论著

文章编号:1000-5404(2010)21-2322-04

谷胱甘肽转移酶基因多态性在微囊藻毒素致人群肝损伤发生中的作用

李 砚,陈济安,赵 清,邱志群,许 川,曾 慧,舒为群 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院环境卫生学教研室)

【摘要】 目的 探讨谷胱甘肽转移酶(glutathione S-transferase,GST)M1(GSTM1)和T1(GSTT1)基因多态性在微囊藻毒素(microcystins,MCs)致人群肝损伤发生中的作用。方法 在重庆涪陵区采用酶联免疫法检测饮用水和水产品中MCs浓度,并随机在MCs暴露人群中选择肝功异常人群81名,肝功正常人群92名为研究对象进行病例-对照研究,多重PCR方法检测GSTM1和GSTTl基因多态性,采用χ^2检验比较各组基因型的差异。结果 饮用水中MCs的浓度连续4年超过国家规定标准,水产品中MCs阳性率为100%;GSTM1缺失频率在肝损伤组和对照组分别为43.2%和47.8%,两组间无显著统计学差异($P=1.00$);GSTT1缺失频率在肝损伤组为60.5%,高于对照组39.1%,两组间有显著统计学差异($P=0.006$);GSTM1和GSTT1共同缺失频率在肝损伤组为29.6%,同样高于对照组中16.3%,两组间有显著统计学差异($P=0.045$)。结论 GSTT1缺失可能是在MCs暴露人群肝损伤的易感因素;GSTM1和GSTT1共同缺失将会增加MCs暴露人群发生肝损伤的危险性。

【关键词】 微囊藻毒素;肝损伤;基因多态性;谷胱甘肽转移酶M1;谷胱甘肽转移酶T1
【中图法分类号】 R123;R394.5 R575 【文献标志码】 A

Role of glutathione S-transferase genetic polymorphisms in persons with liver damage due to microcystin exposure

Li Yan, Chen Ji'an, Zhao Qing, Qiu Zhiqun, Xu Chuan, Zeng Hui, Shu Weiqun (Department of Environmental Hygiene, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 Objective To study the role of genetic polymorphisms of glutathione S-transferases (GSTT1, GSTM1) in persons with liver damage due to microcystin (MC) exposure. Methods Concentrations of MC in drinking water and aquatic products in Fuling District (Chongqing, China) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay, and 81 persons with liver damage were randomly selected as an observation group and 92 healthy persons served as a control group. Genetic polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 were assayed by multiplex PCR. Difference in genotypes was detected by Chi square test. Results The concentration of MC in drinking water was higher than the national standard in the past 4 consecutive years, and the positive MC rate was 100% for aquatic products. The frequency of GSTM1 null genotype was 43.2% in observation group and 47.8% in control group ($P>0.05$). The frequency of GSTT1 null genotype was 60.5% in observation group and 39.1% in control group ($P<0.05$). The percentage of GSTM1 and GSTT1 null genotypes was 29.6% in observation group and 39.1% in control group ($P<0.05$). Conclusion GSTT1 null genotype may be the susceptible factor for liver damage in persons exposed to MC. GSTM1 and GSTT1 null genotypes may increase the risk of developing liver damage in persons exposed to MC.

【Key words】 microcystin; liver damage; genetic polymorphism; GSTM1; GSTT1

Supported by the National Natural Science Funds for Distinguished Young Scholar(30800900) and the Innovative Foundation of Third Military Medical University (0416). Corresponding author: Shu Weiqun, Tel: 86-23-68752294, E-mail: xm0630@sina.com

近年来,蓝藻水华日趋频繁,其产生了大量对人类健康有极大危害的微囊藻毒素(microcystins, MCs)。研究表明MCs主要产生肝毒性,长期慢性暴露甚至可以导致肝癌[1]。林玉娣[2]等通过对MCs暴露人群进行问卷调查、血清酶检测及对水域中生物样品中的MCs检测,发现MCs暴露是引起当地小学生肝损伤的一个重要的危险因素。谷胱甘肽转移酶(glutathione

