

## 全氟辛烷磺酸促大鼠肝脏 NQO1 甲基化作用\*

沈杰, 夏玮, 万延建, 许冰, 李媛媛, 徐顺清

**摘要:**目的 探讨基因启动子甲基化水平与全氟辛烷磺酸(PFOS)诱导的肝毒性早期过程相关性。方法 在雌性 SD 大鼠受孕后 2~21 d 采用 PFOS(0.1、0.6、2.0 mg/kg)灌胃染毒;在子鼠出生后 21 d 收集肝脏组织样本,用亚硫酸氢钠测序聚合酶链式反应法(BSP)结合质粒克隆后测序,检测烟酰胺腺嘌呤二核苷酸:醌氧化还原酶 1(NQO1)和肉毒碱棕榈酰转移酶 1A(CPT1A)基因启动子区域甲基化状态。结果 与对照组(0%)比较,高剂量 PFOS 组子鼠肝脏 NQO1 基因甲基化状态有所上升,-573、-523、-507 3 个位点分别升高了 10%,而中低剂量组无变化(均为 0%);CPT1A 基因启动子区域甲基化状态无明显变化。结论 出生前暴露于 PFOS 的子鼠肝脏中 NQO1 基因启动子甲基化水平升高。

**关键词:**全氟辛烷磺酸(PFOS);大鼠;NQO1;启动子甲基化;孕期暴露

中图分类号:R 114

文献标志码:A

文章编号:1001-0580(2012)12-1597-03

## Prenatal exposure to PFOS alters individual genes NQO1 promoter methylation levels of liver in postnatal SD rats

SHEN Jie, XIA Wei, WAN Yan-jian, et al (Institute of Environmental Medicine, Key Laboratory of Education Ministry, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wubao, Hubei Province 430030, China)

**Abstract: Objective** To examine the possibility of early epigenetic alteration in perfluorooctane sulphonate (PFOS)-exposed rat liver. **Methods** Pregnant Sprague-Dawley (SD) rats were exposed to PFOS at doses of 0.1, 0.6, and 2.0 mg/kg/d and 0.05% Tween 80 as control by gavage from gestation day 2 to 21. The dams were allowed to give birth and liver samples from weaned (postnatal day 21) offspring rats were analyzed for individual genes such as NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) and carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) promoter methylation level. **Results** In PFOS exposed weaned rats, compared to the control, methylation of critical CpG sites in NQO1 promoter was found up to 10% methylated in the livers of treated rats. **Conclusion** Early induced hypermethylation in critical cytosines within the NQO1 gene promoter region may be a significant biomarker of hepatic PFOS burden, though their direct role in PFOS induced-hepatotoxicity, including its potential carcinogenic action, needs further research.

**Key words:** perfluorooctane sulfonate (PFOS); rat; NQO1; promoter methylation; prenatal exposure.

全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulphonate, PFOS)是一种持续性有机污染物,可通过食物链富集,诱导多种毒效应<sup>[1-2]</sup>;肝毒性和发育毒性是近年来研究热点<sup>[3]</sup>。它能通过胎盘屏障,引起发育毒性<sup>[4]</sup>。研究表明,出生前暴露于不良因素和出生后的健康效应相关<sup>[5]</sup>。近年很多研究着力于寻找与环境因素相关的表观遗传效应,尤其非遗传毒性物质,而 PFOS 就是一种非遗传毒性物质<sup>[3-5]</sup>。其中,基因启动子甲基化状态改变常被作为早期诊断生物标志物<sup>[5]</sup>。本研究主要以基因烟酰胺腺嘌呤二核苷酸:醌氧化还原酶 1 [NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, NQO1]和肉毒碱棕榈酰转移酶 1A (carnitine palmitoyltransferase 1A, CPT1A)为指标,观察 PFOS 孕期暴露是否与出生后断乳期大鼠肝脏

某些基因启动子甲基化状态改变有关。

### 1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** PFOS(瑞典 FlukaChemical 公司);MJ research PTC-400 PCR 扩增仪(美国 MJ research 公司);BioPhotometer 6131 核酸定量测定仪(德国 Eppendorf 公司);ABI-3130xl 测序仪(美国 Applied Biosystems 公司);DNA 提取试剂盒(大连宝生物公司);亚硫酸氢钠和氢醌(美国 Sigma 公司);引物由上海生工生物试剂公司合成;Go HS Taq DNA 聚合酶,琼脂糖凝胶回收试剂盒(美国 Promega 公司);克隆载体 pCRII TA cloning 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);DNA Marker、感受态细菌 Top 10、异丙基-B-D-硫代半乳糖(IPTG)和 5-溴-4-氯-3-吡啶-D-半乳糖苷(x-gal)(北京天根生化科技有限公司)。

