实验研究
Experiment

G9a 在砷致 HaCaT 细胞 DNA 损伤中的作用初探

丁雪娇，张安柳，李昌哲，赵华，李军

贵州医科大学公共卫生学院 / 环境污染与疾病监控教育部重点实验室，贵州 贵阳 550025

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18746

摘要：

[背景] 砷可导致皮肤癌、肺癌等，相关机制存在多种假说。有研究认为 DNA 损伤及其修复抑制在砷的毒作用机制中起重要作用。本课题组前期在人群研究中也发现砷暴露可引起外周血淋巴细胞 DNA 双键断裂损伤。因此，探讨砷暴露引起细胞 DNA 损伤的分子机制对研究砷致癌机制尤为重要。

[目的] 通过检测人永生化皮肤角质形成细胞（HaCaT 细胞）组蛋白赖氨酸甲基转移酶 2（G9a）过表达前后 $NaAsO_2$ 所致细胞 DNA 损伤，初步探讨 G9a 与砷致 HaCaT 细胞 DNA 损伤修复关系。

[方法] 体外常规培养 HaCaT 细胞，以 0.00、2.50、5.00、10.00 μmol/L $NaAsO_2$ 处理 HaCaT 细胞 24 h，其中 0.00 μmol/L 为空白对照组。采用实时荧光定量 PCR 法检测 *G9a* mRNA 转录水平，免疫印迹法检测 G9a 蛋白表达水平，单细胞凝胶电泳法检测各组 HaCaT 细胞 DNA 损伤水平。为了进一步验证 G9a 对 $NaAsO_2$ 致细胞 DNA 损伤的影响，用 pCDNA3.1-G9a 质粒瞬时转染 HaCaT 细胞的基础上，再以 0.00 μmol/L 或 10.00 μmol/L $NaAsO_2$ 处理细胞 24 h，另设立空白对照组、空载体转染组和单独染砷组（10.00 μmol/L），采用上述实验方法检测各项指标的变化。

[结果] 用不同浓度 $NaAsO_2$ 染毒 HaCaT 细胞 24 h 后，实时荧光定量 PCR 结果显示，与空白对照组（1.00±0.00）比较，2.50、5.00、10.00 μmol/L 染砷组 *G9a* mRNA 转录水平（0.87±0.04、0.70±0.05、0.59±0.04）逐渐减低（$P<0.05$）；免疫印迹法结果显示，G9a 蛋白表达水平在 5.00、10.00 μmol/L 染砷组（0.40±0.05、0.29±0.06）较对照组（0.59±0.09）降低；单细胞凝胶电泳结果显示，细胞彗星尾部 DNA 百分含量（0.63±0.07、3.26±0.34、6.79±0.66、13.18±2.34）和 Olive 尾矩（1.08±0.05、3.67±0.20、6.26±0.46、12.63±0.63）均随 $NaAsO_2$ 浓度增加而逐渐增加（r=0.93、0.95，$P<0.05$）。质粒转染 HaCaT 细胞后，实时荧光定量 PCR 和 Western blot 结果显示，与对照组（1.00±0.00、0.67±0.06）比较，*G9a* 高表达组 *G9a* mRNA 的转录水平（105.93±28.72）及蛋白表达水平（1.07±0.06）均明显增加（$P<0.05$），与染砷组（0.57±0.08、0.40±0.02）比较，*G9a* 高表达联合染砷组 *G9a* mRNA 的转录水平（41.80±7.14）及蛋白表达水平（0.67±0.02）也有所升高（$P<0.05$）；单细胞凝胶电泳结果显示，与空白对照组（0.91±0.10、0.53±0.09）比较，*G9a* 高表达组细胞的彗星尾部 DNA 百分含量（1.00±0.18）及 Olive 尾矩（0.77±0.13）无明显变化，与染砷组（11.41±1.02、12.59±1.38）比较，*G9a* 高表达联合染砷组细胞彗星尾部 DNA 百分含量及 Olive 尾矩（15.24±1.25、17.12±2.88）有所升高（$P<0.05$）。

[结论] 砷可导致 HaCaT 细胞 DNA 损伤和 *G9a* mRNA 转录水平及蛋白表达水平的改变，但还不确定 G9a 的变化是否与砷所致 DNA 损伤机制有关联，其机制有待进一步研究。

关键词：砷；HaCaT 细胞；组蛋白赖氨酸甲基转移酶 2 G9a；DNA 损伤

Preliminary study on role of G9a in DNA damage in HaCaT cells induced by arsenic

DING Xue-jiao, ZHANG An-liu, LI Chang-zhe, ZHAO Hua, LI Jun (*School of Public Health/The Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou* 550025, *China*)

Abstract:

[Background] Arsenic can cause cancers such as skin cancer and lung cancer, and there are many mechanical assumptions. Studies have shown that DNA damage and its repair inhibition play an important role in the mechanism of arsenic toxicity. Our previous population-based studies have also found that arsenic exposure can cause DNA double strand breaks in peripheral blood lymphocytes. Therefore, understanding the molecular mechanism of arsenic exposure-induced DNA damage in cells is a key step in studying the carcinogenic mechanism of arsenic.

