

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620120153792

UDC _____

廈門大學

博 士 学 位 论 文

砷转化细胞 (TLECs) 的建立及非 CpG 岛启动子
甲基化抑制 TLECs 中 NQO1 表达的研究

The establishment of arsenite-transformed cells (TLECs) and the study on
methylation of non-CpG island promoter repressing NQO1 expression in TLECs

作者姓名: 黄宁宇

指导教师姓名: 陶涛 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2016 年 05 月

论文答辩时间: 2016 年 06 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 06 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

砷及其衍生物广泛分布自然环境并对人类健康构成危害。虽然流行病学研究已经证实长期的砷暴露能诱发多种癌症，但对砷致癌的确切机制目前远未被阐明，需要进一步深入地探索。砷诱导肿瘤形成是一个长期和复杂的过程，相关研究工作首先需要有一个合适的细胞模型。为此，我们以低浓度亚砷酸钠长时间处理正常的大鼠肺上皮细胞系（LECs）诱导其转化，再通过一系列的指标实验验证，成功地建立砷转化细胞模型 TLECs（Arsenite-transformed LECs），从而为下一步的研究奠定基础。

砷转化最重要的机制之一就是活性氧途径，涉及到细胞内氧化还原体系异常变化。该体系中的重要成员：醌氧化还原酶 1（NQO1），是一种催化电子还原反应，保护细胞对抗氧化的 II 相反应黄素酶。由于其醌解毒作用和调节 p53 的稳定性被认为与细胞转化和肿瘤形成有密切关系而受到关注。我们在砷诱导转化的大鼠肺上皮细胞（TLECs）的多个亚克隆中发现 NQO1 表达出现了异常，即过表达和低表达，提示这种变化可能是细胞砷转化和癌变过程中重要的事件，因此对其异常表达机制的研究很有意义和必要。由于本实验之前已经发现大鼠的 NQO1 基因非 CpG 岛（Non-CpG island）启动子呈现组织特异性甲基化并与其转录水平呈负相关现象，且越来越多的研究表明该类型启动子的表观遗传功能几乎与 CpG 岛相同，我们推测该基因在大鼠源 TLEC 肿瘤细胞的表达变化可能是 DNA 异常甲基化的结果。为此，本研究先通过甲基化测序（BSP）确认两类亚克隆细胞 NQO1 基因启动子甲基化程度存在明显差异，再用去甲基化药物 5-Aza-CdR 恢复 NQO1 基因表达，进一步用不含 CpG 的 pCpGL 载体构建插入大鼠 NQO1 上游抗氧化元件（ARE）及连接近端-306~+229 启动子序列的报告质粒：pCpGL-NQO1，对其体外甲基化后转染细胞进行荧光素酶测定，验证甲基化对该段序列转录活性的影响。我们的实验研究第一次发现和证明了 non-CpG 岛启动子甲基化可抑制大鼠源的砷转化细胞（TLECs）中 NQO1 基因的表达。

关键词：砷转化细胞； NQO1； 甲基化； non-CpG 岛

Abstract

Arsenic and its derivatives are widely distributed in the environment and are seriously harmful to human health. Although many epidemiological studies have shown that inorganic arsenicals are human lung carcinogens, there is currently no accepted mechanism for arsenic-induced carcinogenesis, which requires further investigations in this area. Since arsenic-induced carcinogenesis is chronic and very complicated, it is most important to establish a cell model to emulate this process. So, we executed the transformation of normal rat lung epithelial cells (LECs) with chronic arsenite treatment and gained the arsenite-transformed LECs (TLECs). Then, a series of relevant experiments were carried out to verify the successful establishment of TLECs for the following studies.

