

· 论 著 ·

饮水型砷暴露地区人群血液CYP1A1mRNA 表达对砷中毒患病情况的影响

崔娜,刘一君,郭志伟,夏雅娟,李艳红*

(内蒙古自治区综合疾病预防控制中心 内蒙古 呼和浩特 010031)

摘要:目的:通过分析饮水型砷暴露人群血液中CYP1A1mRNA的表达情况,探讨CYP1A1mRNA的表达与高砷暴露地区砷中毒患病情况之间的关系。方法:选取内蒙古自治区巴彦淖尔市的砷暴露地区作为调查点,将在此居住10年以上的居民作为调查对象。按饮水砷浓度将233名居民分为4组:对照组(饮水砷浓度 $<10.0 \mu\text{g/L}$),低剂量组(饮水砷浓度 $10.0 \sim 99.9 \mu\text{g/L}$),中剂量组(饮水砷浓度 $100 \sim 199.9 \mu\text{g/L}$),高剂量组(饮水砷浓度 $\geq 200.0 \mu\text{g/L}$)。采用流行病学调查结合实时荧光定量PCR检测技术,测定血液CYP1A1 mRNA的表达水平,分析基因表达与砷中毒患病情况之间的关系。结果:(1)砷中毒的患病率随水砷浓度升高逐渐升高,与对照组相比,各剂量组人群砷中毒患病存在上升趋势,差异有统计学意义($\chi^2=16.97, P<0.05$),经线性趋势卡方检验发现随着水砷浓度的升高,砷中毒的病情逐渐加重($\chi^2=2.371, P<0.05$);(2)长期砷暴露会导致CYP1A1mRNA的表达水平升高,高浓度组CYP1A1mRNA表达水平升高具有统计学意义($P<0.05$);(3)随着砷中毒的病情加重,各组之间的CYP1A1mRNA的表达水平没有显著性差异($P>0.05$)。结论:长期慢性砷暴露会导致CYP1A1mRNA的表达水平升高,这可能是影响地方性砷中毒患病的重要因素,但CYP1A1mRNA的表达与砷中毒病情严重程度无关。

关键词:水;砷中毒;细胞色素P4501A1(CYP1A1)

中图分类号:R34

文献标识码:A

文章编号:1673-9388(2020)04-0253-04

EFFECTS OF BLOOD CYP1A1 mRNA EXPRESSION ON THE PREVALENCE OF ARSENIC POISONING IN DRINKING WATER- EXPOSED ARSENIC POPULATION

CUI Na, LIU Yi-jun, GUO Zhi-wei, et al.

(The Inner Mongolia Autonomous Region Comprehensive Center for
Disease Control and prevention, Huhhot 010031 China)

Abstract: To analyze the potential relationship between CYP1A1 mRNA expression and disease caused by Arsenic, though detecting objective. CYP1A1mRNA expressing in blood of subjects exposed to different concentration of arsenic in drinking water. **Methods:** Arsenic exposure area in Bayannao'er city of Inner Mongolia Autonomous Region was selected as the survey point, and the residents living more than 10 years in this area were investigated. According to drinking water arsenic concentration, 233 residents were divided into four groups: control group (drinking water arsenic concentration $<10.0 \mu\text{g/L}$), low exposure group (drinking water arsenic concentration $10.0 \sim 99.9 \mu\text{g/L}$), middle exposure group (drinking water arse-

收稿日期:2020-04-02;修回日期:2020-07-20

基金项目:内蒙古社会发展项目(201702148);内蒙古自治区卫生计生科研计划项目(201701039)

