

细胞衰老过程中 POLD1 基因表达下调的 甲基化调控机制

夏武杰 郑如莲 林维谦 宋 静

摘要 目的 探讨人胚肺二倍体成纤维细胞(2BS)衰老过程中 POLD1 基因表达下降的甲基化调控机制。方法 按传代情况将 2BS 分为年轻细胞组(25PD)、衰老细胞组(55PD)。采用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和蛋白免疫印迹(Western blot)法检测 2BS 衰老过程中 POLD1 mRNA 和蛋白表达水平的变化,利用亚硫酸氢盐修饰后测序法(BSP)分析 2BS 衰老过程中 POLD1 基因启动子区甲基化状态的变化,应用甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-dc)处理 2BS(48PD),RT-PCR 检测处理前后 POLD1 mRNA 表达变化,分析 2BS 衰老过程中 POLD1 基因甲基化及去甲基化对 POLD1 mRNA 表达的影响及二者之间的关系。结果 与年轻细胞组比较,衰老细胞组 POLD1 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$),POLD1 启动子区甲基化水平显著增高($P < 0.01$),且 POLD1 mRNA 表达水平与其启动子区甲基化水平呈负相关($n = 6, r^2 = 0.853, P = 0.009$);经 5-Aza-dc 处理后,POLD1 mRNA 表达水平增高($P < 0.01$)。结论 POLD1 启动子区甲基化水平的改变与其增龄性表达下调存在密切关系。

关键词 甲基化 细胞衰老 基因表达

中图分类号 R34

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.10.031

Downregulation of POLD1 Gene by Promoter Methylation in Cellular Senescence. Xia Wujie, Zheng Rulian, Lin Weiqian, et al. Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Wenzhou Medical University, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To investigate the downregulation of POLD1 gene mediated by promoter methylation and its regulatory mechanism in senescence of human embryonic lung diploid fibroblasts (2BS). **Methods** The 2BS were divided into young cells (25PD) and senescent cells (55PD) according to the age definition in cell culture. The expression levels of POLD1 mRNA and protein were detected by reverse transcription PCR (RT-PCR) and western blot in different groups during cellular senescence of 2BS. Bisulfite sequencing PCR (BSP) was performed to analyze the methylation changes of POLD1 promoter in the process of cellular senescence. The expressions of POLD1 mRNA in 2BS (48PD) before and after treated with methyltransferase inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dc) were analyzed by RT-PCR. The effect of methylation and demethylation on the mRNA expression of POLD1, and the association of mRNA expression of POLD1 were analyzed. **Results** In the process of cellular senescence, the expression levels of POLD1 mRNA and protein were significantly down-regulated in the senescent cells compared with that of young cells ($P < 0.01$), the methylation level of POLD1 promoter was increased with aging ($P < 0.01$). The expression level of POLD1 mRNA was inversely correlated with the methylation level of POLD1 promoter ($n = 6, r^2 = 0.853, P = 0.009$). After treatment with 5-Aza-dc, the expression of POLD1 mRNA was increased ($P < 0.01$). **Conclusion** The change of methylation level in the promoter region of POLD1 is closely related to the downregulation of age-related POLD1 expression.

Key words Methylation; Cellular senescence; Gene expression

衰老是细胞、组织、器官等随着年龄增加,结构和功能出现渐进性退行性改变,最终走向不可逆的死亡过程。既往研究表明,基因组稳定性的维持可能对衰老进程有决定性的影响^[1,2]。在 DNA 修复基因缺失或突变的小鼠模型中,小鼠表现出类似于早衰的表

型。如核苷酸切除修复蛋白 ERCC1 缺失可导致小鼠肝脏、大脑、皮肤和脾脏等组织的衰老^[3,4]。反之,寿命的延长则与 DNA 修复效率提高有关^[5]。POLD1 是人源 DNA 聚合酶 δ 催化亚基的编码基因,在 DNA 损伤修复以及维持基因组结构的完整性和稳定性等方面发挥着重要作用^[6]。近年来研究发现,在阿尔兹海默症患者中 POLD1 表达随着年龄增长逐渐下降,且与病情进展呈正相关,推测 POLD1 可能参与细胞衰老过程^[7]。然而 POLD1 表达下调的机制尚不

