

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20220805001

赵晓旭, 李纹, 侯巧利, 等. 纳米氧化钴对组蛋白 H3 修饰的影响及其机制[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(3): 336-346

Zhao X X, Li W, Hou Q L, et al. Effects of cobalt oxide nanoparticles on histone H3 modification and its mechanism [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(3): 336-346 (in Chinese)

纳米氧化钴对组蛋白 H3 修饰的影响及其机制

赵晓旭^{1,2,*}, 李纹³, 侯巧利⁴, 吕源财^{4,#}

1. 福建省新型污染物生态毒理效应与控制重点实验室, 莆田 351100

2. 生态环境及其信息图谱福建省高等学校重点实验室, 莆田 351100

3. 莆田学院环境与生物工程学院, 莆田 351100

4. 福州大学环境与安全工程学院, 福州 350108

收稿日期: 2022-08-05 录用日期: 2022-10-06

摘要: 纳米氧化钴因其优异的性能被广泛应用于组织工程等领域, 然而, 广泛的应用增加了其对人类健康和环境暴露的风险。本文在详细表征纳米氧化钴的基础上, 选用人永生角质形成细胞 HaCaT 为模型, 采用台盼蓝染色法检测纳米氧化钴对细胞生存率的影响, 利用蛋白免疫印记法观察纳米氧化钴对组蛋白 H3 常见修饰位点的影响, 通过对细胞内蓄积量、组蛋白 H3 修饰水平及 DNA 损伤的定量分析, 探究了纳米氧化钴对组蛋白 H3 修饰的影响机制。表征结果显示, 在分散介质中纳米氧化钴明显团聚, 比表面积减少, 二次粒径增大。生存率测定发现, 实验最大剂量($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)作用 24 h 后, 细胞生存率无明显变化。 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 纳米氧化钴暴露 1 h 后, 诱导了组蛋白 H3 第 10 位丝氨酸的磷酸化(p-H3S10)、第 9 位赖氨酸的乙酰化(Ac-H3K9)及第 4 位赖氨酸的三甲基化(Me3-H3K4)的上调, 并持续长达 24 h。同时, 观察到第 14 位赖氨酸的乙酰化(Ac-H3K14)在纳米氧化钴暴露 4 h 后明显上调。第 27 位赖氨酸的三甲基化(Me3-H3K27)升高 4 h 后出现下降趋势。定量分析表明, 纳米氧化钴的细胞内蓄积是其诱导组蛋白 H3 修饰变化的关键因素之一, 且组蛋白 H3 修饰可能涉及 DNA 损伤修复途径。本研究通过体外实验证明了纳米氧化钴对组蛋白 H3 修饰的影响及可能的机制, 为进一步评价纳米氧化钴的生物毒性及致癌风险提供了科学依据。

关键词: 纳米氧化钴; 表观遗传; 组蛋白修饰; 细胞内蓄积; DNA 损伤

文章编号: 1673-5897(2023)3-336-11 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Cobalt Oxide Nanoparticles on Histone H3 Modification and Its Mechanism

Zhao Xiaoxu^{1,2,*}, Li Wen³, Hou Qiaoli⁴, Lv Yuancai^{4,#}

1. Fujian Provincial Key Laboratory of Ecology-Toxicological Effects and Control for Emerging Contaminants, Putian 351100, China

2. Key Laboratory of Ecological Environment and Information Atlas of Fujian Provincial University, Putian 351100, China

3. College of Environmental and Biological Engineering, Putian University, Putian 351100, China

4. College of Environment and Safety Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China

Received 5 August 2022 accepted 6 October 2022

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(31801462); 福建省自然科学基金面上项目(2021J011105); 福建省自然科学基金青年基金资助项目(2020J05211); 福建省大学生创新创业训练项目(S202111498004); 莆田学院引进人才科研启动项目(2018055)

第一作者: 赵晓旭(1984—), 男, 博士, 研究方向为环境毒理学, E-mail: zhaoxiaoxu0711@126.com

* **通信作者** (Corresponding author), E-mail: zhaoxiaoxu0711@126.com

共同通信作者 (Co-corresponding author), E-mail: yclv@fzu.edu.cn

Abstract: Cobalt (II, III) oxide nanoparticles (Co_3O_4 -NPs) have been widely used in tissue engineering and other fields due to their excellent properties. However, the extensive application of Co_3O_4 -NPs increases the risk to human health and environmental exposure. In this paper, Co_3O_4 -NPs were first characterized in detail. Subsequently, the effects of Co_3O_4 -NPs on cell viability were evaluated by trypan blue assay, and the effects of Co_3O_4 -NPs on histone H3 modification were observed by Western blotting using human skin keratinocytes HaCaT as model cells. The influence mechanism of Co_3O_4 -NPs on histone H3 modification was explored through the quantitative analysis of intracellular accumulation, histone H3 modification, and DNA damage. After dispersion treatment, Co_3O_4 -NPs showed obvious agglomeration, and their specific surface area decreased whereas the secondary particle size increased. The cell viability measurement indicated that cell viability didn't change significantly after exposed to the maximum dose ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 24 h. The phosphorylation of histone H3 at serine 10 (p-H3S10), the acetylation of histone H3 at lysine 9 (Ac-H3K9) and the trimethylation of histone H3 at lysine 4 (Me3-H3K4) were induced to upregulate after exposure to Co_3O_4 -NPs ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 1 h and lasted for 24 h. Meanwhile, the acetylation of histone H3 at lysine 14 (Ac-H3K14) was significantly upregulated after exposure to Co_3O_4 -NPs for 4 h. In addition, the trimethylation of histone H3 at lysine 27 (Me3-H3K27) increased after exposure to Co_3O_4 -NPs, and then decreased after 4 h. Quantitative analysis suggested that the intracellular accumulation of Co_3O_4 -NPs is one of the key factors in its induction of changes in histone H3 modification, and histone H3 modification may be involved in DNA damage repair pathways. This study demonstrated the effects of Co_3O_4 -NPs on histone H3 modification and its possible mechanism through *in vitro* experiments. It can provide a scientific basis for further evaluation of the biological toxicity and carcinogenic risk of Co_3O_4 -NPs.

Keywords: cobalt oxide nanoparticles; epigenetics; histone modification; intracellular accumulation; DNA damage

在商用的纳米材料中,金属及其氧化物是目前生产和应用最多的纳米级产品之一^[1-2]。其中纳米氧化钴(cobalt (II, III) oxide nanoparticles, Co_3O_4 -NPs)因其优异的电催化性能和磁性特点,被广泛用于生产锂电池和气体传感器^[3-4]。另外, Co_3O_4 -NPs有望在靶向诊断、治疗和给药过程中发挥重要作用^[5-7]。

然而,广泛的应用增加了纳米材料对人类健康和环境暴露的风险。研究表明,活性氧(reactive oxygen species, ROS)和氧化应激反应是进入细胞内的纳米材料引起细胞损伤的主要原因之一^[8-11]。另一方面,纳米材料引起的细胞毒性也与其诱导的组蛋白修饰(histone modification)变化密切相关^[12-14]。在各种组蛋白修饰中,组蛋白 H3 修饰程度最高,可通过直接影响染色质结构或招募染色质重塑复合物来调节常染色质与异染色质之间的动态转换^[15],在相关修饰酶的作用下,调节基因激活和沉默的动态变化^[16]。此外,组蛋白 H3 修饰参与调控 DNA 修复^[17-18],在决定细胞命运、细胞生长以及致癌作用的过程中也发挥着重要的作用^[19]。然而, Co_3O_4 -NPs 暴露是否引起组蛋白修饰变化尚不明确,其潜在风险亟待探讨。