作者简介:崔娜(1988-),女,蒙古族,内蒙古综合疾病预防控制中心主管医师。

通信作者:李艳红,主任医师, E-mail:nmdfbk@yeah.net 内蒙古综合疾病预防控制中心,010031

nic concentration 100.0—199.9 $\mu\text{g/L}$), high exposure group (drinking water arsenic concentration $\geq 200.0 \mu\text{g/L}$). The epidemiological investigation was combined with real-time quantitative fluorescence PCR and the relationship between expression levels of blood CYP1A1 mRNA and arsenic poisoning were analyzed. **Results:** (1) With water arsenic concentration increased, prevalence rate of arsenic poisoning gradually increased. Compared with the control group, the prevalence rate of arsenic poisoning is high, and the difference was statistically significant ($\chi^2=16.97, P<0.05$), and through the linear trend chi-square test, arsenic poisoning condition gradually worsened with the water arsenic concentration increased ($\chi^2=2.371, P<0.05$); (2) Long-term arsenic exposure can cause elevated levels of CYP1A1 mRNA expression. Compared with the control group, the CYP1A1 mRNA expression level of the high concentration group increased significantly ($P<0.05$); (3) There was no significant difference in the expression level of CYP1A1 mRNA between different aggravation level of arsenic poisoning patients ($P>0.05$). **Conclusion:** Long-term chronic arsenic exposure will increase the expression level of CYP1A1 mRNA, which may be an important factor affecting the prevalence of endemic arsenism. However, there are no significant relationship between the expression of CYP1A1 mRNA expression and the severity of arsenism.

Key words: water; arsenic exposure; CYP1A1

砷是人类致癌物之一,长期慢性砷暴露可引起皮肤损伤及皮肤癌,并且会对全身多个组织、器官造成严重损害。多年来人们对砷的致病机理作出了广泛研究。近年来研究认为砷能够发挥雌激素样效应,使小鼠动情周期发生紊乱,导致雌性小鼠子宫和卵巢的ER α mRNA表达降低^[1,2],但砷是通过哪种途径引起的雌激素样效应目前尚不清楚。大量研究发现,CYP1A1在卵巢癌、宫颈癌和子宫内膜癌的发生过程中都起到了关键作用^[3-5]。CYP1家族通过雌激素(ER)途径在ER-依赖性相关的癌症发生中起作用,同时CYP1家族在不依赖ER的其他癌症中也起到重要作用^[6]。为了解CYP1A1是否在砷的环雌激素样效应中起作用,本研究以内蒙古地区饮水型砷暴露人群为调查对象,采用荧光定量PCR技术检测血液中细胞色素P4501A1(CYP1A1) mRNA的表达,探讨其与砷的雌激素样效应的关系,进一步探讨P4501A1在砷中毒患病过程中起到的作用。

1 材料与方法

1.1 调查现场及对象选择

调查点选取内蒙古自治区巴彦淖尔市的砷暴露地区。选择在当地生活至少10年的居民作为目标人群;排除有药物性、职业性砷暴露及有其他摄砷途径的个体。本次研究所选调查点的居民全部为汉族,生产方式、经济状况和饮食习惯接近,使用燃料,取暖方式基本相同,无其他途径的砷污染。

1.2 现场调查内容与方法

首先检测当地居民的水砷含量,然后采用分层整群随机抽样方法,抽取饮用水砷浓度范围为

0.8~824.7 $\mu\text{g/L}$ 的居民233名。将调查对象分为4组:对照组(饮水砷浓度 $<10.0 \mu\text{g/L}$,共55名),低剂量组(饮水砷浓度 $10.0 \sim 99.9 \mu\text{g/L}$,共47名),中剂量组(饮水砷浓度 $100 \sim 199.9 \mu\text{g/L}$,共45名),高剂量组(饮水砷浓度 $\geq 200.0 \mu\text{g/L}$,共86名)。各组间研究对象的年龄、暴露年限、吸烟情况及饮酒等情况均衡可比。

采取问卷调查的方式,对其进行现场调查,收集人口学资料,并调查砷暴露相关因素,以及砷中毒的危害指标。上述工作均取得调查人知情同意。

1.3 血液CYP1A1 mRNA的表达水平检测

抽取调查对象空腹外周血5 mL,置于BD采血管(德国QLAGEN公司)中。按照RNA提取试剂盒(德国QLAGEN公司)说明书操作,提取总RNA。

采用实时荧光定量PCR检测CYP1A1 mRNA的表达水平。

目的基因CYP1A1和内参基因 β -actin cDNA实时荧光定量PCR反应体系均为20 μL ,其中包括2 \times QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix 10 μL 、cDNA 1.5 μL 、上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL 、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL 和无酶水 7.5 μL 。阴性对照分别以1.5 μL 无酶水和1.5 μL RNA样品代替cDNA模板,阳性对照用测序确定的克隆质粒代替cDNA模板,每个样本测两个重复样。反应条件均为95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40个循环。根据美国国立生物技术信息中心(NCBI)发布的CYP1A1及人类 β -actin基因mRNA序列设计引物(见表1),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 数据分析与处理

