

· 论著 ·

尘肺病患者外周血核糖体DNA拷贝数变化及影响因素研究

龚晓雪，冯玲芳，陈俊斐，傅浩，蒋兆强，刘爽，董小雯，吴帆，楼建林

杭州医学院公共卫生学院，浙江 杭州 310013

摘要：目的 了解尘肺病患者外周血核糖体DNA(rDNA)拷贝数变化及其影响因素，为尘肺病早期诊断与治疗提供依据。**方法** 选择某定点医院就诊的尘肺病患者88例，无尘肺病史和粉尘暴露史的社区居民71人作为对照。通过问卷调查收集年龄、吸烟、饮酒和累计接触粉尘时间等资料；采用实时荧光定量PCR法检测外周血45S rDNA和5S rDNA拷贝数，比较两组间差异；采用多重线性回归模型分析45S rDNA和5S rDNA拷贝数的影响因素。**结果** 尘肺病组年龄 $M(Q_R)$ 为56.00(15.25)岁，吸烟占56.82%，饮酒占62.50%，累计接触粉尘时间为(12.40±8.08)年；对照组年龄 $M(Q_R)$ 为64.00(37.00)岁，吸烟占32.39%，饮酒占26.76%。尘肺病组45S rDNA拷贝数 $M(Q_R)$ 为1.29(0.59)，低于对照组的2.10(1.88)；尘肺病组5S rDNA拷贝数为5.33(0.85)，高于对照组的4.66(1.34)(均 $P<0.05$)。多重线性回归分析结果显示，年龄($\beta=-0.034$)、患尘肺病($\beta=-1.595$)是45S rDNA拷贝数的影响因素；年龄($\beta=-0.013$)是5S rDNA拷贝数的影响因素；年龄($\beta=0.018$)是尘肺病组5S rDNA拷贝数的影响因素(均 $P<0.05$)。**结论** 与无尘肺病史且无粉尘暴露史的人群比较，尘肺病患者外周血45S rDNA拷贝数降低，5S rDNA拷贝数升高。

关键词：尘肺病；核糖体DNA；拷贝数变化；影响因素

中图分类号：R135.2 文献标识码：A 文章编号：2096-5087(2024)02-0101-04

Ribosomal DNA copy number variation in peripheral blood and its influencing factors among patients with pneumoconiosis

GONG Xiaoxue, FENG Lingfang, CHEN Junfei, FU Hao, JIANG Zhaoqiang, LIU Shuang,
DONG Xiaowen, WU Fan, LOU Jianlin

School of Public Health, Hangzhou Medical College, Hangzhou, Zhejiang 310013, China

Abstract: Objective To explore the changes in ribosomal DNA copy number in peripheral blood among patients with pneumoconiosis and its influencing factors, so as to provide insights into prevention and treatment of pneumoconiosis.

Methods Eighty-eight patients with pneumoconiosis who visited a designated hospital and 71 community residents with no history of pneumoconiosis or dust exposure were selected as the pneumoconiosis group and control group, and age, smoking history, drinking history and cumulative years of exposure to dust were collected through questionnaire surveys. The copy number of 45S rDNA and 5S rDNA was detected using real-time fluorescence quantitative PCR, and the differences between the two groups were compared. Factors affecting the copy number of 45S rDNA and 5S rDNA were identified by a multiple linear regression model. **Results** The pneumoconiosis group had a median age of 56.00 (interquartile range, 15.25) and a mean cumulative dust exposure duration of (12.40±8.08) years, with 56.82% smoking and 62.50% drinking. The control group had a median age of 64.00 (interquartile range, 37.00) years, with 32.39% smoking and 26.76% drinking. The median copy number of 45S rDNA in the pneumoconiosis group was 1.29

