

· 论 著 ·

六价铬诱发rDNA拷贝数变异对不同细胞系DNA损伤反应的影响

吴帆¹, 冯玲芳¹, 陈俊斐¹, 蒋兆强¹, 龚晓雪¹, 秦瑶¹, 楼建林²

1. 杭州医学院公共卫生学院, 浙江 杭州 310013; 2. 湖州师范学院, 浙江 湖州 313000

摘要: **目的** 观察六价铬暴露致rDNA拷贝数变异对不同细胞系DNA损伤反应的影响, 为六价铬诱发rDNA拷贝数变异参与DNA损伤反应过程的研究提供思路和方法。**方法** 人正常肺上皮细胞(BEAS-2B)和人胚肺细胞(MRC-5)采用2 $\mu\text{mol/L}$ 重铬酸钾10 μL 染毒, 24 h后去毒, 置于新鲜培养基继续孵育, 对照组用等体积磷酸盐缓冲液处理; 收集染毒24 h、去毒后3 d和去毒后7 d的细胞, 采用实时荧光定量PCR法检测rDNA拷贝数; 采用Muse细胞分析仪检测细胞周期、细胞凋亡和DNA损伤情况, 通过共济失调毛细血管扩张突变基因(ATM)激活率、DNA双链断裂率和彗体组蛋白(H2A.X)磷酸化率评估DNA损伤情况。**结果** MRC-5细胞背景45S rDNA (1.54 ± 0.26)和5S rDNA拷贝数 (6.97 ± 1.07) 高于BEAS-2B细胞 (1.02 ± 0.18 和 3.00 ± 0.15) (均 $P < 0.05$)。去毒后3 d, MRC-5细胞45S rDNA拷贝数 (0.80 ± 0.04) 低于对照组, BEAS-2B细胞45S rDNA拷贝数 (1.43 ± 0.07) 高于对照组 (均 $P < 0.05$)。MRC-5细胞染毒24 h时发生G0/G1期阻滞, 去毒后3 d和去毒后7 d总凋亡率 ($11.53\% \pm 1.53\%$ 和 $18.33\% \pm 0.70\%$) 高于对照组 ($3.53\% \pm 0.93\%$) (均 $P < 0.05$); BEAS-2B细胞染毒24 h和去毒后3 d总凋亡率 ($2.80\% \pm 0.17\%$ 和 $3.33\% \pm 0.57\%$)、去毒后3 d时ATM激活率 ($3.37\% \pm 0.67\%$)、DNA双链断裂率 ($4.45\% \pm 0.85\%$) 和H2A.X磷酸化率 ($1.68\% \pm 0.56\%$) 均高于对照组 ($1.53\% \pm 0.61\%$ 、 $1.18\% \pm 0.22\%$ 、 $0.97\% \pm 0.21\%$ 和 $0.29\% \pm 0.06\%$) (均 $P < 0.05$)。**结论** 六价铬诱发rDNA拷贝数变异对不同细胞系DNA损伤反应的影响不同, 背景rDNA拷贝数较低的BEAS-2B细胞反应更明显, 而背景rDNA拷贝数较高的MRC-5细胞相对稳定。

关键词: 六价铬; 核糖体DNA; 拷贝数变异; DNA损伤反应;

中图分类号: R114

文献标识码: A

文章编号: 2096-5087 (2023) 05-0374-06

Effect of hexavalent chromium-induced ribosomal DNA copy number variation on DNA damage response in various cell lines

WU Fan¹, FENG Lingfang¹, CHEN Junfei¹, JIANG Zhaoqiang¹, GONG Xiaoxue¹, QIN Yao¹, LOU Jianlin²

1. School of Public Health, Hangzhou Medical College, Hangzhou, Zhejiang 310013, China; 2. Huzhou University, Huzhou, Zhejiang 313000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of ribosomal DNA (rDNA) copy number variation caused by hexavalent chromium exposure on DNA damage response in different cell lines, so as to provide insights into the involvement of hexavalent chromium-induced rDNA copy number variation in DNA damage responses. **Methods** Human lung epithelial BEAS-2B cells and human embryonic lung MRC-5 cells were treated with 2 $\mu\text{mol/L}$ potassium dichromate for 24 hours, and then cells were transferred to fresh media for further incubation, while cells treated with the same volume of phosphate buffer solution served as controls. Cells treated with potassium dichromate for 24 hours, and 3 and 7 days post-detoxification, were harvested, and rDNA copy number was quantified in cells using a quantitative fluorescent real-

