

Hela 细胞端粒 DNA 断裂损伤^{*}

阳 芳 杨洁萍 李清焕 邵 兰 谭 铮^{**}

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072) (中国科学院动物研究所, 北京 100080)

Strand breaks in telomeres in Hela cells^{*}

YANG Fang YANG Jie-Ping LI Qing-Huan SHAO Lan TAN Zheng^{**}

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

(Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Telomeres are the repetitive G-rich DNA sequences at the end of chromosomes and shorten at each round of cell division. Besides the incomplete DNA synthesis, single and double DNA strand breaks, if not repaired, also contribute to the telomere shortening. To assess the frequency of strand breaks in proliferating Hela cells, telomere fragments were released by alkaline denaturing and electrophoresis from cells embedded in agarose, blotted onto membrane, and detected by probe specific to telomere sequence. The quantity of telomere fragments released was estimated to be less than 0.4% of the total telomere content, which corresponded to less than one break per cell. Since the mean length of the terminal restriction fragments of the cells was about 7 kbp, the fragments detected would lead to less than 19 bp in mean telomere shortening [Acta Zoologica Sinica 49 (6): 873 - 877, 2003].

Key words Telomere, DNA strand break, Hela cells

关键词 端粒 DNA 断裂 Hela 细胞

端粒是真核细胞染色体末端由富含 G 的 DNA 序列和蛋白质组成的复合物。人类端粒 DNA 为 (TTAGGG)_n 六聚体重复序列, 长度约为几千至几万个碱基对。端粒在维持染色体的稳定中起重要作用 (Blasco *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; van Steensel *et al.*, 1998)。由于 DNA 半保留复制不能完全复制线性 DNA 模板链的 3' 末端, 细胞每分裂一次都要造成端粒序列的丢失。在人永生细胞如生殖细胞、癌细胞中, 端粒的丢失由端粒酶在端粒末端合成端粒 DNA 来进行补偿。人的正常体细胞中由于没有明显的端粒酶活性, 无法维持端粒的长度, 细胞每分裂一次端粒将缩短约 30~200 bp。由于这一原因, 人正常体细胞只能分裂有限的次数, 即具有 Hayflick 极限 (Hayflick *et al.*, 1961)。当端粒随着细胞分裂而缩短到临界长度时, 细胞将失去分裂能力, 停止增殖, 表现为细胞增殖性衰老 (Lundblad *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 1990)。

人正常体细胞随着细胞分裂而发生端粒缩短。目前认为造成端粒缩短的主要因素有两个: 一是细胞分裂时端粒末端的不完全复制, 二是发生在端粒区的 DNA 损伤。这两个因素对端粒缩短的相对贡献目前还不明确。端粒末端的不完全复制产生 3' 末端单链悬突 (3' overhang), 实验测量几种人细胞端粒末端单链悬突长度的结果表明, DNA 的不完全复制可以解释 70%~90% 的端粒丢失 (Huffman *et al.*, 2000)。然而, 另有报道表明在正常培养条件下人成纤维细胞的端粒区约有 4 或 5 个单链断裂。这样高的断裂数则说明端粒单链断裂可以解释绝大部分端粒的缩短, 因此细胞生理代谢中的氧化损伤造成的端粒单链断裂可能是端粒缩短的主要原因 (Sitte *et al.*, 1998; von Zglinicki *et al.*, 2000)。

除了染色体 DNA 末端复制问题导致端粒缩短外, 发生在端粒区的 DNA 断裂如果没有被修复, 端粒碎片在细胞分裂、DNA 复制时将脱离染色体,

2002-12-02 收稿, 2003-07-03 修回

^{*} 中国科学院“百人计划”和“知识创新工程”项目资助

^{**} 通讯作者 (Corresponding author) E-mail: tanclswu@public.wh.hb.cn

第一作者简介 阳 芳, 女, 25 岁, 硕士研究生。研究方向: 生物化学。E-mail: yangf@panda.ioz.ac.cn

© 2003 动物学报 Acta Zoologica Sinica

也会造成端粒的丢失。对于端粒末端不完全复制和端粒 DNA 链断裂这两个因素,它们在端粒缩短中的贡献程度在已有的报道中结论不一致。有报道指出,端粒末端未复制部分的长度与细胞端粒缩短的速度成正比,说明端粒末端的不完全复制是端粒缩短的主要因素 (Huffman *et al.*, 2000)。另一方面,氧胁迫可以导致人成纤维细胞端粒 DNA 单链断裂并加速细胞的复制性衰老 (von Zglinicki *et al.*, 1995)。更有报道指出,端粒 DNA 单链断裂的积累是端粒缩短的主要原因 (von Zglinicki *et al.*, 2000)。

