

· 儿童铅中毒防治 ·

重度铅污染地区儿童铅中毒的分子流行病学研究

郑玉新 冷曙光 宋文佳 王雅文 牛勇 张文众 闫惠芳 刘玉瑛 黄清霄 吴宜群

【摘要】 目的 研究高暴露于铅的条件下, δ -氨基乙酰丙酸脱水酶(ALAD) 和维生素 D 受体(VDR) 基因多态性对儿童铅中毒易感性的影响。方法 分析了 469 名严重铅暴露儿童 ALAD 和 VDR 基因多态性、血铅、锌原卟啉(ZPP)、头围、身高和体重等指标。结果 具有 ALAD2 等位基因个体, 血中 ZPP 水平高于不含该等位基因的个体($P=0.017$); 携带 VDR B 等位基因个体的头围大于仅携带 b 等位基因者(51.19 cm 和 50.75 cm)($P=0.028$)。结论 在高水平铅暴露儿童中, ALAD 多态性可影响铅的血液毒性效应, VDR 基因的遗传变异改变铅对儿童颅骨发育的作用程度。ALAD 和 VDR 基因多态性是影响严重铅暴露条件下儿童铅中毒易感性的分子遗传学因素。

【关键词】 铅中毒; 遗传易感性; 流行病学; 分子

A molecular epidemiological study of childhood lead poisoning in lead-polluted environment ZHENG Yuxin, LENG Shuguang, SONG Wenjia, WANG Yawen, NIU Yong, ZHANG Wenzhong, YAN Hui Fang, LIU Yuying, HUANG Qingxiao, WU Yiqun. Institute of Occupational Health and Poisoning Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

【Abstract】 Objective The relationship between polymorphisms of ALAD and VDR genes and individual susceptibility of lead poisoning was investigated in children highly-exposed to lead. **Method** Four hundred and sixty-nine children were recruited into this study and the blood lead, ZPP, hemoglobin as well as three physical developmental indexes(head circumference, height and weight) were measured. VDR and ALAD gene polymorphisms were analyzed by the methods of PCR-RFLP. **Results** The subjects with ALAD2 allele had higher ZPP level($10.12\ \mu\text{mol/L}$ vs $12.87\ \mu\text{mol/L}$)($P=0.017$). The subjects with B allele has larger head circumference than only with b allele(51.19 cm vs 50.75 cm)($P=0.028$). **Conclusions** It was suggested that the ALAD gene polymorphism modified the relationship between blood lead and ZPP and the VDR gene variants influenced the skull development in children living under lead-polluted environment. The polymorphism of ALAD and VDR genes might serve as the molecular inherited factors modifying the susceptibility of lead poisoning.

【Key words】 Lead poisoning; Inherited susceptibility; Epidemiology; molecular

环境铅污染是儿童铅中毒的主要原因, 研究表明, 儿童的神经系统、血液系统和骨骼是铅的作用靶组织。尽管对铅的危害有了越来越深入的认识, 但处于同样的环境暴露条件下, 不同个体的反应仍有很大差异, 推测这与多种先天遗传因素和后天获得性因素有关。在人群中铅的代谢动力学和毒效动力学都存在着明显的变异, 在同样的暴露条件下, 遗传因素的变异可以影响体内的铅负荷水平及其健康效应差异。氨基乙酰丙酸脱水酶(ALAD) 基因多态性与儿童铅中毒易感性已有报告, 但是这些研究对象

都是中低水平铅暴露的儿童, 对高水平铅暴露条件下, ALAD 基因多态性对儿童中毒的影响仍属未知。为此, 我们在严重铅污染地区开展了儿童铅中毒的分子流行病学研究, 旨在探讨在高铅负荷条件下, ALAD 和维生素 D 受体(VDR) 基因多态性对儿童铅负荷水平和生长发育的影响。

对象与方法

1. 研究对象: 为某镇 5 个自然村的小学生。该地区以铅产品加工为主要产业, 在生产过程中对儿童的学习和生活环境产生了严重的污染。该地区人群中的铅负荷明显增高, 并且已经有数例铅中毒性脑病发生。在问卷的基础上, 对资料齐全的、无直接

