

镉对肝细胞中 *PPP2R1A* 启动子区甲基化及其转录水平的影响

张玉静¹, 陈慧峰², 廖昆¹, 夏斌¹, 殷花¹, 何承勇³, 林育纯³, 林忠宁³

1. 广东省营养膳食与健康重点实验室, 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510080;

2. 广东省职业病防治院, 广东省职业病防治重点实验室, 510300; 3. 厦门大学公共卫生学院, 福建 厦门 361102

摘要: 目的 分析镉染毒处理肝细胞中蛋白磷酸酶 2A (PP2A) α 亚基基因 *PPP2R1A* 启动子区甲基化状态及其转录水平的改变。方法 采用永生化人正常肝 L02 细胞及肝细胞癌 HepG2 细胞为研究对象, 对其进行以下分组和处理: ① 低、中和高剂量氯化镉 (CdCl₂) 处理组, 分别予浓度为 20.0、40.0 和 60.0 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 处理 24 h; ② 低、中和高剂量 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-dC) 处理组, 分别予浓度为 2.5、5.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-dC 处理 48 h; ③ 5-Aza-dC 组予浓度为 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-Aza-dC 处理 48 h, CdCl₂ 组予浓度为 40.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 CdCl₂ 处理 24 h (5-Aza-dC + CdCl₂) 组予浓度为 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-Aza-dC 预处理 48 h 后再予浓度为 40.0 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 处理 24 h; ④ CdCl₂ 处理组予浓度为 40.0 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 处理 24 h。上述 4 种分组均设对照组, 予等体积生理氯化钠溶液或二甲亚砜处理。经 ①~③ 处理后的细胞采用实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 检测 *PPP2R1A*、金属硫蛋白 1B (*MT1B*) 和 DNA 甲基转移酶 3A (*DNMT3A*) 的 mRNA 转录水平 (以对照组水平为 1.00)。经 ④ 处理后的细胞采用亚硫酸氢盐修饰后 PCR 扩增 *PPP2R1A* 启动子区克隆测序检测 CpG 岛的甲基化情况。结果 L02 细胞和 HepG2 细胞中, 不同剂量 CdCl₂ 处理组 *PPP2R1A* mRNA 转录水平随镉处理剂量增高呈剂量依赖性下降 ($P < 0.05$); 不同剂量 5-Aza-dC 处理组 *PPP2R1A* mRNA 转录水平随 5-Aza-dC 处理剂量增加呈剂量依赖性升高 ($P < 0.05$)。2 种细胞中, 分别与对照组和 5-Aza-dC 处理组比较, CdCl₂ 处理组和 (5-Aza-dC + CdCl₂) 处理组 *PPP2R1A* mRNA 转录水平均下降 ($P < 0.05$), *MT1B* 和 *DNMT3A* 的 mRNA 转录水平均升高 ($P < 0.05$); 与 CdCl₂ 处理组比较, (5-Aza-dC + CdCl₂) 处理组 *PPP2R1A* mRNA 转录水平均升高 ($P < 0.05$), *MT1B* 和 *DNMT3A* 的 mRNA 转录水平均下降 ($P < 0.05$)。甲基化测序结果显示, L02 细胞 CdCl₂ 处理组 *PPP2R1A* 启动子区甲基化率高于对照组 (6.35% vs 2.31%, $P < 0.01$), HepG2 细胞 CdCl₂ 处理组 *PPP2R1A* 启动子区甲基化率与对照组比较, 差异无统计学意义 (5.19% vs 3.85%, $P > 0.05$)。结论 外源化学物 CdCl₂ 可诱导肝细胞中 *PPP2R1A* 转录水平降低, 可能与镉能够引起目的基因启动子区甲基化状态改变有关, 提示 PP2A 亚基基因的表现遗传学调控可影响镉诱导的肝细胞功能。

关键词: 镉; L02 细胞; HepG2 细胞; *PPP2R1A*; 金属硫蛋白 1B; DNA 甲基转移酶 3A; 启动子区甲基化

中图分类号: R114; R135; R735.7

文献标识码: A

文章编号: 2095-2619(2014)05-0496-06

Effects of cadmium on promoter methylation and transcriptional level of *PPP2R1A* gene in hepatocytes

ZHANG Yu-jing*, CHEN Hui-feng, LIAO Kun, XIA Bin, YIN Hua, HE Cheng-yong, LIN Yu-chun, LIN Zhong-ning

* Guangdong Provincial Key Laboratory of Food, Nutrition and Health, School of Public Health,

Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China

Abstract: Objective To analyze the effects of cadmium on the promoter methylation and transcriptional level of protein phosphatase 2A (PP2A) α -subunit supported subunit gene *PPP2R1A* gene in hepatocytes. **Methods** The immortalized human fetal liver cell line L02 and the hepatocellular carcinoma cell line HepG2 were selected as the research objects: ① Cells were treated with low-, medium- and high-dose (20.0, 40.0 and 60.0 $\mu\text{mol/L}$) cadmium chlorid (CdCl₂) for 24 h. ② Cells were treated with low-, medium- and high-dose (2.5, 5.0 and 10.0 $\mu\text{mol/L}$) 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC) for 48 h. ③ Cells were given 5.0 $\mu\text{mol/L}$ for 48 h in 5-Aza-dC group, cells were exposed to 40.0 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ for 24 h in CdCl₂ group and cells were exposed to 40.0 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ for 24 h after 48 h pretreatment of 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-dC in (5-Aza-dC + CdCl₂) group. ④ Cells were treated with 40.0 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ for 24 h in CdCl₂ group. The above groups were all given the controls with the same volumes of physiological sodium chloride solution or dimethyl sulfoxide. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) detection was used to detect the mRNA transcriptional levels of

基金项目: 国家自然科学基金 (81172705, 81072334, 81130052); 广东省自然科学基金重点项目 (S2011020002769)

作者简介: 张玉静 (1987—) 女, 在读医学硕士研究生, 主要从事卫生毒理学研究

通讯作者: 林忠宁教授, 博士生导师, E-mail: linzhn@xmu.edu.cn

PPP2R1A, Metallothionein 1B (*MT1B*), DNA methyltransferase 3A (*DNMT3A*) after treatments ①-③. After treatment ④, cloning sequencing was used to detect the CpG island methylation status of *PPP2R1A* promoter after bisulfite sequencing PCR. **Results** In L02 and HepG2 cells, the transcriptional levels of *PPP2R1A* mRNA in CdCl₂ group were decreased in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). The transcriptional Levels of *PPP2R1A* mRNA in 5-Aza-dC group were increased in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). In the two kinds of cells, compared with the control or 5-Aza-dC group, transcriptional levels of *PPP2R1A* mRNA in CdCl₂ group and (5-Aza-dC + CdCl₂) group were decreased significantly respectively ($P < 0.05$), while transcriptional levels of *MT1B* and *DNMT3A* mRNA in the 2 groups were increased significantly respectively ($P < 0.05$); compared with those of CdCl₂ group, transcriptional levels of *PPP2R1A* mRNA in (5-Aza-dC + CdCl₂) group were increased significantly ($P < 0.05$), while transcriptional levels of *MT1B* and *DNMT3A* mRNA in the group were decreased significantly respectively ($P < 0.05$). According to the results of sequencing, the methylation ratio of CpG island in *PPP2R1A* promoter region was significantly increased in CdCl₂ group compared with that of the control in L02 cells (6.35% vs 2.31%, $P < 0.01$); but there was no obvious increase in HepG2 cells (5.19% vs 3.85%, $P > 0.05$). **Conclusion** It was indicated the CdCl₂ could lead to the transcription inhibition of *PPP2R1A*, and the effect may be related with the change of its promoter methylation status. These data showed epigenetic regulation of PP2A subunit genes may affect the function of hepatocytes exposed to cadmium.

Key words: Cadmium; L02 cells; HepG2 cells; *PPP2R1A* gene; Metallothionein 1B; DNA methyltransferase 3A; Promoter methylation

镉及其化合物是一种常见的职业重金属毒物,可导致包括肝脏在内的多种靶器官毒性^[1]。DNA 甲基化是重要的表观遗传修饰方式,主要发生在目的基因启动子区的 CpG 岛,参与细胞分化、基因组稳定性和基因印记等多种生物学过程,单基因水平及基因组范围内甲基化状态的改变在疾病的发生和发展中起着重要作用^[2]。研究证实,镉暴露可诱导大鼠肝细胞和人肝细胞上皮细胞 DNA 甲基转移酶(DNMT)表达升高,导致 DNA 高甲基化^[3-4]。蛋白磷酸酶 2A(Protein phosphatase 2A, PP2A)通过对关键蛋白的去磷酸化作用,在细胞的生理及病理过程中发挥重要的调控作用,其中 PP2A-A α 支架亚基由基因 *PPP2R1A* 编码^[5]。镉的肝毒性与 PP2A 的功能异常密切相关^[6],但镉是否诱导不同肝细胞中 *PPP2R1A* 启动子区甲基化水平的改变以及其对该基因转录水平的影响尚未见报道。本研究通过建立氯化镉(CdCl₂)染毒永生代人正常肝 L02 细胞(以下简称“L02 细胞”)和肝细胞癌 HepG2 细胞(以下简称“HepG2 细胞”)模型,探讨镉对人肝细胞中 *PPP2R1A* 启动子区甲基化修饰及其转录水平的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞、仪器和试剂 L02 细胞(中山大学生命科学院); HepG2 细胞(中山大学肿瘤研究所); XLI-Blue 感受态细胞(美国 Stratagene 公司)。2720 型聚合酶链反应(PCR)仪、7500 型实时荧光定量聚合酶链反应(QRT-PCR)仪(美国 ABI 公司);二氧化碳(CO₂)培养箱(美国 Thermo 公司)。胎牛血清(FBS)、RPMI-1640

