

· 论 著 ·

# 温石棉暴露诱发核糖体DNA拷贝数变异及DNA损伤反应研究

刘佳琪, 冯玲芳, 陈俊斐, 夏海玲, 蒋兆强, 吴帆, 龚晓雪, 楼建林

杭州医学院公共卫生学院, 浙江 杭州 310013

**摘要:** **目的** 探索温石棉暴露对核糖体DNA (rDNA) 拷贝数的影响及其与DNA损伤反应的关系, 为石棉致癌机制研究提供依据。**方法** 分别用1.25、2.5、5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (低、中、高浓度) 的温石棉悬液处理MeT-5A人胸膜间皮细胞, 磷酸盐缓冲液处理作为对照。分别收集处理6、24、48和72 h的细胞, 采用实时荧光定量PCR检测rDNA拷贝数及核仁蛋白基因*BIRC5*、*HRAS*、*GINS4*和*RRM2* mRNA表达; 使用Muse细胞分析仪及相应试剂盒检测细胞凋亡和DNA损伤。比较不同处理时间不同温石棉浓度组细胞rDNA拷贝数、DNA损伤反应和核仁蛋白基因mRNA表达水平。**结果** 温石棉悬液处理6、48、72 h时, 低、中、高浓度组和对照组45S rDNA拷贝数差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 处理6 h时, 各浓度组45S rDNA拷贝数均低于对照组 ( $P<0.05$ ); 处理48、72 h时, 高浓度组45S rDNA拷贝数高于低、中浓度组 ( $P<0.05$ )。处理24、48、72 h时, 各组5S rDNA拷贝数比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 处理24、48 h时, 中、高浓度组5S rDNA拷贝数均低于对照组 ( $P<0.05$ ); 处理24、72 h时, 中、高浓度组5S rDNA拷贝数均低于低浓度组 ( $P<0.05$ )。不同处理时间点各组总细胞凋亡率比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 中、高浓度组总细胞凋亡率均高于对照组 ( $P<0.05$ ), 以晚期凋亡为主。处理72 h时, 各组ATM激活率和DNA双链断裂率比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 中、高浓度组细胞ATM激活率和DNA双链断裂率均高于对照组 ( $P<0.05$ )。处理24、48 h时, 各组*BIRC5*、*HRAS*、*GINS4*和*RRM2* mRNA相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 中、高浓度组*BIRC5*、*HRAS*、*GINS4*和*RRM2* mRNA相对表达量均低于对照组 ( $P<0.05$ )。**结论** 温石棉暴露可诱发人胸膜间皮细胞rDNA拷贝数变异, 引起相关核仁蛋白表达改变, 可能参与DNA损伤反应过程的调控。

**关键词:** 温石棉; 核糖体DNA; 拷贝数变异; DNA损伤反应; 核仁蛋白

**中图分类号:** R135.99 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087 (2022) 06-0547-08

## Effect of exposure to chrysotile on ribosomal DNA copy number variation and DNA damage response

LIU Jiaqi, FENG Lingfang, CHEN Junfei, XIA Hailing, JIANG Zhaoqiang, WU Fan, GONG Xiaoxue, LOU Jianlin  
School of Public Health, Hangzhou Medical College, Hangzhou, Zhejiang 310013, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of chrysotile exposure on ribosomal DNA (rDNA) copy number and DNA damage response, so as to provide insights into the mechanism of asbestos-induced carcinogenesis. **Methods** Human pleural mesothelial MeT-5A cells were treated with chrysotile suspensions at doses of 1.25, 2.5 and 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (low-, medium-, high-dose group), while PBS served as controls. MeT-5A cells were harvested 6, 24, 48 and 72 h post-treatment, and the rDNA copy numbers and the *BIRC5*, *HRAS*, *GINS4* and *RRM2* mRNA expression were determined using a quantitative real-time PCR (qPCR) assay. The apoptosis of MeT-5A cells and DNA damage were detected using Muse cell analyzer. The rDNA copy numbers, DNA damage responses and *BIRC5*, *HRAS*, *GINS4* and *RRM2* mRNA ex-

