

文章编号: 1674-7054(2013)04-0335-07

# 芥子中甲代烯丙基异硫氰酸酯对 k562 细胞的抑制与诱导

侯杰<sup>2</sup>, 刘雪冰<sup>2</sup>, 操凤<sup>2</sup>, 潘彦鹏<sup>2</sup>, 吕杨<sup>2</sup>, 吴紫阳<sup>2</sup>, 郑育声<sup>2</sup>, 曹献英<sup>1, 2</sup>

(1. 海南大学 热带岛屿资源先进材料教育部重点实验室, 海南 海口 570228;

2. 海南大学 材料与化工学院, 海南 海口 570228)

**摘要:** 从海南十字花科植物芥菜种子中提取异硫氰酸酯类化学成分甲代烯丙基异硫氰酸酯(MITC), 并将其作用于 k562 细胞, 用 MTT 比色法测定增殖抑制效果, 应用瑞式姬姆萨、4', 6'-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、罗丹明 123 染色观察细胞形态。结果表明, MITC 作用 k562 细胞呈现一定的量效关系, MITC 体积分数为  $120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 作用时间为 96 h 时, 抑制率达到最高, 为  $(87.5 \pm 1.4)\%$ 。MITC 作用 k562 细胞 24、48、72、96、120 h 的半数抑制体积分数(IC<sub>50</sub>) 分别为 250.007、100.584、39.030、54.701、88.719  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。MITC 处理的 K562 细胞出现凋亡形态特征: 细胞皱缩、细胞核固缩、细胞核向内凹陷、线粒体电势下降。根据细胞形态变化初步判断 MITC 诱导 k562 细胞凋亡。

**关键词:** 异硫氰酸酯; K562 细胞; 细胞凋亡; 芥菜

中图分类号: R 733.72; Q813

文献标志码: A

十字花科蔬菜是一类因有十字形花而得名的蔬菜, 包括卷心菜、甘蓝、花椰菜、白菜、萝卜、辣根等, 其分布广泛, 来源丰富, 容易获得。流行病学研究发现, 十字花科蔬菜的摄取能降低人类前列腺癌、肺癌、膀胱癌、食道癌和结肠癌等的患病危险<sup>[1]</sup>。研究发现降低患癌症几率的活性成分为十字花科蔬菜中的异硫氰酸酯<sup>[2]</sup>。异硫氰酸酯是天然存在于各种十字花科蔬菜中的硫代葡萄糖苷的降解产物, 完整的硫代葡萄糖苷几乎没有抗癌活性, 只有在水解成异硫氰酸酯后才能发挥其重要的抗癌作用。异硫氰酸酯通过抑制 I 相酶活性, 阻止致癌前体物活化<sup>[3]</sup>, 激活 II 相脱毒/抗氧化酶, 加速致癌前体物在体内的代谢, 发挥肿瘤预防作用<sup>[4]</sup>, 同时异硫氰酸酯也能诱导肿瘤细胞凋亡和周期阻滞来发挥抗肿瘤作用<sup>[5]</sup>。抗肿瘤异硫氰酸酯化合物有萝卜硫素(SFN)、苯乙基异硫氰酸酯(BITC)、烯丙基异硫氰酸酯(AITC)等<sup>[6-9]</sup>, 研究表明, 这些异硫氰酸酯化合物具有抗肿瘤活性均因为含有异硫氰酸酯基团<sup>[10]</sup>。本实验中所用的具有异硫氰酸基团的甲代烯丙基异硫氰酸酯(MITC)是从芥菜种子中首次分离提取的, 因为来源于食用蔬菜种子, 与临床使用的化疗药物相比毒性较小, 且国内外没有关于 MITC 体外抑制白血病细胞增殖的报道。另外白血病中的慢粒急变期白血病在临床上的治愈率特别低, 即使骨髓移植治愈率也只有大约 20%, 在临床上对于慢粒白血病的治疗面临非常大的挑战, 因此, 笔者选用慢粒白血病急变期细胞 k562, 研究 MITC 抑制 k562 的体外增殖及作用机理, 旨在为后续实验提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

