·环境与职业卫生·

铅暴露下 *BRCA*1 基因沉默对 TK6 细胞 DNA 双链断裂损伤修复的研究

刘祥铨[1,2],唐宏阁[1],黄思敏[1],吴海婷[1]
1.厦门医学院公共卫生与医学技术学院,福建 厦门 361023;2.福建医科大学公共卫生学院,福建 福州 350108

摘要:目的　探讨 *BRCA*1 基因沉默对醋酸铅诱导的人淋巴母细胞 TK6 细胞 DNA 双链断裂损伤修复的影响。**方法**　采用慢病毒载体介导的 shRNA 技术构建 *BRCA*1 稳定沉默的 TK6 细胞模型，设置 Normal 组（未处理对照组）、Control 组（空载体对照组）、shRNA-NC 组（阴性对照慢病毒组）和 shRNA-BRCA1 组（BRCA1 沉默组）。所有染毒组均用 480 μmol/L 醋酸铅处理 24 h。通过 qPCR 和蛋白质印迹法（Western blot）验证沉默效率；采用免疫荧光法检测 DNA 损伤标志物 γ-H2AX 焦点；运用流式细胞术分析细胞周期与凋亡；并通过 Western blot 检测同源重组、非同源末端连接（non-homologous end joining，NHEJ）修复通路关键蛋白及 DNA 损伤应答信号分子表达。**结果**　*BRCA*1 沉默模型构建成功，shRNA-BRCA1 组细胞 *BRCA*1 mRNA 及蛋白相对表达水平均显著低于 Control 组与 shRNA-NC 组（$P<0.05$）。铅暴露下，shRNA-BRCA1 组 γ-H2AX 阳性率（26.94 ± 2.93）%、G1 期细胞比例（65.31 ± 1.13）%及凋亡率（52.84 ± 1.21）%均显著高于其他各组（$P<0.05$），而 S 期细胞比例（8.59 ± 0.45）%进一步降低。蛋白检测显示，与 Control 组和 shRNA-NC 组相比，shRNA-BRCA1 组同源重组通路关键蛋白 Rad51 表达下降（0.52 ± 0.10），而 NHEJ 通路蛋白 53BP1（9.73 ± 0.87）及损伤应答信号分子 ATM（6.10 ± 0.48）、ATR（6.25 ± 0.92）、CHK1(2.35 ± 0.46)和 DNA-PKcs（3.85 ± 0.93）表达均显著升高（$P<0.05$）。**结论**　*BRCA*1 沉默抑制同源重组修复，增强铅诱导的 DNA 双链断裂，阻滞 G1/S 进程并加剧细胞凋亡，其机制与激活 ATM/ATR-CHK1 及代偿性上调 NHEJ 通路有关。

关键词:*BRCA*1 基因;铅;DNA 双链断裂;同源重组修复;非同源末端连接
中图分类号:R114　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1003-8507(2026)11-1969-07
DOI:10.20043/j.cnki.MPM.202601037

Effect of *BRCA*1 gene silencing on the repair of lead-induced DNA double-strand breaks in TK6 cells

LIU Xiang-quan*, TANG Hong-ge, HUANG Si-min, WU Hai-ting
School of Public Health and Medical Technology, Xiamen Medical College, Xiamen, Fujian 361023, China

Abstract: Objective To investigate the effect of *BRCA*1 gene silencing on the repair of DNA double-strand breaks (DSBs) induced by lead acetate in human lymphoblastoid TK6 cells. **Methods** A stable *BRCA*1-silenced TK6 cell model was established using lentivirus-mediated shRNA technology. Cells were divided into four groups: normal group (untreated control group), control group (empty vector control group), shRNA-NC group (negative control lentivirus group), and shRNA-BRCA1 group (*BRCA*1 knockdown group). All exposed groups were treated with 480 μmol/L lead acetate for 24 h. Silencing efficiency was confirmed by qPCR and Western blot. DNA damage was assessed by immunofluorescence staining for γ-H2AX foci. Cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. The expression of key proteins in the homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ) repair pathways and DNA damage response (DDR) signaling molecules was detected by Western blot. **Results** The *BRCA*1 silencing model was successfully constructed, with significantly lower levels of BRCA1 mRNA and protein in the shRNA-*BRCA*1 group compared to the control and shRNA-NC groups ($P<0.05$). Under lead exposure, the shRNA-BRCA1 group showed a significantly higher positive rate of γ-H2AX (26.94±2.93)%, a higher proportion of G1 phase cells (65.31±1.13)%, and a higher apoptosis rate (52.84±1.21)% compared to all other groups ($P<0.05$), while the proportion of S phase cells (8.59±0.45)% was further reduced. Protein analysis revealed that, compared to the control and shRNA-NC groups, the expression of the HR key protein Rad51 was decreased (0.52±0.10) in the shRNA-*BRCA*1 group, while the expression levels of the NHEJ pathway protein 53BP1 (9.73±0.87) and the DDR signaling molecules ATM (6.10±0.48), ATR (6.25±0.92), CHK1 (2.35±0.46), and DNA-PKcs (3.85±0.93) were significantly increased ($P<0.05$).

