



论文

污染水产去甲基化表观遗传毒性 EGFP 评价方法

王先良^{①*}, 满江红^{①②}, 王春辉^②, 江艳^③, 王小利^④, 杨怡姝^④, 王菲菲^①, 赵秀阁^①, 李琴^①, 段小丽^①, 张衍燊^①, 张金良^①

① 环境基准与风险评估国家重点实验室; 中国环境科学研究院, 北京 100012

② 安徽医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生系, 合肥 230032

③ 厦门大学海洋与环境学院, 厦门 361005

④ 北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100124

*通讯作者, E-mail: xlwang@craes.org.cn

收稿日期: 2011-01-27; 接受日期: 2011-03-24

doi: 10.1360/032011-75

摘要 pEGFP-C3 质粒经过体外人工甲基化处理后, 被转染进入 HepG2 细胞以构建重组细胞株. 以 5-AZA 为阳性去甲基化毒物与重组细胞共培养, 通过亚硫酸氢钠测序法定量检测 EGFP 基因启动子区甲基化状态, 通过实时定量 PCR 检测 EGFP 基因表达, 借助流式细胞术和荧光摄片定量检测共培养细胞的绿色荧光强度, 在 DNA 甲基化、EGFP 基因 mRNA 表达、GFP 蛋白等多个层次研究 5-AZA 染毒处理与其去甲基化能力和荧光表达改变的响应关系. 对天津污染水产的去甲基化能力进行了实际样品测试. 结果表明, 5-AZA 与重组细胞的 DNA 甲基化、基因表达、蛋白产物变化之间存在显著关联, 具有较低的检出浓度和良好的重复性. 天津污染海域的水产去甲基化能力较强. 本文初步建立了一种污染物去甲基化表观遗传毒性评价方法.

关键词去甲基化
表观遗传毒性
评价载体
EGFP
污染物

1 引言

安全性评价是化合物使用前必不可少的环节. 相当多的通过现有安全性评价检测的污染物, 可以通过影响 DNA 甲基化等表观遗传机制导致生物性状的长期轻微变化, 却没有被发现可以导致基因突变、染色体畸变等遗传学损伤. 当一种化合物可以导致人类受体 DNA 中基因启动子区甲基化水平等化学修饰改变, 但不伴有基因突变等其他遗传物质损伤时, 就可以被认为是一种表观遗传毒物^[1]. 砷暴露并不导致受体基因突变等直接的遗传物质损伤, 研究发现, 长期低浓度的砷暴露所致健康损害与其导致受体遗传物质 DNA 去甲基化等表观遗传机制有密切关系^[2], 微量的砷暴露可以导致 p15 启动子区甲基化水平显

著降低^[3]. 一种人类常用的合成香料二氢香豆素 (Dihydrocoumarin), 通过作用于机体的表观遗传调控系统, 使细胞凋亡水平上升为正常水平的 3 倍^[4]. 另外, 镍^[5]和二乙基己烯雌酚^[6]等污染物的毒性也与表观遗传调控密切相关. 我们有理由相信来自于环境和饮食中的一大类化学物质, 目前被认为是无毒或无害的, 却通过调节 DNA 甲基化水平对人类产生潜移默化的深远影响^[7]. 因此化学物质的表观遗传毒性是当前化合物安全性评价面临的新问题.

DNA 甲基化是一种基因表达调控的重要机制, 不管是体内还是体外实验, 在评估化学物质潜在毒性的同时了解其对于人类甲基化水平的作用状态, 可以提供更全面的评价信息. 我国目前对于环境污染物的表观遗传毒性研究尚处于萌芽阶段. 以 DNA

甲基化为代表的表观遗传学机制是一些外来化学物质作用于机体并导致不良健康效应的第一站, 对肿瘤的病因学研究表明肿瘤发生相关基因启动子区的甲基化水平改变要早于基因突变^[8]. 着眼于人类基因组 DNA 甲基化的调节, 作者构建了基于绿色荧光蛋白报告基因的高甲基化真核表达载体, 并将其转染进人类 HepG-2 细胞, 初步构建了去甲基化测试细胞受试体系. 以该改造细胞株为主要工具, 以人类明确去甲基化药物 5-甲基胞嘧啶(5-AZA)为阳性去甲基化污染物, 研究了污染物去甲基化表观遗传毒性健康损害风险评价新方法. 以天津污染海域出产的水产品重金属提取液为受试物, 利用该方法对其进行了去甲基化表观遗传毒性的健康风险评估.

