

# 苯并[a]芘诱导的恶性转化细胞中 DNA 聚合酶 $\beta$ 高表达的机制研究\*

赵巍, 吴媚, 杨沫, 张遵真 $\Delta$

四川大学华西公共卫生学院 环境卫生教研室(成都 610041)

**【摘要】** 目的 探讨苯并[a]芘(BaP)诱导的恶性转化细胞中 DNA 聚合酶  $\beta$ (pol $\beta$ )表达增加的可能机制。方法 采用 RT-PCR-单链构象多态性(RT-PCR-SSCP)分析及基因测序检测 BaP 诱导的恶性转化细胞(pol $\beta$ -T 细胞)中 pol $\beta$  基因外显子序列;基因测序检测 pol $\beta$  基因启动子序列。采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 pol $\beta$ -T 细胞和未经 BaP 处理的对照细胞(pol $\beta$  细胞)中蛋白精氨酸甲基转移酶 6 (PRMT6) mRNA 及蛋白质表达水平。结果 RT-PCR-SSCP 和基因测序未发现 pol $\beta$ -T 细胞中 pol $\beta$  基因外显子序列改变,但其启动子区域经基因测序证实 5' 端上游 -10 位和 -61 位分别存在插入突变(插入 G)和点突变(C $\rightarrow$ A)。此外, pol $\beta$ -T 细胞中 PRMT6 mRNA 和蛋白表达量均较对照 pol $\beta$  细胞增高( $P < 0.05$ )。结论 BaP 诱导的恶性转化细胞中 pol $\beta$  基因的高表达不伴随其外显子序列的突变,但与启动子序列遗传学突变密切相关, PRMT6 还可能通过表观遗传学途径导致 pol $\beta$  的高表达。

**【关键词】** 苯并芘 细胞转化, 肿瘤 蛋白精氨酸甲基转移酶 6 DNA 聚合酶  $\beta$

**Mechanism of DNA Polymerase Beta Hyper-expression in Malignant Transformation Induced by Benzo[a] Pyrene**  
ZHAO Wei, WU Mei, YANG Mo, ZHANG Zun-zhen $\Delta$ . Department of Environmental Health, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

$\Delta$  Corresponding author, E-mail: zhangzunzhen@163.com

**【Abstract】** **Objective** To explore the mechanism of the hyper-expression of DNA polymerase beta (pol $\beta$ ) in benzo[a]pyrene (BaP) induced malignant transformed cell (pol $\beta$ -T). **Methods** The mutation of pol $\beta$  gene exon and promoter were examined using reverse transcriptase-polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (RT-PCR-SSCP) and gene sequencing. The expression of protein-arginine N-methyltransferase 6 (PRMT6) mRNA and protein in pol $\beta$ -T cell and control cell (pol $\beta$  cell) were investigated by RT-PCR and Western blot. **Results** RT-PCR-SSCP and gene sequencing revealed that the hyper-expression of pol $\beta$  in pol $\beta$ -T cell was not associated with the mutation of pol $\beta$  gene exon while insert mutation (G) and point mutation (C $\rightarrow$ A) were found located in the core region of pol $\beta$  gene promoter. Furthermore, the expression of PRMT6 mRNA and protein also increased in pol $\beta$ -T cell compared with control cell ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The enhancement of expression of pol $\beta$  in pol $\beta$ -T cell might be attributed to the mutations locating in pol $\beta$  gene promoter on transcription level of pol $\beta$  gene, and PRMT6 might also enhance the expression of pol $\beta$  in pol $\beta$ -T cell through relative epigenetic pathways.

**【Key words】** Benzo[a]pyrene Cell transformation, neoplastic Protein-arginine N-methyltransferase 6 DNA polymerase beta

苯并[a]芘(benzo[a]pyrene, BaP)是一种广泛存在的环境污染物,2005年国际癌症研究机构(IARC)将其由人类可疑致癌物(Group II B)升级为人类确定致癌物(Group I),其致癌分子机制一直是研究的热点。既往对于 BaP 致癌机制的研究多涉及 DNA 加合物形成、原癌基因激活、抑癌基因失活、信号传导异常、细胞周期改变、DNA 损伤与修复

