

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20180923001

王若楠, 牛小影, 王睿琚, 等. PFOS对星形胶质细胞表观遗传调控作用初探[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(2): 98-105

Wang R N, Niu X Y, Wang R J, et al. Role of epigenetic modification in the PFOS neurotoxicity—A study in the rat primary astrocytes [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(2): 98-105 (in Chinese)

PFOS对星形胶质细胞表观遗传调控作用初探

王若楠, 牛小影, 王睿琚, 秦畅, 李亚晨, 刘晓暉*, 邵静#

大连医科大学公共卫生学院, 大连市血液病重点实验室, 辽宁省造血干细胞移植医学中心, 辽宁省造血干细胞移植临床转化医学研究重点实验室, 大连 116044

收稿日期: 2018-09-23 录用日期: 2018-11-20

摘要: 脑源性神经营养因子(BDNF)甲基化在全氟辛烷磺酸(PFOS)神经毒性中的作用已证实,但表观遗传修饰中其他调控因子在PFOS对星形胶质细胞毒性中的影响仍有待探索。本文以大鼠原代星形胶质细胞为体外生物体系,建立24 h PFOS(0、25、50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)暴露模型,通过观察PFOS暴露对星形胶质细胞表观遗传调控主要分子DNA甲基化酶(DNMTs)、组蛋白去乙酰化酶(HDACs)和小泛素化修饰物(SUMOs)的影响,初步明确表观遗传调控机制参与PFOS神经毒性作用。采用Hoechst 33258检测细胞凋亡,利用ELISA试剂盒检测HDACs含量,以实时荧光定量PCR考察DNMTs、HDACs和SUMOs基因表达。结果显示,星形胶质细胞暴露于一定浓度PFOS($\geq 25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)时产生凋亡现象($P < 0.05$),HDACs含量升高($P > 0.05$),且DNMT1、HDAC1/2/4与SUMO-1的基因表达显著升高($P < 0.05$);而当PFOS浓度高于50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,可显著诱导DNMT3A、SUMO-2的基因表达($P < 0.05$);DNMT3B在PFOS $\geq 25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其基因表达具有升高趋势,但不具统计学显著性($P > 0.05$)。结果表明,PFOS可以影响星形胶质细胞的表观遗传修饰;表观遗传修饰可能是PFOS神经毒性作用机制之一。

关键词: PFOS;星形胶质细胞;表观遗传;神经毒性

文章编号: 1673-5897(2019)2-098-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Role of Epigenetic Modification in the PFOS Neurotoxicity —A Study in the Rat Primary Astrocytes

Wang Ruonan, Niu Xiaoying, Wang Ruijun, Qin Chang, Li Yachen, Liu Xiaohui*, Shao Jing#

School of Public Health, Dalian Medical University, Dalian Key Laboratory of Hematology, Liaoning Medical Center for Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Liaoning Key Laboratory of Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Translational Medicine, Dalian 116044, China

Received 23 September 2018 accepted 20 November 2018

Abstract: Though the role of DNA methylation for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in PFOS-induced neurotoxicity has been confirmed, the other related molecular of epigenetics in PFOS-induced neurotoxicity in astrocytes is needed to be explored. In the present study, the model of PFOS exposure with 0, 25, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h was built through primary cultured astrocyte from Wistar rats. And the main molecular in epigenetics, such

基金项目: 国家自然科学基金(81302400); 中国博士后科学基金(2016M591438); 大连市科技之星项目(2016RQ044); 大连医科大学本科教学改革研究立项项目(DY LX16053)

作者简介: 王若楠(1993-), 女, 硕士, 研究方向为环境污染与出生缺陷, E-mail: daisywrn@126.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: liuxh892@126.com

共同通讯作者 (Co-corresponding author), E-mail: js.jshao@gmail.com; jshao@uw.edu

as DNA methyltransferase (DNMTs), histone deacetylase (HDACs), small ubiquitination (SUMOs) was evaluated. Then the cell apoptosis was detected by Hoechst 33258, the content of HDACs was evaluated by ELISA kit, and the gene expressions of *DNMTs*, *HDACs* and *SUMOs* were detected by real time quantitative PCR. The results showed that PFOS ($\geq 25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) could induce apoptosis in the primary cultured astrocytes ($P < 0.05$), increase the content of HDACs ($P > 0.05$). Further analysis showed that PFOS ($\geq 25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) significantly increased the expressions of *DNMT1*, *HDAC1/2/4* and *SUMO-1* mRNA ($P < 0.05$). The expressions of *DNMT3A* and *SUMO-2* mRNA were also increased in PFOS ($\geq 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) exposure group ($P < 0.05$). And there was an increase trend for *DNMT3B* gene expression ($P > 0.05$). Generally, the results showed that PFOS could influence the epigenetic modification in astrocytes. The present study might give a clue for the mechanism of neurotoxicity induced by PFOS.

