

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001586

氢醌 HQ 对 K562 细胞 WRN 基因甲基化水平及 DNMT1 表达的影响

温缘缘, 肖芸, 赵雪, 万秀方, 郑丹, 张亚莉

(贵州医科大学医学检验学院, 贵阳 550004)

【摘要】目的:探讨氢醌(hydroquinone, HQ)对 K562 细胞中 WRN 基因甲基化水平及 DNMT1 表达的影响。**方法:**K562 细胞生长至对数期后, 设置空白对照组, 低(15 $\mu\text{mol/L}$)、中(30 $\mu\text{mol/L}$)、高(60 $\mu\text{mol/L}$)剂量 HQ 组, 重复间隔染毒 72 h, 空白对照组加入等量的 PBS 培养。MTT 比色法检测细胞存活率; 重亚硫酸盐测序法(bisulfite sequencing PCR, BSP)检测细胞 WRN 基因甲基化水平; FQ-PCR 法检测 DNMT1 基因的 mRNA 表达情况; 免疫印迹法检测 DNMT1 基因的蛋白表达情况。**结果:**①MTT 结果显示, 细胞存活率随着 HQ 染毒浓度增加而下降($P=0.000$)。②BSP 检测结果显示, 低、中、高剂量 HQ 组甲基化率与对照组比较, 差异有统计学意义($\chi^2=7.50, P=0.048$)。③与对照组比较, 低、中、高剂量 HQ 组 DNMT1 基因 mRNA 及蛋白表达量呈下降趋势($P=0.000$)。**结论:**HQ 染毒 K562 细胞可引起 WRN 基因甲基化水平增高, 同时下调 DNMT1 基因的表达。

【关键词】氢醌; K562 细胞; WRN 基因; 甲基化; DNMT1 基因

【中图分类号】R34

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-12-04

Effects of hydroquinone on methylation level of WRN gene and expression of DNMT1 in K562 cells

Wen Yuanyuan, Xiao Yun, Zhao Xue, Wan Xiufang, Zheng Dan, Zhang Yali

(School of Medical Laboratory Science, Guizhou Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the influences of hydroquinone(HQ) on methylation level of WRN gene and expression of DNMT1 gene in K562 cells. **Methods:** The low dose HQ group, middle dose HQ group and high dose HQ group were treated with 15 $\mu\text{mol/L}$, 30 $\mu\text{mol/L}$, 60 $\mu\text{mol/L}$ hydroquinone for 72h at intervals and repeatedly, while the blank control group cells were cultured with PBS. The survival rate of each experimental group was detected by MTT assay. The methylation level of WRN gene was detected by bisulfite sequencing PCR(BSP). The protein expression of DNMT1 gene was detected by Western blot. The mRNA expressions of DNMT1 gene were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results:** ①The results of MTT showed that the cell viability decreased with the increasing of HQ concentration($P=0.000$). ②Compared with the that of control group, the difference of the methylation rates of low dose HQ group, middle dose HQ group, high dose HQ group, was statistically significant($\chi^2=7.50, P=0.048$). ③Compared with that of the control group, the relative expression of mRNA and protein of DNMT1 of each HQ group decreased($P=0.000$). **Conclusion:** HQ can increase the methylation level of WRN gene and down-regulated the expression of DNMT1 gene in K562 cells.

【Key words】hydroquinone; K562 cells; WRN gene; methylation; DNMT1 gene

苯(Benzene)是广泛存在的环境和职业污染物, 是一种众所周知的可引起白血病和各种血液疾病的血液中毒致癌物质^[1]。苯的毒性作用与其体内代

谢物密切相关, 苯的重要代谢物氢醌(hydroquinone, HQ)能诱导染毒生物个体发生遗传和表观遗传改变^[2], HQ 可以直接或间接诱导 DNA 双链断裂和染色体畸变^[3]。细胞受到内部和外界刺激发生 DNA 损伤时, 会产生一系列应激反应, 如 DNA 损伤修复、细胞周期阻滞等, 是 HQ 诱导病理改变的基础。因此, 探讨 HQ 致细胞损伤后的修复机制有着重要的意义。

