

# 长期低剂量甲醛染毒对永生化人支气管上皮细胞 16HBE 部分癌症相关基因启动子区甲基化的影响

杨淋清<sup>1</sup>, 吴德生<sup>1</sup>, 刘庆成<sup>1</sup>, 龚春梅<sup>2</sup>, 张文娟<sup>2</sup>, 胡恭华<sup>1</sup>, 周 丽<sup>1</sup>,  
黄新风<sup>1</sup>, 刘建军<sup>1</sup>, 庄志雄<sup>1</sup>

(1. 深圳市疾病预防控制中心现代毒理学重点实验室 卫生毒理医学重点实验室, 广东 深圳 518055;  
2. 深圳市慢性病防治院, 广东 深圳 518020; 3. 南方医科大学热带医学与  
公共卫生学院, 广东 广州 510515)

**摘要:** **目的** 探讨低剂量甲醛长期染毒对永生化人支气管上皮细胞 16HBE 癌症相关基因启动子区甲基化水平的影响。**方法** 16HBE 细胞每周染毒甲醛  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  24 h, 连续 24 周, 分别于染毒 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 和 24 周提取 RNA 或 DNA, 应用 DNA 甲基化相关酶消化结合荧光定量 PCR 的方法观察 24 个癌症相关基因启动子区甲基化水平的变化; 应用荧光定量 PCR 的方法观察染毒对亚甲基四氢叶酸还原酶基因 (*MTHFR*) 和成对盒基因 (*PAX5*) 基因表达的时间-效应关系。**结果** 与正常对照组 16HBE 细胞相比, 甲醛染毒细胞 4 个基因甲基化水平显著改变, 2 个基因甲基化程度升高, 2 个基因甲基化程度降低; 而在阳性对照人非小细胞癌上皮细胞 A549 细胞中有 9 个基因甲基化水平发生显著变化, 其中 3 个基因甲基化水平升高, 6 个基因甲基化水平降低; 甲醛染毒 16HBE 细胞和 A549 细胞 *MTHFR* 基因均发生高甲基化改变, *PAX5* 基因均出现低甲基化改变。与正常对照组相比, 甲醛染毒 24 周的细胞中, *MTHFR* 基因启动子区甲基化水平升高, 非甲基化 DNA 含量降低 58.2%, 而 *PAX5* 基因启动子区甲基化水平降低, 非甲基化 DNA 含量升高 27.1%; 随着甲醛染毒时间延长, *MTHFR* 基因表达逐渐降低, 而 *PAX5* 基因表达逐渐升高。**结论** 低剂量甲醛长期染毒可以使 *MTHFR* 基因和 *PAX5* 基因启动子区甲基化水平异常, 进而引起基因表达水平改变。

**关键词:** 甲醛; 亚甲基四氢叶酸还原酶基因; 成对盒基因; DNA 甲基化

中图分类号: R996 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002(2013)03-0335-06

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.03.005

目前国内外关于甲醛急性毒性、靶器官毒性、遗传毒性的研究报道已有很多。已有大量研究证实, 甲醛可以通过影响细胞凋亡、对生物大分子(如 DNA 和蛋白质)造成氧化损伤等机制, 引起组织细胞癌变, 并且还可引起 DNA 链断裂、DNA 链间交联、DNA-蛋白质交联等遗传毒性<sup>[1]</sup>, 但是甲醛致癌的确切机制仍然没有完全明了。近年来迅猛发展的表观遗传领域的研究引领了新一轮遗传学研究热潮, 表观遗传研究的手段应用到毒理学范畴也为全

面评价外源化学物质的毒性提供了新的思路。研究表明, 部分与 DNA 损伤修复、细胞周期、增殖、分化、凋亡调控、药物代谢、激素反应以及细胞黏附等功能相关的基因启动子区的甲基化水平在癌症的发生、发展过程中具有重要作用<sup>[2]</sup>, 同时基因组 DNA 整体低甲基化也可以显著影响基因组的稳定性。在前期研究中发现, 应用低剂量甲醛长期连续作用于人支气管上皮细胞 16HBE 可以引起细胞基因组 DNA 整体甲基化水平的显著降低<sup>[3]</sup>。本研究拟观察低剂量甲醛长期连续染毒对 16HBE 细胞部分癌症相关基因启动子甲基化水平的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及试剂

16HBE 细胞由中山大学陈雯教授赠送。人非小细胞癌上皮细胞 A549 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。基因组