Keywords: PFOS; astrocytes; epigenetics; neurotoxicity

表观遗传学,是指在细胞增殖过程中可遗传基因活性的稳定改变,但不涉及 DNA 序列变化,联系着表型与基因型,主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA 等对基因表达的调控^[1]。环境因素可引起错误的表观遗传程序建立、进而导致多种人类疾病,如肿瘤、衰老、印记综合征、免疫疾病、中枢神经系统及精神发育紊乱。其中,组蛋白修饰和 DNA 甲基化被认为是环境变化改变细胞命运、基因表达以及人类疾病发展的关键环节^[2]。研究已证实,环境污染物能够通过表观遗传修饰影响神经系统功能;而妊娠期或出生早期的环境污染物暴露可引起发育神经毒性,进而导致神经系统功能损伤并持续至成年^[3-4]。例如,成年大鼠暴露于苯并 a 芘,其海马组织内钙通道基因等发生表观遗传修饰改变,导致学习记忆能力损伤^[5]。铅能够通过诱导新生大鼠仔鼠海马突触可塑性相关基因甲基化,损伤学习记忆能力^[6]。

然而,新型持久性有机污染物,全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS),对神经系统影响的表观遗传调控机制研究报道比较少见。Guo 等^[7]研究发现,PFOS 可能通过诱导脑源性神经营养因子(BDNF)甲基化,致人神经母细胞瘤凋亡。另有研究也发现,新生小鼠暴露 PFOS 可致其空间学习记忆功能障碍,并伴随 DNA 甲基化酶和组蛋白去乙酰化酶亚基基因及蛋白改变^[1]。上述研究提示,表观遗传修饰可能在 PFOS 神经毒性中具有重要作用,亟需对表观遗传学在 PFOS 神经毒性中的作用进行系统和深入研究。

星形胶质细胞是神经细胞含量最为丰富的细胞类型,既承担神经元结构维护和营养支持,又可产生和释放神经递质、神经营养因子和促炎因子等,广泛参与神经生理和病理活动。近年研究发现,星形胶质细胞可能参与 PFOS 神经毒性作用。本课题组前

期研究发现,PFOS 通过介导神经元-星形胶质细胞的谷氨酸-谷氨酰胺循环,诱导神经元凋亡^[8]。Chen 等^[9]研究也发现,星形胶质细胞在 PFOS 引起的神经炎症因子释放致神经细胞凋亡中具有重要作用。目前,尚未见 PFOS 对星形胶质细胞表观遗传学修饰的研究。

因此,本研究利用大鼠原代皮质星形胶质细胞建立 PFOS 暴露模型,考察 PFOS 对星形胶质细胞中表观遗传修饰关键调控分子(包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和组蛋白泛素化)的基因表达,从而初步探讨表观遗传调控机制在 PFOS 神经毒性中的作用。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

仪器:3111 型细胞培养箱(美国, Thermo 公司), 354 型多功能酶标仪(美国, Thermo 公司), CKX41 型倒置相差荧光显微镜(日本, Olympus 公司), F-2700 型荧光分光光度计(日本, Hitachi 公司), PCR 仪(Takara Thermal Cycler Dice TP800, 大连, 宝生物公司)。

试剂: PFOS(纯度 >98%, 美国, Sigma 公司), RNA 提取及反转录试剂(大连, 宝生物公司), Hoechst 33258 (C1017)及青、链霉素(海门, 碧云天生物试剂研究所), DMEM 培养基及胎牛血清(美国, Hyclone 公司), 其他试剂皆为国产分析纯。

1.2 大鼠原代星形胶质细胞提取与培养

无菌条件下取新生 Wistar 大鼠脑组织, $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液(PBS)漂洗 3 遍, 冰上刷去脑膜, 用眼科弯镊夹取皮层, 眼科剪剪碎 0.125% 胰酶, 37°C 消化 8 min, 巴氏管吹打分散为细胞悬液, 经 200 目的筛网过滤后, $800 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 弃去上清, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液重悬

后,置于 37 °C, 95% O₂、5% CO₂ 恒温培养箱中培养,隔日换液 1 次,传代 2 次(F2)的细胞用于实验。按 5×10⁴个·mL⁻¹的密度接种于多聚赖氨酸包被的盖玻片或培养皿。

1.3 细胞暴露实验

正常培养的星形胶质细胞铺满培养皿底部 90% 以上用于实验研究。实验分为正常对照组(无血清培养基)、25 μmol·L⁻¹ PFOS 暴露组(无血清培养基中含有 25 μmol·L⁻¹ PFOS)、50 μmol·L⁻¹ PFOS 暴露组(无血清培养基中含有 50 μmol·L⁻¹ PFOS)、100 μmol·L⁻¹ PFOS 暴露组(无血清培养基中含有 100 μmol·L⁻¹ PFOS)。正常对照组和 PFOS 暴露组在 37 °C, 95% O₂、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h 后,进行相关检测。

1.4 实验检测指标及方法

1.4.1 细胞凋亡

细胞在载玻片上贴壁后,室温下,将 5 mg·L⁻¹ Hoechst 33258 染色液用于细胞染色 10 min, PBS 洗涤后,在荧光显微镜下观察,拍照。每组 3 张不同的玻片,随机选取 4 个视野计数,凋亡% = 凋亡细胞数/细胞总数×100%。

1.4.2 ELISA

ELISA 法测定组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDACs) 的含量,操作严格按照试剂盒要求进行。终止反应 10 min 内用酶标仪测定各孔吸光度值,检测波长 450 nm,参考波长 610 nm,绘制标准曲线。依据标准曲线计算各孔相应的 HDACs 浓度。

