

重铬酸钾和谷胱甘肽作用致小牛胸腺 DNA 损伤的原子力显微镜研究

马豫峰¹, 蔡继业², 赵秋香³, 杨培慧² (¹南方医科大学药学院化学系, 广东 广州 510515; ²暨南大学化学系, 广东 广州 510632; ³广东省物料实验检测中心, 广东 广州 510080)

摘要:目的 研究重铬酸钾和谷胱甘肽对小牛胸腺 DNA 的损伤。方法 利用原子力显微镜、紫外光谱两种分析方法观察 DNA 的超微结构变化和吸收光谱的改变。结果 单一重铬酸钾不能诱导 DNA 断裂, 但将重铬酸钾和谷胱甘肽按一定比例和浓度混合同时作用于 DNA 时, 则可以诱导小牛胸腺 DNA 断裂。紫外-可见吸收光谱分析也得到同样的结果, 当重铬酸钾和谷胱甘肽共同作用 DNA 时, 其最大吸收峰呈增色效应。结论 从形态学和光谱学角度佐证了谷胱甘肽在引发铬(VI)化合物发生还原反应产生多种中间产物并导致人体细胞癌变中有重要作用。

关键词:重铬酸钾; 谷胱甘肽; 原子力显微镜; DNA 损伤;

中图分类号: Q523 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)10-1427-04

Study of DNA damage induced by potassium dichromate and glutathione with atomic force microscope

MA Yu-feng¹, CAI Ji-ye², ZHAO Qiu-xiang³, YANG Pei-hui²

¹Department of Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ³Material Testing Center of Guangdong Province, Guangzhou 510080, China

Abstract: Objective To observe calf thymus DNA damage induced by potassium dichromate in combination with glutathione (GSH). **Methods** Atomic force microscope and ultraviolet spectrum (UV) were used to observe the alterations of the DNA ultrastructure and absorption spectrum. **Results** Atomic force microscopy revealed no breaks of the DNA strand in response to treatment with potassium dichromate alone, but when coupled with GSH at proper concentrations, potassium dichromate induced alterations in the DNA structure and DNA fragmentation. UV examination also confirmed these findings by showing increased absorption intensity of the maximum UV peak following combined treatment of the DNA with potassium dichromate and GSH. **Conclusion** These morphological and spectrographic evidences verified the important role of GSH in mediating the generation of various tumor-inducing intermediate products of potassium dichromate.

Key words: potassium dichromate; glutathione; atomic force microscope; DNA damage

DNA 是生物体内一种重要的生物大分子, 其作为遗传信息的携带者, 在生物信息的表达和传递中起着重要作用, 但其相应功能的发挥与体内许多微量元素的存在相关, 铬元素就是其中的一种。有研究表明, 铬(VI)化合物易通过细胞膜上的阴离子通道进入细胞对 DNA 结构功能等产生影响, 从而影响细胞的免疫功能。当其缺乏时, 会对人体的生长发育起抑制作用, 但过量时又会引起机体病变如肺癌等^[1-3]。但铬(VI)化合物本身并不能诱导 DNA 损伤, 只有与还原性物质发生反应才能导致 DNA 断裂, 而谷胱甘肽(GSH) 是存在于人体细胞内的一种重要的抗氧化物质, 并很可能在铬(VI)化合物的致癌过程中起着重要的作用^[4,9]。

这方面的相应研究国内进行的很少, 国外也主要

采用的是凝胶电泳、电子自旋共振波谱等测定方法, 但从形态学方面对铬(VI)和 GSH 致 DNA 损伤及其致癌机理的研究并不多, 利用原子力显微镜(AFM)直接对其损伤过程进行形态学表征尚未见有报道。原子力显微镜(AFM)作为一种新型的显微技术, 能在纳米尺度观察物质结构, 是分析象 DNA 这样的生物大分子结构的有力工具, 能够直接观察到重铬酸钾和 GSH 致 DNA 损伤后结构的变化, 与凝胶电泳等方法相比, 这是它的一大优势。因此, 本实验利用 AFM 和紫外光谱两种手段在体外对重铬酸钾和 GSH 相互作用导致 DNA 损伤与断裂的过程及机制进行了初步研究, 得到了一些有意义的结果, 为从微观角度理解重铬酸钾和 GSH 致 DNA 损伤的本质, 进而探讨和解决宏观领域中的实际问题提供了一些实验依据。