基金项目:浙江省温州市科技局医疗科技项目(Y20190575)

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院

通讯作者:宋静,电子信箱:jing_song1983@hotmail.com

清楚。DNA 甲基化是基因表达调控的重要方式之一,它与衰老、肿瘤、遗传疾病等的发生和发展密切相关。本研究中笔者通过检测人胚肺二倍体成纤维细胞(human embryonic lung diploid fibroblasts, 2BS)衰老过程中 POLD1 基因启动子区甲基化状态及 POLD1 mRNA 和蛋白表达水平变化,分析去甲基化对 POLD1 基因表达的影响,探讨 2BS 衰老过程中 POLD1 基因表达的甲基化调控机制。

材料与方法

1. 材料:(1)细胞株:人胚肺二倍体成纤维细胞株(2BS)由北京大学医学部生物化学与分子生物学实验室惠赠。(2)主要试剂:DMEM 培养基、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;RNA 提取及反转录试剂盒、DNA 提取试剂盒和 DNA 重亚硫酸盐转化试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;蛋白提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;全基因组 DNA 甲基化测定试剂盒购自美国 Epigentek 公司;BSP 扩增试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;POLD1 兔抗人单克隆抗体购自英国 Abcam 公司,羊抗兔辣根过氧化物酶抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;5-氮杂-2'-脱氧胞苷购自美国 Sigma 公司;引物由美国 ThermoFisher 公司合成。(3)主要仪器:ABI2720PCR 扩增仪(美国 ABI 公司);CX31-32RFL 型生物显微镜(日本 Olympus 公司);5417 型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

2. 细胞培养:使用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在饱和湿度、37℃、5% CO₂ 通用培养条件下培养 2BS。当细胞融合度约 90% 时,细胞 1:2 传代培养。30 代以下为年轻细胞,55 代及以上为衰老细胞。

3. RT-PCR 检测 POLD1 mRNA 表达:提取 25PD 和 55PD 2BS 总 RNA、第一链 cDNA 的合成,引物序列及产物大小见表 1,以 GAPDH 为内参,PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪下成像,观察 PCR 扩增结果。RT-PCR 反应条件:95℃ 预变性 2min;95℃ 变性 30s,60℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,共 40 个循环;72℃ 延伸 5min。

4. Western blot 法检测 POLD1 蛋白表达:收集 25PD 和 55PD 2BS 提取总蛋白,BCA 法进行蛋白定量,100℃ 煮沸 5min 使蛋白变性后,取 50μg 总蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳,蛋白电泳分离后转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1h,一抗封闭,4℃ 过夜,室温封闭二抗 2h,ECL 显色,观察结果。以 GAPDH 表达为内参,用 Image J 进行相对定量分析。

表 1 PCR 反应引物序列及扩增片段长度

基因	引物序列(5'→3')	长度 (bp)
POLD1	正向引物 CAACCTGGTCACTGCCTCAC	211
	反向引物 GTCCCGCTTCCTCATCTCT	
GAPDH	正向引物 CGAGTCAACGGATTGGTGGTAT	100
	反向引物 AGCCTTCTCCATGGTGAAGAC	

5. DNA 提取与亚硫酸氢盐修饰后测序:提取 25PD 和 55PD 2BS 基因组 DNA,将纯化好的 DNA 溶液,用亚硫酸氢盐 DNA 修饰试剂盒,按照操作手册进行亚硫酸氢钠的转化。将修饰后的样品进行巢式 PCR 扩增,引物见表 2。然后将 PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后回收纯化,连接 T 载体后将阳性克隆的样本送日本 TaKaRa 公司进行测序。RT-PCR 反应条件:95℃ 预变性 5min;95℃ 变性 30s,45℃ 退火 30s,72℃ 延伸 40s,共 35 个循环;72℃ 延伸 5min。

6. 5-Aza-dc 去甲基化处理:以 2×10^5 个/孔的细胞浓度,将 48PD 2BS 接种于 6 孔板中。接种第 2 天起,每 24h 更换培养基为 5μmol/L 5-Aza-dc 的完全 DMEM 培养基。培养 96h 后,收集细胞,提取总 RNA,采用 RT-PCR 检测 POLD1 mRNA 表达水平。

