

文章编号: 1000-8020(2013)02-0179-06

·论著·

## 短期暴露于纳米 SiO<sub>2</sub> 对 HaCaT 细胞 基因组 DNA 甲基化的影响

龚春梅 杨淋清<sup>1</sup> 陶功华<sup>1</sup> 刘庆成<sup>1</sup> 刘建军<sup>1</sup> 庄志雄<sup>1,2</sup>

深圳市慢性病防治中心, 深圳 518020



**摘要:**目的 探讨纳米 SiO<sub>2</sub> 对体外培养细胞基因组总体 DNA 甲基化水平的影响。方法 分别以 2.5、5、10 μg/ml 纳米 SiO<sub>2</sub> 溶液和 10 μg/ml 微米级 SiO<sub>2</sub> 处理人皮肤表皮细胞系 (HaCaT) 24h; 以 3 μmol/L DNA 甲基化转移酶抑制剂 5-脱氧杂氮胞苷 (DAC) 处理 48 h 的 10 μg/ml 组为阳性对照, 并设立溶剂对照组。应用高效毛细管电泳 (HPCE) 定量分析纳米 SiO<sub>2</sub> 处理细胞 24h 后, 基因组 DNA 总体甲基化的变化, 用 Q-PCR 和 Western Blot 方法检测甲基化相关蛋白 mRNA 和蛋白的表达变化, 并用 DNA 甲基化转移酶活性试剂盒检测 DNA 甲基化转移酶的活性。结果 HPCE 定量分析结果显示纳米 SiO<sub>2</sub> 可引起 HaCaT 细胞总体甲基化程度降低, 呈剂量依赖性关系; 与正常细胞相比, 微米 SiO<sub>2</sub> 以及 2.5、5 和 10 μg/ml 纳米 SiO<sub>2</sub> 组分别降低 37.8%、43.9%、54.9% 和 52.8%, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ); 对照组 5-aza-dC 处理后使 HaCaT 细胞甲基化程度减少 27.3%。各组酶的蛋白表达与 mRNA 表达水平及 DNMTs 活性变化具有相同的变化趋势, 经纳米 SiO<sub>2</sub> 处理的 HaCaT 细胞, DNMT1、DNMT3a 及 MBD<sub>2</sub> 表达随着纳米 SiO<sub>2</sub> 剂量的上升而下降, DAC 组表达水平最低。结论 纳米 SiO<sub>2</sub> 能引起 HaCaT 细胞整体基因组 DNA 甲基化水平降低, 可能与 DNA 甲基化转移酶的酶活性降低有关。

**关键词:** DNA 甲基化 高效毛细管电泳 (HPCE) 纳米 SiO<sub>2</sub>

中图分类号: Q555 R994.6

文献标识码: A

## Genome DNA hypomethylation in HaCaT cells after short exposure to SiO<sub>2</sub> nanoparticles

GONG Chunmei, YANG Linqing, TAO Gonghua, LIU Qingcheng, LIU Jianjun,  
ZHUANG Zhixiong

Shenzhen Center for Chronic Disease Control, Shenzhen 518020, China

**Abstract: Objective** To observe the effect of SiO<sub>2</sub> nanoparticles on genome DNA methylation profile in cultured cells. **Methods** HaCaT cells were treated with nm-SiO<sub>2</sub> at 2.5, 5 and 10 μg/ml and micro-SiO<sub>2</sub> at 10 μg/ml for 24h and DAC treatment was given at 10 μg/ml group for 48h. The mC/(mC + C) percent was quantified by high performance capillary electrophoresis (HPCE) assay, and the expression level of mRNA and protein was detected by Real-time Q-PCR and western blot assay. The activity of DNMTs was determined by DNA Methyltransferase Activity/Inhibition Assay Kit. **Results** HPCE assay showed that nm-SiO<sub>2</sub>-treated cells were decreased in some degree. An average

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 30972505, 81202239); 深圳市重点项目 (No. 200901017)

