

组蛋白 H3K36me3 在砷致大鼠肝氧化损伤中的作用

吕佳鑫^{a, b}, 马璐^{a, b}, 张爱华^{a, b}

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. 公共卫生学院毒理学系, 贵州 贵阳 550025

摘要:

[背景] 环境污染物致机体健康损害是国内外学者关注的焦点, 组蛋白 H3 第 36 位赖氨酸三甲基 (H3K36me3) 作为砷暴露敏感的表观遗传修饰靶点之一, 其介导的砷致肝损害机制研究目前尚不清楚。

[目的] 探讨砷暴露大鼠肝脏组蛋白 H3K36me3 修饰水平与砷致肝氧化损伤的关系, 从表观遗传学角度为深化认识砷致肝氧化损伤机制及其干预研究提供新思路。

[方法] 32 只健康初断乳 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 按体重采用随机数字表法分为对照组, 低、中、高染砷剂量组, 每组 8 只。大鼠亚砷酸钠半数致死量 (LD_{50}) 为 $41 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 按照亚慢性毒性试验剂量设计原则, 低、中、高染砷组分别给予 2.5 ($1/16 LD_{50}$)、 5.0 ($1/8 LD_{50}$)、 10.0 ($1/4 LD_{50}$) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以体重计, 后同) 亚砷酸钠溶液, 对照组给予去离子水, 灌胃染毒, 灌胃量为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每周连续染毒 6 d, 共处理 4 个月。实验终期采集大鼠尿样、肝脏样本。采用电感耦合等离子质谱 (ICP-MS) 检测肝脏中砷的质量分数, 酸抽提法提取大鼠肝脏组蛋白, 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测肝脏中 H3K36me3 的质量分数, 超高效液相色谱 - 串联四级杆质谱 (UPLC-MS/MS) 检测尿 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 的质量浓度, 硫代巴比妥酸法 (TBA 法) 检测肝脏丙二醛 (MDA) 的质量摩尔浓度。分析肝砷、H3K36me3、8-OHdG、MDA 之间的线性相关关系, 并建立“肝砷—H3K36me3—8-OHdG/MDA”中介检验模型以探索 H3K36me3 在砷致肝氧化损伤中的中介作用。

[结果] 低、中、高砷剂量组肝砷、尿 8-OHdG、肝 MDA 水平分别高于对照组, 而肝 H3K36me3 水平低于对照组 (均 $P < 0.05$) ; 且随染砷剂量的增加, 肝砷、尿 8-OHdG 和肝 MDA 水平逐渐升高, H3K36me3 修饰水平逐渐降低 ($P_{\text{趋势}} < 0.01$)。相关性分析也显示肝砷水平与尿 8-OHdG、肝 MDA 水平呈正相关 ($r=0.701$ 、 0.748 , 均 $P < 0.01$), 与肝 H3K36me3 修饰水平呈负相关 ($r=-0.715$, $P < 0.01$) ; 肝 H3K36me3 修饰水平与尿 8-OHdG、肝 MDA 水平呈负相关 ($r=-0.660$ 、 -0.683 , 均 $P < 0.01$) ; 尿中 8-OHdG 水平与肝中 MDA 水平呈正相关 ($r=0.778$, $P < 0.01$)。H3K36me3 在砷致 8-OHdG 和 MDA 水平的中介效应分别占总效应的 30.97%、38.91%。

[结论] 砷致大鼠肝脏 H3K36me3 水平降低可能参与肝氧化损伤的调控, H3K36me3 有望是砷致肝氧化损伤机制研究的新靶点。

关键词: 砷 ; 大鼠 ; 肝脏 ; H3K36me3 ; 氧化损伤

Role of histone H3K36me3 in hepatic oxidative damage induced by arsenic in rats LYU Jiaxin^{a, b}, MA Lu^{a, b}, ZHANG Aihua^{a, b} (a.Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education b.Department of Toxicology, School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract:

[Background] Environmental pollutants can cause human health damage, which has become a research focus of domestic and foreign scholars. Histone H3 lysine 36 trimethylation (H3K36me3) is one of the sensitive targets of epigenetic modification due to arsenic exposure, and the mechanism of arsenic induced liver damage is still unclear.