作者介绍: 温缘缘, Email: wenyuanyuan68@163.com,

研究方向: 主要从事检验诊断学方面的研究。

通信作者: 张亚莉, Email: zhangyl20011002@aliyun.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81360437)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180408.1425.014.html>

(2018-04-08)

Werner 基因(*Werner syndrome gene*, *WRN*)是人类重要的 DNA 损伤修复基因,可参与 DNA 双链断裂的修复,通过非同源末端连接以及同源重组^[3]。*WRN* 蛋白属于 RecQ 解旋酶家族,具有 3'→5'解旋方向性,而 *WRN* 蛋白所具有的独特 3'→5'核酸外切酶活性^[3],可以解开受损 DNA 双链、修复停顿的复制叉等复杂 DNA 结构^[4]。课题组前期研究表明^[5],HQ 可使 K562 细胞中 *WRN* 基因的 mRNA 及蛋白表达受到抑制。有研究表明^[6],在原发性结肠癌和胃癌组织中,*WRN* 基因启动子区的 CpG 岛产生高甲基化改变,导致表观遗传沉默,蛋白表达受抑。DNA 甲基化是研究最广泛的表观遗传机制,通过 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)将 CpG 二核苷酸中的甲基添加到胞嘧啶(5mC)中实现^[7],DNMTs 参与 DNA 甲基化的形成和维持,包括 DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b, DNMT1 主要维持 CpG 岛甲基化^[8]。本研究旨在证实 HQ 对 K562 细胞 *WRN* 基因表达的影响,以探讨该基因的表达变化是否与 HQ 致 DNA 甲基化转移酶表达及表观遗传学的改变有关。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

K562 细胞株(贵州医科大学组织工程与干细胞实验中心保种),EZ DNA Methylation –Gold Kit(美国 ZYMO RESEARCH 公司),HQ(美国 Sigma 公司),PRMI1640 培养基(HYCLONE 公司),胎牛血清(北京四季青公司),Platinum–DNA–Polymerase,1 kb Plus DNA Ladder(美国 Invitrogen 公司),DNMT1 鼠抗人单克隆抗体、Anti–mouse IgG(Abcam 公司),RNAisoTM Plus、PrimeScript™ RT Master Mix、Premix Ex Taq(Probe qPCR)、DH5α 感受态细胞(大连 Takara 公司)。

1.2 细胞培养及染毒方法

复苏 K562 细胞,用 RPMI1640 培养基,在 37℃、5%CO₂、90%相对湿度培养箱中培养,隔 1~2 d 换液传代。待细胞生长至对数期后,按 2×10⁵ 个/mL 接种,根据前期研究^[5],根据 HQ 溶液(PBS 配制)浓度设置低剂量(15 μmol/L)、中剂量(30 μmol/L)、高剂量(60 μmol/L)HQ 组,染毒 24 h 后用 PBS 洗 2 次,加入培养基继续培养 24 h 后,再次用 HQ 进行相同处理^[9],共处理 3 次即为 HQ 重复间隔染毒 72 h,空白对照组加入等量 PBS(即 0 μmol/L HQ),收集处理后细胞用于检测。

1.3 细胞存活率检测

将对数期生长的细胞以 2×10⁵ 个/mL 的密度接种于 6

孔板中,参照上述方法染毒 72 h 后,用 PBS 洗 2 次,加入新鲜培养基重悬后接种于 96 孔板(100 μL/每孔),同时加入 5 g/L MTT 溶液 10 μL,培养 4 h 后加入 MTT 三联溶解液 100 μL,继续培养 12 h 后,于酶标仪(490 nm 波长)检测吸光度,测定各孔吸光度(absorbance, A)值,空白孔调零。每个浓度设置 6 个复孔,重复 3 次。细胞存活率(%)=(A_{实验组值}/A_{对照组值})×100%。

1.4 *WRN* 基因甲基化状态检测

1.4.1 细胞 DNA 提取及重亚硫酸盐处理 参照 DNA 提取试剂盒说明书提取细胞 DNA 后,用紫外分光光度计测定 DNA 的纯度和浓度,取 0.5 μg DNA 样品(A_{260 nm/280 nm} 比值在 1.7~2.0)进行亚硫酸盐修饰,按照 MethylCode™ Bisulfite Conversion Kit 说明书对基因组 DNA 进行处理。