作者简介: 龚春梅, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 分子与生化毒理学, E-mail: spring417@126.com

<sup>1</sup> 深圳市疾病预防控制中心

<sup>2</sup> 通讯作者: 庄志雄, 男, 教授, 研究方向: 分子与生化毒理学, E-mail: zxzhuang2007@126.com

proportion of methylated  $mC / (mC + C)$  was 4.82% in control, 2.7% in 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 2.17% in 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  groups, while 3.1% in micro-SiO<sub>2</sub> groups, which got the consistent downtrend of genome methylation level during increasing nm-SiO<sub>2</sub> dose nanoparticles. The mRNA expression level for DNMT1 decreased gradually with increased dose of nm-SiO<sub>2</sub> nanoparticles. The alterations at protein level were similar to those at the mRNA level.

**Conclusion** Genomic DNA methylation levels were decreased in HaCaT cells after short term exposure to SiO<sub>2</sub> nanoparticles.

**Key words:** DNA methylation, high performance capillary electrophoresis, SiO<sub>2</sub> nanoparticles (nm-SiO<sub>2</sub>), HaCaT cell

纳米 SiO<sub>x</sub> 是目前世界上大规模工业化生产产量最高的一种纳米材料。众所周知以石英为代表的结晶型 SiO<sub>2</sub> 对人体有很大危害,可致肺组织纤维化(矽肺),其致癌作用已有足够的动物实验和人群流行病学调查证据,被国际癌症研究所(IARC)于1997年确定为I类致癌物<sup>[1-2]</sup>。纳米 SiO<sub>2</sub>,因具有特殊的结构层次,化学纯度高,分散性好,比表面积大,是目前世界上大规模工业化生产的产量最高的一种纳米粉体材料,具有良好的稳定性、易散性和融变性,因此广泛应用于橡胶、涂料、生物医学及生物技术等各个领域<sup>[3-4]</sup>。人们在工作生活中接触机会增多,对其生物学效应的研究也越来越受到人们的关注,其毒性研究目前尚处于起步阶段,研究结论亦不完全一致<sup>[5-9]</sup>,迄今世界各国尚未制定针对纳米材料特性的安全评价标准和劳动保护条例。

表遗传学研究手段应用到毒理学范畴为全面评价外源化学物质的遗传毒性提供了新的思路和可能<sup>[10]</sup>,对纳米材料的安全性评价也是如此,但目前国内外关于纳米材料表遗传毒性的研究报道还很鲜见。基因组 DNA 整体甲基化状况是基因表观遗传微环境的基础之一,DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 参与维持基因组 DNA 的甲基化状态<sup>[11]</sup>。

本研究以人皮肤表皮细胞 HaCaT 为研究对象,对比细胞暴露于微米 SiO<sub>2</sub> 及纳米 SiO<sub>2</sub> 后基因组 DNA 总体甲基化水平的变化,同时检测甲基化转移酶在 mRNA 和蛋白表达变化及 DNMTs 的活性变化,观察暴露于 SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒后,基因组 DNA 甲基化水平及 DNMTs 表达及活性差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HaCaT 细胞购自中国武汉典型物收藏中心;细胞受试物为质量浓度 2% 的 15nm-SiO<sub>2</sub> 溶液,购

自杭州万景新材料有限公司。微米 SiO<sub>2</sub> 粉末 (1~5  $\mu\text{m}$ ) 购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 纳米 SiO<sub>2</sub> 材料的表征

