

苯并[a]芘诱发细胞恶性转化过程中基因组总体 DNA 甲基化改变

陶功华¹, 庄志雄², 杨淋清², 龚春梅², 刘庆成², 刘建军², 肖萍¹

摘要: [目的] 观察苯并[a]芘(BaP)诱导人支气管上皮细胞(16HBE)恶性转化过程中基因组总体 DNA 甲基化水平的改变。[方法] 采用 40.0 μmol/L BaP 长期诱导 16HBE 细胞, 构建恶性转化细胞模型, 分别采用 5-甲基胞嘧啶免疫荧光和高效毛细管电泳技术从定性和定量的角度动态检测细胞全基因组总体 DNA 甲基化水平的变化趋势, 同时监测 DNA 甲基转移酶的活性改变。[结果] 在 BaP 诱导 16HBE 细胞 3、6、9、12、15 及 18 周过程中, 细胞基因组 DNA 总体甲基化水平呈时间依赖性降低; 定量分析结果显示, 正常 16HBE 细胞基因组 DNA 总体甲基化百分比(mCpG%)为(4.78±0.58)%, 各诱导阶段细胞的 mCpG% 值分别为(4.62±0.39)%、(3.82±0.39)%、(4.07±0.40)%、(3.27±0.31)%、(2.63±0.21)%和(2.48±0.15)%。随着诱导时间的延长, 16HBE 细胞中总体甲基转移酶活性也呈逐渐降低的趋势。[结论] 基因组总体 DNA 甲基化水平进行性降低是 BaP 诱导 16HBE 细胞恶性转化过程中的重要特征, DNA 甲基转移酶活性的降低是导致细胞基因组 DNA 总体甲基化水平降低的主要原因。

关键词: 苯并[a]芘; 细胞转化; 表观遗传学; DNA 甲基化; 甲基转移酶

Genomic DNA Methylation in Benzo(a)pyrene-Induced Cell Malignant Transformation TAO Gong-hua¹, ZHUANG Zhi-xiong², YANG Lin-qing², GONG Chun-mei², LIU Qing-cheng², LIU Jian-jun², XIAO Ping¹ (1.Division of Toxicology, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China; 2.Toxicology Laboratory, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China). Address correspondence to XIAO Ping, E-mail: pxiao@scdc.sh.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To observe the changes in genomic DNA methylation profile of benzo(a)pyrene (BaP)-induced malignant transformation of human bronchial epithelial cells (16HBE). [Methods] A malignant transformed 16HBE model was established by 40.0 μmol/L BaP administration. The dynamic cellular genome DNA methylation levels were qualitatively and quantitatively detected by 5-methylcytosine immunofluorescence and high-performance capillary electrophoresis, respectively. The DNA methyltransferase activity was also monitored. [Results] At the selected time spots of 3, 6, 9, 12, 15, and 18 weeks during the 16HBE malignant transformation induced by BaP, the genomic DNA methylation levels decreased in a time-dependent manner, and the genomic DNA methylation percentages (mCpG%) at corresponding time spots were (4.62±0.39)%, (3.82±0.39)%, (4.07±0.40)%, (3.27±0.31)%, (2.63±0.21)% and (2.48±0.15)% respectively, while the mCpG% of the normal 16HBE cells was (4.78±0.58)%. In addition, the methyltransferase activities of the BaP-treated 16HBE cells also decreased in a time-dependent manner. [Conclusion] The reduced genomic DNA methylation level is an important feature in the process of BaP-induced malignant transformation of 16HBE cells, and the reduced DNA methyltransferase activity is the main cause.

