

亚砷酸钠对 HaCaT 细胞 DNA 甲基转移酶的影响及 N-乙酰半胱氨酸的干预效应

韩进美, 黄红茜, 李凤敏, 张爱华, 韩雪

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

摘要:

[背景] 砷暴露可致人皮肤病变, 砷所致的 DNA 甲基化改变是其主要的致病机制之一, 但砷如何引起 DNA 甲基化改变目前尚未明确。

[目的] 本研究以永生化的人皮肤角质形成细胞 (HaCaT) 为研究对象, 检测亚砷酸钠 (NaAsO₂) 暴露对 HaCaT 细胞 DNA 甲基转移酶 (DNMTs) mRNA 和蛋白表达水平的影响, 并探讨砷所致氧化应激与其所致 DNMTs mRNA 和蛋白表达水平改变之间的关联。

[方法] 给予 HaCaT 细胞不同浓度的 NaAsO₂ (0、0.625、1.25、2.50 μmol·L⁻¹) 处理, 干预组给予 10.0 μmol·L⁻¹ 抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 预处理 4 h 后加入 2.50 μmol·L⁻¹ NaAsO₂, 染毒时间为 72 h。应用免疫荧光法检测细胞活性氧 (ROS) 含量, 生化法检测细胞内丙二醛 (MDA) 含量, 实时荧光定量 PCR 法检测细胞 DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b mRNA 水平, Western blotting 法检测 DNMTs 蛋白水平。

[结果] 不同浓度 NaAsO₂ 处理 HaCaT 细胞 72 h 后, HaCaT 细胞 ROS 含量、MDA 水平随染毒浓度的增加而升高 ($F_{趋势}=441.675, P<0.001$; $F_{趋势}=22.430, P=0.012$); 1.25、2.50 μmol·L⁻¹ 浓度组 DNMT1 mRNA 及蛋白表达水平均高于对照组 ($P<0.05$)。随染毒浓度的增加, DNMT1 mRNA 及蛋白表达水平升高 ($F_{趋势}=30.280, P=0.001$; $F_{趋势}=40.421, P<0.001$), DNMT3a mRNA 及蛋白表达水平降低 ($F_{趋势}=226.283, P<0.001$; $F_{趋势}=30.848, P=0.001$), DNMT3b 蛋白表达水平升高 ($F_{趋势}=15.095, P=0.005$); 各染毒组 DNMT3b mRNA 表达水平与对照组相比, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。NAC 处理后, 与 2.50 μmol·L⁻¹ NaAsO₂ 单独处理组相比, HaCaT 细胞 ROS 含量、MDA 水平、DNMT1 mRNA 和蛋白表达水平均降低 ($P<0.05$), DNMT3a mRNA 及蛋白水平无明显改变 ($P>0.05$), DNMT3b 蛋白水平降低 ($P<0.05$), mRNA 水平无明显改变 ($P>0.05$)。

[结论] NaAsO₂ 可改变 HaCaT 细胞 DNMTs mRNA 及蛋白表达水平, 这种变化可能与砷所致的氧化应激有关。

关键词: 亚砷酸钠; HaCaT 细胞; 氧化应激; DNA 甲基转移酶

Effects of sodium arsenite on DNA methyl transferases and antagonistic effects of N-acetylcystein in HaCaT cells HAN Jin-mei, HUANG Hong-qian, LI Feng-min, ZHANG Ai-hua, HAN Xue (Key Laboratory of Environment Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education/School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract:

[Background] Exposure to arsenic can cause skin lesions in humans. DNA methylation changes caused by arsenic are one of its pathogenic mechanisms, but how arsenic causes DNA methylation changes is not yet clear.

[Objective] This study aims to investigate the effects of sodium arsenite (NaAsO₂) exposure on DNA methyl transferases (DNMTs) mRNA and protein expression levels of immortalized human keratinocytes (HaCaT), and to explore the associations between oxidative stress induced by arsenic and the changes in DNMTs mRNA and protein expression levels.

