

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18090

低温对斑马鱼 ZF4 细胞基因组 DNA 甲基化水平的影响

侯艳雯, 刘玮, 姜蓬垒, 张俊芳, 韩兵社

1. 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海海洋大学, 上海 201306;
2. 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海海洋大学, 上海 201306;
3. 海洋生物科学国际联合研究中心, 中国科学技术部, 上海海洋大学, 上海 201306

摘要: 低温压力会导致鱼类生理功能失调、机体损伤甚至死亡, 鱼类会产生各种适应性变化来应对低温压力, 其中涉及的表观遗传学机制越来越受到重视。为了探讨鱼类低温应激压力下的表观遗传学调控机制, 本研究对斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎成纤维细胞 ZF4 进行短期低温胁迫(18℃ 处理 3 d、5 d 和 10℃ 处理 3 d、5 d) 和长期低温胁迫(18℃ 处理 30 d), 然后用具有不同甲基化敏感性的同裂酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 对细胞基因组 DNA 进行酶切以监测细胞基因组 DNA 甲基化水平变化。结果显示短期低温胁迫下 ZF4 细胞生长受到抑制甚至死亡, 而经过长期低温胁迫的 ZF4 细胞对低温压力产生了一定适应性。并且低温胁迫下 DNA 甲基化水平呈现动态变化, 短期低温培养细胞的基因组 DNA 甲基化水平明显增高, 但是长期低温培养细胞的 DNA 甲基化水平反而下降。此外, 研究发现抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC) 或者共济失调—毛细血管扩张突变蛋白(ataxia telangiectasia mutated, ATM) 抑制剂 KU-55933 可以抑制 18℃ 5 d 低温处理后的 ZF4 细胞 DNA 甲基化水平的增高, 说明活性氧(reactive oxygen species, ROS) 的产生和 ATM 的激活介导了 DNA 甲基化水平的增高。本研究结果显示, 短期低温刺激下 ZF4 细胞 ROS 的产生导致 DNA 损伤, 激活 DNA 损伤修复机制, 进而导致基因组 DNA 甲基化水平上升, 该研究为后期斑马鱼低温胁迫分子机制的研究奠定基础。

关键词: 斑马鱼 ZF4 细胞; 低温应激; ROS; ATM; DNA 甲基化

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)02-0271-09

DNA 甲基化是发生于 DNA 胞嘧啶第五个碳原子上的一种共价修饰, 作为一种表观遗传标记, DNA 甲基化已经被证明与基因组功能、基因转录以及 X 染色体失活相关^[1-2]。在脊椎动物中, DNA 甲基化主要发生在鸟嘌呤前的胞嘧啶位点上或者在 CpG 岛上, 研究发现在人类和小鼠胚胎干细胞中, DNA 非 CpG 岛区域也存在甲基化修饰, 然而这种非 CpG 位点的甲基化在成熟组织中往往会被丢失^[3]。越来越多的研究发现环境压力能够改变基因组甲基化水平, 如磷饥饿^[4]以及热压力^[5]。在植物中, DNA 甲基化调控胁迫应答基因的表

达使植物适应外界环境变化^[6-7], 在昆虫中研究发现, DNA 甲基化的改变使得昆虫适应温度的变化^[8]。然而, 在鱼类中 DNA 甲基化与冷适应之间的关系尚未研究清楚。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)如超氧阴离子(O_2^-)和过氧化氢(H_2O_2)等, 是需氧细胞在代谢中产生的电子还原产物。在高浓度时, ROS 很容易与蛋白质、脂类、碳水化合物以及核苷酸反应, 这些反应通常包括不可逆的功能的改变, 甚至是彻底的破坏^[9]。已有研究证明, 短期低温压力下斑马鱼 ZF4 细胞中 ROS 水平明显上升并且产

收稿日期: 2018-03-13; 修订日期: 2018-05-17.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372516, 81770165); 上海市自然科学基金项目(13ZR1419500); 上海市教育委员会“东方学者”计划支持项目.

作者简介: 侯艳雯(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学. E-mail: 471708976@qq.com

通信作者: 韩兵社, 副教授, 从事分子生物学研究. E-mail: bs-han@shou.edu.cn

生 DNA 双链断裂^[10]。在植物中研究发现，低温压力下 ROS 作为一种信号分子能激活细胞转录调控从而调控下游基因的表达，最终使得植物适应低温^[11]。在人结肠癌细胞中研究发现 ROS 能在启动子 CpG 岛产生氧化损伤，损伤部位能够募集 DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)等表观酶类^[12]，导致 DNA 发生甲基化，从而抑制下游基因的转录^[13]。ATM 是应答 DNA 双链断裂的一个重要的调控因子，控制着一个复杂的生化网络，能够直接或间接影响 DNA 损伤修复^[14]。研究证明 ROS 能够激活共济失调-毛细血管扩张症突变蛋白(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)^[15]。但是活性氧导致的氧化损伤与低温鱼类细胞甲基化水平改变是否有关尚不明确。

斑马鱼(*Danio rerio*)由于易饲养、繁殖速度快且基因组全序列已经公布成为一种广泛应用于分子生物学、遗传学的模式生物^[16]。斑马鱼成纤维细胞 ZF4 细胞系是来源于发育 1 d 的斑马鱼胚胎，常用于研究硬骨鱼类冷适应过程中基因表达调控^[17]以及甲基化水平变化^[18]。本研究探究了不同时间点(3 d、5 d 和 30 d)，和不同温度条件下(18℃ 和 10℃)，斑马鱼 ZF4 细胞 DNA 甲基化水平变化及其与低温下氧化损伤之间的关系，为后期斑马鱼细胞低温胁迫分子机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞