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2023.05.002

基金项目: 中国疾病预防控制中心化学污染与健康安全重点实验室开放基金 (2023CDCKL02); 国家自然科学基金项目 (81872602)

作者简介: 吴帆, 硕士研究生在读

通信作者: 楼建林, E-mail: jianlinlou@163.com

time PCR assay. Cell cycle, apoptosis and DNA damage were detected using a Muse cell analyzer, and the DNA damage was evaluated with the proportion of ataxia telangiectasia-mutated (ATM) gene activation, proportion of double-strand DNA breaks and the percentage of the H2A.X variant histone phosphorylation. **Results** The 45S and 5S rDNA copy numbers of were significantly higher in MRC-5 cells than in BEAS-2B cells [(1.54±0.26) vs. (1.02±0.18), $P<0.05$; (6.97±1.07) vs. (3.00±0.15), $P<0.05$]. The 45S rDNA copy number was lower in MRC-5 cells 3 days post-detoxification (0.80±0.04) than in controls ($P<0.05$), and was higher in BEAS-2B cells 3 days post-detoxification (1.43±0.07) than in controls ($P<0.05$). G0/G1 phase arrest was found in MRC-5 cells 24 hours post-treatment, and the apoptotic rates were significantly higher in MRC-5 cells 3 and 7 days post-detoxification than in controls [(11.53±1.53)%, (18.33±0.70)% vs. (3.53±0.93)%, $P<0.05$]. The overall apoptotic rates 24 hours post-treatment and 3 days post-detoxification [(2.80±0.17)%, (3.33±0.57)% vs. (1.53±0.61)%, $P<0.05$], proportion of ATM gene activation 3 days post-detoxification [(3.37±0.67)% vs. (1.18±0.22)%, $P<0.05$], proportion of double-strand DNA breaks 3 days post-detoxification [(4.45±0.85)% vs. (0.97±0.21)%, $P<0.05$] and percentage of the H2A.X variant histone phosphorylation 3 days post-detoxification [(1.68±0.56)% vs. (0.29±0.06)%, $P<0.05$] in BEAS-2B cells were higher than in controls. **Conclusions** Hexavalent chromium-induced rDNA copy number variation affects DNA damage response in different cell lines. A stronger DNA damage response is found in BEAS-2B cells with a low rDNA copy number, and a relative stable response is observed in MRC-5 cells with a high rDNA copy number.

Keywords: hexavalent chromium; ribosomal DNA; copy number variation; DNA damage response

铬是自然界普遍存在的一种重金属,主要用于制革、镀铬、化工、采矿和钢铁等行业,六价铬是铬中毒性最强的价态,已被列为第一类职业致癌物^[1]。六价铬化合物通过吸入、皮肤接触和口服方式被人体吸收^[2],长时间暴露可导致皮炎、支气管炎、肺充血水肿、胃肠溃疡、肝肾损害,甚至鼻咽癌或肺癌等^[3-5]。有研究表明,六价铬暴露可引发核糖体DNA (ribosomal DNA, rDNA) 拷贝数变异(扩增、缺失)^[6]。