**基金项目:** 国家自然科学基金(30700673); 国家自然科学基金(81172710); 国家自然科学基金(81001259); 深圳市科技研发资金基础研究计划项目(JC201105180762A); 深圳市科技计划项目(201202097)

**作者简介:** 杨淋清(1978-), 女, 副主任医师, 博士, 主要从事生化与分子毒理学研究。

**通讯作者:** 庄志雄, E-mail: zxzhuang2007@126.com, Tel: (0755)25639066

DNA 提取试剂盒, DNA 甲基化相关酶试剂盒 (Methyl-Profiler DNA Methylation Enzyme Kit) 和 人 肺 癌 相 关 基 因 启 动 子 区 DNA 甲 基 化 PCR 检 测 试 剂 盒 (Methyl-Profiler DNA Methylation PCR Array System, Human Lung Cancer Signature Panel, MeAH-041A), 均 购 自 Qiagen 公 司。

## 1.2 仪器

HFSafe-1200/C 型生物安全柜, HF212uv 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 (上海力申科学仪器公司), 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), ABI PRISM 7900HT (美国 Applied Biosystems 公司), 生物分析仪 2100 (美国 Agilent 公司)。

## 1.3 细胞培养及染毒

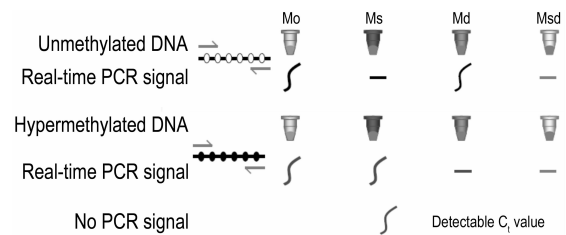
16HBE 细胞培养在含有 10% 胎牛血清的 MEM 完全培养基中, 置于 37℃ 恒温, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的恒温培养箱中培养, 待其融合度达到 80% 左右时, 用含 0.25% 胰酶-乙二胺四乙酸 (EDTA) 液进行消化传代。待 16HBE 细胞生长至约 70% ~ 80% 汇合度时, 根据既往研究选择的剂量<sup>[4]</sup>, 予以甲醛 10.0 μmol·L<sup>-1</sup> 染毒 24 h, 随后换正常培养基培养、传代, 每周染毒 1 次, 连续染毒 24 周, 分别在染毒 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 和 24 周后, 收集细胞提取 RNA 和 DNA 进行基因表达及甲基化检测。A549 细胞培养在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中, 37℃ 恒温, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的恒温培养箱持续培养, 融合度达到 80% ~ 90% 时, 用 0.25 胰酶-EDTA 溶液消化传代。

## 1.4 甲基化相关内切酶酶解结合荧光定量 PCR 检测基因启动子区甲基化水平

### 1.4.1 方法原理

本研究选用 Qiagen 公司开发的以限制性内切酶消化为基础的甲基化分析技术来检测相关基因启动子区甲基化状态, 其基本原理如图 1 所示<sup>[5]</sup>: 甲基化敏感性内切酶体系 (methylation sensitive digest, Ms) 切割未甲基化和部分甲基化的 DNA, 而对高度甲基化的 DNA 无作用; 甲基化依赖性内切酶切体系 (methylation dependent digest, Md) 切割高度甲基化的 DNA, 对未甲基化和部分甲基化 DNA 无作用; 双重内切酶体系 (double digest, Msd) 切割所有甲基化和未甲基化 DNA, 用以测量背景和对酶切不敏感组分; 无酶模拟体系 (mock digest, Mo) 作为反映 DNA 总量的对照。应用荧光定量 PCR 的方法检测 4 个体系中的 DNA 含量, 进而根据 Qiagen 公司提供的在线分析软件计算高度甲基化 (hypermethylated, HM) DNA、中度甲基化 (inter-

mediately methylated, IM) DNA、未甲基化 (unmethylated, UM) DNA 的相对含量。



**Fig. 1 Schematic diagram of DNA methylation detection method<sup>[5]</sup>.** Mo: mock digest; Ms: methylation sensitive digest; Md: methylation dependent digest; Msd: double digest.

