

PCB153对人肾上皮细胞中LINE-1表达及转座的影响

李佳慈, 景亚青, 茹雅维, 鞠明艳, 李克秋, 李光

摘要:

[目的] 探究2, 2', 4, 4', 5, 5'-六氯联苯(PCB153)对人肾上皮细胞系(293T)细胞中长散在重复序列-1(LINE-1)基因表达和转座的影响。

[方法] 293T细胞每2d传代一次, 传代后立即使用5 μmol/L PCB153进行染毒。染毒后的细胞置于37℃、体积分数5% CO₂培养箱中继续培养, 连续染毒10d。同时设置二甲亚砜(DMSO)对照组。采用实时荧光定量PCR技术检测LINE-1开放阅读框1(ORF-1)和开放阅读框2(ORF-2)基因的mRNA表达水平及拷贝数, LINE-1拷贝数增加反映其发生转座。Western blot检测LINE-1 ORF-1和ORF-2蛋白表达水平。

[结果] 与对照组比较, 从第4天开始PCB153染毒组细胞中LINE-1 ORF-1 mRNA表达水平增加($P < 0.05$), 从第6天开始PCB153染毒组细胞中LINE-1 ORF-2 mRNA表达水平增加($P < 0.05$)。染毒第10天时, 与对照组(LINE-1 ORF-1: 2.74 ± 0.51 ; LINE-1 ORF-2: 0.57 ± 0.10)相比, PCB153染毒组的LINE-1 ORF-1蛋白表达水平(4.39 ± 0.85)和LINE-1 ORF-2蛋白表达水平(0.78 ± 0.10)均明显增加($P < 0.05$)。染毒第10天时, PCB153染毒组与对照组的LINE-1 ORF-1拷贝数分别为 1.43 ± 0.64 和 0.83 ± 0.37 , LINE-1 ORF-2拷贝数分别为 1.11 ± 0.52 和 0.81 ± 0.12 , 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

[结论] PCB153暴露可增加LINE-1的表达和拷贝数, 诱导其转座。

关键词: PCB153; 人肾上皮细胞; LINE-1; 基因表达; 拷贝数; 转座

引用: 李佳慈, 景亚青, 茹雅维, 等. PCB153对人肾上皮细胞中LINE-1表达及转座的影响[J]. 环境与职业医学, 2018, 35(3): 241-245. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.17466

Effects of PCB153 on LINE-1 expression and translocation in human renal tubular epithelial cells LI Jia-ci, JING Ya-qing, RU Ya-wei, JU Ming-yan, LI Ke-qiu, LI Guang (School of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China). Address correspondence to LI Guang, E-mail: lig@tmu.edu.cn
• The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To assess the effects of 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl (PCB153) on long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) gene expression and transposition in human renal tubular epithelial 293T cells.

[Methods] The 293T cells were transmitted every two days and exposed to PCB153 (5 μmol/L) *in vitro* after transmitting. The exposed cells were cultured in a 5% CO₂ incubator at 37℃ and the exposure lasted for 10 days, with the 293T cells treated with dimethyl sulfoxide (DMSO) as control group. LINE-1 open read framework 1 (ORF-1) and open read framework 2 (ORF-2) gene mRNA expression levels and copy numbers (increasing copy number indicates transposition) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. LINE-1 ORF-1 and ORF-2 protein expression levels were measured by Western blot.

[Results] Compared with the control group, the mRNA expression level of LINE-1 ORF-1 in the PCB153 exposed group was increased from day 4 ($P < 0.05$), and the mRNA expression level of LINE-1 ORF-2 in the PCB153 exposed group was increased from day 6 ($P < 0.05$). On day 10, compared with the control group (LINE-1 ORF-1: 2.74 ± 0.51 ; LINE-1 ORF-2: 0.57 ± 0.10), the protein expression levels of LINE-1 ORF-1 (4.39 ± 0.85) and LINE-1 ORF-2 (0.78 ± 0.10) in the PCB153 exposed group were both increased ($P < 0.05$). In addition, on day 10, the copy numbers of LINE-1 ORF-1 were 1.43 ± 0.64 and 0.83 ± 0.37 , and the copy numbers of LINE-1 ORF-2 were 1.11 ± 0.52 and 0.81 ± 0.12 in the PCB153 exposed group and the control group, respectively, with significant differences ($P < 0.05$).

[Conclusion] Exposure to PCB153 can increase the expression and copy number of LINE-1 and induce its transposition in 293T cells.

