

砷冶炼厂工人砷甲基化代谢与肝和皮肤损伤及 LncRNAs 表达的关系

成会荣, 秦明芳, 陈杨, 任思颖, 文卫华

摘要:

[目的] 探讨职业性砷接触工人砷甲基化代谢转化模式与肝和皮肤损伤、长链非编码 RNA(LncRNAs)表达的关系。

[方法] 2013年10月选择云南省文山州两个砷冶炼厂的112名工人作为接触组, 无砷接触经历的居民41人为对照组。对接触组进行健康监护体检, 检查肝和皮肤损伤情况并分为4组(无损伤组、肝损伤组、皮肤损伤组、肝和皮肤均损伤组); 用带有砷预处理系统的原子吸收分光光度计检测尿中无机砷、甲基砷酸和二甲基砷酸含量, 并计算一、二级甲基化指数; 用实时荧光定量PCR法检测外周血3种与恶性肿瘤发生关系相关的LncRNAs(MEG3、TUG1和HOTAIR)表达。

[结果] 职业性砷接触工人年龄(33.9 ± 16.8)岁, 工龄(16.6 ± 9.7)月, 其中无损伤组42人, 肝损伤组29人, 皮肤损伤组21人, 肝和皮肤均损伤组20人。各接触组尿中3种砷化合物浓度均高于对照组(均 $P < 0.05$), 一、二级甲基化指数低于对照组(均 $P < 0.05$); 肝损伤组一级甲基化指数和皮肤损伤组一、二级甲基化指数低于肝和皮肤均损伤组($P < 0.05$)。与对照组相比, 无损伤、皮肤损伤、肝和皮肤均损伤组外周血MEG3和HOTAIR表达升高, 无损伤、肝和皮肤均损伤组工人TUG1表达升高($P < 0.05$)。与肝和皮肤均损伤组比较, 无损伤和肝损伤组MEG3表达降低, 肝损伤组TUG1和HOTAIR表达降低($P < 0.05$)。

[结论] 职业性砷接触工人不同砷甲基化代谢模式与肝和皮肤损伤、外周血LncRNAs表达之间存在关联。

关键词: 砷; 甲基化; 长链非编码RNA; 肝损伤; 皮肤损伤

引用: 成会荣, 秦明芳, 陈杨, 等. 砷冶炼厂工人砷甲基化代谢与肝和皮肤损伤及 LncRNAs 表达的关系[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(11): 983-987. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.17264

Relationship of arsenic methylation metabolism with liver and skin damage and expressions of long non-coding RNAs in arsenic smeltery workers CHENG Hui-rong, QIN Ming-fang, CHEN Yang, REN Si-ying, WEN Wei-hua (Department of Chronic Non-Communicable Diseases Prevention and Treatment, Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Kunming, Yunnan 650022, China). Address correspondence to WEN Wei-hua, E-mail: dongsijiehua@sina.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To assess the relationship of arsenic methylation metabolism with liver and skin damage and expressions of long non-coding RNAs in arsenic smeltery workers.

[Methods] Workers exposed to arsenic ($n=112$) from two arsenic smelteries in Wenshan of Yunnan Province and control individuals without arsenic exposure ($n=41$) were selected in October 2013. After medical examinations, the arsenic exposed participants were divided into four groups (without damage, with liver damage, with skin damage, with both liver and skin damage). Inorganic arsenic (iAs), methylarsonic acid (MMA), and dimethylarsinic acid (DMA) in urine were determined using atomic absorption spectrophotometer with an arsenic speciation pretreatment system. Primary methylation index (PMI) and secondary methylation index (SMI) were calculated. Real-time fluorescence quantitative PCR was performed to detect the expressions of three long non-coding RNAs (MEG3, TUG1, and HOTAIR) in peripheral blood closely related to malignant tumor.

