

抗菌肽 CM4 组分对 K562 癌细胞 染色质 DNA 断裂作用的 SCGE 研究*

王 芳 张双全 戴祝英

(南京师范大学生物系, 南京 210097)

摘要 单细胞凝胶电泳法 (single cell gel electrophoresis, SCGE) 是一种快速、敏感的检测单个哺乳动物细胞 DNA 断裂的技术, 也叫彗星实验 (comet assay). 此实验首次通过 SCGE 法观察抗菌肽 CM4 组分对人髓样白血病 K562 细胞和正常人白细胞核染色质 DNA 的影响, 从而进一步研究抗菌肽抗癌作用的机制. 荧光显微镜观察显示经抗菌肽 CM4 组分处理过的 K562 癌细胞核染色质 DNA 出现断裂, 形成一个亮的荧光头部和彗星似的尾部, 而经同样处理的正常人白细胞和未经抗菌肽处理的 K562 癌细胞核染色质 DNA 未出现断裂, 核完整, 呈圆形. 经彗星尾长分析, 前者 DNA 损伤率平均为 73.62%, 统计学处理 $P < 0.001$, 具高度显著性差异. 这表明, 抗菌肽 CM4 对 K562 癌细胞核染色质 DNA 有明显的断裂作用, 而对正常人白细胞则没有断裂作用.

关键词 单细胞凝胶电泳, 抗菌肽, K562 癌细胞, 染色质 DNA

学科分类号 Q523

70 年代后期, Rydberg 和 Johanson 等^[1]首先用定量方法对单细胞 DNA 断裂进行了研究. 1984 年, Ostling 等^[2]采用中性微凝胶电泳技术使这一方法的灵敏度进一步提高. 1988 年, Singh^[3]采用碱性电泳并结合溴化乙锭 (EB) 染色能显示遇碱不稳定和明显断裂的 DNA. 经荧光显微镜观察, 单个受损细胞在电泳时, 其断裂的 DNA 从核中向阳极伸展, 形成一个亮的荧光头部和尾部, 形似彗星, 故又称彗星实验, 或单细胞凝胶电泳. 此实验能检测 DNA 损伤与修复在细胞间的差异, 10^5 ku 中可检出 0.1 个 DNA 断裂, 甚至可检测到自然光照射体外淋巴细胞 1 h 所引起的 DNA 损伤. 它同样可用于检测静止状态的细胞, 且对 T、B 细胞均敏感, 和用 ^{32}P 标记的 DNA 检测灵敏度一致, 并被认为是低水平辐射 (0.05 Gy) 检测的快速、敏感的方法^[4]. 目前此方法已广泛用于检测氧化、紫外光和电离辐射等引起的损伤与修复、细胞衰老、生物监测、遗传毒理研究, 肿瘤治疗跟踪监测等.

细胞染色质结构状态和 DNA 超螺旋程度是影响细胞 DNA 复制、转录及损伤、修复的重要环节. 细胞染色质结构状态的研究已成为肿瘤细胞生物学及放射生物学所共同关注的问题^[5]. 我们成功地利用单细胞凝胶电泳技术定量研究了纯化的家蚕抗菌肽 CM4 组分对人髓样白血病 K562 癌细胞核和正常人白细胞核染色质 DNA 的影响, 以探索抗菌肽的抗癌机制.

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 家蚕 (*Bombyx mori*): 品种苏 5 × 苏 6, 中国农业科学院蚕业研究所提供.

1.1.2 K562 癌细胞: 中国人民解放军八一医院提供.

* 国家自然科学基金资助 (39570111) 及国家教育委员会留学回国人员资助费支持项目.

收稿日期: 1996-12-25, 修回日期: 1997-03-14

1.1.3 正常人白细胞: 南京市中心血库提供.

1.1.4 诱导源 (大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$): 中科院上海生物工程研究中心屈贤明教授提供.

1.1.5 细胞培养基: RPMI-1640 为 GIBCO 产品, 小牛血清为杭州四季青生物工程研究所产品.

1.1.6 分离纯化试剂: CM-Sephrose CL-6B 为 Pharmacia 产品; Tryton, Yeast Extract 为 OXIOD 公司产品; 丙烯酰胺为 Sigma 公司产品; 甲叉双丙烯酰胺为 Aldrich 公司产品; 其他试剂除注明外均为国产分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 大肠杆菌对家蚕蛹的诱导及血淋巴的收集: 家蚕蛹每头注射 1×10^6 大肠杆菌数 (*E. coli* D_{31}), 置室温 (25 °C, 相对湿度 60% ~ 80%) 培育一定时间 (一般为 3~7 d) 后, 采集血淋巴. 经玻璃纤维过滤后, 将血淋巴于 100 °C 沸水浴加热 30 min, 10 000 r/min, 4 °C 离心 30 min, 收集上清液置 -20 °C 保存备用^[6].

