

菠萝蛋白酶诱导 K562 细胞分化及其对 P53 基因表达的影响¹

颜 青¹ 陈瑞川¹ 郭大勇² 张 铮² 杨善民¹

(¹厦门大学抗癌研究中心 ²厦门大学生物学系 厦门 361005)

摘要 为进一步证实菠萝蛋白酶对肿瘤细胞的诱导分化作用,采用形态观察计数、血红蛋白定量测定、发光法测定细胞吞噬能力和 Northern 原位杂交法观察和检测了菠萝蛋白酶诱导 K562 细胞分化及其 p53 基因表达变化。结果显示,菠萝蛋白酶可诱导 K562 细胞向红系和粒/巨噬系两个方向分化;在菠萝蛋白酶作用下,p53 基因于给药后 8 h 转录表达增强,24 h 达高峰,此后又下降,其时相变化先于分化发生。这些结果提示 p53 基因在 Bromelain 诱导 K562 细胞分化过程中可能起启动分化的重要作用,有关机制尚待深入研究。

关键词 诱导分化,菠萝蛋白酶, K562 细胞

中国图书分类号 Q 2.24

肿瘤细胞诱导分化和分化治疗已被证明是一种较有前途的肿瘤治疗新手段,但有关菠萝蛋白酶诱导肿瘤细胞分化的研究报道较少^[1]。菠萝蛋白酶(Bromelain, E. C. 4. 3. 22. 3)是从菠萝中分离纯化的蛋白水解酶,属巯基蛋白酶类。我们在文献[2]中已报道了该酶对 HL-60 细胞的诱导分化作用。为进一步证实菠萝蛋白酶对肿瘤细胞诱导分化是否有普遍性,本文选择人红白血病 K562 细胞株为对象,研究了菠萝蛋白酶诱导 K562 细胞分化过程中细胞形态学、分化方向及 p53 基因转录表达变化等特征,以期初步探讨菠萝蛋白酶的抗肿瘤机理。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

K562 细胞株系本单位保存,以 10^{-5} 细胞/mL 接种于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 (GIBCO) 培养液中,37℃、5% CO₂ 培养传代;菠萝蛋白酶纯化、激活及酶活力测定参照文献[3],以国际单位(IU)表示酶活力;地高辛 DNA 标记检测试剂盒购自宝灵曼,硝酸纤维素膜为 Amersham 产品,p53(cDNA)由本单位周红惠赠。

1.2 方 法

1) 给药处理: K562 细胞按 8 mL/瓶接种于 10 mL 的培养瓶中,第 2 天加入 3×10^{-2} IU/mL(终浓度)的菠萝蛋白酶,此后每天补加同量菠萝蛋白酶,对照组仅加相应量不含菠萝蛋白酶的稀释液。

2) 细胞计数及光镜观察:于血球计数板上常规苔酚蓝拒染法计数活及死亡细胞,细胞经

常规 Wright-Giemse 染色后,光镜下观察并计数 200 个细胞中分化细胞数计算分化指数,实验均重复 2 次,取平均值.

3) 血红蛋白测定:参照临床生化检验测定血红蛋白方法^[4],以联苯胺法测定分化细胞中相对血红蛋白含量,以吸光值表示,每样品各取 2×10^6 个细胞,重复 2 次,取平均值.

4) 发光法测定分化细胞吞噬能力:按文献[5]以酵母多糖为吞噬颗粒,鲁米诺为冷光剂,液闪仪检测吞噬能力,用发光强度(CPM)表示.

5) 探针标记和 Northern 原位杂交分析:按试剂盒说明标记 p53cDNA 探针,并按鲍家驹的方法^[6]进行 Northern 原位杂交分化.

2 结果

2.1 细胞计数及形态观察

K562 细胞经菠萝蛋白酶处理后,于不同时间分别取样对活细胞、坏死细胞及分化细胞计数,计算各自所占百分率,由图 1 可见随处理时间延长,分化细胞比率增高,菠萝蛋白酶对 K562 细胞具明显抑制作用,但坏死率始终较低.光镜下,分化细胞核/质比下降,胞质出现颗粒、空泡等分化标志,胞核呈肾形、分叶、杆状或无核(红系),核内有明显的块状或粒状异染色质凝聚并出现粒/巨噬系分化细胞(图 2b)和红系分化细胞(图 2c).