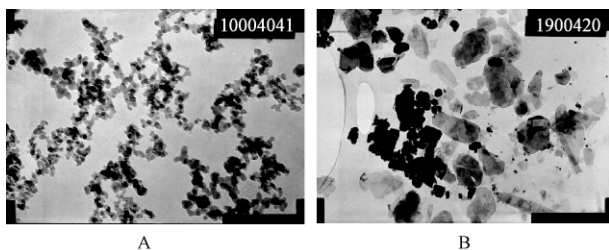
**1.2.1 粒径分布** 使用 NICOMP 380ZLS Submicron Particle Sizer 测定纳米 SiO<sub>2</sub> 溶液的有效粒径分布,比较检测结果与商品标注的粒径值有无差异。并使用激光离子粒度仪检测纳米 SiO<sub>2</sub> 与 MEM 培养基混合 24h 后的水动力学粒径,以检测与细胞暴露时的有效粒径。15nm 样品平均粒径为 (13.0 ± 1.8) nm 的颗粒占 100%。该有效粒径值与厂商标注的 15nm 有一定偏差,但较接近标注值。为了确定暴露过程中的真实粒径,将纳米 SiO<sub>2</sub> 用无血清 MEM 培养基稀释到最大的工作浓度,37℃ 放置 24h,测其有效粒径。结果 15nm 样品平均粒径为 (14.6 ± 0.3) nm。

**1.2.2 Zeta 电位** 使用 NICOMP 380ZLS Submicron Particle Sizer 测定纳米 SiO<sub>2</sub> 溶液的 Zeta 电位 (Zeta 电位是一个表征分散体系稳定性的重要指标),比较检测不同溶液体系分散性和稳定性。结果显示 15nm SiO<sub>2</sub> 的 Zeta 电位为 -14.37 mV,而微米 SiO<sub>2</sub> 的 Zeta 电位 -63.31 mV。

**1.2.3 化学纯度** 使用 ICP-MS Thermo Elemental X7 检测其化学纯度,比较不同样品的化学组成,包括重金属元素等。检测结果显示:样品纯度均相当高,达到 99.9% 以上;并未检出有任何重金属元素存在,仅有少量的钠元素被检出。

**1.2.4 透射电镜检测** 使用透射电镜 (TEM) 对其粒径进行直接表征,比较其与间接粒径表征之间的差异。透射电镜对纳米颗粒的表征是一种直接表征,本实验中前面的间接表征显示该纳米 SiO<sub>2</sub> 符合实验要求。直接表征结果也显示该纳米 SiO<sub>2</sub> 合乎规格 (见图 1)。

**1.2.5 无菌处理** 为了确保在细胞暴露于不同粒径的二氧化硅的过程中仍然处于无菌状态,在暴露之前,对其储液进行 30min 的紫外暴露处理。无菌处理的结果显示,当购入的纳米 SiO<sub>2</sub> 溶液不

A: 15nm SiO<sub>2</sub>; B: 微米 SiO<sub>2</sub>图 1 SiO<sub>2</sub>颗粒的透射电镜分析图Figure 1 TEM images of engineered SiO<sub>2</sub> nanoparticles

经任何处理时,作用于哥伦比亚血平板后能长出大量细菌(未处理),但是每毫升样品放于六孔板中经过紫外处理 30min 或者经过 0.22 $\mu$ m 滤膜处理后,则处于无菌状态。但是经过 0.22 $\mu$ m 滤膜处理后的样品,可能会降低二氧化硅溶质的含量,所以所有实验都采用紫外处理的方式。

### 1.3 细胞培养及处理

HaCaT 细胞用含胎牛血清 10% (V/V)、1% 青霉素双抗、1% 的丙酮酸钠、1% 的非必需氨基酸的 MEM 培养液,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的环境中培养,细胞大致按 1.0  $\times$  10<sup>4</sup> 个/cm<sup>2</sup> 密度接种,隔日换液,每周传代 2~3 次。根据既往的细胞毒性试验确定细胞暴露浓度。分别以 2.5、5 和 10 $\mu$ g/ml 纳米 SiO<sub>2</sub> 处理人永生化细胞 (HaCaT) 24h。其中一组以 3 $\mu$ mol/L DNA 甲基转移酶抑制剂 5-脱氧杂氮胞苷 (DAC) 预处理 24h 后,再以 10 $\mu$ g/ml 的纳米 SiO<sub>2</sub> 处理 HaCaT 细胞 24h 记为 DAC 组,以此为阳性对照。溶剂对照组、微米组对照组分别是以溶剂和 10 $\mu$ g/ml 的微米 SiO<sub>2</sub> 处理 24h 的细胞。

