

线粒体膜电位在三氧化二砷诱导 K562 细胞凋亡中的作用

韩义香, 章圣辉, 吴建波, 叶爱芳, 尹丽慧, 谭映霞

(温州医学院附属第一医院 内科实验室, 浙江 温州 325000)

摘要:目的 探讨三氧化二砷 (As_2O_3) 诱导 K562 细胞凋亡的发生机制。方法 分别以 1、2、4、8、16 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 诱导 K562 细胞凋亡, MTT 法检测不同时间点细胞增殖抑制率, DNA Ladder 法检测细胞凋亡, Annexin V/PI 染色结合流式细胞术检测细胞凋亡率, Rhodamine 123 染色流式细胞术检测线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 变化, ELISA 法检测胞浆细胞色素 C (CYT C) 水平, 分光光度法检测 Caspase 3 活性, 流式细胞术检测 Bcl 2 和 Bax 表达。结果 MTT 结果显示 As_2O_3 能抑制 K562 细胞生长, 且呈现时间剂量依赖性; 4~16 $\mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 作用 24 h 均可诱导 K562 细胞凋亡, 同时伴有 $\Delta\Psi_m$ 下降, 胞浆内 CYT C 蛋白浓度及 Caspase 3 活性增高, 胞浆 Bcl 2/Bax 值下降, 且均呈剂量依赖性。结论 As_2O_3 诱导 K562 细胞凋亡可能是通过降低 $\Delta\Psi_m$, 激活线粒体凋亡途径实现的, Bcl 2/Bax 值下降可能与其有关。

关键词: 三氧化二砷; 人慢粒细胞系 K562; 细胞凋亡; 线粒体跨膜电位

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)03-0452-04

近十几年来, 三氧化二砷 (As_2O_3) 被成功用于治疗常规化疗或维甲酸治疗后复发的急性早幼粒白血病^[1], 其作为一种古老的矿物药成为国际血液、肿瘤学界的研究热点。近年来研究证实, As_2O_3 对多种恶性血液病细胞和实体瘤细胞具有明显的抑制生长及促进凋亡作用^[2,3]。慢性粒细胞白血病 (CML) 是发生在早期多能干细胞上的恶性骨髓增殖性疾病, 其进入急变期往往对化疗药物作用不敏感。伊马替尼 (ST1571) 的研制成功为急变期的患者带来了新的希望, 但是由于价格昂贵和耐药问题使其应用受到一定的局限^[4], 因此许多临床血液学家开始关注 As_2O_3 治疗 CML 的研究。本实验研究了 As_2O_3 对 CML 细胞株 K562 体外诱导凋亡作用及对线粒体跨膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 和 Bcl 2/Bax 值的影响, 探讨 $\Delta\Psi_m$ 和 Bcl 2/Bax 值在 As_2O_3 诱导 K562 细胞凋亡中的作用, 以期阐明 As_2O_3 诱导 K562 细胞凋亡的分子机制。

1 材料

K562 细胞购于中国科学院上海细胞生物研究所。 As_2O_3 、MTT 试剂、Rhodamine 123 (Sigma 公司); 胎牛血清、RPMI 1640 培养基 (Gibco 公司); DNA Ladder 抽提试剂盒、Caspase 3 活性检测试剂盒 (碧云天生物技术有限公司); FIX & PERM kit、Annexin V/PI kit (Caltag 公司); 细胞色素 C (CYT C) ELISA kit (R&D 公司); Bcl 2-FITC 及同型对照 (A ncell 公司); Bax-PE 及同型对照

(Santa Cruz 公司)。Elx800 酶标仪 (BIO-TEK 公司); FACS Calibur 流式细胞仪 (BD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及实验分组: 采用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液常规培养 K562 细胞, 药物处理时均选用对数生长期细胞。实验分成 6 组: 对照组, 1、2、4、8、16 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 组。