### 1.4.2 操作步骤

每个 DNA 样品经 Ms, Md, Msd 和 Mo 酶切体系 37℃ 消化过夜后, 65℃ 保温 5 min 终止消化。经 4 个体系消化后的 DNA, 分别与 PCR 反应缓冲液混合形成 PCR 反应体系, 分别加样于已预先铺制 24 对癌症相关基因启动子区引物的 96 孔反应板上, 基因列表见表 1<sup>[6]</sup>。充分混匀并短暂离心后, 在 ABI PRISM 7900HT 荧光定量 PCR 仪上进行荧光定量 PCR 检测, 反应条件为: 95℃ 预变性 10 min; 99℃ 变性 30 s, 72℃ 退火 1 min, 3 个循环; 97℃ 变性 15 s, 72℃ 退火 1 min, 40 个循环。首先通过比对 Msd 和 Mo 两个体系的 PCR 扩增结果, 只有当符合  $Msd - Mo > 2$  时, 表示酶切体系有效, 继续根据 4 个酶切体系样品的 PCR 扩增结果, 应用 Qiagen 公司专用的在线分析软件<sup>[6]</sup> 来确定特定基因启动子区甲基化水平。

### 1.4.3 结果判断标准

在高通量检测基因启动子区 CpG 岛甲基化水平的方法中, 通常认为甲基化程度改变高于 20% 的为有显著差异。本研究以 3 种甲基化模式中任意一种变化高于 20% 作为甲基化模式发生显著改变的判断标准。

## 1.5 实时荧光定量 PCR 法测定亚甲基四氢叶酸还原酶基因和成对盒基因 5 mRNA 表达

按试剂盒说明书提取各处理组细胞总 RNA, 紫外分光光度计定量, 并按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。利用 Primer3 软件设计基因的引物并由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列见表 2。反应体系: 10 μl SYBR 反应缓冲液 (含 Taq 酶), 0.4 μl 参比荧光缓冲液 (50 ×), 0.4 μl 上、下游引物 10 μmol·L<sup>-1</sup>, 2 μl cDNA 模板, 6.8 μl 无菌双蒸水, 总体积为 20 μl。在 ABI PRISM 7900HT 荧光定量 PCR 仪上进行荧光定量 PCR 检

**Tab. 1 Gene list of DNA methylation detection panel<sup>[6]</sup>**

UniGene	RefSeq	Gene symbol	Description
Hs. 171939	NM_001163	APBA1	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 1
Hs. 158932	NM_000038	APC	adenomatous polyposis coli
Hs. 370510	NM_014333	CADM1	cell adhesion molecule 1
Hs. 461086	NM_004360	CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
Hs. 654386	NM_001257	CDH13	cadherin 13, H-cadherin (heart)
Hs. 106070	NM_000076	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)
Hs. 512599	NM_000077	CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
Hs. 72901	NM_004936	CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)
Hs. 522891	NM_000609	CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
Hs. 154654	NM_000104	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
Hs. 134296	NM_006094	DLC1	deleted in liver cancer 1
Hs. 715588	NM_002012	FHIT	fragile histidine triad gene
N/A	MIMAT0000062	Has-let-7a	
N/A	MIMAT0000422	Has-miR-124	
Hs. 501522	NM_002412	MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
Hs. 195364	NM_000249	MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 ( <i>E. coli</i> )
Hs. 214142	NM_005957	MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)
Hs. 4817	NM_002545	OPCML	opioid binding protein/cell adhesion molecule-like
Hs. 654464	NM_016734	PAX5	paired box 5
Hs. 371823	NM_015866	PRDM2	PR domain containing 2, with ZNF domain
Hs. 476270	NM_007182	RASSF1	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1
Hs. 631504	NM_014737	RASSF2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2
Hs. 713546	NM_003012	SFRP1	secreted frizzled-related protein 1
Hs. 78061	NM_003206	TCF21	transcription factor 21

**Tab. 2 Primer sequences of the objective gene**

Gene	Primer	Length/bp
PAX5	F: 5'-CAGATGCGGGGAGACTTGTT-3'	141
	R: 5'-CGAGGCCATGGCTGAATACT-3'	
MTHFR	F: 5'-CTCTCCAGCAACCTGACACC-3'	148
	R: 5'-TTCCTCTGGCTTCGTTCCACC-3'	
β-Actin	F: 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	349
	R: 5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	

PAX5: paired box 5; MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase.