1.4.3 基因表达

采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测 DNA 甲基化、组蛋白修饰、组胺泛素化等基因 mRNA 表达水平。按照 RNAiso Plus 试剂盒(大连宝生物公司)方法分别提取总 RNA,通过紫外吸收值 A260/A280 和琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 无污染及降解。所用引物均由大连宝生物公司设计合成,引物序列号及序列如表 1 所示。将 2 μg 总 RNA 逆转录合成 cDNA (PrimeScript[®] RT Master Mix 试剂盒,大连宝生物公司),然后按照 SYBR Premix Ex Taq[™] 试剂盒(大连宝生物公司)说明,使用大连宝生物公司 PCR 仪 (Takara Thermal Cycler Dice TP800) 进行实时荧光定量。反应条件为:预变性 95 °C 30 s; PCR 反应 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 95 °C 15 s。使用 TP800 v4.01 软件对结果进行分析,以 *GAPDH* 的表达量对结果

进行标准化。每个样本重复 3 次,每次 3 个复孔。

1.5 统计学分析

所有数据结果均用均值±标准误差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据管理与分析。方差齐时,采用单因素方差分析(ANOVA test)进行组间比较;方差不齐则用 Dunnett's T3 直接进行多重比较。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果 (Results)

2.1 PFOS 对大鼠原代星形胶质细胞凋亡影响

Hoechst 33258 是一种可以穿过细胞膜的蓝色荧光染料。细胞凋亡时,细胞核呈致密浓染,或呈现碎块状致密浓染。本实验利用 Hoechst 33258 染料,考察 PFOS 对大鼠原代星形胶质细胞的影响。结果发现,随着 PFOS 染毒剂量的升高,凋亡细胞数量逐渐升高(图 1A~D, $P<0.05$)。与对照组比较,25、50 和 100 μmol·L⁻¹ PFOS 分别升高约 3、7 和 10 倍(图 1E)。

2.2 PFOS 对大鼠原代星形胶质细胞 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的影响

经 PFOS 染毒 24 h 后,星形胶质细胞 *DNMT* 基因表达上升。其中,25、50 和 100 μmol·L⁻¹ 组 *DNMT1* 相对对照组分别增加约 0.44、0.40 和 0.33 倍,均存在统计学差异(图 2A, $P<0.05$)。与对照组比较, *DNMT3A* 基因表达上升,50 和 100 μmol·L⁻¹ PFOS

表 1 定量引物信息

Table 1 Parameters of the primers for RT-qPCR

| 基因名称 | 序列号 | 序列(5'-3') |
|------------------------------|------------------|--------------------------|
| Gene name | Accession No. | Sequence (5'-3') |
| <i>GAPDH</i> | NM_001289726.1-F | GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG |
| | NM_001289726.1-R | ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA |
| <i>DNMT1</i> | NM_053354-F | AAATCCGTCTGTGGAAGGTG |
| | NM_053354-R | GCGGTAGAAAAGCCAATGAG |
| <i>DNMT3A</i> | NM_001003958-F | GCTGAAGGAGAGGGAAGTGA |
| | NM_001003958-R | TGCCTGGAAGGTGAGTCTTG |
| <i>DNMT3B</i> | NM_001003958-F | TGCGGTAAGAAGAACCCTGT |
| | NM_001003958-R | CTGATAGCCGTCCTCATCGT |
| <i>HDAC1</i> ^[10] | NM_008228.2-F | GTGAGGACTGTCCGGTATTTGATG |
| | NM_008228.2-R | GATGTCCGCTGCTGCTGCTTATTG |
| <i>HDAC2</i> | NM_008229.2-F | AGCCCATGGCGTACAGTCAA |
| | NM_008229.2-R | GGATGACCCTGGCCGTAATAATAA |
| <i>HDAC4</i> | NM_207225.2-F | CACCGTGCCAGCACTCCAG |
| | NM_207225.2-R | GGCCTGTGACAAGGGGCGTC |
| <i>SUMO-1</i> | NM_009460-F | CCAGGAGGCAAAACCTTCAAC |
| | NM_009460-R | CACTGCTATCTGTCCAATGAC |
| <i>SUMO-2</i> | NM_133594-F | GGGACAGGATGGTTCTGTGG |
| | NM_133594-R | CAAACCTGCCGTTCAAT |

