

组蛋白 H4K20 甲基化修饰对砷致 HaCaT 细胞 DNA 双链断裂损伤的影响

谢琅, 李军, 李成贵, 陈丽, 马璐, 张爱华, 杨光红, 杨红艳

摘要:

[目的] 观察亚砷酸钠(NaAsO_2)对人永生皮肤角质形成细胞(HaCaT细胞)DNA双链断裂损伤、组蛋白H4第20位赖氨酸一、二甲基化(H4K20me1、H4K20me2)修饰水平的影响,探讨H4K20me1、H4K20me2修饰在砷致DNA双链断裂损伤中的作用。

[方法] 体外常规培养HaCaT细胞,以0.00、1.25、2.50、5.00、10.00 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 连续处理HaCaT细胞24 h, 10.00 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 处理HaCaT细胞0、6、12、24 h,其中以0.00 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组和0 h为空白对照组。采用中性单细胞凝胶电泳法检测各组HaCaT细胞DNA双链断裂损伤水平(尾部DNA百分含量、Olive尾矩);免疫印迹法检测各组H4K20me1、H4K20me2蛋白表达水平。

[结果] HaCaT细胞染砷24 h后,DNA双链断裂程度在5.00、10.00 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组高于对照组($P < 0.05$);H4K20me1/me2蛋白表达水平在2.50、5.00、10.00 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组低于对照组($P < 0.05$)。10.00 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 处理HaCaT细胞0、6、12和24 h后,DNA双链断裂程度在12、24 h染砷组高于对照组($P < 0.05$),H4K20me1、H4K20me2蛋白表达水平在6、12、24 h较对照组降低($P < 0.05$)。尾部DNA百分含量与H4K20me1、H4K20me2修饰水平呈负相关($r = -0.955$ 、 -0.855 ,均 $P < 0.05$),Olive尾矩与二者亦呈负相关($r = -0.940$ 、 -0.841 ,均 $P < 0.05$)。

[结论] 砷可导致HaCaT细胞DNA双链断裂损伤和H4K20me1、H4K20me2表达改变,提示砷所致DNA损伤可能与组蛋白H4K20甲基化修饰有关。

关键词: 亚砷酸钠; HaCaT细胞; H4K20甲基化; DNA双链断裂; 蛋白表达

引用: 谢琅, 李军, 李成贵, 等. 组蛋白H4K20甲基化修饰对砷致HaCaT细胞DNA双链断裂损伤的影响[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(2): 143-147. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16517

Role of H4K20 methylated modification in DNA double-strand break damage in HaCaT cells induced by arsenic XIE Lang, LI Jun, LI Cheng-gui, CHEN Li, MA Lu, ZHANG Ai-hua, YANG Guang-hong, YANG Hong-yan (School of Public Health/Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China). Address correspondence to LI Jun, E-mail: 641885476@qq.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To investigate the effects of sodium arsenite (NaAsO_2) on DNA double-strand break and the expression of histone H4 lysine 20 monomethylation and dimethylation (H4K20me1 and H4K20me2) in immortalized human keratinocytes (HaCaT cells), and to study the roles of H4K20me1 and H4K20me2 in DNA double-strand break induced by arsenic.

[Methods] HaCaT cells were conventionally cultured *in vitro* and treated continuously with different concentrations of NaAsO_2 (0.00, 1.25, 2.50, 5.00, and 10.00 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, or treated with 10.00 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 for 0, 6, 12, and 24 h, respectively. The 0.00 $\mu\text{mol/L}$ and 0 h treatments were used as blank control group. The damage degree of DNA double-strand break (DSB) (tail DNA% and Olive tail moment) in HaCaT cells were measured by neutral single cell gel electrophoresis. Western blot was used to observe the protein expression levels of H4K20me1 and H4K20me2.