斑马鱼胚胎成纤维细胞 ZF4 购于 American Type Culture Collection (ATCC)，采用 DMEM/F-12 培养基[(含 2.50 mmol/L 谷氨酰胺(Hyclone)、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 mg/mL)(Hyclone)、10%的胎牛血清(Gibco)]，于 28℃、95%湿度、5%CO₂ 的培养箱中进行培养。每隔 2 d 换液，当细胞长至 90%用不含有 EDTA 的 0.25%胰蛋白酶(Gibco)进行消化，1:2 传代后加入培养基继续培养，实验所用的细胞均为 4~6 代。

1.2 试剂和仪器

DMEM/F-12 液体培养基(Hyclone, SH30023.01B)、胎牛血清和胰蛋白酶购于 Gibco 公司；谷氨酰胺 L-glutamine (Hyclone, SH30034.01)

和杜氏磷酸缓冲液 DPBS 购于 Thermo 公司；KU-55933 和二甲基亚砜 DMSO 购于 Sigma 公司；限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hpa* II 购于 NEB 公司；甲基化检测试剂盒 5-mC DNA ELISA Kit (D5325) 购于 Zymo Research 公司；其他常用试剂均为国产分析纯。

主要仪器：倒置荧光显微镜(Zeiss)、细胞低温培养箱(Galaxy170R, Eppendorf)、多功能酶标仪(BioTek)、电泳仪(Bio-Rad)。

1.3 细胞低温及药物处理

1.3.1 细胞低温处理 取生长状态良好的野生型 ZF4 细胞，实验前 1 d 按汇合度 70% 接种于 100 mm 培养皿中，28℃ 培养 24 h 后，将细胞放到低温培养箱中，18℃ 低温培养 3 d、5 d、30 d，10℃ 低温培养 3 d、5 d。利用倒置显微镜观察细胞形态并拍照。

1.3.2 N-乙酰半胱氨酸(NAC)处理细胞 取对数期 ZF4 细胞提前 1 d 接种至 100 mm 培养皿中，28℃ 培养 24 h，待汇合度至 70%~90%，加入终浓度 2 mmol/L 的 NAC 于 28℃ 预处理 2 h 后放到低温培养箱，18℃ 处理 3 d、5 d，每天都需要补充 NAC。

1.3.3 KU-55933 处理细胞 取对数期 ZF4 细胞提前 1 d 接种至 100 mm 培养皿中，28℃ 培养 24 h，待汇合度至 70%~90%，参照 Chwastek 等^[19]的研究结果，选取终浓度为 1 μmol/L 和 10 μmol/L 的 KU-55933 于 28℃ 预处理 1 h 后放到低温培养箱 18℃ 处理 3 d、5 d，每天都需要补充 KU-55933。

1.4 细胞浓度与比生长速率测定

28℃ 培养的细胞分为两组，接种于 12 孔板中，24 h 后一组置于 28℃ 培养作为常温对照组，另一组置于 18℃ 培养 7 d 作为 18℃ 短期培养组；另外将 18℃ 低温驯化 30 d 的细胞也接种至 12 孔板中，24 h 后置于 18℃ 培养箱中培养 7 d 作为 18℃ 长期培养组。每天将细胞用胰酶消化收集，用磷酸缓冲液(PBS)稀释至适当浓度，加入 0.4%(wt/v)台盼蓝进行活细胞染色，吹打均匀后用血球计数板进行计数。

1.5 限制性内切酶检测 DNA 甲基化水平

利用两种限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hpa* II 对基因组 DNA 进行酶切, *Msp* I 和 *Hpa* II DNA 识别位点都是 CCGG, 但是具有不同的甲基化敏感性: *Hpa* II 不能对发生甲基化的 DNA 进行酶切而 *Msp* I 可以。用酚氯仿法提取出细胞基因组 DNA, 取 1 μg 基因组 DNA, 分别用 *Msp* I 和 *Hpa* II 于 37°C 水浴锅中酶切过夜。酶切后的 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。利用灰度分析软件, 通过比较 *Hpa* II / *Msp* I 的比值分析各个样品间的相对甲基化水平^[20]。

1.6 酶联免疫吸附剂测定 DNA 甲基化水平

利用酚氯仿法提取细胞基因组 DNA, 后按照 Zymo Research 公司的 5-mC DNA ELISA 试剂盒 (5-mC DNA ELISA Kit, D5325, Zymo Research) 说明书检测基因组 DNA 甲基化水平。

1.7 数据统计分析

比生长速率(μ)通过以下公式计算:

$$\mu = \frac{1}{C_v} \times \frac{dC_v}{dt}$$

其中, C_v 为活细胞密度(10^6 cells/mL), t 为培养时间(day)。

所有实验结果均是来自至少 3 次独立实验, 图中所示结果均为均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)。t-test 法用于检测低温处理的显著性, 两两之间的显著差异($P < 0.05$)利用 Turkey's 多重比较来检测。

2 结果与分析

2.1 细胞低温处理后形态以及比生长率变化

用倒置相差显微镜观察细胞可以发现, 在正常培养温度下(28°C)ZF4 细胞呈不规则三角形, 细胞核为卵圆形, 胞质突起, 细胞边缘清晰。在 18°C 低温处理 5 d 后, 细胞形态无显著变化, 有少量细胞脱落。在 18°C 低温处理 30 d 后, 可以看见细胞边缘模糊, 大部分细胞不再是不规则三角形, 细胞核形态不规则。在 10°C 处理 3 d 后, ZF4 细胞形状从不规则三角形收缩为长条状, 细胞间空隙变大, 部分细胞死亡。而在 10°C 处理 5 d 后, 细胞大量死亡漂浮在培养基中(图 1a)。

