维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)06-0588-04

亚硒酸钠诱导 K562 细胞凋亡作用及机制探讨

孙 毅[1],阳 强[1],黄 琳[2],卢贤瑜[1]

(1.重庆医科大学医学检验系临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室重庆市重点实验室,重庆 400016;
2.成都市第五人民医院检验科,成都 611130)

【摘 要】目的:探讨亚硒酸钠诱导 K562 细胞凋亡的作用及机制。方法:不同浓度亚硒酸钠作用 K562 细胞后,MTT 法检测细胞增殖抑制,电镜和 TUNEL 法检测 K562 细胞的凋亡,RT-PCR 检测 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达变化,分光光度法检测 Caspase-3 的活性变化。结果:亚硒酸钠能抑制 K562 细胞的生长增殖,诱导其凋亡。20μmol/L 亚硒酸钠作用 K562 细胞 48h 后,Bcl-2 表达明显降低,Bax 表达明显升高,Caspase-3 活性升高,与对照组相比具有显著的统计学意义($P<0.01$)。结论:亚硒酸钠能够诱导 K562 细胞凋亡,其机制可能与下调 Bcl-2,上调 Bax,活化 Caspase-3 有关。

【关键词】亚硒酸钠;K562;凋亡
【中国图书分类法分类号】R329.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-25

Research on the mechanism of sodium selenite inducing K562 cells apoptosis

SUN Yi, et al

(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnositcs, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of sodium selenite on the cell apoptosis of K562 cells and to elucidate its molecular mechanisms. *Methods*: K562 cells were treated with various concentrations of sodium selenite at different time points, and then MTT assay was employed to evaluate the effects of sodium selenite on the proliferative inhibition of K562 cells.MTT assay was employed to evaluate the effects of sodium selenite on the proliferative inhibition of K562 cells. Electronmicroscopy, and TUNEL were performed to confirm the apoptosis of K562 cells, RT-PCR was employed to analyze the mRNA expression levels of Bcl-2 and Bax. Colorimetric method were used to measure the activities of caspase-3 of K562. *Results*: Sodium selenite could inhibit proliferation of K562 cells and induce them to undergo apoptosis. RT-PCR results showed that sodium selenite could decrease the mRNA expression level of Bcl-2 and increase the level of Bax of K562 cells which had been treated with sodium selenite for 48h significantly, and the activity of caspase-3 elevated remarkably too. Compared with the control group, the expression levels of Bcl-2, Bax and acivity of caspase-3 in 20μmol/L sodium selenite treatment group were markedly changed($P<0.05$). *Conclusions*: Sodium selenite can induce K562 cells to undergo apoptosis. The decrease of mRNA expression level of Bcl-2, the increase of Bax and activity of caspase-3 may be its mechanisms.

【Key words】Sodium selenite; K562; Apoptosis

近年来,随着对微量元素硒及其化合物研究的深入,其抗肿瘤和诱导肿瘤细胞凋亡的作用越来越受到重视。研究发现,亚硒酸钠能诱导 K562 细胞的凋亡,但其作用机制尚不明确。本实验以 K562 细胞为研究对象,采用 MTT 实验、电子显微镜、细胞凋亡原位检测、RT-PCR、分光光度法等方法研究亚硒酸钠对 K562 细胞的作用,为含硒类化合物进入临床抗肿瘤治疗提供依据。

作者介绍:孙 毅(1981-),男,硕士研究生,
主要研究方向:药物抗肿瘤机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

K562 细胞株为本实验室保存;亚硒酸钠购自重庆北碚化工厂(AR 级);MTT 四甲基偶氮唑盐和 DMSO 二甲基亚砜购自 Sigma 公司,MTT 以生理盐水配成 5mg/ml 的工作液,-20℃保存;RPMI 1640 和小牛血清购自 Gibco 公司;琼脂糖购自 BBI 公司;TUNEL 试剂盒和 Caspase-3 检测试剂盒购自南京凯基公司;Trizol 购自上海生工;逆转录试剂购自 BIOBRK 公司;PCR 试剂和 DNA Marker 购自北京天为时代。K562 细胞培养于 RPMI 1640 培养基中(含 10%小牛血清,

