

大黄素对宫颈癌Hela细胞端粒损伤作用的研究

刘晶 周天兴 刘蕊 肖英男 耿鑫 王峰*

(天津医科大学基础医学院, 天津 300070)

摘要 该文探究了抗肿瘤药物、化疗增敏剂大黄素对人宫颈癌Hela细胞端粒和端粒酶活性的影响。利用磷酸化组蛋白H2AX(γ -H2AX)免疫荧光-端粒荧光原位杂交技术检测端粒区特异性DNA损伤水平。利用中期染色体-端粒荧光原位杂交技术检测端粒异常信号, 包括多端粒信号(multitelomeric signals, MTSs)和端粒信号缺失(signal free ends, SFEs)。利用荧光定量PCR方法和端粒重复扩增程序分别检测端粒相对长度和端粒酶活性。结果显示, 与0 μ mol/L对照组相比, 20 μ mol/L大黄素处理Hela细胞48 h能够诱导端粒长度缩短至80%, 同时还发现端粒功能障碍损伤灶(telomere dysfunction induced foci, TIFs)和端粒异常信号增多, 包括MTSs由1.65%增加至3.98% ($P < 0.01$)、SFEs由2.74%增加至8.49% ($P < 0.01$)。同时, 结果还发现, 大黄素处理后, Hela细胞端粒酶活性显著升高, 10 μ mol/L和20 μ mol/L大黄素处理48 h后, 端粒酶活性分别升高为对照组的1.42倍 ($P < 0.05$)和1.92倍 ($P < 0.01$)。综上, 实验结果表明, 大黄素的急性暴露能够引起端粒功能障碍以及端粒酶活性升高, 后者可能与端粒损伤后修复有关。

关键词 大黄素; 端粒; 端粒酶; DNA损伤反应

Emodin Triggers Telomere Dysfunction in Hela Cells

Liu Jing, Zhou Tianxing, Liu Rui, Xiao Yingnan, Geng Xin, Wang Feng*

(School of Basic Medical, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract This study was aimed to investigate the effect of emodin, an anticancer drug and chemosensitizer, on telomere and telomerase activity in Hela cells. Telomere specific DNA damage level was detected by phosphated histone family 2A variant (H2AX), referred as γ -H2AX immunofluorescence-telomere fluorescence *in situ* hybridization. Metaphase-telomere FISH was used to detect abnormal telomere signals, including multitelomeric signals (MTSs) and telomere signal free ends (SFEs). Quantitative real-time PCR and telomere repeat amplification protocol were used to detect relative telomere length and telomerase activity respectively. The results demonstrated that compared with the control group (0 μ mol/L), emodin (20 μ mol/L) treatment for 48 h shortened the telomere length to 80% and increased the frequency of telomere dysfunction induced foci (TIFs) and abnormal telomere signals, including MTSs increasing from 1.65% to 3.98% ($P < 0.01$) and SFEs increasing from 2.74% to 8.49% ($P < 0.01$). To our surprise, telomerase up-regulation was detected following emodin treatment. The telomerase activities of Hela cells treated by 10 μ mol/L and 20 μ mol/L emodin for 48 hours were up-regulated to 1.42 times ($P < 0.05$) and 1.92 times ($P < 0.01$) respectively compared with the

收稿日期: 2017-09-06 接受日期: 2017-11-13

国家自然科学基金(批准号: 31471293、91649102、81671054、81771135)和天津市应用基础与前沿技术计划(批准号: 14JCYBJC41900、15JCZDJC35100)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-83336839, E-mail: Wangf@tmu.edu.cn

Received: September 6, 2017 Accepted: November 13, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31471293, 91649102, 81671054, 81771135) and Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (Grant No.14JCYBJC41900, 15JCZDJC35100)

*Corresponding author. Tel: +86-22-83336839, E-mail: Wangf@tmu.edu.cn

网络出版时间: 2018-01-29 17:33:15

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180129.1733.016.html>

control group. Taken together, the results suggested that emodin acute treatment triggered telomere dysfunction and telomerase activity up-regulation. The elevated telomerase activity induced by emodin may be related to repairment after telomere dysfunction.

Keywords emodin; telomere; telomerase; DNA damage response

端粒位于真核细胞染色体末端, 是一种由重复DNA序列和端粒相关蛋白构成的“帽子”样的特殊结构^[1], 其主要功能是稳定染色体末端结构, 防止染色体末端被识别为损伤的DNA而诱导DNA损伤反应和异常的DNA修复, 防止染色体末端融合、重组和丢失^[1-2]。末端复制问题、外切酶活性异常升高及端粒DNA损伤等可以导致端粒功能障碍, 进而促进基因突变的发生, 造成基因组不稳定、染色体融合等严重后果, 从而对细胞增殖产生恶劣影响^[3-4]。端粒酶是一种具有逆转录活性的核糖核蛋白复合体, 能够以自身RNA为模板, 在染色体末端合成重复的端粒DNA序列, 以延长和维持端粒长度不变^[5]。端粒酶活性在细胞内受到严格调控, 大多数正常体细胞中不能检测到端粒酶活性, 永生化细胞和90%以上的恶性肿瘤细胞中可以检测到端粒酶活性^[6]。端粒长度和端粒酶活性与肿瘤和衰老等密切相关, 因而对端粒功能和端粒酶活性调控的研究成为近年的研究热点^[7]。