采用SPSS20.0软件进行数据分析。计数资料组间比较采用 χ^2 检验。偏态分布的计量资料以M

表1 实时荧光定量PCR的CYP1A1和β-actin基因引物序列

项目	引物序列	引物位置	产物大小(bp)
CYP1A1			147
上游引物	5'-TGTCATCTGTGCCATTTGCT-3'	711	
下游引物	5'-TCAGGGAAGGTTGGGTAG-3'	857	
β-actin			144
上游引物	5'-CCTGGCACCCAGCAAT-3'	1 041	
下游引物	5'-CGGCCGGACTCGTCATAC-3'	1 184	

注:CYP为细胞色素P450

(Q)表示,原始资料经对数转变后服从正态分布,多组间的比较采用单因素方差分析。采用双侧检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 砷中毒患病情况调查结果

本研究中,按均衡可比的原则,选择了4个剂量组的233例研究对象。研究发现:与对照组相比,各剂量组人群砷中毒患病存在上升趋势,差异有统计学意义($\chi^2=16.97, P<0.05$);随着饮用水水砷浓度的升高砷中毒的病情也逐渐加重,二者呈线性相关关系($\chi^2=15.636, P<0.05$)。同时经线性趋势卡方检验发现,砷中毒的病情随着水砷浓度的升高逐渐加重($\chi^2=2.371, P<0.05$)(见表2)。

表2 各剂量组砷中毒患病情况汇总表

组别	n	正常	可疑病例数	砷中毒患病情况				
				n	患病率%	轻度病例数	中度病例数	重度病例数
对照组	55	47	1	7	12.73	7	0	0
低剂量组	47	32	3	12	25.53	10	2	0
中剂量组	45	30	1	14	31.11	13	1	0
高剂量组	86	42	5	38	44.19	25	7	7
合计	233	151	10	72	30.90	55	10	7

2.2 不同砷暴露水平CYP1A1mRNA表达情况

研究发现,与对照组人群血液CYP1A1mRNA表达水平相比,高剂量组人群血液CYP1A1mRNA表达水平与对照组比较明显升高($\chi^2=7.532, 2.802$;

$P<0.05$),但低、中剂量组人群血液CYP1A1mRNA表达水平与对照组比较,均无统计学差异($P>0.05$)(见表3)。

2.3 不同患病情况人群CYP1A1mRNA表达情况

表3 不同水砷剂量组人群血液CYP1A1mRNA表达水平M(Q)

暴露分组	n	CYP1A1mRNA
对照组	55	$9.99 \times 10^{-4} (1.49 \times 10^{-3})$
低剂量组	47	$1.1 \times 10^{-3} (1.92 \times 10^{-3})$
中剂量组	45	$1.26 \times 10^{-3} (1.15 \times 10^{-3})$
高剂量组	86	$1.58 \times 10^{-3} (1.93 \times 10^{-3})^*$

注:*与对照组相比,有统计学差异 $P<0.05$;

表4 不同砷中毒患病水平目的基因表达情况M(Q)

病情分组	n	CYP1A1mRNA
正常	151	$1.12 \times 10^{-3} (1.72 \times 10^{-3})$
可疑病例	10	$1.59 \times 10^{-3} (4.04 \times 10^{-3})$
轻度病例	55	$1.30 \times 10^{-3} (1.55 \times 10^{-3})$
中度病例	10	$2.02 \times 10^{-3} (3.77 \times 10^{-3})$
重度病例	7	$2.36 \times 10^{-3} (2.40 \times 10^{-3})$