Key Words: benzo(a)pyrene; cell transformation; epigenetics; DNA methylation; methyltransferase

苯并[a]芘[benzo(a)pyrene, BaP]是最早发现的环境致癌物之一, 广泛存在于烟囱、烟草烟雾、内燃机尾气及烹饪油烟和熏炸食物等中^[1], 可致肺癌、皮

肤癌和胃癌。BaP 的代谢产物 7, 8-二氢二醇-9, 10-环氧苯并芘(BPDE)是 BaP 致癌活性最强的代谢产物, 可与 DNA 亲核位点共价结合形成加合物, 激活靶细胞内原癌基因和其他关键基因, 从而引起 DNA 氧化损伤和遗传突变, 并最终诱导肿瘤的发生^[2]。由于 BaP 的低诱变性及强致癌性, 提示表观遗传学改变可能在 BaP 致癌过程中起着重要作用, 而 DNA 甲基化是哺乳动物基因表达调控的主要表观遗传学形式。研究表明^[3], DNA 甲基化与肿瘤的发生和演进密切相关, 可通过基因组总体甲基化程度的降低和某些启动

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2014.0079

[基金项目] 国家自然科学基金(编号: 81273127, 81302468, 81172710)

[作者简介] 陶功华(1982—), 男, 博士, 主管医师; 研究方向: 卫生毒理学; E-mail: taogonghua@126.com

[通信作者] 肖萍, E-mail: pxiao@scdc.sh.cn

[作者单位] 1.上海市疾病预防控制中心毒性评价科, 上海 200336;

2.深圳市疾病预防控制中心毒理研究室, 广东 518055

子区甲基化程度的增高造成基因功能的失活,从而导致肿瘤的形成。虽然目前对 BaP 致癌易感基因的 DNA 甲基化调控机制研究得较多,但从全基因组总体 DNA 甲基化的角度研究 BaP 致癌机制,乃至筛选早期敏感分子标志物则鲜有报道。我们前期的研究发现^[4],人支气管上皮细胞(16HBE)经 BaP 短期处理后,细胞基因组 DNA 总体甲基化水平降低,提示基因组 DNA 总体甲基化水平改变可能是 BaP 诱导细胞发生恶性转化的早期重要的分子事件。为了进一步探讨基因组 DNA 总体甲基化水平在 BaP 致癌过程中的作用,本研究拟采用 BaP 诱导人 16HBE 细胞,构建恶性转化细胞模型,动态检测细胞全基因组 DNA 总体甲基化水平的变化趋势,同时监测 DNA 甲基转移酶(DNMTs)的活性变化,探讨 BaP 诱发细胞恶性转化过程中基因组总体 DNA 甲基化修饰的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

16HBE 细胞由美国加利福尼亚大学 Gruenert 教授赠送;BaP 为美国 Sigma 公司产品,用丙酮配置成 10 mmol/L 的储液备用。

1.2 主要试剂

最低必需培养基(MEM)(美国 GIBCO 公司);Anti-5-methylcytosine Mouse mAb(美国 Calbiochem 公司),Goat anti-mouse IgG F(ab')₂-FITC(Santa Cruz 公司),Albumin Bosine(加拿大 Bio Basic 公司),4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(美国 Biotium 公司);碱性磷酸酶、核酸酶 P1(美国 Sigma 公司),脱氧鸟苷(dG)、脱氧腺苷(dA)、脱氧胸苷(dT)、脱氧胞苷(dC)和 5-甲基脱氧胞苷(5-mdC)5 种标准品均由美国 Sigma 公司提供;核蛋白抽提试剂盒(中国南京凯基生物),蛋白定量试剂盒(瑞典 Amersham Biosciences 公司),DNA 甲基化转移活性/抑制分析试剂盒(美国 Epigentek 公司)。

1.3 细胞培养及恶性转化模型构建

16HBE 细胞用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基在 37℃、5%CO₂、饱和湿度的环境中培养。待细胞生长至约 70% 汇合度时,予以 40.0 μmol/L BaP 染毒诱导 24 h,随后换普通培养基培养、传代,每周染毒一次;每隔 3 周对细胞的恶性程度进行鉴定,最终确定 BaP 诱导 18 周的 16HBE 细胞为恶性转化细胞模型[benzo(a)pyrene transformed cells, BTC]。同时以

3 μmol/L DNA 甲基化转移酶抑制剂 5-脱氧杂氮胞苷(DAC)处理 BTC 细胞 72 h,作为阳性对照。

1.4 5-甲基胞嘧啶细胞免疫荧光

4% 多聚甲醛固定细胞,分别用 2 mol/L 盐酸和 0.1% 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)破膜处理 5 min,3% 牛血清白蛋白(BSA)于 37℃ 封闭 30 min。5-mdC 抗体 37℃ 孵育 1 h 后,再用相应异硫氰酸荧光素(FITC)标记的二抗孵育 30 min。4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)衬染 2 min,以抗淬灭剂封片,激光共聚焦显微镜观察和摄片。