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金(30800900);第三军医大学科研创新基金(0416)
【通信作者】 舒为群,电话:(023)68752294,E-mail:xm0630@sina.com

S-transferase, GST) GSTs 是一组具有解毒功能的蛋白超基因家族,是体内生物转化最重要的Ⅱ相代谢酶之一,是细胞抗损伤、抗癌变的主要解毒酶。GSTM1 和 GSTT1 基因多态性与Ⅱ相代谢酶的活性大小密切相关,是导致机体反应差异性的重要影响因素之一[3]。人体血清肝功酶水平是反映早期肝损伤的重要标志物,广泛用于人群肝功能检查[4]。因此,我们采用病例-对照研究方法探讨 MCs 暴露人群中的 GSTM1 和 GSTT1 基因多态性与肝损伤易感性的关系,为筛选和保护 MCs 易感人群提供依据。

1 材料与方法

1.1 水样和水产品

于2005-2009年每年的8月,在重庆市涪陵区义和镇沿其水库主轴选择了4个采样点,采集深度0.5 m水样各5 L。2009年8月捕捉水库中鱼类和鸭子,冷藏条件下带回实验室后立即取肝脏1 g和肌肉5 g,-20 ℃保存备检。

1.2 研究对象

随机选取重庆市涪陵区义和镇中小学生1 112名,年龄7~15岁。设计问卷调查表,收集研究对象的年龄、性别、饮用水源、水量、水产品消费量等信息。根据问卷调查结果判定有5年以上MCs暴露史的学生780名,并对所有对象作乙肝两对半、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)和谷氨酰转肽酶(GGT)检测。根据问卷调查和肝功能检测结果,排除乙肝、药物等其他因素影响后,选择81名肝功酶异常的人群为肝损伤组[AST = (35.7 ± 8.2) U/L、ALT = (42.6 ± 7.1) U/L、ALP = (29.4 ± 8.3) U/L、GGT = (357.2 ± 90.7) U/L],同时在MCs暴露人群中随机选取92名肝功酶正常的人群作为对照组。研究对象的父母签署知情同意书后,静脉抽血2 ml,乙二胺四乙酸二钠(EDTA)抗凝后置-70 ℃保存备用。

1.3 仪器试剂

主要仪器:有机玻璃采水器(中国科学院水生生物研究所)、玻璃纤维滤膜(Whatman GF/C)、高速冷冻离心机(美国Thermo Electron Corporation)、PTC2100型原位基因扩增仪(美国Thermo Electron Corporation)、电泳槽(美国Thermo E2lectron Corporation)、高性能冷光源凝胶成像分析系统(美国Alpha Innotech Corporation)。酶联免疫检测试剂盒(中国科学院水生生物研究所)、多重PCR引物购自重庆升博科技有限公司;血液基因组提取试剂盒、*Taq* DNA聚合酶均购自北京天根生化科技有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 MC-LR测定 水样-80 ℃冻融3次,经玻璃纤维滤膜过滤,取样1 ml待测。肌肉和肝脏样品经丁醇:甲醇:水(体积比为5:25:70)抽提,C18小柱过滤,真空冷冻干燥机冷冻,小管分装待测。样品中MC-LR测定采用酶联免疫吸附法,操作步骤见文献[5]报道。

1.4.2 基因型分析 采用血液基因组提取试剂盒进行DNA提取,-20 ℃保存备用。根据文献[6]报道选择了β-Globin、GSTM1、GSTT1 3对引物(表1),以β-Globin为内对照与GSTT1、GSTM1同时扩增进行多重PCR检测。

表1 PCR引物序列与扩增片段大小

序列名称	序列(5′→3′)	扩增片段(bp)
β-Globin	CAACTTCATCCACGTTCACCGAA GAGCCAAGGACAGCAAC	268
GSTM1	CTCCTGATTATGACAGAAGCCCTGGATTGTAGCAGATCATGC	650
GSTT1	TTCCTTACTGGTCCTCACATCTCTCACCGGATCATGGCCAGCA	480