有关端粒单链断裂的工作利用了 S1 核酸酶对 DNA 的水解特性,即在低浓度时切割有单链断裂位点的双链 DNA,将单链断裂转化为双链断裂,然后根据 S1 核酸酶水解前后端粒限制性酶切片段长度的变化来计算单链断裂的数量。我们认为通过 S1 核酸酶水解测量单链断裂数量的方法可能存在两个方面的问题。一是 S1 核酸酶并非具有严格的酶切位点特异性,在低浓度时它以切割单链断裂为主,但是它同时也切割双链 DNA,在高浓度和低盐浓度时以切割双链断裂为主。无缺刻的 0.15 μg 线状质粒 pBR322 DNA 在 1.98 单位 S1 核酸酶作用下,用原子力显微镜观察显示 35% 的质粒产生了断裂碎片 (Umemura *et al.*, 2000)。因此非特异性的切割双链有可能造成链断裂偏多的假象。二是 S1 核酸酶会水解端粒 3' 末端单链悬突,人为低估了 S1 核酸酶处理后的端粒限制性酶切片段长度。

为了进一步探讨 DNA 损伤造成的 DNA 链断裂在端粒丢失中的贡献程度,我们借鉴单细胞凝胶电泳技术 (Single cell gel electrophoresis assay, SCGE),在碱性条件下原位裂解细胞,通过电泳释放 DNA 断裂片段,使用端粒探针检测端粒碎片。通过计算端粒 DNA 碎片量占细胞总端粒 DNA 量的比例,估算出端粒区链断裂的数量以及它所引起的端粒丢失,以此来了解端粒 DNA 链断裂对端粒丢失的贡献。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养

人宫颈癌 HeLa 细胞 (ATCC, USA) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养于含 10% 胎牛血清 (杭州四季青公司), 100 U/ml 青霉素钠 (石家庄制药集团有限公司) 和 100 U/ml 硫酸链霉素 (华北制药股份有限公司) 的 Minimum Essential Medium (MEM,

GIBCO/BRL, USA) 培养基中。

1.2 检测端粒末端限制片段 (TRF) 的细胞处理

处于指数生长期末的细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化收获后用 PBS 洗涤。然后悬浮于适量 PBS, 并与等体积低熔点琼脂糖混合成含 0.8% 琼脂糖 (GIBCO/BRL, USA) 的细胞悬液, 细胞浓度为 $10^5/100 \mu\text{l}$ 。将细胞悬液灌注于体积为 100 μl 有机玻璃模子中并放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 约 10 min 使之凝固。细胞琼脂糖小块在细胞裂解液 ESP (0.5 mol/L EDTA, pH 9.0, 1% sodium lauroylsarcosine, 1 mg/ml proteinase K) 中于 50 $^{\circ}\text{C}$ 轻摇裂解 48 h。裂解后用 1 mmol/ml 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 洗涤两次, 每次 2 h, 随后用 TE (pH 7.4) 洗涤 3 次, 每次 2 h。细胞小块 (约含 0.5 ~ 1 μg DNA) 用限制性内切酶 *Hinf* (Promega, USA) 酶切 4 h, 反应体积 250 μl 。用 25 mmol/L EDTA 终止反应。

1.3 检测端粒断裂碎片的细胞处理

收获的细胞同在上在 37 $^{\circ}\text{C}$ 与等体积琼脂糖混合制成细胞琼脂糖小块。为避免光氧化引起 DNA 的损伤, 下面的步骤于暗处进行: 细胞小块于碱性裂解液 (2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L Na_2EDTA , 1% sodium lauroylsarcosine, 1% Triton X100, 10% DMSO, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 10.0) 中室温裂解 1 h, 然后在碱变性液 (333 mmol/L NaOH, 1 mmol/L Na_2EDTA , pH 13.0) 中室温变性 1 h (Rapp *et al.*, 2000)。