基金项目: 国家“九五”科技攻关项目(96-920-26-03)

作者单位: 100050 北京, 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所

血缘关系的 469 例研究对象进行血铅和锌原卟啉测定、生长发育检查以及基因分析。469 例研究对象的平均年龄为 8.5 岁,其中男性 235 例,女性 234 例。

2. 血铅测定:皮肤用稀硝酸和去离子水洗涤后消毒,采集 0.4 ml 静脉血,肝素抗凝,用石墨炉原子吸收光谱法测定血铅含量。所有测定过程按照标准方法进行^[1],同时用质量控制样品进行质量控制。对 3 个血铅标准参考物进行了 64 次测定,每份标准物所测得值都在标准物标定的置信范围内。此外,在测定过程中,每 10 个样品测 1 个平行样,当样品变异 < 10% 时认为合格,否则停止测定,重新检查仪器状态、标准曲线、质控样品以及样品处理程序。

3. 基因分析:采集静脉血,EDTA 抗凝,按常规方法提取基因组 DNA^[2], -20℃ 冰箱保存。分别使用文献介绍的方法,应用 PCR-RFLP 的方法检测 ALAD^[3]、Bsm I 和 Taq I^[4] 基因型。

4. 体格发育检查:按照标准方法检查儿童的身高、体重和头围。

5. 血红蛋白测定:使用高铁氰化法。

6. 统计分析方法:采用 *t* 检验(*t*' 检验)、 χ^2 检验和协方差分析。

结 果

儿童的血铅浓度为 504.6 $\mu\text{g/L}$ (220~938 $\mu\text{g/L}$), 属于重度铅中毒^[5]。由于该地区长期从事蓄电池的回收以及铅产品的加工,造成了严重的环境污染问题。经采样测定,该地区大气中铅的日平均浓度为 0.012 8 mg/m^3 , 超过我国居民区大气铅日平均最高允许浓度(0.001 5 mg/m^3) 8 倍,最高日均值为 0.098 8 mg/m^3 , 超标达 65 倍。同时还发现土壤和农作物的铅水平增高。

1. 研究对象的基因分布情况:对 469 例样品基因型的分析发现有 29 例 ALAD1-2 型杂合子,其余 440 例为 ALAD1-1 型纯合子,ALAD2 等位基因的频率为 3.1%, VDR Bsm I 的 BB、Bb 和 bb 3 种基因型频数分别为 1、45 和 423, B 等位基因的分布频率为 5.0%。VDR Taq I 的 TT、Tt 和 tt 3 种基因型频数分别为 419、49 和 1, t 等位基因分布频率为 5.4%。ALAD、VDR-Taq 和 VDR-Bsm 3 种基因型的分布见表 1。经统计学检验,3 个基因型的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡。由于 VDR-Bsm 的 BB 和 VDR-Taq 的 tt 为罕见基因型,所以,以下分析过程中分别将 BB 与 Bb、tt 与 Tt 两组合并分析。

表1 研究对象 3 种基因型的多态性分布

基因型	例数	构成比 (%)	Hardy-Weinberg 理论频数
ALAD			
1-1	440	93.8	440
1-2	29	6.2	28
2-2	0	0	1
VDR-Taq			
TT	419	89.3	419
Tt	49	10.4	48
tt	1	0.2	1
VDR-Bsm			
bb	423	90.2	423
Bb	45	9.6	45
BB	1	0.2	1

2. 以基因型分组分析比较血铅、ZPP 和血红蛋白以及生长发育指标:为探讨在同样暴露条件下基因变异对血铅的影响,以年龄和性别为协变量,通过协方差分析比较不同基因型儿童的血铅水平。结果发现,ALAD1-2 杂合子和 VDR-Taq I 的携带 t 基因的血铅都略有增高,但是,差异未达显著性水平。而 VDR-Bsm I 的两组血铅水平十分相近。但是,当以基因型分组,在校正了年龄、性别、血铅变量的影响后,ALAD1-2 基因型的 ZPP 水平增高,且差异有显著性。以 VDR-Taq 和 VDR-Bsm 基因分组时,都未发现各组间的差异有显著性。也未发现各基因型之间血红蛋白水平的统计学差异(表 2)。