[Objective] This study observes the DNA damage induced by $NaAsO_2$ exposure in immortalized

基金项目
国家自然科学基金（81760574），贵州省科技厅基金（黔科合基础［2018］1134）

作者简介
丁雪娇（1993—），女，硕士生；
E-mail：623903181@qq.com

通信作者
李军，E-mail：641885476@qq.com

利益冲突 无申报
收稿日期 2018-11-09
录用日期 2019-04-11

文章编号 2095-9982(2019)05-049-06
中图分类号 R114
文献标志码 A

▸引用
丁雪娇，张安柳，李昌哲，等. G9a 在砷致 HaCaT 细胞 DNA 损伤中的作用初探［J］. 环境与职业医学，2019，36（5）：496-500，505.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18746

Funding
This study was funded.

Correspondence to
LI Jun, E-mail: 641885476@qq.com

Competing interests None declared
Received 2018-11-09
Accepted 2019-04-11

▸To cite
DING Xue-jiao, ZHANG An-liu, LI Chang-zhe, et al. Preliminary study on role of G9a in DNA damage in HaCaT cells induced by arsenic[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(5): 496-500, 505.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18746

non-tumorigenic human epidermal cells (HaCaT) with over-expressed euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2 (G9a) or not, and to preliminarily explore the relationship between G9a and arsenic-induced DNA damage in HaCaT cells.

[Methods] HaCaT cells were routinely cultured *in vitro* and treated with different concentrations of $NaAsO_2$ (0.00, 2.50, 5.00 and 10.00 μmol/L) for 24 h. The 0.00 μmol/L was used as blank control. The mRNA transcription and protein expression of G9a were detected by real-time quantitative PCR and Western blot, respectively. DNA damage in HaCaT cells with different treatments was detected by single cell gel electrophoresis. In order to further verify the effect of G9a on DNA damage induced by $NaAsO_2$, HaCaT cells were transfected with pCDNA3.1-G9a plasmid, and then treated with 0.00 μmol/L or 10.00 μmol/L $NaAsO_2$ for 24 h; related blank control group, null-vector transfection group, and arsenic group (10.00 μmol/L) were also set up. The changes of related indicators were detected as mentioned earlier.

[Results] After exposure to $NaAsO_2$ for 24 h, the real-time quantitative PCR results showed that the mRNA transcription levels of *G9a* in HaCaT cells of the 2.50, 5.00, and 10.00 μmol/L groups (0.87±0.04, 0.70±0.05, 0.59±0.04) were gradually lower than the level of the blank control group (1.00±0.00) ($P<0.05$); the Western blot results showed that the protein expression levels of G9a of the 5.00 and 10.00 μmol/L groups (0.40±0.05, 0.29±0.06) were lower than that of the blank control group (0.59±0.09) ($P<0.05$); the single cell gel electrophoresis results showed that the tail DNA% (0.63±0.07, 3.26±0.34, 6.79±0.66, 13.18±2.34) and the Olive tail moment (1.08±0.05, 3.67±0.20, 6.26±0.46, 12.63±0.63) were increased (r=0.93 and 0.95, $P<0.05$) with higher $NaAsO_2$ exposure dose. After plasmid transfection into HaCaT cells, the real-time quantitative PCR and Western blot results showed that the mRNA transcription level and the protein expression level of the *G9a* over-expression group (105.93±28.72, 1.07±0.06) were higher than those of the blank control group (1.00±0.00, 0.67±0.06) ($P<0.05$), the levels of the *G9a* over-expression and arsenic exposure group (41.80±7.14, 0.67±0.02) were also higher than those of the arsenic exposure group (0.57±0.08, 0.40±0.02) ($P<0.05$); the single cell gel electrophoresis results showed that the tail DNA% and the Olive tail moment of the *G9a* over-expression group (1.00±0.18, 0.77±0.13) were not significantly changed compared with the blank control group (0.91±0.10, 0.53±0.09), but the levels of the *G9a* over-expression and arsenic exposure group (15.24±1.25, 17.12±2.88) were increased compared with the arsenic exposure group (11.41±1.02, 12.59±1.38) ($P<0.05$).

