

对氧磷酶和谷胱甘肽S转移酶基因多态性与农药暴露花卉种植者的健康关系研究

何建辉 刘苹 漆骏 杨红英

【摘要】 目的 探讨花卉种植者(花农)对氧磷酶及谷胱甘肽S转移酶基因多态性的分布情况,并分析基因多态性与健康的关系。**方法** 选择云南省某村136名从事花卉种植的花农作为暴露组(男性74名,女性62名);41名不使用农药的同村居民作为对照组(男性16名,女性25名);进行问卷调查和体格检查,并采集血液样本,分析血常规、肝功能、激素水平、免疫球蛋白(IgM、IgG、IgA)和全血乙酰胆碱酯酶活性。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法(PCR-RFLP)检测PON1-107、PON1 192、GST M1、T1基因型。**结果** (1)对照组球蛋白高于暴露组($\beta=-0.16, t=-2.30, P=0.02$),而白蛋白与球蛋白的比(白球比)低于暴露组($\beta=0.14, t=2.09, P=0.04$);(2)PON1 192位点分析显示,QQ基因型个体症状积分高于RR基因型个体($t=-2.78, P=0.006$);(3)GST T1-的个体分析显示,球蛋白高于GST T1+的个体($\beta=-0.20, t=-3.01, P=0.00$),IgG高于GST T1+的个体($\beta=-0.15, t=-2.15, P=0.03$),而白球比低于GST T1+的个体($\beta=0.17, t=2.54, P=0.01$);(4)农药暴露者心电图异常情况增加($\beta=1.147, P=0.042$)。**结论** PON1 192和GST T1位点与农药暴露后的花农健康状况相关。

【关键词】 健康效应;花卉种植者;基因多态性;对氧磷酶;谷胱甘肽S转移酶

Relationship between paraoxonase/glutathione S-transferase gene polymorphism and health conditions of floriculture farmers HE Jian-hui¹, LIU Ping¹, QI Jun², YANG Hong-ying³. 1 Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, Kunming Medical College, Kunming 650031, China; 2 Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention; 3 The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College

Corresponding author: LIU Ping, Email: liupingkm@gmail.com

This work was supported by a grant from the Science and Technology Foundation of Yunnan (No. 2005GH20).

【Abstract】 Objective In this study we conducted a cross-sectional study and reported on the distribution of two common genetic polymorphisms of the PON1 gene and two common genetic polymorphisms of the GST gene as well as the association between those polymorphisms and other predictors in a population of floriculture workers from Kunming city. **Methods** 136 pesticide-exposed farmers were recruited. PON1 and GST T1, M1 genotype were determined by means of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** (1) Compared with exposure group, the GLB in control group was higher ($\beta=-0.16, t=-2.30, P=0.02$), but the A/G in control group was lower ($\beta=0.14, t=2.09, P=0.04$); (2) Compared with the persons who carried QQ genotype, the accumulative symptom scores were lower in the persons who carried RR genotype ($t=-2.78, P=0.006$); (3) Compared with GST T1 carriers, non-carriers' GLB ($\beta=-0.20, t=-3.01, P=0.00$) and IgG ($\beta=-0.20, t=-3.01, P=0.00$) were higher, but the A/G was lower; (4) The abnormalities of cardiograms among people who had been exposed to pesticides were higher compared to people who did not expose to any pesticides ($\beta=1.147, P=0.042$). **Conclusion** PON1-192 and GST T1 gene were associated with the farmers health condition after pesticides exposure.

