

(DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃ 抑制 K562 细胞周期并诱导细胞凋亡

牛艳玲^① 蒋宇扬^{①*} 曹胜利^② 杜伟^① 赵玉芬^①

(^①清华大学化学系, 生命有机磷化学教育部重点实验室, 北京 100084; ^②首都师范大学化学系, 北京 100037.)

* 联系人, E-mail: yuyang_jiang@yahoo.com.cn)

摘要 利用本实验室建立的方法, 合成了 20 种 N-磷酰二肽甲酯, 通过 MTT 比色实验筛选, 发现(DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃ 对 K562 细胞的增殖抑制作用明显好于其他的 N-磷酰二肽甲酯(IC₅₀ 为 22.66 μmol/L). 通过对其结构类似物的活性研究, 发现 DIPP—和—OCH₃ 都是使其具有活性的必不可少的基团. 细胞核的形态学改变、DNA 琼脂糖凝胶电泳出现梯状条带及流式细胞仪检测到早期的凋亡细胞都证明(DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃ 对 K562 细胞的增殖抑制作用是通过诱导其发生细胞凋亡实现的. 利用碘化丙锭对细胞核内染色质进行着色, 流式细胞仪测定细胞内 DNA 分布情况, 发现(DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃ 同时具有细胞周期抑制作用, 推测(DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃ 可能通过将细胞阻滞在 G₂/M 期, 再启动这一时相的凋亡调控机制而引发细胞凋亡.

关键词 细胞凋亡 细胞周期 N-磷酰二肽甲酯 K562 细胞

细胞凋亡(apoptosis)是多细胞有机体为调控有机体发育, 维护内环境稳定, 由基因控制的细胞主动死亡过程^[1]. 细胞凋亡和细胞增殖控制着细胞群体的大小, 作为一种生理性细胞消亡方式, 凋亡普遍存在于生物界^[2]. 细胞凋亡与多种疾病的发生有着密切的关系, 特别是肿瘤的发生, 与细胞凋亡的抑制直接相关^[3]. 随着凋亡研究的逐步深入, 人们发现临床上应用的化疗药物大部分都有诱导肿瘤细胞凋亡的作用, 许多肿瘤内在地抵抗化疗可能与其不能激活凋亡机制有关, 人们已经认识到特异地诱导肿瘤细胞凋亡可能是肿瘤治疗中最具有广阔前景的尝试.

磷是生命的中心元素, 许多 N-磷酰肽具有重要的生物活性和药用价值, 例如, N-磷酰-*L*-丙氨酸-*L*-脯氨酸为血管紧张素转化酶抑制剂^[4]; N-磷酰-亮色二肽及其类似物具有抑制内皮素转化酶的活性^[5]等, 但到目前为止, 还没有关于其能够诱导细胞凋亡的报道. 我们通过本实验室建立的方法合成了 20 种 N-磷酰二肽甲酯, 以 K562(人类慢性髓性白血病细胞)细胞为模型, 筛选出其中细胞增殖抑制活性较好的化合物是(DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃, 研究了其结构与活性之间的关系, 并讨论了其诱导细胞凋亡的可能机理. 其中 DIPP—代表(O, O'-二异丙基)-磷酰基.

1 材料与方法

(i) N-磷酰二肽甲酯的合成与纯化. 采用本实

验室建立的方法^[6], 先制得 N-磷酰-*L*-氨基酸, 再与 *L*-氨基酸甲酯偶联, 用硅胶柱层析纯化得到产品, 经质谱和磷谱鉴定. 用甲醇溶解后用 PBS 溶液稀释成为不同浓度, 4℃下保存备用.

(ii) 细胞培养及药物处理. K562 细胞为悬浮生长的细胞, 购自上海细胞研究所, 在 37℃, 5%CO₂ 条件下培养于 RPMI-1640 培养液中(含 10%灭活小牛血清). 取对数生长期的细胞, 以 2 × 10⁵ 个/mL 的密度接种于培养板中, 培养 4 h 后, 加入样品溶液(使孔中甲醇终浓度为 1%), 同时设阴性对照(仅含 1%的甲醇)和阳性对照(50 μg/mL 的顺铂).