等<sup>[1]</sup>。近年来一些研究揭示:BaP 在细胞内过氧化物酶和二氢二醇脱氢酶的作用下可生成包括超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基等活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS),造成 DNA 的氧化损伤,这类损伤主要由碱基切除修复(base excision repair, BER)系统予以修复<sup>[2]</sup>;此外,许多由 BaP 代谢产物与嘌呤上的亲核位点反应形成的小分子 DNA 加合物的修复也涉及 BER 途径<sup>[3]</sup>。DNA 聚合酶  $\beta$  (DNA polymerase beta, pol $\beta$ )作为 BER 途径的关键酶,不仅具有 DNA 聚合酶的功能,而且还能够填

\* 国家自然科学基金(No. 30872079、81172632 和 81001230)资助

$\Delta$  通讯作者, E-mail: zhangzunzhen@163.com

补受损 DNA 的核苷酸缺口,在维持生物基因组完整性和稳定性方面具有重要的作用<sup>[4]</sup>。

大量研究表明肿瘤细胞和组织中 *polβ* 活性较正常细胞高,并伴随 *polβ* mRNA 和蛋白质的高表达<sup>[5, 6]</sup>;肿瘤细胞系和肿瘤样本中还发现了 *polβ* 基因的突变,主要包括点突变<sup>[7-12]</sup>、缺失突变<sup>[8, 10, 12]</sup>和插入突变<sup>[8]</sup>。本实验室在前期研究中发现:经过 BaP 低剂量、长时间诱导转化的恶性细胞中 *polβ* 基因在 mRNA 和蛋白质水平均显著高于未经处理的对照细胞,提示 *polβ* 高表达参与了 BaP 诱导的细胞恶性转化过程。然而, BaP 诱导的恶性转化细胞中 *polβ* 高表达的机制未见报道。本研究拟探讨 BaP 诱导的恶性转化细胞中 *polβ* 高表达的可能机制,为进一步阐明 BaP 致癌的分子机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

DMEM 细胞培养液: Gibco; 胎牛血清: 上海复蒙基因生物科技有限公司; 胰蛋白酶: Difco; L-谷氨酰胺: Amresco; 焦碳酸二乙酯 (DEPC): Sigma; TRIzol 总 RNA 提取剂: Invitrogen; 逆转录试剂盒 Rever Tra Ace 组合型: Toyobo; 蛋白酶抑制剂: Roche; DNA marker: TaKaRa;  $\beta$ -巯基乙醇: Fluka; 预染蛋白 marker: MBI; 兔抗蛋白精氨酸甲基转移酶 6 (PRMT6) 多克隆抗体: Santa Cruz; 兔抗  $\beta$ -actin: 北京博奥森; 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG: 北京中杉; 增强型化学发光 (ECL) 显影试剂盒: Pierce; 全蛋白提取试剂盒: 南京凯基科技发展有限公司; 考马斯亮兰蛋白测定试剂盒: 南京建成生物工程研究所。

CO<sub>2</sub> 培养箱: Thermo; Medol 550 型酶联免疫检测仪: Bio-Rad; 倒置相差显微镜: Leica; 显微数码摄像图像采集系统: Pixera; BioSpec-mini DNA/RNA/PROTEIN Analyzer: SHIMADZU; UVI 凝胶成像系统: Bio-Rad; PCR 扩增仪: Eppendorf; D-37520 型低温离心机: Heraeus instrument。

### 1.2 细胞培养

DNA 聚合酶  $\beta$  野生型小鼠胚胎成纤维细胞株 (*polβ* wild type cell line, 简称 *polβ* 细胞) 由美国国立环境卫生研究院 (NIEHS) Samuel H. Wilson 实验室惠赠; 恶性转化细胞: 本实验室采用低剂量、长时间 BaP 染毒 *polβ* 细胞, 诱导其恶性转化, 挑取转化灶扩增培养并鉴定证实转化特征, 命名为 *polβ*-T 细胞 (细胞恶性转化及鉴定内容另文发表)。细胞采

