

# 二烯丙基二硫诱导人白血病 K562 细胞凋亡及其对 Bax、Bag-1 表达的影响 \*

赵 谦 殷小成<sup>△</sup> 彭艳辉

(南华大学附属第一医院儿科 湖南 衡阳 421001)

**摘要 目的：**探讨二烯丙基二硫 (Diallyl disulfide) 诱导白血病 K562 细胞凋亡的作用及其机制。**方法：**采用吖啶橙 / 溴化乙啶 (AO/EB)染色法观察细胞凋亡形态学变化 ;DNA 琼脂糖凝胶电泳测定 DNA 梯度带 ;RT-PCR 法检测 BAG-1、BAX 基因的 mRNA 表达变化。**结果** :DADS 可诱导 K562 细胞凋亡。其对 K562 细胞的凋亡效用与药物浓度、有明显依赖关系 ;DNA 琼脂糖凝胶电泳示 :40mg/LDADS 作用 K562 细胞 48 小时后能够产生明显的梯形电泳图谱(DNA ladder) ;DADS 作用 48h 后,BAX mRNA 表达水平较对照组上调 ;BAG-1 mRNA 较对照组下调 (差异具有统计学意义, $P<0.05$ )。**结论** :DADS 能够诱导 K562 细胞凋亡,其凋亡机制可能与上调 BAX,下调 BAG-1 有关。

**关键词** 二烯丙基二硫 K562 细胞 凋亡

**中图分类号** R733.7 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273 (2012) 02-231-04

## Effects of Diallyl Disulfide on Apoptosis of Human Leukemia k562 Cells and the Expression of Bax and Bag-1 \*

ZHAO Qian, YING Xiao-cheng<sup>△</sup>, PENG Yan-hui

(The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the effects of diallyl disulfide (DADS) on apoptosis of human leukemia K562 cells and possible mechanisms. **Methods:** The morphologic changes of leukemia K562 after DADS treatment were observed by AO/EB. DNA ladder was showed by agarose gelelectrophoresis. Bax, Bag-1 mRNA expression was estimated by reverse transcriptionpolymerase chain reaction (RT-PCR) 48 hours after DADS treatment. **Results:** The characteristics of apoptosis in k562 cells induced by DADS were observed. The leukemia K562 was treated with 40mg/L DADS for 48 hours reveal an obvious DNA ladder. Expression of Bax mRNA increased, while Bag-1 mRNA expression decreased significantly after DADS treatment for 48 hours compared with the control group( $P<0.05$ ). **Conclusion:** DADS can induce apoptosis of human leukemia K562 cells in a concent ration-dependent manner, possilbly through increasing Bax expression and decreasing Bag-1 expression.

**Key words:** Diallyl disulfide; K562 cells; Apoptosis

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

**Article ID:** 1673-6273(2012)02-231-04

### 前言

大蒜(*Allium sativum*L)是百合科属植物的鳞茎,早在公元前 15 世纪,古埃及人就已经认识到大蒜对许多种疾病具有治疗作用,具有抗菌,防癌,抗病毒,降血脂,抗肿瘤,抗氧化,解毒,提高免疫功能的功效<sup>[1-3]</sup>。流行病学调查显示 摄入大蒜与众多肿瘤的发生发展成负相关<sup>[4]</sup>。二烯丙基二硫(diallyl disulfide, DADS)是大蒜中的一种脂溶性的有效成分。对乳腺癌、皮肤癌、肝癌、肺癌、胃癌、食管癌、结肠癌和白血病等细胞均有抑制作用<sup>[5]</sup>。本研究探讨 DADS 诱导人红白血病细胞株 K562 凋亡的机制,为临床应用 DADS 治疗白血病提供理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物和试剂

DADS 购自 Fluka 公司,按说明书用二甲基亚砜(DMSO)溶解配制,DMSO 终浓度 <0.01% 小牛血清购自杭州四季青 RP-MI-1640 培养基购自 HyClone 公司 ;Trizol 为美国 GIBCOBRL 公司产品 ;逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司,PCR 试剂盒购自广州东盛生物工程公司,PCR 引物由 Invitrogen 公司合成 ;AO/EB 染色剂购自江苏碧云天生物技术公司。

