

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.14.002

二烯丙基二硫上调 Beclin1 介导白血病 K562 细胞自噬性死亡的研究*

胡贤娇 殷小成[△] 王 萍 彭艳辉 罗永姣

(南华大学附属第一医院儿科 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的:通过二烯丙基二硫诱导白血病 K562 细胞发生自噬性死亡,探讨其作用机制。**方法:**40 mg/L DADS 作用 K562 细胞 12 小时后,透射电镜观察 K562 细胞超微结构,MDC 染色荧光显微镜观察自噬泡及流式细胞仪定量检测自噬率,RT-PCR 检测 Beclin1 mRNA 的表达水平。**结果:**DADS 作用后的 K562 细胞后,透射电镜可观察到胞质内出现大量自噬体;MDC 染色荧光显微镜观察显示, K562 细胞胞浆中的自噬泡明显增多,而空白组与溶媒组胞浆中的自噬泡很少;流式细胞术定量测定空白对照组、溶媒对照组、DADS 药物组自噬率分别为 $(7.27 \pm 5.60)\%$ 、 $(7.10 \pm 5.13)\%$ 、 $(27.39 \pm 6.51)\%$ ($P < 0.05$);空白对照组为 0.658 ± 0.007 ,溶媒对照组为 0.671 ± 0.012 ,两者的 Beclin1 mRNA 的表达强度无明显差异($P > 0.05$),DADS 药物组为 0.911 ± 0.008 ,高于对照组($P < 0.05$)。**结论:**二烯丙基二硫可诱导白血病 k562 细胞发生自噬性死亡,其机制可能与 Beclin1 的上调有关。

关键词:二烯丙基二硫;Beclin1;K 562 细胞;自噬性死亡

中图分类号:R733.7;R979.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)14-2606-04

Diallyl Disulfide Raised Beclin1 Mediated Autophagy in Leukemia K562 Cell*

HU Xian-jiao, YIN Xiao-cheng[△], WANG Ping, PENG Yan-hui, LUO Yong-jiao

(Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang, Hunan, 421001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the possibility of autophagic death of K562 cell induced by diallyl disulfide (DADS) and its possible mechanisms. **Methods:** K562 cells was treated by 40mg/L DADS for 12 hours. Its ultrastructure was observed by transmission electron microscopy (TEM); Using monodansylcadaverin (MDC) staining, the autophagic vacuoles (AV) was observed by fluorescence microscope and the rates of autophagy was analyzed by flow cytometry; RT-PCR was employed to detect the expression levels of Beclin1 mRNA. **Results:** After treatment with DADS, large amount of autophagosomes were observed in cytoplasm of K562 cell by TEM. Compared with blank reference group and the vehicle group, the autophagic vacuoles determined by MDC staining fluorescence microscope were increased significantly in DADS medication group. And the autophagy rate of blank reference group, vehicle reference group and DADS medication group, measured by means of flow cytometer, were $(7.27 \pm 5.60)\%$, $(7.10 \pm 5.13)\%$, $(27.39 \pm 6.51)\%$ ($P < 0.05$) respectively. Higher Beclin1 mRNA expression level (0.911 ± 0.008) was found in DADS medication group compared with blank reference group (0.658 ± 0.007) and vehicle reference group (0.671 ± 0.012), while no significant difference was observed between those control groups. **Conclusion:** DADS can induce autophagic death of leukemia K562 cell, the autophagic death may be related to the up-regulation of Beclin1 mRNA expression.

Key words: Diallyl disulfide; Beclin1; K562 cell; Autophagy

Chinese Library Classification(CLC): R733.7; R979.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)14-2606-04

前言

自噬性细胞死亡 (autophagic cell death) 又称为 II 型程序性细胞死亡,是近期研究发现的凋亡以外的一种新的程序性细胞死亡。大量研究表明,化疗药物主要通过诱导肿瘤细胞程序性死亡发挥抗肿瘤作用,目前常见的细胞程序性死亡形式包括凋亡和自噬。二烯丙基二硫 (diallyl disulfide, DADS) 是从植物大蒜中提取的有效成分,研究表明,其可诱导多种肿瘤细胞发生