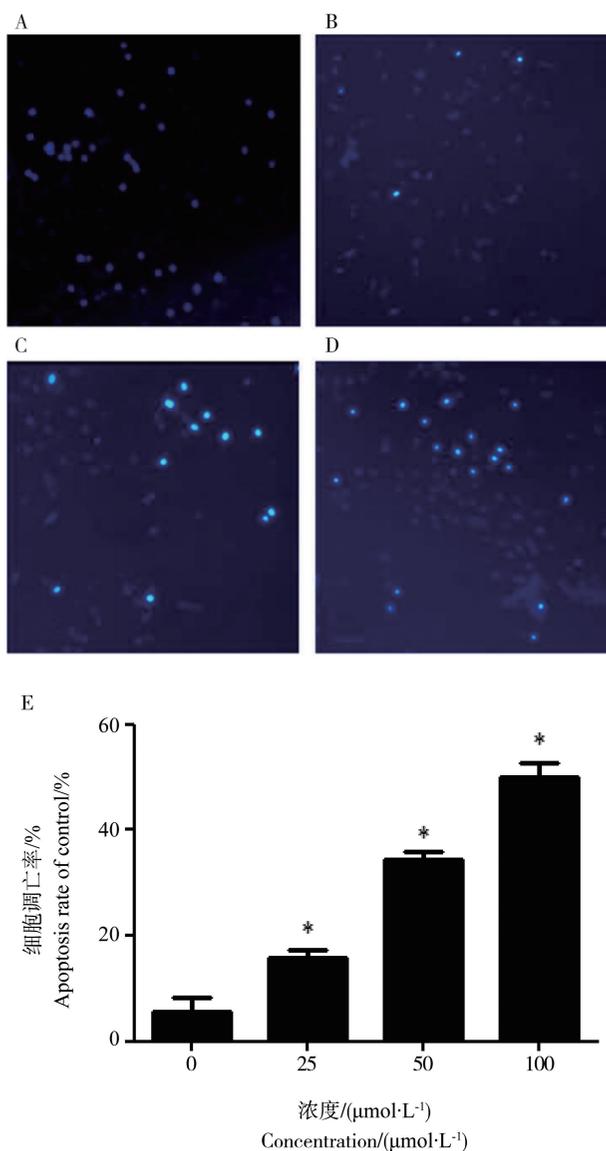


图 1 全氟辛烷磺酸 (PFOS) 对大鼠原代星形胶质细胞凋亡的影响 ($n=3$)

注:A 为对照组,Hoechst 33258 染色,放大 10 倍;
B 为 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS 暴露组,Hoechst 33258 染色,放大 10 倍;
C 为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS 暴露组,Hoechst 33258 染色,放大 10 倍;
D 为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS 暴露组,Hoechst 33258 染色,放大 10 倍;
E 为凋亡细胞统计图,* 与对照组比较 $P<0.05$ 。

Fig. 1 Effect of perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure on apoptosis in primary cultured astrocyte ($n=3$)

Note: A, Representative control group stained with Hoechst 33258, $\times 10$; B, Representative $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS group stained with Hoechst 33258, $\times 10$; C, Representative $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS group stained with Hoechst 33258, $\times 10$; D, Representative $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS group stained with Hoechst 33258, $\times 10$;
E, Statistically analysis of apoptosis cells, * compared with the control, $P<0.05$.

组 *DNMT3A* 分别显著升高 0.37 和 0.67 倍(图 2B, $P<0.05$)。 *DNMT3B* 在 $\geq 25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS 染毒组有升高趋势,但无统计学意义(图 2C)。

2.3 PFOS 对大鼠原代星形胶质细胞 HDACs 基因表达的影响

由图 3 可见,经 PFOS 染毒 24 h 后,星形胶质细胞 *HDAC1*、*HDAC2*、*HDAC4* 基因表达皆升高。其中,与对照组比较, 25 、 50 、 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS 组的 *HDAC1* 分别上升约 0.42、0.47 倍和 0.35 倍,且存在

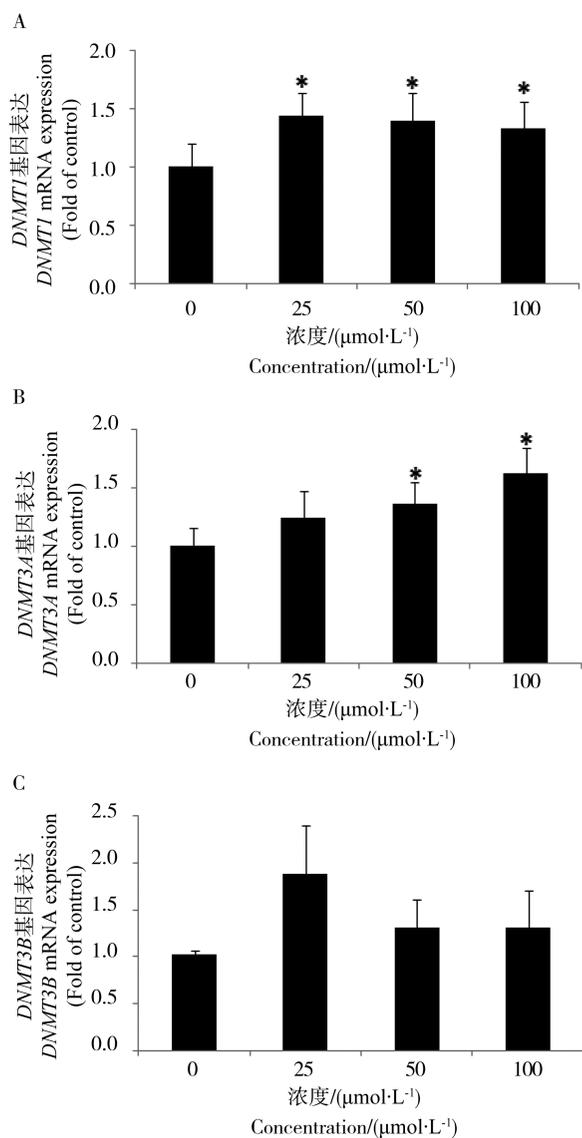


图 2 PFOS 对大鼠原代星形胶质细胞 DNMTs 基因表达的影响($n=3$)

注:*与对照组比较 $P<0.05$ 。

Fig. 2 Effect of PFOS exposure on mRNA of DNMTs in primary cultured astrocyte ($n=3$)

Note: * compared with the control, $P<0.05$.

