

·论著·

# 中国汉族儿童 ALAD 基因型频率分布特点初探

吴胜虎,沈晓明,颜崇淮,殷洁敏,章依文,周建德

**[摘要]** 目的 通过研究中国汉族人群 氨基-酮戊酸脱水酶(ALAD)基因型,探讨中国儿童是否存在 ALAD 基因的遗传多态性及其频率分布特点,以确定遗传因素对儿童血铅水平的影响。方法 整群抽取对铅毒性较为敏感的 6~10 岁儿童 229 名为研究对象。通过 PCR 及限制性内切酶酶切分析两种 ALAD 等位基因的频率。结果 所研究儿童中 ALAD 1-1 型有 211 例,ALAD 1-2 型有 18 例。ALAD<sup>2</sup> 基因频率为 8%;ALAD<sup>1</sup> 基因频率为 92%。未发现 ALAD 2-2 型。结论 中国人 ALAD 基因存在遗传多态性;从遗传特质上来说,中国儿童对铅毒性的易感性可能低于欧美儿童。

**[关键词]** 铅;铅中毒;儿童;氨基-酮戊酸脱水酶;基因型

**[中图分类号]** R135.1<sup>+</sup>1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2000)02-0065-03

## Characteristics of ALAD Genotype Frequency Distribution in the Han Ethnic Children in China

WU Sheng-Hu, SHEN Xiao-Ming, YAN Chong-Huai, et al.

Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092

**[Abstract]** **Objective** To explore the genetic polymorphism of the  $\alpha$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) gene in children of the Han ethnic group. **Methods** The erythrocyte  $\alpha$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) isozyme phenotypes were determined in a population of 229 pre-school and primary school children aged 6~10 years. **Results** (1) There were 211 individuals with the ALAD 1-1 isozyme phenotype and 18 individuals with the ALAD 1-2 isozyme phenotype. (2) The phenotype of ALAD 2-2 was not detected. **Conclusions** A polymorphic enzyme exists in the ALAD gene of the Chinese population and the ALAD<sup>2</sup> allele frequency was lower than in Caucasians. Chinese children are genetically less susceptible to lead toxicity than Caucasian children.

**[Key words]** Lead; Lead poisoning; Child; ALAD; Genotype

在以往的流行病学研究中,人们发现,处于相似铅暴露环境的儿童有的血铅水平很高,而有些血铅水平并不增高;同样血铅水平的儿童有的表现出明显的智能发育障碍,而有些表现则不明显。这说明除环境暴露因素外,机体的易感性也是铅毒性作用的重要决定因素。国外研究发现,机体对铅毒性作用的易感性与 氨基-酮戊酸脱水酶( $\alpha$ -aminolevulinic acid dehydratase, ALAD)的遗传多态性有关。中国儿童是否也存在 ALAD 基因的遗传多态性? ALAD 等位基因的频率如何? 本文就此进行了探讨。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

在浙江省兰溪市某铅作业工厂子弟小学(该小学邻近厂区)整群抽取学前班和 1~3 年级学龄儿童共计 229 名为研究对象。

### 1.2 研究方法

1.2.1 标本留取 对所有研究对象均抽取肘静脉血 2 ml,采用 Na<sub>2</sub>EDTA (7%, 10 $\mu$ l) 抗凝,用于分离白细胞、抽提 DNA 供进一步 PCR 及酶切分析用。

[基金项目] 本课题为国家自然科学基金资助项目(39970645)

[作者简介] 吴胜虎,男,1968 年出生,医学硕士,住院医师。

[作者单位] 200092 上海第二医科大学新华医院,上海市儿科医学研究所环境医学研究室

1.2.2 白细胞分离与DNA抽提 常规氯仿法抽提基因组DNA。

### 1.2.3 ALAD基因型分析

(1) PCR扩增ALAD基因上一个长度为916 bp片段 PCR引物:上游引物:5'...AGACAGACATTAGCTCAGTA...3';下游引物:3'...GGCAAA-GACCACGTCCATTC...5'

扩增条件:先94℃变性5 min,然后按下列参数进行循环:94℃ 1 min,55℃ 50 s,72℃ 50 s,共30圈,最后一圈结束时,72℃ 7 min。

(2) ALAD基因型分析,用内切酶Msp对PCR扩增的ALAD基因片段(916 bp)进行酶解。酶解产物用琼脂糖凝胶电泳,通过分析带型的变化识别有无基因突变,以确定中国人的ALAD基因型。

