

去铁胺诱导 K562 细胞凋亡研究

贾国存¹ 汤有才² 李丰益³ 廖清奎³

(1. 郑州市儿童医院血液科, 河南 郑州 450003; 2. 郑州大学第三附属医院血液科, 河南 郑州 450052;
3. 四川大学华西第二医院血液肿瘤实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 探讨铁螯合剂去铁胺(DFO)诱导白血病细胞凋亡的分子机制。方法 实验分为 DFO 组(终浓度分别为 10、50、100 μM)、DFO + FeCl_3 (各 10 $\mu\text{mol/L}$) 组及空白对照组。用钙黄绿素检测 K562 细胞可变铁池。锥虫蓝活细胞拒染实验进行活细胞计数及细胞存活率测定; 光镜形态学观察及流式细胞仪方法检测 K562 细胞凋亡; 比色法检测 caspase-3 活性。结果 (1) DFO 作用于 K562 细胞后, 随培养时间延长及 DFO 浓度的增加, 动态铁池降低, 细胞生存率逐渐下降, 凋亡率增加, 显示一定的时间剂量依赖性; 而 DFO + FeCl_3 组细胞凋亡率与空白对照组差异无统计学意义。(2) 50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ DFO 作用于 K562 细胞 24 h 时, caspase-3 酶活性升高明显, 与对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 相关分析结果显示, K562 细胞铁池的荧光改变与 caspase-3 活性变化呈负相关($r = -0.894, P < 0.05$)。结论 DFO 诱导白血病细胞凋亡的作用可能与螯合细胞内铁, 降低细胞可变铁池, 激活 caspase-3 有关。

[中国当代儿科杂志, 2011, 13(8): 674-676]

[关键词] 去铁胺; 凋亡; caspase-3; 白血病细胞

[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2011)08-0674-03

Deferoxamine induces apoptosis of K562 cells

JIA Guo-Cun, TANG You-Cai, LI Feng-Yi, LIAO Qing-Kui. Department of Hematology, Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou 450003, China (Tang Y-C, Email: tangyoucai@hotmail.com)

Abstract: Objective To study the molecular mechanism of apoptosis of leukemic cells (K562 cells) induced by iron chelating agent deferoxamine (DFO). **Methods** The exponentially growing K562 cells were used ($1 \times 10^6/\text{mL}$) in this study. The K562 cells were treated with different concentrations of DFO (10, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$), DFO + FeCl_3 (10 $\mu\text{mol/L}$ each) or normal saline (blank control). The cellular labile iron pool was measured with a fluorimetric assay using the metalsensitive probe calcein-AM. The viable count and cell viability were determined by trypan blue assay. Cell apoptosis was determined by morphological study and flow cytometry assay. Caspase-3 activity in K562 cells was detected by colorimetry. **Results** After DFO treatment, the cellular labile iron pool and the viability of K562 cells were reduced and the cell apoptosis increased in a time- and dose-dependent manner compared with the blank control group. The apoptosis rate of K562 cells in the DFO + FeCl_3 treatment group was not significantly different from that in the blank control group. The caspase-3 activity in K562 cells increased significantly 24 hrs after 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ DFO treatment when compared with the blank control group ($P < 0.01$). There was a negative correlation between cellular labile iron pool and caspase-3 activity of K562 cells ($r = -0.894, P < 0.05$). **Conclusions** DFO induces apoptosis of leukemic cells possibly through decreasing cellular labile iron pool and increasing caspase-3 activity of the cells.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (8): 674-676]