Reactive oxygen species (ROS) pathway was supposed to play an important role in arsenite-induced cell transformation with the intracellular redox system being disrupted. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), one significant member of the system, is a phase II flavoenzyme catalyzing reduction reactions that protect cells against electrophiles and oxidants. For its detoxification of quinones and the effect on increasing the stability of p53 in cells, NQO1 was also confirmed to be involved with the cell tumorigenesis. Here we first report the NQO1 exhibited expression differentiation in arsenite-transformed LEC (TLEC) whose ROS level was elevated. That is, the gene became either inactive or hyperactive in the subclones. It indicated that the change of NQO1 expression was an important event in arsenite-induced cell transformation and carcinogenesis. So, the study on the mechanism of its aberrant expression is necessary and meaningful. Our laboratory have found that the NQO1 gene of rat displays tissue-specific methylation in the non-CpG island promoter and it seemed to be inversely correlated with the transcript level in corresponding tissue. In addition, more and more studies have shown that the epigenetic signatures of such promoter are almost identical to CpG island promoter. We speculated that the changes of TLEC NQO1 could result from the aberrant methylation of non-CpG island promoter. Next, Bisulfite-sequencing was carried out to revealed that non-CpG island

promoter is hyper- or hypo-methylation in subclones with inactive or hyperactive transcription of NQO1 respectively. Treated with demethylating drug 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR), NQO1 in the hypermethylated subclones was restored drastically in transcript level. Further, the NQO1 promoter (-306 to +229) containing the ARE (Antioxidant response element) enhancer in 5'end was fused into the CpG-less vector pCpGL-Basic with luciferase gene to generated the reporter as pCpGL-NQO1. Luciferase assay showed that the pCpGL-NQO1 construct in vitro methylation was completely silenced in contrast to its mock methylaton control. Together, our results demonstrate for the first time that hypermethylation of the non-CpG island promoter could repress NQO1 expression in rat arsenite-transformed lung epithelial cells.

Key words : Arsenite-transformed cells; NQO1; Methylation; non-CpG island

目录

摘要	I
目录	IV
缩略语表	X
1. 前言	
1.1 砷污染与肿瘤	1
1.2 砷转化模型选择	1
1.3 细胞模型建立和验证	1
1.4 NQO1 基因简介	2
1.5 NQO1 与肿瘤	3
1.6 NQO1 的调控	4
1.7 砷转化与表观遗传	4
1.8 大鼠 NQO1 启动子特点	5
1.9 研究的内容与意义	5
2. 实验材料	
2.1 实验材料与试剂	
2.1.1 菌株和质粒	6
2.1.2 细胞列表	6
2.1.3 抗体列表	6
2.1.4 主要药品与试剂	7
2.1.5 仪器设备	9
2.2 实验方法	
2.2.1 细胞培养	10
2.2.2 MTT法检测亚砷酸钠的细胞毒性	10
2.2.3 细胞砷诱导转化	11
2.2.4 细胞形态观察	11
2.2.5 细胞软琼脂克隆形成实验	11
2.2.6 分离单克隆细胞	13
2.2.7 细胞迁徙和侵袭实验	13
2.2.8 Western blot	14

2.2.9 明胶酶谱法检测MMP	17
2.2.10 对LEC和TLEC 细胞的p53基因CDS测序	18
2.2.11 流式细胞术检测LEC和TLEC 细胞内ROS	19
2.2.12 RT-PCR和qPCR检测基因表达水平	19
2.2.13 5-Aza-CdR处理各细胞株诱导NQO1表达	23
2.2.14 动物和细胞基因组的提取	24
2.2.15 重亚硫酸盐测序 BSP	24
2.2.16 pCpGL-NQO1 质粒的构建	27
2.2.17 质粒的体外甲基化及验证	29
2.2.18 荧光素酶活性测定	30

