

TRF1 和 TRF2 在砷致 MGC803 细胞染色体畸变中的作用

张 杨 苏 琦 宋 颖 唐荣军 周建国 董 琳 梁晓秋 *

(南华大学肿瘤研究所, 衡阳 421001)

摘要 为了分析端粒重复序列结合因 1 和 2(TRF1 和 TRF2)在砷致 MGC803 细胞染色体畸变中的作用, 探讨砷致细胞增殖及癌变的可能机制, 以人 MGC803 细胞为实验对象, 采用染色体分析检测畸变率及有丝分裂指数(MI)、Western 印迹检测 TRF1、TRF2、PCNA 表达。结果表明, 0.625 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理 MGC803 细胞 4 周后, PCNA 表达及有丝分裂指数均高于对照组, 显示细胞分裂增殖增强; 染色体分析显示畸变率明显高于对照组, 畸变类型以融合染色体(即双或多着丝粒、环形染色体)为主; 同时, Western 印迹分析结果表明 TRF1 表达上升, 而 TRF2 表达下降。研究结果提示低浓度砷通过上调 TRF1 表达和下调 TRF2 表达, 导致染色体畸变率增加以及基因组稳定性下降, 从而加快细胞增殖。

关键词 砷; MGC803 细胞; 端粒重复序列结合因子; 染色体畸变

砷是一种公认的致癌物质, 大量流行病学研究和临床观察证明: 长期接触无机砷化合物可导致肝脏损伤、周围神经病变, 并可增加皮肤癌、肺癌、膀胱癌、肝癌等多种肿瘤的发生率^[1]。目前, 关于砷致癌分子机制的研究方面有许多有关砷导致遗传物质改变的报道: 砷能诱导细胞染色体畸变、姊妹染色单体互换(SCE)、微核增加及 DNA 蛋白交联等。砷可能通过诱导染色体异常改变、引起氧化应激、影响 DNA 甲基化及 p53 基因表达等导致细胞癌变^[2-4]。端粒空间上的环状结构对于维持染色体的稳定性至关重要, 端粒重复序列结合因子 1 和 2(TRF1 和 TRF2)是维持这种环状结构的重要结合蛋白^[5]。TRF1、TRF2 表达情况的改变可能会影响染色体稳定性, 从而导致遗传物质改变。本文用低浓度砷较长期处理 MGC803 细胞, 观察砷致 MGC803 细胞染色体畸变率的改变, 及该过程中 TRF1、TRF2 表达情况, 进一步探讨砷致癌变的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

As_2O_3 购自 Sigma 公司(Lot, A1010), 以 PBS 溶解为 1 mmol/L 储存液, 过滤后 4 °C 冰箱内保存。使用前以 RPMI 1640 培养基配成不同浓度。RPMI 1640 培养基购自 Gibco BRL 公司。秋水仙素购自北

京华美公司; BCA 蛋白定量试剂盒为 Pierce 公司产品; Western 印迹鲁米诺试剂盒、抗 TRF1 抗体、抗 TRF2 抗体、二抗均为 Santa Cruz 公司产品; 抗 PCNA、 β 肌动蛋白抗体为 Neomarker 公司产品。

1.2 细胞培养

MGC803 细胞(山东师范大学生物系建株, 为人胃低分化黏液癌, 从中南大学湘雅医学院肿瘤所引进)以含 10% 灭活的小牛血清、100 u/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 RPMI 1640 培养基, 在 5% CO_2 、37 °C、湿度 95% 的二氧化碳培养箱内培养。培养细胞单层生长、融和贴壁达 90% 时, 以 0.25% 胰蛋白酶消化, 常规传代培养。取对数生长期细胞用于实验。

1.3 染色体分析

前期 MTT 结果显示: 经 1~10 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理, 人 MGC803 细胞生长抑制, 出现凋亡改变; 而小于 1 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 作用后, 细胞生长增强, 故选用小于 1 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 浓度为实验终浓度。用 0.625 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理 MGC803 细胞 2 周、4 周, 于培养终止前 1.67 h 加入终浓度为 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 秋水仙素, 常规收集细胞、低渗、固定、滴片、10%

