文章编号:1000-5404(2005)20-2039-03

论著

半胱氨酸蛋白酶在EPA和DHA抑制HL-60细胞增殖中的作用

张乾勇,糜漫天,承 海,唐 勇 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400038)

提 要: 目的 探讨ω-3多不饱和脂肪酸抑制HL-60细胞增殖与半胱氨酸蛋白酶(caspases)之间的关系。**方法** 用6.0×10^{-5}mol/L二十碳五烯酸或二十二碳六烯酸处理HL-60细胞,运用MTT比色法、流式细胞仪分析ω-3脂肪酸对HL-60细胞增殖能力和凋亡的影响,RT-PCR和免疫印迹技术分析细胞caspase-3、caspase-8基因的表达变化,激酶活性分析检测caspase-8活性。并观察caspases特异性抑制剂对ω-3脂肪酸引起的HL-60细胞生长抑制的拮抗作用。**结果** HL-60细胞经ω-3多不饱和脂肪酸处理后,细胞增殖能力减弱,G_0/G_1期细胞增多,S期细胞减少,并检测到约6%的凋亡率,caspase-3、caspase-8基因表达增加,caspase-8活性升高。caspases抑制剂可以部分拮抗ω-3脂肪酸对HL-60细胞的增殖抑制作用。**结论** ω-3脂肪酸可以抑制HL-60细胞增殖,并诱导细胞凋亡,而上调caspases的表达和/或活性可能在此过程中发挥重要作用。

关键词: ω-3多不饱和脂肪酸;半胱氨酸蛋白酶;HL-60细胞
中图法分类号: R392.28;R733.7;R977.6 **文献标识码**: A

Roles of caspases in growth inhibition of HL-60 cells treated by ω-3 polyunsaturated fatty acid

ZHANG Qian-yong, MI Man-tian, CHENG Hai, TANG Yong (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the roles of caspases in growth inhibition of HL-60 cells treated by ω-3 polyunsaturated fatty acids(ω-3 PUFA). **Methods** HL-60 cells were treated with 6.0×10^{-5}mol/L eicosapentaenoic acid (EPA) or docosahexaenoic acid (DHA). The cellular proliferation capacity was tested with MTT assay and flow cytometry. The expression of caspase-3 and 8 was analyzed with RT-PCR and Western blotting. The activity of caspase-8 was analyzed with Ac-IETD-AMC, a caspase special substrate. To confirm the function of caspase activation in ω-3 PUFA induced apoptosis, Ac-IETD-CHO, an inhibitor of caspase, was used while cells were treated with ω-3 PUFA. **Results** In 2-3 d, the proliferation capacity of HL-60 cells in EPA or DHA groups was significantly decreased as compared with control group. HL-60 cells in 2 d after ω-3 PUFA treatment by flow cytometer showed cells increased in number at G_0/G_1, decreased at S and G_2/M phases, with an increasing apoptitic rate. The expression of caspase-3 and 8 and the activity of caspase-8 were increased in HL-60 cells treated with ω-3 PUFA as compared with control group, but the activity of caspase-8 in HL-60 cells decreased when cocultured with ω-3 PUFA and Ac-IETD-CHO for 2 d. **Conclusion** ω-3 PUFA could induce HL-60 cell apoptosis and inhibit the cell proliferation, in which the caspases network may play a key role.

Key words: ω-3 polyunsaturated fatty acid; caspase; HL-60 cells

ω-3多不饱和脂肪酸(ω-3 polyunsaturated fatty acid,ω-3 PUFA)主要来源于深海鱼油,包括二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)等,是一类具有多种生物学功能的营养素,在体内外均能抑制多种肿瘤细胞的增殖、诱导肿瘤细胞分化甚至凋亡[1-3]。但是其分子机制仍不十分清楚,本研究探讨EPA和DHA对HL-60细胞增殖和凋亡的影响,以及caspase在EPA和DHA抑制HL-60细胞增殖和诱导凋亡过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株及实验分组

HL-60细胞(人粒系白血病细胞株)由中科院上海细胞所提供。实验分为3组:对照组、EPA组和DHA组。

1.2 主要试剂

RPMI1640培养液为Gibco公司产品;二十碳五烯酸(EPA)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100150)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100150)
作者简介:张乾勇(1969-),男,四川省南充市人,博士,副教授,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68753585,E-mail: zqianyong@yahoo.com
通讯作者:糜漫天,电话:(023)68752292
收稿日期:2005-03-24;**修回日期**:2005-08-09

