

慢性砷暴露致人体生物样品 *p53*、*p16* 启动子区甲基化的改变

韩雪^{1a}, 李军^{1a}, 胡丽莎^{1b}, 顾先桃^{1b}, 魏绍峰^{1b}, 黄晓欣², 张爱华^{1a}

摘要:

[目的] 了解砷暴露对人体生物样品中 *p53*、*p16* 启动子区甲基化的影响, 探讨 *p53*、*p16* 启动子区 DNA 甲基化改变及在砷致病中的作用。

[方法] 于贵州省燃煤污染型地方性砷中毒病区, 选择 42 名常驻居民为暴露组, 另于距病区约 12 km 的非砷暴露村, 选择 40 例居民作为对照组。在知情同意的原则下, 采集受试对象尿液、血液和发样, 使用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS) 法检测受试对象尿砷和发砷, 采用亚硫酸盐修饰后测序法(BSP) 法检测 *p53*、*p16* 启动子区 CpG 位点甲基化情况。

[结果] 暴露组尿砷为 $(40.59 \pm 27.12) \mu\text{g/g}$ 、发砷为 $(0.32 \pm 0.36) \mu\text{g/g}$, *p53* 平均甲基化率为 $(8.32 \pm 1.51)\%$, 暴露组 -71、+42、+109 位 CpG 位点甲基化率分别为 $(11.44 \pm 3.64)\%$ 、 $(2.58 \pm 1.29)\%$ 和 $(4.98 \pm 1.33)\%$, 均高于对照组(均 $P < 0.05$); 暴露组和对照组 *p16* 平均甲基化率和各 CpG 位点甲基化率差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

[结论] *p53* 基因启动子区 CpG 位点的甲基化与砷暴露有关, 砷暴露所致的 DNA 甲基化可能存在位点的特异性。

关键词: 砷; DNA 甲基化; *p53* 基因; *p16* 基因

引用: 韩雪, 李军, 胡丽莎, 等. 慢性砷暴露致人体生物样品 *p53*、*p16* 启动子区甲基化的改变 [J]. 环境与职业医学, 2017, 34(2): 138-142. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16521

Promoter methylation of *p53* and *p16* in human biological samples with chronic arsenic exposure HAN Xue^{1a}, LI Jun^{1a}, HU Li-sha^{1b}, GU Xian-tao^{1b}, WEI Shao-feng^{1b}, HUANG Xiao-xin², ZHANG Ai-hua^{1a} (1.a.Key Laboratory of Environment Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education b.Department of Toxicology, School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2.The 44th Hospital of PLA, Guiyang, Guizhou 550009, China). Address correspondence to ZHANG Ai-hua, E-mail: aihuagzykd@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To test the effects of arsenic exposure on DNA methylation of promoter of *p53* and *p16* genes in human biological samples.

[Method] Arsenic-exposed residents from a burning-coal-type endemic arsenic poisoning area in Guizhou Province ($n=42$) and another control residents who lived 12 km away from the endemic area ($n=40$) were recruited in the study. Blood, urine, and hair samples were collected from all the subjects giving informed consent. The levels of urinary and hair arsenic were measured by inductively coupled plasma mass spectrometry, and DNA methylation at CpG site of *p53* and *p16* were determined by bisulfite sequencing.

[Results] Compared with the control group, the arsenic-exposed residents exhibited higher levels of urinary [$(40.59 \pm 27.12) \mu\text{g/g}$] and hair arsenic [$(0.32 \pm 0.36) \mu\text{g/g}$], *p53* methylation [$(8.32 \pm 1.51)\%$], and the methylation at CpG sites of -71 [$(11.44 \pm 3.64)\%$], +42 [$(2.58 \pm 1.29)\%$], and +109 [$(4.98 \pm 1.33)\%$] (all $P < 0.05$). There was no difference in *p16* methylation between the exposed and non-exposed residents (all $P > 0.05$).

[Conclusion] Arsenic exposure is associated with CpG site methylation in *p53* promoter and may induce CpG site-specific DNA methylation.