慢性粒细胞性白血病急变期细胞 k562 购自武汉中国典型培养物保藏中心。MITC(海南大学

收稿日期: 2013-11-10

作者简介: 侯杰(1988-), 男, 湖北公安人, 海南大学材料与化工学院 2011 级硕士研究生。

通信作者: 曹献英(1962-), 女, 研究员, 博士, 博士生导师, 从事生物材料评价和天然活性成分抗肿瘤的研究。

E-mail: cxying\_02@163.com

冯玉红老师赠送)、羟基脲(TCI)、1640培养基(Gibco)、胎牛血清(Gibco)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(BIOSHARP)、DAPI(BIOSHARP)、罗丹明123(BIOSHARP)、瑞式-姬姆萨染液(南京建成);荧光倒置显微镜(Olympus IX71, Japan)、多功能酶标仪(BIO-TEK Synergy, USA)、二氧化碳培养箱(SANYO MCO-178, Japan)、Bio-RAD细胞计数仪(TC-10, USA)等。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养条件 将保存于液氮中的k562细胞冻存管取出,置于37℃水浴中,轻轻摇动50s,迅速融化,将细胞转移至含10%胎牛血清1640培养基的培养瓶中,于37℃,φ=5%CO<sub>2</sub>条件下培养备用<sup>[11-12]</sup>。

1.2.2 MTT比色测定法 取对数期生长细胞,稀释细胞浓度至2×10<sup>4</sup>·mL<sup>-1</sup>。96孔板每孔加入100μL细胞悬液,培养12h,加入终体积分数分别为60,80,100,120,140μmol·L<sup>-1</sup>MITC,每组3个复孔。阳性对照为终质量浓度200mg·L<sup>-1</sup>的羟基脲。在药物作用细胞24,48,72,96,120h后分别加入ρ=5g·L<sup>-1</sup>的MTT溶液20μL,孵育4h后加入150μL三联液,孵育12h后用酶标仪检测溶液在570nm处的吸光值<sup>[13]</sup>。

计算药物对k562细胞增殖的抑制率,细胞的增殖抑制率=1-(实验组吸光值-空白组吸光值)/(阳性对照组吸光值-空白组吸光值)×100%。

1.2.3 细胞形态学观察 取60,80,100,120,140μmol·L<sup>-1</sup>MITC处理48h的细胞在倒置相差显微镜下观察拍照。

取60,80,100,120,140μmol·L<sup>-1</sup>MITC处理48h的细胞,同一体积分数分3份,每份1mL细胞悬液,离心去除上清,PBS重悬细胞离心去上清,第1份加入适量PBS重悬,取20μL细胞悬液涂布到载玻片上,用瑞式-姬姆萨染液对细胞进行染色<sup>[14]</sup>,在显微镜下观察拍照。第2份加入150μLDAPI工作液洗细胞沉淀,离心去上清,再加入150μLDAPI工作液,37℃避光孵育15min,离心去上清,PBS洗涤细胞,离心去上清,用荧光显微镜观察拍照。第3份加入500μL罗丹明123工作液,37℃避光孵育30min,离心去上清,用荧光显微镜观察拍照。

1.2.4 统计学分析 实验数据细胞抑制率用( $\bar{x} \pm s$ )表示。应用SPSS 17.0统计软件,通过单因素方差分析实验组对k562细胞的抑制作用,通过Probit回归分析计算IC<sub>50</sub><sup>[15]</sup>。检验水准α=0.05,所有实验重复3次。

## 2 结果与分析

2.1 异硫氰酸酯对k562细胞的增殖抑制作用 不同体积分数的MITC作用k562细胞24,48,72,96,120h,MTT法检测结果见表1和图1,与阳性对照相比,药物体积分数在120μmol·L<sup>-1</sup>时的抑制率均高于阳性对照的。且随着药物体积分数和药物作用时间的增加,细胞的抑制率明显增加。细胞增殖抑制率在药物作用72h时达到最高,随着药物作用时间的增加抑制率有缓慢的下降趋势。在相同作用时间下药物体积分数为120μmol·L<sup>-1</sup>的细胞抑制率最高,且抑制率相对100μmol·L<sup>-1</sup>时的抑制率差异极显著,相对于药物体积