对低温 18°C 下细胞进行比生长速率测定发现,

28°C 细胞以及 18°C 下处理 30 d 的细胞在接种后 4~5 d 都能达到最大比生长速率, 分别为 0.568 和 0.355。而 18°C 下短期处理的细胞贴壁后第 1 天有部分细胞死亡, 比生长速率为负, 之后的第 2~7 天比生长速率也较低, 在 0.06 左右。并且从图中可以看出, 相同时间点下, 18°C 长期培养的细胞的比生长速率显著高于 18°C 短期培养组($P < 0.05$) (图 1b)。

2.2 短期低温下基因组 DNA 甲基化水平上升

与 28°C 下培养的细胞相比, 无论是在 18°C 还是 10°C, 短期低温压力都能导致细胞基因组甲基化水平上升, 而在 18°C 低温处理 30 d 后, 细胞基因组甲基化水平明显下降($P < 0.05$)(图 2a、图 2b)。用 5-mC DNA ELISA 试剂盒检测同样证明相比于对照组(28°C), 18°C 处理 5 d 细胞其 DNA 甲基化水平上升而 18°C 处理 30 d 细胞的 DNA 甲基化水平下降(图 2c)。

2.3 短期低温下细胞甲基化水平上升与活性氧产生相关

前期研究已经证明低温能够诱导斑马鱼 ZF4 细胞产生活性氧, 并且在低温(10°C 和 18°C)处理 5 d 时 ROS 水平上升最为显著。为了证明短期低温下基因组 DNA 甲基化水平上升与 ROS 有关, 本研究用抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对低温处理的细胞进行预处理。从图中可以看出, 相对于未预处理 NAC 的细胞, 预处理 NAC 后细胞的甲基化水平显著下降($P < 0.05$)(图 3a、图 3b)。用 5-mC DNA ELISA 试剂盒检测同样也可以发现, 相对于未用 NAC 预处理的 18°C 5 d 细胞, 预处理 NAC 后, DNA 甲基化水平明显下降(图 3c)。这说明短期低温压力下细胞内 DNA 甲基化水平上升与活性氧产生相关。

2.4 短期低温下细胞甲基化水平上升与 DNA 损伤修复相关

共济失调-毛细血管扩张突变蛋白(ATM)属于磷脂酰肌醇-3-激酶相关激酶家族, 是 DNA 损伤的感应器。ATM 能够将 DNA 损伤信息传递到下游修复蛋白, 从而启动 DNA 修复机制, 维持细胞基因组的完整性。为了探究短期低温下 DNA 甲基化与 DNA 损伤修复的直接关系, 在细胞低

