

文章编号: 2095-9982(2017)03-0189-07

中图分类号: R114

文献标志码: A

【论著 | 原创精选】

RING2对苯并[a]芘导致的人支气管上皮细胞BPDE-DNA加合物及CHK1的影响

王武斌, 张红杰, 刘艳丽, 杨瑾

摘要:

【目的】探讨泛素连接酶RING2对苯并[a]芘(BaP)导致的人支气管上皮细胞(BEAS-2B)BPDE-DNA加合物及周期检测点激酶1(CHK1)表达水平的影响。

【方法】用不同浓度的BaP(0、1、2、4、8、16、32 μmol/L)染毒BEAS-2B细胞24 h,以16 μmol/L BaP染毒BEAS-2B细胞不同时间(0、1、2、4、8、12、24 h);通过siRNA干扰技术降低BEAS-2B细胞中泛素连接酶RING2的表达水平,用16 μmol/L BaP染毒BEAS-2B和BEAS-2B(siRNA-RING2)细胞24 h。使用免疫组化荧光法检测细胞中BPDE-DNA加合物的表达情况,采用Western blot检测细胞中CHK1及其S345位点磷酸化的水平。

【结果】免疫组化荧光法结果显示,与正常对照组相比,转染前后染毒组的荧光强度均增加($P<0.01$),提示染毒后BPDE-DNA加合物增加,其中BESA-2B(siRNA-RING2)染毒组的荧光强度较正常染毒组的增加了32%。Western blot结果显示,随着染毒时间和染毒浓度的增加,BESA-2B的CHK1及CHK1 S345-p的水平逐渐增加($P<0.01$);16 μmol/L BaP染毒BEAS-2B(siRNA-RING2)细胞24 h后,其CHK1及CHK1 S345-p水平较对照组明显下降($P<0.01$);析因分析表明,转染与染毒均对CHK1及CHK1 S345-p的表达量有影响,两因素间存在交互作用($P<0.01$),转染后染毒组与不染毒组CHK1及CHK1 S345-p水平的差异,与正常细胞组的相比,分别降低了54%和51%;协方差分析控制染毒因素后,BESA-2B(siRNA-RING2)组CHK1及CHK1 S345-p水平的修正均数(分别为0.77和0.89)较BEAS-2B组的修正均数(分别为1.24和1.32)明显降低($P<0.01$)。

【结论】RING2低表达的细胞DNA对BaP更加敏感,这提示RING2可能通过影响CHK1及其磷酸化水平来调控细胞周期的进程,进而影响DNA的损伤修复。

关键词: 苯并[a]芘;泛素连接酶RING2;BPDE-DNA加合物;周期检测点激酶1

引用: 王武斌,张红杰,刘艳丽,等. RING2对苯并[a]芘导致的人支气管上皮细胞BPDE-DNA加合物及CHK1的影响[J]. 环境与职业医学, 2017, 34 (3): 189-195. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16616

Effects of ubiquitin protein ligase RING2 on BPDE-DNA adducts and CHK1 in BEAS-2B cells exposed to benzo(a)pyrene WANG Wu-bin, ZHANG Hong-jie, LIU Yan-li, YANG Jin (Department of Occupational Health, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China). Address correspondence to YANG Jin, E-mail: yj750410@163.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

【Objective】To explore the role of ubiquitin protein ligase RING2 in the changes of BPDE-DNA adducts and checkpoint kinase 1 (CHK1) in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) exposed to benzo(a)pyrene (BaP).

【Methods】BESA-2B cells were exposed to BaP at concentrations of 0, 1, 2, 4, 8, 16, and 32 μmol/L for 24 h, respectively; BESA-2B cells were exposed to 16 μmol/L BaP for 0, 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h, respectively. The expressions of RING2 were inhibited by small interfering RNA (siRNA) in BEAS-2B cells, then the BESA-2B cells and BESA-2B (siRNA-RING2) cells were exposed to 16 μmol/L BaP for 24 h. BPDE-DNA adducts were evaluated by fluorescent immunohistochemistry. The levels of CHK1 and CHK1 S345-p were detected by Western blot.

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

【基金项目】国家自然科学基金项目(编号:81273041)