1.5 高效毛细管电泳^[5]

取 3 μg 纯化后的 DNA 样品,沸水煮 2 min 后,加入 0.75 μL ZnSO₄ 溶液(10 mmol/L)和 1.25 μL 核酸酶 P1,于 37℃ 孵育 16 h。短暂离心后各加 1.25 μL Tris(0.5 mol/L, pH=8.3)和 0.75 μL 碱性磷酸酶,于 37℃ 继续孵育 3 h 后上毛细管电泳仪进行测定。检测条件:电泳缓冲液为 60 mmol/L 十二烷基硫酸钠(SDS),48 mmol/L NaHCO₃(pH=9.6);电泳电压为 20 kV,毛细管有效分离长度为 55 cm,汞灯,紫外检测波长 254 nm。

1.6 DNA 甲基转移酶(DNMTs)活性检测

分别抽提 BaP 诱导 3、6、9、12、15 周及 BTC 细胞的核蛋白,经定量后,按照甲基转移酶活性检测试剂盒说明书对抽提的核蛋白中 DNMTs 活性进行测定。

1.7 统计学分析

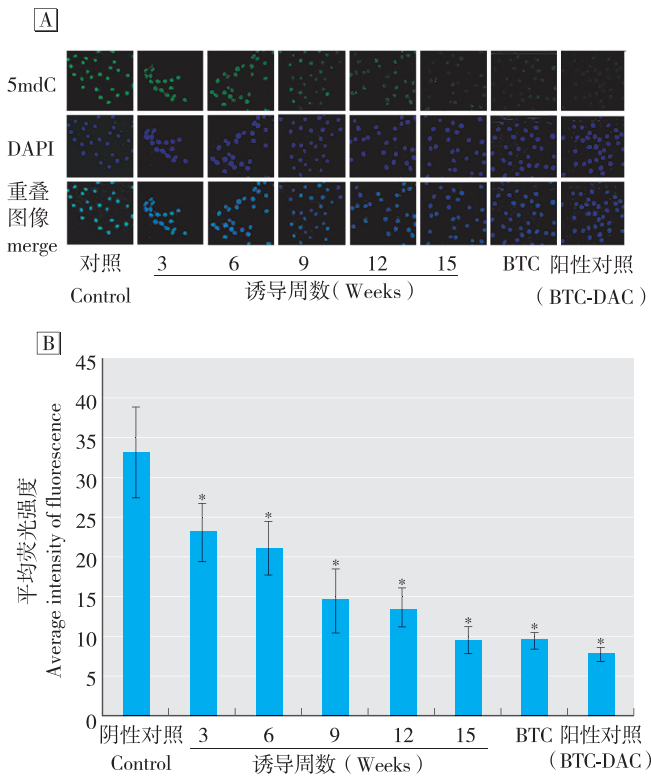
使用 SPSS 16.0 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均数的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),进一步的两两比较采用 Dunnett-*t'* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 基因组 DNA 总体甲基化水平

2.1.1 5-甲基胞嘧啶细胞免疫荧光 利用 5-mdC 抗体进行细胞免疫荧光实验,从形态学上观察恶性转化各阶段细胞基因组 DNA 甲基化的定位,并比较其平均荧光强度的变化趋势。结果如图 1-A 所示,在 BaP 诱导 16HBE 细胞恶性转化过程中,与正常 16HBE 细胞相比,随着 BaP 诱导时间的延长,各阶段细胞基因组 DNA 总体甲基化水平呈时间依赖性降低。用 Image J 图像分析软件对平均荧光强度进行分析,结果如图 1-B 所示,与正常对照组细胞相比,BaP 诱导恶性转化的 6 个时间阶段细胞 5-甲基胞嘧啶平均荧光强度分别降低了 30.2%、36.5%、56.0%、59.1%、71.4% 和