### 1.4 HPCE 法精确检测 5-mC 的含量

1.4.1 样品处理 HPCE 的样品预处理和电泳参考文献 [12] 并略作修改,样品处理步骤详细如下:

(1) 取 10 $\mu$ g DNA, 37 $^{\circ}$ C, RNAase A 消化 1h; 用 3mol/L NaAc (0.1V, pH5.2) 和冷无水乙醇 (2V, 100%) 沉淀 DNA。(2) DNA 溶于 10 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 中,沸水中水浴 5min,冰上冷却。(3) 10mmol/L ZnSO<sub>4</sub> (1.5 $\mu$ l) + 1.5 $\mu$ l 核酸酶 P1 (Sigma; 200U/ml) 于 30mmol/L NaAc 中, 37 $^{\circ}$ C 下孵育 18h。(4) 加入 Tris 1.25 $\mu$ l; (0.5mol/L; pH8.3) 和 0.75 $\mu$ l 碱性磷酸酶 (Sigma; 50U/ml) 于 2.5mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2h。(5) 10 000r/min 离心 5min 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4.2 高效毛细管电泳 70cm  $\times$  75 $\mu$ m 的毛细管,有效分离长度为 65cm,电泳缓冲液由

48mmol/L NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.6) 及 60mmol/L SDS 组成,电泳条件 25 $^{\circ}$ C, 15kV, 254nm 处检测;电泳系统先用 1.0mol/L NaOH 及 0.1mol/L NaOH 平衡 3min,电泳缓冲液 48mmol/L NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.6) + 60mmol/L SDS 平衡 3min;进样条件 (0.3p. s. i.) 3s; 15kV 恒压及 20 $^{\circ}$ C 恒温,汞灯,紫外检测波长 254nm,计算: dmC 峰面积  $\times$  100 / (dC 峰面积 + dmC 峰面积)。

### 1.5 基因蛋白表达水平检测

1.5.1 相关基因 mRNA 表达变化 应用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 提取细胞总 RNA, PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit (Takara) 反转录合成 cDNA, 荧光定量 PCR 采用 SYBR<sup>®</sup> + Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Perfect Real Time) (TaKaRa) 试剂。引物序列如下表:

表 1 DNMTs 引物设计和内对照基因 ACTB 引物

Table 1 The primer sequences of DNMTs related genes and ACTB gene

	序列 (5'—3')	退火 温度 ( $^{\circ}$ C)
DNMT1	F ACGACCCTGACCTCAAATAT R CCATTAACACCACCTTCAAG A	60
DNMT3a	F CACAGAAGCATATCCAGGAG R CACATTCTCAAAGAGCCAGA R CGATAGGAGACGAGCTTATTG R CCTGACCCTTCTGATGTCTC	60
MBD2	F ACTATAAGTGCCCTCTGTGT R TCAGAGTCTCCTTCATGTACTION	58
ACTB	F TGGCACCCAGCACAATGAA R CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA	60

1.5.2 相关蛋白水平表达 采用蛋白裂解液 (10mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 7mol/L Urea, 2mol/L Thiourea, 4% CHAPS, 2mol/L Thiourea) 提取细胞总蛋白,一抗 DNMT1 (ab54759-100, abcam), DNMT3a (sc-20703, Santa Cruz), MBD<sub>2</sub> (sc-10753, Santa Cruz), GAPDH (sc-32233, Santa Cruz); 二抗 goat anti-mouse IgG-HRP (prod # 31430, Thermo Scientific), goat anti-rabbit IgG-HRP (prod # 31460, Thermo Scientific); 进行 Western Blot 检测蛋白表达水平变化。