2.2 MTT 法评价细胞增殖抑制: 细胞生长培养液调整每组细胞浓度均为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 。取 96 孔板, 每孔加入 100 μL 细胞悬液, 每组设 8 个平行培养孔。分别于 24、48、72 h 取各组培养板, 每孔加入 20 μL MTT (5 g/L) 继续培养 4 h, 经洗涤离心弃去上清, 加入 100 μL 二甲亚砜, 震荡 10 min, 在酶标仪上读取波长为 570 nm 的吸光度 (A) 值, 计算 K562 细胞的生长抑制率 [抑制率 = $(1 - A_{\text{加药组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$]。

2.3 DNA 片段化分析: 各组细胞药物作用 24 h 后, 取 3×10^6 个细胞用于总 DNA 提取。提取方法根据 DNA Ladder 抽提试剂盒提供的操作手册进行。1.5% 琼脂糖凝胶电泳 30 min, 凝胶成像分析仪观察并记录结果。

2.4 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡: 24 h 时收集各组 K562 细胞, PBS 洗涤 2 次, 按 Annexin V/PI 试剂盒说明书操作。1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 获取和分析均采用 Cell Quest V3.2 软件。

2.5 $\Delta\Psi_m$ 检测: 各组细胞药物作用 24 h 后, 收获

①收稿日期: 2009-07-07

作者简介: 韩义香 (1979—), 女, 山东惠民人, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 免疫学及分子生物学。

Tel: (0577) 86550276 E-mail: yxhan2001@163.com

细胞用 D-hanks 液洗涤 2 次, 将细胞悬浮于 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rhodamine 123 染液中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱 30 min, D-hanks 液洗涤 3 次后重悬细胞, 流式细胞仪测定 Rhodamine123 荧光强度。

2.6 胞浆 CYTC 浓度及 Caspase-3 活性测定: 分别按 CYTC 浓度检测试剂盒和 Caspase-3 活性检测试剂盒说明书要求进行, 各组样品及标准品均采用复孔。

2.7 Bcl-2 和 Bax 蛋白检测: 离心收集各组 24 h 后的 K562 细胞各约 1.0×10^6 个, PBS 洗涤 2 次, 细胞沉淀用 FIX & PERM A 液 100 μL 固定 20 min, 加入 2 mL PBS 洗涤后加入 200 μL B 液, 重悬后均分成 2 管, 1 管加入鼠抗 IgG1-FITC/鼠抗 IgG1-PE, 另 1 管加入 Bcl-2 FITC/Bax PE, 每种抗体均加 10 μL , 混匀, 室温避光孵育 20 min, PBS 洗涤 1 次后用 300 μL 1% 多聚甲醛 PBS 重悬, 流式细胞仪获取和分析均采用 Cell Quest V3.2 软件。

2.8 统计学方法: 全部数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 LSD 方差分析作组间数据比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 数据统计分析采用 SPSS 13.0 软件。

3 结果

3.1 As_2O_3 对 K562 细胞增殖的影响: 各组处理 K562 细胞 24~72 h, 绘制生长曲线, 发现 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ As_2O_3 处理的细胞即出现明显的细胞增殖抑制效应, 细胞增殖抑制效应表现为剂量-效应和时间-效应依赖关系, 见图 1。表明一定浓度的 As_2O_3 对 K562 细胞有明显的细胞增殖抑制作用。

3.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析: DNA 琼脂糖凝胶电泳分析表明, 4、8、16 $\mu\text{mol}/\text{L}$ As_2O_3 分别作用于 K562 细胞 24 h 后, DNA 降解为相差 180~200 bp 大小的片段, 电泳均出现典型的梯状条带。对照组、1、2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ As_2O_3 组均未出现梯状条带 (图 2)。

