

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20151126001

曾柳丹, 马慧敏, 张干, 等. Cl-BDE-208 和 BDE-209 诱导 LINE-1 基因低甲基化和 ESR1 基因高甲基化[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(2): 163-169

Zeng L D, Ma H M, Zhang G, et al. Cl-BDE-208 and BDE-209 induce LINE-1 gene hypomethylation and ESR1 gene hypermethylation [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(2): 163-169 (in Chinese)

Cl-BDE-208 和 BDE-209 诱导 LINE-1 基因低甲基化和 ESR1 基因高甲基化

曾柳丹^{1,2}, 马慧敏^{1,*}, 张干¹, 于志强¹, 盛国英¹, 傅家谟¹

1. 中国科学院广州地球化学研究所 有机地球化学国家重点实验室和广东省环境资源利用与保护重点实验室, 广州 510640

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049

收稿日期: 2015-11-26 录用日期: 2016-1-11

摘要: 十溴联苯醚(BDE-209)是使用最多的一种多溴阻燃剂, 由于具有高亲脂性和低挥发性, 容易蓄积在生物体内。在人体血清、母乳、肝脏等组织中均有检出; 其环境脱溴产物九溴一氯联苯醚(Cl-BDE-208)也在血清样品和环境样品中被频频检出, 而目前对这种化合物的毒理学研究, 特别是对人体早期健康效应的研究较少。为了评估 Cl-BDE-208 和 BDE-209 的早期健康效应, 以人乳腺癌细胞 MCF-7 为模型, 环境相关浓度(0.375 ~ 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)为暴露浓度, 检测 Cl-BDE-208 和 BDE-209 对重复序列 LINE-1、全基因组 DNA 甲基化(GDM)和雌激素受体基因(包括 ESR1 和 ESR2)甲基化水平的改变。结果表明, Cl-BDE-208 和 BDE-209 都可能通过降低 DNA 甲基化转移酶(DNMTs)活性而诱导了 LINE-1 和 GDM 的低甲基化, β -羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)水平的升高可能参与了 BDE-209 引起的低甲基化过程; 同时通过促进雌激素受体 α (ESR1)基因的高甲基化而显著下调了 ESR1 基因的表达, 而对雌激素受体 β (ESR2)基因甲基化水平并没有显著影响。Cl-BDE-208 和 BDE-209 都可能通过改变 DNA 甲基化水平而影响人体的早期健康效应, 同时 ESR1 基因的高甲基化可能是 Cl-BDE-208 和 BDE-209 引起内分泌毒性的机制之一。

关键词: Cl-BDE-208; BDE-209; DNA 甲基化; LINE-1; ESR1; 环境相关浓度

文章编号: 1673-5897(2016)2-163-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Cl-BDE-208 and BDE-209 Induce LINE-1 Gene Hypomethylation and ESR1 Gene Hypermethylation

Zeng Liudan^{1,2}, Ma Huimin^{1,*}, Zhang Gan¹, Yu Zhiqiang¹, Sheng Guoying¹, Fu Jiamo¹

1. State Key Laboratory of Organic Geochemistry and Guangdong Key Laboratory of Environmental Protection and Resources Utilization, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China

2. Graduate School of the Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China

Received 26 November 2015 accepted 11 January 2016

Abstract: Decabromodiphenyl ether (BDE-209) is the mostly used compound of polybrominated flame retardants. The high lipid solubility and low vapor pressure contribute to their bioaccumulation. BDE-209 has been detected in human blood, milk, and liver tissues. Monochloro-nonabromo diphenyl ethers (Cl-BDE-208), the environmental metabolite of BDE-209 is also found in human tissues, but the information of Cl-BDE-208 and BDE-209 toxicity is limit-

基金项目: 国家青年基金 (NSFC-21007072); 有机地球化学国家重点实验室开放基金 (SKLOG2015A02); 广东省环境资源利用与保护重点实验室开放运行费 (2014B03031060)

作者简介: 曾柳丹(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境污染与表观遗传学, E-mail: zengliudan@gig.ac.cn

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: mahuimin@gig.ac.cn

ed. The objective of this study is to investigate whether environmental relative concentrations BDE-209 and Cl-BDE-208 ($0.375 \sim 3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) could cause DNA methylation changes of several DNA methylation biomarkers in MCF-7 cells, including repetitive elements (LINE-1), global DNA methylation (GDM) and estrogen receptor gene (ESR1 and ESR2), and to explore the possible mechanism. Results showed that Cl-BDE-208 and BDE-209 down-regulated LINE-1 and global DNA methylation through DNMTs activity decrease, and 8-OHdG level increase may be involved in BDE-209-induced hypomethylation. More interesting, Cl-BDE-208 and BDE-209 inhibited ESR1 gene expression by promoting the DNA methylation in promoter area, while both compounds have no effects on ESR2 gene. Results suggested that Cl-BDE-208 and BDE-209 have the adverse health outcomes, and ESR1 gene hypermethylation may be the potential mechanism of endocrine toxicity of BDE-209.