**1.2 实验动物** 选用 SPF 级 11 周龄 SD 大鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司)。饲养于湖北省疾病预防控制中心 SPF 动物房[许可证号 SYXK

\* 基金项目:国家自然科学基金(21177046)

作者单位:华中科技大学同济医学院公共卫生学院环境医学研究所 教育部重点实验室 湖北 武汉 430030

作者简介:沈杰(1962-)男,江苏吴江人,讲师,硕士,研究方向:分子毒理。

通讯作者:夏玮, E-mail: 26110072@qq.com

(鄂) 2008 - 0014 ]。鼠笼和鼠水瓶为聚丙烯材料,不含 PFOS 等相关物质。实验动物室温度 22 ~ 25 °C,湿度 30% ~ 40%,光线 12/12 h 循环。常规饲料和饮用水由湖北省疾病预防控制中心的实验动物中心提供。

1.3 动物分组与处理 适应 7 d 后,雌雄大鼠按 2:1 合笼,阴道涂片法检查精子阳性与否,检出当天记为受孕 0 d,将孕鼠分为对照(0.05% Tween 20)和 PFOS 低、中、高剂量组(0.1、0.6、2.0 mg/kg),于受孕 2 ~ 21 d 对孕鼠进行灌胃染毒,根据母鼠体重增长调整灌胃用量;孕鼠自然分娩。哺乳期间停止对母鼠染毒。出生后随机择取每窝 6 只,使之继续生长至断乳期,其余仔鼠弃去。待仔鼠断乳时(出生后 21 d)收集肝脏组织样本,冻存于 -80 °C,备检。多聚甲醛固定肝脏组织,石蜡包埋,切片 4 μm,苏木素 - 伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色。光学显微镜下观察切片。

1.4 亚硫酸氢钠处理 用试剂盒提取基因组 DNA,放 -20 °C 备用。亚硫酸氢钠处理,对修饰后 DNA 纯化,加入 NH<sub>4</sub>OAc 还原碱基,加 NaOH 中和,之后乙醇沉淀 DNA,干燥后重悬于 20 μL TE [10 mM Tris-HCl (pH 8), 0.1 mM EDTA], -20 °C 备用<sup>[6-7]</sup>。

1.5 基因克隆测序 采用亚硫酸氢钠测序聚合酶链式反应法 (bisulfite sequencing polymerase chain reaction, BSP), NQO1 (385 bp) 上下游引物分别为: 5'-TTT GGT TTT TTG GAG GGT TAT ATA G-3', 5'-CAA CTA CTC CCT ATC CAA AAT CTT CTA-3'; 退火温度为 55 °C。CPT1A (308 bp) 上下游引物分别为: 5'-GTG TTG GTA GGT TGT TTT GTT GTA T-3', 5'-CAA ATC AAA ACT ACA AAT TCA AAA C-3', 退火温度为 53 °C。PCR 产物电泳,纯化回收;与克隆载体连接、转化,复苏细菌;涂布 37 °C 过夜,筛选。挑单白色菌落(每个产物挑 10 个克隆)接种于液体培养基中;37 °C 摇过夜,送华大基因武汉分部测序 (Applied Biosystems 3730xl)。

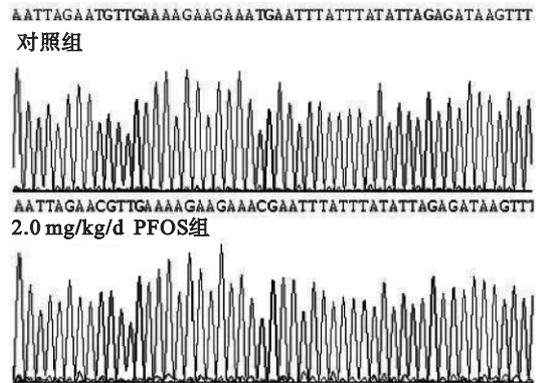
1.6 统计分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,用  $\chi^2$  检验比较基因启动子甲基化水平在剂量组和对照组之间差异。当  $P < 0.05$  时,认为组间差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 PFOS 对肝脏细胞形态影响 经过 PFOS 胚胎早期暴露后,出生后子鼠肝脏光学显微镜下未观察到病理学改变,无肝细胞肿大、空泡化等现象发生。

