

论著·实验研究

二烯丙基二硫诱导人白血病 K562 细胞 凋亡及其对 Fas、FasL 及 caspase-8 表达的影响

肖正香¹ 殷小成¹ 谭艳芳² 彭艳辉¹

(1. 南华大学附属第一医院儿科, 湖南 衡阳 421001; 2. 湖南省儿童医院感染二科, 湖南 长沙 410007)

[摘要] 目的 探讨二烯丙基二硫(DADS)诱导白血病 K562 细胞凋亡的作用及其机制。方法 采用 Hoechst 33258 染色法观察细胞凋亡形态学变化;流式细胞术分析不同浓度及不同作用时间 DADS 对 K562 细胞凋亡的诱导作用;RT-PCR 法检测 DADS 作用 48 h 后 Fas、FasL、caspase-8 mRNA 的表达。结果 DADS 可诱导 K562 细胞凋亡。DADS(作用细胞 24 h)浓度从 10 mg/L 增至 40 mg/L 时,其对 K562 细胞的凋亡率由 (11.60 ± 0.83)% 增至 (37.94 ± 0.87)% ;DADS(40 mg/L 浓度组)作用时间从 24 h 增至 72 h,其对 K562 细胞的凋亡率由 (37.94 ± 0.87)% 增至 (47.02 ± 0.66)% ,各实验组随时间、浓度增加凋亡率明显增加 ($P < 0.05$)。DADS 作用 48 h 后,Fas、caspase-8 mRNA 表达水平较对照组上调;FasL mRNA 较对照组下调 ($P < 0.05$)。结论 DADS 呈时间和浓度依赖性诱导白血病 K562 细胞凋亡,其凋亡机制可能与上调 Fas、caspase-8,下调 FasL 有关。

[中国当代儿科杂志,2011,13(1):53-56]

[关键词] 二烯丙基二硫;凋亡;K562 细胞

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)01-0053-04

Effects of diallyl disulfide on apoptosis of human leukemia K562 cells and expression of Fas, FasL and caspase-8

XIAO Zheng-Xiang, YIN Xiao-Cheng, TAN Yan-Fang, PENG Yan-Hui. First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China (Yin X-C, Email: xcyin108@sina.com)

Abstract: Objective To study the effects of diallyl disulfide (DADS) on apoptosis of human leukemia K562 cells and possible mechanisms. **Methods** The morphologic changes of leukemia K562 cells after DADS treatment were observed by Hoechst 33258 staining. Cell apoptosis rates after different concentrations and different durations of DADS treatment were determined by flow cytometry. Fas, FasL and caspase-8 mRNA expression was estimated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 48 hrs after DADS treatment. **Results** The characteristics of apoptosis in K562 cells induced by DADS were observed. After 24 hrs of DADS treatment, the apoptosis rate of K562 cells increased from (11.60 ± 0.83)% at the concentration of 10 mg/L to (37.94 ± 0.87)% at the concentration of 40 mg/L. The apoptosis rate of K562 cells increased after 40 mg/L DADS with the increasing time from (37.94 ± 0.87)% (24 hrs) to (47.02 ± 0.66)% (72 hrs). Expression of Fas and caspase-8 mRNA increased, while FasL mRNA expression decreased significantly 48 hrs after DADS treatment compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** DADS can induce apoptosis of human leukemia K562 cells in a time- and concentration-dependent manner, possibly through increasing Fas and caspase-8 expression and decreasing FasL expression. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (1):53-56]

Key words: Diallyl disulfide; Apoptosis; K562 cell

二烯丙基二硫(diallyl disulfide, DADS)是一种小分子量的大蒜脂溶性提取物,具有广泛的生物学效应,如降胆固醇、降血压、抗衰老、抗菌消炎、提高免疫力等^[1]。大量的流行病学和实验性研究证实,大蒜及其烯丙基硫化物有抗肿瘤的作用,能降低多种化学致癌物诱发的恶性肿瘤的发生率^[2]。近年