3.3 细胞凋亡改变: Annexin V/PI 双染色后流式细

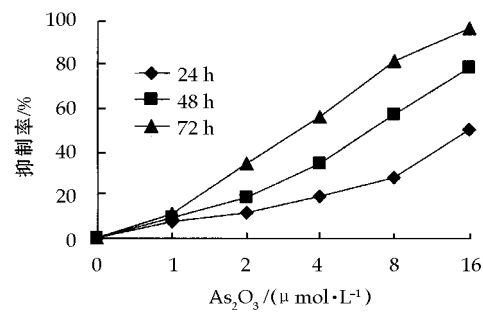


图 1 不同浓度的 As_2O_3 处理 K562 细胞不同时间后的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of K562 cells treated by As_2O_3 at different concentration for 24, 48, and 72 h

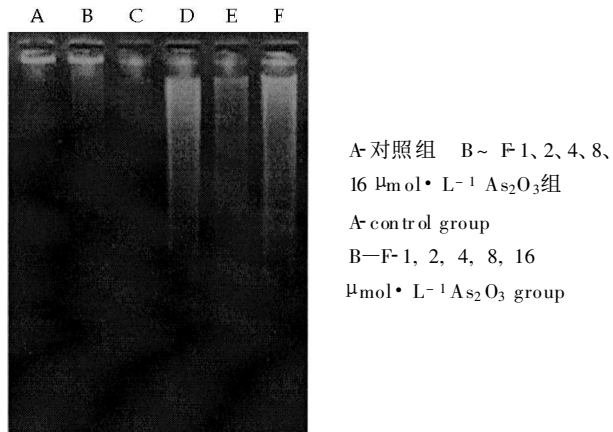


图 2 不同浓度 As_2O_3 作用 24 h 后 K562 细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 DNA Agarose electrophoresis analysis of K562 cells treated by As_2O_3 at different concentration for 24 h

胞仪检测结果显示, 对照组及 1、2、4、8、16 $\mu\text{mol}/\text{L}$ As_2O_3 作用 24 h 后早期细胞凋亡率分别为 (2.09 $\pm$ 1.42) %、(2.13 $\pm$ 1.57) %、(2.41 $\pm$ 1.48) %、(5.61 $\pm$ 2.03) %、(11.84 $\pm$ 2.69) %、(30.98 $\pm$ 4.16) %。与对照组相比, 1、2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ As_2O_3 组差异均没有统计学意义 ($P > 0.05$), 4、8、16 $\mu\text{mol}/\text{L}$ As_2O_3 组凋亡率均增加 ($P < 0.01$) (图 3)。

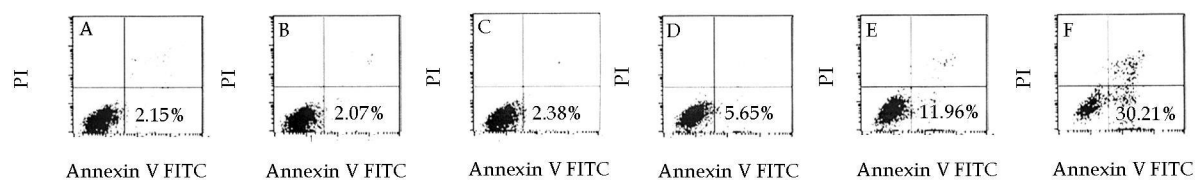


图 3 不同浓度 As_2O_3 作用 24 h 后 K562 细胞流式凋亡分析图

Fig. 3 Changes in apoptosis percentage of K562 cells treated by As_2O_3 at different concentration for 24 h

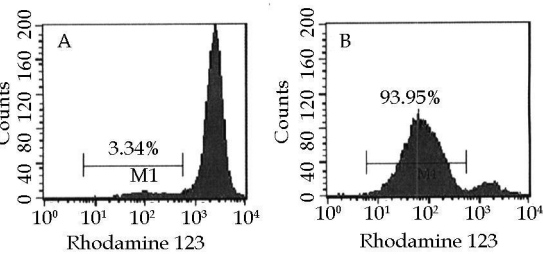
3 4 As₂O₃ 对 ΔΨ_m 影响: 不同浓度 As₂O₃ 作用 K562 细胞 24 h 后, 除 1 μmol/L As₂O₃ 外其他浓度组 Rhodamine123 染色细胞均增多 ($P < 0.05$), 且呈剂量依赖性 (表 1 和图 4)。