【作者简介】王武斌(1990—),男,硕士生;研究方向:职业肿瘤发生机制及预防;E-mail:wbw044200@163.com

【通信作者】杨瑾, E-mail: yj750410@163.com

【作者单位】山西医科大学公共卫生学院劳动卫生学教研室,山西太原030001

[Results] Compared with the normal control group, the fluorescence intensities were significantly elevated both in the BESA-2B cells and the BESA-2B (siRNA-*RING2*) cells exposed to BaP ($P < 0.01$), indicating elevated levels of BPDE-DNA adducts, and the fluorescence intensity of BESA-2B (siRNA-*RING2*) cells were increased by 32% compared with the BESA-2B cells. According to results of Western blot, the relative expression levels of CHK1 and CHK1 S345-p in BESA-2B cells were significantly elevated along with increasing concentration and exposure time ($P < 0.01$); the levels of CHK1 and CHK1 S345-p in BESA-2B (siRNA-*RING2*) cells exposed to 16 $\mu\text{mol/L}$ BaP for 24 h were significantly decreased compared with the normal control group ($P < 0.01$). The results of factorial analysis showed both transfection and BaP treatment had impacts on the expression levels of CHK1 and CHK1 S345-p, as well as interactions between these two factors ($P < 0.01$). Compared with the BESA-2B cells, the difference between levels of CHK1 and CHK1 S345-p in BESA-2B (siRNA-*RING2*) cells exposed or non-exposed to BaP decreased by 54% or 51%. The results of covariance analysis showed that the estimated means of the levels of CHK1 and CHK1 S345-p (0.77 and 0.89 respectively) in BESA-2B (siRNA-*RING2*) cells were significantly lower than those in BESA-2B cells (1.24 and 1.32 respectively) ($P < 0.01$) with control of BaP exposure.

[Conclusion] The DNA of siRNA-*RING2* cells are much more sensitive to BaP exposure than that of normal cells, which indicates that *RING2* may be involved in DNA repair by affecting the expression of CHK1 and CHK1 S345-p.

Keywords: benzo(a)pyrene; ubiquitin protein ligase *RING2*; BPDE-DNA adducts; checkpoint kinase1

Citation: WANG Wu-bin, ZHANG Hong-jie, LIU Yan-li, et al. Effects of ubiquitin protein ligase *RING2* on BPDE-DNA adducts and CHK1 in BEAS-2B cells exposed to benzo(a)pyrene[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(3): 189-195. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16616

环境中的多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs) 主要是通过煤、原油等碳氢化合物的不完全燃烧所产生, 其致癌性早在 1876 年就有报道。1930 年, 苯并 [a] 芘 [benzo (a) pyrene, BaP] 作为 PAHs 的一种, 被认定为致癌物。焦炉工、化石燃料加工工人、长期吸烟和经常食用烧烤食品的人群被判定为 BaP 高暴露人群, 且流行病学调查显示, 长期接触 BaP 可增加肺癌和结肠癌的易感性^[1-3]。2012 年, 国际癌症研究中心 (IARC) 将 BaP 认定为 2A 类致癌物。细胞实验表明, BaP 进入机体后, 经过细胞色素氧化酶 P450s (CYP450) 代谢成为终致癌物苯并 [a] 芘-7, 8-二氢二醇-9, 10-环氧化物 [benzo (a) pyrene-7, 8-dihydrodiol-9, 10-epoxide, BPDE]^[4]。BPDE 具有亲电子性, 容易与 DNA 的鸟嘌呤共价结合形成稳定的 BDE-DNA 加合物, 导致 DNA 双螺旋结构受损^[5]。当 DNA 受损时, 机会启动相应的 DNA 修复机制来进行修复, 以保证遗传物质的稳定性。近年来的研究表明, 表观遗传在 DNA 修复过程中发挥重要作用, 其中组蛋白修饰的作用日益受到人们的重视^[6]。本课题组前期研究表明, 组蛋白 H2A 的单泛素化水平会影响 BaP 所致的 DNA 损伤修复^[7], 而泛素连接酶 *RING2* 是其单泛素化过程中的关键酶。此外, 有研究表明, 组蛋白泛素化可能参与细胞周期的调控^[8]。当 DNA 出现损伤时, 机会激活相应的 DNA 损伤检测点共济失调 - 毛细血管扩张突变激酶 - 周期检测点激酶 2 (ATM-CHK2)、共济失调 - 毛细血管扩张有关激酶 - 周期检测点激酶 1 (ATR-CHK1) 通路, 参与 DNA 损伤位点的识别、修复

等^[9]。其中 ATR-CHK1 通路在维持 DNA 复制过程中基因组的稳定性方面发挥重要作用。ATR-CHK1 通路的活化会激活一系列的酶级联反应^[10], 导致细胞周期阻滞, 使受损的 DNA 有充足的时间来进行修复。考虑到泛素连接酶 *RING2* 可能通过调节组蛋白 H2A 的单泛素化水平, 进而调控细胞周期进程来影响 DNA 的损伤修复, 因此本研究以永生化人支气管上皮细胞 (BEAS-2B) 为对象, 通过观察 BaP 染毒前后 BEAS-2B 和 BEAS-2B (siRNA-*RING2*) 细胞中 BPDE-DNA 加合物的量、CHK1 及其磷酸化水平的变化, 探讨泛素连接酶 *RING2* 在 BaP 致细胞 DNA 损伤中的作用及其对 CHK1 水平的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂和仪器

人支气管上皮细胞株由首都医科大学田琳教授惠赠。BaP (批号 WUD5H, Sigma, 美国); Lipofectamine RNAi MAX 转染试剂 (Invitrogen, 美国); *RING2* siRNA 序列 (广州市锐博生物科技有限公司, 中国); BPDE-DNA 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, 美国); Alexa Fluor 488 山羊抗鼠抗体、CHK1 鼠单克隆抗体 (Proteintech, 美国); 抗 CHK1-Ser345 抗体 (Abcam, 美国); 哺乳动物蛋白抽提试剂盒、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒、抗 β -Actin 鼠单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG (北京康为世纪生物科技有限公司, 中国)。二氧化碳培养箱