rDNA是指位于13、14、15、21和22号染色体上的45S rDNA (编码18S、5.8S和28S rRNA)和位于1号染色体上的5S rDNA^[7]。rDNA位点是基因组维持稳定的重要因素^[8],rDNA重复序列损伤可引起rDNA拷贝数变异,进而触发DNA损伤反应^[9-10]。rDNA拷贝数变异可能与肿瘤等多种疾病密切相关,WANG等^[11]在胃癌、肺腺癌、卵巢癌等肿瘤及配对正常组织全基因组数据中发现5S rDNA片段扩增和45S rDNA片段缺失,伴有增殖速率提高和核仁活性增强。不同个体的rDNA拷贝数也存在较大差异,细胞背景rDNA拷贝数可能影响细胞对外界刺激的反应,从而影响相关疾病的发生^[12]。课题组前期实验发现,人正常肺上皮细胞(BEAS-2B)和人胚肺细胞(MRC-5)是背景rDNA拷贝数差异明显的2种细胞系,本研究拟通过体外实验探究六价铬暴露致rDNA拷贝数变异对这2种细胞DNA损伤反应的影响,为六价铬诱发rDNA拷贝数变异参与DNA损伤反应过程的研究提供思路和方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 BEAS-2B、MRC-5细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。CO₂培养箱(日本SANYO公司);倒置显微镜(日本Olympus公司);Ⅱ级生物安全柜、高速冷冻离心机、超微量分光光度计(美国Thermo Fisher公司);梯度PCR仪、实时荧光定量PCR仪(美国BioRad公司);Muse细胞分析仪(德国Merck Millipore公司)。胎牛血清(南美Bovogen Biological公司);DMEM培养基、MEM培养基、胰酶(美国Thermo Fisher公司);磷酸盐缓冲液(PBS)、DEPC水(北京兰杰柯科技有限公司);DNA提取试剂盒(德国Qiagen公司);RNAiso Plus、反转录试剂盒和荧光定量试剂盒(日本Takara公司);PCR引物(美国Thermo Fisher公司);细胞周期检测试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒、DNA损伤检测试剂盒(美国Luminex公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与染毒 BEAS-2B细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基,MRC-5细胞培养于含10%胎牛血清的MEM培养基、1%丙酮酸钠、1%NEAA(非必需氨基酸)和1%谷氨酰胺,并置于37℃、5%CO₂培养箱中。细胞按2×10⁵个/孔接种于6孔板,接种体积均为2 mL。孵育12 h后分别加入终浓度为2 μmol/L(细胞活力能保持在50%左右,便于后续实验)的重铬酸钾溶液10 μL,对照组加入等体积PBS,每种处理做3个重复。重铬酸钾溶液处理24 h后的细胞采用PBS清洗2遍去毒,对照组

加入等体积 PBS 处理, 分别收集染毒 24 h、去毒后 3 d 和去毒后 7 d 的细胞, 每个时间点做 3 个重复。

1.2.2 rDNA 拷贝数检测 按照试剂盒说明书提取 DNA, 以 TP53 为内参基因进行 PCR 扩增, 引物序列见表 1。反应体系: 2×SYBR®PremixExTaq II 10 μL, ROXReferenceDye II 0.4 μL, 正、反向引物各 0.4 μL; DNA 20 ng, 添加 ddH₂O 至 8.8 μL。反应条件: 95 ℃预变性 30 s; 95 ℃变性 3 s, 60 ℃退火 30 s, 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 计算 rDNA 拷贝数的相对表达量。45S rDNA 拷贝数为 18S、5.8S 和 28S rDNA 拷贝数的平均值。

表 1 rDNA 基因引物序列

Table 1 The primer sequences of rDNA gene amplification

基因	正向引物	反向引物
28S	GCGGGTGGTAACTCCATCT	CACGCCCTCTTGAACCTCTCT
18S	CGCGCTCTACCTTACCTACC	GGCCGTGCGTACTTAGACAT
5.8S	CGACTCTTAGCGGTGGATCA	GATCAATGTGTCCTGCAATTC
5S	TCGTCTGATCTCGGAAGCTAA	AAGCCTACAGCACCCGGTAT
TP53	TGTCCTTCCTGGAGCGATCT	CAAACCCCTGGTTTAGCACTTC

1.2.3 细胞周期检测 以 300×g 离心 5 min 后收集各组细胞, 弃上清液, 用 1 mL PBS 清洗后 300×g 离心 5 min, 弃上清液, 每 10⁶ 个细胞约留 50 μL PBS, 通过反复移液或轻轻涡旋将细胞颗粒重悬在残留的 PBS 中。将重悬细胞缓慢滴入含 1 mL 70% 冰乙醇 (-20 ℃预冷) 的离心管中, 同时以中速涡旋振荡, 置于 -20 ℃冰箱孵育过夜固定。加入 200 μL 固定的细胞到新管中, 300×g 离心 5 min 后弃上清液, 每管加入 500 μL PBS 洗涤 1 次后弃上清液, 加入 200 μL Muse Cell Cycle 试剂重悬, 室温下避光孵育 30 min 后使用 Muse 细胞分析仪检测细胞周期情况。