(iii) 四甲基偶氮唑盐(3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT)比色实验分析 N-磷酰化二肽甲酯对 K562 细胞增殖抑制率的影响. 收集药物作用 24 h 后的 K562 细胞, 加入 MTT 溶液(终浓度为 5 μg/mL), 培养 4 h 后离心吸去上清, 加入 100 μL 的 DMSO, 37℃培养约 10 min, 待结晶溶解完全后, 用酶标仪于 490 nm 处测量吸光度 A 值, 按如下公式计算细胞增殖的抑制率(inhibition rate, IR%):

$$IR\% = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100\%.$$

(iv) Hoechst33258 染色法检测 N-磷酰化二肽甲酯对细胞核的影响. 收集药物作用 24 h 后的 K562 细胞, 加入 0.5%的 KCl 溶液 500 μL, 室温静置 15 min,

离心去上清, 加入固定液(甲醇: 乙酸 = 3: 1)100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 固定 10 min, 打匀后取 20 μ L 滴于载玻片上, Hoechst33258(5 μ g/mL)染色, 紫外光激发, 荧光显微镜下观察并照相.

(v) DNA 琼脂糖凝胶电泳分析. 收集药物作用 24 h 后的 K562 细胞, 加入细胞裂解液(100 mmol/L Tris-HCl (pH8.5), 5 mmol/L EDTA, 0.2 mol/L NaCl, 0.2% SDS(含终浓度为 0.2 mg/mL 的蛋白酶 K)), 37 $^{\circ}$ C, 静置过夜, 加入 5 mol/L NaCl (至终浓度为 1.5 mol/L), 4 $^{\circ}$ C 静置 2 h 后离心除去蛋白质等大分子, 上清中加入无水乙醇至终浓度 75%, 4 $^{\circ}$ C 静置 4 h 后离心除去乙醇, 沉淀即 DNA, 加入适量 TE 缓冲液溶解之, 加入 RNA 酶 A(终浓度为 200 μ L/mL), 37 $^{\circ}$ C 静置 2 h, 加入 2%琼脂糖凝胶中, 电泳缓冲液为 1 $\times$ TBE, 恒压 70 V 下电泳 3 h. 用 5 μ g/mL 溴化乙锭液染色 10 min 后, 在紫外透射反射仪下检测, 并利用电泳凝胶自动成像系统拍照.

(vi) 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的连接素(Annexin V -FITC)和 PI 双染法检测细胞凋亡. 使用 CLONTECH 公司的试剂盒. 收集药物作用 24 h 后的 K562 细胞, 用 Annexin V -FITC 和 PI 染色 15 min, 利用流式细胞仪进行检测.

(vii) 碘化丙锭(propidium iodide, PI)染色法检测 N-磷酸化二肽甲酯对 K562 细胞周期的影响. 收集药物作用 24 h 后的 K562 细胞, 70%乙醇固定过夜, 加入 200 μ L 1 mg/mL 的 RNA 酶 A, 37 $^{\circ}$ C 反应 2 h, 离心收集细胞, 加入 200 μ L 5 mg/mL PI 染色液, 4 $^{\circ}$ C, 避光染色 30 min, 1 $\times$ PBS 适量稀释后, 利用流式细胞仪测定细胞内 DNA 分布情况.

2 结果

(i) 细胞增殖抑制率. 通过 MTT 法检测所合成

的 20 种 N-磷酸化二肽甲酯对 K562 细胞的体外增殖抑制活性, 各种样品的作用浓度均为 100 μ g/mL, 每种样品同时设 3 个复孔, 作用时间均为 24 h, 得到的样品对 K562 细胞的增殖抑制率见表 1.

从表中可以看出, 对细胞增殖抑制活性较好的化合物是(DIPP-L-Leu)₂-L-Lys-OCH₃, 在作用浓度为 100 μ g/mL 时, 细胞增殖抑制率达到 88.33%, 而其他 N-磷酸化二肽甲酯对 K562 细胞的增殖抑制率均低于 40%. 取(DIPP-L-Leu)₂-L-Lys-OCH₃ 1, 5, 10, 20, 40, 80 μ g/mL 6 个浓度作用于 K562 细胞, 每个浓度设 3 个复孔, 作用时间为 24 h, 实验结果见图 1.

从上图可以看出细胞增殖抑制率与(DIPP-L-Leu)₂-L-Lys-OCH₃ 的作用浓度成正比, 存在着剂量反应关系. 通过作图法得到的(DIPP-L-Leu)₂-L-Lys-OCH₃ 对 K562 细胞的 IC₅₀ 为 16.2 μ g/mL (22.66 μ mol/L).

对(DIPP-L-Leu)₂-L-Lys-OCH₃ 进行结构改变, 得到如下化合物, 通过 MTT 法检测其对 K562 细胞的体外抑制活性, 作用浓度均为 100 μ g/mL, 作用时间为 24 h, 得到的药物对 K562 细胞的增殖抑制率见表 2.