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2024.02.003

基金项目：国家重点研发计划项目（2019YFE0116100）；国家卫生健康委科学研究基金-浙江省医药卫生重大科技计划项目（WKJ-ZJ-2022）

作者简介：龚晓雪，硕士，主要从事尘肺病诊断与机制研究工作

通信作者：楼建林，E-mail: jianlinlou@163.com

(interquartile range, 0.59), which was lower than 2.10 (interquartile range, 1.88) in the control group; the median copy number of 5S rDNA in the pneumoconiosis group was 5.33 (interquartile range, 0.85), which was higher than 4.66 (1.34) in the control group (both $P<0.05$). Multiple linear regression analysis identified age ($\beta=-0.034$) and pneumoconiosis ($\beta=-1.595$) as factors affecting 45S rDNA copy number, age ($\beta=-0.013$) as a factor affecting 5S rDNA copy number, and age ($\beta=0.018$) as a factor affecting 5S rDNA copy number in the pneumoconiosis group (all $P<0.05$). **Conclusions** Compared with community residents with no history of pneumoconiosis or dust exposure, the copy number of 45S rDNA in peripheral blood among patients with pneumoconiosis is reduced and the copy number of 5S rDNA is increased.

Keywords: pneumoconiosis; ribosomal DNA; copy number variation; influencing factor

核糖体 DNA (ribosomal DNA, rDNA) 是用于编码核糖体 RNA 的串联重复序列，主要包括第 13、14、15、21 和 22 号染色体上的 45S rDNA 和 1 号染色体上的 5S rDNA，其中 45S rDNA 又进一步加工修饰成 28S、18S 和 5.8S rRNA，与 5S rRNA 及其他核糖体蛋白组装，发挥“蛋白质加工厂”的作用^[1]。rDNA 拷贝数变异与多种疾病存在关联^[2-4]，前期研究发现石棉粉尘暴露可诱发人胸膜间皮细胞 rDNA 拷贝数变异，提示 rDNA 拷贝数变异可能参与粉尘暴露相关的健康效应^[5]。

尘肺病是因长期吸入生产性粉尘并在肺内潴留引起的一类职业性肺部疾病，是我国最常见且危害最严重的职业病之一^[6-7]。阐明尘肺病发病机制、探索有效的诊断标志物及阻断肺纤维化的治疗药物仍是目前尘肺病防治领域的重点和难点。为了解 rDNA 拷贝数变化与尘肺纤维化之间的关系，本研究比较尘肺病患者和对照人群血液 rDNA 拷贝数的差异，并分析 rDNA 拷贝数的影响因素，为尘肺纤维化机制研究及早期诊断提供参考。

1 对象与方法

1.1 对象

选择 2021—2022 年在某尘肺病定点医院就诊的尘肺病患者，同时选择无尘肺病史和粉尘暴露史的社区居民作为对照。尘肺病诊断参照 GBZ 70—2009《尘肺病诊断标准》^[8]。排除标准：(1) 既往有尘肺病史，有药物干预经历；(2) 有其他外源性化合物暴露史；(3) 伴有肺结核、肺部恶性肿瘤和肺心病而影响尘肺病诊断；(4) 患有严重认知障碍或精神疾病；(5) 主要指标数据缺失。研究对象均签署知情同意书。本研究通过浙江省医学科学院（杭州医学院）伦理委员会审查，审批号：(2019) 伦审研第(012) 号。

1.2 方法

1.2.1 问卷调查

采用自制问卷，由经过统一培训的调查人员面对面进行调查，收集年龄、工龄、累计接触粉尘时间、吸烟、饮酒和尘肺期别等资料。吸烟指目前吸烟；饮酒指过去 1 年内每周饮酒≥1 次。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 法检测 rDNA 拷贝数

抽取静脉血 5 mL, 200 μL 用于 DNA 提取，剩余血液储存于 -80 ℃ 冰箱待后续检测。200 μL 全血加 40 μL 蛋白酶 K (百泰克生物技术有限公司)，上下颠倒混匀后，按照 DNA 提取试剂盒（德国 Qiagen 公司）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：5 μL SYBR Green、0.2 μL ROX Reference Dye II、正向引物和反向引物各 0.4 μL；DNA 10 ng, ddH₂O 补至 10 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 rDNA 拷贝数，其中 45S rDNA 拷贝数为 28S、18S 和 5.8S rDNA 拷贝数的平均值。