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

主要仪器: 紫外分光光度计(Shimadzu, UV2401PC, 日本); 水平电泳仪(Biometra, 德国); 凝胶成像系统(Vilberlo urmat, 法国); PCR 仪(Biometra, 德国); 高速离心机(Sigma 3K30, Sigma, 美国); 实时定量 PCR 仪(Stratagen MX3100, 美国); 流式细胞仪(Bechman Coulter Altra, 美国); CO₂ 培养箱(Thermo, 美国).

主要试剂: 大肠杆菌感受态细胞、pEGFP-C3 质粒(以下简称 C3 质粒)由北京工业大学杨怡姝教授馈赠; HepG-2 细胞由协和细胞库提供; Plasmid maxi kit 试剂盒(QIAGEN, 美国); DNA Fragment Purification Kit Ver.2.0(TaKaRa, 中国); EZ DNA Methylation-Gold Kitted(ZYMO Research, 美国); CpG 甲基化酶(M.SssI), 核酸内切酶 HpaII, EcoRI, ApaLI, MspI均购自美国

New England Biolabs 公司; T4 DNA ligase(New England Biolabs, 美国); PGEM-T Easy Vector System(Promega, 美国); RNeasy Mini Kit 试剂盒(QIAGEN, 美国).

2.2 实验方法

2.2.1 基本原理

基于 EGFP 重组细胞株的化学污染物去甲基化表观遗传毒性评价新方法的基本原理, 综合运用甲基化酶 M.SssI、含增强型绿色荧光蛋白报告基因的 pEGFP-C3 质粒(以下简称 C3 质粒)的特点, 通过人工甲基化处理获得荧光蛋白基因启动子区(CMV 启动子)处于高甲基化状态的 C3 质粒, 并将其转染进人类 HepG-2 肝癌细胞株; 随后以该改造细胞株(EGFP-HepG2)为主要工具载体, 与受试物进行共培养, 依据细胞绿色荧光强度来定量评价受试化学物的去甲基化功能的强弱. 共培养化学物的去甲基化能力越强, 则培养细胞内 GFP 基因启动子区甲基化水平越低, 受试细胞的绿色荧光越强; 反之则培养细胞内 GFP 基因启动子区甲基化水平越高, 受试细胞的绿色荧光较弱(图 1).

2.2.2 C3 质粒大量制备与甲基化处理

依据常规方法扩增环状 C3 质粒, 借助核酸内切酶 ApaLI 和 EcoRI 双酶切将 C3 质粒切割为长片段 L 和短片段 S, 其中短片段 S 中含有 GFP 蛋白基因的启动子序列. 利用甲基化酶 MSss.I 对短片段 S 进行人工甲基化处理^[9]. 反应体系为: 10×NE 缓冲液 2, 4 μL; 100 × SAM, 4 μL; DNA(1.7 μmol/L) 8 μL; M.SssI 6 μL; ddH₂O, 18 μL; 总量 40 μL; 混匀, 37 °C, 3 h 温