基金项目:福建省科技计划项目(2021D005);厦门市科技计划项目(3502Z202474032);厦门医学院科技计划项目(K2022-08)
作者简介:刘祥铨(1974—),男,博士,副教授、主任医师,研究方向:环境与健康风险评估
通信作者:刘祥铨,E-mail:lxq@xmmc.edu.cn

Conclusion *BRCA*1 silencing inhibits homologous recombination repair, exacerbates lead-induced DNA double-strand breaks, arrests the G1/S phase progression, and intensifies apoptosis. The mechanism may be related to the activation of the ATM/ATR-CHK1 pathway and compensatory upregulation of the NHEJ repair pathway.

Keywords: *BRCA*1 gene; Lead; DNA double-strand breaks; Homologous recombination repair; Non-homologous end joining

铅及其无机化合物是广泛存在的环境污染物和职业病危害因素，国际癌症研究机构依据致癌性证据的强弱，将无机铅化合物评定为 2A 类（很可能对人类致癌），并将金属铅划分为 2B 类（可能对人类致癌）[1]。铅暴露可导致包括 DNA 双链断裂在内的多种遗传损伤，在各类 DNA 损伤中，双链断裂对基因组完整性的威胁最为严重[2-3]。同源重组修复（homologous recombination repair，HR）和非同源末端连接修复（non-homologous end joining，NHEJ）是真核细胞修复 DNA 双链断裂的两条主要机制，其中前者属于高保真修复，后者则属于易错修复[4]。其中，HR 途径的启动与执行高度依赖于 BRCA1-RAD51 轴心蛋白的核心调控[5]。我们前期研究发现，铅暴露可诱导人淋巴母细胞 TK6 中 RAD51 表达上调并参与部分双链断裂的修复；若抑制 RAD51，则会导致双链断裂累积并伴 NHEJ 修复途径的代偿性激活[6-7]。值得注意的是，作为 HR 通路上游的关键调控因子及 RAD51 功能的直接调控者，*BRCA*1 在铅致双链断裂修复应答中的具体作用尚不清楚。为此，本研究利用 shRNA 慢病毒建立 *BRCA*1 沉默 TK6 细胞模型，系统评估 *BRCA*1 缺失对铅诱导 DNA 损伤水平、细胞周期分布、细胞凋亡及 HR/NHEJ 修复蛋白表达的影响，以阐明 *BRCA*1 在铅遗传毒性中的分子角色，为铅致癌机制提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 乙酸铅粉剂（中国 Aladdin 公司）；RPMI 1640 培养基、2 × Taq PCR MasterMix（Solarbio 公司）；胎牛血清（美国 Hyclone 公司）；EdU 成像检测试剂盒（中国凯基生物）；γ-H2AX 抗体（英国 Abcam）；DAPI（中国阿拉丁）；Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒、RAD51 抗体、BRCA1 抗体、ATM 抗体、CHK1 抗体、全蛋白提取试剂盒、内参抗体 β-actin（中国万类生物公司）；DNA-PKcs 抗体、53BP1 抗体（中国 abclonal 公司）；ATR 抗体（中国 affinity 公司）；BeyoRT Ⅱ M-MLV 反转录酶（碧云天公司）；RNase inhibitor（上海生工公司）。

1.2 仪器 HF-90 型 CO_2 培养箱（上海力申公司）；IX53 倒置相差显微镜（日本 OLYMPUS 公司）；ELX-800 酶标仪（美国 BIOTEK 公司）；NovoCyte 流式细胞仪（美国 Aceabio 公司）；WD-9413B 型凝胶成像系统、DYCZ-24DN 双垂直蛋白电泳仪（北京六一公司）；NANO 2000 紫外分光光度计（美国 Thermo 公司）；Exicycler 96 荧光定量 PCR 仪（韩国 BIONEER 公司）。

1.3 方法

1.3.1 针对 *BRCA*1 的 shRNA 慢病毒载体构建与感染 本研究采用的 pLVX-shRNA1 慢病毒载体及干扰序列由万类生物科技有限公司构建。其中阴性对照序列 sh-NC 为 cccTTCTCCGAACGTGTCACGTttcaagagaACGTGACACGTTCGGAGAAttttt，针对 *BRCA*1 的特异性干扰序列 sh-BRCA1 为 ccgGCAGTTTATTACTCACTAAAGttcaagagaCTTTAGTGAGTAATAAACTGCttttt。慢病毒包装：将 sh-BRCA1、sh-NC 质粒与辅助包装质粒 psPAX2、pMD2.G 共转染至 HEK-293T 细胞。转染前，将 HEK-293T 细胞接种于 10 cm 培养皿中，待细胞密度达 50% ~ 70% 时，按照 Lipofectamine 3 000 转染试剂盒说明书进行操作。转染后 6 h 更换新鲜完全培养基（含 10%胎牛血清的 DMEM），分别于转染后 48 h 和 72 h 收集病毒上清，经 0.45 μm 滤膜过滤后分装，置于 -80 ℃保存备用。经检测，*BRCA*1 沉默慢病毒的滴度为 2×10^8 TU/ml，阴性对照慢病毒的滴度为 3.4×10^8 TU/ml。病毒感染：感染前 1 d，将 TK6 细胞接种于 6 孔板中，使感染当日细胞汇合度达 50% ~ 70%，每孔细胞数量约为 6×10^5 个。根据病毒滴度及感染复数（MOI=10）计算所需病毒量，计算公式为：加病毒量（μl）=MOI × 细胞数 / 病毒滴度（TU/ml）× 1 000。经计算，*BRCA*1 沉默慢病毒每孔加入 30 μl，阴性对照慢病毒每孔加入 17.6 μl。感染时，吸去细胞培养基，加入含病毒液的新鲜培养基，并添加 8 μg/ml Polybrene 以提高感染效率。混匀后置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。24 h 后吸去含病毒的培养液，更换新鲜完全培养基继续培养。感染 48 h 后收集细胞进行后续检测。