以年龄、性别、身高、体重和血铅水平为协变量,分析基因型之间头围的差异时,我们发现了 VDR-Bsm I 的 bb 纯合子的头围小于 Bb 杂合子和 BB 纯合子,差异达到显著性水平($P = 0.028$)。但是,以年龄、性别和血铅水平为协变量,用协方差分析比较了各组之间的身高和体重两项体格发育指标,未发现各基因型之间这些指标的差异有显著性(表 3)。

讨 论

人类 ALAD 基因定位于 9q34, 两种等位基因分别为 ALAD1 和 ALAD2。ALAD1 与 ALAD2 相比其基因在 177 碱基位点上的产生了 G-C 颠换,引起在氨基酸序列 59 位残基由赖氨酸变成天冬酰胺。这种氨基酸的置换改变了它与铅的亲合力,通过影响铅的分布和排泄,继而影响到对铅易感性差异^[6]。推测 ALAD 基因多态性可影响个体的内暴露剂量和分布等代谢动力学参数。由于 ALAD2 更易与铅结合^[7],表现为在内剂量水平相同的条件下,ALAD2 携带者的在靶组织剂量可能高于携带 ALAD1 者^[8]。Schwartz 等^[9]对韩国的铅作业工厂

工人的研究发现,他们给血铅 25 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 工人口服二巯基琥珀酸(dimercaptosuccinic, DMSA)驱铅治疗,对比分析不同基因型工人在治疗过程中从尿中排铅的量,发现 ALAD1-2 杂合子基因型工人经 DMSA 治疗后从尿中排铅量少于 ALAD1-1 纯合子。这提示携带 ALAD2 基因者可能增加体内铅的蓄积。Astrin 等^[10]对 1 000 多名纽约儿童的血铅与 ALAD 基因型关系的研究发现 ALAD2 携带者的血铅增高。在德国,对 1 278 名儿童的研究也发现了相似的结果。本研究儿童长期生活在严重铅污染的环境中,其平均的血铅水平高达 504.6 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。通过比较两种基因型个体的血铅水平发现,ALAD1-2 杂合子的血铅水平略高于 ALAD1-1 纯合子,但是未达到统计学的显著性水平。

在研究中发现 ALAD1-2 杂合子的血 ZPP 水平高于 ALAD1-1 纯合子。推测其机制与 ALAD 基因型影响铅的分布以及靶部位的剂量有关。ALAD 基因多态性对铅作用的影响可能很复杂,也有文献认为 ALAD2 等位基因可能起保护作用。例如,对 65 名平均血铅为 27.9 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 工人的研究发现,ALAD1-1 基因型的血浆 ALAD 水平比 ALAD1-2 高 30%^[11]。此外,还有学者检测到 ALAD 1-1 携带者 ZPP 水平高于 ALAD 1-2 杂合子^[12]。VDR 与维生素 D 的活性形式($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)结合,可诱导钙离子结合蛋白的表达,调节机体钙离子的吸收和分布。人群中 VDR 基因存在多态性现象,目前已发现 19

个 VDR 基因的多态性位点。其中研究最多的是位于内含子 8 的 Bsm I 位点和位于外显子 9 的 Taq I 位点。由于铅和钙通过相似的转运机制在机体界面之间的转运,并且具有共同的组织分布,因此,可影响体内钙离子代谢的 VDR 基因多态性就有可能通过钙铅相互作用,改变体内铅的毒代动力学和毒效动力学参数^[13,14]。Schwartz 等^[15]发现 VDR 基因 Bsm I 位点多态性可影响铅作业工人胫骨铅含量,为这一假说提供了有力的支持。迄今,还没有关于铅暴露儿童 VDR 基因多态性与铅负荷以及所致生物学效应关系的报告。我们发现在高水平铅暴露条件下,儿童具有 bb 基因型的头围显著小于具有 BB/Bb 基因型的个体,因此,我们推测对于钙离子吸收利用活跃的儿童期和青春期个体,已知铅可对钙代谢和利用产生影响,但是,对 bb 基因型大于 BB 和 Bb 基因型。对 VDR 基因多态性的功能研究结果显示,具有 Bt 单倍型等位基因的个体对钙离子的吸收和利用高于具有 bT 单倍型等位基因纯合子的个体。

