

广西某金属冶炼厂工人镉暴露与认知相关基因甲基化的关联

刘秋梅¹, 喻国旗¹, 张志勇^{1, 2a}, 农春涛¹, 蔡建升^{1, 2b}, 徐敏¹, 张君玲¹, 许霞¹, 刘淑珍¹, 韦春梅¹, 覃健¹

1. 广西医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 广西 南宁 530021

2. 桂林医学院 a. 公共卫生学院环境卫生与职业医学教研室 b. 广西肿瘤免疫与微环境调控重点实验室, 广西 桂林 541199

摘要：

[背景] 多项研究表明镉暴露与认知功能受损相关，但是关于职业镉暴露与多个认知相关基因甲基化水平的关联性研究有限。

[目的] 观察工人重金属镉职业暴露后机体认知相关的 *klotho* (*KL*)、脑源性神经营养因子 (*BDNF*)、淀粉样蛋白前体 (*APP*) 基因的甲基化水平变化，探讨镉与 3 个基因甲基化的关联。

[方法] 选择广西某金属冶炼厂参与 2017 年职业体检的职业工人作为研究对象，完成问卷调查及血样、尿样的采集。采用原子吸收光谱法测定尿镉 (Ucd) 浓度，并经尿肌酐调整校正。根据调整后的 Ucd ($<P_{25}$, $P_{25} \sim P_{75}$, $>P_{75}$) 将研究对象分为低、中、高暴露组，将各暴露组工人按年龄、性别进行分层，采用频数匹配法从各暴露组随机抽取 150 例样本，应用多重 PCR 结合的 MethylTarget 技术检测 *APP*、*BDNF*、*KL* 基因甲基化水平。通过方差分析和 Mann-Whitney *U* 检验探索各组之间三个基因甲基化水平和 CpG 位点的差异，限制性立方样条分析用于探索 Ucd 水平与基因甲基化率之间的暴露-效应关系。

[结果] 共纳入了 450 名研究对象，其中男性 377 名 (83.78%)，年龄为 (38.88±6.87) 岁，Ucd 水平为 2.73 (1.04, 5.75) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。*APP*、*BDNF*、*KL* 基因平均甲基化率分别为 (1.52±0.34)%、(4.55±1.08)%、(2.34±0.39)%。*APP* 基因 04 片段、*KL* 基因及其 02 片段的甲基化率在各暴露组间存在差异 ($P<0.05$)；中暴露组 *APP* 基因 04 片段甲基化率低于低暴露组 ($P<0.05$)，而中、高暴露组的 *KL* 基因及其 02 片段平均甲基化率均低于低暴露组 ($P<0.05$)。限制性立方样条分析的结果显示，Ucd 水平 (lg 转换) 与 *KL* 基因甲基化率呈线性负相关关系 ($P=0.035$)，即随着 Ucd 水平升高，*KL* 基因甲基化率降低。

[结论] 镉暴露可能与 *KL*、*APP* 基因低甲基化率有关，*KL* 基因甲基化水平与尿镉水平呈负相关。

关键词： 镉暴露；DNA 甲基化；认知功能；金属冶炼工人；限制性立方样条

Associations between cadmium exposure and cognition-related gene methylation of workers in a Guangxi metal smelter

LIU Qiumei¹, YU Guoqi¹, ZHANG Zhiyong^{1, 2a}, NONG Chuntao¹, CAI Jiansheng^{1, 2b}, XU Min¹, ZHANG Junling¹, XU Xia¹, LIU Shuzhen¹, WEI Chunmei¹, QIN Jian¹ (1. Department of Environmental Health, School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2.a. Department of Environmental Health and Occupational Medicine, School of Public Health b. Guangxi Key Laboratory of Tumor Immunology and Microenvironmental Regulation, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541199, China)

Abstract:

[Background] Several studies have shown that cadmium exposure is related to impaired cognitive function, but there are limited studies on the association between occupational cadmium exposure and the methylation levels of cognition-related genes.

[Objective] This study aims to determine the methylation levels of cognition-related genes *klotho* (*KL*), brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*), and amyloid protein precursor (*APP*) of workers after exposure to heavy metal cadmium, and explore the relationships between cadmium exposure and the methylation of the three genes.