[Methods] HaCaT cells were treated with NaAsO₂ (0, 0.625, 1.25, and 2.50 μmol·L⁻¹, respectively); HaCaT cells were pretreated with antioxidant N-acetylcystein (NAC) 10.0 μmol·L⁻¹ for 4 h, and then treated with 2.50 μmol·L⁻¹ NaAsO₂ for 72 h. Immunofluorescence method was used to detect the content of reactive oxygen species (ROS), biochemical method was used to detect the content of malondialdehyde (MDA), real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the DNMT1,

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19698

基金项目

国家自然科学基金项目 (U1812403, 81302394)

作者简介

韩进美 (1992—), 女, 硕士生;
E-mail: 1074863505@qq.com

通信作者

韩雪, E-mail: hanxueshiqi@163.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-10-12

录用日期 2019-12-13

文章编号 2095-9982(2020)03-0205-06

中图分类号 R14

文献标志码 A

引用

韩进美, 黄红茜, 李凤敏, 等. 亚砷酸钠对 HaCaT 细胞 DNA 甲基转移酶的影响及 N-乙酰半胱氨酸的干预效应 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (3): 205-210.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19698

Funding

This study was funded.

Correspondence to

HAN Xue, E-mail: hanxueshiqi@163.com

Competing interests None declared

Received 2019-10-12

Accepted 2019-12-13

To cite

HAN Jin-mei, HUANG Hong-qian, LI Feng-min, et al. Effects of sodium arsenite on DNA methyl transferases and antagonistic effects of N-acetylcystein in HaCaT cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(3): 205-210.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19698

DNMT3a, and *DNMT3b* mRNA expression levels, and Western blotting was used to detect the DNMTs protein expression levels in HaCaT cells.

[Results] After 72 h of NaAsO₂ treatment, the ROS and MDA levels in HaCaT cells increased with higher dose ($F_{\text{trend}}=441.675$, $P<0.001$; $F_{\text{trend}}=22.430$, $P=0.012$); *DNMT1* mRNA and protein expression levels in HaCaT cells in the 1.25 and 2.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups were higher than those in the control group ($P<0.05$). With the increase of NaAsO₂ dose, *DNMT1* mRNA and protein expression levels in HaCaT cells increased ($F_{\text{trend}}=30.280$, $P=0.001$; $F_{\text{trend}}=40.421$, $P<0.001$), *DNMT3a* mRNA and protein expression levels decreased ($F_{\text{trend}}=226.283$, $P<0.001$; $F_{\text{trend}}=30.848$, $P=0.001$), *DNMT3b* protein expression level increased ($F_{\text{trend}}=15.095$, $P=0.005$), and there was no significant difference in the *DNMT3b* mRNA expression level between the NaAsO₂ treatment groups and the control group ($P>0.05$). After NAC treatment, ROS content, MDA level, and *DNMT1* mRNA and protein expression levels in HaCaT cells decreased significantly compared with the 2.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ group ($P<0.05$); *DNMT3a* mRNA and protein expression levels did not change significantly ($P>0.05$); *DNMT3b* protein expression level decreased significantly ($P<0.05$), and its mRNA expression level did not change significantly ($P>0.05$).

[Conclusion] NaAsO₂ can change the mRNA and protein expression levels of DNMTs in HaCaT cells, and these changes may be related to the oxidative stress induced by arsenic.

Keywords: sodium arsenite; HaCaT cell; oxidative stress; DNA methyltransferase

砷(As)是自然界中分布广泛的类金属物质。无机砷尤其是三价砷(As³⁺),毒性更大并具有致癌性,是人类癌症的环境病因之一^[1]。长期接触砷污染的饮用水或燃烧含砷煤可导致砷中毒,皮肤病变是砷中毒患者最常见的症状,其典型病变包括色素沉着、色素脱失、角化过度,严重者甚至出现鳞状细胞癌和基底细胞癌^[2]。无机砷暴露所引起的DNA甲基化模式改变与砷所致多种疾病的发生发展密切相关^[2-3],但砷通过何种途径改变DNA甲基化模式,目前还不得而知^[4]。