1.4.2 *WRN* 基因甲基化水平检测 以亚硫酸氢盐修饰 DNA 为模板,采用重亚硫酸盐测序法进行检测,采用上海 Invitrogen 公司设计及合成的 2 对 BSP 巢式 PCR 引物进行 CpG 岛扩增,第一轮引物序列,上游为 5'–GTAGYGYGGGTTT–AGT–3',下游为 5'–CCCTCCCCTCCTAACRAATA–3' (扩增片段 423 bp),第二轮引物序列,上游为 5'–AGTTATTGTG–GTGTTGG–3',下游为 5'–ACCCCTACCCRACTACTCC–3' (扩增片段 309 bp)。25 μL 反应体系:10×Buffer 2.5 μL、MgCl₂(50 mmol/L)0.8 μL、dNTP(10 mmol/L)0.5 μL、10 μmol/L 上下游引物各 1 μL、重亚硫酸盐修饰 DNA 2 μL、DNA 聚合酶 0.2 μL、5×GC buffer 5 μL。PCR 反应条件:第一轮:95℃预变性 3 min;95℃ 30 s,55℃ 40 s,72℃ 40 s,共 25 个循环,最后 72℃延伸 10 min;第二轮:95℃预变性 3 min;95℃ 30 s,55℃ 40 s,72℃ 40 s,共 40 个循环,最后 72℃延伸 10 min。用 1.5%琼脂糖凝胶把 PCR 产物电泳后,用凝胶回收试剂盒进行回收纯化,纯化后进行 TA 克隆连接反应,采用氨苄青霉素抗性。TA 克隆连接反应体系:pMD18–T Vector1 μL、PCR 回收产物 4 μL、Solution I 5 μL,混匀后放置在 14℃连接过夜,然后把产物转化感受态细胞,接着取一定量菌液均匀涂抹于氨苄青霉素抗性 LB 平板中,然后 37℃倒置培养过夜,直到长出单菌落。分别从每个平板中挑 10 个克隆接种于 2 mL LB 培养基中,37℃培养过夜,最后送上海 Invitrogen 公司进行测序,分析测序结果中,○代表未发生甲基化的 CG 位点,●代表发生甲基化的 CG 位点。

1.5 *DNMT1* 基因 mRNA 的表达检测

提取细胞总 RNA 后,取 RNA(A_{260 nm/280 nm} 比值为 1.8~2.0 范围内的)进行逆转录成 cDNA,然后把 cDNA 作为模板进行 FQ–PCR 反应,根据 DNMT1(NM_001379.1)基因序列,由大连 Takara 公司进行引物设计合成,见表 1。20 μL 反应体系:10×PCR buffer 2 μL、超纯水 14.4 μL、Taqman 探针 probe(10 μmol/L)0.3 μL、dNTPs(10 mmol/L)0.5 μL、MgCl₂(50 mmol/L)1 μL、上下游引物(10 μmol/L)各 0.3 μL、Taq 酶(5 U/μL)0.2

μL、模板 1.0 μL,均设置 3 个复孔,空白对照用 Rnase-free-ddH₂O 替代 cDNA。PCR 的反应条件为:95 ℃,2 min;95 ℃,10 s,60 ℃,30 s,72.0 ℃,15 s,共 40 个循环。按照 10 倍比例把 cDNA 进行倍比稀释,制备成标准品后进行 QPCR。由 CFX Manager 软件 (Version 1.5) 自动生成标准曲线,获得各靶基因实际扩增效率(E)及相关系数(r),以 β-actin 作内参基因,根据各靶基因实际扩增效率,根据 Pfaffl Method 公式^[10]自动计算,然后分析各组 mRNA 的表达水平。