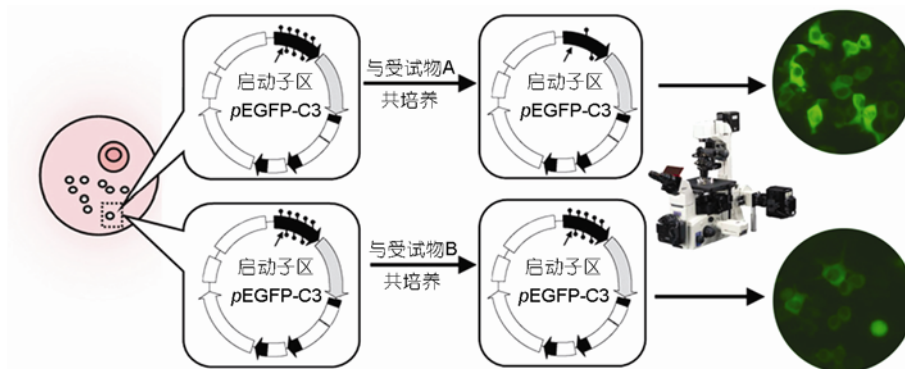


图1 污染物去甲基化表观遗传毒性评价原理

育. 产物 DNA 浓度为 $0.36 \mu\text{mol/L}$. 65°C , 20 min 灭活 M.SssI CpG 甲基化酶, 分装冷藏保存. 利用 T4 DNA 连接酶把成功甲基化的 C3 质粒短片段 S 和长片段 L 重新连接成环, 纯化备用.

2.2.3 甲基化 C3 质粒转染 HepG-2 细胞

快速将所冻存 HepG-2 细胞 40°C 水浴摇床 60 r/min 慢摇至其溶解, 溶解后马上转入 37°C 水浴箱, 手工慢摇恒温 2~3 min 复苏. 复苏后 800 r/min 离心 5 min, 吸去上清加入 10 mL 含 15% 胎牛血清 DMEM 培养基, 混匀后加入细胞培养板, 每孔 1 mL, 5% CO_2 温箱 37°C 培养. 在 95%~100% 时进行细胞传代调整细胞生长状态, 在 4 个 24 孔板上进行细胞传代. 24 h 后细胞贴壁, 依据说明书加入 Eugene HD 转染试剂和甲基化 C3 质粒进行转染^[10].

2.2.4 以 5-AZA 为阳性受试物实施去甲基化表观遗传毒性测试方法原理验证

C3 质粒转染 6 h 后, 加入 5-AZA 进行细胞梯度剂量共培养染毒处理, 通过细胞毒性预实验确定最终细胞培养液中污染物的剂量梯度为 0, 0.00016, 0.0008, 0.004, 0.02 $\mu\text{mol/L}$. 通过预实验发现共培养 24 h 后细胞可以稳定地发出较强的荧光, 故选取质粒转染后 30 h 开始进行下列测试.

(1) 共培养细胞绿色荧光检测

对处理后的 24 孔板进行摄片, 每孔随机取 10 个视野, 在共培养后 24 h 拍摄 10 张荧光照片. 摄片于半小时内完成. 拍照后收取各孔细胞进行流式细胞仪荧光检测. 收集 24 孔板内细胞. 消化液消化, 加入 1 mL PBS 吹打均匀, 吸取到 1.5 mL EP 管中, 2000 r/min 离心, 去上清液. 再加入 1 mL PBS 清洗一遍, 离心. 1 mL PBS 重悬细胞沉淀, 轻轻吹打均匀, 过 300 目滤网到流式专用管中, 放入流式细胞仪测量检测.

(2) 共培养细胞 C3 质粒 CMV 启动子甲基化定量检测

按照 EZ Direct DNA 甲基化试剂盒说明书对目的细胞进行消化. 借助亚硫酸氢钠测序法对 CMV 启动子区的甲基化水平进行检测^[9]. PCR 扩增 Primer1: 5'TAATGGGAGTTTGTGTTTGGTATT3'; Primer2: 5'TTATACTCCAACCTTATACCCCAAAA3'.