**DOI:** 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2022.06.002

**基金项目:** 浙江省自然科学基金项目 (LY21H260002); 浙江省医药卫生科技计划项目 (2020KY100); 杭州医学院基本科研业务费基础科研项目 (KYYB202113)

**作者简介:** 刘佳琪, 硕士研究生在读

**通信作者:** 楼建林, E-mail: jianlinlou@163.com

pression were compared in MeT-5A cells treated with different doses of chrysotile suspensions. **Results** There were significant differences in 45S rDNA copy numbers among low-, medium-, high-dose groups and the control groups 6, 48 and 72 h post-treatment with chrysotile suspensions, and significantly lower 45S rDNA copy numbers were measured in low-, medium- and high-dose groups than in the control group 6 h post-treatment, while significantly higher 45S rDNA copy numbers were found in the high-dose group than in low- and medium-dose groups 48 and 72 h post-treatment (all  $P<0.05$ ). There were significant differences in 5S rDNA copy numbers among low-, medium-, high-dose groups and the control groups 24, 48 and 72 h post-treatment with chrysotile suspensions, and significantly lower 5S rDNA copy numbers were measured in medium- and high-dose groups than in the control group 24 and 48 h post-treatment, while significantly lower 5S rDNA copy numbers were found in medium- and high-dose groups than in the low-dose group 24, 72 h post-treatment (all  $P<0.05$ ). There were significant differences in the overall apoptotic rate of MeT-5A cells among groups at different time points, and the overall apoptotic rate of MeT-5A cells were significantly higher in medium- and high-dose groups than in the control group (all  $P<0.05$ ), with late-stage apoptosis predominantly detected. There were significant differences in the rates of ATM activation and DNA double-strand break in MeT-5A cells among groups 72 h post-treatment, and higher rates of ATM activation and DNA double-strand break were measured in medium- and high-dose groups than in the control group (all  $P<0.05$ ). In addition, there were significant differences in the relative mRNA expression of *BIRC5*, *HRAS*, *GINS4* and *RRM2* genes among groups 24 and 48 h post-treatment, and significantly lower *BIRC5*, *HRAS*, *GINS4* and *RRM2* mRNA expression was quantified in medium- and high-dose groups than in the control group (all  $P<0.05$ ). **Conclusion** Exposure to chrysotile may induce rDNA copy number variations and altered expression of nucleolar proteins in human pleural mesothelial cells, which may be involved in the regulation of DNA damage responses.

**Keywords:** chrysotile; ribosomal DNA; copy number variation; DNA damage response; nucleolar protein

石棉是一类天然存在的硅酸盐矿物,因具有高柔韧性、耐热性和耐腐蚀性被广泛应用于建筑业、纺织业和造船业。石棉为 I 类致癌物,可导致间皮瘤和肺癌等疾病。世界卫生组织和国际劳工组织联合监测报告显示,2016 年石棉所致死亡占职业相关死亡的 11.1%<sup>[1]</sup>。温石棉属于蛇纹石类石棉,使用量约占石棉使用总量的 90%~95%<sup>[2]</sup>,我国是世界上主要的温石棉生产国之一。

石棉的致癌机制尚不明确<sup>[2]</sup>。目前已有六价铬、双酚 A 等外源化学物质暴露引发核糖体 DNA (ribosomal DNA, rDNA) 拷贝数变异的研究报道<sup>[3-4]</sup>。核糖体 DNA 是指位于 13、14、15、21 和 22 号染色体上的 45S rDNA (包括 18S、5.8S 和 28S rDNA) 和位于 1 号染色体上的 5S rDNA,均为串联重复序列,在维持基因组稳定性方面发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>。高度重复性使 rDNA 较为脆弱,当 rDNA 重复序列受到损伤时,可能通过与其他拷贝重组进行修复,易导致错误重组,rDNA 序列延长或缩短,从而使 rDNA 拷贝数发生变异(扩增、缺失)<sup>[7]</sup>。rDNA 拷贝数变异可诱发核仁应激,触发一系列 DNA 损伤反应<sup>[8]</sup>;DNA 损伤反应又可抑制 rDNA 转录,引起 rDNA 拷贝数变异<sup>[9]</sup>。肺癌、胃癌和卵巢癌等多种肿瘤组织已发现 45S rDNA 拷贝数的减少和 5S rDNA 拷贝数的增加<sup>[10]</sup>。本研究拟通过体外实验探究温石棉暴露诱发

rDNA 拷贝数变异及 DNA 损伤反应的情况,并分析核仁蛋白在该过程中发挥的作用,为石棉致癌机制研究提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** CO<sub>2</sub> 培养箱(日本 SANYO 公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);超声粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);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);电子精密天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);梯度 PCR 仪、实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);Muse 细胞分析仪(德国 Merck Millipore 公司)。人胸膜间皮细胞 MeT-5A 购自中国科学院上海细胞库,温石棉购自加拿大。胎牛血清(美国 Corning 公司);199 培养基[赛澳美细胞技术(北京)有限公司];胰酶(浙江森瑞生物科技有限公司);磷酸盐缓冲液(PBS,美国 HyClone 公司);DEPC 水(北京兰杰柯科技有限公司);DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司);RNAi-so 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);细胞凋亡检测试剂盒、DNA 损伤检测试剂盒(美国 Luminox 公司)。

1.2 方法

1.2.1 纤维制备 温石棉用玛瑙研钵研磨 40 min, 160 °C烘烤 6 h, 称重后加 PBS 制备 12 mg/mL 混悬液, 高压灭菌。使用前超声振荡 10 min, 并用 PBS 调至所需浓度。

1.2.2 细胞培养与染毒 MeT-5A 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 199 培养基中, 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 孵育培养。细胞按 2×10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板, 过夜后分别加入 1.25、2.5、5 μg/cm<sup>2</sup> 温石棉悬液 (低、中、高浓度组) 10 μL, 加入等体积 PBS 的细胞作为对照, 每个浓度设置 3 个平行样。

1.2.3 rDNA 拷贝数检测 分别于染毒 6、24、48、72 h 后收集细胞, 按试剂盒说明书提取 DNA, 以 TP53 作为内参基因进行 PCR 扩增, 引物序列见表 1。反应体系: 2×SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq II 10 μL, ROX Reference Dye II 0.4 μL, 正向引物和反向引物各 0.4 μL; DNA 20 ng, 加 ddH<sub>2</sub>O 补至 8.8 μL。反应条件: 95 °C预变性 30 s; 95 °C变性 3 s, 60 °C退火 30 s, 40 个循环。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算 rDNA 拷贝数。45S rDNA 拷贝数为 18S、5.8S 和 28S rDNA 拷贝数的平均值。