(Heraeus, 德国); SpectraMaxM2 型多功能酶联免疫检测仪 (Molecular Devices, 美国); Olympus BX-51 荧光显微镜 (Olympus, 日本); DYY-7C 型电泳仪 (北京六一仪器厂, 中国); 凝胶成像仪 Universal Hood II (Bio-Rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 siRNA-*RING2* 转染 BEAS-2B 细胞 BEAS-2B (siRNA-*RING2*) 取适量处于对数生长期的 BEAS-2B 细胞混悬液均匀地铺于 6 孔板中, 待细胞密度达到 40% 时进行转染。由广州锐博生物科技有限公司根据人 *RING2* 基因靶序列 “GGCAATAACAGATGGCTTA” 设计 *RING2* 干扰序列 5'-GGCAAUAAACAGAUUGGCUUA dTdT 3', 3'-dTdTCCGUUAUUG UCUACCGAAU 5', 阴性对照序列由该公司一并提供。用 245 μ L 不含血清和双抗的培养基稀释 5 μ L 20 μ mol/L siRNA, 轻轻混匀, 室温孵育 5 min。用 245 μ L 不含血清和双抗的培养基稀释 5 μ L lipofectamine RNAi MAX, 轻轻混匀并室温孵育 5 min。将两种混合液轻轻混匀, 室温孵育 20 min 后, 加入细胞密度 40% 的 6 孔培养板中。将培养板置于 37°C、体积分数为 5%CO₂ 的培养箱中培养, 6 h 后将孔里含有混合液的培养基移去, 更换新鲜的生长培养基, 再培养 24 h, 之后进行染毒处理。

1.2.2 细胞染毒及处理 前期实验结果^[7]显示, 随着 BaP 染毒浓度和染毒时间的增加, H2A 的单泛素化水平和 S 期阻滞会随之增加, 但当浓度高于 16 μ mol/L 时, 细胞的 H2A 单泛素化水平会达到一个平台期, 此时再增加 BaP 染毒浓度和染毒时间, H2A 的单泛素化水平无明显改变, S 期阻滞也不再增加, 且细胞的活力会迅速下降, 细胞大量死亡, 无法进行之后的免疫荧光和免疫印记实验。在 16 μ mol/L 染毒达到 24 h 时, 此时细胞的活力还比较高, 且 BaP 导致的 DNA 损伤和 S 期阻滞都比较明显, 因此选用 16 μ mol/L BaP 染毒不同时间点, 又选用 24 h 作为不同浓度 BaP 染毒的观察时间。

用不同浓度的 BaP (0、1、2、4、8、16、32 μ mol/L) 染毒 BEAS-2B 细胞 24 h, 以 16 μ mol/L BaP 染毒 BEAS-2B 细胞不同时间 (0、1、2、4、8、12、24 h); 用 16 μ mol/L BaP 染毒 BEAS-2B 和 BEAS-2B (siRNA-*RING2*) 细胞 24 h, 各组设 3 个平行样。以未染毒组为空白对照组, 体积分数 0.1% DMSO 处理组为溶剂对照组, 阴性对照序列组作为干扰阴性对照组。

1.2.3 免疫荧光法检测细胞 BPDE-DNA 加合物的含量

细胞染毒结束后, 加适量质量分数为 4% 的多聚甲醛室温固定 1 h, 用体积分数为 0.1% 的 TritonX-100 室温通透 30 min, 之后用 RNase A (100 μ g/mL, 37°C, 1 h) 和蛋白激酶 K (10 μ g/mL, 室温, 30 min) 进行处理, 用 4 mol/L HCl (室温, 10 min) 变性, 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris-base) (室温, 5 min) 进行中和, 随后用 BSA 封闭 1 h, 滴加 BPDE-DNA 抗体 (抗体与稀释液的体积比为 1:50), 4°C 孵育过夜。第二天用滴加 Alexa Fluor 488 山羊抗鼠抗体 (抗体与稀释液的体积比为 1:200), 37°C 孵育 1 h, 接着滴加 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI, 抗体与稀释液的体积比为 1:1000) 室温孵育 10 min; PBS 冲洗 3 min, 3 次后, 用激光共聚焦仪检测 BPDE-DNA 加合物的表达。采用 Olympus BX-51 荧光显微镜进行图像采集, 用 FV10-ASW 软件对各组荧光强度进行分析。