统计学差异(图3A, $P<0.05$)。HDAC2在25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS组分别上升约0.48、0.47和0.30倍,且存在统计学差异(图3B, $P<0.05$)。HDAC4基因表达在PFOS染毒组呈剂量-反应型升高,分别是对照组的约1.6、2.7和3.2倍(图3C, $P<0.05$)。

2.4 PFOS对大鼠原代星形胶质细胞小泛素化修饰物(small ubiquitin-related modifier, SUMO)基因表达的影响

经由PFOS染毒24 h后,与对照组比较,星形胶质细胞SUMO-1基因表达量上升(图4)。其中,25、50

和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度相比对照组分别上升约0.3、0.5和0.4倍,且均存在统计学差异($P<0.05$)。与对照组比较,星形胶质细胞SUMO-2基因表达量上升。其中,50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度与对照组相比分别上升了约0.59和0.95倍,且存在统计学差异($P<0.05$)。

2.5 PFOS对大鼠原代星形胶质细胞HDACs含量影响

采用ELISA试剂盒对大鼠原代星形胶质细胞HDACs含量进行了考察。结果发现,PFOS能够降低HDACs含量,具有一定剂量依赖性,但未发现统计学显著性(图5)。

3 讨论(Discussion)

近来研究提示,星形胶质细胞在PFOS神经毒性中具有重要作用,但其分子机制仍不明确。翁振坤等^[1]的研究表明,PFOS神经毒性可能与表观遗传修饰有关。因此,本研究利用大鼠原代星形胶质细胞进一步对DNMTs、HDACs、SUMOs进行考察,以期初步了解PFOS对神经系统表观遗传修饰影响在

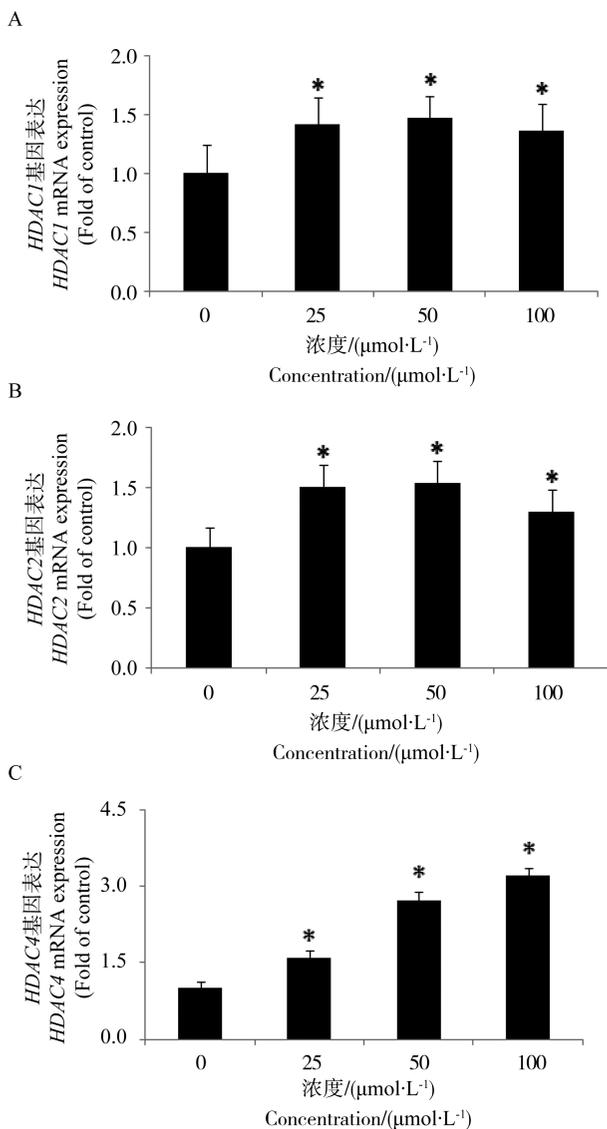


图3 PFOS对大鼠原代星形胶质细胞HDACs基因表达的影响($n=3$)

注:*与对照组比较 $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effect of PFOS exposure on mRNA of HDACs in primary cultured astrocyte ($n=3$)

Note: * compared with the control, $P<0.05$.

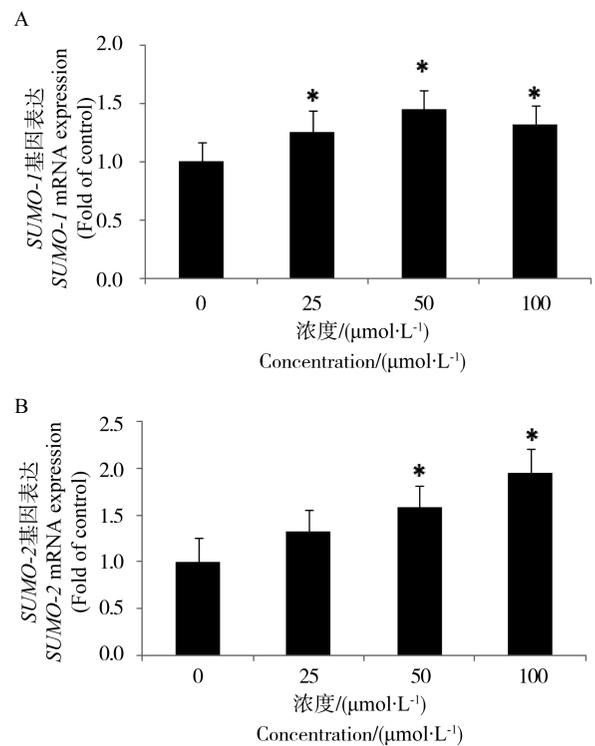


图4 PFOS对大鼠原代星形胶质细胞SUMO基因表达的影响($n=3$)

注:*与对照组比较 $P<0.05$ 。

Fig. 4 Effect of PFOS exposure on mRNA of SUMO in primary cultured astrocyte ($n=3$)

Note: * compared with the control, $P<0.05$.