【Key words】 Health effects; Floriculturists; Gene polymorphism; Paraoxonase; Glutathione S-transferase

农药慢性暴露能引起细胞基因损伤、神经系统功能障碍、生殖和发育毒性等^[1-3]。农药暴露引起的

损伤或疾病,很大程度上取决于人类的遗传变异。对氧磷酶和谷胱甘肽S转移酶是两类在农药的生物活化和解毒过程中起着重要作用的代谢酶,其基因多态性直接影响着酶的水解活性^[4,5]。国外对农药代谢基因与农药暴露引起的健康问题关系研究的比较多^[4],但是,在大棚花卉种植这一多种农药暴露下的研究比

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.07.009

基金项目:云南省科学技术基金(2005GH20)

作者单位:650031 昆明医学院公共卫生学院(何建辉、刘苹);云南省疾病预防控制中心(漆骏);昆明医学院第二附属医院(杨红英)

通信作者:刘苹, Email: liupingkm@gmail.com

较少^[6]。本课题组选取花卉种植者(花农)作为研究对象,了解对农药的使用情况、防护知识、态度及现况;并探讨基因多态性和农药暴露与花农健康的关系。

对象与方法

1. 调查对象:云南省某村花农136名作为农药暴露组,男74名、女62名,年龄18~60岁,平均44岁。41名在当地居住5年以上的非花农作为对照组,男16名、女25名,年龄20~60岁,平均39岁。两组人群均身体健康,未患有慢性疾病及其他与调查指标相关的疾病^[7]。

2. 现场调查:在经过伦理学审查和调查对象的知情同意后,进行体格检查、心电图检测及健康状态自我报告;采用真空肝素抗凝管采集静脉血液样本进行检验,指标包括乙酰胆碱酯酶、血常规、肝功能检测;免疫球蛋白(IgG、IgA、IgM)测定,T₃、T₄、促甲状腺激素(TSH)、促黄体生成素(LH)、促卵泡生成素(FSH)、E₂、T检测^[8];剩余血样本在-70℃冷冻保存,用于后续实验。

3. 症状积分:按照有机磷农药长期接触出现的症状、体征的特异性,赋权重给分:1分:头痛、头昏、乏力、脚酸;2分:食欲减退、恶心、呕吐、腹痛、腹泻、失眠、多梦、记忆力减退、嗜睡;3分:心悸、胸闷、视物模糊;4分:手足多汗、四肢发麻、肌肉跳动、痉挛、流涎、颈肌无力。

4. 基因多态性测定:

(1)主要仪器和试剂:各基因的引物均由上海英俊生物技术有限公司提供。内切酶Bsh1236I和Hin1 I由Fermentas Life sciences提供,Hinf I由宝生物工程(大连)有限公司提供。DNA Ladder、琼脂糖和溴化乙锭(EB)由天根生化科技(北京)有限公司提供。PCR仪为美国MJ公司的MJOpticon 2荧光定量仪,DNA电泳仪为大连竞迈生物科技公司产品,BioRad凝胶成像系统为美国BioRad公司产品。血样本中DNA采用天根公司的试剂盒提取。

(2)方法:PON1-107、PON1 192基因型的确定采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法(PCR-RFLP);GST T1、GST M1基因型的确定采用多重PCR的方法。

(3)对氧磷酶启动区107位点基因型确定:体外扩增引物见表1。PCR反应体系为25 μl,内含0.5 μg基因组DNA、20 μmol/L引物各2 μl,2×Master Mix 15 μl。反应条件为:95℃预变性5 min,95℃变性1 min,63℃退火1 min,72℃延伸1 min,共40个循

环,最后72℃延伸10 min。取10 μl PCR产物,2 μl 10×buffer R,2 μl Bsh1236I,18 μl去离子水,合计32 μl,轻轻混匀,离心几秒,37℃下孵育8 h;取6 μl酶切产物,6 μl DNA Ladder,150 V,1.5%琼脂糖电泳40 min,确定酶切产物的大小。用BioRad凝胶成像系统拍摄照片,观测结果。

表1 研究所用引物序列

引物名称	引物序列(5' - 3')
PON1-107 正向	GAC CGC AAG CCA CGC CTT CTG TGC ACC
反向	TAT ATT TAA TTG CAG CCG CAG CCC TGC TGG GGC AGC GCC GAT TGG CCC GCC G
PON1 192 正向	TTGAATGATATTGTTGCTGTGGACCTGAG
反向	CGAACCACGCTAAACCCAAATACATCTCCCAGAA
GSTM1 正向	GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C
反向	GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G
GSTT1 正向	TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC
反向	TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA
β-globin 正向	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC
反向	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC

(4)对氧磷酶编码区192位点基因型确定:体外扩增引物见表1。PCR反应体系为25 μl,内含0.5 μg基因组DNA、10 μmol/L引物各2 μl,2×Master Mix 15 μl。反应条件为:95℃预变性5 min,95℃变性1 min,59℃退火1 min,72℃延伸1 min,共40个循环,最后72℃延伸10 min。取10 μl PCR产物,3 μl 10×H buffer,2 μl Hinf I,5 μl去离子水,合计20 μl,轻轻混匀,离心几秒,37℃下孵育8 h;取6 μl酶切产物,6 μl DNA Ladder,150 V,1.5%琼脂糖电泳40 min,确定酶切产物的大小;用BioRad凝胶成像系统拍摄照片,观测结果。

(5)谷胱甘肽S转移酶M1、T1基因型确定:体外扩增引物见表1。PCR反应体系为50 μl,内含1.0 μg基因组DNA、20 μmol/L引物各1 μl,2×Master Mix 25 μl。同时扩增β-globin基因作为内对照。反应条件为:95℃预变性5 min,95℃变性1 min,58℃退火1 min,72℃延伸1 min,共40个循环,最后72℃延伸10 min。取6 μl PCR扩增产物,2%琼脂糖-EB染色的凝胶上电泳40 min,用BioRad凝胶成像系统拍摄照片,观测结果。

5. 统计学分析:所有实验数据均采用Stata软件包进行数据分析。对指标进行正态检验,对不符合正态调查的健康相关指标经对数转换后,进行多重线性逐步回归分析,其中的心电图异常采用二分类logistic回归分析。变量进入方程的显著水准为0.05,剔除变量的显著水准为0.10。检验水准均为0.05。

结 果

1. 基因分型:PON1-107C/T的3种基因型TT、

TC 和 CC 分别检出 51、82 和 44 例;PON1 192Q/R 的 3 种基因型 QQ、QR 和 RR 分别检出 16、91 和 70 例; GST M1 的 2 种基因型 GST M1+、GST M1- 分别检出 81 和 96 例; GST T1 的 2 种基因型 GST T1+、GST T1- 分别检出 141 和 36 例。

2. 基因型分析: 经过 χ^2 检验, 对照组与暴露组间各基因型构成、性别构成差异无统计学意义(表 2)。

表 2 暴露组与对照组携带不同基因型构成

基因/性别	基因型	对照组	暴露组	合计
192 位点	QQ	4	12	16
	QR	17	74	91
	RR	20	50	70
107 位点	TT	8	43	51
	CT	25	57	82
	CC	8	36	44
GST T1	GST T1-	10	26	36
	GST T1+	31	110	141
GST M1	GST M1-	23	73	96
	GST M1+	18	63	81
男		16	74	90
女		25	62	87

3. 农药接触效应单因素分析: 对照与暴露组各指标经过两独立样本 t 检验(正态分布资料)或两独立样本秩和检验(偏态资料)分析后, 可见球蛋白、白球比(白蛋白与球蛋白的比)、IgG、IgM、LH、FSH 两组间差异有统计学意义(表 3)。症状积分(单独暴露组)按 PON1 192 基因型分组比较差异有统计学意义; QQ 基因型个体症状积分高于 RR 基因型个体($t=-2.78$, $P=0.006$), 其他相关指标未见差异(表 3 中未列出)。

表 3 暴露组与对照组各指标单因素分析

指标	对照组($n=41$)	暴露组($n=136$)
球蛋白($\bar{x}\pm s$)	29.32±3.77	27.38±3.12*
IgG($\bar{x}\pm s$)	12.37±2.24	11.57±2.09*
IgM($\bar{x}\pm s$)	1.82±0.75	1.54±0.75*
白球比[Md(Q)]	1.60(0.30)	1.70(0.30)*
LH[Md(Q)]	8.20(6.55)	5.50(2.98)*
FSH[Md(Q)]	7.80(10.10)	6.00(3.15)*