Keywords: Cl-BDE-208; BDE-209; DNA methylation; LINE-1; ESR1; environmental relative concentrations

十溴联苯醚(BDE-209) ,作为价格低廉、稳定性良好的阻燃剂 ,被广泛用于电子和纺织等消费产品中 ,是目前市场需求量最大的一类多溴联苯醚(PBDEs) ,约占 PBDEs 使用量的 83.3% 左右^[1]。近年来 ,我国 BDE-209 污染严重 ,在人体血液、母乳、胎盘、肝脏等组织中均有检出^[2] ,而在电子垃圾高风险区工人血清中的浓度高达 $3 \sim 100 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 脂重^[3] (约 $3.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。越来越多的研究表明 ,BDE-209 具有内分泌干扰毒性及潜在的致癌性^[4-5] ,但具体机制仍不十分清楚。此外 ,九溴一氯联苯醚 Cl-BDE-208 是十溴联苯醚工业品的一个次要的组分 ,同时也是 BDE-209 的环境脱溴产物^[6] ,这种化合物也在环境样品和血清样品中被频频检出^[7] ,而对这种化合物的毒理学研究 ,特别是对人体早期健康效应的研究并不多见。

目前 ,DNA 甲基化作为生物标志物 ,被广泛用于环境污染物的早期健康效应的评估中。许多环境污染物的暴露都能引起 DNA 甲基化水平的改变 ,比如双酚 A(BPA)引起了 Avy 小鼠全基因组 DNA 甲基化(GDM)水平的降低^[8] ,PM10 诱导了钢铁铸造工人血液 DNA 中 ALU、LINE-1 和一氧化氮合成酶(iNOS)基因的低甲基化^[9] ,镉的暴露诱导了欧洲鳗鱼 GDM 水平的降低^[10]。DNA 甲基化是表观遗传学中最重要的一种修饰方式 ,是指在基因胞嘧啶(cytosine)的第 5 位碳原子上加了一个甲基基团的过程 ,DNA 甲基化特别是特定基因启动子区域内的高甲基化 ,会导致基因表达受到抑制和引起染色体异常等^[11]。目前 GDM 水平降低 ,抑癌基因启动子区域内甲基化的升高和癌基因启动子区域内甲基化的降低等都是疾病发生早期的重要生物事件^[12] ,可作为疾病诊断的指标而用于临床^[13]。

基于 BDE-209 的内分泌毒性 ,本文以 MCF-7 为

模型 ,选择环境相关浓度($0.375 \sim 3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)为暴露浓度 ,检测 Cl-BDE-208 和 BDE-209 对 GDM、LINE-1 和雌激素受体基因甲基化水平的改变 ,包括雌激素受体 ESR1 和 ESR2 基因甲基化水平的改变 ,应用表观遗传学中的 DNA 甲基化指标来表征 Cl-BDE-208 和 BDE-209 对人体的早期健康效应 ,借以初步评估 Cl-BDE-208 和 BDE-209 的毒性。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

HPLC 级的甲醇、乙腈和甲酸购买于 MerK 公司 (Germany)。碳酸氢铵、醋酸铵、5-甲基脱氧胞苷 (5mdC)、脱氧鸟苷(dG)、8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)、磷酸二酯酶 I 和十溴联苯醚(BDE-209)购于 Sigma 公司(USA); DNA 甲基化酶(M. SssI)、碱性磷酸酶购于 New England Biolabs (Beverly ,MA); DMEM 培养基、胰蛋白酶和胎牛血清均购自 GIBCO 公司; 九溴一氯联苯醚(Cl-BDE-208)由中国科学院广州地球化学研究所于志强研究员提供 ,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及处理

MCF-7 细胞购自中国科学院上海细胞库 ,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 ,在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 恒温培养箱中培养。取对数生长期细胞依次以 0.375 、 0.75 、 1.5 和 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 Cl-BDE-208 和 BDE-209 处理 48 h ,0.1% DMSO(V/V)为对照组。

