

ALAD genotype

†, , , , ,

Relationship on the lead exposure indices and symptoms by ALAD genotype in lead worker

Kyu Dong Ahn[†] · Jong Chun Lee · Kwang Sung Cho · Jin Ho Kim · Sung Soo Lee · Byung Kook Lee

Institute of Industrial Medicine, Soonchunhyang University

A cross-sectional study was performed to evaluate associations between lead biomarkers, lead-related symptoms, and δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) genotype among 598 lead workers and 144 control office workers in storage battery industries, secondary smelting and litharge making industries. Lead inhibits the second enzymes, ALAD, in the heme synthesis pathway. ALAD gene, which codes for one of three isozymic proteins (termed ALAD1-1, ALAD1-2, and ALAD2-2), seems to modify the toxicokinetics of lead. The result as follows;

The percents of total workers whose genotype of ALAD1-1 and ALAD1-2 were 88.4% and 11.6%, respectively. The zinc protoporphyrin in blood (ZPP) and δ -aminolevulinic acid in urine (ALAU) of lead workers with ALAD1-2 were significantly lower than those of lead workers with ALAD1-1, but there were no significant difference between two genotype

for blood lead, age, and work duration.

The proportion of ALAD1-2 genotype in control office workers was 13.2%. The proportions of ALAD1-2 genotype of lead workers were 14.0%(their mean air lead level below $0.024\text{mg}/\text{m}^3$), 10.4%($0.025\text{--}0.049\text{mg}/\text{m}^3$), 11.8%($0.050\text{--}0.099\text{mg}/\text{m}^3$), and 9.4%(above $0.100\text{mg}/\text{m}^3$), respectively.

In the logistic analysis of 15 lead related symptoms, 'arthralgia'(S7) symptom of ALAD1-2 was significantly lower (OR=0.481; 95% CI=0.248-0.932) than that of ALAD1-1, but 'feeling of irritation'(S11) of ALAD1-2 was significantly higher(OR=1.636; 95% CI=1.035-2.586) than that of ALAD1-1 after controlling possible confounder (blood lead, work duration, smoking and drinking habit).

Key Words : lead exposure indices, symptoms, ALAD genotype, lead worker

I.

1960

* 2000 (, 1996)
: 2001 5 6 , : 2001 8 3
† : (1970 1980
Tel : 041-570-2481, Fax : 041-573-4521, E-mail : akdong@sch.ac.kr)

연구되었던 시점 이전의 우리나라 근로자들의 일반적인 영양상태와 건강상태, 그리고 당시의 우리나라 산업의학 수준을 반영하였던 것으로서 현재 우리나라 근로자들의 그것들과는 현격한 차이가 있음은 거론할 필요조차 없다. 한편 이러한 과도한 연흡수가 확인되는 근로자들의 연 노출에 따른 증상들의 변화는 기존의 연 노출지표들과의 관련성의 확인이 잘 이루어지지 않고 있어 근로자들의 건강관리를 소홀히 하는 경우가 있으므로 연흡수와 관련된 새로운 biomarkers를 찾으려는 노력들이 있어왔다.

이러한 요구에 따라서 연구자들은 개인의 유전인자와 직업적 혹은 환경적 노출과의 상호관계를 찾으려는 분자생물학적 연구가 산업보건 분야에서도 새로운 과제로 제기되고 있다. Wetmur(1991a;b)와 Potluri (1987) 등은 적혈구의 조혈계의 작용효소인 δ -aminolevulinic acid dehydratase에는 두 개의 대립유전자(alleles: ALAD1-1와 ALAD1-2) 형이 있어 이들 유전자형이 연의 독성과 동력학적 독성에 영향을 준다고 보고한 바 있다.