• 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: 21647008); 天津市科技支撑计划(编号: 16YFZCSY00900); 国家重点研发计划(编号: SQ2017YF080109)

[作者简介] 李佳慈(1993—), 女, 硕士生; 研究方向: 环境与健康; E-mail: lijia-ci@tmu.edu.cn

[通信作者] 李光, E-mail: lig@tmu.edu.cn

[作者单位] 天津医科大学基础医学院, 天津 300070

Keywords: PCB153; human renal tubular epithelial cells; *LINE-1*; gene expression; copy number; transposition

Citation: LI Jia-ci, JING Ya-qing, RU Ya-wei, et al. Effects of PCB153 on *LINE-1* expression and translocation in human renal tubular epithelial cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2018, 35(3): 241-245. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.17466

多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)是一类具有持久性、生物蓄积性、高毒性的有机污染物。PCBs可干扰细胞的代谢过程,影响机体的稳态,可能会引起代谢紊乱、生殖毒性、神经发育毒性、癌症等危害。有研究表明,PCBs暴露能够降低机体基因组甲基化水平,并影响基因组稳定性^[1]。长散在重复序列-1(long interspersed nuclear element-1, *LINE-1*)是人类基因组中唯一可以自主转座的逆转座子,占人类基因组的17%~20%^[2]。由于*LINE-1*在人类基因组中数量巨大,所以可在一定程度上代表整体基因组,其转座可降低基因组稳定性,加剧DNA损伤^[3]。*LINE-1*开放阅读框1(open read framework 1, *ORF-1*)和开放阅读框2(open read framework 2, *ORF-2*)编码的蛋白质可以介导*LINE-1*转座。结肠癌、肝癌、乳腺癌等癌组织存在大量的*LINE-1*转座,其转座位置具有随机性^[4-6],并且*LINE-1*在生殖细胞的转座最为活跃^[7]。除生殖细胞和癌细胞外,UPTON等^[8]研究发现,正常人的脑组织中也存在*LINE-1*转座,其转座与神经细胞的功能发挥有关。*LINE-1*的转座可由其拷贝数增加间接反映。目前,对于PCBs通过激活*LINE-1*致机体损伤机制的研究较少。本研究拟分析人肾上皮细胞系293T细胞在2, 2', 4, 4', 5, 5'-六氯联苯(PCB153)暴露下*LINE-1*的表达及转座效应,为PCBs分子毒性的研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

PCB153(纯度>99%)(Accustandard,美国),胰蛋白酶、胎牛血清(Gibco,美国),DMEM培养基(Corning,美国),二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(Sigma,美国),Trizol(Life Technologies,美国),RIPA蛋白裂解液、三羟甲基氨基甲烷、吐温-20(北京索莱宝科技有限公司,中国),二喹啉甲酸(BCA)蛋白测定试剂盒(Thermo Fisher,美国),氯化钠(天津光复精细化工有限公司,中国),逆转录试剂盒(Promega,美国),实时荧光定量PCR试剂盒(Invitrogen,美国),Axygen DNA提取试剂盒(Corning,美国),Nanodrop2000微量紫外分光光度计(Thermo Fisher,美国),Eco实时荧光定量PCR仪(Illumina,美国),Tanon 5200自动化

学发光成像仪(上海天能公司,中国),引物合成于上海生工生物工程公司。

1.2 细胞培养及染毒

在37℃、体积分数5% CO₂的条件下,将293T细胞培养在含质量分数10%胎牛血清的高糖DMEM培养基中,当细胞处于对数生长期时进行染毒。PCB153染毒溶液的配制:准确称取适量的PCB153,用DMSO配制成5 μmol/L PCB153溶液。实验中PCB153染毒组及对照组的DMSO质量分数均为0.05%^[9-10]。经查阅文献发现:在多种细胞的剂量-反应曲线中,PCB153浓度达到5 μmol/L时,细胞的生存率相对较高,此时的PCB153对细胞无毒性作用,染毒组细胞状态与对照组相比无差异^[9]。故本研究最终选择5 μmol/L进行染毒。实验共分对照组和PCB153染毒组(5 μmol/L)2组,染毒实验分为两个部分。一为连续染毒,293T细胞每2 d传代一次,传代后染毒组立即进行染毒,染毒后的细胞置于37℃、体积分数5% CO₂培养箱中继续培养,连续染毒10 d。采用细胞计数板的方式进行计数,确保各组平行样本之间的细胞数量大致相同。二为细胞收集,实验中293T细胞每2 d传代一次,胰酶消化后,离心半径为10 cm的离心机以1 000 r/min离心5 min,收集细胞。