[Methods] The workers of a metal smelter in Guangxi who participated in 2017 an occupational

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21200

组稿专家

施小明 (中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所), E-mail: shixm@chinacdc.cn

基金项目

国家自然科学基金项目 (81660528)

作者简介

刘秋梅 (1990—), 女, 硕士生, 医师; E-mail: liuqm@163.com

通信作者

覃健, E-mail: qinjian@gxmu.edu.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-05-08

录用日期 2021-08-10

文章编号 2095-9982(2021)10-1077-06

中图分类号 R135

文献标志码 A

► 引用

刘秋梅, 喻国旗, 张志勇, 等. 广西某金属冶炼厂工人镉暴露与认知相关基因甲基化的关联 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38 (10): 1077-1082.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21200

Funding

This study was funded.

Correspondence to

QIN Jian, E-mail: qinjian@gxmu.edu.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-05-08

Accepted 2021-08-10

► To cite

LIU Qiumei, YU Guoqi, ZHANG Zhiyong, et al. Associations between cadmium exposure and cognition-related gene methylation of workers in a Guangxi metal smelter [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(10): 1077-1082.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21200

physical examination were selected as study subjects and were asked to complete a questionnaire and donate blood and urine samples. The concentration of urinary cadmium (UCd) was determined by atomic absorption spectrometry, and adjusted by urinary creatinine. According to the distribution of the adjusted UCd ($<P_{25}$, $P_{25}-P_{75}$, $>P_{75}$), the study subjects were divided into low, medium, and high exposure groups. Workers in each exposure group were stratified according to age and gender, and 150 samples were randomly selected from each exposure group by frequency matching method. Multiplex PCR combined with MethylTarget technology was employed to detect the methylation rates of *APP*, *BDNF*, and *KL* genes. Analysis of variance and Mann-Whitney *U* test were used to test the differences in the methylation levels and CpG sites of the three genes among the three groups. Restricted cubic spline (RCS) analysis was used to evaluate the exposure-effect relationship between urinary cadmium levels and gene methylation rates.

[Results] A total of 450 workers were included in final analysis, of which 377 (83.78%) were male, with a mean age of (38.88±6.87) years, and an average UCd level of 2.73 (1.04, 5.75) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. The average methylation rates of *APP*, *BDNF*, and *KL* genes were (1.52±0.34)%, (4.55±1.08)%, and (2.34±0.39)%, respectively. The methylation rates of *APP* gene 04 segment, *KL* gene, and *KL* gene 02 segment were different among the three exposure groups ($P<0.05$). The methylation rate of *APP* gene 04 segment in the medium exposure group was lower than that in the low exposure group ($P<0.05$); the methylation rates of *KL* gene and its 02 segment in the medium and high exposure groups were lower than those in the low exposure group ($P<0.05$). The restricted cubic spline analysis results showed that UCd level (after lg conversion) was negatively and linearly correlated with *KL* gene methylation rate ($P=0.035$), namely *KL* gene methylation rate decreased with elevated UCd level.

[Conclusion] Cadmium exposure may be related to lower methylation rates of *KL* and *APP* genes, and UCd level is negatively correlated with the methylation rate of *KL* gene.

Keywords: cadmium exposure; DNA methylation; cognitive function; metal smelter worker; restricted cubic spline

镉是在蓄电池、电镀、电器制造等生产领域中广泛使用的有毒金属,可诱发神经毒性^[1]。Hart等^[2]率先发现职业镉暴露可导致工人认知功能的损伤。人群研究表明,高浓度镉暴露与老年人^[3]及儿童^[4]的认知功能呈负相关。镉暴露还可增加职业工人阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)的发病风险^[5]。动物实验也提示,镉的持续暴露会损害C57BL/6雄性小鼠的认知及嗅觉记忆^[6]。然而在最近的一项研究中,使用来自AD患者和无痴呆的老年对照的死后脑样本,AD病例的额叶皮层中的镉浓度低于对照^[7],Przybyla等^[8]也未发现镉暴露与认知功能有关联。故关于镉暴露与认知功能的关联性,不同研究结果存在异质性,仍需开展更多的研究。

金属暴露对健康的作用可能与表观遗传改变有关,而DNA甲基化可能在其中发挥重要作用。既往研究发现*KL* (klotho)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, *BDNF*)、淀粉样蛋白前体(amyloid protein precursor, *APP*)基因是神经功能发育、修复、退行性变等过程的重要调节基因。*KL*基因是重要的抗衰老基因^[9],其过表达可有效改善小鼠的认知缺陷和AD样病理改变^[10],而*KL*基因敲除小鼠则会出现记忆功能障碍、海马神经退行性变等^[11]。*BDNF*是一种认知相关蛋白,对神经元的生长、发育和维持起保护作用。Meta分析结果显示AD病人的*BDNF*水平低于健康人群^[12]。*APP*衍生的C端片段(*APP-CTF*)的积累会触发过量线粒体形态的改变,缺陷的线粒体