DNA甲基化主要依赖DNA甲基转移酶(DNA methyl transferase, DNMTs)的催化。哺乳动物中DNMTs主要分为两大类:DNA甲基化维持酶DNMT1,以及DNA从头甲基化酶DNMT3a、DNMT3b等。DNMT1可在DNA复制期间将先前存在的甲基标记复制到半甲基化的子链上,维持已建立的甲基化模式;DNMT3a、DNMT3b则负责将甲基转移到未甲基化的DNA上^[5]。DNMTs异常表达可在砷所致多种肿瘤中检测到,然而其建立机制尚未阐明。有研究表明,活性氧(reactive oxygen species, ROS)可通过影响DNMTs的表达或形成新的DNMT-复合物,引起基因特定位点异常高甲基化^[6-8]。慢性砷暴露可致机体内ROS增多,引起机体抗氧化系统失衡,诱导氧化应激,破坏机体的生理过程^[9-10]。砷是否通过诱导ROS生成进而影响DNMTs的表达,目前尚不清楚。

本研究以As³⁺的主要靶细胞——人角质形成细胞(human keratinocyte, HaCaT)为研究对象,检测亚砷酸钠(sodium arsenite, NaAsO₂)暴露对永生化的HaCaT氧化应激、DNMTs表达改变的影响,并探讨氧化应激在其中是否发挥作用,为砷中毒机制研究提供

资料和依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

NaAsO₂、N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)、2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐(2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)(美国Sigma),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、RPMI-1640培养基(美国Gibco),细胞微量丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(中国南京建成生物工程研究所),TRIzol试剂(美国Invitrogen),逆转录实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, RT-PCR)相关试剂(日本TaKaRa),Western blotting电泳相关试剂(中国碧云天公司),内参 β -actin(中国武汉三鹰生物有限公司),DNMT1、DNMT3b(美国Immunoway),DNMT3a(英国Abcam);无菌操作台、二氧化碳恒温培养箱、倒置(荧光)显微镜、全自动酶标仪(美国Thermo),实时荧光定量PCR仪(美国Eppendorf)。

1.2 细胞培养与染毒

1.2.1 细胞培养 HaCaT细胞购买于武汉大学中国典型培养物保藏中心,将其常规培养于含10%FBS的PIR-1640完全培养基,置于37℃、5%(体积分数)CO₂恒温培养箱中培养,使其充分贴壁后,更换新鲜培养基。当细胞生长至85%~95%时,胰酶消化传代。

1.2.2 染毒浓度选择 根据参考文献[11],预实验采用终浓度为0、0.625、1.25、2.5、5、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaAsO₂分别处理细胞72 h,通过CCK-8法检测细胞相对活力。低浓度的NaAsO₂(0.625、1.25、2.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理72 h对HaCaT细胞没有明显的毒性作用,故本次实验给予0、0.625、1.25、2.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂作用

HaCaT 细胞 72 h。

1.3 NAC 抗氧化处理

不同浓度 NaAsO_2 染毒细胞 72 h 后, $2.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组 DNMTs 表达改变最明显, 故选择此浓度进行干预: $10.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAC 预处理 4 h 后, 加入 $2.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO_2 继续作用 72 h, 同时设立正常对照组、单独 NAC 处理组 ($10.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAC), 按常规培养后进行指标检测。

1.4 ROS 检测

将 HaCaT 细胞接种于 6 孔板后常规培养, 根据参考文献 [12] 及预实验结果, 处理结束后更换新鲜无血清培养基稀释荧光探针 (DCFH-DA 终浓度: $10.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 后, 置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 恒温培养箱中避光孵育 30 min, 用荧光显微镜拍照观察, 通过 Image J 软件分析各组荧光亮度。

1.5 MDA 检测

根据 MDA 测定试剂盒说明书检测各组细胞内 MDA 含量。

1.6 RT-PCR 法检测 DNMTs mRNA 表达

根据 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b、 β -actin 基因的 mRNA 序列, 设计特异性引物, 由上海生工生物工程公司合成, 引物序列如表 1。收集处理好的细胞, PBS 洗 3 遍, 根据 TRIzol 说明书提取总 RNA 后, 逆转录合成 cDNA, 将逆转录产物与特异性引物进行 PCR 扩增, 反应终体系为 $25 \mu\text{L}$, 具体体系如下: cDNA $1 \mu\text{L}$, 正向、反向引物各 $0.5 \mu\text{L}$, SYBR $12.5 \mu\text{L}$, 双蒸水 (ddH_2O) $10.5 \mu\text{L}$; 95°C 预变性 2 min; 95°C 变性 10 s; 59.0°C 退火 20 s; 72°C 延伸 30 s, 40 个循环; 72°C 延伸 10 s。反应结束后, 用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测条带。

