

· 现场调查 ·

血清中有机氯农药残留及谷胱甘肽转移酶 T1 基因多态性与乳腺癌关系的病例对照研究

常永丽 李君 姚三巧 胡万宁 蒋守芳 郭忠 杨莉 李丹丹 李亚梅 刘岩

【摘要】 目的 研究血清中有机氯农药水平及谷胱甘肽转移酶 T1(GSTT1)基因多态性对女性乳腺癌患病风险的交互作用。方法 运用1:1配比的病例对照研究方法,自2006年9月至2007年10月,收集经病理学确诊为乳腺癌的女性病例及对照共70对。采用问卷调查获取病例和对照乳腺癌相关危险因素的信息;采用气相色谱-电子捕获(GC-ECD)方法检测血清中有机氯农药残留水平,用PCR检测 GSTT1 基因多态性,根据交互作用系数($\gamma = \beta_{\alpha\beta} / \beta_{\alpha}$)判断交互作用存在与否以及不同的基因-环境作用类型。结果 GSTT1 基因多态性与氯苯乙烷(DDT)及六氯环己烷(HCH)间存在一定的交互作用,交互作用系数分别为1.352、1.528,交互作用都表现为超相乘模型。结论 乳腺癌的发生是环境和遗传因素综合作用的结果。GSTT1 基因多态性与环境危险因素 DDT/HCH 的暴露在乳腺癌发生中存在一定的交互作用。

【关键词】 乳腺肿瘤; 基因多态性; 交互作用; 氯苯乙烷; 六氯环己烷; 谷胱甘肽转移酶 T1

A case-control study on serum organochlorines residues, genetic polymorphisms of glutathione S-transferase T1 and the risks of breast cancer CHANG Yong-li*, LI Jun, YAO San-qiao, HU Wan-ning, JIANG Shou-fang, GUO Zhong, YANG Li, LI Dan-dan, LI Ya-mei, LIU Yan. *Department of Epidemiology of North China Coal Medical University, Tangshan 063000, China

Corresponding author: LI Jun, Email: junlits@sina.com

【Abstract】 **Objective** To study the potential effect of gene-environment interaction between glutathione S-transferase T1 (GSTT1) and serum organochlorines residues on the risk of breast cancer in women, in China. **Methods** 70 newly diagnosed female breast cancer patients and 30 controls from September 2006 to October 2007 were interviewed using the same questionnaire to obtain information regarding exposure to those risks. Organochlorine residues level in serum was measured by gas chromatography (GC). Genotypes of GSTT1 polymorphisms were analyzed by multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR). Interaction indexes (γ) were calculated to determine the type of gene-environment interaction. **Results** After adjusting the confounding factors, results showed that interaction existed in genetic polymorphisms of GSTT1 and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)/hexachlorocyclohexane (HCH) residues, with interaction indexes (γ) value as 1.352 and 1.528. **Conclusion** Genetic and environmental hazard factors had a co-effect on the development of breast cancer while genetic polymorphisms of GSTT1 and DDT/HCH expressed an interaction to breast cancer.

【Key words】 Breast neoplasms; Genetic polymorphisms; Interaction; Dichlorodiphenyltrichloroethane; Hexachlorocyclo-hexane; Glutathione S-transferase T1

乳腺癌是女性最常见、最多发的恶性肿瘤,全世界范围内乳腺癌的发病率和死亡率呈上升趋势。临床观察显示唐山地区乳腺癌病例有逐年增多且发病

年龄年轻化的趋势。1976年唐山大地震后为了消毒防病,在唐山市区、郊区、东矿区及丰南县城施用了大量杀虫剂和消毒剂[1976、1977年共使用有机磷农药300 000 kg,有机氯农药氯苯乙烷(DDT)84 000 kg、六氯环己烷(HCH)416 000 kg^[1]],而有有机氯杀虫剂长时间残留于环境中,易造成环境污染;DDT、HCH又有较为肯定的干扰雌激素活性效应。乳腺癌的发生是环境因素和遗传因素相互作用的结