从表 2 可以看出, 无论是去掉 DIPP—(得到 L-Leu₂-L-Lys-OCH₃)或是去掉—OCH₃(得到(DIPP-L-Leu)₂-L-Lys 和(DIPP-L-Leu)₂-L-Lys-NH₂)或者是同时去掉 DIPP—和—OCH₃(得到 L-Leu₂-L-Lys), 在作用浓度为 100 μ g/mL 时, 对 K562 细胞的增殖抑制率均低于 30%, 说明 DIPP—和—OCH₃ 也都是使(DIPP-L-Leu)₂-L-Lys-OCH₃ 具有活性的必要基团.

(ii) 细胞凋亡的特征. 体外培养的 K562 细胞, 用 40 μ g/mL 的(DIPP-L-Leu)₂-L-Lys-OCH₃ 处理后, 细胞胞质浓缩, 体积缩小, 核固缩, 染色质凝集成新月形分布于核膜周边, 最后凋亡小体形成. 用 Hoechst 33258 对(DIPP-L-Leu)₂-L-Lys-OCH₃ 作用 24 h 后的细

表 1 各种 N-磷酸化二肽甲酯对 K562 细胞的体外增殖抑制率

N-磷酸化二肽甲酯		IR%	
DIPP -L-Ala-L-Ala-OCH ₃	22.44 $\pm$ 2.16	DIPP-L-Val-L-Ala-OCH ₃	25.44 $\pm$ 1.27
DIPP-L-Ala-L-Val-OCH ₃	16.67 $\pm$ 2.07	DIPP-L-Val-L-Val-OCH ₃	19.35 $\pm$ 3.13
DIPP-L-Ala- L-Leu-OCH ₃	38.80 $\pm$ 2.13	DIPP-L-Val-L-Leu-OCH ₃	40.90 $\pm$ 4.49
DIPP-L-Ala- L-Ile-OCH ₃	28.63 $\pm$ 3.58	DIPP-L-Val-L-Ile-OCH ₃	4.17 $\pm$ 2.62
(DIPP-L-Ala) ₂ -L-Lys-OCH ₃	18.95 $\pm$ 2.21	(DIPP-L-Val) ₂ -L-Lys-OCH ₃	32.29 $\pm$ 1.57
DIPP-L-Leu-L-Ala-OCH ₃	33.41 $\pm$ 2.64	DIPP-L-Ile-L-Ala-OCH ₃	36.86 $\pm$ 2.64
DIPP-L-Leu-L-Val-OCH ₃	30.19 $\pm$ 3.86	DIPP-L-Ile-L-Val-OCH ₃	7.93 $\pm$ 4.59
DIPP-L-Leu-L-Leu-OCH ₃	41.22 $\pm$ 1.94	DIPP-L-Ile-L-Leu-OCH ₃	36.29 $\pm$ 4.13
DIPP-L-Leu-L-Ile-OCH ₃	31.46 $\pm$ 2.48	DIPP-L-Ile-L-Ile-OCH ₃	22.93 $\pm$ 4.74
(DIPP-L-Leu) ₂ -L-Lys-OCH ₃	88.33 $\pm$ 5.13	(DIPP-L-Ile) ₂ -L-Lys-OCH ₃	38.66 $\pm$ 4.88

表 2 (DIPP-Leu)₂-Lys-OCH₃ 类似物对 K562 细胞的体外增殖抑制率

化合物	IR%	化合物	IR%
(DIPP- <i>L</i> -Leu) ₂ - <i>L</i> -Lys	22.82 ± 1.48	(DIPP- <i>L</i> -Leu) ₂ - <i>L</i> -Lys-NH ₂	18.70 ± 2.16
<i>L</i> -Leu ₂ - <i>L</i> -Lys-OCH ₃	18.58 ± 1.21	<i>L</i> -Leu ₂ - <i>L</i> -Lys	1.83 ± 1.32

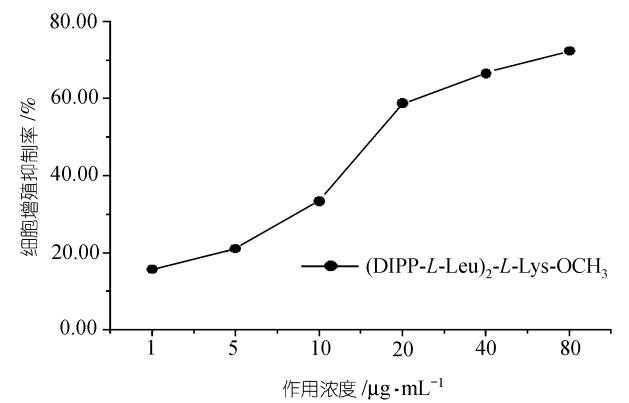


图 1 (DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃ 作用浓度与 K562 细胞增殖抑制率的关系