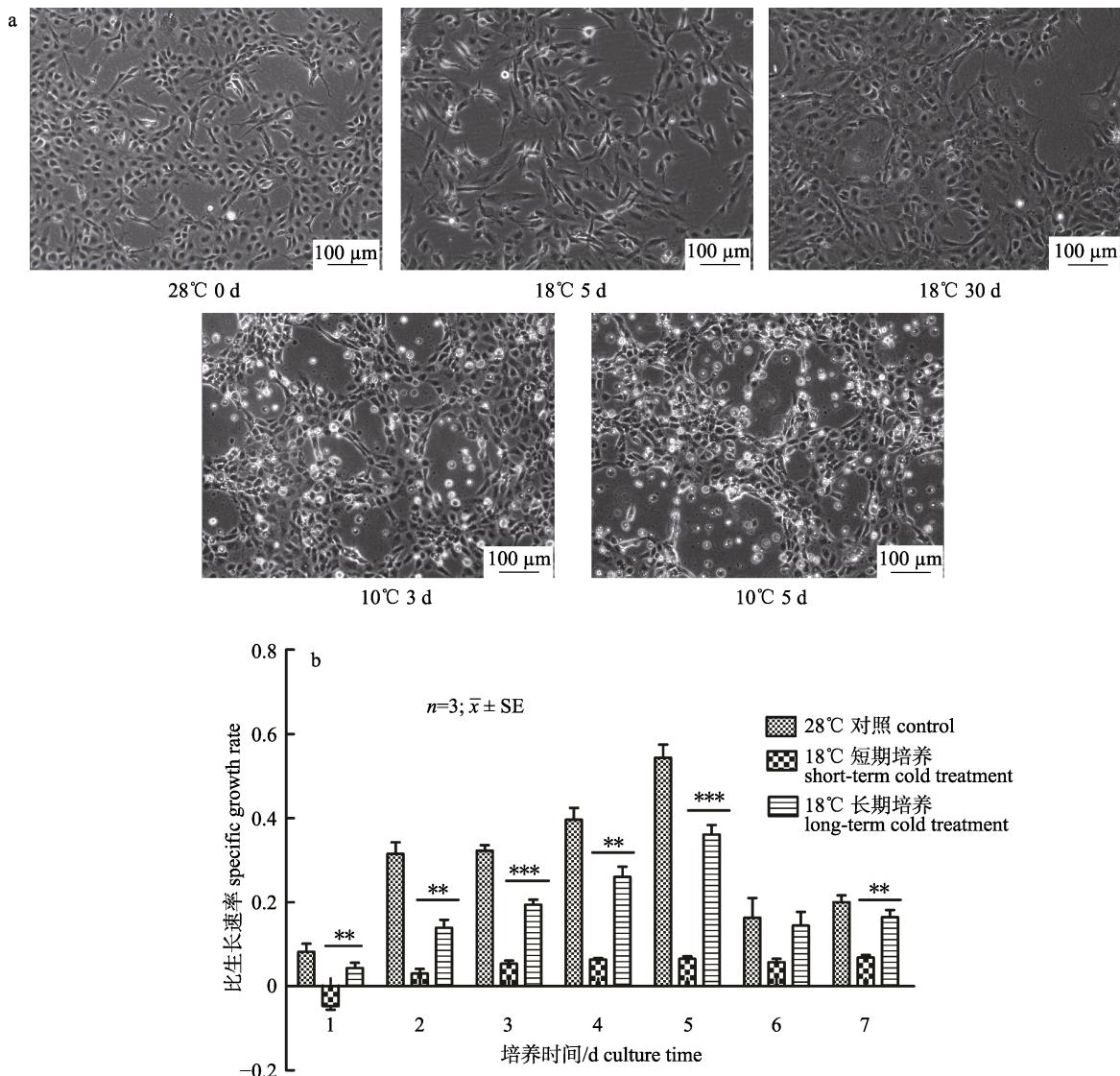


图 1 细胞在不同温度和时间点下细胞形态图以及比生长速率

- a. 细胞在常温 28℃、低温 18℃ 处理 5 d、30 d 以及低温 10℃ 处理 3 d、5 d 的细胞形态图;
 b. 细胞在常温(28℃)培养以及短期和长期低温(18℃)培养下的比生长速率。*表示短期培养组与长期培养组相比差异显著, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$ 。

Fig. 1 Cell morphology and specific growth rate at different temperatures and time points

- a. The cellular morphology at normal temperature (28°C), low temperature (18°C) for 5 d, 30 d, and 10°C for 3 d, 5 d.
 b. Changes of specific growth rate (μ) of cells cultured at normal temperature (28°C) or low temperature (18°C) for short and long periods. * denotes significant differences between short-term cold treatment group and long-term cold treatment group; *means $P<0.05$; ** means $P<0.01$; *** means $P<0.001$.

温处理前用一种特异的 ATM 抑制剂 KU-55933 对细胞进行预处理。从图中可以看出, 短期低温胁迫下(18°C 5 d), 相对于没有用 KU-55933 进行预处理的细胞, 预处理 $1 \mu\text{mol/L}$ KU-55933 后, 细胞内 DNA 甲基化水平显著降低($P<0.05$)(图 4a、图 4b), 另外使用 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 KU-55933 处理与 $1 \mu\text{mol/L}$ 相比 DNA 甲基化水平没有显著差异,

说明对于 ZF4 细胞系 $1 \mu\text{mol/L}$ KU-55933 即可有效抑制 ATM(图 4a)。同样地, 用 5-mC DNA ELISA 试剂盒检测发现, 同样实验温度和时间点下, 预处理 KU-55933 的细胞 DNA 甲基化水平相比于对照组明显下降(图 4c)。这说明了短期低温压力下细胞内甲基化水平上升与 DNA 损伤修复相关。