1.3.2 TK6 细胞培养和分组处理 本研究所用的 TK6 细胞来源于武汉普诺赛生命科技有限公司。细胞常规培养条件为：采用添加了 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基，在 37 ℃、5% CO_2 的恒温培养箱对细胞进行培养。实验前，将细胞以约 1×10^6 个 / 孔的密度铺于 6 孔板中过夜。随后将细胞随机分为四组：（1）Normal 组（未处理对照组）：仅细胞培养，无病毒感染及药物处理；（2）Control 组（空载体对照组）：未感染病毒，施加 480 μmol/L 醋酸铅（避光）染毒 24 h；（3）

shRNA-NC 组(阴性对照慢病毒组):转染空载体慢病毒后，同 Control 组条件进行醋酸铅染毒;(4) shRNA-BRCA1 组（BRCA1 沉默组）：转染特异性 shRNA 慢病毒后,同 Control 组条件进行醋酸铅染毒。染毒结束后,收集各组细胞用于后续检测。

1.3.3　实时荧光定量聚合酶链反应分析　利用 NANO 2000 紫外分光光度计对样本总 RNA 进行定量检测。完成定量后,将 RNA 逆转录为 cDNA,使用韩国 BIONEER 公司生产的 Exicycler™ 96 仪器开展实时荧光定量检测，相对表达量的计算依据 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法，引物信息列于表 1。扩增参数设置如下:95 ℃ 5 min 的初始变性（1 个循环），随后进行 40 个循环的 95 ℃ 10 s,60 ℃ 10 s,72 ℃ 15 s。

表 1　*BRCA*1 基因 qPCR 的引物序列

Table 1　Primer sequences for *BRCA*1 gene qPCR

名称	序列(5′-3′)	引物长度(bp)	Tm	产物长度(bp)
*BRCA*1 F	TCTCGTTACTGGAAGTTAGCAC	22	54.4	184
*BRCA*1 R	CTTGTTTCCCGACTGTGGTT	20	57.3	
β-actin F	CTTAGTTGCGTTACACCCTTTCTTG	25	62	156
β-actin R	CTGTCACCTTCACCGTTCCAGTTT	24	64.4	

1.3.4　免疫荧光检测 γ-H2AX 表达　细胞经 1.3.2 处理后制备涂片，先利用 0.1% Triton X-100 在室温下透化 30 min，磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline,PBS)洗涤后,再于室温下使用山羊血清封闭 15 min。一抗孵育选用兔抗 γ-H2AX(1∶200),4 ℃过夜;二抗选用 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG(1∶200),室温避光反应 1 h。最后经 DAPI 复染细胞核及抗荧光淬灭封片。在 600 倍荧光显微镜下观察,将核内红色荧光焦点数≥5 个的细胞计为阳性,每组随机选取至少 200 个细胞进行计数,按公式“阳性细胞数 / 总细胞数 × 100.0%”计算阳性率。

1.3.5　细胞周期的流式检测　收集经 1.3.2 处理后的各组细胞，用 4 ℃PBS 重悬并调整浓度至约 1×10^6/ml。取细胞悬液 1 ml,经离心后,用预冷 70%乙醇 4 ℃固定过夜。经 PBS 洗涤(2 次,5 min/ 次)后,依次进行 37 ℃ RNase A 水浴处理(100 μl,30 min)及碘化丙啶染色(500 μl)。4 ℃避光反应 30 min。样品经 400 目细胞筛过滤后上机检测(激发波长 488 nm),计算细胞群体中处于 G1、S、G2 期的细胞比例。

1.3.6　细胞凋亡的流式检测　收集经 1.3.2 处理后的各组细胞,以 4 ℃PBS 重悬并调整细胞数至 5×10^5 个 / 组。按照试剂盒说明操作:加入 500 μl 结合缓冲液,再依次滴入 5 μl Annexin V-FITC 及 10 μl 碘化丙啶。充分混匀后,室温避光孵育 15 min,并在 1 h 内上流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.3.7　Western blot 检测蛋白表达　各组细胞经 1.3.2 步骤处理后，通过放射免疫沉淀裂解获取总蛋白,用二喹啉甲酸法测定蛋白浓度。吸取 40 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，并将分离后的蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜。经 5%脱脂奶粉室温封闭后,依次加入一抗:BRCA1 (1∶500)、Rad51 (1∶500)、53BP1 (1∶1 000)、γ-H2AX (1∶5 000)、ATM (1∶500)、ATR (1∶1 000)、CHK1 (1∶500)、DNA-PKcs (1∶1 000)及内参 β-actin (1∶1 000),4 ℃孵育过夜。洗膜后,加入对应辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶5 000)并在室温下孵育 45 min。经电化学发光液显影及凝胶成像系统采集图像后,使用 ImageJ 软件分析条带灰度,并以目的蛋白与 β-actin 的灰度比值量化蛋白相对表达水平。

1.4　统计学处理　所有数据均在 SPSS 27.0 软件中运算。计量资料经检验确认符合正态分布后,以(均值 ± 标准差)表达。针对多组均数的差异,选用单因素方差分析；组间两两比较则在满足方差齐性条件时,采用 LSD-*t* 检验。双侧检验,检验水准 α=0.05。