表 1 rDNA 和内参基因引物序列

Table 1 rDNA and internal reference gene primer sequences

基因	正向引物 (5' -3')	反向引物 (5' -3')
18S	CGCGCTCTACCTTACCTACC	GGCCGTGCGTACTTAGACAT
28S	GCGGGTGGTAAACTCCATCT	CACGCCCTTGAACCTCTCT
5.8S	CGACTCTTAGCGGTGGATCA	GATCAATGTGTCTGCATTCAATT
5S	TCTGCTGATCTCGGAAGCTAA	AAGCCTACAGCACCCGGTAT
TP53	TGTCCCTTCCTGGAGCGATCT	CAAACCCCTGGTTAGCACTTC

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，不服从正态分布的采用中位数和四分位数间距 [$M (Q_R)$] 描述，组间比较采用 Mann-Whitney U 检验；定性资料采用相对数描述，组间比较 χ^2 检验。相关性采用 Spearman 秩相关分析；45S rDNA 和 5S rDNA 拷贝数的影响因素分析采用多重线性回归模型。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 两组一般人口学资料比较

调查尘肺病组 88 例, 对照组 71 人。尘肺病组年龄 $M (Q_R)$ 为 56.00 (15.25) 岁; 累计接触粉尘时间为 (12.40 ± 8.08) 年; 工龄为 (13.03 ± 8.46) 年; 吸烟 50 例, 占 56.82%; 饮酒 55 例, 占 62.50%。对照组年龄 $M (Q_R)$ 为 64.00 (37.00) 岁; 吸烟 23 例, 占 32.39%; 饮酒 19 例, 占 26.76%。两组年龄差异无统计学意义 ($Z=-0.478$, $P=0.632$), 吸烟 ($\chi^2=9.439$, $P=0.002$)、饮酒比例 ($\chi^2=20.174$, $P<0.001$) 差异有统计学意义。

2.2 两组 rDNA 拷贝数比较

尘肺病组 5S rDNA 与 18S rDNA、5.8S rDNA 存在相关性 ($r_s=0.279$, $P=0.009$; $r_s=0.342$, $P=0.001$); 对照组 5S rDNA 与 28S rDNA、18S rDNA、5.8S rDNA 存在相关性 ($r_s=0.644$ 、 0.701 、 0.611 , 均 $P<0.001$)。尘肺病组 28S rDNA、18S rDNA、5.8S rDNA 和 45S rDNA 拷贝数低于对照组, 5S rDNA 拷贝数高于对照组 (均 $P<0.05$), 见表 2。不同期别尘肺病患者 28S rDNA、18S rDNA、5.8S rDNA、45S rDNA 和 5S rDNA 拷贝数差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 3。

表 2 尘肺病组与对照组 rDNA 拷贝数比较 [$M (Q_R)$]

Table 2 Comparison of rDNA copy number between the pneumoconiosis group and the control group [$M (Q_R)$]

rDNA	尘肺病组 (n=88)	对照组 (n=71)	Z值	P值
28S	1.57 (0.84)	2.98 (1.83)	-8.937	<0.001
18S	1.17 (0.54)	2.00 (1.79)	-7.763	<0.001
5.8S	1.11 (0.51)	1.46 (1.08)	-6.030	<0.001
45S	1.29 (0.59)	2.10 (1.88)	-8.026	<0.001
5S	5.33 (0.85)	4.66 (1.34)	-2.824	0.005

表 3 不同期别尘肺病患者 rDNA 拷贝数比较 [$M (Q_R)$]

Table 3 Comparison of rDNA copy number in patients with different stages of pneumoconiosis [$M (Q_R)$]

rDNA	I / II 期尘肺 (n=70)	III 期尘肺 (n=18)	Z值	P值
28S	1.58 (0.83)	1.42 (0.69)	-1.490	0.136
18S	1.20 (0.57)	1.04 (0.53)	-1.878	0.060
5.8S	1.12 (0.55)	1.01 (0.43)	-1.298	0.194
45S	1.34 (0.62)	1.21 (0.53)	-0.455	0.649
5S	5.30 (0.79)	5.46 (1.23)	-1.629	0.103