在AD的发病机制起重要作用^[13]。大量研究表明,基因甲基化在重金属暴露致躯体功能损害过程中的作用不容忽视。本研究拟通过对广西某冶炼厂职工展开流行病学研究,探索不同镉暴露水平与认知相关基因甲基化之间的关联性,为重金属职业暴露者的健康防护提供科学依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

所有研究对象均来自广西某金属冶炼厂工人,参与2017年职业体检,并完成一般情况问卷调查及血样、尿样的采集。体检资料纳入标准:(1)工龄 ≥ 3 月的18~60岁职工;(2)无其他职业危害因素接触史,如苯、一氧化碳等;(3)身体系统无明显疾病;(4)所有研究对象均愿意参加本项目并知情同意。排除标准为:(1)问卷资料不全;(2)确诊神经官能症患者;(3)尿铅(urinary lead, UPb)浓度超标(前期抽检发现镉和铅为该厂工人主要重金属暴露)。共有1010名工人的资料符合标准,对他们进行尿镉(urinary cadmium, UCd)、UPb、尿肌酐测定,并根据尿肌酐校正后的UCd水平($<P_{25}$, $P_{25}-P_{75}$, $>P_{75}$)将1010名工人分为低、中、高暴露组,各暴露组工人按年龄、性别进行分层,采用频数匹配法从各暴露组随机抽取各150例样本进行甲基化水平测定,最终纳入分析的共有450例研究对象。

本次研究获得广西医科大学伦理委员会的批准

(批准号：20160302-11)，所有参与研究的职工均在受检之前签署了知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 调查内容 由经过培训的调查员采用统一设计的调查问卷对受访对象进行面对面调查，收集包括基本人口学特征、生活行为习惯（饮酒、吸烟）、工龄、职业暴露史等资料。过去 30 d 中，至少饮过半瓶啤酒/2.5 两葡萄酒或果酒/0.8 两白酒（1 两等于 50 g）视为饮酒；每天吸烟 1 支及以上，连续或累积 ≥ 6 个月视为吸烟。

1.2.2 血液、尿液样本采集 抽取研究对象空腹静脉血 15 mL，用于血生化检测及 DNA 提取等。剩余样本置于 -80℃ 低温冰箱冻存，以备后续检测。留取受检者中段尿样约 20 mL，于 4℃ 保存，待后续测定。

1.2.3 UCd、UPb、尿肌酐水平检测 研究对象 UCd、UPb 水平的检测采用石墨炉原子吸收光谱法（岛津 AA-6300C，日本），具体操作方法参照文献^[14]。低于检出限水平的值以检出限/√2 代替。尿肌酐水平的测定采用 96 微孔板肌氨酸氧化酶法（南京建成，中国）。最终纳入分析的 UCd、UPb 水平均为经尿肌酐调整后的水平。

1.2.4 KL、BDNF、APP 基因甲基化水平检测 对 450 例抽样人群进行外周血基因组 DNA 的提取；随后利用 MethylTarget 技术，结合多重 PCR 进行测序，检测 KL、BDNF、APP 基因各 CpG 位点的甲基化水平。利用软件（<http://primer3.ut.ee/>）进行引物设计、序列比对及 CpG 岛分析等。相关引物详见表 1。

测定时，每间隔 15 个样本测定一次镉、铅标准品浓度进行质控，并将平行样的变异度控制在 5% 以内；加标回收率控制在 80%~120%。此外，尿肌酐测定设置 5 次平行样检测，相对标准偏差控制在 5% 以内。

1.4 统计学分析

所有分析均在 SPSS 23.0、R 4.0.2 中完成。将 UCd 水平进行常用对数 (lg) 转换纳入样条分析。计数资料用率表示，组间比较采用卡方检验；正态分布计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间差异采用单因素方差分析，事后两两比较采用 LSD；不服从正态性的计量资料以 $M (P_{25}, P_{75})$ 表示，组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。限制性立方样条分析用于探索 UCd 与基因甲基化水平的暴露-效应关系。通过 Mann-Whitney U 检验分析各暴露组两组之间特定基因 CpG 位点甲基化水平的差异。双侧检验，检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 研究对象的基本情况