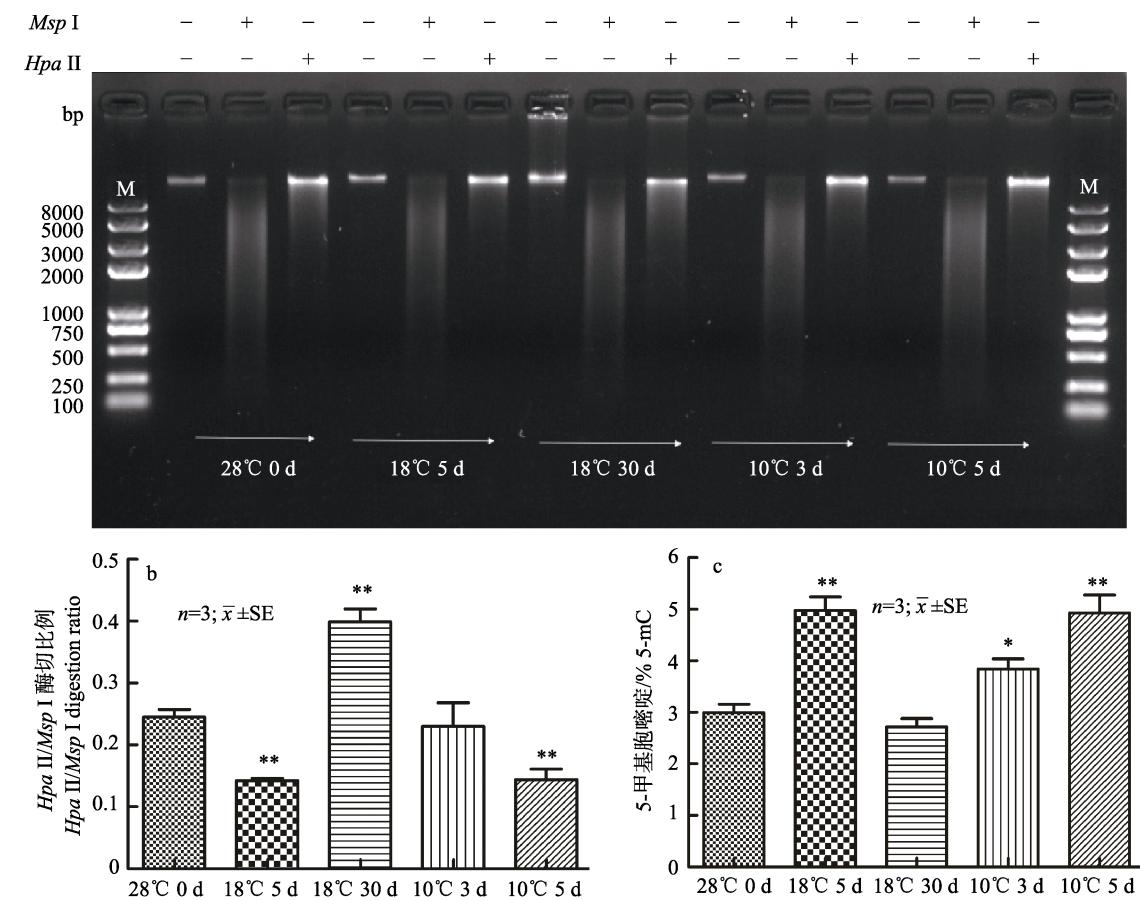


图2 不同温度条件下DNA甲基化水平变化

- a. 各个温度和时间点下限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hpa* II 酶切电泳图; M: Trans 2K® Plus II DNA Ladder;
 b. 各个温度和时间点下, DNA 甲基化水平量化为甲基化敏感酶 *Hpa* II 相对于甲基化不敏感同裂酶 *Msp* I 酶切比例;
 c. 不同实验条件下, 利用 5-mC 甲基化试剂盒检测 DNA 甲基化水平变化. *表示低温处理组(18°C 5 d, 18°C 30 d, 10°C 3 d, 10°C 5 d)与对照组(28°C)相比差异显著, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$.

Fig. 2 Changes of DNA methylation level at different temperatures

a. Electrophoretogram of digestion of genomic DNA with restriction endonucleases *Msp* I and *Hpa* II; M: Trans 2K® Plus II DNA Ladder; b. For ZF4 cells under different temperatures and time points, DNA methylation levels are quantified as the relative amount of DNA digestion by the methylation-sensitive enzyme *Hpa* II relative to its methylation-insensitive isoschizomer *Msp* I. c. Using 5-mC methylation kit to detect intracellular DNA methylation levels under different experimental conditions. *denotes significant differences between low temperature treatment groups (18°C 5 d, 18°C 30 d, 10°C 3 d, 10°C 5 d) and the control group (28°C);

*means $P<0.05$; ** means $P<0.01$; *** means $P<0.001$.

3 讨论

之前研究中, 研究者们对斑马鱼实施 18°C^[21]、12°C^[22]或者 10°C^[23]等的低温胁迫, 进而研究鱼类中一些与温度耐受相关基因的表达。许琼琼等^[10]分别在 18°C 和 10°C 下处理斑马鱼细胞 1 d、3 d 和 5 d 发现低温胁迫能够诱导斑马鱼细胞 ROS 产生。另外, Han 等^[18]发现, 斑马鱼细胞在 18°C 短期培养下 DNA 甲基化水平上升, 而 18°C 长期培养下 DNA 甲基化水平下降。已有研究证实, ROS

能够诱导 DNA 损伤进而发生 DNA 甲基化^[13]。因此, 本研究参照之前的研究体系^[17], 选取了 18°C 和 10°C 这两个温度点对斑马鱼细胞进行低温处理, 探究低温下 DNA 甲基化水平上升与 ROS 产生之间的联系。18°C 和 10°C 这两个温度点能够典型的反映出斑马鱼 ZF4 细胞在低温胁迫下的生理状态: 斑马鱼 ZF4 细胞在 18°C 低温胁迫下能够很好地适应, 而在 10°C 下培养 5 d 后有大多数细胞死亡漂浮在培养基中(图 1a)。并且, 计算斑马鱼细胞在 18°C 下比生长速率可以发现, 在 18°C 长期培养的