用开放式单层贴壁培养, 每 3 d 传代 1 次。培养液为含 10% 胎牛血清和 2 mmol/L L-谷氨酰胺的 DMEM, 培养条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 RT-PCR-单链构象多态性 (RT-PCR-SSCP) 检测 *polβ* 基因外显子突变** 按照 TRIzol 总 RNA 提取说明书提取 *polβ* 细胞和 *polβ*-T 细胞的总 RNA; 紫外分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度, 琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 的完整性。各取 1  $\mu$ L 总 RNA 经逆转录试剂盒 Rever Tra Ace 逆转录成 cDNA, 取逆转录产物 5  $\mu$ L 为模板进行 PCR 以扩增 *polβ* 基因外显子。参照 *polβ* 基因外显子序列 (GenBank AF513911), 引物用 Primer 5.0 软件设计, 南京金斯特科技有限公司合成, 详见表 1。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 57.5 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 共进行 30 次循环; 最后 72 °C 延伸 4 min。PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳 (100 V, 25 min) 分离后, 用 UVI 凝胶成像系统拍照。再取适量 PCR 产物与等体积上样缓冲液混匀, 沸水浴变性 10 min, 冰浴 5 min; 300 V, 60 g/L (第 3、4 和 6 对引物扩增产物) 或 80 g/L (第 1、2 和 5 对引物扩增产物) 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 18 h, 0.1% AgNO<sub>3</sub> 溶液染色 15 min, 20% NaOH 显色 10 min 后拍照并分析。以 *polβ* 细胞作为对照, 若 *polβ*-T 细胞出现目的条带泳动变位 (即条带增加、减少或移位), 则判断为有突变。

表 1 扩增 *polβ* 基因外显子的 6 对引物序列  
Table 1 Six pairs of primers for *polβ* gene exons

Primer	Sequence (5'-3')	Fragment length (bp)
FP1	ACCGTAAGACCCAGGTG	234
RP1	TGTTCTACTCTGGCAGTTT	
FP2	GATAGCCAAGTACCCACACAAA	210
RP2	ACAACTTCCTTGACAGAGA	
FP3	CCTGACTCGAGTTACTGGCA	459
RP3	TGTGGATATTCCTTTCCATCC	
FP4	CAACGAATTGGGCTGAAATA	350
RP4	TGTGGATATTCCTTTCCATCC	
FP5	CAGCAAACAGCCAAAGTTGT	273
RP5	TCATTGATTGTGAAGCCCTTT	
FP6	AGGGTGAAACAAAGTTCATGG	328
RP6	GCAGGGCATCATCACTTCT	

**1.3.2 基因测序检测 *polβ* 基因外显子和启动子突变** *polβ*-T 细胞总 RNA 提取、鉴定、逆转录成 cDNA 同 1.3.1, 取逆转录产物 5  $\mu$ L 为模板进行 PCR 以扩增 *polβ* 基因外显子和启动子。参照 *polβ*

基因外显子序列和启动子序列<sup>[13]</sup>,引物用 Primer 5.0 软件设计,南京金斯特科技有限公司合成。*polβ* 基因外显子序列共 1058 bp,故设计两对引物(A, B)扩增,扩增产物拼接片段包含 *polβ* 基因外显子序列全长。A 上游引物,5'-ACCGGTAAGACCCAGGTG-3', A 下游引物,5'-TGTGGATATTCCTTCCATCC-3',产物长度 407 bp; B 上游引物,5'-CAGCAAACAGCCAAAGTTGT-3', B 下游引物,5'-GCAGGGCATCATTCACTTCT-3',产物长度 788 bp。启动子序列设计一对引物:上游引物 5'-CCTCTATACTCTTTCAGATTCACCCAC-3',下游引物 5'-ATGTCCGTGATGCCGCCGTTG AG-3',产物长度 746 bp,产物包含 *polβ* 基因启动子序列全长。PCR 反应条件:外显子序列退火温度 42 °C,启动子序列退火温度 52 °C;其他条件同 1.3.1。PCR 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化后送华大基因进行测序分析,DNA 片段测序结果经拼接后分别与相应基因序列比对,分析突变情况。

**1.3.3 RT-PCR 检测 PRMT6 mRNA 表达** *polβ*-T 和 *polβ* 细胞总 RNA 提取、鉴定、逆转录成 cDNA 同 1.3.1。各取逆转录产物 5  $\mu$ L 为模板进行 PCR 以扩增 PRMT6 基因及内参甘油醛-3-磷酸酯脱氢酶(GAPDH)。PRMT6 和 GAPDH 引物均由上海生工生物工程有限公司设计并合成:PRMT6 上游引物 5'-ACT ATG GCG TGG ATA TGA GC-3',下游引物 5'-TGG TCT CCC ACT TTG TAG CG-3',产物长度 451 bp;内参 GAPDH 上游引物 5'-GGT GAA GGT CGG TGT GAA CG-3',下游引物 5'-CTC GCT CCT GGA AGA TGG TG-3',产物长度 233 bp。PCR 反应条件:PRMT6 退火温度 59.2 °C,GAPDH 退火温度 56 °C;其他条件同 1.3.1。PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳(100 V, 25 min)分离后,用 UVI 凝胶成像系统拍照,Image J 软件测定目的条带积分光密度值(IOD=电泳条带平均光密度 $\times$ 面积),以目的条带和内参条带的比值作为目的基因的相对表达量。