1.4 电泳及端粒 DNA 检测

将处理后的细胞块置于 0.8% 琼脂糖凝胶, 在 TAE 电泳缓冲液中室温下 5 V/cm 电泳 2 h。电泳结束后将 DNA 转至尼龙膜 (Hybond-N⁺ membranes, 0.45 μm , Pall, USA) 上, 转移缓冲液为 20 \times SSC。转移结束后用地高辛 (DIG) 标记的端粒探针试剂盒 (Telo TAGGG Telomere Length Assay Kit, Roche, Germany) 检测端粒碎片。化学发光杂交信号用胶片 (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche, Germany) 曝光。

1.5 端粒碎片量的定量检测

用图像分析软件 Image J (NIH) 采集迁移出细胞小块外的端粒片段信号的光密度。实验中以 10^5 个细胞的端粒限制性酶切片段 (TRF) 作为内标, 用于计算群体细胞的总端粒量。因 DNA 断裂而产生的端粒碎片只占总端粒的很小部分, 为了增强其信号, 测定端粒碎片时采用的细胞数为 2×10^6 。细胞中端粒断裂碎片占其总端粒的比例可以

计算为: (端粒碎片信号/ TRF 信号) \times (测量端粒碎片所用细胞数/ 测量 TRF 所用细胞数)

2 结 果

2.1 *Hinf* 内切酶浓度对细胞端粒末端限制片段释放的影响

每个细胞块处理的酶量从 0.375 增加到 6 u 时, 端粒片段释放量逐渐增加, 细胞小块内的端粒信号逐渐减少。当酶量为 6 u/ 细胞块时, 端粒限制性酶切片段完全释放至凝胶中 (图 1)。在后续的实验中选择 6 *Hinf* u/ 10^5 细胞这个酶浓度来测定总端粒量。



图 1 不同 *Hinf* 浓度下 HeLa 细胞端粒末端限制片段的释放

Fig. 1 Terminal restriction fragments (TRF) released from agarose plugs as a function of *Hinf* endonuclease concentration

每细胞块中细胞数量均为 10^5 (Each plug has 10^5 cells) 1: 无酶切的阴性对照 (Plug without *Hinf* digestion) 2~7: 酶量分别为 0.375、0.75、1.5、3、4 和 6 u/ 细胞块 (Plug digested with 0.375, 0.75, 1.5, 3, 4, 6 units of *Hinf* respectively)

2.2 HeLa 细胞端粒末端限制片段的检测灵敏度

不同数量细胞的端粒限制性酶切片段检测结果见图 2。所得到的端粒限制性酶切片段信号随细胞数量减少而降低。在细胞数量为 1.25×10^4 时端粒限制性酶切片段的信号很微弱, 在细胞数量为 6.25×10^3 时基本检测不到信号。这一结果给出本实验方法对细胞端粒区 DNA 断裂频率的大致检测下限。该结果表明这个方法检测端粒限制性酶切片段的下限约为 1.25×10^4 个细胞。这些细胞的端粒量可折算为我们用来检测端粒碎片时用的 2×10^6 个细胞的端粒量的 0.6%。一个细胞的染色体数量为 46, 由于一个染色体有两个端粒, 这样一个细

胞则有 92 个端粒。如果平均每个细胞在端粒区 DNA 上出现断裂的总数为一个, 由于 DNA 断裂的随机性, 端粒碎片的平均长度将为端粒平均长度的一半, 这一端粒碎片将占总端粒量的 0.5/92, 或 0.54%, 接近 1.25×10^4 个细胞的端粒量, 可以被检测出来。

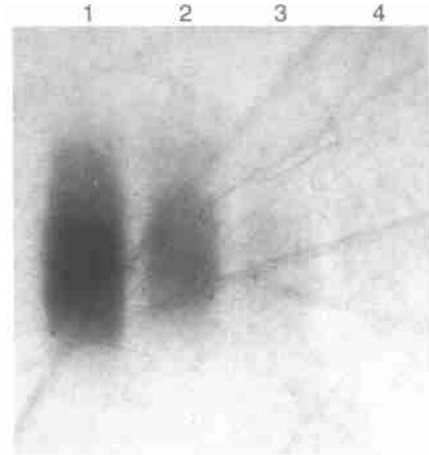


图 2 不同数量的 HeLa 细胞在 *Hinf* 酶切后释放端粒末端限制片段

Fig. 2 Terminal restriction fragment (TRF) released from different number of HeLa cells by 6 units *Hinf* digestion