胞核进行染色, 在荧光显微镜下观察发现, 细胞核变小、皱缩, 可见致密强荧光, 偶见凋亡小体. 而未经 (DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃ 处理的 K562 细胞核所发荧光较弱, 较均匀(图 2).

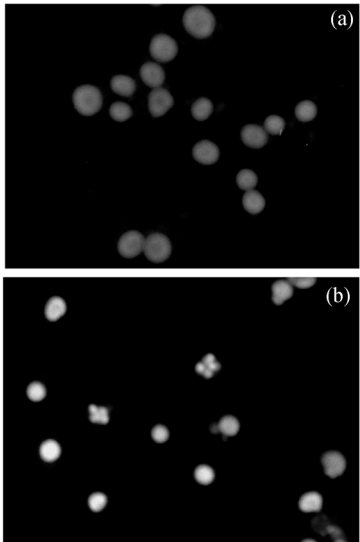


图 2 荧光显微镜下未处理(a)及经(DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃ 处理后(b)的 K562 细胞核形态

此外经(DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃处理 24 h 的细胞, 其 DNA 琼脂糖凝胶电泳呈现 180 bp 梯状条带(图 3), 表明 DNA 链在核小体之间发生断裂, 生成寡聚核小体.

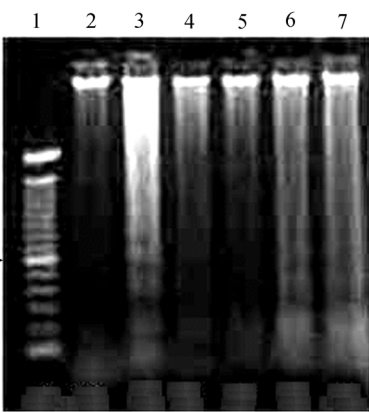


图 3 (DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃ 诱导的 K562 细胞 DNA 核小体间断裂

1 示分子量标准, 2 示未处理的 K562 细胞, 3 示阳性对照, 4~7 分别示经 1, 5, 20, 40 $\mu\text{g/mL}$ 的 (DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃ 处理 24 h 的 K562 细胞

细胞在正常生存状态下, 细胞膜磷脂在胞膜内外表面之间呈不对称分布, 磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl serine, PS)定位于内表面. 在凋亡早期, 凋亡细胞膜不对称丢失, 导致 PS 暴露于胞膜的外表面, 而 Annexin V 与带有负电荷的 PS 具有极强的结合力. 用 FITC 标记的 Annexin V 对细胞进行染色, 可使早期的凋亡细胞膜外表面暴露的 PS 与 Annexin V-FITC 特异性结合而出现绿色荧光, 但细胞仍维持其膜的完整性, 使变性染色质着色的荧光染料 PI 不能进入细胞, 坏死和凋亡晚期的继发坏死细胞可同时用 Annexin V 与 PI 标记(图 4).

(iii) (DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃ 对细胞周期的影响. 利用流式细胞仪检测细胞内 DNA 分布情况, PI 在破膜剂的作用下进入细胞核, 使细胞 DNA 染色, 在流式细胞仪直方图上, 可见明显的 2 倍体峰、4 倍体峰和介于 2 倍体和 4 倍体之间的区段, 分别代表细胞周期中的 G₀/G₁ 期、G₂/M 期和 S 期, 当发生细胞凋亡时, 会出现低于 2 倍体的峰, 称之为 Sub-G₀ 期(图 5). 取 (DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃ 1, 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$ 6 个浓度作用于 K562 细胞, 作用时间为 24 h, 得到药物作用浓度与处于细胞周期各时相的细胞比例的关系(图 6).