**1.3.4 Western blot 检测 PRMT6 蛋白表达** 收集状态良好的处于对数生长期的 *polβ* 和 *polβ*-T 细胞,根据全蛋白提取试剂盒说明书操作提取细胞总蛋白,并用考马斯亮兰比色法测定蛋白浓度,将样品调整为相同蛋白浓度,于 120 g/L 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,每孔加入 30  $\mu$ g 总蛋白。电泳结束后,取出凝胶将蛋白转印到聚偏二氟乙烯膜上(80 V,30 min),缓冲液洗涤 3 次,5%脱

脂奶粉封闭 1 h,缓冲液洗涤 3 次,一抗 4 °C 振荡孵育过夜,缓冲液洗涤 3 次,加入二抗室温振荡孵育 1 h,缓冲液洗涤 3 次,ECL 显影,于暗室内 X 胶片曝光成像,以  $\beta$ -actin 蛋白为内参。Image J 软件测定目的条带积分灰度值(IGV=蛋白条带平均灰度值 $\times$ 面积),以目的条带和内参条带的比值作为目的蛋白的相对表达量。

## 1.4 统计学方法

各实验均重复 3 次以上,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 *t* 检验, $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 BaP 诱导的恶性转化细胞 *polβ* 基因突变检测

**2.1.1 RT-PCR-SSCP 检测恶性转化细胞 *polβ* 外显子基因突变** 根据 *polβ* 外显子序列设计的 6 对引物均能扩增出预期大小的片段,条带清晰,特异性强(图 1)。恶性转化细胞 *polβ*-T 与对照组细胞的 *polβ* 区段扩增产物经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳均能显示两条变性单链条带和一条未变性双链条带(图 2),与对照细胞比较,*polβ*-T 细胞未发现异常泳动条带,提示 *polβ*-T 细胞中 *polβ* 外显子序列未发生改变。

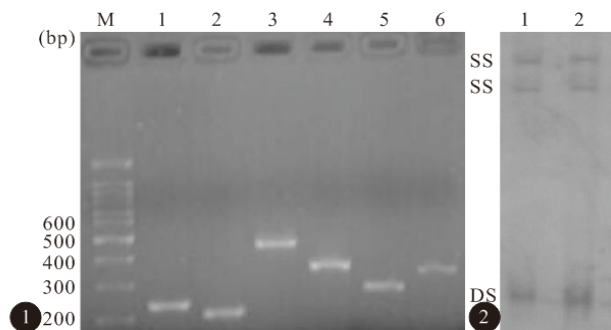


图 1 *polβ* 区段扩增结果

图 2 恶性转化细胞 *polβ* 基因外显子序列 RT-PCR-SSCP 银染结果

**Fig 1 Gel electrophoresis of six different sections in *polβ* gene (M: DNA marker; 1-6: Different sections in *polβ* gene)** **Fig 2 The RT-PCR-SSCP result of the sequence of *polβ* gene exon in transformed cells induced by BaP stained with AgNO<sub>3</sub> (SS: Denatured single strand; DS: Undenatured double strand; 1: *polβ*-T cells; 2: *polβ* cells)**

**2.1.2 基因测序检测恶性转化细胞 *polβ* 外显子和启动子基因突变** 根据 *polβ* 外显子序列设计的 2 对引物均能扩增出清晰条带(788 bp, 407 bp),位置与预期相符(图 3);PCR 产物测序并拼接后,与 *polβ* 基因外显子序列对照,未发现序列差异,与 RT-PCR-SSCP 结果一致。针对 *polβ* 启动子序列设计

的引物能扩增出清晰的特异性条带(746 bp),位置与预期相符(图 4),PCR 产物测序结果与 *polβ* 基因启动子序列进行比对,发现在 BaP 诱导的恶性转化