3 5 As₂O₃ 诱导 K562 细胞凋亡时胞浆 CYTC 浓度和 Caspase 3 活性的变化: 结果见表 2。与对照组相比, 1 μmol/L As₂O₃ 组 K562 细胞 CYTC 浓度和 Caspase 3 活性没有明显变化, 其他处理组 K562 细胞 CYTC 浓度和 Caspase 3 活性均升高 ($P < 0.05$), 8 μmol/L 和 16 μmol/L As₂O₃ 组 CTYC 浓度和 Caspase 3 活性差别没有统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 不同浓度 As₂O₃ 作用 24 h 后对 K562 细胞 ΔΨ_m 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effects of As ₂ O ₃ at different concentration on ΔΨ _m in K562 cells for 24 h ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)		
组 别	剂量/ (μmol · L ⁻¹)	Rhodamine 123 染色细胞/ %
对照	-	5.52 ± 3.31
As ₂ O ₃	1	7.17 ± 4.15
	2	11.90 ± 5.06*
	4	15.09 ± 5.98**
	8	44.47 ± 10.23**
	16	91.80 ± 6.43**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group



A- 对照组 B- 16 μmol · L⁻¹ As₂O₃ 组
A- control group B- 16 μmol · L⁻¹ As₂O₃ group

图 4 As₂O₃ 作用 24 h 后对 K562 细胞 ΔΨ_m 的影响

Fig. 4 Effects of As₂O₃ on ΔΨ_m in K562 cells for 24 h
表 2 不同浓度 As₂O₃ 作用 24 h 后对 K562 细胞胞浆 CYTC 浓度和 Caspase 3 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effects of As ₂ O ₃ at different concentration on cytochrome C concentration and Caspase 3 activity in K562 cells for 24 h ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)			
组 别	剂量/ (μmol · L ⁻¹)	CYTCC/ (μg · L ⁻¹)	Caspase 3 活性
对照	-	0.41 ± 0.14	0.12 ± 0.05
As ₂ O ₃	1	0.55 ± 0.14	0.21 ± 0.06
	2	0.70 ± 0.17*	0.36 ± 0.15*
	4	1.12 ± 0.21**	0.60 ± 0.19**
	8	1.46 ± 0.30**	0.86 ± 0.24**
	16	1.60 ± 0.32**	0.98 ± 0.24**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3 6 As₂O₃ 对 K562 细胞内 Bcl-2/Bax 的影响: 结果见表 3。K562 细胞内 Bcl-2 高表达, Bax 表达率极低。各浓度 As₂O₃ 处理 K562 细胞 24 h 后, 与对照组相比, K562 细胞内 Bcl-2 均表达降低 ($P < 0.01$); 1 和 2 μmol/L As₂O₃ 组与对照组比较 Bax 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 其他浓度组 Bax 表达均升高 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 各浓度 As₂O₃ 组 K562 细胞内 Bcl-2/Bax 值均降低 ($P < 0.05$)。

表 3 不同浓度 As₂O₃ 作用 24 h 后对 K562 细胞内 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Effects of As ₂ O ₃ at different concentration on expression of Bcl-2 and Bax protein in K562 cells for 24 h ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)				
组 别	剂量/ (μmol · L ⁻¹)	Bcl-2 表达率/ %	Bax 表达率/ %	(Bcl-2/Bax) / %
对照	-	98.10 ± 1.19	1.56 ± 0.78	76.47 ± 34.56
As ₂ O ₃	1	85.31 ± 4.57*	2.12 ± 1.05	51.54 ± 31.21*
	2	81.70 ± 5.23*	3.44 ± 1.41	30.28 ± 21.13*
	4	75.41 ± 5.47*	5.68 ± 2.06*	15.03 ± 6.05**
	8	34.57 ± 9.85**	10.16 ± 3.82**	3.75 ± 1.45**
	16	14.41 ± 8.62**	15.51 ± 4.42**	1.11 ± 0.86**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

