

慢性砷暴露人群 DNA 氧化损伤与血脂异常关联性的研究

杨辉 毛广运 张海洋 张传武 邱文婷 郭小娟

【摘要】 目的 探讨慢性砷暴露人群 DNA 氧化损伤与血脂异常的关联性。方法 采用分层整群抽样方法,随机抽取某饮水型高砷暴露地区 407 名慢性砷暴露者作为调查对象,检测其血脂水平,并据此分为血脂正常组、HDL-C 比值异常组、高 TC 血症组和 HDL-C 比值异常合并高 TC 血症组。采集调查对象晨尿,并使用 ELISA 试剂盒测定其 DNA 氧化损伤的关键性标志物 8-羟基脱氧鸟苷/肌酐(8-OHdG/Cr)水平。采用广义线性回归模型调整相关混杂因素后,分析慢性砷暴露人群 DNA 氧化损伤与血脂异常的关联性。**结果** 4 组人群 8-OHdG/Cr 水平 $M(Q1 \sim Q3)$ 分别为 51.43(36.86~68.57)、55.73(39.90~79.94)、58.08(44.94~69.91) 和 65.28(49.29~92.95) ng/mg, 各组间差异有统计学意义($P=0.006$)。广义线性回归模型进一步表明,在校正血压、文化程度、暴露年限、BMI、FPG、性别、主动吸烟、被动吸烟、吸烟指数和饮酒等潜在的混杂因素后,HDL-C 比值异常合并高 TC 血症组 8-OHdG/Cr 水平与血脂水平呈现出显著正相关($P=0.018$),且 8-OHdG/Cr 水平与其血脂异常程度间存在明显的线性趋势($P=0.016$)。**结论** 慢性砷暴露人群 8-OHdG/Cr 水平与其血脂状态间存在显著的关联性,血脂异常程度越严重,其 DNA 氧化损伤越明显。

【关键词】 砷暴露,慢性; 8-羟基脱氧鸟苷/肌酐; 血脂异常; DNA 氧化损伤

Association between dyslipidemia and 8-OHdG/Cr among a population exposed to chronic arsenic Yang Hui, Mao Guangyun, Zhang Haiyang, Zhang Chuanwu, Qiu Wenting, Guo Xiaojuan. School of Environmental Science and Public Health, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China Corresponding author: Guo Xiaojuan, Email: gxj@wzmc.edu.cn

This work was supported by grants from the Zhejiang Provincial Natural Science Funding (No. Y2110454), Zhejiang Science and Technology Funding (No. 2013c33169) and Wenzhou Science and Technology Funding (No. H20100025).

【Abstract】 Objective To explore the association between dyslipidemia and the level of 8-OHdG/Cr in urine among a population exposed to chronic arsenic. **Methods** Four hundred and seven subjects were randomly selected in an arsenic-affected area in Inner Mongolia. After blood biochemical examination, all the subjects were divided into 4 groups based on the results of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C). The groups consisted of hypercholesterolemia, HDL-C ratio anomaly, combined hypercholesterolemia and HDL-C ratio anomaly, as well as a normal lipid group. Urine samples were collected and 8-OHdG/Cr was measured using the ELISA method. A generalized linear mixed model was used to analyze the association between dyslipidemia and 8-OHdG/Cr. **Results** The levels of 8-OHdG/Cr as 55.73 (39.90~79.94) ng/mg, 58.08 (44.94~69.91) ng/mg, 65.28 (49.29~92.95) ng/mg and 51.43 (36.86~68.57) ng/mg in the HDL-C ratio anomaly, hypercholesterolemia, combined hypercholesterolemia and HDL-C ratio anomaly groups and the control group, respectively, which showed significant differences on the levels of 8-OHdG/Cr in the four groups ($P=0.006$). From the linear regression analysis results showed that the 8-OHdG/Cr level in combined hypercholesterolemia and HDL-C ratio anomaly group was higher (4.25 ± 0.55 ng/mg) than in the control group (3.96 ± 0.55 ng/mg) ($P=0.018$). After adjusting for important covariates, there was a linear trend between the levels of 8-OHdG/Cr and dyslipidemia ($P=0.016$). **Conclusion** Data from our study showed a linear relation between hypercholesterolemia, HDL-C ratio anomaly and the 8-OHdG/Cr level, suggesting that dyslipidemia was associated with oxidative DNA damage among those arsenic-affected people.