基于此,本文在对 Co_3O_4 -NPs 进行详细表征的

基础上,以人永生角质形成细胞 HaCaT 为模型,采用蛋白免疫印迹法及流式细胞技术等研究手段,探究了 Co_3O_4 -NPs 作用后的细胞生存率、细胞内蓄积量以及组蛋白 H3 修饰变化及其潜在的调控机制。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

HaCaT 细胞(上海传秋生物科技有限公司); Co_3O_4 -NPs (平均粒径 $<50 \text{ nm}$, 美国 Sigma-Aldrich 公司)。聚偏二氟乙烯膜($0.45 \mu\text{m}$, 美国 Millipore 公司); 3M 滤纸(3 mm , 美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 实验试剂

DMEM 细胞培养基(01863, 美国 Thermo Fisher 公司); 胎牛血清(193254C, 美国 Thermo Fisher 公司); 青链霉素双抗(J170027, 美国 Thermo Fisher 公司); 2.5% 胰蛋白酶溶液(1911594, 美国 Thermo Fisher 公司); WB 细胞蛋白裂解液(P0013, 上海碧云天生物技术有限公司); 抗体 (AF1201、AF1180、AF1207、AF5614、AF5704、AF5710、A0208, 上海碧云天生物技术有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒(BCA02, 北京鼎国昌盛有限公司); WB 化学发光试剂盒(TG268245, 美国 Thermo Fisher 公司); RNA 提取试剂盒(R6834-01, 美国 Omega 公司); 反转录试剂

盒(RR047A,日本 Takara 公司);荧光定量 PCR 试剂盒(RR420A,日本 Takara 公司)。

1.3 实验仪器

场发射扫描电子显微镜(SU8010,日本 Hitachi 公司);激光粒度仪(WINNER803,济南微纳颗粒仪器股份有限公司,中国);比表面积微孔吸附仪(AS-PA2460,美国 Micromeritics 公司);X 射线粉末衍射仪(XRD-6100,日本 Shimadzu 公司);密闭式超声破碎仪(VCX150,美国 Sonics 公司);二氧化碳培养箱(3111,美国 Thermo Fisher 公司);酶标仪(INFINITE F50,瑞士 Tecan 公司);电泳仪(EPS301,美国 Thermo Fisher 公司);电泳槽(AE-6500,日本 Atto 株式会社);转膜仪(TE77,美国 Thermo Fisher 公司);化学发光成像系统(AI600,美国 Thermo Fisher 公司);流式细胞仪(A00-1-1102,美国 Beckman Coulter 公司);荧光定量 PCR 仪(CFX96,新加坡 Bio-Rad 公司);梯度 PCR 仪(T100,新加坡 Bio-Rad 公司);超微量核酸/蛋白分析仪(Duo⁺,美国 Bio Drop 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 样品前处理

实验当日,称取适量的 Co_3O_4 -NPs,用含 0.5% 胎牛血清及 1% 青链霉素双抗的 DMEM 细胞培养基(0.5% DMEM)配制成 $10 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的悬浊液。为使 Co_3O_4 -NPs 分散,使用密闭式超声破碎仪在 60 W 功率下超声 1 min。另外,用于 X 射线粉末衍射及比表面积微孔表征的 Co_3O_4 -NPs 及其悬浊液在测试前,经 $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ 、24 h 真空冷冻干燥处理后置于干燥器内保存备用。

1.4.2 纳米材料表征

1.4.2.1 场发射扫描电子显微镜表征

将适量待测样品均匀涂抹或滴加于导电胶上,喷金 150 s 后上机测试。测试参数为扫描加速电压 $10 \sim 13 \text{ kV}$,加速电流 $10 \text{ } \mu\text{A}$,观察倍率 $70\ 000 \sim 110\ 000$ 倍。

1.4.2.2 动态光散射表征

Co_3O_4 -NPs 的流体动力学粒径(二次粒径)及其分布采用动态光散射法(dynamic light scattering, DLS)表征。测试参数为折射角度 90° ,分散介质折射率 1.333,介质黏度 $0.0008904 \text{ Pa} \cdot \text{s}$,粒度测试范围为 $1 \sim 10\ 000 \text{ nm}$,设备延迟单位时间 $10 \text{ } \mu\text{s}$ 。

1.4.2.3 X 射线粉末衍射表征

取适量经干燥处理后的待测样品置于样品槽,用玻璃板压片压平待测样品,随后测试。测试参数

为仪器铜靶辐射源 $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0.154056 \text{ nm}$),扫描速度为 $2(^\circ) \cdot \text{min}^{-1}$,扫描角度为 $4 \sim 90^\circ$ 。

1.4.2.4 比表面积微孔表征

比表面积微孔表征采用氮气吸附-脱附(Brunauer-Emmett-Teller, BET)表征方法。分别称取 $0.1 \sim 0.2 \text{ g}$ 经干燥处理后的待测样品置于 BET 试管底部,随后使用真空干燥脱气仪在 $200 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下对待测样品脱气 2 h。在相对压力 P/P_0 为 0.99 、 $-195.85 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下获得氮气吸附-脱附等温曲线。 P/P_0 在 $0.05 \sim 0.35$ 之间线性拟合。

1.5 供试细胞培养

人体可以通过皮肤接触、口鼻吸入、注射等暴露途径吸收和积累纳米材料。其中,皮肤是人体接触纳米材料的主要途径之一。基于此,选取了人永生角质形成细胞 HaCaT 为模型进行了实验。HaCaT 细胞经 0.25% 胰蛋白酶溶液消化传代后,接种于含 10% 胎牛血清及 1% 青链霉素双抗的 DMEM 细胞培养基(10% DMEM)的 100 mm 细胞培养皿中,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度的二氧化碳培养箱中静置培养,细胞贴壁面积达到 $70\% \sim 90\%$ 之间时,用 0.5% DMEM 细胞培养基冲洗细胞 2 次后,细胞在 0.5% DMEM 细胞培养基中继续培养 24 h。

1.6 Co_3O_4 -NPs 处理 HaCaT 细胞

细胞在 0.5% DMEM 中培养 24 h 后,弃掉旧培养基,加入含样品的新鲜 0.5% DMEM 细胞培养基,使样品最终浓度为 0.1 、 0.3 、 1 、 3 、 10 、 30 、 100 、 300 及 $1\ 000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。随后,分别将细胞置于培养箱中静置培养 0.5 、 1 、 2 、 3 、 4 、 6 、 8 、 9 、 10 、 12 、 24 、 36 、 48 、 60 及 72 h 。每批次实验对照组以未加入样品的细胞为空白对照,每个浓度及时间单次实验中设置 3 个重复,各组实验独立重复 3 次。

1.7 细胞生存率检测

至暴露时间点,弃培养基,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗细胞 2 次,0.25% 胰蛋白酶溶液消化并收集细胞,制备单细胞悬液。将细胞悬液与台盼蓝染色液按 $1:1$ 吹打混匀后移至血球计数板。使用倒置显微镜观测细胞数量,并记录数值进行统计。每个样品的细胞生存率为 4 个 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 大方格中的细胞生存率的平均值。1 个大方格中的细胞生存率的计算公式为:细胞生存率% = 活细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.8 蛋白免疫印记法

