

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.24.012

燃煤污染型地方性氟中毒患者血细胞 hMLH1 与 MGMT mRNA 表达改变^{*}

王煜衡¹, 张婷¹, 吴昌学¹, 李毅¹, 官志忠^{1,2}, 齐晓岚^{1△}

(贵州医科大学:1. 分子生物学重点实验室;2. 病理学教研室, 贵阳 550004)

[摘要] 目的 探讨燃煤污染型地方性氟中毒(简称燃煤型地氟病)对血液中错配修复基因(hMLH1)及 O(6)-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶基因(MGMT)mRNA 表达水平的影响。方法 在贵州省毕节地区燃煤型地氟病区抽取 45 例患者, 按其氟斑牙和氟骨症严重程度分为轻、中、重度组各 15 例。在毕节地区非病区抽取 15 名村民作为对照组。实时荧光定量 PCR 技术检测各组血样本 MGMT、hMLH1 mRNA 水平。结果 燃煤型氟中毒轻、中、重度 3 个组中 hMLH1 及 MGMT mRNA 水平与对照组相比明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 且随着氟中毒程度的加重, 其降低程度更加明显。组间两两比较, 随着中毒程度加重, 表达水平明显降低($P < 0.05$)。结论 MGMT 与 hMLH1 mRNA 水平在燃煤型氟中毒所造成的 DNA 损伤及修复机制中可能有负面作用。

[关键词] O(6)-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶; 错配修复基因; 氟中毒

[中图分类号] R34

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)24-3348-03

The effect of endemic fluorosis caused by coal burning on the expression of hMLH1 and MGMT mRNA^{*}

Wang Yiheng¹, Zhang Ting¹, Wu Changxue¹, Li Yi¹, Guan Zhizhong^{1,2}, Qi Xiaolan^{1△}

(1. Key Laboratory of Molecular Biology; 2. Department of Pathology, Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[Abstract] **Objective** To discuss the impact of endemic fluorosis caused by coal burning on the DNA repair gene human mismatch repair gene(hMLH1) and O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase(MGMT) mRNA level in blood. **Methods** Forty-five villagers selected from Bijie area of Guizhou Province were divided into three groups as the low-dose fluoride group, the middle-dose fluoride group, the high-dose fluoride group based on the severity of dental and skeletal fluorosis, and each group with 15 cases. Fifteen villagers from the non-fluorosis area of Bijie area were selected as control group. The MGMT and hMLH1 mRNA were quantitated with the real-time quantitative PCR technology. **Results** The mRNA expression level of MGMT, hMLH1 mRNA from the patients in fluorosis region decreased compared to control group($P < 0.05$), and had a positive correlation with the severity of fluorosis, which was significantly different in group comparison($P < 0.05$). **Conclusion** The reduction of MGMT and hMLH1 mRNA may play an important role in the mechanism of DNA injury and repair, which may be related to DNA damage arose from fluoride caused by coal burning.

[Key words] O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase; mismatch repair gene; fluorosis

燃煤污染型地方性氟中毒(简称燃煤型地氟病)指居民长期在室内使用无排烟道的土炉灶燃烧含氟量较高的煤用于取暖、做饭、烘干粮食和蔬菜等, 导致体内长期摄入过量氟所引起的全身损害性疾病^[1]。燃煤型地氟病患者除了表现有典型的氟骨症和氟斑牙特征外, 还可表现其他系统和器官的病理改变。近年来有关氟对基因改变和 DNA 损伤已经引起了较大的关注^[2], 研究表明氟在一定剂量条件下, 可引起肝细胞、生殖细胞、神经细胞、成骨细胞等 DNA 发生损伤。如果 DNA 损伤能够得到正确的修复, 则不会发生 DNA 的突变, 而如果修复发生错误或没有启动 DNA 的修复过程, 会诱导 DNA 突变。因此, DNA 损伤与修复之间的平衡决定了 DNA 是否发生改变及其程度。对于氟所诱导 DNA 损伤的增强, 主要原因之一是氟既诱导了 DNA 损伤, 同时也损害了 DNA 修复系统^[3]。