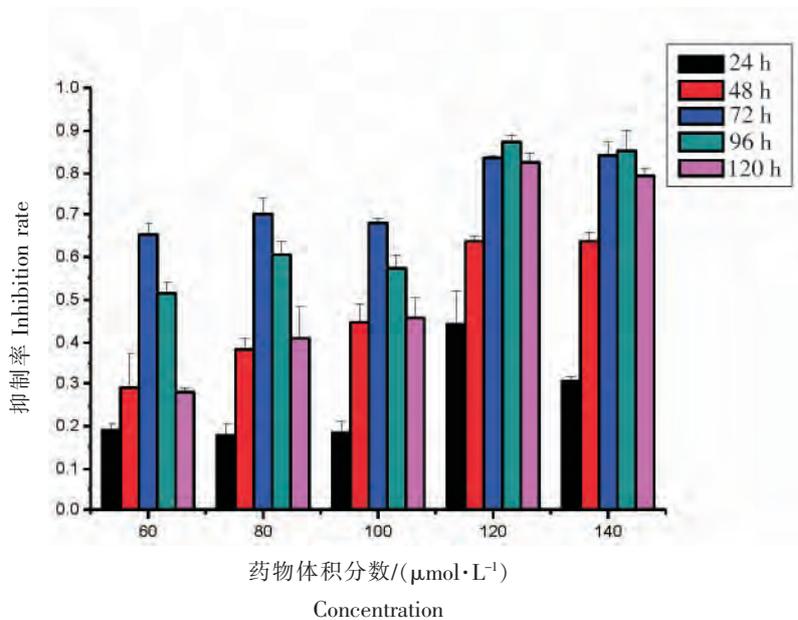


图1 MITC对k562细胞增殖抑制作用  
Fig. 1 Inhibition effect of MITC on the proliferation of k562 cells

分数  $140 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  只在作用时间 24 h 有显著性差异,在 48、72、96、120 h 均无显著性差异。在 MITC 药物体积分数为  $120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  作用 96 h 细胞的抑制率达到最高 ( $87.5 \pm 1.4$ )%。各实验组与对照组比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

根据 MITC 在不同药物作用时间对 k562 细胞的增殖抑制作用效果,利用 SPSS 17.0 软件 Probit 回归分析计算出 MITC 作用 k562 细胞 24、48、72、96、120 h 的 IC<sub>50</sub> 分别为 250.007、100.584、39.030、54.701、88.719  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,初步判断 MITC 为具有活性的抗肿瘤成分。

表1 MITC对k562细胞的增殖抑制作用

Tab. 1 Inhibition effect of MITC on the proliferation of k562 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

浓度 / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) Concentration	抑制率 Inhibition rate / %				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
阳性对照 Positive control	$7.4 \pm 1.5$	$20.2 \pm 2.6$	$58.4 \pm 4.2$	$70.3 \pm 1.0$	$65.5 \pm 4.0$
60	$18.8 \pm 1.7$	$29.2 \pm 4.9\#\#$	$65.2 \pm 3.1\#$	$51.3 \pm 3.0\#\#$	$27.8 \pm 1.3\#$
80	$17.7 \pm 2.9^{**}$	$38.2 \pm 2.4^*$	$70.5 \pm 3.4^*\#\#$	$60.6 \pm 3.5^{**}$	$40.6 \pm 7.6^{**}$
100	$18.6 \pm 2.5$	$44.7 \pm 3.9$	$68.1 \pm 1.1$	$57.4 \pm 3.1\#\#$	$45.8 \pm 4.8$
120	$44.1 \pm 0.9^{**}$	$63.8 \pm 0.9^{**}$	$83.8 \pm 0.5^{**}$	$87.5 \pm 1.4^{**}\#$	$82.4 \pm 2.1^{**}$
140	$30.4 \pm 1.1^*$	$64.0 \pm 1.8\#\#$	$83.9 \pm 3.4\#$	$85.3 \pm 4.4$	$79.4 \pm 1.7$

注:采用单因素方差分析,与前一体积分数差异显著性分析。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ ;与前一作用时间差异显著性分析, #:  $P < 0.05$  ##:  $P < 0.01$

Note: Analysis with one-way ANOVA; \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , as compared with that of its previous concentration; #:  $P < 0.05$  ##:  $P < 0.01$ , as compared with that of its previous concentration

2.2 细胞形态学观察结果 用倒置显微镜对不同体积分数 MITC 处理的细胞进行观察(见图 2)。其中图 2F 为对照组细胞边缘整齐,细胞饱满圆润,而实验组细胞形态则有不同程度的变化。图 2A 和图 2B 有细胞出现皱缩,少数细胞出泡。图 2C、2D 细胞皱缩,大量细胞都出泡,有少部分的细胞分解。图 2E 大部分的细胞出泡,分解。