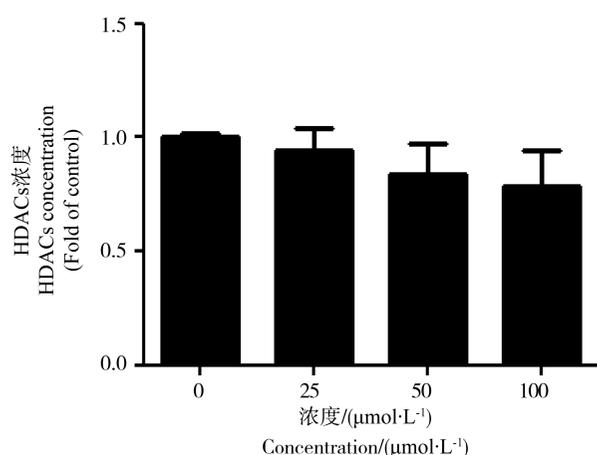


图 5 PFOS 对大鼠原代星形胶质细胞组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 含量的影响 ($n=3$)

Fig. 5 Effect of PFOS exposure on the concentration of histone deacetylase (HDACs) in primary cultured astrocyte ($n=3$)

其神经毒性中的作用。结果表明,PFOS 对星形胶质细胞的毒性作用,可能与其调控星形胶质细胞表观遗传修饰分子有关。

PFOS 暴露浓度在 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上时,能够显著诱导大鼠星形胶质细胞凋亡。Dong 等^[11]的研究也表明,PFOS 暴露能够显著提高星形胶质细胞的凋亡率。这提示 PFOS 神经毒性机制可能与星形胶质细胞有关。

神经元生成之后,神经干细胞经过一系列复杂的表观遗传修饰严格控制,生成、完善为星形胶质细胞。星形胶质细胞生成以后,仍然需要表观遗传修饰调控,以维持细胞特性。DNA 甲基化是在 DNA 甲基化转移酶催化下,由 S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体,将胞嘧啶转变为 5-甲基胞嘧啶的反应。CpG 双核苷酸结构是最主要的甲基化位点,一般该位点的甲基化修饰会引起基因失活。DNA 甲基化转移酶主要包括 DNMT1、2 和 3。其中, DNMT1 主要是维持 DNA 复制过程中子代细胞与母细胞相同的特异性甲基化模式。DNMT2 对 DNA 甲基化的作用比较薄弱,与 RNA 相关。DNMT3 包括 DNMT3A、3B 和 3L 3 种亚型。DNMT3A 与 3B 的主要功能是在胚胎分化过程中建立新的组织特异性甲基化模式, DNMT3L 与 DNMT3A 和 3B 相比较,结构上具有高度同源性,但功能上并不能直接产生甲基化作用,其主要功能是协助 DNMT3A 和 DNMT3B 的重新甲基化。本研究中,PFOS 能够显著升高大鼠原代星形胶质细胞 *DNMT1* 与 *DNMT3A* 基因表达,

DNMT3B 基因表达也有升高趋势。Wan 等^[12]研究也发现,PFOS 暴露能够显著诱导肝脏组织中 *DNMT3A* 基因表达显著升高, *DNMT1* 和 *DNMT3B* 表达无明显变化。Guo 等^[7]研究发现,PFOS 暴露降低 SK-N-SH 细胞中 DNMT1 在 mRNA 和蛋白水平的表达,但增加了 DNMT3B 在 mRNA 和蛋白水平的表达; DNMT3A 在 mRNA 水平表达与对照组相比没有明显差别,但在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS 暴露组中其蛋白的表达量下降。以上研究中, *DNMTs* 基因表达结果出现差异,可能是组织、细胞不同, *DNMTs* 亚基表达不同所致^[13]。Wan 等^[12]的实验中,PFOS 暴露后肝脏组织中, *DNMT3A* 表达的增加,可能是对总甲基化下降的一种代偿反应。Guo 等^[7]的研究中, PFOS 暴露后的 SK-N-SH 细胞中, *DNMTs* 表达差异可能与 *BDNF* 的 I 型和 IV 型启动子甲基化状态不同有关。另外,即使是同一组织,细胞发育时期不同, *DNMTs* 亚基表达也不同,例如 *DNMT3B* 在神经发育早期表达更多,而 *DNMT3A* 在未成熟和成熟脑组织中均有表达^[14]。这可能是本实验中,PFOS 暴露后的大鼠原代星形胶质细胞 *DNMT3B* 升高并不显著的主要原因。研究发现,肝脏组织中, *DNMT1* 与 *DNMT3B* 基因敲除,能够使细胞具有凋亡敏感性^[15]。然而,心肌细胞 *DNMTs* 上调,会使心脏发育过程中的相关细胞发生凋亡^[16]。因此,不同组织、细胞的 *DNMTs* 亚基表达不同,其作用可能也有区别。本实验结果表明,PFOS 暴露可能通过上调星形胶质细胞的 *DNMTs* 基因表达,促进细胞凋亡。