2　结　果

2.1　*BRCA*1 沉默模型的验证　荧光定量 PCR 扩增体系稳定,熔解曲线峰值高,无引物二聚体及非特异性产物产生,扩增产物特异，结果显示，三组细胞间 *BRCA*1 mRNA 的相对表达水平差异具有统计学意义(F=57.521, P<0.01),shRNA-BRCA1 组的 *BRCA*1 mRNA 表达水平为(0.20 ± 0.03),显著低于 Control 组的(1.00 ± 0.11)与 shRNA-NC 组的(1.11 ± 0.16)(P<0.05),Control 组与 shRNA-NC 组间的 *BRCA*1 mRNA 相对表达水平差异无统计学意义(P>0.05);Western blot 实现发现,BRCA1 蛋白在三组细胞中的表达差异显著（F=178.036, P<0.01),shRNA-BRCA1 组的 BRCA1 蛋白相对表达水平为(0.29 ± 0.05),显著低于 Control 组的(1.00 ± 0.04)与 shRNA-NC 组的(1.14 ± 0.08)(P<0.05)。BRCA1 蛋白在 Control 组与 shRNA-NC 组中的相对表达水平差异无统计学意义(P>0.05)。表明 *BRCA*1 沉默模型构建成功。见图 1、表 2 。

2.2　*BRCA*1 基因沉默对铅诱导 TK6 细胞 γ-H2AX 表达的影响　免疫荧光检测结果显示,四组细胞间的

γ–H2AX 阳性率比较，差异具有统计学意义（F=117.063, P<0.01）；进一步比较显示，醋酸铅染毒的 Control 组与 shRNA–NC 组的 γ–H2AX 阳性率分别为（11.01 ± 1.21）%、（10.08 ± 1.12）%，均高于 Normal 组的（1.02 ± 0.77）%（P<0.05）。shRNA–BRCA1 组的 γ–H2AX 阳性率为（26.94 ± 2.93）%，显著高于 Control 组、shRNA–NC 组及 Normal 组（P<0.05）。见图 2、表 3。

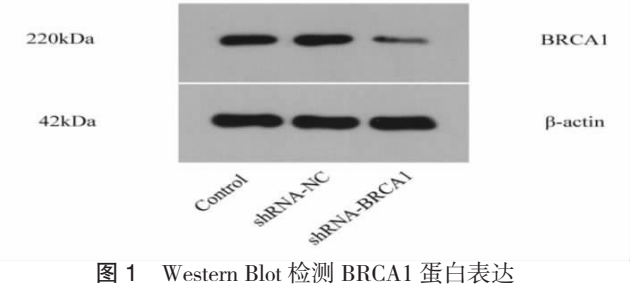


图 1　Western Blot 检测 BRCA1 蛋白表达

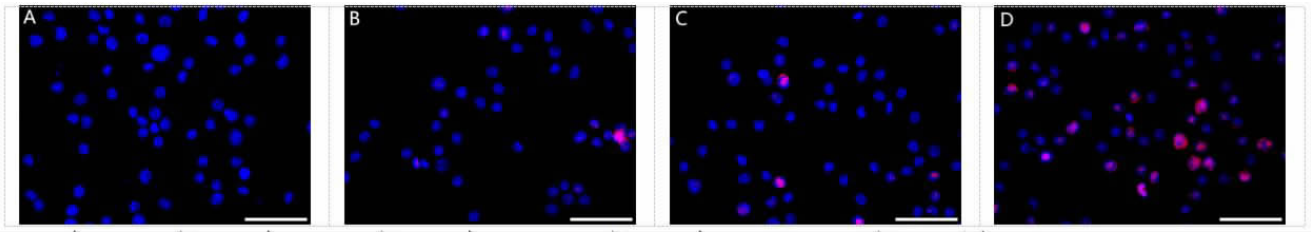
Figure 1　Detection of BRCA1 protein expression by western blot

表 2　TK6 细胞 *BRCA*1 基因的表达[n=3, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 2　Expression of the *BRCA*1 gene in TK6 cells [n=3, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	mRNA 相对表达水平	BRCA1 蛋白相对表达水平
Control 组	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.04
shRNA–NC 组	1.11 ± 0.16	1.14 ± 0.08
shRNA–BRCA1 组	0.20 ± 0.03^{ab}	0.29 ± 0.05^{ab}
F 值	57.521	178.036
P 值	< 0.001	< 0.001

注：与 Control 组比较：^{a}P<0.05；与 shRNA–NC 组比较，^{b}P<0.05。



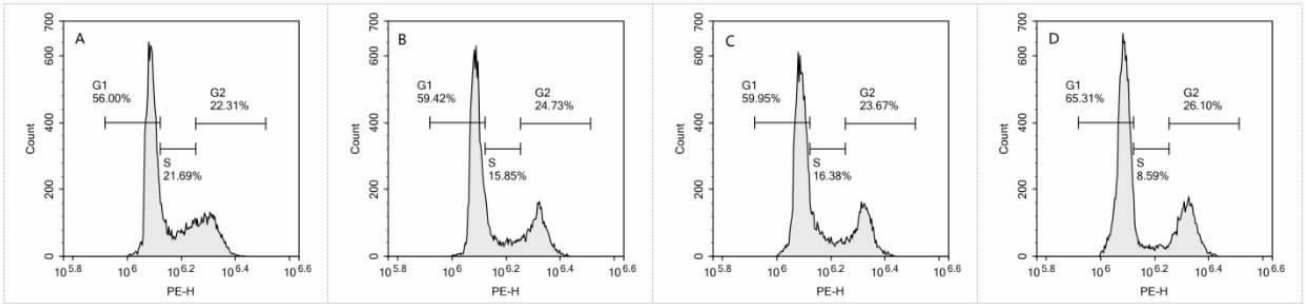
注：A 为 Normal 组；B 为 Control 组；C 为 shRNA–NC 组；D 为 shRNA–BRCA1 组。