表 1 rDNA 和核仁蛋白基因引物序列

Table 1 The primer sequences of rDNA and nucleolar protein genes

基因 Gene	正向引物 F-primer (5'-3')	反向引物 R-primer (5'-3')
18S	CGCGCTCTACCTTACCTACC	GGCCGTGCGTACTTAGACAT
28S	GCGGGTGGTAAACTCCATCT	CACGCCCTCTTGAACCTCTCT
5.8S	C GACTCTTAGCGGTGGATCA	GATCAATGTGTCTCTGCAATTC
5S	TCGTCTGATCTCGGAAGCTAA	AAGCCTACAGCACCCGGTAT
TP53	TGTCCTTCCTGGAGCGATCT	CAAACCCCTGGTTTACCACTTC
BIRC5	AGGTCATCTCGGCTGTTCTCTG	TCATCCTCACTGCGGCTGTCT
GAPDH	GCACCCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
GINS4	GAATGTGTCATGGAACAGCTGGA	TGAGGCGACACCCGAAGTAG
HRAS	GGGCTTCCTGTGTGTGTTTG	CCGAGTCCTTACCCCGTTT
RRM2	GCAAGCGATGGCATAGTAAATGAA	TGGCAATTTGGAAGCCATAGAA

1.2.4 相关核仁蛋白基因 mRNA 表达检测 相应染毒时间结束后收集细胞, 采用 RNAiso Plus 试剂提取总 RNA, 反转录获取 cDNA, 反应条件: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 保持。以 GAPDH 作为内参基因, 检测核仁蛋白基因 BIRC5、GINS4、HRAS 和 RRM2, 引物序列见表 1。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算目的基因 mRNA 相对表达量。

1.2.5 细胞 DNA 损伤反应检测

1.2.5.1 细胞凋亡检测 离心收集各组细胞, 弃上清, 加入 100 μL 含 1% 胎牛血清的 199 培养基重悬, 再加入 100 μL Muse Annexin V&Dead Cell Kit 试剂, 混匀后避光孵育 20 min, 采用 Muse 细胞分析仪检测细胞凋亡。

1.2.5.2 细胞 DNA 损伤检测 离心收集各组细胞, 弃上清, 用 PBS 清洗 1 次, 加入 1×Assay Buffer 重悬细胞, 再加入等量 Fixation Buffer 上下颠倒混匀, 冰上孵育 10 min。离心弃上清后, 加入预冷的 1×

Permeabilization Buffer 吹打重悬, 冰上孵育 10 min。再离心弃上清后, 加入 1×Assay Buffer 和抗体预混液, 避光孵育 30 min。加入 1×Assay Buffer 重悬后离心, 弃上清。加入 1×Assay Buffer 重悬, 采用 Muse 细胞分析仪检测。通过 ATM 激活率、DNA 双链断裂率和 H2A.X 磷酸化率反映 DNA 损伤情况。

1.3 统计分析 采用 SPSS 26.0 软件统计分析。定量资料服从正态分布的采用均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 描述, 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。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MeT-5A 细胞 rDNA 拷贝数变异情况 处理 6、48、72 h 时, 各组 45S rDNA 拷贝数比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 处理 6 h 时, 低、中、高浓度组细胞 45S rDNA 拷贝数均低于对照组, 高浓度组 45S rDNA 拷贝数低于低浓度组 ( $P<0.05$ ); 处理 48、

72 h 时, 高浓度组 45S rDNA 拷贝数高于低、中浓度组 ( $P<0.05$ )。

处理 24、48、72 h 时, 各组 5S rDNA 拷贝数比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 处理 24、48 h

时, 中、高浓度组 5S rDNA 拷贝数均低于对照组 ( $P<0.05$ ); 处理 24、72 h 时, 中、高浓度组 5S rDNA 拷贝数均低于低浓度组 ( $P<0.05$ )。见表 2。

表 2 不同温石棉浓度组 MeT-5A 细胞 rDNA 拷贝数比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of rDNA copy numbers of MeT-5A cells in different dose groups of chrysotile ( $\bar{x}\pm s$ )

组别 Group	45S rDNA 拷贝数 45S rDNA copy number	5S rDNA 拷贝数 5S rDNA copy number	组别 Group	45S rDNA 拷贝数 45S rDNA copy number	5S rDNA 拷贝数 5S rDNA copy number
6 h			48 h		
对照组 Control	1.01±0.09	1.00±0.09	对照组 Control	1.00±0.03	1.00±0.09
低浓度组 Low-dose	0.89±0.01 <sup>a</sup>	0.97±0.04	低浓度组 Low-dose	0.77±0.11 <sup>a</sup>	0.85±0.06 <sup>a</sup>
中浓度组 Medium-dose	0.81±0.04 <sup>a</sup>	0.87±0.03	中浓度组 Medium-dose	0.91±0.08	0.87±0.05 <sup>a</sup>
高浓度组 High-dose	0.78±0.06 <sup>ab</sup>	0.87±0.09	高浓度组 High-dose	1.13±0.13 <sup>bc</sup>	0.82±0.03 <sup>a</sup>
F 值	9.492	3.095	F 值	7.461	5.670
P 值	0.005	0.089	P 值	0.011	0.022
24 h			72 h		
对照组 Control	1.00±0.06	1.00±0.07	对照组 Control	1.00±0.04	1.00±0.06
低浓度组 Low-dose	0.95±0.10	0.97±0.05	低浓度组 Low-dose	1.11±0.12	1.04±0.04
中浓度组 Medium-dose	0.93±0.05	0.87±0.02 <sup>ab</sup>	中浓度组 Medium-dose	0.96±0.09	0.85±0.07 <sup>ab</sup>
高浓度组 High-dose	0.99±0.02	0.87±0.02 <sup>ab</sup>	高浓度组 High-dose	1.46±0.07 <sup>abc</sup>	0.89±0.06 <sup>b</sup>
F 值	0.869	6.588	F 值	21.041	6.769
P 值	0.496	0.015	P 值	<0.001	0.014

