

广州市交通警察血清 p53 蛋白的检测分析

朱文昌 陈清 楚心唯 罗晨玲 吴敏 王雅贤 陈思东

【摘要】 目的 检测职业接触汽车废气的人群中血清 p53 蛋白的过表达情况,分析经常大量接触汽车废气是否增加了 p53 基因异常的危险性。方法 采用酶联免疫吸附试验检测血清中 p53 蛋白的表达,采用卡方检验对工种与血清 p53 蛋白表达之间的关系进行分析。结果 交警外勤人员血清 p53 蛋白的过表达率为 5.74%,高于内勤人员(4.89%),但差异无显著性($P > 0.05$)。外勤人员工龄 30 年以上组血清 p53 蛋白过表达率为 12.12%,高于 30 年以下组(5.36%), $P < 0.05$, $OR = 2.43$,95% $CI : 1.11 \sim 5.33$ 。平均每周接触汽车废气 40 h 以上组的血清 p53 蛋白过表达率为 6.89%,远高于 40 h 以下组的 4.16%,二者的差异具有显著性($P < 0.05$, $OR = 1.71$,95% $CI : 1.03 \sim 2.81$)。结论 经常大量接触汽车废气可能增加了 p53 基因异常的危险性,从而使使得肺癌的危险性增加。

【关键词】 汽车废气; 肺肿瘤; p53 蛋白

Study on serum p53 protein in cops in Guangzhou city ZHU Wen-chang*, CHEN Qing, CHU Xin-wei, LUO Chen-ling, WU Min, WANG Ya-xian, CHEN Si-dong. *Department of Epidemiology, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China
Corresponding author: ZHU Wen-chang. E-mail: zhuwenchang@263.net

【Abstract】 Objective Serum p53 protein overexpression was detected in population exposed to traffic exhaust gas to study the relation between traffic exhaust gas and the increased risk in p53 gene mutation. **Methods** Serum p53 protein expression was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Relationship between different types of job and serum p53 protein overexpression were studied by pearson Chi-square tests. **Results** Results on serum p53 protein overexpression on jobs outside of office (5.74%) were not significantly higher than jobs inside the office. However, it suggested that traffic police men (12.12%) working outside of office, with whose length of service longer than 30 years had a significant overexpression of serum p53 protein than the others (5.36%) whose length of service was less than 30 years ($P < 0.05$, $OR = 2.43$, 95% $CI : 1.11-5.33$). Overexpression rate of p53 protein appeared to be 6.89% in the group whose average weekly exposure hours were more than 40 hours, which was significant higher than the group whose exposed hours were less than 40 hours ($P < 0.05$, $OR = 1.71$, 95% $CI : 1.03-2.81$). **Conclusion** The result suggested that traffic exhaust gas was likely to cause mutation of p53 gene and increasing the incidence of lung cancer.

【Key words】 Traffic exhaust gas; Lung neoplasms; p53 protein

随着我国经济的飞速发展,城市汽车保有量的急剧增加,汽车废气已经成为城市大气污染的主要的污染源之一。汽车废气中含有大量的颗粒物,这些颗粒物表面吸附了许多有害物质,其中包括了大量的致癌物。微核试验证实这种颗粒物具有致突变性,动物实验也证实了这种颗粒物可以引起肺癌^[1]。交通警察(交警)是大量接触汽车废气的职业人群,

以往有一些流行病学调查表明,交警的肺癌发病率要高于一般人群^[2]。血清 p53 蛋白在肺癌人群中的过表达率较高,本研究旨在交警中检测血清 p53 蛋白表达情况,并分析汽车废气等因素与血清 p53 蛋白表达之间的关系,以探讨血清 p53 蛋白作为交警早期筛查肺癌指标的意义。

对象与方法

1. 研究对象:调查对象为广州市交警 2 383 人。其中男性 2 099 人,占 88.5%,女性 274 人,占 11.5%,男女比例为 7.7:1,最小年龄 19 岁,最大 83 岁,平均年龄 35.8 岁;外勤人员 1 428 人,占 60.2%,内勤人员 838 人,占 35.3%,退休人员 80 人,占

基金项目 广东省医学科研基金资助项目(A2001349)

作者单位 510515 广州,第一军医大学流行病学教研室(朱文昌、陈清、楚心唯、罗晨玲、吴敏、王雅贤);广东药学院(陈思东)

第一作者现工作单位 510315 广州,第一军医大学分校军事医学教研室

3.4%。

2. 检测标本 :每名被调查者从手臂静脉采集 3 ml 血液 非抗凝 ,置入 5 ml 试管 ,标记 ,将试管置入水平离心机 4 000 r/min 离心 10 min ,分离上层血清备用。