#### 1.2 实验方法和步骤

**1.2.1 细胞株与细胞培养** K562 细胞株购自第四军医大学实验动物中心,细胞生长于含 10%的灭活新生小牛血清、 $1 \times 10^5 \mu\text{mL}$  青霉素和 10mg/mL 链霉素的 RPMI-1640 完全培养基中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱内培养,每 2-3 天换液传代。实验分为 2 组 对照组及药物处理组。对照组包括 空白对照组及溶媒对照组,空白对照组不加 DADS,溶媒对照组加有同最高药物浓度组等量体积的 DMSO,药物处理组加入浓度

\* 基金项目 湖南省高校科研经费项目 (09C840)

作者简介 赵谦, (1983),男,硕士研究生,主要研究方向 :儿童血液病

<sup>△</sup>通讯作者 殷小成,电话 :13973427603,E-mail: xcyin108@sina.com

(收稿日期 2011-06-01 接受日期 2011-06-25)

分别为 20 mg/L、40 mg/L、80mg/L DADS。取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 (AO/EB)染色 取对数生长期 K562 细胞,用 10%灭活的新生牛血清 RPMI-1640 培养基制成  $3.0 \times 10^6/\text{mL}$  的单细胞悬液,接种于无菌 6 孔培养板中,每孔 2ml。48 小时后,小心吸去部分上清,离心去液体,用冷 PBS 洗 2 遍,调整细胞浓度至  $10^6/\text{mL}$ ,取 1ml 细胞悬液离心收集细胞,加入 25  $\mu\text{L}$  PBS 重新悬浮细胞,加 2 $\mu\text{L}$  AO 染(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )及 2 $\mu\text{L}$ EB 染液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )混合,取 10  $\mu\text{L}$  滴于载玻片上盖片封片后在荧光显微镜下观察形态学。

1.2.3 DNA 琼脂糖凝胶电泳 收集细胞,用 10%小牛血清的 RPMI-1640 培养基制成  $3.0 \times 10^6/\text{mL}$  的单细胞悬液,接种于无菌 6 孔培养板中,每孔 2ml。48 小时后,小心吸去部分上清,2000r/min 离心 10min 后去上清,用冷 PBS 洗 2 遍。将细胞重悬于 0.5ml 裂解缓冲液中 (10mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  蛋白酶 K, 0.5% SDS),与 50 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 小时。然后用等体积的饱和酚抽提,10000r/min 离心 10min,取上层,再用等倍体积的氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提一次,除蛋白,10000r/min 离心 10min,收集水相,加入 2.5 体积冰冷无水乙醇及 0.1 体积的 3mol/L 醋酸钠 -20 $^{\circ}\text{C}$  沉淀,过夜。最后 10000r/min 离心 10min,将沉淀用 70%乙醇洗涤两次,空气干燥后,溶于 50 $\mu\text{L}$  含有 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase A 的 TE 缓冲液中。在 1.5%的琼脂糖凝胶电泳 2 小时,用凝胶成像系统观察、拍照。

1.2.4 RT-PCR 检测 Bax、Bag-1 基因的表达 根据 AO/EB 染色结果选择凋亡率最明显的 40mg/L 浓度进行 RT-PCR 检测。收集作用 48 小时后的各组细胞,按 Trizol 法提取各组细胞总 RNA,取总 RNA 约 2 $\mu\text{g}$ ,逆转录合成 cDNA,反应体积为 20 $\mu\text{L}$ 。以  $\beta$ -action 作为内参,取上述逆转录产物 2 $\mu\text{L}$ cDNA 进行 PCR