【Key words】 Chronic arsenic exposure; 8-OHdG/Cr; Dyslipidemia; Oxidative DNA damage

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.07.010

基金项目:浙江省自然科学基金(Y2110454);浙江省科技厅项目(2013c33169);温州市科技局项目(H20100025)

作者单位:325035 温州医科大学环境与公共卫生学院

通信作者:郭小娟, Email: gxj@wzmc.edu.cn

砷及其化合物,作为常见的环境污染物普遍存在于自然界中,可通过职业暴露、饮水、燃煤和食物等途径进入人体^[1-5],产生明显的蓄积效应^[6],出现砷中毒症状,引发各种疾病甚至癌症^[7,8]。近年来,慢性暴露成为主要存在形式,环境砷暴露已成为重大公共卫生和医学研究热点问题^[6,9,10]。在慢性砷中毒机制研究中,砷甲基化代谢诱发产生大量活性氧(reactive oxidative species)并加重DNA氧化损伤是重要的理论^[11],其中关键性分子标志物8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)普遍应用于评价机体的DNA氧化损伤^[12]。研究显示,血脂异常容易引发各种心血管系统疾病,而后者的发生、发展与DNA甲基化关系密切^[12,13],但慢性砷暴露人群合并血脂异常者,其DNA氧化损伤是否显著高于健康对照人群,其健康风险是否显著高于一般慢性砷暴露人群,则尚未见报道。为此本研究通过分析慢性砷暴露人群8-OHdG的水平与血脂异常的关联性,探讨慢性砷暴露合并血脂异常人群的健康风险。

对象与方法

1. 研究对象:本研究选择已确定是我国主要的饮水型慢性砷暴露病区,并依据当地村落地理位置和居民生活习惯差异,采用分层整群抽样方法,从不同村落居民中,随机抽取407人作为研究对象。其中男性156人,年龄17.8~79.2岁,平均暴露(48.25±12.60)年;女性251人,年龄20.8~77.5岁,平均暴露(43.60±12.47)年。由事先经过严格系统培训的专业人员,使用自行设计的规范调查表进行流行病学调查、体格检查和实验室检测。按检测的血脂水平,分为血脂正常组、HDL-C比值异常组(血脂异常组1)、高TC血症组(血脂异常组2)和HDL-C比值异常合并高TC血症组(血脂异常组3)。本研究方案在项目实施前通过温州医科大学伦理委员会审批,所有研究对象事先均获得知情同意,并签署知情同意书。

2. 标本采集和检测:要求研究对象空腹8~12 h,按项目SOP采集肘静脉血,30 min内分离血清,置于0℃环境下保存,并于当日转移至-86℃低温冰箱冻存待测。同时一次性收集晨尿,保存于-86℃低温冰箱中待测。

(1)血生化检测:及时分离血清样品,室温解冻,由实验室专业检测人员采用全自动生化分析仪检测血生化,包括血脂(TG、TC、HDL-C、LDL-C)和FPG等。血脂异常诊断标准定义为HDL-C比值(TC/HDL-C)男性>4.5、女性>3.5^[14];高TC血症为TC>

5.17 mmol/L且TG<1.71 mmol/L^[15]。

(2)尿8-OHdG/Cr检测:尿样室温解冻,12 000 r/min离心10 min,取上清液100 μl,由专业实验室检测人员采用德国IBL公司生产的ELISA试剂盒按SOP操作规范,测定尿样中8-OHdG含量,每份样品做2次平行测定,以尿肌酐水平对其进行校正,计算8-OHdG/Cr水平。