[Conclusion] Arsenic can induce DNA damage and changes in the *G9a* mRNA transcription and protein expression in HaCaT cells; however, it is not certain yet whether the change of G9a is related to the mechanism of arsenic-induced DNA damage, which needs to be further studied.

Keywords: arsenic; HaCaT cell; euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2 G9a; DNA damage

砷是一种普遍存在于自然环境中的类金属，砷中毒可引起皮肤、神经、心血管、生殖等多器官、多系统的损伤，甚至可导致皮肤癌、肺癌等，其中皮肤是砷的主要靶器官[1]。有关砷致癌机理存在多种假说，但至今仍没有一种被广泛认可的学说，DNA损伤及其修复抑制会增加基因组的不稳定性和基因突变，是肿瘤发生发展过程中的重要原因[2-3]，本课题组在既往的人群和体外实验中发现砷暴露可引起DNA双键断裂损伤[4-5]。

G9a又称常染色质组蛋白赖氨酸N-甲基转移酶2（euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2，EHMT2），是常染色质上重要的组蛋白赖氨酸甲基转移酶，主要催化组蛋白H3K9单甲基化和二甲基化[6]，对基因转录具有重要调控作用，既可以通过催化组蛋白甲基化并与转录因子共同作用，进而改变组蛋白与DNA结合的紧密程度，从而调节基因的转录[7]，也可以不依赖甲基转移酶活性而通过募集转录激活子激活基因转录的功能[8]，其功能紊乱可导致胚胎发育异常[9]、认知、适应性行为[10]及神经系统发育障碍[11]等。新近研究发现G9a参与DNA损伤修复。当DNA双链断裂时，G9a磷酸化后可被招募到DNA损伤位点，促进DNA修复因子p53结合蛋白1和人乳腺癌易感蛋白1对受损DNA的修复[12]；而抑制G9a催化活性，DNA双链断裂的同源重组修复和非同源性末端接合修复能力会降低，且细胞对电离辐射的敏感性增加[12]。

人永生化皮肤角质形成细胞（HaCaT细胞）为贴壁细胞，形态为上皮细胞样，与正常皮肤角质细胞分化特性相似，是体外研究砷作用机制的有利模型，因此，本研究检测砷染毒HaCaT细胞后G9a表达水平及细胞DNA损伤情况，并分析G9a与砷致DNA损伤修复的关系，为后续砷致病机制的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 HaCaT细胞 来源于武汉大学中国典型培养物保藏中心。

1.1.2 主要试剂和仪器 胰蛋白酶、DMEM细胞培养基、胎牛血清（Gibco，美国），溴化乙锭（ethidium bromide，EB）（北京索莱宝，中国），二喹啉甲酸（bicinchoninic acid，BCA）蛋白浓度测定试剂盒（上海碧云天，中国），G9a抗体（Abcam，英国），β-actin抗体（北京博奥森，中国），山羊抗兔抗体（Proteintech，美国），Western一抗、二抗稀释液（上海碧云天，中国），MCO-15AC CO_2培养箱（Sanyo，日本），反转录试剂盒、绿色荧光核酸染料SYBR Green（北京TaKaRa，

中国），Trizol、脂质体3000转染试剂（Invitrogen，美国），$NaAsO_2$（Merck，德国）。TE2000-U+DXM 1200倒置显微镜、DS-Ri2正置荧光显微镜（Nikon，日本），HVE-50高压灭菌锅（HIRAYAMA，日本），1510全波长酶标仪（Thermo，美国），905超低温冰箱（Thermo，美国），ChemiDocTMXRS+凝胶成像系统（Bio-Rad，美国）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HaCaT细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基，于37℃、5%CO_2培养箱中培养。

1.2.2 细胞染毒 $NaAsO_2$用灭菌纯水配制成10 mmol/L的储备液，过滤除菌后分装，于-20℃保存，临用前于4℃融化，用含5%胎牛血清的DMEM培养基配制成所需浓度的应用液。将对数生长期的细胞接种于6孔板，融合度培养至80%。根据既往试验结果，10 μmol/L $NaAsO_2$染毒组HaCaT细胞活力为70%~80%[4]，故以0.00、2.50、5.00、10.00 μmol/L $NaAsO_2$染毒细胞24 h。