研究结果提示,在高水平铅暴露条件下,ALAD 和 VDR-Bsm I 基因多态性影响儿童铅中毒的易感性。ALAD 多态性可影响铅的血液毒性效应,VDR 基因的遗传变异改变铅对儿童颅骨发育的作用程度。ALAD 和 VDR 基因多态性是影响严重铅暴露条件下儿童铅中毒易感性的分子遗传学因素。

表2 以基因型分组比较血铅、ZPP 和血红蛋白的协方差分析结果($\bar{x} \pm s$)

基因型	例数	血铅($\mu\text{g}/\text{L}$) [*]	ZPP($\mu\text{mol}/\text{L}$) [#]	血红蛋白(g/L) [#]	
ALAD	1-1	449	503.38 \pm 6.50	10.12 \pm 0.29	128.94 \pm 0.63
	1-2	50	522.72 \pm 25.35	12.87 \pm 1.12	128.83 \pm 2.48
P 值		0.461	0.018	0.964	
VDR-Taq	TT	419	503.20 \pm 6.66	10.36 \pm 0.30	129.06 \pm 0.65
	Tt/tt	50	516.18 \pm 19.29	9.70 \pm 0.86	127.86 \pm 1.89
P 值		0.524	0.467	0.547	
VDR-Bsm	bb	423	504.36 \pm 6.63	10.26 \pm 0.29	129.03 \pm 0.65
	BB/Bb	46	506.62 \pm 20.11	10.58 \pm 0.89	128.00 \pm 1.96
P 值		0.915	0.738	0.615	

* 协变量:年龄、性别; # 协变量:年龄、性别、血铅

表3 以基因型分组比较生长发育指标的协方差分析结果($\bar{x} \pm s$)

	ALAD		P 值	VDR-Taq		P 值	VDR-Bsm		P 值
	1-1	1-2		TT	Tt/tt		bb	BB/Bb	
身高(cm) [*]	120.25 \pm 0.31	119.78 \pm 1.20	0.709 5	120.28 \pm 0.32	119.71 \pm 0.92	0.555 9	120.23 \pm 0.31	120.13 \pm 0.95	0.926
体重(kg) [*]	23.62 \pm 0.18	23.84 \pm 0.69	0.763 7	23.65 \pm 0.18	23.51 \pm 0.53	0.797 6	23.64 \pm 0.18	23.60 \pm 0.55	0.940
头围(cm) [#]	50.77 \pm 0.06	51.21 \pm 0.24	0.073 2	50.77 \pm 0.06	50.99 \pm 0.18	0.250 5	50.75 \pm 0.06	51.19 \pm 0.19	0.028

* 协变量:年龄、性别、血铅; # 协变量:年龄、性别、血铅、身高、体重

参 考 文 献

1 中国预防医学科学院标准处. 血中铅等测定-无焰原子吸收光谱

法. 职业病诊断国家标准汇编(GB1504-89). 北京:中国标准出版社,1992. 201.

