

学校编码:10384

分类号_____ 密级_____

学号: 21720091152032

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

多环芳烃暴露与不良妊娠结局的关系及其
机制研究

The study on the association between polycyclic aromatic
hydrocarbons exposure and adverse pregnancy outcomes
and their mechanisms

钟渊福

指导教师姓名：左正宏 副教授

专 业 名 称：动物学

论文提交日期：2012 年 5 月

论文答辩时间：2012 年 6 月

学位授予日期：2012 年 月

答辩委员会主席：

评 阅 人：

2012 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(王重刚)
课题(组)的研究成果,获得(王重刚)课题(组)
经费或实验室的资助,在(王重刚)实验室完成。

(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,
未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

200 年 月

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

目录	I
Content	I
摘要	1
Abstract	3
第一章 前言	5
1.1 不良妊娠结局的现状	5
1.2 造成不良妊娠结局的原因	6
1.3 多环芳烃的来源及分布现状	8
1.4 多环芳烃暴露对妊娠结局及子代健康的影响及分子机制	9
1.5 本研究的目 的、意义及研究内容	16
第二章材料与方法	17
2.1 研究对象	17
2.2 仪器与试剂	17
2.2.1 主要仪器	18
2.2.2 主要试剂	18
2.2.3 主要溶液配置	18
2.3 研究方法	18
2.3.1 流行病学资料的收集	18
2.3.2 母亲静脉血及新生儿脐带血的收集	18
2.3.3 多环芳烃含量测定	19
2.3.4 EROD 活性的测定	21
2.3.5 GST 活性的测定	21
2.3.6 蛋白含量测定	21
2.3.7 基因多态性的测定	22
2.3.8 LA-QPCR	23
2.4 数据统计与分析	24

第三章 结果分析	25
3.1 孕妇流行病学调查结果	25
3.2 新生儿妊娠结局调查结果	25
3.3 血清中 16 种多环芳烃的含量结果	26
3.3.1 多环芳烃检测方法的回收率	26
3.3.2 孕妇静脉血与新生儿脐带血中多环芳烃含量测定结果	27
3.3.3 孕妇静脉血与新生儿脐带血中多环芳烃含量的相关性分析	28
3.3.4 正常与各种不良妊娠结局的孕妇静脉血中多环芳烃含量的比较 ..	29
3.3.5 正常与各种不良妊娠结局的新生儿脐血中多环芳烃含量的比较 ..	32
3.4 新生儿脐带血中代谢酶活性测定结果	35
3.4.1 EROD 与 GST 活性与多环芳烃含量的相关性分析	35
3.4.2 EROD、GST 酶活与妊娠结局的比较分析	36
3.5 新生儿代谢酶基因多态性结果	37
3.5.1 CYP1A1 基因和 GSTP1 基因多态性分析	37
3.5.2 多环芳烃代谢酶基因多态性与不良妊娠结局的关系	38
3.5.3 多环芳烃代谢酶基因多态性与多环芳烃含量的关系	39
3.6 多环芳烃暴露后新生儿的 DNA 损伤	39
3.6.1 DNA 损伤与多环芳烃含量的相关性分析	39
3.6.2 不同妊娠结局之间的 DNA 损伤比较	40
第四章 讨论	41
4.1 1104 例孕妇流行病学调查及妊娠结局分析	41
4.2 多环芳烃的含量与不良妊娠结局的关系	41
4.2.1 多环芳烃测定结果	41
4.2.1.1 多环芳烃测定结果.....	41
4.2.1.2 多环芳烃的含量.....	42
4.2.2 多环芳烃的含量与不良妊娠结局的关系	43
4.3 多环芳烃暴露与不良妊娠结局的其机制研究	44
4.3.1 多环芳烃暴露对两种代谢酶活性的影响	44
4.3.2 多环芳烃暴露与基因多态性的关系	44