2.3 rDNA 拷贝数的影响因素分析

分别以 45S rDNA 和 5S rDNA 拷贝数为因变量,

以组别、年龄、吸烟和饮酒为自变量做多重线性回归分析。结果显示, 组别、年龄与 45S rDNA 拷贝数变化有关; 年龄与 5S rDNA 拷贝数变化有关。分别以尘肺病组的 45S rDNA 和 5S rDNA 拷贝数为因变量, 以尘肺期别、累计接触粉尘时间、年龄、吸烟和饮酒为自变量做多重线性回归分析。结果显示, 年龄与尘肺病例组 5S rDNA 拷贝数变化有关。见表 4。

表 4 rDNA 拷贝数影响因素的多重线性回归分析

Table 4 Multiple linear regression analysis of factors affecting rDNA copy number

因变量	自变量	β	$s\bar{x}$	β'	t值	P值
45S	组别	-1.595	0.205	-0.525	-7.791	<0.001
	年龄	-0.034	0.006	-0.365	-5.597	<0.001
5S	年龄	-0.013	0.005	-0.230	-2.888	0.004
	尘肺病组 5S	年龄	0.018	0.005	0.385	3.707

3 讨 论

rDNA 阵列起源于核仁, 是一种感知细胞应激并协调代谢、能量状态和核结构的关键细胞器^[9]。rDNA 拷贝数影响细胞核功能, 并与细胞生理、增殖、基因组完整性和基因表达密切相关^[4]。研究表明 rDNA 拷贝数过高或过低对细胞均会产生负面影响。当 rDNA 拷贝数升高时, 转录形成更多的 rRNA, 诱导大量核糖体蛋白形成, 导致总蛋白合成水平显著提高, 该过程会消耗大量能量, 导致细胞代谢异常^[10-11]; 反之, rDNA 拷贝数降低会减弱 rDNA 重组修复能力, 重组修复效率降低^[12]。BEIKO 等^[13]发现, rDNA 拷贝数越低的皮肤成纤维细胞, 在毒物暴露后细胞死亡率越高。

本研究分析了尘肺病患者和未暴露于粉尘环境的社区正常人群的外周血 rDNA 拷贝数变化, 发现与对照人群相比, 尘肺病患者的 45S rDNA 拷贝数降低, 而 5S rDNA 拷贝数升高。这可能是由于粉尘诱导细胞凋亡、坏死, 肺细胞死亡, 伴随核 DNA、线粒体 DNA 等双链 DNA 释放^[14], 诱发核仁应激, 加快 DNA 损伤反应, 而持续的粉尘暴露反复刺激该过程导致外周血 rDNA 拷贝数异常, 此假设需进一步研究验证。尘肺病患者 45S rDNA 与 5S rDNA 拷贝数变化趋势不一致, 可能与 45S rDNA 和 5S rDNA 分别由不同的 RNA 聚合酶转录, 细胞调控机制存在差异有关^[5]。此外, 不同的环境因素可能会引发不同的 rDNA 拷贝数变化: LOU 等^[15]发现六价铬暴露人群

外周血 45S rDNA 与 5S rDNA 拷贝数降低, 但 WANG 等^[16]发现多环芳烃与金属联合暴露会导致鼻腔上皮细胞 45S rDNA 与 5S rDNA 拷贝数升高。

本研究发现 5S rDNA 拷贝数与 45S rDNA 各片段 (28S rDNA、18S rDNA 和 5.8S rDNA) 拷贝数存在相关性, 与文献报道^[17]一致, 但尘肺病组 5S rDNA 与 45S rDNA 各片段间的相关性低于对照组, 推测粉尘暴露影响 rDNA 转录过程。

本研究对 45S rDNA 和 5S rDNA 拷贝数的影响因素进行多重线性回归分析, 结果显示年龄可能是 rDNA 拷贝数变化的影响因素。研究表明, 衰老可能导致基因组不稳定, 线粒体功能和 DNA 修复能力下降^[18-19]。STEIN 等^[20]认为核糖体功能会随着年龄的增长而退化。45S rDNA、5S rDNA 与核糖体的形成息息相关, 因此年龄会影响 rDNA 拷贝数。可能存在一些特定的生物学机制或环境因素, 使得尘肺病患者 5S rDNA 的表达与年龄的关系发生改变, 这需要进一步的探究。