1.2.3 实时荧光定量PCR检测*G9a* mRNA表达水平 染毒结束后，Trizol法提取细胞总RNA，反转录试剂盒反转录合成cDNA，进行实时荧光定量反应，引物由上海杰瑞公司设计并合成，G9a序列如下：正向5'-TGATGCCACTCTGTACGACCC-3'，反向5'-AGATTGAGCCTCCGCTGATTT-3'；采用β-肌动蛋白（β-actin）进行内参校正，序列如下：正向5'-CTACCTCATGAAGATCCTCACCGA-3'，反向5'-TTCTCCTTAATGTCACGCACGATT-3'。10 μL PCR反应体系含5 μL iTaq™Universal SYBR Green supermix（2×）、10 μmol/L正反向引物各0.5 μL、cDNA 1 μL、灭菌ddH_2O 3.0 μL。实时荧光定量PCR反应条件：95℃预变性3 min，95℃变性10 s，55℃退火30 s，60℃延伸20 s，共40个循环。扩增完毕后进行熔解曲线分析，每个样本重复检测3次。根据扩增效率和循环（*Ct*）值采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算mRNA相对表达量。

1.2.4 免疫印迹法检测G9a蛋白表达水平 染毒结束后，提取细胞总蛋白，上样前用5×蛋白上样缓冲液将样品蛋白浓度调节一致，煮沸变性8 min。冷却后用SDS/PAGE上样，上层浓缩胶使用80 V恒压电泳，待样品进入分离胶，120 V恒压电泳至溴酚蓝跑至底部，冰上300 mA恒流转膜60 min，在含5%脱脂奶粉的1×TBST中室温振摇封闭2 h。取相应条带用G9a抗体（1∶1000）和β-actin抗体（1∶1000）于4℃孵育过夜。山羊抗兔IgG抗体（1∶7000）室温孵育2 h，加ECL电化学发光液进行显影，采用Imagelab软件对蛋白条带灰度值进行分析，重复试验3次。蛋白相对表达水平以目的蛋白与β-actin灰度值的比值表示。

1.2.5 pCDNA3.1-G9a质粒瞬时转染HaCaT细胞 pCDNA3.1-G9a过表达质粒由课题组自行构建，取对数生长期的细胞接种于6孔板，待细胞生长到80%，按脂质体3000转染试剂盒说明书进行转染，实验中发现10 μmol/L $NaAsO_2$致HaCaT细胞DNA损伤[4]，因此选择10.00 μmol/L浓度进行进一步的研究。采用以下5种方式处理细胞：①对照组，无任何处理的细胞；②空载体转染组，单独转染空载体pCDNA3.1；③*G9a*高表达组，单独转染pCDNA3.1-G9a质粒；④染砷组，单独10.00 μmol/L $NaAsO_2$染毒24 h；⑤*G9a*高表达联合染砷组：转染pCDNA3.1-G9a质粒24 h后，加入10.00 μmol/L $NaAsO_2$染毒24 h。

1.2.6 单细胞凝胶电泳法检测DNA损伤情况 染毒结束后，取细胞悬液20 μL制片，于预冷的新鲜配制的碱性裂解液裂解细胞2 h，电泳液中解旋25 min，25 V、300 mA条件下电泳25 min，5 μL/mL EB染色15 min，镜检拍摄图像，全程避光操作。图像采用CASP1.2.3b1软件进行分析，每组分析100个细胞，以Olive尾矩及尾部DNA百分含量作为评价DNA双链断裂程度的指标。

1.3 统计学分析

实验数据均为计量资料，用$\bar{x}\pm s$表示，SPSS 21.0统计软件进行分析。计量资料进行正态性检验及方差齐性检验，组间比较采用单因素方差分析，关联性分析采用直线回归分析，检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 $NaAsO_2$染毒对HaCaT细胞*G9a* mRNA转录和蛋白表达水平的影响

与对照组（0.00 μmol/L）比较，2.50、5.00、10.00 μmol/L $NaAsO_2$染毒处理HaCaT细胞24 h后，各组*G9a* mRNA表达水平明显降低（$P<0.05$）；G9a蛋白表达水平变化与mRNA转录水平基本一致，5.00、10.00 μmol/L染砷组G9a蛋白表达水平明显低于0.00 μmol/L组（$P<0.05$）（表1和图1）。

表1 $NaAsO_2$染毒HaCaT细胞24 h后*G9a* mRNA和蛋白表达水平

$NaAsO_2$浓度（μmol/L）	mRNA水平	蛋白表达水平
0.00（对照组）	1.00±0.00	0.60±0.09
2.50	0.87±0.04*	0.51±0.06
5.00	0.70±0.05*	0.40±0.05*
10.00	0.59±0.04*	0.29±0.06*