7. 统计学方法:应用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行统计分析。使用独立样本 *t* 检验检测两组数据差异,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,相关性分析采用 Pearson 直线相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 2BS 衰老过程中 POLD1 mRNA 表达水平的变化:采用 RT-PCR 法检测年轻(25PD)和衰老(55PD)2BS POLD1 mRNA 表达情况(图 1)。衰老 2BS POLD1 mRNA 表达水平较年轻 2BS 显著下降($P < 0.01$)。

2. 2BS 衰老过程中 POLD1 蛋白的表达水平的变化:采用 Western blot 法检测年轻(25PD)和衰老(55PD)2BS POLD1 蛋白表达情况(图 2)。衰老 2BS POLD1 蛋白表达水平较年轻 2BS 显著下降($P < 0.01$)。

3. 2BS 衰老过程中 POLD1 基因甲基化状态的变化:通过搜索 UCSC 基因数据库,得到 POLD1 启动子区基因序列,取转录起始位点 -2000bp ~ +300bp 区段序列作为研究对象,采用 MethyPrimer 在线分析软件对 POLD1 启动子区基因序列进行甲基化岛预测分

表 2 BSP 相关引物信息

CpG 岛	引物序列(5'→3')	长度(bp)
1	正向引物 1-1: TGAGTTTAATTTACGTATAGGG	514
	反向引物 1-1: GTACGCCAACACAGTGCTGTC	
	正向引物 2-1: GAGAATAGATTAAGTTAGGATTTTAT	
	反向引物 2-1: TTTAAGTCTCTCAAATCTATATACCTAAC	
2	正向引物 2-1: TTGGGTTGGGTTTTTTAAAG	174
	反向引物 2-1: AAAGTTTGCTAGGCTAGGGG	
	正向引物 2-2: AATACCGACGTCTATCTACT	
	反向引物 2-2: AAATAACCAACCCCTCACTC	
3	正向引物 3-1: AATAGAGGTAATCGTTGGGA	124
	反向引物 3-1: TTTAAGTTGAGGGAATAGTA	
	正向引物 3-2: CCCCAAATAAATACACCTTTA	
	反向引物 3-2: CATCCCTCCATCCAACCCCC	
4	正向引物 4-1: GGTAGGGAACGGGTTTGAG	121
	反向引物 4-1: AGGTATATAGATTTGAGAGA	
	正向引物 4-2: CGAACCACGTCCCGCCCCAC	
	反向引物 4-2: GACGCATACGCCCCCTACCC	