本研究最终纳入 450 名研究对象，包含 377 名男性 (83.78%) 和 73 名女性 (16.22%)，年龄为 (38.88 ± 6.87) 岁，尿镉水平的 $M (P_{25}, P_{75})$ 为 2.73 (1.04, 5.75) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (经尿肌酐校正，后同)，UCd 水平在低、中、高暴露组间差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。研究对象多数为已婚或再婚 (90.89%)，初中及以下文化程度占半数以上 (62.00%)，婚姻状况及文化程度存在组间差异 ($P < 0.05$)。性别、年龄、民族、饮酒、吸烟情况、工龄及体重指数 (body mass index, BMI) 在各暴露组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.2 不同镉暴露组间 APP、BDNF、KL 基因甲基化率的比较

APP、BDNF、KL 三个基因平均甲基化率分别为 (1.52 ± 0.34) %、(4.55 ± 1.08) %、(2.34 ± 0.39) %。APP 基因 04 片段、KL 基因及其 02 片段的甲基化率在各暴露组间存在差异 ($P < 0.05$)。APP 基因 04 片段在低、中暴露组间比较有差异，中暴露组甲基化水平较低 ($P < 0.05$)；而 KL 基因及其 02 片段平均甲基化率在低暴露组分别与中、高暴露组之间比较均有差异 ($P < 0.05$)，中、高暴露组甲基化率低于低暴露组。见表 3。

2.3 UCd 水平与 KL 基因甲基化率的暴露-效应关系

组间比较显示 KL 基因低-中、低-高暴露组比较均有差异，限制性立方样条分析 UCd 水平 (常用对数 lg 转换) 与 KL 基因甲基化水平的暴露-效应关系，结

表 1 目的基因甲基化特异性引物序列

Table 1 Specific primer sequences of target gene methylation

基因片段 Gene segment	正向引物 (5'→3') Forward	反向引物 (5'→3') Reverse
APP_03	GGAAGGYGGGGTGGTTAT	CTTCCTACTCCAACCTCTTTTC
APP_04	GGGGTTTAGAGTTAGGYGAGTTAGTT	CAAACCTCTCCCTCCCACTATTC
BDNF_05	GTTTTATAGTAGYGGTGGGTGTTTTATT	TTTAACCAATCRAAACTCAACCRAA
BDNF_06	GGTAGAGGTAGGAGATTTTTATGTTAG	CTAAAATATCTATTTCAAACAACRA AAATATCA
BDNF_07	GGTTGGATAGAGTTAATAATAGTTGGA	CTTCTATCTCACCCRCCAAACC
BDNF_08	GGTTGAGTTGAATGAAGTTATGATTG	CCACCCAACCTAACTCC
KL_01	GGGATTGTTTTYTTTTGGTATTG	AAACCRCTCAAAACTACTCTCAAAA
KL_02	TTTTTGGTTTTTGGGAGGTTTT	CCCTAACCRACCCTCTCAAAA

1.3 质量控制

所有调查员经过统一培训，严格按照调查标准进行。生物样本采集后迅速放入 4℃ 冷藏箱内。使用 EpiData 软件进行数据的双人双录入。UCd、UPb 水平

表2 各暴露组研究对象的基本情况 [例数 (构成比 %)]

Table 2 Characteristics of study subjects with different levels of cadmium exposure [n (proportion %)]