1.2.2 DNA 提取与水解

用纳米磁珠法基因组 DNA 提取试剂盒(善诺科技有限公司 ,中国)提取基因组 DNA ,然后取 $10 \mu\text{g}$ DNA 样品溶于 $5 \mu\text{L}$ 去离子水中 ,在 $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下变性 3 min 后立即放于冰浴中。然后加入 $0.6 \mu\text{L}$ DNA 酶 ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) ,在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后 ,再加入 $4.1 \mu\text{L}$ 乙酸钠($30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 7.8$)和 $1 \mu\text{L}$ 磷酸二酯酶 I

($2 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下反应 2 h 后加入 $1 \mu\text{L}$ 碱性磷酸酶($3 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。水解完全的 DNA 样品保存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 待分析。

1.2.3 LINE-1 甲基化水平检测实验

每个样品取 $1 \mu\text{g}$ DNA 用亚硫酸氢钠修饰试剂盒(Zymo, USA)进行处理,具体操作按照说明书。然后取 40 ng DNA 用于 Methylight PCR 反应,PCR 反应条件为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 10 min 后 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 15 s $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火延伸 1 min ,共 50 个循环。反应在 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪上进行,使用正常人外周血淋巴细胞 DNA(PBL DNA)按 1:10 比例做一系列稀释,作标准曲线。每个基因的甲基化水平用 PMR(甲基化百分比)表示, $\text{PMR} = 100\% \times (\text{样品中目的基因拷贝数}/\text{内参基因拷贝数}) / (\text{甲基化 PBL 中目的基因拷贝数}/\text{内参基因拷贝数})$ 。 $\text{PMR} < 4\%$, 则视为非甲基化状态。设过甲基化的 PBL DNA 的甲基化率为 100% , PBL DNA 的 M.SssI 甲基化反应具体方法见文献^[14]。LINE-1 基因以 Alu-C4 为内参基因,ESR2 基因以 β -actin 为内参基因,具体引物和探针序列见表 1。

1.2.4 GDM 水平检测实验

DNA 水解样品采用 Agilent 1100 型高效液相色谱系统,色谱柱为 Atlantis dC₁₈ 柱(Waters 公司),保护柱(Phenomenon 公司),流动相为体积分数 0.1% 的甲酸溶于水(A)和体积分数 0.1% 的甲酸溶于甲醇(B),洗脱程序为: $0 \sim 24 \text{ min}$, $0\% \sim 18\% \text{ B}$,流速为 $0.22 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。 5mdC 、 dG 和 8-OHdG 离子对检测条件分别为 m/z 241.9/126.3, m/z 268.1/152.3, m/z 284.2/152.3。GDM 水平表示为 $[5\text{mdC}]/[\text{dG}] \times 100\%$, 8-OHdG 水平表示为 $[8\text{-OHdG}]/[\text{dG}] \times 10^6$ 。

1.2.5 DNA 甲基转移酶(DNMTs)活性检测实验

$3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 CI-BDE-208 和 BDE-209 染毒 48 h 后,收集细胞并用细胞核蛋白/浆蛋白抽提试剂盒(百泰克,北京)提取蛋白质。然后用 DNMTs 活性检测试剂盒(Epigentek, USA)检测 DNMTs 活性,具体操作按照说明书。DNMTs 活性值表示为: $\text{DNMTs 活性}(\text{OD} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}) = 1000 \times (\text{样品吸光度值} - \text{空白吸光度值}) / (\text{蛋白量}(\mu\text{g}) \times \text{反应时间}(\text{h}))$ 。

1.2.6 基因表达水平检测实验

采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,经 PrimeScript[®] 逆转录试剂盒(Takara, China)逆转录成 cDNA 后,以 cDNA 为模板扩增。荧光定量 PCR(RT-PCR)扩增条件为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 2 min 后 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 15 s $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火延伸 1 min ,共 40 个循环。以 18S 基因为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法分析基因表达水平的改变,ESR1 和 18S 基因引物序列见表 1。

1.2.7 ESR1 基因甲基化水平检测实验

DNA 样品经亚硫酸氢钠修饰后,进行焦磷酸盐测序(华大基因公司完成)。具体方法如下: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 3 min $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s $48 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min ,共 40 个循环,最后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 7 min 。用 Pyrosequencing 检测仪(QIAGEN)进行反应,Pyro Q-CpG 软件自动分析每个位点甲基化状态。具体测序引物见表 1。

1.2.8 统计学处理

采用 IBM SPSS Statistics 19.0 统计软件进行数据处理。实验结果以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,采用 t 检验和单因素方差分析方法(ANOVA)比较实验组与对照组的差异性,* $P < 0.05$ 表示差异显著 # $P < 0.01$ 表示差异极显著 $P > 0.05$ 表示差异不显著。