Key words: Deferoxamine; Apoptosis; Caspase-3; Leukemic cell

铁是细胞生长所必需的元素之一, 人体内许多酶的合成及其活性的维持都依赖于铁, 许多基因的表达也受细胞内铁水平的影响。研究表明, 铁螯和可抑制白血病细胞生长, 诱导其凋亡^[1], 其作用可能与铁螯合剂导致肿瘤细胞可变铁池 (labile iron pool, LIP) 的改变有关, 但无细胞铁 LIP 变化的直接证据, 是否与 caspase 级联反应有关也尚不清楚^[2]。本研究以白血病细胞 K562 为研究对象, 观察去铁胺 (deferoxamine, DFO) 诱导白血病细胞凋亡过程中细胞铁池及 caspase-3 的改变, 进一步阐明铁剥夺诱导白血病细胞凋亡的可能机制, 为探索儿童白血病治疗的新方法提供初步的实验依据。

[收稿日期] 2011-01-10; [修回日期] 2011-03-08
[基金项目] 河南省医学科技创新人才工程资助项目 (2002216)。
[作者简介] 贾国存, 男, 博士, 副主任医师。
[通信作者] 汤有才, 副教授。

1 材料与方法

1.1 材料

K562 细胞(本室保存);DFO(Giba 公司 0698);RPMI 1640(Gibco 公司);特级新生牛血清(Hyclone 公司);calcein AM(FW998.9 Sigma 公司);BIP(2,2-Bipyridine,FW 156.2 Sigma 公司),DMSO(上海试剂公司)。caspase-3 检测试剂盒(CHEMICON(No. APT131);兔抗人 caspase-3 多克隆抗体(Santa Cruz,U.S.A)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将 K562 细胞置于含体积分数为 10% 灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养基中,37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中悬浮培养,2~3 d 传代一次,取对数生长期细胞进行实验。细胞浓度为 1×10⁶/mL,0.1% 台盼蓝鉴定活性在 98% 以上。

1.2.2 细胞周期同步化 采用血清饥饿法,将 K562 细胞置于无血清培养基中,培养 48 h,重悬于含有血清的培养基中。

1.2.3 实验分组 根据有关文献报道及临床用药剂量^[3],经预实验选择 DFO 浓度 10 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L 为实验浓度,加于 K562 细胞培养基中。实验分为对照组、DFO(终浓度分别为 10 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L)组、DFO + FeCl₃(各 10 μmol/L)组。每组设 2 个复孔,实验重复 3 次,以生理盐水代替 DFO 作为空白对照。分别于第 6 h、12 h、24 h、48 h 收集细胞,观察不同浓度 DFO 对 K562 细胞增殖及凋亡的影响。

1.2.4 细胞 LIP 检测 参考文献^[4]提供的方法,略加改进。钙黄绿素是一种荧光染料,可以主动穿过细胞膜,在细胞内乙酰甲基化酯被分解,calcein 即游离出来。在细胞内,calcein 可以与 Fe²⁺、Fe³⁺ 可逆性结合,几乎不与其他金属离子结合,对添加铁螯合剂所增加的荧光几无影响。用 0.25 μmol/L 钙黄绿素负荷细胞,添加锥虫蓝(0.25 μg/mL)以猝灭细胞外过多的钙黄绿素,测定荧光后,再加入 BIP 螯合钙黄绿素结合的铁,再检测荧光值,二者的差值即为细胞内 LIP 的变化量。

1.2.5 细胞凋亡检测 分别取培养不同时间点的 K562 细胞,行苏木精-伊红染色形态学观察及流式细胞仪检测细胞凋亡率及细胞周期分布。

1.2.6 caspase-3 活性测定 采用比色法检测 caspase-3(基于 pNA 标记底物的比色法)活性,依

照说明操作。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件分析,各组细胞凋亡率及 caspase-3 活性比较采用方差分析,两两比较用 *q* 检验,caspase-3 活性与细胞 LIP 的关系用相关分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞 LIP 测定

荧光光度计(激发波长:495 nm;发射波长:530 nm)检测对照组及 DFO 组 48 h 荧光变化量,本研究结果显示 50 μmol/L 及 100 μmol/L DFO 可降低 K562 细胞 LIP,与对照组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见图 1。