变量 Variable	总人群 (n=450) Total	低暴露组 (n=150) Low exposure group	中暴露组 (n=150) Medium exposure group	高暴露组 (n=150) High exposure group	P
性别 (Gender)					0.186
男 (Male)	377 (83.78)	128 (85.33)	130 (86.67)	119 (79.33)	
女 (Female)	73 (16.22)	22 (14.67)	20 (13.33)	31 (20.67)	
年龄 / 岁 (Age/years) ($\bar{x}\pm s$)	38.88±6.87	38.76±6.59	38.88±7.20	39.01±6.83	0.953
民族 (Ethnic group)					0.586
壮族 (Zhuang)	281 (62.44)	91 (60.67)	93 (62.00)	97 (64.67)	
汉族 (Han)	133 (29.56)	43 (28.67)	48 (32.00)	42 (28.00)	
其他 (Others)	36 (8.00)	16 (10.67)	9 (6.00)	11 (7.33)	
婚姻状况 (Marital status)					0.036
已婚或再婚 (Married or remarried)	409 (90.89)	129 (86.00)	141 (94.00)	139 (92.67)	
未婚, 离异或丧偶 (Single, divorced, or widowed)	41 (9.11)	21 (14.00)	9 (6.00)	11 (7.33)	
文化程度 (Educational level)					0.042
中专及高中以上 (Technical secondary school, high school, and above)	171 (38.00)	61 (40.67)	65 (43.33)	45 (30.00)	
初中及以下 (Middle school and below)	279 (62.00)	89 (59.33)	85 (56.67)	105 (70.00)	
饮酒 (Drinking)					0.064
从不饮酒 (Never)	193 (42.89)	58 (38.67)	63 (42.00)	72 (48.00)	
曾经饮酒 (Former)	19 (4.22)	2 (1.33)	8 (5.33)	9 (6.00)	
现在饮酒 (Current)	238 (52.89)	90 (60.00)	79 (52.67)	69 (46.00)	
吸烟 (Smoking)					0.523
从不吸烟 (Never)	195 (43.33)	70 (46.67)	58 (38.67)	67 (44.67)	
曾经吸烟 (Former)	31 (6.89)	12 (8.00)	9 (6.00)	10 (6.67)	
现在吸烟 (Current)	224 (49.78)	68 (45.33)	83 (55.33)	73 (48.67)	
工龄 / 年 (Working age/years) [M (P ₂₅ , P ₇₅)]	6.00 (3.00, 10.00)	5.00 (3.00, 10.00)	7.00 (3.00, 11.00)	7.00 (4.00, 11.00)	0.051
BMI / (kg·m ⁻²) ($\bar{x}\pm s$)	23.48±3.09	23.66±3.12	23.38±3.22	23.40±2.95	0.689
尿镉浓度 / (μg·g ⁻¹) [Urinary cadmium level / (μg·g ⁻¹)] [M (P ₂₅ , P ₇₅)]	2.73 (1.04, 5.75)	0.67 (0.36, 1.04)	2.73 (2.52, 2.94)	6.73 (5.75, 9.24)	<0.001
尿铅浓度 / (μg·g ⁻¹) [Urinary lead level / (μg·g ⁻¹)] [M (P ₂₅ , P ₇₅)]	10.20 (3.82, 27.55)	9.42 (3.62, 28.77)	8.54 (3.67, 24.15)	12.21 (4.60, 28.83)	0.311

[注] 正态分布资料采用方差分析, 非正态分布资料用 Kruskal-Wallis 检验; 分类变量采用卡方检验进行分析。

[Note] Normal data are tested by variance analysis, non-normal data are tested by Kruskal-Wallis test. Categorical variables are tested by chi-square test.

果显示, 调整婚姻状况、文化程度后, UCd 水平与 KL 基因甲基化水平呈负相关 ($P=0.035$), 并且存在线性暴露-效应关系 (图 1), 随着 UCd 水平升高, KL 基因甲基化水平降低。

表3 不同暴露组间各目的基因甲基化率比较

Table 3 Comparison of gene methylation rates between different exposure groups

基因 Gene	总人群 Total	低暴露组 Low exposure group	中暴露组 Medium exposure group	高暴露组 High exposure group	单位 (Unit) : %	
					F	P
APP	1.52±0.34	1.56±0.35	1.50±0.35	1.49±0.33	2.165	0.116
APP_03	1.60±0.46	1.63±0.50	1.61±0.44	1.56±0.45	1.063	0.346
APP_04	1.46±0.37	1.52±0.36	1.40±0.35 ^a	1.45±0.39	4.318	0.014
BDNF	4.55±1.08	4.70±1.18	4.45±0.97	4.51±1.06	2.121	0.121
BDNF_05	3.17±1.05	3.32±1.23	3.07±0.85	3.13±1.02	2.446	0.088
BDNF_06	2.85±0.43	2.87±0.52	2.88±0.36	2.80±0.40	1.810	0.165
BDNF_07	9.70±2.09	9.98±2.20	9.58±2.02	9.55±2.04	1.975	0.140
BDNF_08	3.31±0.87	3.44±1.00	3.30±0.79	3.20±0.78	2.963	0.053
KL	2.34±0.39	2.40±0.42	2.28±0.37 ^a	2.32±0.37 ^a	3.626	0.027
KL_01	1.60±0.35	1.62±0.35	1.59±0.32	1.59±0.37	0.493	0.611
KL_02	3.22±0.55	3.33±0.57	3.18±0.54 ^a	3.15±0.53 ^a	4.714	0.009

[注] a : 与低暴露组相比, $P<0.05$ 。

[Note] a: Compared with the low exposure group, $P<0.05$.