来,DADS 的抗肿瘤作用日益受到人们的关注。有研究表明^[3],DADS 可以抑制乳腺癌、皮肤癌、肝癌、肺癌、胃癌、食管癌、结肠癌等肿瘤细胞的生长,但其对白血病细胞的影响目前报道较少。本研究探讨 DADS 诱导人红白血病细胞株 K562 凋亡及其对 Fas/ FasL 受体相关信号转导的调节作用,为寻找和

[收稿日期]2010-03-14; [修回日期]2010-06-12
[基金项目]湖南省高校科研经费项目(09C840)。
[作者简介]肖正香,女,硕士研究生,住院医师。
[通信作者]殷小成,副主任医师。

开发能诱导白血病细胞凋亡而毒副作用较小的中药提供理论与实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

DADS 购自 Fluka 公司,用二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解配制, DMSO 终浓度 $<0.01\%$; 小牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司; RPMI-1640 培养基购自 HyClone 公司; Trizol 购自美国 GIBCO BRL 公司; 逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司, PCR 试剂盒购自广州东盛生物公司, PCR 引物由 Invitrogen 公司合成; Hoechst 33258 凋亡检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞株与细胞培养 K562 细胞株购自第四军医大学实验动物中心, 细胞生长于含 10% 的新生小牛血清、 1×10^5 U/mL 青霉素和 10 mg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中, 置于 37°C , 5% CO_2 培养箱内培养, 每 $2 \sim 3$ d 换液传代。实验分为 2 组: 对照组及药物处理组。对照组包括: 空白对照及溶媒对照, 空白对照组不加 DADS 与 DMSO, 溶媒对照组加有同最高药物浓度组等量体积的 DMSO; 药物处理组加入浓度分别为 10 、 20 、 40 、 80 mg/L DADS。取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 Hoechst 33258 染色 收集细胞, 用 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基制成 3.0×10^5 /mL 的单细胞悬液, 接种于无菌 6 孔培养板中, 每孔 2 mL。24 h 后吸去上清, 离心去液体, 冷 PBS 洗 2 遍, 涂片, 用 4% 的甲醛溶液 1 mL 4°C 固定 10 min, PBS 洗 2 遍, 滴加 $100 \mu\text{L}$ 的 Hoechst 33258 工作液, 室温 10 min, 冲洗干净, 自然风干, 在荧光显微镜下紫外光 340 nm 波长激发条件下观察并照相。

1.2.3 流式细胞仪检测 DADS 作用后 K562 细胞的凋亡率 收集 DADS 作用后培养 24 、 48 、 72 h 细胞, 1000 r/min 离心 5 min, 用预冷 PBS 液重悬细胞, 离心 5 min, 1000 r/min, 重复 1 次; 将收集的细胞用 4°C 预冷的体积分数为 0.75 的乙醇固定, 冰盒送检。上机前作如下处理: ①细胞离心洗涤, 去上清, 摇匀; ②加 RNA 酶 $50 \mu\text{L}$, 37°C 水浴 30 min。③加碘化丙啶(PI) $50 \mu\text{L}$, 振荡混匀, 避光置冰箱 30 min; ④ 300 目尼龙网滤过, 上机检测, 计数 10000 个细胞, 进行凋亡率的检测。细胞凋亡率 = [凋亡细胞数 / (凋亡细胞数 + 未凋亡细胞数)] $\times 100\%$ 。实验重复 15 次。