与 DNA 甲基化功能相似,组蛋白修饰主要影响染色质的结构进而影响基因的转录功能,可调节组蛋白-DNA 的相互作用,为与神经元功能相关的转录调节蛋白提供招募位点。组蛋白修饰包括组蛋白的乙酰化、磷酸化、甲基化、泛素化及 ADP 核糖基化等。星形胶质细胞经常作为组蛋白乙酰化抑制剂的作用靶点,在神经系统疾病中发挥保护作用。在帕金森氏综合症中,HDACs 抑制剂能够通过提高星形胶质细胞的胶质源性和脑源性神经营养因子的表达,保护多巴胺能神经元^[17]。在治疗多发性硬化症中,富马酸二甲酯刺激星形胶质细胞,降低 *HDAC1*、*HDAC2* 和 *HDAC4* 基因表达,激活 Nrf,抑制炎症反应发生^[18]。另外,组蛋白去乙酰化也经常发生在外源性化合物诱导的神经细胞损伤中。Guo 等^[10]研究发现,氯化锰能够显著提高神经细胞的去乙酰化程度,利用去乙酰化抑制剂曲古霉素,能够显著降低氯

化锰诱导的细胞凋亡。本研究发现,PFOS暴露虽然具有降低 HDACs 含量趋势,却能够显著升高 *HDAC1*、*HDAC2* 和 *HDAC4* 的基因表达。由此可见 PFOS 暴露可能通过升高星形胶质细胞 HDACs 基因表达,抑制营养因子表达,引起细胞损伤,导致细胞凋亡发生。

组蛋白泛素化是组蛋白修饰的另一种方式。蛋白质的泛素化修饰就是蛋白质的赖氨酸残基位点与泛素分子的羧基端相互结合的过程。SUMOs 是一类重要的类泛素蛋白,主要包括 SUMO-1、SUMO-2 和 SUMO-3,是近年来神经退行性疾病研究中的热点之一。SUMO-1 以结合状态存在,而 SUMO-2/3 多以自由状态存在。生理状态下的组蛋白泛素化,能够维持突触功能和认知。赵晓燕等^[19]研究发现,在 *APP/PS1* 转基因鼠脑内,*SUMO-1* 基因上调,可能参与阿尔茨海默病老年斑形成和神经突起变性的调节。阿尔茨海默病发生时,星形胶质细胞激活意味着神经元的丢失,而 SUMO-1 泛素化能够维持星形胶质细胞非活化状态,保持神经元稳定。在人类胶质瘤细胞中,*SUMO-1/2/3* 皆高表达,而沉默 *SUMO-1/2/3* 基因,能够阻止 DNA 合成与细胞生长^[20]。Wasiak 等^[21]发现在 Bcl-2 家族成员 Bax/Bak 存在的条件下,*SUMO-1* 能够结合至动力相关蛋白,使其发生 SUMO 化后促进动力相关蛋白定位到线粒体外膜,释放细胞色素 C,导致细胞凋亡。然而,也有研究表明,*SUMO-2/3* 引导的 SUMO 化将抑制动力相关蛋白与线粒体外膜结合从而阻碍细胞凋亡进程^[22]。本研究中,*SUMO-1* 与 *SUMO-2* 基因表达异常提示,蛋白泛素化在 PFOS 诱导星形胶质细胞凋亡中具有重要作用,可能与线粒体功能紊乱有关,但具体分子机制仍需进一步探讨。目前,关于外源化合物影响星形胶质细胞或其他组织细胞的蛋白泛素化的研究,鲜有报道。近来研究发现,作为一种潜在的前列腺癌致癌物,镉暴露能够诱导 293T 细胞(人肾上皮细胞系 293 细胞的派生细胞)SUMO 特异性蛋白酶 1(SUMO-specific protease 1, SENP1)表达,降低雄激素受体泛素化水平,致雄激素受体活性降低^[23]。上述蛋白泛素化研究结果表明,外源化合物很可能通过蛋白泛素化发挥毒性作用,且其作用机制复杂,值得深入研究。

综上,本研究利用大鼠原代星形胶质细胞建立模型发现,PFOS 能够诱导星形胶质细胞凋亡,诱导星形胶质细胞表观遗传修饰分子基因表达改变,包

括 DNA 甲基化、蛋白乙酰化和泛素化发生。表观遗传修饰分子广泛参与细胞周期、凋亡、信号通路与转录调控及细胞应激等方面,因此 PFOS 暴露调控表观遗传修饰导致星形胶质细胞凋亡的具体分子调控机制仍需深入探讨。

通讯作者简介: 刘晓晖(1981—),女,博士,副教授,主要研究方向为环境污染与出生缺陷。

共同通讯作者简介: 邵静(1965—),博士生导师,教授,主要研究方向为环境污染与出生缺陷。

参考文献 (References):