注: a、b、c 分别表示与对照组、低浓度组、中浓度组比较,  $P<0.05$ 。Note: a, b, c,  $P<0.05$  compared with control group, low- and medium-dose group, respectively.

## 2.2 MeT-5A 细胞 DNA 损伤反应

### 2.2.1 细胞凋亡

各处理时间点, 各组晚期细胞凋亡率和总细胞凋亡率比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。处理 6 h 时, 中、高浓度组晚期细胞凋亡率和总细胞凋亡率均高于低浓度组和对照组 ( $P<0.05$ )。处理 24 h 时, 中浓度组早期细胞凋亡率, 高浓度组早期、晚期和总细胞凋亡率均高于对照组, 高浓度组晚期细胞凋亡率和总细胞凋亡率均高于低、中浓度组 ( $P<0.05$ )。处理 48 h 时, 中、高浓度组晚期细胞凋亡率和总细胞凋亡率均高于对照组, 中浓度组晚期细胞凋亡率高于低浓度组, 高浓度组晚期细胞凋亡率和总细胞凋亡率均高于低、中浓度组 ( $P<0.05$ )。处理 72 h 时, 各浓度组晚期细胞凋亡率和总细胞凋亡率均高于对照组, 高浓度组晚期细胞凋亡率和总细胞凋亡率均高于低、中浓度组 ( $P<0.05$ )。见表 3。

### 2.2.2 DNA 损伤情况

处理 24 h 时, 各组 DNA 双链断裂率比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 低、中浓度组细胞 DNA 双链断裂率均高于对照组 ( $P<0.05$ )。处理 72 h 时, 各组 ATM 激活率和 DNA 双链断裂率比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 中、高浓度组细胞 ATM 激活率均高于低浓度组和对照组, 高浓度组细胞 ATM 激活率高于中浓度组; 各浓度组细胞 DNA 双链断裂率均高于对照组 ( $P<0.05$ )。见表 4。

### 2.3 MeT-5A 细胞相关核仁蛋白基因 mRNA 表达水平

处理 6 h 时, 各组 *HRAS* mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 中、高浓度组 *HRAS* mRNA 相对表达量低于对照组 ( $P<0.05$ )。处理 24、48 h 时, 各组 *BIRC5*、*HRAS*、*GINS4* 和 *RRM2* mRNA 相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 处理 24 h 时, 中、高浓度组 *BIRC5*、



*HRAS* 和 *GINS4* mRNA 相对表达量均低于对照组, 各浓度组 *RRM2* mRNA 相对表达量均低于对照组 ( $P < 0.05$ ); 处理 48 h 时, 中、高浓度组 *BIRC5*、*GINS4* 和 *RRM2* mRNA 相对表达量均低于对照组, 各浓度组 *HRAS* mRNA 相对表达量均低于对照组 ( $P <$

0.05)。处理 72 h 时, 各组 *HRAS* mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 各浓度组 *HRAS* mRNA 相对表达量均低于对照组 ( $P < 0.05$ )。见表 5。

表 3 不同温石棉浓度组 MeT-5A 细胞凋亡率比较 ( $\bar{x} \pm s$ , %)