2.2 NQO1 甲基化状态及基因表达(图 1) 检测结果显示,与对照组比较,高剂量 PFOS 组子鼠肝

脏 NQO1 基因(-573、-523、-507 位点)甲基化状态有所升高,达 10% ( $P < 0.05$ ),中低剂量组无明显改变 ( $P > 0.05$ )。



注: 图为代表性测序图,反应 PFOS 暴露后大鼠肝脏 NQO1 启动子区域关键 CpG 位点(-523、-507)改变。

图 1 大鼠 NQO1 的调控区域序列及 PFOS 暴露后改变状况

2.3 CPT1A 甲基化状态及基因表达(图 2) 表达谱芯片结果提示 PFOS 暴露后,表达改变最明显的 2 个基因中另一个是 CPT1A。CPT1A 的 BSP 检测结果显示实验组和对照组子鼠肝脏中启动子区域均未甲基化。

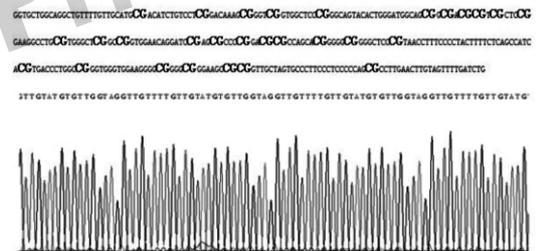


图 2 各组子鼠肝脏组织中 CPT1A 启动子区域甲基化状态(测序代表图)

## 3 讨论

PFOS 有生物累积效应,在人体中含量相当高;PFOS 在职业和非职业暴露人群血清中浓度分别达到了 2 440 和 55.8 μg/L(最大均数)<sup>[1]</sup>。其在人体中半衰期(5.4 年)远大于在大鼠体内半衰期(100 d),人类暴露后果堪忧<sup>[3]</sup>。PFOS 胚胎期暴露后,大鼠肝脏发生了分子水平改变<sup>[6-7]</sup>;包括某些基因调节区域甲基化状态改变,这些基因可通过表观遗传效应在细胞代谢外来化合物或者相关调控方面起作用<sup>[6]</sup>。

研究表明 NQO1 和 CPT1A 是 PFOS 暴露后子鼠肝脏表达改变最明显的 2 个基因<sup>[8]</sup>。本研究结果显示,高剂量组中, NQO1 有 2 个 CpG 位点甲基化发生在同一克隆上,这反映基因组同一个拷贝原始甲基化状态;甲基化发生在一个克隆上更容易发挥抗转录因子结合效应。文献报道,这种毗邻甲基化

DNA 序列易于诱导强力转录抑制因子结合,如甲基化结合区(5-methyl-CpG-binding domain,MBD)<sup>[9]</sup>,其诱导结合能力强于不同拷贝上散在/毗邻甲基化 CpG 位点。

#### 参考文献

- [1] Fromme H, Tittlemier SA, Volkel W, et al. Perfluorinated compounds-exposure assessment for the general population in western countries [J]. Int J Hyg Environ Health 2009 212(3):239-270.
- [2] 张炯,万延建,张迅,等. 水体全氟辛烷磺酸高效液相色谱质谱法检测[J]. 中国公共卫生 2010 26(10):1340-1341.
- [3] Lau C, Anitole K, Hodes C, et al. Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings [J]. Toxicol Sci 2007 99(2):366-394.
- [4] Lau C, Thibodeaux JR, Hanson RG, et al. Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II: postnatal

- evaluation [J]. Toxicol Sci 2003 74(2):382-392.
- [5] Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility [J]. Nat Rev Genet 2007 8(4):253-262.
- [6] Wan YJ, Li YY, Xia W, et al. Alterations in tumor biomarker GSTP gene methylation patterns induced by prenatal exposure to PFOS [J]. Toxicology 2010 274(1-3):57-64.
- [7] 王丽君,班金豹,万延建,等. 雌鼠全氟辛烷磺酸暴露对仔鼠 DNA 甲基化影响[J]. 中国公共卫生 2011 27(3):322-323.
- [8] Bjork JA, Lau C, Chang SC, et al. Perfluorooctane sulfonate-induced changes in fetal rat liver gene expression [J]. Toxicology 2008 251(1-3):8-20.
- [9] Bakker J, Lin X, Nelson WG. Methyl-CpG binding domain protein 2 represses transcription from hypermethylated pi-class glutathione S-transferase gene promoters in hepatocellular carcinoma cells [J]. J Biol Chem 2002 277(25):22573-22580.