表 1 引物和探针序列

Table 1 The sequence of primer and probe

基因 Gene	上游序列(5' → 3')	下游序列(5' → 3')	探针/测序引物 Probe/pyrosequencing primers
ESR1 ^a	GGGTAGGGTAGGGGTGAG	ATCCCCAAACAAAACTCAA	GGATAGGGTTAGAGT
Alu-C4 ^b	GGTAGGTATAGTGGTTATAATTGTAATTAG	ATATACTAAACTAATCTTAACTCTAACCTCA	FAM-CCTACCTTACCCTCCC-MGB
LINE-1 ^b	GGACGTATTTGGAATCCGG	ATTCTCGCGATACGCGGTT	FAM-TCGATATTGCGTTTCGGATCGGTT-BHQ-1
ESR2 ^b	TTGAAATTTGTAGGCGAAGAGTAG	ACCGTCGCAACTCGATTA	FAM-CCGACCCACGCTGCCG-TAMRA
β -actin ^b	TGGAGATGGAGGAGGTTAAGTAGT	AACCAATAAATCCTACTCCTCCTTAA	FAM-ACCACCACCAACACA CAATACACACA-TAMRA
ESR1 ^c	TGTGCAGACTATGCTTCA	CTGTTCTCCTGTGTTA	
18S ^c	TGCTCATTAAATCAGTTAGT	GTCCGCATGTACTAGCTCTAG	

注: ^a 为焦磷酸盐测序引物; ^b 为 Methylight 反应引物; ^c 为荧光定量 PCR 引物。

Note: ^a, the primers of Pyrosequencing; ^b, the primers of Methylight assay; ^c, the primers of RT-PCR.

2 结果 (Results)

2.1 CI-BDE-208 和 BDE-209 对 MCF-7 细胞的 LINE-1 甲基化和 GDM 水平的影响

从图 1A 中可看出,与对照组 DMSO 相比,0.375 ~ 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 CI-BDE-208 和 BDE-209 均引起了 LINE-1 基因甲基化水平的显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中,0.375、0.75、1.5 和 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 CI-BDE-208 诱导的 LINE-1 甲基化水平分别为 $(89.48 \pm 7.63)\%$ 、 $(86.59 \pm 5.5)\%$ 、 $(86.56 \pm 8.21)\%$ 、 $(86.29 \pm 9.78)\%$; 而 0.375、0.75、1.5 和 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 BDE-209 诱导的 LINE-1 甲基化水平分别为 $(87.01 \pm 9.75)\%$ 、

$(83.88 \pm 8.34)\%$ 、 $(81.05 \pm 11.46)\%$ 、 $(82.07 \pm 9.10)\%$ 。

为了进一步验证 LINE-1 甲基化改变的结果,采用 HPLC-MS/MS 方法检测 0.375 ~ 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 CI-BDE-208 和 BDE-209 对 GDM 水平的影响。结果显示,CI-BDE-208 和 BDE-209 在 0.375 ~ 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下都能引起 GDM 水平的显著降低(图 1B)。其中,0.375、0.75、1.5 和 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 CI-BDE-208 引起 GDM 水平分别降低为 $(91.51 \pm 0.03)\%$ 、 $(89.78 \pm 0.3)\%$ 、 $(92.09 \pm 6.47)\%$ 、 $(91.85 \pm 5.68)\%$; 而 0.375、0.75、1.5 和 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 BDE-209 引起 GDM 水平分别降低为 $(91.28 \pm 1.51)\%$ 、 $(89.93 \pm 0.22)\%$ 、 $(93.28 \pm 7.05)\%$ 、 $(91.93 \pm 4.38)\%$ 。

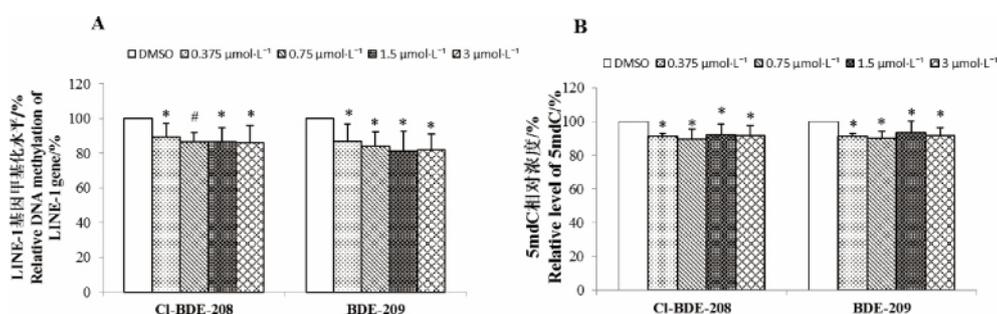


图 1 CI-BDE-208 和 BDE-209 对 MCF-7 细胞的 LINE-1 甲基化和 GDM 水平的影响

注: A) MethyLight 方法检测 LINE-1 基因甲基化水平的变化; B) HPLC-MS/MS 方法检测 GDM 水平的变化;