表 1 DNMTs、 β -actin 基因 RT-PCR 反应引物

Table 1 Sequences for primers of DNMTs and β -actin used for RT-PCR

引物名称 (Primer)	引物序列 (Primer sequence, 5'-3')
DNMT1	F: CCAAGCTCCGGACCTGGATGTGT
	R: TGACACCATCTGTTCTTCAGCTTCAC
DNMT3a	F: CGAGGCCGGTAGTAGTCACAGTAG
	R: GCACCTATGGGCTGCTGCGAAGACG
DNMT3b	F: CTGCCTCAATCACCAGGTCGATTG
	R: CAAGGAGGGGACAACCGTCCTT
β -actin	F: GAGCGGGAAATCGTCCGTGACATT
	R: GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG

1.7 Western blotting 检测 DNMTs 蛋白表达

采用超声破碎从 HaCaT 细胞中提取总蛋白, 用聚

丙烯酰胺凝胶电泳, 转移到聚偏二氟乙烯膜。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 于适当浓度的一抗中 4°C 孵育过夜。次日于 2.5% 脱脂奶粉配制的二抗 ($1:8000$) 室温孵育 2 h, 然后用电化学发光 (ECL) 试剂盒进行曝光检测。通过 Image Lab 软件分析 DNMTs 蛋白表达的相对亮度, 测定其灰度值, 以样本值和内参 β -actin 表达量的比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.8 统计学分析

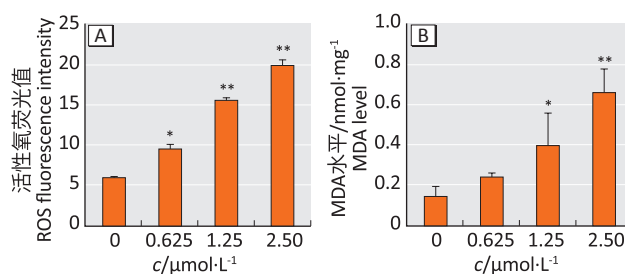
用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA), 进一步采用 LSD-t 检验进行两两比较, 采用趋势检验检测量效关系。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 NaAsO_2 的毒性效应

2.1.1 ROS 荧光探针 DCFH-DA 检测 ROS 发现, 对照组荧光亮度微弱, 不同浓度 NaAsO_2 处理组荧光亮度均增加, 与对照组相比差异均有统计学意义 ($t=-0.755$, $P=0.001$; $t=-20.832$, $P<0.001$; $t=-30.224$, $P<0.001$); 趋势检验结果显示, ROS 表达水平呈浓度依赖性改变 ($F_{\text{趋势}}=441.675$, $P<0.001$)。见图 1A。

2.1.2 MDA 与对照组相比, 1.25 、 $2.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO_2 染毒组 MDA 水平升高 ($t=5.854$, $P=0.001$; $t=7.933$, $P<0.001$), 且随着染毒浓度的增加, 细胞 MDA 水平逐渐升高 ($F_{\text{趋势}}=22.430$, $P=0.012$)。见图 1B。



[注] 与对照组比较, * : $P<0.05$; ** : $P<0.001$ 。

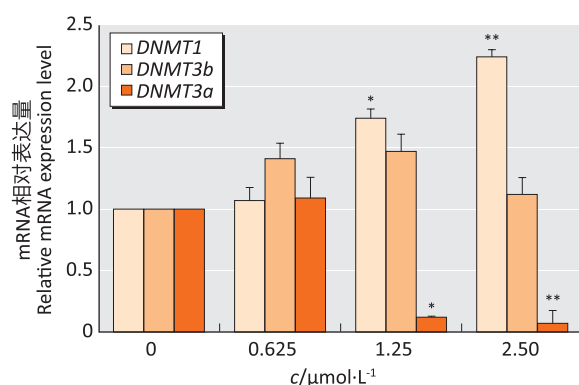
[Note] Compared with the control group, * : $P<0.05$; ** : $P<0.001$.