测,反应条件为:95℃预变性 30 s;95℃变性 30 s,60℃退火 30 s,40 个循环。应用 PQ Manager1.2 分析软件定量基因相对表达量。

## 2 结果

### 2.1 低剂量甲醛长期染毒对癌症相关基因启动子区甲基化水平的影响

在高通量检测基因启动子区 CpG 岛甲基化水平的方法中,通常认为甲基化程度改变高于 20% 的

为有显著差异。甲醛染毒 16HBE 细胞在 24 个与癌症相关的候选基因中,4 个基因甲基化水平发生了显著改变,分别是脆性组氨酸三联体基因(*fragile histidine triad gene*, *FHIT*)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制物 2B 基因(*cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*, *CDKN2B*)、亚甲基四氢叶酸还原酶基因(*methylenetetrahydrofolate reductase*, *MTHFR*)和成对盒基因(*paired box 5*, *PAX5*)。其中 *FHIT* 和 *MTHFR* 基因甲基化水平增高,*CDKN2B* 和 *PAX5* 基因甲基化水平降低。与正常对照组 16HBE 细胞相比,肺癌阳性对照细胞 A549 9 个基因启动子甲基化水平发生显著改变(表 3),其中甲基化水平增加的基因包括:腺瘤性结肠息肉病基因(*adenomatous polyposis coli*, *APC*)、钙黏素基因 13(*cadherin 13*, *H-cadherin*, *CDH13*)和 *MTHFR* 等 3 个基因,而细胞黏附分子 1(*CADM1*)、*CDKN1C*、趋化因子(C-X-C 基元)配体 12 基因[*chemokine (C-X-C motif) ligand 12*, *CXCL12*]、PR 结构域锌指蛋白 2 基因(*PRDM2*)、*PAX5* 和分泌型卷曲相关蛋白基因(*SFRP1*)等 6 个基因表现为

**Tab.3 Methylation pattern of lung cancer related genes' promoter in 16HBE cells exposed to formaldehyde( FA) 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 24 weeks**

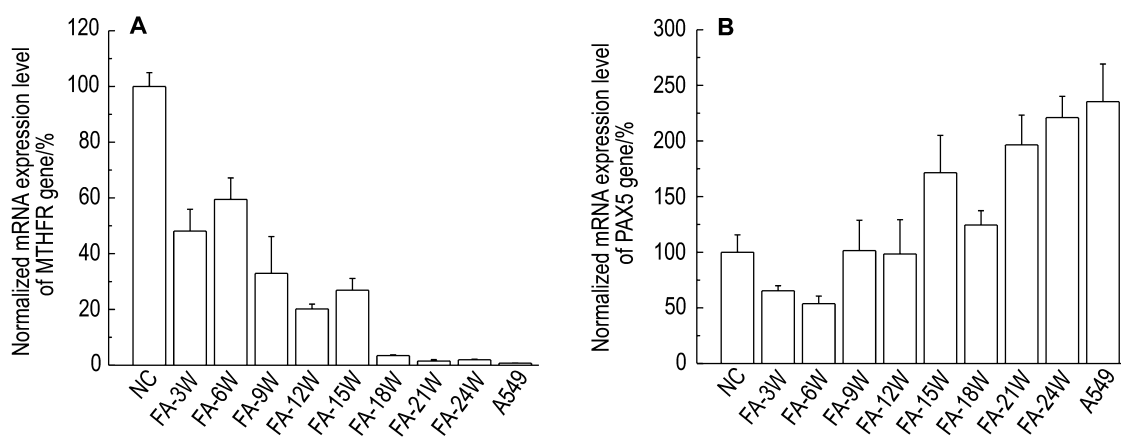
Gene	Unmethylated			Hypermethylated			Intermediately methylated		
	Normal 16HBE	FA exposed 16HBE	A549	Normal 16HBE	FA exposed 16HBE	A549	Normal 16HBE	FA exposed 16HBE	A549
FHIT	99.30%	37.69%	99.84%	0.67%	1.53%	0.16%	0.00%	60.78%	0.00%
CDKN2B	32.40%	53.44%	50.00%	67.60%	46.56%	50.00%	0.00%	0.00%	0.00%
MTHFR	98.71%	40.51%	0.33%	1.29%	3.79%	99.67%	0.00%	55.70%	0.00%
PAX5	3.10%	30.16%	4.96%	96.90%	69.84%	45.97%	0.00%	0.00%	49.07%
APC	99.91%	99.77%	28.16%	0.09%	0.23%	71.84%	0.00%	0.00%	0.00%
CDH13	97.70%	95.31%	0.80%	2.30%	4.69%	23.79%	0.00%	0.00%	75.42%
CADM1	6.50%	8.79%	83.77%	93.50%	91.21%	16.23%	0.00%	0.00%	0.00%
CDKN1C	13.94%	10.05%	99.83%	17.12%	28.60%	0.17%	68.94%	61.35%	0.00%
CXCL12	0.68%	0.92%	12.37%	99.32%	99.08%	5.18%	0.00%	0.00%	82.45%
PRDM2	0.15%	0.31%	99.94%	6.13%	10.46%	0.06%	93.72%	89.23%	0.00%
SFRP1	50.00%	50.00%	75.83%	50.00%	50.00%	24.17%	0.00%	0.00%	0.00%