1.2.4 Western blot 检测 CHK1 及其磷酸化水平 各组细胞染毒结束后, 用质量分数为 0.25% 的胰酶消化细胞, D-hanks 平衡盐溶液清洗 2 遍, 收集至 1.5 mL 离心管中。按哺乳动物蛋白抽提剂试剂盒说明书提取蛋白, 采用 BCA 蛋白定量法测各组蛋白浓度, 将各组蛋白浓度调至同一浓度, 加入相应的蛋白示踪上样缓冲液。取约 50 μ g 总蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳 (SDS-PAGE)。电泳后湿转至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 用质量分数为 5% 的脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 加入 CHK1 及 CHK1 S345-p 抗体孵育, 4°C 过夜。PBS 漂洗 10 min, 3 次, 加入相对应的二抗 37°C 孵育 2 h, PBS 漂洗 10 min, 3 次。用 Bio-Rad 凝胶成像仪进行检测, 用 Quantity One-4.6.5 软件进行读数, 得到各组的灰度值。

1.3 统计学分析

用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同组间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 LSD 法。采用 2×2 析因分析比较各处理因素对检测指标的单独效应和交互效应。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

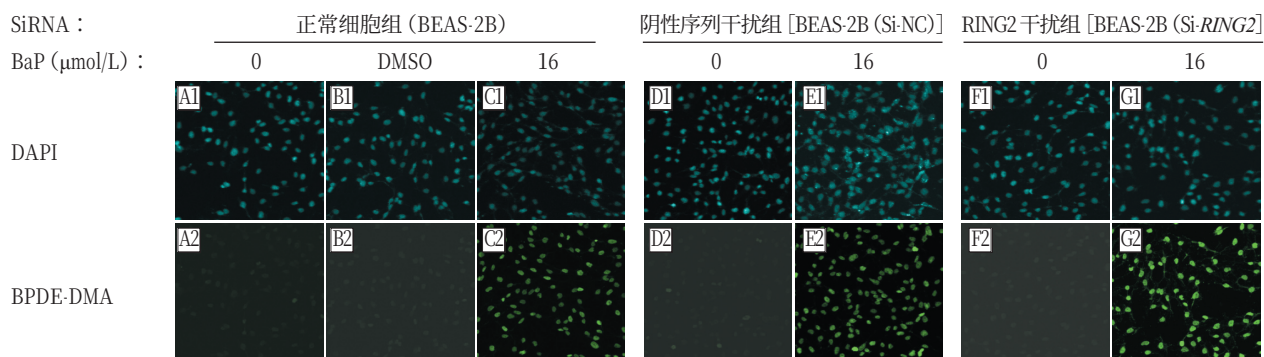
2 结果

2.1 泛素连接酶 RING2 对 BaP 所致细胞 BPDE-DNA 加合物的影响

如图 1 所示, 用 16 μ mol/L BaP 染毒 BEAS-2B 和 BEAS-2B (siRNA-*RING2*) 细胞 24 h 后, 各染毒组 (C2、E2 和 G2) 的荧光强度较正常组 (A2) 分别增加了

59%、61%和110%，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，说明染毒后BPDE-DNA加合物表达增加。BEAS-2B (siRNA-*RING2*) 染毒组 (G2) 的荧光强度较BEAS-2B染毒组 (C2) 增加了32%，差异有统计学意义 ($P <$

0.01)。溶剂对照组、阴性序列干扰组、*RING2*序列干扰组与正常组相比，BPDE-DNA加合物表达差异无统计学意义 ($P = 0.422$)，正常细胞染毒组 (C2) 与阴性序列干扰后染毒组 (E2) 差异无统计学意义 ($P = 0.864$)。



[注] 图中A1~G1是4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 染色结果, A2~G2是BPDE-DNA加合物染色结果, 其中A是正常细胞培养组, B是正常细胞的溶剂对照组, C是正常细胞16 $\mu\text{mol/L}$ BaP染毒24h组, D是阴性序列干扰对照组, E是阴性序列干扰后16 $\mu\text{mol/L}$ BaP染毒24h组, F是*RING2*干扰组, G是*RING2*干扰后16 $\mu\text{mol/L}$ BaP染毒24h组。C2、E2、G2较A2相比, 荧光强度增加 ($P < 0.01$), G2较C2荧光更强 ($P < 0.01$), C2与E2差异无统计学意义 ($P = 0.864$)。

[Note] Results of confocal analysis with immunostaining of 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue) in Figure A1-G1 and BPDE-DNA adducts (green) in Figure A2-G2. BEAS-2B, BEAS-2B (Si-NC), BEAS-2 (Si-*RING2*) are cultured without (Figure A, D, and F, respectively) or with (Figure C, E, and G, respectively) 16 $\mu\text{mol/L}$ BaP. The solvent control group of BEAS-2B shows in Figure B. The levels of fluorescence intensity are significantly higher in Figure C2, E2, and G2 than in Figure A2 ($P < 0.01$), and the level of Figure G2 is increased compared with Figure C2 ($P < 0.01$). However, no significant difference is found between Figure C2 and Figure E2 ($P = 0.864$).