71.3%; BTC 细胞经 DAC 处理 72h 后, 其 5-甲基胞嘧啶平均荧光强度又降低了 17.6%。



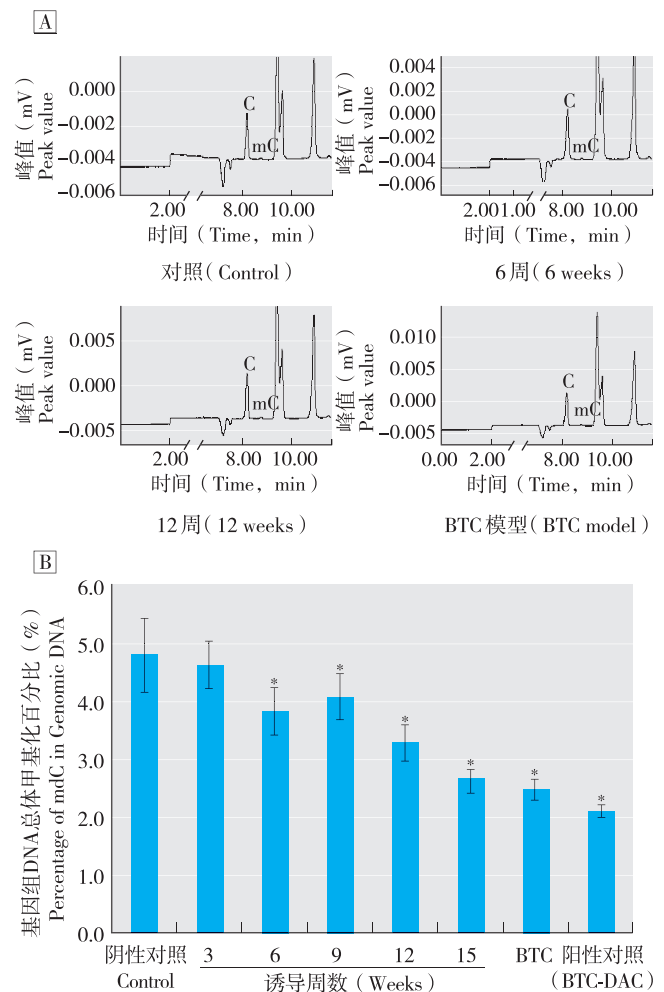
[注] ①与正常对照组比较, *: $P < 0.05$ 。②A: 各阶段细胞 5-甲基胞嘧啶荧光图; B: 平均荧光强度变化趋势。

[Note] ①Compared with the control group, *: $P < 0.05$. ②A: The representative fluorescence images of 5-methylcytosine in BaP-induced 16HBE over time; B: Alterations of average fluorescence intensity in 16HBE.

图 1 BaP 诱导各阶段 16HBE 细胞恶性转化细胞基因组 DNA 总体甲基化水平

Figure 1 Alterations of genomic DNA methylation level in BaP-induced 16HBE malignant transformation

2.1.2 基因组 DNA 总体甲基化百分比 为了进一步定量分析 BaP 诱导恶性转化各阶段细胞的基因组 DNA 甲基化水平, 我们采用 HPCE 技术进行测定。部分阶段细胞样品中脱氧核苷成分的电泳出峰图见图 2-A; 对基因组 DNA 总体甲基化百分比 (percentage of methylated CpG site, mCpG%) 进行分析得到各阶段细胞 mCpG% 值变化趋势如图 2-B 所示。结果显示, 正常 16HBE 细胞中平均 mCpG% 值为 $(4.78 \pm 0.58)\%$, 随着 BaP 诱导时间的延长, 6 个阶段细胞的 mCpG% 值分别为 $(4.62 \pm 0.39)\%$ 、 $(3.82 \pm 0.39)\%$ 、 $(4.07 \pm 0.40)\%$ 、 $(3.27 \pm 0.31)\%$ 、 $(2.63 \pm 0.21)\%$ 和 $(2.48 \pm 0.15)\%$; BTC 细胞经 DAC 处理 72h 后, 其 mCpG% 值进一步下降为 $(2.11 \pm 0.09)\%$ 。



[注] ①与正常对照组比较, *: $P < 0.05$ 。②A: 部分阶段样品毛细管电泳出峰图; B: DNA 总体甲基化百分比变化趋势。

[Note] ①Compared with the control group, *: $P < 0.05$. ②A: The representative graphs of capillary electrophoresis; B: Alterations of genomic methylated DNA percentage.