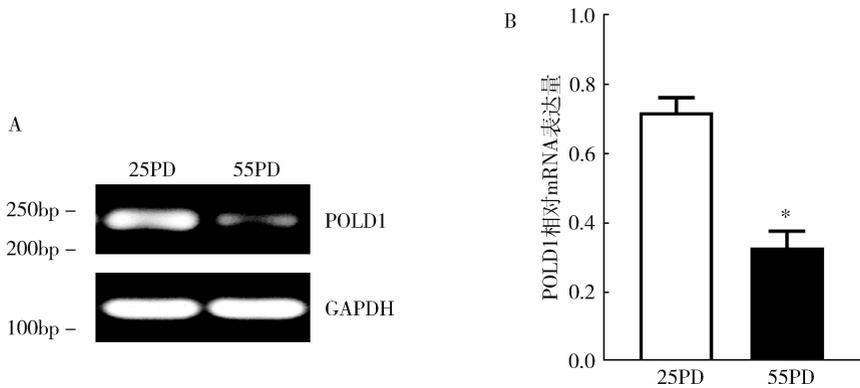


图 1 不同年龄 2BS POLD1 mRNA 表达水平

A. RT-PCR 法检测不同年龄 2BS POLD1 mRNA 表达量; B. 不同年龄 POLD1 相对 mRNA 表达量统计分析结果, * $P < 0.01$

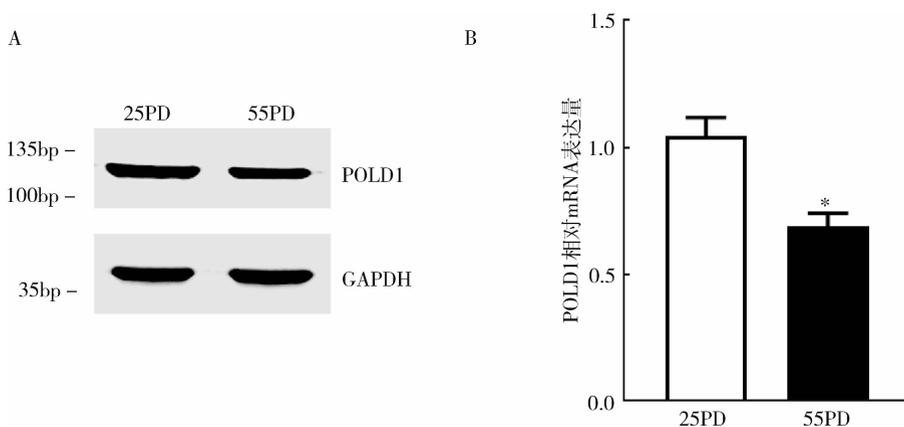


图 2 不同年龄 2BS POLD1 蛋白表达水平

A. Western blot 法检测不同年龄 2BS POLD1 蛋白表达量; B. 不同年龄 POLD1 相对蛋白表达量统计分析结果, * $P < 0.01$

析, POLD1 启动子区存在 4 个 CpG 岛。采用 BSP 法检测年轻 (25PD) 和衰老 (55PD) 2BS POLD1 启动子

区甲基化水平 (图 3)。衰老 2BS POLD1 启动子区甲基化水平较年轻 2BS 显著升高 ($P < 0.01$)。

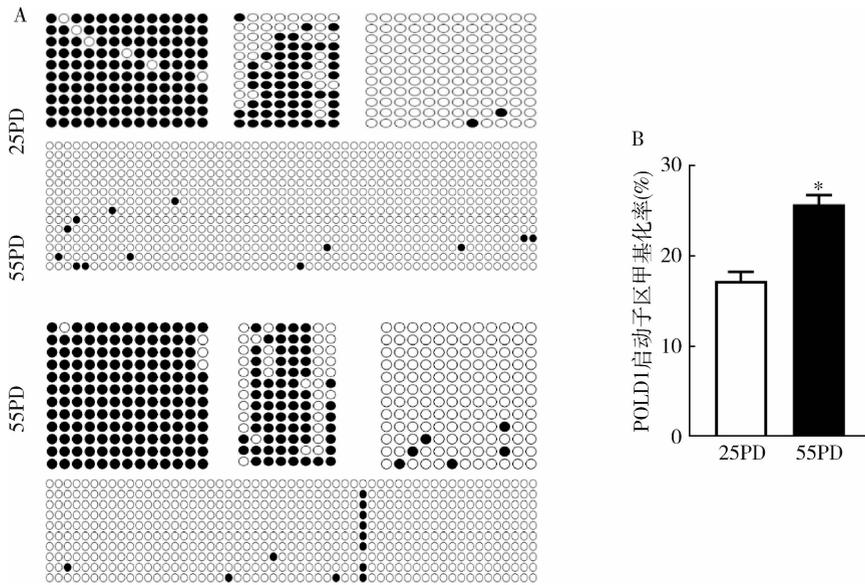


图3 不同代龄 2BS POLD1 启动子区甲基化水平

A. BSP 法检测不同代龄 2BS POLD1 启动子区 CpG 岛的 DNA 甲基化水平；
 B. 不同代龄 POLD1 启动子区甲基化水平统计分析结果，* $P < 0.01$

4. POLD1 mRNA 表达与启动子甲基化的关系：分析年轻和衰老 2BS POLD1 mRNA 表达水平和其启动子甲基化水平相关性(图 4)。POLD1 启动子区甲基化水平与其 mRNA 表达水平呈负相关($n = 6, r^2 = 0.853, P = 0.009$)。为进一步阐明 POLD1 甲基化与其 mRNA 表达水平间的关系,以 $5\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-dc 去甲基化试剂处理 48PD 2BS,采用 RT-PCR 法检测 POLD1 mRNA 表达水平(图 5)。去甲基化试剂处理组 POLD1 表达水平明显增加($P < 0.01$)。