PCR反应体系25 μl,含DNA模板20~30 ng,引物1和2各1 μl,2×Master Mix 12.5 μl,适量ddH_2O。PCR反应条件:94 ℃预变性3 min,94 ℃变性30 s,56 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,共34个循环,最后72 ℃延伸5 min。1.7%琼脂糖凝胶电泳,采用凝胶紫外成像系统分析结果。

1.5 统计学分析

采用SPSS 12.0统计进行数据分析,根据数据分布特点采用t检验和秩和检验比较两组人群人口学指标,χ^2检验比较各组基因频率,比值比(*OR*)及95% 可信区间(95% *CI*)。以双侧$\alpha = 0.05$为检验水准。

2 结果

2.1 MC-LR检测

2005-2009年共检测水样20份,阳性率为100%。2005-2008年水样中MC-LR浓度依次为1.1、3.2、4.1、4.3 μg/L,均高于国家规定标准1 μg/L,2009年停止养鱼后,MC-LR浓度急剧下降为0.2 μg/L。

2009年8月在水库中捕获了6种鱼类和1种禽类,检测结果见表2,肝脏和肌肉样本中均检测出MC-LR,且肝脏中浓度高于肌肉中的浓度,花鲢肝脏MC-LR含量最高为(580 ± 34) ng/g DW(dry weight,干质量)。

表2 水产品中MC-LR的含量(ng/g干质量,$\bar{x} \pm s$)

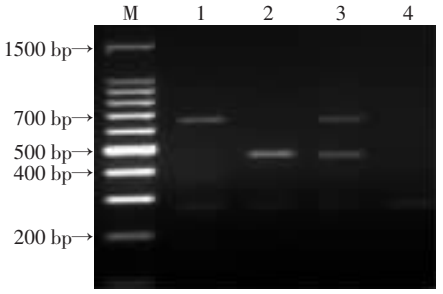
种类	数量	肝脏	肌肉
白鲢	6	564 ± 25	485 ± 32
花鲢	4	580 ± 34	320 ± 27
鲫鱼	5	86 ± 16	75 ± 19
鲤鱼	5	510 ± 28	243 ± 34
草鱼	6	286 ± 53	125 ± 43
鸭	3	215 ± 21	107 ± 18

2.2 基因型判定

采用多重PCR技术检测GSTM1和GSTT1,电泳结果见图1。出现650 bp和268 bp目的条带,判定为GSTM1(+)/GSTT1(-);出现480 bp和268 bp目的条带,判定为GSTM1(-)/GSTT1(+);均出现650 bp,268 bp和480 bp目的条带,则判定为GSTM1(+)/GSTT1(+),而只出现268 bp目的条带为GSTM1(-)/GSTT1(-)。

2.3 人群基本情况

本研究中,肝损伤组年龄为(10.9 ± 2.1)岁,对照组为(11.4 ± 2.0)岁,两组无统计学差异($P = 0.13$)。肝损伤组中男性47名(58.0%),每日饮水量(1.1 ± 0.3) L,体质量指数(body mass index,BMI)为(11.2 ± 1.8)。对照组中男性58(63.0%)名,每日饮水量(1.2 ± 0.2) L,BMI为(11.5 ± 2.1)。两组人群的性别组成、饮水量和BMI均无统计学差异($P = 0.29$)。



M：标准；1：GSTM1（+）/GSTT1（-）；2：GSTM1（-）/GSTT1（+）；3：GSTM1（+）/GSTT1（+）；4：GSTM1（-）/GSTT1（-）

图1　GSTM1 和 GSTT1 基因型判定

2.4　基因型分布

两组人群的 GSTM1 和 GSTT1 基因型的分布状况见表3。两组间 GSTM1 基因型的分布没有统计学差异（$P=1$，χ^2检验），但肝损伤组中 GSTT1 基因缺失型的频率为60.5%，显著高于对照组的39.1%，且差异具有统计学意义（$P=0.006$，χ^2检验）。