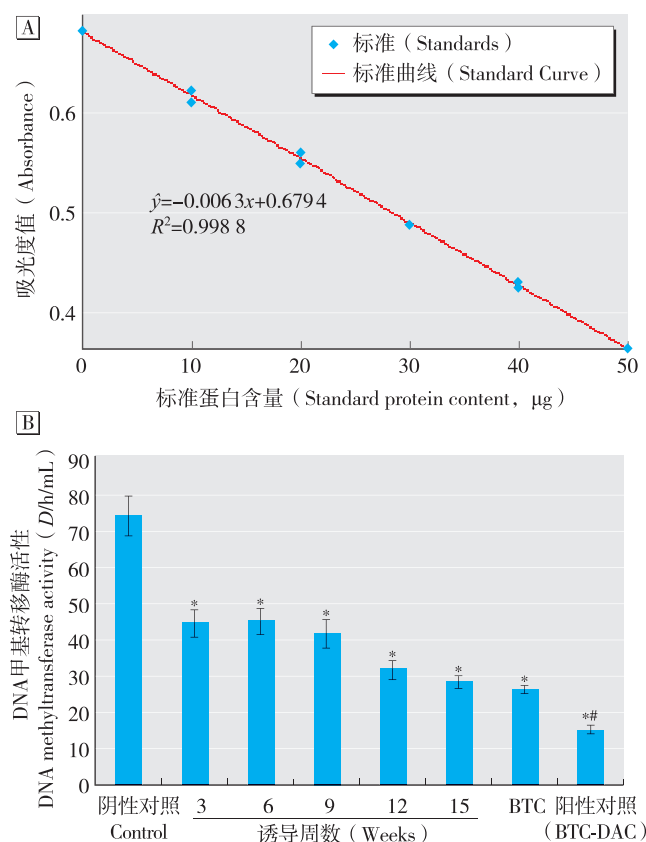
图 2 BaP 诱导各阶段 16HBE 细胞恶性转化过程中基因组 DNA 总体甲基化百分比

Figure 2 Alterations of genomic methylated DNA percentage in BaP-induced 16HBE malignant transformation

2.2 胞内总体 DNA 甲基转移酶活性 (DNMTs)

利用类 ELISA 原理对胞内总体 DNMTs 的活性进行检测, 其结果包括从头甲基化和维持甲基化酶活性两个方面, 共包含 DNMT-1、DNMT-2、DNMT-3a 和 DNMT-3b 四种甲基转移酶的活性。核蛋白定量标准曲线见图 3-A, 线性方程的 R^2 值为 0.9988。调整各反应体系中总核蛋白量至相同水平后, 检测结果如图 3-B 所示, 16HBE 细胞经 BaP 诱导恶性转化过程中, 随着诱导时间的延长, 各阶段细胞中总体 DNMTs 活性呈逐渐降低的趋势; 其中, 12、15 周和 BTC 组细胞中总体 DNMTs 活性较正常 16HBE 细胞分别降低了 57.0%、

61.5% 和 64.3%。BTC 细胞经 DAC 处理 72 h 后, 其总体 DNMTs 活性进一步下降了 41.7%。



[注] ①与正常 16HBE 细胞比较, *: $P < 0.05$ 。与 BTC 细胞比较, #: $P < 0.05$ 。② A: 核蛋白定量标准曲线; B: 各阶段胞内 DNMTs 活性。

[Note] ① Compared with the control group, *: $P < 0.05$. Compared with the BTC, #: $P < 0.05$. ② A: Standard curve of nucleoprotein quantification; B: Alterations of cellular DNA methyltransferase activity.