16HBE cells treated with FA 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 24 h every week and for total 24 weeks.

甲基化水平降低。*MTHFR* 和 *PAX5* 的甲基化水平在甲醛 16HBE 细胞和 A549 细胞中发生了相似的改变。*MTHFR* 基因在正常对照组 16HBE 细胞中呈低甲基化状态,UM 含量为 98.7%,在甲醛染毒 16HBE 细胞中,甲基化水平增高,其中 UM 含量为 40.5%、IM 含量为 55.7%,而在 A549 细胞中呈高甲基化状态, HM 含量达 99.7%。*PAX5* 基因在 16HBE 细胞中高甲基化状态, HM 含量为 96.9%,在甲醛染毒 16HBE 细胞中,甲基化程度降低,其中 HM 含量为 69.8%、UM 含量为 30.2%,而在 A549 细胞中 HM 含量低至 45.97%。

## 2.2 低剂量甲醛长期染毒对 *MTHFR* 和 *PAX5* 基因表达的影响

*MTHFR* 和 *PAX5* 采用荧光定量 PCR 的方法观察基因在低剂量甲醛持续染毒过程中的表达水平的改变。结果显示,随着甲醛染毒时间的延长 *MTHFR* 基因表达水平有逐渐降低的趋势,在癌细胞 A549 中表达量最低,仅为 16HBE 细胞表达水平的 1%左右(图 2A);随着甲醛染毒时间的延长, *PAX5* 基因的表达水平有逐渐升高的趋势,在 A549 细胞中表达水平最高,为正常 16HBE 细胞表达水平的 2.5 倍左右(图 2B)。



**Fig.2 Effect of FA on the mRNA expression of *MTHFR*(A) and *PAX5*(B) genes in 16HBE cells.** When the 16HBE cells grown to 70% –80% confluence, cultures were treated with FA 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 24 h, once a week and for total 24 weeks(24 W). RNA was collected according to the treatment time for 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24 W. NC; normal control.

### 3 讨论

已有研究表明,表观遗传信息紊乱在肿瘤、神经紊乱、糖尿病、发育异常等众多疾病中发挥着重要作用。DNA 甲基化的改变也可能是多种化学物理因子毒性的重要机制。在前一阶段的研究中我们观察到低剂量甲醛长期持续染毒 16HBE 细胞可以引起基因组 DNA 甲基化水平降低,同时 DNA 甲基化相关酶的表达也发生一定改变,并且细胞出现恶性转化趋势<sup>[3]</sup>。