3. 结果

第一部分砷转化细胞模型的验证

3.1 亚砷酸钠对 LEC 细胞活性影响	33
3.2 砷转化细胞发生 EMT 形态学变化	34
3.3 砷转化细胞 EMT 指标蛋白出现相应变化	35
3.4 砷转化细胞能锚定非依赖性生长并形成多数克隆	36
3.5 砷转化细胞的转移能力显著增强	37
3.6 砷转化细胞分泌基质金属蛋白酶大幅增加	39
3.7 砷转化细胞 p53 出现异常蓄积和基因突变	39
3.8 流式细胞检测发现 TLEC 细胞 ROS 水平异常升高	41

第二部分 NQO1 非 CpG 岛启动子甲基化的转录抑制作用

3.9 NQO1 在砷转化 TLEC 细胞的亚克隆中出现异常表达	42
3.10 运用 EMBOSS CpGplot 软件分析大鼠的 NQO1 启动子序列	43
3.11 大鼠各组织 NQO1 启动子甲基化与表达呈负相关	44
3.12 BSP 显示 TLEC 各个亚克隆 NQO1 启动子出现异常甲基化	45
3.13 去甲基化能显著恢复 TLEC 高甲基化亚克隆的 NQO1 表达	47
3.14 体外甲基化显著抑制 NQO1 非 CpG 岛启动子的转录活性	49
3.15 Tfsitescan 分析大鼠 NQO1 非 CpG 岛启动子转录因子结合位点	51

4. 讨论和结论

4.1 砷转化细胞模型验证的讨论	52
------------------	----

4.2 非 CpG 岛启动子甲基化抑制 TLEC 细胞 NQO1 表达的讨论·····	53
参考文献 ·····	57
致谢 ·····	62

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

Abstract	II
Table of Contents	VII
Abbreviations	X
1. Introduction	
1.1 Arsenic pollution and tumorigenesis	1
1.2 The selection of arsenite-transformed model	1
1.3 The establishment and validation of cell transform model	1
1.4 The introduction of NQO1 gene	2
1.5 NQO1 and tumorigenesis	3
1.6 The regulation of NQO1 gene	4
1.7 Arsenite-induced transformation and epigenetic regulation	4
1.8 The analysis of rat NQO1 promoter	5
1.9 The objective of this study	5
2. Materials and Methods	
2.1 Materials	
2.1.1 E.coli strains and plasmids	6
2.1.2 The list of cell lines	6
2.1.3 The list of antibodies	6
2.1.4 The list of reagents	7
2.2.5 Apparatuses	9
2.2 Methods	
2.2.1 Cell culture.....	10
2.2.2 MTT assay	10
2.2.3 Protocol of LEC arsenite-induced transformation.....	11
2.2.4 Cell morphological observation	11
2.2.5 Colony formation in soft agar	11
2.2.6 Isolation of TLECs subclones	13
2.2.7 Transwell assay and matrigel-transwell assay.....	13
2.2.8 Western blot	14

2.2.9 Gelatin zymography	17
2.2.10 Sequencing of p53 CDS of LECs and TLECs.....	18
2.2.11 ROS detection in LECs and TLECs by flow cytometry	19
2.2.12 RT-PCR and qPCR.....	19
2.2.13 5-Aza-2'-deoxycytidine treatment for NQO1 induction	23
2.2.14 Extration of cell and tissue Genomic DNA.....	24
2.2.15 Bisulfite sequencing PCR.....	24
2.2.16 The construct of pCpGL-NQO1 plasmid	27
2.2.17 In vitro methylation of pCpGL-NQO1 plasmid	29
2.3.18 Luciferase assay.....	30

3. Results

Part I The establishment of arsenite-transformed cell model

3.1 The toxicity of arsenite on LECs determined by MTT assay	33
3.2 TLECs displayed significant morphological features of EMT	34
3.3 The expression changes of EMT hallmark proteins	35
3.4 TLECs exhibited anchor-independent growth in soft agar	36
3.5 TLEC metastasis was significantly enhanced during EMT	37
3.6 The activities of MMPs were obviously increased in TLECs	39
3.7 p53 aberrant accumulation and mutation in TLECs	39
3.8 ROS was aberrantly elevated in TLECs	41