1.2.2 抗菌肽 CM4 组分的分离纯化及活性测定: 用 pH 5.1 $HAc-NH_4OH$ 条件下的 CM-Sephrose CL-6B 阳离子交换柱层析, pH 5.1 0.05 mol/L $HAc-NH_4OH$ 对 pH 5.1 1 mol/L $HAc-NH_4OH$ 梯度洗脱, 收集洗脱液, 以酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定纯度及琼脂孔扩散法测定活性, 收集活性部分^[7].

1.2.3 细胞培养与细胞悬液的制备: 常规方法培养 K562 细胞和正常人白细胞各三瓶 (每瓶 10 ml 培养液) 至对数生长期. 各取一瓶细胞, 分别加入用 RPMI-1640 培养液配置的抗菌肽 CM4 的无菌溶液, 使其终浓度为 7.5 mg/L, 37 °C 培养 24 h; 另各取一瓶细胞, 以 20 W 紫外灯作为光源, 在超净台内近距离照射 45 min; 还有两瓶作为对照组. 经处理后的细胞 1 000 r/min 离心 8 min, 收集细胞, 用新鲜配置的细胞培养液配置成约 1×10^6 细胞/ml 的细胞悬液.

1.2.4 单细胞凝胶电泳的制备过程: 在 37 °C 下, 取 10 μ l 细胞悬液与 75 μ l 0.5% 的低熔点

琼脂糖 (LMA) 混匀, 迅速铺于载玻片上, 加盖玻片, 4 °C 放置 10 min, 使其固化. 在 37 °C 下, 移开盖玻片, 铺盖第二层约 75 μ l 0.5% 低熔点琼脂糖, 4 °C 放置 10 min 使其固化. 去除盖玻片, 将载玻片浸入新配置的预冷的细胞溶解液 [2.5 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Na_2EDTA , 0.01 mol/L Tris, pH 10, 1% 十二烷基肌氨酸钠 (Na lauryl sarconiate), 用前加入 1% Triton X-100, 10% DMSO] 中至少 1 h 或过夜. 将载玻片取出, 室温晾干待用.

1.2.5 电泳条件及彗星观察: 将准备好的载玻片置水平电泳槽中阳极端, 电泳前在高 pH 电泳缓冲液 (1 mmol/L Na_2EDTA , 300 mmol/L NaOH) 中放置 20 min. 然后在室温下, 置 25 V, 300 mA 电泳 20 min. 电泳后, 置染缸中, 用 pH 7.5 的 0.4 mol/L Tris 浸洗 3 次, 每次 10 min. 后用 20 g/L EB 染色, 荧光显微镜观察 (型号 OLYMPUS BH), 拍照.

1.2.6 彗星长度测量及 DNA 损伤率计算: 通过拍照放大后测量彗星长度 (放大倍数为 $\times 400$)

DNA 损伤率计算公式:

DNA 损伤率 (%) =

$$\frac{\text{实验组平均彗星长度} - \text{对照组平均彗星长度}}{\text{实验组平均彗星长度}} \times 100\%$$

2 结 果

2.1 单细胞凝胶电泳行为

图 1 结果表明未经抗菌肽处理的正常人白细胞 (图 1a), K562 癌细胞 (图 1b) 和经抗菌肽 CM4 处理的正常人白细胞 (图 1c) 的荧光显微镜观察照片, 细胞核染色质 DNA 未出现断裂, 核完整, 呈圆形. 而经抗菌肽 CM4 处理的 K562 癌细胞 (图 1d) 和用紫外光照射后的正常人白细胞 (图 1e) 与 K562 癌细胞 (图 1f) 则出现细胞核染色质 DNA 明显断裂, 形成一个亮的荧光头部和较长的彗星状尾部.