* $P < 0.05$, # $P < 0.01$; 0.375 ~ 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 CI-BDE-208 和 BDE-209 处理 MCF-7 细胞 48 h, 0.1% DMSO(V/V) 为对照组。

Fig. 1 Effects of CI-BDE-208 and BDE-209 exposure on LINE-1 methylation and GDM levels in MCF-7 cells

Note: A) Changes of LINE-1 methylation level were analyzed using MethyLight method; B) Changes of GDM level were analyzed using

HPLC-MS/MS method; * $P < 0.05$, # $P < 0.01$; MCF-7 cells were treated with 0.375 ~ 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CI-BDE-208 or

BDE-209 for 48 h, and 0.1 % DMSO (V:V) was used as the control group.

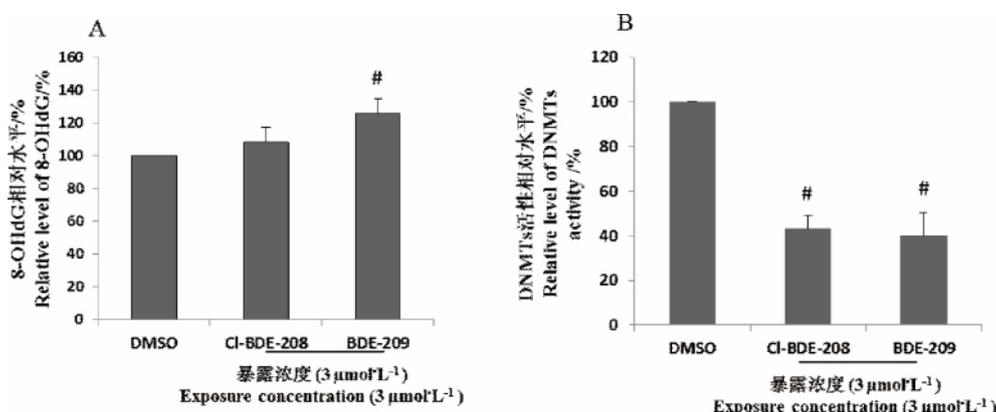


图 2 CI-BDE-208 和 BDE-209 对 MCF-7 细胞的 8-OHdG 水平和 DNMTs 酶活性的影响

注: A) HPLC-MS/MS 方法检测 8-OHdG 相对水平的变化; B) DNMTs 酶活性试剂盒检测 DNMTs 酶活性的变化;

$P < 0.01$; 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 CI-BDE-208 和 BDE-209 处理 MCF-7 细胞 48 h, 0.1% DMSO(V/V) 为对照组。

Fig. 2 Effects of CI-BDE-208 and BDE-209 exposure on 8-OHdG levels and DNMTs activity in MCF-7 cells

Note: A) Changes of 8-OHdG levels were analyzed using HPLC-MS/MS method; B) Changes of DNMTs activity were analyzed using DNMTs activity assay;

$P < 0.01$; MCF-7 cells were treated with 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CI-BDE-208 or BDE-209 for 48 h, and 0.1 % DMSO (V:V) was used as the control group.

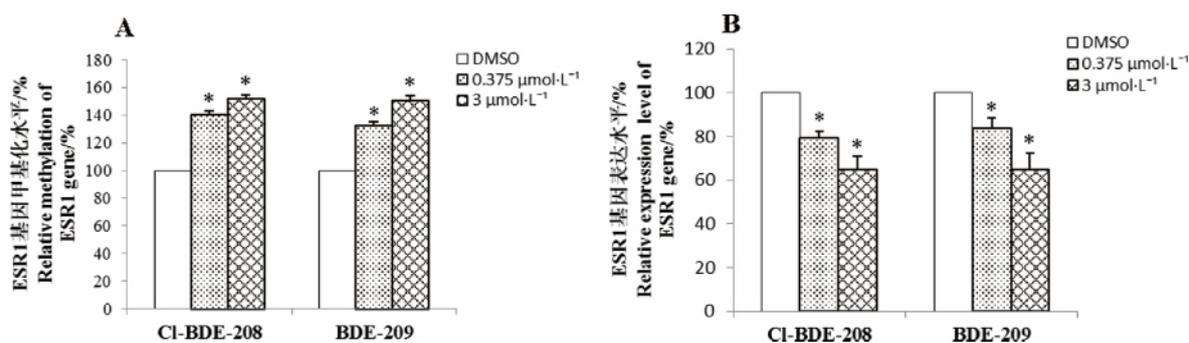


图 3 CI-BDE-208 和 BDE-209 对 MCF-7 细胞 ESR1 基因甲基化和表达水平的影响

注: A) 焦磷酸盐测序方法检测 ESR1 基因甲基化水平的变化; B) RT-PCR 检测 ESR1 基因表达水平的变化;