Part II Methylation of non-CpG island promoter represses NQO1 expression of TLEC

3.9 NQO1 expression was aberrantly altered in TLEC subclones	42
3.10 CpG clusters distribution of rat NQO1 promoter	43
3.11 The analysis of promoter methylation and expression of NQO1 gene in rat tissues	44
3.12 TLEC subclones displayed different methylation of NQO1 promoter.....	45
3.13 Demethylation restored NQO1 expression significantly in hypermethylated TLEC subclones	47
3.14 In vitro methylation of NQO1 non-CpG promoter resulted in drastic	

inhibition of its transcription activity	49
3.15 Analysis of crucial transcriptional elements in rat NQO1 promoter	51
4. Discussion and Conclusion	
4.1 Discussion on the TLECs establishment	52
4.2 Discussion on the results of Part II	53
Reference	57
Acknowledgements	62

厦门大学博士学位论文摘要

缩略语表

AP	Ammonium persulfate	过硫酸胺
Acr	Acrylamide	丙烯酰胺
ARE	Antioxidant response element	抗氧化反应元件
B[α]P	Benzo[α]pyrene	苯并芘
BSP	Bisulfite sequencing PCR	重亚硫酸盐测序 PCR
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
DMSO	Dimethyl Sulphoxide	二甲基亚砷
DNMT	DNA methyltransferases	DNA 甲基转移酶
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
EDTA	Ethylene diaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
LEC	Rat lung epithelial cell	大鼠肺泡上皮细胞
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein1	Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2 related factor 2	转录因子红细胞系-2 相关因子-2
NQO1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1	依赖还原型辅酶 I / II 醌氧化还原酶 1
Non-CpGI	Non-CpG island	非 CpG 岛
ONPG	O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	2-硝基苯- β -D-半乳糖苷
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲磺酰氟
ROS	Reactive oxygen	活性氧
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TBS	Tris-Buffered saline	Tris 缓冲盐溶液
TEMED	N,N,N,N,-tetramethyl-ethylere diamine	四甲基乙烯二胺
TLEC	Arsenite-transformed LEC	砷转化的 LEC 细胞
Tris	N-trishydroxymethyl aminomethane	N-三羟甲基氨基甲烷
5-Aza-CdR	5-aza-2'-deoxycytidine	5-氮杂胞嘧啶

1. 前言

1.1 砷污染与肿瘤

砷是一种常见元素，能以 -3 ， 0 ， $+3$ ，或 $+5$ 价形成无机或有机化合物，广泛存在在水源、土壤、空气和食物中[1, 2]。其中 $+3$ 价和 $+5$ 价的三氧化二砷、亚硝酸盐、砷酸盐（亚硝酸盐的氧化物）的生物毒性最大并且是很多地方环境污染物的主要成分。两百多年来随着工业的发展，砷污染对人类卫生健康造成的危害愈发严重，很多流行病学研究已经表明长期的砷暴露与多种人类癌症（如：肺癌、皮肤癌、膀胱癌、肾癌、肝癌）密切相关[3-8]。因此国际癌症研究机构在1980年正式将无机砷列为致癌物[9]。对于砷致癌存在多种假说，如：砷对DNA的损伤、诱发细胞染色体畸变、阻止DNA修复[10, 11]；砷紊乱信号转导、促进细胞周期和增殖[12]；砷引起细胞氧化应激，产生过多的胞内活性氧（Reactive oxygen species, ROS），通过ROS途径诱导细胞癌变等[13, 14]。但被主流学界接受的确切作用机理依然未有，进一步深入探究显得非常迫切。