[Objective] This experiment evaluates the association of H3K36me3 and hepatic oxidative damage induced by arsenic in rats, providing an epigenetic understanding of the mechanism and intervention of arsenic induced liver oxidative damage from the perspective of epigenetics.

[Methods] Thirty-two healthy weaned Wistar rats were randomly divided into a control group and three arsenic groups (low, medium, and high dose groups), with eight rats in each group. The

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20542

基金项目

国家自然科学基金项目 (81430077, 81703176, U1812403)

作者简介吕佳鑫 (1995—), 女, 硕士生;
E-mail : 752834770@qq.com**通信作者**

张爱华, E-mail : aihiagzykd@163.com

伦理审批 已获取**利益冲突** 无申报**收稿日期** 2020-11-18**录用日期** 2021-04-15

文章编号 2095-9982(2021)06-0637-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

▶引用

吕佳鑫, 马璐, 张爱华. 组蛋白 H3K36me3 在砷致大鼠肝氧化损伤中的作用 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38 (6) : 637-642.

▶本文链接www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20542**Funding**

This study was funded.

Correspondence to

ZHANG Aihua, E-mail: aihiagzykd@163.com

Ethics approval Obtained**Competing interests** None declared**Received** 2020-11-18**Accepted** 2021-04-15**▶To cite**

LYU Jiaxin, MA Lu, ZHANG Aihua. Role of histone H3K36me3 in hepatic oxidative damage induced by arsenic in rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(6): 637-642.

▶Link to this articlewww.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20542

median lethal dose (LD_{50}) of sodium arsenite in rats was $41\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. According to the principle of dose design for subchronic toxicity test, the three arsenic dose groups were given 2.5 ($1/16 LD_{50}$), 5.0 ($1/8 LD_{50}$), and 10.0 ($1/4 LD_{50}$) $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (calculated by body weight, thereafter) sodium arsenite solution respectively. The rats in the control group were given $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ deionized water by intragastric administration, 6 d a week. After 4 months, urine and liver tissue samples were collected. The content of arsenic in liver was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Histone was extracted from the liver of rats by acid extraction, and the modification level of H3K36me3 was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The level of urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) was tested by the ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The content of liver malondialdehyde (MDA) was determined by thiobarbituric acid (TBA) method. The linear relationships between liver arsenic, H3K36me3, 8-OHdG, and MDA were evaluated. A “liver arsenic-H3K36me3-8-OHdG/MDA” mediation model was established to explore potential mediating role of H3K36me3 in arsenic induced liver oxidative injury.

[Results] The levels of hepatic arsenic, urinary 8-OHdG, and hepatic MDA in the low, medium, and high arsenic groups were higher than the levels in the control group, while the level of hepatic H3K36me3 in the three arsenic dose groups were lower ($P<0.05$). The levels of hepatic arsenic, urinary 8-OHdG, and hepatic MDA increased with higher arsenic doses ($P_{\text{trend}}<0.01$), while the level of H3K36me3 in liver decreased with higher arsenic doses ($P_{\text{trend}}<0.01$). Hepatic arsenic level had a positive correlation with urinary 8-OHdG and hepatic MDA levels ($r=0.701, 0.748, P<0.01$), but had a negative correlation with liver H3K36me3 modification ($r=-0.715, P<0.01$). Liver H3K36me3 modification was negatively correlated with urinary 8-OHdG and hepatic MDA levels ($r=-0.660, -0.683, P<0.01$). Urinary 8-OHdG level was positively correlated with hepatic MDA level ($r=0.778, P<0.01$). The mediating effect of H3K36me3 on arsenic induced 8-OHdG and MDA levels accounted for 30.97% and 38.91% of the total effect, respectively.

[Conclusion] The decreased H3K36me3 in rat liver induced by arsenic may be involved in the regulation of hepatic oxidative damage, suggesting that H3K36me3 may be used as a new target for studying the mechanism of hepatic oxidative damage.