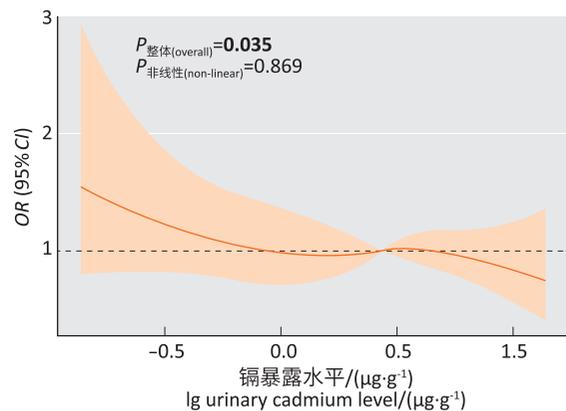


图1 镉暴露水平与 KL 基因甲基化水平相关性的限制性立方样条图

Figure 1 Restricted cubic spline plot of the correlation between urinary cadmium levels and KL gene methylation rate

2.4 不同暴露组间基因 CpG 位点甲基化水平分析

采用 Mann-Whitney U 检验进行 KL、APP、BDNF 三个目的基因的 CpG 位点的组间比较。表 4 仅列出差异具有统计学意义的 CpG 位点、组间甲基化差异程度及其 P 值。低暴露组与中暴露组比较, 随着暴露浓度的增加, 三个目的基因的 CpG 位点改变具有统计

学意义的位点个数分别为：*APP*基因2个，*BDNF*基因7个，*KL*基因5个（均 $P < 0.05$ ）。中、高暴露组间比较，*APP*基因在共有3个CpG位点存在差异，*KL*基因2个，*BDNF*基因5个；低暴露组与高暴露组比较，*APP*、*KL*基因CpG位点平均甲基化水平存在差异共3个（ $P < 0.05$ ），而*BDNF*基因的CpG位点甲基化水平在低、高暴露组间差异无统计学意义。

表4 不同基因CpG位点平均甲基化率的组间比较

Table 4 Comparison of average methylation rates of CpG loci of selected genes between different exposure groups

比较组别 Group	片段 Segment	CpG	甲基化率差异 Methylation difference	P
低暴露组与中暴露组 Low vs Medium				
	<i>APP_04</i>	52	0.000588	0.044
	<i>APP_04</i>	165	0.000669	0.035
	<i>BDNF_05</i>	112	0.002681	0.044
	<i>BDNF_05</i>	128	0.003339	0.036
	<i>BDNF_05</i>	167	0.002965	0.009
	<i>BDNF_05</i>	182	0.004335	0.015
	<i>BDNF_08</i>	188	0.003227	0.013
	<i>BDNF_08</i>	209	0.002651	0.042
	<i>BDNF_08</i>	235	0.002298	0.017
	<i>KL_01</i>	50	0.002376	0.005
	<i>KL_01</i>	96	0.003004	0.019
	<i>KL_01</i>	169	0.002934	0.010
	<i>KL_01</i>	197	0.002228	0.028
	<i>KL_02</i>	135	0.000966	0.040
中暴露组与高暴露组 Medium vs High				
	<i>APP_04</i>	52	0.000835	0.002
	<i>APP_04</i>	181	0.000781	0.044
	<i>APP_04</i>	204	0.000894	0.045
	<i>BDNF_05</i>	57	0.001084	0.029
	<i>BDNF_05</i>	85	0.001912	0.019
	<i>BDNF_05</i>	112	0.003118	0.035
	<i>BDNF_05</i>	128	0.003606	0.040
	<i>BDNF_05</i>	156	0.006078	0.018
	<i>BDNF_05</i>	167	0.002422	0.024
	<i>BDNF_05</i>	182	0.005232	0.007
	<i>BDNF_08</i>	135	0.003067	0.026
	<i>KL_01</i>	50	0.002533	0.011
	<i>KL_02</i>	120	-0.001146	0.050
低暴露组与高暴露组 Low vs High				
	<i>APP_04</i>	120	0.000740	0.040
	<i>APP_04</i>	181	0.000713	0.030
	<i>KL_01</i>	197	0.001892	0.015