* $P < 0.05$; $0.375 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 CI-BDE-208 和 BDE-209 处理 MCF-7 细胞 48 h 0.1% DMSO(V/V)为对照组。

Fig. 3 Effects of CI-BDE-208 and BDE-209 exposure on methylation levels and gene expression of ESR1 in MCF-7 cells.

Note: A) Changes of ESR1 methylation levels were analyzed using Pyrosequencing method; B) Changes of ESR1 gene expression levels were analyzed using RT-PCR method; * $P < 0.05$; MCF-7 cells were treated with $0.375 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CI-BDE-208 or BDE-209 for 48 h, and 0.1% DMSO (V/V) was used as the control group.

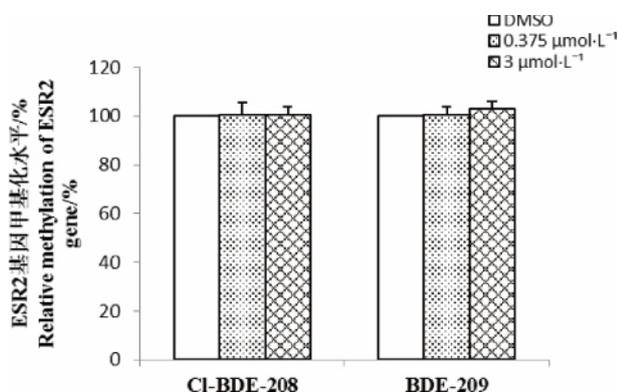


图 4 CI-BDE-208 和 BDE-209 对 MCF-7 细胞 ESR2 基因甲基化水平的影响

注: $0.375 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 CI-BDE-208 和 BDE-209 处理 MCF-7 细胞 48 h 0.1% DMSO(V/V)为对照组, 然后用 MethyLight 方法检测 ESR2 基因甲基化水平的变化。

Fig. 4 Effects of CI-BDE-208 and BDE-209 exposure on ESR2 methylation levels in MCF-7 cells

Note: MCF-7 cells were treated with $0.375 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CI-BDE-208 or BDE-209 for 48 h, and 0.1% DMSO (V/V) was used as the control group. Changes of ESR2 methylation levels were analyzed using MethyLight method.

2.2 CI-BDE-208 和 BDE-209 对 MCF-7 细胞的 8-OHdG 水平的影响

从图 2A 中可看出, CI-BDE-208 并没有引起 8-OHdG 水平的显著改变 ($P > 0.05$), 但 BDE-209 在 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下引起了 8-OHdG 水平的显著升高 ($P < 0.01$)。

2.3 CI-BDE-208 和 BDE-209 对 MCF-7 细胞的 DNMTs 活性的影响

从图 2B 中可看出, CI-BDE-208 和 BDE-209 在 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下都引起了 DNMTs 活性的显著降低, 与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 CI-BDE-208 和 BDE-209 对 MCF-7 细胞 ESR1 基因甲基化和表达水平的影响

从图 3 中可看出, CI-BDE-208 和 BDE-209 在 $0.375 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 均引起了 ESR1 基因甲基化水平的显著升高 (图 3A), 同时显著下调了 ESR1 基因的表达 (图 3B)。

2.5 CI-BDE-208 和 BDE-209 对 MCF-7 细胞 ESR2 基因甲基化水平的影响

从图 4 中可看出, CI-BDE-208 和 BDE-209 在 $0.375 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 并没有引起 ESR2 基因甲基化水平的显著改变 ($P > 0.05$)。

3 讨论 (Discussions)

目前较广泛使用重复序列 (ALU, LINE 和 SAT 等) 的甲基化水平和 5mdC 的水平这 2 种指标来表征全基因组 DNA 甲基化水平。本文采用重复序列 LINE-1 的甲基化水平来表征全基因组 DNA 甲基化水平, 因为这种指标可以将 DNA 甲基化改变定位到这一类的重复序列上, 并且与其他重复序列相比, 更多的癌症组织表现为 LINE-1 基因低甲基化的特性^[11]。本实验中, CI-BDE-208 和 BDE-209 都显著降低了 LINE-1 的甲基化水平, 5mdC 数据也验证了这