图 2　免疫荧光检测 γ–H2AX 的表达（×600）

Figure 2　Detection of γ–H2AX expression by immunofluorescence (×600)

2.3　*BRCA*1 基因沉默对铅诱导 TK6 细胞周期的影响　细胞周期分布显示，四组细胞在 G1 期、S 期和 G2 期的比例差异均具有统计学意义（F=46.511、307.732、19.266；P 值均<0.01）。与 Normal 组相比，醋酸铅染毒导致 Control 组与 shRNA–NC 组细胞 G1 期比例升高，S 期比例降低（P<0.05）。shRNA–BRCA1 组与 Control 组及 shRNA–NC 组相比，其 G1 期比例进一步升高，S 期比例进一步降低（P<0.05）。在 G2 期，Control 组比例显著高于 Normal 组（P<0.05），shRNA–BRCA1 组 G2 期比例高于 Normal 组与 shRNA–NC 组（P<0.05）。见图 3、表 3。

2.4　*BRCA*1 基因沉默对铅诱导 TK6 细胞 γ–H2AX 凋亡的影响　四组细胞间的凋亡率比较，差异具有统计学意义（F=361.429, P<0.01）。醋酸铅染毒的 Control 组（37.99 ± 1.25）%与 shRNA–NC 组（38.52 ± 1.30）%的凋亡率均高于 Normal 组（8.09 ± 1.09）%（P<0.05）。shRNA–BRCA1 组的凋亡率（52.84 ± 1.21）%显著高于 Control 组、shRNA–NC 组及 Normal 组（P<0.05）。见图 4、表 3。



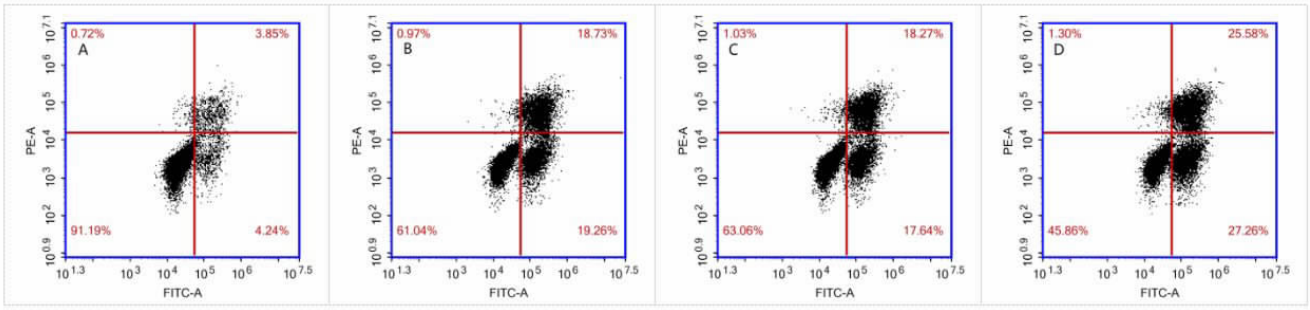
注：A 为 Normal 组；B 为 Control 组；C 为 shRNA–NC 组；D 为 shRNA–BRCA1 组。

图 3　各组细胞周期变化情况

Figure 3　Changes in cell cycle in each group

2.5　铅暴露下 *BRCA*1 基因沉默对 TK6 细胞 DNA 损伤修复及信号通路相关蛋白表达的影响

2.5.1　同源重组与非同源末端连接修复相关蛋白的表达　四组细胞间 BRCA1、Rad51 及 53BP1 蛋白的



注：A 为 Normal 组；B 为 Control 组；C 为 shRNA-NC 组；D 为 shRNA-BRCA1 组。

图 4　各组细胞凋亡情况

Figure 4　Cell apoptosis in each group

表 3　各组 TK6 细胞 γ-H2AX 阳性率、EDU 阳性细胞比例、细胞周期分布和细胞凋亡率的结果[n=3，($\bar{x} \pm s$)]