错配修复基因(hMLH1)及 O(6)-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基

转移酶基因(MGMT)是 DNA 修复系统中的两个重要基因, 本研究采用实时荧光定量 PCR 的方法对氟病区患者的血液样本 hMLH1 及 MGMT mRNA 水平进行检测, 研究其是否与氟中毒病患严重程度有关。

1 资料与方法

1.1 一般资料 在贵州省典型燃煤型地氟病区毕节市进行样本抽取, 选取八寨镇毛栗坪村 45 例燃煤型地氟病患者为氟病组, 平均年龄为(50.0±12.6)岁, 按 Dean 氏分类法对氟病区居民氟斑牙程度进行分级, 氟骨症诊断按 GB16396-1996 进行分类, 《地方性氟骨症临床分度诊断》(GB16396-1996)的诊断依据和分度原则为: 生活在地方性氟中毒病区的人群, 因氟摄入过量, 引起慢性中毒, X 线片发现有氟骨症征象时, 方可诊断为地方性氟骨症, 并按分度标准加以分度, 结合病区人群氟斑牙与氟骨症严重程度分为轻、中、重度组。同时, 在贵州省非燃煤

* 基金项目: 国家科技支撑计划项目(2013BAI05B03); 国家自然科学基金资助项目(81160335); 贵州省科技厅重点项目[黔科合计 Z 字(2012)4010]; 贵州省科技计划课题(国际合作项目)资助[黔科合外 G 字(2011)7014 号]。 作者简介: 王煜衡(1988—), 硕士, 主要从事燃煤型氟中毒的研究。 △ 通讯作者, Tel: 13885158277; E-mail: xiaolan76@163.com。

型地氟病区贵阳市沙文镇新寨村,选取年龄性别平衡的 15 名健康人群作为对照组,平均年龄为(50.4±14.2)岁。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂及仪器 Trizol (Invitrogen, 美国), 氯仿、异丙醇、SYBR Green (Roche, 德国), 逆转录试剂盒 (Invitrogen, 美国), DU640 核酸蛋白分析仪, ABI Step one 型 Real-time PCR 仪。

1.2.2 MGMT 及 hMLH1 mRNA 水平的测定 在知情同意的情况下,抽取患者静脉血 2 mL, 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,分离血细胞,采用经典 Trizol 一步法提取血液总 RNA,检测 RNA 浓度以及纯度。 A_{260}/A_{280} 比值在 1.9~2.1 表示无蛋白或 DNA 影响,为可用 RNA。按照逆转录试剂盒说明,取 3 μ g 血液总 RNA 为模板进行逆转录合成 cDNA, 设计并合成 MGMT 及 hMLH1 和内参 β -actin 荧光定量 PCR 引物,引物序列见表 1。运用 ABI Step One Plus 实时荧光定量 PCR 仪收集 MGMT 及 hMLH1 基因及内参照 β -actin 扩增循环的荧光信号,反应条件为:95 °C 10 min, 95 °C 15 s; 60 °C 60 s, 40 个循环 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。以 Applied Biosystems SDS2.1 软件进行荧光收集和数据分析。SDS2.1 软件分析其 $\Delta\Delta Ct$ 值和 RQ(relative quantity) 值($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$)。以 β -actin 为内参照分析结果,并计算各组 MGMT 及 hMLH1 mRNA 相对表达水平。实验重复 3 次,每次 3 个复孔。

表 1 MGMT 及 hMLH1 的引物序列

基因	引物
β -actin	上游: 5'-TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG-3' 下游: 5'-CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG-3'
MGMT	上游: 5'-TTG GAA AAA TGG ACA AGG ATT G-3' 下游: 5'-AGA CCC TGC TGA CAA CCA GAC-3'
hMLH1	上游: 5'-ACC TGA TTG GAT TAC CCC TTC T-3' 下游: 5'-CGC ATT CTT TAC TGA GGC TTT C-3'