表 1 FQ-PCR 引物序列、探针序列及产物大小

Tab.1 The sequence and products length of primer and probe with FQ-PCR

基因名称	序列(5'-3')	产物长度(bp)
DNMT1	DN-F GGAAGAAGAAAGAGATGAAA	80
	DN-R CCTTCAGTTTCTGTTTGG	
	DN-P (FAM)TCCGAAGTCAAACCAAA-GAACCAAC(BHQ1)	
β-actin	B-F GACTTAGTTGCGTTACACCCCTTTC	159
	B-R GCTGTACACCTTCACCGTTCC	
	B-P (FAM)TGACAAAACCTAACTTGC-GCAGAAAACA(BHQ1)	

1.6 DNMT1 蛋白的表达检测

将不同浓度氢醌间隔染毒的 K562 细胞悬液分别移入离心管内,PBS 洗 2 次,参照说明书提取总蛋白,并用 BCA 法定量,煮蛋白后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转至聚偏氟乙烯膜上,5%脱脂奶粉封闭(2 h),DNMT1 鼠抗人单克隆抗体(稀释比为 1:2 000)4 ℃过夜,羊抗鼠二抗(稀释比 1:25 000)常温孵育 1 h,用增强化学发光剂(ECL)显色,使用 Image J 软件扫描 X 线片上条带灰度值,用 β-actin 作为内参,计算、分析 DNMT1 蛋白的相对表达量。

1.7 统计学分析

数据采用 SPSS 23.0 统计软件进行分析。细胞存活率、DNMT1 基因 mRNA 及蛋白表达数据等计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,组间比较采用单因素方差分析,多重比较为 HSD-*q* 检验。甲基化程度等计数资料采用常规卡方检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HQ 处理对 K562 细胞存活率的影响

低、中、高剂量 HQ 组细胞存活率分别为(62.29 ± 6.29)%、(40.44 ± 2.95)%、(23.28 ± 2.96)%,与空白对照组(100.00 ± 0.00)%比较,细胞的存活率随着 HQ 染毒浓度增加而降低。整体分析(单因素方差分析)及两两组间比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.2 WRN 基因甲基化水平

以重亚硫酸盐测序法检测 K562 细胞 WRN 基因甲基化水平(图 1),HQ 染毒 72 h,低、中、高剂量 HQ 组甲基化率分别为 0.00%、2.17%、2.61%,与空白对照组的甲基化率 0.87% 比较,差异有统计学意义($\chi^2=7.500, P=0.048$)。

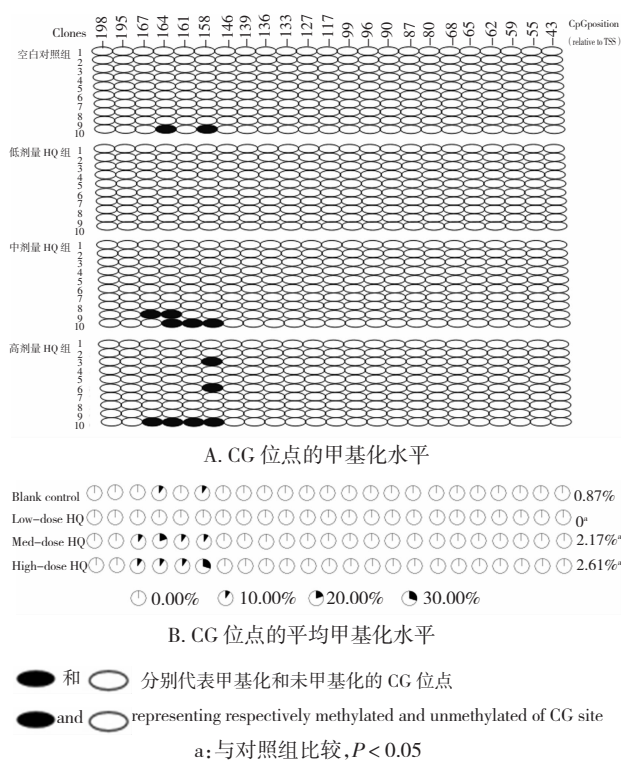


图 1 HQ 染毒 72 h 后 K562 细胞 WRN 基因甲基化水平

Fig.1 The methylation status of WRN in the K562 cells of exposed with HQ on 72 hour

表 2 HQ 处理对 K562 细胞存活率的影响, mRNA 及 DNMT1 蛋白的表达 (n=6)