(3) 共培养细胞 GFP 基因 mRNA 表达检测

按 RNeasy Mini Kit 试剂盒说明书抽提细胞总

RNA, 取 $4.5 \mu\text{g}$ 进行反转录, 按照 SYBR Green 试剂盒说明书检测 GFP 基因 mRNA 相对表达水平^[11]. 参照基因为 GADPH. 实时荧光定量 PCR 扩增引物: 5'TTCAAGGACGACGGCAACTAC3'和 5'GTGAAC-TTCAAGATCCGCCAC3'.

2.2.5 污染水产的去甲基化能力检测

2010 年 4 月在天津沿海污染近岸采取水产样品 19 个, 均为当地居民喜欢食用的鱼类、贝类等 8 个品种, 常规方法进行前处理, 粉碎、烘干, 消化和溶解, 获得水产品的重金属提取液作为样品进行测试^[12].

2.2.6 统计方法

数据采用 SPSS for windows 10.0 进行均数检验、相关分析、回归分析等统计处理, 细胞荧光图片处理采用 Image-Pro Plus 图像分析处理软件, 曲线拟合采用 Excel 软件.

3 结果与讨论

3.1 C3 质粒甲基化处理效果双酶切验证

未甲基化处理的质粒分别经 HpaII 和 MspI 酶切后电泳照片呈现弥散状态; 甲基化处理的 C3 质粒经 MspI 酶切后 DNA 产物电泳也呈弥散状态, 但是经 HpaII 酶切后其产物电泳呈单一条带; 酶切产物电泳结果提示甲基化处理效果较好, 经甲基化处理的 C3 质粒处于高甲基化状态(图 2).

对回收的甲基化 C3 质粒进行亚硫酸氢钠处理, PCR 扩增后行 pGEM-T Easy 载体转染和克隆测序, 发



图 2 重组质粒甲基化效果检测凝胶电泳. 1, 4.7 kb 的环状 C3 质粒; 2, 未甲基化处理 C3 质粒经 MspI 酶切产物; 3, 未甲基化处理 C3 质粒经 HpaII 酶切产物; 4, 甲基化 C3 质粒经 MspI 酶切产物; 5, 甲基化 C3 质粒经 HpaII 酶切产物; 6, DNA 分子量标准

现质粒 EGFP 基因启动子区经过甲基化处理有 90.4% 的 CG 位点被甲基化, 也表明 EGFP 基因启动子区处于高甲基化状态.

3.2 5-AZA 染毒对 EGFP 基因启动子甲基化及其基因表达的影响

3.2.1 对 EGFP 基因启动子甲基化的影响

对不同剂量 5-AZA 处理的细胞提取 C3 质粒进行甲基化检测. 结果表明 C3 质粒 EGFP 基因启动子区甲基化水平与 5-AZA 处理浓度存在线性关系. 线性方程为 $y = -1.962x + 0.856$; $R^2 = 0.800$ ($p = 0.024$). 5-AZA 染毒剂量与 HepG2 重组细胞 EGFP 基因启动子区甲基化水平有较好的响应关系(表 1, 图 3).

3.2.2 对 EGFP 基因表达的影响

实时定量 PCR 检测过程中荧光信号稳定, 抬升坡度适中. 实时定量 PCR 检测结果表明, 5-AZA 剂量梯度和染毒细胞 EGFP 基因表达相对量成良好的响应关系, $y = 370.216x + 0.309$; $R^2 = 0.982$ ($p = 0.009$) (图 4).

3.2.3 对 HepG2 细胞 EGFP 绿色荧光的影响

通过荧光显微镜对染毒细胞进行摄片, 发现不同染毒剂量组之间细胞存在明显的荧光梯度. 5-AZA 染毒处理后 24 h 各剂量组的代表性荧光图片如图 5 所示.