(3)尿肌酐检测:尿样室温解冻,摇匀后取100 μl,加入1 700 μl 95%醋酸钠、5%甲醇的稀释液,摇匀后12 000 r/min离心10 min,取上清液1 ml,过水相针式滤器收集待测。由实验室专业检测人员采用高效液相色谱法紫外检测器(HPLC-UV)进行双重平行测定。高效液相色谱条件为0.9 ml/min,95%醋酸钠,5%甲醇,紫外波长230 nm,检测温度30℃。

3. 统计学分析:使用EpiData 3.1中文版进行数据库设计和双重录入、检错。4组人群尿8-OHdG/Cr水平比较采用Wilcoxon秩和检验,血脂异常与尿8-OHdG/Cr水平的关联性采用广义线性回归模型分析。运用R3.0.1中文版进行数据管理、分析和绘图,所有检测均为双侧检验, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般特征:不同血脂水平人群砷暴露年限、BMI、FPG、性别、主动吸烟、吸烟指数(吸烟年数×年吸烟包数)和饮酒情况等差异均有统计学意义($P<0.05$),但年龄、SBP、DBP、文化程度、被动吸烟和皮损史等的差异则无统计学意义($P>0.05$)。提示砷暴露年限、BMI、FPG、性别、主动吸烟、吸烟指数和饮酒情况可能是慢性砷暴露人群血脂异常的重要影响因素(表1)。

2. 尿8-OHdG/Cr水平:不同组别研究对象尿8-OHdG/Cr水平分布如图1,提示血脂异常与慢性砷暴露个体的DNA氧化受损程度间可能存在关联性。血脂正常组、血脂异常组1、血脂异常组2和血脂异常组3人群中尿8-OHdG/Cr水平的 $M(Q1\sim Q3)$ 分别为51.4(36.86~68.57)、55.73(39.90~79.94)、58.08(44.94~69.91)和65.28(49.29~92.95)ng/mg,4组间差异有统计学意义($P=0.006$);不同组别研究对象尿8-OHdG/Cr水平属于偏态分布,将其进行自然对数转换后,尿8-OHdG/Cr水平的自然对数分别为(3.96±0.55)、(4.07±0.53)、(4.08±0.45)和(4.25±0.55)ng/mg,不同组别间差异依然有统计学意义($P=0.012$)。组间相互比较,血脂异常组3与血脂

表 1 不同组别研究人群一般特征

变 量	血脂正常组 (n=141)	血脂异常组 1 (n=190)	血脂异常组 2 (n=26)	血脂异常组 3 (n=50)	P 值
年龄(岁)	48.96±12.76	49.98±11.81	52.62±12.07	51.35±12.18	0.421
暴露年限	43.45±13.40	45.17±12.20	50.43±12.11	48.87±11.78	0.010
BMI(kg/m ²)	23.10(21.70~24.70)	25.50(23.50~27.70)	22.00(20.40~23.50)	24.90(22.70~26.00)	<0.000 1
SBP(mmHg)	130(120~140)	135(120~150)	132.5(120~145)	130(120~145)	0.140
DBP(mmHg)	80(80~90)	85(80~92)	84.5(80~92)	80(79~90)	0.092
FPG(mmol/L)	5.04(4.62~5.39)	5.19(4.75~5.65)	4.76(4.49~4.99)	4.8(4.45~5.34)	<0.001
性别					<0.001
男	80(56.74)	46(24.21)	20(76.92)	10(20.00)	
女	61(43.26)	144(75.79)	6(23.08)	40(80.00)	
文化程度					0.054
文盲	23(16.43)	45(23.81)	4(15.38)	19(38.00)	
小学	44(31.43)	64(33.86)	10(38.46)	14(28.00)	
初中及以上	73(52.14)	80(42.33)	12(46.15)	17(34.00)	
主动吸烟					<0.001
否	74(52.28)	139(73.54)	10(38.46)	33(66.00)	
是	67(47.52)	50(26.46)	16(61.54)	17(34.00)	
被动吸烟					0.071
否	75(53.19)	109(57.37)	10(38.46)	20(40.00)	
是	66(46.81)	81(42.63)	16(61.54)	30(60.00)	
吸烟指数					<0.001
轻	84(59.57)	152(80.00)	15(57.69)	41(82.00)	
中	12(8.51)	5(2.63)	1(3.85)	1(2.00)	
重	45(31.91)	33(17.37)	10(38.46)	8(16.00)	
饮酒					<0.001
否	81(58.27)	146(77.25)	10(38.46)	38(76.00)	
是	58(41.73)	43(22.75)	16(61.54)	12(24.00)	
皮损史	77(55.00)	121(63.68)	18(69.23)	34(68.00)	0.219