收稿日期: 2005-01-25 接受日期: 2005-05-27

湖南省自然科学基金资助项目(No.02JJY2026)

* 通讯作者。Tel: 0734-8281075, E-mail: Liangxiaojie505@hotmail.com

Giemsa 染色。每组观察 1000 个细胞，记录有丝分裂中期细胞数量，计算有丝分裂指数(mitotic index, MI)。每组选择 100 个分散良好的中期分裂相进行镜检分析，分别计算各组不同类型畸变染色体出现频率。均经 2~3 名专业人员确认，并详细记录，试验重复 3 次。

1.4 Western 印迹分析

As₂O₃ 处理细胞 2 周、4 周后收集细胞，以冷 PBS 洗两次，加入适量的高盐裂解缓冲液(10 mmol/L HEPES pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L PMSF, 0.5 mmol/L DTT)于 4 °C 裂解 10 min, 3 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 沉淀用适量低盐裂解缓冲液(20 mmol/L HEPES pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl₂, 25% 甘油, 10 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L EDTA, 0.2 mmol/L PMSF, 0.5 mmol/L DTT)重悬, 逐滴加入 2.5 mol/L KCl 至终浓度 0.4 mol/L, 轻轻摇动, 冰上温育 30 min, 于 4 °C 离心, 12 000 r/min 离心 30 min, 吸出上清液, 即为细胞核蛋白, 用 BCA 法进行蛋白质定量。调节每份样品浓度, 以每孔 20 μg 的蛋白质量上样, 样品加入等体积 2 × SDS 加样缓冲液, 沸水煮沸 10 min, 经 10% SDS-PAGE 胶电泳后转膜, 膜用 7% BSA 封闭后, 加入相应的一抗, 二抗温育, 用 Western 印迹鲁米诺试

剂盒检测蛋白质表达状况。薄层扫描仪(日本产, 型号 CS-930)测定印迹区带的光密度值。

1.5 统计学处理

结果采用 SPSS10.0 统计学软件进行分析, 用 χ^2 检验, *t* 检验比较处理组与对照组的区别。

2 结果

2.1 砷对 MGC803 细胞增殖的影响

分裂指数可反映细胞分裂增殖能力, 如表 1 所示对照组分裂指数为 353.1‰, 0.625 μmol/L As₂O₃ 处理 MGC803 细胞 2 周的分裂指数为 366.0‰, 与对照组比较无差别(*P*>0.05), 处理 4 周的分裂指数为 526.3‰, 较对照组明显增加(*P*<0.01)。PCNA 是反映细胞增殖能力的指标。Western 印迹分析表明 PCNA 在 0.625 μmol/L As₂O₃ 处理 4 周后表达明显高于对照组(*P*<0.05)(图 1)。显示小剂量 As₂O₃ 长期处理后 MGC803 细胞增殖能力增强。

2.2 砷对 MGC803 细胞染色体畸变的影响

镜检观察 As₂O₃ 引起 MGC803 细胞染色体畸变的类型主要有染色体断裂、双或多着丝粒染色体、环形染色体(图 2)。如表 2 所示 0.625 μmol/L As₂O₃ 处理 MGC803 细胞 2 周后, 细胞总畸变率与未加 As₂O₃ 的对照组比较无差别(*P*>0.05)。处理 4 周后,

表 1 As₂O₃ 对 MGC803 细胞有丝分裂指数(MI)的影响

处理时间 (周)	分析细胞个数 (个)	中期细胞数($\bar{x} \pm s$)		MI (‰)	
		0 μmol/L As ₂ O ₃	0.625 μmol/L As ₂ O ₃	0 μmol/L As ₂ O ₃	0.625 μmol/L As ₂ O ₃
0	1000	352.3±4.9	353.1±7.0	352.3	353.1
2	1000	355.0±4.3	366.0±3.6	355.0	366.0
4	1000	355.7±2.5	526.3±6.0	355.7	526.3**