Msp酶切位点ALAD基因型分析:ALAD 1-1基因型出现583 bp,158 bp,139 bp,36 bp 4条带;ALAD 1-2基因型出现583 bp,512 bp,158 bp,139 bp,71 bp,36 bp 6条带;ALAD 2-2基因型出现512 bp,158 bp,139 bp,71 bp,36 bp 5条带。36 bp条带和71 bp条带因分子量小、泳动速度明显快于其它条带,通常情况下并不可见。

## 2 结果

2.1 Msp酶切结果(ALAD基因型分析) 见附图。

1 2 3 4 5 6 7 8



附图 Msp酶切结果(Msp restriction fragments);lane 2, 4: ALAD 1-2; lane 5, 8: 阴性对照(The control); lane 6: ALAD 1-1; lane 1, 7: PCR产物(PCR product); lane 3: Markers

### 2.2 229例儿童ALAD基因分析结果

229例儿童中ALAD 1-1 211例,占92%;AL-

AD 1-2 18例,占8%;未发现ALAD 2-2。各占所调查人群百分比见表1。

表1 本组儿童中ALAD各基因型的表现频率

Table 1. The children ALAD gene: phenotype frequencies

百分比	ALAD基因型	例数
1-1	211	92
1-2	18	8
1-3	0	0

从表中数据可推测中国汉族儿童ALAD 1-2型的频率:ALAD 1-2型阳性率的标准误 $S_p$ 为0.0179。由于样本量较大且阳性率及阴性率不低,即样本率的抽样分布接近正态,用正态近似法计算总体样本率的95%可信区间为:4.49%~11.51%;99%可信区间为:3.38%~12.62%。

### 2.3 中外部分人群ALAD基因频率的比较(表2)

从表2中可看出本组中国儿童ALAD基因的突变频率低于美国及德国,但较利比里亚人群为高。

表2 中外部分人群ALAD基因频率的比较(%)

Table 2. Human ALAD polymorphism: phenotype and gene frequencies (%)

国别	ALAD 1-1	ALAD 1-2	ALAD 2-2
中国	92	8	0
美国	89	10	1
德国	79	16	5
利比里亚	100	0	0

## 3 讨论

本研究调查了229例学龄前及学龄儿童并检测了这些研究对象的ALAD基因型,结果发现229例儿童中ALAD 1-1型有211例,占总数的92%;ALAD 1-2型有18例,占总数的8%;由于ALAD 1-2型样本率的抽样分布接近正态,用正态近似法计算总体样本率的95%可信区间为:4.49%~11.51%;99%可信区间为:3.38%~12.62%。这与文献报道的频率分布较为接近,但中国儿童ALAD 1-2基因型的频率(8%)低于美国(11%)及德国(21%)<sup>[1]</sup>,这可能是人种之间的差异所造成。同时也表明,从遗传特质上来说,中国儿童对铅毒性的易感性可能低于欧美儿童。此外,本组研究未发现ALAD 2-2型,这可能是由于样本量不够大所致,我们正进一步扩大样本量,可望阐明其分布特点。

人体内的铅全部来自外界环境,外界环境中的铅主要由消化道和呼吸道进入儿童体内,但由于遗传因素的存在,即使是生活在同样的铅污染环境中,其血铅水平也会有所不同。除了环境暴露因素外,机体的易感性也是铅毒性作用的重要决定因素。国外研究发现,机体对铅毒性作用的易感性和  $\delta$ -ALAD 的遗传多态性有关<sup>[2]</sup>。此前国外的一些研究发现,ALAD 1-2 型和 ALAD 2-2 型个体在受到铅暴露时更容易发生高血铅和铅中毒,是铅毒性的易感和高危人群<sup>[1,3,4]</sup>。我们的研究表明中国儿童存在 ALAD 基因的遗传多态性。如果我们能通过建立某种快速、简便的方法,将那些遗传特性上对铅毒性高度易感的人群(即高危人群)筛查出来,对他们进行重点预防(如进行小环境干预、针对性健康教育、个体化药物预防等),可望在现有条件下明显减轻环境铅污染对儿童健康的危害,提高儿童的健康水平。有关 ALAD 基因型与儿童铅毒性易感性之间关系的研究我们正在进行中。