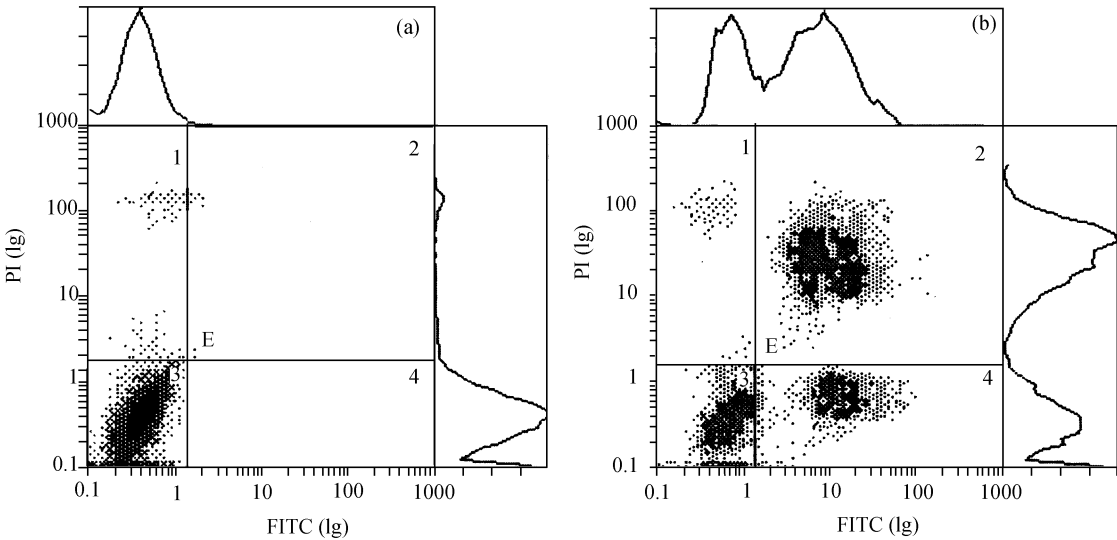


图 4 Annexin V-FITC 和 PI 双染检测 K562 细胞早期凋亡
(a) 未处理细胞; (b) 40 $\mu\text{g/mL}$ 的 $(\text{DIPP-L-Leu})_2\text{-L-Lys-OCH}_3$ 作用 24 h 的 K562 细胞. E1: 机械性损伤细胞($\text{Annexin V}^-/\text{PI}^+$); E2: 晚期凋亡或继发性坏死细胞($\text{Annexin V}^+/\text{PI}^+$); E3: 正常活细胞($\text{Annexin V}^-/\text{PI}^-$); E4: 早期凋亡细胞($\text{Annexin V}^+/\text{PI}^-$)

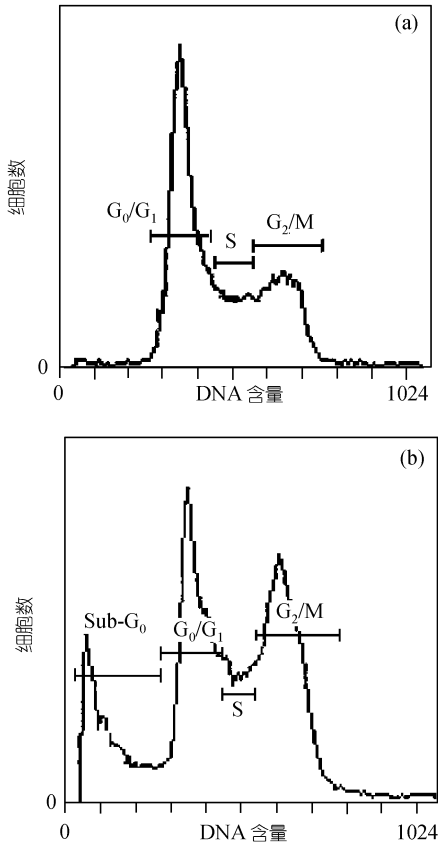


图 5 $(\text{DIPP-L-Leu})_2\text{-L-Lys-OCH}_3$ 处理 24 h 后 K562 细胞周期的变化
(a) 未处理细胞; (b) 40 $\mu\text{g/mL}$ 的 $(\text{DIPP-L-Leu})_2\text{-L-Lys-OCH}_3$ 作用 24 h 的 K562 细胞