流式细胞术定量检测显示 5-AZA 剂量梯度与荧

光强度均数有良好的对数线性关系(表 1, 图 6 和图 7), 线性方程为 $y = 0.640 \ln x + 10.284$; $R^2 = 0.890$ ($p = 0.028$). 表明细胞表达绿色荧光的强度的与阳性受试物去甲

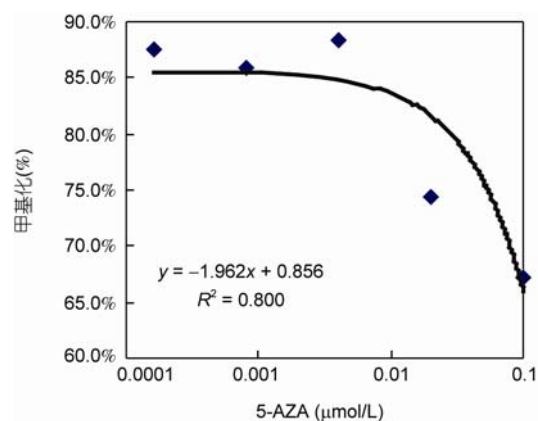


图 3 5-AZA 剂量梯度与甲基化水平线性关系

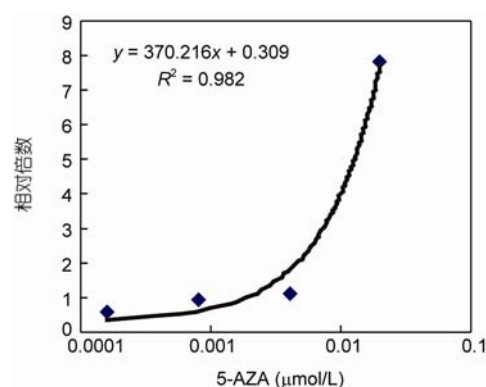


图 4 5-AZA 与 EGFP 表达相对量线性关系

表 1 5-AZA 剂量梯度与检测指标关系($\bar{x} \pm s$)

5-AZA(μmol/L)	n	甲基化百分比(%)	EGFP 表达相对量	EGFP 荧光强度
0	5	90.4±8.7	—	2.88±0.86
0.00016	5	87.6±7.9	0.599±0.226	7.73±0.93
0.0008	5	85.9±7.2	0.940±0.315	8.70±1.12
0.004	5	88.3±7.5	1.102±0.392	8.96±1.25
0.02	5	74.4±6.1	7.835±1.028	11.08±1.33

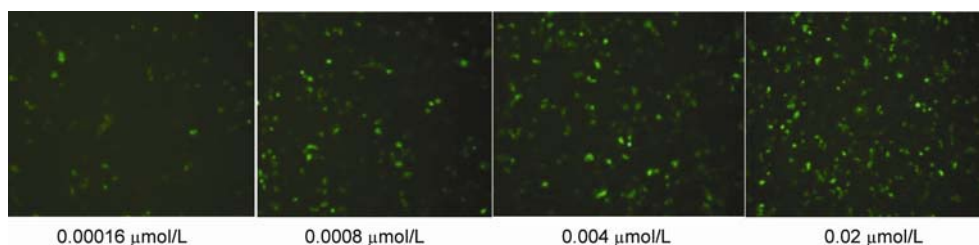


图 5 5-AZA 剂量梯度染毒细胞株的代表性荧光显微镜绿色荧光摄片(放大倍数: 100)