注: 与对照组比较 * $P<0.01$, * $P<0.05$

4. 基因和农药接触健康效应的多重线性回归分析: 对所有指标经过单因素分析后, 发现球蛋白、白球比、IgG、IgM、LH、FSH 在对照与暴露两组间差异

有统计学意义; 进一步采用逐步回归法拟合这些观测指标与可能影响变量之间的回归方程, 考虑纳入的自变量有年龄、性别、是否饮酒、是否吸烟和基因型。回归分析结果显示: ①在以球蛋白为因变量拟合的回归方程中, GST T1 基因型作为球蛋白的一个可能影响因素进入方程($\beta=-0.20$, $t=-3.01$, $P=0.00$), 表明 GST T1- 的个体, 球蛋白高于 GST T1+ 的个体; 在以白球比为因变量拟合的回归方程中, GST T1 基因型作为白球比的一个可能影响因素进入方程($\beta=0.17$, $t=2.54$, $P=0.01$), 显示 GST T1- 的个体, 白球比低于 GST T1+ 的个体; 在以 IgG 为因变量拟合的回归方程中, GST T1 基因型作为 IgG 的一个可能影响因素进入方程($\beta=-0.15$, $t=-2.15$, $P=0.03$), 表明 GST T1- 的个体, IgG 高于 GST T1+ 的个体。②在以球蛋白为因变量拟合的回归方程中, 分组作为球蛋白的一个可能影响因素进入方程($\beta=-0.16$, $t=-2.30$, $P=0.02$), 表明对照组的球蛋白高于暴露组; 在以白球比为因变量拟合的回归方程中, 分组作为白球比的一个可能影响因素进入方程($\beta=0.14$, $t=2.09$, $P=0.04$), 显示对照组的白球比低于暴露组(表 4); 其他相关指标经拟合回归方程, 研究所关注的分组和基因型未进入方程(表 4 中未列出)。

5. 基因与心电图 logistic 回归分析: 采用逐步回归法, 筛选可能影响心电图的因素, 拟考虑筛选的因素有年龄、性别、吸烟、饮酒、暴露分组、基因型(PON1-107、PON1 192、GST T1、GST M1)。最后进入方程的指标只有暴露分组; 其相应的指标 $\beta=1.147$, $P=0.042$, $OR=3.150$ 。该结果说明不同基因型间心电图异常情况无差异, 而农药暴露能增加心电图异常(在本研究中包括窦性心动过缓、心率不齐、电轴左偏和右偏)的发生, 其发生的危险性暴露组是对照组的 3.15 倍。

讨 论

对氧磷酶是一种与高密度脂蛋白紧密结合的颗

表 4 多重线性回归分析

自变量	赋 值	球蛋白			白球比			IgG		
		β	t 值	P 值	β	t 值	P 值	β	t 值	P 值
年龄	连续变量	0.15	2.17	0.03	0.26	3.89	0.00*	0.13	1.83	0.07
性别	男=1, 女=2	0.18	1.50	0.14	0.15	1.35	0.18	0.18	1.48	0.14
饮酒情况	从不饮酒=1, 以前饮、现在不饮=2, 现在饮=3	0.03	0.40	0.69	0.07	0.87	0.39	-0.03	-0.31	0.76
分组	对照=0, 暴露=1	-0.16	-2.30	0.02*	0.14	2.09	0.04*	-0.11	-1.61	0.11
吸烟情况	从不吸=1, 以前吸、现在不吸=2, 现在吸=3	-0.36	-5.46	0.00*	0.36	5.53	0.00*	-0.35	-5.04	0.00*
PON1-107 位点	TT 型纯合子=1, TC 型杂合子=2, CC 型纯合子=3	-0.00	-0.06	0.95	0.02	0.26	0.79	0.06	0.87	0.39
PON1 192 位点	QQ 型纯合子=1, QR 型杂合子=2, RR 型纯合子=3	0.04	0.53	0.60	0.08	1.16	0.25	-0.08	-1.17	0.24
GST T1 位点	GST T1 阴性=0, GST T1 阳性=1	-0.20	-3.01	0.00*	0.17	2.54	0.01*	-0.15	-2.15	0.03*
GST M1 位点	GST M1 阴性=0, GST M1 阳性=1	0.01	0.07	0.94	0.03	0.41	0.68	-0.04	-0.59	0.56