As₂O₃ 在祖国医药中被称为砒霜, 其能抑制多种肿瘤增殖, 但不同细胞株对其敏感性不同。本研究用 As₂O₃ (浓度 ≥ 4 μmol/L) 作用 K562 细胞 24 h 后, DNA 片段化分析呈现典型的梯状条带, 1 和 2 μmol/L 浓度组没有发现凋亡变化。MTT 实验结果显示在 24~ 72 h 内 1~ 16 μmol/L As₂O₃ 对 K562 细胞生长增殖抑制率呈递增趋势, 16 μmol/L As₂O₃ 组处理 72 h 时增殖抑制率已达 (96.82 ± 2.35)%。Annexin V/PI 双染法检测 24 h 各组的早期细胞凋亡率显示, As₂O₃ 浓度 ≥ 4 μmol/L 时 K562 细胞早期凋亡增多, 16 μmol/L As₂O₃ 作用 24 h 早期细胞凋亡率为 (30.98 ± 4.16)%, 其增殖抑制率为 (50.29 ± 7.82)%, 说明 As₂O₃ 主要通过诱导细胞凋亡来抑制 K562 细胞增殖。

激活细胞凋亡途径是细胞毒性药物杀伤肿瘤细胞的一个主要机制。不同的外因素启动凋亡的方式不同, 所引起的信号转导也不相同, 目前比较清楚的主要有两条通路: 一条是线粒体通路; 另一条是以 Fas 和 TNFR 为代表的死亡受体通路。两条通路最终都激活 Caspase 酶, 细胞凋亡的过程实际上是 Caspase 不可逆有限水解底物的级联放大反应过

程^[5]。随着对细胞凋亡机制研究的进一步深入,线粒体在凋亡中的作用越来越受重视。线粒体膜通透性转运孔道(MPT)主要由位于内膜的腺苷转位因子(ANT)和位于外膜的电压依赖性阴离子通道(VDAC)等蛋白所组成。在致凋亡因子的刺激下,MPT 开放,导致 $\Delta\Psi_m$ 降低或丧失,线粒体基质中释放出致凋亡活性物质,如细胞凋亡诱导因子和 CYTC 等,这些物质进入胞质,可激活 Caspase 级联反应,最终导致细胞凋亡^[6]。

本实验主要研究线粒体跨膜电位在 As_2O_3 促 K562 细胞凋亡中的作用。通过流式细胞仪检测 $\Delta\Psi_m$ 的变化,结果表明 As_2O_3 浓度 $\geq 2 \mu\text{mol/L}$ 时作用于 K562 细胞 24 h 后, Rhodamine123 染色细胞的量逐渐增加,胞浆 CYTC 浓度和 Caspase-3 活性增加,具有剂量依赖性,与细胞凋亡趋势变化相同。本研究表明 As_2O_3 在不影响细胞膜完整性的情况下可以使线粒体膜电位去极化, $\Delta\Psi_m$ 下降,意味着线粒体内膜结构改变,通透性增加, MPT 开放,导致 CYTC 等促凋亡因子自线粒体释放至胞浆,诱导线粒体下游的凋亡相关 Caspase 家族活化。Caspase 家族以级联活化形式逐级活化家族成员,其中 Caspase-3 是重要的下游效应分子,它识别并水解相应的底物,致使细胞骨架蛋白降解、核膜破裂、DNA 降解等,从而导致细胞凋亡。