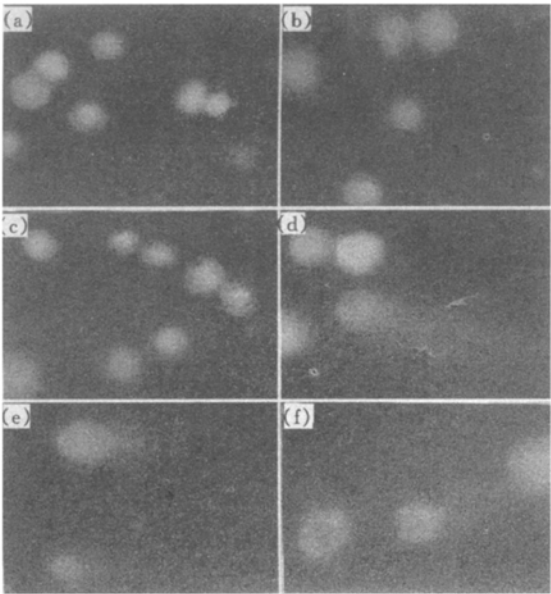


图1 紫外光照射及抗菌肽 CM4 对正常人白细胞及 K562 癌细胞核染色质 DNA 作用的单细胞凝胶电泳荧光显微照片

(a) 正常人白细胞; (b) K562 癌细胞; (c) 抗菌肽 CM4 处理后的人白细胞; (d) 抗菌肽 CM4 处理后的 K562 癌细胞; (e) 紫外线照射后的人白细胞; (f) 紫外线照射后的 K562 癌细胞.

2.2 彗星长度与 DNA 的损伤率

由表 1 可见, 经抗菌肽 CM4 处理和紫外光照射后的 K562 癌细胞单细胞凝胶电泳彗星长度分别为 (36.41 ± 1.44) mm 和 (29.7 ± 0.72) mm, 而未经任何处理的 K562 癌细胞彗星长度测量仅为彗星头部直径 (8.43 ± 0.12) mm, 统计学处理为极度显著性差异 (P< 0.001), 细胞核染色质 DNA 损伤率前者分别为 76.30% 和 70.94%. 对照组未经任何处理和经抗菌肽 CM4 处理的正常人白细胞彗星测量仅 (11.6 ± 0.18) mm 和 (10.6 ± 0.21) mm, 两者数值接近, 统计学分析没有显著性差异 (P> 0.05). 说明抗菌肽 CM4 对正常人白细胞核染色质 DNA 没有产生损伤作用, 但紫外光照射可断裂正常人白细胞核染色质 DNA, 彗星测量长度为 (19.32 ± 0.45) mm, DNA 损伤率为 37.89%, 统计学处理表明与前者有显著性差异 (P< 0.001).

表 1 正常人白细胞和 K562 癌细胞单细胞凝胶电泳的彗星长度与 DNA 损伤率

细胞株	组别	测试 细胞 数	彗星长度 / mm ($\bar{x} \pm s$)	DNA 损伤率 / %	P
正常人 白细胞	对照组	15	11.6 ± 0.18		
	抗菌肽组	15	10.6 ± 0.21	9.4	P> 0.05
	紫外光组	11	19.32 ± 0.45	37.89	P< 0.001
K562 癌细胞	对照组	50	8.43 ± 0.12		
	抗菌肽组	22	36.41 ± 1.44	76.30	P< 0.001
	紫外光组	20	29.7 ± 0.72	70.94	P< 0.001

注: 彗星长度值为放大 400 倍后的数值.

3 讨 论

昆虫的抗菌多肽能杀死大多数的有害细菌、某些原生动物、真菌、病毒感染的细胞和癌变细胞^[8]以及某些动物癌实体瘤.

微量纯化的家蚕抗菌肽 CM4 能使 K562 癌细胞产生一系列的病理变化, 可造成细胞高度肿胀, 膜与细胞质分离, 细胞器和膜结构排列紊乱, 细胞表面微绒毛消失, 出现不规则的孔洞, 细胞骨架严重破坏, 膜局部结构破裂, 缺损, 胞浆内容物大量外泄, 最终细胞解体, 崩解成碎片^[9]. 同样家蚕抗菌肽 β 组分对体外培养的癌细胞有选择性杀伤作用, 用透射电镜不仅观察到细胞膜的破坏, 还进一步观察到细胞器的变化: 首先是线粒体的肿胀, 嵴消失, 出现空泡化. 线粒体是细胞赖以生存的“动力工厂”, 抗菌肽破坏线粒体的结构, 使细胞无法获得能量, 最终使细胞死亡. 但抗菌肽 CM4 对正常人白细胞不仅没有损害, 相反能刺激其生长^[10]. 其次也发现癌细胞核的核膜也发生变化, 双层膜模糊消失, 有的甚至破损^[10], 因而推测抗菌肽对癌细胞核染色质 DNA 也可能产生作用.