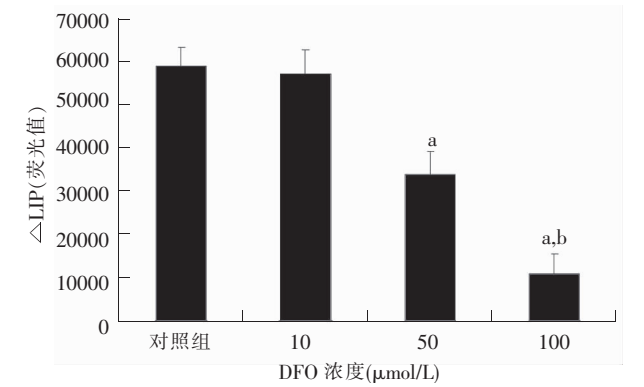


图1 DFO 作用 K562 细胞 48 h LIP 改变 a:与对照组比较,*P* < 0.05; b:与其他 3 组比较,*P* < 0.05

2.2 形态学观察及流式细胞仪检测 DFO 对 K562 细胞凋亡的作用

不同浓度的 DFO 作用于 K562 细胞 6~48 h,形态学检测均可见凋亡细胞。随 DFO 浓度升高,凋亡率逐渐增加,在 48 h 时凋亡率最高(表 1),显示 DFO 诱导 K562 细胞凋亡有剂量及时间依赖性。与等当量 FeCl₃ 共同作用于 K562 细胞时,凋亡率与对照组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

2.3 caspase-3 活性在 K562 细胞凋亡中的变化

结果显示,K562 细胞在不同浓度的 DFO 作用下,caspase-3 的活性逐渐升高。50 μmol/L、100 μmol/L DFO 作用于 K562 细胞 24 h 时,caspase-3 酶活性升高明显,与对照组相比,差异有统计学意义(*P* < 0.001);6 h 时,各浓度组之间 caspase-3 活性水平比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见图 2。

表 1 DFO 浓度及培养时间对 K562 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	细胞凋亡率(%)			
	6 h	12 h	24 h	48 h
对照组	1.33 ± 0.56	1.35 ± 0.41	2.23 ± 0.59	5.67 ± 1.67
10 μmol/L DFO	1.42 ± 0.62	1.53 ± 0.56	3.43 ± 1.27	9.63 ± 3.92 ^a
50 μmol/L DFO	1.48 ± 0.36	6.87 ± 2.30 ^{a,b}	17.97 ± 3.85 ^{a,b}	32.67 ± 4.84 ^{a,b}
100 μmol/L DFO	1.83 ± 0.53	9.72 ± 3.99 ^{a,b}	23.07 ± 7.04 ^{a,b,c}	42.67 ± 9.35 ^{a,b,c}
DFO + FeCl ₃	1.18 ± 0.24	1.55 ± 0.38 ^{c,d}	2.55 ± 0.91 ^{c,d}	7.30 ± 1.14 ^{c,d}
F 值	1.464	18.62	39.551	59.43
P 值	> 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 10 μmol/L 组比较, $P < 0.05$; c: 与 50 μmol/L 组比较, $P < 0.05$; d: 与 100 μmol/L 比较, $P < 0.05$ 。

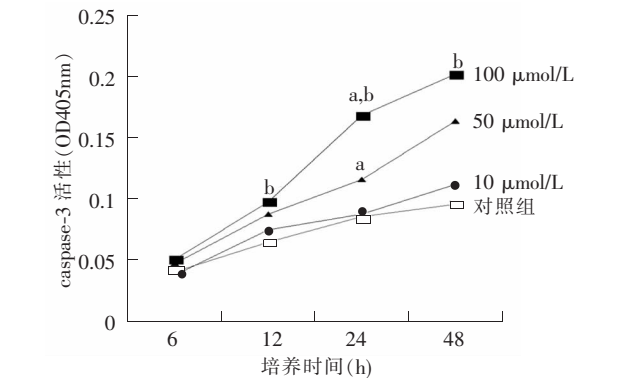


图 2 DFO 对 K562 细胞 caspase-3 活性的影响 a: 与同时时间点对照组比较, $P < 0.01$; b: 与同组其他时间点比较, $P < 0.01$

