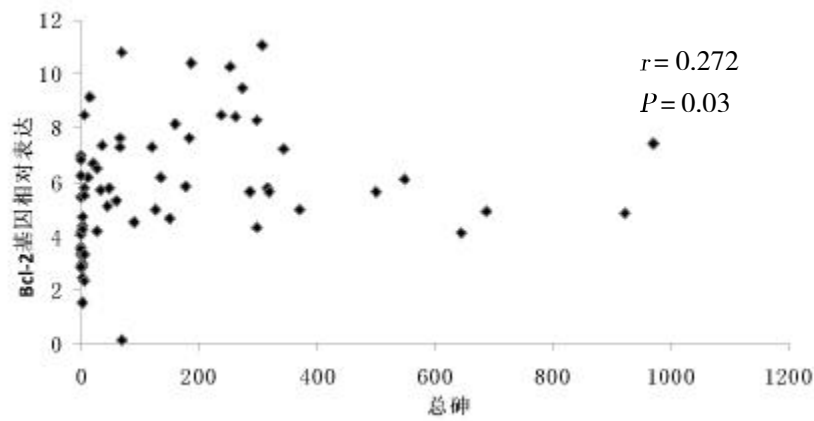


图 1 总砷与 Bcl-2 相对表达关系

Fig. 1 The relationship between the total arsenic content and the relative expression of Bcl-2

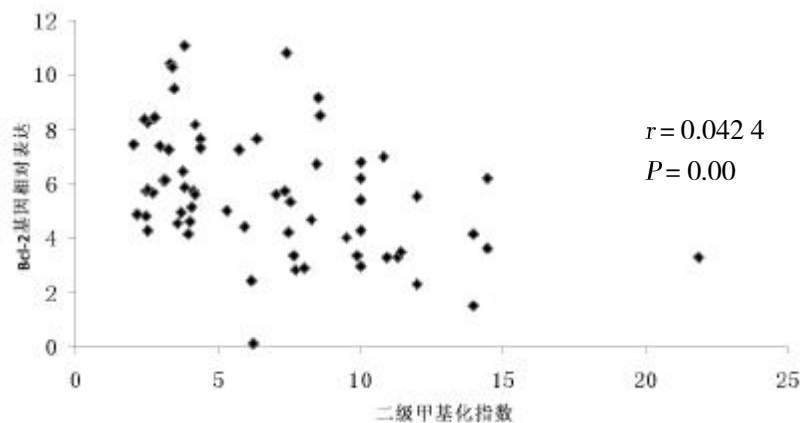


图 2 二级甲基化指数与 Bcl-2 相对表达关系

Fig. 2 The relationship between the relative expression of Bcl-2 and SMI

3 讨论

目前,砒致癌已为大量的人群流行病学调查资料所证实.流行病学研究和临床观察证明:人类长期暴露于无机砷及其化合物可以引起皮肤和内脏组织的肿瘤发病率增高. Bcl-2 作为癌基因提出最初是在淋巴瘤. 其后的研究表明,许多人类肿瘤中均有 Bcl-2 的高度表达,它与肿瘤的发生密切相关^[8].

不同的砷水平对 Bcl-2 表达的影响尚未明确,本次研究采用流行病学的方法收集样本,测得暴露人群外周血淋巴细胞中的 Bcl-2 表达水平显著高于对照组,并且与尿中 MMA 和 DMA 的含量显著正相关,实验结果表明,砷暴露使人外周血淋巴细胞中 Bcl-2 基因表达显著升高. 与本研究结果相似,王宇东等研究发现^[9],砷中毒患者血清 Bcl-2 水平显著高于外对照组,反映了患者体内砷水平具有上调 Bcl-2 作用;Escudero-Lourdes C 等将上皮细胞用 MMA 染毒 3 个月后发现, Bcl-2 的表达显著增高^[10]. 此外,一些体外细胞染毒研究发现经三氧化二砷染毒后,细胞中 Bcl-2 的表达有所降低. 单悦梅等研究发现,不同浓度的三氧化二砷作用于 SGC-7901 细胞后, Bcl-2 基因呈低表达^[11]. 这一结果上的差异,提示在不同的组织或细胞中,砷的作用效果可能并不相同,从而导致其对 Bcl-2 基因的表达影响也不同,由此,今后可作更深入的进一步研究.