培养基(美国 HyClone 公司);胰酶、青-链霉素(美国 Gibco 公司);细胞总 RNA 提取试剂(Trizol,美国 Invitrogen 公司);PCR 逆转录试剂盒、TA 连接载体(日本 TaKaRa 公司);甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-dC)、CdCl₂、二甲基亚砜(DMSO)、氨苄青霉素、氯化钠(美国 Sigma 公司);琼脂糖(上海 Yito 生物器材企业有限公司);DNA 分子标记(DNA marker)、特异性引物合成(上海生工生物工程有限公司);EZ DNA 甲基化试剂盒(美国 Zymo Research 公司);凝胶纯化试剂盒(美国 Qiagen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 L02 细胞和 HepG2 细胞离体培养 2 种细胞均用含体积分数为 10.00% FBS 和体积分数为 1.00% 青-链霉素的 RPMI-1640 培养基在 37℃、体积分数为 5.00% 的 CO₂ 培养箱中培养 2~3 d 传代 1 次,取生长良好的对数期细胞,用体积分数为 0.05% 胰酶消化后接种,设置不同的细胞处理组,用于后续实验。

1.2.2 L02 细胞和 HepG2 细胞分组和处理 ①2 种细胞均设低、中和高剂量 CdCl₂ 处理组,分别予浓度为 20.0、40.0 和 60.0 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 处理 24 h; ②2 种细胞均设低、中和高剂量 5-Aza-dC 处理组,分别予浓度为 2.5、5.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-dC 处理 48 h 作为去甲基化干预模型; ③2 种细胞均设 5-Aza-dC 组(相当于阳性对照组)、CdCl₂ 组和(5-Aza-dC + CdCl₂)组,5-Aza-dC 组予浓度为 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-Aza-dC 处理 48 h, CdCl₂ 组予浓度为 40.0 mol/L 的 CdCl₂ 处理 24 h, (5-Aza-dC + CdCl₂)组采用浓度为 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-Aza-dC 预处理 48 h 后再予浓度为 40.0 mol/L CdCl₂ 处理 24 h, 以建立验证模型。④2 种细胞均设 CdCl₂ 处理组,予浓度为 40.0 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 处理细胞 24 h, 用于

甲基化测序。上述①、③和④项的分组均另设对照组，予等体积生理氯化钠溶液处理 24 h；②项的分组另设予等体积 DMSO 处理 48 h 的对照组。

1.2.3 QRT-PCR 检测细胞内目的基因 mRNA 转录水平 分别收集 1.2.2 中第①、②和③项处理后的 L02 细胞和 HepG2 细胞的各组细胞，采用 TRIzol 法提取总 RNA，采用 PCR 逆转录试剂进行逆转录获得总 cDNA。采用 QRT-PCR 仪以本课题组设计的相关引物(表 1)检测细胞中目的基因 *PPP2R1A*、金属硫蛋白 1B 基因(*MT1B*)和 DNA 甲基转移酶 3A 基因(*DNMT3A*)的 mRNA 转录水平。以各自对照组 β -肌动蛋白基因(*ACTB*)扩增信号为参照，以获得的各目的基因的扩增信号 ΔCt ；以对照组细胞中各基因相对表达量为参照(设为 1.00)，获得各目的基因的 $\Delta\Delta Ct$ ，按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各目的基因的 mRNA 相对表达水平，即为其转录水平。此实验重复 3 次。

1.2.4 亚硫酸氢盐修饰后 PCR 扩增法(BSP)克隆测序检测 DNA 甲基化水平 ①基因组 DNA 提取、亚硫酸氢盐修饰和 PCR 扩增。收集 1.2.2 中第④项的 L02 细胞和 HepG2 细胞的 CdCl₂ 处理组和对照组细胞，分别采用 DNA 甲基化试剂盒按照说明书步骤操作提取细胞基因组 DNA，并进行亚硫酸氢盐修饰，以获得的修饰后的基因组 DNA 为模板，以本课题组设计的相关引物(表 1)进行 PCR 扩增，获得 *PPP2R1A* 基因 5'侧翼端(-424 ~ +237 nt)启动子区序列。其中 50.0 μ l PCR 扩增体系含 2 \times Taq Platinum PCR Master Mix 25.0 μ l、引物各 2.5 μ l、DNA 模板 2.5 μ l。PCR 条件：94 $^{\circ}$ C、2 min 预变性；94 $^{\circ}$ C、30 s 变性；58 $^{\circ}$ C、30 s 退火；72 $^{\circ}$ C、2 min 延伸，共 35 个循环；72 $^{\circ}$ C、10 min 终止延伸后 4 $^{\circ}$ C 保存。②重组片段克隆 PCR 扩增序列鉴定和 DNA 甲基化检测。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后，采用凝胶纯化试剂盒按照操作说明书步骤，回收纯化目的 DNA 片段。按常规方法进行分子克隆。具体操作方法：常规进行 TA 载体连接，转化 XL1-Blue 感受态细胞；转化产物平铺于含质量浓度为 100 mg/L 氨苄青霉素的 LA 平板上 37 $^{\circ}$ C 倒置培养至可见克隆形成，随机挑选独立、圆滑的菌落作为模板，采用表 1 中 *pMD19T* 特异性引物进行 PCR 鉴定。随机挑选 10 个鉴定含有目的 DNA 片段的克隆至含质量浓度为 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 ~ 16 h；取菌液送上海生工生物工程有限公司测序，获得含有 *PPP2R1A* 启动子区目的 DNA 片段的测序图谱。以美国国家生物技术信息中心基因银行(Genebank)序列为参照，分析测序获得的目的片段 52 个 CpG 位点中各 CpG 二核苷酸位点的甲基化比例，结果以 *PPP2R1A* 启动子区甲基化率(%)表示，以评价甲基化状态的改变。