研究发现,与正常人群比较,各组CYP1A1mRNA的表达水平没有变化($F=1.935, P>0.05$)。

3 讨论

CYP1A1在诱导肿瘤细胞凋亡,抑制细胞增生及促分化等方面均起到作用^[7]。动物实验和流行病学实验均表明,某种特定CYP高代谢表型或活性升高都会导致个体患肿瘤的概率升高^[8,9]。Jui-Pin Wu等人在研究砷参与了肺组织细胞的芳香烃受体和CYP1A1表达时发现,在高浓度的砷暴露可以引起CYP1A1mRNA的表达量升高^[10]。研究证明,长期慢性砷暴露会导致肿瘤及多种慢性病的发生风险增大^[11]。通过以上研究提示,CYP1A1 mRNA表达异常与慢性砷暴露引起疾病发生之间可能存在某种联系。在本研究中发现,长期慢性砷暴露会导致人群砷中毒的患病率升高,且随着饮用水水砷浓度的升高砷中毒的病情也逐渐加重,二者呈线性相关关系($P<0.05$)。进一步检测人群血液CYP1A1mRNA的表达水平,结果发现,随饮水水砷浓度的升高,人群血液中CYP1A1mRNA表达水平明显升高;这提示长期慢性高浓度砷暴露可能会影响人体血液中CYP1A1mRNA的表达。通过对砷中毒病情与基因表达之间关系的研究发现,随砷中毒的病情加重,CYP1A1mRNA在砷中毒的病情变化方面的影响较小。

综上所述,长期慢性砷暴露会导致细胞色素P4501A1的表达升高,这可能是影响地方性砷中毒患病的重要因素,但CYP1A1mRNA的表达与砷中毒病情严重程度无关。通过上述研究结果推测细胞色素P450家族可能是砷的雌激素样效应的相关因子,这也为研究砷的致病机制作用提供了新的思路。

参考文献

[1]古丽达娜·塔布斯别克,马瑶,白雪.砷染毒对家兔皮肤雌激素受体 α 、 β 和PI3K mRNA表达的影响及性别差异[J].环境与职业医学,2020(03):254-259

[2]夏雅娟,孟萌,张峰等.三氧化二砷雌激素样效应及对Hela细胞生长的影响[J].中国地方病学杂志,2009(1):24-27

[3]Hanna Piotrowska-Kempisty, Agnieszka Klupczyńska, Dorota Trzybulska, et al. Role of CYP1A1 in the Biological Activity of Methylated Resveratrol Analogue, 3,4,5,4'-tetramethoxy stilbene (DMU-212) in Ovarian Cancer A-2780 and Non-Cancerous HOSE Cells[J]. Toxicol Lett. 2017;267:59-66

[4]Debmalya Sengupta, Udayan Guha, Sagnik Mitra, et al. Meta-Analysis of Polymorphic Variants Conferring Genetic Risk to Cervical Cancer in Indian Women Supports CYP1A1 as an Important Associated Locus[J]. Asian Pac J Cancer Prev. 2018;19(8):2071-2081

[5]黄裕,陈文娟,舒锦等.CYP1A1和CYP1B1基因多态性与中国妇女I型子宫内膜癌的相关性[J].肿瘤防治研究,2018(01):15-18

[6]Shakila Sabir, Muhammad Sajid Hamid Akash, Fareeha Fayyaz, et al. Role of Cadmium and Arsenic as Endocrine Disruptors in the Metabolism of Carbohydrates: Inserting the Association Into Perspectives[J]. Biomed Pharmacother. 2019;114:108802

[7]Mengtian Zhang, Qin Wang, Ka-Wai Wan, et al. Liposome mediated- CYP1A1 Gene Silencing Nanomedicine Prepared Using Lipid Film-Coated Proliposomes as a Potential Treatment Strategy of Lung Cancer[J]. Int J Pharm. 2019;566:185-193

[8]Elfaki I, Mir R, Almutairi FM, Duhier FMA. Cytochrome P450: Polymorphisms and Roles in Cancer, Diabetes and Atherosclerosis[J]. Asian Pac J Cancer Prev. 2018;19(8):2057-2070

[9]Eugene G Hrycaj, Stelvio M Bandiera. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer[J]. Adv Pharmacol. 2015;74:35-84

[10]Jui-Pin Wu, Louis W. Chang, Hsien-Tsung Yao, et al. Involvement of Oxidative Stress and Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor in Elevation of CYP1A1 Expression and Activity in Lung Cells and Tissues by Arsenic: An In Vitro and In Vivo Study[J]. Toxicology, 2009; 107(2): 385-393

[11]张爱华,曾奇兵.新形势下地方性砷中毒科学防治的新机遇与挑战[J].中华地方病学杂志,2019;38(2): 87-90