收稿日期: 2011-09-07

(解学魁编辑 周欣琳校对)

#### • 实验研究 •

## 镉对人肝癌细胞增殖及凋亡影响\*

王雨,范美,高英伟,伏蓉

**摘要:**目的 研究镉对人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖及凋亡的影响及其作用机制。方法 体外培养的人肝癌细胞 SMMC-7721 分别以 0、40、80、160  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{CdCl}_2$  处理 0~48 h,应用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞相对存活率,流式细胞仪检测细胞凋亡百分率,分光光度法检测半胱天冬酶 Caspase-3 酶活性的变化,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白印迹(western blot)法测 Caspase-3 mRNA 和蛋白表达的变化。结果 随着镉处理浓度的增加,氯化镉对细胞活力的抑制作用明显增强,40、80、160  $\mu\text{mol/L}$  氯化镉处理 SMMC-7721 细胞,其抑制率分别为 33.94%、48.04% 和 68.54%,均明显高于 0  $\mu\text{mol/L}$  氯化镉处理组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );40、80、160  $\mu\text{mol/L}$  镉处理组细胞的凋亡百分率分别为(25.77  $\pm$  4.66)%、(34.97  $\pm$  9.25)% 和(55.14  $\pm$  5.67)%,与 0  $\mu\text{mol/L}$  镉处理组比较明显升高,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );镉处理 SMMC-7721 细胞 24 和 48 h,Caspase-3 相对酶活性均随着镉浓度的增加而明显增强;40  $\mu\text{mol/L}$  镉处理 SMMC-7721 细胞,12、24 和 48 h 可明显上调细胞中 Caspase-3 基因及蛋白的表达,Caspase-3 基因 mRNA 表达水平分别为对照组的 4.1、3.7 和 3.9 倍,Caspase-3 蛋白表达分别为对照组的 5.8、6.0 和 7.2 倍。结论 镉能明显抑制人肝癌细胞增殖,诱导细胞凋亡,Caspase-3 基因在镉诱导 SMMC-7721 细胞凋亡过程中起着重要的作用。

**关键词:** 镉;人肝癌细胞株 SMMC-7721;凋亡;基因表达

中图分类号: R 994.6

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)12-1599-03

## Proliferation and apoptosis of SMMC-7721 induced by cadmium and its mechanism

WANG Yu, FAN Mei, GAO Ying-wei, et al. (Nursing School of Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning Province 110034, China)

**Abstract: Objective** To study the effect on proliferation and apoptosis of SMMC-7721 cells induced by cadmium and its mechanism. **Methods** SMMC-7721 cells were incubated with 0, 40, 80, 160  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  for 0-48 hours. Cell viability was measured by methyl thiazolyl tetrazolium assay (MTT). The occurrence of apoptosis was determined by flow cytometry. Absorption spectrometry was adopted to measure the relative activity of Caspase-3. The expression of Caspase-3 gene in SMMC-7721 cells after treatment with cadmium was determined by the methods of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and western-blot analysis. **Results** Cell viability decreased in dose-dependent manner with the dose increase of cadmium. The inhibition ratio of cell proliferation incubated with 40, 80, 160  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  was 33.94%, 48.04%, and 68.54%, respectively. Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  cadmium, the inhibition ratio increased obviously ( $P < 0.01$ ). The apoptosis rate of SMMC-7721 cell incubated with 40, 80, 160  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  was 25.77  $\pm$  4.66%, 34.97  $\pm$  9.25%, and 55.14  $\pm$  5.67%, respectively. Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  cadmium, the apoptosis

\* 基金项目: 辽宁省博士启动基金资助项目(20091082)

作者单位: 沈阳医学院护理学院, 辽宁 沈阳 110034

作者简介: 王雨(1973-),女,辽宁沈阳人,副教授,博士,研究方向: 重金属毒性机制及防治。