

番茄红素诱导 K562 细胞凋亡及机制的探讨

史倩莹¹, 方琴^{1,2*}, 王季石³, 陈舒雅¹, 徐展学⁴

(1. 贵阳医学院, 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院附属白云医院, 贵阳 550004;
3. 贵阳医学院附属医院, 贵阳 550004; 4. 广东省揭阳市人民医院, 广东 揭阳 522000)

[摘要] 目的:研究番茄红素(lycopene)对人慢性髓系白血病 K562 细胞凋亡的影响,探讨其凋亡的作用机制。方法:用不同浓度(0,20,40,60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的番茄红素作用 K562 细胞 24,48,72 h,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 番茄红素为空白组。采用 MTT 法检测不同浓度的番茄红素作用 24,48,72 h 时 K562 细胞增殖抑制率;Annexin V/PI 双染色法检测不同浓度的番茄红素作用 48 h 时 K562 细胞凋亡率;RT-PCR 法及 Western blot 法检测不同浓度的番茄红素作用 48 h 时 K562 细胞中 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)mRNA 及蛋白的表达。结果:与空白组比较,细胞增殖抑制率随番茄红素浓度升高而明显升高,细胞凋亡率逐渐明显增加,随番茄红素浓度明显升高,Bcl-2 mRNA 及蛋白的表达明显降低,Caspase-3mRNA 及蛋白的表达明显升高,均具有统计学差异($P < 0.05$)。结论:番茄红素诱导人慢性髓系白血病 K562 细胞凋亡,其凋亡机制与下调 Bcl-2 及上调 Caspase-3 表达有关。

[关键词] 番茄红素; K562 细胞; 凋亡; B 细胞淋巴瘤-2; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0133-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070133

Apoptotic Effects and Mechanism of Lycopene on K562 Cell SHI Qian-ying¹, FANG Qin^{1,2*}, WANG Ji-shi³, CHEN Shu-ya¹, XU Zhan-xue⁴ (1. Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Affiliated Baiyun Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China; 4. People's Hospital of Jieyang, Jieyang 522000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the induced apoptotic effects and its mechanism of lycopene on human leukemia cell line K562 cells. **Method:** K562 cells were treated with different concentrations of lycopene (0, 20, 40, 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Cell proliferation in K562 was observed by MTT. Cell apoptosis was inspected by Annexin V/PI double staining method. The expressions of Bcl-2 and Caspase-3 were determined using RT-PCR and Western blot. **Result:** MTT and Annexin V/PI showed that the rates of proliferation inhibition and apoptosis were positively associated with the concentrations of lycopene ($P < 0.05$). RT-PCR and Western blot indicated that the expression of Bcl-2 gene decreased negatively, but the expression of Caspase-3 gene decreased positively associated with concentration of lycopene ($P < 0.05$). **Conclusion:** Lycopene could induce the apoptosis of K562 cells, which may be associated with lowering expressions of Bcl-2 and enhancing caspase-3 activity.

[Key words] lycopene; K562 cell; apoptotic; Bcl-2; Caspase-3

慢性髓系白血病(chronic myelocytic leukemia, CML)是血液系统的一种恶性增殖性疾病,以贫血、外周血粒细胞增高和出现各阶段幼稚粒细胞、嗜碱粒细胞增高、常有血小板增多和脾大为特征。目前化学治疗是 CML 的主要治疗途径,但高昂的治疗费

用和耐药的出现已成为目前的难题,因此寻找安全有效的抗肿瘤药物是目前的研究热点之一。番茄红素是植物中所含的一种天然色素^[1],广泛分布于各种植物中,其中在番茄成熟果实中含量最高。由于番茄红素具有抗氧化、预防衰老、预防癌症的作用而

[收稿日期] 20141023(002)

[基金项目] 贵州省科技厅科技基金项目(黔科合 SY 字 20123138 号);贵阳市科技局科技基金项目(筑科合 201210334 号,筑科合 201210336 号)