• 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 国家自然科学基金(编号: 81160343, 30860238)

[作者简介] 成会荣(1973—), 女, 硕士, 副主任医师; 研究方向: 慢性病防治; E-mail: huirong999@126.com

[通信作者] 文卫华, E-mail: dongsijiehua@sina.com

[作者单位] 云南省疾病预防控制中心慢性非传染病防制所, 云南 昆明 650022

[Results] The mean age of the arsenic exposed workers was (33.9 ± 16.8) years, and the mean length of service was (16.6 ± 9.7) months. There were 42 workers without damage, 29 with liver damage, 21 with skin damage, and 20 with both liver and skin damage. Compared to the control group, the concentrations of three arsenic species were all higher ($P < 0.05$), and PMI & SMI were lower ($P < 0.05$) in the workers exposed to arsenic. Compared to the workers with both liver and skin damage, PMI in the workers with liver damage as well as PMI and SMI in the workers with skin damage were lower ($P < 0.05$). Compared to the control group, the expressions of *MEG3* and *HOTAIR* in peripheral blood were higher in the workers without damage, with skin damage, and with both liver and skin damage, and the expressions of *TUG1* were higher in the workers without damage and with both liver and skin damage ($P < 0.05$). Compared to the workers with both liver and skin damage, the expressions of *MEG3* were lower in the workers without damage and with liver damage, and the expressions of *TUG1* and *HOTAIR* were lower in the workers with liver damage ($P < 0.05$).

[Conclusion] There is a correlation of arsenic methylation metabolism with liver and skin damage and expressions of long non-coding RNAs in arsenic exposed workers.

Keywords: arsenic; methylation; non-coding RNA; liver damage; skin damage

Citation: CHENG Hui-rong, QIN Ming-fang, CHEN Yang, et al. Relationship of arsenic methylation metabolism with liver and skin damage and expressions of long non-coding RNAs in arsenic smeltery workers[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(11): 983-987.

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.17264

砷对个体健康的危害差异巨大,这是其毒性机制研究难以取得突破的重要原因^[1]。近年来研究认为,机体内砷的甲基化代谢模式变化可能导致个体健康危害的差异巨大^[2]。肝和皮肤损伤是砷接触人群的主要健康危害^[2-3]。肝是毒物代谢主要器官,而二级甲基化指数低的长期砷接触人群,出现皮肤损伤和相关肿瘤几率较大,代谢中间产物甲基砷酸可能在其中具有重要作用^[2]。砷甲基化代谢转化可能对肝和皮肤损伤及长链非编码RNA(long non-coding RNAs, LncRNAs)表达变化具有重要影响。一些特殊代谢模式可能与恶性肿瘤发生存在重要关联^[2-5]。国际上通常采用甲基化指数评估砷代谢转化模式,一级甲基化指数代表无机砷转化为甲基砷酸的能力,二级甲基化指数代表甲基砷酸转化为二甲基砷酸的能力^[2, 3-5]。LncRNAs是一类长度大于200 nt的非编码RNA,在转录激活等过程中具有重要功能。已有研究表明,LncRNAs通过多个层面调节基因表达,参与多种生物学过程^[4]。本研究选择砷冶炼厂工人为研究对象,检测尿砷化合物、肝和皮肤损伤及外周血中3种与恶性肿瘤发生密切相关的LncRNAs表达的变化,探讨职业性砷接触工人不同砷甲基化代谢模式与肝、皮肤损伤和LncRNAs表达的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2013年10月选择云南文山州两个砷冶炼厂112名工人为接触人群,没有砷接触经历的41名居民为对照人群。研究对象入选标准为年龄18~60岁,身体相对健康,没有肿瘤等多种相关疾病(无可能影响机

体表观遗传学变化和肝对砷代谢转化的疾病),接触人群在砷冶炼厂工作累计3个月以上;对照人群居住地周围50 km没有可能导致机体砷负荷明显升高的污染源,没有较长时间、较大剂量的砷及其他有毒、有害物质接触史(不影响肝功能及其对砷的代谢转化),在当地居住1年以上。

1.2 研究方法

在取得知情同意后,采集外周血和空腹晨尿。使用统一调查表收集年龄、性别、文化程度、工种、工作时间、药物服用史、吸烟史、饮酒史、家族史及个人疾病史等资料。研究过程符合2013年修订的《赫尔辛基宣言》。