2.4 细胞 LIP 和凋亡率与 caspase-3 活性的相关关系

相关分析结果显示, K562 细胞 LIP 的改变与 caspase-3 活性呈负相关($r = -0.894, P < 0.05$); 细胞凋亡率与 caspase-3 活性呈正相关关系($r = 0.946, P < 0.05$)。

3 讨论

已有的研究显示, 一定量的铁可促进肿瘤细胞生长, 而铁螯合可诱导肿瘤细胞凋亡, 并推测与铁螯合剂导致肿瘤细胞内铁的改变有关^[5]。由于缺少检测 LIP 的方法, 则无法提供细胞铁 LIP 变化的直接证据。铁通过内吞膜转入胞浆后进入细胞内铁池, 称之为 LIP, 参与机体的许多生理病理过程。本研究结果显示, DFO 降低了细胞的 LIP, 且呈现剂量依赖性。该实验结果提供了 DFO 作用下, 细胞内铁池变化的直接证据。

细胞凋亡主要是由一系列高度调控的半胱氨酸蛋白酶 caspase 级联反应事件的结果^[6]。caspase-3 是凋亡过程中激活的关键激酶, 通过降解细胞内相关的底物使细胞死亡。本研究结果显示, K562 细胞在 DFO 的作用下, 随作用时间的延长及浓度的

增加, caspase 3 的活性逐渐升高, 呈现出时间及剂量依赖性。相关分析显示, 细胞 LIP 下降与 caspase-3 活性升高呈负相关, 进一步表明 caspase-3 在 DFO 诱导 K562 细胞凋亡过程中起重要作用。

caspase-3 被激活的通路有线粒体途径、Fas/FasL 信号途径、TNFR-1 信号途径、内质网通路^[7]。不同途径下传的凋亡信号, 最终激活 caspase-3, 导致细胞凋亡。本研究结果表明, DFO 可能通过螯合细胞内铁, 使细胞内 LIP 降低, 诱导细胞凋亡, 而且可通过对 caspase-3 的激活实施细胞凋亡。但有关凋亡过程中细胞铁的改变与 caspase 3 间的信号转导途径及 caaspase 级联反应之间的关系尚待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] 汤有才, 贾国存, 李丰益, 廖清奎, 张冬梅, 王军. 铁剥夺抗 K562 细胞的增殖作用及机制[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(3): 180-182.

[2] Meggiato T, Calabrese F, De Cesare CM, Baliello E, Valente M, Del Favero G. C-JUN and CPP32 (CASPASE 3) in human pancreatic cancer; relation to cell proliferation and death[J]. Pancreas, 2003, 26(1): 65-70.

[3] Gao J, Lovejoy D, Richardson DR. Effect of iron chelators with potent anti-proliferative activity on the expression of molecules involved in cell cycle progression and growth[J]. Redox Rep, 1999, 4(6): 311-322.

[4] Epsztejn S, Kakhlon O, Glickstein H, Breuer W, Cabantchik I. Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells[J]. Anal Biochem, 1997, 248(1): 31-40.

[5] 贾国存, 刘玉峰, 汤有才, 李丰益, 房定珠, 廖清奎. 去铁胺联合阿糖胞苷诱导 HL60 细胞凋亡作用实验研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(4): 368-370.

[6] Greene BT, Thorburn J, Willingham MC, Thorburn A, Planalp RP, Brechbiel MW, et al. Activation of Caspase pathways during Iron Chelator-mediated Apoptosis[J]. Biol Chem, 2002, 277(28): 25568-25575.

[7] Roy S, Bayly CI, Gareau Y, Houtzager VM, Kargman S, Keen SL, et al. Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic "safety catch" regulatory tripeptide[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 22(11): 6132-6137.

(本文编辑: 徐福兰)