作者单位:063000 唐山,华北煤炭医学院预防医学系(常永丽、李君、姚三巧、蒋守芳、杨莉、李丹丹、李亚梅、刘岩);唐山市肿瘤医院(胡万宁);唐山市疾病预防控制中心(郭忠)

第一作者现工作单位:054001 邢台医学高等专科学校

通讯作者:李君,Email: junlits@sina.com

果,本次研究采用1:1配对的病例对照研究方法,从环境因素与遗传因素相互作用的角度,探讨有机氯农药残留和谷胱甘肽转移酶 T1(GSTT1)与乳腺癌的关系,分析 DDT/HCH 类物质与 GSTT1 在乳腺癌患病风险中的交互作用。

对象与方法

1. 研究对象:病例来自 2006 年 9 月至 2007 年 10 月在唐山市 5 所大医院就诊的新发女性乳腺癌患者 70 例,所有病例均经病理学确诊为原发乳腺癌,并在唐山本地居住 10 年以上。排除标准:转移性乳腺癌患者、有精神疾患和临终患者。对照组与病例组同期收集,选取病例所在医院同期住院女性患者,按年龄相差不超过 2 岁、相近居住地区进行 1:1 配比。排除有职业暴露史、肿瘤、内分泌相关疾病、生殖系统疾病以及精神疾病的患者。面访调查对象并填写调查表。

2. 研究内容与方法:

(1) 试剂及仪器:主要试剂包括 10× 缓冲液、MgCl₂、dNTPs(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、Taq 聚合酶;溴化乙锭(EB)、电泳缓冲液(TBE)、PCR Marker、琼脂糖等(以上试剂均购自华美生物工程公司)。DDT 和 HCH 标准品(国家标准物质研究中心)、无水硫酸钠(分析纯)、浓硫酸(分析纯)、正己烷。主要仪器有高速低温离心机、PCR 扩增仪、电泳仪、凝胶成像图像分析仪、-20℃ 低温冰箱等、GC-4000A 型气相色谱仪(附⁶³Ni-ECD 检测器,北京东西电子技术研究所生产)。

(2) 血清有机氯农药的检测:收集 70 对病例及对照的血液 4 ml,离心后取血清 2 ml, -20℃ 保存待测。采用食品中 DDT、HCH 残留量测定(国家标准方法 GB/T 5009.19-2003),并适当改进样品处理:0.1 ml 甲酸与 0.5 ml 血清充分混匀,加入 2.5 ml 正己烷充分振摇,超声波萃取 10 min,取上层有机层萃取液过无水硫酸钠脱水,用真空干燥器干燥,并用正己烷定容至 2.5 ml,然后加入 0.2 ml 浓硫酸,静置 30 min 磺化,取磺化后的萃取液 1 ml 保存于 -20℃ 待测^[2]。用气相色谱-电子捕获(GC-ECD)方法检测血清样品中的 DDT、HCH 的水平。

(3) 环境暴露的鉴定标准:血清中总 DDT > 15.013 μg/L 为高残留组,总 DDT ≤ 15.013 μg/L 为低残留组;血清中总 HCH > 7.111 μg/L 为高残留组,总 HCH ≤ 7.111 μg/L 为低残留组;分别以对照血清

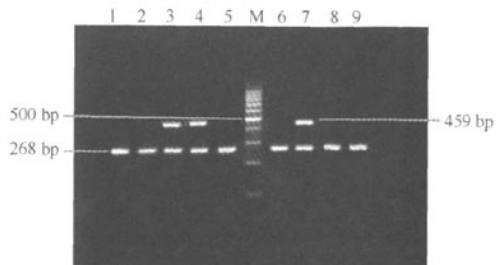
中 DDT/HCH 含量的中位数作为划分的依据。

(4) GSTT1 基因型测定:每名调查对象抽取静脉 EDTA 抗凝血 4 ml,采用盐析法抽提 DNA。GSTT1 基因多态性检测采用 PCR 方法。参照文献[3],分别构建 GSTT1 引物,β-球蛋白(268 bp)作为内对照,由赛百盛生物技术有限公司合成。引物序列见表 1。