Tab.2 Cellular activity, DNMT1 mRNA expression, DNMT1 protein expression in the K562 cells exposed with HQ (n=6)

指标	空白对照组	HQ 剂量			F 值	P 值
		低	中	高		
K562 细胞存活率 (%)	100.00 ± 0.00	62.28 ± 6.19 ^a	40.44 ± 2.95 ^{ab}	23.28 ± 2.96 ^{abc}	470.335	0.000
DNMT1 mRNA 表达	1.00 ± 0.00	0.53 ± 0.05 ^a	0.43 ± 0.05 ^{ab}	0.21 ± 0.01 ^{abc}	522.212	0.000
DNMT1 蛋白相对表达量	1.00 ± 0.00	0.83 ± 0.09 ^a	0.57 ± 0.03 ^{ab}	0.40 ± 0.05 ^{abc}	148.387	0.000

注:整体分析为单因素方差分析;多重比较为 HSD-*q* 检验, a、b、c 分别为和空白对照组、低剂量组、中剂量组比较, $P < 0.05$

2.3 DNMT1 基因 mRNA 的表达

DNMT1 及 β -actin 的 qPCR 反应的扩增曲线呈光滑 S 形(图 2、图 3)。标准曲线显示,染毒 72 h 后, DNMT1 及 β -actin 引物扩增效率分别为 78.39% 及 85.55%。低、中、高剂量 HQ 组 DNMT1 基因 mRNA 相对表达量分别为 (0.53 ± 0.05) 、 (0.43 ± 0.05) 和 (0.21 ± 0.01) , 与空白对照组 (1.00 ± 0.00) 比较, 表达量呈下降趋势。整体分析(单因素方差分析)及两两间比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

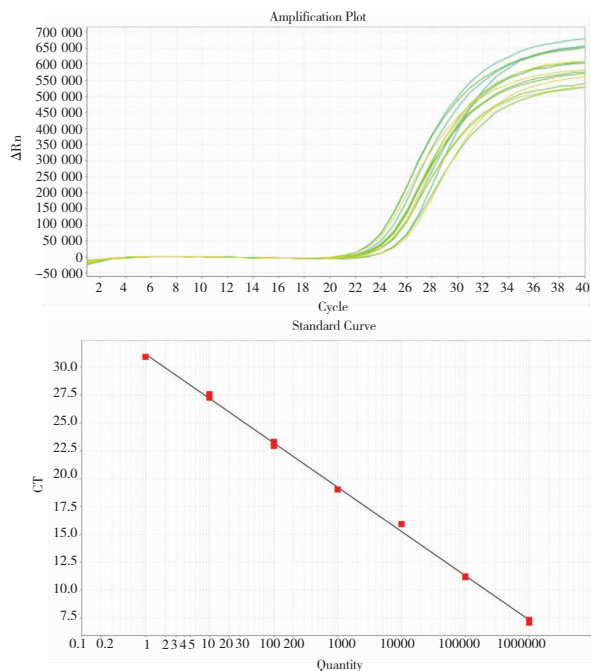


图 2 DNMT1 FQ-PCR 扩增曲线及标准曲线(72 h)

Fig.2 The amplified curve and standard curve of DNMT1 gene in FQ-PCR(72 h)

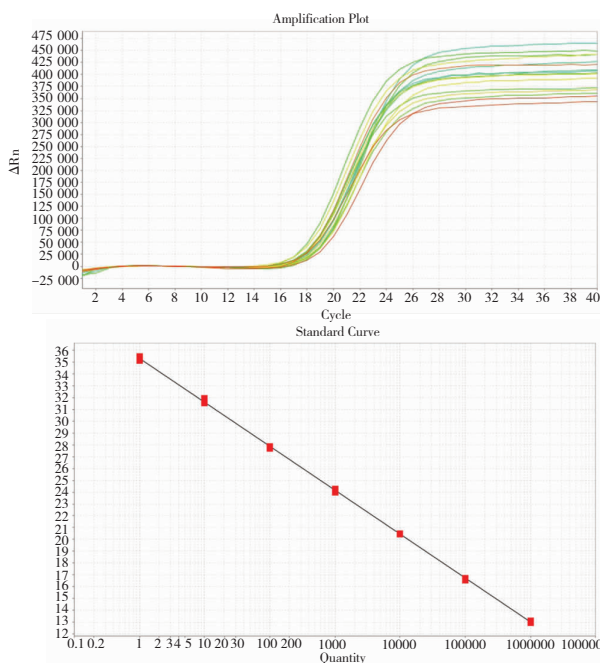


图 3 β -actin FQ-PCR 扩增曲线及标准曲线(72 h)