大黄素(1,3,8-三羟基-6-甲基蒽醌)是中药大黄的主要成分, 具有利尿、保肝、抗菌、抗病毒和保护心脑血管等多种功能^[8]。现代药理学研究表明, 大黄素具有抑制乳腺癌^[9]、肝癌^[10]和肺癌^[11]等肿瘤细胞增殖的功能, 并有化疗增敏的功效^[12]。有研究证实, 大黄素能够抑制拓扑异构酶II的活性, 造成DNA双链断裂(double strands breaks, DSBs)^[13]。尽管现代研究对大黄素的抗肿瘤机制有了一定认识, 但其对端粒结构及端粒酶活性的影响尚未报道。本研究以人宫颈癌细胞(Hela细胞)为模型, 首次探究了大黄素对端粒和端粒酶活性的影响, 为大黄素的临床抗肿瘤应用提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大黄素(emodin)购自Sigma公司, 用二甲基亚砜(DMSO)溶解后, 于4 °C避光保存, 待用。

1.2 试剂及仪器

二甲基亚砜(DMSO)、PMSF、Triton X-100和

Tween-20均购自Sigma公司。胎牛血清、RPMI-1640培养基和DMEM培养基均购自Biological Industries公司。胰蛋白酶购自Gibco公司。基因组DNA提取试剂盒购自Biomiga公司。SYBR Green qPCR试剂盒购自Invitrogen公司。Taq DNA聚合酶和10×PCR buffer购自TaKaRa公司。 γ -H2AX鼠抗体购自MilliPore公司。Alexa Fluor 555山羊抗小鼠IgG(H+L)抗体购自Thermo公司。TelC-FITC探针购自Panagene公司。四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自索莱宝生物科技有限公司。其余常用化学试剂购自国药集团。

电泳仪购自Bio-Rad公司。Eco实时荧光定量PCR仪系统购自Illumine公司。荧光倒置显微镜购自Nikon公司。

1.3 细胞培养

人宫颈癌Hela细胞培养于含有10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素(青霉素浓度为100 U/mL, 链霉素浓度为100 ng/mL)的RPMI-1640培养基中, 人结肠癌HCT116细胞培养于含有10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素(青霉素浓度为100 U/mL, 链霉素浓度为100 ng/mL)的DMEM培养基中, 将两种细胞置于在37 °C、5% CO₂细胞培养箱中生长。每2~3 d传代一次。

1.4 大黄素对Hela细胞和HCT116细胞的生长抑制作用

1.4.1 大黄素对Hela细胞的生长抑制作用 将 1.5×10^6 Hela细胞/皿接种于10 cm细胞培养皿中, 分别给予0.1% DMSO(对照组)和1 μ mol/L、5 μ mol/L和10 μ mol/L大黄素处理, 每2~3 d传代1次并用血球计数板计数细胞数目, 每次传代时接种在新的培养皿中的细胞数目均为 1.5×10^6 /皿, 共培养9 d。绘制细胞生长曲线。对照组和实验组均设3个复孔。

1.4.2 大黄素对HCT116细胞的生长抑制作用 取对数生长期HCT116细胞, 5 000/孔接种于96孔板中, 每孔100 μ L。在培养箱中培养至细胞贴壁后, 分别加入不同浓度大黄素(使终浓度为0 μ mol/L、5 μ mol/L、10 μ mol/L和20 μ mol/L), 每组5个复孔, 培养48 h或72 h后每孔加入20 μ L MTT(5 g/L), 继续培养4 h, 弃去上

清。每孔加入100 μL DMSO, 摇床低速震荡10 min, 于酶标仪490 nm处测吸光(D)值, 计算细胞生存率。细胞生存率= $(D_{\text{用药组}}/D_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。实验重复3次, 取平均值。

1.5 免疫荧光-荧光原位杂交(IF-FISH)技术

将Hela细胞以 10^6 /孔接种于6孔板盖玻片上, 在细胞对数生长期加入不同浓度的大黄素(0、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)继续培养48 h, 随后用2%多聚甲醛固定5 min, 0.5% Triton X-100的PBS液常温通透20 min。用Blocking reagent封闭10 min, TelC-FITC探针FISH杂交液35 μL /片于暗室85 $^{\circ}\text{C}$ 变性3 min, 常温杂交2 h。用洗涤溶液A(2 \times SSC pH7.2, 50%甲酰胺, 0.1% SDS)洗涤2次, 每次15 min。洗涤溶液B(4 \times SSC pH7.2/0.1% Tween-20)洗涤3次, 每次5 min。随后用PBG封闭1 h后, 一抗 γ -H2AX鼠抗体(1:2 000)常温孵育1 h, 1 \times PBST(0.1% Tween-20的PBS液)常温振荡5 min, 4次。二抗Alexa Fluor 555山羊抗小鼠IgG(H+L)IF(1:2 000), 常温避光孵育30 min, 1 \times PBST常温避光振荡5 min, 4次。最后用70%、90%、100%酒精梯度脱水各2 min, 晾干后用抗荧光猝灭剂封片, 荧光显微镜下观察显像。实验独立重复3次。

1.6 分裂中期细胞收获及染色体片制备

用0 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和20 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素处理Hela细胞48 h后, 于培养液中加入秋水仙素至终质量浓度0.1 $\mu\text{g/mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 胰酶37 $^{\circ}\text{C}$ 消化, 用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液终止反应, 1 000 r/min离心5 min。逐滴加入0.075 mol/L KCl溶液37 $^{\circ}\text{C}$ 裂解30 min, 随后用固定液(甲醇:冰醋酸为3:1)固定, 滴3~4滴细胞悬液于4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷载玻片, 固定液冲洗, 85 $^{\circ}\text{C}$ 干燥2~3 min, 显微镜下观察, 选取中期分裂相比较多的区域并做好标记。实验独立重复3次。