1.3 肝和皮肤损伤诊断

3位肝病专家和3位皮肤科专家联合诊断。肝损伤检测项目包括B超、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、直接胆红素、间接胆红素等,诊断要求至少2项以上异常;皮肤损伤要求出现明显的皮肤角化过度,尤其在掌跖部位出现疣状过度角化,躯干部及四肢出现弥漫的黑色或棕褐色的色素沉着和色素脱失斑。

根据肝和皮肤的损伤情况,将接触人群分为无损伤组、肝损伤组、皮肤损伤组、肝和皮肤均损伤组。

1.4 实验方法

1.4.1 测定砷的甲基化代谢指标 取解冻后尿样1 mL, 95℃、2 mol/L氢氧化钠(和光纯药工业株式会社,日本)热消解3 h,热消解振荡2次/1 h。热消解后,将样品稀释至10 mL,上样至带有砷化物预处理装置(ASA-2SP,岛津公司,日本)的原子吸收分光光度计(AA-6103,岛津公司,日本),测定样品中3种砷化合

物:无机砷、甲基砷酸、二甲基砷酸。砷化合物检出限为1 ng,变异系数<5%。标准物为无机砷国家标准物(1000 mg/L,国家标准物质中心,中国)及甲基砷酸、二甲基砷酸混合标准物(1000 mg/L,和光纯药工业株式会社,日本)。同时测定尿中肌酐水平,以肌酐水平对各砷化合物进行标化,单位为 $\mu\text{g/g}$ (以肌酐计,后同)。用甲基砷酸/无机砷表示一级甲基化指数,二甲基砷酸/甲基砷酸表示二级甲基化指数。

1.4.2 总RNA提取 取研究对象外周血,在无菌塑料离心管中加入2 mL淋巴细胞分离液,在装有2 mL血样的真空管中加入2 mL PBS(体积比为1:1)混匀。用5 mL的小注射器吸取分离液层中的淋巴细胞。用Trizol试剂提取外周血淋巴细胞总RNA,异丙醇沉淀法浓缩RNA,检查提取RNA的质量及浓度。

1.4.3 实时荧光定量PCR法检测3种LncRNAs相对表达 用TaqMan Real-Time PCR Master Mixes(Invitrogen,美国)检测LncRNAs相对表达水平。反应条件:95℃ 5 min,95℃ 10 s,60℃ 30 s,共40循环。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算RNA相对表达水平。引物由上海生工生物工程有限公司设计合成,MEG3上游序列:5'-GGAGCTGTTGAGCCTTCAGT-3',下游序列:5'-ATTGAGAGCACAGTGGGGTG-3';TUG1上游序列:5'-TAGCAGTTCCTCCCAATCCTTG-3',下游序列:5'-CACAAATTCCTCATTCCTCC-3';HOTAIR上游序列:5'-CAGTGGGGAAGTCTGACTCG-3',下游序列:5'-GTGCCTGGTGCTCTCTTACC-3'。

1.5 统计学分析

数据录入和统计分析均采用SPSS 19.0软件。研究对象尿中3种砷化合物含量呈偏态分布,将其进行对数转换后,经检验符合正态分布。3种LncRNAs相对表达量符合正态分布。采用单因素方差分析比较对照组和各砷接触组间的差异。用Student's *t*检验分析3种砷化合物及相应的指数和LncRNAs表达水平在对照组和各砷接触组间的差异。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