1.3 *LINE-1* *ORF-1* 和 *ORF-2* mRNA 表达水平检测

Trizol法提取收集的293T细胞总RNA,采用微量紫外分光光度计测定RNA的纯度(D_{260}/D_{280} 在1.8~2.0为宜)。1 μg总RNA通过逆转录试剂盒逆转录成cDNA。以cDNA产物为模板,在实时荧光定量PCR仪上检测*ORF-1*和*ORF-2* mRNA的相对表达量。反应条件为:95℃ 10 min, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 72℃ 20 s; 35个循环。采用2^{-ΔΔC_t}进行相对定量分析。引物序列为:*LINE-1* *ORF1*-F: 5'-TGCGGAGGATGTGGAGAA-3'; *LINE-1* *ORF1*-R: 5'-CCTGCAATCCCACCAACAAT-3'; *LINE-1* *ORF2*-F: 5'-GAACCAAGACCACTCACCATCA-3'; *LINE-1* *ORF2*-R: 5'-CCCTGGACTGGGCGAAGT-3'。

1.4 *LINE-1* *ORF-1* 和 *LINE-1* *ORF-2* 蛋白表达水平检测

RIPA裂解法提取收集293T细胞总蛋白,采用BCA法检测蛋白浓度。Western blot法检测*ORF-1*和*ORF-2*的蛋白表达量。SDS-PAGE进行蛋白分离,上

样蛋白量为30 µg/孔,恒压电流,堆积胶80 V,分离胶120 V,电泳至凝胶3/4处。湿转法进行蛋白转膜,冰浴中以100 V恒压电转60 min,质量分数5%的脱脂奶粉室温封闭2 h。加入用封闭液稀释的一抗,4℃轻摇过夜。次日,取出一抗孵育的聚偏氟乙烯膜,TBST洗3次,每次洗15 min;然后,按照质量比1:10 000比例加入封闭液稀释的二抗,室温轻摇2 h。取出二抗孵育的聚偏氟乙烯膜,TBST洗3次,每次洗15 min,辣根过氧化物酶化学发光法显色。

1.5 LINE-1 ORF-1和LINE-1 ORF-2基因拷贝数检测

Axygen试剂盒提取收集293T细胞DNA,-20℃储存。用微量紫外分光光度计测定DNA的浓度和纯度(D_{260}/D_{280} 在1.8~2.0为宜)。以DNA为模板,在实时荧光定量PCR仪上检测ORF-1和ORF-2在基因组DNA上的相对量。反应条件:95℃ 10 min,95℃ 10 s,60℃ 30 s,72℃ 20 s;35个循环。内对照为FOXP2基因(在基因组拷贝数恒定为2),每个样本进行目的基因扩增时均重复3次,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行相对定量分析。引物序列为:FOXP2-F:5'-TGACATGCCAGCTTATCTGTTT-3';FOXP2-R:5'-GAGAAAAGCAATTTTCACAGTCC-3';LINE-1 ORF1-F:5'-GGCAGGGCACAGACAAAC-3';LINE-1 ORF1-R:5'-AGGGACCCACTTGAGGAG-3';LINE-1 ORF2-F:5'-GGATACATTCCTCGACAC-3';LINE-1 ORF2-R:5'-CTCCTCCTTGACCTCTG-3'。

1.6 统计学分析

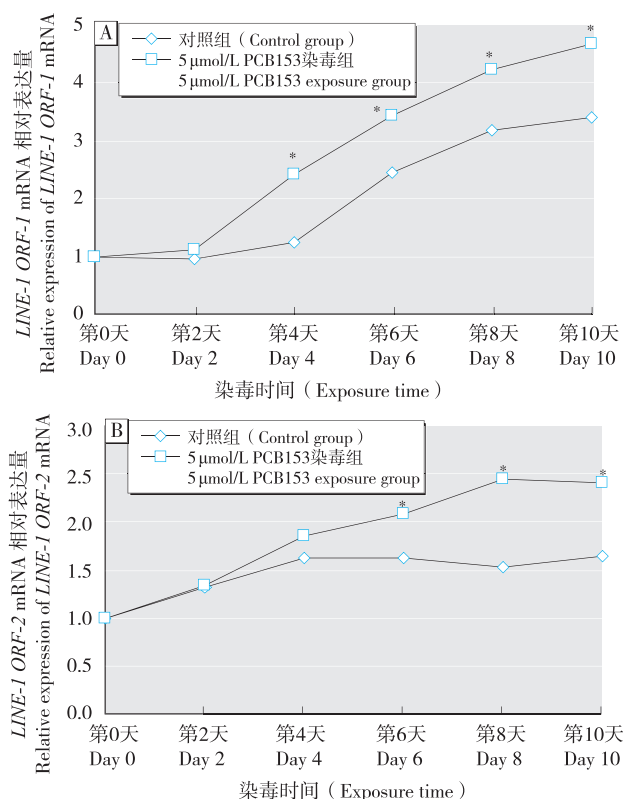
所得实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 17.0统计软件进行单因素方差分析,用 t 检验进行两两比较。双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PCB153对293T细胞中LINE-1 ORF-1和ORF-2基因表达的影响