1.7 端粒长度检测

收集不同药物浓度处理48 h的Hela细胞, 利用

DNA提取试剂盒提取细胞基因组DNA。用缓冲液TE稀释基因组DNA至20 ng/ μL 。PCR反应体系总体积为10 μL , 其中包括: SYBR Green Mix 5 μL 、上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各0.3 μL 、DNA模板1 μL 、DTT 0.4 μL 、Betaine 0.8 μL 、双蒸水2.2 μL , 每个样本设置3个复孔。以36B4为内参基因。36B4基因上游引物序列(F)为: 5'-CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC-3', 下游引物序列(R)为: 5'-CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A-3'; 端粒序列上游引物序列(F)为: 5'-GGT TTT TGA GGG TGA GGG TGA GGG TGA GGT-3', 下游引物序列(R)为: 5'-TCC CGA CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA-3'。PCR反应程序设置为: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 49 $^{\circ}\text{C}$ 15 s进行2个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 74 $^{\circ}\text{C}$ 15 s进行40个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s终止反应。反应结束后, 每个样本会得到关于36B4和端粒的两组Ct值, 利用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算基因组端粒对内参基因36B4的相对表达量。实验独立重复3次。

1.8 端粒重复扩增程序(telomeric repeat amplification protocol, TRAP)检测端粒酶活性

收集药物处理后的Hela细胞(约 2×10^6)并加入400 μL 的1 \times CHAPS裂解液(10 mmol/L Tris-HCL(pH7.5)、1 mmol/L MgCl_2 、1 mmol/L EGTA、0.5% CHAPS、10%甘油)、50 μL PMSF(1 mmol/L)、50 μL DTT(10 mmol/L)和0.5 μL RNA酶抑制剂(10 U/mL)。4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解40 min后于4 $^{\circ}\text{C}$ 、16 000 $\times g$ 离心40 min。吸取上清液分装至无菌无酶离心管中, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。全程冰上操作。TRAP采用两步法进行PCR。第一步25 μL 的PCR反应体系包括2.5 μL 10 \times TRAP缓冲液、2.5 μL dNTP(2.5 mmol/L)、1 μL TS(10 mmol/L)、1 μL TSNT(10 pmol/L)、1 μL 细胞抽提液、0.25 μL RNA酶抑制剂(10 U/mL)及16.75 μL 无酶水, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。第二步25 μL 的反应体系为1 μL TS(10 mmol/L)、1 μL ACX(10 mmol/L)、1 μL NT(10 mmol/L)、2.5 μL

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
TS	5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT-3'
TSNT	5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT AAA AGG CCG AGA AGC GAT-3'
ACX	5'-GCG CGG (CTT ACC) ₃ CTA ACC-3'
NT	5'-ATC GCT TCT CGG CCT TTT-3'

dNTP(2.5 mmol/L)、2.5 μ L 10 \times PCR buffer、0.2 μ L Taq酶(5 U/ μ L)和5 μ L的第一步PCR产物, 无酶水补足至25 μ L。按照90 $^{\circ}$ C, 30 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 55 $^{\circ}$ C, 30 s; 持续32个循环; 72 $^{\circ}$ C, 5 min。对第二步PCR产物进行12%聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 用EB(1:1 000稀释)染色30 min, 去离子水洗2~3次, 利用紫外凝胶成像系统分析。其中, 10 \times TRAP缓冲液成分: 200 mmol/L Tris-HCl(pH8.3)、15 mmol/L MgCl₂、630 mmol/L KCl、10 mmol/L EGTA和0.05% Tween-20。引物序列见表1。实验独立重复3次。

1.9 数据统计

实验数据利用SPSS 16.0进行统计分析, 各组间比较采用独立样本 t 检验, 定量结果用mean \pm S.D.表示。 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 大黄素对Hela细胞和HCT116细胞的增殖抑制作用

低浓度(1 μ mol/L、5 μ mol/L和10 μ mol/L)大黄素处理Hela细胞9 d, 每2~3 d传代一次, 同时计数细胞个数, 绘制细胞生长曲线(图1A)。与0 μ mol/L对照组相比, 大黄素对Hela细胞增殖具有明显的抑制作用, 并随药物浓度的增加而增加。

大黄素(5 μ mol/L、10 μ mol/L和20 μ mol/L)处理HCT116细胞48 h(或72 h), MTT法测定HCT116细胞生存率。结果显示, 与0 μ mol/L对照组相比, 10 μ mol/L和20 μ mol/L大黄素处理48 h(或72 h)对

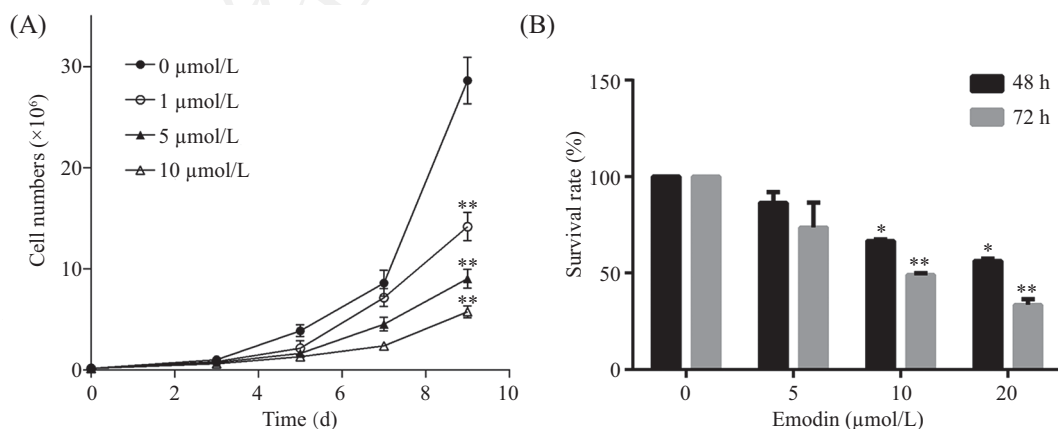
HCT116细胞具有显著的增殖抑制作用(图1B)。同一作用时间, 药物浓度越高, 抑制增殖作用越明显; 同一药物浓度, 作用时间越长, 抑制增殖作用越明显(图1B)。