Bcl-2 家族成员在线粒体凋亡途径中扮演了关键的调控作用^[7]。Bcl-2 家族蛋白对 MPT 孔的开放和关闭起关键的调节作用,促凋亡蛋白 Bax、Bak 等可以通过与 ANT 或 VDAC 的结合介导 MPT 孔的开放,而抗凋亡类蛋白如 Bcl-2、Bcl-xL 等则可通过与 Bax 竞争性地与 ANT 结合,或者直接阻止 Bax 与 ANT、VDAC 的结合来发挥其抗凋亡效应^[8,9]。本研究结果显示 As_2O_3 (浓度 $\geq 1 \mu\text{mol/L}$) 作用 24 h 即可下调 K562 细胞 Bcl-2 蛋白的表达,

上调 Bax 蛋白表达,导致 Bcl-2/Bax 值下降,可能加重 K562 细胞对 As_2O_3 诱导凋亡的敏感性^[10]。

综上所述, As_2O_3 具有诱导 K562 细胞产生凋亡的活性,通过使线粒体 $\Delta\Psi_m$ 下降,导致 CYTC 释放及胞浆 Caspase-3 活性增加,使 Bcl-2/Bax 值降低,从而导致细胞凋亡发生,其确切的机制有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Wang Z Y, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable [J]. *Blood*, 2008, 111(5): 2505-2515
- [2] Tarhini A A, Kirkwood J M, Tawbi H, *et al.* Safety and efficacy of arsenic trioxide for patients with advanced metastatic melanoma [J]. *Cancer*, 2008, 112(5): 1131-1138
- [3] 蔡宝, 魏为添, 刘岸, 等. 三氧化二砷对胰腺癌 BXP-3 细胞移植瘤的体内抑制作用 [J]. *中草药*, 2010, 41(1): 90-93
- [4] 周斌, 王爱华, 王黎, 等. 伊马替尼治疗慢性粒细胞白血病 151 例临床疗效及安全性观察 [J]. *中华血液学杂志*, 2008, 29(1): 13-17.
- [5] Debatin K M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(3): 153-159
- [6] Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, *et al.* Mechanisms of cytochrome C release from mitochondria [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(9): 1423-1433
- [7] Wong W W, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway [J]. *ILMB Life*, 2008, 60(6): 390-397.
- [8] Asakura T, Maeda K, Omi H, *et al.* The association of deamidation of Bcl-xL and translocation of Bax to the mitochondria through activation of JNK in the induction of apoptosis by treatment with GSH-conjugated DXR [J]. *Int J Oncol*, 2008, 33(2): 389-395
- [9] Kim H, Rafiuddin Shah M, Tu H C, *et al.* Hierarchical regulation of mitochondria-dependent apoptosis by Bcl-2 subfamilies [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(12): 1348-1358
- [10] Nutt L K, Gogvadze V, Uthaisang W, *et al.* Indirect effects of Bax and Bak initiate the mitochondrial alterations that lead to cytochrome C release during arsenic trioxide induced apoptosis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(4): 459-467.

欢迎订阅《中草药》杂志 1996—2009 年增刊

为了扩大学术交流,提高新药研究水平,经国家新闻出版主管部门批准,我部从 1996 年起,每年出版增刊一册。

1996~2009 年增刊 包括中药创新药物开发的思路和方法、中药现代化研究、中药知识产权保护、中药专利的申请及中药走向国际等热点内容。

以上各卷增刊选题广泛、内容新颖、学术水平高、科学性强,欢迎广大读者订阅。以上增刊为我部自办发行,邮局订阅《中草药》不含增刊,但能提供订阅凭证者,购买增刊 7 折优惠,款到寄刊。

地址:天津市南开区鞍山西道 308 号(300193) 网址:www.中草药杂志社. 中国; www.tipress.com

电话:(022)27474913 23006821

传真:(022)23006821

E mail:zey@tipress.com