图 1 不同浓度 NaAsO_2 处理 HaCaT 细胞 72 h 后 ROS (A)、MDA (B) 水平

Figure 1 ROS (A) and MDA (B) levels in HaCaT cells treated with different concentrations of NaAsO_2 for 72 h

2.1.3 DNMTs 基因 mRNA 不同浓度 NaAsO_2 处理 HaCaT 细胞 72 h 后, 与对照组比较, 1.25 、 $2.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO_2 染毒组 DNMT1 mRNA 表达增加 ($t=-3.13$, $P=0.012$; $t=-5.170$, $P=0.001$); 进一步趋势检验结果显示, DNMT1 mRNA 表达随染毒浓度的增加而升高 ($F_{\text{趋势}}=30.280$,

$P=0.001$)。DNMT3a mRNA 表达随 NaAsO₂ 染毒浓度的增加表现为先升高后降低 ($F_{趋势}=226.283$, $P<0.001$), 在 NaAsO₂ 为 $0.625 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时表达最高, 但与对照组相比, 差异无统计学意义 ($t=-0.600$, $P=0.565$), 1.25 、 $2.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 染毒组 DNMT3a mRNA 表达明显低于对照组 ($t=5.409$, $P=0.001$; $t=5.714$, $P<0.001$)。各组 DNMT3b mRNA 表达量差异无统计学意义 ($F=1.259$, $P=0.354$)。见图 2。



[注] 与对照组比较, * : $P<0.05$; ** : $P<0.001$ 。

[Note] Compared with the control group, * : $P<0.05$; ** : $P<0.001$ 。

图2 不同浓度 NaAsO₂ 处理 HaCaT 细胞 72 h 后 DNMTs 基因 mRNA 相对表达量

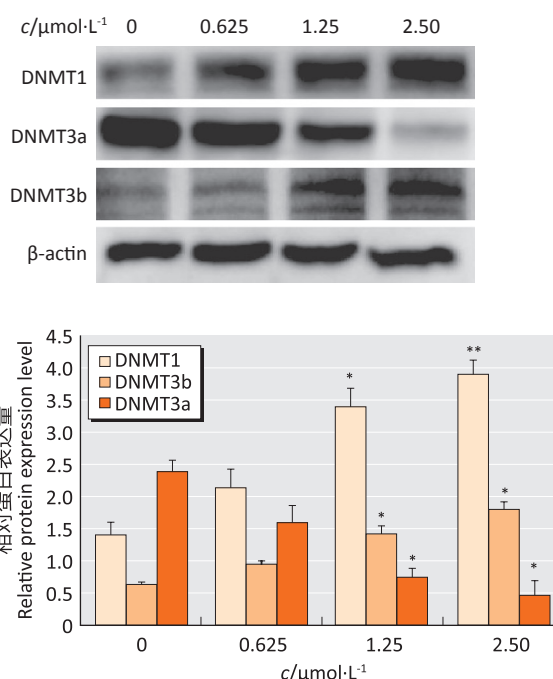
Figure 2 DNMTs relative mRNA expression levels in HaCaT cells treated with different concentrations of NaAsO₂ for 72 h

2.1.4 DNMTs 蛋白 Western blotting 结果显示, HaCaT 细胞经 NaAsO₂ 处理 72 h 后, 与对照组相比, 1.25 、 $2.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 染毒组 DNMT1、DNMT3b、DNMT3a 蛋白表达水平均发生改变, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 进一步趋势检验结果显示, DNMT1、DNMT3b 蛋白表达水平随染毒浓度的增加逐渐升高 ($F_{趋势}=40.421$, $P<0.001$; $F_{趋势}=15.095$, $P=0.005$), 而 DNMT3a 蛋白表达水平随着染毒浓度的增加而降低 ($F_{趋势}=30.848$, $P=0.001$)。见图 3。

2.2 NAC 的干预效应

2.2.1 ROS DCFH-DA 探针检测结果显示, 与 $2.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 单独处理组相比, $10.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAC 预处理组细胞内荧光亮度降低, 差异有统计学意义 ($t=27.718$, $P<0.001$), 单独 NAC 处理组与对照组比较, 差异无统计学意义 ($t=1.878$, $P=0.133$)。见图 4A。

2.2.2 MDA 与 $2.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 单独处理组相比, NAC 预处理组 MDA 水平降低 ($t=7.421$, $P=0.026$), 单独 NAC 处理组与对照组相比, 差异无统计学意义 ($t=2.253$, $P=0.265$)。见图 4B。