Table 3 Comparison of apoptotic rates of MeT-5A cells in different dose groups of chrysotile ( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别 Group	早期细胞 凋亡率 Early-stage apoptotic rate	晚期细胞 凋亡率 Late-stage apoptotic rate	总细胞 凋亡率 Overall apoptotic rate	组别 Group	早期细胞 凋亡率 Early-stage apoptotic rate	晚期细胞 凋亡率 Late-stage apoptotic rate	总细胞 凋亡率 Overall apoptotic rate
6 h				48 h			
对照组 Control	5.42±0.83	3.10±0.65	8.52±1.08	对照组 Control	1.68±0.45	3.97±0.42	5.65±0.87
低浓度组 Low-dose	6.53±0.28	3.78±0.16	10.32±0.12 <sup>a</sup>	低浓度组 Low-dose	2.02±0.20	4.73±0.71	6.75±0.83
中浓度组 Medium-dose	7.27±1.21	5.87±0.80 <sup>ab</sup>	13.13±0.50 <sup>ab</sup>	中浓度组 Medium-dose	1.95±0.80	5.95±0.54 <sup>ab</sup>	7.90±1.04 <sup>a</sup>
高浓度组 High-dose	7.15±0.39	5.28±0.49 <sup>ab</sup>	12.43±0.73 <sup>ab</sup>	高浓度组 High-dose	3.08±0.68	7.63±0.59 <sup>abc</sup>	10.72±1.16 <sup>abc</sup>
<i>F</i> 值	3.616	14.818	26.961	<i>F</i> 值	3.384	23.338	14.747
<i>P</i> 值	0.065	0.001	<0.001	<i>P</i> 值	0.075	<0.001	0.001
24 h				72 h			
对照组 Control	3.23±0.43	6.18±1.53	9.42±1.58	对照组 Control	2.60±0.35	6.68±0.66	9.28±0.40
低浓度组 Low-dose	4.98±1.19	5.53±0.51	10.52±1.33	低浓度组 Low-dose	3.05±0.89	9.88±1.33 <sup>a</sup>	12.93±1.61 <sup>a</sup>
中浓度组 Medium-dose	5.70±0.83 <sup>a</sup>	6.32±0.08	12.02±0.81 <sup>a</sup>	中浓度组 Medium-dose	3.35±1.00	11.09±0.56 <sup>a</sup>	14.44±1.14 <sup>a</sup>
高浓度组 High-dose	6.00±1.11 <sup>a</sup>	9.83±0.33 <sup>abc</sup>	15.83±0.93 <sup>abc</sup>	高浓度组 High-dose	4.83±1.26	16.03±1.41 <sup>abc</sup>	20.87±0.45 <sup>abc</sup>
<i>F</i> 值	5.239	16.640	16.314	<i>F</i> 值	3.206	40.121	66.006
<i>P</i> 值	0.027	0.001	0.001	<i>P</i> 值	0.083	<0.001	<0.001

注: a、b、c 分别表示与对照组、低浓度组、中浓度组比较,  $P < 0.05$ 。Note: a, b, c,  $P < 0.05$  compared with control group, low- and medium-dose group, respectively.

表 4 不同温石棉浓度组 MeT-5A 细胞 DNA 损伤情况比较 ( $\bar{x} \pm s$ , %)

Table 4 Comparison of DNA damage of MeT-5A cells in different dose groups of chrysotile ( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别 Group	ATM 激活 率 ATM activation rate	DNA 双链 断裂率 DNA double- strand break rate	H2A.X 磷酸 化率 H2A.X phosphorylati on rate	组别 Group	ATM 激活 率 ATM activation rate	DNA 双链 断裂率 DNA double- strand break rate	H2A.X 磷酸 化率 H2A.X phosphorylati on rate
6 h				48 h			
对照组 Control	0.65±0.29	2.33±1.20	0.55±0.29	对照组 Control	1.04±0.22	1.38±0.25	0.34±0.31
低浓度组 Low-dose	0.40±0.13	2.80±0.78	0.54±0.39 <sup>a</sup>	低浓度组 Low-dose	0.74±0.38	2.12±0.70	0.23±0.06
中浓度组 Medium-dose	0.62±0.21	2.70±0.65 <sup>ab</sup>	0.18±0.17 <sup>ab</sup>	中浓度组 Medium-dose	0.81±0.36	2.57±0.76	0.23±0.15
高浓度组 High-dose	0.58±0.32	2.49±0.94 <sup>ab</sup>	0.27±0.06 <sup>ab</sup>	高浓度组 High-dose	1.45±0.21	2.94±1.32	0.37±0.16
<i>F</i> 值	0.600	0.164	1.601	<i>F</i> 值	3.338	1.882	0.425
<i>P</i> 值	0.633	0.918	0.264	<i>P</i> 值	0.077	0.211	0.741

表 4 (续) Table 4 (continued)

组别 Group	ATM 激活率 ATM activation rate	DNA 双链断裂率 DNA double-strand break rate	H2A.X 磷酸化率 H2A.X phosphorylation rate	组别 Group	ATM 激活率 ATM activation rate	DNA 双链断裂率 DNA double-strand break rate	H2A.X 磷酸化率 H2A.X phosphorylation rate
	24 h					72 h	
对照组 Control	0.51±0.11	1.62±0.88	0.81±0.61	对照组 Control	0.88±0.15	2.87±0.57	0.88±0.06
低浓度组 Low-dose	0.37±0.38	2.86±0.46 <sup>a</sup>	0.67±0.42	低浓度组 Low-dose	0.95±0.32	4.93±0.91 <sup>a</sup>	1.53±0.62
中浓度组 Medium-dose	0.43±0.21	3.02±0.20 <sup>a</sup>	0.91±0.10	中浓度组 Medium-dose	1.42±0.18 <sup>ab</sup>	5.79±0.49 <sup>a</sup>	1.22±0.10
高浓度组 High-dose	0.91±0.54	2.46±0.27	0.64±0.21	高浓度组 High-dose	1.94±0.21 <sup>abc</sup>	5.93±0.38 <sup>a</sup>	0.79±0.36
F 值	1.442	4.279	0.306	F 值	14.564	15.631	2.646
P 值	0.301	0.044	0.820	P 值	0.001	0.001	0.121

注: a、b、c 分别表示与对照组、低浓度组、中浓度组比较,  $P < 0.05$ 。Note: a, b, c,  $P < 0.05$  compared with control group, low- and medium-dose group, respectively.