讨 论

POLD1 是 DNA 复制和损伤修复中最重要的基因之一,位于第 19 号染色体 q13.3-q13.4 上,其 cDNA 全长约 3.5kb,编码 1107 个氨基酸^[6]。POLD1 基因

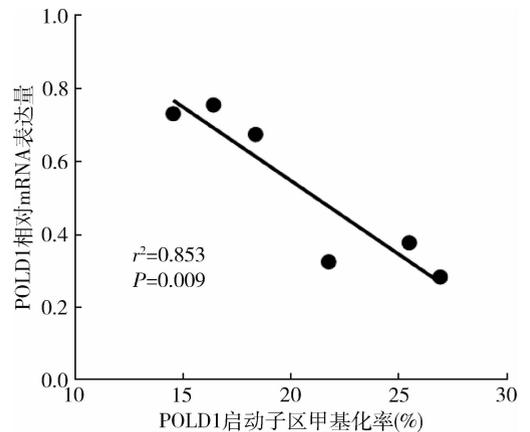


图4 POLD1 启动子区甲基化水平与其 mRNA 表达水平的相关性分析

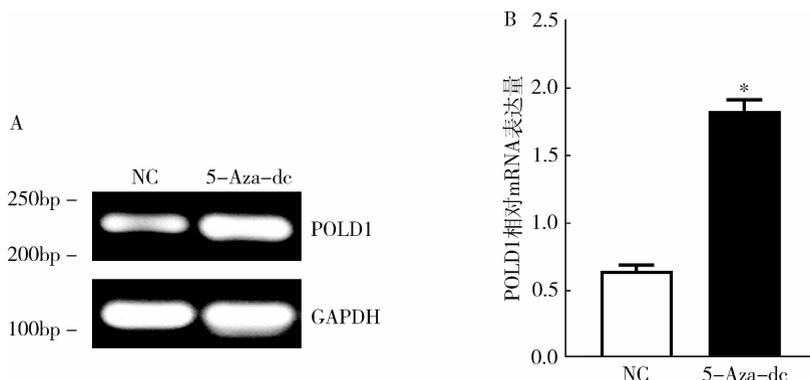


图5 $5\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-dc 处理前后 POLD1 mRNA 表达水平

A. RT-PCR 法检测 $5\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-dc 处理 2BS 前后 POLD1 mRNA 表达量; B. $5\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-dc 处理前后 POLD1 相对 mRNA 表达量统计分析结果。NC. 正常对照组; * $P < 0.01$

缺陷不仅与肿瘤关系密切,也增加早老综合征如沃纳综合征(Werner syndrome)的发生风险^[8-11]。此外,研究发现,下调 POLD1 表达,细胞生长增殖能力显著下降,细胞周期减慢,DNA 合成减低,DNA 损伤明显增加^[12]。动物实验进一步证实,沉默 POLD1 基因表达可导致小鼠神经元细胞发生早衰^[7]。近年来,一些研究者观察到 DNA 损伤修复基因如 BRCA1、BLM 等在衰老过程中表达均有所降低^[13,14]。而本研究结果显示,在 2BS 衰老过程中 POLD1 呈增龄性表达下调,也再次证实了上述观点。

近年来,DNA 甲基化在衰老的发生、发展中的作用越来越受到国内外研究者的重视,成为目前衰老领域研究的热点之一。DNA 甲基化是指 DNA 的 5'-C 胞嘧啶 p 磷酸 G 鸟嘌呤-3'(CpG)双核苷酸位点的胞嘧啶在 DNA 甲基转移酶的催化下,以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,将甲基转移到特定碱基上的化学修饰过程。一般来说,低甲基化可促进基因的表达,而高甲基化则抑制基因表达。体外研究发现,将已甲基化的序列转入细胞后则其表达抑制,而许多内源基因经去甲基化试剂如 5-Aza-dc 处理后可被激活^[15,16]。本研究结果显示,在 2BS 衰老过程中 POLD1 启动子区甲基化水平呈增高趋势,且 POLD1 mRNA 表达水平与其启动子区甲基化水平呈负相关;经 5-Aza-dc 处理后,POLD1 mRNA 表达水平明显增高。POLD1 表达水平与其启动子甲基化水平呈负相关,提示 POLD1 启动子区甲基化水平的改变与其增龄性表达下调有密切关系。