至暴露时间点,细胞刮刀剥离细胞并移至离心

管, PBS 冲洗 2 次后弃上清液。随后向样品中添加适量 WB 细胞蛋白裂解液, 超声破碎 1 min 后于 4 °C 静置 2 h。样品蛋白提取后参照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白定量。将定量过的蛋白样品与蛋白凝胶电泳上样缓冲液按 1:1 比例充分混合。样品经电泳、转膜、染色、脱色、封闭后, 在 4 °C 下一抗孵育 12 h。随后, 室温下二抗孵育 2 h 后上机检测。蛋白条带的影像采用 Photoshop 2020 软件进行分析统计。

1.9 纳米材料的细胞内蓄积量检测

利用流式细胞仪侧向散射光(side scattered light, SS)的变化研究细胞内纳米材料的蓄积量^[20]。细胞摄入纳米材料颗粒后, 细胞内部精细结构和细胞粒度改变, 引起 SS 增加。至暴露时间点, 弃培养基, PBS 冲洗细胞 2 次, 0.25% 胰蛋白酶消化并收集细胞, 制备单细胞悬液。将细胞悬液移至新的流式管, 使用流式细胞仪检测, 每组数据检测 10 000 个细胞, 每组样品检测 3 次, 采用 FlowJo 10.7.1 软件对所得实验结果进行分析。

1.10 实时荧光定量 PCR

至暴露时间点, 弃培养基, PBS 冲洗细胞 2 次, 0.25% 胰蛋白酶溶液消化并收集约 10^7 个细胞, 使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。采用超微量核酸/蛋白分析仪定量待测样品 RNA 浓度。随后使用反转录试剂盒反转录 RNA (800 ng)。使用荧光定量 PCR 试剂盒对获得的 cDNA 模板进行聚合酶链式扩增反应。反应条件为: 预变性(95 °C/30 s), 变性(95 °C/5 s), 退火(64 °C/30 s), 延伸(72 °C/1 min), 共 40 个循环。本研究采用基因相对表达量 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ 公式进行计算, 通过 SPSS 26 软件对数据进行分析。用于实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR,

RT-qPCR)的内参基因及扩增引物如表 1 所示。

2 结果 (Results)

2.1 Co_3O_4 -NPs 表征

图 1(a)为 Co_3O_4 -NPs 及经 0.5% DMEM 分散处理的 Co_3O_4 -NPs 的场发射扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)图像。与供应商标注信息基本一致, 未分散前的 Co_3O_4 -NPs (左)呈现较为规则均匀的球形, 单个颗粒粒径(一次粒径)约为 50 nm, 颗粒之间界线分明, 呈分散堆叠、松散聚集状态, 表明颗粒之间黏性较低。经 0.5% DMEM 分散处理后的 Co_3O_4 -NPs (右)呈现球形, 但颗粒之间界线模糊, 呈成片聚集、无序堆叠状态, 颗粒之间黏性显著升高, 出现明显团聚现象, 其粒径(二次粒径)约为 100 nm。为了进一步评估 Co_3O_4 -NPs 在 0.5% DMEM 中的分散情况, 进行了 DLS 测试分析。经 0.5% DMEM 分散处理后, Co_3O_4 -NPs 的粒径分布集中在 100 ~ 300 nm 之间, 分布较为均匀, 其 DLS 平均粒径(二次粒径)为 184.88 nm, 与一次粒径(<50 nm)相比, 由于团聚其二次粒径增大约 3 倍(图 1 (b))。另外, 由图 1(c)可知, 2 种样品的吸附-脱附等温曲线均为 IV 型, 在相同压力下, Co_3O_4 -NPs 的吸附量大于经 0.5% DMEM 分散处理后的 Co_3O_4 -NPs, 其 BET 比表面积分别为 $(40.8870 \pm 0.1175) \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 及 $(25.1706 \pm 0.1003) \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 。表明 Co_3O_4 -NPs 堆积松散, 其孔间隙更大, 而经分散处理后的 Co_3O_4 -NPs 则由于聚集程度高, 其孔间隙更小。X 射线粉末衍射仪(X-ray-diffraction, XRD)分析结果表明, Co_3O_4 -NPs 的晶型为立方晶(Cubic), PDF 卡片号为 74-2120, 且无论分散(团聚)与否其晶型特征无明显变化, 均能保持良好的晶型结构(图 1(d))。但值得注意

表 1 RT-qPCR 内参基因及扩增引物^[21-24]

Table 1 Internal reference genes and amplification primers for RT-qPCR^[21-24]

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	产物大小/bp Product size/bp
<i>GAPDH</i>	Forward: GAGTCAACGATTGGTCGT; Reverse: TTGATTTTGGAGGGATCTCG	238
<i>p300</i>	Forward: GGGACTAACCAATGGTGGTG; Reverse: GCCACCAACTCCCATATTGA	139
<i>HDAC1</i>	Forward: AACCTGCCTATGCTGATGCT; Reverse: CAGGCAATTCGTTTGTGTCAGA	374
<i>LSD1</i>	Forward: GCTCGGGGCTCTTATTCCTA; Reverse: CCCAAAACTGGTCTGCAAT	224

注: *GAPDH* 表示甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因; *p300* 表示组蛋白乙酰转移酶 p300 基因; *HDAC1* 表示组蛋白去乙酰化酶 1 基因; *LSD1* 表示组蛋白去甲基化酶 1 基因。

Note: *GAPDH* stands for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene; *p300* stands for histone acetyltransferase p300 gene; *HDAC1* stands for histone deacetylase 1 gene; *LSD1* stands for lysine specific demethylase 1 gene.

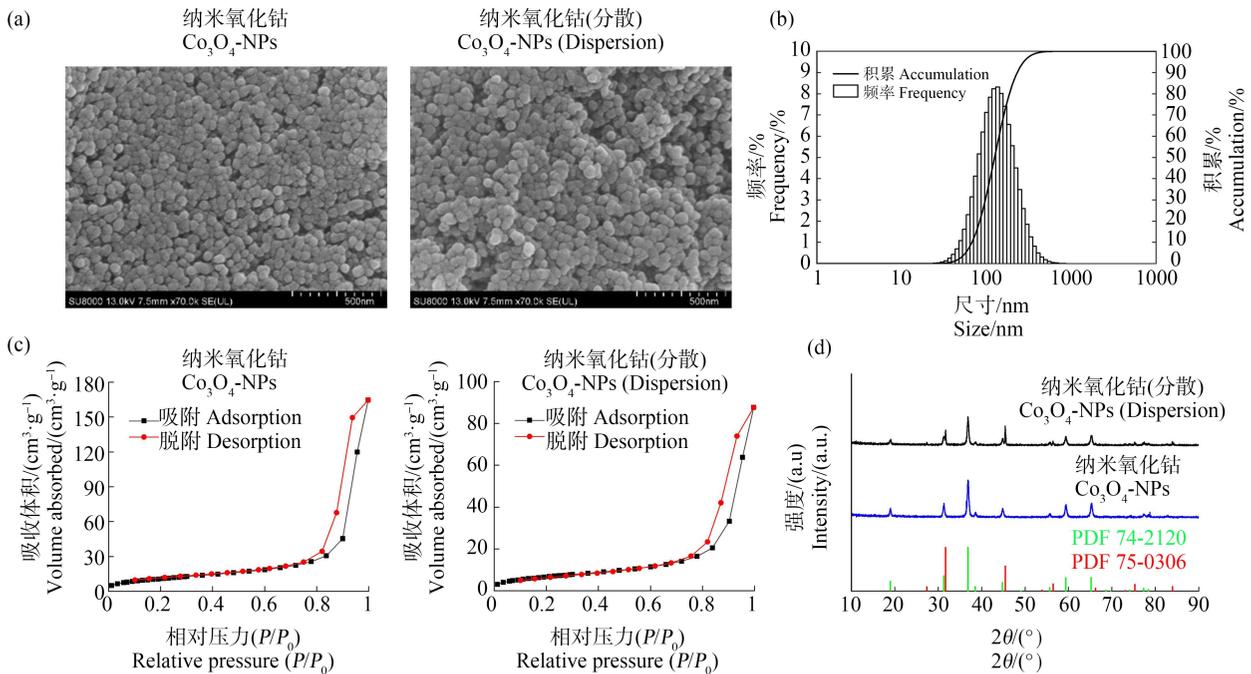


图 1 分散介质中 Co_3O_4 -NPs 的理化性质

注:(a) SEM;(b) DLS;(c) BET;(d) XRD。

Fig. 1 Physicochemical properties of Co_3O_4 -NPs in dispersion medium

Note: (a) SEM; (b) DLS; (c) BET; (d) XRD.