表 1 QRT-PCR、PCR 扩增和克隆的特异性引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	长度(bp)
<i>ACTB</i>	上游: CACCAGGGCGTGATGGT	257
	下游: CTCAAACATGATCTGGGTGTCAT	
<i>PPP2R1A</i>	上游: TCTGCATCAATGTGCTGTCT	170
	下游: TTCACTCTGCAAGGTGCTGT	
<i>MT1B</i>	上游: GGCTTGCTTTGGCTCCAATG	289
	下游: GCAAACCGGTCAGGCTAGTT	
<i>DNMT3A</i>	上游: GGTATGAACAGGCCGTTG	215
	下游: GGAAACCAAATACCCCTTTCC	
<i>PPP2R1ApMe-1</i>	上游: TTGGGTTTTTGGTATAAATTAAG	321
	下游: AACAAAAATTAACCATATCCTAACRACC	
<i>PPP2R1ApMe-2</i>	上游: TAGGTTTAAATTAAGTTAAATTTTGTTTA	376
	下游: TACCCCAAATACCCCTCC	
<i>pMD19T</i>	上游: ATGTGCTGCAAGCGCATTAAG	222
	下游: CATACGAGCCGGAAGCATAAAGT	

1.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计量资料经正态性检验符合正态分布，以 $\bar{x} \pm s$ 表示；多组组间均数比较用单因素方差分析，均数间两两比较采用 SNK 法；计数资料率的比较采用 Pearson χ^2 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 CdCl₂ 处理对 2 种细胞 *PPP2R1A* mRNA 转录水平影响 L02 细胞和 HepG2 细胞的 4 组 *PPP2R1A* mRNA 转录水平分别比较，差异均有统计学意义(F 值分别为 47.183、19.786, $P < 0.01$)；与各自对照组比较，中、高剂量 CdCl₂ 处理组的 *PPP2R1A* mRNA 转录水平均下降，差异有统计学意义($P < 0.05$)；2 种细胞的 3 个 CdCl₂ 处理组 *PPP2R1A* mRNA 转录水平分别两两比较，差异均有统计学意义($P < 0.05$)，说明 2 种细胞中 *PPP2R1A* mRNA 转录水平均随 CdCl₂ 处理剂量的增加而下降，呈剂量-效应关系。见表 2。

表 2 4 组 L02 细胞和 HepG2 细胞 *PPP2R1A* mRNA 转录水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	实验次数	L02 细胞	HepG2 细胞
对照组	3	1.00 \pm 0.02	1.00 \pm 0.03
低剂量 CdCl ₂ 处理组	3	0.95 \pm 0.02	0.93 \pm 0.05
中剂量 CdCl ₂ 处理组	3	0.78 \pm 0.06 ^{ab}	0.80 \pm 0.03 ^{ab}
高剂量 CdCl ₂ 处理组	3	0.67 \pm 0.04 ^{abc}	0.71 \pm 0.04 ^{abc}

注：与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与低剂量 CdCl₂ 处理组比较，^b $P < 0.05$ ；与中剂量 CdCl₂ 处理组比较，^c $P < 0.05$ 。

2.2 5-Aza-dC 处理对 2 种细胞 *PPP2R1A* mRNA 转录水平影响 L02 细胞和 HepG2 细胞的 4 组 *PPP2R1A* mRNA 转录水平分别比较，差异均有统计学意义(F 值分别为 622.010、130.954, $P < 0.01$)；2 种细胞的 4 组 *PPP2R1A* mRNA 转录水平两两比较，差异均有统计学意义($P < 0.05$)。说明 2 种细胞的 *PPP2R1A* mRNA