1~4: HeLa 细胞数量分别为 5×10^4 、 2.5×10^4 、 1.25×10^4 、 6.25×10^3 , *Hinf* 酶用量均为 6 u (Telomeres restriction fragments released by digestion with 6 units of *Hinf* from 5×10^4 , 2.5×10^4 , 1.25×10^4 , 6.25×10^3 HeLa cells, respectively)

2.3 HeLa 细胞在正常培养下端粒链断裂碎片的检测

HeLa 细胞端粒限制性酶切片段和端粒链断裂碎片的检测结果见图 3。其中端粒限制性酶切片段用于计算细胞的端粒总量, H_2O_2 处理的细胞作为端粒断裂的阳性样品。图 3 中端粒探针的杂交信号显示正常培养条件下 HeLa 细胞的端粒碎片很少 (第 5、6 道)。通过图像分析软件定量图 3, 得知迁移出细胞小块的端粒碎片约占其总端粒量的 0.8%。这些端粒碎片包括发生在端粒区和非端粒区的断裂所产生的并能够进入琼脂糖胶的碎片。发生在端粒区的断裂所产生的碎片不会大于端粒长度。发生在非端粒区的断裂, 其片段会大于端粒长度。如果只计算与端粒限制酶切片段 (TRF) 相对应区域的端粒碎片来衡量发生在端粒区的断裂, 则其信号约只占其总端粒量的 0.4%, 由此数据可以估算出每个细胞在端粒区平均所发生的断裂数少于一个断裂, 由于所用细胞的端粒限制酶切片段

(TRF) 的平均长度约为 7 kbp, 它所贡献的端粒丢失将少于 3.5 kbp/细胞, 或少于 19 bp/端粒 (3500/4/46)。

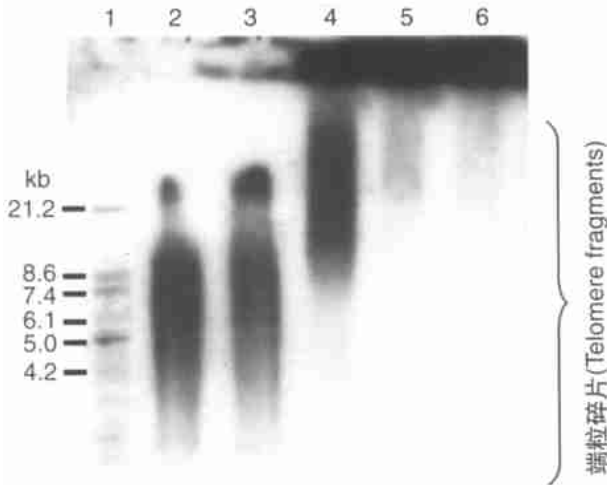


图 3 HeLa 细胞端粒碎片的检测

Fig. 3 Detection of terminal restriction fragments (TRF) in HeLa cells

1: 分子量 Marker 2, 3: 10^5 HeLa 细胞的端粒末端限制片段 (Terminal restriction fragments from 10^5 HeLa cells) 4: 10^6 HeLa 细胞经 $291 \mu\text{mol/L H}_2\text{O}_2$ 处理后释放的端粒碎片 (Telomeric fragments from 10^6 HeLa cells treated by $291 \mu\text{mol/L H}_2\text{O}_2$) 5, 6: 2×10^6 HeLa 细胞碱性裂解后释放的端粒碎片 (Telomere fragments from 2×10^6 HeLa cells)

3 讨论

为了探讨由端粒链断裂引起的端粒丢失及其在端粒缩短中所做的贡献, 我们借鉴了单细胞凝胶电泳的方法来测定细胞因 DNA 断裂而引起的端粒丢失。单细胞凝胶电泳, 又称彗星电泳, 是一种在单细胞水平上检测真核细胞 DNA 损伤与修复的方法 (Gedik *et al.*, 1992)。它将分散的细胞包埋于琼脂糖中, 经碱性裂解细胞、变性 DNA, 用电泳将 DNA 碎片与未损伤的染色体 DNA 分离开来。与单细胞凝胶电泳方法不同的是我们将足够数量的细胞包埋于小体积的琼脂糖块中进行处理和电泳, 测定的是细胞群体的 DNA 碎片。通过端粒探针进行 Southern 杂交即可测定端粒碎片的释放, 通过与端粒限制性酶切片段即细胞总端粒量相比较, 可以评估端粒的断裂程度。