和二十二碳六烯酸(DHA)为 Sigma 公司产品,溶于无水乙醇,配制成终浓度为 0.06 mol/L 的储存液,细胞处理浓度为 6.0×10^{-5} mol/L;四甲基偶氮唑盐(MTT)为 Sigma 公司产品;Trizol 试剂、M-MuLV 逆转录酶、*Taq* DNA 聚合酶为北京鼎国生物技术发展中心产品;小鼠抗人 caspase-3 和 caspase-8 单抗为 Santa cruz 公司产品,Ac-IETD-AMC 为 ALEXIS 公司产品。

1.3 细胞增殖能力检测

MTT 比色法[4]检测 ω-3 PUFA(EPA 或 DHA)对 HL-60 细胞增殖能力的影响。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期相分布及细胞凋亡率

ω-3 PUFA 处理 2d 后收获细胞,70% 冰冷乙醇固定,RNaseA 消化,碘化丙啶(PI)染色,采用流式细胞仪检测细胞周期相分布和细胞凋亡率。

1.5 Caspase 表达的检测

1.5.1 Caspase mRNA 表达的检测 HL-60 细胞经 6.0×10^{-5} mol/L ω-3 PUFA(EPA 或 DHA)处理 2 d 后,收获细胞,按 Trizol 试剂说明书提取细胞总 RNA,逆转录制备成 cDNA。根据文献[5]设计 PCR 引物,caspase-3 引物 P1:5′-CAAACTTTTTCAGAGGGGATCG-3′,P2:5′-GCATACTGTTTCAGCATGGCAC-3′,扩增长度为 272 bp;caspase-8 引物 P1:5′-GCATTAGGGACAGGAATGGA-3′,P2:5′-TTATTCACAGTGGCCATCCC-3′,扩增长度为 463 bp;以人微球蛋白(β_2-MG)为内参照,设计引物为 P1:5′-ACCCCCACTGAAAAAGATGA-3′,P2:5′-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3′,扩增片段长度为 127 bp。反应体系为:总体积 50 μl,0.2 mmol/L dNTP、0.1 U/ml *Taq* DNA 聚合酶、1 mmol/L $MgCl_2$、1×反应缓冲液、上下游引物各 1 mmol/L、cDNA 模板 3 μl。扩增条件为:94 ℃,5 min→94 ℃,30 s;62 ℃,50 s;72 ℃,1 min;35 个循环→72 ℃,10 min。取 5 μl 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察并拍照。

1.5.2 Caspase 蛋白表达的检测 参照文献[6]提取细胞总蛋白,免疫印迹法检测细胞内 Caspase 蛋白的表达变化。

1.6 Caspase-8 活性检测

按 ALEXIS 公司 caspase-8 荧光分析试剂盒操作说明书进行。绘制标准曲线,根据测定样本的荧光值,计算 caspase-8 活性。

1.7 Caspase 抑制剂对 ω-3 PUFA 诱导细胞凋亡的拮抗作用

20 μmol/L Ac-IETD-CHO(临用时用 DMSO 配成 10 mmol/L)与 6.0×10^{-5} mol/L ω-3 PUFA(EPA 或 DHA)共处理 HL-60 细胞,检测其对 ω-3 PUFA 引起的细胞增殖抑制、caspase-8 蛋白酶活性升高的拮抗作用。

1.8 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 ω-3 PUFA 对 HL-60 细胞增殖能力的影响

MTT 实验结果显示,经 6.0×10^{-5} mol/L EPA 或 DHA 处理 2~3 d 后,HL-60 细胞 $D(492)$ 值比对照组细胞明显降低($P<0.01$)(表 1)。

表 1 MTT 比色法检测 ω-3 PUFA 对 HL-60 细胞增殖功能的影响 [$D(492)$, $\bar{x}\pm s$, $n=3$]

Tab 1 Effect of ω-3 PUFA on the proliferative capacity of HL-60 cells [$D(492)$, $\bar{x}\pm s$, $n=3$]

Groups	1 d	2 d	3 d	2 d + Ac-IETD-CHO
Control	0.437 ± 0.013	0.821 ± 0.018	1.241 ± 0.038	0.798 ± 0.024
EPA	0.405 ± 0.010	0.653 ± 0.009[a]	1.018 ± 0.040[a]	0.786 ± 0.023[b]
DHA	0.415 ± 0.017	0.669 ± 0.021[a]	1.052 ± 0.022[a]	0.802 ± 0.017[b]
F	5.091	70.012	37.300	0.614
P	0.051	0	0	0.572

a: $P<0.01$, *vs* control group; b: $P<0.01$, *vs* groups without Ac-IETD-CHO

2.2 ω-3 PUFA 对 HL-60 细胞周期相分布及凋亡百分率的影响

流式细胞仪检测结果显示,HL-60 细胞经 ω-3 PUFA 处理 2 d 后 G_0/G_1 期细胞增多,S 期和 G_2/M 期细胞减少,细胞凋亡百分率增加(表 2)。