Schwartz 등(1995)은 우리나라 연축전지 사업장의 근로자를 대상으로 ALAD를 확인한 바 ALAD1-2의 이형성 유전형질을 가진 근로자의 분포가 11.1%라고 보고하였으나 개별 사업장 별로 이 이형성의 유전자 분포가 20%, 22%로 각각 다른 것으로 나타나 있다. 또한 이들은 이형 유전자인 ALAD1-2를 가진 근로자들이 ALAD1-1을 가진 근로자에 비하여 6년 이상 근무경력에서 유의한 비차비(OR)를 가진 것으로 보고하여 혈중 연이 높은 경우에도 이 이형성 유전자를 가진 근로자가 연에 의한 영향이 적은 것이 아닌가하는 가설을 제기하고 있다. 우리나라에서는 일부 연구자(김우형, 1999)가 특정 연 취급 사업장 근로자를 대상으로 이들 유전자형의 빈도와 특성을 조사한 적이 있으며, 이병국 등(1999)이 ALAD의 유전형질이 혈중 zinc protoporphyrin량과 δ -aminolevulinic acid 배설량에 미치는 영향에 대하여 보고한 적이 있다. 그러나 공기 중 연에 의한 농도에 따른 이 효소의 유전

자 근로자들의 분포를 조사한 경우는 없었다. 한편 Bergdahl 등(1997)은 89명의 연 노출 근로자와 34명의 대조군의 뇨중 칼슘과 크레아틴의 농도는 ALAD1-1 대상자보다 ALAD1-2대상자에서 더 낮았다고 보고하면서 신장기능에서의 특이적 차이가 존재하는 것으로 시사된다고 하였다.

따라서 본 연구는 연을 취급하는 근로자들에서의 공기중 연노출 정도를 측정하면서 동시에 이들 근로자들의 ALAD gene type을 검사하여, 연 노출 정도에 따라 이 유전자 형질의 분포가 어떠한가를 확인하며, 이 두 가지 대립 유전자 형이 근로자들의 연 노출에 의해 어떤 자각증상에 어떻게 영향을 주는가를 확인하며, 특히 만성적 연 노출 근로자들의 신기능 영향을 추적하는 아주 중요한 지표가 될 수 있는가를 확인하고자 한다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 축전지 제조업, 연분 제조 및 플라스틱 안정제 제조, 그리고 2차 체련업체를 포함한 3개 사업장으로부터 사무직 근로자 144명과 생산직 근로자 598명, 계 742명을 연구대상으로 하였다.

2. 연구내용 및 방법

1) 근로자의 연노출 조사; 조사대상 사업장에 대하여 근로자들의 공기중 연 농도 측정은 정기적인 연 2회 작업환경측정에서의 결과를 부서별로 평균하여 해당 부서별 근로자들의 노출 농도로 하였다. 그러나 사무직 근로자에 대한 작업환경측정을 하지 못하였다.

2) 공기중 연농도 측정; 공정별 단위작업장을 정하여 작업환경측정규정(노동부, 2001)에 명시된 근로자 수에 따른 필요한 시료 수를 personal air sampler를 이용하여 분당 2리터의 유속으로 시료를 채취한 다음과 같은 전처리를 하여 분석은 ICP

-7500(Shimadzu, Japan)을 이용하여 분석하였다.

① cassette holder를 제거하고 시료채취 여과지와 공시료를 각각 비이커에 옮기고 유리덮개를 덮는다.

② 비이커에 회화용액 5ml를 넣고 실온에서 30분 정도 방치한 후 가열판을 120°C 정도에서 용량이 0.5ml 정도 남을 때까지 가열한다. 회화용액 2ml를 다시 첨가하여 가열시킨다. 회화용액이 투명해질 때까지 이 과정을 반복한다.

③ 증류수로 비이커와 유리덮개를 행군 다음, 이 용액이 0.5ml 정도가 될 때까지 증발시킨다.

④ 회석용액 2-3ml를 비이커에 가해 잔유물을 용해시킨 다음 10ml 용량 플라스크로 옮긴 후 회석용액을 가해 10ml가 되게 한다.

⑤ ICP를 사용하여 검량선을 작성하고, 전처리 한 시료를 분석한다. ICP의 분석조건은 다음과 같다.