凋亡作用^[1-3]。本课题组前期研究发现,DADS 诱导人白血病 K562 细胞发生凋亡且呈时间和剂量依赖性^[4-5],而关于 DADS 诱导肿瘤细胞自噬性死亡的研究目前很少。本实验通过二烯丙基二硫上调 Beclin1 介导白血病 K562 细胞自噬性死亡的研究,探讨二烯丙基二硫能否诱导白血病 K562 细胞发生自噬性死亡及其相关分子机制,为二烯丙基二硫应用于临床提供理论基础,同时为白血病的治疗提供新的靶点。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31271482)

作者简介:胡贤娇(1987-),女,硕士研究生,住院医师。主要研究方向:小儿白血病基础与临床

[△] 通讯作者:殷小成,男,教授,主任医师, E-mail: xcyin108@sina.com

(收稿日期:2013-09-24 接受日期:2013-10-20)

1 材料与方

1.1 主要材料与试剂

DADS 购自 Fluka 公司,用二甲基亚砜(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;RPMI1640 培养基购自 HyClone 公司;Trizol 购自 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒及 PCR 试剂购自 Fermentas 公司;PCR 引物由上海生工公司合成;单丹磺酰尸胺(MDC, 货号 30432) 购自美国 sigma 公司,临用前用 PBS 配制成 0.05mmol/L。

1.2 方法

1.2.1 细胞株与细胞培养 K562 细胞株购自北京协和细胞中心,细胞生长于含 10% 的新生小牛血清的 RPMI1640 培养基中,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱内培养,每 2~3 d 换液传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 实验分组 实验分为 3 组:空白对照组;实验组:40 mg/L DADS 药物组;溶媒对照组:加有同 DADS 组等量体积的 DMSO。

1.2.3 透射电镜观察细胞自噬性死亡 收集三组 12 h 后的细胞, PBS 液洗涤,800 rpm 离心 5 min,然后将细胞收集于离心管中;经 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定,丙酮逐级脱水,环氧树脂包埋,超薄切片(厚度 500 埃),醋酸铀和柠檬酸铅双染色,最后透射电镜进行观察和摄片。

1.2.4 MDC 荧光染色 MDC 荧光染色检测自噬泡(autophagic vacuoles,AV)的染色:参考文献^[6],取对数生长期 K562 细胞,调整细胞浓度后接种于 6 孔板,按上述分组进行加药处理,在给药 12 h 后换 0.05 mmol/L 的 MDC37℃,5% CO₂ 孵育 15 min;再用 PBS 洗涤两次,离心 800 rpm,5 min;用少量 PBS 重悬细胞

后涂于载玻片上,盖上盖玻片;使用荧光显微镜(Olympus)加 356 nm 发射滤片和 545 nm 断滤片进行观察和摄片。

1.2.5 流式细胞术定量检测细胞自噬率 MDC 染色方法染色,流式细胞仪以 488 nm 激发波长测定 MDC 染色阳性 K562 细胞百分率即自噬率。

1.2.6 RT-PCR 检测 Beclin1 mRNA 表达 收集各组细胞,TRIZol 法提取各组细胞总 RNA,取总 RNA1.5μL;按逆转录合成试剂盒说明合成 cDNA,取 cDNA2μL 行 PCR 循环,扩增 Beclin1 基因。GAPDH 作为内参,GAPDH 上游引物:5' ACCACAGTCC-ATGCCATCAC 3',下游引物:5' TCCACCACCCTGTTGCTG-TA3',扩增片段 452bp。Beclin1 上游引物:5'ATCCTGGACCG-TGTCACCATCCAGG 3',下游引物:5' GTTGAGCTGAGTGT-CCAGCTGG 3',扩增片段 363 bp。PCR 反应条件:94℃ 2 min 变性后,按热循环参数 94℃ 45 s、59℃ 45 s、72℃ 45 s 反应 40 个循环,72℃ 延伸 5 min。使用图像分析软件对 PCR 凝胶电泳产物进行分析。

1.3 统计学分析

所有指标以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS18.0 统计软件包进行统计处理,多组均数间的显著性检验采用单因素方差分析,P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 透射电镜观察 DADS 对 K562 细胞超微结构的影响

与对照组、溶媒组相比,DADS 药物处理组 K562 细胞胞质内出现独立双层膜结构,部分双层膜结构逐渐延伸、弯曲,包含一部分胞浆成分以及溶酶体等细胞器形成双层及多层膜结构的自噬体,部分自噬体内部可见未消化的细胞器(图 1)。表明 DADS 可诱导 K562 细胞发生自噬性死亡。