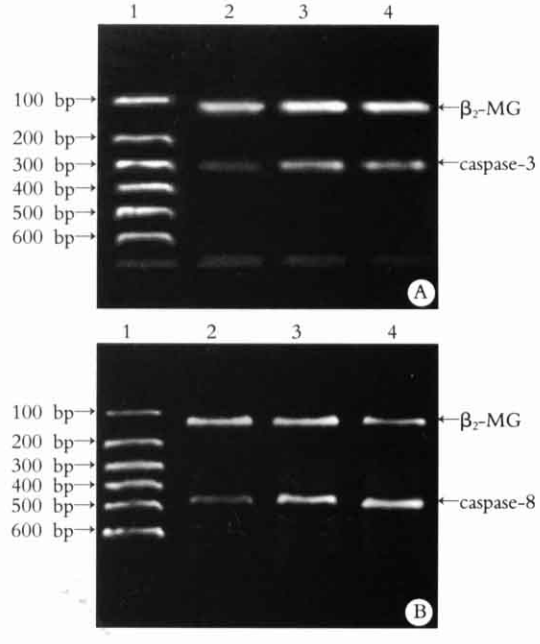
表 2 ω-3 PUFA 对 HL-60 细胞周期相分布和细胞凋亡的影响

Tab 2 Effect of ω-3 PUFA on distribution of cell cycles and the apoptotic rate in HL-60 cells

Groups	Distribution of cell cycle (%)			Apoptotic rate (%)
	G_0/G_1	S	G_2/M	
Control	43.1	39.0	17.9	0
EPA	51.7	35.2	13.1	6.2
DHA	50.3	35.4	14.3	5.9

2.3 ω-3 PUFA 对 HL-60 细胞 caspase 表达的影响

RT-PCR 分析结果显示,HL-60 细胞表达低水平的 caspase-3 和 caspase-8 mRNA,经 ω-3 PUFA 处理后,HL-60 细胞 caspase-3 和 caspase-8 mRNA 的表达水平增加(图 1)。

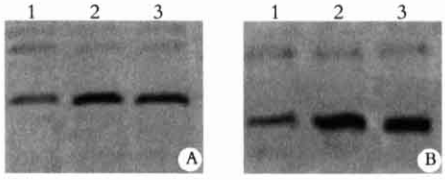


A: Caspase-3; B: Caspase-8. 1: Marker; 2: HL-60; 3: HL-60 + EPA; 4: HL-60 + DHA

图 1 ω-3 PUFA 对 HL-60 细胞 caspase mRNA 表达的影响

Fig 1 Effect of ω-3 PUFA on the expression of caspase mRNA in HL-60 cells

与 caspase mRNA 变化趋势相似，免疫印迹分析结果显示，ω-3 PUFA 促进 HL-60 细胞 caspase-3 和 caspase-8 蛋白表达（图 2）。



A：Caspase-3；B：Caspase-8.　1：HL-60；2：HL-60 + EPA；3：HL-60 + DHA

图 2　ω-3 PUFA 对 HL-60 细胞 caspase 蛋白表达的影响

Fig 2　Effect of ω-3 PUFA on the expression of caspase protein in HL-60 cells

2.4　ω-3 PUFA 对 HL-60 细胞 caspase-8 酶活性的影响

以 Ac-IETD-AMC 为特异性荧光底物分析 caspase-8 活性，结果表明，经 ω-3 PUFA 处理后，HL-60 细胞 caspase-8 酶活性增高（$P<0.01$），见表 3。

表 3　ω-3 PUFA 对 HL-60 细胞 caspase-8 活性的影响（$\bar{x}\pm s, n=3$）

Tab 3　Effect of ω-3 PUFA on the activity of caspase-8 in HL-60 cells（$\bar{x}\pm s, n=3$）

Groups	Ac-IETD-CHO(－)	Ac-IETD-CHO(＋)
Control	385.6 ± 24.3	375.4 ± 34.8
EPA	791.8 ± 30.7 *	457.4 ± 24.8#
DHA	748.2 ± 31.4 *	436.7 ± 28.2#
F	191.426	6.056
P	0	0.036

*：$P<0.01$，*vs* control group；#：$P<0.01$，*vs* groups without Ac-IETD-CHO

2.5　Caspase 抑制剂对 ω-3 PUFA 的增殖抑制作用的拮抗效应

Ac-IETD-CHO 是 caspase-3 和 caspase-8 蛋白酶的特异性抑制剂，与 ω-3 PUFA 共处理 HL-60 细胞 2 d 后 caspase-8 酶活性下降，MTT 比色法 $D(492)$ 值比相应的 ω-3 PUFA 单独处理组增高（表 1、3）。