转录水平均随 5-Aza-dC 处理剂量的增加而升高,呈剂量-效应关系。见表 3。

表 3 4 组 L02 细胞和 HepG2 细胞 *PPP2R1A* mRNA 转录水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	实验次数	L02 细胞	HepG2 细胞
对照组	3	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.03
低剂量 5-Aza-dC 处理组	3	1.28 ± 0.07 ^a	1.21 ± 0.04 ^a
中剂量 5-Aza-dC 处理组	3	1.60 ± 0.04 ^{ab}	1.71 ± 0.13 ^{ab}
高剂量 5-Aza-dC 处理组	3	2.62 ± 0.04 ^{abc}	2.43 ± 0.14 ^{abc}

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与低剂量 5-Aza-dC 处理组比较,^b $P < 0.05$;与中剂量 5-Aza-dC 处理组比较,^c $P < 0.05$ 。

2.3 5-Aza-dC 对 CdCl₂ 处理的的目的基因 mRNA 转录水平影响

2.3.1 对 *PPP2R1A* mRNA 转录水平影响 L02 细胞和 HepG2 细胞的 4 组 *PPP2R1A* mRNA 转录水平分别比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 128.164、38.123, $P < 0.01$);与各自对照组比较,2 种细胞的 *PPP2R1A* mRNA 转录水平在 5-Aza-dC 处理组均升高,在 CdCl₂ 处理组和(5-Aza-dC + CdCl₂) 组均下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$);2 种细胞的(5-Aza-dC +

CdCl₂) 处理组 *PPP2R1A* mRNA 转录水平均高于 CdCl₂ 处理组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

2.3.2 对 *MT1B* mRNA 转录水平影响 L02 细胞和 HepG2 细胞的 4 组 *MT1B* mRNA 转录水平分别比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 2 494.707、4 275.786, $P < 0.01$);与各自对照组比较,2 种细胞中 *MT1B* mRNA 转录水平在 5-Aza-dC 处理组、CdCl₂ 处理组和(5-Aza-dC + CdCl₂) 处理组均升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);2 种细胞的(5-Aza-dC + CdCl₂) 处理组 *MT1B* mRNA 转录水平均低于 CdCl₂ 处理组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

2.3.3 对 *DNMT3A* mRNA 转录水平影响 L02 细胞和 HepG2 细胞的 4 组 *DNMT3A* mRNA 转录水平分别比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 877.470 和 1 172.985, $P < 0.01$);与各自对照组比较,2 种细胞中 *DNMT3A* mRNA 转录水平在 CdCl₂ 处理组和(5-Aza-dC + CdCl₂) 处理组均升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);2 种细胞的(5-Aza-dC + CdCl₂) 处理组 *DNMT3A* mRNA 转录水平均低于 CdCl₂ 处理组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 4 组 L02 细胞和 HepG2 细胞 *PPP2R1A*、*MT1B*、*DNMT3A* 的 mRNA 转录水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

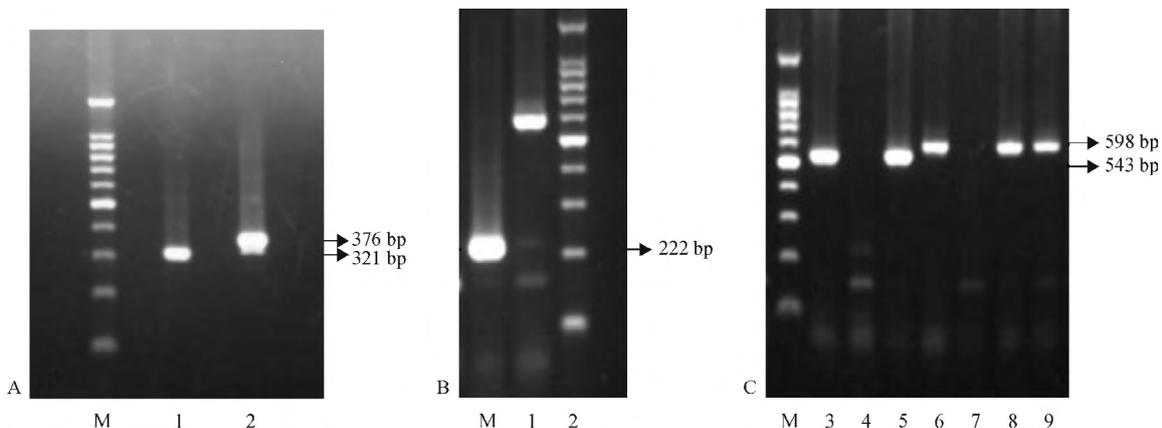
组别	实验次数	L02 细胞			HepG2 细胞		
		<i>PPP2R1A</i>	<i>MT1B</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>PPP2R1A</i>	<i>MT1B</i>	<i>DNMT3A</i>
对照组	3	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.01
5-Aza-dC 处理组	3	1.35 ± 0.05 ^a	9.46 ± 1.31 ^a	1.12 ± 0.03 ^a	1.29 ± 0.02 ^a	5.32 ± 0.72 ^a	1.03 ± 0.04
CdCl ₂ 处理组	3	0.72 ± 0.03 ^{ab}	2 482.14 ± 70.41 ^{ab}	2.87 ± 0.08 ^{ab}	0.79 ± 0.06 ^{ab}	3 667.94 ± 84.65 ^{ab}	2.72 ± 0.02 ^{ab}
(5-Aza-dC + CdCl ₂) 处理组	3	0.88 ± 0.04 ^{abc}	1 464.50 ± 50.06 ^{abc}	1.74 ± 0.05 ^{abc}	0.90 ± 0.05 ^{abc}	1 113.43 ± 31.99 ^{abc}	1.68 ± 0.06 ^{abc}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 5-Aza-dC 处理组比较,^b $P < 0.05$;与 CdCl₂ 处理组比较,^c $P < 0.05$ 。