图1 BaP染毒转染前后各组细胞BPDE-DNA加合物的情况

Figure1 Changes of BPDE-DNA adducts in BEAS-2B cells with different treatments

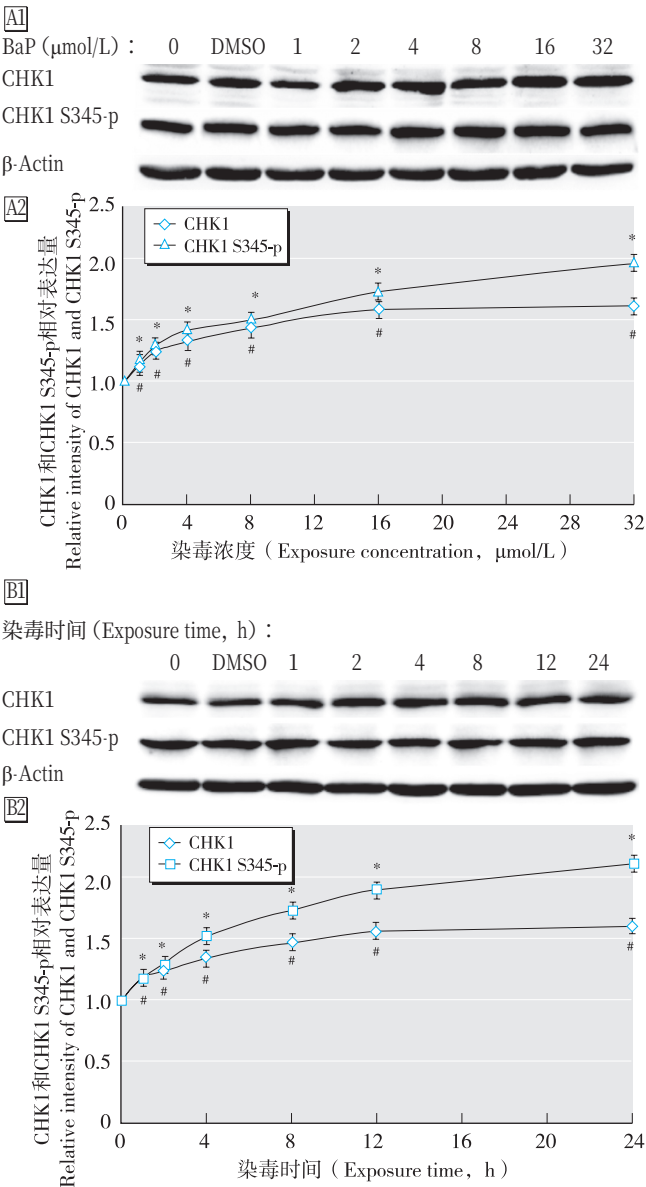
2.2 BaP对CHK1及CHK1 S345-p表达水平变化的剂量效应与时间效应

图2显示, 用不同浓度BaP处理BEAS-2B细胞24h (图A1、A2) 以及用16 $\mu\text{mol/L}$ BaP处理BEAS-2B细胞不同时间 (图B1、B2) 的蛋白检测结果。随着染毒浓度和染毒时间的增加, CHK1及CHK1 S345-p的水平均增加 ($P < 0.01$)。不同染毒浓度组中, 32 $\mu\text{mol/L}$ BaP组的CHK1和CHK1 S345-p的含量较正常组分别增加了59%和98%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；不同染毒时间点中, 24h的CHK1和CHK1 S345-p的含量较正常组分别增加了62%和109%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。CHK1的水平在16 $\mu\text{mol/L}$ BaP染毒24h后达到峰值, 之后随着浓度的增加, 其表达水平基本不变, 差异无统计学意义 ($P = 0.326$)；但其磷酸化水平依然增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。溶剂对照组与正常组相比, 两种蛋白表达量差异均无统计学意义 (分别为 $P = 0.668$ 和 $P = 0.761$)。

2.3 泛素连接酶RING2对BaP所致细胞CHK1及CHK1 S345-p表达水平的影响

本次实验采用SiRNA技术沉默*RING2*, 经检

测, 干扰后可以使泛素连接酶RING2的表达水平下调72%^[7], 此水平满足后续实验需求。如图3和表1、表2所示, 用16 $\mu\text{mol/L}$ BaP染毒BEAS-2B和BEAS-2B (siRNA-*RING2*) 细胞24h后, BEAS-2B组的CHK1及CHK1 S345-p的水平分别比不染毒组增加了48%和65%；而BEAS-2B (siRNA-*RING2*) 组CHK1及CHK1 S345-p的水平分别下降了45%和28%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。析因分析结果显示, 转染与染毒均对CHK1及CHK1 S345-p的水平有影响, 且转染与染毒之间存在交互效应 ($P < 0.01$)。转染后染毒组CHK1及CHK1 S345-p水平比非染毒组的低, 差异为负值, 而正常细胞染毒组与不染毒组间的差异为正值。因此, 转染后染毒组与不染毒组两种蛋白水平的差异较正常细胞组的差异分别降低了46%和49%。协方差分析控制染毒因素后, BEAS-2B (siRNA-*RING2*) 组CHK1及CHK1 S345-p水平的修正均数 (0.77和0.89) 较BEAS-2B组的修正均数 (1.24和1.32) 明显降低, 差别有统计学意义 ($P < 0.01$)。溶剂对照组、阴性序列干扰组与正常组相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。