职业性砷接触工人112名,主要在砷冶炼厂从事反射炉操作、鼓风炉操作、回转窑操作、成品包装及化验等工作,绝大多数工种和工作岗位不固定,工人工作环境中砷污染水平没有明显差异。既往环境检测显示,车间砷污染水平超过职业接触限值2倍以上^[2]。砷接触工人年龄为(33.9 ± 16.8)岁;男性77名(68.8%),女性35名(31.2%);工龄为(16.6 ± 9.7)月;文化程度:受教育年限5年以下23人(20.5%),5~10年68人(60.7%),10年以上21人(18.8%);71人吸烟(63.4%);83人饮酒(74.1%)。对照组居民41名,年龄为(31.8 ± 17.1)岁;男性25名(61.0%),女性16人(39.0%);文化程度:受教育年限5年以下9人(22.0%),5~10年21人(51.2%),10年以上11人(26.8%);22人吸烟(53.7%);29人饮酒(70.7%)。两组人群在年龄、性别、文化程度、吸烟史、饮酒史、家族史和个人疾病史等方面的差异均无统计学意义。所有研究对象在职业健康监护中未发现肿瘤等多种相关疾病及其他疾病。

2.2 肝和皮肤检查结果

职业性砷接触工人中无损伤的工人42人,肝损伤的工人29人,皮肤损伤的工人21人,肝和皮肤均损伤的工人20人。

2.3 砷的甲基化代谢指标

研究对象尿中3种砷化合物及甲基化指数结果见表1。单因素方差分析显示,砷相关指标在接触组和对照组的检验统计量分别为无机砷: $F=47.46$, $P=0.00$;甲基砷酸: $F=42.36$, $P=0.00$;二甲基砷酸: $F=43.69$, $P=0.00$;一级甲基化指数: $F=6.22$, $P=0.00$;二级甲基化指数: $F=13.36$, $P=0.00$ 。各接触组尿中3种砷浓度均高于对照组(均 $P<0.05$),一、二级甲基化指数则低于对照组(均 $P<0.05$);肝损伤组一级甲基化指数和皮肤损伤组一、二级甲基化指数低于肝和皮肤均损伤组工人(均 $P<0.05$)。

表1 砷冶炼厂工人尿中3种砷化合物浓度及砷甲基化指数

组别	无机砷($\mu\text{g/g}$)	甲基砷酸($\mu\text{g/g}$)	二甲基砷酸($\mu\text{g/g}$)	一级甲基化指数	二级甲基化指数
对照组	1.91 ± 1.55	0.99 ± 0.76	12.19 ± 7.62	16.34 ± 9.64	12.26 ± 9.04
无损伤组	$116.25 \pm 110.29^*$	$121.72 \pm 109.22^*$	$513.56 \pm 377.51^*$	$6.87 \pm 4.93^*$	$3.86 \pm 1.64^{*\Delta}$
肝损伤组	$125.35 \pm 109.76^*$	$127.31 \pm 119.71^*$	$461.17 \pm 350.31^*$	$5.03 \pm 3.10^{*\Delta}$	$3.89 \pm 3.13^*$
皮肤损伤组	$127.53 \pm 112.54^*$	$142.61 \pm 125.65^*$	$601.65 \pm 480.41^*$	$6.05 \pm 3.15^{*\Delta}$	$3.43 \pm 1.18^{*\Delta}$
肝和皮肤均损伤组	$91.49 \pm 82.73^*$	$114.43 \pm 102.33^*$	$548.13 \pm 390.47^*$	$8.86 \pm 5.00^*$	$4.67 \pm 1.89^*$

[注]*:与对照组相比, $P<0.05$; Δ :与肝和皮肤均损伤组相比, $P<0.05$;#:以肌酐计。

2.4 外周血 LncRNAs 相对表达量

研究对象外周血 LncRNAs 相对表达量见表 2。单因素方差分析显示, 3 种 LncRNAs 在接触组和对照组的检验统计量分别为 *MEG3*: $F=6.53$, $P=0.00$; *TUG1*: $F=3.36$, $P=0.01$; *HOTAIR*: $F=6.38$, $P=0.00$ 。各组间外周血 LncRNAs 相对表达量的差异均具有统计学意义($P<0.05$)。除肝损伤组外, 各接触组外周血 *MEG3* 和 *HOTAIR* 均高于对照组, 无损伤组、肝和皮肤均损伤组的 *TUG1* 高于对照组。与肝和皮肤均损伤组比较, 无损伤和肝损伤组 *MEG3* 表达降低; 肝损伤组 *TUG1* 和 *HOTAIR* 表达降低(均 $P<0.05$)。