• 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: 81360411); 国家自然科学基金重点项目(编号: 81430077)

[作者简介] 谢琅(1988—), 女, 硕士生; 研究方向: 环境毒理学; E-mail: 648691516@qq.com

[通信作者] 李军, E-mail: 641885476@qq.com

[作者单位] 贵州医科大学公共卫生学院, 环境污染与疾病监控省部共建教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

[Results] After exposure to NaAsO_2 for 24 h, the degrees of DSB in HaCaT cells of the 5.00 and 10.00 $\mu\text{mol/L}$ groups were higher than that of the blank control group ($P < 0.05$), and the protein expression levels of H4K20me1 and H4K20me2 in HaCaT cells of the 2.50, 5.00, and 10.00 $\mu\text{mol/L}$ groups were lower than that of the blank control group ($P < 0.05$). Regarding treatment with 10.00 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 for different time periods, compared with the blank control group, the degrees of DSB in HaCaT cells at 12 and 24 h were significantly increased ($P < 0.05$), and the H4K20me1 and H4K20me2 protein expression levels in HaCaT cells at 6, 12, and 24 h were reduced ($P < 0.05$). Tail DNA% was negatively associated with the protein expression level of H4K20me1 and H4K20me2 ($r = -0.955$, -0.855 , both $P_s < 0.05$). Olive tail moment was also negatively associated ($r = -0.940$, -0.841 , both $P_s < 0.05$).

[Conclusion] Arsenic can cause DNA double-strand break damage and changes in the expression of H4K20me1 and H4K20me2 in HaCaT cells, suggesting that DNA damage induced by arsenic may be related to histone H4K20 methylation.

Keywords: sodium arsenite; HaCaT cell; H4K20 methylation; DNA double-strand break; protein expression

Citation: XIE Lang, LI Jun, LI Cheng-gui, et al. Role of H4K20 methylated modification in DNA double-strand break damage in HaCaT cells induced by arsenic [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(2): 143-147. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16517

砷是环境中普遍存在的一种类金属元素,是国际癌症研究中心(IARC)确认的人类致癌物,可经消化道、皮肤及呼吸道等多种途径进入人体引起急性慢性砷中毒^[1-2]。砷中毒对机体健康产生多方面危害,皮肤是其作用的主要靶器官。目前关于砷致病机制主要存在以下几种假说:致氧化应激、DNA损伤、染色体畸变、干扰DNA甲基化、抑制DNA修复等,但其确切机制仍未被阐明^[3]。随着研究的进展,Ren等^[4]发现表观遗传学作用也是砷致病致癌的重要机制。表观遗传学调控机制主要包括DNA甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑等^[5]。近期研究显示,组蛋白修饰可作为一种重要的表观遗传学调控模式参与多种DNA损伤修复通路^[6]。如:牛林梅等^[6]发现H3K4的甲基化可能调控HBE细胞对砷暴露造成的DNA损伤修复过程;章征保等^[7]发现亚砷酸钠(NaAsO_2)可以改变HBE细胞整体的H3K9me3修饰水平,从而影响细胞同源末端的修复能力。组蛋白H4第20位赖氨酸甲基化(H4K20me)作为一种重要的组蛋白修饰,包含一甲基化(H4K20me1)、二甲基化(H4K20me2)和三甲基化(H4K20me3)3种修饰水平,分别被不同组蛋白甲基化转移酶催化,其与DNA复制和转录、DNA损伤修复、染色质浓缩、异染色体形成等生物学过程相关^[8-9]。多项研究发现,H4K20me作为保证基因完整性的关键因素参与了DNA损伤修复,其中,H4K20me1参与基因的转录过程,H4K20me2招募修复因子参与DNA损伤修复过程^[10-12]。但关于H4K20甲基化是否参与砷所致细胞DNA损伤修复的报道至今未见。本课题组前期人群研究结果显示,H4K20me1和H4K20me2修饰改变可能参与了调控燃煤型砷暴露引起的DNA损伤修复过程^[13]。因此,