[第一作者] 史倩莹,在读硕士,从事肿瘤药理学研究,Tel:18285096030,E-mail:823473916@qq.com

[通讯作者] *方琴,教授,从事肿瘤药理学研究,Tel:0851-6771403,E-mail:fq-fangqin@yahoo.com.cn

日益受到人们的重视。番茄红素能抑制许多癌细胞的增殖,且其无副作用和毒性^[2]。国内外研究表明番茄红素具有抗肿瘤的作用,与前列腺癌、胃癌、宫颈癌、乳腺癌、胰腺癌等发生率呈负相关^[3-5],并有研究指出番茄红素诱导白血病细胞 HL-60 凋亡^[6]。但番茄红素对慢性髓系白血病细胞的抗肿瘤研究至今未见国内外相关报道。本研究以慢性髓系白血病 K562 细胞为研究对象,观察番茄红素对 K562 细胞增殖抑制和凋亡作用的影响,探讨其凋亡可能的作用机制,为番茄红素治疗慢性髓系白血病提供实验基础和依据。

1 材料

1.1 细胞株 慢性髓系白血病 K562 细胞株,由贵阳医学院附属医院血液科提供。

1.2 药物及试剂 番茄红素(美国 Sigma 公司,批号 L3948),MTT(北京索莱宝科技公司,批号 0793),DMSO(北京索莱宝科技公司,批号 D2650),Annexin V-FITC/PI 试剂盒(南京凯基生物科技公司,批号 KG105),RPMI-1640 培养基(美国 Sigma 公司,批号 1243098),新生牛血清(杭州四季青公司,批号 HB0205),L-谷氨酰胺(美国 Sigma 公司,批号 2490973),TRNzol-A⁺ 总 RNA 提取试剂(北京天根生化科技公司,批号 15596026),逆转录试剂盒(美国 MBI 公司,批号 00016296),RIPA 裂解液(碧云天生物技术研究所以,批号 P0013B),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所以,批号 P0011),ECL 发光试剂盒(碧云天生物技术研究所以,批号 P0018),Bcl-2 一抗(美国 Sigma 公司,批号 M0014),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)一抗(美国 Sigma 公司,批号 J1107),二抗(碧云天生物技术研究所以,批号 HA1004)。

1.3 仪器 2406-2 型 CO₂ 培养箱(美国 Forma 公司),SW-CJ-2F 型超净工作台(中国苏州安泰空气净化公司),Anthos 2010 型酶标仪(美国通用公司),TMB4-Accuri c6 型流式细胞仪(美国 BD 公司),Gel Doc 型凝胶成像系统(美国 Masfeygeemidend 公司),BJRY26-RY DY-S3 型电泳仪(北京君意仪器厂),BL3-DYCP-31 型电泳槽(北京君意仪器厂),JY-ZY3 型转移槽(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 K562 细胞培养 人慢性髓系白血病 K562 细胞在无菌作用条件下接种于含体积分数为 10% 灭活的新生牛血清 RPMI 1640 培养基中,置 5% CO₂,

饱和湿度,37 °C 培养箱中进行传代培养,每 2 d 换液 1 次。

2.2 MTT 法检测细胞增殖抑制率 将对数生长期 K562 细胞接种于 96 孔板(每孔总体积为 200 μL),加入终浓度为不同浓度的番茄红素(0, 20, 40, 60 μmol·L⁻¹)作用于 K562 细胞 24 h,设 0 μmol·L⁻¹ 组为空白组,20 μmol·L⁻¹ 番茄红素为 Ly1 组,40 μmol·L⁻¹ 番茄红素为 Ly2 组,60 μmol·L⁻¹ 番茄红素为 Ly3 组,每组设 3 个复孔。37 °C,5% CO₂,饱和湿度下继续培养至 24,48,72 h 后,取出 96 孔板,每孔加 MTT(5 g·L⁻¹)液 20 μL,培养箱中继续培养 4 h 后,1 500 r·min⁻¹ 离心 6 min,弃上清。每孔加入 150 μL DMSO,避光振荡 10 min 使结晶充分溶于 DMSO,测定各孔在 570 nm 波长处的吸光度(A),按公式计算成活率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = [1 - A_{\text{模型组或给药组}} / A_{\text{空白组}}] \times 100\%$$