Fig.3 The amplified curve and standard curve of β -actin gene in FQ-PCR(72 h)

2.4 DNMT1 蛋白的表达

DNMT1 蛋白相对表达量,空白对照组为 (1.00 ± 0.00) , 低、中、高剂量 HQ 组蛋白表达量分别为 (0.83 ± 0.09) 、 (0.57 ± 0.03) 和 (0.40 ± 0.05) 。整体分析(单因素方差分析)及两两间比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$) (表 2、图 4)。

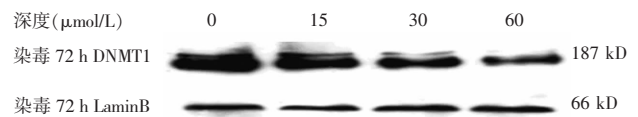


图 4 HQ 处理 K562 细胞中 DNMT1 蛋白表达

Fig.4 DNMT1 protein expression in the cells exposed with HQ

3 讨论

HQ 染毒 K562 细胞后,细胞存活率随着 HQ 染毒浓度增加而降低,这与沙焱等^[11]的研究结果相一致,表明 HQ 可抑制细胞的增殖和分化。课题组前期研究结果表明, HQ 染毒 K562 细胞后,产生明显的毒性作用,可导致细胞 DNA 损伤^[5,12]。作为重要的 DNA 损伤修复基因, WRN 基因通过同源重组、非同源末端连接参与双链 DNA 断裂的修复^[13],然而 HQ 致 WRN 基因表达受抑是否通过表观遗传改变方式实现,通过本研究做进一步的探讨。

表观遗传修饰,可通过组蛋白修饰、DNA 甲基化、非编码调控等调控基因表达^[14],其中甲基化的研究较为广泛。本研究中, HQ 对 K562 细胞 WRN 基因甲基化水平有一定影响,中、高剂量 HQ 组甲基化率分别为 2.17%、2.61%,表明 HQ 会引起 WRN 基因甲基化升高。故本研究表明, WRN 基因的表达受抑可能与 WRN 基因甲基化增高而引起的表观遗传沉默有关。经过生物信息学软件分析显示, WRN 基因存在 2 个 CpG 岛,其启动子周围也存在大量的 CG 位点^[15],本研究针对 WRN 基因中一个长度为 309 bp 的 CpG 岛区,采用 BSP 法检测该 CpG 岛的甲基化。由于检测位点有限,甲基化分析存在一定的局限性。要全面评估 HQ 染毒对 WRN 基因的总甲基化程度的影响,尚有待进一步联合 WRN 基因的其他 CG 位点来分析论证。

DNMT1 可以在 DNA 的复制和修复中保持细胞原有的甲基化信息,维持 DNA 甲基化^[16]。本研究结果显示, HQ 可下调 K562 细胞中的 DNMT1 基因表

达。凌晓璇等的研究结果^[17]也显示,HQ 染毒 TK6 细胞后 DNMT1 的表达量降低,且呈剂量依赖性。Zhang 等^[18]采用 DNA 甲基化芯片技术,研究 HQ 处理 TK6 细胞后 IL12 基因甲基化,结果显示该基因的甲基化水平增高。Li 等^[19]的研究表明,K562 细胞暴露于 HQ 后,GATA-1 基因甲基化水平显著增加,进而可能导致 GATA-1 的 mRNA 表达下调,与本研究的结果相似。凌晓璇等的研究^[17]中 HQ 染毒可使细胞 DNMT1 的表达降低,然而其研究结果同时也显示,某些特定基因呈高甲基化水平,提示尽管 DNMT1 在参与甲基化的维持中有着重要作用,但其表达降低时,某些基因的甲基化水平可呈现增高的趋势。