一结果。其他文献也报道了类似结果,比如环境污染物苯和PM10都诱导了人体血液DNA中LINE-1基因的低甲基化^[9,15],以及苯和三氯生都引起了哺乳动物细胞GDM水平的降低^[16-17]。从5mdC数据看,C1-BDE-208和BDE-209引起的GDM水平降低程度略小,而2个化合物引起LINE-1基因甲基化水平的改变较为明显,这可能是由于重复序列仅占全基因组序列的三分之一^[18],而当某些基因组区域内可能发生了高甲基化时,比如抑癌基因启动子区域内发生高甲基化时,全基因组DNA甲基化水平的整体降低幅度将减小,即5mdC%的降低幅度较小。

DNA甲基化主要是由DNA甲基转移酶(DNMTs,包括DNMT1、DNMT3a和DNMT3b)催化完成的,基因组DNA甲基化的失调常伴随着DNMTs的异常^[19]。有研究表明,DNMTs活性的缺失与全基因组DNA甲基化水平的降低具有相关性,但DNMTs表达水平的降低并不一定是全基因组DNA甲基化水平降低的直接影响因素,比如结肠癌、前列腺癌和乳腺癌等样品中都呈现全基因组DNA甲基化水平降低,但DNMTs表达却是升高的^[11,20]。所以,本文只选择检测DNMTs活性来探究LINE-1和GDM低甲基化的可能机制,而数据表明C1-BDE-208和BDE-209都显著降低了DNMTs活性,说明C1-BDE-208和BDE-209可能都是通过抑制DNMTs的活性而引起了LINE-1和GDM低甲基化。

LINE-1和GDM低甲基化的另一个可能原因是8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)水平的升高。8-OHdG是DNA氧化损伤的标志物,可通过降低DNA甲基化酶(DNMTs)与DNA的亲和力,从而抑制DNA甲基化^[21]。本次实验结果显示,BDE-209引起了8-OHdG水平的显著升高,而C1-BDE-208对8-OHdG水平影响较小。表明C1-BDE-208的DNA氧化损伤的能力小于BDE-209,也说明BDE-209可能通过增加8-OHdG水平而诱导了LINE-1和GDM低甲基化。

ESR1高甲基化是在乳腺癌^[22]、卵巢上皮癌^[23]和膀胱癌^[24]等癌症组织中频频出现的指标,是疾病诊断的生物标志物。从ESR1实验结果看,C1-BDE-208和BDE-209都显著诱导了ESR1基因甲基化的升高,并下调了ESR1基因的表达,说明C1-BDE-208和BDE-209可能都是通过诱导ESR1的高甲基化而下调了ESR1基因的表达。这一结果暗示了环境相关

浓度的C1-BDE-208和BDE-209对人体的早期健康具有一定的不良效应,表明ESR1基因的高甲基化可能是C1-BDE-208和BDE-209引起内分泌毒性的机制之一。

综上,C1-BDE-208和BDE-209都可能通过改变DNA甲基化水平而影响人体的早期健康效应,同时ESR1基因的高甲基化可能是C1-BDE-208和BDE-209引起内分泌毒性的机制之一;从表观遗传学的改变水平看,一个氯(Cl)基团的取代对BDE-209的毒性影响并不大。因此,还需通过使用多种人体细胞、动物实验或采集相关暴露人群的血液样本开展下一步的研究,以便从表观遗传角度更全面地阐述C1-BDE-208和BDE-209对人体的早期健康效应。

通讯作者简介:马慧敏(1981-),女,副研究员,博士。研究方向为环境污染物与表观遗传学。

参考文献(References):

- [1] 杜红燕,朱琳,陈中智,等. 十溴联苯醚的毒理学效应研究进展[J]. 毒理学杂志, 2008, 22(1): 50-52
Du H Y, Zhu L, Chen Z Z, et al. The research progress of BDE-209 in toxicological effect [J]. Toxicology, 2008, 22(1): 50-52 (in Chinese)
- [2] Frederiksen M, Vorkamp K, Thomsen M, et al. Human internal and external exposure to PBDEs—A review of levels and sources [J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2009, 212(2): 109-113
- [3] Bi X H, Thomas G O, Jones K C, et al. Exposure of electronics dismantling workers to polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticides in South China [J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(16): 5647-5653
- [4] Tseng L H, Li M H, Tsai S S, et al. Developmental exposure to decabromodiphenyl ether (PBDE 209): Effects on thyroid hormone and hepatic enzyme activity in male mouse offspring [J]. Chemosphere, 2008, 70(4): 640-647
- [5] Van der Ven L T M, Van de Kuil T, Leonards P E G, et al. A 28-day oral dose toxicity study in Wistar rats enhanced to detect endocrine effects of decabromodiphenyl ether (decaBDE) [J]. Toxicology Letters, 2008, 179(1): 6-14
- [6] Yu Z Q, Zheng K W, Ren G F, et al. Identification of monochloro-nonabromodiphenyl ethers in the air and soil samples from south China [J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(7): 2619-2625
- [7] Qu W Y, Bi X H, Sheng G Y, et al. Exposure to polybrominated diphenyl ethers among workers at an electronic