细胞中,*polβ* 基因启动子的核心区域存在突变,分别是位于 *polβ* 基因 5' 端上游 -10 位的插入突变(G)和 -61 位的点突变(C→A)(图 5)。

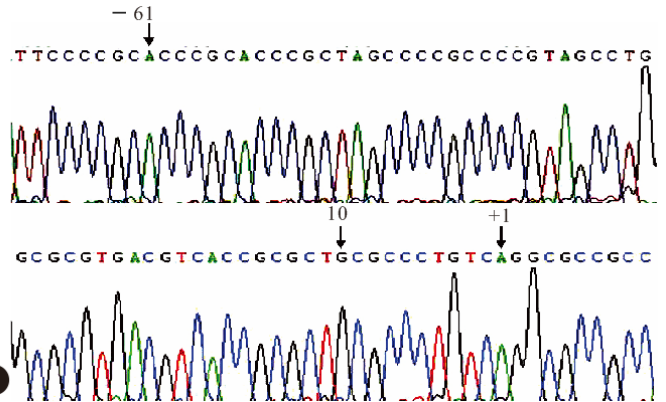
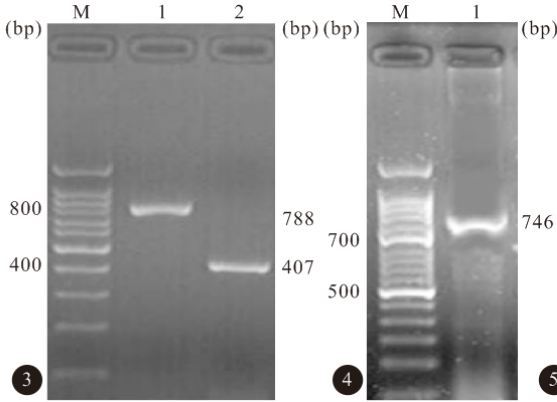


图 3 两对引物扩增的 *polβ* 基因的外显子片段

图 4 引物扩增的 *polβ* 基因的启动子片段

图 5 恶性转化细胞中 *polβ* 启动子序

列的测序结果〔+1 表示 *polβ* 外显子的第 1 位碱基,-10 和 -61 分别表示 *polβ* 基因 5' 端上游 -10 位的插入突变(G)和 -61 位的点突变(C→A)〕

Fig 3 PCR products of *polβ* gene exon fragments amplified with two pair primers (M: DNA marker; 1, 2: PCR products amplified with two pair primers)

Fig 4 PCR products of *polβ* gene promoter fragment (M: DNA marker; 1: PCR product for DNA sequencing)

Fig 5 DNA sequencing of *polβ* promoter of *polβ*-T cells〔+1 means the first base of *polβ* gene exon, -10 and -61 mean insert mutation (G) and point mutation (C→A) were found located in the core region of *polβ* gene promoter, respectively〕

### 2.2 BaP 诱导的恶性转化细胞 PRMT6 表达水平的改变

**2.2.1 PRMT6 mRNA 的表达** PCR 扩增产物电泳结果见图 6。*polβ*-T 细胞的 PRMT6 条带相对积分光密度值为  $2.59 \pm 0.88$ , 对照组 *polβ* 细胞的 PRMT6 条带相对积分光密度值为  $1.31 \pm 0.23$ 。恶性转化的 *polβ*-T 细胞中 PRMT6 mRNA 的相对表达量高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 其平均表达量接近对照组细胞的 2 倍。

组 *polβ* 细胞的 PRMT6 条带相对积分灰度值为  $0.46 \pm 0.18$ 。恶性转化的 *polβ*-T 细胞中 PRMT6 蛋白的相对表达量高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 其平均表达量高出对照组细胞的 2 倍。

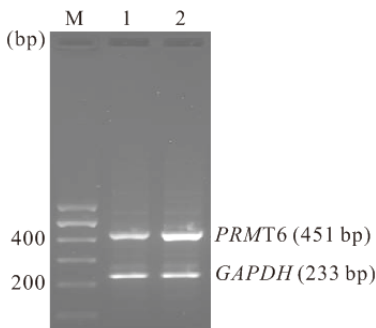


图 6 两种细胞 PRMT6 mRNA 的表达水平

Fig 6 Expression of PRMT6 mRNA in *polβ*-T and *polβ* cells

M: DNA marker; 1: *polβ* cells; 2: *polβ*-T cells

**2.2.2 PRMT6 蛋白的表达** 由图 7 可见相对分子质量均为  $42 \times 10^3$  的 PRMT6 和  $\beta$ -actin 蛋白, 条带明显、清晰, 位置与预期相符。*polβ*-T 细胞的 PRMT6 条带相对积分灰度值为  $1.00 \pm 0.65$ , 对照