1.2.4 细胞凋亡检测 以 300×g 离心 5 min 后收集各组细胞, 弃上清液, 用 PBS 清洗 1 次后加入 100 μL 含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬, 然后加入 100 μL MuseAnnexinV&DeadCellKit 试剂并混匀, 避光孵育 20 min 后用 Muse 细胞分析仪检测细胞凋亡情况。

1.2.5 细胞 DNA 损伤检测 以 300×g 离心 5 min 后收集各组细胞, 弃上清液, 用 PBS 清洗 1 次后加入 200 μL 1×AssayBuffer 重悬细胞, 然后加入等量 Fixation Buffer 上下颠倒混匀, 冰上孵育 10 min。以 300×g 离心 5 min 后弃上清液, 加入 200 μL 预冷的 1×PermeabilizationBuffer 吹打重悬, 冰上孵育 10 min。再次离心弃上清液, 加入 90 μL 1×Assay-

Buffer 和 10 μL 抗体预混液, 避光孵育 30 min。加入 200 μL 1×AssayBuffer 重悬, 离心后弃上清液。加入 200 μL 1×AssayBuffer 重悬, 采用 Muse 细胞分析仪检测。通过共济失调毛细血管扩张突变基因 (ataxia telangiectasia-mutated gene, ATM) 激活率、DNA 双链断裂率和变体组蛋白 (H2A histone family member X, H2A.X) 磷酸化率反映 DNA 损伤情况。

1.3 统计分析 采用 SPSS 23.0 软件统计分析。定量资料服从正态分布, 采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MRC-5 与 BEAS-2B 细胞 rDNA 拷贝数变异分析 MRC-5 和 BEAS-2B 细胞背景 rDNA 拷贝数差异有统计学意义 (*P* < 0.05), MRC-5 细胞背景 45S、5S rDNA 拷贝数均高于 BEAS-2B 细胞, 见表 2。4 组细胞 45S rDNA 拷贝数比较, 差异有统计学意义 (均 *P* < 0.05); 去毒后 3 d, MRC-5 细胞 45S rDNA 拷贝数较对照组下降, BEAS-2B 细胞 45S rDNA 拷贝数较对照组上升 (均 *P* < 0.05), 见表 3。

表 2 MRC-5 与 BEAS-2B 细胞 rDNA 拷贝数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of rDNA copy numbers between MRC-5 and BEAS-2B cells ($\bar{x} \pm s$)

细胞系	45S rDNA 拷贝数	5S rDNA 拷贝数
MRC-5	1.54±0.26	6.97±1.07
BEAS-2B	1.02±0.18	3.00±0.15
<i>t</i> 值	2.808	6.374
<i>P</i> 值	0.048	0.003

表 3 4 组 MRC-5 与 BEAS-2B 细胞 rDNA 拷贝数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of hexavalent chromium on rDNA copy number between MRC-5 and BEAS-2B cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	45S rDNA 拷贝数		5S rDNA 拷贝数	
	MRC-5	BEAS-2B	MRC-5	BEAS-2B
对照组	1.00	1.00	1.00	1.00
六价铬染毒 24 h	1.20±0.06	1.13±0.10	1.09±0.10	1.03±0.12
去毒后 3 d	0.80±0.04 *	1.43±0.07 *	0.90±0.06	1.00±0.15
去毒后 7 d	1.08±0.11	1.16±0.07	1.01±0.23	0.99±0.13
<i>F</i> 值	19.650	13.290	1.082	0.066
<i>P</i> 值	0.001	0.002	0.410	0.977

注: *表示与对照组比较 *P* < 0.05, 对照组细胞 rDNA 拷贝数相对表量为 1.00。

2.2 MRC-5 与 BEAS-2B 细胞周期变化分析 4 组 MRC-5 细胞比例比较, 差异有统计学意义 (均 $P<0.05$); 六价铬染毒 24 h 时 MRC-5 细胞发生 G0/G1 期阻滞, G0/G1 期细胞比例高于对照组, 而 G2/M 期细胞比例低于对照组 (均 $P<0.01$)。各组 BEAS-2B 细胞比例比较, 差异均无统计学意义 (均 $P\geq 0.05$)。见表 4。