Keywords: arsenic; rat; liver; H3K36me3; oxidative damage

砷是危害人体健康的常见环境污染物，砷暴露可引起多系统多脏器的损伤，肝脏是其主要的靶器官之一^[1]。结果显示，氧化应激是砷致肝脏损伤的主要机制，砷暴露可以通过促进氧自由基产生，抑制抗氧化酶表达水平及活性，破坏肝脏氧化-抗氧化平衡，诱导肝脏的氧化损伤，从而进一步引起肝脏持续性炎症等损伤的发生^[1-2]。目前研究发现除经典的氧化应激调控通路外，表观遗传修饰是调控砷诱导氧化损伤的新途径。如砷可通过干扰DNA甲基化、miRNA的正常表达，造成其靶向的抗氧化酶转录抑制等方式，参与砷诱导氧化损伤的进程^[3-4]。组蛋白修饰是表观遗传调控的另一种重要机制，课题组前期研究发现H3第36位赖氨酸三甲基(H3 lysine 36 trimethylation, H3K36me3)是参与砷诱导体外细胞氧化应激调控的关键靶点^[5]。近年研究也揭示了H3K36me3的水平异常可参与肝脏疾病的发生发展^[6]。

为了探讨H3K36me3是否参与砷诱导肝氧化损伤的调控，本研究在课题组成功建立砷暴露致大鼠肝损伤模型基础上，检测大鼠肝组织中砷水平、组蛋白H3K36me3修饰水平以及尿8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG)和肝脏丙二醛(malondialdehyde, MDA)等氧化损伤指标水平，通过分析肝砷、肝组织H3K36me3、氧化损伤指标之间的关系以及H3K36me3对砷致肝氧化损伤的中介效应，探讨H3K36me3在砷致肝氧化损伤中的作用，为

砷致肝氧化损伤的调控机制研究寻找特异的表观遗传靶点提供依据。

1 对象与方法

1.1 主要仪器与试剂

电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)、超高效液相色谱-串联四级杆质谱仪(UPLC-MS/MS)、酶标仪(Thermo Fisher, 美国)，全自动样品快速研磨器(上海净信实业发展有限公司, 中国)，高速冷冻离心机(Eppendorf, 德国)。亚砷酸钠(Sigma, 美国)，浓硝酸、硫酸、过氧化氢(天津市大茂化学试剂厂, 中国)，蛋白酶抑制剂Cocktail(Roche, 瑞士)、H3K36me3抗体(Abcam, 英国)，IgG抗鼠二抗(Proteintech, 美国)，H3K36me3重组蛋白标准品(Active Motif, 美国)，四甲基联苯(TMB)显色剂、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术研究所, 中国)，MDA检测试剂盒(南京建成生物工程研究所, 中国)，8-OHdG的同位素($^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_5$)内标、8-OHdG标准品(Sigma, 美国)。

1.2 实验动物分组及处理

本研究依托课题组前期建立的砷中毒大鼠肝损伤模型^[7]，动物模型建立如下：32只健康初断乳Wistar大鼠，购自辽宁长生生物技术有限公司[合格证号为SCXK(辽)2015-0003]。其中体重为80~100 g，雌雄各半。实验期间，大鼠饲养在清洁级动物房内(室

温22~24℃，湿度60%~70%，光照/黑暗交替12 h/12 h)，分笼饲养，自由摄取饲料，自由饮水。将大鼠按体重采用随机数字表法分为对照组，低、中、高染砷剂量组，每组8只。大鼠亚砷酸钠半数致死量(LD_{50})为41 mg·kg⁻¹(以体重计，后同)，按照亚慢性毒性试验剂量设计原则，低、中、高染砷组分别给予2.5(1/16 LD_{50})、5.0(1/8 LD_{50})、10.0(1/4 LD_{50}) mg·kg⁻¹(以体重计，后同)亚砷酸钠溶液，对照组给予去离子水，灌胃染毒，灌胃量为10 mL·kg⁻¹，每周连续染毒6 d，共处理4个月。实验终期采集大鼠24 h尿样，大鼠处死后取肝脏样本。依据大鼠肝组织病理形态及肝功能指标(总胆汁酸、谷氨酰胺转移酶)改变与亚砷酸钠的剂量-反应关系来判定砷中毒大鼠肝损伤模型的成功构建^[7-8]。本研究经贵州医科大学伦理委员会审查批准(批准号：1403059)。