与对照相比, ***P*<0.01。

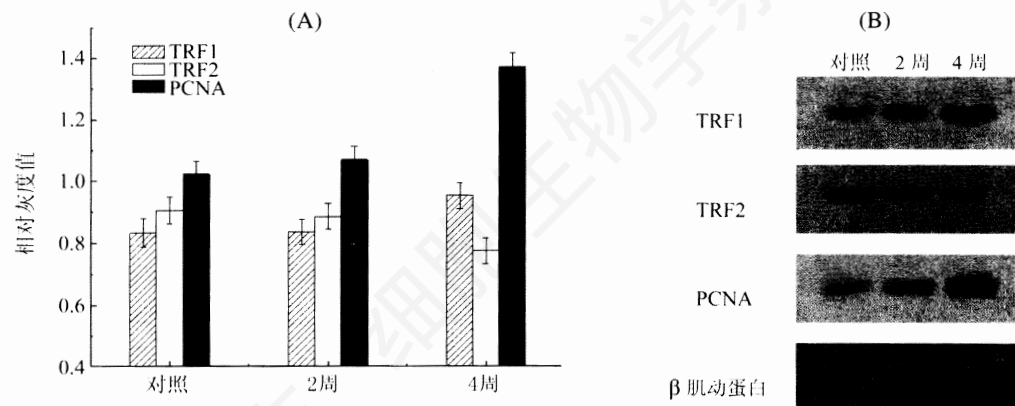


图 1 0.625 μmol/L As₂O₃ 处理 2 周、4 周对 MGC803 细胞 TRF1、TRF2、PCNA 表达的影响

(A) 0.625 μmol/L As₂O₃ 处理 MGC803 细胞 2 周、4 周后, TRF1、TRF2、PCNA 条带相对灰度值。(B) Western 印迹分析结果。经 0.625 μmol/L As₂O₃ 处理 4 周后, TRF1、PCNA 表达上调, TRF2 表达下调。

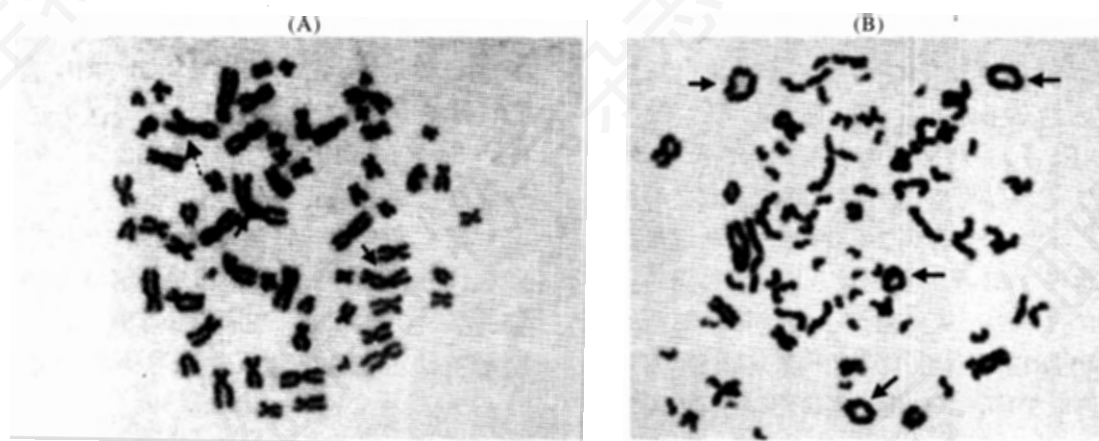


图2 0.625 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理 4 周致 MGC803 细胞染色体畸变
(A)实线箭头表示双着丝粒染色体, 虚线箭头表示染色体断裂; (B)箭头表示环形染色体。

表2 As_2O_3 诱发 MGC803 细胞染色体结构畸变率

处理时间 (周)	断裂($\bar{x} \pm s$)		双或多着丝粒($\bar{x} \pm s$)		环形($\bar{x} \pm s$)		总畸变率 (%)
	0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3	0.625 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3	0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3	0.625 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3	0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3	0.625 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3	
0	5.3 \pm 1.5	5.3 \pm 1.2	10.7 \pm 1.2	10.6 \pm 0.6	2.7 \pm 1.2	2.6 \pm 0.5	18.7
2	5.4 \pm 0.5	8.1 \pm 1.0	10.3 \pm 0.5	14.3 \pm 1.2	2.6 \pm 1.5	3.6 \pm 1.6	26.0
4	5.6 \pm 0.6	10.3 \pm 1.2*	10.6 \pm 1.1	31.7 \pm 3.2*	2.9 \pm 0.7	7.7 \pm 1.0*	49.7*