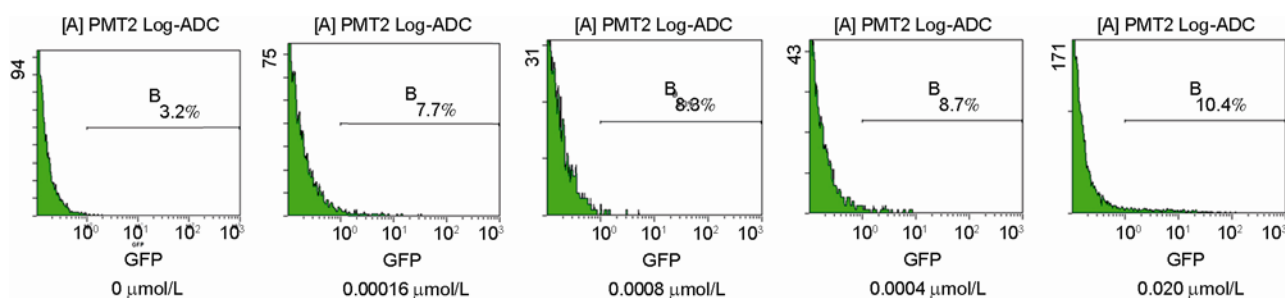


图6 5-AZA 剂量梯度染毒 HepG2 细胞株的绿色荧光流式细胞检测效果

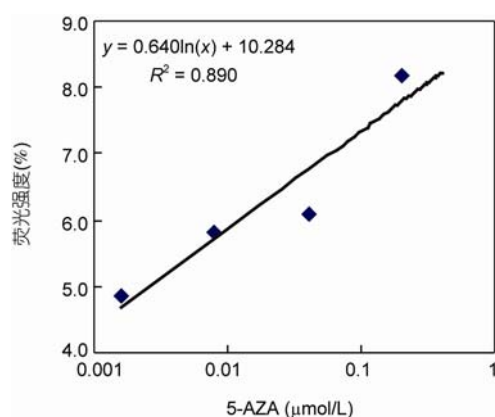


图7 5-AZA 剂量梯度与细胞荧光强度均数对数回归拟合线图($p = 0.028$)

基化污染物存在比较灵敏的对数响应关系。

3.2.4 重组细胞受试体系的最低测试剂量和稳定性

在预实验的基础上,我们以 0.00016 $\mu\text{mol/L}$ 为最高染毒剂量,依据 4 倍稀释的方式设置了四级染毒梯度对受试细胞进行 5-AZA 染毒实验,24 h 后在荧光显微镜下,0.00004 $\mu\text{mol/L}$ 为可以观察到细胞里具有显著的荧光改变的最低剂量。故初步认为该方法的最低评价水平为 0.00004 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-AZA。对浓度范围介于 0.00016, 0.0008, 0.004, 0.02, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 之间的 5-AZA 样品进行测试,发现同一样品 5 个平行样品之间的荧光检测变异程度介于 7.5% ~ 23.9% 之间。

3.2.5 污染海域水产样品测试结果

以 5-AZA 的去甲基化能力作为参考,以 5-AZA 浓度当量作为评价样品去甲基化能力的指标,以纯净水对照和 0.00004 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-AZA 去甲基化能力为参考,在 19 个测试样品中,发现 9 个水产的重金属

提取液可以观察到明显的去甲基化效应,其去甲基化能力分别相当于 0.0064、0.007、0.0074、0.0082、0.0183、0.0202、0.0203、0.0326、0.0387 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-AZA 溶液,占总体 19 种受试样品的 47%,其中花蛤的去甲基化能力相对最高。1 号采样点(中心渔港)的扇贝、花蛤、毛蚶、虾蛄;2 号采样点(北塘口)的花蛤、缢蛏;4 号采样点(高沙岭)的花蛤的重金属提取液呈现较强的去甲基化能力(图 8)。

4 结论

污染物不仅可以通过损伤人体的遗传物质,导致基因序列改变或染色体畸变,影响重要功能性蛋白的表达进而产生各种健康损伤效应;还可以通过改变受体重要基因启动子区的甲基化水平,来调节重要功能性蛋白的表达,进而产生肿瘤等各种不良效应,也就是说污染物可以通过下调基因启动子区