的是,观察到经 0.5% DMEM 分散处理后的样品中出现 NaCl (PDF 卡片号为 75-0306)的衍射峰。实验结果表明,经 0.5% DMEM 分散处理后,由于团聚 Co_3O_4 -NPs 的比表面积减小、粒径增大。

2.2 Co_3O_4 -NPs 暴露后细胞生存率的变化

为了确定 Co_3O_4 -NPs 对 HaCaT 细胞生存率的影响,利用台盼蓝染色法测定了 Co_3O_4 -NPs 暴露后的细胞生存率(图 2)。实验结果表明,不同剂量梯度的 Co_3O_4 -NPs ($\sim 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)暴露 24 h 后,HaCaT 细胞生存率略有下降,但不明显。实验最大剂量($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)作用 24 h 后,HaCaT 细胞生存率仅下降约 6%,与对照组生存率(97%)基本一致(图 2(a))。另外,观察了较低剂量的 Co_3O_4 -NPs 长时间暴露对 HaCaT 细胞生存率的影响。不同时间梯度的实验结果表明,0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Co_3O_4 -NPs 长时间暴露后,HaCaT 细胞生存率无明显变化,均高于 90% (图 2(b)和(c))。

2.3 Co_3O_4 -NPs 对组蛋白 H3 修饰的影响

为了确定 Co_3O_4 -NPs 对组蛋白 H3 常见修饰位点的影响,利用蛋白免疫印迹法观察了 Co_3O_4 -NPs 暴露后 HaCaT 细胞的组蛋白 H3 第 10 位丝氨酸的

磷酸化(p-H3S10)、第 9 位赖氨酸的乙酰化(Ac-H3K9)、第 14 位赖氨酸的乙酰化(Ac-H3K14)、第 4 位赖氨酸的三甲基化(Me3-H3K4)及第 27 位赖氨酸的三甲基化(Me3-H3K27)修饰水平变化(图 3)。不同剂量 Co_3O_4 -NPs ($\sim 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)暴露 1 h 后,p-H3S10 修饰水平随着暴露剂量的升高而升高,显示出较为明显的剂量依赖性(图 3(a))。与 p-H3S10 的结果相似,Ac-H3K9、Me3-H3K4 及 Me3-H3K27 修饰水平也随着暴露剂量的升高而升高。但是,未观察到暴露 1 h 内 Ac-H3K14 修饰水平有明显变化。另一方面,低剂量 0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Co_3O_4 -NPs 长时间($\sim 36 \text{ h}$)暴露的结果表明(图 3(b)), Co_3O_4 -NPs 暴露后诱导了 p-H3S10 修饰水平的升高并持续长达 24 h。同样的,随着暴露时间的增加,观察到 Ac-H3K9、Ac-H3K14 及 Me3-H3K4 修饰水平明显上调。另外,0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Co_3O_4 -NPs 暴露后 Me3-H3K27 修饰水平上调,但在暴露 4 h 及 8 h 时修饰水平降低。实验结果表明, Co_3O_4 -NPs 暴露后短时间内(1 h)即引起了 p-H3S10、Ac-H3K9 及 Me3-H3K4 的高表达,并持续长达 24 h。 Co_3O_4 -NPs 暴露后引起了 Ac-H3K14 修饰水平的上调,但晚于其

他被测修饰位点。另外,Me3-H3K27 修饰的上调在 Co₃O₄-NPs 暴露 4 h 后,出现先下降再升高趋势。

2.4 细胞内 Co₃O₄-NPs 的蓄积量

不同于传统的材料,纳米材料更容易进入细胞,从而在细胞内引起各种功能损伤^[9,11]。为了探究 Co₃O₄-NPs 对组蛋白 H3 修饰影响的机制,利用流式细胞仪的侧向散射光 SS 分析检测了细胞内 Co₃O₄-NPs 的蓄积量。图 4(a)显示了 Co₃O₄-NPs (~1 mg·mL⁻¹)暴露 1 h 后,流式细胞仪的前向散射光(forward scattered light, FS)和 SS 的点状图。实验

结果表明,Co₃O₄-NPs 作用对 FS 的强度没有影响,而平均 SS 强度(mean SS)以剂量依赖的方式增加,各样本平均 SS 强度分别为 74.994、75.840、76.527、78.439、81.189、86.691、89.397、90.320、104.852 及 118.632。另外,观察到 SS 强度并未随着 1 mg·mL⁻¹ Co₃O₄-NPs 暴露时间的增加而增强,各暴露时间点的结果与 1 h 时基本一致(图 4(b))。

为了进一步确定细胞内 Co₃O₄-NPs 的蓄积量与组蛋白修饰之间的关系,使用 Photoshop 2020 软件定量了图 2(a)中所示的 p-H3S10、Ac-H3K9 及 Me3-H3K4

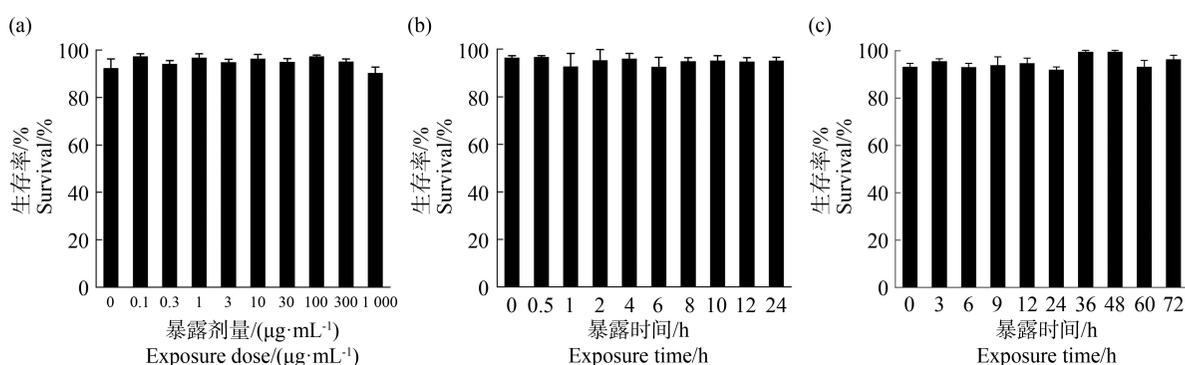


图 2 Co₃O₄-NPs 暴露后的细胞生存率

注:(a) 剂量依赖;(b) 时间依赖(~24 h);(c) 时间依赖(~72 h)。

Fig. 2 Cell viability after exposure to Co₃O₄-NPs

Note: (a) Dose-dependent; (b) Time-dependent (~24 h); (c) Time-dependent (~72 h).