循环,扩增 Bax、Bag-1 基因。 $\beta$ -action 的上游引物为: 5-ATCTGGCACCACACCT-3,下游引物 5-CGTCATACTCCT-GCTT-3;扩增片段 838bp Bax 的上游引物为 5-GAGGAT-GATTGCCGCCGTGGACA-3,下游引物 5-GGTGGGGT-GAGGAGGCTTGAGG-3,扩增片段 275bp Bag-1 的上游引物为 5-AAGCGACCTGGAGTGAAG-3;下游引物 5-AGTGCT-GACAACGGTGT-3,扩增片段 330bp。 $\beta$ -action、Bax 的 PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 2min $\rightarrow$ 95 $^{\circ}\text{C}$  60s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}\text{C}$  60s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}\text{C}$  90s (循环 30 次) $\rightarrow$ 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 5min。Bag-1 的扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 2min $\rightarrow$ 95 $^{\circ}\text{C}$  15s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}\text{C}$  15s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}\text{C}$  15s (循环 40 次) $\rightarrow$ 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 5min PCR。使用 ScionImage 图像分析软件进行 PCR 产物凝胶电泳图像分析。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计学软件进行结果处理,所有数据均以表示,两样本均数的比较采用 t 检验,多组比较用单因素方差分析 ( $P < 0.05$  或 0.01,差异有统计学意义)。

## 2 结果

### 2.1 (AO/EB)染色

经 20mg/L、40mg/L、80mg/L 浓度的 DADS 作用 48 小时后,K562 细胞在 AO/EB 染色时,显微镜下形态学改变(图 1)。正常细胞核染色着绿色,并呈圆形或椭圆形;凋亡细胞核染色质为橘红色,并呈固缩状或圆珠状;非凋亡的死亡细胞核染色质着橘红色,并呈正常结构。随着 DADS 浓度的加大,细胞失去原有形状胞核染色质为橘红色,并呈固缩状或圆珠状的 K562 细胞数目逐渐增多,甚至形成凋亡小体(箭头所示)其中加入浓度为 80mg/L DADS 时细胞核染色质着橘红色,并呈正常结构,可能是由于高浓度 DADS 导致 K562 细胞坏死所致。