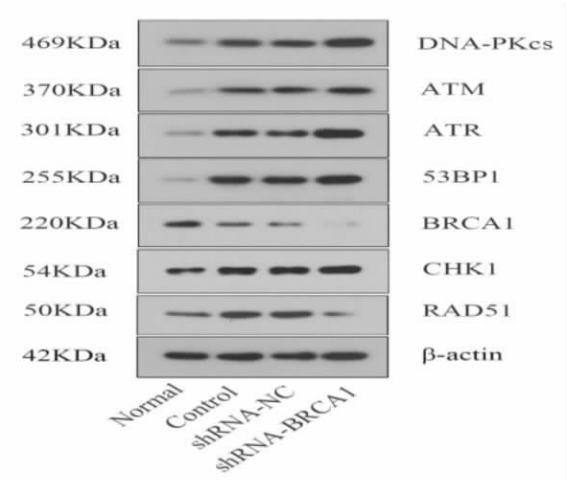
Table 3　Results of γ-H2AX positive rate, EdU positive cell ratio, cell cycle distribution, and apoptosis rate in TK6 cells of each group [n=3, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	γ-H2AX 阳性率(%)	细胞周期分布(%)			凋亡率(%)
		G1 期	S 期	G2 期	
Normal 组	1.02 ± 0.77	56.00 ± 0.89	21.69 ± 0.41	22.31 ± 0.62	8.09 ± 1.09
Control 组	11.01 ± 1.21[a]	59.42 ± 0.97[a]	15.85 ± 0.58[a]	24.73 ± 0.77[a]	37.99 ± 1.25[a]
shRNA-NC 组	10.08 ± 1.12[a]	59.95 ± 0.90[a]	16.38 ± 0.65[a]	23.67 ± 0.68	38.52 ± 1.30[a]
shRNA-BRCA1 组	26.94 ± 2.93[abc]	65.31 ± 1.13[abc]	8.59 ± 0.45[abc]	26.10 ± 0.41[ac]	52.84 ± 1.21[abc]
F 值	117.063	46.511	307.732	19.266	361.429
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：与 Normal 组比较，[a]P<0.05；与 Control 组比较，[b]P<0.05；与 shRNA-NC 组比较，[c]P<0.05。

相对表达水平差异均具有统计学意义(F=148.256、46.842、123.651；P 值均 < 0.01)。与 Normal 组的 BRCA1 蛋白相对表达水平(1.00 ± 0.06)相比，醋酸铅染毒的 Control 组与 shRNA-NC 组的 BRCA1 蛋白相对表达水平降低（P<0.05），分别为（0.32 ± 0.04）、(0.31 ± 0.07)；shRNA-BRCA1 组的相对表达水平(0.09 ± 0.05)进一步低于 Control 组及 shRNA-NC 组(P<0.05)。对于 Rad51 蛋白，Control 组与 shRNA-NC 组的相对表达水平分别为（1.97 ± 0.21）、(2.08 ± 0.23)，高于 Normal 组的（1.00 ± 0.20)(P<0.05)；而 shRNA-BRCA1 组的相对表达水平(0.52 ± 0.10)低于 Control 组及 shRNA-NC 组(P<0.05)。对于 53BP1 蛋白，Control 组、shRNA-NC 组及 shRNA-BRCA1 组的相对表达水平分别为（6.59 ± 0.45）、(6.76 ± 0.43)、(9.73 ± 0.87)，均高于 Normal 组的(1.00 ± 0.38)(P<0.05)，且 shRNA-BRCA1 组的相对表达水平高于 Control 组及 shRNA-NC 组(P<0.05)。见图 5、表 4。

2.5.2　DNA 损伤应答信号通路相关蛋白的表达　四组细胞间 CHK1、DNA-PKcs、ATM 及 ATR 蛋白的相对表达水平差异均具有统计学意义(F=7.358、8.253、121.174、30.994；P 值均 <0.05)。CHK1 蛋白在 shRNA-BRCA1 组的相对表达水平为（2.35 ± 0.46)，高于 Normal 组的(1.00 ± 0.32)(P<0.05)。DNA-PKcs 蛋白在 shRNA-BRCA1 组的相对表达水平为(3.85 ± 0.93)，高于 Normal 组的(1.00 ± 0.51)(P<0.05)。ATM 蛋白在 Control 组、shRNA-NC 组及 shRNA-BRCA1 组的相对表达水平，分别为（4.13 ± 0.27）、(4.50 ± 0.30)、(6.10 ± 0.48)，均高于 Normal 组的（1.00 ± 0.24)(P<0.05)，且 shRNA-BRCA1 组的相对表达水平高于 Control 组及 shRNA-NC 组(P<0.05)。ATR 蛋白在 Control 组、shRNA-NC 组及 shRNA- BRCA1 组的相对表达水平分别为（3.27 ± 0.66）、(2.78 ± 0.68)、(6.25 ± 0.92)，均高于 Normal 组的(1.00 ± 0.31)(P<0.05)，且 shRNA-BRCA1 组的相对表达水平，高于 Control 组及 shRNA-NC 组(P<0.05)。见图 5、表 4。



注：A 为 Normal 组；B 为 Control 组；C 为 shRNA-NC 组；D 为 shRNA-BRCA1 组。

图 5　Western Blot 检测 BRCA1、Rad51、53BP1、DNA-PKcs、ATM、ATR 和 CHK1 蛋白表达

Figure 5　Detection of BRCA1, Rad51, 53BP1, DNA-PKcs, ATM, ATR, and CHK1 protein expression by western blot

表 4　TK6 细胞 BRCA1、Rad51、53BP1、DNA-PKcs、ATM、ATR 和 CHK1 蛋白表达[n=3,($\bar{x}\pm s$)]

Table 4　Expression of BRCA1, Rad51, 53BP1, DNA-PKcs, ATM, ATR, and CHK1 proteins in TK6 cells [n=3, ($\bar{x}\pm s$)]