[注] *：与对照组比较，$P<0.05$。

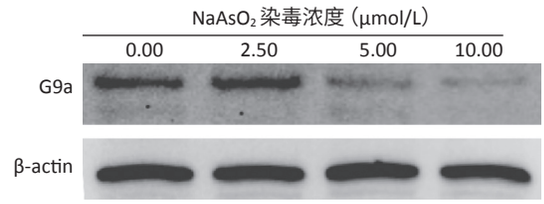
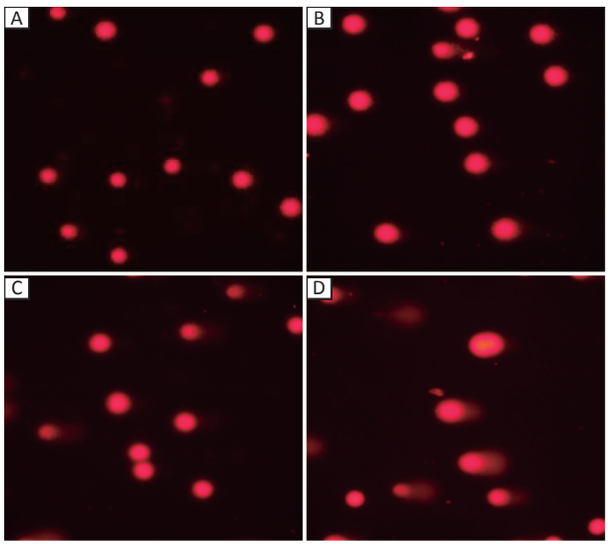


图1 不同浓度 $NaAsO_2$ 染毒 HaCaT 细胞 24 h 后 G9a 蛋白电泳图

2.2 $NaAsO_2$ 染毒对 HaCaT 细胞 DNA 损伤水平的影响

与对照组比较，2.50、5.00、10.00 μmol/L $NaAsO_2$ 组 HaCaT 细胞尾部 DNA 百分含量及 Olive 尾矩均升高（$P<0.05$）（图2、表2），且尾部 DNA 百分含量及 Olive 尾矩与 $NaAsO_2$ 浓度均呈正相关（r=0.93、0.95，均 $P<0.05$）。



[注] A：对照组；B：2.50 μmol/L $NaAsO_2$；C：5.00 μmol/L $NaAsO_2$；D：10.00 μmol/L $NaAsO_2$。

图2 $NaAsO_2$ 致 HaCaT 细胞 DNA 断裂损伤彗星图像（EB 染色，×200）

表2 $NaAsO_2$ 染毒 HaCaT 细胞 DNA 损伤水平

$NaAsO_2$ 浓度（μmol/L）	Olive 尾矩	尾部 DNA 百分含量
0.00（对照组）	0.63±0.07	1.08±0.05
2.50	3.26±0.34*	3.67±0.20*
5.00	6.79±0.66*	6.26±0.46*
10.00	13.18±2.34*	12.63±0.63*

[注] *：与对照组比较，$P<0.05$。

2.3 过表达 *G9a* 后 $NaAsO_2$ 染毒对细胞 *G9a* mRNA 和蛋白表达水平的影响

与空白对照组比较，空载体转染组的 *G9a* mRNA 水平无明显变化（$P>0.05$），*G9a* 过表达组的 *G9a* mRNA 水平明显升高（$P<0.05$），提示 *G9a* 转染效率较高。与染砷组比较，*G9a* 高表达联合染砷组的 *G9a* mRNA 水平升高（$P<0.05$）（表3）；G9a 蛋白表达水平与 mRNA 水平一致（图3）。

表3 过表达 *G9a* 基因后 $NaAsO_2$ 染毒 HaCaT 细胞 *G9a* mRNA 和蛋白表达水平

分组	mRNA 水平	蛋白表达水平
空白对照组	1.00±0.00	0.67±0.06
空载体对照组	0.98±0.11	0.71±0.06
G9a 高表达组	105.93±28.72*	1.07±0.06*
染砷组	0.57±0.08*	0.40±0.03*
G9a 高表达联合染砷组	41.80±7.14#	0.67±0.02#