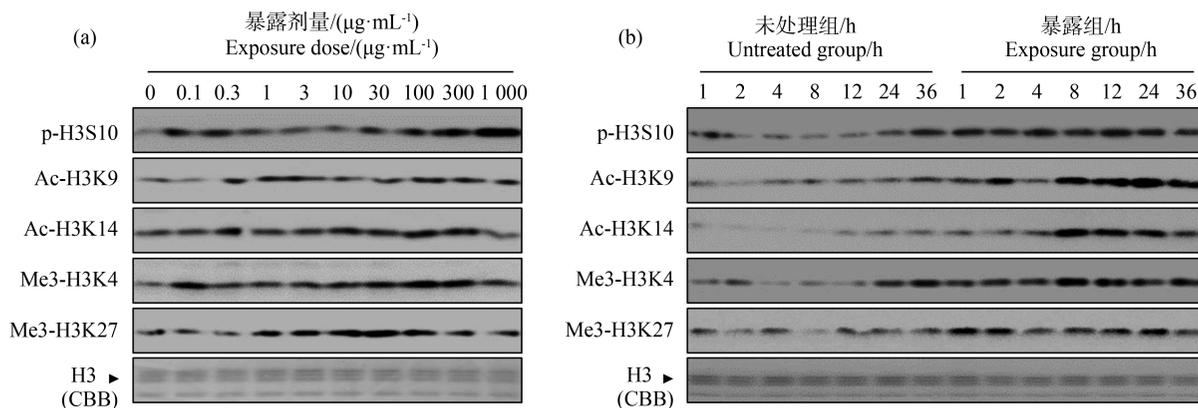


图 3 Co₃O₄-NPs 暴露后的组蛋白 H3 修饰

注:p-H3S10 表示组蛋白 H3 第 10 位丝氨酸的磷酸化;Ac-H3K9 表示组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸的乙酰化;Ac-H3K14 表示组蛋白 H3 第 14 位赖氨酸的乙酰化;Me3-H3K4 表示组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸的三甲基化;Me3-H3K27 表示组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸的三甲基化;(a) 剂量依赖;(b) 时间依赖。

Fig. 3 Histone H3 modification after exposure to Co₃O₄-NPs

Note: p-H3S10 stands for phosphorylation of histone H3 at serine 10; Ac-H3K9 stands for acetylation of histone H3 at lysine 9; Ac-H3K14 stands for acetylation of histone H3 at lysine 14; Me3-H3K4 stands for trimethylation of histone H3 at lysine 4; Me3-H3K27 stands for trimethylation of histone H3 at lysine 27; (a) Dose-dependent; (b) Time-dependent.

条带,并计算了SS和各组蛋白H3修饰强度的平均值。随着Co₃O₄-NPs的暴露剂量的增加,Co₃O₄-NPs的蓄积量(平均SS强度)和p-H3S10、Ac-H3K9及Me3-H3K4的强度平行增加(图5)。各自的相关

系数为 $r^2=0.67767$ 、 $r^2=0.81936$ 及 $r^2=0.80852$ 。

2.5 Co₃O₄-NPs 诱导 DNA 损伤形成

为了确定进入细胞内的Co₃O₄-NPs是否引起DNA损伤,观察了Co₃O₄-NPs暴露后组蛋白H2AX

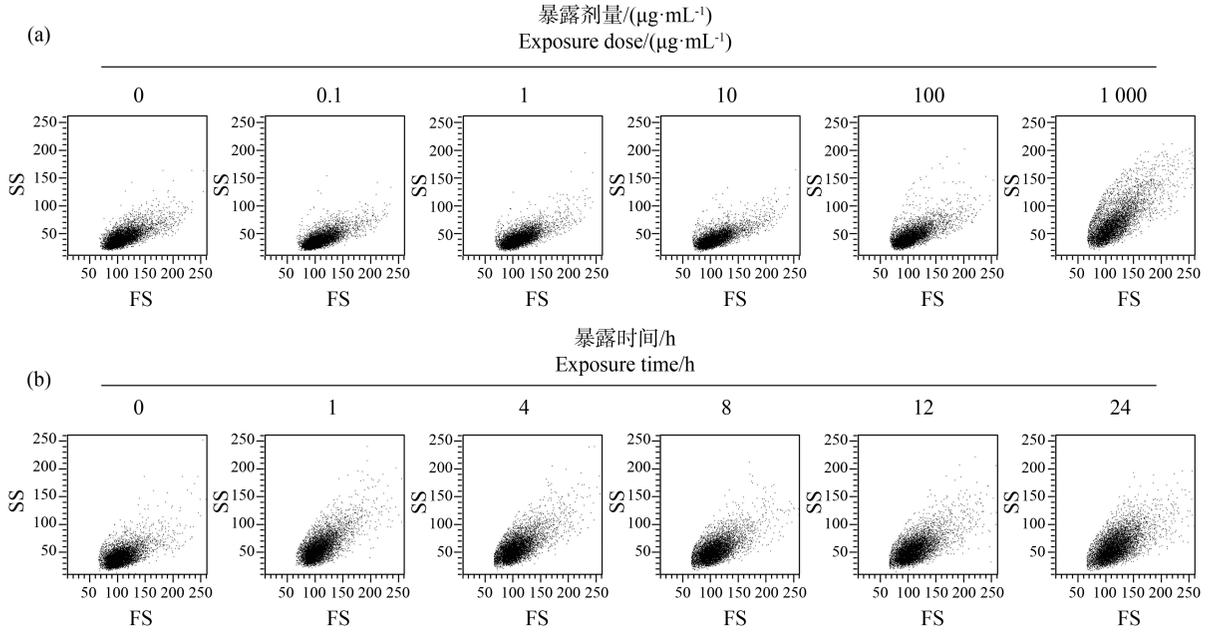


图4 Co₃O₄-NPs暴露后的细胞内蓄积量

注:SS表示侧向散射光;FS表示前向散射光;(a)剂量依赖;(b)时间依赖。

Fig. 4 Intercellular accumulation after exposure to Co₃O₄-NPs

Note: SS stands for side scattered light; FS stands for forward scattered light; (a) Dose-dependent; (b) Time-dependent.

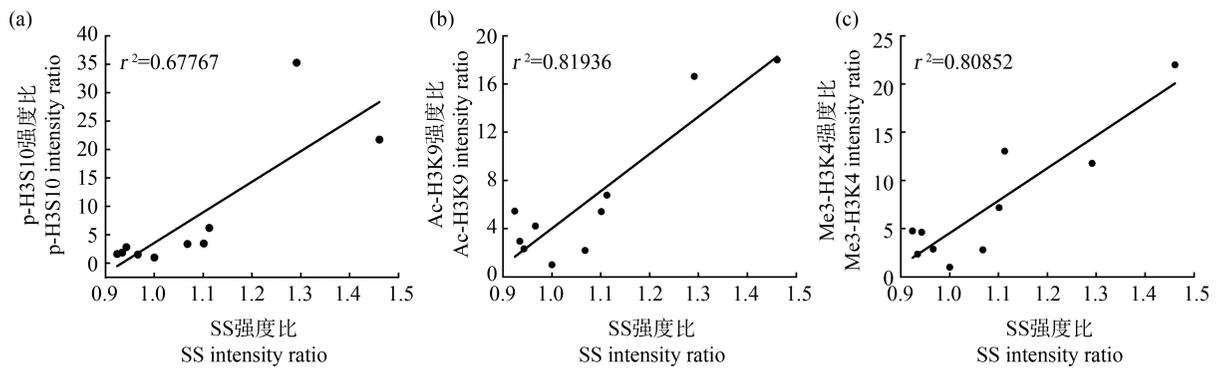


图5 Co₃O₄-NPs的细胞内蓄积量与组蛋白H3修饰之间的相关性

注:使用Photoshop 2020提取了蛋白免疫印迹法测定后的组蛋白H3修饰强度;计算了Co₃O₄-NPs处理与未处理细胞的组蛋白H3修饰程度及细胞内蓄积量的比值(p-H3S10、Ac-H3K9、Me3-H3K4及SS强度比);使用最小二乘法计算了相关性;(a)p-H3S10与SS;(b)Ac-H3K9与SS;(c)Me3-H3K4与SS。

Fig. 5 Correlation between intercellular accumulation of Co₃O₄-NPs and histone H3 modification

Note: Histone H3 modification was determined using Western blotting, where the intensity of each band was extracted using Photoshop 2020; the intensity ratio of histone H3 modification and intracellular accumulation in cells treated with Co₃O₄-NPs, versus untreated control cells, was calculated; correlations were calculated using the least-squares method; (a) p-H3S10 and SS; (b) Ac-H3K9 and SS; (c) Me3-H3K4 and SS.