- Power
1.0 kW
- Plasma gas flow
15.0 L/min
- Auxiliary gas flow
1.5 L/min
- Spray chamber type
glass cyclonic
- Torch
Standard axial torch with 2.3mm ID injector
- Nebulizer
High flow microconcentric nebulizer
- Pump speed
15 rpm
- Sample up take rate
160 μ l/min
- No. of replicates
3

3) δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) 유전형질의 분석(Wetmur 등, 1991)

① DNA 추출방법; 정맥혈을 항응고제인 15%-K₃-EDTA Vacutainer에 채혈하여 dry ice로 냉동하여 운반한 후 nitrogen

tank . DNA 200 C, 10unit/ $\mu\ell$ incubation buffer(SURE/ 5) ZPP; portable hema-
 $\mu\ell$ 1.5M centrifuge tube cut 5 buffer) 5 $\mu\ell$ PCR tube tofluorometer (Aviv model 206, U.S.A)
25 $\mu\ell$ QIAgen protease K 200 $\mu\ell$ AL DNA 20 $\mu\ell$ 가 spectrum 423 nm
(prepare) buffer 70 50 $\mu\ell$ 37 (Blumberg, 1977).
10 . isopro- 24 .
panol(96-100%) 210 $\mu\ell$ 가 5 agarose gel ; 10 $\mu\ell$ 6) -amino levulinic acid(ALAU);
, 8,000rpm 0.5 $\mu\ell/\mu\ell$ ethidium bromide가 spot urine HPLC
. 2M collection tube 1.5% agarose gel TBE buffer(Tris base (, 1996).
QIAamp spin column 0.089M, boric acid 0.089M, EDTA 0.002M) 7) ;
, 8,000rpm 150V 40 15
filter . gel UV-trans-illuminator 가
DNA 139-473 (1).
AW(wash) buffer DNA
8,000rpm 1 2 DNA
, 13,000rpm 2 DNA
. ALAD 1-1, 1-2, 2-2
QIAamp spin column AW(elution) 가 1.
buffer 200 $\mu\ell$ 70 incubation
1 filter
8,000rpm 1 ALAD1-1 473, 271, 158, 139 1 742
DNA가 ALAD1-2 473, 402, ALAD1-1 656 88.4%
(polymerase chain reaction: 271, 158, 139 , ALAD1-2 86 11.6%
ALAD2-2 402, 271, 158, 139 . ALAD2-2 가
PCR) 가 1 ALAD1-2
(PCR);
Bio RAD Thermal Gene
Cycler(Serial No. 10596) primer
OPERON(Operon Inc., CA U.S.A)
oligonucleotide primer
4 $\mu\text{g}/\mu\ell$. primer
. ALAD-A : 5'-CCC AAC CAT CCC TCT
CAG TC-3'
ALAD-B : 5'-CCC AAC CTC CCT TCC
TTT TT-3'
10
PCR buffer 5 $\mu\ell$, 0.2mM-dNTP 1 $\mu\ell$,
1-5u/100 $\mu\ell$ Taq DNA polymerase 0.3
 $\mu\ell$ (5unit/ $\mu\ell$) .
primer A 1 $\mu\ell$ (200 $\mu\text{g}/\mu\ell$)
primer B 1 $\mu\ell$ /200 $\mu\text{g}/\mu\ell$) template
DNA 3 $\mu\ell$ (<1 $\mu\text{g}/100\mu\ell$ 10⁵-10⁶ copies)
50 $\mu\ell$.
DNA ;
MspI 2 $\mu\ell$ (sequence GGC

Table 1. List of lead-related symptoms

Symptoms	
S1	Recent loss of appetite
S2	Trouble with constipation or diarrhea
S3	Lower abdominal pain
S4	Intermittent pains in abdomen
S5	Tingling or numbness of arm or leg
S6	Weakness of wrist or ankle joint
S7	Joint pain or arthralgia
S8	Muscle pain
S9	Generalized weakness and fatigue
S10	Unable to sleep well at night
S11	Feeling of irritation at the slightest disturbance
S12	Loss of weight
S13	Difficulty in concentration
S14	Dizziness when standing suddenly
S15	Continuous headache

Table 2. Summary data for selected study variables by ALAD genotype

Variables		ALAD1-1(n=656)	ALAD1-2(n=86)	Total(n=742)
		Mean(SD)	Mean(SD)	Mean(SD)
Age(yrs)		37.3(8.2)	36.2(8.7)	37.2(8.2)
WD(yrs)		9.6(6.3)	8.6(6.2)	9.4(6.3)
PbB($\mu\text{g/dl}$)		23.4(12.4)	24.3(11.5)	23.5(12.3)
ZPP($\mu\text{g/dl}$)		51.8(30.0)	45.9(17.5) [*]	51.1(28.9)
ALAU($\mu\text{g/dl}$)		2.0(1.4)	1.7(0.6) [*]	1.9(1.3)
Sex(%)	Male	89.2	90.7	89.4
	Female	10.8	9.3	10.6
Smoke(%)	Yes	59.5	64.0	60.0
	No	40.5	36.0	40.0
Drink(%)	Yes	70.3	79.1	71.3
	No	29.7	20.9	28.7