注: * $P<0.05$, * $P<0.01$

粒成分,能保护低密度和高密度脂蛋白,降解有机磷农药和神经毒性物质^[9]。在动脉粥样硬化和心脏疾病的发生中起着重要作用。它还能保护乙酰胆碱酯酶免受有机磷农药如二嗪啉和毒死蜱的抑制^[5];能水解神经毒性物质如索曼和沙林。个体的对氧磷酶水平呈现很大变化^[10]。

人类谷胱甘肽 S 转移酶是一类重要的外源性化学物代谢酶,主要催化外源代谢物的亲电子中心与还原型谷胱甘肽的接合反应,从而降低外源化学物和致癌化合物的毒性及致癌性。谷胱甘肽 S 转移酶至少有 4 种同工酶(α 、 μ 、 p 和 δ)。当 α GST (GST T1) 或 μ GST (GST M1) 基因缺失时,不能产生相应的酶,就可能影响机体氧化与抗氧化系统的平衡及清除内、外源性有害物质的能力^[11]。

经单因素分析显示,球蛋白、IgG、IgM、LH、FSH 暴露组低于对照组;白球比暴露组高于对照组。经多重逐步回归分析同时考虑多种因素的影响后,发现分组在以球蛋白、白球比分别为因变量拟合的方程中,作为可能的影响因素进入方程,结果与单因素分析的结果一致。GST T1 基因在以球蛋白、白球比和 IgG 分别为因变量拟合的方程中,作为可能的影响因素进入方程,相对于 GST T1- 个体,球蛋白、免疫球蛋白高于 GST T1+ 的个体,而白球比低于 GST T1+ 的个体。有研究显示,长期农药暴露,能影响个体的血液生化指标^[12]。Prakasam 等^[13]指出,不同种类的农药暴露能导致农药喷洒者的氧化应激。Musak 等^[14]研究发现,携带 GST T1- 基因型的个体,农药或其他毒物暴露后染色体畸变(CA)、姐妹染色体互换(SCE)率与 GST T1+ 人群比较显著升高。Lucena 等^[15]发现,携带 GST T1- 和 GST M1- 个体因药物引起的肝脏损伤增加。以上不同基因型各指标的差异,可能是由于农药暴露引起的氧化应激作用的结果。GST T1 基因缺失的个体,不能产生相应的酶,就可能影响机体氧化与抗氧化系统的平衡及清除内、外源性有害物质的能力^[16];长时间接触低剂量的农药,可能损害肝脏功能、免疫系统及造血系统的功能,造成各项指标的异常。以 IgG、IgM、LH 和 FSH 为因变量拟合的方程中,分组和基因型未进入方程,与单因素分析结果不一致,其原因可能是这些指标年龄性别是其主要决定因素(分析结果未显示)。本研究发现,携带 RR 基因型的个体,其接触农药相关的症状积分低于 QQ 基因型的个体。而携带 QQ 基因型的个体,长期接触农药,可能导致农药慢性中毒,表现出的临床症状增多。Cherry