3 讨论

镉暴露引起机体认知功能损伤的确切机制尚不清楚。本研究通过对职业镉暴露人群认知相关基因的甲基化研究，结果发现低、中浓度尿镉暴露可能与*KL*、*APP*基因甲基化率降低有关。方差分析显示*KL*基因平均甲基化水平在低-中、低-高暴露组间存在差异，限制性立方样条提示镉暴露与*KL*基因甲基化率

呈负相关。Guan等^[15]发现镉处理可降低果蝇39个基因甲基化水平，这些基因与发育、繁殖和能量代谢有关。同时有研究发现宫内镉暴露可致新生儿基因出现全基因组低甲基化现象^[16]。*KL*基因主要在脉络丛和神经元细胞中高表达，与神经退行性疾病相关，镉暴露引起该基因甲基化水平降低可能导致海马退行性变，进而损伤认知功能。动物研究发现*KL*高表达小鼠表现出更好的认知功能^[17]。金属镉暴露与*KL*基因甲基化的关系及其对认知功能的影响有待进一步研究。

镉、铅联合暴露致雄性大鼠中海马和皮质中淀粉样蛋白的产生，介导了*APP*的表达^[18]。Hou等^[19]观察到AD患者的*APP*基因整体甲基化水平低于正常人群，且其表达水平与AD病情严重程度呈正相关。本研究对职业人群镉暴露与*APP*基因甲基化水平的关联性进行首次探讨，结果显示低镉暴露组*APP*基因04片段的平均甲基化率高于其他两个暴露水平，与中暴露组比较有差异。该结果支持了镉暴露与*APP*基因甲基化的关联性，即低浓度的镉暴露可引起*APP*基因去甲基化从而改变转录并诱导*APP*基因过表达，进而增加了淀粉样蛋白的产生并在认知功能障碍和AD发病机制中起重要作用，需要进一步研究以探索其相关机制。

本研究结果显示不同暴露组间*BDNF*甲基化水平无差异。目前关于镉或其他重金属暴露与*BDNF*基因的甲基化水平的关联性研究较少。在一项移民孕妇研究中发现，孕早期重金属Pb、Hg、Cd暴露与*BDNF*浓度之间无相关性^[20]。研究表明，锰暴露可降低职业工人血浆*BDNF*水平和认知能力^[21]。*BDNF*基因的甲基化状态，尤其是其启动子区域的甲基化状态，是与精神疾病有关的最重要参数之一^[22]，在男性精神分裂症患者中发现*BDNF*启动子甲基化水平更高。海马中*BDNF*基因外显子IX的DNA甲基化增加进而引起*BDNF* mRNA的表达下降，是影响大鼠及其后代的学习记忆障碍和认知障碍的重要原因之一^[23]。由于本研究样本量较少，因此，需要更大样本量的进一步研究来确认二者的关联性及其对认知功能的影响。

本研究的优势在于对重金属镉与3个基因甲基化水平的关联性进行探讨，但仍有部分局限性：首先，作为金属暴露与相关基因甲基化的关联性探讨，本研究纳入样本量较少，差异具有统计学意义的CpG位点的相关性有待进一步功能性验证；另外，本次调查仅针对广西某冶炼厂职工，对于其他职业性金属镉暴露高危人群以及普通人群外推性较弱。