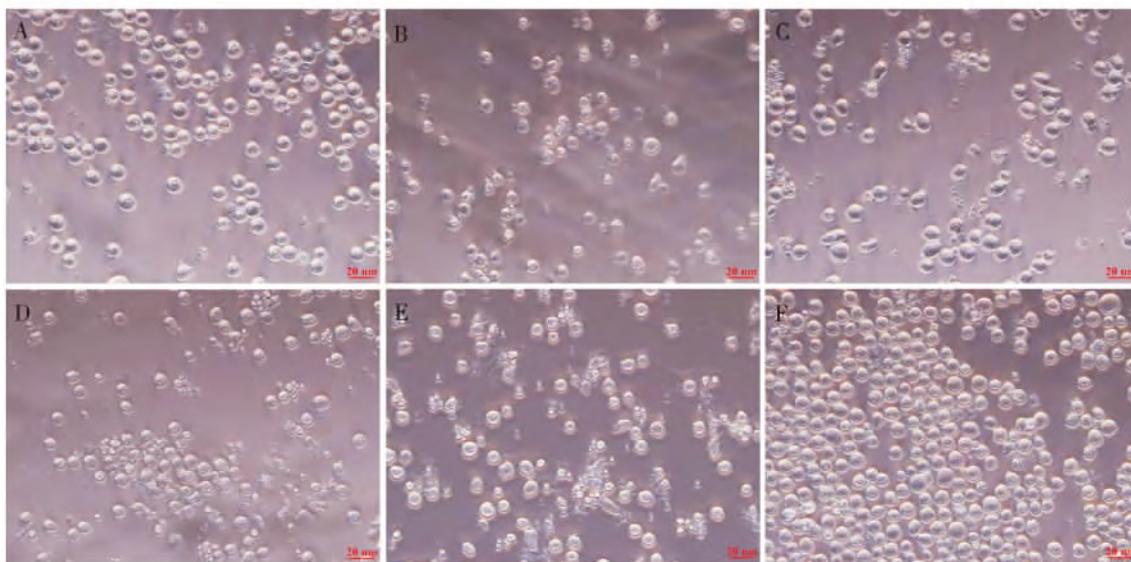


图2 倒置显微镜观察k562细胞形态变化(400×)

A ~ E 分别为 60、80、100、120、140  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MITC 处理的细胞, F 为对照组细胞

Fig. 2 The morphological change of k562 cells by inverted microscope (400 ×)

A - E: Cells treated with 60, 80, 100, 120, 140  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MITC, respectively; F: Negative control

经瑞式-姬姆萨染液染色的细胞,细胞膜呈紫黑色,细胞核着色呈深浅不同的紫黑色,胞浆呈浅红色。图3中为对照组和实验组细胞姬姆萨染色后的细胞形态。从图3F中可见,对照组细胞结构完整,细胞膜平滑,核内染色质均匀,图3A、3B显示细胞出现细胞核固缩,且细胞的大小和对照组相比明显皱缩变小,且图3B细胞有出泡现象,图3C~3E细胞形状有不同程度改变,细胞随着药物浓度的增高,细胞出现不同程度的裂解。

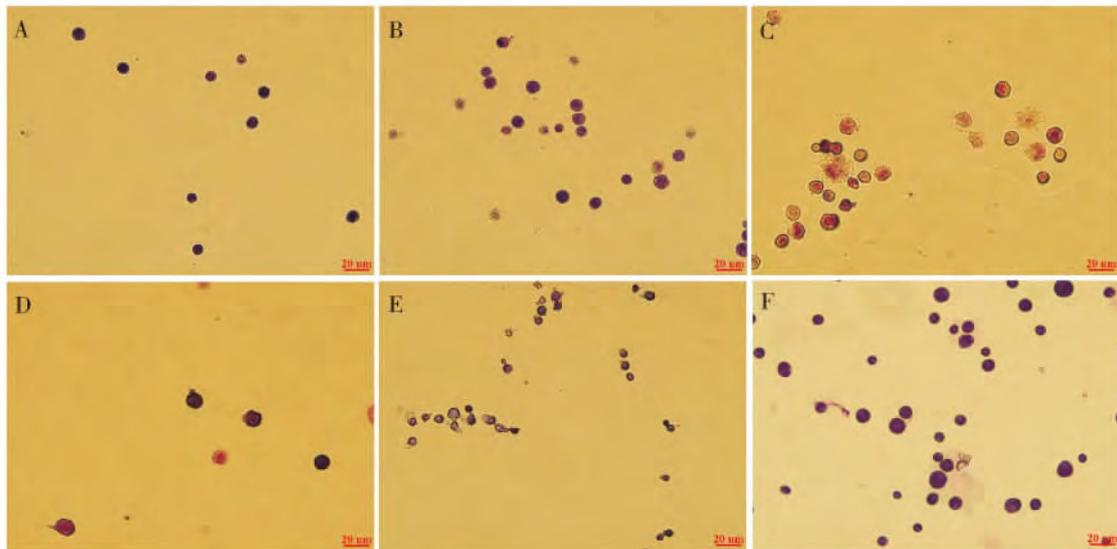


图3 瑞式-姬姆萨染显示 k562 细胞的形态变化(400×)