WD : work duration PbB : blood lead ZPP : zinc protoporphyrin

ALAU : urinary α -amino levulinic acid * : $p < 0.05$

Table 3. Distribution of genotype(ALAD1-1 vs ALAD1-2) by lead exposed level

Genotype	Concentration level of exposed lead(mg/m ³)				
	office worker	- 0.024	0.025-0.049	0.050-0.099	0.100-
ALAD1-1	125(86.8)	49(86.0)	86(89.6)	261(88.2)	135(90.6)
ALAD1-2	19(13.2)	8(14.0)	10(10.4)	35(11.8)	14(9.4)
Total	144(100.0)	57(100.0)	96(100.0)	296(100.0)	149(100.0)

² = 1.539 p = 0.820

Table 4. Adjusted odd ratio and 95% confidence interval of lead-related symptoms (presence vs. absence) by genotype (ALAD1-1=0; ALAD1-2=1)

Symptoms	Adjusted OR	95% Confidence interval
S1 Recent loss of appetite	1.135	0.623 2.068
S2 Trouble with constipation or diarrhea	1.209	0.649 2.254
S3 Lower abdominal pain	0.963	0.531 1.749
S4 Intermittent pains in abdomen	0.193	0.026 1.426
S5 Tingling or numbness of arm or leg	1.168	0.720 1.894
S6 Weakness of wrist or ankle joint	0.961	0.552 1.674
S7 Joint pain or arthralgia	0.481	0.248 0.932
S8 Muscle pain	0.634	0.282 1.426
S9 Generalized weakness and fatigue	1.049	0.666 1.653
S10 Unable to sleep well at night	1.622	0.930 2.829
S11 Feeling of irritation at the slightest disturbance	1.636	1.035 2.586
S12 Loss of weight	1.249	0.720 2.167
S13 Difficulty in concentration	1.263	0.774 2.059
S14 Dizziness when standing suddenly	1.035	0.627 1.706
S15 Continuous headache	1.430	0.672 3.043

OR=0.481, 95% CI=0.248-0.932 Caucasian 10%, African-American 3%, Asian 6%, Wetmur (1994) Caucasian ALAD1-2

ALAD1-2 OR=1.636, 95% CI=1.035-2.586 ZPP, ALA

(1999) 1 40 μ g/dl 262 ALAD

194 ALAD1-2 98% 8.4%, 6.0% 40 μ g/dl (Simons, 1993), ALA

hemoglobin (Lolin Gorman, 1988). ALAD1-2 가 가 Schwartz (1995) 3 290

-aminolevulinic acid dehydratase -aminolevulinic acid(ALA) 가 , 2 40 μ g/dl heme 가 . Schwartz (1995) logistic 3 308

ALAD1-1 ALAD1-2, ALAD2-2 ALAD1-2 가 (polymorphism) (Wetmur, 1994). 22.2% 8.6%, 20.0%, 가

가 가 가 ZPP ALA Alexander (1998) 134 (2000) 263 ALAD Lee (2000) , ZPP ALA, DMSA-cheletable lead median logistic

ALAD1-1 85%, ALAD1-2 15% 85.9%, ALAD1-2 14.1% ALAD1-2 가 DMSA-cheletable lead

ZPP ALAD1-2 11.6% Benkmann (2000) S7 " " ALAD1-2

(1983) , , 88.9%, 94.2%, ALAD1-2 가 S11 " " ALAD1-2 100.0% ALAD1-1 , , ad- (1997) ALAD1-2 ALAD2-2 justed odd ratio가