图 3 BaP 诱导各阶段 16HBE 细胞恶性转化过程中 DNMTs 活性

Figure 3 Alterations of cellular DNA methyltransferase activity in the process of BaP-induced 16HBE malignant transformation

3 讨论

DNA 甲基化是哺乳动物基因表达调控的主要表观遗传学形式。近年来研究揭示, 全基因组 DNA 低甲基化是肿瘤细胞的重要特征^[6], 可导致染色体对称重组和非对称重组现象频繁发生, 染色体不稳定性明显增加, 进而导致基因融合、缺失、扩增等一系列突变; 此外, 基因组 DNA 低甲基化还可诱导原癌基因和转座子成分活化, 基因的印迹缺失, 最终诱发肿瘤^[7-8]。POGRIBNY 等研究发现^[9], 小鼠细胞在受到电离辐射后基因组 DNA 迅速出现广泛低甲基化, 呈剂量依赖性, 且可长期稳定存在; 同时, 辐射小鼠不同组织基因组 DNA 低甲基化的程度与 DNA 损伤水平呈正比。

本研究组前期采用结晶型硫化镍诱导 16HBE 细胞发生恶性转化, 对细胞基因组 DNA 总体甲基化水平进行检测发现, 无论是短期诱导还是恶性转化细胞模型, 基因组 DNA 总体甲基化水平均出现降低^[10]。上述研究提示, 基因组 DNA 低甲基化可能是细胞对环境化学物诱导 DNA 损伤的即时适应性反应, 是细胞癌变启动阶段的早期驱动力。

本研究首先采用 BaP 长期诱导 16HBE 细胞构建恶性转化细胞模型, 并在诱导过程中分别利用 5-甲基胞嘧啶免疫荧光和高效毛细管电泳技术从定性和定量的角度监测细胞基因组 DNA 总体甲基化水平的动态变化。结果发现, 在 BaP 诱导早期, 未发生明显恶性转化的 16HBE 细胞基因组 DNA 已出现一定程度的降低; 而随着诱导时间的延长, 细胞基因组 DNA 总体甲基化水平呈逐渐降低的趋势。SMITH 等^[11]研究发现, 基因组 CpG 位点的 5-甲基化胞嘧啶 (5-mCs) 是香烟烟雾中多环芳烃致癌物 BaP 的优先结合位点, 从而在人类肺癌发生中形成重要的损伤热点。因此, 致癌物与肿瘤相关基因编码区 5-mCs 的结合可引起这些基因功能缺失或突变频率增加, 加速肿瘤发生的进程。目前, 很多关于肿瘤组织或细胞中 DNA 甲基化水平的研究只涉及到某个终点, 其实在肿瘤的发展过程中, DNA 甲基化的状态是逐渐变化的。肿瘤细胞基因组 DNA 低甲基化的程度与肿瘤进展、肿瘤大小和恶性程度都存在密切的关系, 肿瘤细胞 DNA 总体甲基化水平越低, 肿瘤的恶性程度也越大, 这可能是恶性肿瘤组织异质性的重要原因之一^[12]。本研究对恶性转化过程中 6 个阶段 16HBE 细胞的总体甲基化水平进行动态研究, 所得出的结论与上述观点一致。

目前, 关于基因组 DNA 总体甲基化水平降低对肿瘤发生的具体作用机制还不明确, 主要存在以下几个观点: (1) 基因组不稳定性增加。CHEN 等^[13]对 DNMT-1 基因失活的胚胎干细胞进行标记基因分析, 发现其染色体发生丢失, 和野生型细胞相比, DNMT-1 基因缺陷的胚胎干细胞基因组不稳定性增加。(2) 癌基因的活化。De JONG 等^[14]发现, 在非小细胞肺癌及吸烟志愿者的支气管组织中, 多数黑色素瘤抗原基因的低甲基化状态与其 mRNA 表达增高密切相关。(3) 转座子的异常表达。转座子是人类基因组中含量丰富的可移动基因序列, 主要包括 LINE-1、HERV-K 等, 它们是插入突变的重要参与因素, 正常情况下被