维普资讯 http://www.cqvip.com

青、链霉素 100U/ml)，置 37℃、饱和湿度、5%CO_2 培养箱中培养。

1.2 MTT 法观察细胞增殖抑制

取对数生长期细胞，离心计数。以浓度 1.0×10^5 个 /ml 100μl 接种于 96 孔板，加入 Na_2SeO_3 使其终浓度分别为 5μmol/L、10μmol/L、20μmol/L、40μmol/L、80μmol/L，同时设空白对照和溶剂对照，每孔浓度做 5 个复孔，37℃，5%CO_2 培养箱中孵育 24h、48h、72h。实验结束前 4h 每孔加入 5mg/ml MTT10μl，继续培养 4h。平板离心 2000r/min 10min，去上清，每孔加入 DMSO 100μl 终止反应，振荡器振荡至结晶完全溶解，酶标仪测定 570nm 吸光度。计算不同浓度 Na_2SeO_3 作用 K562 细胞不同时间的抑制率。细胞抑制率＝(对照组 A 值－实验组 A 值)/ 对照组 A 值×100%。

1.3 细胞形态学检查

取 K562 细胞悬液 1.0×10^5 个 /ml 5ml 接种于培养瓶中，加入 Na_2SeO_3 使其终浓度为 20μmol/L 培养 48h 后，收集 1.0×10^6 个细胞，加入戊二醛 0.5ml，4℃固定 2h，石蜡包埋，染色，电镜观察。

1.4 TUNEL 法原位凋亡检测

取 K562 细胞悬液 1.0×10^5 个 /ml 5ml 接种于培养瓶中，加入 Na_2SeO_3 使其终浓度为 20μmol/L 培养 48h 后，收集 1.0×10^6 个细胞，同时设对照组，洗涤后涂片，干燥。4%多聚甲醛固定，PBS 洗涤 5min×2 次。0.2%的 Triton X-100 处理，PBS 洗涤 5min×2 次。滴加 Equilibration Buffer，室温平衡后滴加 TdT 酶反应液，37℃潮湿环境中反应 75min，终止反应。室温放置 15min，PBS 洗涤 5min×3 次。0.3%的 H_2O_2 浸洗 5min，PBS 洗涤 5min×3 次。滴加 Streptavidin-HRP 溶液，室温反应 5min，PBS 洗涤 5min×2 次。滴加 DAB 工作液，至出现浅棕色背景，蒸馏水漂洗 3 次，依次用 70%、90%、100%乙醇浸洗。固定封片，光镜下观察并拍照。

1.5 RT-PCR 检测 Bcl-2 和 Bax

取 K562 细胞悬液 1.0×10^5 个 /ml 5ml 接种于培养瓶中，加入 Na_2SeO_3 使其终浓度为 20μmol/L 培养 48h 后，收集 3.0×10^6 个细胞，同时设对照组。Trizol 法提取总 RNA，逆转录为 cDNA。Bcl-2 引物 5'-GTC TGG GAA TCG ATC TGG AA-3'，3'-AAT GCA TAA GGC AAC GAT CC-5'，长度 131bp；Bax 引物 5'-GAT GCG TCC ACC AAG AAG CT-3'，5'-CGG CCC CAG TTG AAG TTG-3'，长度 170bp；GAPDH 作为内参，5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'，3'-TCC ACC CTG TTG CTG TA-5'，长度 450bp。Bcl-2PCR 反应为 94℃ 3min，在 94℃ 45s，61℃ 45s，72℃ 45s 条件下进行 30 个循环，最后 72℃ 5min；Bax PCR 反应为 94℃ 3min，在 94℃ 45s，58℃ 45s，72℃ 45s 条件下进行 30 个循环，最后 72℃ 5min。扩增产物电泳。

1.7 分光光度法检测 Caspase-3

取 K562 细胞悬液 1.0×10^5 个 /ml 5ml 接种于培养瓶中，加入 Na_2SeO_3 使其终浓度为 20μmol/L 培养 48h 后，参照试剂盒说明，收集处理细胞及正常对照细胞 4×10^6 个，用 50μl 冰冷的 Lysis Buffer 悬浮细胞，-20℃ 20min，4℃ 10000r/min 3min，Bradford 法测定上清总蛋白浓度，调整蛋白浓度为 2.0μg/μl。吸取 50μl 含 100μg 蛋白的细胞裂解上清，加入 50μl 2×Reaction Buffer，再加入 5μlCaspase-3 Substrate 并于 37℃避光孵育 4h。酶标仪测 A_{405} 值，以 A_{405} 值代表 Caspase-3 的活性。