[注] *, #: 与正常对照组相比, $P < 0.05$ 。
[Note] *, #: Compared with the normal control group, $P < 0.05$ 。
图2 BaP 不同染毒浓度 (A1、A2) 处理 24 h 和 16 μmol/L BaP 染毒不同时间 (B1、B2) 对 BEAS-2B 细胞 CHK1 及 CHK1 S345-p 表达的影响

Figure2 Protein expression of CHK1 and CHK1 S345-p in BEAS-2B cells exposed to different concentrations of BaP for 24 h (A1, A2) or to 16 μmol/L BaP for different time (B1, B2)

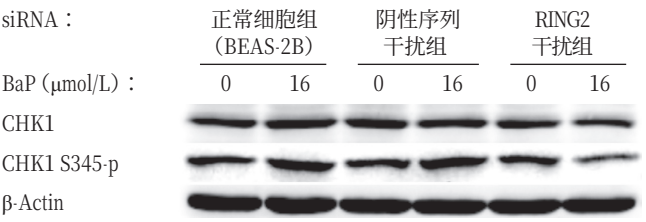


图3 BaP 染毒转染前后各组细胞 CHK1 及 CHK1 S345-p 的变化情况
Figure 3 Changes of protein expression of CHK1 and CHK1 S345-p in BEAS-2B cells with different treatments

表1 CHK1 的相对表达量及转染、染毒因素的效应分析

Table1 Relative expression of CHK1 and effect analysis on transfection and exposure factors			
是否转染 Transfection or not	BaP (μmol/L)		染毒的单独效应 Effect of BaP only
	0	16	
BEAS-2B	1.00	1.48 ^a	0.48
BESA-2B (siRNA-RING2)	0.99	0.55 ^a	-0.44
转染的单独效应 Effect of transfection only	-0.01	-0.93	-0.46 (交互效应) -0.46 (Interaction effect)

[注] a: 与 BEAS-2B 0 μmol/L BaP 组相比, $P < 0.05$ 。
[Note] a: Compared with the BEAS-2B 0 μmol/L BaP group, $P < 0.05$ 。

表2 CHK1 S345-p 的相对表达量及转染、染毒因素的效应分析

Table 2 Relative expression of CHK1 S345-p and effect analysis on transfection and exposure factors			
是否转染 Transfection or not	BaP (μmol/L)		染毒的单独效应 Effect of BaP only
	0	16	
BEAS-2B	1.00	1.65 ^a	0.65
BESA-2B (siRNA-RING2)	1.05	0.72 ^a	-0.33
转染的单独效应 Effect of transfection only	0.05	-0.93	-0.49 (交互效应) -0.49 (Interaction effect)

[注] a: 与 BEAS-2B 0 μmol/L BaP 相比, $P < 0.05$ 。
[Note] a: Compared with the BEAS-2B 0 μmol/L BaP group, $P < 0.05$ 。

3 讨论

PAHs 包含萘、蒽、菲、芴、芘等 150 多种化合物, BaP 常作为 PAHs 的代表物被研究。动物实验和流行病学研究表明, 动物和人类肺癌的发生与 BaP 的暴露有一定的关系^[11]。BaP 在机体内经过一系列反应后与 DNA 共价结合形成 BPDE-DNA 加合物, 此加合物是导致细胞发生癌变的源头^[12]。Einaudi 等^[13] 学者研究表明, 细胞内的 BPDE-DNA 加合物随着接触 BaP 时间的延长而增加。本次结果表明, BPDE-DNA 加合物的量随着 BaP 染毒浓度和染毒时间的增加而增加, 提示随着 BaP 染毒浓度和时间的增加, DNA 损伤越来越严重, 这与本课题组之前的彗星试验^[14] 和 ELISA^[15] 法检测结果相一致。

正常情况下, 组蛋白与 DNA 超螺旋形成致密的核小体, 这种结构可以对 DNA 起到保护作用^[16]。当出现 DNA 损伤时, 这种致密结构使得相应的损伤识别因子、修复因子等不能很好地识别损伤位点, 从而影响受损 DNA 的修复。近年来, 组蛋白的修饰在 DNA 损伤修复过程中的作用受到人们的重视, Bergink^[17] 与 Zhu 等^[18] 学者认为, 组蛋白的单泛素化修饰的作用与 DNA 修复有着密切的关系, 而泛素连接酶 RING2 由于其特异识别底物的能力, 在组蛋白单泛素化的过程中起着关键性的作用。在机体应答 DNA 损伤过

程中, RING2起着保护性的作用^[19], 当RING2表达量受限时, 会影响受损DNA的修复。本次实验证明, RING2低表达的细胞对BaP更为敏感, DNA损伤更严重, 此结果与Gieni等^[20]学者的观点相符。