[注] *：与空白对照组比较，$P<0.05$；#：与染砷组比较，$P<0.05$。

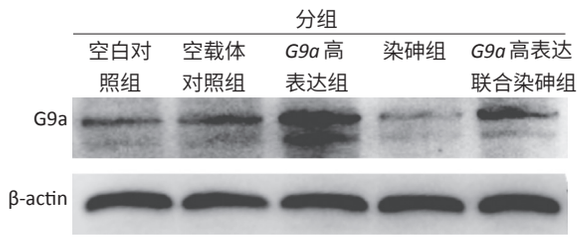
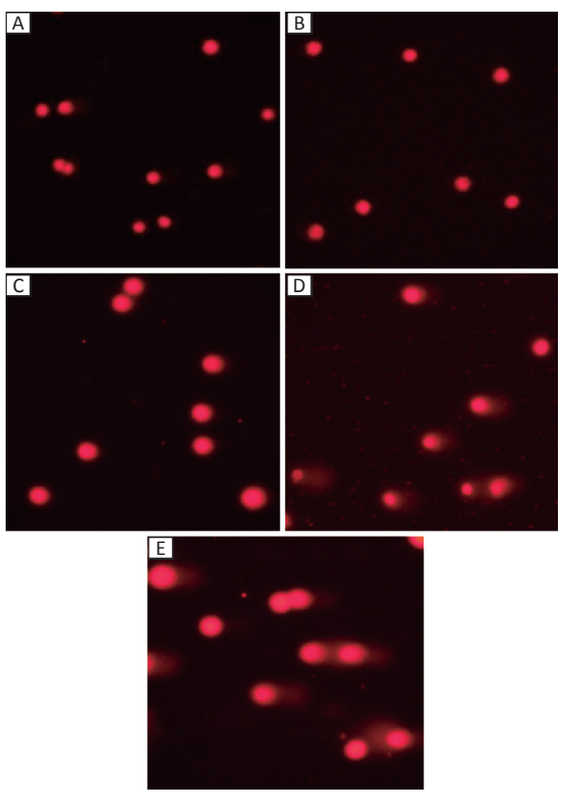


图3 高表达 *G9a* 基因后 $NaAsO_2$ 染毒 HaCaT 细胞 G9a 蛋白电泳图

2.4 高表达 *G9a* 基因对 $NaAsO_2$ 染毒 HaCaT 细胞 DNA 损伤水平的影响

与空白对照组比较，*G9a* 高表达组的细胞尾部 DNA 百分含量及 Olive 尾矩差异无明显变化（$P>0.05$）；与染砷毒组比较，*G9a* 高表达联合染砷组细胞尾部 DNA 百分含量及 Olive 尾矩明显升高（$P<0.05$）（图4、表4）。



[注] A：空白对照组；B：空载体对照组；C：*G9a* 高表达组；D：染砷组；E：*G9a* 高表达联合染砷组。

图4 高表达 *G9a* 基因后 $NaAsO_2$ 染毒 HaCaT 细胞 DNA 断裂损伤彗星图像（EB 染色，×200）

表4 高表达 *G9a* 基因后 $NaAsO_2$ 染毒 HaCaT 细胞 DNA 损伤水平

分组	Olive 尾矩	尾部 DNA 百分含量
空白对照组	0.53±0.09	0.91±0.10
空载体对照组	0.67±0.13	1.02±0.19
G9a 过表达组	0.77±0.13	1.00±0.18
染砷组	12.59±1.38*	11.41±1.02*
G9a 高表达联合染砷组	17.12±2.88#	15.24±1.25#

[注] *：与空白对照组比较，$P<0.05$；#：与染砷组比较，$P<0.05$。

3 讨论

砷是国际癌症研究中心（IARC）确认的人类致癌物，关于其致病致癌机制的探索是近年来的研究热点。随着研究的进展，发现 DNA 损伤和修复在砷毒作用机制中起重要作用，砷可以通过抑制参与 DNA 修复的蛋白酶类而导致 DNA 损伤修复的紊乱。随着砷中毒患者皮肤病变的发展，DNA 损伤修复基因 *MGMT*、*XRCC1* 和 *hMSH2* 的表达会逐渐降低[13]，用低浓度的 $NaAsO_2$ 处理 HaCaT 细胞可抑制多聚 ADP 核糖化聚合酶 -1 活性，从而干扰 DNA 损伤修复过程[14]。砷对 DNA 损伤修复过程的影响存在多种调控机制。组蛋白甲基化转移酶作为表观遗传学分子，参与多种 DNA 损伤及其修复通路[15]。G9a 作为一种重要的组蛋白甲基化转移酶，在多种组织中广泛表达。目前许多研究表明，G9a 在细胞 DNA 的损伤和修复、基因的表达调控等生物学过程中发挥重要作用[12]。