综上所述, 尘肺病患者外周血 45S rDNA 拷贝数降低和 5S rDNA 拷贝数升高。然而尘肺纤维化是一个漫长复杂的病理过程, 粉尘诱发 rDNA 拷贝数变化的机制仍需进一步研究验证。

参考文献

- [1] FENG L F, DU J, YAO C J, et al.Ribosomal DNA copy number is associated with P53 status and levels of heavy metals in gastrectomy specimens from gastric cancer patients [J/OL].Environ Int, 2020, 138 [2024-01-08]. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105593>.
- [2] PANDA A, YADAV A, YEEMA H, et al.Tissue-and development-stage-specific mRNA and heterogeneous CNV signatures of human ribosomal proteins in normal and cancer samples [J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48 (13): 7079-7098.
- [3] SAKA K, TAKAHASHI A, SASAKI M, et al.More than 10% of yeast genes are related to genome stability and influence cellular senescence via rDNA maintenance [J].Nucleic Acids Res, 2016, 44 (9): 4211-4221.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 世界中医药学会联合会肺康复专业委员会, 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南中医药大学.尘肺病康复专家共识(2021 版) [J].中国循证医学杂志, 2021, 21 (9): 1000-1007.
- [7] 何晓庆, 罗进斌, 陈强, 等.2009—2021 年金华市职业性尘肺病疾病负担分析 [J].预防医学, 2023, 35 (7): 620-624.
- [8] 中华人民共和国卫生部.尘肺病诊断标准: GBZ 70—2009 [S].北京: 中国标准出版社, 2009.
- [9] YU S K, LEMOS B.The long-range interaction map of ribosomal DNA arrays [J].PLoS Genet, 2018, 14 (3): 1-22.
- [10] 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].Front Genet, 2018, 9: 1-11.
- [11] BUCHWALTER A, HETZER M W.Nucleolar expansion and elevated protein translation in premature aging [J].Nat Commun, 2017, 8 (1): 1-13.
- [12] IDE S, MIYAZAKI T, MAKI H, et al.Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity [J].Science, 2010, 327 (5966): 693-696.
- [13] BEIKO N N, TEREKHOV S V, SHUBAEVA N O, et al.Early and late responses to oxidative stress in human dermal fibroblasts of healthy donors and rheumatoid arthritis patients.Relationship between the cell death rate and the genomic dosage of active ribosomal genes [J].Mol Biol (Mosk), 2005, 39 (2): 264-275.
- [14] BENMERZOUG S, ROSE S, BOUNAB B, et al.STING-dependent sensing of self-DNA drives silica-induced lung inflammation [J].Nat Commun, 2018, 9 (1): 1-19.
- [15] LOU J L, YU S K, FENG L F, 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 [2024-01-08]. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106525>.
- [16] WANG Y H, MENG T, ZHANG L Y, et al.Inhalable mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons and metals, DNA oxidative stress and nasal ribosomal DNA copy number amplification: direct and indirect effect analyses among population [J/OL].J Hazard, 2023, 455 [2024-01-08]. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131538>.
- [17] 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 U S A, 2015, 112 (8): 2485-2490.
- [18] FAKOURI N B, HOU Y, DEMAREST T G, et al.Toward understanding genomic instability, mitochondrial dysfunction and aging [J].Febs J, 2019, 286 (6): 1058-1073.
- [19] WATANABE K, IKUNO Y, KAKEYA Y, et al.Age-related dysfunction of the DNA damage response in intestinal stem cells [J].Inflamm Regen, 2019, 39 (1): 1-7.
- [20] STEIN K C, MORALES-POLANCO F, VAN DER LIENDEN J, et al.Ageing exacerbates ribosome pausing to disrupt cotranslational proteostasis [J].Nature, 2022, 601 (7894): 637-642.

收稿日期: 2023-10-07 修回日期: 2024-01-08 本文编辑: 徐文璐