2.4 *PPP2R1A* 近端启动子区甲基化 PCR 扩增及重组克隆鉴定结果

2.4.1 不同目的 DNA 片段的甲基化 PCR 扩增 分别 PCR 扩增甲基化修饰的 *PPP2R1A* 近端启动子区 2 个目的片段产物,可见 321 和 376 bp 的特异性条带,位置(1、2 泳道)与预期目的片段大小相符。见图 1-A。

2.4.2 目的片段重组克隆的 PCR 扩增及鉴定 不含插入目的 DNA 片段的空载体只扩增出 222 bp 条带(2 泳道),含 *PPP2R1A* 近端启动子区 2 个不同目的片段的克隆可分别扩增出 543 和 598 bp 的条带(3、5、6、8 和 9 泳道),提示重组克隆中含有的目的 DNA 序列插入在 *pMD19T* 上下游引物之间。见图 1-B、C。



注: A: *PPP2R1A* 近端启动子区不同目的基因 DNA 片段 PCR 产物; B: 重组克隆空载体 PCR 扩增与鉴定结果; C: 含不同目的 DNA 片段重组克隆 PCR 扩增与鉴定结果; M: DNA marker。

图 1 *PPP2R1A* 近端启动子区甲基化 PCR 扩增及重组克隆鉴定结果

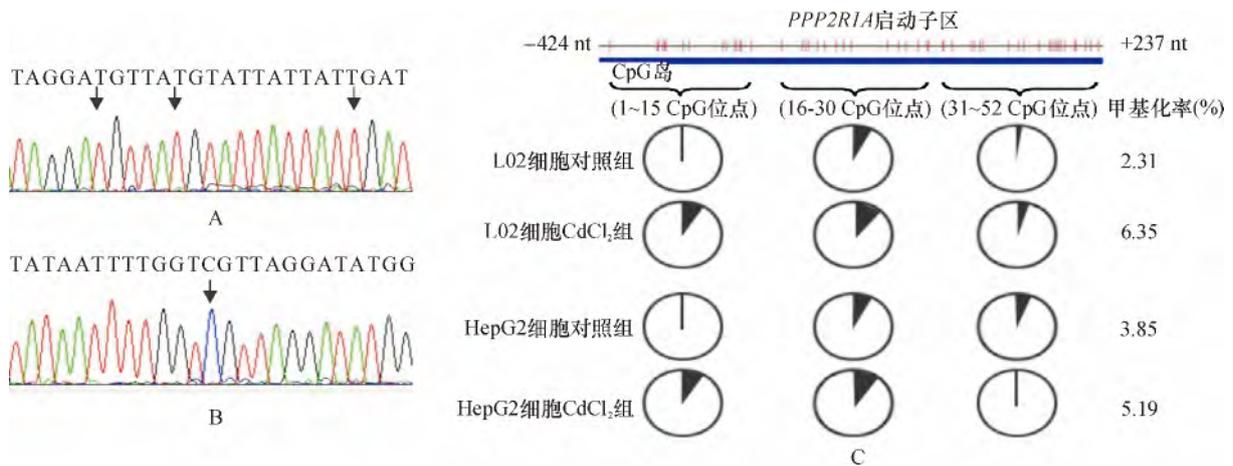
2.5 CdCl₂ 对 PPP2R1A 启动子区甲基化状态及甲基化率的影响 2 种细胞的基因组 DNA 经亚硫酸氢盐修饰后测序,发现未甲基化的 CpG 碱基变为 TpG(图 2-A),甲基化的 CpG 碱基不变(图 2-B)。BSP 克隆测序结果显示,L02 细胞 CdCl₂ 处理组的 PPP2R1A 启动

子区甲基化率高于对照组,差异有统计学意义($\chi^2 = 10.243, P < 0.01$); HepG2 细胞 CdCl₂ 处理组的 PPP2R1A 基因启动子区甲基化率虽然稍高于对照组,但差异无统计学意义($\chi^2 = 1.092, P = 0.296$)。见表 5、图 2-C。