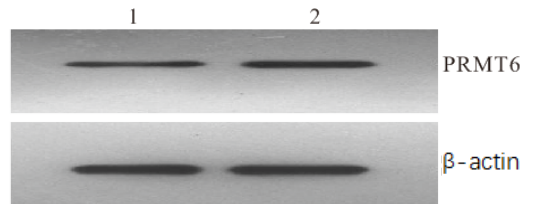


图 7 两种细胞 PRMT6 蛋白表达水平

Fig 7 Expression of PRMT6 in *polβ*-T and *polβ* cells

1: *polβ* cells; 2: *polβ*-T cells

### 3 讨论

*polβ* 不仅是 BER 系统中的限速酶, 而且还广泛参与基因组 DNA 复制、DNA 重组以及跨损伤 DNA 合成等多种生物学过程<sup>[14, 15]</sup>。然而, 由于缺乏 3'-5' 的校读功能, *polβ* 在 DNA 合成中保真度较低, 高表达可能导致突变增加, 甚至表现出潜在的原癌基因的作用<sup>[5]</sup>; 因此, 近年来人们将研究热点转向了 *polβ* 与基因组遗传不稳定性和肿瘤形成之间的关系上<sup>[16-18]</sup>。有研究显示肝癌组织中 *polβ* 活力显著高于正常组织, 其活力的增强与 *polβ* mRNA 和蛋白质的过表达相关<sup>[6]</sup>。事实上大约 1/3 的肿瘤组

织中  $\text{pol}\beta$  在 mRNA 和蛋白质水平均表达增加<sup>[5]</sup>, 在多种肿瘤细胞系如结肠癌、乳腺癌、白血病、卵巢癌细胞系中也发现了  $\text{pol}\beta$  基因的高表达<sup>[19]</sup>。另有研究发现, Wistar 大鼠肺细胞在电离辐射作用后第 20 代 DNA 聚合酶活性明显增加, 并在第 30 代获得非锚着依赖性生长能力, 能在半固体琼脂中形成集落, 并证实细胞发生了恶性转化<sup>[20]</sup>。本实验室之前的研究也发现: BaP 长期慢性染毒 20 代后形成的恶性转化细胞中,  $\text{pol}\beta$  在 mRNA 和蛋白质水平均较对照组细胞显著增加<sup>[21]</sup>。上述研究均提示在肿瘤形成/细胞恶性转化过程中伴随了  $\text{pol}\beta$  的高表达, 但其高表达的机制国内外未见报道; 本研究拟对 BaP 诱导的恶性转化细胞中  $\text{pol}\beta$  基因的高表达机制进行探索。

Tan 等<sup>[7]</sup>在 1/3 的肿瘤细胞系和肿瘤样本中发现了  $\text{pol}\beta$  的点突变; 大约 30% 的肿瘤组织存在  $\text{pol}\beta$  的突变和缺失, 其中以结直肠癌突变率最高, 可达 80% 以上<sup>[8, 22]</sup>。董子明等也连续报道: 恶性脑胶质瘤、食管癌、鼻咽癌、前列腺癌、胃癌和宫颈癌组织中高表达的  $\text{pol}\beta$  均具有突变现象<sup>[9-12]</sup>。另有研究显示, 高表达野生型  $\text{pol}\beta$  的小鼠 C127 细胞不具有恶性转化的特性, 只有高表达突变型  $\text{pol}\beta$  的小鼠 C127 细胞能够发生恶性转化<sup>[23, 24]</sup>。因此我们推测, BaP 诱导细胞发生恶性转化过程中  $\text{pol}\beta$  基因的表达增高可能与其基因外显子和启动子序列的突变有关, 并采用 RT-PCR-SSCP 和测序进行了探讨。结果显示 BaP 诱导的恶性转化细胞中没有发现  $\text{pol}\beta$  基因外显子突变。然而, RT-PCR-SSCP 的结果判断较为主观, 容易造成假阳性或假阴性结果, 对此, 我们又采用 DNA 测序对  $\text{pol}\beta$ -T 细胞中  $\text{pol}\beta$  基因外显子进行了 DNA 序列分析, 结果再次证明在 BaP 诱导的恶性转化细胞中  $\text{pol}\beta$  基因外显子序列没有发生改变, 提示  $\text{pol}\beta$  外显子基因可能并不包含 BaP 诱发肿瘤形成过程中的基因突变热点。在 BaP 诱导的恶性转化细胞中, 针对  $\text{pol}\beta$  基因启动子序列的分析发现, 分别于  $\text{pol}\beta$  基因 5' 端上游 -10 位和 -61 位处检测出插入突变和点突变, 提示 BaP 诱导细胞恶性转化过程中  $\text{pol}\beta$  基因表达水平的增高与其基因启动子的碱基序列改变有关。