表 4 4 组 MRC-5 与 BEAS-2B 细胞比例比较 ($\bar{x}\pm s/\%$)
Table 4 Cell cycle variation between MRC-5 and BEAS-2B cells post-exposure to hexavalent chromium ($\bar{x}\pm s/\%$)

组别	MRC-5 细胞比例			BEAS-2B 细胞比例		
	G0/G1 期	S 期	G2/M 期	G0/G1 期	S 期	G2/M 期
对照组	39.65±4.38	7.43±0.07	30.60±2.16	59.66±4.14	11.50±2.88	24.99±6.90
六价铬染毒 24 h	56.07±1.74 ^a	7.31±0.08	22.54±0.67 ^a	57.62±0.95	13.72±0.91	25.34±1.94
去毒后 3 d	44.20±1.34	7.35±0.07	27.70±0.86	47.94±4.39	9.52±0.30	36.47±4.31
去毒后 7 d	39.07±5.98	9.79±1.86	32.86±3.51	50.44±0.91	8.57±0.34	31.08±1.69
F 值	12.490	5.084	13.100	6.602	4.478	3.247
P 值	0.002	0.029	0.002	0.050	0.090	0.143

注: ^a表示与对照组比较 $P<0.01$ 。

2.3 MRC-5 与 BEAS-2B 细胞凋亡分析 MRC-5 细胞在去毒后 7 d 时早期凋亡率, 去毒后 3 d、7 d 时晚期凋亡率和总凋亡率均高于对照组 (均 $P<0.05$)。BEAS-2B 细胞染毒 24 h 时早期凋亡率、去毒后 3 d 时晚期凋亡率、染毒 24 h 和去毒后 3 d 时总凋亡率均高于对照组 (均 $P<0.05$)。见表 5。

表 5 4 组 MRC-5 与 BEAS-2B 细胞凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s/\%$)
Table 5 Comparison of apoptosis between MRC-5 and BEAS-2B cells post-exposure to hexavalent chromium ($\bar{x}\pm s/\%$)

组别	MRC-5 细胞凋亡率			BEAS-2B 细胞凋亡率		
	早期	晚期	总计	早期	晚期	总计
对照组	0.83±0.31	2.70±0.70	3.53±0.93	0.20±0.17	1.33±0.45	1.53±0.61
六价铬染毒 24 h	0.87±0.06	3.10±0.30	3.97±0.31	0.75±0.15 ^a	2.05±0.23	2.80±0.17 ^a
去毒后 3 d	2.02±0.50	9.85±0.87 ^a	11.53±1.53 ^a	0.15±0.05	3.18±0.60 ^a	3.33±0.57 ^a
去毒后 7 d	5.10±0.85 ^a	13.20±0.26 ^a	18.33±0.70 ^a	0.23±0.06	2.33±0.50	2.57±0.51
F 值	44.880	228.400	156.400	16.110	8.027	6.908
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.009	0.013

注: ^a表示与对照组比较 $P<0.05$ 。

2.4 MRC-5 与 BEAS-2B 细胞 DNA 损伤分析 4 组 MRC-5 细胞 ATM 激活率、DNA 双链断裂率比较, 差异有统计学意义 (均 $P<0.05$); 去毒后 3 d、7 d 的 ATM 激活率高于对照组 (均 $P<0.05$)。各组 BEAS-2B 细胞 ATM 激活率、DNA 双链断裂率和 H2A.X 磷酸化率比较, 差异有统计学意义 (均 $P<0.05$); 染毒 24 h 的 DNA 双链断裂率, 去毒后 3 d 的 ATM 激活率、DNA 双链断裂率和 H2A.X 磷酸化率, 去毒后 7 d 的 ATM 激活率均高于对照组 (均 $P<0.05$)。见表 6。

3 讨论

六价铬是一种极易被人体吸收的职业性肿瘤致癌物, 具有强氧化性^[13]。研究表明, 电离辐射和复制应激等外源性 DNA 损伤剂造成 rDNA 损伤后, 其转录受到抑制, 导致 rDNA 不稳定, 引起拷贝数变异, 进而诱发核仁应激, 触发 DNA 损伤反应^[14]。DNA 损伤反应参与调节 DNA 损伤识别、DNA 修复因子招募、DNA 修复途径的启动和协调、细胞周期转运和细胞凋亡信号通路, 是细胞为了抵御 DNA 损伤造成