目前研究认为 DNA 甲基化影响基因表达的机制可能是:(1)某些可与 DNA 结合的转录因子对结合位点甲基化较敏感,当该位点处于甲基化状态时,这类转录因子和其他转录相关蛋白无法正确地识别并结合到相应位点从而造成转录抑制。(2)DNA 甲基化后,甲基化 CpG 结合蛋白与甲基化 CpG 残基结合,并与其他转录抑制因子共同抑制基因转录,其介导的转录抑制取决于甲基化密度和启动子强度,低密度甲基化可能抑制弱的启动子,而一个强的启动子可能不受甲基化的影响。(3)具有转录活性的基因序列甲基化后与甲基化 CpG 特异性结合蛋白相结合,使组蛋白脱乙酰化,染色质结构变化致使转录抑制发生^[17,18]。既往研究发现,POLD1 可间接通过 p53、E2F1 和 Sp1 等转录因子调控促进肿瘤的发生和发展,推测 POLD1 启动子区 CpG 位点甲基化可能通过阻碍转录因子与启动子的结合,从而抑制 POLD1 基

因的转录和表达^[19,20]。

综上所述,本研究结果表明,POLD1 启动子区 CpG 岛的 DNA 甲基化水平是细胞衰老的重要特征,较高的甲基化水平参与该基因的表达调控。通过调节 POLD1 启动子区 DNA 甲基化水平,对于衰老和衰老相关疾病的预防和治疗具有一定的启示作用。进一步深入研究 POLD1 启动子区的 DNA 甲基化调控机制,有助于更好地阐释细胞衰老过程中的表观遗传学调控机制。

参考文献

- Edifizi D, Schumacher B. Genome instability in development and aging: insights from nucleotide excision repair in humans, mice, and worms[J]. *Biomolecules*, 2015, 5(3): 1855-1869
- Thurston AK, Radebaugh CA, Almeida AR, et al. Genome instability is promoted by the chromatin-binding protein spn1 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Genetics*, 2018, 210(4): 1227-1237
- Kim DE, Dolle MET, Vermeij WP, et al. Deficiency in the DNA repair protein ERCC1 triggers a link between senescence and apoptosis in human fibroblasts and mouse skin[J]. *Aging Cell*, 2020, 19(3): e13072
- Weeda G, Donker I, de Wit J, et al. Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence[J]. *Curr Biol*, 1997, 7(6): 427-439
- Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, et al. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging[J]. *Cell*, 2008, 135(5): 907-918
- Nicolas E, Golemis EA, Arora S. POLD1: central mediator of DNA replication and repair, and implication in cancer and other pathologies[J]. *Gene*, 2016, 590(1): 128-141
- Gao S, Zhang X, Song Q, et al. POLD1 deficiency is involved in cognitive function impairment in AD patients and SAMP8 mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114: 108833
- Buchanan DD, Stewart JR, Clendenning M, et al. Risk of colorectal cancer for carriers of a germ-line mutation in POLE or POLD1[J]. *Genet Med*, 2018, 20(8): 890-895
- Qin Q, Tan Q, Li J, et al. Elevated expression of POLD1 is associated with poor prognosis in breast cancer[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 5591-5598
- da Silva CM, Shimba D, Oishi D, et al. VUS-type alteration in POLD1 and microsatellite instability in a metastatic luminal B breast cancer patient[J]. *Ecancermedicalscience*, 2020, 14: 1002
- Lessel D, Hisama FM, Szakszon K, et al. POLD1 germline mutations in patients initially diagnosed with werner syndrome[J]. *Human Mutat*, 2015, 36(11): 1070-1079
- Song J, Hong P, Liu C, et al. Human POLD1 modulates cell cycle progression and DNA damage repair[J]. *BMC Biochem*, 2015, 16: 14
- Collin G, Huna A, Warnier M, et al. Transcriptional repression of DNA repair genes is a hallmark and a cause of cellular senescence[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 259