本研究以人永生化皮肤角质形成细胞(HaCaT细胞)为观察对象, NaAsO_2 为处理因素,探讨组蛋白H4K20me1、H4K20me2修饰水平与砷致HaCaT细胞DNA损伤修复关系,为后续毒作用机制深入研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验对象 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 四噻唑蓝(MTT)(北京Solarbio公司,中国),胰蛋白酶(Amresco,美国),DMEM细胞培养基、胎牛血清(Gibco,美国),溴化乙锭(EB)(北京Solarbio,中国),BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天公司,中国),组蛋白H4抗体(Santa Cruz,美国),H4K20me1抗体(Enzo,美国),H4K20me2抗体(Abcam,英国),山羊抗小鼠、抗兔抗体(proteintech,美国),Western一抗、二抗稀释液(上海碧云天公司,中国),CO₂培养箱(MCO-15AC CO₂)(Sanyo,日本),倒置显微镜(TE2000-U+DXM1200)(Sanyo,日本),正置荧光显微镜(DS-Ri2)(Nikon,日本),高压灭菌锅(HVE-50)(HIRAYAMA,日本),全波长酶标仪(1510)(Thermo,美国),超低温冰箱(905)(Thermo,美国),凝胶成像系统(ChemiDocTMXRS+)(Bio-rad,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与染毒 HaCaT细胞用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基,于37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养,取对数期细胞用于实验。 NaAsO_2 用灭菌纯水配制成10mmol/L的储备液,过滤除菌后

分装, 于 -20°C 保存, 临用前于 4°C 融化, 用含体积分数为5%血清的DMEM培养基配制所需浓度的应用液。根据参考文献及NaAsO₂染毒预试验结果, 以0.00、1.25、2.50、5.00、10.00 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂连续处理HaCaT细胞24 h, 以10.00 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂分别处理HaCaT细胞0、6、12、24 h, 观察NaAsO₂对HaCaT细胞的DNA损伤的剂量效应和时间效应关系。

1.2.2 中性单细胞凝胶电泳法 (SCGE) 检测 DNA 双链断裂损伤情况 取细胞悬液20 μL 制片、裂解细胞2 h、解旋25 min、电泳25 min、溴化乙锭染色15 min、镜检拍摄图像。图像采用CASP软件分析, 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。

1.2.3 Western-blot 检测组蛋白 H4K20me1、H4K20me2 表达水平 细胞核蛋白抽提试剂盒提取HaCaT细胞核蛋白, 测定蛋白浓度。根据蛋白浓度, 用5 $\times$ 蛋白上样缓冲液将样品蛋白浓度调节一致, 煮沸变性5 min, -80°C 保存备用。采用质量分数为12%的十二烷基硫酸钠 (SDS) 聚丙烯酰胺凝胶电泳2 h、转膜60 min、室温封闭2 h、一抗 4°C 孵育过夜、二抗室温孵育2 h、电化学发光液显影、Quantity one软件分析蛋白条带灰度值。

1.5 统计学分析

SPSS 21.0统计软件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, 组间比较采用单因素方差分析, 相关性分析采用Spearman等级相关。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

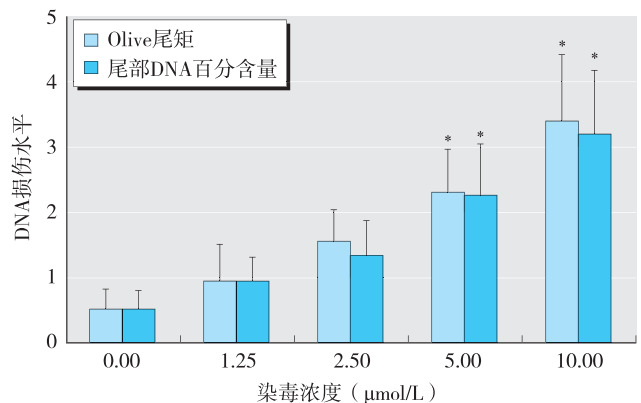
2 结果

2.1 染砷 HaCaT 细胞 DNA 双链断裂损伤情况

与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, HaCaT细胞经不同浓度NaAsO₂处理24 h后, 5.00、10.00 $\mu\text{mol/L}$ 染砷组尾部DNA百分含量及Olive尾矩均升高 ($P<0.05$), 见图1。10.00 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂分别作用HaCaT细胞不同时间后, 12、24 h染砷组尾部DNA百分含量及Olive尾矩均高于对照组 (0 h) ($P<0.05$), 见图2。