本研究用不同浓度 $NaAsO_2$ 处理 HaCaT 细胞 24 h，发现随着 $NaAsO_2$ 浓度的增加，以尾部 DNA 百分含量和 Olive 尾矩为代表的细胞 DNA 损伤水平逐渐增加，与课题组前期的砷中毒人群血液单细胞凝胶电泳结果相符[5]，*G9a* mRNA 水平和蛋白表达水平随着 $NaAsO_2$ 浓度的增加而降低，推测 $NaAsO_2$ 所致细胞 DNA 损伤可能与 G9a 有关。为进一步确定 G9a 在 $NaAsO_2$ 致细胞 DNA 损伤中的作用，本研究采用 *G9a* 高表达质粒瞬时转染 HaCaT 细胞后，发现 $NaAsO_2$ 致细胞 DNA 损伤明显增加。由于组蛋白甲基化修饰水平存在基因依赖性，所以可特异性在某些基因某些区域上富集[16]，比如细胞内维甲酸激活靶基因转录过程中伴随着增强子区组蛋白 H3.3 水平下降，启动子区组蛋白 H3.3 上升[17]。故 G9a 作为组蛋白甲基转移酶，其总体表达水平与基因特定区域表达水平可能不一致。此外，G9a 可以通过催化组蛋白 H3K9 甲基化，从而参与基因转录的调控[7]。组蛋白 H3K9 甲基化在基因启动子区是抑制基因转录的，但在编码区可促进基因表达，比如 Shankar 等[18] 发现 G9a 催化 *RUNX3*（人类 runt 相关转录因子 3）启动子区域 H3K9me2 增加，抑制了 *RUNX3* 转录；Vakoc 等[19] 发现 G9a 在小鼠的红细胞系 GIE 细胞中促进与分化有关的基因其编码区 H3K9me2 增加，从而上调了分化基因的表达，促进细胞分化。因此推测，在 $NaAsO_2$ 染毒致 HaCaT 细胞 DNA 损伤过程中，G9a 总体水平是降低的，但在 DNA 损伤修复基因启动子区 G9a 特异性升高，使 H3K9 甲基化水平增加，从而抑制修复基因的表达，增加 $NaAsO_2$ 致细胞的 DNA 损伤程度；当细胞 G9a 过表达后，DNA 损伤修复基因启动子区 H3K9 甲基化水平进一步增加，修复基因转录表达进一步降低，使 DNA 损伤程度加重。课题组正在采用定量染色质免疫沉淀技术对上述推测进行验证。

综上所述，砷可导致 HaCaT 细胞 DNA 损伤与 *G9a* mRNA 水平和蛋白表达水平的改变，但还不确定 G9a 的变化是否与砷所致 DNA 损伤机制有关联，其具体机制有待进一步深入研究。

参考文献

[1] HONG Y S，SONG K H，CHUNG J Y. Health effects of chronic arsenic exposure [J]. J Prev Med Public Health，2014，47（5）：245-252.

[2] 张爱华，王大朋. 重视地方性砷中毒机制假说间相互作用，提升机制研究及其转化应用价值 [J]. 中华地方病学杂志，2016，35（1）：1-3.

[3] ISLAM K，WANG Q，NARANMANDURA H. Molecular mechanisms of arsenic toxicity [J]. Adv. Mol Toxicol，2015，9：77-107.

[4] 谢琅，李军，李成贵，等. 组蛋白 H4K20 甲基化修饰对砷致 HaCaT 细胞 DNA 双键断裂损伤的影响 [J]. 环境与职业医学，2017，34（2）：143-147.

[5] LI J，MA L，WANG X，et al. Modifications of H3K9me2，H3K36me3 and H4K20me2 may be involved in arsenic-induced genetic damage [J]. Toxicol Res，2016，5（5）：1380-1387.

[6] ZHANG J，WANG Y，SHEN Y，et al. G9a stimulates CRC growth by inducing p53 Lys373 dimethylation-dependent activation of *Plk1* [J]. Theranostics，2018，8（10）：2884-2895.

[7] CHANG C C，WU M J，YANG J Y，et al. Leptin-STAT3-G9a signaling promotes obesity-mediated breast cancer

（下转第 505 页）

2010，29（6）：73-77.

[5] 李勇竞，郑妹凤. 固相萃取-超高效液相色谱法测定饮用水中四环素类抗生素[J]. 环境与职业医学，2016，33（6）：624-626.