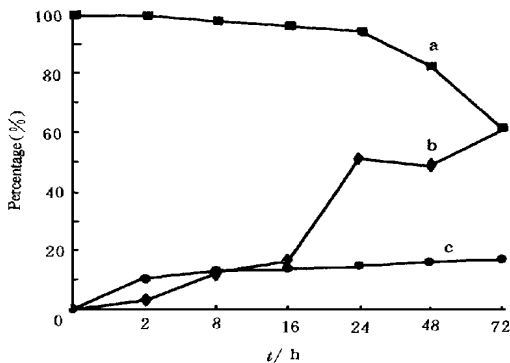
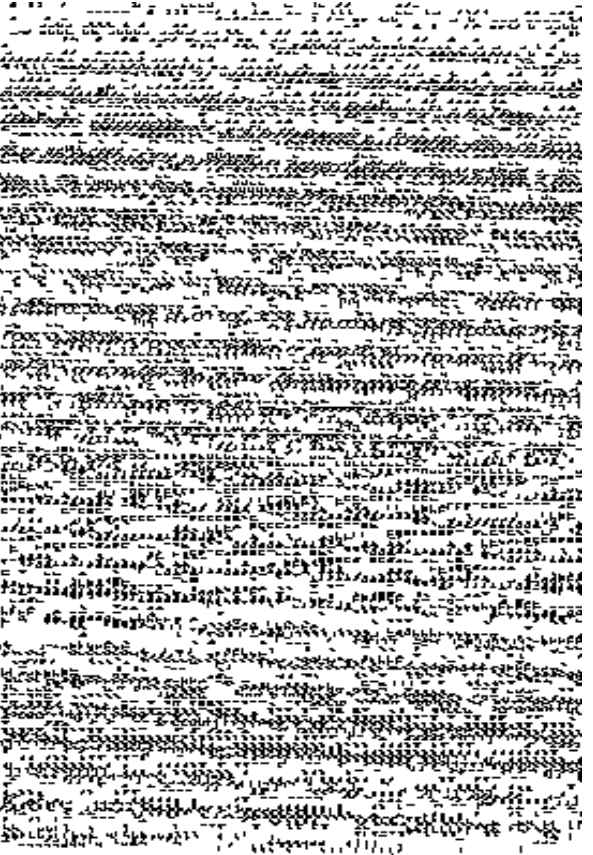


图 1 菠萝蛋白酶对 K562 细胞生长影响
a. 生长曲线; b. 分化曲线; c. 坏死曲线

图 2 菠萝蛋白酶对 K562 细胞形态的影响(处理 3 d, Wright-Giemsa 染色, $\times 1500$)
a. 对照, b. 粒/巨噬系分化细胞, c. 红系分化细胞(箭头示)

Fig. 1 Effect of Bromelain on K562 cell

Fig. 2 Effect of Bromelain on K562 cell morpholo-

2.2 菠萝蛋白酶对 K562 细胞血红蛋白合成的影响

以 1×10^{-2} IU/mL、 3×10^{-2} IU/mL 和 5×10^{-2} IU/mL 菠萝蛋白酶处理 K562 细胞 3 d, 测定细胞内血红蛋白相对含量, 结果见图 3, 可见菠萝蛋白酶具有促进 K562 细胞血红蛋白的合成作用, 尤以 1×10^{-2} IU/mL 最强。

2.3 菠萝蛋白酶对 K562 细胞吞噬能力的影响

以 3×10^{-2} IU/mL 菠萝蛋白酶处理 K562 细胞, 分别于第 3 天和第 4 天取样测定细胞吞噬功能, 结果见图 4, 显示菠萝蛋白酶可提高 K562 细胞吞噬能力, 表明 K562 尚有向粒/巨噬系分化的趋势。

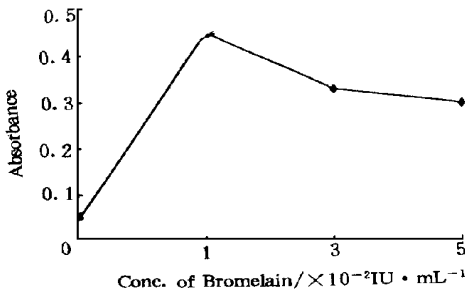


图 3 菠萝蛋白酶对 K562 细胞血红蛋白合成的促进作用

Fig. 3 Promotion effect of Bromelain on heme protein synthesis in K562 cell

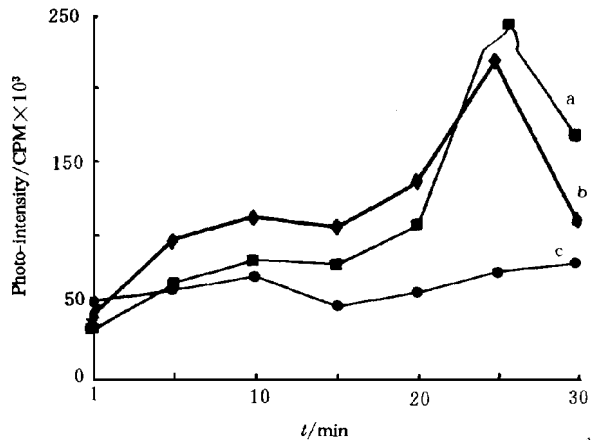


图 4 菠萝蛋白酶对 K562 细胞吞噬能的促进作用
a. 第 3 天, b. 第 4 天; c. 对照

Fig. 4 Promotion effect of Bromelain on phagocytosis of K562 cell

2.4 菠萝蛋白酶对 K562 细胞 p53 基因表达的影响

取分别经 1×10^{-2} IU/mL 和 3×10^{-2}

IU/mL 处理不同时间后的 K562 细胞以不同数量进行点膜, 处理后原位杂交分析 p53 基因转录表达变化, 结果见图 5, 显示 p53 基因表达于给药后 8 h 开始增强, 24 h 达高峰, 后又下降。