A~E 分别为体积分数 60、80、100、120、140  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MITC 处理的细胞, F 为阴性对照

Fig. 3 The morphological change of k562 cells by wright-giemsa staining (400×)

A~E: Cells treated with 60, 80, 100, 120, 140  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MITC, respectively; F: Negative control

从图4A~4C中可以看出,药物处理的细胞比对照组细胞荧光亮度亮,即药物处理细胞后细胞核出现了不同程度的固缩,且细胞核向内凹陷移向细胞的一侧。图4C~4E药物处理组细胞中除出现核固缩向内凹陷,还伴随细胞质膜皱折出泡且小泡中含有染色质。

从图5可以看出,60、80  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MITC 处理细胞 48 h,少数细胞内荧光强度不变,大部分细胞的荧光强度出现了降低,100、120、140  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MITC 处理细胞 48 h,大约 90% 的细胞内的荧光强度明显比阴性对照低。荧光结果显示,药物处理后细胞的线粒体膜电位丧失,随着药物体积分数增加,细胞线粒体膜电位的丧失呈现良好的浓度依赖性。

### 3 讨论

MTT 结果显示,随 MITC 体积分数和作用时间的增加, k562 细胞抑制率呈上升趋势,说明对浓度和时间有一定的依赖性,但 k562 细胞在药物体积分数为 120  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时抑制率达到最高,继续增大药物体积分数抑制率不再增加,这可能是因为药物在 120  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时已经达到最好效果。当作用时间达 72 h 后细胞抑制率总体开始下降,这可能是由于空间和营养的原因,阴性对照组的细胞处于衰亡期,细胞活力和细胞数量开始下降,而药物作用的细胞由于部分细胞适应了药物环境后开始利用营养物质增殖,导致药物作用时间 96 h 和 120 h 出现了抑制率下降。根据 k562 细胞在不同体积分数 MITC 和不同作用时间条件下的抑制效果,得到 MITC 药物体积分数为 120  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  作用 96 h,细胞的抑制率达到最高(87.5 ± 1.4) %。根据 MITC 在不同药物作用时间对 k562 细胞的增殖抑制作用效果,利用 SPSS17.0 软件 Probit 回归分析计算出 MITC 作用 k562 细胞 24、48、72、96、120 h 的 IC<sub>50</sub> 分别为 250.007、100.584、39.030、54.701、88.719  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,初步判断 MITC 为具有活性的抗肿瘤成分。