1.2 转化模型的选择

探索砷诱导癌变机理的相关实验工作需要合适的研究对象，建立一个可靠的细胞转化模型十分重要。转化(Transformation)是指正常细胞的基因遗传、形态生理等发生重大改变，细胞恶性转变或获得与恶变相关特征。通常在对环境致癌物检测与肿瘤细胞形成的机理研究中，哺乳类动物细胞体外转化实验是一种非常重要的方法。一般来说体外转化分为器官培养细胞转化法和体外培养细胞转化法。早期体外转化实验系统所用的靶细胞绝大部分为纤维细胞，而大约85%人类恶性肿瘤为来源于上皮组织[15]，所以将上皮组织细胞作为研究对象更为重要。但由于人上皮细胞较难培养和转化，经常用大鼠上皮细胞作为研究模型。LECs (Rat lung epithelial cells) 是一种大鼠二型肺泡上皮干细胞，不具锚定非依赖性生长，保持稳定的非转化性状[16]，因此本实验室将其作为砷诱导转化的靶细胞。

1.3 转化模型的建立与验证

事实上，环境污染中的砷常常还夹带着多环芳香烃类物质对人体细胞产生复合协同作用，更加具有危害性。而这类致癌物中苯并芘(B[a]P)最具代表性。

B[α]P 广泛存在我们的生活中，如熏制食品、香烟、煤烟及汽车废气中[17]。研究发现苯并芘是一种很强的 DNA 突变剂，用其皮下注射可诱发肉瘤而涂抹于动物皮肤上则会引起皮肤癌[18]。我们设计以永生化的大鼠肺上皮细胞（LEC）用短时 B[α]P 诱变联合低浓度亚砷酸钠 16 周长期持续作用，能更好地模拟动物细胞在这两种环境污染物复合协同作用下的细胞转化，更具有实际意义。

模型的建立是否成功需要进行一系列的指标性检验。我们知道上皮细胞从正常状态逐步被致癌物诱导转化要经过一系列复杂的变化，最常见的就是上皮-间充质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)。伴随这一过程，细胞的形态、生理代谢等发生重要的改变，细胞的增殖、转移的能力也显著增强，呈现出多种恶性肿瘤特征。通过细胞形态观察、转化标志蛋白检测、软琼脂克隆形成以及细胞迁徙与侵袭等指标实验可验证细胞转化模型是否建立成功。由于 LEC 细胞群体在砷转化过程可能各自发生各种随机基因遗传改变，所以在最后 TLEC 细胞群落中可能包含多种特性的肿瘤干细胞（Tumor stem cells），分离纯化 TLEC 单克隆或称亚克隆（Subclone）能够得到性状非常稳定的肿瘤细胞株作为更好的研究对象。为此我们用琼脂培养基培养 TLEC 单细胞群落（能够长出的群落都是源自一个肿瘤干细胞）[19]，并用自制克隆环分离出单克隆，再胰酶消化后扩增培养。总共成功培育了六株 TLEC 亚克隆细胞，分别命名为 Subclone 1、2、3、4、5、6，用以进行下一步实验研究。

1.4 NQO1 简介

依赖还原型辅酶 I/II 醌类氧化还原酶 1（NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, NQO1）也被称为 DT-硫辛酰胺脱氢酶(DT-diaphorase)，是一种以 NAD(P)H 为供体，催化醌类物质发生还原反应的黄素蛋白酶[20]。NQO1 催化特性在于无单电子还原产物半醌及自由基等氧化产物形成。NQO1 在细胞内对醌类物质的解毒作用、减少活性氧（ROS）形成、保护细胞 DNA 及其他细胞器免受损伤等方面发挥十分重要的作用（见图 1.）[21-23]。NQO1 作为细胞内的 II 相反应酶，之前的研究主要关注其对机体细胞的代谢解毒功能，但近些年来发现 NQO1 在细胞中参与更多的事件，影响也更加深远。