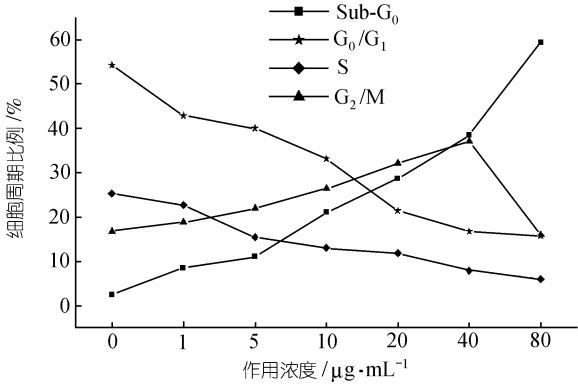


图 6 药物浓度对处于各期的 K562 细胞比例的影响曲线

从图 6 可以看出, 随着作用于 K562 细胞的 $(\text{DIPP-L-Leu})_2\text{-L-Lys-OCH}_3$ 浓度逐渐增加, 细胞周期中 Sub-G₀ 期细胞比例逐渐增加, G₀/G₁ 期和 S 期细胞比例逐渐减少, 同时 G₂/M 期细胞比例也增加, 当 $(\text{DIPP-L-Leu})_2\text{-L-Lys-OCH}_3$ 浓度大于 40 $\mu\text{g/mL}$ 时, G₂/M 期细胞比例开始减少, G₀/G₁ 期和 S 期细胞比例变化很小, 而 Sub-G₀ 期细胞比例增加明显, 说明 $(\text{DIPP-L-Leu})_2\text{-L-Lys-OCH}_3$ 具有细胞周期抑制作用。

3 讨论

自从 1972 年 Kerr^[7]等人提出了细胞凋亡的概念,

从形态学的角度区分了细胞凋亡与细胞死亡, 细胞凋亡就逐渐成为生物学与医学的研究热点. 越来越多的实验表明, 药物等对肿瘤细胞的杀伤作用与诱导其产生凋亡有关. 既然抗肿瘤药物可以通过引起肿瘤细胞凋亡来发挥其治疗作用, 而细胞凋亡又是一个可被抑制或激活的可调节过程, 那么能够引起细胞凋亡发生的化合物, 也就有可能成为临床上用于治疗肿瘤的化疗药物, 实际上人们已经发现一些小分子物质可以通过对细胞凋亡的调控而抑制肿瘤细胞的生长.

在本实验室建立的方法的基础上, 合成了 20 种 N-磷酸化二肽甲酯, 通过 MTT 法筛选其中能够抑制 K562 细胞增殖的化合物, 发现(DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃ 的活性明显高于其他的 N-磷酸化二肽甲酯(IC₅₀ 为 22.66 μmol/L), 更进一步的研究表明 DIPP—和—OCH₃ 都是保证其具有活性的基团. 我们通过形态学观察, DNA 凝胶电泳以及流式细胞仪检测早期凋亡细胞证明了(DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃ 对 K562 细胞的增殖抑制作用是通过诱导其凋亡实现的. 而通过研究其对细胞周期的影响, 发现随着(DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃ 作用浓度的增加, G₀/G₁期和 S 期细胞比例逐渐减少, G₂/M 期先增加后减少, 只有 Sub-G₀ 期是一直增加的, 特别需要指出的是当 G₂/M 期比例下降后 Sub-G₀ 期细胞比例明显增加, 我们推测(DIPP-*L*-Leu)₂-*L*-Lys-OCH₃ 可能将细胞阻滞在

G₂/M 期, 再启动这一时相的凋亡调控机制, 从而引起细胞凋亡.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 20132020)、北京市科学技术委员会和清华工业研究院科技基金资助项目.

参 考 文 献

1 姜泊. 细胞凋亡基础与临床. 北京: 人民军医出版社, 1999. 3

2 赵卫红. 细胞凋亡. 郑州: 河南医科大学出版社, 1997. 3~45

3 Culotta E, Koshland J D E. DNA repair works its way to the top. Science, 1994, 266: 1926~ 1929

4 Galardy R E, Grobelny D. N^α-(Diphenoxyposphoryl)-*L*-alanylproline, N^α-[Bis(4-nitrophenoxy) phosphoryl]-*L*-alanylproline, and N^α-[(2-phenylethyl) phenoxyposphoryl]-*L*-alanylproline: releasers of potent inhibitors of angiotensin converting enzyme at physiological pH and temperature. J Med Chem, 1985, 28: 1422 ~ 1427

5 McMahon E G, Palomo M A, Moore W H, et al. Phosphoramidon blocks the pressor activity of porcine big-ET-1 in vivo and conversion of big endothelin-1 to endothelin-1 in vitro. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 702 ~ 707

6 Ji G J, Xue C B, Zeng J N, et al. Synthesis of N-(diisopropoxyphosphoryl) amino acids and peptides. Synthesis, 1988, 6: 444 ~ 448

7 Kerr J F R, Wyllie A H. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer, 1972, 26: 239 ~ 257

(2002-03-06 收稿, 2002-07-08 收修改稿)