本课题组前期结果显示, BaP会导致BEAS-2B细胞阻滞在S期^[21]。DNA受损时, 真核生物会激活相应的信号通路阻止复制叉的进行从而使细胞周期阻滞, DNA得以有时间进行修复。彗星实验结果显示, 碱性(pH=12.1)电泳^[22]检测出BaP所致的DNA损伤与紫外线所致的DNA损伤相似, 都是以单链损伤为主。单链损伤主要由ATR-CHK1^[23]信号通路来识别, CHK1在感应到损伤后, 其Ser345位点被磷酸化激活, 从而磷酸化下游的细胞分裂周期蛋白25A (Cdc25A), 导致Cdc25A抑制、水解, 进而导致周期素依赖性蛋白激酶2 (Cdk2) 的抑制性磷酸化位点不能被去磷酸化激活, 最终导致细胞周期阻滞^[24-25]。本次实验结果显示, 随着染毒时间和染毒剂量的增加, CHK1及CHK1 S345-p的表达量增加, 与前期S阻滞结果相一致, 而RING2低表达的细胞, CHK1及CHK1 S345-p的水平均下降。析因分析表明, 染毒和RING2两种因素都会对CHK1及其磷酸化水平产生影响, 从而影响细胞周期的进程; 用协方差分析平衡染毒因素后, 观察RING2的作用, 发现RING2低表达的细胞中, CHK1及其磷酸化水平均降低, 进一步说明了RING2的存在有助于受损DNA的修复。

本次研究表明, 泛素连接酶RING2低表达后, 会下调CHK1的表达水平及磷酸化水平, 进而影响细胞周期的进程, 导致BPDE-DNA加合物增多, DNA损伤加重。本次实验通过siRNA干扰RING2前后, BPDE-DNA加合物的水平变化, CHK1及CHK1 S345-p表达量的差异, 在细胞水平上阐明了泛素连接酶RING2可能在BaP所致DNA损伤修复中的作用。但RING2所致的组蛋白H2A单泛素化与周期检测点激酶对DNA损伤的识别之间有无其他机制参与尚不清楚, 有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Zhu L, Lu H, Chen S, et al. Pollution level, phase distribution and source analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in residential air in Hangzhou, China [J]. J Hazard Mater, 2009, 162 (2/3): 1165-1170.
- [2] Basu S. Bioactive eicosanoids: role of prostaglandin $F_{2\alpha}$ and F_2 -isoprostanes in inflammation and oxidative stress related pathology [J]. Mol Cells, 2010, 30 (5): 383-391.
- [3] Cai Y, Lv J, Zhang W, et al. Dietary exposure estimates of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Xuanwei and Fuyuan, counties in a high lung cancer incidence area in China [J]. J Environ Monit, 2012, 14 (3): 886-892.
- [4] Beranek M, Fiala Z, Kremlacek J, et al. Genetic polymorphisms in biotransformation enzymes for benzo [a] pyrene and related levels of benzo [a] pyrene-7, 8-diol-9, 10-epoxide-DNA adducts in Goeckerman therapy [J]. Toxicol. Lett., 2016, 255 (26): 47-51.
- [5] Møller P, Loft S. Oxidative damage to DNA and lipids as biomarkers of exposure to air pollution [J]. Environ Health Perspect, 2010, 118 (8): 1126-1136.
- [6] Bhaskara S, Chyla BJ, Amann JM, et al. Deletion of Histone Deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control [J]. Mol Cell, 2008, 30 (1): 61-72.
- [7] Yang J, Wang Z, Chen W, et al. Role of ubiquitin protein ligase Ring2 in DNA damage of human bronchial epithelial cells exposed to benzo [a] pyrene [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2013, 27 (7): 357-363.
- [8] Graham K, Moran-Jones K, Sansom OJ, et al. FAK deletion promotes p53-mediated induction of p21, DNA-damage responses and radio-resistance in advanced squamous cancer cells [J]. PLoS One, 2011, 6 (12): e27806.
- [9] Matsunuma R, Niida H, Ohhata T, et al. UV Damage-induced phosphorylation of HBO1 triggers CRL4^{DBB2}-mediated degradation to regulate cell proliferation [J]. Mol Cell Biol, 2016, 36 (3): 394-406.
- [10] Demidova AR, Aau MY, Zhuang L, et al. Dual regulation of Cdc25A by Chk1 and p53-ATF3 in DNA replication checkpoint control [J]. J Biol Chem, 2008, 284 (7): 4132-4139.
- [11] Zheng Z, Park SY, Lee M, et al. Effects of benzo (a) pyrene on the expression of heat shock proteins, pro-inflammatory cytokines and antioxidant enzymes in hepatic tumors induced by rat hepatoma N1-S1 cells [J]. J Korean Med Sci, 2011, 26 (2): 222-230.
- [12] Herbstman JB, Tang D, Zhu D, et al. Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons benzo [a] pyrene-DNA adducts, and genomic DNA methylation in cord blood [J]. Environ Health Perspect, 2012, 120 (5): 733-738.
- [13] Einaudi L, Courbiere B, Tassistro V, et al. In vivo exposure to benzo (a) pyrene induces significant DNA damage in mouse oocytes and cumulus cells [J]. Hum Reprod, 2014, 29 (3): 548-554.
- [14] 王志武, 贾利娜, 牛侨, 等. 苯并 (a) 芘致人支气管上皮细