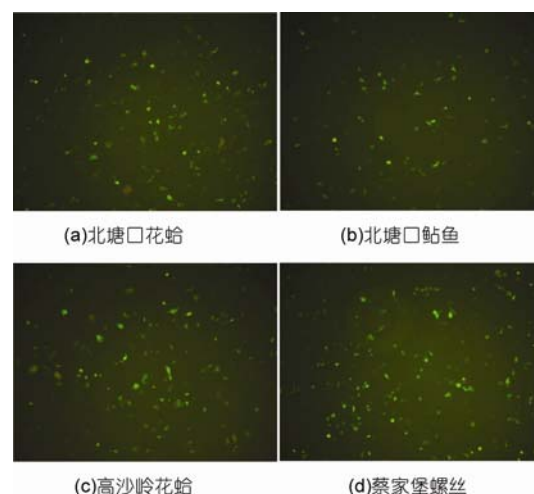


图8 天津海域水产重金属提取物检测的代表性荧光显微镜摄片(放大倍数: 100)

DNA 甲基化水平影响关键基因表达进而产生各种人体健康损害^[4, 13], 即表观遗传毒性. 本研究方法为表观遗传毒性评价和检测提供了一种途径.

5-AZA 是一种脱氧胞苷类似物, 也是 DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)的抑制剂, 在 DNA 复制过程中与 DNA 分子相结合, 并与 DNMT1 形成复合物, 抑制该酶的甲基转移活性, 生成低甲基化子链, 从而实现去甲基化功能^[14]. 基本原理验证结果说明, 本研究创立的污染物去甲基化表观遗传毒性评价方法可行. 与 EGFP 报告基因载体的常见使用方法不同, 本研究没有插入新的目的基因, 而是对 EGFP 基因蛋白区进行了人工高甲基化处理. 结合 GFP 报告基因的特点, 作者构建一个研究污染水产去甲基化表观遗传毒性检测的载体. 在甲基化、基因表达、蛋白质表达产物等 3 个水平的研究显示, 改造细胞株 EGFP-HepG2 对受试物的去甲基化能力具有较好的响应关系, 5-AZA 染毒共培养的剂量与其去甲基化能力和末端效果之间存在统计学关联, 并且灵敏性和稳定性均属于可接

受范围.

海河是我国主要的重污染河流之一, 据国家海洋质量公报显示, 2008 年天津海域环境质量状况依然严峻, 严重污染海域面积有所增加, 主要集中在汉沽、北塘、塘沽附近海域、大港少部分海域及大沽锚地等; 84.6%的天津市入海排污口存在超标排污现象, 尽管总体水产品质量尚好, 但汉沽和塘沽附近的经济贝类也受到重金属镉的轻微污染, 甚至少数出现了不同程度的超标现象^[15]. 多种污染物的复合健康危害效应是否严重, 长期食入该水产品能否导致人体基因组关键基因启动子 DNA 的显著去甲基化都不清楚, 我们的研究结果显示天津污染海域的水产品去甲基化能力值得关注. 就本研究在该地采集的水产品而言, 有近半数显示出较强的去甲基化表观遗传毒性.

本研究为污染物去甲基化的新型健康危害风险评价方法研究奠定了基础, 进一步深化了对环境污染毒性的认识, 有望推进污染物的表观遗传毒性健康损害风险评价方法的建立.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(20907047)和中国环境科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务专项基金(2008KYYW05)资助, 特此致谢.