我们首次用 SCGE 法研究了抗菌肽 CM4 组分对人髓样白血病 K562 癌细胞和正常人白细胞核染色质 DNA 的断裂缺失作用, 从而进一步研究抗菌肽的抗癌作用机制. 结果证实抗

菌肽 CM4 对 K562 癌细胞核染色质 DNA 有明显的断裂作用, 而对正常人白细胞核染色质则没有断裂作用, 说明抗菌肽对靶细胞有较强的选择性, 其抗癌作用也并非只作用于细胞质膜, 而是一个十分复杂的过程. 有关抗菌肽对癌细胞核染色质 DNA 的断裂作用有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Hanawalt P C, Friedberg E C, Fox C F *et al.* DNA repair mechanisms. New York: Academic Press, 1978. 465~ 468
- 2 Ostling O, Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, **123** (1): 291~ 298
- 3 Singh N P, McCoy M T, Tice R R *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exptl Cell Res*, 1988, **175** (1): 184~ 191
- 4 秦椿华, 沈建英, 黄仕和等. DNA 断裂检测方法-单细胞凝胶电泳法. *生物化学与生物物理进展*, 1995, **22** (6): 517~ 520
- 5 罗 琰, 孙志贤, 夏寿萱等. 荧光晕法在细胞染色质结构状态检测中的应用. *实验生物学报*, 1995, **28** (1): 37~ 39
- 6 戴祝英, 张双全. γ -射线及大肠杆菌诱导蓖麻蚕产生抗菌物质的研究. *南京师大学报 (自然科学版)*, 1988, (1): 88~ 93
- 7 屈贤铭, 吴克佐, 邱雪贞等. 经聚肌胞核苷酸诱导家蚕蛹血淋巴中六种抗菌肽的分离纯化. *生物化学和生物物理学报*, 1986, **18** (3): 284~ 292
- 8 Boman H G. Antibacterial peptides: key component deduced in immunity. *Cell*, 1991, **65**: 205~ 207
- 9 张双全, 贾红武, 戴祝英. 家蚕抗菌肽对癌细胞的杀伤作用及其超微结构的观察. *生物化学和生物物理进展*, 1997, **24** (2): 62~ 67
- 10 贾红武, 张双全, 戴祝英. 抗菌肽 CM4 抗 K562 癌细胞的超微结构观察. *动物学研究*, 1997, **18** (2): 258~ 264

Studies on the Action of the CM4-ABP anti K562 Cancer Cells by SCGE. WANG Fang, ZHANG Shuang-quan, DAI Zhu-ying (*Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China*).

Abstract The single cell gel electrophoresis (SCGE), also called comet assay, is a simple, rapid and sensitive biochemical technique for detecting DNA single strand breakage of the mammalian cells. In order to study the anti-cancer mechanism of CM4-component of the anti-bacterial peptides (CM4-ABP), the SCGE was used to observe the chromatin DNA breakage action of the K562 cancer cells comparing with the leucocytes of normal human under treating with CM4-ABP. Using the fluorescent microscopy, it is observed the chromatin DNA cleavage of the K562 cancer cells treated with CM4-ABP forms bright fluorescent head and comet like tail; On the contrary, the normal human leucocytes treated and the K562 cancer cells untreated with CM4-ABP show intact, round nuclei, no comet tails. The analysis of comet assay showed that the average ratio of the K562 nuclei cleavage is 73.62% ($P < 0.001$). The results showed that the CM4-ABP can cause the chromatin DNA of the K562 cells damaged, but it has no normal human leucocytes.

Key words single cell gel electrophoresis, anti-bacterial peptide, K562 cancer cell, chromatin DNA

(上接第 8 页, Continued from page 8)

参 考 文 献

- 1 Waitz W, Loide P. Cell cycle dependent association of c-myc protein with the nuclear matrix. *Oncogene*, 1991, **6** (1): 29~ 35
- 2 Muller B F, Paulsen O, Deppert W. Specific binding of MAR/SAR DNA-elements by mutant p53. *Oncogene*, 1996, **12** (9): 1941~ 1952
- 3 Deppert W. Binding of MAR-DNA elements by mutant p53:

possible implication for its oncogenic functions. *J Cell Biochem*, 1996, **62** (2): 172~ 180

- 4 Mancini M A, Shan B, Nickerson J A *et al.* The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent nuclear matrix-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (1): 418~ 422
- 5 Obata H, Sawada N, Isomura H *et al.* Abnormal accumulation of copper in LEC rat liver induces expression of p53 and nuclear matrix-bound p21 waf1/cip1. *Carcinogenesis*, 1996, **17** (10): 2157~ 2161