本研究结果显示,在甲醛长期染毒细胞中,4 个候选基因的甲基化程度发生了显著变化, *MTHFR* 和 *FHIT* 基因甲基化程度增高,前者主要生理功能是参与一碳单位代谢,后者生理功能尚未完全明了,但其异常可见于多种肿瘤,尤其以致癌物引起的肿瘤中更为常见;*CDKN2B* 和 *PAX5* 基因甲基化程度降低,前者是调节细胞生物学特性的重要基因,后者在机体早期发育过程中具有重要作用,也是一种对多种肿瘤发生发展具有重要作用的原癌基因。已有研究证实,表观遗传学机制在癌症的发生发展过程中具有重要作用,其中原癌基因的低甲基化和抑癌基因的高甲基化是其表现形式。此外,决定细胞生物学特性及 DNA 修复等相关基因启动子区甲基化水平的改变也参与其中。在作为癌症对照的 A549 细胞中 *APC*, *CDH1* 和 *MTHFR* 基因呈高甲基化改变。既往的研究报道这 3 个基因在癌症组织中也出现了甲基化水平增高的现象<sup>[7-9]</sup>。而另外 6 个甲基化水平降低的基因中包括一个已知的原癌基因 *PAX5* 和 5 个与细胞生物学性状及信号通路相关的基因 (*CADM1*, *CDKN1C*, *CXCL12*, *PRDM2*, *SFRP1*)。其中后 5 个基因在既往的报道中认为其在癌症组织中呈高甲基化改变<sup>[10-13]</sup>。在本研究中其甲基化水平降低原因可能有二:其一,比较对象不同,既往研究中多用癌症组织与癌旁组织比较,而本研究是癌症细胞与支气管上皮细胞的比较;其二,组织类型不同,既往多应用活体组织进行研究,而本研究是应用体外培养的细胞系。结果提示不同类型细胞、组织甲基化水平可能存在一定差异。*MTHFR* 和 *PAX5* 基因甲基化水平在甲醛处理组细胞和 A549 细胞中甲基化水平同时发生改变,*MTHFR* 基因甲基化程度升高、*PAX5* 基因甲基化程度降低。进一步研究发现,随着染毒时间的延长 *MTHFR* 基因表达水平呈逐渐降低趋势,而 *PAX5* 基因表达水平则呈逐渐升高趋势。本世纪初期就有学者发现 *PAX5* 基因启动子区去甲基化在包括肺癌在内的多个肿瘤发生过程中有重要影响<sup>[14]</sup>。*MTHFR* 编码

的酶蛋白可以特异地将 5,10-亚甲基四氢叶酸转化为 5-甲基四氢叶酸,该过程在同型半胱氨酸转化为蛋氨酸、蛋氨酸合成蛋白质、一碳单位代谢等反应中均具有重要作用。其在多种疾病发生发展过程中均扮演一定角色,有研究发现其在癌症组织中呈高甲基化表现<sup>[8]</sup>。本研究结果提示,低剂量甲醛长期染毒可能通过对 *MTHFR* 和 *PAX5* 基因启动子区甲基化水平的调控来影响这两个基因的表达,进而对细胞生物学特性产生影响,使细胞发生恶性转化倾向,但其相关的作用机制仍需进一步探讨。

### 参考文献:

- [1] Schmid O, Speit G. Genotoxic effects induced by formaldehyde in human blood and implications for the interpretation of biomonitoring studies[J]. *Mutagenesis*, 2007, **22** (1):69-74.
- [2] Cheung HH, Lee TL, Rennert OM, Chan WY. DNA methylation of cancer genome[J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2009, **87**(4):335-350.
- [3] Liu Q, Yang L, Gong C, Tao G, Huang H, Liu J, et al. Effects of long-term low-dose formaldehyde exposure on global genomic hypomethylation in 16HBE cells[J]. *Toxicol Lett*, 2011, **205**(3):235-240.
- [4] Liu QC, Yang LQ, Tao GH, Gong CM, Liu JJ, Zhang WJ, et al. The effect of proliferation promoting and DNA damage of low dose formaldehyde on 16HBE cells[J]. *Chin J Dis Control Prev* (中华疾病控制杂志), 2011, **15** (11):927-930.
- [5] Quellhorst G. Simple, Fast and Reliable DNA Methylation Analysis Without Bisulfite [M/OL]. (2008-12-18) [2012-12-25]. [http://www.biomolde/details/SA/methylation\\_2008-12-18pdf](http://www.biomolde/details/SA/methylation_2008-12-18pdf).
- [6] SABioscience. EpiTect Methyl DNA Methylation PCR Data Analysis [EB/OL]. (2012-5-25) [2012-12-25]. [http://www.sabiosciences.com/dna\\_methylation\\_data\\_analysis1.php](http://www.sabiosciences.com/dna_methylation_data_analysis1.php).
- [7] Poursoltan P, Currey N, Pangon L, van Kralingen C, Selinger CI, Mahar A, et al. Loss of heterozygosity of the Mutated in colorectal cancer gene is not associated with promoter methylation in non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2012, **77**(2):272-276.
- [8] Vaissière T, Hung RJ, Zaridze D, Moukheria A, Cuenin C, Fasolo V, et al. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors[J]. *Cancer Res*, 2009, **69**(1):243-252.
- [9] Feng Q, Hawes SE, Stern JE, Wiens L, Lu H, Dong ZM, et al. DNA methylation in tumor and matched normal tissues from non-small cell lung cancer patients[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, **17**(3):645-654.
- [10] Reamon-Buettner SM, Borlak J. Epigenetic silencing of cell adhesion molecule 1 in different cancer progenitor cells of transgenic c-Myc and c-Raf mouse lung tumors [J]. *Cancer Res*, 2008, **68**(18):7587-7596.
- [11] Suzuki M, Mohamed S, Nakajima T, Kubo R, Tian L, Fu-