表 6 4 组 MRC-5 与 BEAS-2B 细胞 DNA 损伤情况比较 ($\bar{x}\pm s/\%$)
Table 6 Comparison of DNA damage between MRC-5 and BEAS-2B cells post-exposure to hexavalent chromium ($\bar{x}\pm s/\%$)

组别	ATM 激活率		DNA 双链断裂率		H2A.X 磷酸化率	
	MRC-5	BEAS-2B	MRC-5	BEAS-2B	MRC-5	BEAS-2B
对照组	0.32±0.05	1.18±0.22	1.00±0.36	0.97±0.21	0.45±0.28	0.29±0.06
六价铬染毒 24 h	0.19±0.08	1.67±0.22	0.86±0.13	2.69±0.47 ^a	0.20±0.10	0.58±0.16
去毒后 3 d	1.62±0.54 ^a	3.37±0.67 ^a	1.77±0.41	4.45±0.85 ^a	0.49±0.24	1.68±0.56 ^a
去毒后 7 d	1.40±0.32 ^a	4.03±1.25 ^a	1.04±0.18	1.46±0.23	0.41±0.09	0.68±0.09
F 值	16.120	10.500	5.691	28.080	1.289	12.390
P 值	0.001	0.004	0.022	<0.001	0.343	0.002

注：^a表示与对照组比较 $P<0.05$ 。

的伤害而进化出的一种防御机制^[15]。本研究针对背景 rDNA 拷贝数不同的细胞系，观察六价铬诱发 rDNA 拷贝数变异参与 DNA 损伤反应的过程。

MRC-5 细胞背景 rDNA 拷贝数高于 BEAS-2B 细胞，采用 2 $\mu\text{mol/L}$ 六价铬染毒 24 h 再去毒 3 d 后，BEAS-2B 细胞 45S rDNA 拷贝数高于对照组，而 MCR-5 细胞 45S rDNA 拷贝数低于对照组。rDNA 拷贝数在一个物种内的个体之间，甚至在同一个体内的细胞之间都存在较大差异^[16]，而且与 mRNA 转录不同，rRNA 不能通过翻译多轮扩增循环^[17]。提示细胞背景 rDNA 拷贝数较高可提供足够的 rRNA 来源，以维持 rDNA 拷贝数，为细胞维持稳态并快速适应环境刺激提供了一种可能的分子机制。

研究结果显示，MRC-5 细胞用六价铬染毒 24 h 时细胞周期阻滞在 G0/G1 期，且细胞凋亡率随着去毒时间的延长而增加，ATM 激活率也在去毒后 3 d 时增加；BEAS-2B 细胞在染毒 24 h 时早期凋亡率、总凋亡率和 DNA 双链断裂率增加，去毒后 3 d 时晚期凋亡率、总凋亡率、ATM 激活率、DNA 双链断裂率和 H2A.X 磷酸化率也增加。在细胞周期进程中，当细胞内监控成分检测到细胞 DNA 损伤时，会立即启动修复机制对其进行修复，然后再继续完成细胞周期。如果不能修复，则会启动细胞周期检测点使细胞周期阻滞，以便给细胞足够的时间修复损伤。当损伤太过严重而无法修复时，细胞凋亡机制被激活，导致细胞的程序性死亡^[18]。ATM 是 DNA 损伤修复过程中关键的蛋白激酶，参与激活细胞周期、DNA 损伤修复和转录调节等^[19]。由此推断六价铬导致 MRC-5 细胞和 BEAS-2B 细胞 rDNA 拷贝数变异可能与 DNA 损伤反应有关。另外，背景 rDNA 拷贝数较高的 MRC-5 细胞可能由于 G0/G1 期细胞周期阻滞，导致去毒后期凋亡水平升高；而背景 rDNA 拷贝数较