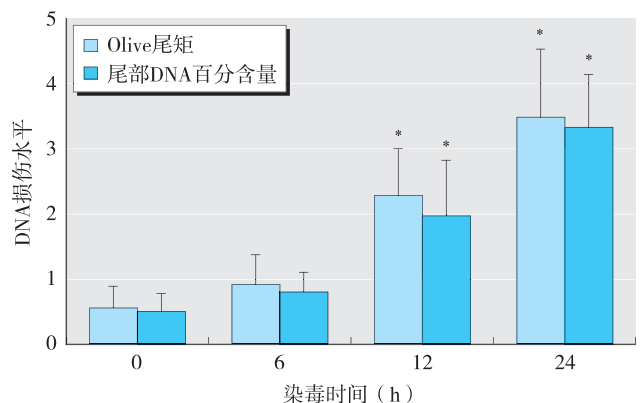
2.2 染砷 HaCaT 细胞组蛋白 H4K20 甲基化修饰情况

与对照组 (0.00 $\mu\text{mol/L}$) 比较, 不同浓度NaAsO₂作用HaCaT细胞24 h后, 2.50、5.00、10.00 $\mu\text{mol/L}$ 染砷组H4K20me1、H4K20me2蛋白表达水平降低 ($P<0.05$), 见图3。10.00 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂作用HaCaT细胞不同时间后, 6、12、24 h染砷组H4K20me1、H4K20me2均低于对照组 (0 h) ($P<0.05$), 见图4。



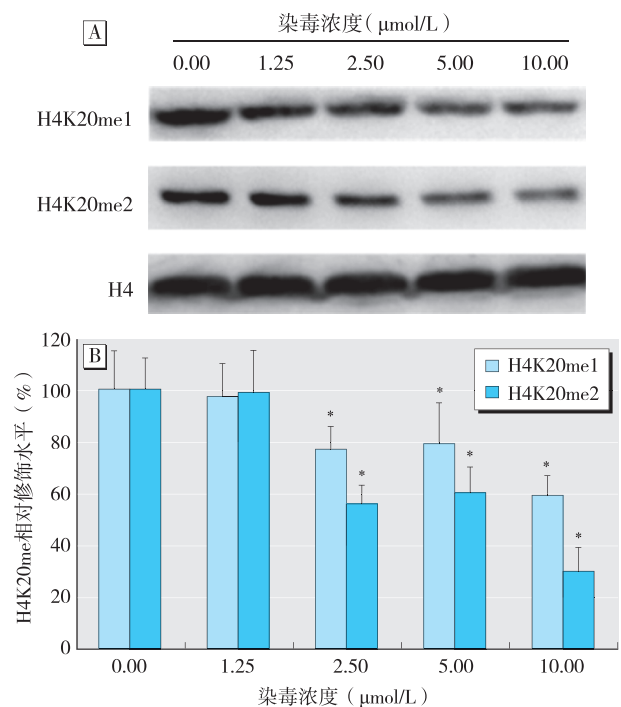
[注]*: 与0.00 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.05$ 。

图1 不同浓度NaAsO₂染毒24 h后HaCaT细胞DNA双链断裂水平



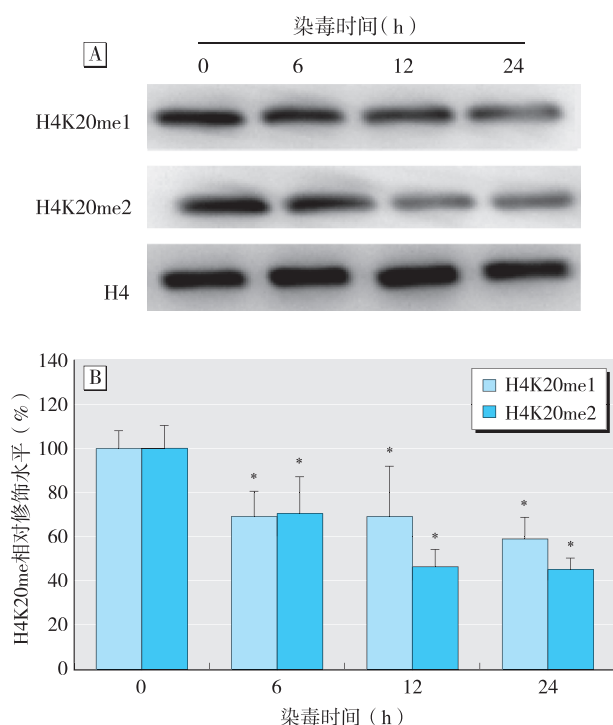
[注]*: 与0 h组比较, $P<0.05$ 。

图2 10.00 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂染毒不同时间后HaCaT细胞DNA双链断裂水平