等^[17]研究指出,携带异常纯合子(QQ)的个体症状积分最高,与本研究结果一致。而接触农药能引起心电图异常^[18],也与本研究观察到的结果相一致。

本研究显示,PON1 192 基因是否能作为农药暴露的易感生物标志物,还需进一步深入的研究;而 GST T1 基因缺失的个体,可以作为农药暴露容易产生慢性中毒的高危人群;开展有针对性的健康宣传和行为干预,对预防农药慢性中毒有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Remor AP, Totti CC, Moreira DA, et al. Occupational exposure of farm workers to pesticides: biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ Int*, 2009, 35(2): 273-278.
- [2] Roldan-Tapia L, Nieto-Escamez FA, del Aguila EM, et al. Neuropsychological sequelae from acute poisoning and long-term exposure to carbamate and organophosphate pesticides. *Neurotoxicol Teratol*, 2006, 28(6): 694-703.
- [3] Pérez-Herrera N, Polanco-Minaya H, Salazar-Arredondo E, et al. PON1Q192R genetic polymorphism modifies organophosphorous pesticide effects on semen quality and DNA integrity in agricultural workers from southern Mexico. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 230(2): 261-268.
- [4] López-Flores I, Lacasaña M, Blanco-Muñoz J, et al. Relationship between human paraoxonase-1 activity and PON1 polymorphisms in Mexican workers exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol Lett*, 2009, 188(2): 84-90.
- [5] Li WF, Costa LG, Richter RJ, et al. Catalytic efficiency determines the in-vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphates. *Pharmacogenetics*, 2000, 10: 767-779.
- [6] Lauria L, Settimi L, Spinelli A, et al. Exposure to pesticides and time to pregnancy among female greenhouse workers. *Reprod Toxicol*, 2006, 22(3): 425-430.
- [7] Chen QS, Liu P, Xing J, et al. Pesticide exposure assessment and its effect on apoptosis of white blood cell in floriculture farmers. *Chin J Ind Hyg and Occup Dis*, 2009, 27(3): 169-171. (in Chinese) 陈青松, 刘苹, 邢杰, 等. 花卉种植者农药暴露评价及其对白细胞凋亡的影响. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2009, 27(3): 169-171.
- [8] Xing J, Liu P, Chen QS, et al. The effects of pesticides exposure on farmers in floriculture greenhouse. *J Kunming Medical University*, 2009, 30(8): 56-62. (in Chinese) 邢杰, 刘苹, 陈青松, 等. 花卉种植大棚农药暴露对花农健康的影响. *昆明医学院学报*, 2009, 30(8): 56-62.
- [9] Mackness B, Mackness MI, Arrol S, et al. Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in noninsulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 1998, 139: 341-349.
- [10] Davies HG, Richter RJ, Keifer M, et al. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nature Genet*, 1996, 14: 334-336.
- [11] Awasthi YC, Sharma R, Singhal S. Human glutathione-S-transferase. *Int J Biochem*, 1994, 26(3): 295-308.
- [12] Ali T, Bhalli JA, Rana SM, et al. Cytogenetic damage in female Pakistani agricultural workers exposed to pesticides. *Environ Mol Mutagen*, 2008, 49(5): 374-380.
- [13] Prakasam A, Sethupathy S, Lalitha S. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clin Chim Acta*, 2001, 310: 107-112.
- [14] Musak L, Soucek P, Vodickova L, et al. Chromosomal aberrations in tire plant workers and interaction with polymorphisms of biotransformation and DNA repair genes. *Mutat Res*, 2008, 641(1-2): 36-42.
- [15] Lucena MI, Andrade RJ, Martínez C, et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes increase susceptibility to idiosyncratic drug-induced liver injury. *Hepatology*, 2008, 48(2): 588-596.
- [16] Awasthi YC, Sharma R, Singhal SS. Human glutathione-S-transferase. *Int J Biochem*, 1994, 26(3): 295-308.
- [17] Cherry N, Mackness M, Durrington P, et al. Paraoxonase (PON 1) polymorphisms in farmers attributing ill health to sheep dip. *Lancet*, 2002, 359: 763-764.
- [18] Zhang DF. ECG analysis of 176 workers exposed to organophosphorus pesticides. *Chin J Ind Hyg and Occup Dis*, 2008, 26(10): 587. (in Chinese) 张东风. 176 例有机磷农药作业工人心电图分析. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2008, 26(10): 587.

(收稿日期: 2009-12-29)

(本文编辑: 尹廉)