2.2 大黄素造成严重的DNA损伤

用 γ -H2AX抗体标记总基因组DSBs信号(红色), 利用免疫荧光技术检测大黄素对DNA双链的损伤程度。免疫荧光结果显示, 与0 μ mol/L对照组相比, 大黄素(10 μ mol/L和20 μ mol/L)处理48 h引起明显增多的 γ -H2AX信号(图2A); 每组计数100个细胞核, 统计每个细胞核内 γ -H2AX信号的数目, 统计结果见图2B。由此可见, 大黄素处理能够引起Hela细胞严重的DNA损伤。

2.3 大黄素诱导端粒区特异性DNA损伤

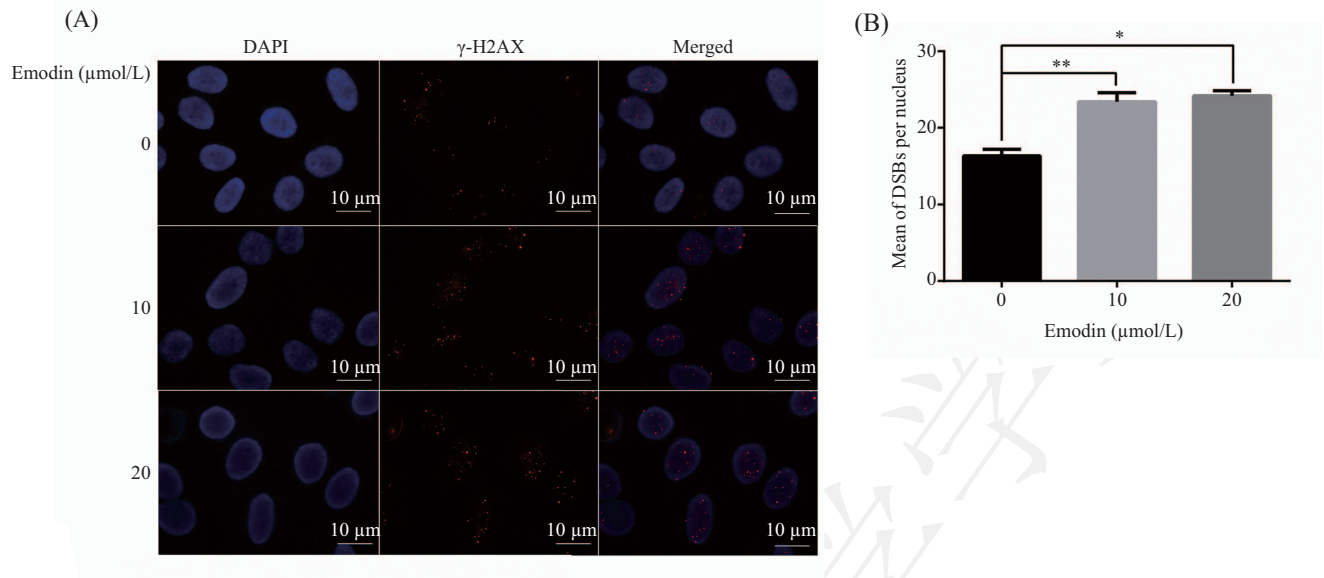
为了进一步探究大黄素对端粒区DNA的损伤作用, 我们用 γ -H2AX抗体和FITC探针分别标记了总基因组DSBs信号(红色)和端粒信号(绿色), 两种信号的重合代表端粒区特异性DNA损伤(图3A中白色箭头所示), 即端粒功能障碍损伤灶(telomere dysfunction induced foci, TIFs)。细胞核用DAPI染色(蓝色)。结果显示, 不同浓度大黄素(10 μ mol/L和20 μ mol/L)处理48 h后, 细胞内TIFs数目增多(图3A); 将含有 ≥ 4 个TIFs的细胞计为TIFs阳性细胞, 图3B显示了大黄素处理后, TIFs阳性细胞占总细胞个数的比例(计数细胞总数 ≥ 100 /组), 可见10 μ mol/L和20 μ mol/L大黄素能够诱导明显的端粒区DNA损伤($P<0.05$)。值得注意的是, 与0 μ mol/L对照组相比,



A: 大黄素处理Hela细胞生长曲线(9 d); B: 大黄素处理HCT116细胞48 h(或72 h)后的细胞生存率。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组(0 μ mol/L)比较。
A: growth curve of Hela cells treated with emodin (9 days); B: the survival rate of HCT116 cells following emodin treatment for 48 h (or 72 h).
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control (0 μ mol/L) group.