表1 GSTT1 和 β-球蛋白的引物序列

基因	引物(5'~3')	片段长度(bp)
GSTT1	上游:TCCTTACTGGTCCTCACATCTC	459
	下游:CACCGGATCATGGCCAGCA	
β-球蛋白	上游:AAGAGCCAAGGACAGGTAC	268
	下游:AACTTCATCCACGTTCAAC	

PCR 反应条件:总体积 20 μl; ddH₂O 11 μl; 10× 缓冲液 2 μl; dNTPs 3.2 μl(0.2 mmol/L); 引物各 1 μl; Taq 酶 0.2 μl(1 U); 模板 1 μl。各成分与冰浴中用微量加样器加入 0.2 ml 离心管中,微量振荡器混匀,短暂离心后于 PCR 仪上扩增。扩增条件:94℃ 预变性 3 min 后,于 94℃ 变性 1 min、58℃ 退火 1 min、72℃ 延伸 1 min 为一个循环,进行 3 个循环,94℃ 变性 30 s、58℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 30 s 为一个循环进行扩增,共进行 30 个循环,结束后于 72℃ 最后一次延伸 5 min。PFLP 分析:取 2 μl 扩增产物,加少量上样缓冲液,120 V 电压条件下电泳 15 min,于凝胶成像系统下观察结果并照相。基因型的判定:GSTT1 基因型为非缺失型时,扩增的基因片段存在,可扩增出 459 bp 和 268 bp 2 条带;由于 GSTT1 基因两侧的高度相同区域之间发生了同源染色体的不等交换所致的包括 GSTT1 整个基因在内的 54 251 bp 碱基片段从 22 号染色体上丢失,造成 GSTT1 基因的缺失,当 GSTT1 为缺失型时,扩增的目的基因片段不存在,只出现内对照 268 bp 1 条带(图 1)。



注:M:PCR Marker; 1,2,5,6,8,9:GSTT1 非缺失基因型; 3,4,7: GSTT1 缺失基因型

图1 PCR 扩增后 GSTT1 基因多态性的检测结果

3. 统计学分析:用 Excel 软件建立数据库,应用 SAS 6.12 软件,以 χ^2 检验比较基因型在病例和对照组中分布差异的统计学意义。运用条件 logistic 回归模型分析 GSTT1 和有机氯农药在乳腺癌发生中的作用。根据 Khoury 和 Wagener^[4] 提出 2 型交互作用模型 (type 2 gene-environment interaction), 分析 GSTT1 和有机氯农药在乳腺癌发生中的交互作用。模型中包括单独遗传因素、单独环境危险因素和两因素共同组成变量的效应。有无交互作用以及交互作用的强度与方式,由各变量前的回归系数 β 决定。 $G(Y) = \alpha + \beta_e E + \beta_g G + \beta_{eg} EG$, 式中 Y 是疾病的比值(odds), α 为常数,协变量 E 为环境危险因素,协变量 G 为代谢基因多态性, EG 为两者交互作用项,针对不同的基因-环境暴露水平,分别设立哑变量,对 GSTT1 和有机氯农药在乳腺癌发生中的交互作用进行分析,根据交互作用系数 (γ , $\gamma = \beta_{eg} / \beta_e$) 判断交互作用存在与否以及基因-环境作用类型。

结 果

1. 病例组与对照组年龄分布及可比性的比较: 病例组年龄 29~76 岁,平均 (47.09 ± 10.36) 岁; 对照组年龄 30~76 岁,平均 (46.59 ± 10.55) 岁。两组间年龄比较差异无统计学意义 ($t = 0.28, P = 0.778$)。病例组在 40~50 岁年龄段发病人数最多, 其次为 35~40 岁年龄段。将两组的职业、文化程度、婚姻状况进行均衡性比较,差异无统计学意义, 两组间具有可比性。