本研究结果提示,HQ 染毒 K562 细胞可能通过 WRN 基因甲基化的改变而使 WRN 基因的表达受抑,影响 WRN 基因的修复功能。为进一步研究 HQ 对细胞的生物学影响,可运用 DNMTs 抑制剂抑制 DNMTs 的活性,分析 WRN 的表达变化,以进一步探明 HQ 致 DNA 修复基因表达改变的分子机制。

参 考 文 献

- [1] Sun R, Cao M, Zhang J, et al. Benzene exposure alters expression of enzymes involved in fatty acid β -oxidation in male C3H/He mice[J]. Int J Environ Res Public Health, 2016, 13(11): E1068.
- [2] Mancini M, Mandruzzato M, Garzia AC, et al. In vitro hydroquinone-induced instauration of histone bivalent mark on human retroelements (LINE-1) in HL60 cells[J]. Toxicol In Vitro, 2017, 40: 1-10.
- [3] Ren X, Lim S, Smith MT, et al. Werner syndrome protein, WRN, protects cells from DNA damage induced by the benzene metabolite hydroquinone[J]. Toxicol Sci, 2009, 107(2): 367-375.
- [4] Machwe A, Xiao L, Lloyd RG, et al. Replication fork regression in vitro by the Werner syndrome protein (WRN): holliday junction formation, the effect of leading arm structure and a potential role for WRN exonuclease activity[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(17): 5729-5747.
- [5] 龚骏杰, 郑丹, 肖芸, 等. 苯代谢物氢醌对 K562 细胞 WRN 基因转录及表达的影响[J]. 广东医学, 2016, 37(8): 1122-1126.
- [6] Agrelo R, Cheng WH, Setien F, et al. Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(23): 8822-8827.
- [7] Mehler MF. Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease[J]. Prog Neurobiol, 2008, 86(4): 305-341.
- [8] Yang C, Shang X, Cheng L, et al. DNMT 1 maintains hypermethylation of CAG promoter specific region and prevents expression of exogenous gene in fat-1 transgenic sheep[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171442.
- [9] Ji W, Yang L, Yu L, et al. Epigenetic silencing of O6-methylguanine DNA methyltransferase gene in NiS-transformed cells[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(6): 1267-1275.
- [10] Bustin SA, Benes V, Nolan T, et al. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective[J]. J Mol Endocrinol, 2005, 34(3): 597-601.
- [11] 沙焱, 杨振宇, 周伟, 等. 氢醌致人支气管上皮细胞 DNA 甲基化改变中聚 ADP-核糖聚合酶 1 的作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2014, 32(3): 181-185.
- [12] 万秀方, 郑丹, 张越时, 等. 氢醌对 K562 细胞着色性干皮病基因 D 转录及表达的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2015, 40(6): 556-559, 565.
- [13] Ryu JS, Koo HS. Roles of caenorhabditis elegans WRN helicase in DNA damage responses, and a comparison with its mammalian homolog: a mini-review[J]. Gerontology, 2016, 62(3): 296-303.
- [14] Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy[J]. Cell, 2012, 150(1): 12-27.
- [15] Wang L, Hunt KE, Martin GM, et al. Structure and function of the human Werner syndrome gene promoter: evidence for transcriptional modulation[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(15): 3480-3485.
- [16] Carnero A, Leonart ME. Epigenetic mechanisms in senescence, immortalisation and cancer[J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2011, 86(2): 443-455.
- [17] 凌晓璇, 梁海荣, 黄明元, 等. 氢醌对 DNA 甲基转移酶表达的影响[J]. 实用预防医学, 2012, 19(7): 961-963.
- [18] Zhang L, McHale CM, Rothman N, et al. Systems biology of human benzene exposure[J]. Chem Biol Interact, 2010, 184(1-2): 86-93.
- [19] Li Y, Wu X, Li X, et al. Changes in DNA methylation of erythroid-specific genes in K562 cells exposed to phenol and hydroquinone[J]. Toxicology, 2013, 312: 108-114.

(责任编辑:冉明会)