### 1.6 DNA 甲基化转移酶 (DNMTs) 活性检测

核抽提试剂盒是一种从全细胞中抽提核的简便、快速而有效的方法,本试验参照核抽提试剂盒 (Active Motif North America) 对处理细胞抽提核蛋白后,利用 2D quant 定量试剂盒对获得的核抽提物进行定量。定量后参照甲基转移酶活性检测试剂盒 DNA Methyltransferase Activity/Inhibition

Assay Kit( Epigentek US) 对抽提的核蛋白 DNMTs 的活性进行测定。

### 1.7 统计学分析

统计分析使用 SPSS 16.0 软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间均数的比较采用单因素方差分析( one-way ANOVA) 的方法,进一步的两两比较采用 Dunnett-*t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 总体甲基化水平

以 HaCaT 细胞作为受试细胞,经纳米 SiO<sub>2</sub> 染毒处理 24h 后,用 HPCE 电泳检测 HaCaT 细胞的总体甲基化水平。实验结果如图 2 显示纳米 SiO<sub>2</sub> 可引起 HaCaT 细胞甲基化程度降低,呈剂量依赖性关系;与正常细胞相比,微米 SiO<sub>2</sub>、2.5、5 和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  分别降低 37.8%、43.9%、54.9% 和 52.8%,差异有显著性( $P < 0.05$ );与甲基化免疫荧光结果相似。对照组 5-aza-dC 处理后使 HaCaT 细胞甲基化程度减少 27.3%。

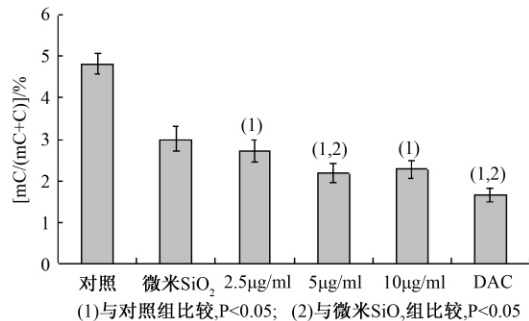


图 2 HPCE 法检测纳米 SiO<sub>2</sub> 对 HaCaT 细胞总体 DNA 甲基化的影响

Figure 2 Analysis of global DNA methylation in HaCaT cells induced by SiO<sub>2</sub> particles through HPCE assay

### 2.2 甲基转移酶基因和蛋白表达水平的检测

#### 2.2.1 甲基转移酶 mRNA 表达水平的检测

由表 2 可见,对于 DNMT1 的 mRNA 水平表达,与溶剂对照组相比,微米 SiO<sub>2</sub> 组细胞无明显改变,纳米 SiO<sub>2</sub> 暴露组(2.5、5 和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 分别降低 26.8%、55%、59.6%,对于 DAC 处理组, DNMT1 的 mRNA 水平也降低 74.9%。对于 DNMT3a 的 mRNA 水平表达,与溶剂对照组细胞相比,微米 SiO<sub>2</sub> 组细胞稍微降低,纳米 SiO<sub>2</sub> 暴露组(2.5、5 和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 分别降低 42.4%、49.8%、62.5%,对于 DAC 处理组, DNMT1 的 mRNA 水平也降低 66.1%。对于 MBD<sub>2</sub> 则随着纳米 SiO<sub>2</sub> 剂量的升高有降低的趋势。因此,在纳米 SiO<sub>2</sub> 致 HaCaT 细胞表观遗传改变的过程中,与对照组细胞相比,纳米 SiO<sub>2</sub> 暴露组细胞 DNMT1、DNMT3a 和 MBD<sub>2</sub> 的