2. GSTT1 基因多态性与乳腺癌发生的关系: 经

Hardy-Weinberg(H-W)平衡定律检验,表明各基因频率分布不拒绝 H-W 遗传平衡的假设,具有群体代表性。由表 2 可见,利用条件 logistic 回归模型, GSTT1 缺失与乳腺癌的发生有关,携带 GSTT1 缺失基因型的个体患乳腺癌的危险性高 ($OR = 4.711, 95\% CI: 1.098 \sim 12.208$)。

3. 乳腺癌发生的环境危险因素筛选: 由表 2 可见,血清中 DDT 和 HCH 高残留可增加乳腺癌发生的危险性, OR 值分别为 1.015、1.212。

表2 乳腺癌危险因素的多因素条件 logistic 回归分析

因素	$\hat{\beta}$	$s_x(\hat{\beta})$	P 值	OR 值(95% CI)
GSTT1 缺失基因型	1.549	0.743	0.0370	4.711(1.098~12.208)
HCH 残留	0.192	0.066	0.0036	1.212(1.065~1.379)
DDT 残留	0.014	0.007	0.0948	1.015(0.997~1.033)

4. GSTT1 基因多态性与血清中有机氯农药残留量之间的交互作用: 由表 3 可见,在此交互作用模型中,单独暴露于环境危险因素 DDT 高残留的 OR_e 值为 4.566,单独 GSTT1 缺失基因型的 OR_g 值为 1.980,而两因素共同造成的 OR_{eg} 值为 6.513, γ 值为 1.352,提示 GSTT1 缺失基因型对血清 DDT 残留的效应有放大作用,表现为 4 型交互作用的超相乘模型。由表 4 可见,在此交互作用模型中,单独暴露于环境危险因素 HCH 高残留的 OR_e 值为 4.477,单独 GSTT1 缺失基因型的 OR_g 值为 3.635,而两因素共同造成的 OR_{eg} 值为 4.830, γ 值为 1.528,提示 GSTT1 缺失基因型对血清 HCH 残留的效应有放大作用,亦表现为 4 型交互作用的超相乘模型。

表3 GSTT1 基因多态性、血清 DDT 残留量与乳腺癌之间的交互作用

GSTT1	DDT 残留量 ($\mu\text{g/L}$)	病例组 ($n = 70$)	对照组 ($n = 70$)	OR 值	P 值	OR 值 95% CI	β_e	β_{eg}	γ
非缺失	≤ 15.013	8	20	1.000	-	-	0.000	-	-
非缺失	> 15.013	24	20	4.566	0.019	1.271~16.403	1.386	-	-
缺失	≤ 15.013	12	15	1.980	0.323	0.510~7.683	0.000	0.683	-
缺失	> 15.013	26	15	6.513	0.005	1.775~23.904	1.386	1.874	1.352

表4 GSTT1 基因多态性、血清 HCH 残留量与乳腺癌之间的交互作用

GSTT1	HCH 残留量 ($\mu\text{g/L}$)	病例组 ($n = 70$)	对照组 ($n = 70$)	OR 值	P 值	OR 值 95% CI	β_e	β_{eg}	γ
非缺失	≤ 7.111	11	24	1.000	-	-	0.000	-	-
非缺失	> 7.111	21	16	4.477	0.018	1.288~15.566	0.981	-	-
缺失	≤ 7.111	14	11	3.635	0.056	0.966~13.682	0.000	1.291	-
缺失	> 7.111	24	19	4.830	0.016	1.329~17.551	0.981	1.499	1.528

讨 论

1. 有机氯农药与乳腺癌的关系:本研究提示总 HCH 和总 DDT 残留与乳腺癌存在着一定的关联性, HCH、DDT 残留水平愈高, 患乳腺癌的危险性愈高。这与国外的一些研究结果一致^[5,6], 但 Lopez-Carrillo 等所做的对墨西哥妇女的研究却未发现体内 β -HCH 水平与乳腺癌的关系^[7]。由于研究的人群、国家不同, HCH 的使用量也不相同, 因此研究会存在一定的差异。我国曾是一个农药使用大国, 累积使用 HCH 比同期国际上多 3 倍以上^[8], 因此国内研究更有意义和说服力。