用倒置显微镜对细胞进行观察显示低体积分数药物处理细胞时,细胞只出现细胞皱缩,细胞表面不

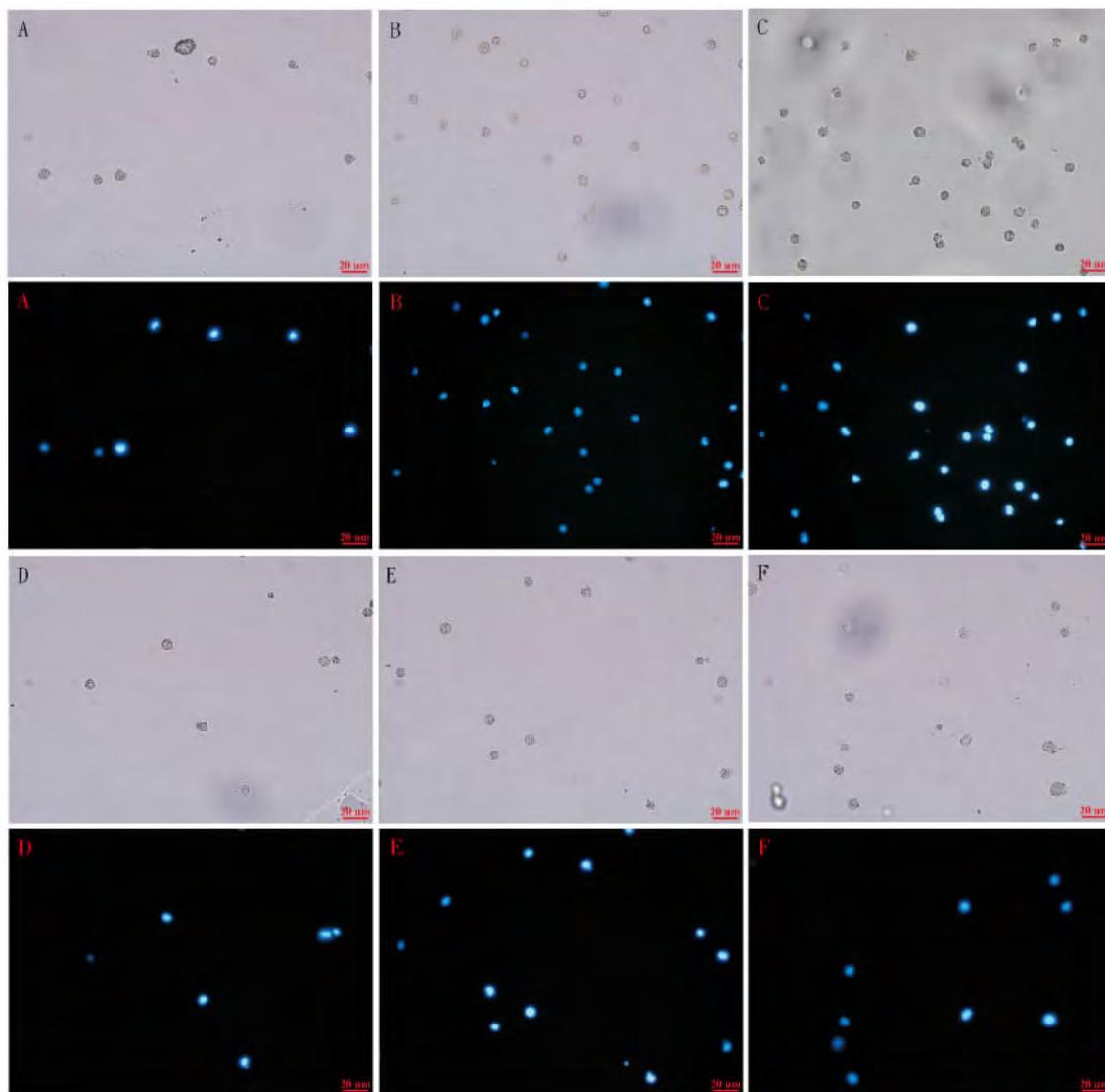


图 4 DAPI 染色显示 k562 细胞的形态变化(400 ×)

A ~ E 分别为体积分数 60 ,80 ,100 ,120 ,140  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MITC 处理的细胞; F 为阴性对照

Fig. 4 The morphological change of k562 cells by DAPI staining (400 ×)

A - E: Cells treated with 60 ,80 ,100 ,120 ,140  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MITC; F: Negative control

再圆润。随着药物体积分数的增大,细胞出现了不同程度的出泡,并且有细胞裂解。细胞形态的改变程度与药物体积分数的变化呈正相关关系,显示出了对药物体积分数的依赖性,该结果与 MTT 实验结果相吻合。

细胞凋亡的主要特征为细胞膜皱折出泡,细胞核固缩移至细胞一侧并向内凹陷,形成新月状帽状结构,之后细胞核内的染色体断裂成大小不等的片段,与某些细胞器聚集在一起,被反折的细胞质膜包围形成凋亡小体<sup>[16]</sup>。经瑞式-姬姆萨染液染色的细胞,细胞膜呈紫黑色,细胞核着色呈深浅不同的紫黑色,胞浆呈浅红色。本研究中通过瑞式-姬姆萨染色药物作用细胞,观察到细胞有比较明显的细胞核固缩和细胞核移向细胞一侧,且 DAPI 荧光染料染色也观察到细胞核固缩和向内凹陷的细胞形态特征。

细胞凋亡的诱导主要存在依赖 caspase 和不依赖 caspase 途径。当细胞受到凋亡信号刺激时两条途径一般能同时被激活。而 caspase 依赖性细胞凋亡主要由两条途径引发:有死亡受体起始的外源途径和由线粒体起始的内源途径。在细胞凋亡的内源途径中线粒体处于中心位置,细胞受到刺激后线粒体膜电位