1.8 统计检验

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，SPSS10.0 进行单因素方差分析。

2 结 果

2.1 Na_2SeO_3 对 K562 细胞增殖抑制作用

MTT 法结果显示，同一浓度 Na_2SeO_3 对 K562 细胞增殖抑制作用随作用时间延长增强，具有时间依赖性，见表 1。各浓度 Na_2SeO_3 作用 K562 细胞 48h、72h 与对照组比较有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.2 Na_2SeO_3 诱导 K562 细胞凋亡的形态学改变

表 1 Na_2SeO_3 对 K562 细胞增殖的抑制

组别	24h 抑制率(%)	48h 抑制率(%)	72h 抑制率(%)
5μmol/L	-6.0	20.8*	47.2**
10μmol/L	3.2	44.3**	66.4**
20μmol/L	7.7*	53.1**	71.7**
40μmol/L	10.8*	61.2**	76.1**
80μmol/L	24.9*	69.0**	77.9**

注：与对照组比较：*$P<0.05$，**$P<0.01$，Na_2SeO_3 终浓度 20μmol/L 为抑制 K562 细胞生长的最佳浓度

20μmol/L Na_2SeO_3 作用 K562 细胞 48h 后细胞凋亡明显增加。电镜下可见细胞核固缩，染色质凝集成新月形紧贴于核膜周围，核膜扭曲，胞浆空泡化，凋亡小体形成等特征，见图 1。

2.3 原位末端标记技术(TUNEL 法)检测细胞凋亡

20μmol/L Na_2SeO_3 作用 K562 细胞 48h 后凋亡细胞明显增加，凋亡细胞胞核呈深棕色而正常细胞胞核不着色，见图 2。

2.4 Na_2SeO_3 对 K562 细胞 Bcl-2 和 Bax 基因表达的影响

20μmol/L Na_2SeO_3 作用 K562 细胞 48h 后，Bcl-2 相对表达量明显降低 ($P<0.01$)，见图 3A 和表 2，Bax 相对表达量明显升高($P<0.05$)，见图 3B 和表 2。

2.5 Na_2SeO_3 对 K562 细胞 Caspase-3 活性的影响

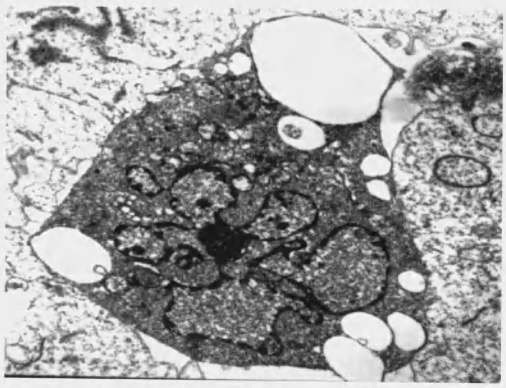
20μmol/L Na_2SeO_3 作用 K562 细胞 48h 后，A405 明显升高，表明 Na_2SeO_3 作用 K562 细胞后，处理组 Caspase-3 相对活性明显升高，见表 3。