1.3 统计学处理 数据分析采用 SPSS16.0 统计分析软件。统计采用单因素方差分析,方差齐性检验采用 Levene 法,方差齐则用 LSD 法,方差不齐则用 Dunnett-t3 法检验,以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

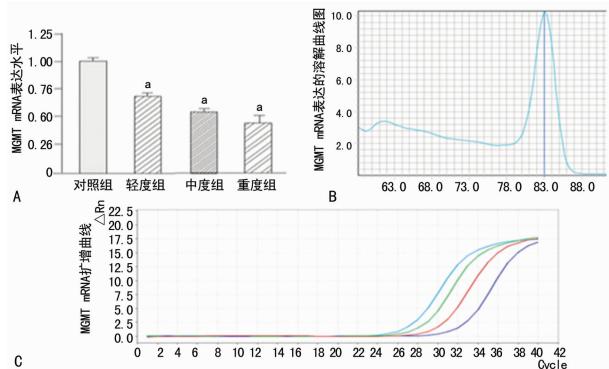
2 结 果

2.1 各组氟斑牙以及氟骨症分度情况 轻度氟病组氟斑牙分度情况如下,0 度 1 例,1 度 14 例;中度氟病组 1 度 2 例,2 度 13 例;重度氟病组 3 度 15 例。轻度氟病组氟骨症分度情况如下,0 度 1 例,1 度 14 例;中度氟病组 2 度 15 例;重度氟病组 2 度 2 例,3 度 13 例。

2.2 组间 MGMT mRNA 表达水平比较 在轻、中、重度氟病组中, MGMT mRNA 水平与对照组相比明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。通过组间两两比较发现, 随着氟中毒程度加重, MGMT 水平降低更加明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组 MGMT mRNA 表达水平比较见图 1。

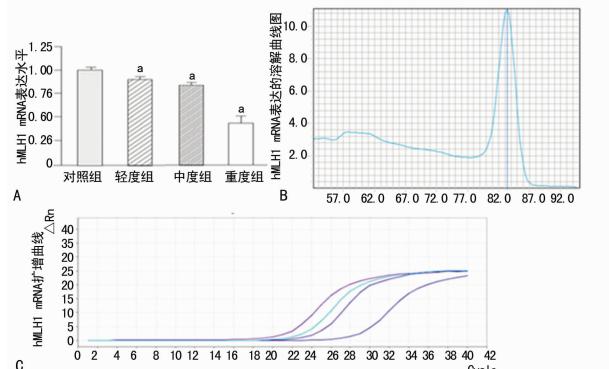
2.3 组间 hMLH1 mRNA 表达水平比较 在轻、中及重度氟病组中 hMLH1 mRNA 表达水平与对照组相比明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。组间两两比较发现, 随着氟中毒程度加重, hMLH1 mRNA 水平降低程度更加明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组 hMLH1 mRNA 表达水平比较见图 2。

图 2。



A: 表达水平; B: 溶解曲线; C: 扩增曲线;^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 1 各组 MGMT mRNA 表达水平



A: 表达水平; B: 溶解曲线; C: 扩增曲线;^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 2 各组 hMLH1 mRNA 表达水平

3 讨 论

氟是人类生命活动中必需的微量元素之一,适当氟的摄入,有助于骨骼和牙齿的正常发育,有利于神经系统的传导等。最早,人们只是发现氟与一些地区居民的牙齿斑釉的流行有潜在关联,后来,随着研究的不断深入,超过一定剂量的氟不仅会对牙齿造成伤害,还会对骨骼造成损伤,同时,对肝肾及神经系统的研究也证实了氟的非骨相损伤。随着氟研究的深入,氟化物的致癌性及致突变性日益得到重视,尤其是致突变性更成为研究热点^[4]。在细胞增殖过程中,DNA 损伤是比较常见的一种现象,遗传信息完整稳定遗传则需依赖于 DNA 损伤修复系统。人体内存在 DNA 损伤修复系统,能够及时有效地修复 DNA 的损伤,以确保 DNA 的准确复制及基因组的稳定性^[5]。