蛋白精氨酸甲基化主要是由蛋白精氨酸甲基转移酶 (protein-arginine N-methyltransferases, PRMTs) 家族的部分成员催化完成的表观遗传学修饰, PRMTs 可以催化 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, S-AdoMet) 上的甲基转移到底

物蛋白精氨酸的胍基氮上, 在 DNA 修复、RNA 加工、信号转导、转录调控以及癌症发生等多种生物学过程中都发挥着重要作用<sup>[16]</sup>。迄今为止, 已经发现了十余种 PRMTs, 其中有关 PRMT6 的研究十分有限, 其在基因调控过程中所起的作用也并不一致。Harrison 等<sup>[17]</sup>报道, PRMT6 在乳腺癌细胞 MCF-7 中能够同时体现雌激素依赖型的黄体酮、糖皮质激素和雌激素受体的促转录作用和非激素依赖型的内源性血管内皮生长因子和酪氨酸激酶的抑制转录作用。另有研究发现, PRMT6 主要是通过 H3R2 (组蛋白 H3 第 2 位精氨酸残基) 非对称性的双甲基化来拮抗基因启动子区域的 H3K4 (组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸残基) 的双甲基化或三甲基化, 从而达到抑制基因组启动子区域的目的<sup>[18]</sup>。重要的是, 体内外试验均发现  $\text{pol}\beta$  是 PRMT6 的特异性底物, 可与 PRMT6 共价结合, 形成  $\text{pol}\beta$ -PRMT6 复合物, PRMT6 可催化  $\text{pol}\beta$  蛋白第 83 位和 152 位精氨酸残基甲基化, 甲基化修饰后的  $\text{pol}\beta$  在 BER 过程中识别绑定修复位点和持续合成的能力均大大增强<sup>[16]</sup>。据此, 我们有理由推测 PRMT6 的水平及其相关的甲基化过程极有可能影响  $\text{pol}\beta$  基因的表达和功能。本研究首次发现: 在经 BaP 诱导的恶性转化细胞中, PRMT6 在 mRNA 和蛋白质两个水平均显著高于对照细胞, 提示 PRMT6 相关的甲基化过程可能参与了 BaP 诱导的恶性细胞中  $\text{pol}\beta$  基因的高表达。

综上所述, BaP 诱导的恶性转化细胞中  $\text{pol}\beta$  高表达可能是  $\text{pol}\beta$  启动子区域突变的遗传学改变和 PRMT6 参与的精氨酸残基甲基化表观遗传学改变共同作用的结果。

## 参 考 文 献

- 1 Kozack R, Seo KY, Jelinsky SA, *et al.* Toward an understanding of the role of DNA adduct conformation in defining mutagenic mechanism based on studies of the major adduct (formed at N-2-dG) of the potent environmental carcinogen, benzo[a]pyrene. *Mutat Res*, 2000; 450(1-2): 41-59.
- 2 Elbekai RH, Korashy HM, Wills K, *et al.* Benzo [a] pyrene, 3-methylcholanthrene and beta-naphthoflavone induce oxidative stress in hepatoma hepa 1c1c7 Cells by an AHR- dependent pathway. *Free Radic Res*, 2004; 38(11): 1191-1200.
- 3 Kundu CN, Balusu R, Jaiswal AS, *et al.* Cigarette smoke condensate-induced level of adenomatous polyposis colib locks long-patchbase excision repair in breast epithelial cells. *Oncogene*, 2007; 26(10): 1428-1438.