2.3 Annexin V/PI 双染色法检测不同浓度(0, 20, 40, 60 μmol·L⁻¹)番茄红素干预下 K562 细胞凋亡率 在待测细胞中加入 Annexin V-FITC 和 PI,使其终浓度分别为 50, 100 mg·L⁻¹,流式细胞仪激发波长为 488 nm,在双变量流式细胞仪的散点图上,分析细胞周期及细胞凋亡。细胞分为活细胞(Annexin V-FITC⁻, PI⁻),早期凋亡细胞(Annexin V-FITC⁺, PI⁻),晚期凋亡细胞(Annexin V-FITC⁺, PI⁺),坏死细胞(Annexin V-FITC⁻, PI⁺) 4 群。

$$\text{总凋亡率} = \text{早期细胞凋亡率} + \text{晚期细胞凋亡率}$$

2.4 RT-PCR 检测 K562 细胞 Bcl-2, Caspase-3 mRNA 表达 细胞总 RNA 提取:用 TRIzol 试剂分别提取培养 48 h 后的 K562 细胞的总 RNA,调整总 RNA 质量浓度为 1 g·L⁻¹。按 MBI 逆转录试剂盒说明合成 cDNA 作为 PCR 模版,进行 PCR 扩增。Bcl-2 引物:上游 5'-GGAGGATTGTGGCCTTCTTTG-3',下游 5'-GCAGGCATGTTGACTTCACTT-3',扩增片段 302 bp;Caspase-3 引物:上游 5'-ATGTCGATGAGCAAACCTCAGGGAA-3',下游 5'-ACACGCCATGTCATCATCAACACCAC-3',扩增片段 395 bp;GAPDH 内参引物:上游 5'-AGAAGGCTGGGGC-TCATTG-3',下游 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3',扩增片段 266 bp。PCR 循环参数:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 45 s,58 °C 退火 30 s(Bcl-2),63 °C 退火 45 s(Caspase-3),52.5 °C 退火 45 s(GAPDH),72 °C 延伸 1 min,32 个循环。等量 PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,然后用凝胶成像系统观察分析其吸光度,与 GAPDH 的灰度之比判断 mRNA 的

相对表达水平,并用 Quantiy One 4.5.2 分析目的条带的灰度值。

2.5 Western blot 法检测 K562 细胞 Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达 将待测细胞,按细胞以密度为 $1 \times 10^9/L$ 接种于 96 孔板,于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 饱和培养 48 h 后收集各组细胞。用预冷的 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤细胞 2 次,按 1×10^{12} 细胞/200 L 裂解液的比例,加入预冷的单去污剂细胞裂解液裂解细胞, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 10 min, 取上清液,总蛋白于 -80°C 冻存, CBB-G250 色素结合法测蛋白含量。取等量蛋白,加入 $5 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液中使终浓度为 $1 \times \text{SDS}$, 上样前将样品于沸水中煮 5 min 使蛋白变性,进行 SDS-PAGE 电泳分离。把聚丙烯酰胺凝胶中的蛋白质槽式湿转移到 PVDF 膜上。用封闭液(含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液)室温下封闭 1 h, Caspase-3 单克隆抗体(1:100) 4°C 孵育过夜后加相应的二抗(1:1 000)室温孵育 1 h, ECL 试剂盒显色后曝光检测分析。用 Quantiy One 4.5.2 分析目的条带的灰度值。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间经方差齐性检验,若方差齐则用 LSD 法进行组间比较,若方差不齐则用 Ganes-Howell 法进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 K562 细胞增殖抑制率的影响 与空白组比较,番茄红素 20, 40, 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组均能明显升高 K562 细胞的增殖抑制率($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 番茄红素对 K562 细胞增殖抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effects of lycopene on inhibition rate of proliferation in K562 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	增殖抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
空白	0	2.16 ± 0.13	4.28 ± 0.21	4.99 ± 0.69
Ly1	20	$11.27 \pm 0.04^{1)}$	$20.50 \pm 1.89^{1)}$	$22.01 \pm 0.37^{1)}$
Ly2	40	$26.44 \pm 0.11^{1)}$	$30.22 \pm 0.53^{1)}$	$32.76 \pm 1.20^{1)}$
Ly3	60	$36.08 \pm 0.24^{1)}$	$43.47 \pm 0.42^{1)}$	$45.13 \pm 0.99^{1)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

3.2 对 K562 细胞凋亡率的影响 与空白组比较,番茄红素 20, 40, 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组均能明显升高 K562 细胞的凋亡率($P < 0.05$)。见表 2。