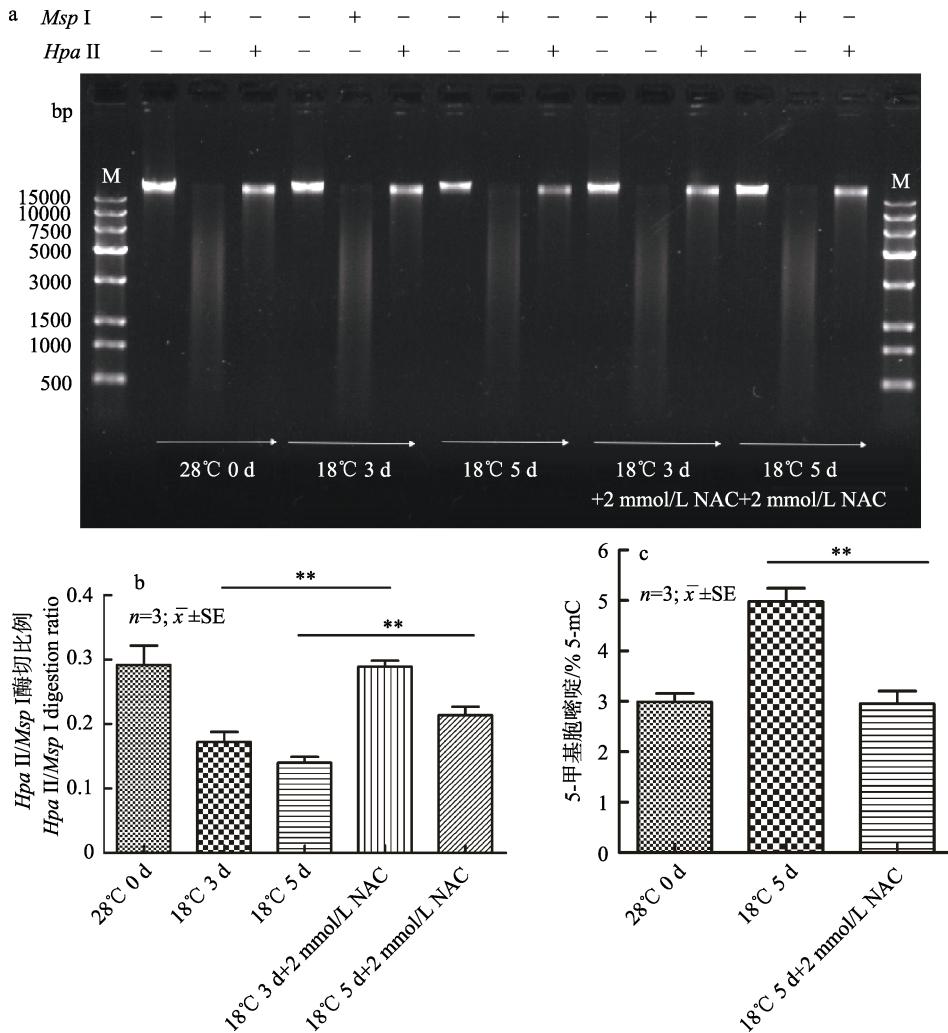


图 3 短期低温下 NAC 预处理后 DNA 甲基化水平变化

a. 不同实验条件下限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hpa* II 酶切电泳图; M: Trans 15K DNA Marker; b. 不同实验条件下, 甲基化敏感酶 *Hpa* II 相对于甲基化不敏感同裂酶 *Msp* I 酶切比例; c. 不同实验条件下, 利用 5-mC 甲基化试剂盒检测 DNA 甲基化水平变化。
*表示低温处理加药组与未加药组相比差异显著, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$.

Fig. 3 NAC pretreatment inhibited DNA methylation induced under short-term cold stress

a. Electrophoretogram of digestion of genomic DNA with restriction endonucleases *Msp* I and *Hpa* II; M: Trans 15K DNA Marker; b. For ZF4 cells under different experimental conditions, DNA methylation levels are quantified as the relative amount of DNA digestion by the methylation-sensitive enzyme *Hpa* II relative to its methylation-insensitive isoschizomer *Msp* I; c. Using 5-mC methylation kit to detect intracellular DNA methylation levels under different experimental conditions. *denotes significant differences between the drug treatment group and the untreated group under short-term cold stress; *means $P<0.05$; **means $P<0.01$; ***means $P<0.001$.

细胞的比生长速率远远高于短期培养的细胞(图 1b), 反映出在 18℃长期培养过程中, 细胞表现出对外界低温压力的适应性。

利用限制性内切酶对DNA进行酶切发现, 相对于 28℃培养的细胞, 18℃处理 5 d 的细胞 DNA 甲基化水平明显上升, 而 18℃处理 30 d 的细胞 DNA 甲基化水平反而下降(图 2), 这些都说明斑马鱼细胞在 18℃下培养时存在一个低温适应的过程。

并且 DNA 甲基化可能参与了细胞低温适应过程。为研究低温胁迫下 DNA 甲基化与 ROS 之间的关系, 利用 ROS 抑制剂 NAC 对细胞进行预处理, 发现短期低温压力下抑制了 ROS 产生的同时 DNA 甲基化水平也会相应降低(图 3), 这说明了在斑马鱼低温适应过程中 DNA 甲基化水平的升高和 ROS 产生密切相关。