·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(编号: 81430077, 81302394)

[作者简介] 韩雪(1984—), 女, 博士, 副教授; 研究方向: 地方性砷中毒发病机制; E-mail: demonerin@sina.com

[通信作者] 张爱华, E-mail: aihuagzykd@163.com

[作者单位] 1. 贵州医科大学 a. 环境污染与疾病监控教育部重点实验室 b. 公共卫生学院卫生毒理学教研室, 贵州 贵阳 550025; 2. 中国人民解放军军第 44 医院, 贵州 贵阳 550009

Keywords: arsenic; DNA methylation; *p53* gene; *p16* gene

Citation: HAN Xue, LI Jun, HU Li-sha, et al. Promoter methylation of *p53* and *p16* in human biological samples with chronic arsenic exposure[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(2): 138-142. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16521

砷是确认的人类致癌物，但其致病机制迄今未明^[1]。现有研究提示，砷所致的表观遗传学改变，可能在其致病致癌中发挥重要作用^[2-4]。DNA 甲基化通过调节基因转录、印记等，在细胞分化、环境适应和疾病发生发展中扮演重要角色，是当前表观遗传学研究的热点领域之一^[5-6]。研究证实砷暴露可致某些抑癌基因、DNA 损伤修复基因启动子区的异常甲基化^[2, 7]，本课题组在前期采用甲基化敏感的限制性内切酶-PCR (MSRE-PCR) 法在燃煤型砷中毒患者人群中检出 *p53* 和 *p16* 基因启动子区的高甲基化^[8-9]。随着测序技术的广泛应用，越来越越多的研究提示，外源化学物所致的DNA 甲基化特别是启动子区的甲基化，存在 CpG 位点的特异性，即某种化学物可能特异地导致 CpG 岛中某个或者某些 CpG 位点的甲基化^[10-11]，而非所有 CpG 位点的普遍甲基化。那么砷所致 *p53* 和 *p16* 基因异常甲基化是否也存在 CpG 位点的特异性？本研究在既往研究的基础上，采用亚硫酸盐修饰后测序法 (bisulfite sequencing PCR, BSP) 对燃煤型砷中毒患者以及对照人群 *p53* 和 *p16* 启动子区部分 CpG 位点甲基化情况进行检测，分析砷所致 *p53* 和 *p16* 基因甲基化改变的特点，为进一步的机制探讨奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

Mastercycler gradient 5331 型 PCR 仪 (Eppendorf, 美国), GelDocXR⁺ 凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国), SIM-F124 型颗粒制冰机 (三洋, 日本), DYY III -2 型电泳仪 (北京六一仪器厂, 中国)。EpiTect Fast Bisulfite Conversion Kits (QIAGEN, 德国), Taq 酶、Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, 美国), pMDTM19-T

Vector (Takara, 日本), LB 培养基、胰蛋白胨酵母提取物 (Oxoid, 英国), JM109 感受态细胞 (全式金公司, 中国)。

1.2 研究对象

选取贵州省兴仁县燃煤污染型砷中毒病区居民 42 人作为暴露组和距该病区 12 km 外某村居民 (经健康体检合格)40 人作为对照组，采集血液、尿液、头发样本，血液置于 -80℃ 保存，尿液 -20℃ 保存，发样室温保存备用。暴露组纳入标准：具有当地户口，并在当地居住 10 年以上，有长期砷暴露史；对照组纳入标准：无砷暴露史，无砷中毒的相关临床表现；排除标准：有职业病史、遗传病史。本研究通过了贵州医科大学伦理委员会的伦理审查，所有研究对象均签署了知情同意书。

1.3 尿砷、发砷的检测

参考文献 [12] 方法，取观察对象晨尿，枕部发际近头皮 3 cm 以内的头发，采用电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 检测尿砷及发砷含量，尿砷采用尿肌酐含量校正。

1.4 *p53*、*p16* 启动子区甲基化检测

1.4.1 基因组 DNA 提取 按照 DNA 提取试剂盒说明书，提取血液 DNA，核酸蛋白仪检测 DNA 纯度和浓度。

1.4.2 基因组 DNA 亚硫酸氢盐修饰 按照试剂盒的说明书操作。

1.4.3 PCR 扩增及产物回收 使用 MethPrimer 在线甲基化引物设计软件对 *p53*、*p16* 启动子区序列的 CpG 岛进行分析，并设计 *p53* 重亚硫酸盐修饰后测序引物，参考文献 [10] 设计 *p16* 引物，引物序列及 PCR 反应条件见表 1。PCR 产物回收按照试剂盒说明书的方法进行。

表 1 PCR 反应引物、条件及产物

	引物序列 (5'-3')	退火温度	扩增片段位置	产物大小	CpG 个数
<i>p53</i> 上游	5'-TTGATGAGAAGAAAGGATTAGTTGA-3'	56℃	-299, +185	484 bp	17 个
下游	5'-AAAAACTTACCAATCCAAAAAAC-3'				
<i>p16</i> 上游	5'-TTAGAGGATTGAGGGATAGGG-3'	57℃	+150, +538	388 bp	35 个
下游	5'-ACCTAATTCCAATTCCCCTACAACT-3'				