图1 大黄素对Hela细胞和HCT116细胞的增殖抑制作用

Fig.1 The anti-proliferation effect of emodin on Hela cells and HCT116 cells

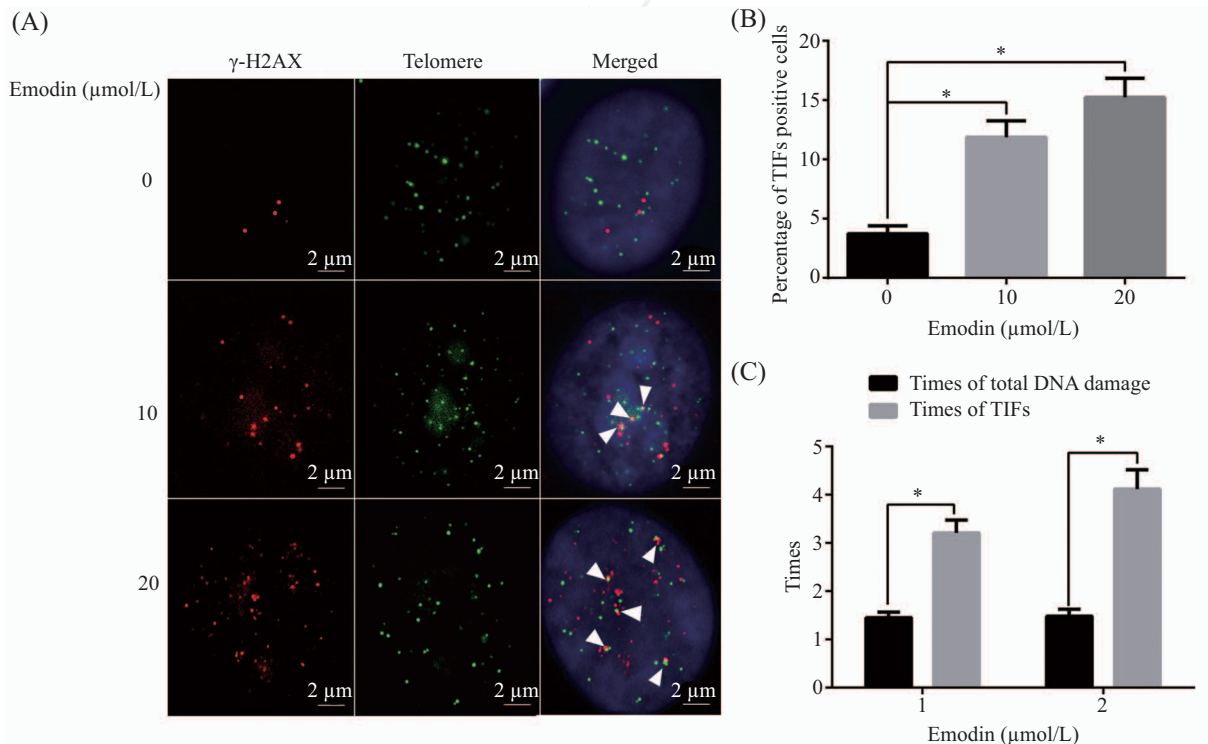


A: 大黄素处理48 h后, γ -H2AX免疫荧光染色。蓝色为DAPI染色, 红色代表 γ -H2AX信号; B: 大黄素处理后, 平均每个细胞核中DSBs个数; 每组至少计数100个细胞核。* P <0.05, ** P <0.01。

A: images of γ -H2AX immunofluorescence staining following emodin 48 h treatment; blue indicates DAPI staining; red indicates γ -H2AX signals; B: average number of DSBs per nucleus following emodin treatment. More than 100 nuclei were analyzed per group. * P <0.05, ** P <0.01.

图2 大黄素对DSBs生成的影响

Fig.2 The effect of emodin on DSBs production



A: 大黄素处理48 h后, γ -H2AX免疫荧光-端粒FISH染色; 红色代表 γ -H2AX信号, 绿色代表端粒信号, 蓝色为DAPI染色, 白色箭头指示端粒功能异常损伤灶TIFs; B: 大黄素处理后, TIFs阳性细胞所占的百分比; C: 大黄素处理组总DSBs及端粒功能异常损伤灶TIFs升高的倍数(与对照组相比)。每组至少计数100个细胞核。* P <0.05, ** P <0.01。

A: images of γ -H2AX immunofluorescence-telomere FISH staining following emodin 48 h treatment; red indicates γ -H2AX signals; green indicates telomere signals; blue indicates DAPI staining; white arrows indicate TIFs; B: percentages of TIFs positive cells following emodin treatment; C: the activation times of total DSBs and TIFs in emodin treatment groups (compared with the control group). More the 100 nuclei were analyzed per group. * P <0.05, ** P <0.01.

图3 大黄素造成端粒区特异性DSBs

Fig.3 Emodin caused telomere specific DSBs

10 $\mu\text{mol/L}$ 组诱导总基因组DSBs的个数是对照组的 1.45 ± 0.02 倍, 诱导TIFs的数目是对照组的 3.30 ± 0.49 倍(图3C), 后者明显高于前者($P<0.05$); 20 $\mu\text{mol/L}$ 组分别为 1.48 ± 0.10 和 6.47 ± 1.95 倍(图3C), 后者明显高于前者($P<0.01$)。以上结果表明, 与引起总基因组DNA损伤相比, 大黄素更倾向于引起端粒区特异性DNA损伤。