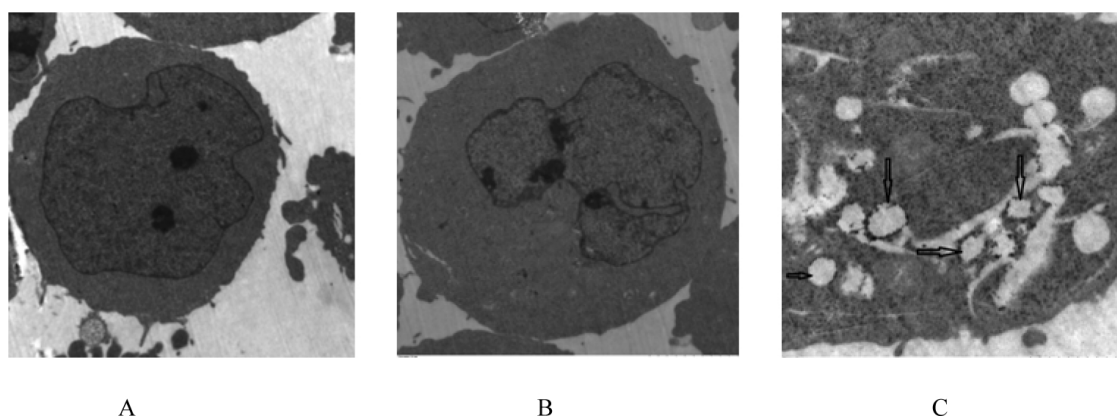


图 1 透射电镜观察 DADS 对 K562 细胞超微结构的影响

A 空白对照组($\times 1.5k$);B 溶媒对照组($\times 1.5k$);C DADS 药物组($\times 4k$)

Fig.1 K562 cell ultrastructure was observed by transmission electron microscopy after treated with DADS

A Blank reference group($\times 1.5k$); B Vehicle reference group($\times 1.5k$); C DADS medication group($\times 4k$)

2.2 MDC 荧光染色检测 DADS 诱导 K562 细胞自噬

实验结果示:MDC 作为自噬追踪剂,可被 K562 细胞吸收并选择性地聚集于自噬囊泡中,荧光显微镜可观察被 MDC 染上的细胞呈深绿色或黄绿色点状结构的自噬囊泡。DADS 药物组,被 MDC 染上的细胞数明显增加,每个细胞中自噬泡的数量也增多,空白组、溶媒组细胞、仅见到很少量的被 MDC 染上

的细胞,并且每个细胞中含的自噬泡数量很少(图 2)。空白对照组、溶媒对照组和 DADS 药物组的自噬率分别为 $(7.27 \pm 5.60)\%$ 、 $(7.10 \pm 5.13)\%$ 、 $(27.39 \pm 6.51)\%$ ($P < 0.05$) (表 1)。

2.3 DADS 处理 12 小时后 Beclin1 mRNA 表达变化

RT-PCR 结果显示:DADS 作用 K562 细胞 12 小时后,GAPDH 基因的 RT-PCR 产物几乎保持不变,但目的基因 Be-

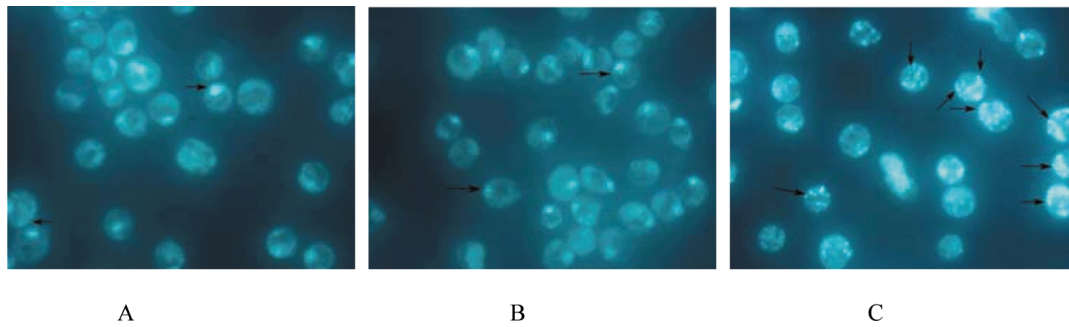


图2 MDC 染色荧光显微镜观察自噬泡(MDC× 400)