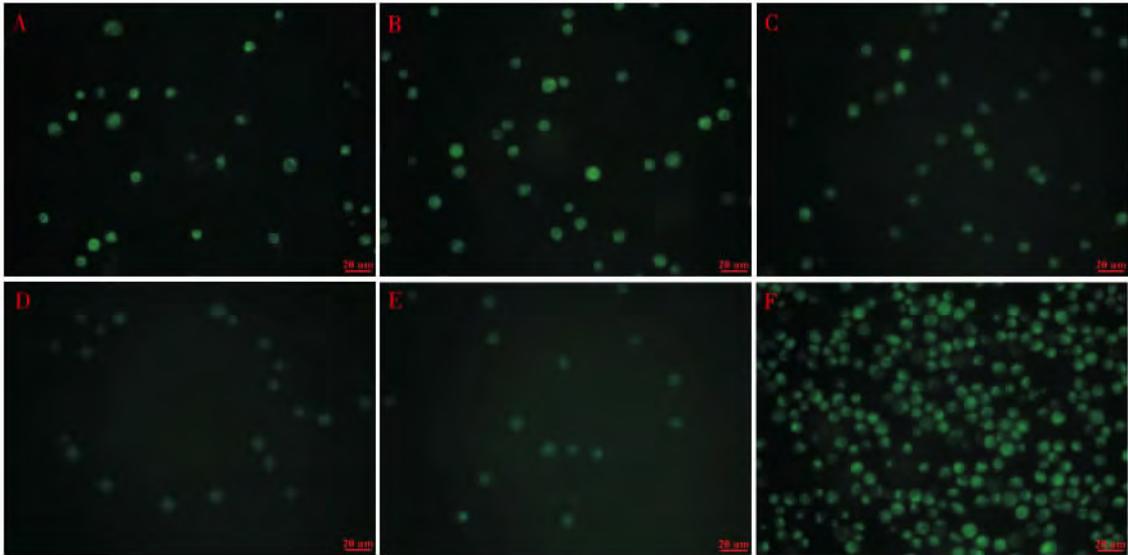


图5 罗丹明 123 染色显示 k562 细胞的形态变化(400 ×)

A - E 分别为体积分数 60 ,80 ,100 ,120 ,140  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MITC 处理的细胞 ,F 为阴性对照

Fig. 5 The morphological change of k562 cells by rodanmin123 staining (400 ×)

A - E: Cells treated with 60 ,80 ,100 ,120 ,140  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MITC , respectively; F: Negative control

会丧失 ,导致线粒体外膜通透性改变 ,导致细胞色素 c 等凋亡因子的释放 ,从而激活凋亡信号通路<sup>[16]</sup>。罗丹明 123 在细胞中的聚集量与线粒体的膜电位高低呈正比例关系。本研究药物处理细胞经罗丹明 123 染色后荧光强度比阴性对照组弱 ,即 MITC 能诱导 k562 细胞线粒体膜电位丧失 ,从而诱导 k562 细胞凋亡。这与 CHEN<sup>[17]</sup> 研究中同类异硫氰酸酯化学成分苯乙基异硫氰酸酯通过降低 HL60 和 Raji 白血病细胞线粒体电位来诱导细胞凋亡的结果一致。

#### 4 结 论

采用 MTT 比色法检测 MITC 对 k562 细胞的体外增殖抑制效果 ,得到 MITC 作用 k562 细胞最佳药物体积分数、作用时间及抑制率为 120  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ,96 h (87.5 ± 1.4) %。利用 SPSS 软件分析得到 MITC 作用 k562 细胞 24 ,48 ,72 ,96 ,120 h 的 IC<sub>50</sub> 分别为 250.007 ,100.584 ,39.030 ,54.701 ,88.719  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ,初步得出 MITC 对 k562 细胞增殖有明显的抑制作用。

根据 MITC 作用 k562 细胞的形态观察 ,结合瑞式 - 姬姆萨染色和荧光染色细胞形态观察 ,药物作用后的细胞出现了细胞线粒体膜电位降低 ,细胞固缩 ,染色质固缩且向内凹陷 ,根据这些细胞形态的变化初步判断 MITC 通过降低 k562 细胞线粒体电位诱导了细胞凋亡。

#### 参考文献:

- [1] BACON J R , WILLIAMSON G , GARNER R C , et al. Sulforaphane and quercetin modulate PhIP-DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes [J]. *Carcinogenesis* ,2003( 24) : 1903 - 1911.
- [2] ROUZAUD G , RABOT S , RATCLIFFE B , et al. Influence of plant and bacterial myrosinase activity on the metabolic fate of glucosinolates in gnotobiotic rats [J]. *Br. J. Nutr.* ,2003 ,90: 395 - 404.
- [3] KUROIWA Y , NISHIKAWA A , KITAMURA Y , et al. Protective effects of benzyl isothiocyanate and sulforaphane but not resveratrol against initiation of pancreatic carcinogenesis in hamsters [J]. *Cancer Letters* ,2006 ,241( 2) : 275 - 280.
- [4] SARACINO M R , LAMPE J W. Phytochemical regulation of UDP-glucuronosyltransferases: implications for cancer prevention [J]. *Nutr. Cancer* ,2007( 59) : 121 - 141.
- [5] XIAO D , JOHNSON C S , TRUMP D L , et al. Proteasome-mediated degradation of cell division cycle 25C and cyclin-dependent kinase 1 in phenethyl isothiocyanate-induced G2/M phase cell cycle arrest in PC-3 human prostate cancer cells [J]. *Mol.*