与对照相比, * $P < 0.05$, $n = 100$ 。

MGC803 细胞总畸变率明显高于对照组, 差异有显著性($P < 0.01$)。对 0.625 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理后 MGC803 染色体数目进行统计, 处理组与未处理组比较无差别($P > 0.05$)。

2.3 砷对 MGC803 细胞 TRF1、TRF2 表达的影响

由于染色体畸变主要表现为双或多着丝粒、环形染色体, 均由末端融合所致。因此, 本实验观察了影响染色体端粒结构稳定性的主要蛋白质 TRF1、TRF2 的表达情况。Western 印迹分析检测 MGC803 细胞经 0.625 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理不同时间后, TRF1、TRF2 表达变化情况(实验重复 3 次)。TRF1 在 0.625 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理 2 周后与对照组比较无差别($P > 0.05$), 在处理 4 周后, TRF1 表达高于对照组 ($P < 0.05$)。而 TRF2 在 0.625 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理 2 周后表达无差别($P > 0.05$), 在处理 4 周后与对照组比较明显下降($P < 0.05$)(图 1)。

3 讨论

本文通过对 MI 分析及 PCNA 表达分析发现: 低浓度砷处理 MGC803 细胞 4 周, 可使其分裂增殖能力增强, 这将是导致肿瘤细胞进展或正常细胞癌变的基础。本实验结果提示经小剂量 As_2O_3 长期处理的 MGC803 细胞染色体畸变率明显高于对照组

($P < 0.05$)。畸变类型以融合染色体(即双或多着丝粒、环形染色体)为主, 由染色体端-端融合所致。

染色体畸变分析观察的细胞经历了一个分裂周期, 其染色体畸变是 DNA 损伤经过修复后的综合表现。染色体畸变率可以被当作判断遗传物质受到损伤程度大小的依据^[6]。动物实验表明, As_2O_3 对雄性小鼠具有明显的遗传毒性, 可使小鼠精子的畸变率及骨髓嗜多染红细胞(PCE)微核率增加($P < 0.001$)^[7]。Chou 等^[8]在研究 NB4 细胞对砷剂产生抵抗的机制中发现: 砷剂通过降低 c-Myc 及 Sp1 转录因子活性, 抑制编码端粒酶逆转录亚单位的 hTERT 基因转录, 从而抑制端粒酶活性, 使染色体末端融合, 进而致使基因不稳定; Sciandrello 等^[9]研究表明: 砷剂可通过诱导 DNA 低甲基化而使染色体重排, 出现双着丝粒染色体等畸变; Liu 等^[10]通过实验证实: 砷诱导氧化应激, 使端粒磨损, 染色体末端融合, 从而影响染色体稳定性。

端粒是真核生物染色体末端以(TTAGGG) $_n$ 为特征的一段重复序列, 它可以防止染色体末端降解、融合、重组。空间上是 3' 端富含 G 的序列(称为 T 环)插入端粒重复序列的双链之间置换形成环状结构, 此环状结构亦称为 D 环。TRF1、TRF2 是维持端粒这种环状结构的重要结合蛋白^[5]。TRF1 结合在 T 环上, 与端粒长度的调节密切相关, 其结合于