ATM 是作为直接感受 DNA 双链断裂损伤并

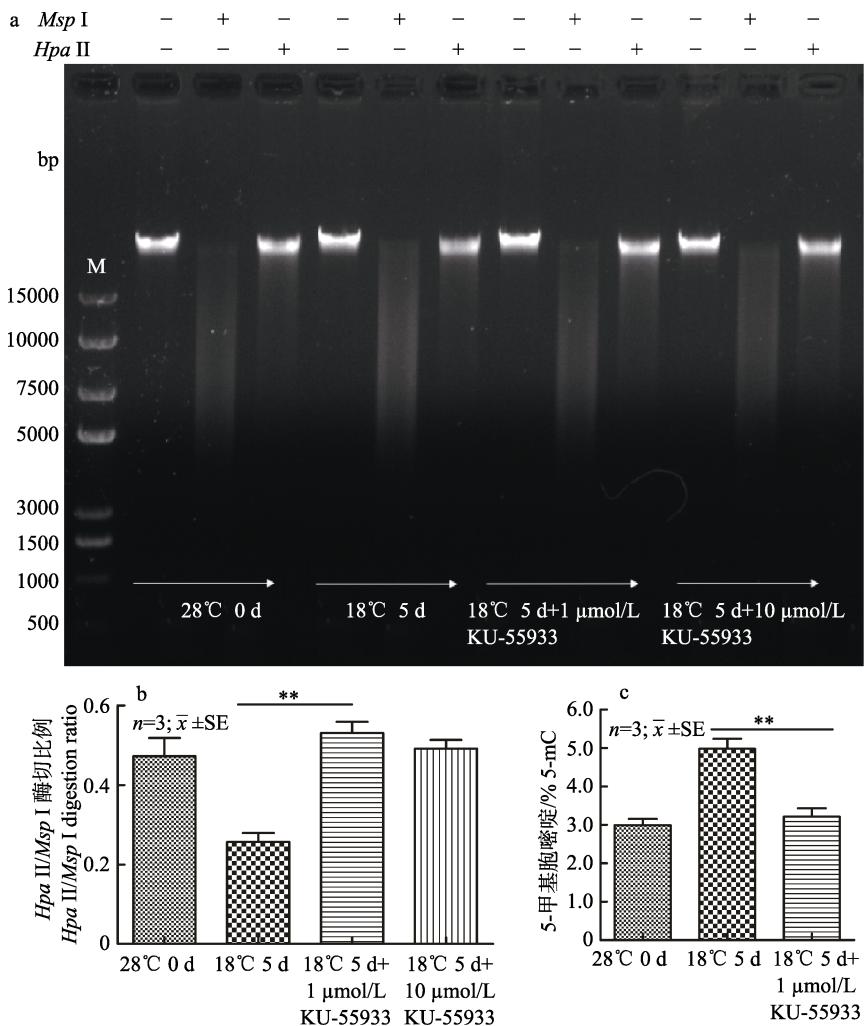


图4 短期低温下KU-55933预处理后细胞内DNA甲基化水平变化

a. 不同实验条件下限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hpa* II 酶切电泳图; M: Trans 15K DNA Marker; b. 不同实验条件下, 甲基化敏感酶 *Hpa* II 相对于甲基化不敏感同裂酶 *Msp* I 酶切比例; c. 不同实验条件下, 利用 5-mC 甲基化试剂盒检测 DNA 甲基化水平变化。* 表示短期低温胁迫下, 加药组与未加药组相比差异显著, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$ 。

Fig. 4 Changes of DNA methylation level of KU-55933 pretreatment under short-term low temperature stress

a. Electrophoretogram of digestion of genomic DNA with restriction endonucleases *Msp* I and *Hpa* II; M: Trans 15K DNA Marker; b: For ZF4 cells under different experimental conditions, DNA methylation levels are quantified as the relative amount of DNA digestion by the methylation-sensitive enzyme *Hpa* II relative to its methylation-insensitive isoschizomer *Msp* I; c. Using 5-mC methylation kit to detect intracellular DNA methylation levels under different experimental conditions. *denotes significant differences between the drug treatment group and the untreated group under short-term cold stress; * means $P<0.05$; ** means $P<0.01$; *** means $P<0.001$.

起始诸多DNA损伤信号反应通路的主开关分子, 调控了DNA损伤修复过程中一系列信号通路。有研究发现ROS能够激活ATM^[15], 而ATM能够通过调控视网膜母细胞瘤肿瘤抑制基因(Rb)从而引起DNA甲基化^[24]。同样在斑马鱼ZF4细胞中, 研究发现短期低温压力下利用KU-55933抑制ATM后, DNA甲基化水平出现下降(图4), 这说明短期低温压力下细胞内甲基化水平上升与DNA损伤修复相关。另外, 利用5-mC DNA甲基

化试剂盒重复上述研究得出的结果与 *Msp* I / *Hpa* II 酶切法相同, 说明研究结果可靠。有研究推测, 在DNA修复期间, DNA甲基化水平的变化有利于稳定染色体抑制性标记如组蛋白修饰H3K9me2/3以及导致染色质的浓缩, 在DNA损伤修复期间抑制基因的表达, 起到稳定基因组的作用^[25]。综合以上发现, 推测短期低温胁迫下, 由于活性氧的产生导致DNA损伤, DNA损伤激活了DNA损伤修复机制, 进一步导致了DNA甲基