1.4.4 质粒连接及转化 TA连接。5 μL凝胶回收DNA中加入5 μL混合反应体系[pMD19-T Vector 0.5 μL, Solution I 2 μL, 超纯水(ddH₂O)2.5 μL], 16℃反应2 h。细菌转化: 将质粒连接产物与JM109感受态细胞混匀, 冰浴30 min, 42℃热休克45 s, 再冰浴2 min。将转化后的产物加入Luria-Bertani培养基37℃, 250 r/min(摇板尺寸为496 mm×350 mm), 培养1.5 h。取200 μL转化菌均匀涂于氨苄选择平板, 37℃培养16 h。

1.4.5 重组质粒鉴定 每个平板随机挑取28个克隆进行鉴定, PCR反应条件为94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 25个循环; 72℃ 7 min, 4℃保持。电泳鉴定结果。

1.4.6 测序 每个样本挑18~20个阳性克隆, 送华大基因公司测序, 测序结果用MegAlign软件进行序列比对。

1.5 统计学分析

采用SPSS 21.0统计软件对数据进行分析, 采用Fisher精确卡方检验比较两组间性别、吸烟情况, 独立样本t检验比较两组间年龄的差异, 两独立样本t检验和Mann-Whitney U检验比较两组间尿砷、发砷和甲基化的差异, 偏相关和Spearman相关分析尿砷、发砷与甲基化, 甲基化与病情间的相关关系。

2 结果

2.1 研究对象基本情况

砷暴露组和对照组年龄、性别及吸烟情况差异无统计学意义($P>0.05$); 暴露组尿砷、发砷含量高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 研究对象基本情况

变量	人数	年龄(岁)	性别		吸烟		尿砷(μg/g)	发砷(μg/g)
			男	女	是	否		
砷暴露组	42	44.5±9.65	31	11	7	35	40.59±27.12	0.32±0.36
非暴露组	40	42.56±9.12	30	10	11	29	23.63±14.67	0.19±0.23
P			0.38 ^b	0.55 ^a	0.27 ^a	0.01 ^{*c}	0.01 ^{*c}	

[注]a: Fisher精确卡方检验; b: 两独立样本t检验; c: Mann-Whitney U检验。^{*}: 吸烟: 每天吸烟≥1支, 连续或累计6个月以上。

2.2 p53、p16甲基化情况

2.2.1 p53 在检测的p53启动子区(-299, +185)中共含有17个CpG位点, 其中-138、-64和+148位CpG位点在暴露和对照组中均未检出甲基化; 经独立样本t检验发现, 暴露组-71、+42、+109位CpG位点甲基化率高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$),

其他位点的甲基化率差异无统计学意义。暴露组p53启动子区平均甲基化率高于对照组[(8.32±1.51)%,(7.19±0.54)%], 差异有统计学意义($P=0.01$)。见表3。

表3 暴露组与对照组p53基因甲基化率

基因位点	暴露组(% , n=42)		P
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	
-266	3.30±0.67	2.90±0.81	0.20
-138	0.00±0.00	0.00±0.00	—
-126	3.38±0.85	3.41±1.35	0.92
-124	3.26±0.83	3.31±1.31	0.92
-71	11.44±3.64	8.26±2.72	0.02
-64	0.00±0.00	0.00±0.00	—
-37	6.35±4.50	3.57±2.96	0.06
-9	11.23±2.00	10.22±2.93	0.27
+42	2.58±1.29	1.03±1.01	0.00
+80	49.96±6.87	45.13±8.02	0.20
+109	4.98±1.33	3.64±1.43	0.01
+122	3.55±1.01	2.85±1.13	0.08
126	3.55±1.01	2.85±1.13	0.08
+137	5.67±2.85	5.15±2.63	0.61
+148	0.00±0.00	0.00±0.00	—
+151	6.19±4.38	3.47±2.88	0.06
+159	5.31±2.66	5.15±2.63	0.61
平均	8.32±1.51	7.19±0.54	0.01

2.2.2 p16 p16启动子区CpG岛(+150, +538)共含有35个CpG位点, 砷暴露组中有28个CpG位点检出甲基化, 平均甲基化率为(0.70±0.84)%; 对照组中有24个位点检出甲基化改变, 平均甲基化率为(0.50±0.51)%, 两组间CpG位点甲基化阳性率差异无统计学意义($\chi^2=3.8$, $P=0.09$)。经Mann-Whitney U检验, 两组35个CpG位点的平均甲基化率差异无统计学意义。