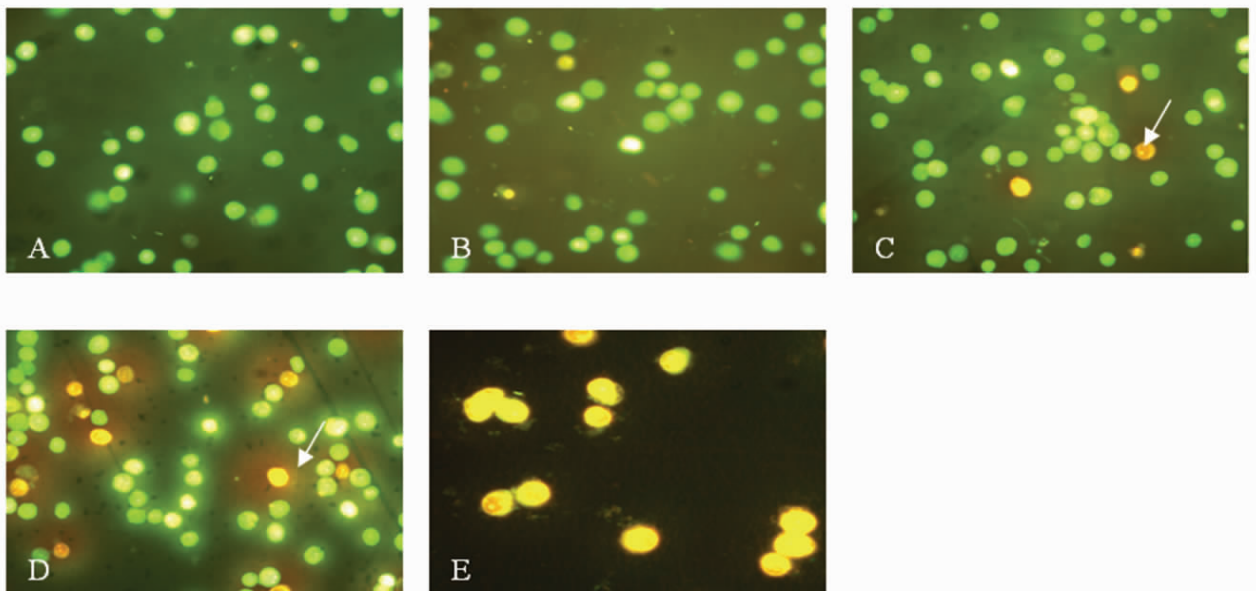


图 1 DADS 作用于 K562 细胞 48 小时后 AO/EB 染色光镜观察 (400 $\times$ )

A 空白对照 B 溶剂对照 C~E 20、40、80mg/L DADS 组

Fig. 1 The morphologic changes of leukemia DADS on K562 cell 48 hour after AO/EB staining observed by light microscope(400 $\times$ ) A: control group;

B: DMSO group; C~E: 20、40、80mg/L DADS group

2.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳

分别用 20mg/L、40mg/L、80mg/L 浓度的 DADS 处理细胞 48h 后,提取细胞 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳,检测到 40mg/L 浓度细胞发生凋亡时由于 DNA 有规律的降解而出现典型的 DNA 梯形条带(图 2)。

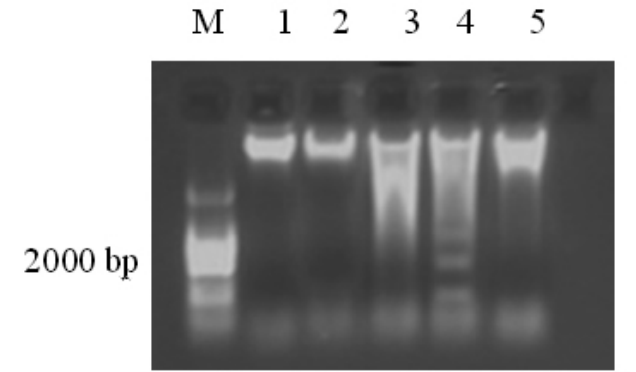


图 2 DADS 作用 K562 细胞 48 小时后 DNA 梯状条带的形成  
M 1marker ;1 空白对照 2 DMSO 对照 3~5 20、40、及 80mg/L 药物处理组  
Fig. 2 DADS on K562 cell 48 hour after DNA ladder was showed  
M:marker; 1:control group; 2:DMSO group; 3~5:20, 40, 80mg/L DADS group

2.3 DADS 诱导 K562 细胞凋亡与 Bax、Bag-1 基因表达的变化

不同浓度的 DADS 作用 K562 细胞 48 h 后,空白对照组的 Bax 基因 RT-PCR 产物相对表达量为  $0.55 \pm 0.03$ ,与 DMSO 溶媒组的表达强度( $0.54 \pm 0.03$ )无明显差异,Bax 基因 RT-PCR 产物(275bp 带)随着 DADS 浓度增大明显增多,电泳条带变宽、变亮(图 3A)。20mg/L 浓度组 Bax 的表达强度为  $0.68 \pm 0.03$ ; 40mg/L 浓度组 Bax 的表达强度为  $1.13 \pm 0.04$  80mg/L 浓度组 Bax 的表达强度为  $0.32 \pm 0.02$  均高于空白对照组( $P < 0.05$ ) 空白对照组的 Bag-1 基因 RT-PCR 产物相对表达量为  $1.17 \pm 0.04$ ,与 DMSO 溶媒组的表达强度( $1.15 \pm 0.04$ )无明显差异, Bag-1 基因 RT-PCR 产物(330bp 带)随着 DADS 浓度增大明显增多,电泳条带变窄、变暗(图 3B) 20mg/L 组、40mg/L 组、80mg/L 药物处理的 Bag-1 相对表达量( $0.70 \pm 0.03$ ,  $0.44 \pm 0.02$ ,  $0.23 \pm 0.01$ )均明显低于空白对照组( $P < 0.05$ ),见表 1。