4.3.3 多环芳烃暴露对 DNA 损伤的影响	45
第五章 结论与展望	47
参考文献	49
致谢	56

厦门大学博硕士论文摘要库

Content

Content(in Chinese)	I
Content(in English)	I
Abstract(in Chinese)	1
Abstract(in English)	3
Chapter 1. Introduction	5
1.1 The status of adverse pregnancy outcomes	5
1.2 The reasons of adverse pregnancy outcomes	6
1.3 The source and the distribution status of polycyclic aromatic hydrocarbons	8
1.4 The mechanism of PAHs exposure on adverse pregnancy outcomes and offspring health	9
1.5 Purpose and content of thesis	16
Chapter 2. Materials and methods	17
2.1 The object of study	17
2.2 Apparatus and reagents	17
2.1.1 Major apparatus	18
2.1.2 Major reagents	18
2.1.3 Major solution configuration	18
2.3 Methods	18
2.3.1 Epidemiological investigations	18
2.3.2 Collection of blood (pregnant women and newborn cord blood)	18
2.3.3 Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon concentration	19
2.3.4 Detection of the activity of EROD	21
2.3.5 Detection of the activity of GST	21
2.3.6 Detection of the content of total protein	21
2.3.7 Detection of gene polymorphism	22
2.3.8 LA-QPCR	23
2.4 Statistical analysis	24
Chapter 3. Results and analysis	25

3.1 The results of epidemiological investigations	25
3.2 The results of birth outcomes	25
3.3 The results of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations	26
3.3.1 The recovery coefficient of detected method	26
3.3.2 PAHs concentrations in pregnant women and newborns	27
3.3.3 The correlation of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations between pregnant woman and newborns	28
3.3.4 The difference of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in pregnant women between normal and adverse pregnancy outcomes	29
3.3.5 The difference of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in newborns between normal and adverse pregnancy outcomes	32
3.4 The results of EROD and GST activity in newborns	35
3.4.1 The correlation between GST/EROD activity and polycyclic aromatic hydrocarbons concentration in newborns	35
3.4.2 EROD/GST activity between different pregnancy outcome	36
3.5 The results of CYP1A1 and GST gene polymorphism	37
3.5.1 The difference of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in newborns	37
3.5.2 The correlation between polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations and CYP1A1 and GST gene polymorphism in newborns	38
3.5.3 The difference of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in newborns among different genotype of CYP1A1 and GST gene	39
3.6 The results of DNA damage in newborns	39
3.6.1 The correlation between DNA damage and polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations	39
3.6.2 The levels of DNA damage in different pregnancy outcome	40
Chapter 4. Discussion	41
4.1 The analysis of epidemiological investigations and birth outcomes	41
4.2 The relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations and adverse birth outcomes	41
4.2.1 The results of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations	41
4.2.1.1 The detection rate of polycyclic aromatic hydrocarbons	41

4.2.1.2 The concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons	42
4.2.2 The relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations and adverse birth outcomes	43
4.3 The mechanism of PAHs exposure on adverse birth outcomes.....	44
4.3.1 The effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on the EROD and GST activity	44
4.3.2 The association between polycyclic aromatic hydrocarbons exposure and gene polymorphism	44
4.3.3 The effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on DNA damage.....	45
Chapter 5. Conclusions and outlook.....	47
References	49
Acknowledgements.....	56

摘要

目的 通过流行病学调查, 掌握闽南地区妊娠妇女妊娠结局情况, 并探讨多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 暴露对妊娠结局的影响, 结合 PAHs 代谢酶活性及基因多态性分析, DNA 损伤等指标, 评价 PAHs 暴露对胎儿健康的危害。

方法 利用问卷形式收集 1106 例孕妇流行病学资料, 以了解环境因素对妊娠妇女妊娠结局的影响。采用气相色谱串联质谱 (gas chromatograph-mass spectrometer, GC-MS) 技术测定 206 例孕妇外周静脉血、新生儿脐带血中 PAHs 含量; 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 技术分析 PAHs 代谢酶基因细胞色素 P450 氧化酶 1A1 (Cytochrome P450 monooxygenase 1A1, CYP1A1) 和谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione-S-transferase, GST) 的多态性; 应用 long amplicon-quantitative polymerase chain reaction (LA-QPCR) 检测 DNA 损伤, 以此分析多环芳烃暴露对妊娠结局的影响。