1.3 肝砷水平检测

肝组织经消化处理(0.3 g肝组织于6.0 mL浓HNO₃及2.0 mL H₂O₂溶液中，微波消解后用2% HNO₃定容至25 mL，微孔滤膜过滤)于ICP-MS上机检测，采用标准曲线法根据样品的峰面积计算肝中砷的质量分数，以每克肝中砷元素的质量表示。

1.4 肝中组蛋白提取及H3K36me3修饰水平的测定

肝组织与预冷裂解缓冲液按1:6于研磨仪中研磨后离心、弃上清，留沉淀，酸抽提法提取组蛋白，BCA蛋白浓度测定试剂盒进行定量；采用ELISA法检测H3K36me3水平，100 μL·孔⁻¹的H3抗体稀释液(1:10 000)包被96孔板，4℃过夜；PBST(包含1×PBS、0.05% Tween-20)清洗3次，含5%脱脂牛奶的PBST 200 μL·孔⁻¹，室温封闭2 h；PBST清洗，每孔加入100 μL H3K36me3重组蛋白标准品(0、0.313、0.625、1.25、2.5、5、10 μg·mL⁻¹)及样品(20 μg·mL⁻¹)，室温摇床孵育1.5 h；PBST清洗，每孔加入100 μL H3K36me3抗体(1:3 000)室温摇床孵育1 h；PBST清洗，每孔加入100 μL IgG抗鼠二抗(1:5 000)，室温摇床孵育1 h；PBST清洗，每孔加入200 μL TMB显色液避光室温孵育0.5 h后，加入50 μL 2 mol·L⁻¹硫酸终止显色；在酶标仪波长为450 nm处检测吸光度(*D*)值，并根据标准曲线计算H3K36me3的质量分数，以每克肝中组蛋白H3K36me3的质量表示。

1.5 尿8-OHdG水平的测定

将处理的尿液混匀液[150 μL尿液+150 μL 10 mmol·L⁻¹醋酸钠(NaAc, pH=7.5)+7.5 μL 400 μg·L⁻¹同位素(¹³C,

¹⁵N)₂]内标8-OHdG]于被甲醇活化亲水亲油平衡的固相萃取小柱(60 mg, 3cc, Waters Oasis)中，将待测物在小柱中经过富集、去离子水冲洗、洗脱等过程，放置氮吹仪吹至近干。加入150 μL甲醇流动相，经离心、取上清液于上样瓶中。用UPLC-MS/MS分析标品、样品中8-OHdG及同位素(¹³C, ¹⁵N)₂内标8-OHdG的峰面积，根据标准曲线用内标法计算尿中8-OHdG的质量浓度，以每毫升尿液8-OHdG的质量表示。

1.6 肝MDA水平的测定

肝组织与裂解液按1:9配置10%肝组织匀浆稀释液，离心、弃沉淀，取上清。采用BCA蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量。采用硫代巴比妥酸法(TBA法)，根据MDA检测试剂盒的操作步骤及计算方法完成检测，以试剂盒推荐的单位nmol·mg⁻¹(以蛋白计)表示肝组织中MDA水平。

1.7 统计学分析

采用SPSS 22.0对实验数据进行分析。计量资料进行正态性检验及方差齐性检验，非正态分布数据以中位数(P_{25} , P_{75})表示，多组间比较采用Kruskal-Wallis *H*法，采用Kruskal-Wallis单因素方差分析法进行两两比较，经对数变换后采用线性回归进行趋势分析；正态分布且方差齐数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步采用SNK法进行两两比较，趋势分析采用线性趋势检验；相关性分析采用Pearson分析方法。将肝砷水平对数转换后进行中介效应检验，肝砷水平为自变量，8-OHdG、MDA水平为应变量，肝组蛋白H3K36me3水平为中介变量，建立“肝砷—H3K36me3—8-OHdG”及“肝砷—H3K36me3—MDA”中介检验模型，通过PROCESS 3.2软件采用Bootstrap法对H3K36me3修饰水平在砷暴露与肝氧化应激的中介效用进行检验^[9]，检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 砷染毒大鼠肝脏砷水平、H3K36me3修饰水平及氧化损伤指标的改变