mRNA 表达有所降低。

表 2 HaCaT 细胞经 15nm SiO<sub>2</sub> 处理 24h 后甲基化相关酶 mRNA 相对定量

组别	DNMT1	DNMT3a	MBD2
对照组	100	100	100
微米 SiO <sub>2</sub>	89 $\pm$ 6	74 $\pm$ 8 <sup>(1)</sup>	110 $\pm$ 12
纳米 SiO <sub>2</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )			
2.5	73 $\pm$ 4 <sup>(1,2)</sup>	58 $\pm$ 4 <sup>(1,2)</sup>	106 $\pm$ 10
5	45 $\pm$ 5 <sup>(1,2)</sup>	50 $\pm$ 5 <sup>(1,2)</sup>	90 $\pm$ 8 <sup>(1,2)</sup>
10	40 $\pm$ 3 <sup>(1,2)</sup>	38 $\pm$ 4 <sup>(1,2)</sup>	78 $\pm$ 7 <sup>(1,2)</sup>
DAC	25 $\pm$ 3 <sup>(1,2)</sup>	34 $\pm$ 3 <sup>(1,2)</sup>	34 $\pm$ 9 <sup>(1,2)</sup>

注:(1)与对照组相比  $P < 0.05$ ;(2)与微米 SiO<sub>2</sub> 组比较  $P < 0.05$

#### 2.2.2 DNA 甲基化转移酶蛋白表达水平的检测

应用相应的抗体进行蛋白印迹检测,各组细胞 DNA 甲基化相关酶的蛋白表达如图 3 显示,各组酶的蛋白表达与 mRNA 表达水平具有相同的变化趋势,纳米 SiO<sub>2</sub> 致 HaCaT 损伤的过程中, DNMT1、DNMT3a 及 MBD<sub>2</sub> 表达呈下降趋势, DAC 组表达水平最低。

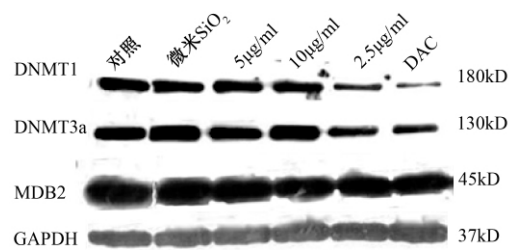


图 3 HaCaT 细胞经 15nm SiO<sub>2</sub> 处理 24h 后甲基化相关酶的蛋白表达

Figure 3 The protein levels in HaCaT cells induced by 15nm SiO<sub>2</sub> for 24h were detected by immunoblotting

### 2.3 甲基转移酶活性检测

纳米 SiO<sub>2</sub> 致 HaCaT 损伤的过程中,与溶剂对照组细胞相比,发现所测得的酶活性有下降的趋势,微米级对照组的活性是溶剂对照组活性的 96.7%,nm-SiO<sub>2</sub> 染毒组(2.5、5、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 细胞的活性分别为溶剂对照组的 68.7%、57.1% 和 60.4%,对于 3 $\mu\text{mol}/\text{L}$  甲基化酶抑制剂 DAC 组为溶剂对照组的 32.5%。与对照及微米 SiO<sub>2</sub> 组比较,纳米 SiO<sub>2</sub> 三个染毒组及 DAC 组均显著降低( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

皮肤是人体最大的器官,经皮暴露是纳米 SiO<sub>2</sub> 的一种重要暴露途径,所以本研究选用皮肤表皮细胞 HaCaT 为研究对象,研究暴露后对其基因组整体甲基化的影响及 DNA 甲基化相关蛋

白的表达变化,为纳米 SiO<sub>2</sub>的生物效应研究和安全性评价提供实验依据。DNA 甲基化是一种十分重要的基因表达调控机制,在生物进化、物种繁衍和个体生存诸方面均具有广泛的作用。DNA 甲基化也是表观遗传学修饰的一个主要方面,通过对基因组整体甲基化水平和特定基因水平甲基化的研究,进一步明确了基因功能,也揭示了疾病中许多基因表达沉默的表观遗传学机制<sup>[13]</sup>。