通过对氟中毒动物模型及人群的研究显示,氟可以诱导 DNA 损伤,影响与细胞凋亡相关基因的表达,诱导细胞凋亡的发生^[6-7]。如果 DNA 修复系统正常,刚不会引起 DNA 的突变,反之,则可导致 DNA 的损伤甚至突变发生。氟对机体的损伤除骨相损伤外,也有非骨相损伤,这些损伤的发生可能是氟在直接造成 DNA 损伤的同时,也影响了 DNA 修复系统。因此,本实验针对 DNA 修复相关基因进行研究,探讨氟是否会影响 DNA 修复系统。

DNA 错配修复(MMR)系统是 DNA 复制后的一种修复机制,能够特异性识别并修复错配碱基,具有维持基因复制保真度、维持基因组稳定及降低 DNA 自发突变的功能^[8-10]。现从人体共分离到 9 个 MMR 基因,分别编码不同的 MMR 蛋白^[8]。当 MMR 系统出现异常时,不能修复 DNA 复制中出现

的碱基错配时,会引起 DNA 突变率的增加,而产生遗传不稳定性。MGMT 与 DNA 烷基化损伤的修复密切相关,能修复 O6-甲基鸟嘌呤即烷化基团对细胞 DNA 的损伤,在 DNA 损伤修复的早期发挥了重要的作用^[11]。因此 MGMT 正常表达是机体细胞能够维持基因组 DNA 稳定性,修复 DNA 烷化损伤的关键酶。有研究表明,MGMT 表达低下与其启动子区异常甲基化有关,后续实验可对此进行进一步探索。hMLH1 能够消除 DNA 复制过程中由于 DNA 聚合酶滑移而引起碱基-碱基错配和插入缺失突环的形成。

由于有研究表明过量氟会造成 DNA 损伤,本实验以此为基础选取修复系统相关基因进行研究,结果显示染氟组 MGMT、hMLH1 mRNA 表达量与对照组相比均有所下降,且下降程度与氟中毒的严重程度成正比,说明过量氟可抑制 MGMT、hMLH1 的表达,可能对机体的 DNA 修复系统造成了一定的损害,导致 DNA 损伤无法正常修复。

氟引起 DNA 损伤的机制比较复杂,可能是多因素共同作用的结果,而研究 DNA 损伤修复基因与氟引起 DNA 损伤之间的关系对损伤机制的猜想有一定的意义。同时对深入研究氟引起 DNA 损伤的机制有一定的参考作用。

参考文献

- [1] 官忠惠. 关注地方性氟中毒发病机制研究的重要性和热点问题[J]. 中华地方病学杂志, 2014, 33(2): 119-120.
- [2] 刘清. 氟化物与 DNA 损伤的研究进展[J]. 微量元素与健康研究, 2003, 20(6): 54-57.
- [3] Margreet Hogeweg. 全球防盲资讯[J]. 实用防盲技术, 2007, 2(1): 1-3.

(上接第 3347 页)

壁软化型、淋巴结瘘型支气管结核,支气管镜下局部注入 INH + AMK 是否对其有效,有待于大量样本的采集进行验证。在本组中,女性患者 58 例,有报道支气管结核好发于青年女性^[8-9],女性发病率约为男性的 1~3 倍^[10-11],原因未明,可能与激素分泌水平有关。

综上所述,支气管镜下注入 INH + AMK 同时联合全身化疗治疗支气管结核可显著提高痰菌阴转率,促进肺结核病灶吸收,提高疗效,改善患者生活,是支气管结核治疗的有效方法^[12-13]。