- Cancer Ther. ,2004 ,3( 5) :567 – 575.
- [6] KIM S J , KANG S Y , SHIN H H , et al. Sulforaphane inhibits osteoclastogenesis by inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B [J]. Mol. Cells ,2005( 20) : 364 – 370.
- [7] HONG F , FREEMAN M L , LIEBLER D C. Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane [J]. Chem. Res. Toxicol. ,2005( 18) : 1917 – 1926.
- [8] CHEUNG K L , KHOR T O , YU S , et al. PEITC induces G1 cell cycle arrest on HT-29 cell through the activation of p38 MAPK signaling pathway [J]. AAPS J. ,2008( 10) : 277 – 281.
- [9] ZHANG Y , TANG L , GONZALEZ V. Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells [J]. Mol. Cancer Ther. ,2003( 2) : 1045 – 1052.
- [10] PRASHAR A , SIDDIQUI F , SINGH A K. Synthetic and green vegetable isothiocyanates target red blood leukemia cancers [J]. Fitoterapia ,2012( 83) : 255 – 265.
- [11] 刘玉琴. 细胞培养手册 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2009 ,6: 70.
- [12] 张静波. 组织和细胞培养技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002 ,1: 110.
- [13] 张雪涛. RNA 干扰抑制 bcr/abl 融合蛋白表达及其对慢性白血病细胞 k562 的影响 [D]. 海口: 海南大学, 2012.
- [14] 朱辛为. 血涂片标本瑞氏-姬姆萨混合染色方法的探讨 [J]. 第四军医大学吉林军医学院学报, 2001 ,23( 4) : 217.
- [15] 周一平. 用 SPSS 软件计算新药的  $LD_{50}$  [J]. 药学进展, 2003 ,27( 5) : 314 – 316.
- [16] 翟中和, 王忠喜, 丁明孝. 细胞生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 443.
- [17] CHEN G , CHEN Z , HU Y M , et al. Inhibition of mitochondrial respiration and rapid depletion of mitochondrial glutathione by  $\beta$ -phenethyl isothiocyanate: mechanisms for anti-leukemia activity [J]. Antioxidants and Redox signaling ,2011( 15) : 2911 – 2921.

## Inhibition and Inducing of k562 Cells by Methallyl Isothiocyanate Extracted from Mustard Seeds

HOU Jie<sup>2</sup> , LIU Xuebing<sup>2</sup> , CAO Feng<sup>2</sup> , PAN Yanpeng<sup>2</sup> , LÜ Yang<sup>2</sup> , WU Ziyang<sup>2</sup> ,  
ZHENG Yusheng<sup>2</sup> , CAO Xianying<sup>1 2</sup>

(1. Ministry of Education Key Laboratory for Advanced Materials in Tropical Island Resources , Hainan University , Haikou 570228 , China;

2. College of Material and Chemical Engineering , Hainan University , Haikou 570228 , China)

**Abstract:** Methallyl isothiocyanate ( MITC) were extracted from the seeds of mustard ( *Brassica juncea* ) , a cruciferous plant , which grows in Hainan Province , China. The inhibition effect of MITC on proliferation of k562 cells was determined by a MTT assay , and the cell morphology was observed by using Wright-giemsa , DAPI and Rodanmin 123 staining. MITC showed a concentration-response relationship with k562 cells in cell proliferation *in vitro*. The k562 cells were inhibited at the highest rate (  $87.5 \pm 1.4$  ) % when treated with the MITC at  $120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 96 h. The k562 cells treated with MITC for 24 , 48 , 72 , 96 , 120 h gave respective IC<sub>50</sub> of 250.007 , 100.584 , 39.030 , 54.701 , 88.719  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . And the cells shrank with nuclear chromatin condensation , nuclear inward depression and low mitochondrial potential. These morphological changes suggest that k562 cell apoptosis were induced by MITC.

**Key words:** isothiocyanate; k562 cell; cell apoptosis; *Brassica juncea*