综上, 镉暴露可能与 *KL*、*APP* 基因低甲基化率有关, *KL* 基因甲基化率与 UCd 水平呈负相关。

参考文献

- [1] ZONG L, XING J, LIU S, et al. Cell metabolomics reveals the neurotoxicity mechanism of cadmium in PC12 cells [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 147 : 26-33.
- [2] HART R P, ROSE C S, HAMER R M. Neuropsychological effects of occupational exposure to cadmium [J]. *J Clin Exp Neuropsychol*, 1989, 11 (6) : 933-943.
- [3] PENG Y, LI Z, YANG X, et al. Relation between cadmium body burden and cognitive function in older men : a cross-sectional study in China [J]. *Chemosphere*, 2020, 250 : 126535.
- [4] GUSTIN K, TOFAIL F, VAHTER M, et al. Cadmium exposure and cognitive abilities and behavior at 10 years of age : a prospective cohort study [J]. *Environ Int*, 2018, 113 : 259-268.
- [5] LIU C, ZHANG R, SUN C, et al. Resveratrol prevents cadmium activation of Erk1/2 and JNK pathways from neuronal cell death via protein phosphatases 2A and 5 [J]. *J Neurochem*, 2015, 135 (3) : 466-478.
- [6] WANG H, ZHANG L, ABEL G M, et al. Cadmium exposure impairs cognition and olfactory memory in male C57BL/6 mice [J]. *Toxicol Sci*, 2018, 161 (1) : 87-102.
- [7] SZABO S T, HARRY G J, HAYDEN K M, et al. Comparison of metal levels between postmortem brain and ventricular fluid in Alzheimer's disease and nondemented elderly controls [J]. *Toxicol Sci*, 2016, 150 (2) : 292-300.
- [8] PRZYBYLA J, HOUSEMAN E A, SMIT E, et al. A path analysis of multiple neurotoxic chemicals and cognitive functioning in older US adults (NHANES 1999-2002) [J]. *Environ Health*, 2017, 16 (1) : 19.
- [9] KURO-O M. The Klotho proteins in health and disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15 (1) : 27-44.
- [10] ZENG C Y, YANG T T, ZHOU H J, et al. Lentiviral vector-mediated overexpression of Klotho in the brain improves Alzheimer's disease-like pathology and cognitive deficits in mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2019, 78 : 18-28.
- [11] LASZCZYK A M, FOX-QUICK S, VO H T, et al. Klotho regulates postnatal neurogenesis and protects against age-related spatial memory loss [J]. *Neurobiol Aging*, 2017, 59 : 41-54.
- [12] NG T K S, HO C S H, TAM W W, et al. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in patients with Alzheimer's disease (AD) : a systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (2) : 257.
- [13] VAILLANT-BEUCHOT L, MARY A, PARDOSSI-PIQUARD R, et al. Accumulation of amyloid precursor protein C-terminal fragments triggers mitochondrial structure, function, and mitophagy defects in Alzheimer's disease models and human brains [J]. *Acta Neuropathol*, 2021, 141 (1) : 39-65.
- [14] 喻国旗. 职业镉暴露人群中 *KL*、*BDNF*、*APP* 基因甲基化与认知的关联性研究 [D]. 南宁 : 广西医科大学, 2019.
- YU G Q. Correlation analysis between cadmium exposure, gene methylation and cognitive function [D]. Nanning : Guangxi Medical University, 2019.
- [15] GUAN D L, DING R R, HU X Y, et al. Cadmium-induced genome-wide DNA methylation changes in growth and oxidative metabolism in *Drosophila melanogaster* [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20 (1) : 356.
- [16] 黄丽华, 张云, 王君, 等. 宫内镉暴露对新生儿全基因组 DNA 甲基化水平的影响 [J]. *环境与职业医学*, 2017, 34 (7) : 617-620, 626.
- HUANG L H, ZHANG Y, WANG J, et al. Effect of cadmium exposure *in utero* on global DNA methylation of newborns [J]. *J Environ Occup Med*, 2017, 34 (7) : 617-620, 626.
- [17] DUBAL D B, ZHU L, SANCHEZ P E, et al. Life extension factor klotho prevents mortality and enhances cognition in hAPP transgenic mice [J]. *J Neurosci*, 2015, 35 (6) : 2358-2371.
- [18] KARRI V, SCHUHMACHER M, KUMAR V. Heavy metals (Pb, Cd, As and MeHg) as risk factors for cognitive dysfunction : a general review of metal mixture mechanism in brain [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 48 : 203-213.
- [19] HOU Y, CHEN H, HE Q, et al. Changes in methylation patterns of multiple genes from peripheral blood leucocytes of Alzheimer's disease patients [J]. *Acta Neuropsychiatr*, 2013, 25 (2) : 66-76.
- [20] ZAW Y H, TANEEPANICHSKUL N. Blood heavy metals and brain-derived neurotrophic factor in the first trimester of pregnancy among migrant workers [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (6) : e0218409.
- [21] ZOU Y, QING L, ZENG X, et al. Cognitive function and plasma *BDNF* levels among manganese-exposed smelters [J]. *Occup Environ Med*, 2014, 71 (3) : 189-194.
- [22] CHANG L, WANG Y, JI H, et al. Elevation of peripheral *BDNF* promoter methylation links to the risk of Alzheimer's disease [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (11) : e110773.
- [23] HU Y D, PANG W, HE C C, et al. The cognitive impairment induced by zinc deficiency in rats aged 0~2 months related to *BDNF* DNA methylation changes in the hippocampus [J]. *Nutr Neurosci*, 2017, 20 (9) : 519-525.

(英文编辑 : 汪源 ; 责任编辑 : 丁瑾瑜)