3 讨论

Bag-1(Bcl-2-associated athanogene 1) 称为 Bcl-2 相关抗凋亡基因 1, 是 20 世纪 90 年代初发现的一种抗细胞凋亡基因。它属于分子伴侣家庭成员,分为 4 个亚型,根据分子量大小分别命名为 p29、p33、p46 和 p50。Bag-1 在人体大部分正常组织中呈微弱表达或不表达,但在大多数肿瘤细胞(如乳腺癌、肾

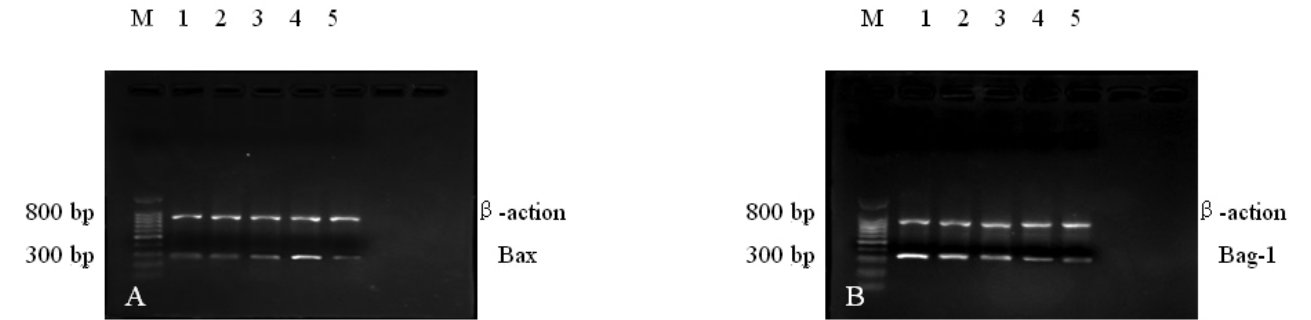


图 3 RT-PCR 法检测 Bag-1、Bax mRNA 表达情况  
M 1marker ;1 空白对照 2 DMSO 对照 3~5 20、40、及 80mg/L 药物处理组  
Fig. 3 RT-PCR detection the expression of Bag-1、Bax mRNA  
M:marker; 1:control group; 2:DMSO group; 3~5:20, 40, 80mg/L DADS group

表 1 DADS 作用 K562 细胞 48 小时后 Bag-1 和 Bax mRNA 表达的情况  
Table1 After treated with DADS for 48h the expression of Bax and Bag-1 mRNA

|                             | Contrast group  |                 | DADS group(mg/L)  |                      |                       |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|----------------------|-----------------------|
|                             | Control         | DMSO            | 20                | 40                   | 80                    |
| $V_{bag-1}/V_{\beta-actin}$ | $1.17 \pm 0.04$ | $1.15 \pm 0.04$ | $0.70 \pm 0.03^a$ | $0.44 \pm 0.02^{ab}$ | $0.23 \pm 0.01^{abc}$ |
| $V_{bax}/V_{\beta-actin}$   | $0.55 \pm 0.03$ | $0.54 \pm 0.03$ | $0.68 \pm 0.03^a$ | $1.13 \pm 0.04^{ab}$ | $0.32 \pm 0.02^{abc}$ |

Note: a: vs the control group,  $P < 0.05$ ; b: vs the 20mg/L DADS group,  $P < 0.05$ ; c: vs the 40mg/L DADS group,  $P < 0.05$

癌、前列腺癌、直肠癌和白血病等) 中均有表达,这表明与肿瘤的恶性转化密切相关<sup>[6]</sup>。Bag-1 是一种抗凋亡蛋白,它可以通过与 Bcl-2 结合形成复合物,与雌激素、雄激素及糖皮质激素等的受体结合,通过多种途径抑制细胞凋亡,并可与热休克蛋白 70 作用,发挥多种生理、病理功能<sup>[7]</sup>。线粒体途径是细胞凋亡的