表 5 不同温石棉浓度组 MeT-5A 细胞相关核仁蛋白基因 mRNA 表达量比较

Table 5 Comparison of mRNA expression of related nucleolar protein genes in MeT-5A cells in different dose groups of chrysotile

组别 Group	mRNA 相对表达量 Relative mRNA expression				组别 Group	mRNA 相对表达量 Relative mRNA expression			
	BIRC5	HRAS	GINS4	RRM2		BIRC5	HRAS	GINS4	RRM2
6 h					48 h				
对照组 Control	1.00±0.04	1.00±0.05	1.00±0.08	1.00±0.06	对照组 Control	1.00±0.04	1.00±0.03	1.00±0.07	1.00±0.01
低浓度组 Low-dose	0.97±0.03	0.94±0.03	1.03±0.06	1.02±0.02	低浓度组 Low-dose	0.94±0.05	0.94±0.02 <sup>a</sup>	0.95±0.07	0.97±0.05
中浓度组 Medium-dose	1.02±0.08	0.91±0.02 <sup>a</sup>	0.93±0.08	1.04±0.05	中浓度组 Medium-dose	0.81±0.12 <sup>a</sup>	0.85±0.03 <sup>ab</sup>	0.80±0.06 <sup>ab</sup>	0.82±0.01 <sup>ab</sup>
高浓度组 High-dose	1.01±0.06	0.85±0.05 <sup>ab</sup>	0.91±0.03	1.01±0.03	高浓度组 High-dose	0.71±0.06 <sup>ab</sup>	0.86±0.03 <sup>ab</sup>	0.74±0.05 <sup>ab</sup>	0.81±0.05 <sup>ab</sup>
F 值	0.407	7.642	2.177	0.458	F 值	9.487	19.208	11.727	26.650
P 值	0.752	0.010	0.169	0.719	P 值	0.005	0.001	0.003	<0.001
24 h					72 h				
对照组 Control	1.00±0.06	1.00±0.09	1.00±0.05	1.00±0.05	对照组 Control	1.00±0.08	1.00±0.10	1.00±0.00	1.00±0.12
低浓度组 Low-dose	0.93±0.05	0.97±0.05	0.91±0.07	0.89±0.02 <sup>a</sup>	低浓度组 Low-dose	0.96±0.06	0.82±0.05 <sup>a</sup>	0.95±0.01	0.94±0.05
中浓度组 Medium-dose	0.89±0.02 <sup>a</sup>	0.94±0.09	0.80±0.07 <sup>ab</sup>	0.84±0.04 <sup>a</sup>	中浓度组 Medium-dose	0.88±0.04	0.76±0.01 <sup>a</sup>	0.88±0.15	0.89±0.16
高浓度组 High-dose	0.79±0.03 <sup>abc</sup>	0.80±0.03 <sup>abc</sup>	0.78±0.03 <sup>ab</sup>	0.80±0.03 <sup>ab</sup>	高浓度组 High-dose	0.87±0.05	0.75±0.03 <sup>a</sup>	0.76±0.14	0.80±0.18
F 值	13.236	4.741	11.339	14.648	F 值	3.434	12.277	3.137	1.233
P 值	0.002	0.035	0.003	0.001	P 值	0.072	0.002	0.087	0.359

注: a、b、c 分别表示与对照组、低浓度组、中浓度组比较,  $P < 0.05$ 。Note: a, b, c,  $P < 0.05$  compared with control group, low- and medium-dose group, respectively.

### 3 讨论

我国是世界上主要的石棉生产国和消费国之一, 从事石棉生产加工行业的人群数量众多, 防护措施

不到位等原因导致石棉职业性暴露水平较高, 易造成严重的健康危害<sup>[11-12]</sup>。本研究通过温石棉暴露诱发 rDNA 拷贝数变异及其与 DNA 损伤反应的关系探索石棉的致癌机制, 结果显示, 采用温石棉处理 6 h

后各浓度组 MeT-5A 细胞 45S rDNA 拷贝数均明显降低, 处理 48、72 h 时温石棉高浓度组 45S rDNA 拷贝数上升明显; 而 5S rDNA 拷贝数下降在处理 48 h 时最明显。rDNA 序列的同质性主要通过染色体内和染色体间的重组维持, 受损的 45S rDNA 和 5S rDNA 重复序列可通过同源重组改变 rDNA 拷贝数。45S rDNA 和 5S rDNA 分别由不同的 RNA 聚合酶转录, 调控机制可能不同, 具体原因仍需进一步研究。

DNA 损伤反应包括 DNA 损伤修复、细胞凋亡和细胞周期阻滞等过程, 是细胞的一种防御机制, 可阻止疾病发生<sup>[13]</sup>。rDNA 受损可诱导核仁损伤, 致使一系列核仁蛋白释放到核质中, 与鼠双微体基因 2 (mouse double minute 2, MDM2) 作用激活 p53, 引起细胞周期阻滞或细胞凋亡<sup>[14]</sup>。ATM 是 DNA 损伤反应的关键调节因子, 可感受 DNA 损伤, 被 MRN 复合物激活, 通过磷酸化下游多种蛋白启动信号级联, 参与 DNA 损伤修复和细胞周期调控等。当 rDNA 重复序列受损时, 导致拷贝数重组修复, 引起复制叉失速或垮塌, 从而造成 DNA 双链断裂<sup>[15]</sup>, 而 DNA 双链断裂是最为严重的一种 DNA 损伤。本研究结果显示, 温石棉暴露浓度越高, 晚期细胞凋亡率、总细胞凋亡率、ATM 激活率和 DNA 双链断裂率也越高。由此推断温石棉处理导致 MeT-5A 细胞 rDNA 拷贝数变异可能与 DNA 损伤反应有关, rDNA 拷贝数变异诱发核仁应激, 从而触发 DNA 损伤反应, 包括参与损伤的识别修复和调控细胞凋亡等。