2.2.3 砷暴露水平与甲基化情况偏相关分析 经年龄、吸烟、饮酒校正, 尿砷、发砷含量与所检测的p53及p16各CpG位点及平均甲基化率间无相关关系($P>0.05$), 部分CpG位点与尿砷、发砷的相关关系见表4。

2.2.4 砷中毒与甲基化相关性分析 按照砷中毒诊断标准WS/T 211-2001《地方性砷中毒诊断标准》, 将所有研究对象分为对照组(40人)、病区非病人(9人)、轻(19人)、中(14人)4组, 经Kruskal-Wallis检验发现, p53基因+42、+109位CpG位点甲基化率和平均甲基化率组间差异有统计学意义($P<0.05$), 且与病情呈正向关系(相关系数分别为0.44、0.46和0.40, $P<0.05$)。

表4 尿砷、发砷与p53及p16甲基化相关性(n=82)^a

基因	尿砷		发砷	
	r	P	r	P
<i>p53</i>				
-124	0.02	0.95	-0.12	0.58
-71	-0.17	0.46	-0.11	0.65
+42	0.12	0.59	0.02	0.94
+109	0.04	0.86	0.05	0.82
+137	-0.40	0.07	0.28	0.22
<i>p53-average</i>	-0.26	0.26	0.24	0.29
<i>p16</i>				
+174	-0.05	0.69	-0.15	0.24
+248	0.17	0.19	-0.05	0.68
+254	0.06	0.66	0.08	0.55
+261	0.1	0.44	-0.10	0.42
+314	0.02	0.90	-0.08	0.53
+413	0.04	0.75	-0.21	0.11
+423	-0.203	0.113	-0.04	0.76
+438	-0.075	0.56	0.01	0.95
+442	-0.05	0.85	0.05	0.71
-476	0.19	0.15	0.05	0.73
+496	0.12	0.37	0.01	0.95
<i>p16-average</i>	0.06	0.62	-0.15	0.23

[注]a: 偏相关分析, 校正年龄、吸烟、饮酒。

3 讨论

DNA 甲基化等表观遗传学改变在细胞对环境化学物质的反应中发挥重要作用。研究提示DNA 甲基化参与了砷所致的基因表达改变、基因组稳定性变化以及细胞恶性转化等过程^[2]。

CpG 位点是原癌基因和抑癌基因突变的热点部位, 在外源化学物作用下甲基化修饰的CpG 位点与其他序列相比更易发生突变。课题组前期研究和已有的研究发现砷污染可致人体*p53* 基因启动子区高甲基化^[8, 11-14], 与已有结果相似。本研究发现砷暴露组和非砷暴露组间*p53* 基因启动子区某些CpG 位点甲基化率和平均甲基化率间差异明显, 且甲基化率与砷暴露间存在一定的关系, 这一结果提示, 砷有可能通过导致抑癌基因某些CpG 位点甲基化, 增加这些基因发生突变的可能, 进而发挥其促癌或致病、致癌的作用。

本研究发现*p53* 和*p16*启动子区的甲基化位点分散在不同的CpG 位点上, 大部分位点的甲基化率在暴露组和对照组间差异并不显著, 只有个别位点差异显著, 这与目前甲基化的“热点”学说一致^[10], 虽然这些个别的位点即热点的甲基化是否可以改变或者参与基因表达, 或是否可以和其他的效应相互作用改变细胞的稳定性目前还不得而知, 但这些热点有望成为

新的生物学标志, 用于环境污染物暴露的监控。

在本研究中并未发现砷的内暴露水平与*p53* 甲基化呈剂量-反应关系。这一结果提示, 砷所致的DNA 甲基化改变可能是一个长期暴露所导致的累积效应, 而尿砷和发砷仅能反映短期暴露情况, 这也许是本研究未发现它们之间相关关系的原因之一。砷所致的DNA 甲基化是如何产生并且固定下来, 还需要进一步深入研究予以揭示。本研究中砷暴露组*p16* 基因启动子区平均甲基化率和CpG 位点甲基化阳性率均未见高于对照组, 受制于BSP方法的成本和工作量, 本研究的样本量较小, 这可能是本研究部分研究指标为临界阴性结果或阴性结果的原因之一。因此本研究的结果还需进一步的体外体内研究和大样本量的人群研究予以证实。

(志谢: 衷心感谢何志妮博士在实验过程予以的指导和帮助)