表3　肝损伤组与对照组的 GSTT1、GSTM1 基因型分布

组别	n	GSTM1		GSTT1	
		+	-	+	-
肝损伤组	81	42（56.8%）	39（43.2%）	32（39.50%）	49（60.5%）
对照组	92	48（52.2%）	44（47.8%）	56（60.9%）	36（39.1%）
χ^2值		0.37		7.87	
P值		0.65		0.01	

2.5　GSTM1、GSTT1 联合作用

两组人群 GSTM1 和 GSTT1 基因型联合作用的比较见表4。在 GSTM1 和 GSTT1 基因型联合作用中，GSTM1（+）/GSTT1（+）与 GSTM1（-）/GSTT1（-）有显著性差异（$P=0.04$，OR=2.54），而 GSTM1（+）/GSTT1（+）与 GSTM1（+）/GSTT1（-）、GSTM1（-）/GSTT1（+）这两对联合作用的基因型间均无统计学意义（$P>0.05$）。

表4　GSTT1 和 GSTM1 联合作用的比较

GSTM1/GSTT1	肝损伤组	对照组	χ^2	P	OR	95% CI
+/+	17	27	-	-	-	-
+/-	25	21	2.23	0.15	1.89	0.82~4.38
-/+	15	29	0.20	0.83	1.22	0.51~2.91
-/-	24	15	4.34	0.04	2.54	1.05~6.16

3　讨论

目前我国许多地区 MCs 染严重，不仅严重影响水质和环境卫生，而且给人民健康带来巨大的威胁[13]。本研究地点位于重庆市涪陵区义和镇，饮用水中 MCs 浓度连续4年的高于国家规定标准1 μg/L，2009年该镇水产品中 MCs 浓度也高于世界卫生组织（WHO）推荐的限值[14]。问卷调查结果显示当地大多数中小学生长期饮用该镇水库的饮用水，MCs 暴露时间较长。

MCs 慢性暴露通过饮水食物途径进入体内后主要蓄积于肝脏，产生肝毒性，主要表现为肝功酶的升高和异常。根据 GBZ59-2002 中慢性中毒性肝病肝的初筛指标，我们选择了 AST、ALT、ALP 和 GGT 指标作为肝损伤指标，并排除乙肝感染等因素的影响。研究表明，人体对各种毒物的反应存在明显的差异，甚至同一毒物在不同个体内的活性差异可达数十倍，这种差异主要是由于代谢酶基因的遗传多态性所决定的[15]。人类 GSTs 为体内最重要的Ⅱ相代谢酶，能催化 GSH 的巯基（-SH）结合到疏水的化合物上，变成亲水的物质，将体内各种致癌物和断裂剂产生的亲电子试剂、潜在毒性的物质及亲脂性化合物降解排出，在毒物代谢中发挥重要的作用。GSTMl 和 GSTT1 分别位于染色体 1p13.3、22q11.2 区，基因缺失的个体缺乏Ⅱ相酶活性，难以有效解毒体内中间代谢产物，增加了毒物的危险性[16]。

本研究结果表明肝损伤组和暴露组 GSTM1 缺失的频率分别为43.2%和47.8%，两组间没有统计学差异（$P=1.00$）。但邓卓霖等[17]研究显示在肝癌组162人例中 GSTM1（-）的频率为63%，高于对照组52%，且具有统计学差异（$P<0.05$）。韦义萍[18]的研究中肝细胞癌组 GSTM1 和 GSTT1 基因缺失率为63.6%和60.0%，分别高于对照组47.4%和40.7%，两组间有统计学差异（$P<0.05$），GSTM1 缺失的差异更为显著（$P<0.01$）。有研究表明 GSTM1 基因缺失与肝癌易感性存在相关性的原因，可能与地区、种族差异有关[19]。在本试验中没有差异的原因可能是 MCs 暴露量低，也可能是选择的样本量不够发现差异。