[6] 朱峰，吉文亮，阮丽萍，等. 高效液相色谱-质谱联用法同时检测水体中13种β-内酰胺类药物残留[J]. 色谱，2016，34（3）：299-305.

[7] 陆克祥，隋铭皓，高乃云. 固相萃取-超高压液相色谱-串联质谱测定水中19种抗生素[J]. 分析测试学报，2010，29（12）：1209-1214.

[8] 彭凡立，吉文亮，彭丹红，等. 超高效液相色谱串联质谱检测尿液中6种环境内分泌干扰物方法的建立与应用[J]. 环境与职业医学，2016，33（5）：499-503.

[9] HERNÁNDEZ F，CALISTO-ULLOA N，GÓMEZ-FUENTES C，et al. Occurrence of antibiotics and bacterial resistance in wastewater and sea water from the Antarctic[J]. J Hazard Mater，2019，363：447-456.

[10] 岳秀英，彭莉，程江，等. 酶联免疫吸附法测定牛奶中青霉素残留的试验报告[J]. 四川畜牧兽医，2007，34（6）：27-28.

[11] 张秀尧，蔡欣欣. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法快速同时测定牛奶中53种β-内酰胺类抗生素及其代谢产物的残留[J]. 色谱，2014，32（7）：693-701.

[12] 刘洪斌，文一，刘勇军，等. LC-MS/MS法检测牛奶中14种β-内酰胺类抗生素残留[J]. 分析试验室，2014，33（2）：221-224.

[13] 生活饮用水标准检验方法 水样的采集和保存：GB/T 5750.2—2006[S]. 北京：中国标准出版社，2007.

[14] MATUSZEWSKI B K，CONSTANZER M L，CHAVEZ-ENG C M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS[J]. Anal Chem，2003，75（13）：3019-3030.

[15] KACZYŃSKI P. Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides[J]. Food Chem，2017，230：524-531.

（英文编辑：汪源；编辑：丁瑾瑜；校对：王晓宇）

（上接第500页）

progression[J]. Cancer Res，2015，75（11）：2375-2386.

[8] YANG Q，ZHU Q，LU X，et al. G9a coordinates with the RPA complex to promote DNA damage repair and cell survival[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2017，114（30）：E6054-E6063.

[9] ZYLICZ J J，DIETMANN S，GÜNESDOGAN U，et al. Chromatin dynamics and the role of G9a in gene regulation and enhancer silencing during early mouse development[J]. eLife，2015，4：e09571.

[10] MAZE I，COVINGTON III H E，DIETZ D M，et al. Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity[J]. Science，2010，327（5962）：213-216.

[11] WANG N，SHEN X，BAO S，et al. Dopaminergic inhibition by G9a/Glp complex on tyrosine hydroxylase in nerve injury-induced hypersensitivity[J]. Mol Pain，2016，12：1744806916663731.

[12] GINJALA V，RODRIGUEZ-COLON L，GANGULY B，et al. Protein-lysine methyltransferases G9a and GLP1 promote responses to DNA damage[J]. Sci Rep，2017，7（1）：16613.

[13] 张爱华，李健，潘雪莉，等. 砷中毒患者皮肤组织中DNA修复基因的表达变化[J]. 中国地方病学杂志，2005，24（2）：121-123.

[14] QIN X J，LIU W，LI Y N，et al. Poly（ADP-ribose）polymerase-1 inhibition by arsenite promotes the survival of cells with unrepaired DNA lesions induced by UV exposure[J]. Toxicol Sci，2012，127（1）：120-129.

[15] PFISTER S X，AHRABI S，ZALMAS L P，et al. SETD2-dependent histone H3K36 trimethylation is required for homologous recombination repair and genome stability[J]. Cell Rep，2014，7（6）：2006-2018.

[16] MARTIN C，ZHANG Y. The diverse functions of histone lysine methylation[J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2005，6（11）：838-849.

[17] CHEN P，ZHAO J，WANG Y，et al. H3.3 actively marks enhancers and primes gene transcription via opening higher-ordered chromatin[J]. Genes Dev，2014，27（19）：2109-2124.

[18] SHANKAR S R，BAHIRVANI A G，RAO V K，et al. G9a，a multipotent regulator of gene expression[J]. Epigenetics，2013，8（1）：16-22.

[19] VAKOC C R，MANDAT S A，OLENCHOCK B A，et al. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1γ are associated with transcription elongation through mammalian chromatin[J]. MolCell，2005，19（3）：381-391.

（英文编辑：汪源；编辑：汪源；校对：宋琪）