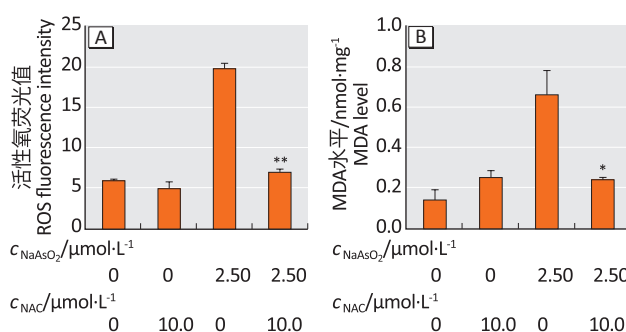


[注] 与对照组比较, * : $P<0.05$; ** : $P<0.001$ 。

[Note] Compared with the control group, * : $P<0.05$; ** : $P<0.001$ 。

图3 不同浓度 NaAsO₂ 处理 HaCaT 细胞 72 h 后 DNMTs 蛋白表达

Figure 3 DNMTs protein expression levels in HaCaT cells treated with different concentrations of NaAsO₂ for 72 h



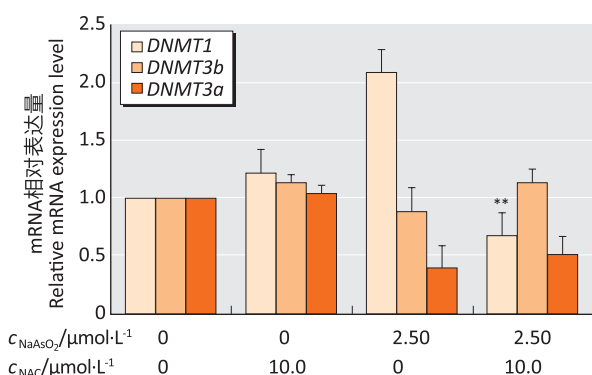
[注] * : 与 $2.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 单独处理组比较, $P<0.05$ 。

[Note] * : Compared with the $2.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ group, $P<0.05$ 。

图4 NAC 预处理对 NaAsO₂ 致 HaCaT 细胞 ROS (A)、MDA (B) 表达的影响

Figure 4 ROS (A) and MDA (B) levels in HaCaT cells induced by NaAsO₂ and NAC pretreatment

2.2.3 DNMTs 基因 mRNA 及蛋白 与单独 NaAsO₂ $2.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 染毒组相比: NAC 预处理组 DNMT1 基因 mRNA 表达水平降低 ($t=8.801$, $P=0.000$), DNMT3a、DNMT3b mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($t=0.117$, $P=0.558$; $F=2.122$, $P=0.176$) (图 5); DNMT1、DNMT3b 蛋白水平均降低 ($t=10.827$, $P<0.001$; $t=9.276$, $P<0.001$)。各组 DNMT3a 蛋白水平无明显改变 ($F=1.149$, $P=0.387$) (图 6)。

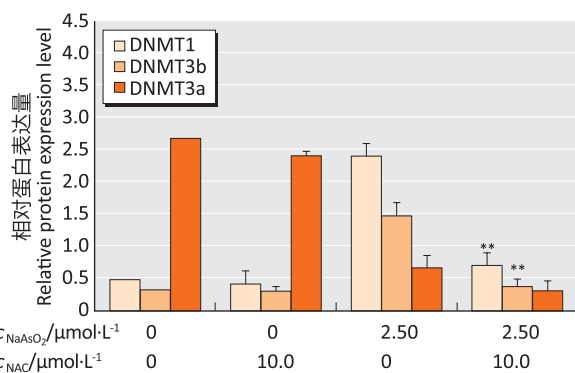
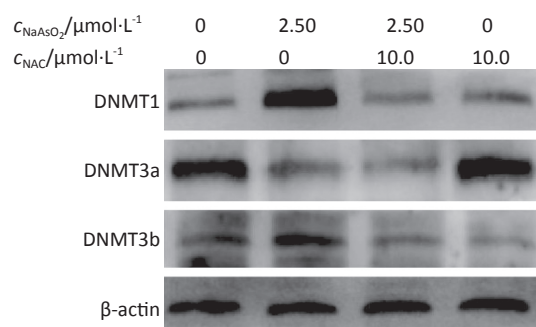


[注] **: 与单独 2.50 μmol·L⁻¹ NaAsO₂ 处理组比较, $P < 0.001$ 。

[Note] **: Compared with the 2.50 μmol·L⁻¹ NaAsO₂ group, $P < 0.001$.