- 胞DNA损伤及与组蛋白H2A单泛素化水平的关系[J]. 环境与职业医学, 2012, 29 (3): 136-138, 143.
- [15] 杨瑾, 陈文涛, 范燕峰, 等. 苯并(a)芘染毒致人支气管上皮细胞的周期改变及BPDE-DNA加合物形成[J]. 癌变·畸变·突变, 2015, 27 (2): 86-90.
- [16] Peterson CL, Côté J. Cellular machineries for chromosomal DNA repair [J]. Genes Dev, 2004, 12 (18): 602-616.
- [17] Bergink S, Salomons FA, Hoogstraten D, et al. DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A [J]. Genes Dev, 2006, 20 (10): 1343-1352.
- [18] Zhu Q, Wani G, Arab HH, et al. Chromatin restoration following nucleotide excision repair involves the incorporation of ubiquitinated H2A at damaged genomic sites [J]. DNA Rep, 2009, 8 (2): 262-273.
- [19] Ismail IH, Andrin C, McDonald D, et al. BMI1-mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair [J]. J Cell Biol, 2010, 191 (1): 45-60.
- [20] Gieni RS, Ismail IH, Campbell S, et al. Polycomb group proteins in the DNA damage response: A link between radiation resistance and "stemness" [J]. Cell Cycle, 2011, 10 (6): 883-894.
- [21] 范燕峰, 陈文涛, 王武斌, 等. 泛素连接酶RING2对苯并(a)芘染毒人支气管上皮细胞周期和P53蛋白表达的影响[J]. 癌变·畸变·突变, 2015, 27 (5): 347-352.
- [22] 赵琳娜, 陈薛钊, 钟儒刚. 单细胞凝胶电泳技术检测DNA损伤的方法及进展[J]. 生物学杂志, 2013, 30 (3): 85-88, 71.
- [23] Flynn RL, Zou L. ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress [J]. Trends Biochem Sci, 2011, 36 (3): 133-140.
- [24] Yasutis KM, Kozminski KG. Cell cycle checkpoint regulators reach a zillion [J]. Cell Cycle, 2013, 12 (10): 1501-1509.
- [25] Chung JH, Bunz F. Cdk2 is required for p53-independent G₂/M checkpoint control [J]. PLoS Genet, 2010, 6 (2): e1000863.

(收稿日期: 2016-09-18; 录用日期: 2016-11-25)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 汪源; 校对: 洪琪)

【告知栏】

《环境与职业医学》杂志2017年征订通知

《环境与职业医学》杂志(<http://jeom.scdc.sh.cn:8081>)创刊于1984年,系由上海市疾病预防控制中心、中华预防医学会主办,国内外公开发行的专业性学术期刊(ISSN 2095-9982, CN 31-1879/R, CODEN HYZYAZ)。曾多次被评为华东地区优秀期刊和中华预防医学会系列杂志优秀期刊。

《环境与职业医学》目前已入选中国科学引文数据库(CSCD)源期刊、中文核心期刊(预防医学、卫生学类核心期刊)、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、RCCSE中国核心学术期刊(A),并被美国化学文摘(CA)、乌利希国际期刊指南、英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、英国全球健康(GH)及美国剑桥科学文摘(自然科学)(CSA: NS)等数据库收录。

本刊主要介绍国内外劳动卫生与职业病防治工作,环境危害因素及其治理,以及有关职业和环境卫生学的学术研究、科研成果及实践经验,包括职业与环境流行病学、环境检测、毒理学、职业人群健康、职业病防治、应急救援、卫生管理、环境生态、环境污染与治理等方面的论著、实验研究、调查研究、综述、短篇报道、病例报告等。可供广大疾病控制、卫生监督、厂矿劳动安全、职业卫生与职业病防治、环境保护、环境科学研究等相关单位专业人员,医学院校教学和科研等人员参考,欢迎订阅。本刊为月刊,大16开,96页,每月25日出版,定价每期20元,全年240元(含包装及平邮邮资,需挂号或速递者邮资另计)。由邮局及自办结合发行,邮发代号:4-568,邮局可办理2017年征订工作。

1. 银行汇款 户名:上海市疾病预防控制中心;账号:3166 3803 0016 65382;开户行:上海银行白玉支行。

2. 邮局汇款 上海市延安西路1326号(生物大厦)22楼《环境与职业医学》杂志编辑部,邮编:200052。

读者如需单行本或合订本,可直接向编辑部联系邮购。对历年本刊所出的专题专刊(含会议论文集),需要者亦可联系邮购。

联系人:葛宏妍;电话:021-61957507;传真:021-62084529;E-mail:zazhi2@scdc.sh.cn。