一重要的信号转导通路。Bcl-2 家族是在细胞凋亡过程中起关键性作用的一类基因,它们通过调控线粒体结构与功能的稳定性,发挥着细胞凋亡 " 主开关 " 的作用<sup>[8]</sup>。Bax 是 Bcl-2 家族中研究最广泛的促凋亡蛋白,其定位于细胞浆,自身可形成同源二聚体或与 Bcl-2 形成异源二聚体<sup>[9]</sup>。许多细胞凋亡中有 Bax



表达升高。Bax 广泛分布于人体组织和细胞,在多数肿瘤表达下降。

在实验中我们利用 AO/EB 染色法,从形态学方面观察了细胞凋亡的变化。荧光染色观察到,未干预的 K562 细胞核染色质着绿色并呈呈圆形或椭圆形,DADS 处理后的细胞核染色质为橘红色并呈固缩状或圆珠状。为了进一步验证 DADS 对 K562 凋亡的影响,采用 DNA 琼脂糖凝胶电泳观察基因凋亡,结果显示 DNA 琼脂糖凝胶电泳观察到典型的 DNA 梯形条带。

Bcl-2 家族是在细胞凋亡中有重要作用的一类蛋白质,Bcl-2 家族的表达和调控是影响细胞凋亡的关键因素之一,而 Bag-1 与 Bax 又分别是 Bcl-2 家族中重要的抗凋亡基因和促凋亡基因<sup>[10]</sup>。有报道,Bag-1 与 Bax 表达水平与肿瘤发生与转移密切相关<sup>[6]</sup>。我们的实验结果表明,Bax 在 K562 细胞中表达水平较低,Bag-1 在 K562 细胞中表达水平较高。不同浓度 DADS 作用 K562 细胞 48h 后,Bax 表达水平较对照组增加 ( $P < 0.01$ ); Bag-1 表达水平较对照组减少 ( $P < 0.01$ ),提示线粒体途径中的 Bcl-2 家族在诱导 K562 细胞凋亡中起着重要作用。