2 Miller SA, Dykes DD, Polesky, et al. Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Res,

- 1988, 85:1215.
- 3 Wetmur JG, Kaya AH, Plewinska M, et al. Molecular characterization of the human delta-aminolevulinic acid dehydratase 2 (ALAD2) allele: implications for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning. *Am J Hum Genet*, 1991, 49:757-763.
 - 4 Taylor JA, Hirvonen A, Watson M, et al. Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism. *Cancer Research*, 1996, 56:4108-4110.
 - 5 Center for Disease Control and Prevention. Preventing lead poisoning in young children. Atlanta: CDC, 1999, 1:1-5.
 - 6 Battistuzzi G, Petrucci R, Silvagni L, et al. Delta-Aminolevulinic acid dehydratase: a new genetic polymorphism in man. *Ann Hum Genet*, 1981, 45(Pt 3):223-229.
 - 7 Bergdahl IA, Grubb A, Schutz A, et al. Lead binding to delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. *Pharmacol Toxicol*, 1997, 81:153-158.
 - 8 Fleming DE, Chettle DR, Wetmur JG, et al. Effect of the delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on the accumulation of lead in bone and blood in lead smelter workers. *Environ Res*, 1998, 77:49-61.
 - 9 Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, et al. δ -aminolevulinic acid dehydratase genotype modifies four urinary lead excretion after oral administration dimercaptosuccinic acid. *Occup Environ Med*, 1997, 54:241-246.
 - 10 Astric KH, Bishop DF, Wetmur JG, et al. Aminolevulinic acid dehydratase isozymes and lead toxicity. *Ann NY Acad Sci*, 1987, 514:23-29.
 - 11 Sithisarankul P, Schwartz BS, Lee BK, et al. Aminolevulinic acid dehydratase genotype mediates plasma levels of neurotoxin, 5-aminolevulinic acid, in lead-exposed workers. *Am J Ind Med*, 1997, 32:15-20.
 - 12 Alexander BH, Checkoway H, Costa-Mallen P, et al. Interaction of blood lead and delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype on markers of heme synthesis and sperm production in lead smelter workers. *Environ Health Perspect*, 1998, 106:213-216.
 - 13 Morrison NA, Qi J C, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*, 1994, 367:284-287.
 - 14 Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Recent progress in understanding the genetic susceptibility to osteoporosis. *Genetic Epidemiol*, 1999, 16:356-367.
 - 15 Schwartz BS, Stewart WF, Karl TK, et al. Associations of tibial lead levels with Bsm I polymorphisms in the vitamin D receptor in former organolead manufacturing workers. *Environ Health Perspect*, 2000, 108:199-203.

(收稿日期 2001-11-30)

(本文编辑 段江娟)

· 出版信息 ·

《新发传染病预防与控制》出版

1995 年国际上出现了一个新词汇,即“新发现的传染病”(emerging infectious diseases, EID),与其相对应的已基本上得到控制而又重新流行的古老传染病,如结核病、西尼罗病毒病等,称“再肆虐的传染病”(reemerging infectious diseases, REID)。迄今已发现的,由细菌、病毒及寄生虫引致感染的新发传染病达 40 余种,如埃博拉出血热、尼巴病毒脑炎及疯牛病等对人类造成严重的致死性感染。由于人们对其生物学性状、传播因素及传播规律等方面缺乏足够的认识,也未掌握其斗争手段,往往给人类造成严重的公共卫生问题。在国外新发现的传染病,在我国已陆续被发现或存在着传播因素。我国入世后,国际交往更加频繁,由此存在某些新发传染病迅速传播的机会和条件,再加上食源、血源、新资源开发利用及微生物物种变异等一些不确定的因素,有可能扩大新发传染病的流行范围。新发现的传染病,大部分属于动物源病(zoonoses),通称人兽共患病,这种复杂因素将给新发传染病的防制措施方面带来严峻的挑战。北京预防医学会组织北京市疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心及军事医学科学院的有关专家教授,编撰了一部《新发传染病的预防与控制》专著,2002 年第一季度将由中国协和医科大学出版社出版。该专著包括 30 余种新发传染病,从发现简史、病原特点、临床表现、诊断治疗、流行病学特点及预防控制等方面进行了全面的介绍和探讨,它将有助于人们对新发传染病的了解和认识。欲购者可直接与 100031 北京市和平里中街 16 号,北京市疾病预防控制中心裴绍民联系,电话(010)64217983。