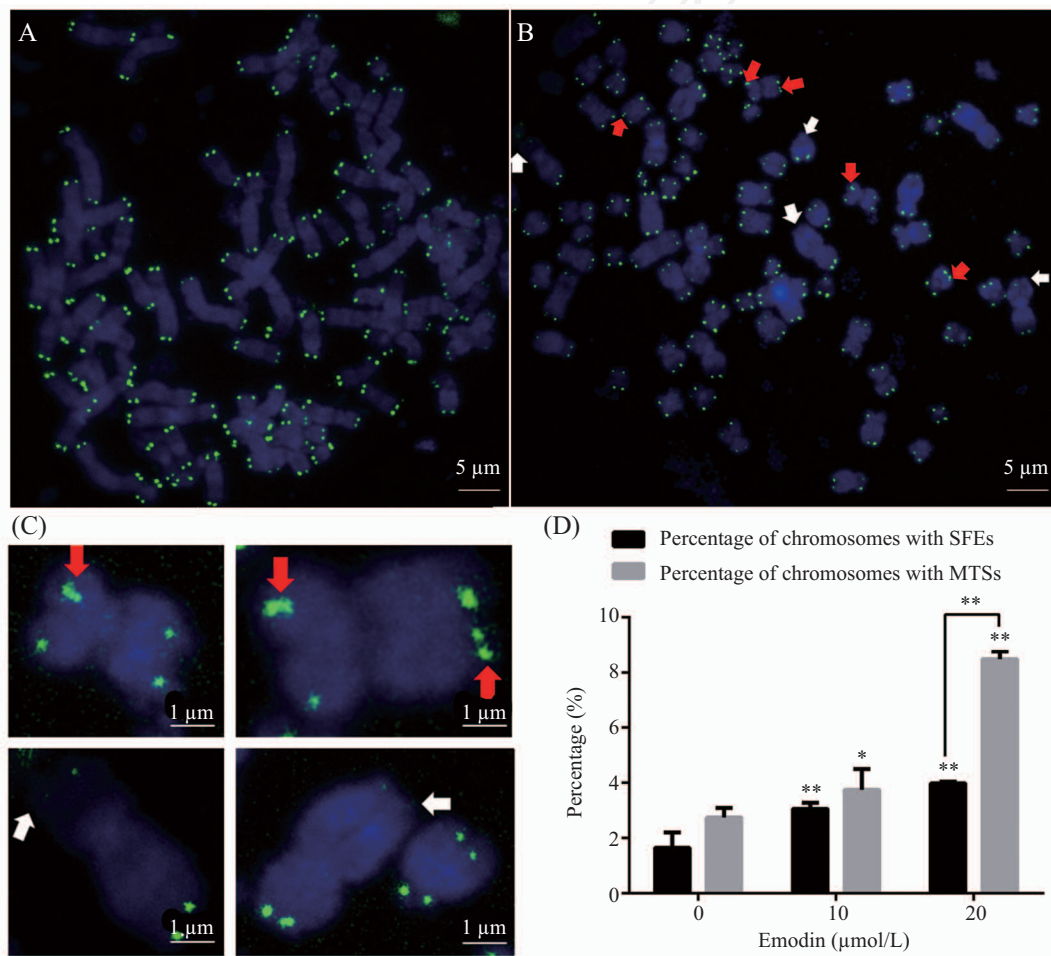
2.4 大黄素诱导Hela细胞异常端粒信号明显增多

为了进一步明确大黄素对Hela细胞端粒的损伤情况, 我们利用中期染色体-FISH技术检测染色体末端端粒状态。结果显示, 与0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 10 $\mu\text{mol/L}$ 和20 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素处理Hela细胞48 h

后, 染色体末端的异常端粒信号, 包括多端粒信号(multitelomeric signals, MTSs)和染色体末端端粒信号缺失(signal free ends, SFEs)明显增多, 差异有统计学意义($P<0.05$)。同时, 20 $\mu\text{mol/L}$ 处理组引起的MTSs明显多于SFEs($P<0.01$)(图4)。

2.5 大黄素造成Hela细胞端粒长度缩短

Hela细胞经0 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和20 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素处理48 h后, 利用荧光定量PCR方法检测端粒长度。以0 $\mu\text{mol/L}$ 对照组的端粒长度为1, 大黄素处理48 h后细胞的端粒长度显著缩短: 10 $\mu\text{mol/L}$ 组缩短为对照组的 0.85 ± 0.06 倍($P<0.05$), 20 $\mu\text{mol/L}$ 组缩短为对照组的 0.80 ± 0.04 倍($P<0.05$)(图5)。

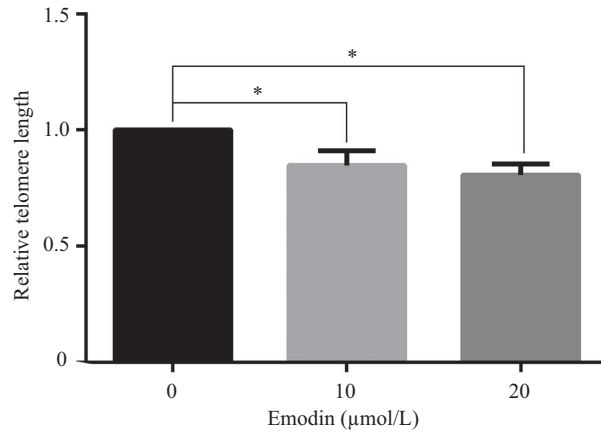


A、B: 0 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素处理后, Hela细胞染色体(蓝色)和末端端粒信号(绿色)的变化。红色箭头指示MTSs, 白色箭头指示SFEs。C: 图B中部分染色体放大图像。D: 大黄素处理后, 含MTSs(或SFEs)染色体所占的比例。每组至少计数20个分裂相, 总计数染色体数目 ≥ 800 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)比较。

A,B: the change of telomeres (green) located on chromosomes (blue) of HeLa cells after 0 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$ emodin treatment. Red arrows indicate MTSs and white arrows indicate SFEs; C: enlarged images of some chromosomes in figure B. D: the percentage of chromosomes with MTSs (or SFEs) after emodin treatment. More than 20 metaphases were analyzed per group. More than 800 chromosomes were counted per group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control (0 $\mu\text{mol/L}$) group.