3 讨论

菠萝蛋白酶对白血病源肿瘤细胞的诱导分化作用是由 Maurer 等人首先发现的^[7], 在文献^[2]中, 我们已证实菠萝蛋白酶诱导 HL-60 细胞分化的作用. 本研究结果进一步证实菠萝蛋白酶对 K562 细胞亦具有诱导分化作用, 形态学观察表明 K562 细胞在 Bromelain 作用下可向红系及粒/巨噬系二个方向分化, 其中红系曾为 Maurer 以联苯胺染色计数法所证实^[8]. 本文采用生化检验方法定量测定血红蛋白相对含量, 进一步证实了形态观察的结果(图 2c 和图 3). 菠萝蛋白酶诱导 K562 细胞向粒/巨噬系分化的现象尚属首次发现, 为此以发光法测定分

化细胞吞噬能力,证实分化的K562细胞恢复了粒/巨噬细胞所具有的吞噬能力.

P53基因被认为是一种分化因子,有报道表明p53基因表达增强可促进K562细胞分化和血红蛋白的合成^[8],细胞分化后p53表达则急剧下降^[9].本文以Northern原位杂交法检测菠萝蛋白酶作用后K562细胞p53表达变化所得结果与上述报道一致:菠萝蛋白酶作用8h后p53基因表达增强,而24h后又下降(图5),分化细胞计数结果表明分化细胞明显出现于1d之后,提示p53基因表达增强可能启动细胞分化的作用.当然细胞分化本身是一个很复杂的过程,涉及到许多基因的协同作用,有关的机制有待于进一步的研究.



图5 菠萝蛋白酶对K562细胞p53基因转录表达的影响

Fig.5 Effect of Bromelain on p53 gene expression in K562 cell

参 考 文 献

- 1 Fibach E, Treves A, Kidron M et al. Induction of differentiation in human myeloid leukemic cells by proteolytic enzymes. *J Cellul Physiol*, 1985, 123(3):22~26
- 2 颜青,杨善民,朱林杉等. Bromelain 对 HL-60 细胞的诱导分化作用. *癌症*, 1997, 16(6):401~405
- 3 陈清西,颜思旭. 果菠萝蛋白酶催化功能基因的研究. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1991, 29(4):454~459
- 4 上海市医学化验所编. *临床生化检验*. 上海:上海科技出版社, 1984:123~125
- 5 胡天喜编. *发光分析与医学*. 上海:华东师范大学出版社, 1992:94~156
- 6 鲍家驹,沈德瑜,王瑞瑜等. 一种简便且灵敏的核酸杂交新方法——地高率配基标记探针细胞原位杂交法应用于癌基因表达研究. *中国医学科学院学报*, 1991, 13(6):439~403
- 7 Maurer HR, Hozumi M, Honma Y et al. Bromelain induces the differentiation of leukemic cells in vitro: an explanation for its cytostatic effect? *Planta Medica*, 1988, 54(5):377~381
- 8 Shaulsky G, Goldfinger N, Peled A et al. Involvement of wild-type p53 in pre-B-Cell differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:8982~8986
- 9 Montanarch M. Biochemical, immunological, and functional aspects of the growth-suppressor, oncoprotein p53. *Crit Rev Oncogenesis*. 1992, 3(3):233~238

Bromelain-induced Cell Differentiation and Its Effect on Expression of p53 Gene in K562 Cells

Yan Qing¹ Chen Ruichuan¹ Guo Gayong² Zhang Zhen² Yang Shanmin¹
(¹Cancer Research Center, ²Dept. of Biology of Xiamen Univ., Xiamen 361005)

Abstract By using method of cell morphology, hemoglobin detection, cell phagocytosis testing with illumination and Northern blot in situ, the impact of inducing differentiation on K562 cells and expression of p53 gene by Bromelain were further investigated. The results showed that K562 cell could be induced to differentiation into both erythroid and granulocytic/macrophage lineages. During Bromelain treatment, the expression of p53 gene was upregulated from 8 hours to the top of 24 hours, then, downregulated again. These results suggested that p53 might play an important role in triggering K562 cell differentiation induced by Bromelain. However, more detailed work may be needed in future.

Key words Cell differentiation, Bromelain, K562 cell