- waste dismantling region in Guangdong, China [J]. *Environment International*, 2007, 33(8): 1029-1034
- [8] Dolinoy D C, Huang D, Jirtle R L. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(32): 13056-13061
- [9] Tarantini L, Bonzini M, Apostoli P, et al. Effects of particulate matter on genomic DNA methylation content and iNOS promoter methylation [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2009, 117(2): 217-222
- [10] Pierron F, Baillon L, Sow M, et al. Effect of low-dose cadmium exposure on DNA methylation in the endangered European eel [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(1): 797-803
- [11] Wilson A S, Power B E, Molloy P L. DNA hypomethylation and human diseases [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1775(1): 138-162
- [12] Hsiung D T, Marsit C J, Houseman E A, et al. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2007, 16(1): 108-114
- [13] Do H D, Wong N C, Murone C, et al. A critical re-assessment of DNA repair gene promoter methylation in non-small cell lung carcinoma [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 4186
- [14] Weisenberger D J, Campan M, Long T I, et al. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(21): 6823-6836
- [15] Bollati V, Baccarelli A, Hou L, et al. Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene [J]. *Cancer Research*, 2007, 67(3): 876-880
- [16] Hu J J, Ma H M, Zhang W B, et al. Effects of benzene and its metabolites on global DNA methylation in human normal hepatic L02 cells [J]. *Environmental Toxicology*, 2014, 29(1): 108-116
- [17] Ma H M, Zheng L J, Li Y H, et al. Triclosan reduces the levels of global DNA methylation in HepG2 cells [J]. *Chemosphere*, 2013, 90(3): 1023-1029
- [18] Hou L F, Zhang X, Wang D, et al. Environmental chemical exposures and human epigenetics [J]. *International Journal of Epidemiology*, 2012, 41(1): 79-105
- [19] Liu Q C, Yang L Q, Gong C M, et al. Effects of long-term low-dose formaldehyde exposure on global genomic hypomethylation in 16HBE cells [J]. *Toxicology Letters*, 2011, 205(3): 235-240
- [20] 王晶晶, 马慧敏, 李宝才, 等. 苯代谢物氢醌对人体肝细胞内 DNA 甲基转移酶基因和蛋白表达的影响 [J]. *昆明理工大学学报: 自然科学版*, 2013, 38(5): 90-95
- Wang J J, Ma H M, Li B C, et al. Effects of hydroquinone on the expression of DNA methyltransferase mRNA and protein in L02 cells [J]. *Journal of Kunming University of Science and Technology: Natural Science Edition*, 2013, 38(5): 90-95 (in Chinese)
- [21] Maltseva D V, Baykov A A, Jeltsch A, et al. Impact of 7, 8-dihydro-8-oxoguanine on methylation of the CpG site by Dnmt3a [J]. *Biochemistry*, 2009, 48(6): 1361-1368
- [22] Giacinti L, Claudio P P, Lopez M, et al. Epigenetic information and estrogen receptor alpha expression in breast cancer [J]. *Oncologist*, 2006, 11(1): 1-8
- [23] 刘曼华, 王莹. 雌激素受体 α 基因启动子甲基化在卵巢上皮癌中表达的意义 [J]. *实用癌症杂志*, 2011, 26(5): 448-451
- Liu M H, Wang Y. Expression of methylation of ER α gene promoter in ovarian cancer [J]. *The Practical Journal of Cancer*, 2011, 26(5): 448-451 (in Chinese)
- [24] 阳东荣, 沈罡, 单玉喜, 等. 膀胱癌 ER α 基因甲基化与 ER 表达的相关性 [J]. *江苏医药*, 2010, 36(19): 2237-2239
- Yang D R, Shen G, Shan Y X, et al. Correlation between estrogen receptor α gene methylation and ER gene expression in bladder transitional cell carcinoma [J]. *Jiangsu Medical Journal*, 2010, 36(19): 2237-2239 (in Chinese) ◆