表 5 2 组 L02 细胞和 HepG2 细胞 PPP2R1A 启动子区甲基化情况比较

组别	克隆数(个)	CpG 位点数(个)	L02 细胞		HepG2 细胞	
			甲基化位点数(个)	甲基化率(%)	甲基化位点数(个)	甲基化率(%)
对照组	10	520	12	2.31	20	3.85
CdCl ₂ 处理组	10	520	33	6.35 ^a	27	5.19

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$ 。



注: A: 未甲基化的 CpG; B: 甲基化的 CpG; C: CdCl₂ 处理对 L02 和 HepG2 细胞中 PPP2R1A 启动子区甲基化状态的影响。

图 2 PPP2R1A 近端启动子区甲基化 PCR 扩增克隆测序结果

3 讨论

镉及其化合物被国际癌症研究机构确认为人类 I 类致癌物,是环境中存在的主要重金属污染物^[7],镉可影响细胞的增殖和分化,导致细胞凋亡^[8];镉暴露不仅能够引起动物和人的急、慢性中毒,还可引起肝脏和肺脏等多种器官肿瘤^[7-9]。本课题组前期研究发现镉可引起 L02 细胞的增殖抑制,证实镉暴露诱导的细胞毒性转归和损伤与 PP2A 介导的去磷酸化作用密切相关^[10]。Filipic^[11]的研究表明,镉引起的细胞毒性与其诱导氧化应激进而导致细胞染色体稳定性下降有关,近年来,镉在诱导各种毒性和损伤效应的过程中能否引起表观遗传学机制的改变引起越来越多的关注^[12]。研究报道,镉暴露可导致 DNA 异常甲基化的发生,该表观遗传修饰方式的异常在镉诱导的多种毒性转归过程中扮演了重要角色^[13]。Yuan 等^[14]采用 CdCl₂ 染毒大鼠 8~12 周,发现大鼠周围血白细胞增殖受到严重抑制,认为该效应的发生与 p16 甲基化水平升高密切相关。Wang 等^[15]在 CdCl₂ 染毒 4 周的大鼠中发现 1 629 个基因的甲基化水平发生改变。

人群研究的结果也提示,长期接触镉可导致基因启动子区高甲基化,并可见 DNA 甲基化转移酶 I 的表达异常升高^[16]。然而,对于短期高剂量镉暴露是否影响基因的甲基化尚待研究。本研究以通用的 L02 细胞和 HepG2 细胞为人肝细胞对象,基于本课题组前期研究的剂量选择^[10],建立镉肝细胞毒性损伤模型。结果显示,不同剂量(浓度为 20.0~60.0 μmol/L)的 CdCl₂ 短时间(24 h)暴露使肝细胞中 PPP2R1A mRNA 转录水平随镉处理剂量增加而呈剂量依赖性下降($P < 0.05$),表明 CdCl₂ 对 PPP2R1A 的转录水平具有明显的抑制效应。与此相符的是,本课题组前期采用报告基因质粒进行高甲基化和模拟甲基化处理后转染 L02 细胞,发现启动子区的高甲基化能够降低 PPP2R1A 的转录水平^[17]。因此,提示 CdCl₂ 处理可能通过诱导细胞中基因启动子区高甲基化导致 PPP2R1A 转录水平下降。本研究进而采用甲基转移酶抑制剂 5-Aza-dC 进行验证,在不同剂量(浓度为 2.5~10.0 mol/L)的 5-Aza-dC 处理的 L02 细胞和 HepG2 细胞中,均表现出 PPP2R1A mRNA 转录水平的升高($P < 0.05$),并表现出随 5-Aza-dC 处理剂量增加呈剂量依赖性升高的趋

势 ($P < 0.05$) ,提示由于 5-Aza-dC 的去甲基化作用,致使 *PPP2R1A* 启动子区甲基化水平下降,从而增加了基因转录水平。以上研究结果为进一步阐明 *PPP2R1A* 启动子区甲基化调控及其在 CdCl_2 介导 *PPP2R1A* mRNA 转录水平改变的表观遗传学机制提供了线索。

为了进一步确证 *PPP2R1A* 的甲基化调控参与 CdCl_2 暴露介导的肝细胞效应,本研究检测了镉暴露肝细胞中金属硫蛋白和 DNA 甲基转移酶等生物标志物,发现 CdCl_2 可使肝细胞模型中 *MT1B* 和 *DNMT3A* 的 mRNA 转录水平升高 ($P < 0.05$) ,提示镉暴露与肝细胞中甲基化状态变化有关;并且在 5-Aza-dC 干预模型中 (5-Aza-dC + CdCl_2) 处理组 *MT1B* 和 *DNMT3A* 的 mRNA 转录水平均低于 CdCl_2 处理组 ($P < 0.05$) ,说明 5-Aza-dC 干预可明显影响 CdCl_2 诱导 *DNMT3A* 转录介导的甲基化调控。在此基础上,为了证实镉暴露对 *PPP2R1A* 甲基化调控的潜在靶向作用,本研究通过对 BSP 修饰的甲基化 DNA 克隆测序,发现 L02 细胞的 CdCl_2 处理组 *PPP2R1A* 启动子区甲基化率高于对照组 ($P < 0.01$) 提示 *PPP2R1A* 启动子区甲基化可能是参与 CdCl_2 诱导的肝毒性的主要表观遗传调控机制之一。本研究结果显示, HepG2 细胞的 CdCl_2 处理组 *PPP2R1A* 启动子区甲基化率与对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ,与 L02 细胞的结果存在差异,可能与实验细胞类型不同有关,也可能与 CdCl_2 的处理条件(染毒剂量、染毒时间和染毒方式等)有关,尚需进一步开展验证研究。