4个指标不同染毒组间比较差异有统计学意义(均 $P<0.05$)，见表1；与对照组相比，低、中、高砷剂量组肝砷水平、尿8-OHdG和肝MDA水平升高(均 $P<0.05$)，而肝H3K36me3修饰水平降低($P<0.05$)；肝砷水平、尿8-OHdG和肝MDA水平随染砷剂量的增加逐渐升高($P_{\text{趋势}}<0.01$)，而肝H3K36me3修饰水平逐渐降低($P_{\text{趋势}}<0.01$)，见表1。

表1 砷染毒大鼠肝砷水平、H3K36me3修饰及氧化损伤水平($n=8$)

Table 1 The levels of arsenic, H3K36me3 modification, and oxidative damage in liver of rats exposed to arsenic ($n=8$)

组别	肝砷质量分数 [$M (P_{25}, P_{75})$] / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	尿 8-OHdG 质量浓度 ($\bar{x}\pm s$) / ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	肝 MDA 质量摩尔浓度 ($\bar{x}\pm s$) / ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	H3K36me3 质量分数 ($\bar{x}\pm s$) / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
对照组	3.07 (2.21, 3.51)	1.30 \pm 0.19	1.20 \pm 0.08	51.55 \pm 8.07
低砷剂量组	63.83 (58.72, 74.27) ^a	2.06 \pm 0.39 ^a	1.73 \pm 0.37 ^a	44.29 \pm 6.12 ^a
中砷剂量组	65.20 (57.08, 75.52) ^a	2.54 \pm 0.33 ^a	1.99 \pm 0.26 ^a	39.99 \pm 3.13 ^a
高砷剂量组	79.26 (70.09, 95.74) ^{ab}	2.92 \pm 0.80 ^a	2.99 \pm 0.71 ^{abc}	36.02 \pm 3.81 ^{ab}
H/F	21.83	13.74	29.21	16.416
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
F _{趋势}	52.28	40.75	82.97	48.71
P _{趋势}	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

[注] a : 与对照组比较, $P<0.05$; b : 与低砷剂量组比较, $P<0.05$; c : 与中砷剂量组比较, $P<0.05$ 。

表2 H3K36me3 介导砷暴露与氧化损伤的中介效应($n=8$)

Table 2 Mediating effect of H3K36me3 on arsenic exposure and oxidative damage ($n=8$)

氧化损伤指标	总效应 (95% CI)	H3K36me3 的中介效应		
		直接效应 (95% CI)	H3K36me3 中介效应 (95% CI)	中介效应 / 总效应 / %
尿 8-OHdG	0.694 (0.426~0.963) ^c	0.479 (0.154~0.805) ^c	0.215 (0.059~0.476) ^b	30.97
肝 MDA	0.681 (0.408~0.954) ^c	0.416 (0.097~0.735) ^a	0.265 (0.085~0.543) ^b	38.91

[注] a : $P<0.01$, b : $P<0.05$, c : $P<0.001$ 。

3 讨论

砷暴露致机体多系统多脏器的毒作用机制研究一直以来备受国内外学者关注。肝脏作为砷毒性蓄积和代谢的主要靶器官, 其机制研究除氧化应激、遗传损伤、信号通路转导等途径外, 表观遗传修饰也是砷暴露与肝细胞损害或肝组织结构和功能异常的重要媒介, 其表达的改变可能是肝脏损害或疾病恶变的早期、关键生物学标志^[2, 8]。因此, 进一步探究砷致表观遗传修饰的改变对揭示砷致肝损害机制及针对性的防治具有重要的意义和价值。组蛋白修饰是表观遗传修饰的重要机制之一。本课题组前期发现, 组蛋白 H3K36me3 可能是砷诱导机体损伤的表观遗传调控新靶点。饮水型及燃煤型砷中毒人群研究显示, 随着尿砷水平的升高, 人外周血淋巴细胞 H3K36me3 的修饰水平发生相应改变^[10~11]。体外研究显示 H3K36me3 可通过调控 DNA 修复酶 [O6-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶 (O6-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)]、氧化应激相关基因的表达参与砷诱导 DNA 损伤、氧化损伤的发生^[12, 5], 但砷暴露诱导肝脏 H3K36me3 改变与其介导砷中毒肝脏早期损伤效应的关系尚不清楚。本课题组前期成功构建了砷暴露致大鼠肝损伤模型, 发现随着染砷剂量的增加, 大鼠肝脏出现不同程