结果

1、1106 例母婴配对样本妊娠结局调查资料结果: 总不良妊娠结局发生率为 9.41%, 其中早产率为 1.90%, 足月小样儿发生率为 1.45%, 巨大儿发生率为 2.80%, 宫内窘迫发生率为 1.27%。

2、检测了孕妇静脉血与新生儿脐带血血清中 16 种 PAHs, 共检出其中的 13 种 PAHs。母婴血清中 PAHs 含量均呈较强的相关性 [苯并 (b) 荧蒽 (Benzo(b)fluoranthene, BbF) 除外], 除萘烯 (Acenaphthylene, Ace) 外, 其它 PAHs 在脐带血中的含量略高于母亲静脉血。此外, PAH 不管在孕妇静脉血还是新生儿脐带血中, 其在不良妊娠结局中的含量均明显高于正常结局 [屈 (Chrysene, Chr)、苯并 (a) 芘 (Benzo(a)pyrene, BaP) 除外]。

3、检测了新生儿血液中 EROD 和 GST 的活性, 发现 GST 活性分别与芴 (Fluorene, Flu)、苯并 (a) 蒽 [Benzo(a)anthracene, BaA] 两种 PAH 的含量呈正相关, 而 EROD 与 BaA 呈正相关。EROD 和 GST 的活性也存在极强的正相关性

($r=0.571$, $P<0.001$)。

4、检测了新生儿 CYP1A1 MspI 及 GSTP1 基因多态性。新生儿 CYP1A1Msp I 纯合突变型 (val/val) 中芘烯 (Ace)、芴 (Flu)、蒽 (Anthracene, Ant)、荧蒽 (Flouranthene, FluA) 四种 PAHs 浓度与野生纯合型相比, 呈极显著性增高 ($P<0.001$), 芘 (Acenaphthene, Acp) 则呈显著性降低 ($P<0.001$) 其余 PAHs 组间无显著性差异。新生儿 GSTP1 三种基因型的所有 PAHs 组间均无显著性差异。

5、检测了新生儿 DNA 损伤。DNA 损伤程度与新生儿脐带血中芘 (Acenaphthene, Acp) 含量呈正相关 ($r=0.25$, $P<0.001$)。并且, 与正常妊娠结局相比较, 不良妊娠结局的新生儿其 DNA 都已受到不同程度的损伤, 总不良妊娠结局、宫内窘迫及巨大儿结果与正常结局相比较呈极显著性差异 ($P<0.01$)。

关键词: 妊娠结局; 多环芳烃; 基因多态性; DNA 损伤

Abstract

Objective In order to investigate the effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) exposure on pregnancy outcomes, a questionnaire survey and the level of PAHs in serum of pregnant women and cord blood of newborn were analysis. To elucidate the mechanisms of PAHs exposure on pregnancy outcomes, the metabolic enzyme activity, gene polymorphism, and DNA damage were detected.

Methods Using a questionnaire survey to collect epidemiological data of pregnant women. We examined PAHs concentrations in maternal and newborn cord serum by using gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS); and examined metabolism enzyme gene polymorphism by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP); and examined DNA damage by using LA-QPCR.

Results

1. The results of 1106 paired samples of maternal and child epidemiological data: the rate of adverse pregnancy outcomes is 9.41%, while 1.90% rate of preterm birth, 1.45% rate of small-for-date, 2.80% rate of great children and 1.27% rate of intrauterine distress.

2. Only 13 kinds could be detected [Indeno(1,2,3-cd)pyrene, Dibenz(a,h)anthracene, Benzo(g,h,i) perylene] were not detected] in the serum of maternal and neonatal umbilical cord blood (n=206). In addition to Chr, the remaining 12 PAHs in mothers and neonatal blood umbilical cord serum were correlated ($P < 0.05$); cord blood levels of various PAHs were higher than the blood content of the mother (except Acenaphthene). There was significant difference between serum PAHs concentrations (except Chrysene, Benzo(a)pyrene) in adverse pregnancy outcomes and the normal pregnancy outcomes ($P < 0.05$).

3. We determined the activity of EROD and GST in newborns blood. We found positive correlation between GST activity and 2 kinds of PAH concentrations (Fluorene and Benzo(a)anthracene, $p < 0.05$), and also found a strong positive correlation between EROD activity and Acp concentration ($r = 0.25$, $P < 0.001$).