低的 BEAS-2B 细胞周期阻滞不明显，进入了 S 期复制，形成了 rDNA 拷贝数在去毒后 3 d 升高又随着细胞周期进程恢复到正常的过程。然而，rDNA 重复序列受到损伤时会通过与其他拷贝重组进行修复，引起复制叉的失控或倒塌，进而导致 DNA 双链断裂^[20]。因此，不同细胞在受到损伤时启动修复或凋亡程序还需进一步深入研究。

综上所述，六价铬暴露会导致 MRC-5 细胞和 BEAS-2B 细胞 rDNA 拷贝数变异，六价铬诱发 rDNA 拷贝数变异对这 2 种不同细胞系 DNA 损伤反应可产生不同影响，背景 rDNA 拷贝数较低的 BEAS-2B 细胞反应更明显，而背景 rDNA 拷贝数较高的 MRC-5 细胞在应对六价铬毒性时呈现相对稳定的状态，可能和参与 DNA 损伤反应调控的过程不同有关。

参考文献

[1] 郭心念, 童延, 贾君麟, 等. 六价铬对职业人群细胞周期相关基因表达的影响 [J]. 预防医学, 2017, 29 (7): 670-674.

[2] NOVOTNIK B, ŠČANČAR J, MILAČIČ R, et al. Cytotoxic and genotoxic potential of Cr (VI), Cr (III) -nitrate and Cr (III) -EDTA complex in human hepatoma (HepG2) cells [J]. Chemosphere, 2016, 154: 124-131.

[3] WELLING R, BEAUMONT J J, PETERSEN S J, et al. Chromium VI and stomach cancer: a meta-analysis of the current epidemiological evidence [J]. Occup Environ Med, 2015, 72 (2): 151-159.

[4] HESSEL E V S, STAAL Y C M, PIERSMA A H, et al. Occupational exposure to hexavalent chromium. Part I. Hazard assessment of non-cancer health effects [J/OL]. Regul Toxicol Pharmacol, 2021, 126 [2023-03-31]. <https://europepmc.org/article/MED/34563613>. DOI: 10.1016/j.yrtph.2021.105048.

[5] 朱瑞瑞, 李宁宁, 贾光, 等. 六价铬致肺癌作用机制研究进展 [J]. 中国公共卫生, 2023, 39 (2): 181-185.

[6] LOU J, YU S, FENG L, et al. Environmentally induced ribosomal DNA (rDNA) instability in human cells and populations exposed to hexavalent chromium [Cr (VI)] [J/OL]. Environ Int, 2021, 153 [2023-03-31]. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106525>.

- [7] WARMERDAM D O, WOLTHUIS R M F. Keeping ribosomal DNA intact: a repeating challenge [J]. *Chromosome Res*, 2019, 27 (1/2): 57–72.
- [8] NELSON J O, WATASE G J, WARSINGER-PEPE N, et al. Mechanisms of rDNA copy number maintenance [J]. *Trends Genet*, 2019, 35 (10): 734–742.
- [9] MALINOVSKAYA E M, ERSHOVA E S, GOLIMBET V E, et al. Copy number of human ribosomal genes with aging: unchanged mean, but narrowed range and decreased variance in elderly group [J/OL]. *Front Genet*, 2018, 9 [2023-03-31]. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00306>.
- [10] DONG C, AN L, YU C H, et al. A DYRK1B-dependent pathway suppresses rDNA transcription in response to DNA damage [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49 (3): 1485–1496.
- [11] WANG M, LEMOS B. Ribosomal DNA copy number amplification and loss in human cancers is linked to tumor genetic context, nucleolus activity, and proliferation [J/OL]. *PLoS Genet*, 2017, 13 (9) [2023-03-31]. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006994>.
- [12] GIBBONS J G, BRANCO A T, GODINHO S A, et al. Concerted copy number variation balances ribosomal DNA dosage in human and mouse genomes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112 (8): 2485–2490.
- [13] GE X, LI M, SONG G X, et al. Chromium (VI)-induced AL-DH1A1/EGF axis promotes lung cancer progression [J/OL]. *Clin Transl Med*, 2022, 12 (12) [2023-03-31]. <https://doi.org/10.1002/ctm2.1136>.
- [14] 贾君麟, 楼建林. 核糖体 DNA 在 DNA 损伤反应中的作用机制研究进展 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2018, 36 (1): 70–74.
- [15] JACKSON S P, BARTEK J. The DNA-damage response in human biology and disease [J]. *Nature*, 2009, 461 (7267): 1071–1078.
- [16] GIBBONS J G, BRANCO A T, YU S, et al. Ribosomal DNA copy number is coupled with gene expression variation and mitochondrial abundance in humans [J/OL]. *Nat Commun*, 2014, 5 [2023-03-31]. <https://doi.org/10.1038/ncomms5850>.
- [17] PROKOPOWICH C D, GREGORY T R, CREASE T J. The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes [J]. *Genome*, 2003, 46 (1): 48–50.
- [18] 刘佳琪, 冯玲芳, 陈俊斐, 等. 温石棉暴露诱发核糖体 DNA 拷贝数变异及 DNA 损伤反应研究 [J]. *预防医学*, 2022, 34 (6): 547–554.
- [19] XIAO J, LIU M, QI Y, et al. Structural insights into the activation of ATM kinase [J]. *Cell Res*, 2019, 29 (8): 683–685.
- [20] SMIRNOV E, CHMÚRČIAKOVÁ N, CMARKO D. Human rDNA and cancer [J/OL]. *Cells*, 2021, 10 (12) [2023-03-31]. <https://doi.org/10.3390/cells10123452>.