(1999)
 “ (tibial lead) 가 .
 ALAD 3. ALAD1-2 가
 ”
 ALAD 가 1/2 14.0% 가
 ZPP ALA ,
 13.2%, 0.05-0.099mg/m³
 가 11.8%, 0.025-0.049mg/m³
 10.4% , 2
 9.4% 가
 4. 15
 가 , , ,
 ALAD ALAD1-1
 가 , ALAD1-2
 . (odds ratio) logistic
 S7 "
 “가 ALAD1 -1
 OR=0.481, 95%
 CI=0.248-0.932 ,
 -amino S11 "
 levulinic acid dehydratase(ALAD) " ALAD1-2
 heme OR=1.636, 95% CI=1.035-2.586
 . ALAD1-1
 ALAD1-2 가

REFERENCES

1. 742 ALAD1-1 가 656 (88.4%) ALAD .
 , ALAD1-2 86 (11.6%) .
 1999.
 2. ZPP .
 ALA ALAD1-2 , 1996
 (p<0.05), .
- (2001-20). ,
 2001
 , , , , ,
 , .
 HPLC
 -ALA
 .
 1996; 6: 77-87
 , , , , ,
 , , , , ,
 .
 -aminolevulinic acid dehydratase
 zinc protoporphyrin aminolevulinic acid
 .
 . 1999; 5(1): 25-32
- Alexander BH, Silva M, Checkoway H, Costa-Mallen P, Faustman EM, Woods JS, Kelsey KT, Netten C, Costa LG. Interaction of blood lead and -aminolevulinic acid dehydratase genotype on markers of heme synthesis and sperm production in lead smelter workers. *Environmental Health Perspective* 1998; 106(4): 213-216
- B.K Lee, K.D. Ahn, S.S. Lee, G.S. Lee, Y.B. Kim, B.S. Schwartz. A comparison of different lead biomarkers in their associations with lead-related symptoms. *Int. Arch. Occup Environ Health* 2000; 73(5): 298-304
- Benkmann HG, Bogdanski P, Goedde HW. Polymorphism of delta-aminolevulinic acid dehydratase in various populations. *Hum Hered* 1983; 33: 62-64
- Bergdahl IA, Desnick RJ, Wetmur JG, Skerfving SW. Delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: Influence on lead levels and kidney function in humans. *Archives of Environmental Health* 1997; 52(2): 91-96
- Blumberg WE, Eisinger J, Lamola AA, Zuckermann DM. Zinc protoporphyrin level in blood determination by a portable hematofluorometer; A screening device for lead poisoning. *J*

- Lab Lin Med 1977; 89: 712-723
- Fernandez FJ. Micromethod for lead determination in whole blood by atomic absorption with use of graphite furnace. Clin Chem 1975; 21: 555-561
- Lolin Y, O' Gorman P. An intra-erythrocytic low molecular weight lead-binding protein in acute and chronic lead exposure and its possible protective role in lead toxicity. Ann Clin Biochem 1988; 25: 688-697
- Potluri VR, Astrin KH, Wetmur JK, Wetmur JG, Bishop DF, Desnick RJ. Human δ -aminolevulinic acid dehydratase: chromosomal localization to 9q34 by in situ hybridization. Human Genetics 1987; 76: 236-239
- Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, Ahn KD, Springer K, Kelsey K. Associations of δ -aminolevulinic acid dehydratase genotype with plant, exposure duration, and blood lead and zinc protoporphyrin levels in Korean lead workers. Am J Epidemiol 1995; 142(7): 738-745
- Simons TJB. Lead transport and binding by human erythrocytes in vitro. Pflugers Arch 1993; 423: 307-313
- Sithisarankul P, Schwartz BS, Lee BK, Kelsey KT, Strickland PT. Aminolevulinic acid dehydratase genotype mediates plasma levels of the neurotoxin, 5-aminolevulinic acid, in lead-exposed workers. Am J Ind Med 1997 Jul; 32(1): 15-20
- Wetmur JG, Kaya AH, Plewinska M, Desnick RJ. Molecular characterization of the human δ -aminolevulinic acid dehydratase 2 (ALAD²) allele: implications for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning. Am J Hum Genet 1991; 49: 757-763
- Wetmur JG, Lehnert G, Desnick RJ. The δ -aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: Higher blood lead levels in lead workers and environmentally exposed children with the 1-2 and 2-2 isozymes. Environ Res 1991; 56: 109-119
- Wetmur JG. Influence of the common human δ -aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on lead body burden. Environ Heal Persp 1994; 102(3): 215-219