与对照组比较,从第4天开始,5 µmol/L PCB153染毒组细胞中LINE-1 ORF-1 mRNA表达水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);从第6天开始,LINE-1 ORF-2 mRNA表达水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图1。

染毒10 d时:5 µmol/L PCB153染毒组与对照组的LINE-1 ORF-1灰度值分别为 4.39 ± 0.85 和 2.74 ± 0.51 ,差异具有统计学意义($P<0.05$);LINE-1 ORF-2灰度值分别为 0.78 ± 0.10 和 0.57 ± 0.10 ,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图2。

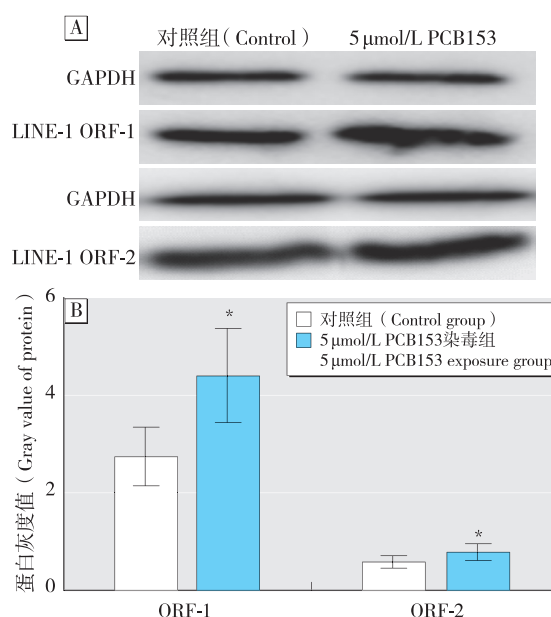


[注]*: 与对照组相比, $P<0.05$ 。

[Note]*: Compared to the control group, $P<0.05$.

图1 PCB153对293T细胞中LINE-1 ORF-1(A)和LINE-1 ORF-2(B)mRNA表达的影响

Figure 1 The effects of PCB153 treatment on LINE-1 ORF-1(A) and LINE-1 ORF-2(B)mRNA expressions in 293T cells



[注]*: 与对照组相比, $P<0.05$ 。

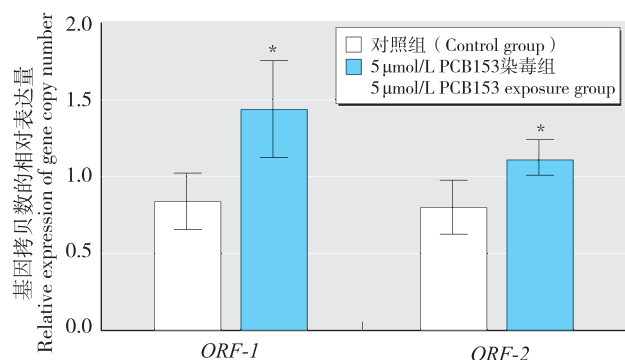
[Note]*: Compared to the control group, $P<0.05$.