胞嘧啶甲基化是真核生物最常见的 DNA 序列修饰,是在 DNA 甲基转移酶(DNMT)的作用下,胞嘧啶环的 C<sub>5</sub>加入一个甲基成为 5-甲基胞嘧啶(5-mC)。该反应主要发生在与鸟嘌呤 5' 端相邻的胞嘧啶上,也就是 CpG 二核苷酸。DNA 甲基化发生在 5-胞嘧啶残基,由 DNMTs 催化,并建立和维持正常的 DNA 甲基化模式,从而进行正常的基因表达调控<sup>[14]</sup>。

每项毒理学检测都应该附有待测纳米材料的详细表征参数,以更好地了解其生物关联性。因此,在进行实验研究之前,对纳米 SiO<sub>2</sub>及微米 SiO<sub>2</sub>进行了部分理化性质的表征工作,目的在于描述不同实验阶段纳米 SiO<sub>2</sub>的主要表征参数的变化,从而评估当前所用的分析技术、方法和程序是否能满足体内外实验研究中定性和定量检测纳米材料的要求,以得到科学有意义的剂量-效应关系。从毒理学角度去考虑纳米材料最基本的理化性质,能更好地描述作为毒性介质的纳米材料的生物学效应。本研究从纳米 SiO<sub>2</sub>原液粒径及与 MEM 培养基稀释后的水动力学粒径分布、透射电镜、Zeta 电位、纯度等方面进行表征,发现本实验所购试剂符合实验要求。

本研究通过 HPCE 法定量检测纳米 SiO<sub>2</sub>溶液暴露于细胞过程中基因组 DNA 甲基化水平的变化及甲基化转移酶相关基因的表达及活性变化。HaCaT 细胞暴露于纳米 SiO<sub>2</sub>颗粒后,基因组 DNA 甲基化随着剂量的升高而下降,10 μg/ml 组整体 DNA 甲基化水平最低。然而,造成基因组 DNA 甲基化水平随纳米 SiO<sub>2</sub>剂量增大而改变的机制仍不清楚,DNMT1 随剂量表达降低,其可能作用于甲基化胞嘧啶内容物的整体降低。DNA 低甲基化促使基因组不稳定性的发生,通常反映的是重复序列散在 CpG 岛或一些基因转录相关区域的甲基化程度降低<sup>[15]</sup>。另外有研究报道:氧自由基会造成 DNA 损伤,影响 DNA 甲基化,应用 8-OH-鸟嘌呤取代鸟嘌呤,发现邻近胞嘧啶的甲基化显著改变,这一改变具有高度的位置特异性,氧自由基一定程度上改变所观察的甲基化状态<sup>[16]</sup>。

羟自由基的产生能引起大范围的 DNA 损伤,如碱基修饰、碱基丢失、链断裂、染色体重排等。上述的 DNA 损伤会影响 DNA 作为甲基转移酶底物的活性,并最终导致 DNA 甲基化不足<sup>[17]</sup>。氧化剂能够改变细胞内谷胱甘肽的水平,通过降低 SAM 的可利用度而影响 DNA 甲基化<sup>[18]</sup>,而且也可以削弱细胞内甲基转移酶对靶胞嘧啶甲基化的能力<sup>[19]</sup>。前期的研究结果表明,在纳米 SiO<sub>2</sub>致细胞损伤的过程中,ROS 起着重要的作用,由此过程中产生的 ROS 也可能在纳米 SiO<sub>2</sub>所致的表观遗传学改变过程中起着重要的作用。单一的 5-甲基胞嘧啶氧化成 5-羟甲基胞嘧啶,能显著抑制 MBD 与寡核苷酸复合体的结合,从而降低结合能力<sup>[20]</sup>。已有研究表明在 CpG 二核苷酸序列中出现的 8-OHdG 对相邻近的胞嘧啶残基的甲基化有很强的抑制作用,并且还能够干扰限制性内切酶对 DNA 酶切作用<sup>[18]</sup>。