收稿日期: 2006-02-16

基金项目: 国家自然科学基金(60578025、30230350)

Supported by National Natural Science Foundation of China (60578025, 30230350)

作者简介: 马豫峰(1979-), 2005年毕业于暨南大学, 硕士, 助教, 电话: 020-35805096, E-mail: happymyf@tom.com

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

小牛胸腺 DNA 和 GSH 购自 Sigma 公司, 重铬酸钾、3-氨基丙基三乙氧基硅烷等试剂均为分析纯。实验用水为三次蒸馏水, 所有样品均在 pH 为 5.6 的

HAc-NaAc缓冲溶液中配制。

原子力显微镜：美国 THERMO MICROSCOPE 仪器公司生产的 Autoprobe CP Research 型产品,100 μm 扫描器(APSC-0100 型),微悬臂长度为 180 μm,扫描针尖为商用氮化硅针尖,力常数为 3.2 N/m,成像模式为轻敲式。

双光束紫外可见分光光度计：中国北京普析通用仪器有限责任公司生产的 TU-1901 型仪器。所有样品的紫外光谱均以 pH 5.6 的 HAc-NaAc 缓冲溶液为参比,在波长 235-450 nm 之间进行扫描。

1.2 AFM 成像基片表面处理与样品制备

室温条件下,将 1%的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APS)滴加在新鲜剥离的云母表面处理 5 min,通过自组装方法将 APS 修饰在云母表面,使云母表面带正电,这样有利于 DNA 在云母表面更好的吸附和固定。

在 pH 为 5.6 的 HAc-NaAc 缓冲溶液中分别配制浓度为 5 μg/ml 的单一 DNA、1×10⁻⁶ mol/L K₂Cr₂O₇+ 5 μg/ml DNA、1×10⁻⁶ mol/l K₂Cr₂O₇+5×10⁻⁶ mol/L GSH + 5 μg/ml DNA 三种样品各 5 ml,并充分摇匀静置 1 h,使其反应完全。然后各取 5 μl 样品分别滴在不同基片上吸附 5 min 后,将其浸入三蒸水中 30 s,以除去盐和自由 DNA 分子,置于空气中自然风干,并利用原子力显微镜进行成像。

2 结果

2.1 重铬酸钾与 GSH 相互作用导致 DNA 断裂的 AFM 图像

如图 1 所示为 3 种不同情形下 DNA 结构的 AFM 图像。图 1A 为 5 μg/ml 的单一小牛胸腺 DNA 分子,从图像可以看出 DNA 分子舒展呈链状,链段较长,但有一定的弯曲,通过相应数据分析,DNA 链宽平均为 20 nm,高度平均为 0.6 nm。图 1B 为 1×10⁻⁶ mol/L 的重铬酸钾单独作用于 5 μg/ml DNA 时的 AFM 成像,该情形下 DNA 分子链的长度基本没有改变,数据分析得到其链宽平均为 21 nm,链的高度平均为 0.58 nm。而图 1C 为 1×10⁻⁶ mol/L 的重铬酸钾和 5×10⁻⁶ mol/L 的 GSH 共同作用于 5 μg/ml 的 DNA 时的 AFM 图像,此时 DNA 分子链明显变短,发生了断裂现象,通过数据分析,其链宽平均为 26 nm,高度平均为 1 nm,受损的 DNA 片断长度集中在 65-125 nm 之间,这与图 1A 中 DNA 链长相比发生了明显的变化,可以肯定此时的 DNA 链已经发生了断裂。当增加重铬酸钾和 GSH 的浓度时,DNA 链断裂现象更明显(图 2),断裂的 DNA 长度变的更短,且聚集在一起。