4. We determined metabolism enzyme gene polymorphism. Compared with wild-type (ile/ile), 4 kinds of PAH (Acenaphthylene, Fluorene, Anthracene and Flouranthene) concentrations with pure mutant genotypes (val / val) of CYP1A1Msp I

site were extremely significantly higher ($P<0.001$) while Acenaphthene was significantly lower ($P<0.001$).

5. We determined DNA damage in newborns. The results showed a positive correlation between DNA lesions and Acenaphthene concentrations ($r=0.25$, $P<0.001$). DNA lesions in adverse pregnancy outcomes was significantly higher than normal pregnancy outcomes ($P<0.01$), except the small-for-date outcome ($P=0.053$, in proximity to 0.05).

Keywords: Pregnancy outcome; PAHs; Gene polymorphism; DNA damage

第一章 前言

1.1 不良妊娠结局的现状

不良妊娠结局 (adverse pregnancy outcomes) 包括低出生体重 (low birth weight, LBW)、早产 (preterm delivery)、宫内发育迟缓 (intrauterine growth retardation, IUGR)、出生缺陷 (birth defects)、流产 (abortion) 和死产 (stillbirth) 等 (胡晓斌等, 2008)。De Onis 等 (1998) 统计了全球范围内的 1995 年出生的新生儿情况, 发现约有 2 千万的新生儿属于低出生体重, 发达国家的新生儿中有 16% 是属于低出生体重。根据美国疾病控制中心出生缺陷监测资料 (Dolk 等, 2010), 刚出生至 1 岁婴儿中可发现的严重出生缺陷占 3%~4%, 即美国每年有 10 万~15 万严重出生缺陷的婴儿出生。部分国家的不良妊娠结局具体数据见表 1 (WHO, 1995)。

表 1 参加 WHO 合作研究国家的不良妊娠结局结果

Tab.1 Pregnancy outcome among countries participating in World Health Organization collaborative study

国家	低出生体重(%)	宫内窘迫(%)	早产(%)	婴儿死亡率 (%)
阿根廷	6.3	9.7	7.2	1.6
中国	4.2	9.4	7.5	3.1
哥伦比亚	16.1	17.8	15.7	1.9
古巴	8.1	14.7	7.2	0.7
冈比亚	12.1	13.5	13.5	9.1
危地马拉	12.5	25.3	15.8	4.3
印度	28.2	54.2	9.7	6.7
印度尼西亚	10.5	19.8	18.5	3.3
爱尔兰	5.6	6.	6.2	0.6
马拉维	11.6	26.1	8.2	11.4
缅甸	17.8	30.4	24.6	7.7
尼泊尔	14.3	36.3	15.8	6.6
斯里兰卡	18.4	34.0	14.0	1.7
泰国	9.6	17.0	21.3	2.4
英国	6.2	12.3	4.6	0.6
美国/CDC(Black)	10.6	11.2	16.6	1.4
美国/CDC(Hispanic)	4.8	5.8	10.2	0.6
美国/CDC(White)	6.0	6.9	9.3	0.6
越南	5.2	18.2	13.6	3.0

我国是不良妊娠结局高发的国家，1988~1992 年卫生部组织全国各省市共同实施国家“七五”重点科技攻关课题《中国出生缺陷监测》，其结果显示：全国新生儿出生缺陷总发生率为 99.62/ 万人次，位居世界第一。每年还新增加先天残疾儿童总数高达 80 万~120 万人次，约占每年出生人口总数的 4~6%（毛萌等，2009）。

随着环境污染等高危因素的日趋严重，各地出生缺陷人口控制形势也日趋严峻。据厦门市出生缺陷调查资料表明，2005~2007 年，厦门市出生缺陷人口数和人口率分别为 181 例（66.9/万）、261 例（76.3/万）和 397 例（87.0/万），呈逐年升高趋势。许多先天性缺陷危害严重并无法治愈，给患者本人及家庭带来极大不幸，给社会造成沉重负担，也影响了社会的可持续性发展。