参考文献

- Bombail V, Moggs JG, Orphanides G. Perturbation of epigenetic status by toxicants. *Toxicol Lett*, 2004, 149(5): 51–58
- Reichard JF, Schneckenger M, Puga A. Long term low-dose arsenic exposure induces loss of DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 352: 188–192
- Macc JM, Wang LJ. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene P53 in human lung cells: A model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat Res*, 1997, 386(3): 263–277
- Olaharski AJ, Rine J, Marshall BL, Babiarz J, Zhang L, Verdin E, Smith MT. The flavoring agent dihydrocoumarin reverses epigenetic silencing and inhibits sirtuin deacetylases. *PLoS Genet*, 2005, 1(6): e77
- Salnikow K, Zhitkovich A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21(1): 28–44
- Tang WY, Newbold R, Mardilovich K, Jefferson W, Cheng RY, Medvedovic M, Ho SM. Persistent hypomethylation in the promoter of nucleosomal binding protein 1 (Nsbp1) correlates with overexpression of Nsbp1 in mouse uteri neonatally exposed to diethylstilbestrol or genistein. *Endocrinology*, 2008; 149(12): 5922–5931
- Feil R. Environmental and nutritional effects on the epigenetic regulation of genes. *Mutat Res*, 2006, 600(1-2): 46–57
- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(1): 21–33
- Wang X, Zhang C, Zhang L, Wang X, Xu S. High-throughput assay of DNA methylation based on methylation-specific primer and SAGE. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(3): 749–754
- Bhise NS, Gray RS, Sunshine JC, Htet S, Ewald AJ, Green JJ. The relationship between terminal functionalization and molecular weight of a gene delivery polymer and transfection efficacy in mammary epithelial 2-D cultures and 3-D organotypic cultures. *Biomaterials*, 2010, 31(31): 8088–8096
- Mayginnes JP, Reed SE, Berg HG, Staley EM, Pintel DJ, Tullis GE. Quantitation of encapsidated recombinant adeno-associated virus DNA in crude cell lysates and tissue culture medium by quantitative, real-time PCR. *J Virol Methods*, 2006, 137(2): 193–204

- 12 姜杰, 丘红梅, 张慧敏, 刘桂华, 黎雪慧, 申治国. 广东沿海海域海产品中重金属的含量及评价. 环境与健康杂志, 2009, 26(9): 814-816
- 13 张丽丽, 吴建新. DNA 甲基化-肿瘤产生的一种表观遗传学机制. 遗传, 2006, 28(7): 880-885
- 14 Jackson-Grusby L, Laird PW, Magge SN, Moeller BJ, Jaenisch R. Mutagenicity of 5-aza-2'-deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(9): 4681-4685
- 15 2008 年天津市海洋环境质量公报. <http://www.soa.gov.cn/soa/hygb/yhgb/eight/webinfo/2009/02/1271382649753224.htm>. 中国国家海洋局网站. 2011-3-30

A novel evaluation method for epigenetic demethylation toxicity of contaminated aquatics based on EGFP reporter

WANG XianLiang¹, MAN JiangHong^{1,2}, WANG ChunHui², JIANG Yan³, WANG XiaoLi⁴, YANG YiShu⁴, WANG FeiFei¹, ZHAO XiuGe¹, LI Qin¹, DUAN XiaoLi¹, ZHANG YanSheng¹ & ZHANG JinLiang¹

1 State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment; Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

2 School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

3 College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

4 College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China

Abstract: To study a novel evaluation method for demethylation epigenetic toxicity of pollutants based on an artificial recombinant pEGFP-C3 plasmid, pEGFP-C3 plasmid was methylated with M.Sss I *in vitro* first and then transfected into HepG2 cells. Taking 5-AZA as positive demethylation agent, the levels of methylation of the EGFP CMV promoter region, EGFP gene expression and green fluorescence intensity of the recombinant cell lines was quantified with sodium bisulfite sequencing assay, quantitative real-time quantitative PCR and flow cytometry at the time of 24 h after the cells co-cultured with 5-AZA gradients, respectively. A dose-response relationship was explored between the cells' response intensity at the former three levels and the co-cultured 5-AZA. The demethylation ability of the aquatic from polluted area of Tianjin basin was tested with this novel method. Good dose-response relationships were found between DNA methylation of CMV promoter, EGFP gene expression, green fluorescence intensity of the recombinant cells and 5-AZA. The equation for green fluorescence intensity of the test cells and 5-AZA is $y = 0.640\ln x + 10.284$ with $R^2 = 0.890$. This method has a detection limit of 0.00004 μM 5-AZA and good repeatability with variation of 7.5%–23.9%. Almost half of the aquatic from the Tianjin basin was found demethylation ability positively with this method.

Keywords: demethylation, epigenetic toxicity, evaluation vector, EGFP, pollutants