图4 大黄素造成Hela细胞端粒脆性信号(MTSs/SFEs)明显增多

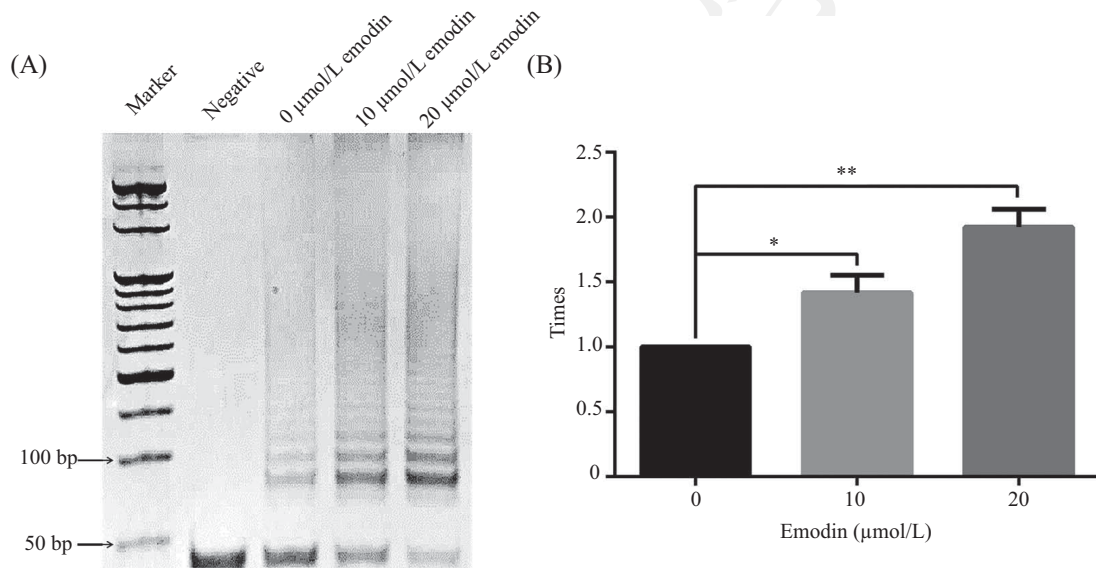
Fig.4 Emodin significantly increased telomere fragile signals (MTSs/SFEs) in HeLa cells



* $P < 0.05$.

图5 大黄素对Hela细胞端粒长度的影响

Fig.5 The effect of emodin on telomere length in HeLa cells



A: 大黄素对Hela细胞端粒酶活性的影响; B: 大黄素处理后Hela细胞端粒酶活性灰度值分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: effects of emodin on telomerase activity of HeLa cells; B: the gray-value of telomerase activity of HeLa cells after emodin treatment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图6 大黄素对Hela细胞端粒酶活性的影响

Fig.6 The effect of emodin on telomerase activity in HeLa cells

2.6 大黄素诱导Hela细胞端粒酶活性升高

HeLa细胞经0 μmol/L、10 μmol/L和20 μmol/L大黄素处理48 h后,利用TRAP方法检测端粒酶活性。灰度分析结果显示,端粒酶活性明显升高。与0 μmol/L相比,10 μmol/L组的端粒酶活性升高为 1.42 ± 0.13 倍($P < 0.05$),20 μmol/L组的端粒酶活性升高为 1.92 ± 0.13 倍($P < 0.01$)(图6)。

3 讨论

本研究报道了大黄素对Hela细胞内端粒和端

粒酶活性的影响,即大黄素能够造成端粒功能障碍,进而抑制细胞增殖。同时,本实验发现,大黄素处理后,端粒酶活性明显升高,可能与端粒损伤后修复有关。

DNA拓扑异构酶II(topoII)通过催化DNA双链的断裂与结合,调控DNA的拓扑状态,在DNA复制、重组和转录等过程中发挥重要功能,同时,topoII也是抗肿瘤药物作用的靶点之一^[4]。文献报道,大黄素能够通过抑制ATP与topoII的结合,降低topoII的活性,从而引起细胞内广泛DSBs^[13]。与先前报道的

结果一致, 本研究发现, 大黄素能够抑制Hela细胞的增殖, 同时造成细胞内总基因组DSBs明显增多。DNA损伤能够引起细胞周期阻滞及一系列DNA修复反应, 若损伤的DNA未能获得及时正确的修复, 则会诱发突变及更广泛的基因组畸变, 从而导致细胞或生物体的死亡^[15]。

最新研究报道, topoII对端粒具有保护作用, 抑制拓扑异构酶II的活性能够引起端粒区脆性位点增加^[16]。文献报道, 大黄素能够促进细胞内活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的生成^[17], 而后者对基因组及端粒均具有损伤作用^[18]。本研究发现, 大黄素诱导端粒区DSBs(即TIFs)的能力明显高于诱导总基因组DSBs的能力, 表明大黄素对端粒区DNA具有特异性损伤作用。本实验证实大黄素对端粒的损伤体现在三个方面: 一是端粒区特异性DSBs显著增多; 二是端粒脆性信号增多, 包括多端粒信号(MTSs)和染色体末端端粒缺失(SFEs); 三是端粒长度明显缩短。作者曾报道, TEN1(端粒结合蛋白CST复合体的组成之一)的敲除能够引起明显的MTSs和SFEs, 这两种异常信号的出现是端粒复制时出现复制叉停滞、端粒断裂或丢失的表现^[19]。端粒功能障碍能够导致基因组不稳定, 包括诱发突变、染色体末端融合等, 最终对细胞增殖产生严重不良影响^[3]。