联合国新千年首脑会议上通过的《新千年宣言》将儿童和生命早期的健康和发展纳入优先发展的领域。我们国家也十分重视不良妊娠结局的预防和控制，于 2000 年将提高出生人口素质列为人口与计划生育工作的重点之一，并于 2011 年颁布的“中华人民共和国国民经济和社会发展第十二个五年规划纲要”和“国家中长期科学和技术发展规划纲要（2006--2020 年）”，将出生缺陷的预防和控制作为政府工作的重点。

1.2 造成不良妊娠结局的原因

造成不良妊娠结局，甚至是出生缺陷主要有两大原因，一是遗传因素，占 25%，二是环境因素，占 10%，而大多数是遗传因素和环境因素相互作用的结果，这两种因素兼及原因不明占 65%（李庆业，2001）。

近些年的研究表明，环境污染是导致不良妊娠结局的主要因素之一（Bobak 等，2000；Dejmek 等，2000；Perera 等，2005；Ghosh 等，2007；Ritz 等，2007）。环境污染主要包括以下几点：

1. 有毒气体 [一氧化碳、一氧化氮、二氧化硫]

一氧化碳（carbon monoxide, CO）作为户外空气污染物的主要成分之一，可迅速穿过胎盘。妊娠期间暴露于 CO，可干扰胎儿的氧合作用（Ziaei, 2005）。胚胎学研究证明，孕期（尤其是孕早期）孕妇经常吸入二氧化硫（sulfur dioxide, SO₂），能通过血液循环进入胎儿体内，严重干扰胎儿的正常生长发育，甚至引起胎儿畸形或自发流产。Dugandzic 等（2006）在加拿大的研究显示，孕早期随着

SO₂ 暴露浓度的增加，发生低出生体重的危险增加，OR= 1.33(95%CI: 1.04~1.78)。

2. 重金属（铅、镉等）

由于环境中的铅是使用时间最长、毒性最严重的元素之一，直到最近才停止对它的不顾后果的使用，所以对环境中从不同的角度探讨铅对出生缺陷的研究相对较多。研究认为母亲受到铅污染时，新生儿低体重和出生神经管缺损的风险很大（Irgens, 1998）。

3. 辐射

随着电视、电脑、微波炉和手机等的普及使用，电磁辐射污染逐渐引起人们的关注。刘欣燕等（2007）研究发现，平均每周看电视 10h 以上，使用电脑 45h 以上，经常使用复印机、微波炉和手机，生活环境附近有高压线等电磁辐射装置，可能是导致早期自然流产的危险因素。董翠英（2004）报道，视频显示终端（visual display terminal, VDT）接触组先兆流产、自然流产发生率显著高于对照组。Smith 等（1997）研究显示，暴露于 VDT 可能引起子代先天畸形、围产期死亡、胎儿宫内发育迟缓等，还可增加不孕的危险性。

4. 致畸性化学物质

最近有文献表明（Aguilar 等，2010），无论是父亲还是母亲的职业与有机溶剂暴露有关，都将增加后代无脑儿的发病风险。某些多环芳香碳氢化合物，某些亚硝基化合物，某些烷基和苯类化合物可导致胎儿发生神经管缺陷（Wennborg, 2005）。广泛使用的有机氯农药污染，制造塑料制品过程中使用的添加剂、增塑剂等，与先天性发育缺陷升高有关，如果在胚胎早、中期受到此类物质的作用则可导致性别分化的障碍和生殖系统畸形（张惠玲，2008）。

在众多有害化学物质中，持久性有机污染物（Persistent Organic Pollutants, POPs）是对人体造成极其严重影响的一类环境化学物质。

POPs 指在环境中具有难降解性、较强亲脂性和生物毒性，能通过生物食物链（网）累积、并对人类健康造成有害影响的化学物质。POPs 对生态环境和人体健康的影响是目前最受关注的问题之一。其中多环芳烃（polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs）是环境中最常见，也是危害最为严重的持久性有机污染物之一。PAHs 是人类最早发现的环境污染物和致癌物质，普遍存在于空气、食物和饮用水中，是一类广泛存在的具有致癌、致畸和致基因突变“三致”特性的

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库