由此可知,当单独的重铬酸钾作用于 DNA 时并不会导致 DNA 分子产生明显的损伤,但在重铬酸钾和 GSH 共同作用下的 DNA 分子,其链长、链宽和链高均发生了明显改变,这可能就是氧化性的重铬酸钾

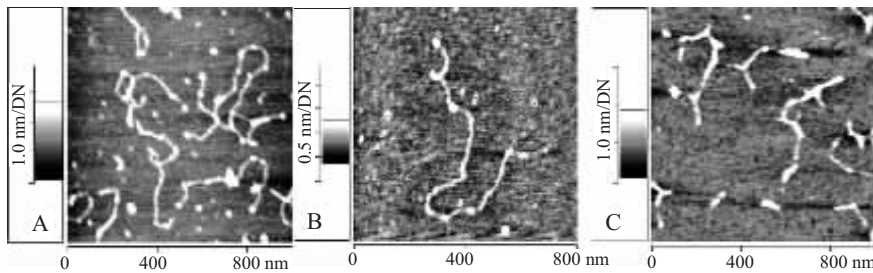


图 1 不同情况下小牛胸腺 DNA 超微结构的 AFM 图像

Fig.1 AFM images of the calf thymus DNA following different treatments

A: 5 μg/ml calf thymus DNA; B: 5 μg/ml DNA nduced by K₂Cr₂O₇ (1×10⁻⁶mol/L); C: DNA induced by K₂Cr₂O₇ (1×10⁻⁶mol/L) in combination with GSH(5×10⁻⁶mol/L)

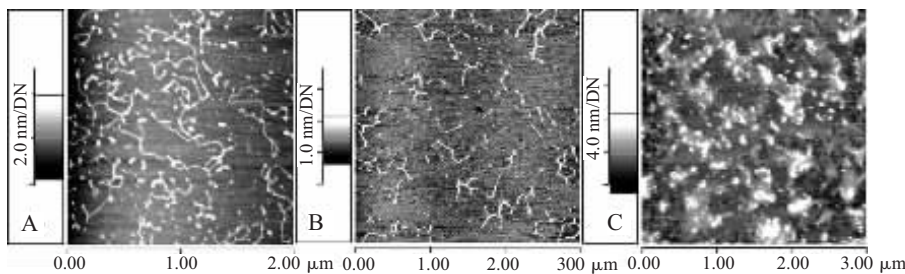


图 2 不同浓度 K₂Cr₂O₇ 和 GSH 共同作用小牛胸腺 DNA 的 AFM 图像

Fig.2 AFM images of the calf thymus DNA following treatments with K₂Cr₂O₇ and GSH at different doses

A: 5 μg/ml calf thymus DNA; B: 5 μg/ml DNA induced by K₂Cr₂O₇ (1×10⁻⁶mol/L) and GSH (2.5×10⁻⁴mol/L); C: DNA induced by K₂Cr₂O₇ (1×10⁻⁵mol/L) and GSH(5×10⁻⁵mol/L)

与抗氧化性的 GSH 发生反应产生了某种中间产物并导致 DNA 损伤或断裂的结果,说明二者与 DNA 发生了反应,致使 DNA 损伤。

2.2 重铬酸钾与 GSH 共同作用导致 DNA 断裂的紫外光谱分析(图 3)