组别	BRCA1 蛋白相对表达水平	Rad51 蛋白相对表达水平	53BP1 蛋白相对表达水平	CHK1 蛋白相对表达水平	DNA-PKcs 蛋白相对表达水平	ATM 蛋白相对表达水平	ATR 蛋白相对表达水平
Normal 组	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.38	1.00 ± 0.32	1.00 ± 0.51	1.00 ± 0.24	1.00 ± 0.31
Control 组	0.32 ± 0.04[a]	1.97 ± 0.21[a]	6.59 ± 0.45[a]	1.88 ± 0.29	2.49 ± 0.66	4.13 ± 0.27[a]	3.27 ± 0.66[a]
shRNA-NC 组	0.31 ± 0.07[a]	2.08 ± 0.23[a]	6.76 ± 0.43[a]	1.83 ± 0.34	2.48 ± 0.64	4.50 ± 0.30[a]	2.78 ± 0.68[a]
shRNA-BRCA1 组	0.09 ± 0.05[abc]	0.52 ± 0.10[abc]	9.73 ± 0.87[abc]	2.35 ± 0.46[a]	3.85 ± 0.93[a]	6.10 ± 0.48[abc]	6.25 ± 0.92[abc]
F 值	148.256	46.842	123.651	7.358	8.253	121.174	30.994
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	0.011	0.008	<0.001	<0.001

注：与 Normal 组比较，[a]P<0.05；与 Control 组比较，[b]P<0.05；与 shRNA-NC 组比较，[c]P<0.05。

3　讨　论

铅作为明确的环境与职业毒物，其遗传毒性机制，特别是对 DNA 双链断裂修复系统的影响，是阐释其健康危害的关键。双链断裂的准确修复对于维持基因组稳定性至关重要，主要依赖于高保真的 HR 和易错的 NHEJ 两条通路[8-9]。BRCA1 蛋白是 HR 修复途径的核心调控因子，近年来其在肿瘤发生发展中的功能日益受到关注[10]，不仅参与早期损伤识别与信号传导，更在启动 DNA 末端切除、促进 RAD51 核丝形成等关键步骤中发挥不可替代的作用[11-12]。本研究首次在铅暴露的背景下，利用人源性 TK6 细胞模型（该细胞具有正常 p53 状态及完整二倍体基因组，能较好模拟人体细胞应答），系统探讨了 *BRCA*1 功能缺失对铅致双链断裂修复结局的影响。结果揭示，*BRCA*1 沉默通过破坏 HR/NHEJ 修复平衡，显著加剧了铅的遗传毒性。

本研究首先证实了 *BRCA*1 特异性 shRNA 能有效下调 TK6 细胞中 BRCA1 的 mRNA 和蛋白表达，成功构建了功能缺失模型。在铅暴露条件下，*BRCA*1 沉默导致 DNA 损伤标志物 γ-H2AX 的阳性率较单纯铅染毒组进一步显著升高，表明 *BRCA*1 缺失加剧了 DNA 损伤的累积。这一现象与细胞命运的改变相一致：*BRCA*1 沉默细胞表现出更严重的 G1/S 期阻滞和更高的凋亡率。这提示，当高保真的 HR 修复因 *BRCA*1 缺失而受阻时，细胞可能因无法有效修复铅诱导的双链断裂，从而激活更强的细胞周期检查点并走向凋亡。

本研究提供了 *BRCA*1 调控修复通路选择的直接证据。*BRCA*1 沉默后，其下游 HR 执行蛋白 Rad51 的表达显著下调，证实 HR 通路功能被实质性削弱。与此同时，NHEJ 通路的关键蛋白 53BP1 和 DNA-PKcs 的表达则协同上调。这一“HR 抑制-NHEJ 增强”的分子表型与前期 *Rad*51 沉默研究结果相呼应[7]，但因其作用于 HR 通路的更上游，对修复通路选择的调控作用更为根本。HR 与 NHEJ 通路存在竞争关系[13]。*BRCA*1 的缺失削弱了 HR 的竞争力，可能导致更多的双链断裂被导向易错的 NHEJ 途径进行修复。NHEJ 介导的修复易产生微小插入或缺失，是基因组不稳定的重要来源，这为理解铅暴露如何增加突变负荷提供了新的机制线索。

此外，本研究观察到 *BRCA*1 沉默后，DNA 损伤应答网络的核心激酶 ATM、ATR 及其下游效应蛋白 CHK1 的表达均进一步升高。这可能是对持续存在且无法被 HR 有效修复的双链断裂的强化反应。强烈的损伤应答信号一方面可能试图协调修复资源，另一方面也最终触发了上述的细胞周期阻滞与凋亡程序。因此，*BRCA*1 在铅毒性中的作用，不仅在于直接参与修复，还在于其作为修复“传感器”和“调度员”，影响着全局的损伤应答与细胞命运决策。

综上所述，本研究证实 *BRCA*1 是细胞防御铅诱导 DNA 损伤的关键分子。在铅暴露环境下，*BRCA*1 功能完整对于维持 HR 修复能力、抑制易错修复倾向、从而保障基因组稳定性至关重要。其功能缺失可能构成个体对铅遗传毒性敏感性增高的内在风险因素，为从 DNA 修复能力角度评估职业与环境铅暴露的健康风险提供了新的理论依据。

本研究存在一定局限性。一是，尚未通过 *BRCA*1 基因回补实验直接证明表型的可逆性；二是，未使用特异性的 HR 或 NHEJ 通路抑制剂进一步验证通路转换的因果关系。未来研究可结合 *CRISPR/Cas*9 基因编辑、染色质免疫共沉淀及高通量测序技术，深入解析 *BRCA*1 在铅暴露条件下调控下游修复网络的具体转录程序与蛋白互作动态，以更全面地阐明其分子机制。

利益冲突声明　本研究不存在任何利益冲突

参考文献

[1]　IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Inorganic and organic Lead compounds [M]. Lyon: IARC

（下转第 1986 页）

oxidative function: implications for genotoxic mechanisms in mammalian cells[J]. Cancer Research, 2007, 67(11): 5239–5247.