表 2 砷冶炼厂工人外周血 LncRNAs 相对表达量
($\bar{x} \pm s$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$)

组别	<i>MEG3</i>	<i>TUG1</i>	<i>HOTAIR</i>
对照组	2.76 ± 1.51	4.32 ± 2.37	3.96 ± 2.87
无损伤组	6.48 ± 4.40* [△]	5.45 ± 1.85*	7.19 ± 3.86*
肝损伤组	4.67 ± 4.26 [△]	4.81 ± 1.46 [△]	4.84 ± 3.59 [△]
皮肤损伤组	7.31 ± 3.74*	4.52 ± 2.36	7.56 ± 4.87*
肝和皮肤均损伤组	8.66 ± 3.01*	6.02 ± 1.46*	7.21 ± 3.25*

[注]*: 与对照组相比, $P<0.05$; [△]: 与肝和皮肤均损伤组相比, $P<0.05$ 。

3 讨论

甲基化代谢转化是无机砷在机体的主要代谢过程, 因机体内相关代谢酶存在饱和问题, 高水平接触将导致砷代谢模式发生较大变化, 主要表现为一、二级甲基化指数明显下降, 代谢中间产物甲基砷酸含量增加^[2, 3, 5]。暴露于相同砷污染水平的环境中, 如果二级甲基化指数下降较多, 机体内代谢中间产物甲基砷酸含量相对增高, 此代谢模式下人群皮肤损伤和恶性肿瘤发生危险度高^[2]。但促进砷化合物甲基化代谢转化, 减少甲基砷酸含量是否可以明显降低肿瘤等相关疾病的发生风险尚未见报道。甲基砷酸在砷遗传毒性和致癌过程中具有重要作用, 但仍有大量其他致病因素的作用难以评估, 需深入研究^[2, 6]。本研究显示, 职业性砷接触人群机体内各种砷化合物含量较高, 机体不断进行砷甲基化代谢转化, 一、二级甲基化指数明显下降。但不同个体代谢模式差异巨大, 且与肝和皮肤损伤与肿瘤发生密切相关的 LncRNAs 表达存在重要关联。二级甲基化指数低是皮肤损伤组的主要表现, 与以前研究一致^[2, 6]。肝损伤组一、二级甲基化指数均较低, 机体不能及时将无机砷转化为甲基砷酸及二甲基砷酸。过去研究认为二级甲基化指数低, 可能导致机体排出甲基砷酸等代谢中间产物的速

度降低, 导致恶性肿瘤发生风险增加^[2, 6]。但本研究发现, 属于此代谢模式的肝损伤组的相关 LncRNAs 表达明显低于肝和皮肤均损伤组。肝和皮肤均损伤组一、二级甲基化指数相对较高, 机体内甲基砷酸含量稍低于其余接触组。相关 LncRNAs 表达上升难以用一、二级甲基化指数升高来解释, 可能来源于砷甲基化代谢过程中产生的其他危害因素。

甲基砷酸在砷致皮肤损伤中具有重要作用^[2]。但 Wei 等^[6]研究发现, 同时存在高血压和皮肤损伤的人群, 二甲基砷酸和二级甲基化指数较高, 机体内甲基砷酸较低, 与本研究肝和皮肤均损伤组代谢模式类似。此人群机体内甲基砷酸含量相对较低, 砷甲基化代谢过程的其他致病因素可能具有重要作用。持续进行高水平砷甲基化代谢转化可能对肝和皮肤同时损伤具有重要影响。

本研究选择的 LncRNAs 与恶性肿瘤发生密切相关。在结直肠癌中 *MEG3* 过表达可抑制细胞的侵袭、迁移能力^[7], *TUG1* 已证实与癌症发生存在重要关联^[8], *HOTAIR* 在非小细胞肺癌中异常高表达^[9]。本研究通过间接分析, 发现 LncRNAs 表达与砷甲基化代谢转化存在重要关联, 除甲基砷酸外的一些致病因素在其中可能发挥重要作用。