由此我们认为,DADS 可在体外呈浓度依赖性诱导人白血病 K562 细胞凋亡,其凋亡机制可能是通过上调 Bax,下调 Bag-1 表达,激活线粒体通路实现的。

#### 参考文献(References)

- [1] Brasky TM, Kristal AR, Navarro SL, et al. Specialty Supplements and Prostate Cancer Risk in the VITamins And Lifestyle (VITAL) Cohort [J]. Nutr Cancer, 2011 May;63(4):573-582
- [2] Huang YS, Xie N, Su Q, et al. Diallyl disulfide inhibits the proliferation of HT-29 human colon cancer cells by inducing differentially expressed genes[J]. Mol Med Report, 2011 May-Jun;4(3):553-559
- [3] Powolny AA, Singh SV, Melov S, et al. The garlic constituent diallyl trisulfide increases the lifespan of *C. elegans* via skn-1 activation[J]. Exp Gerontol, 2011 Jun;46(6):441-452
- [4] Huang YS, Xie N, Su Q, et al. Diallyl disulfide inhibits the proliferation of HT-29 human colon cancer cells by inducing differentially expressed genes[J]. Mol Med Report, 2011 May-Jun;4(3):553-559
- [5] Wu PP, Chung HW, Liu KC, et al. Diallyl sulfide induces cell cycle arrest and apoptosis in HeLa human cervical cancer cells through the p53, caspase- and mitochondria-dependent pathways [J]. Int J Oncol, 2011 Jun;38(6):1605-1613
- [6] Tsubura A, Lai YC, Kuwata M, et al. Anticancer effects of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2011 Mar 1;11(3):249-253
- [7] Kanno S, Hiura T, Shouji A, et al. Resistance to Ara-C up-regulates the activation of NF-kappaB, telomerase activity and Fas expression in NALM-6 cells[J]. Biol Pharm Bull, 2007 Nov;30(11):2069-2074
- [8] Lin M, Xie HL, Su Q, et al. Effects of diallyl disulfide on differential expression of apoptosis-associated genes in leukemia cell line HL-60 [J]. 2007 Apr;26(4):351-356(Chinese)
- [9] 刘杨, 邓婷, 胡春宏, 等. 选择性环氧化酶-2 抑制剂对乳腺癌细胞的化疗增敏作用[J]. 现代生物医学进展, 2007, 9(9):1684-1686
- [10] Liu Yang, Deng Ting, Hu Chun-hong, et al. Effect of selective COX-2 inhibitors on chemotherapy sensitization for breast cancer cells [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2007, 9(9):1684-1686
- [11] Antoku K, Master WJ, Scully J, et al. Isolation of bcl-2 binding proteins that exhibit horriobgy with BAG-1 and suppressor of death domains protein [J]. Biochem Biochem Biophys Res Commun, 2001, 286(5): 1003-1010
- [12] 陈宏. 基因工程原理与应用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 16-25
- [13] Chen Hong. Genetic Engineering Principles and Applications [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004: 16-25
- [14] 杨涛, 杨利军, 程牛亮, 等. 一种构建多拷贝串联小分子多肽基因的方法[J]. 生物技术通讯, 2006, 15 (6) 974-977
- [15] Yang Tao, Yang Li-jun, Cheng Niu-liang, et al [J]. letters in biotechnology, 2006, 15(6):974-977
- [16] 姚玲玲, 王家宁, 黄永章, 等. 利用同尾酶技术构建 pET15b-PEP-1-CAT 重组质粒[J]. 邵阳医学院学报, 2006, 25(1):1-5
- [17] Yao Ling-ling, Wang Jia-ning, Huang Zhang, et al. To construct the recombinant plasmid pET15b- PEP-1-CAT with isocaudamer technique [J]. Journal of yunyang medical college, 2006, 25 (1) :1-5
- [18] Praznovszky T. Chromosome Engineering with Lambda-Integrase Mediated Recombination System: The ACE System[J]. Methods Mol Biol, 2011, 738:141-149

- [19] O'Brien SJ, Nelson GW. Human genes that limit AIDS [J]. Nature genetics, 2004, 36, 565 - 574
- [20] Charles R. CCL3L1 dose and HIV-1 susceptibility [J]. Trends in Molecular Medicine, 2005, 11(5): 203-206
- [21] Kumar V, Prakash O, Manpreet S, et al. Genetic basis of HIV-1 resistance and susceptibility: An approach to understand correlation between human genes and HIV-1 infection[J]. Indian journal of Experimental biology, 2006, 44: 683-692
- [22] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual 2nd ed[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 243-260
- [23] 吴乃虑. 基因工程原理(上册)[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998: 131-149
- [24] Wu Nai-lv. The principle of genetic engineering (Volume) [M]. 2. Beijing: Science Press, 1998: 131-149

- [25] 陈宏. 基因工程原理与应用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 16-25
- [26] Chen Hong. Genetic Engineering Principles and Applications [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004: 16-25
- [27] 杨涛, 杨利军, 程牛亮, 等. 一种构建多拷贝串联小分子多肽基因的方法[J]. 生物技术通讯, 2006, 15 (6) 974-977
- [28] Yang Tao, Yang Li-jun, Cheng Niu-liang, et al [J]. letters in biotechnology, 2006, 15(6):974-977
- [29] 姚玲玲, 王家宁, 黄永章, 等. 利用同尾酶技术构建 pET15b-PEP-1-CAT 重组质粒[J]. 邵阳医学院学报, 2006, 25(1):1-5
- [30] Yao Ling-ling, Wang Jia-ning, Huang Zhang, et al. To construct the recombinant plasmid pET15b- PEP-1-CAT with isocaudamer technique [J]. Journal of yunyang medical college, 2006, 25 (1) :1-5
- [31] Praznovszky T. Chromosome Engineering with Lambda-Integrase Mediated Recombination System: The ACE System[J]. Methods Mol Biol, 2011, 738:141-149