2.2 大鼠肝砷水平、肝 H3K36me3 修饰水平、氧化损伤指标间的关联性

大鼠肝砷水平与肝 H3K36me3 修饰水平呈负相关 ($r=-0.715$, $P<0.01$), 与尿 8-OHdG、肝 MDA 水平呈正相关 ($r=0.701$ 、 0.748 , 均 $P<0.01$), 且肝 H3K36me3 修饰水平与尿 8-OHdG、肝 MDA 水平呈负相关 ($r=-0.660$ 、 -0.683 , 均 $P<0.01$) ; 此外, 尿中 8-OHdG 水平与肝中 MDA 水平呈正相关 ($r=0.778$, $P<0.01$)。

2.3 H3K36me3 的中介效应

砷暴露对 8-OHdG 和 MDA 的总效应、直接效应及以 H3K36me3 介导的中介效应均有统计学意义 (均 $P<0.05$), 且 H3K36me3 在砷致 8-OHdG 和 MDA 水平的中介效应分别占总效应的 30.97%、38.91%, 见表 2。

度的炎性浸润等病理改变及肝功能指标的紊乱^[7~8]。本研究在此基础上, 从整体动物探讨砷暴露大鼠肝脏 H3K36me3 的表达水平, 分析 H3K36me3 在砷致大鼠肝氧化损伤中的作用, 为进一步探索砷致肝损伤的表观遗传机制提供新依据。

有研究表明, H3K36me3 的修饰改变与多种肝脏疾病密切相关。据文献报道, H3K36me3 表达异常可以通过抑制胆固醇外排基因的表达, 阻碍 DNA 错配修复机制诱导肝脂肪样变及肝肿瘤的恶化^[13~14]。另有研究报道肝氧化损伤是诱导肝脏持续炎症及远期肝肿瘤发生的关键事件^[15]。砷暴露诱导肝氧化损伤的多种途径中, 氧自由基增多引发的致突变损伤产物 8-OHdG、脂质过氧化物 MDA 是评价机体氧化应激及氧化损伤程度的敏感生物标志物。本研究发现, 随着砷暴露剂量的增加, 大鼠尿 8-OHdG、肝 MDA 的水平升高, 尿 8-OHdG 与肝 MDA 具有相同的变化趋势, 提示尿 8-OHdG 改变可间接反映肝中氧化损伤的情况, 且尿 8-OHdG、肝 MDA 均与大鼠肝中砷内负荷存在剂量-效应关系, 表明砷暴露诱导的氧化损伤是砷致大鼠肝损伤发生发展的直接原因。近年研究发现, 组蛋白修饰可以通过调控氧化应激通路中关键因子及抗氧化酶的表达诱导机体氧化损伤的发生^[16], 推测组蛋白

白修饰也可能是诱导靶器官氧化损伤的重要环节。本研究发现,大鼠肝H3K36me3的表达随着砷暴露剂量的增加不断降低,且其与氧化损伤指标(尿8-OHDG、肝MDA)水平呈负相关,提示砷诱导大鼠氧化损伤的进程中,H3K36me3修饰水平的改变在其中扮演了重要角色。