[注]*: 与0.00 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.05$ 。

图3 不同浓度NaAsO₂染毒24 h后HaCaT细胞组蛋白H4K20me1、H4K20me2电泳图 (A) 及蛋白表达水平 (B)



[注]*: 与0h组比较, $P < 0.05$ 。

图4 10.00 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂ 染毒不同时间后 HaCaT 细胞组蛋白 H4K20me1、H4K20me2 电泳图 (A) 及蛋白表达水平 (B)

2.3 染砷 HaCaT 细胞组蛋白 H4K20 甲基化修饰与 DNA 双链断裂的相关性

10.00 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂ 染毒 24 h 后, HaCaT 细胞 H4K20me1、H4K20me2 修饰水平与 DNA 双链断裂损伤水平(尾部 DNA 百分含量、Olive 尾矩)均呈负相关关系,见表 1。

表 1 染砷 HaCaT 细胞 H4K20me 与 DNA 双链断裂的相关性分析

指标	尾部 DNA 百分含量		Olive 尾矩	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
H4K20me1	-0.955	<0.05	-0.940	<0.05
H4K20me2	-0.855	<0.05	-0.841	<0.05

3 讨论

砷作为一种环境毒物,可造成机体多器官、多系统的损伤,表现为皮肤色素沉着、脱发、掌跖角化及癌变,因此成为众多学者的研究热点。随着研究进展,发现组蛋白甲基化与砷毒作用机制密切相关,如三价无机砷处理哺乳动物细胞引起 H3K9me2、H3K4me2、H3K4me3 增加及 H3K27me3 减少^[14];孟加拉地区饮水砷高暴露人群研究发现,尿砷含量与 H3K9me2、H3K9ac 的水平呈相关关系^[15]。NaAsO₂ 可通过上调组蛋白修饰酶 Suv39h1 的表达导致细胞 H3K9me3 整体

修饰水平升高,从而抑制细胞同源末端(HR)的修复能力^[6]。研究还发现,H4K20me 作为保证基因完整性的关键因素,参与了 DNA 损伤修复,但不同的甲基化状态具有不同的生物学功能^[12]。

本研究以不同浓度 NaAsO₂ 处理 HaCaT 细胞后,发现随着染砷浓度增加至 2.5 $\mu\text{mol/L}$, HaCaT 细胞 H4K20me1、H4K20me2 蛋白表达水平均逐渐降低,其 DNA 双链断裂程度均逐渐升高。提示 H4K20me1、H4K20me2 修饰参与了砷致 HaCaT 细胞的 DNA 双链断裂损伤过程,且存在剂量依赖性。其中 H4K20me2 蛋白表达水平与课题组前期人群研究及 Tuzon 等^[12] 研究结果相符,H4K20me1 蛋白表达水平与课题组前期人群研究结果存在差异,原因可能与体内对砷代谢耐受性不同有关。机体较细胞而言,具有较强的代偿能力,如组蛋白甲基化过程中所需的甲基供体-S-腺苷甲硫氨酸,在细胞中较易被砷代谢竞争消耗,而机体内具有较充足的储备,其具体原因尚需进一步论证。为进一步探明 H4K20me1、H4K20me2 修饰水平在砷致 DNA 双链断裂损伤作用中是否受时相的影响,本研究选取 10 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂ 对 HaCaT 染毒 6、12、24 h 后,结果发现:随着染砷时间的增加,HaCaT 细胞 H4K20me1、H4K20me2 蛋白表达水平逐渐降低,DNA 双链断裂程度呈逐渐升高趋势,提示 H4K20me1、H4K20me2 修饰参与砷致 DNA 双链断裂损伤存在时间依赖性。进一步相关性分析发现,染砷 HaCaT 细胞 H4K20me1、H4K20me2 修饰水平与 DNA 双链断裂损伤程度尾部(DNA 百分含量、Olive 尾矩)均呈负相关关系。目前研究发现,H4K20me 与 DNA 损伤存在两个主要方面的联系,一方面是 H4K20me1 位于基因激活区,激活基因的转录,但其与 L3MBTL1 基因相作用后,亦会导致染色体局部压紧和转录抑制^[15];另一方面 H4K20me2 作为修复因子 53BP1 的结合位点,在 DNA 双链断裂处促进 53BP1 的募集,参与 DNA 双链断裂修复^[16]。综合上述研究结果,我们推测,砷可能通过抑制 H4K20me1 修饰水平调控 DNA 损伤修复基因的表达来应答细胞的 DNA 损伤,影响 DNA 损伤修复,导致 DNA 损伤加重;还可通过影响 H4K20me2 修饰水平,降低 DNA 损伤位点修复蛋白的募集,导致损伤修复抑制,从而导致 DNA 损伤加重,具体的调控机制尚需进一步深入研究。