收稿日期: 2023-02-08 修回日期: 2023-03-31 本文编辑: 徐文璐

(上接第373页)

- [14] ZHOU J, ZHOU Y, QIU J. Study of item text in the Chinese symptom checklist-90 [J/OL]. *Medicine*, 2021, 100 (11) [2023-03-31]. https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2021/03190/Study_of_item_text_in_the_Chinese_Symptom.36.aspx. DOI: 10.1097/MD.00000000000024841.
- [15] CHENG Q, XU Y, XIE L, et al. Prevalence and environmental impact factors of somatization tendencies in eastern Chinese adolescents: a multicenter observational study [J/OL]. *Cad Saude Publica*, 2019, 35 (1) [2023-03-31]. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00008418>.
- [16] 程庆林, 谢立, 王乐, 等. 青少年抑郁倾向影响因素分析 [J]. *中国公共卫生*, 2022, 38 (6): 680–685.
- [17] 李娟娟, 章荣华, 邹艳, 等. 浙江省青少年抑郁症状的影响因素分析 [J]. *预防医学*, 2021, 33 (2): 139–142.
- [18] MAGKLARA K, LAZARATOU H, BARBOUNI A, et al. The impact of COVID-19 lockdown on children's and adolescents' mental health in Greece [J]. *Child Soc*, 2023, 37 (2): 469–484.
- [19] CROCETTI E, MOSCATELLI S, KANIUŠONYTĖ G, et al. Developing morality, competence, and sociability in adolescence: a longitudinal study of gender differences [J]. *J Youth Adolesc*, 2019, 48 (5): 1009–1021.
- [20] CLEMENS V, DESCHAMPS P, FEGERT J M, et al. Potential effects of “social” distancing measures and school lockdown on child and adolescent mental health [J]. *Eur Child Adolesc Psy*, 2020, 29 (6): 739–742.
- [21] RAUFELDER D, KULAKOW S. The role of social belonging and exclusion at school and the teacher-student relationship for the development of learned helplessness in adolescents [J]. *Br J Educ Psychol*, 2022, 92 (1): 59–81.
- [22] BURNS E C, VAN BERGEN P, LEONARD A, et al. Positive, complicated, distant, and negative: how different teacher-student relationship profiles relate to students' science motivation [J]. *J Adolesc*, 2022, 94 (8): 1150–1162.
- [23] MODESTIN J, LÖTSCHER K, ERNI T. Dissociative experiences and their correlates in young non-patients [J]. *Psychol Psychother-T*, 2002, 75 (1): 53–64.
- [24] ETHIER K A, KERSHAW T S, LEWIS J B, et al. Self-esteem, emotional distress and sexual behavior among adolescent females: inter-relationships and temporal effects [J]. *J Adolescent Health*, 2006, 38 (3): 268–274.

收稿日期: 2022-12-16 修回日期: 2023-03-31 本文编辑: 徐文璐