我们的结果还发现肝损伤组中 GSTT1（-）频率为60.5%高于对照组39.1%，且具有统计学差异（$P=0.006$）。与国内的报道较一致，任雪峰等[20]在对氯乙烯致肝损伤与代谢酶基因多态性的关系研究中，发现的肝损伤组与对照组 GSTT1 基因型分布有统计学差异（OR为0.35，95% CI为0.12~0.97，$P<0.05$），且多元 Logistic 回归分析同样显示，GSTT1 基因型，GSTT1 与 GSTM1 基因型间的联合作用与肝脏损伤有关联（$P<0.05$）。刘自光等[21]采用病例对照方法研究广西人群肝癌易感性因素，结果显示正常人群组 GSTT1（-）频率为33.96%，低于肝癌组 GSTT1（-）频率为54.9%，且具有统计学差异（$P<0.05$），比值比（OR）为2.367，GSTT1（-）可能导致广西人肝癌易感性增加。

慢性肝损伤的发生是一个长期复杂的过程，不仅有基因多态性和环境因素共同作用，而且还存在基因间的交互作用。在本研究中肝损伤组中 GSTM1（-）/GSTT1（-）基因型频率为29.6%，高于对照组16.3%，且 GSTM1（-）/GSTT1（-）的个体发生肝损

伤的危险性分别比 GSTM1(+)/GSTT1(+)高 2.54 倍。杨志国等[22]研究认为 GSTM1 与 GSTT1 二者的功能有不同程度的重叠或交叉,单个基因的酶活力的减弱或缺失有时可能由 GSTs 家族其他成员的作用覆盖得到补偿,但两个基因同时缺损就较难出现这种补偿作用。郭惠媛等[23]在研究 GSTM1(-)/GSTT1(-)与肝癌的遗传易感性研究中发现,OR 值比较后拥有 GSTM1(-)/GSTT1(-)基因型的个体罹患肝细胞癌的危险性增加 4.57 倍。

国内不同地区人群的代谢酶基因多态性分布频率存在一定差异,很有必要对全国人群的基因的分布进行了解。经过统计分析,重庆地区[7]、贵州地区[8]、江苏地区[9]、广西地区[10]人群中 GSTM1 基因型分布无统计学差异($P>0.05$),但重庆地区、贵州地区、江苏地区、广西地区人群与河北[11]、浙江地区[12]人群中的 GSTM1 基因型分布存在差异且有统计学意义($P<0.05$)。重庆地区、贵州地区、江苏地区、广西地区、河北地区人群中 GSTT1 基因均无统计学差异($P>0.05$),但重庆地区、贵州地区、江苏地区、广西地区、河北地区与浙江地区人群中的 GSTM1 基因型分布具有统计学差异($P<0.05$)。本研究中 GSTM1 和 GSTT11 基因缺陷型分别占 47.8% 和 39.1%,两基因联合缺失的比例为 29.6%,只与浙江地区基因分布频率有差异。

综上所述,本文研究结果表明:在 MCs 暴露人群中 GSTT1 基因缺失可能是肝损伤的易感基因型,但未发现两组间 GSTM1(-)的差异,可能是人群样本量小的原因。GSTM1 和 GSTT1 缺失基因型交互作用会增加发生肝损伤的危险性,导致暴露人群对 MCs 致肝损伤的易感性增强,但其作用的具体机制仍有待进一步研究。

参考文献:

[1] Grosse Y, Baan R, Straif K, *et al*. Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins[J]. Lancet Oncol, 2006, 7(8): 628-629.

[2] 林玉娣,俞顺章,徐明,等. 无锡太湖水域藻类毒素污染与人群健康关系的研究[J]. 上海预防医学:2003, 15(9):435-438.

[3] Kadouri L, Kote-Jarai Z, Hubert A, *et al*. Glutathione-S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms, and breast cancer risk, in BRCA1/2 mutation carriers[J]. Br J Cancer, 2008, 98(14):2006-2010.