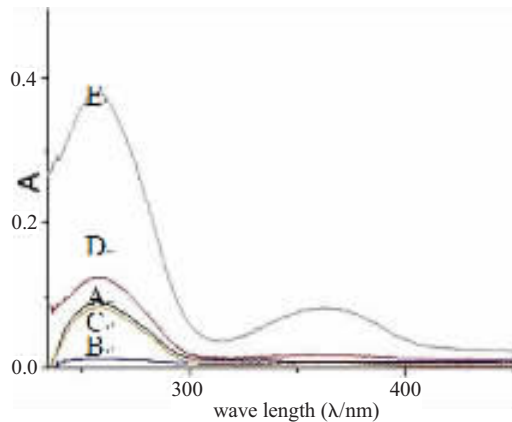


图 3 重铬酸钾、GSH 共同作用 DNA 的紫外吸收谱图
Fig.3 UV spectra of the calf thymus DNA treated by $K_2Cr_2O_7$ and GSH

A: 5 $\mu\text{g/ml}$ DNA; B: 1×10^{-6} mol/L $K_2Cr_2O_7$ + 5×10^{-6} mol/LGSH;
C: 1×10^{-6} mol/L $K_2Cr_2O_7$ +5 $\mu\text{g/ml}$ DNA; D: 1×10^{-6} mol/l
 $K_2Cr_2O_7$ + 5×10^{-6} mol/L GSH+5 $\mu\text{g/ml}$ DNA; E: 1×10^{-5} mol/L
 $K_2Cr_2O_7$ + 5×10^{-5} mol/L GSH+5 $\mu\text{g/ml}$ DNA

图 3 是重铬酸钾与 DNA 作用、重铬酸钾和 GSH 共同作用 DNA 的紫外吸收谱图。曲线 A(5 $\mu\text{g/ml}$ 小牛胸腺 DNA)在 258 nm 处有一最大吸收峰。测定重铬酸钾和 GSH 的吸收谱,发现其在紫外区基本无吸收(曲线 B)。当将 1×10^{-6} mol/L $K_2Cr_2O_7$ 与 5 $\mu\text{g/ml}$ DNA 作用后,测定其吸收谱(曲线 C),并与未加重铬酸钾的 DNA(5 $\mu\text{g/ml}$)(曲线 A)相比较。发现加入重铬酸钾后,曲线 A 和曲线 C 形状几乎不变,在 258 nm 处都有一个最大吸收峰,且两条曲线基本重合,说明重铬酸钾和 DNA 没有作用,即重铬酸钾对 DNA 没有损伤作用,这与 AFM 实验结果相符合(图 1B)。曲线 D 为重铬酸钾和 GSH 按照 1:5 浓度比混合共同作用 DNA 的紫外吸收谱,经过数据分析,其最大吸收峰呈增色效应。曲线 A 与 D 相比,红移的程度小,但吸光度增强。如果重铬酸钾和 GSH 共同作用 DNA 后没有发生反应,则图 3 中的曲线 A、D 应发生重合现象,但实验结果显示这两条曲线并没有重合,表明重铬酸钾、GSH 和 DNA 发生了作用。曲线 E 为重铬酸钾和 GSH 浓度增大时作用 DNA 的紫外吸收谱,其吸光度与曲线 D 相比明显增大,说明 DNA 受损程度增大,这与 AFM 结果相符合,且在 365 nm 左右出现的新峰可能为重铬酸钾和 GSH 共同作用 DNA 后

生成物的吸收峰。

3 讨论

在生理 pH 范围内,Cr(VI)容易穿透细胞膜而进入细胞。在细胞内,铬的还原剂对 DNA 损伤是起决定性作用的。当反应体系无任何还原剂存在时,Cr(VI)并不与 DNA 反应,这可以从本实验中的 AFM 结果和紫外-可见吸收光谱曲线得到验证(图 1B、曲线 3C)。当有还原剂存在时,Cr(VI)化合物被还原成 Cr(III)化合物,由于细胞内还存在其它还原性物质,使这个还原过程中可能产生很多中间产物,而这些中间产物可以和 DNA 反应造成 DNA 解旋或断裂,从而导致各种癌症的产生。而细胞内存在的谷胱甘肽是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸结合而成的三肽,有还原型(G-SH)和氧化型(G-S-S-G)两种形式,在生理条件下以还原型谷胱甘肽占绝大多数,从而能直接与一些氧化剂如重铬酸钾发生反应。