- jiwara T, *et al.* Aberrant methylation of CXCL12 in non-small cell lung cancer is associated with an unfavorable prognosis[J]. *Int J Oncol*, 2008, **33**(1):113-119.
- [12] Du Y, Carling T, Fang W, Piao Z, Sheu JC, Huang S. Hypermethylation in human cancers of the RIZ1 tumor suppressor gene, a member of a histone/protein methyltransferase superfamily[J]. *Cancer Res*, 2001, **61**(22):8094-8099.
- [13] Licchesi JD, Westra WH, Hooker CM, Machida EO, Baylin SB, Herman JG. Epigenetic alteration of Wnt pathway antagonists in progressive glandular neoplasia of the lung [J]. *Carcinogenesis*, 2008, **29**(5):895-904.
- [14] Palmisano WA, Crume KP, Grimes MJ, Winters SA, Toyota M, Esteller M, *et al.* Aberrant promoter methylation of the transcription factor genes PAX5 alpha and beta in human cancers [J]. *Cancer Res*, 2003, **63**(15):4620-4625.

## Effect of long term contamination of low dose formaldehyde on methylation pattern of promoter of cancer related genes in 16HBE cells

YANG Lin-qing<sup>1</sup>, WU De-sheng<sup>1</sup>, LIU Qing-cheng<sup>1</sup>, GONG Chun-mei<sup>2</sup>, ZHANG Wen-juan<sup>2</sup>, HU Gong-hua<sup>1</sup>, ZHOU Li<sup>1</sup>, HUANG Xin-feng<sup>1</sup>, LIU Jian-jun<sup>1</sup>, ZHUANG Zhi-xiong<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Modern Toxicology of Shenzhen, Shenzhen Center for Disease Prevention and Control, Shenzhen 518055, China; 2. Shenzhen Center for Chronic Disease Control, Shenzhen 518020, China; 3. School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract: OBJECTIVE** To explore the effect of long term contamination of low dose formaldehyde on the methylation pattern of the promoter of 24 cancer related genes in 16HBE cells. **METHODS** The 16HBE cells were taken as objects and A549 cells as positive control. The method that combined the digestion of DNA methylation related enzymes and real-time PCR was applied to detect the methylation status of the promoters of the 24 cancer related genes. Real-time PCR was used to observe the expression levels of *MTHFR* and *PAX5* genes. **RESULTS** Compared with normal 16HBE cells, the methylation pattern of 4 out of 24 genes' changed remarkably in formaldehyde treated 16HBE cells, two were hypermethylated and two were hypomethylated. In A549 cells, the methylation pattern of 9 out of 24 genes' changed remarkably, 3 of them were hypermethylated and 6 of them were hypomethylated. *MTHFR* gene was hypermethylated in both formaldehyde treated 16HBE cells and A549 cells, and *PAX5* gene was hypomethylated in both cells. In the formaldehyde treated 16HBE cells, the non-methylated DNA of *MTHFR* gene decreased by 58.2%, while the non-methylated DNA of *PAX5* gene increased by 27.1%. Along with the contamination of low dose formaldehyde the mRNA expression level of *MTHFR* decreased while the mRNA expression level of *PAX5* increased gradually. **CONCLUSION** The long term contamination of low dose formaldehyde could cause aberrant methylation pattern of *MTHFR* and *PAX5* genes and lead to the mRNA expression level change of the two genes.

**Key words:** formaldehyde; methylenetetrahydrofolate reductase gene; paired box 5 gene; DNA methylation

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China (30700673); National Natural Science Foundation of China (81172710); National Natural Science Foundation of China (81001259); Basic Research Program of the Shenzhen Municipal Science and Technology R & D Foundation (JC201105180762A); and Shenzhen Science and Technology Program (201202097)

**Corresponding author:** ZHUANG Zhi-xiong, E-mail: zxzhuang2007@126.com

(收稿日期: 2012-11-15 接受日期: 2012-12-18)

(本文编辑: 乔虹)