本部分实验结果表明在纳米 SiO<sub>2</sub>处理 HaCaT 细胞的过程中,DNMTs 和 MBDs 表达存在差异,同时肯定了在此过程中,基因组 DNA 甲基化水平的逐渐降低与 DNMT1 不断下降有关。考虑到这些酶在细胞水平的改变,甲基化的调控机制可能是细胞损伤过程中的一个早期事件,而氧化应激与 DNA 基因组甲基化之间的关系尚需要深入研究。

## 参考文献

- 1 DONALDSON K, BORM P J A. The quartz hazards: a variable entity [J]. *Ann Occup Hyg*, 1998, 142(5): 287-294.
- 2 IARC Monograph. IARC monograph on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: silica, some silicates, coal dust and paraaramid fibrils [M]. Geneva: IARC Press, 1997, 68: 41-242.
- 3 WANG C, MA Q, DOU W, et al. Synthesis of aqueous CdTe quantum dots embedded silica nanoparticles and their applications as fluorescence probes [J]. *Talanta*, 2009, 77: 1358-1364.
- 4 BAUN A, HARTMAN N B, GRIEGER K, et al. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing [J]. *Ecotoxicology*, 2008, 17(5): 387-395.
- 5 CHEN M, MIKECZA V. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO<sub>2</sub> nanoparticles [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 305(1): 51-62.
- 6 HEN Y, CHEN J, DONG J, et al. Comparing study of

- the effect of nanosized silicon dioxide and microsized silicon dioxide on fibrogenesis in rats [J]. *Toxicol Ind Health* 2004 20(1/2/3/4/5):21-27.
- 7 PETERS K, UNGER R E, KIRKPATRICK C J, et al. Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies on viability, proliferation and inflammation [J]. *J Mater Sci* 2004 15(4):321-325.
- 8 JIN Y H, KANNAN S, WU M, et al. Toxicity of luminescent silica nanoparticles to living cells [J]. *Chem Res Toxicol* 2007 20(8):1126-1133.
- 9 LIN W S, HUANG Y W, ZHOU X D, et al. *In vitro* toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006 217(3):252-259.
- 10 薛开先. 表遗传学推动新一轮遗传学的发展[J]. *遗传*, 2005(1):155-159.
- 11 BURYANOV Y I, SHEVCHUK T V. DNA methyltransferases and structural functional specificity of eukaryotic DNA modification [J]. *Biochemistry* 2005 70(7):730-742.
- 12 FRAGA M F, RODRIQUEZ R, CANAL M J. Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis* 2000 21(14):2990-2994.
- 13 FEINBERG A P, TYCKO B. The history of cancer epigenetics [J]. *Nat Rev Cancer* 2004 4(2):143-153.
- 14 ROBERTSON K D. DNA methylation and chromatin: unraveling the tangled web [J]. *Oncogene* 2002 21(35):5361-5379.
- 15 FRAGA M F, BALLESTAR E, PAZ M F, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102(30):10604-10609.
- 16 WEITZMAN, TURK P W, MIKOWSKI D H, et al. Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 91(4):1261-1264.
- 17 WACHSMAN J T. DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis [J]. *Mut Res* 1997 375(1):1-8.
- 18 HUTCGKER M J, DONMANN F. An epigenetic perspective on the free radical theory of development [J]. *Free Radic Biol Med* 2007 43(7):1023-1036.
- 19 TURK P W, LAAYOUN A, SMITH S S, et al. DNA adduct 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine (8-hydroxyguanine) affects function of human DNA methyltransferase [J]. *Carcinogenesis* 1995 16(5):1253-1255.
- 20 VALINLUCK V, HSIN-HAO, DANIEL K, et al. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) [J]. *Nucleic Acids Res* 2004 32(14):4100-4108.

收稿日期:2012-10-08

\* \* \* \* \*

## 参考文献类型和标识代码

文献类型	标识代码	文献类型	标识代码
普通图书	M	报告	R
会议录	C	标准	S
汇编	G	专利	P
报纸	N	数据库	DB
期刊	J	计算机程序	CP
学位论文	D	电子公告	EB

《卫生研究》编辑部