第 139 位丝氨酸的磷酸化(γ -H2AX)修饰变化(图 6)。不同剂量 Co_3O_4 -NPs ($\sim 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)暴露 1 h 后, γ -H2AX 修饰水平均随着暴露剂量的升高而升高,显示出明显的剂量依赖性(图 6(a))。0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Co_3O_4 -NPs 长时间($\sim 36 \text{ h}$)暴露后诱导了 γ -H2AX 修饰水平的升高并持续长达 36 h (图 6(b))。

为了进一步确定细胞内 Co_3O_4 -NPs 的蓄积量与 DNA 损伤以及 DNA 损伤与组蛋白 H3 修饰之间的关系,绘制了 DNA 损伤(γ -H2AX)与 SS 强度、DNA 损伤与 p-H3S10、Ac-H3K9、Me3-H3K4 相关性的散点图(图 7)。 Co_3O_4 -NPs 的细胞内蓄积量与其诱导的 DNA 损伤高度相关($r^2 = 0.70403$)。另外, DNA 损伤与 p-H3S10、Ac-H3K9 及 Me3-H3K4 的强度平行增加,各自的相关系数为 $r^2 = 0.98644$ 、 $r^2 = 0.88165$ 和 $r^2 = 0.5501$ 。

2.6 Co_3O_4 -NPs 对组蛋白 H3 修饰酶的影响

组蛋白修饰酶含有特定的结构域,在促进组蛋白修饰功能的多样性和维持细胞稳态发挥先锋作用^[25]。采用 RT-qPCR 法考察了 Co_3O_4 -NPs 暴露后 3 种常见的组蛋白修饰酶 LSD1 (lysine specific demethylase)、HDAC1 (histone deacetylase 1)、p300 (histone acetyltransferase p300)的 mRNA 水平的变化。然而仅有 LSD1 显示出时间依赖性的变化,即随着 0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Co_3O_4 -NPs 暴露时间的增加,LSD1 的 mRNA 表达量呈下降趋势(图 8)。其余 2 种组蛋白修饰酶的 mRNA 水平与空白对照相比差异无统计学意义。

3 讨论 (Discussion)

纳米材料的理化性质是影响其毒性的重要因素。观察到 Co_3O_4 -NPs 无论分散与否,其颗粒形状大部分为球形(图 1(a))。在其他条件相同的情况下,球形颗粒的表面积更大,表面反应位点更多。我们在经 0.5% DMEM 分散处理后的 Co_3O_4 -

NPs 的 XRD 分析中观察到了 NaCl 的衍射峰(图 1(d))。这可能与 Co_3O_4 -NPs 的磁性和导电性将 DMEM 培养基中的无机盐组分大量吸附在其表面有关。

纳米材料可以通过内吞作用或自由扩散等不同途径被细胞蓄积^[26]。观察到将 Co_3O_4 -NPs 分散在 0.5% DMEM 中后,明显出现团聚现象(图 1)。一般而言,纳米颗粒的尺寸越小越容易进入细胞^[27]。纳米颗粒在分散介质中的团聚明显会影响其进入细胞的能力。然而,也有报道指出“蛋白冠”的形成会为纳米颗粒表面提供新的生物结合位点。在生物系统内,纳米颗粒表面吸附的组分可为免疫系统提供特异性,从而使纳米颗粒顺利进入细胞^[28]。多项研究证实纳米颗粒诱导的组蛋白 H3 修饰及 DNA 损伤与其细胞内蓄积量高度相关^[29-30]。这与我们观察到的结果一致,随着 Co_3O_4 -NPs 暴露剂量的增加, Co_3O_4 -NPs 的细胞内蓄积量及其诱导的组蛋白 H3 修饰及 γ -H2AX 显著增加(图 3(a)、图 4 及图 6),进一步分析表明, Co_3O_4 -NPs 的细胞内蓄积量与组蛋白 H3 修饰及 γ -H2AX 形成高度相关(图 5 及图 7(a)),间接证明了 Co_3O_4 -NPs 的细胞内蓄积是引起组蛋白修饰的关键因素之一。

组蛋白修饰在控制染色质结构与调控基因转录中发挥着重要作用^[15-16]。我们的实验结果表明, Co_3O_4 -NPs 能诱导 p-H3S10 的持续高表达(图 3)。然而,p-H3S10 在 Co_3O_4 -NPs 暴露后立即被诱导,这与有丝分裂相关的 p-H3S10 存在明显差异。另一方面,p-H3S10 的高表达也是诱导原癌基因表达的关键因素之一^[31-33]。一些致癌性金属,如镍、砷等能引起 p-H3S10 修饰的改变,从而导致基因表达的改变^[32-33]。p-H3S10 的增加会促进 Ac-H3K14 修饰水平上调^[34-35]。Ac-H3K9 及 Ac-H3K14 主要位于启动子区域,其高表达通常与基因激活相关^[36]。在相同

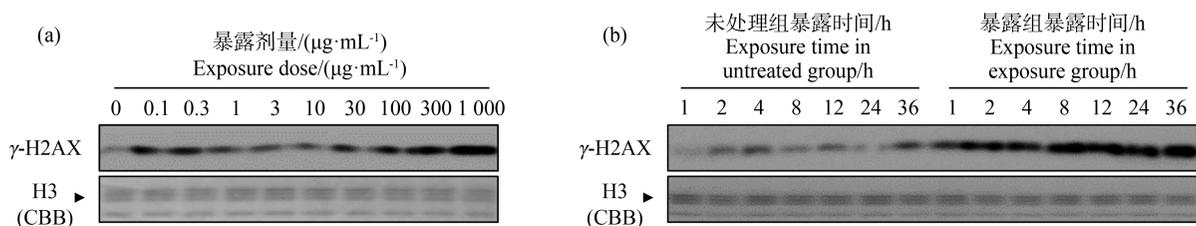


图 6 Co_3O_4 -NPs 暴露后的 γ -H2AX 修饰

注: γ -H2AX 表示组蛋白 H2AX 第 139 位丝氨酸的磷酸化;(a) 剂量依赖;(b) 时间依赖。

Fig. 6 γ -H2AX modification after exposure to Co_3O_4 -NPs

Note: γ -H2AX stands for phosphorylation of histone H2AX at serine 139; (a) Dose-dependent; (b) Time-dependent.