注:吸烟指数中日均<1包且连续3年者为轻,日均<1包且连续10年者为中,日均>1包且连续>10年者为重;连续型正态分布数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,利用方差分析检验;连续型非正态分布数据采用 $M(Q1\sim Q3)$ 表示,利用非参秩和检验;分类变量为例数(%),采用 χ^2 检验

排除暴露年限、BMI、FPG、性别、主动吸烟、吸烟指数和饮酒等可能混杂因素后,将 407 名研究对象的尿 8-OHdG/Cr 水平进行自然对数转换,采用多元线性回归模型分析血脂异常与尿 8-OHdG/Cr 水平的关联性。结果显示(表 3),校正了上述可能的混杂因素后,8-OHdG/Cr 水平自然对数血脂正常组(对照组)为(3.96±0.55) ng/mg,血脂异常组 1 为(4.07±0.53) ng/mg (P=0.156),血脂异常组 2 为(4.08±0.45) ng/mg (P=0.296),血脂异常组 3 为(4.25±0.55) ng/mg (P=0.018),不同组间尿 8-OHdG/Cr 水平的趋势性检验差异有统

计学意义(P=0.016),进一步确认尿中 8-OHdG/Cr 水平升高增加了发生血脂异常的风险。

讨 论

环境砷暴露与健康危害有关,慢性暴露可累积损害各系统和器官^[8],导致或诱发多种癌症以及糖尿病、高血压、缺血性心脏病及外周血管疾病等,其中以心血管系统疾病尤为常见。近年研究显示,无机砷在体内代谢产生的活性氧簇,可导致机体长期处于氧化应激状态,是引起细胞膜脂质双层、相关蛋白和 DNA 氧化损伤的主要原因^[11]。尿 8-OHdG/Cr 水平是近年来评估机体氧化损伤和包括肿瘤在内多种疾病发病风险关键生物标志物^[12]。国内外研究显示,砷中毒人群的尿 8-OHdG/Cr 水平显著高于一般人群,可客观反映其健康受损状况。

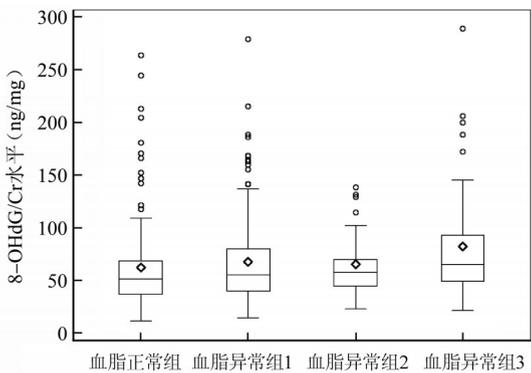


图 1 4 组研究人群尿 8-OHdG/Cr 水平比较

正常组、血脂异常组 3 与血脂异常组 1 尿 8-OHdG/Cr 水平差异均有统计学意义(P<0.05),且随异常指标的增加,尿 8-OHdG/Cr 含量增加(表 2)。

3. 血脂异常与尿 8-OHdG/Cr 水平的关联性:在

表 2 4 组研究人群尿 8-OHdG/Cr 水平及其自然对数的比较

变 量	血脂正常组(n=141)	血脂异常组 1(n=190)	血脂异常组 2(n=26)	血脂异常组 3(n=50)	P 值
8-OHdG/Cr(ng/mg)	51.43(36.86~68.57)	55.73(39.90~79.94)	58.08(44.94~69.91)	65.28(49.29~92.95)	0.006
ln(8-OHdG/Cr)(ng/mg)	3.96±0.55	4.07±0.53	4.08±0.45	4.25±0.55	0.012