- [1] 翁振坤, 顾爱华. 全氟辛烷磺酸的表观遗传学作用研究进展[J]. 环境与职业医学, 2018, 35(4): 371-376
Weng Z K, Gu A H. Research progress on epigenetic effects induced by perfluorooctane sulfonate [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2018, 35(4): 371-376 (in Chinese)
- [2] Lei X N, Muscat J E, Zhang B, et al. Differentially DNA methylation changes induced *in vitro* by traffic-derived nanoparticulate matter [J]. Toxicology, 2018, 395: 54-62
- [3] 冯丽雅, 刘汝青. 环境因素影响人体健康的表观遗传机制[J]. 毒理学杂志, 2014, 28(3): 234-236
Feng L Y, Liu R Q. Epigenetic mechanism of environmental factors affecting human health [J]. Journal of Toxicology, 2014, 28(3): 234-236 (in Chinese)
- [4] Morris G, Puri B K, Frye R E. The putative role of environmental aluminium in the development of chronic neuropathology in adults and children. How strong is the evidence and what could be the mechanisms involved? [J]. Metabolic Brain Disease, 2017, 32(5): 1335-1355
- [5] Wang J, Li C L, Tu B J, et al. Integrated epigenetics, transcriptomics, and metabolomics to analyze the mechanisms of benzo[a]pyrene neurotoxicity in the hippocampus [J]. Toxicological Sciences, 2018, 166(1): 65-81
- [6] Ju L S, Jia M, Sun J, et al. Hypermethylation of hippocampal synaptic plasticity-related genes is involved in neonatal sevoflurane exposure-induced cognitive impairments in rats [J]. Neurotoxicity Research, 2016, 29(2): 243-255
- [7] Guo X X, He Q Z, Li W, et al. Brain-derived neurotrophic factor mediated perfluorooctane sulfonate induced-neurotoxicity via epigenetics regulation in SK-N-SH cells [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(4): 893
- [8] Li Z W, Liu Q, Liu C, et al. Evaluation of PFOS-mediated

- neurotoxicity in rat primary neurons and astrocytes cultured separately or in co-culture [J]. *Toxicology in Vitro*, 2017, 38: 77-90
- [9] Chen X X, Nie X K, Mao J M, et al. Perfluorooctane sulfonate mediates secretion of IL-1 beta through PI3K/AKT NF-kappa B pathway in astrocytes [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2018, 67: 65-75
- [10] Guo Z K, Zhang Z P, Wang Q Q, et al. Manganese chloride induces histone acetylation changes in neuronal cells: Its role in manganese-induced damage [J]. *Neurotoxicology*, 2018, 65: 255-263
- [11] Dong L, Yang X, Gu W, et al. Connexin 43 mediates PFOS-induced apoptosis in astrocytes [J]. *Chemosphere*, 2015, 132: 8-6
- [12] Wan Y J, Li Y Y, Xia W, et al. Alterations in tumor biomarker GSTP gene methylation patterns induced by prenatal exposure to PFOS [J]. *Toxicology*, 2010, 274: 57-64
- [13] 巫英燕. 猪 DNMTs 基因在肌肉和脂肪组织中的表达差异[D]. 成都: 四川农业大学, 2011: 50-53
- Wu Y Y. Differential expression of porcine DNMTs in muscle and adipose tissue [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2011: 50-53 (in Chinese)
- [14] Karpova N N, Sales A J, Joca S R. Epigenetic basis of neuronal and synaptic plasticity [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2016, 17(7): 771-793
- [15] Kurita S, Higuchi H, Saito Y, et al. DNMT1 and DNMT3b silencing sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-mediated apoptosis via up-regulation of TRAIL-R2/DR5 and caspase-8 [J]. *Cancer Science*, 2010, 101: 1431-1439
- [16] 夏慧苏, 林秋雄, 麦丽萍, 等. DNMTs 上调在先天性心脏病发病机制中的作用[C]. 南京: 中国病理生理学会第九届全国代表大会暨学术会议, 2010
- [17] Wu X F, Chen P S, Dallas S, et al. Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons [J]. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2008, 11: 1123-1134
- [18] Kalinin S, Polak P E, Lin S X, et al. Dimethyl fumarate regulates histone deacetylase expression in astrocytes [J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2013, 263: 13-19
- [19] 赵晓燕, 王丹丹, 单焱, 等. APP/PS1 转基因鼠脑内小泛素化修饰物-1 上调可能参与阿尔茨海默病老年斑形成和神经突起变性的调节[J]. *生理学报*, 2013, 65(3): 253-262
- Zhao X Y, Wang D D, Shan Y, et al. Up-regulation of small ubiquitinated modification-1 in the brain of APP/PS1 transgenic mice may be involved in the regulation of senile plaque formation and neurite degeneration in Alzheimer's disease [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2013, 65(3): 253-262 (in Chinese)
- [20] Yang W, Wang L L, Roehn G, et al. Small ubiquitin-like modifier 1-3 is activated in human astrocytic brain tumors and is required for glioblastoma cell survival [J]. *Cancer Science*, 2013, 104: 70-77
- [21] Wasiak S, Zunino R, McBride H M. Bax/Bak promote SUMOylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2007, 177: 439-450
- [22] Guo C, Hildick K L, Luo J, et al. SENP3-mediated deSUMOylation of dynamin-related protein 1 promotes cell death following ischaemia [J]. *Energy Conversion and Management*, 2013, 32: 1514-1528
- [23] Wu R, Cui Y, Yuan X, et al. SUMO-specific protease 1 modulates cadmium-augmented transcriptional activity of androgen receptor (AR) by reversing AR SUMOylation [J]. *Toxicology Letters*, 2014, 229(2): 405-413 ◆