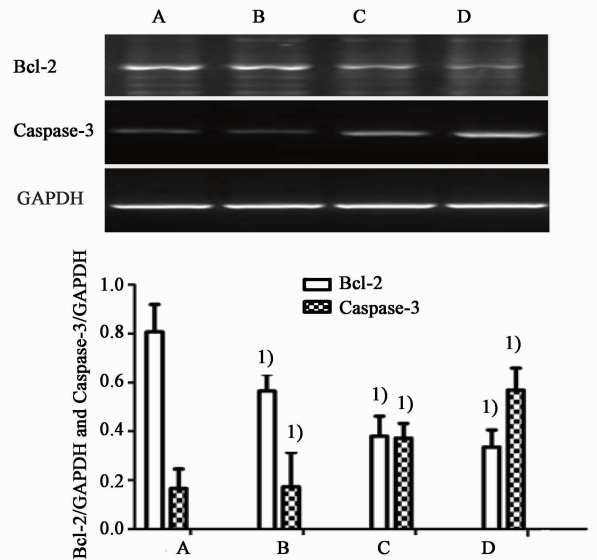
3.3 对 K562 细胞 Bcl-2, Caspase-3 mRNA 表达的影响 与空白组比较,番茄红素 20, 40, 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组均能明显降低 Bcl-2 mRNA 的表达($P < 0.05$), 明显升高 Caspase-3 mRNA 的表达($P < 0.05$), K562 细胞中 Caspase-3 mRNA 的表达量随番

表 2 番茄红素对 K562 细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effects of lycopene on Apoptosis rate in K562 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	凋亡率/%
空白	0	8.34 ± 0.02
Ly1	20	$22.29 \pm 0.03^{1)}$
Ly2	40	$23.41 \pm 0.07^{1)}$
Ly3	60	$36.43 \pm 0.04^{1)}$

茄红素药物作用浓度的增加而不断升高。见图 1。



A. 空白组; B. 番茄红素 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. 番茄红素 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 番茄红素 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(图 2 同)

图 1 番茄红素对 K562 细胞 Bcl-2, Caspase-3 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effects of lycopene on expressions of Bcl-2, Caspase-3 mRNA in K562 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.4 对 K562 细胞 Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达的影响 与空白组比较,番茄红素 20, 40, 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组均能明显降低 Bcl-2 蛋白的表达($P < 0.05$), 明显升高 Caspase-3 蛋白的表达($P < 0.05$), K562 细胞中 Caspase-3 蛋白的表达量随番茄红素药物作用浓度的增加而不断升高。见图 2。

4 讨论

细胞凋亡(apoptosis)又称细胞程序性死亡。细胞凋亡与细胞坏死不同,细胞凋亡是主动过程,它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等的作用,它并不是病理条件下,自体损伤的一种现象,而是为更好地适应生存环境而主动争取的一种死亡过程^[7]。细胞凋亡受阻是肿瘤发生和发展的重要因素之一。目前治疗白血病药物的重要靶点是诱导白血病细胞凋亡^[8]。本研究中 MTT 结果显示,同一浓度的番茄

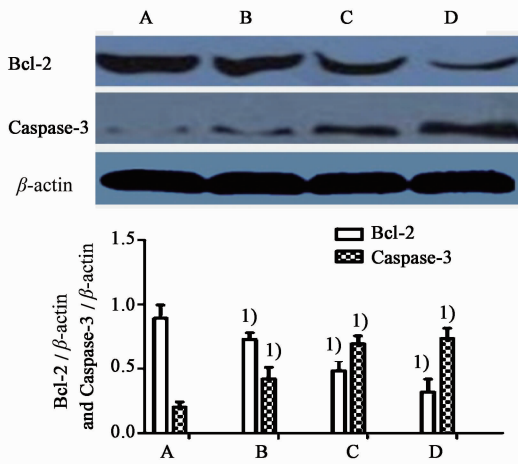


图 2 番茄红素对 K562 细胞 Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effects of lycopene on expressions of Bcl-2, Caspase-3 protein in K562 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

红素作用下,随药物作用时间的增加,K562 细胞增殖抑制率不断增高;同一时间下番茄红素作用浓度越大,K562 细胞增殖抑制率越高。结果表明,经番茄红素作用后,K562 细胞的生长受到明显的抑制,细胞增殖抑制能力不断升高,并且与药物剂量和时间呈依赖关系。而 Annexin V/PI 法结果显示,空白组的细胞凋亡率为 8.34%,经番茄红素(20,40,60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用后细胞凋亡率分别为 22.29%,23.14%,36.43%。一定范围内,番茄红素作用的浓度越高,K562 细胞凋亡率显著增加。