3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com

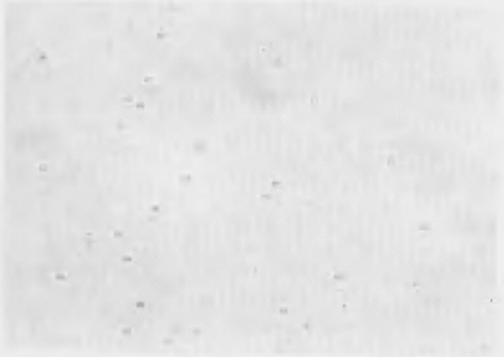


A 对照组 K562 细胞，细胞形态正常 电镜 × 6000

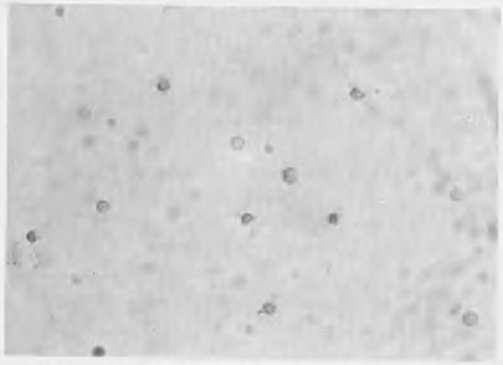


B Na_2SeO_3 作用 K562 细胞 48h，细胞核固缩，核膜扭曲，凋亡小体形成，胞浆空泡化 电镜 × 5000

图 1 K562 细胞电镜检测结果

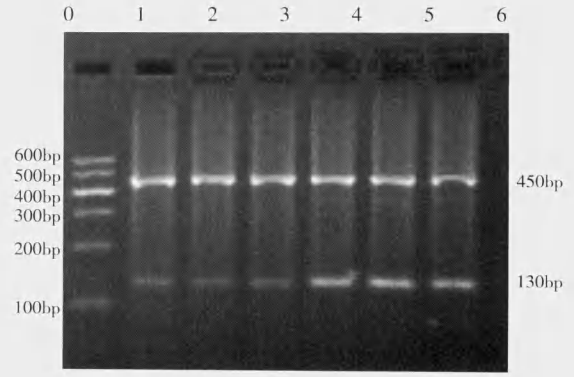


A 对照组 K562 细胞，细胞核不着色 光镜 × 100

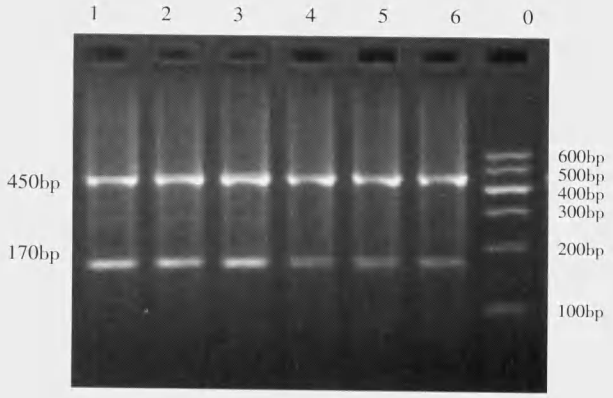


B 处理组 K562 细胞，细胞核着深棕色 光镜 × 250

图 2 K562 细胞 TUNEL 法检测结果



A Bcl-2 扩增产物电泳图



B Bax 扩增产物电泳图

注：0 为 DNA Marker；1~3 为 20 μmol/L Na_2SeO_3 处理组；4~6 为对照组（$P<0.05$）

图 3 Na_2SeO_3 对 K562 细胞 Bcl-2 和 Bax 基因表达影响的电泳结果

表 2 Na_2SeO_3 处理 K562 细胞 48h 后 Bcl-2、Bax RNA 相对表达量

	对照组	处理组
Bcl-2	43.53 ± 1.84	21.10 ± 1.21**
Bax	34.40 ± 2.10	42.40 ± 2.71*

注：与对照组比较：*$P<0.05$，**$P<0.01$

表 3 Na_2SeO_3 处理 K562 细胞 48h Caspase-3 活性测定结果（$A_{405}\bar{x}\pm s$）

	对照组	处理组
Caspase-3	0.087 ± 0.007	0.251 ± 0.033*

注：与对照组比较：*$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

1911 年德国学者 Von Vasserman 发现亚硒酸钠能促进小鼠的移植性癌退化，适量补硒能降低癌症总发病率和总死亡率，硒的抑癌作用及其机理研究引起了肿瘤学、营养学、流行病学及生物化学的极大兴趣。实验肿瘤学研究表明，硒对动物自发以及化学致癌剂和病毒诱发的肿瘤均有抑制作用。流行病学调查发现，摄入适量的硒，癌症发病率降低。体外实验证实，硒不但对肿瘤细胞的增殖有明显抑制作用，而且可以杀伤肿瘤[1]。其抗肿瘤机制尚不十分清楚。

本实验以 K562 细胞为研究对象，通过 MTT 法证实了 Na_2SeO_3 可以有效地抑制 K562 细胞增殖。除 5μmol/L Na_2SeO_3 作用 K562 细胞 24h 后细胞未受抑制反而略有增长外，终浓度为 10~80μmol/L Na_2SeO_3 作用 K562 细胞 24h 均出现抑制现象。各浓度 Na_2SeO_3 作用 K562 细胞 48h，抑制效果较对照组明显增强($P<0.05$)。72h 后，各处理组细胞抑制率均在 50%以上，与对照组比较具有显著性差异 ($P<0.05$)。本实验结果表明，Na_2SeO_3 对 K562 细胞的增殖抑制作用随时间的延长以及药物浓度的增大而增强，呈现出一定的时效和剂量关系，其中终浓度为 20μmol/L 的 Na_2SeO_3 抑制量效关系较好。通过电镜、TUNEL 实验观察，20μmol/L Na_2SeO_3 作用 K562 细胞 48h，大量细胞出现典型的凋亡变化，这可能是其抑制 K562 细胞增殖的机制之一。