A 空白对照组;B 溶媒对照组;C DADS 药物组

Fig.2 MDC staining the autophagic vacuoles observed by fluorescence microscope

A Blank reference group; B Vehicle reference group; C DADS medication group

表1 DADS 作用 K562 细胞 12 小时后的自噬率($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 1 Cell autophagy rate in k562 cell treated with DADS for 12h($\bar{x} \pm s$, n=3)

Group	Autophagy (%)
Blank reference group	7.27± 5.60
Vehicle reference group	7.10± 5.13 ^a
DADS medication group	27.39± 6.51 ^b

注:a:空白对照组与溶媒对照组 $P>0.05$ b: DADS 药物组与对照组 $P<0.05$ 。

Note: a:Blank reference group vs Vehicle reference group $P>0.05$ b: DADS medication group vs control group $P<0.05$.

clin1 表达增多,电泳条带变亮(图3)。Beclin1mRNA 表达水平,空白对照组为 0.658 ± 0.007 ,溶媒对照组为 0.671 ± 0.012 ,

两者表达强度无明显差异 ($P>0.05$),DADS 药物组为 0.911 ± 0.008 ,高于对照组 ($P<0.05$)(图3)。

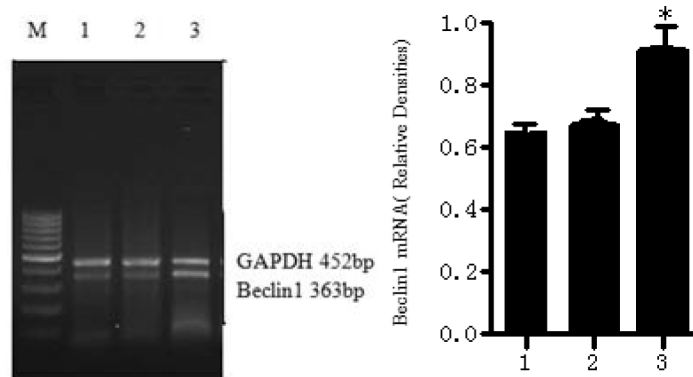


图3 RT-PCR 检测 Beclin-1 mRNA 表达变化

M:marker 1 空白对照组;2 溶媒对照组;3 DADS 药物组 (* $P<0.05$ 与对照组比较)

Fig.3 The expression of Beclin-1 mRNA by RT-PCR

M:marker 1 Blank reference group; 2 Vehicle reference group; 3 DADS medication group (* $P<0.05$ vs control group)

3 讨论

一直以来,凋亡作为化疗药物抗肿瘤的主要作用机制,然而,近几年发现化疗药物抗肿瘤除了引起肿瘤细胞凋亡,还可引起其他形式的非凋亡形式死亡如自噬等^[7]。目前自噬与肿瘤发生及治疗之间的关系成为了研究热点^[8-10],在对乳腺癌,前列腺癌,结肠癌使用抗肿瘤药物的研究中都出现了自噬性细胞死亡^[11]。

自噬性细胞死亡的形态学特征为细胞质中大量的自噬体和自噬溶酶体^[12]。透射电子显微镜是观察自噬现象最直接、最经典的方法。本实验采用透射电子显微镜观察发现经 DADS 处理的 K562 细胞胞质内可见大量自噬体,自噬体内部含有尚

未消化的细胞器,从而从形态学证实了 DADS 可诱导 K562 发生自噬性死亡。在细胞自噬发生过程中,单丹磺酰尸胺(MDC)染色后荧光显微镜观察自噬泡及流式细胞术定量检测细胞自噬率是一种特异性的自噬性死亡检测方法^[13,14]。本研究利用 MDC 染色,通过荧光显微镜观察及流式细胞术定量分析,发现经 DADS 处理的 K562 细胞自噬阳性细胞增多,自噬率提高,进一步证实 DADS 可诱导 K562 细胞发生自噬性死亡。

Beclin1 是酵母自噬相关基因 Atg6/Vps30 的哺乳动物细胞同源基因,也称 BECN1 基因,是参与自噬调控的重要基因,主要是与 Class-III PI3K/hvps34 形成复合体调节自噬相关蛋白在前自噬体膜上的定位,其表达强度与自噬活性密切相关^[15-17]。大量研究表明,Beclin1 基因是一种重要的抑癌基因^[18-20],其过度

表达能够促进肿瘤细胞自噬性死亡,从而抑制肿瘤生长^[21]。本研究采用 RT-PCR 技术在基因转录水平检测了 Beclin1 表达,发现经 DADS 作用后,Beclin1 表达明显增加,提示 DADS 诱导 K562 细胞自噬性死亡可能与 Beclin1 的上调有关。