本研究进一步采用中介效应方法探索H3K36me3修饰异常在砷致肝氧化损伤中的贡献。中介效应是指变量间的影响关系($x \rightarrow y$)不是直接的因果链关系而是通过一个或一个以上变量(M)的间接影响产生的,此时称 M 为中介变量,而 x 通过 M 对 y 产生的间接影响称为中介效应,是揭示自变量(x)对应变量(y)影响的内在机制检验方法,已广泛应用于心理、预防等领域的医学研究^[9]。鉴于本研究肝中砷负荷、H3K36me3与大鼠肝氧化损伤三者的关系满足中介效应分析中中介因素需与暴露因素和结局指标均相关的条件,通过中介效应检验发现砷致大鼠肝氧化损伤指标改变的总影响中,38.91%是通过H3K36me3的中介效应发挥作用,提示H3K36me3有望作为研究砷致肝氧化损伤机制的新靶点。另外,本课题组前期发现抗氧化活性天然药植物刺梨、银杏能促进机体排砷解毒,且对砷暴露致肝损伤具有保护作用^[17-18]。鉴于表观遗传修饰具有可遗传和可逆性的特点,且有研究报道植物类提取剂4β-羟基含烷醇E可以通过恢复H3K36me3水平,抑制肝细胞凋亡基因剪切异常,减缓肝癌的进展^[19]。基于本研究发现H3K36me3可能是调控砷致肝氧化损伤的潜在靶点,提示以H3K36me3为切入点靶向干预H3K36me3,有可能抑制砷中毒肝损伤的发生发展,为后续干预研究提供了新思路。

综上所述,砷暴露可致大鼠肝H3K36me3修饰水平降低,且其变化与肝氧化损伤密切相关。本研究初步探索了H3K36me3在砷致肝氧化损伤中的作用,为后续深入探讨H3K36me3参与调控砷致肝损伤的机制提供了依据。

(志谢:感谢王大朋老师、朱凯和董令同学在动物模型建立等方面的贡献)

参考文献

- [1] 张涛,王庆陵,葛建梅,等.燃煤污染型砷中毒患者血尿常规与肝肾生化指标特征[J].环境与职业医学,2018,35(12):1089-1093,1099.
- ZHANG T, WANG QL, GE JM, et al. Characteristics of blood routine indices, urine routine indices, and biochemical indices of liver and kidney in patients with coal-burning arsenism [J]. J Environ Occup Med, 2018, 35 (12) : 1089-1093, 1099.
- [2] HU Y, YU C, YAO M, et al. The PKCδ-Nrf2-ARE signalling pathway may be involved in oxidative stress in arsenic-induced liver damage in rats [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2018, 62 : 79-87.
- [3] SANYAL T, BHATTACHARJEE P, BHATTACHARJEE S, et al. Hypomethylation of mitochondrial D-loop and ND6 with increased mitochondrial DNA copy number in the arsenic-exposed population [J]. Toxicology, 2018, 408 : 54-61.
- [4] GUO P, CHEN S, LI D, et al. SFPQ is involved in regulating arsenic-induced oxidative stress by interacting with the miRNA-induced silencing complexes [J]. Environ Pollut, 2020, 261 : 114160.
- [5] 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.
- [6] FU Q, YANG F, ZHAO J, et al. Bioinformatical identification of key pathways and genes in human hepatocellular carcinoma after CSN5 depletion [J]. Cell Signal, 2018, 49 : 79-86.
- [7] 朱凯,张爱华,董令,等.辅助性T细胞-17与调节性T细胞浸润在砷致大鼠肝脏损伤中的作用[J].中华地方病学杂志,2018,37(7):536-540.
- ZHU K, ZHANG A H, DONG L, et al. Roles of T helper 17 and regulatory T cell infiltration in hepatic injury induced by arsenic in rats [J]. Chin J Endemiol, 2018, 37 (7) : 536-540.
- [8] 侯腾,马璐,张爱华.大鼠肝脏组蛋白H3K18乙酰化水平与砷诱导肝损伤的关联性研究[J].中华地方病学杂志,2020,39(5):325-331.
- HOU T, MA L, ZHANG A H. The association between histone modification of H3K18 acetylation and hepatic injury induced by arsenic in rats [J]. Chin J Endemiol, 2020, 39 (5) : 325-331.
- [9] 杨春艳,侯艳,李康.中介分析方法及在其医学研究中的应用[J].中国卫生统计,2017,34(1):159-162.
- YANG CY, HOU Y, LI K. Mediation analysis and its application in medical research [J]. Chin J Health Stat, 2017, 34 (1) : 159-162.