为进一步探究 rDNA 拷贝数变异引发 DNA 损伤反应的作用机制, 本研究检测了与细胞凋亡有关的核仁蛋白 BIRC5 和 HRAS, 以及与 DNA 复制和损伤修复有关的核仁蛋白 GINS4 和 RRM2 的表达。结果显示, BIRC5、HRAS、GINS4 和 RRM2 mRNA 表达水平呈下调趋势, 与 rDNA 拷贝数变化趋势基本一致。BIRC5 是凋亡抑制蛋白家族的成员之一, 在癌细胞和肿瘤干细胞中高表达, 在细胞凋亡和有丝分裂调控等方面发挥重要作用。NARIMANI 等<sup>[16]</sup>研究发现敲除 BIRC5 可诱导白血病细胞凋亡、抑制细胞增殖。LI 等<sup>[17]</sup>研究发现 BIRC5 在骨肉瘤组织中高表达, 主要参与细胞凋亡通路的调控, 在体外能显著促进骨肉瘤细胞增殖。HRAS 是 RAS 蛋白中的一种, 在癌细胞增殖等方面发挥重要作用。LÜ 等<sup>[18]</sup>在骨关节炎中研究发现 LINC00623/miR-101/HRAS 轴可通过 MAPK 信号通路调节软骨细胞凋亡和细胞外基质降解。GINS4 是 GINS 复合体的重要组成部分, 对染色体复制起始和延伸至关重要。ZHU 等<sup>[19]</sup>研究发现

GINS4 可通过激活 Rac1 和 CDC42 及其下游通路, 从而调控细胞周期和凋亡等, 促进胃癌细胞的增殖和转移。RRM2 是一种参与 DNA 合成和损伤修复的限速酶, 在细胞增殖、侵袭和迁移等方面发挥重要作用。JIN 等<sup>[20]</sup>研究发现 RRM2 在肺腺癌中表达上调, RRM2 过表达通过 DNA 复制、细胞凋亡等通路增加肺腺癌细胞的增殖和侵袭能力。由此可见这些核仁蛋白在 DNA 损伤反应过程中发挥重要作用, 值得进一步探究其具体调控机制。

综上所述, 温石棉暴露可诱发 MeT-5A 人胸膜间皮细胞 rDNA 拷贝数变异, 而 rDNA 拷贝数变异导致核仁应激, 相关核仁蛋白的基因表达下调, 从而参与 DNA 损伤反应过程的调控。

#### 参考文献

- [1] World Health Organization, International Labour Organization. WHO/ILO joint estimates of the work-related burden of disease and injury, 2000–2016 [EB/OL]. [2022-03-30]. [https://www.ilo.org/global/topics/safety-and-health-at-work/resources-library/publications/WCMS\\_819788/lang--zh/index.htm](https://www.ilo.org/global/topics/safety-and-health-at-work/resources-library/publications/WCMS_819788/lang--zh/index.htm).
- [2] VAN ZANDWIJK N, REID G, FRANK A L. Asbestos-related cancers: the ‘Hidden Killer’ remains a global threat [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2020, 20 (4): 271–278.
- [3] 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 [2022-03-30]. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106525>.
- [4] 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.
- [5] WARMERDAM D O, RMF W. Keeping ribosomal DNA intact: a repeating challenge [J]. *Chromosome Res*, 2019, 27 (1/2): 57–72.
- [6] FANCELLO L, KAMPEN K R, HOFMAN I J, et al. The ribosomal protein gene RPL5 is a haploinsufficient tumor suppressor in multiple cancer types [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (9): 14462–14478.
- [7] WARMERDAM D O, VAN DEN BERG J, MEDEMA R H. Breaks in the 45S rDNA lead to recombination-mediated loss of repeats [J]. *Cell Rep*, 2016, 14 (11): 2519–2527.
- [8] ANDERSEN J S, LAM Y W, LEUNG A K, et al. Nucleolar proteome dynamics [J]. *Nature*, 2005, 433 (7021): 77–83.
- [9] VAN SLUIS M, MCSTAY B. Nucleolar reorganization in response to rDNA damage [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 46: 81–86.
- [10] 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]. *PLoS Genet*, 2017, 13 (9): 1–24.
- [11] 张文翠, 朱钰玲, 胡伟江, 等. 选矿企业石棉粉尘的职业健康