[4] 孙志强, 毛远丽. 肝病酶学指标及临床应用进展[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(6) 659-663.

[5] Sheng J W, He M, Shi H C, *et al*. A comprehensive immunoassay for the detection of microcystins in waters based on polyclonal antibodies [J]. Anal Chim Acta, 2006, 572 (2): 309-315.

[6] Ladero J M, Martinez C, Garcia-Martin E, *et al*. Glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms are not related to the risk of hepatocellular carcinoma: a study in the Spanish population[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(1): 73-77.

[7] 黄萍, 周紫垣, 刘晋祎, 等. 重庆地区人群 GSTT1 和 GSTM1 基因多态性与结直肠癌易感性研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(19):1714-1717.

[8] 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): 6-8.

[9] 付全航, 高长明, 吴建中, 等. 谷胱苷肽转硫酶 GSTM1、GSTT1 和 GSTP1 基因多态性与江苏人群直肠癌易感性的关系[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2007, 27(2):196-201.

[10] 龙喜带, 马韵, 韦义萍, 等. 广西地区人群 gstM1 和 gstT1 编码基因型多态性与肝细胞癌易感性分析[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(10): 777-781.

[11] 任文博, 范志亮, 郭艳苏, 等. 河北省健康人群谷胱甘肽硫转移酶 T1、M1 基因多态性的研究[J]. 脑与神经疾病杂志, 2009, 17(2):88-92.

[12] 陈坤, 蒋沁婷, 马新源, 等. 谷胱甘肽转移酶 T1 和 M1 基因多态性及吸烟与结直肠癌关系的对照研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(11):645-648.

[13] 蒲朝文, 封雷, 张仁平, 等. 重庆市涪陵区城乡居民饮用水微囊藻毒素污染现状及消除方法调查[J]. 卫生研究, 2007, 36(4): 471-472.

[14] Chorus I, Bartram J. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their public health consequences, monitoring and management[M]. London: E & FN Spon, 1999.

[15] Kishi R, Sata F, Yoshioka E, *et al*. Exploiting gene-environment interaction to detect adverse health effects of environmental chemicals on the next generation[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2008, 102(2): 191-203.

[16] Palma S, Cornetta T, Padua L, *et al*. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on genotoxic effects induced by tobacco smoke[J]. Mutat Res, 2007, 633(1):1-12.

[17] 邓卓霖, 韦义萍, 马韵. 肝细胞癌患者的谷胱甘肽转移酶 M1 基因型分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23(6): 477-479.

[18] 韦义萍, 马韵, 邓卓霖. 肝细胞癌患者的谷胱甘肽硫转移酶基因缺失的研究[J]. 肿瘤, 2003, 23(6): 464-466.

[19] White D L, Li D, Nurgalieva Z, *et al*. Genetic variants of glutathione S-transferase as possible risk factors for hepatocellular carcinoma: a HuGE systematic review and meta-analysis[J]. Am J Epidemiol, 2008, 167(4): 377-389.

[20] 任雪峰, 万俊香, 李玉芳, 等. 氯乙烯致肝损伤与毒物代谢酶基因多态性的关系[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2001, 19(6): 412-415.

[21] 刘自光, 韦义萍, 马韵, 等. 谷胱甘肽-硫-转移酶 T1 基因缺失人群与肝癌的相关性研究[J]. 广西医科大学学报, 2003, 20(2): 161-163.

[22] 杨志国, 谢裕安, 匡志鹏, 等. 广西扶绥人群 GSTM1 和 GSTT1 基因多态性与肝癌易感性关系的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(13): 970-973.

[23] 郭惠媛, 边建超, 江峰, 等. 洛阳市 GSTM1 和 GSTT1 缺失基因型与肝癌的遗传易感性[J]. 肿瘤, 2005, 25(1): 58-61.

(收稿:2010-06-18 修回:2010-07-16)

(编辑 邓强庭)