甲基化而转录沉默;当基因组 DNA 总体甲基化水平降低时,这些序列可能会因为去甲基化而被激活,引起插入突变,最终导致肿瘤的发生^[15]。

一般而言,机体 DNA 甲基转移酶活性的改变是引起基因组 DNA 总体甲基化水平变化最直接的原因。本研究进一步对恶性转化过程中各阶段细胞的总体 DNA 甲基转移酶活性进行检测,结果显示,随着 BaP 诱导时间的延长,各阶段细胞中总体 DNA 甲基转移酶活性呈逐渐降低的趋势。在大多正常组织中, DNMT-1、DNMT-3a 和 DNMT-3b 三种转录物广泛、协同地表达^[16],共同调节 DNA 甲基化水平和模式。因此,在 BaP 诱导 16HBE 细胞恶性转化过程中,虽然我们发现总体 DNA 甲基转移酶活性的降低是引起细胞基因组 DNA 总体甲基化水平降低的主要原因,但各种 DNA 甲基转移酶之间的相互作用及调控机制尚需进一步研究。

综上所述,在 BaP 诱导人支气管上皮细胞 16HBE 恶性转化过程中,基因组 DNA 总体甲基化水平呈进行性降低,尤其在 BaP 诱导的早期,细胞基因组 DNA 总体甲基化水平已经出现了明显降低,而 DNA 甲基化转移酶活性的降低是导致细胞基因组 DNA 总体甲基化水平降低的主要原因。研究表明,基因组 DNA 低甲基化可能是导致细胞基因组不稳定性增加的主要原因,在人类细胞恶性转化早期起重要作用,可为筛选环境化学物致癌早期生物标志物提供一定依据。

•作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] LIU G, NIU Z, Van NIEKERK D, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from coal combustion: emissions, analysis, and toxicology [J]. Rev Environ Contam Toxicol, 2008, 192: 1-28.
- [2] BURCZYNSKI ME, PENNING TM. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor [J]. Cancer Res, 2000, 60(4): 908-915.
- [3] KWONG J, LO KW, TO KF, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(1): 131-137.
- [4] 陶功华, 龚春梅, 杨淋清, 等. 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 I 在苯并(a)芘诱导人支气管上皮细胞 DNA 甲基化改变中的作用 [J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(5): 410-415.
- [5] 张慧敏, 陶功华, 杨建平, 等. 毛细管胶束电动色谱测定基因组 DNA 甲基化水平 [J]. 中华预防医学杂志, 2010, 44(6): 539-541.
- [6] BAYLIN SB. DNA methylation and gene silencing in cancer [J]. Nat Clin Pract Oncol, 2005, 2(Suppl 1): S4-S11.
- [7] GUERRERO-PRESTON R, SANTELLA M, BLANCO A, et al. Global DNA hypomethylation in liver cancer cases and controls: a phase I preclinical biomarker development study [J]. Epigenetics, 2007, 2(4): 223-226.
- [8] KISSELJOVA NP, KISSELJOV FL. DNA demethylation and carcinogenesis [J]. Biochemistry (Mosc), 2005, 70(7): 743-752.
- [9] POGRIBNY L, RAICHEB J, SLOVACK M, et al. Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 320(4): 1253-1261.
- [10] 杨淋清, 纪卫东, 陶功华, 等. 结晶型硫化镍诱发细胞恶性转化过程中基因组总体 DNA 甲基化的改变 [J]. 中华预防医学杂志, 2010, 44(7): 622-625.
- [11] SMITH LE, DENISSENKO MF, BENNETT WP, et al. Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(10): 803-811.
- [12] LI QL, ITO K, SAKAKURA C, et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer [J]. Cell, 2002, 109(1): 113-124.
- [13] CHEN RZ, PETTERSSON U, BEARD C, et al. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates [J]. Nature, 1998, 395(6697): 89-93.
- [14] De JONG WK, VERPOOTEN GF, KRAMER H, et al. Promoter methylation primarily occurs in tumor cells of patients with non-small cell lung cancer [J]. Anticancer Res, 2009, 29(1): 363-369.
- [15] ROBERTSON KD. DNA methylation and human disease [J]. Nat Rev Genet, 2005, 6(8): 597-610.
- [16] ROBERTSON KD, UZVOLGYI E, LIANG G, et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors [J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(11): 2291-2298.

(收稿日期: 2013-11-25)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 丁瑾瑜)