3　讨论

肿瘤是目前威胁人类健康最凶险的疾病之一，近年来营养与肿瘤关系的研究备受关注。ω-3 PUFA 是一类主要来源于海洋鱼类的多不饱和脂肪酸（如 EPA、DHA），具有多种生物学功能的营养素，在体内外均能抑制某些肿瘤细胞的增殖、诱导肿瘤细胞分化甚至凋亡[1~3]。目前 ω-3 PUFA 已作为抗癌药物用于临床实验，对胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、白血病等癌症以及某些恶性肿瘤的转移都有较好的预防和治疗作用[6]。本实验用 6.0×10^{-5} mol/L EPA 和 DHA 处理 HL-60 细胞 2 ~ 3 d，细胞生长减慢，细胞凋亡百分率增加，说明 EPA 和 DHA 不仅能抑制 HL-60 细胞的增殖，还能诱导 HL-60 细胞凋亡。

自从半胱氨酸蛋白酶（caspase）在哺乳动物细胞中被发现以来，其在细胞凋亡过程中发挥的中心作用逐渐被人们所了解。Caspase 家族均以酶原形式存在，一旦被凋亡信号激活，就能通过从天冬氨酸残基处特异地水解某些蛋白而协同地引起细胞凋亡[8,9]。研究表明，caspase 蛋白酶家族也是 ω-3 PUFA 抑制肿瘤细胞生长和诱导肿瘤细胞凋亡的主要效应分子之一，在 ω-3 PUFA 诱导肿瘤细胞凋亡的过程中还发现 caspase 表达和活性的增加，说明 caspase 在 ω-3 PUFA 抗肿瘤过程中发挥重要作用[2,3]。本实验以对 ω-3 PUFA 敏感的 HL-60 细胞为研究对象，结果显示 ω-3 PUFA 可以上调 HL-60 细胞 caspase-3 和 caspase-8 基因表达，促进 caspase-8 酶活性增强，caspase 特异性抑制剂 Ac-IETD-CHO 能够部分拮抗 ω-3 PUFA 对 HL-60 细胞的增殖抑制作用，说明 caspase 在 ω-3 PUFA 诱导 HL-60 细胞凋亡过程中具有重要作用。

综上所述，ω-3 PUFA 可上调 HL-60 细胞 caspase-3 和 caspase-8 表达和活性，促进细胞凋亡的发生，进而抑制肿瘤细胞的生长，同时抑制 caspase 的活性就能部分拮抗 ω-3 PUFA 对 HL-60 细胞增殖的抑制作用，说明 caspase 在 ω-3 PUFA 抑制 HL-60 细胞增殖过程中发挥着重要作用。

参考文献：

[1] Danbara N, Yuri T, Tsujita Kyutoku M, *et al*. Conjugated docosahexaenoic acid is a potent inducer of cell cycle arrest and apoptosis and inhibits growth of colo 201 human colon cancer cells[J]. Nutr Cancer, 2004, 50(1): 71 - 79.

[2] Arita K, Kobuchi H, Utsumi T, *et al*. Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids[J]. Biochem Pharmacol, 2001, 62(7): 821 - 828.

[3] Siddiqui R A, Shaikh S R, Sech L A, *et al*. Omega 3-fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action[J]. Mini Rev Med Chem, 2004, 4(8): 859 - 871.

[4] 罗　红，糜漫天，张乾勇，等. 二十碳五烯酸联合视黄酸对 HL-60 细胞增殖与分化功能的影响[J]. 免疫学杂志，2001，17(5)：331 - 333，343.

[5] 张学玲，糜漫天，李等松，等. 胆固醇合成抑制剂洛伐他汀对 IL-60 细胞 caspase-3 基因表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2004，26(20)：1853 - 1856.

[6] 张乾勇，糜漫天，朱俊东. 视黄酸及芳维甲对 HL-60 细胞细胞周期素及相关激酶 $P34^{cdk2}$ 蛋白表达的影响[J]. 第三军医大学学报，1997，19(1)：15 - 17.

[7] Sauer L A, Dauchy R T, Blask D E. Mechanism for the antitumor and anticachectic effects of n-3 fatty acids[J]. Cancer Res, 2000, 60(18): 5289 - 5295.

[8] Wolf B B, Green D R. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases[J]. J Biol Chem, 1999, 274(29): 20049 - 20052.

[9] Philchenkov A. Caspases: potential targets for regulating cell death[J]. J Cell Mol Med, 2004, 8(4): 432 - 444.

（编辑　陈聪连）