当重铬酸钾和 DNA 二元体系中加入谷胱甘肽后,Cr(VI)就和它发生反应,其在还原过程中形成的中间产物损伤了 DNA。许多专家从医学方面研究了 Cr(VI)的致癌机理,他们认为 Cr(VI)与 GSH 反应会生成 Cr(III)、GSSG 和 Cr(V)或 Cr(IV)的中间产物,该中间产物容易致 DNA 损伤或断裂而致癌^[49]。Levina 等^[8]确证了 Cr(VI)和 GSH 作用形成一种导致 DNA 构象变化的中间态配合物 $[CrVO(LH_2)_2]_3-$ (LH₂=GSH),该配合物在 Cr(VI)致癌过程中起主要作用,成为研究 Cr(VI)致癌机制的焦点。现代 Cr(VI)致癌模型也证明了 Cr(IV)作为一种中间产物和有毒致癌物的重要地位^[10]。

本实验尽管是在 pH 为 5.6 的条件下进行的体外研究,但其形态学和光谱学结果和医学结论是基本一致的,共同证明了 Cr(VI)不能致 DNA 损伤,而有还原剂 GSH 存在时,Cr(VI)可以与 GSH 发生反应致 DNA 损伤,使 DNA 链断裂。本研究为开展 DNA 损伤的 AFM 观察进行了探索,并使进一步研究发生断裂的位点及断裂的修复情况等成为可能。

参考文献:

- [1] Chang X, M allard B, Mowat D. Proliferat ion of peripheral blood lymphocytes of feeder calves in response to chromium[J]. Nutr Res, 1994, 14 (6): 851-64.
- [2] Bounting L, Fernandez J, Thompson D, et al. Influence of chromium picolinate on glucose usage and metabolic criteria in growering Holstein calves[J]. J Anim Sci, 1994, 72 (6): 1591-9.
- [3] Nagaya T, Ishikawa N, Nata H, et al. Early renal effects of occupational expo sure to low 2level hexavalent chromium [J]. Arch Toxicol, 1994, 68 (5): 322- 4.
- [4] Travis O'Brien, Jian X, Steven RP. Effects of gluta- thione on

- chromium-induced DNA crosslinking and DNA polymerase arrest [J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, 222: 173-82.
- [5] Krepkiy D, Antholin WE, Myers C, et al. Model reactions of Cr(VI) with DNA mediated by thiol species[J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, 222: 213-9.
- [6] George Q, Margarida G, Joseph M, et al. Reduction of Cr(VI) by cysteine: Significance in human lymphocytes and formation of DNA damage in reactions with variable reduction rates [J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, 222: 107-8.
- [7] Levina A, Lay PA. Solution structures of chromium(VI) complexes with glutathione and model thiols [J]. *Inorg Chem*, 2004, 43, 324-35.
- [8] Levina A, Zhang L, Lay PA. Structure and Reactivity of a Chromium(V) Glutathione Complex [J]. *Inorg. Chem.*2003, 42, 767-84.
- [9] Lee YH, Lee DH, Karlin K, et al. Dong-Heon Lee, Kenneth Karlin, Thioether ligand containin copper complexes modeling PHM and D_βH proteins[J]. *J Inorg Biochem*, 2003, 96,177.
- [10] Liu DJ, Shi XL, Dalal NS. Synthesis of Cr(VI)-GSH, Its identification and Its free hydroxyl radical generation: A Model compound for Cr(VI) carcinogenicity [J]. *Biochem Biophy Res Commun*, 1997, 235: 54-8.