综上,二烯丙基二硫可诱导白血病 K562 细胞发生自噬性死亡,其机制可能与 Beclin1 的上调有关。本课题组前期研究初步表明,DADS 可诱导 K562 细胞发生凋亡作用且呈时间和剂量依赖性发生^[4-5]凋亡,且凋亡发生最明显是在 40 mg/LDADS 药物处理组,DADS 处理组 K562 细胞自噬率明显增高,DADS 诱导 K562 细胞凋亡与自噬之间可能存在一定的关系,但其具体关系及分子机制有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Ji C, Ren F, Ma H, et al. The roles of p38MAPK and caspase-3 in DADS-induced apoptosis in human HepG2 cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29: 50
- [2] Altomonte MO, Andrews SC. Diallyl disulphide, a beneficial component of garlic oil, causes a redistribution of cell-cycle growth phases, induces apoptosis, and enhances butyrate-induced apoptosis in colorectal adenocarcinoma cells (HT-29) [J]. Nutr Cancer, 2011, 63(7):1104-1113
- [3] Wang YB, Qin J, Zheng XY, et al. Diallyl trisulfide induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis via downregulation of Akt phosphorylation in human T24 bladder cancer cells [J]. Phytomedicine, 2010, 17(5):363-368
- [4] Xiao ZX, Yin XC, Tan YF, et al. Effects of diallyl disulfide on apoptosis of human leukemia K562 cells and expression of Fas, FasL and caspase-8 [J]. Chinese journal of contemporary pediatrics, 2011, 13(1): 53-56
- [5] Peng YH, Yin XC. The effect of diallyl disulfide on the proliferation and cell cycle of human leukemia cell line K562 [J]. Journal of basic and clinical oncology, 2010, 23(6):473-477
- [6] Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles[J]. European journal of cell biology, 1995, 66(1):3-14
- [7] Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways[J]. The oncologist, 2006, 11(4):342-357
- [8] Townsend KN, Hughson LR, Schlie K, et al. Autophagy inhibition in cancer therapy: metabolic considerations for antitumor immunity[J]. Immunological reviews, 2012, 249(1):176-194
- [9] Sun Y, Liu JH, Jin L, et al. Over-expression of the Beclin1 gene upregulates chemosensitivity to anti-cancer drugs by enhancing therapy-induced apoptosis in cervix squamous carcinoma CaSki cells[J]. Cancer Lett, 2010, 294(2): 204-210
- [10] Ahn CH, Jeong EG, Lee JW, et al. Expression of Beclin1, an autophagy-related protein, in gastric and colorectal cancers[J]. APMIS, 2007, 115(12):1344-1349
- [11] Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A, et al. Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of Beclin 1[J]. The Journal of biological chemistry, 2004, 279(18):18384-18391
- [12] Jin S. Autophagy, mitochondrial quality control, and oncogenesis[J]. Autophagy, 2006, 2(2):80-84
- [13] Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes[J]. Autophagy, 2008, 4(2):151-175
- [14] Li CL, Liu HB, Zhang M, et al. Mechanism for clofarabine inducing autophagic death of acute myelocytic leukemia cell U937 [J]. Journal of experimental hematology, 2013, 21(2):347-350
- [15] Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by Beclin1 [J]. Nature, 1999, 402(6762): 672-676
- [16] Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Mathiasen IS, et al. Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death[J]. Cell death and differentiation, 2005, 12(10): 1297-1309
- [17] Chang SH, Minai-Tehrani A, Shin JY, et al. Beclin1-induced autophagy abrogates radioresistance of lung cancer cells by suppressing osteopontin[J]. Journal of radiation research, 2012, 53(3):422-432
- [18] Liang XH, Yu J, Brown K, et al. Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function[J]. Cancer research, 2001, 61(8):3443-3449
- [19] Graf MR, Jia W, Johnson RS, et al. Autophagy and the functional roles of Atg5 and beclin-1 in the anti-tumor effects of 3beta androstene 17alpha diol neuro-steroid on malignant glioma cells [J]. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2009, 115(3-5):137-145
- [20] Luo S, Rubinsztein DC. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL [J]. Cell death and differentiation, 2010, 17(2):268-277
- [21] Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A, et al. Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of Beclin1[J]. J Biol Chem, 2004, 279(18): 18384-18391