ALAD 基因型对铅毒性影响的遗传学基础:有关铅毒性作用遗传学基础的研究尚不多见,目前的研究主要集中在  $\delta$ -ALAD<sup>[5]</sup>。ALAD 存在遗传多态现象,ALAD 由单个基因 ALAD 基因编码,位于染色体 9q34,有 2 个等位基因(ALAD<sup>1</sup> 和 ALAD<sup>2</sup>),在欧洲人群中两者出现的频率为 9:1。这两种等位基因的不同表达组成了 3 种遗传表现型。最近的研究表明,儿童表现为 ALAD 1-2 杂合子和 ALAD 2-2 纯合子者对铅中毒的易感性增高。在一项大样本的研究发现,ALAD<sup>2</sup> 等位基因的出现和儿童血铅增高有关。出现 ALAD<sup>2</sup> 等位基因的人群中,血铅水平超过 300  $\mu\text{g/L}$  的比例明显增高<sup>[1]</sup>。Wetmur 等<sup>[1]</sup>研究发现,ALAD 2-2 和 ALAD 1-2 个体在受到铅暴露时更容易发生高血铅和铅中毒,是铅毒性的易感和高危人群。研究表明,同样环境铅暴露水平携带 ALAD<sup>2</sup> 等位基因的纯合子个体的血铅要比 ALAD<sup>1</sup> 高 100  $\mu\text{g/L}$ 。Wetmur 估计 ALAD<sup>2</sup> 对血铅水平的贡献要占血中总铅的 40%,因此,ALAD<sup>2</sup> 是人类铅毒性遗传易感性的标志,该基因携带者是铅毒性的易感人群。

分子机制:1991 年 Wetmur 等发现 ALAD<sup>2</sup> 等位基因是由于基因序列上第 177 位核苷酸(第 59 位氨基酸)发生 G $\rightarrow$ C 突变。这个突变的结果是带正电荷的赖氨酸被电中性的精氨酸代替(K59N 突变)。这是 ALAD<sup>1</sup> 和 ALAD<sup>2</sup> 多肽的主要区别<sup>[5]</sup>。这种不同类型的氨基酸替换可改变酶构象而使酶活性发生改变。由于 ALAD 酶构象的改变,增加了 ALAD<sup>2</sup> 亚单位与铅的亲合力,使 ALAD<sup>2</sup> 亚单位与铅的结合更为紧密,从而导致携有 ALAD<sup>2</sup> 亚单位的个体(ALAD 2-2 和 ALAD 1-2)在受到铅暴露时更容易发生高血铅和铅中毒。此外,ALAD 多态性影响铅的毒代动力学,使铅的生物利用度降低,导致铅在体内循环池中长期蓄积<sup>[6,7]</sup>。

#### [参 考 文 献]

- [1] Wetmur J G, Lehner G, Desnick RJ. The  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: high blood lead levels in lead workers and environmentally exposed children with the 1-2 and 2-2 isozymes [J]. *Environ Res*, 1991, 56(2): 109~119.
- [2] Brody DJ, Pirkle JL, Kramer RA, et al. Blood lead levels in the US population [J]. *JAMA*, 1994, 272(4): 277~283.
- [3] 吴胜虎,颜崇淮,沈晓明. ALAD 基因型与儿童铅毒性易感性 [J]. *国外医学儿科学分册*, 1999, 26(2): 85~87.
- [4] Wetmur J G. Influence of the common human  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on lead body burden [J]. *Environ health Perspect*, 1994, 102(suppl): 215~219.
- [5] Wetmur J G, Kara AH, Pleminska M, et al. Molecular characterization of the human  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase 2 (ALAD<sup>2</sup>) allele: implications for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning [J]. *Am J Hum Genet*, 1991, 49(4): 757~763.
- [6] Fleming DE, Chettle DR, Wetmur J G, et al. Effect of the delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on the accumulation of lead in bone and blood in lead smelter workers [J]. *Environ Res*, 1998, 77(1): 49~61.
- [7] Alexander BH, Checkoway H, Mallen PC, et al. Interaction of blood lead and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase genotype on markers of heme synthesis and sperm production in lead smelter workers [J]. *Environ Health Perspect*, 1998, 106(4): 213~216.

(收稿日期:1999-10-18 修回日期:2000-01-28)

(本文编辑:吉耕中)