- [10] 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.
- [11] TAUHEED J, SANCHEZ-GUERRA M, LEE JJ, et al. Associations between post translational histone modifications, myelomeningocele risk, environmental arsenic exposure, and folate deficiency among participants in a case control study in Bangladesh [J]. *Epigenetics*, 2017, 12 (6) : 484-491.
- [12] 李军, 马璐, 谢琅, 等. H3K36me3 调控 O⁶- 甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶基因与砷致人皮肤角质形成细胞 DNA 损伤的关系 [J]. 中华地方病学杂志, 2017, 36 (2) : 107-112.
LI J, MA L, XIE L, et al. Relationship between O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene regulated by H3K36me3 and DNA damage induced by arsenic in HaCaT Cells [J]. *Chin J Endemol*, 2017, 36 (2) : 107-112.
- [13] SUPEK F, LEHNER B. Clustered mutation signatures reveal that error-prone DNA repair targets mutations to active genes [J]. *Cell*, 2017, 170 (3) : 534-547.e23.
- [14] LI XJ, LI QL, JU LG, et al. Deficiency of histone methyltransferase SET domain-containing 2 in liver leads to abnormal lipid metabolism and HCC [J]. *Hepatology*, 2021, 73 (5) : 1797-1815.
- [15] LIU L, GENG X, CAI Y, et al. Hepatic ZIP8 deficiency is associated with disrupted selenium homeostasis, liver pathology, and tumor formation [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2018, 315 (4) : G569-G579.
- [16] RAY PD, HUANG BW, TSUJI Y. Coordinated regulation of Nrf2 and histone H3 serine 10 phosphorylation in arsenite-activated transcription of the human heme oxygenase-1 gene [J]. *Biochim Biophys Acta (BBA) -Gene Regul Mech*, 2015, 1849 (10) : 1277-1288.
- [17] XU Y, YU C, ZENG Q, et al. Assessing the potential value of Rosa Roxburghii Tratt in arsenic-induced liver damage based on elemental imbalance and oxidative damage [J]. *Environ Geochem Health*, 2021, 43 (3) : 1165-1175.
- [18] 姚茂琳, 张爱华, 于春, 等. 银杏叶片对高砷煤烘玉米粉致大鼠肝损害的干预作用 [J]. 中华地方病学杂志, 2017, 36 (5) : 333-337.
YAO ML, ZHANG AH, YU C, et al. Effect of Ginkgo biloba on liver injury of arsenic poisoning rats caused by corn flour baked by high-arsenic coal [J]. *Chin J Endemol*, 2017, 36 (5) : 333-337.
- [19] LEE CC, CHANG WH, CHANG YS, et al. 4β-Hydroxywithanolide E modulates alternative splicing of apoptotic genes in Human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 : 7290.

(英文编辑：汪源；责任编辑：陈姣)

(上接第 611 页)

- [2020-05-10] . <https://www.epa.gov/risk/microbial-risk-assessment-guideline-pathogenic-microorganisms-focus-food-and-water>.
- [8] 叶显贝. 中国东部沿海某市饮用水微生物潜在风险研究 [D]. 杭州：浙江大学, 2017.
- YE XB. A study of potential microbial risk of drinking water in one of China's eastern coastal cities [D]. Hangzhou : Zhejiang University, 2017.
- [9] 郑平. 环境微生物学 [M]. 杭州：浙江大学出版社, 2002 : 121-135.
- ZHENG P. Environmental microbiology [M]. Hangzhou : Zhejiang University Press, 2002 : 121-135.
- [10] 赵秀阁, 段小丽. 中国人群暴露参数手册 (成人卷) 概要 [M]. 北京 : 中国环境出版社, 2014 : 47-212.
- ZHAO XG, DUAN XL. Highlights of the Chinese exposure factors handbook (adults) [M]. Beijing : China Environment Publishing House, 2014 : 47-212.
- [11] ERCUMEN A, ARNOLD BF, KUMPEL E, et al. Upgrading a piped water supply from intermittent to continuous delivery and association with waterborne illness : a matched cohort study in urban India [J]. *PLoS Med*, 2015, 12 (10) : e1001892.
- [12] WHO. Water quality : guidelines, standards and health : assessment of risk and risk management for water-related infectious disease [M]. Geneva : World Health Organization, 2001 : 35-229.

(英文编辑：汪源；责任编辑：汪源)