- 风险评估 [J]. 预防医学, 2018, 30 (9): 879-883.
- ZHANG W C, ZHU Y L, HU W J, et al. Occupational health risk assessment on asbestos processing enterprises [J]. Prev Med, 2018, 30 (9): 879-883.
- [12] 夏海玲, 蒋兆强, 冯玲芳, 等. 石棉作业对人体氧化应激水平的影响 [J]. 预防医学, 2022, 34 (1): 1-6.
- XIA H L, JIANG Z Q, FENG L F, et al. Effect of asbestos exposure on oxidative stress [J]. Prev Med, 2022, 34 (1): 1-6.
- [13] MIKOLASKOVA B, JURCIK M, CIPAKOVA I, et al. Maintenance of genome stability: the unifying role of interconnections between the DNA damage response and RNA-processing pathways [J]. Curr Genet, 2018, 64 (5): 971-983.
- [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.
- JIA J L, LOU J L. Research progress on the mechanism of ribosomal DNA in DNA damage response [J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis, 2018, 36 (1): 70-74.
- [15] LARSEN D H, STUCKI M. Nucleolar responses to DNA double-strand breaks [J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44 (2): 538-544.
- [16] NARIMANI M, SHARIFI M, JALILI A. Knockout of *BIRC5* gene by CRISPR/Cas9 induces apoptosis and inhibits cell proliferation in leukemic cell lines, HL60 and KG1 [J]. Blood Lymphat Cancer, 2019, 9: 53-61.
- [17] LI Q, LIANG J, CHEN B. Identification of CDCA8, DSN1 and BIRC5 in regulating cell cycle and apoptosis in osteosarcoma using bioinformatics and cell biology [J/OL]. Technol Cancer Res Treat, 2020, 19 [2022-03-30]. <https://doi.org/10.1177/1533033820965605>.
- [18] LÜ G, LI L, WANG B, et al. LINC00623/miR-101/HRAS axis modulates IL-1 $\beta$ -mediated ECM degradation, apoptosis and senescence of osteoarthritis chondrocytes [J]. Aging, 2020, 12 (4): 3218-3237.
- [19] ZHU Z, YU Z, RONG Z, et al. The novel GINS4 axis promotes gastric cancer growth and progression by activating Rac1 and CDC42 [J]. Theranostics, 2019, 9 (26): 8294-8311.
- [20] JIN C Y, DU L, NUERLAN A H, et al. High expression of *RRM2* as an independent predictive factor of poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma [J]. Aging, 2020, 13 (3): 3518-3535.
- 收稿日期: 2022-02-21 修回日期: 2022-03-30 本文编辑: 徐文璐

## (上接第 546 页)

- [10] 张洁, 何青芳, 王立新, 等. 浙江省成年人血脂异常知晓率、治疗率和控制率的影响因素分析 [J]. 预防医学, 2020, 32 (12): 1230-1235.
- ZHANG J, HE Q F, WANG L X, et al. Influencing factors for the awareness, treatment and control rates of dyslipidemia among adults in Zhejiang Province [J]. Prev Med, 2020, 32 (12): 1230-1235.
- [11] 徐倩倩, 冯宏伟, 贺天锋, 等. 宁波市 35~69 岁居民自报慢性病患病情况调查 [J]. 预防医学, 2021, 33 (9): 932-934.
- XU Q Q, FENG H W, HE T F, et al. The prevalence of self-reported chronic diseases among residents aged 35-69 years in Ningbo [J]. Prev Med, 2021, 33 (9): 932-934.
- [12] 刘仕俊, 袁寒艳, 姜彩霞, 等. 杭州市老年高血压患者血压控制的影响因素研究 [J]. 预防医学, 2021, 33 (7): 660-664.
- LIU S J, YUAN H Y, JIANG C X, et al. Influencing factors for blood pressure control in elderly patients with hypertension in Hangzhou [J]. Prev Med, 2021, 33 (7): 660-664.
- [13] 胡世云, 俞蔚, 徐小玲, 等. 浙江省 35~75 岁常住居民血脂异常情况调查 [J]. 预防医学, 2020, 32 (5): 437-441.
- HU S Y, YU W, XU X L, et al. Prevalence of dyslipidemia among the residents aged 35-75 years in Zhejiang Province [J]. Prev Med, 2020, 32 (5): 437-441.
- [14] 庞元捷, 余灿清, 郭彧, 等. 中国成年人行为生活方式与主要慢性病的关联——来自中国慢性病前瞻性研究的证据 [J]. 中华流行病学杂志, 2021, 42 (3): 369-375.
- PANG Y J, YU C Q, GUO Y, et al. Association of lifestyles with major chronic diseases in Chinese adults: evidence from the China Kaodoor Biobank [J]. Chin J Epidemiol, 2021, 42 (3): 369-375.
- [15] 彭洪, 王劭, 何晓燕, 等. 杭州市 15 岁及以上居民吸烟情况调查 [J]. 预防医学, 2020, 32 (3): 253-257.
- PENG H, WANG M, HE X Y, et al. Investigation on smoking status of residents aged 15 years and over in Hangzhou [J]. Prev Med, 2020, 32 (3): 253-257.
- [16] 万凯化, 魏毓, 徐玉茗, 等. 我国药物滥用的流行及干预研究现状 [J]. 中国药物警戒, 2019, 16 (6): 338-359.
- WAN K H, WEI Y, XU Y M, et al. Current status of drug abuse epidemic and intervention research in China [J]. Chin J Pharmacov, 2019, 16 (6): 338-359.
- [17] 刘志民, 郝伟. 甘肃、贵州、辽宁、浙江、湖南五省药物滥用流行病学调查报告 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2015, 24 (1): 50-59.
- LIU Z M, HAO W. Epidemiological household survey on drug abuse in Gansu, Guizhou, Liaoning, Zhejiang and Hunan Province [J]. Chin J Drug Depend, 2015, 24 (1): 50-59.
- 收稿日期: 2022-01-28 修回日期: 2022-03-04 本文编辑: 吉兆洋