1.2.4 RT-PCR 检测 Fas、FasL 及 caspase-8 基因表达 根据流式结果选择凋亡率最明显的 48 h 进行 RT-PCR 检测。收集各组细胞, 按 Trizol 法提取各组细胞总 RNA, 取总 RNA 约 $2 \mu\text{g}$, 逆转录合成 cDNA, 反应体积为 $20 \mu\text{L}$ 。以 GAPDH 作为内参, 取上述逆转录产物 $2 \mu\text{L}$ cDNA 进行 PCR 循环, 扩增 Fas、FasL、caspase-8 基因。Fas 的引物上游为: $5\text{-CACTATTGCTGGAGTCATG-3}$, 下游: $5\text{-CTGAGTCAC-TAGTAATGTCC-3}$; 扩增片段 266 bp; FasL 的引物上游: $5\text{-ACACCTATGGAATTGTCCTGC-3}$, 下游: $5\text{-GAC-CAGAGAGAGCTCAGATACG-3}$, 扩增片段 311 bp; Caspase-8 的引物上游: $5\text{-CTGCTGGGATGGCCACT-GTG-3}$; 下游 $5\text{-TCGCTCGAGGACATCGCTCTC-3}$, 扩增片段 366 bp。Fas、FasL 的 PCR 扩增条件为: 94°C 预变性 2 min $\rightarrow 95^\circ\text{C}$ 60 s $\rightarrow 60^\circ\text{C}$ 60 s $\rightarrow 72^\circ\text{C}$ 90 s (循环 30 次) $\rightarrow 72^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。Caspase-8 的扩增条件为: 95°C 预变性 2 min $\rightarrow 95^\circ\text{C}$ 15 s $\rightarrow 60^\circ\text{C}$ 15 s $\rightarrow 72^\circ\text{C}$ 15 s (循环 40 次) $\rightarrow 72^\circ\text{C}$ 延伸 5 min PCR。使用 ScionImage 图像分析软件进行 PCR 产物凝胶电泳图像分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学处理, 所有数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本均数的比较采用 t 检验, 多组比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hoechst 33258 染色检测细胞形态学变化

Hoechst 33258 荧光染色法检测 DADS 对 K562 细胞的凋亡作用。对照组 K562 细胞胞核界限清晰, 呈圆形或椭圆形, 为均匀蓝绿色荧光, 染色质分布均匀; DADS 处理后的细胞, 部分细胞核缩小, 染色质凝集呈颗粒团状分布, 有的核碎裂形成多个球形颗粒, 为凋亡细胞。见图 1。

2.2 流式细胞仪检测 DADS 对 K562 细胞凋亡率的作用

本研究用流式细胞仪分析了细胞凋亡情况。DADS 各浓度组凋亡率与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而各时间点空白对照组与 DMSO 溶媒对照组的凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。DADS 在不同浓度、不同时间的细胞凋亡率组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), DADS 对 K562 细胞的凋亡效应与药物浓度及作用时间有明显依赖关系: 同一时间点 (24 h) DADS 浓度从 10 mg/L 增至

40 mg/L 时, K562 细胞的凋亡率由 (11.60 ± 0.83)% 增至 (37.94 ± 0.87)% ; DADS (40 mg/L 浓度组) 作用时间从 24 h 增至 72 h, K562 细胞凋亡率由 (37.94 ± 0.87)% 增至 (47.02 ± 0.66)% ; 各药物

组随时间、浓度增加凋亡率明显增加, 以 48 h 时间组中 40 mg/L 浓度组最明显; 而 DADS 浓度在 80 mg/L 时凋亡率反而轻度降低, 可能是由于高浓度 DADS 导致 K562 细胞部分坏死。见表 1。