参考文献

- [1] 张爱华. 砷与健康[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 1-8.
- [2] Reichard J F, Puga A. Effects of arsenic exposure on DNA methylation and epigenetic gene regulation[J]. Epigenomics, 2010, 2(1): 87-104.
- [3] 张爱华. 表观遗传学: 揭示砷中毒机制及改进防治策略的新路径[J]. 中华地方病学杂志, 2013, 32(1): 1-2.
- [4] 潘雪莉, 张爱华. 亚砷酸钠对人皮肤角质形成细胞MGMT基因组蛋白乙酰化及转录与表达的影响[J]. 环境与职业医学, 2011, 28(4): 210-214.
- [5] Terry M B, Delgado-Cruzata L, Vin-Raviv N, et al. DNA methylation in white blood cells: association with risk factors in epidemiologic studies[J]. Epigenetics, 2011, 6(7): 828-837.
- [6] Ruiz-Hernandez A, Kuo C C, Rentero-Garrido P, et al. Environmental chemicals and DNA methylation in adults: a systematic review of the epidemiologic evidence[J]. Clin Epigenetics, 2015, 7(1): 55.
- [7] 张爱华, 陈强, 李健, 等. 燃煤污染型砷中毒患者MGMT基因启动区甲基化及MGMT mRNA的表达[J]. 环境与职业医学, 2008, 25(5): 425-428.
- [8] 张爱华, 潘雪莉, 夏玉洁, 等. *p53* 基因甲基化和突变与燃煤污染型砷中毒关系研究[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(5): 393-398.
- [9] 宾海华, 张爱华, 黄晓欣, 等. 燃煤型砷中毒患者*p16*基因缺失及启动区CpG 岛甲基化的观察[J]. 中国地方病学杂

- 志, 2006, 25(4): 370-373.
- [10] Yang P, Ma J, Zhang B, et al. CpG site-specific hypermethylation of *p16^{INK4a}* in peripheral blood lymphocytes of PAH-exposed workers [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012, 21(1): 182-190.
- [11] Argos M, Chen L, Jasmine F, et al. Gene-specific differential DNA methylation and chronic arsenic exposure in an epigenome-wide association study of adults in Bangladesh [J]. Environ Health Perspect, 2015, 123(1): 64-71.
- [12] Blaurock-Busch E, Amin O R, Rabah T. Heavy metals and trace elements in hair and urine of a sample of arab children with autistic spectrum disorder [J]. Maedica(Bucharest), 2011, 6(4): 247-257.
- [13] Majumdar S, Chanda S, Ganguli B, et al. Arsenic exposure induces genomic hypermethylation [J]. Environ Toxicol, 2010, 25(3): 315-318.
- [14] Chanda S, Dasgupta U B, GuhaMazumder D, et al. DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy [J]. Toxicol Sci, 2006, 89(2): 431-437.

(收稿日期: 2016-07-14; 录用日期: 2016-11-25)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 王晓宇)

【告知栏】

《环境与职业医学》杂志唯一投稿方式系登陆主页 <http://jeom.scdc.sh.cn:8081>

近来,本刊陆续收到作者反映,有多家网站冒用本刊名义收稿并收取高额审稿费。对此,本刊郑重声明如下:(1)我们从未委托任何机构或个人征文,本刊唯一投稿方式是通过登录《环境与职业医学》主页<http://jeom.scdc.sh.cn:8081>。(2)本刊从2016年开始免收审稿费,稿件录用后方收取版面费。望广大作者特别小心,谨防受骗!

假冒网站

<http://www.china-k.net/qikan/yiyeoweisheng/yufangyixue/20151119/2148.html>
<http://www.cneu.org.cn/qikan/show14408.html>
<http://www.hjzyyx.cn/>
<http://hjzyyx.yixue.org.cn/>
<http://www.baywatch.cn/a/qikandaohang/yixueqikan/20111128/1094.html>
<http://www.zhazhi.com/qikan/yyws/yfws/1535.html>
<http://www.zgqkzxw.com/journaldetail.php?aId=359>
<http://hexin.xuebaoqk.com/yixue/1149.html>
<http://www.beautywall.net/yixue/yufangweisheng/872.html>
<http://www.qkw360.com/detail-256.html?hmsr=360so&hmmd=ppc&hmkw=%E7%8E%AF%E5%A2%83%E4%B8%8E%E8%81%8C%E4%B8%9A%E5%8C%BB%E5%AD%A6%E6%8A%95%E7%A8%BF>

<http://hzyx.qikan.com/>

<http://www.7kan.org.cn/shougaoyaqiu/2010-11-25/927.html>

<http://www.js120.net/html/qkxy/201011/11/50680.html>

假冒邮箱

qikanc@163.com; chinacneu@163.com; hjzyyx@163.com; 2355902950@qq.com; 2853759168@qq.com; zg58qk@163.com; wanyuanqikan@163.com