Yung-Kai 等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. 研究显示,有明确砷接触史的高血压患者与非高血压人比较,高血压患者具有更低的二级甲基化指数^[12]; Yen-Ching 等研究显示,低二级甲基化指数 (≤ 4.8) 更容易患膀胱癌^[13]. 在本次研究中发现,低二级甲基化指数导致外周血淋巴细胞 Bcl-2 基因的高表达,而砷暴露人群具有更低的二级甲基化指数,和更高的 Bcl-2 基因的表达量. 这些研究结果提示,低的二级甲基化指数会导致 Bcl-2 基因的异常表达,并与某些疾病的发生具有紧密的联系,因此,应着重加强对砷暴露人群的健康监测,采取相应措施来提高砷二级甲基化指数,防止相关疾病的发生.

[参考文献]

[1] HEI T K, LIU S X, WALDREN C. Mutagenicity of arsenic

- in mammalian cells :Role of reactive oxygen species [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 8 103 - 8 107.
- [2] SAKURAI T, KOJIMA C, OCHIAI M, et al. Cellular glutathione prevent scytolethality of monomethylarsonic acid [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 195(2): 129 - 141.
- [3] 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.
- [4] CHEN G Q, ZHOU L, STYBLO M, et al. Methylated metabolites of arsenic trioxide are more potent than arsenic trioxide as apoptotic but not differentiation inducers in leukemia and lymphoma cells [J]. Cancer Res, 2003, 63(8): 1 853 - 1 859.
- [5] STAVROVSKAYA A A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells [J]. Biochemistry Mosc, 2000, 65(1): 95 - 96.
- [6] SCHOLZ C, RICHTER A, LEHMANN M, et al. Arsenic trioxide induces regulated, death receptor-independent cell death through a Bcl-2-controlled pathway [J]. Oncogene, 2005, 24(47): 7 031 - 7 042.
- [7] SEOL J G, PARK W H, KIM E S, et al. Potential role of caspase-3 and -9 in arsenic trioxide-mediated apoptosis in PCI-1 head and neck cancer cells [J]. Int J Oncol, 2001, 18(2): 249 - 255.
- [8] 范钰, 林庚金, 钱立平, 等. 大鼠胃黏膜癌变发生发展过程中 bcl-2 基因与端粒酶的动态表达 [J]. 复旦学报 (医学科学版), 2001, 28(6): 479 - 482.
- [9] 王宇东, 王芝芳, 白广禄, 等. 陕南燃煤型砷中毒患者内外环境砷、硒水平及对血清 P53、BCL-2、NO、MDA 的影响 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2008, 29(1): 29 - 32.
- [10] ESCUDERO-LOURDES C, WU T, CAMARILLO J M, et al. Interleukin-8 (IL-8) over-production and autocrine cell activation are key factors in monomethylarsonous acid [MMA (III)]-induced malignant transformation of urothelial cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 258(1): 8 - 10.
- [11] 单悦梅, 万勃威. 三氧化二砷诱导胃癌细胞凋亡及其对 bcl-2 基因和 bax 蛋白表达的影响 [J]. 中国全科医学, 2012, 15(5C): 1 727 - 1 729.
- [12] HUANG Y K, TSENG C H, HUANG Y L, 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.
- [13] CHEN Y C, SU H J, GUO Y L, et al. Arsenic methylation and bladder cancer risk in Taiwan [J]. Cancer Cause & Control, 2003, 14(4): 303 - 310.

(2012-12-13 收稿)