图5 NAC预处理对NaAsO₂致HaCaT细胞DNMTs基因mRNA表达改变的影响

Figure 5 DNMTs mRNA expression levels in HaCaT cells induced by NaAsO₂ and NAC pretreatment



[注] **: 与单独 2.50 μmol·L⁻¹ NaAsO₂ 处理组比较, $P < 0.001$ 。

[Note] **: Compared with the 2.50 μmol·L⁻¹ NaAsO₂ group, $P < 0.001$.

图6 NAC对NaAsO₂致HaCaT细胞DNMTs蛋白表达水平变化的影响

Figure 6 DNMTs protein expression levels in HaCaT cells induced by NaAsO₂ and NAC pretreatment

3 讨论

DNMTs是参与DNA甲基化进程的主要酶,其表达异常可引起基因(组)DNA甲基化状态发生紊乱,从而影响基因及基因组的稳定性。探讨砷通过何种途径介导DNMTs发生改变,对进一步揭示砷致DNA甲基化发生机制有着重要意义。

DNMTs表达水平升高被认为是引起抑癌基因启动子区发生高甲基化的主要原因之一,其中DNMT1与一些抑癌基因的甲基化程度密切相关^[13]。DNMT1作为维持甲基化状态的关键酶,在S期与DNA复制位点保持新合成链DNA甲基化状态有关,在G2、M期则主要通过染色质结合,维持已建立的甲基化模式。Rhee等^[14]通过构建DNMT1^{-/-}、DNMT3b^{-/-} HCT116细胞系发现,同时靶向干扰DNMT1与DNMT3b可抑制p16基因表观遗传沉默,提示DNMT1与DNMT3b在人类肿瘤细胞中可协同维持DNA甲基化参与调控基因沉默。Kim等^[15]利用基因敲除技术发现,在DNMT3a基因存在的情况下,同时敲除DNMT1、DNMT3b对目的基因DNA甲基化的影响更胜于单一的敲除。在本研究中,经NaAsO₂处理可致HaCaT细胞DNMT1及DNMT3b蛋白表达水平上调,同时DNMT3a蛋白表达水平降低,提示NaAsO₂诱导的DNMTs蛋白表达变化是砷所致甲基化改变的原因之一。但本研究中DNMT3b mRNA及蛋白水平表达并不完全一致,可能是由于真核基因表达的转录和翻译发生时间和位点存在时空间隔,其次在转录后又有转录后加工、转录产物降解、翻译、翻译后加工及修饰等,具体DNMT3b基因转录及翻译水平不完全一致的原因还需进一步的研究予以揭示。

本课题组前期研究发现,燃煤污染型病区人群尿砷水平与尿中8-羟基鸟嘌呤水平呈正相关;同时,尿中8-羟基鸟嘌呤水平还与p53、p16基因启动子区某些CpG位点的甲基化水平呈正相关,提示砷所致的氧化应激过程可能参与了砷介导的抑癌基因p53、p16基因的异常甲基化过程^[16]。已有研究表明,ROS自由基的产生与诸多外源化学物所致的DNMTs改变有密切的关系。ROS介导的DNMTs特别是DNMT1表达上调可能是由于ROS家族成员超氧阴离子诱导ras等途径激活,导致DNMT1基因启动子激活,从而介导DNMT1基因表达上调^[17-19]。本研究发现,经NaAsO₂处理的HaCaT细胞出现ROS、MDA表达水平升高,以及DNMT1和DNMT3b蛋白表达水平升高,此改变可被抗氧化剂NAC阻断。NAC含有活跃的-SH基,可以通过增加细胞内谷胱甘肽含量从而降低细胞氧化应激损伤,并可清除ROS的生成、抑制氧化应激相关通路等^[6, 20-21]。以上结果提示NaAsO₂所致的ROS生成和氧化应激可能参与了砷所致DNMT1、DNMT3b表达改变。但在本实验条件下,抗氧化剂NAC处理后,