端粒DNA上的数量可作为负性的长度依赖性调节因子；电镜显示在体外 TRF1 形成一种蛋白质丝状物，能促使两条 DNA 链相互连接。

与 TRF1 不同，TRF2 与 D 环结合，位置重要，是整个大 T 环得以形成的关键。除去 TRF2 的体外 T 环形成率可由 42% 降到 2%~12%^[10]。通过维持端粒功能性单链 3'-G 尾的稳定性，TRF2 起到防止其端-端融合的作用，从而保护了染色体及细胞的完整性。抑制 TRF2 可导致 T 环结构破坏或 DNA 复制后不能再形成 T 环，3'-G 尾丢失可出现于 DNA 复制前或通过 DNA 复制产生钝性末端产物。由于缺乏 TRF2 功能，钝性末端端粒不再延伸而成为 DNA 连接酶 IV 的作用底物，形成非同源性末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)，结果在 DNA 复制前或后产生两个端粒间的共价融合，即端-端融合，表现为染色体出现双或多着丝粒染色体、环形染色体等畸形改变^[11]。

本实验运用 Western 印迹对 As₂O₃ 致 MGC803 细胞染色体畸变过程中 TRF1、TRF2 表达水平进行检测，结果显示：0.625 μmol/L As₂O₃ 处理 MGC803

细胞 4 周后，TRF1 表达上升、TRF2 表达下降($P < 0.05$)。提示 As₂O₃ 可能通过上调 TRF1 表达、下调 TRF2 表达，改变端粒空间结构，失去其对双链 DNA 的保护作用，致使染色体畸变，基因不稳定，肿瘤细胞进展或正常细胞癌变。

研究结果提示低浓度砷长期作用能上调 TRF1 表达、下调 TRF2 表达，致染色体末端融合为主的染色体畸变率增加，基因组稳定性下降，而加快细胞增殖，这也许是砷致癌的可能机制之一。

参考文献 (References)

- [1] Liu L *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 31998
- [2] Lee-chen SF *et al.* *Mutat Res*, 1993, **294**: 21
- [3] Jha AN *et al.* *Mutat Res*, 1992, **284**: 215
- [4] Dong JT *et al.* *Mutat Res*, 1994, **315**: 11
- [5] Stansel RM *et al.* *EMBO J*, 2001, **20**: 5532
- [6] 纪之莹等. *卫生毒理学杂志*, 2004, **18**: 82
- [7] 钱晓薇等. *细胞生物学杂志*, 2003, **25**: 179
- [8] Chou WC *et al.* *J Clin Invest*, 2001, **108**: 1541
- [9] Sciandrello G *et al.* *Carcinogenesis*, 2004, **25**: 413
- [10] Griffith JD *et al.* *Cell*, 1999, **97**: 503
- [11] de Lange T. *Oncogene*, 2002, **21**: 532

Role of TRF1, TRF2 in Chromosomal Aberrance of MGC803 Cells Induced by Arsenic

Yang Zhang, Qi Su, Ying Song, Rong-Jun Tang, Jian-Guo Zhou, Lin Dong, Xiao-Qiu Liang*
(Institute of Oncology, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

Abstract The purpose of this experiment is to investigate the role of telomeric repeat binding factor1, 2 (TRF1, TRF2) in the process of chromosomal aberrance of MGC803 cells induced by arsenic, and to explore the possible mechanism of cell proliferation and carcinogenesis induced by arsenic. Human gastric cancer MGC803 cells were used in the experiments, the aberrated rate and mitotic index of MGC803 cells were detected by chromosomal analysis. Expression of TRF1, TRF2 and PCNA were detected by Western blot. Both mitotic index and expression of PCNA in MGC803 cells exposure to 0.625 μmol/L As₂O₃ for 4 week were higher than that of the controls. Chromosomal analysis indicated that the aberrance rates of MGC803 cells were significantly higher than that of the controls, and the most type of aberrances was chromosomal fusion (double or multi-centromere, ringed chromosome). Western blot analysis showed the expression of TRF1 was up-regulated while TRF2 was down-regulated. The present results suggest that the up-regulation of TRF1 and down-regulation of TRF2 could increased chromosomal aberration rate and genome instability in MGC803 cells by long-term exposure to low concentration arsenic.

Key words arsenic; MGC803 cell; telomeric repeat binding factor; chromosomal aberrance

Received: January 25, 2005 Accepted: May 27, 2005

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (No.02JJY2026)

*Corresponding author. Tel: 86-734-8281075, E-mail: Liangxiaoqiu505@hotmail.com