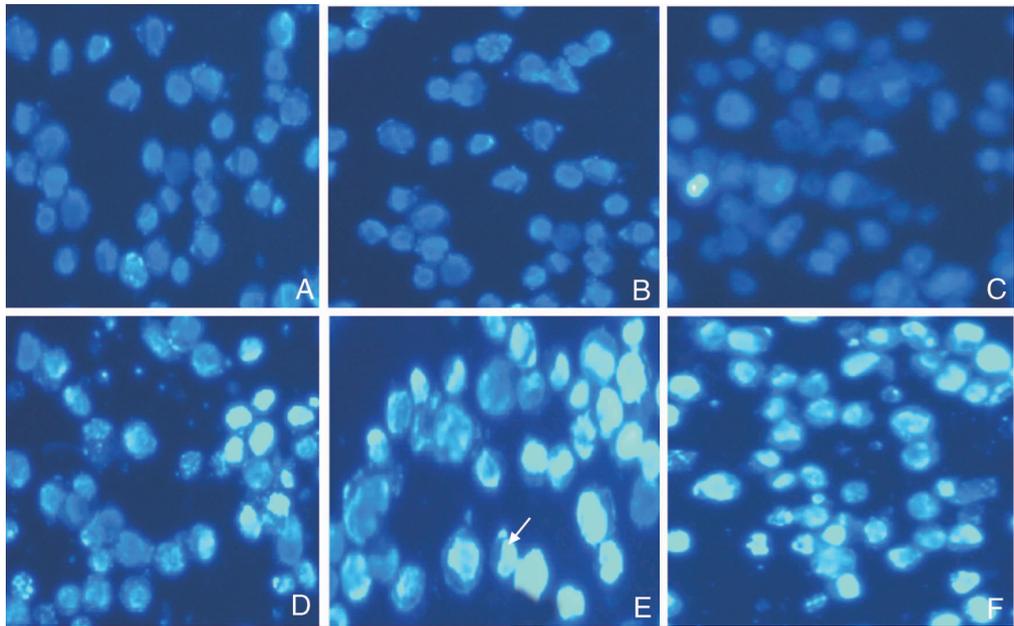


图 1 Hoechst 33258 染色检测不同浓度 DADS 处理后的 K562 细胞形态变化 A: 空白对照; B: 溶媒对照; C~F: 10、20、40、80 mg/L DADS 组。空白组及溶媒对照组细胞呈均匀蓝绿色荧光。药物处理组随着药物浓度增加, 凋亡细胞增多, 呈染色质凝集, 甚至形成凋亡小体 (箭头所示)。

表 1 DADS 作用不同浓度、不同时间后 K562 细胞凋亡率 (n = 15, $\bar{x} \pm s$, %)

时间	对照组		药物处理组 (mg/L)			
	空白对照	DMSO 对照	10	20	40	80
24 h	2.10 ± 0.25	2.35 ± 0.10	11.60 ± 0.83 ^e	18.02 ± 0.70 ^{c,d}	37.94 ± 0.87 ^{c,d,e}	21.48 ± 0.80 ^{c,d,e,f}
48 h	3.76 ± 0.18	3.96 ± 0.18	16.04 ± 0.75 ^{a,e}	26.74 ± 0.40 ^{a,d}	42.22 ± 0.50 ^{a,c,d,e}	40.02 ± 0.73 ^{a,c,d,e,f}
72 h	6.86 ± 0.22	7.44 ± 0.52	23.64 ± 0.41 ^{a,b,c}	29.48 ± 0.89 ^{a,b,c,d}	47.02 ± 0.66 ^{a,b,c,d,e}	46.76 ± 0.54 ^{a,b,c,d,e,f}

a: 与 24 h 组比较, $P < 0.05$; b: 与 48 h 组比较, $P < 0.05$; c: 与同时时间点对照组比较, $P < 0.05$; d: 与同时时间点 10 mg/L 组比较, $P < 0.05$; e: 与同时时间点 20 mg/L 组比较, $P < 0.05$; f: 与同时时间点 40 mg/L 组比较, $P < 0.05$

2.3 Fas、FasL 和 caspase-8 基因表达在 DADS 诱导 K562 细胞凋亡中的作用

DADS 作用 K562 细胞 48 h 后, 空白对照组的 Fas 基因 RT-PCR 产物相对表达量为 0.90 ± 0.05, 与 DMSO 溶媒组的表达强度 (1.02 ± 0.06) 无明显差异, Fas 基因 RT-PCR 产物 (266 bp 带) 随着 DADS 浓度增大明显增多, 电泳条带变宽、变亮 (图 2A)。10 mg/L 组 Fas 表达强度为 1.19 ± 0.05; 20 mg/L 组的表达强度为 1.27 ± 0.04, 40 mg/L 组为 1.75 ± 0.03, 80 mg/L 组为 1.61 ± 0.06, 均高于空白对照组 ($P < 0.05$)。空白对照组 FasL 相对表达量为 2.80 ± 0.05, 与 DMSO 溶媒组表达强度 (2.75 ±