综上所述, CdCl_2 可导致肝细胞中 PP2A-A α 亚基基因的转录水平下降,该效应可能与镉引起 *PPP2R1A* 启动子区甲基化状态改变有关,为 PP2A 亚基基因的表观遗传学调控可能是参与镉影响肝细胞功能和诱导肝致癌作用的分子机制提供了部分证据,并且为镉暴露致肝细胞毒性和损伤的预防与控制提供新的干预策略,但尚需进一步利用动物模型和蛋白水平的结果进行验证和深入研究。

参考文献

[1] Hyder O, Chung M, Cosgrove D, et al. Cadmium exposure and liver disease among US adults[J]. J Gastrointest Surg 2013, 17(7): 1265 - 1273.

[2] Stefanska B, Huang J, Bhattacharyya B, et al. Definition of the landscape of promoter DNA hypomethylation in liver cancer[J]. Cancer Res 2011, 71(17): 5891 - 5903.

[3] Zhu H, Li K, Liang J, et al. Changes in the levels of DNA methylation in testis and liver of SD rats neonatally exposed to 5-aza-2'-deoxycytidine and cadmium[J]. J Appl Toxicol 2011, 31(5): 484 - 495.

[4] Zhou ZH, Lei YX, Wang CX. Analysis of aberrant methylation in DNA repair genes during malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by cadmium[J]. Toxicol Sci 2012, 125(2): 412 - 417.

[5] Lin YC, Chen HF, Lin LN, et al. Identification and functional analyses of polymorphism haplotypes of protein phosphatase 2A-A α gene promoter[J]. Mutat Res 2011, 716(1/2): 66 - 75.

[6] Zhu XN, Chen LP, Bai Q, et al. PP2A-AMPK α -HSF1 axis regulates the metal-inducible expression of HSPs and ROS clearance[J]. Cell Signal 2014, 26(4): 825 - 832.

[7] Joseph P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis[J]. Toxicol Appl Pharmacol 2009, 238(3): 272 - 279.

[8] Zhou Z, Wang C, Liu H, et al. Cadmium induced cell apoptosis, DNA damage, decreased DNA repair capacity, and genomic instability during malignant transformation of human bronchial epithelial cells[J]. Int J Med Sci 2013, 10(11): 1485 - 1496.

[9] Wu KC, Liu JJ, Klaassen CD. Nrf2 activation prevents cadmium-induced acute liver injury[J]. Toxicol Appl Pharmacol 2013, 263(1): 14 - 20.

[10] 胡耀明, 陈慧峰, 罗洁, 等. 镉对蛋白磷酸酶 2A-B55 δ 高表达 L02 细胞周期和核因子- κ B 活化影响[J]. 中国职业医学, 2012, 39(3): 181 - 185.

[11] Filipic M. Mechanisms of cadmium induced genomic instability[J]. Mutat Res 2012, 733(1/2): 69 - 77.

[12] Arita A, Costa M. Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium[J]. Metallomics 2009, 1(3): 222 - 228.

[13] Wang B, Li Y, Shao C, et al. Cadmium and its epigenetic effects[J]. Curr Med Chem 2012, 19(16): 2611 - 2620.

[14] Yuan D, Ye S, Pan Y, et al. Long-term cadmium exposure leads to the enhancement of lymphocyte proliferation via down-regulating p16 by DNA hypermethylation[J]. Mutat Res 2013, 757(2): 125 - 131.

[15] Wang B, Li Y, Tan Y, et al. Low-dose Cd induces hepatic gene hypermethylation, along with the persistent reduction of cell death and increase of cell proliferation in rats and mice[J]. PLoS One 2012, 7(3): e33853.

[16] Kippler M, Engstrom K, Mlakar SJ, et al. Sex-specific effects of early life cadmium exposure on DNA methylation and implications for birth weight[J]. Epigenetics 2013, 8(5): 494 - 503.

[17] Chen HF, Mai JR, Wan JX, et al. Role of a novel functional variant in the *PPP2R1A* promoter on the regulation of PP2A-A α and the risk of hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One 2013, 8(3): e59574.

收稿日期: 2014 - 08 - 06 修回日期: 2014 - 09 - 18 责任编辑: 郑倩玲