3. 检测方法 :采用酶联免疫吸附试验双抗体夹心法 ,以重组人 p53 蛋白为阳性对照 ,正常人血清为阴性对照^[3]。①包被 :用包被缓冲液(pH 9.6 , 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液)将抗体稀释至 p53 蛋白质含量为 15 μg/ml ,在每孔中加 0.1 ml ,37℃ 1 h , 4℃ 过夜 ,用 pH 7.4 0.15 mol/L PBS 洗涤(洗 3 次 ,每次 3 min)。②封闭 :10% 小牛血清每孔 0.2 ml , 4℃ 过夜 ,洗涤(同上)。③加样 :加待测血清每孔 0.1 ml ,每份标本 2 孔 ,同时每板做空白对照、阴性对照、阳性对照各 2 孔 ,37℃ 1 h ,然后 4℃ 过夜 ,洗涤(同上)。④加酶标抗体 :加入新鲜稀释的酶标抗体(1:400) ,每孔 0.1 ml ,37℃ 1 h ,洗涤。⑤显色 :加入新鲜配置的 TMB 底物液 ,每孔 0.05 ml ,室温 10~30 min。⑥终止 :加入 2 mol/L H₂SO₄ ,每孔 0.05 ml。⑦结果判定 :在酶标仪上 ,于 450 nm 处 ,以空白对照孔调零 ,测各孔 A(吸光度)值 ,待测标本的 A 值比阴性对照值高 2.1 ,即判定为过表达阳性。主要试剂 :鼠抗人 p53 单克隆抗体购自原北京医科大学 ,重组人 p53 蛋白购自美国 Diaclone 公司 ,辣根过氧化物酶购自美国 Sigma 公司 RZ>3.0。实验器材 :96 孔聚苯乙烯塑料板(酶标板)购自江苏华兴实验仪器厂 ;DG3022A 型酶标仪。

4. 统计学方法 :采用 Pearson 卡方检验方法分析工种与血清 p53 蛋白过表达之间的关系 ,统计分析软件为 SPSS 9.0。

结 果

1. 交警工种与血清 p53 蛋白过表达之间的关系 :外勤人员的血清 p53 蛋白的过表达率为 5.74% (82/1 428) ,高于内勤人员(4.89% ,41/838) ,但差异无显著性($\chi^2 = 0.74$, $P = 0.39$,95% CI :0.81~1.74)。

2. 按性别和年龄分层后不同工种与血清 p53 蛋白过表达之间的关系 :从表 1 的统计结果来看 ,经过性别分层以后 ,外勤和内勤人员血清 p53 蛋白的过表达率的差异无显著性($P > 0.05$)。表 1 亦显示 ,按年龄分层以后 ,各年龄组的外勤和内勤人员 p53 蛋白的过表达率差异也无显著性($P > 0.05$)。

表1 按性别、年龄分层后交警不同工种与血清 p53 蛋白过表达之间的关系

分组	工种	p53 蛋白			χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)
		阳性例数	阴性例数	阳性率 (%)			
性别							
男	外勤	81	1 336	5.72	1.18	0.28	1.28(0.82~2.00)
	内勤	27	570	4.52	-	-	-
女	外勤	0	5	0.00	0.31	0.58	-
	内勤	14	223	5.90	-	-	-
年龄(岁)							
19~	外勤	41	526	7.23	1.55	0.21	1.59(0.76~3.34)
	内勤	10	187	5.08	-	-	-
30~	外勤	20	497	3.87	0.04	0.85	1.08(0.51~2.28)
	内勤	11	184	5.64	-	-	-
40~	外勤	7	198	3.41	1.15	0.28	0.59(0.22~1.56)
	内勤	11	184	5.64	-	-	-
50~	外勤	7	37	15.91	1.69	0.19	2.03(0.68~6.02)
	内勤	8	86	8.51	-	-	-
60~	外勤	0	8	-	-	-	-
	内勤	0	7	-	-	-	-

3. 工龄与血清 p53 蛋白过表达之间的关系 :表 2 显示 ,外勤人员工龄 30 年以上组血清 p53 蛋白过表达率为 12.12% ,高于 30 年以下组(5.36%) ,经统计学检验差异有显著性 ,工龄 30 年以上组比 30 年以下组血清 p53 蛋白过表达的危险性高出 2.43 倍。表 2 亦显示 ,在内勤人员中 ,20~30 年工龄组的血清 p53 蛋白的阳性率最高为 6.35% ,10~20 年工龄组最低为 3.03% ,但血清 p53 蛋白的过表达在各组之间的分布差异无显著性。

表2 交警外、内勤人员工龄与血清 p53 蛋白过表达之间的关系

工龄(年)	p53 蛋白			χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)
	阳性例数	阴性例数	阳性率 (%)			
外勤						
1~	43	606	6.63	9.87	0.02	-
10~	12	306	3.77	-	-	-
20~	5	147	3.29	-	-	-
30~	8	58	12.12	-	-	-
<30	60	1 059	5.36	5.26	0.02	2.43(1.11~5.33)
>30	8	58	12.12	-	-	-
内勤						
1~	17	327	4.94	2.25	0.52	-
10~	6	192	3.03	-	-	-
20~	8	118	6.35	-	-	-
30~	2	55	3.51	-	-	-