Bcl-2 是目前已知的最重要的抑制细胞凋亡的基因之一[2]，它的过表达可使细胞凋亡减少。Bax 是 Bcl-2 家族成员之一，具有促凋亡作用[3]。当 Bax 过表达时，由各种死亡信号所导致的细胞凋亡开始加速，并最终使细胞发生凋亡[4]。因此 Bcl-2 和 Bax 的比例对细胞的凋亡有重要影响[3]。本实验采用 RT-PCR 的方法检测 Bcl-2 和 Bax 的 RNA 表达情况。结果显示与对照组相比，处理组 Bcl-2 相对表达量明显降低，Bax 相对表达量明显升高。因而 Bcl-2/Bax 的比例明显降低，导致细胞凋亡加速，这可能是 Na_2SeO_3 诱导 K562 细胞发生凋亡的机制之一。

Caspases 在细胞凋亡中处于中心地位。在 Caspases 级联反应中，外界信号作用于 Caspases 前体，前体可以活化蛋白酶激发因子，后者又可以活化蛋白酶效应因子，然后作用于底物蛋白，底物蛋白分解引起细胞凋亡。Caspase-3 是 Caspases 瀑布式激活反应中重要的效应分子[5,6]，可识别并水解相应底物，引起细胞骨架蛋白降解，核膜破裂，DNA 降解，引起细胞形态及功能改变，出现凋亡的特征性改变[7,8]。本实验采用分光光度法检测 Caspase-3 的吸光度变化，进而反映其活化情况。结果显示，20μmol/L Na_2SeO_3 作用 K562 细胞 48h 后，Caspase-3 吸光度较对照组明显升高，表明 Caspase-3 在 Na_2SeO_3 作用后被活化。

在凋亡信号转导过程中，Bcl-2 作用在 Caspase-3 的上游，通过抑制 Caspase-3 激活而发挥凋亡抑制作用[9]。Bax 可与 Bcl-2 结合成异二聚体使之失活并诱导细胞色素 C 释放[10]，激活 Caspase-3 蛋白酶，引起膜泡形成，最终导致核碎裂和细胞凋亡。本研究结果表明，K562 细胞经 Na_2SeO_3 处理后，Bcl-2 基因表达明显减少，Bax 表达明显增加，这提示 Na_2SeO_3 可能是通过 Bax 过表达与 Bcl-2 结合成异二聚体使之失活，下调 Bcl-2/Bax 表达比例，进而激活 Casepase-3，引起 Caspases 级联反应从而导致 K562 细胞凋亡。

（通讯作者：卢贤瑜，电话：023-68485813，E-mail：lxy0627@sina.com）

参 考 文 献

[1] 徐辉碧，杨祥良，刘 琼，等.硒化合物诱导细胞凋亡的信号转导机制[J].化学进展，2002；14(4)：305-310.

[2] Reed JC.Bcl-2 and regulation of PCD[J].The Journal of cell biology，1994；124：1-5.

[3] Kirkin V，Joos S，Zornig M.The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis[J].Biochimica et biophysica acta，2004；1644：229-249.

[4] Sultana H，Kigawa J，Kanamori Y，et al.Chemosensitivity and p53-Bax pathway-mediated apoptosis in patients with uterine cervical cancer[J].Annals of oncology，2003；14：214-219.

[5] Khan S M，Dauffenbach L M，Yeh J.Mitochondria and caspases in induced apoptosis in human luteinized granulose cells[J].Biochemical and biophysical research communications，2000；269(2)：542-545.

[6] Marti A，Jaggi R，Vallan C，et al.Physiological apoptosis in hormone-dependent tissues；involvement of caspases[J].Cell death and differentiation，1999；6(12)：1190-1200.

[7] Green DR.Apoptotic pathways：The roads to ruin[J].Cell，1998；94：695-698.

[8] Thomberry NA，Littlewood Y.Caspases：enemies within[J].Science，1998，281：1312-1316.

[9] 胡美茹，兰 雨，张学敏.Caspase 与 Bcl-2 在凋亡发生和凋亡调控中的相互作用机制[J].军事医学科学院院刊，2000；24(2)：126-129.

[10] 杨 晓.基因打靶和功能基因组学[M].北京：军事医学科学出版社，2001.129-135.