综上所述,砷可导致 HaCaT 细胞 DNA 双链断裂损伤与 H4K20me1 和 H4K20me2 表达改变,提示砷所

致DNA双链断裂损伤可能与组蛋白H4K20甲基化修饰有关,为后续探索H4K20me在砷毒作用中的具体调控机制提供了重要线索。

(志谢:感谢在实验设计和实施中给予帮助的岑延利、王庆陵)

参考文献

- [1] 郭秀琴, 郭小娟, 刘志跃. 砷致癌机制的研究进展[J]. 中国地方病学杂志, 2015, 34(1): 74-75.
- [2] 张爱华. 砷与健康[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 1-3.
- [3] 张巧丽, 乌日娜. 地方性砷中毒发病机理研究进展[J]. 内蒙古医学杂志, 2011, 43(9): 1074-1076.
- [4] Ren X, McHale CM, Skibola CF. An emerging role for epigenetic dysregulation in arsenic toxicity and carcinogenesis[J]. Environ Health Perspect, 2011, 119(1): 11-19.
- [5] 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.
- [6] 牛林梅, 章征保, 曾晓雯, 等. 组蛋白修饰改变在亚砷酸钠毒性效应中的作用研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2014, 26(2): 88-93.
- [7] 章征保, 李道传, 牛林梅. 组蛋白修饰在亚砷酸钠抑制细胞双链断裂修复中的作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(S1): 19.
- [8] Southall SM, Cronin NB, Wilson JR. A novel route to product specificity in the Suv4-20 family of histone H4K20 methyltransferases[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 42(1): 661-671.
- [9] Wu H, Sitarheyeva A, Zeng H, et al. Crystal structures of the human histone H4K20 methyltransferases SUV420H1 and SUV420H2[J]. FEBS Lett, 2013, 587(23): 3859-3868.
- [10] Jørgensen S, Schotta G, Sørensen CS. Histone H4 Lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(5): 2797-2806.
- [11] Beck DB, Oda H, Shen SS, et al. PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription[J]. Genes Dev, 2012, 26(4): 325-337.
- [12] Tuzon CT, Spektor T, Kong X, et al. Concerted activities of distinct H4K20 methyltransferases at DNA double-strand breaks regulate 53BP1 nucleation and NHEJ-directed repair[J]. Cell Rep, 2014, 8(2): 430-438.
- [13] 李成贵, 李军, 张爱华, 等. 组蛋白H4第20位赖氨酸甲基化修饰与燃煤砷暴露人群DNA损伤修复的关系[J]. 中国地方病学杂志, 2016, 35(6): 412-416.
- [14] 凌敏, 刘起展. 砷所致表观遗传改变与致癌作用的研究进展[J]. 中国地方病学杂志, 2012, 31(1): 107-110.
- [15] Cantone L, Nordio F, Hou L, et al. Inhalable metal-rich air particles and histone H3K4 dimethylation and H3K9 acetylation in a cross-sectional study of steel workers[J]. Environ Health Perspect, 2011, 119(7): 964-969.
- [16] Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(1): 7-18.

(收稿日期: 2016-07-12; 录用日期: 2016-11-02)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 丁瑾瑜)