DNMT3a mRNA与蛋白水平均未发生明显改变,提示砷可通过多种途径调节*DNMTs*的转录和表达,但其具体机制还有待进一步研究。

综上,在一定浓度下,NaAsO₂可影响HaCaT细胞*DNMTs*的转录与翻译,即NaAsO₂可致HaCaT细胞*DNMT1* mRNA和蛋白表达水平升高,*DNMT3b*蛋白表达水平升高,*DNMT3a* mRNA和蛋白表达水平降低,且经NAC抗氧化处理后,*DNMT1* mRNA和蛋白表达水平、*DNMT3b*蛋白表达水平降低,这种改变可能与砷所致的氧化应激有关。

参考文献

- [1] 张爱华. 砷与健康[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 1-8.
- [2] ZHOU Q, XI S. A review on arsenic carcinogenesis: epidemiology, metabolism, genotoxicity and epigenetic changes [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2018, 99: 78-88.
- [3] CHANDA S, DASGUPTA UB, 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.
- [4] BARAJAS-OLMOS FM, ORTIZ-SÁNCHEZ E, IMAZ-ROSSHANDLER I, et al. Analysis of the dynamic aberrant landscape of DNA methylation and gene expression during arsenic-induced cell transformation [J]. Gene, 2019, 711: 143941.
- [5] BHUTANI N, BURNS DM, BLAU HM. DNA demethylation dynamics [J]. Cell, 2011, 146 (6): 866-872.
- [6] ZHOU W, TIAN D, HE J, et al. Repeated PM_{2.5} exposure inhibits BEAS-2B cell P53 expression through ROS-Akt-DNMT3B pathway-mediated promoter hypermethylation [J]. Oncotarget, 2016, 7 (15): 20691-20703.
- [7] WU Q, NI X. ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis [J]. Curr Drug Targets, 2015, 16 (1): 13-19.
- [8] O'HAGAN HM, WEI W, SEN S, et al. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG islands [J]. Cancer Cell, 2011, 20 (5): 606-619.
- [9] ZHOU J, CI X, MA X, et al. Pterostilbene activates the Nrf2-dependent antioxidant response to ameliorate arsenic-induced intracellular damage and apoptosis in human keratinocytes [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 497.
- [10] FLORA SJ. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 51 (2): 257-281.
- [11] 张洁, 木晓丽, 王晓雪, 等. 砷对DNA甲基化影响的研究进展 [J]. 环境与健康杂志, 2014, 31 (3): 269-276.
- [12] MA L, LI J, ZHAN Z, et al. Specific histone modification responds to arsenic-induced oxidative stress [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2016, 302: 52-61.
- [13] 黄滔, 周兴路, 毛曦轲, 等. DNA甲基化基因*DNMT1*的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27 (14): 2595-2600.
- [14] RHEE I, BACHMAN KE, PARK BH, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells [J]. Nature, 2002, 416 (6880): 552-556.
- [15] KIM GD, NI J, KELESOGU N, et al. Co-operation and communication between the human maintenance and *de novo* DNA (cytosine-5) methyltransferases [J]. EMBO J, 2002, 21 (15): 4183-4195.
- [16] 韩雪, 马璐, 李军, 等. 砷致氧化损伤与*p53*和*p16*基因启动子区甲基化的关联研究 [J]. 环境与健康杂志, 2017, 34 (7): 565-568.
- [17] CAMPOS AC, MOLOGNONI F, MELO FH, et al. Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation [J]. Neoplasia, 2007, 9 (12): 1111-1121.
- [18] VAZ M, HWANG SY, KAGIAMPAKIS I, et al. Chronic cigarette smoke-induced epigenomic changes precede sensitization of bronchial epithelial cells to single-step transformation by *KRAS* mutations [J]. Cancer Cell, 2017, 32 (3): 360-376.e6.
- [19] MACLEOD AR, ROULEAU J, SZYF M. Regulation of DNA methylation by the Ras signaling pathway [J]. J Biol Chem, 1995, 270 (19): 11327-11337.
- [20] DING N, MILLER SA, SAVANT SS, et al. JAK2 regulates mismatch repair protein-mediated epigenetic alterations in response to oxidative damage [J]. Environ Mol Mutagen, 2019, 60 (4): 308-319.
- [21] 王惠惠, 朱佳玉, 陈锋, 等. 抗氧化剂对砷诱导人膀胱上皮细胞氧化应激相关通路的影响 [J]. 环境与健康杂志, 2016, 33 (3): 198-201.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 汪源)