参考文献

- [1] 中华与呼吸杂志编辑委员会. 2012 气管支气管结核诊断及治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(8): 581-282.
- [2] 唐神结, 高文. 临床结核病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 394-395.
- [3] 《中华结核和呼吸杂志》编辑委员会. 支气管结核的几点专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2009, 32(8): 568-571.
- [4] 王洪武, 周云芝, 李晶, 等. 支气管镜介入治疗支气管结核 24 例分析[J]. 中国误诊学杂志, 2010, 10(21): 5240-5241.
- [5] 武广亭. 支气管结核雾化及纤维支气管镜介入治疗疗效分析[J]. 中国现代医药杂志, 2006, 8(5): 90-91.
- [6] 刘雨清. 氟化物致突变及致瘤性的研究进展[J]. 中国地方病学杂志, 2001, 20(5): 78-79.
- [7] 赵转地, 张爱华, 梁冰, 等. 错配修复基因 hMLH1 和 hMSH2 甲基化及突变与地方性砷中毒关系[J]. 环境与职业医学, 2010, 27(10): 618-621.
- [8] Song GH, Huang FB, Gao JP, et al. Effects of fluoride on DNA damage and caspase-mediated apoptosis in the liver of rats[J]. Biol Trace Elel Res, 2015, 166(2): 173-182.
- [9] Jothiramajayam M, Sinha S, Ghosh M, et al. Sodium fluoride promotes apoptosis by generation of reactive oxygen species in human lymphocytes [J]. J Toxicol Environ Health A, 2014, 77(21): 1269-1280.
- [10] Peña-Díaz J, Rasmussen LJ. Approaches to diagnose DNA mismatch repair gene defects in cancer[J]. DNA Repair (Amst), 2016, 38: 147-154.
- [11] Li M, Zhang Q, Liu L, et al. Expression of the mismatch repair gene hMLH1 is enhanced in non-small cell lung cancer with EGFR mutations[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e78500.
- [12] Yu H, Li H, Cui YA, et al. The mRNA level of MLH1 in peripheral blood is a biomarker for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer[J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(5): 1135-1140.
- [13] 张霞, 吕斌, 郝巧玲, 等. 顺铂对 A549 细胞 DNA 修复酶 MGMT 和 DNA-PKcs 表达的影响[J]. 环境与职业医学, 2004, 21(1): 22-25.

(收稿日期:2016-02-11 修回日期:2016-05-04)

- [6] 刘黎, 李小晶, 谭伟, 等. 初治涂阳肺结核合并支气管内膜结核个体化疗程探讨[J]. 华中医学杂志, 2006, 30(5): 368-369.
- [7] 姜红妮, 瞿介明, 何礼贤. 气管-支气管结核诊断及治疗进展[J]. 中国防痨杂志, 2000, 22(1): 51-55.
- [8] 张正国. 经纤维支气管镜诊治支气管结核 50 例分析[J]. 临床肺科杂志, 2011, 16(11): 1712-1713.
- [9] 陈文明, 汤志坚, 王利芳. 37 例经纤维支气管镜诊断支气管结核临床分析[J]. 临床肺科杂志, 2007, 12(6): 622-623.
- [10] 张艳平. 支气管结核 68 例临床分析(附纤维支气管镜检查报告)[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2006, 3(4): 72-74.
- [11] Strel'tsov EN, Iakh'iaev KhS. Geography of endobronchial pathology in the Astrakhan Region during anthropogenic burden of the region [J]. Probl Tuber Bolezn Legk, 2005(9): 50-52.
- [12] 罗百灵, 袁浩. 临床结核病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 646-652.
- [13] 金发光, 刘同刚, 谢永宏, 等. 纤维支气管镜介入在各型气管、支气管结核治疗中的作用探讨[J]. 中国内镜杂志, 2005, 11(9): 904-906.

(收稿日期:2016-02-21 修回日期:2016-04-17)