(上接 1422 页)

长 27 个碱基对(bp)的核苷酸序列重复 2 次,并继于一长 25 bp 的核苷酸序列重复 2 次(也有人统称为重复 4 次);b 为一长 27bp 的核苷酸序列重复 3 次,并继于一长 25 bp 的核苷酸序列重复 2 次(也有人统称为重复 5 次)。该可变串联重复序列多态性为非编码序列,在基因调控中起一定作用^[6,7]。NOS 已分离和纯化出三种类型,其中,eNOS 存在于血管平滑肌细胞及内皮细胞中,被视为新型的信息传递分子。有研究证明,eNOS 在肾脏的内皮细胞过度表达与 IgA 肾病的肾小球高滤过有关。最近,又有研究发现日本人的 NOS 基因 27 重复核苷酸序列的多态性与高血压相关,而高血压是 IgA 肾病并发症的重要危险因素^[8,9]。以上提示,NOS 基因的结构及功能的异常可能性与 IgA 肾病血管病变的发生有关。

本研究目的旨在对中国人 IgA 肾病患者的 eNOS 基因多态性进行分子筛查。结果表明正常人群中 eNOS 4a/b 基因多态性的基因型频率分别为:4a/4a(2.58%)、4a/4b(12.90%)、4b/4b(84.52%),与意大利健康人群中的基因型频率 [4a/4a (1.8%)、4a/4b (26.9%)、4b/4b(71.3%)]差别较大,而意大利人与土耳其健康人群 [4a/4a (3.16%), 4a/4b (21.0%),4b/4b (75.8%)]相近,不同种族间基因型频率的差异,说明了遗传的种族异质性。

本文的结果初步表明,两组间 eNOS 基因 4a/b 座位基因型与等位基因频率分布差异无显著性。提示 eNOS 基因 4a/b 多态性与 IgA 肾病发生无明显关联,即在中国北方地区汉族人 IgA 肾病与 eNOS 基因第 4 内含子多态性不存在关联,与 Kim 等^[10]的研究一致。说明 eNOS 基因第 4 内含子多态性在 IgA 肾病遗传因素中的地位尚难以确定,其参与 IgA 肾病微血管

病变的作用可能存在种族或地域异质性,扩大样本量、采取肾活检诊断肾病及分期、不同人群对比研究均有利于获得更为客观的结果。

参考文献:

- [1] Wang XL, Sim AS, Badenhof RF, et al. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene[J]. *J Nat Med*, 1996, 2(1): 41-5.
- [2] Elbaz A, Poirer O, Moulin T, et al. Association between the the Glu298Asp polymorphism in endothelial constitutive nitric oxide synthase gene and brain infarction [J]. *J Stroke*, 2000, 31 (7) : 1634-9.
- [3] 王海燕,刘平,张鸣和,等.肾脏病学[M].北京:人民卫生出版社,1996: 708-19
- [4] Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, et al: Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 245: 190-3.
- [5] Nolin L, Coueteau M. Management of IgA nephropathy: evidence based recommendation[J]. *Kidney Int*, 1999, 55(Suppl 70): 56-62.
- [6] Forstermann U, Gath I, Schwarz P, et al. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control [J]. *J Biochem Pharmacol*, 1995, 50(9): 1321-2.
- [7] Lacolley P, Gautier S, Poirier O, et al. Nitric oxide synthase gene polymorphisms: blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects[J]. *J Hypertens*, 1998, 16(1): 31-5.
- [8] Wu J, Chen X, Xie Y, et al. Characteristics and risk factors of intrarenal arterial lesions in patients with IgA nephropathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20(4): 719-27.
- [9] Lee HS, Lee MS, Lee SM, et al. Histological grading of IgA nephropathy predicting renal outcome: revisiting H. S. Lee's glomerular grading system[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20 (2): 342-8.
- [10] Kim W, Kang SK, Lee DY, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in patients with IgA nephropathy[J]. *Nephron*, 2000, 86(2): 232-3.