化水平上升,从而可能对ZF4 细胞基因组起到稳定作用。而这其中所涉及的ROS 通路和ATM 信号通路仍有待进一步研究。

综上所述,本研究通过对斑马鱼细胞进行低温胁迫,研究不同温度和时间点下斑马鱼细胞DNA 甲基化水平的变化,发现细胞在短期低温胁迫下 DNA 甲基化水平上升,而细胞长期在低温下培养后 DNA 甲基化水平下降。并且短期低温胁迫下 DNA 甲基化水平上升与 ROS 产生以及DNA 损伤修复有关,为后期斑马鱼细胞低温胁迫分子机制的研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Singer-Sam J, Riggs A D. DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance[M]. New York: Springer-Verlag, 1993: 358-384.
- [2] Attwood J T, Yung R L, Richardson B C. DNA methylation and the regulation of gene transcription[J]. Cell and Molecular Life Science, 2002, 59(2): 241-257.
- [3] Lister R, Pelizzola M, Dowen R H, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences[J]. Nature, 2009, 462(7271): 315-322.
- [4] Secco D, Wang C, Shou H X, et al. Stress induced gene expression drives transient DNA methylation changes at adjacent repetitive elements[J]. eLife, 2015, 4: e09343.
- [5] Kisliouk T, Cramer T, Meiri N. Methyl CpG level at distal part of heat-shock protein promoter HSP70 exhibits epigenetic memory for heat stress by modulating recruitment of POU2F1-associated nucleosome-remodeling deacetylase (NuRD) complex[J]. Journal of Neurochemistry 2017, 141(3): 358-372.
- [6] Wang M, Qin L M, Xie C, et al. Induced and constitutive DNA methylation in a salinity-tolerant wheat introgression line[J]. Plant and Cell Physiology, 2014, 55(7): 1354-1365.
- [7] Pecinka A, Dinh H Q, Baubec T, et al. Epigenetic regulation of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2010, 22(9): 3118-3129.
- [8] Dai T M, Lü Z C, Wang Y S, et al. Molecular characterizations of DNA methyltransferase 3 and its roles in temperature tolerance in the whitefly, *Bemisia tabaci* Mediterranean[J]. Insect Molecular Biology, 2018, 27(1): 123-132.
- [9] Hernández J A, Ferrer M A, Jiménez A, et al. Antioxidant systems and O₂⁻/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins[J]. Plant Physiology, 2001, 127(3): 817-831.
- [10] Xu Q Q, Han B S, Luo J T, et al. Effects of cold stress on ROS production and expression of MAPK proteins in zebrafish ZF4 cells[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(4): 771-776. [许琼琼, 韩兵社, 罗军涛, 等. 低温胁迫诱导斑马鱼 ZF4 细胞 ROS 及 MAPK 相关蛋白表达的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 771-776].
- [11] Liu H, Ouyang B, Zhang J H, et al. Differential modulation of photosynthesis, signaling, and transcriptional regulation between tolerant and sensitive tomato genotypes under cold stress[J]. PLOS ONE, 2012, 7(11): e50785.
- [12] Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, et al. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(25): 8905-8909.
- [13] Ding N, Bonham E M, Hannon B E, et al. Mismatch repair proteins recruit DNA methyltransferase 1 to sites of oxidative DNA damage[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2016, 8(3): 244-254.
- [14] Berger N D, Stanley F K T, Moore S, et al. ATM-dependent pathways of chromatin remodelling and oxidative DNA damage responses[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 2017, 372(1731): 20160283.
- [15] Guo Z, Kozlov S, Lavin M F, et al. ATM activation by oxidative stress[J]. Science, 2010, 330(6003): 517-521.
- [16] Howe K, Clark M D, Torroja C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. Nature, 2013, 496(7446): 498-503.
- [17] Hu P, Liu M L, Zhang D, et al. Global identification of the genetic networks and cis-regulatory elements of the cold response in zebrafish[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(19): 9198-9213.
- [18] Han B S, Li W H, Chen Z Z, et al. Variation of DNA methylome of zebrafish cells under cold pressure[J]. PLoS ONE, 2016, 11(8): e0160358.
- [19] Chwastek J, Jantas D, Lasoń W. The ATM kinase inhibitor KU-55933 provides neuroprotection against hydrogen peroxide-induced cell damage via a γH2AX/p-p53/caspase-3-independent mechanism: Inhibition of calpain and cathepsin D[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2017, 87: 38-53.
- [20] Ugarte F, Sousae R, Cinquin B, et al. Progressive chromatin condensation and H3K9 methylation regulate the differentiation of embryonic and hematopoietic stem cells[J]. Stem Cell Reports, 2015, 5(5): 728-740.
- [21] Wang G F, Kang N, Gong H M, et al. Upregulation of uncoupling protein Ucp2 through acute cold exposure increases post-thaw sperm quality in zebrafish[J]. Cryobiology, 2015,

- 71(3): 464-471.
- [22] Wu S M, Liu J H, Shu L H, et al. Anti-oxidative responses of zebrafish (*Danio rerio*) gill, liver and brain tissues upon acute cold shock[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2015, 187: 202-213.
- [23] Chen S E, Yu M C, Chu X, et al. Cold-induced retrotransposition of fish LINEs[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2017, 44(8): 385-394.
- [24] Shamma A, Suzuki M, Hayashi N, et al. ATM mediates pRB function to control DNMT1 protein stability and DNA methylation[J]. Molecular and Cellular Biology, 2013, 33(16): 3113-3124.
- [25] Russo G, Landi R, Pezone A, et al. DNA damage and Repair Modify DNA methylation and Chromatin Domain of the Targeted Locus: Mechanism of allele methylation polymorphism[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 33222.

Effect of cold stress on genomic DNA methylation in zebrafish ZF4 cells

HOU Yanwen, LIU Wei, JIANG Penglei, ZHANG Junfang, HAN Bingshe

1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. International Research Center for Marine Biosciences at Shanghai Ocean University, Ministry of Science and Technology, Shanghai 201306, China.

Abstract: Cold stress causes physiological dysfunction, tissue damage, and finally death in fishes, and increasing studies have suggested that epigenetic mechanisms play essential roles in the cold stress response in fishes. Our previous study showed that cold stress induced the production of reactive oxygen species (ROS) in zebrafish *Danio rerio*-derived ZF4 cells in a temperature and time-dependent manner and that the genomic DNA methylation level was increased under short-term (18°C for 5 days) cold exposure and decreased under long-term cold exposure (18°C for 30 days). However, the relationship among DNA methylation, ROS production, and cold acclimation in fishes remains poorly understood. In the present study, zebrafish ZF4 cells were exposed to short-term (18°C or 10°C, for 3 or 5 days) and long-term (18°C for 30 days) cold stress, and then the global DNA methylation level was detected by digestion with the methylation-sensitive enzyme *Hpa*II and its methylation-insensitive isoschizomer *Msp*I. The results showed that short-term cold stress caused remarkable growth arrest and cell death in ZF4 cells, and cold acclimation was observed under long-term cold stress. Additionally, global DNA methylation increased remarkably under short-term cold stress ($P < 0.05$) but decreased under long-term cold stress ($P < 0.05$). Co-treatment of ZF4 cells with *N*-acetylcysteine inhibited global DNA methylation induced by short-term cold stress ($P < 0.05$), suggesting that ROS affects short-term cold stress-induced global DNA methylation levels. Co-treatment of ZF4 cells with the ataxia telangiectasia mutated (ATM) inhibitor KU-55933 also inhibited the induction of global DNA methylation under short-term cold exposure, indicating the involvement of DNA damage repair pathways in this process. Our data indicate that short-term cold stress resulted in ROS production and ataxia telangiectasia mutated activation, which then up-regulated global DNA methylation in ZF4 cells. The present study improves our understanding of the role of DNA methylation under cold stress in fishes.

Key words: *Danio rerio* ZF4 cells; cold stress; reactive oxygen species; ataxia telangiectasia mutated; DNA methylation

Corresponding author: HAN Bingshe. E-mail: bs-han@shou.edu.cn