端粒酶通过在染色体末端添加端粒DNA序列, 在大多数肿瘤细胞和永生细胞中起到维持和延伸端粒长度的作用^[5]。本实验结果显示, 大黄素能够诱导端粒酶活性升高, 而端粒长度显著缩短, 提示端粒酶活性的升高可能是继发于端粒损伤的细胞应激反应。早有研究表明, X射线能够诱导鼠的脾细胞端粒酶活性升高, 同时在染色体断裂处发现新合成的小片段端粒序列^[20], 提示端粒酶可能参与DNA损伤后的修复反应; 紫外线^[21]、肿瘤化疗药物^[22]等致细胞DNA损伤因素同样可以引起端粒酶活性升高; 最新在玉米愈伤组织中的研究发现, 在染色体的损伤处发现了新端粒的合成^[23]。因此我们推测, 大黄素造成Hela细胞端粒功能障碍, 而后者诱导端粒酶活性升高。端粒酶对损伤的端粒是否具有修复作用有待进一步研究证实。

关于大黄素抗肿瘤作用的报道日益增多, 但其对端粒和端粒酶活性的影响尚未报道。本研究首次报道了大黄素能够诱导人宫颈癌Hela细胞端粒功能障碍, 进而对细胞增殖造成恶劣影响, 这为大黄素在

抗肿瘤应用奠定了理论基础。另外, 大黄素处理后端粒酶活性明显升高, 提示端粒酶可能参与端粒损伤后的修复过程。

参考文献 (References)

- 1 Stewart JA, Chaiken MF, Wang F, Price CM. Maintaining the end: roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. *Mutat Res* 2012; 730(1/2): 12-9.
- 2 Bandaria JN, Qin P, Berk V, Chu S, Yildiz A. Shelterin protects chromosome ends by compacting telomeric chromatin. *Cell* 2016; 164(4): 735-46.
- 3 Thomay K, Fedder C, Hofmann W, Kreipe H, Stadler M, Titgemeyer J, *et al.* Telomere shortening, TP53 mutations and deletions in chronic lymphocytic leukemia result in increased chromosomal instability and breakpoint clustering in heterochromatic regions. *Ann Hematol* 2017; 96(9): 1493-500.
- 4 Vajen B, Thomay K, Schlegelberger B. Induction of chromosomal instability via telomere dysfunction and epigenetic alterations in myeloid neoplasia. *Cancers (Basel)* 2013; 5(3): 857-74.
- 5 Shay JW, Wright WE. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol* 2011; 21(6): 349-53.
- 6 Gunes C, Rudolph KL. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell* 2013; 152(3): 390-3.
- 7 Martinez P, Blasco MA. Role of shelterin in cancer and aging. *Aging Cell* 2010; 9(5): 653-66.
- 8 Dong X, Fu J, Yin X, Cao S, Li X, Lin L, *et al.* Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics. *Phytother Res* 2016; 30(8): 1207-18.
- 9 Huang Z, Chen G, Shi P. Effects of emodin on the gene expression profiling of human breast carcinoma cells. *Cancer Detect Prev* 2009; 32(4): 286-91.
- 10 Subramaniam A, Shanmugam MK, Ong TH, Li F, Perumal E, Chen L, *et al.* Emodin inhibits growth and induces apoptosis in an orthotopic hepatocellular carcinoma model by blocking activation of STAT3. *Br J Pharmacol* 2013; 170(4): 807-21.
- 11 Su J, Yan Y, Qu J, Xue X, Liu Z, Cai H. Emodin induces apoptosis of lung cancer cells through ER stress and the TRIB3/NF-kappaB pathway. *Oncol Rep* 2017; 37(3): 1565-72.
- 12 Ma J, Yang J, Wang C, Zhang N, Dong Y, Wang C, *et al.* Emodin augments cisplatin cytotoxicity in platinum-resistant ovarian cancer cells via ROS-dependent MRP1 downregulation. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 107671.
- 13 Li Y, Luan Y, Qi X, Li M, Gong L, Xue X, *et al.* Emodin triggers DNA double-strand breaks by stabilizing topoisomerase II-DNA cleavage complexes and by inhibiting ATP hydrolysis of topoisomerase II. *Toxicol Sci* 2010; 118(2): 435-43.
- 14 Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol* 2010; 17(5): 421-33.
- 15 Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009; 461(7267): 1071-8.
- 16 d'Alcontres MS, Palacios JA, Mejias D, Blasco MA. TopoIIalpha prevents telomere fragility and formation of ultra thin DNA bridges during mitosis through TRF1-dependent binding to telomeres. *Cell Cycle* 2014; 13(9): 1463-81.

- 17 Li X, Wang H, Wang J, Chen Y, Yin X, Shi G, *et al.* Emodin enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human bladder cancer cells through ROS elevation and MRP1 downregulation. *BMC Cancer* 2016; 16: 578.
- 18 Fouquerel E, Lormand J, Bose A, Lee HT, Kim GS, Li J, *et al.* Oxidative guanine base damage regulates human telomerase activity. *Nat Struct Mol Biol* 2016; 23(12): 1092-100.
- 19 Kasbek C, Wang F, Price CM. Human TEN1 maintains telomere integrity and functions in genome-wide replication restart. *J Biol Chem* 2013; 288(42): 30139-50.
- 20 Hande MP, Lansdorp PM, Natarajan AT. Induction of telomerase activity by *in vivo* X-irradiation of mouse splenocytes and its possible role in chromosome healing. *Mutat Res* 1998; 404(1/2): 205-14.
- 21 Stout GJ, Blasco MA. Telomere length and telomerase activity impact the UV sensitivity syndrome xeroderma pigmentosum C. *Cancer Res* 2013; 73(6): 1844-54.
- 22 Miura M, Karasaki Y, Abe T, Higashi K, Ikemura K, Gotoh S. Prompt activation of telomerase by chemical carcinogens in rats detected with a modified TRAP assay. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246(1): 13-9.
- 23 Santos-Serejo JA, Aguiar-Perecin ML. Breakage-fusion-bridge cycles and *de novo* telomere formation on broken chromosomes in maize callus cultures. *Genome* 2016; 59(6): 367-78.