- 4 Liu SK, Lai YH, Zhao W, *et al.* Links between DNA polymerase beta expression and sensitivity to bleomycin. *Toxicology*,2011;281(1-3):63-69.
- 5 Albertella MR, Lau A, O'Connor MJ. The overexpression of specialized DNA polymerases in cancer. *DNA repair*,2005;4(5):583-593.
- 6 郑秀龙,蔡建明. DNA聚合酶 $\beta$ 在DNA修复作用中的分子机制. *辐射研究与辐射工艺学报*,1997;15(3):168-170.
- 7 Tan XH, Zhao M, Pan KF, *et al.* Frequent mutation related with overexpression of DNA polymerase beta in primary tumors and precancerous lesions of human stomach. *Cancer Lett*,2005;220(1):101-114.
- 8 Dobashi Y, Shuin T, Tsuruga H, *et al.* DNA polymerase beta gene mutation in human prostate cancer. *Cancer Res*,1994;54(11):2827-2829.
- 9 高丽,赵国强,史锡文等. 脑胶质瘤组织中DNA聚合酶 $\beta$ 基因突变检测. *郑州大学学报(医学版)*,2005;40(4):605-608.
- 10 董子明,赵国强,赵勤等. 人食管癌组织中DNA聚合酶 $\beta$ 基因突变的研究. *中华医学杂志*,2002;82(13):899-902.
- 11 郑红,李明善,赵国强等. 鼻咽癌组织中DNA聚合酶 $\beta$ 基因的突变. *肿瘤防治研究*,2007;34(5):340-341.
- 12 王明臣,唐琳,赵国强等. 前列腺癌及良性增生组织中DNA聚合酶 $\beta$ 基因突变检测. *郑州大学学报(医学版)*,2005;40(4):611-613.
- 13 Yamaguchi M, Hirose F, Hayashi Y, *et al.* Murine DNA polymerase beta gene: mapping of transcription initiation sites and the nucleotide sequence of the putative promoter region. *Mol Cell Biol*,1987;7(5):2012-2018.
- 14 Plug AW, Clairmont CA, Sapi E, *et al.* Evidence for a role for DNA polymerase beta in mammalian meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*,1997;94(4):1327-1331.
- 15 Canitrot Y, Hoffmann JS, Calsou P, *et al.* Nucleotide excision repair DNA synthesis by excess DNA polymerase beta: a potential source of genetic instability in cancer cells. *FASEB J*,2000;14(12):1765-1774.
- 16 EL-Andaloussi N, Valovka T, Toueille M, *et al.* Arginine methylation regulates DNA polymerase  $\beta$ . *Mol Cell*,2006;22(1):51-62.
- 17 Harrison MJ, Tang YH, Dowhan DH. Protein arginine methyltransferase 6 regulates multiple aspects of gene expression. *Nucl Acids Res*,2010;38(7):2201-2216.
- 18 Guccione E, Bassi C, Casadio F, *et al.* Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature*,2007;449(7164):933-937.
- 19 龙峰,王晨虹,徐波等. 卵巢良恶性病变组织中DNA聚合酶 $\beta$ (DNA pol $\beta$ )和铁蛋白(FT)表达及意义. *医学研究杂志*,2008;37(3):57-59.
- 20 杨素霞,樊飞跃,李煜等. 大鼠细胞转化过程中DNA聚合酶的活性变化. *中国辐射卫生*,2000;9(4):224.
- 21 吴媚. 苯并[a]花诱导的细胞恶性转化与DNA聚合酶 $\beta$ 表达水平上的关系. 成都:四川大学华西公共卫生学院,2009.
- 22 Nemecek AA, Donigan KA, Murphy DL, *et al.* A colon cancer-associated DNA polymerase beta variant induces genomic instability and cellular transformation. *J Biol Chem*,2012;287(28):23840-23849.
- 23 Starcevic D, Dalal S, Sweasy JB. Is there a link between DNA polymerase beta and cancer? *Cell Cycle*,2004;3(8):998-1001.
- 24 Lang T, Dalal S, Sweasy JB, *et al.* The E295K DNA polymerase beta gastric cancer-associated variant interferes with base excision repair and induces cellular transformation. *Mol Cell Biol*,2007;27(15):5587-5596.

(2012-05-07 收稿,2012-08-31 修回)

编辑 余琳