[18] 朱元州. 砷中毒及治疗[J]. 巴楚医学,2025,8(2):9–22.
Zhu YZ. Arsenic poisoning and treatment[J]. Bachu Medical Journal, 2025, 8(2): 9–22.(In Chinese)

[19] García–Villarino M, Fernández–Iglesias R, García AV, et al. Exposure to a mixture of Arsenic species and growth indicators in 6–12–year–old children from the cycles 2007–2020 NHANES[J]. Environment International, 2025, 197: 109347.

[20] Ma L, Lv JX, Zhang AH.Depletion of S–adenosylmethionine induced by Arsenic exposure is involved in liver injury of rat through perturbing histone H3K36 trimethylation dependent bile acid metabolism[J]. Environmental Pollution, 2023, 334: 122228.

[21] Allen LH, Miller JW, de Groot L, et al. Biomarkers of nutrition for development (BOND): vitamin B–12 review[J]. Journal of Nutrition, 2018, 148(suppl_4): 1995S–2027S.

[22] Borghini A, Faita F, Mercuri A, et al. Arsenic exposure, genetic susceptibility and leukocyte telomere length in an Italian young adult population[J]. Mutagenesis, 2016, 31(5): 539–546.

[23] Gao JJ, Roy S, Lin T, et al. Arsenic exposure,telomere length,and expression of telomere–related genes among Bangladeshi individuals [J]. Environmental Research, 2015, 5: 136462–136469.

[24] Zhang CN, Kibriya MG, Jasmine F, et al. A study of telomere length, Arsenic exposure, and Arsenic toxicity in a Bangladeshi cohort[J]. Environmental Research, 2018, 164: 346–355.

[25] Metcalfe NB, Olsson M. How telomere dynamics are influenced by the balance between mitochondrial efficiency, ROS production and DNA damage[J]. Molecular Ecology, 2021, 31(23): 6040–6052.

收稿日期:2026–01–10

(上接第 1974 页)

Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2006.

[2] Liu HL, Nan H, Zhao WW, et al. Phase separation in DNA double–strand break response [J]. Nucleus (Austin, Tex.), 2024, 15(1): 2296243.

[3] Wang TW, Tu YT, Wang K, et al. Associations of blood Lead levels with multiple genotoxic biomarkers among workers in China: A population–based study [J]. Environmental Pollution, 2021, 273: 116181.

[4] Tan J, Sun X, Zhao H, et al. Double–strand DNA break repair: molecular mechanisms and therapeutic targets [J]. MedComm, 2023, 4(5): e388.

[5] Wang ML, Rogers CM, Alimbetov D, et al. In vitro reconstitution of BRCA1–BARD1/RAD51–Mediated homologous DNA pairing [J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2022, 2444: 207–225.

[6] 张佳玲,刘祥铨. RAD51 对铅诱导 TK6 细胞 DNA 双链断裂损伤的修复作用[J]. 中国职业医学,2025,52(4):386–392, 400.
Zhang JL, Liu XQ. The repair role of RAD51 on lead–induced DNA double–strand break in TK6 cells [J]. China Occupational Medicine, 2025, 52(4): 386–392, 400.(In Chinese)

[7] 刘祥铨,吴京颖,林秀洁,等. Rad51 基因沉默对铅诱导 TK6 细胞 DNA 双链断裂损伤修复的影响[J]. 职业卫生与应急救援,2022,40(1):5–9.
Liu XQ, Wu JY, Lin XJ, et al. Effect of rad51 gene silencing on repair of lead–induced DNA double–strand breaks in TK6 cells[J]. Occupational Health and Emergency Rescue, 2022, 40 (1): 5–9.(In Chinese)

[8] Georgieva D, Wang N, Taglialatela A, et al. BRCA1 and 53BP1 regulate reprogramming efficiency by mediating DNA repair pathway choice at replication–associated double–strand breaks [J]. Cell Reports, 2024, 43(4): 114006.

[9] Kumari NT, Kaur E, Raghavan SC, et al. Regulation of pathway choice in DNA repair after double–strand breaks[J]. Current Opinion in Pharmacology, 2025, 80: 102496.

[10] 孙丹丹,田国宝. 细菌及其代谢物影响乳腺癌发展及治疗的研究进展[J]. 中山大学学报(医学科学版),2025,46(3):361–370.
Sun DD, Tian GB. Research progress in bacteria and their metabolites influence on the development and treatment of breast cancer [J]. Journal of Sun Yat–Sen University (Medical Sciences), 2025, 46(3): 361–370.(In Chinese)

[11] Foo TK, Xia B. BRCA1–Dependent and Independent recruitment of PALB2–BRCA2–RAD51 in the DNA damage response and cancer [J]. Cancer Research, 2022, 82(18): 3191–3197.

[12] Zong D, Pavani R, Nussenzweig A. New twist on BRCA1–mediated DNA recombination repair and tumor suppression [J]. Trends in Cell Biology, 2026, 36(1): 4–12.

[13] Scully R, Panday A, Elango R, et al. DNA double–strand break repair–pathway choice in somatic mammalian cells [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019, 20(11): 698–714.

收稿日期:2026–01–03