注:ln(8-OHdG/Cr)为 8-OHdG/Cr 水平的自然对数;使用 $\bar{x}\pm s$ 描述服从正态或近似正态分布数据,采用单因素方差分析比较组间差异;使用 $M(Q1\sim Q3)$ 统计描述明显偏离正态分布数据,采用 H 检验比较组间差异

表 3 血脂异常与尿 8-OHdG/Cr 水平关联性

组别	人数	ln(8-OHdG/Cr) (ng/mg)	未校正			校正		
			β	s_e	P 值	β	s_e	P 值
血脂正常组(Ref)	141	3.96±0.55	-	-	-	-	-	-
血脂异常组 1	190	4.07±0.53	0.11	0.06	0.076	0.10	0.07	0.156
血脂异常组 2	26	4.08±0.45	0.12	0.11	0.294	0.13	0.12	0.296
血脂异常组 3	50	4.25±0.55	0.29	0.09	0.001	0.24	0.09	0.018
趋势性检验					0.001			0.016

注:校正因素为 SBP、DBP、文化程度、暴露年限、BMI、FPG、性别、主动吸烟、被动吸烟、吸烟指数和饮酒

高 TC 血症和 HDL-C 比值异常为血脂异常的主要形式,是增加心血管疾病发病或死亡风险的重要危险因素之一,也已在国内外大量研究中得以证实^[16,17]。本研究显示高 TC 血症和 HDL-C 比值异常人群的尿 8-OHdG/Cr 水平显著高于正常人群,其 DNA 氧化损伤程度加剧,表明血脂异常可能与机体的氧化应激状态有关。

有研究发现,砷暴露剂量及时间与机体 DNA 氧化损伤程度呈正相关关系^[18-20]。本研究人群长期暴露于高砷饮水,无机砷在机体发生以甲基化代谢为主的生物转化过程,需消耗大量的甲基供体,致使因甲基供体不足而难以及时清理体内的自由基,影响 DNA 的正常甲基化进程,加重机体的氧化损伤程度^[8,21]。研究中显示,慢性砷暴露的血脂异常人群其尿 8-OHdG/Cr 水平高于血脂正常组,血脂异常与 DNA 氧化损伤有关,与相关研究结论一致。但未发现高 TC 血症和 HDL-C 比值异常组 8-OHdG/Cr 水平显著高于血脂正常组,可能是其血脂异常程度的差异尚未达到有统计学意义,而该 2 组异常人群 8-OHdG/Cr 水平显著高于血脂正常组,提示异常指标越多,血脂异常程度越大, DNA 氧化损伤越严重,慢性砷暴露合并有血脂异常人群罹患心血管疾病的可能越大,需要得到更多关注,应成为慢性砷病防治的重点人群。但此结论尚需更大规模人群研究加以验证。

本研究通过对慢性砷暴露人群血脂异常与尿 8-OHdG/Cr 水平间的关联性分析,发现慢性砷暴露且合并有血脂异常人群尿 8-OHdG/Cr 水平显著高于一般慢性砷暴露人群,且血脂异常程度越严重,其尿 8-OHdG/Cr 水平越高,表明其体内氧化损伤程度显著高于其他慢性砷暴露人群。