我们用人宫颈癌 HeLa 细胞作为细胞模型, 检测了端粒因 DNA 链断裂 (包括单链断裂和双链断裂) 所释放的端粒碎片。由于所培养的手机持续地

分裂, 所测定的端粒碎片代表一个细胞周期中出现的断裂。结果显示 HeLa 细胞在正常培养条件下所释放的端粒碎片量不到细胞总端粒量的 1%, 对应于端粒限制性酶切片段长度部分的端粒碎片量不到细胞总端粒量的 0.5%。这一数据所对应端粒限制性酶切片段范围内的单链断裂数小于每个细胞一个。由于我们所用的 HeLa 细胞的端粒限制酶切片段 (TRF) 的平均长度约为 7 kbp, 以此作为端粒长度的近似, 则每个细胞一个单链断裂将在细胞分裂中导致约 3.5 kb 的单链, 或平均每个端粒 19 bp 的端粒丢失。Huffman *et al.* (2000) 曾同时测定过几种人细胞的端粒缩短速度和代表 DNA 不完全复制的 3' 末端单链悬突长度, 发现端粒的缩短速度为 50~100 bp, 其中 DNA 不完全复制所贡献的端粒缩短为 40~80 bp, 而且与端粒的缩短速度成正比, 说明 DNA 不完全复制是端粒缩短的主要原因。我们的实验表明在正常条件下端粒区的 DNA 链断裂对于端粒丢失起着一定作用, 但并非主要因素, 人细胞端粒末端复制问题应该是端粒缩短的主要原因。

参考文献 (References)

- Blasco, M. A., H. W. Lee, M. P. Hande, E. Samper, P. M. Lansdorp, R. A. DePinho and C. W. Greider 1997 Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91** (1): 25~34.
- Gedik, C. M., S. W. Ewen and A. R. Collins 1992 Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **62** (3): 313~320.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead 1961 The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**: 585~621.
- Huffman, K. E., S. D. Levene, V. M. Tesmer, J. W. Shay and W. E. Wright 2000 Telomere shortening is proportional to the size of the Grich telomeric 3'-overhang. *J. Biol. Chem.* **275** (26): 19 719~19 722.
- Lee, H. W., M. A. Blasco, G. J. Gottlieb, J. W. Horner, C. W. Greider and R. A. DePinho 1998 Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* **392** (6 676): 569~574.
- Lundblad, V. and J. W. Szostak 1989 A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57** (4): 633~643.
- Rapp, A., C. Bock, H. Dittmar and K. O. Greulich 2000 UV-A breakage sensitivity of human chromosomes as measured by COMET-FISH depends on gene density and not on the chromosome size. *J. Photochem. Photobiol.* **B 56** (2/3): 109~117.
- Sitte, N., G. Saretzki and T. von Zglinicki 1998 Accelerated telomere shortening in fibroblasts after extended periods of conflu-

- ency. *Free Radic. Biol. Med.* **24** (6) : 885 ~ 893.
- van Steensel, B. , A. Smogorzewska and T. de Lange 1998 TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92** (3) : 4 014 ~ 4 013.
- Umemura, K. , F. Nagami , T. Okada and R. Kuroda 2000 AFM characterization of single strand specific endonuclease activity on linear DNA. *Nucleic Acids Res.* **28** (9) : E39.
- Yu, G. L. , J. D. Bradley , L. D. Attardi and E. H. Blackburn 1990 *In vivo* alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated tetrahymena telomerase RNAs. *Nature* **344** (6 262) : 126 ~ 132.
- von Zglinicki, T. , R. Pilger and N. Sitte 2000 Accumulation of single strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* **28** (1) : 64 ~ 74.
- von Zglinicki, T. , G. Saretzki , W. Docke and C. Lotze 1995 Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.* **220** (1) : 186 ~ 193.