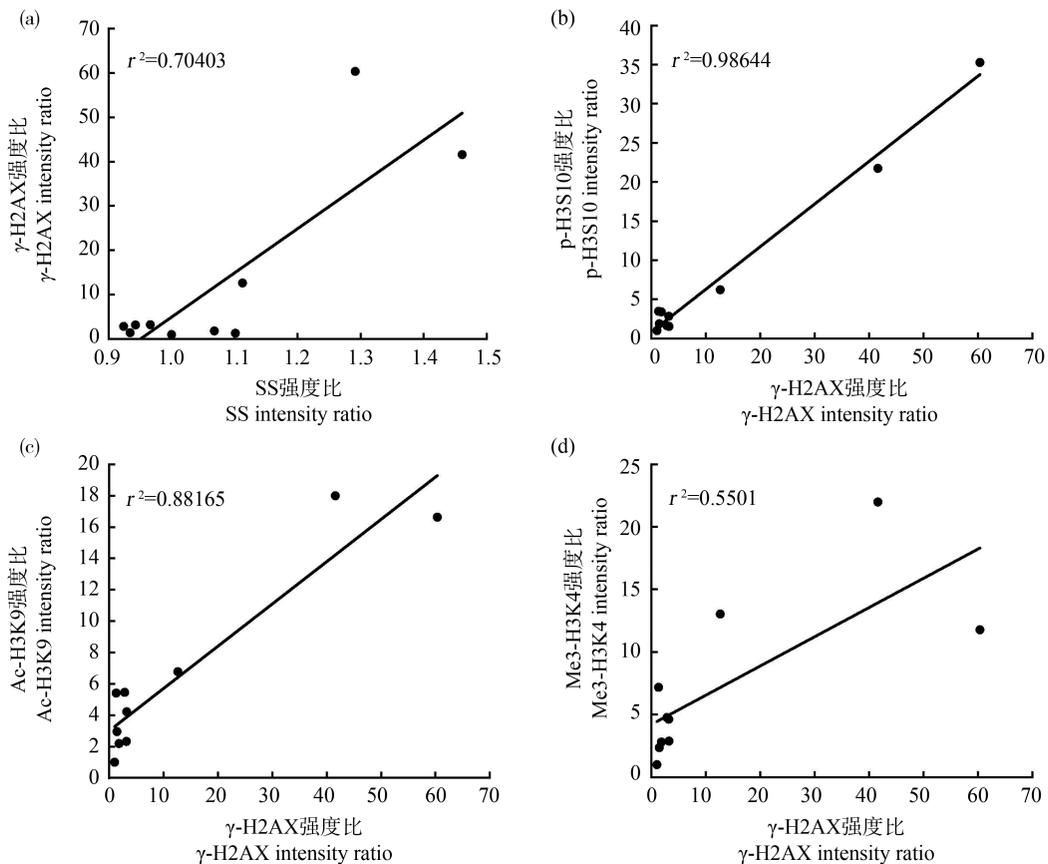


图7 DNA损伤与细胞内蓄积量及组蛋白H3修饰之间的相关性

注:使用 Photoshop 2020 提取了蛋白免疫印迹法测定后的组蛋白 H3 修饰及 DNA 损伤强度;计算了 Co_3O_4 -NPs 处理与未处理细胞的组蛋白 H3 修饰程度、DNA 损伤程度及细胞内蓄积量的比值(p-H3S10、Ac-H3K9、Me3-H3K4、 γ -H2AX 及 SS 强度比);使用最小二乘法计算了相关性;(a) γ -H2AX 与 SS;(b) p-H3S10 与 γ -H2AX;(c) Ac-H3K9 与 γ -H2AX;(d) Me3-H3K4 与 γ -H2AX。

Fig. 7 Correlation between DNA damage and intercellular accumulation and histone H3 modification

Note: DNA damage and histone H3 modification was determined using Western blotting, where the intensity of each band was extracted using Photoshop 2020; the intensity ratio of histone H3 modification, DNA damage and intracellular accumulation in cells treated with Co_3O_4 -NPs, versus untreated control cells, was calculated; correlations were calculated using the least-squares method; (a) γ -H2AX and SS; (b) p-H3S10 and γ -H2AX; (c) Ac-H3K9 and γ -H2AX; (d) Me3-H3K4 and γ -H2AX.

暴露时间点下我们观察到 p-H3S10 与 Ac-H3K9 及 Ac-H3K14 存在协同作用(图 3(b))。另一方面, Me3-H3K4 与组蛋白 H3 的乙酰化之间也存在协同作用^[37], 而 Me3-H3K27 是异染色质区域的主要标志, 其高表达常常被认为是转录抑制的关键^[19], 这与我们观察到的 Co_3O_4 -NPs 诱导的组蛋白 H3 修饰变化结果高度一致。这些结果强烈表明, Co_3O_4 -NPs 诱导的 p-H3S10 与基因激活高度相关。

另一方面, 组蛋白修饰变化在 DNA 损伤修复过程中具有重要作用^[17-18]。组蛋白 H3 乙酰化创造了开放的染色质结构, 为募集 DNA 修复蛋白提供了良好的环境^[17]。DNA 损伤也可以引起相关修饰酶的变化, 进而对组蛋白修饰产生影响。研究表明,

甲基转移酶 SUV39H1 可被迅速募集到 DNA 损伤区域并引起 H3K9 甲基化的迅速上调, 进而激活 DNA 损伤信号蛋白^[38]。我们的分析结果表明, Co_3O_4 -NPs 引起的 DNA 损伤(γ -H2AX)与其诱导的组蛋白 H3 修饰变化强度呈线性相关(图 7(b)、(c)和(d))。这些结果间接证明了 Co_3O_4 -NPs 引起的 DNA 损伤是其诱导组蛋白 H3 修饰变化的原因之一。DNA 损伤修复相关的组蛋白修饰不局限于一种组蛋白或一种修饰^[39]。许多甲基转移酶和去甲基化酶被招募至 DNA 损伤位点, 作用相应修饰的染色质。然而 Co_3O_4 -NPs 暴露后, 我们仅观察到 *LSD1* 随暴露时间的增加而下降(图 8)。今后, 我们将继续深入探讨其内在的分子机制。

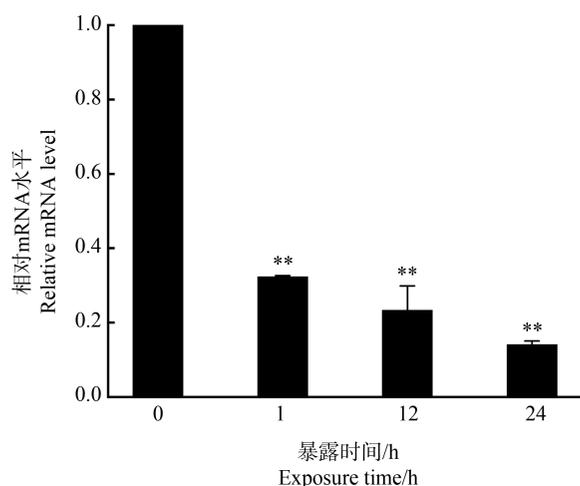


图8 Co_3O_4 -NPs 暴露后 *LSD1* 的基因表达水平

注:*LSD1* 表示组蛋白去甲基化酶1 基因;与空白对照组相比差异显著,** $P<0.01$ 。

Fig. 8 Gene expression levels of *LSD1* after exposure to Co_3O_4 -NPs

Note: *LSD1* stands for lysine specific demethylase 1 gene; compared with blank control group, there is significant difference, ** $P<0.01$.