图2 PCB153染毒10 d对293T细胞中LINE-1 ORF-1和LINE-1 ORF-2蛋白表达(A)和灰度值(B)的影响

Figure 2 The effects of PCB153 treatment for 10 days on LINE-1 ORF-1 and LINE-1 ORF-2 protein expression levels(A) and gray values(B) in 293T cells

2.2 PCB153对293T细胞中LINE-1 ORF-1和ORF-2基因拷贝数的影响

染毒10d时:5 μ mol/L PCB153染毒组与对照组的LINE-1 ORF-1拷贝数的相对表达量分别为 1.43 ± 0.64 和 0.83 ± 0.37 ,差异具有统计学意义($P < 0.05$);LINE-1 ORF-2拷贝数的相对表达量分别为 1.11 ± 0.52 和 0.81 ± 0.12 ,差异也具有统计学意义($P < 0.05$)。见图3。



[注]*:与对照组相比, $P < 0.05$ 。

[Note]*: Compared to the control group, $P < 0.05$.

图3 PCB153染毒10d对293T细胞中LINE-1 ORF-1和LINE-1 ORF-2基因拷贝数的影响

Figure 3 The effects of PCB153 treatment for 10 days on LINE-1 ORF-1 and LINE-1 ORF-2 copy numbers in 293T cells

3 讨论

据世界卫生组织报道,西欧和东欧人体内PCBs含量较高,其中捷克和斯洛伐克人群体内PCBs含量最高^[11]。我国广州贵屿、浙江台州、天津静海人群体内PCBs含量较高,这些地区存在电子垃圾拆卸业,可将产品中的PCBs释放到环境中^[12]。PCBs暴露与乳腺癌、肝癌、结肠癌的发生也存在一定的关系^[4-6]。在前期实验中,本课题组对天津静海电子垃圾区域进行了环境污染物浓度测定,发现在该地区PCB153含量较高,因此本研究选用电子垃圾处理区域含量较高的PCB153作为研究因素,分析其对LINE-1转座的影响。

转座子是指可以在基因组上进行转座且具有高度重复的DNA元件,在RNA的介导下,可以由基因组的一个位置复制插入到另一个位置,增加其在基因组上的拷贝数^[13]。转座子约占全基因组的33%,根据其转座活性可分为自主转座子和非自主转座子^[14]。LINE-1是人类基因组中唯一具有自主转座活性的转座子家族^[15]。

LINE-1基因全长约为6kb,其中ORF-1和ORF-2编码的蛋白质,可介导LINE-1的转座过程^[13-14, 16]。

ORF-1蛋白具有核酸分子伴侣活性,并且能保护核酸核蛋白体复合物中的LINE-1 mRNA免被降解,确保逆转录正确起始等多种功能^[17-20]。一般认为ORF-1蛋白主要作为ORF-2蛋白的辅助因子并能够与核酸结合^[21]。ORF-2蛋白具有核酸内切酶结构域、反转录酶结构域及锌指样结构域。在LINE-1 mRNA进入细胞核后,负责识别在宿主细胞基因组DNA上的目的序列,在靶点引导逆转录过程中发挥重要作用^[2]。

293T细胞是一种人肾上皮细胞系,是实验室内应用比较广泛且较容易获得的一种非癌的人体细胞。本研究发现,在5 μ mol/L PCB153的刺激下,染毒10d时,293T细胞中LINE-1的ORF-1和ORF-2表达量均增加,且无论是在mRNA还是在蛋白水平上,PCB153染毒组ORF-1的表达量均高于ORF-2的表达量。这与ESTÉCIO等^[22]的研究结果一致,他们研究发现LINE-1中ORF-1的表达量是ORF-2的千倍以上,认为ORF-1有可能单独具有其他特定功能。LINE-1的激活与表达可导致各种类型的基因组不稳定,如基因突变、基因扩增^[23-24]。这些异常突变可能通过基因调控途径影响细胞,诱导肿瘤细胞增殖,从而增加结肠癌、肺癌等癌症的发病风险。即便LINE-1不是通过转座插入和ORF-2造成的基因损伤来诱致肿瘤发生,也可能在肿瘤发展的过程中促进相关基因表达,对肿瘤发生发展所需要的人体内环境具有重要的调控作用。

综上所述,PCB153可致293T细胞LINE-1表达及拷贝数增加,反映其发生转座。但是目前关于PCB153致细胞中LINE-1转座调控模式的机制尚未明确,仍需进一步的研究。

参考文献

- [1]高萍,何卫红,何平,等. PCB153对PBDE-47致SH-SY5Y细胞DNA损伤和修复基因表达的影响[J]. 卫生研究, 2008, 37(5): 525-528.
- [2]BABUSHOK DV, KAZAZIAN HHJR. Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1[J]. Hum mutat, 2007, 28(6): 527-539.
- [3]KINES KJ, SOKOLOWSKI M, DEHARO DL, et al. Potential for genomic instability associated with retrotranspositionally-incompetent L1 loci[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(16): 10488-10502.
- [4]HUR K, CEJAS P, FELIU J, et al. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation

- of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis[J]. Gut, 2014, 63(4): 635-646.
- [5] LEE E, ISKOW R, YANG L, et al. Landscape of somatic retrotransposition in human cancers[J]. Science, 2012, 337(6097): 967-971.
- [6] TUBIO JM, LI Y, JU YS, et al. Extensive transduction of nonrepetitive DNA mediated by L1 retrotransposition in cancer genomes[J]. Science, 2014, 345(6196): 12513431.
- [7] ISHIUCHI T, TORRES-PADILLA ME. LINEing germ and embryonic stem cells' silencing of retrotransposition[J]. Genes Dev, 2014, 28(13): 1381-1383.
- [8] UPTON KR, GERHARDT DJ, JESUADIAN JS, et al. Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons[J]. Cell, 2015, 161(2): 228-239.
- [9] XIN X, SENTHILKUMAR PK, SCHNOOR JL, et al. Effects of PCB126 and PCB153 on telomerase activity and telomere length in undifferentiated and differentiated HL-60 cells[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2016, 23(3): 2173-2185.
- [10] EUM SY, ANDRÁS IE, COURAUD PO, et al. PCBs and tight junction expression[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2008, 25(2): 234-240.
- [11] SULKOWSKI WW, KANIA-KORWEL I, ROBERTSON LW, et al. Polychlorinated biphenyls production in Poland[J]. Fresenius Environ Bull, 2003, 12: 152-157.
- [12] XING Y, LU Y, DAWSON RW, et al. A spatial temporal assessment of pollution from PCBs in China[J]. Chemosphere, 2005, 60(6): 731-739.
- [13] PERSSON J, STEGLICH B, SMIALOWSKA A, et al. Regulating retrotransposon activity through the use of alternative transcription start sites[J]. EMBO Rep, 2016, 17(5): 753-768.
- [14] NAZARYAN-PETERSEN L, BERTELSEN B, BAK M, et al. Germline chromothripsis driven by L1-mediated retrotransposition and Alu/Alu homologous recombination[J]. Hum Mutat, 2016, 37(4): 385-395.
- [15] KEMP JR, LONGWORTH MS. Crossing the LINE toward genomic instability: LINE-1 retrotransposition in cancer[J]. Front Chem, 2015, 3: 68.
- [16] KEMP JR, LONGWORTH MS. Crossing the LINE toward genomic instability: LINE-1 retrotransposition in cancer[J]. Front Chem, 2015, 3: 68.
- [17] FENG Q, MORAN JV, KAZAZIAN HH JR, et al. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition[J]. Cell, 1996, 87(5): 905-916.
- [18] MARTIN SL, LI J, EPPERSON LE, et al. Functional reverse transcriptases encoded by A-type mouse LINE-1: defining the minimal domain by deletion analysis[J]. Gene, 1998, 215(1): 69-75.
- [19] MORAN JV, HOLMES SE, NAAS TP, et al. High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells[J]. Cell, 1996, 87(5): 917-927.
- [20] BELGNAOUI SM, GOSDEN RG, SEMMES OJ, et al. Human LINE-1 retrotransposon induces DNA damage and apoptosis in cancer cells[J]. Cancer Cell Int, 2006, 6: 13.
- [21] ROMAN-GOMEZ J, JIMENEZ-VELASCO A, AGIRRE X, et al. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia[J]. Oncogene, 2005, 24(48): 7213-7223.
- [22] ESTÉCIO MR, GHARIBYAN V, SHEN L, et al. LINE-1 hypomethylation in cancer is highly variable and inversely correlated with microsatellite instability[J]. PLoS One, 2007, 2(5): e399.
- [23] LUZHNA L, ILNYTSKYI Y, KOVALCHUK O. Mobilization of LINE-1 in irradiated mammary gland tissue may potentially contribute to low dose radiation-induced genomic instability[J]. Genes Cancer, 2015, 6(1/2): 71-81.
- [24] GUFFANTI G, GAUDIS, KLENGEL T, et al. LINE1 insertions as a genomic risk factor for schizophrenia: preliminary evidence from an affected family[J]. Am J Med Genet Part B: Neuropsychiatr Genet, 2016, 171(4): 534-545.

(收稿日期: 2017-07-19; 录用日期: 2017-12-11)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 汪源; 校对: 陈姣)