细胞凋亡过程中,Caspase 家族是其中的关键性元件,而 Caspase-3 最为重要^[9],其异常表达可引起细胞凋亡,因此其又称之为死亡蛋白酶。Caspase-3 处于细胞凋亡级联反应的下游,是多种凋亡刺激信号传递的汇聚点,其活化标志着凋亡进入不可逆阶段。活化的 Caspase-3 可以让许多与细胞周期、细胞结构以及 DNA 修复等相关的酶失活,从而启动细胞凋亡的发生^[10]。本实验中,RT-PCR 结果显示,K562 细胞中 Caspase-3 mRNA 的表达量随番茄红素药物作用浓度的增加而不断升高。且 Western blot 结果显示 K562 细胞中 Caspase-3 蛋白的表达量也随番茄红素药物浓度的增加而升高。说明番茄红素诱导 K562 细胞凋亡与 Caspase-3 有关,番茄红素通过促进 Caspase-3 表达的增高进而促使 K562 细胞发生凋亡。近年来,国内外大量的研究均证实,Bcl-2 基因与多种恶性肿瘤的发生有着密切关系,Bcl-2 在恶性肿瘤组织中呈现阳性表达^[11]。Bcl-2 基因属于抗细胞凋亡因子,它和 Caspase-3 在细胞凋亡中同样发挥着重要的调控作用。Bcl-2 具有保护细胞的

功能,Bcl-2 的过度表达可引起细胞核谷胱甘肽的聚集,导致核内氧化还原平衡的改变,从而降低 Caspase 的活性^[12]。

综上所述,番茄红素具有诱导人慢性髓系白血病 K562 细胞凋亡的作用,其凋亡作用机制与下调 Bcl-2 以及上调 Caspase-3 的表达有关。本研究为番茄红素的创新药物研制及临床应用提供了实验依据,但其中涉及的具体机制还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 罗连响,李小玲,朱少平. 番茄红素对鱼藤酮所致 PC12 细胞线粒体损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,20(19):181-185.

[2] 陈思呈,吴建璋,李典鹏. 番茄红素研究进展[J]. 广西农业科学,2014,52(6):589-593.

[3] Holzapfel N P, Holzapfel B M, Champ S. The potential role of lycopene for the prevention and therapy of prostate cancer: from molecular mechanisms to clinical evidence [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14 (7): 14620-14646.

[4] Sharoni Y, Linnewiel-Hermoni K, Zango G. The role of lycopene and its derivatives in the regulation of transcription systems: implications for cancer prevention [J]. Am J Clin Nutr, 2012,96(5):1173S-1178S.

[5] Gloria N F, Soares N, Brand C, et al. Lycopene and beta-carotene induce cell-cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cell lines [J]. Anticancer Res, 2014,34(3):1377-1386.

[6] Anna Ettore, Simona Frosali. Lycopene phytocomplex, but not pure lycopene, is able to trigger apoptosis and improve the efficacy of photodynamic therapy in HL-60 human leukemia cells [J]. Exp Biol Med, 2010, 235 (9):1114-1125.

[7] Zeng H H, Kong X L, Peng H, et al. Apoptosis and Bcl-2 family proteins, taken to chronic obstructive pulmonary disease [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2012,16(6):711-727.

[8] Thomas G, Cotter. Apoptosis and cancer-the genesis of a research field [J]. Nat Rev Cancer, 2009,9:501-507.

[9] 岳原亦,张扬,张一奇. Caspase 家族与细胞凋亡 [J]. 中国医疗前沿, 2011,6(6):25-26.

[10] 谢海洋,刘碧波. Caspase-3 及 Survivin 与心肌细胞凋亡的研究进展 [J]. 临床医学工程, 2014,21(1):124-125.

[11] Shinoura N, Yoshida Y, Nishimura M, et al. Expression level of Bcl-2 determines anti-or proapoptotic function [J]. Cancer Research, 2003,25(25):192-201.

[12] 吉木斯,李存保. Bcl-2 家族在线粒体细胞凋亡途径中的作用 [J]. 内蒙古医科大学学报, 2013,35(2):152-156.

[责任编辑 周冰冰]