参 考 文 献

[1] Lin GF, Meng H, Du H, et al. Factors impacting on the excess arseniasis prevalence due to indoor combustion of high arsenic coal in a hyperendemic village [J]. Int Arch Occup Environ Health, 2010, 83:433-440.
 [2] Wan W, Pepping TJ, Banerji T, et al. Effects of water chemistry on arsenic removal from drinking water by electrocoagulation [J]. Water Res, 2011, 45:384-392.
 [3] Liang F, Li YL, Zhang GL, et al. Total and speciated arsenic levels

in rice from China [J]. Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2010, 27:810-816.
 [4] Mondal D, Polya DA. Rice is a major exposure route for arsenic in Chakdaha block, Nadia district, West Bengal, India: a probabilistic risk assessment [J]. Appl Geochem, 2008, 23:2987-2998.
 [5] Baig JA, Kazi TG, Shah AQ, et al. Evaluation of arsenic levels in grain crops samples, irrigated by tube well and canal water [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49:265-270.
 [6] Golka K, Hengstler JG, Marchan R, et al. Severe arsenic poisoning; one of the largest man-made catastrophies [J]. Arch Toxicol, 2010, 84:583-584.
 [7] Kitchin KT, Conolly R. Arsenic-induced carcinogenesis-oxidative stress as a possible mode of action and future research needs for more biologically based risk assessment [J]. Chem Res Toxicol, 2010, 23:327-335.
 [8] Smith HA, Steinmaus CM. Health effects of arsenic and chromium in drinking water: recent human findings [J]. Ann Rev Public Health, 2009, 30:107-122.
 [9] Fendorf S, Michael HA, Geen AV. Spatial and temporal variations of groundwater arsenic in south and southeast asia [J]. Science, 2010, 328:1123-1127.
 [10] Wade TJ, Xia Y, Wu K, et al. Increased mortality associated with well-water arsenic exposure in Inner Mongolia, China [J]. Int J Environ Res Public Health, 2009, 6:1107-1123.
 [11] Lin A, Zhang X, Zhu YG, et al. Arsenate-induced toxicity: effects on antioxidative enzymes and DNA damage in Vicia faba [J]. Environ Toxicol Chem, 2008, 27:413-419.
 [12] Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis [J]. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2009, 27:120-139.
 [13] Wu LL, Chiou CC, Chang PY, et al. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics [J]. Clin Chim Acta, 2004, 339:1-9.
 [14] 高密度脂蛋白_360 百科 [DB/OL]. http://baike.so.com/doc/1499450.html. 2012.
 [15] Joint Committee for Developing Chinese Guidelines on Prevention and Treatment of Dyslipidemia in Adults. Chinese guidelines on prevention and treatment of dyslipidemia in adults [J]. Chin J Cardiol, 2007, 35:390-419. (in Chinese)
 中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南 [J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35:390-419.
 [16] Sanguigni V, Ferro D, Pignatelli P, et al. CD40 ligand enhances monocyte tissue factor expression and thrombin generation via oxidative stress in patients with hypercholesterolemia [J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 45:35-42.
 [17] Inoue T, Inoue K, Maeda H, et al. Immunological response to oxidized LDL occurs in association with oxidative DNA damage independently of serum LDL concentrations in dyslipidemic patients [J]. Clin Chim Acta, 2001, 305:115-121.
 [18] Xu YY, Li X, Wang Y, et al. Comparison of urinary arsenic and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine between subacute and chronic arsenic-exposed subjects [J]. J Environ Health, 2008, 25:946-949. (in Chinese)
 徐苑苑, 李昕, 王毅, 等. 亚急性与慢性砷暴露人群尿砷和 8-羟基脱氧鸟苷含量的比较 [J]. 环境与健康杂志, 2008, 25:946-949.
 [19] Xu YY, Wang Y, Li X, et al. Variations in arsenic methylation capacity and oxidative DNA lesions over a 2-year period in a high arsenic-exposed population [J]. Int Arch Occup Environ Health, 2009, 82:251-258.
 [20] Yamauchi H, Aminaka Y, Yoshida K, et al. Evaluation of DNA damage in patients with arsenic poisoning: urinary 8-hydroxy deoxyguanine [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 198:291-296.
 [21] Del Razo LM, Garcia-Vargas GG, Vargas H, et al. Altered profile of urinary arsenic metabolites in adults with chronic arsenicism. A pilot study [J]. Arch Toxicol, 1997, 71:211-217.

(收稿日期:2013-12-19)
(本文编辑:张林东)