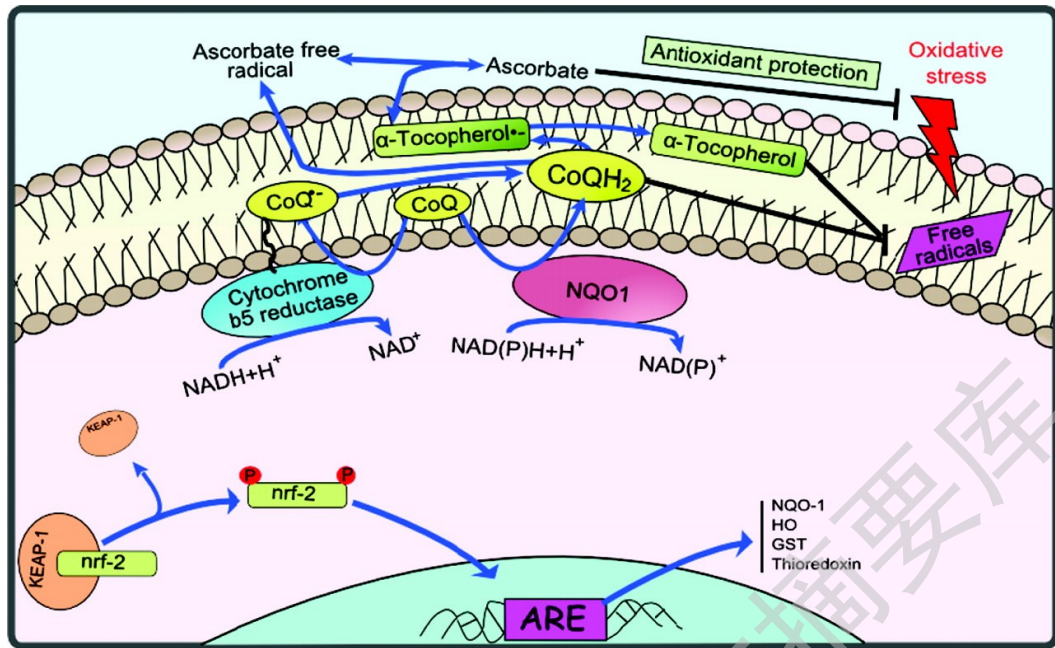


图 1. 细胞膜上的 NQO1 参与的氧化还原系统示意图。

其中：氧化还原循环用蓝色线表示，CoQ 指氧化态的辅酶 Q，CoQ \cdot^- 指半醌自由基，CoQH $_2$ 指还原态的辅酶 Q。

Figure 1. A diagram of the plasma membrane redox system including NQO1. The redox cycle is shown in blue. CoQ indicates oxidized form of coenzyme Q ; CoQ \cdot^- , semiquinone radical; CoQH $_2$, reduced form of coenzyme Q.

资料来源：Zoltan Ungvari et al., *Circulation Research*, 2008

1.5 NQO1 与肿瘤

多种致癌物能使细胞产生氧化应激并上调活性氧（ROS）浓度[24]。而长期较高水平的活性氧能促进细胞有丝分裂与细胞增殖，同时引起细胞基因组的不稳定性，增加遗传变异，进而诱导肿瘤的发生与发展[25, 26]。NQO1 能催化醌基团转化为氢醌，有效地抑制活性氧的生成，保护细胞器及遗传物质免受损伤，维持细胞的正常生理功能和防止肿瘤的发生[21, 23]。研究还发现 NQO1 能够抑制 p53 的泛素蛋白酶体途径降解从而稳定 p53 在细胞内的表达水平[27, 28]。p53 是一种关键的抑癌基因，能够及时停止受损细胞的生长和分裂并对其进行修复或者诱导其凋亡。NQO1 在细胞处于氧化应激状态的时候对 p53 蛋白的保护稳定作用更加突出[28]，这可能是其防止细胞恶性转化的一个重要方式。亚砷酸钠已知对细胞诱导致癌中的一个可能的机制就是通过 ROS 途径[14]，因此 NQO1 在大鼠肺上皮细胞 LEC 的砷诱导转化过程中表达变化值得我们关注。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.