4. 交警外勤人员接触汽车废气时间与血清 p53 蛋白表达之间的关系 :从表 3 的统计结果来看 ,平均

每周接触汽车废气 > 40 h 组的血清 p53 蛋白过表达率为 6.89% , 远高于 40 h 以下组的 4.16% , 二者的差异具有显著性。

表3 交警外勤人员接触汽车废气时间与 p53 蛋白过表达之间的关系

接触时间 (h)	p53 蛋白			χ^2 值	P 值	OR 值(95%CI)
	阳性例数	阴性例数	阳性率 (%)			
1~	6	118	4.84	4.74	0.19	-
20~	4	119	4.35	-	-	-
30~	12	270	4.25	-	-	-
40~	60	811	6.89	-	-	-
<40	22	507	4.16	4.45	0.04	1.71(1.03~2.81)
>40	60	811	6.89	-	-	-

讨 论

p53 蛋白是一种核内磷蛋白,在正常情况下,人体内分泌较少,很不稳定,半衰期很短,大约只有 20 min 左右,一般的检测手段很难检测到。如果 p53 基因发生了突变,它所表达的 p53 蛋白的构相就会发生很大的变化,从而使其功能丧失,但蛋白的稳定性大大增加,在体内会存留很长时间,且分泌到血液中,所以检测血清 p53 蛋白可以反映体内 p53 基因异常的情况^[4]。已经有很多研究表明肺癌患者血清 p53 蛋白水平明显高于对照组^[3,5]。对肺癌高危人群的研究表明,一些经常接触致癌物的职业人群,如接触石棉、沥青、焦炉、铬的工人血清 p53 蛋白的过表达率要高于对照组非暴露人群^[6]。

本研究调查了经常大量接触汽车废气的职业人群交警血清 p53 蛋白的过表达情况,外勤人员为暴露组,内勤人员为非暴露组即对照组,从统计结果来看,外勤人员血清 p53 蛋白的过表达率为 5.74% , 高于内勤人员的 4.89% , 但二者差异在统计学上无显著性。为了消除性别和年龄可能带来混杂作用,分别做了性别和年龄的分层分析,但没有发现外勤人员血清 p53 蛋白过表达率显著高于内勤人员。由于考虑到接触汽车废气时间的长短可能与血清 p53 蛋白的表达有关系,所以进一步分析了工龄与每周接触汽车废气的时间与血清 p53 蛋白的关系,结果发现工龄 > 30 年组血清 p53 蛋白的阳性率显著

高于 < 30 年组的阳性率,而在内勤人员中却没有发现血清 p53 蛋白在各工龄组之间的分布差异,这说明长期大量接触汽车废气使得 p53 异常的可能性大大增加,这是由于汽车废气对机体长期损害以及随着年龄的增加,机体各方面机能下降所造成的。平均每周接触汽车废气的时间 < 40 h 的各组血清 p53 蛋白的阳性率分别为 4.84%、4.85%、4.25% , 各组之间的差别很小,而接触时间 > 40 h 其血清 p53 蛋白的阳性率为 6.89% , 显著高于其他各组。工龄和接触时间两方面结果反映了经常大量接触汽车废气很可能导致 p53 基因的突变率大大增加,表达无效蛋白,功能丧失,为细胞的进一步癌变奠定了分子基础。p53 蛋白作为一个细胞周期调控因子,在细胞的增殖与凋亡的平衡上起着重要作用,它的异常早于肿瘤的发生^[7],所以检测血清 p53 蛋白的表达可以早期检测 p53 基因的异常,如果对该 p53 蛋白阳性人群做前瞻性的随访研究,调查他们以后肺癌的发病率,可以更好地评价血清 p53 蛋白作为经常接触汽车废气的人群肺癌早期检测指标的意义。

参 考 文 献

- 1 Tokiwa H, Sera N, Nakanishi Y, et al. 8-hydroxyguanosine formed in human lung tissues and the association with diesel exhaust particles. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27: 1251-1258.
- 2 Bhatia R, Lopiperio P, Wmth AH. Diesel exhaust exposure and lung cancer. *Epidemiology*, 1998, 9: 84-91.
- 3 Luo JC, Zehab R, Anttila S, et al. Detection of serum p53 protein in lung cancer patients. *J Occupat Med*, 1994, 36: 155-160.
- 4 Fontanini G, Fiore L, Bigini D, et al. Levels of p53 antigen in serum of non-small cell lung cancer patients correlate with positive p53 immunohistochemistry on tumor sections, tumor necrosis and nodal involvement. *Int J Oncol*, 1994, 5: 553-558.
- 5 Segawa Y, Takigawa N, Mandai K, et al. Measurement of serum p53 protein in patients with small cell lung cancer and results of its clinicopathological evaluation. *Lung Cancer*, 1997, 16: 229-238.
- 6 Husgafvel-Pursiainen K, Kanno A, Oksa P, et al. Mutations, tissue accumulations and serum levels of p53 in patients with occupational cancers from asbestos and silica exposure. *Environ Mol Mutagen*, 1997, 30: 224-230.
- 7 Sheikh MS, Fornace AJ. Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. *Leukemia*, 2000, 14: 1509-1513.

(收稿日期 2003-01-03)

(本文编辑 张林东)