2. 谷胱甘肽转移酶(GST)与乳腺癌的关系: GST 是体内重要的 II 相解毒酶系, 参与多环芳烃、杂环胺等致癌物质的解毒过程, 其主要作用为催化还原性 GST 与亲电子物共轭结合成亲水性物质, 增加其水溶性, 使之易于排出体外。其中 GSTT1 位于 22q11.2, 编码 GST- θ 同工酶。GSTT1 基因缺失导致 GST- θ 酶活性降低或丧失。有研究发现携带 GSTT1 缺失基因型的绝经前妇女患乳腺癌的风险性增加^[9]。本研究显示: GSTT1 缺失基因型与乳腺癌的发生有关联 ($OR = 4.711, 95\% CI: 1.098 \sim 12.208$)。

3. GSTT1 基因多态性与有机氯农药残留物的交互作用: 应用交互作用系数 ($\gamma, \gamma = \beta_{eg} / \beta_e$), 探讨 GSTT1 基因多态性与有机氯物质之间的交互作用, 及其对乳腺癌发生的影响。判定依据 1: $OR_{eg} = OR_e \times OR_g$ 为相乘模型; $OR_{eg} > OR_e \times OR_g$ 为超相乘模型; $OR_{eg} < OR_e \times OR_g$ 为次相乘模型; $OR_{eg} = OR_e + OR_g - 1$ 为相加模型。判定依据 2: $\gamma > 1$, 表示基因因素对环境暴露的效应有放大作用, 正向交

互作用; $\gamma < 1$, 表示基因因素对环境暴露的效应有减弱作用, 负向交互作用; $\gamma = 1$, 表示基因因素对环境暴露没有交互作用; 当研究的环境因素是危险因素, 此时 $\beta_e > 0, \gamma$ 为负值时, 则表示基因因素有很强的保护作用。本研究显示 GSTT1 缺失基因型与 DDT、HCH 在乳腺癌发生过程中分别存在一定的交互作用, 交互作用系数分别为 1.352、1.528, 交互作用都表现为超相乘模型。

参 考 文 献

[1] 其嘉, 王子平, 陈非比, 等. 唐山地震灾区社会恢复与社会问题研究. 北京: 地震出版社, 1997: 398-401.

[2] 李佳园, 吴德生, 杨非, 等. 血清有机氯农药 DDT 暴露、CYP1A1 基因多态性与乳腺癌患病风险的病例对照研究. 中华流行病学杂志, 2006, 27(3): 217-222.

[3] 陈坤, 马新源, 姚开颜. 谷胱甘肽转移酶和基因多态性及吸烟与直结肠癌的对照研究. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(11): 645-648.

[4] Khoury MJ, Wagener DK. Epidemiological evaluation of the use of genetics to improve the predictive value of disease risk factors. Am J Hum Genet, 1995, 56(4): 835-844.

[5] Demers A, Ayotte P, Brisson J, et al. Risk and aggressiveness of breast cancer in relation to plasma organochlorine concentrations. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000, 9(2): 161-166.

[6] Isabelle R, Mauricio HA, Eduardo LP, et al. Breast cancer, lactation history, and serum organochlorines. Am J Epidemiol, 2000, 152(4): 363-370.

[7] 李佳园, 李卉, 雷放鸣, 等. 人体 DDE 含量与人类乳腺癌关系的 Meta 分析. 现代预防医学, 2005, 32(2): 91-93, 110.

[8] 华小梅, 单正军. 我国农药生产、使用状况及影响因子分析. 环境科学进展, 1996, 4(2): 33-45.

[9] Park SK, Kang D, Noh DY, et al. Reproductive factors, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and breast cancer risk. Breast Cancer Res Treat, 2003, 78(1): 89-96.

(收稿日期: 2008-01-22)

(本文编辑: 张林东)

• 更正 •

对“河北省廊坊市男男性行为人群艾滋病/性传播疾病危险行为与感染率现况调查”一文作者更正

本刊 2008 年第 6 期目录中“河北省廊坊市男男性行为人群艾滋病/性传播疾病危险行为与感染率现况调查”第一作者郭魏, 更正为郭巍。

本刊编辑部