0.26) 无明显差异 ($P > 0.05$); 10 mg/L 组、20 mg/L、40 mg/L 组、80 mg/L 药物处理组的 FasL 相对表达量 (2.58 ± 0.10, 2.13 ± 0.03, 1.67 ± 0.02, 1.86 ± 0.04) 明显低于空白对照组 ($P < 0.05$)。见图 2B。

DADS 作用细胞 48 h 后, 空白对照组的 caspase-8 相对表达强度为 1.03 ± 0.05, 与溶媒组 (0.93 ± 0.11) 差异无统计学意义。药物处理 10 mg/L 组 caspase-8 相对表达为 1.25 ± 0.07, 20 mg/L 组为 1.35 ± 0.13, 40 mg/L 组为 1.97 ± 0.07, 80 mg/L 组为 1.85 ± 0.08, 均高于空白对照组 ($P < 0.05$)。见图 2C。

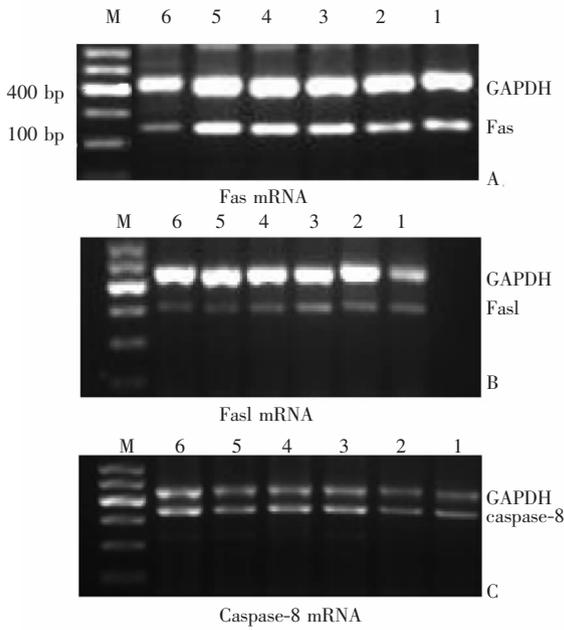


图2 RT-PCR法检测 Fas、FasL 及 caspase-8 mRNA

表达情况 M: marker; 1: 空白对照; 2: DMSO 对照; 3~6: 10、20、40 及 80 mg/L 药物处理组。

3 讨论

Fas 是细胞膜 I 型糖蛋白,分子质量为 48 kDa,属于肿瘤坏死因子受体家族,由 325 个氨基酸组成,主要以膜受体形式存在,在细胞凋亡中具有信号传导作用。FasL 为 Fas 配体,Fas 与 FasL 结合使细胞表面 Fas 分子交联,凋亡信号被传导到细胞内,从而诱导细胞凋亡,所以 Fas 又称死亡因子^[4]。Caspase-8 是一类蛋白水解酶,为 Fas 及 FasL 下游的效应分子,活化的 caspase-8 能裂解大量底物,是凋亡机制的核心成分,当 FasL 表达增高时,caspase-8 活性明显提高^[5],Fas 与 FasL 结合后,Fas 相关蛋白(FADD)激活 caspase-8、caspase-3、7 等级联反应,诱导细胞凋亡^[6]。DADS 作为大蒜中最重要的有效成分,可通过激活相应的受体调控基因的转录活性,从而产生调节增殖、分化和凋亡等多种生物学效应。