组蛋白修饰是表观遗传学领域重要的研究内容之一,参与染色质动态结构的维持和调节、基因激活及沉默、DNA 损伤修复等多种重要的生物学过程,与神经系统疾病、糖尿病和癌症等各类疾病有关^[15-19]。对 Co_3O_4 -NPs 等金属氧化物纳米材料诱导的组蛋白修饰的分子机制的进一步探究,必将为推动纳米安全性评价系统的发展与完善,为评估金属氧化物纳米材料的生物效应和安全性及设计应用于各种领域的金属氧化物纳米材料提供理论基础。

通信作者简介:赵晓旭(1984—),男,博士,副教授,主要研究方向为环境毒理学。

共同通信作者简介:吕源财(1986—),男,博士,副教授,主要研究方向为纳米材料的环境风险。

参考文献 (References):

- [1] Janković N Z, Plata D L. Engineered nanomaterials in the context of global element cycles [J]. *Environmental Science: Nano*, 2019, 6(9): 2697-2711
- [2] Aitken R J, Chaudhry M Q, Boxall A B, et al. Manufacture and use of nanomaterials: Current status in the UK and global trends [J]. *Occupational Medicine*, 2006, 56(5): 300-306
- [3] Li W Y, Xu L N, Chen J. Co_3O_4 nanomaterials in lithium-

- ion batteries and gas sensors [J]. *Advanced Functional Materials*, 2005, 15(5): 851-857
- [4] Li Y G, Tan B, Wu Y Y. Mesoporous Co_3O_4 nanowire arrays for lithium ion batteries with high capacity and rate capability [J]. *Nano Letters*, 2008, 8(1): 265-270
- [5] Hoseinzadeh E, Makhdoui P, Taha P, et al. A review on nano-antimicrobials: Metal nanoparticles, methods and mechanisms [J]. *Current Drug Metabolism*, 2017, 18(2): 120-128
- [6] Tonelli A M, Venturini J, Arcaro S, et al. Novel core-shell nanocomposites based on TiO_2 -covered magnetic Co_3O_4 for biomedical applications [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials*, 2020, 108(5): 1879-1887
- [7] Pankhurst Q A, Thanh N K T, Jones S K, et al. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine [J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2009, 42(22): 224001
- [8] Zhao F, Zhao Y, Liu Y, et al. Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials [J]. *Small*, 2011, 7(10): 1322-1337
- [9] Sengul A B, Asmatulu E. Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles: A review [J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2020, 18(5): 1659-1683
- [10] Liu N, Tang M. Toxic effects and involved molecular pathways of nanoparticles on cells and subcellular organelles [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2020, 40(1): 16-36
- [11] McShan D, Ray P C, Yu H T. Molecular toxicity mechanism of nanosilver [J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2014, 22(1): 116-127
- [12] Wong B S E, Hu Q D, Baeg G H. Epigenetic modulations in nanoparticle-mediated toxicity [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 109: 746-752
- [13] Stoccoro A, Karlsson H L, Coppède F, et al. Epigenetic effects of nano-sized materials [J]. *Toxicology*, 2013, 313(1): 3-14
- [14] Shyamasundar S, Ng C T, Yung L Y, et al. Epigenetic mechanisms in nanomaterial-induced toxicity [J]. *Epigenomics*, 2015, 7(3): 395-411
- [15] Berger S L. The complex language of chromatin regulation during transcription [J]. *Nature*, 2007, 447(7143): 407-412
- [16] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function [J]. *Cell*, 2007, 128(4): 693-705
- [17] Price B D, D'Andrea A D. Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks [J]. *Cell*, 2013, 152(6): 1344-1354

- [18] Wang S Y, Meyer D H, Schumacher B. H3K4me2 regulates the recovery of protein biosynthesis and homeostasis following DNA damage [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2020, 27(12): 1165-1177
- [19] Lawrence M, Daujat S, Schneider R. Lateral thinking: How histone modifications regulate gene expression [J]. *Trends in Genetics*, 2016, 32(1): 42-56
- [20] Zhao X X, Ibuki Y. Evaluating the toxicity of silver nanoparticles by detecting phosphorylation of histone H3 in combination with flow cytometry side-scattered light [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(8): 5003-5012
- [21] Zhao X X, Toyooka T, Ibuki Y. Silver nanoparticle-induced phosphorylation of histone H3 at serine 10 is due to dynamic changes in actin filaments and the activation of Aurora kinases [J]. *Toxicology Letters*, 2017, 276: 39-47
- [22] Liu Y, Mayo M W, Nagji A S, et al. BRMS1 suppresses lung cancer metastases through an E3 ligase function on histone acetyltransferase p300 [J]. *Cancer Research*, 2013, 73(4): 1308-1317
- [23] Jin K L, Pak J H, Park J Y, et al. Expression profile of histone deacetylases 1, 2 and 3 in ovarian cancer tissues [J]. *Journal of Gynecologic Oncology*, 2008, 19(3): 185-190
- [24] Kumar A, Kumari N, Nallabelli N, et al. Expression profile of H3K4 demethylases with their clinical and pathological correlation in patients with clear cell renal cell carcinoma [J]. *Gene*, 2020, 739: 144498
- [25] de la Cruz X, Lois S, Sánchez-Molina S, et al. Do protein motifs read the histone code? [J]. *BioEssays*, 2005, 27(2): 164-175
- [26] Oh N, Park J H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2014, 9(Suppl.1): 51-63
- [27] Liu W, Wu Y, Wang C, et al. Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size [J]. *Nanotoxicology*, 2010, 4(3): 319-330
- [28] Donaldson K, Aitken R, Tran L, et al. Carbon nanotubes: A review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety [J]. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 2006, 92(1): 5-22
- [29] Abudayyak M, Gurkaynak T A, Özhan G. *In vitro* toxicological assessment of cobalt ferrite nanoparticles in several mammalian cell types [J]. *Biological Trace Element Research*, 2017, 175(2): 458-465
- [30] Abudayyak M, Gurkaynak T A, Özhan G. *In vitro* evaluation of cobalt oxide nanoparticle-induced toxicity [J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2017, 33(8): 646-654
- [31] Rossetto D, Avvakumov N, Côté J. Histone phosphorylation: A chromatin modification involved in diverse nuclear events [J]. *Epigenetics*, 2012, 7(10): 1098-1108
- [32] Li J, Gorospe M, Barnes J, et al. Tumor promoter arsenite stimulates histone H3 phosphoacetylation of proto-oncogenes c-fos and c-Jun chromatin in human diploid fibroblasts [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(15): 13183-13191
- [33] Ke Q D, Li Q, Ellen T P, et al. Nickel compounds induce phosphorylation of histone H3 at serine 10 by activating JNK-MAPK pathway [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(6): 1276-1281
- [34] Lo W S, Trievel R C, Rojas J R, et al. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked *in vitro* and *in vivo* to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14 [J]. *Molecular Cell*, 2000, 5(6): 917-926
- [35] Salvador L M, Park Y, Cottom J, et al. Follicle-stimulating hormone stimulates protein kinase A-mediated histone H3 phosphorylation and acetylation leading to select gene activation in ovarian granulosa cells [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(43): 40146-40155
- [36] Karmodiya K, Krebs A R, Oulad-Abdelghani M, et al. H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 424
- [37] Zhang T Y, Cooper S, Brockdorff N. The interplay of histone modifications - writers that read [J]. *EMBO Reports*, 2015, 16(11): 1467-1481
- [38] Ayrapetov M K, Gursoy-Yuzugullu O, Xu C, et al. DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(25): 9169-9174
- [39] van Attikum H, Gasser S M. Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response [J]. *Trends in Cell Biology*, 2009, 19(5): 207-217 ◆