参考文献

- [1] Zhang SX, Han JQ, Zhong DX, et al. Genome-wide identification and predictive modeling of LncRNAs polyadenylation in cancer genome[J]. Comp Bio Chem, 2014, 52: 1-8.
- [2] Wen JH, Wen WH, Li L, et al. Methylation capacity of arsenic and skin lesions in smelter plant workers[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2012, 34(2): 624-630.
- [3] Abdul KS, Jayasinghe SS, Chandana EP, et al. Arsenic and human health effects: A review[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2015, 40(3): 828-846.
- [4] 陈宇宁, 熊兴东. 长链非编码 RNA 与表观遗传调控[J]. 生物化学与生物物理进展, 2014, 41(8): 723-730.
- [5] Wen WH, Lu L, He YF, et al. LincRNAs and base modifications of p53 induced by arsenic methylation in workers[J]. Chem Biolog Interact, 2016, 246: 1-10.
- [6] Wei BG, Yu JP, Wang J, et al. The relationships between arsenic methylation and both skin lesions and hypertension caused by chronic exposure to arsenic in drinking water[J].

Environ Toxicol Pharmacol, 2017, 53: 89-94.

[J]. Nat Commun, 2016, 7: 13616.

[7] 朱栋良, 尹小平, 王芳元. 长链非编码RNA 母系表达基因3 对结直肠癌细胞侵袭和迁移能力的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(2): 296-300.

[9] 林梦洁, 陈志强, 尹凌帝, 等. 长链非编码RNA HOTAIR 对非小细胞肺癌迁移和侵袭能力的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2014, 19(8): 684-689.

[8] Katsushima K, Natsume A, Ohka F, et al. Targeting the Notch-regulated non-coding RNA TUG1 for glioma treatment

(收稿日期: 2017-03-31; 录用日期: 2017-09-30)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 陈皎; 校对: 汪源)

【告知栏】

《环境与职业医学》杂志唯一投稿方式系登录主页 <http://jeom.scdc.sh.cn:8081>

近来, 本刊陆续收到作者反映, 有多家网站冒用本刊名义收稿并收取高额审稿费。对此, 本刊郑重声明如下: (1) 我们从未委托任何机构或个人征文, 本刊唯一投稿方式是通过登录《环境与职业医学》主页 <http://jeom.scdc.sh.cn:8081>。(2) 本刊从2016年开始免收审稿费, 稿件录用后方收取版面费。望广大作者特别小心, 谨防受骗!

假冒网站

<http://www.china-k.net/qikan/yiyaoweisheng/yufangyixue/20151119/2148.html>
<http://www.cneu.org.cn/qikan/show14408.html>
<http://www.hjzyyx.cn/>
<http://hjzyyx.yixue.org.cn/>
<http://www.baywatch.cn/a/qikandaohang/yixueqikan/20111128/1094.html>
<http://www.zhazhi.com/qikan/yyws/yfws/1535.html>
<http://www.zgqkzxw.com/journaldetail.php?aId=359>
<http://hexin.xuebaoqk.com/yixue/1149.html>
<http://www.beautywall.net/yixue/yufangweisheng/872.html>
<http://www.qkw360.com/detail-256.html?hmsr=360so&hmmd=ppc&hmkw=%E7%8E%AF%E5%A2%83%E4%B8%8E%E8%81%8C%E4%B8%9A%E5%8C%BB%E5%AD%A6%E6%8A%95%E7%A8%BF>
<http://hzyx.qikan.com/>
<http://www.7kan.org.cn/shougaoyaoqiu/2010-11-25/927.html>
<http://www.js120.net/html/qkxy/201011/11/50680.html>

假冒邮箱

qikanc@163.com; chinacneu@163.com; hjzyyx@163.com; 2355902950@qq.com; 2853759168@qq.com; zg58qk@163.com; wanyuanqikan@163.com