本研究利用 Hoechst33258 荧光染色法,从形态学方面观察了 DADS 处理后细胞凋亡的变化。发现 DADS 处理后的部分细胞核缩小,染色质凝集呈颗粒团状分布,有的核碎裂形成多个球形颗粒为凋亡小体。采用流式细胞仪检测凋亡率,结果显示 DADS 呈时间和浓度依赖性诱导 K562 细胞凋亡,以 48 h 40 mg/L 浓度组最明显。

Fas、FasL 介导的信号传导通路是细胞凋亡的

主要途径,通路上任一环节缺失都可导致癌细胞逃逸细胞凋亡,从而导致细胞无限增殖。有报道,Fas、FasL 表达水平与肿瘤发生与转移密切相关^[7-10]。本研究发现 Fas 及 caspase-8 在 K562 细胞中表达水平较 FasL 在 K562 细胞中表达水平较低,提示 K562 细胞通过减少细胞凋亡数量,有利于肿瘤细胞增殖。不同浓度 DADS 作用 K562 细胞 48 h 后,Fas、caspase-8 表达水平较对照组增加($P < 0.05$);FasL 表达水平较对照组减少($P < 0.05$),提示 Fas/FasL 途径在诱导 K562 细胞凋亡中起着重要作用。

综上所述,DADS 可在体外呈时间和浓度依赖性诱导人白血病 K562 细胞凋亡,其凋亡机制可能是通过上调 Fas 和 caspase-8 及下调 FasL 表达,激活 Fas/FasL 死亡受体通路实现的。

[参 考 文 献]

- [1] Dausch JG, Nixon DW. Garlic: a review of its relationship to malignant disease[J]. Prev Med, 1990, 19(1): 346-361.
- [2] Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. Intake of garlic and its bioactive components[J]. J Nutr, 2001, 131(3s): 955S-962S.
- [3] Kwon KB, Yoo SJ, Ryu DG, Yang JY, Rho HW, Kim JS, et al. Induction of apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 63(1): 41-47.
- [4] Shimonishi T, Isse K, Shibata F, Aburatani I, Tsuneyama K, Sabit H, et al. Up-regulation of fas ligand at early stages and down-regulation of Fas at progressed stages of intrahepatic cholangiocarcinoma reflect evasion from immune surveillance [J]. Hepatology, 2000, 32(4 Pt 1): 761-769.
- [5] Liang Y, Nylander KD, Yan C, Schor NF. Role of caspase 3-dependent Bcl-2 cleavage in potentiation of apoptosis by Bcl-2[J]. Mol Pharmacol, 2002, 61(1): 142-149.
- [6] Zheng TS, Schlosser SF, Dao T, Hingorani R, Crispe IN, Boyer JL, et al. Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci, U S A, 1998, 95(23): 13618-13623.
- [7] Lee TB, Min YD, Lim SC, Kim KJ, Jeon HJ, Choi SM, et al. Fas (Apo-1/CD95) and Fas ligand interaction between gastric cancer cells and immune cells [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2002, 17(1): 32-38.
- [8] Kim SS, Won SJ, Kim NJ, Yoo JK, Bae K, Lee KT. 3-Oxoolean-12-en-27-oic acid isolated from aceriphyllum rossii induces caspase-8-dependent apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells[J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(1): 91-98.
- [9] Villa-Morales M, Santos J, Pérez-Gómez E, Quintanilla M, Fernández-Piqueras J. A role for the Fas/FasL system in modulating genetic susceptibility to T-cell lymphoblastic lymphomas[J]. Cancer Res, 2007, 67(11): 5107-5116.
- [10] Crew KD, Gammon MD, Terry MB, Zhang FF, Agrawal M, Eng SM, et al. Genetic polymorphisms in the apoptosis-associated genes FAS and FASL and breast cancer risk[J]. Carcinogenesis, 2007, 28(12): 2548-2551.

(本文编辑:俞 燕)