论著

文章编号:1000-5404(2007)22-2160-04

P53途径在辛伐他汀诱导K562细胞凋亡中的作用

周定安[1],黄文芳[2],刘 文[3],胥国强[3],杜 琼[2],赵 慎[4],许 毅[4] (重庆医科大学:[1]附属儿童医院检验科,重庆400014,[3]检验系,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016;[2]四川省医学科学院四川省人民医院检验科,成都610072;[4]泸州医学院检验系,泸州 646000)

提 要:目的 探讨辛伐他汀处理后的P53通路和细胞周期的分子水平变化,以说明P53途径在辛伐他汀抑制K562细胞增殖和诱导细胞凋亡中的作用。**方法** 体外培养和用辛伐他汀处理K562细胞,用流式细胞仪检测辛伐他汀作用后的细胞周期和凋亡率的变化,用RT-PCR检测P53通路和细胞周期相关基因的变化。采用免疫组化LDP法检测P21蛋白变化的水平。**结果** 辛伐他汀能使K562细胞停滞在G_0/G_1期,明显诱导K562细胞凋亡,大多数P53通路基因和细胞周期相关基因出现差异表达。P21蛋白随药物作用时间的延长,表达上调。**结论** P53通路可能在辛伐他汀诱导的K562细胞增殖抑制和凋亡发生的过程中起重要作用。

关键词:K562细胞;P53通路;凋亡

中图法分类号:R73-361;R730.23;R733.72 **文献标识码**:A

Role of P53 pathway in simvastatin-induced apoptosis of K562 cells *in vitro*

ZHOU Ding-an[1], HUANG Wen-fang[2], LIU Wen[3], XU Guo-qiang[3], DU Qiong[2], ZHAO Shen[4], XU Yi[4] ([1]Department of Clinical Laboratory, Children's Hospital, Chongqing 400014, [3]Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Clinical Laboratory Division, Sichuan People's Hospital & Academy of Medical Sciences, Chengdu 610072; [4]Laboratory Medicine Department, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of P53 pathway and cell cycle in K562 cells treated with simvastatin in molecular levels and illustrate the antiproliferative and apoptosis-induced role of P53 pathway in K562 cells when exposed to simvastatin. **Methods** K562 cells were cultured and treated with simvastatin *in vitro*. The apoptosis rate and cell cycle of K562 cells were measured by FCM. The transcriptional level changes of most molecules in P53 pathway and cell cycle were detected by RT-PCR. The changes of P21 protein was measured by immunohistochemistry LDP method. **Results** G_0/G_1 arrest in K562 cells and significant apoptosis of K562 cells were induced by simvastatin. Most genes in P53 pathway and genes related to cell cycle after exposed to simvastatin were expressed differentially in K562 cells. The P21 protein was up-regulated with the prolongation of simvastatin treatment time. **Conclusion** P53 pathway probably plays important roles in antiproliferation and apoptosis of K562 cells induced by simvastatin.

Key words: K562 cells; P53 pathway; apoptosis

慢性髓细胞白血病(chronic myelocytic leukemia, CML)分子生物学特性是染色体t(9:22)易位,并导致融合基因bcr/abl形成。P53是一种与细胞增殖有关的核磷酸化蛋白。与大多数肿瘤不一样,CML细胞中p53突变的频率低[1]。p53的基因结构在CML的慢性阶段大多数时候是正常的,但在慢性粒细胞白血病急变时经常发生异常[2]。文献[3]表明,辛伐他汀可有效地抑制K562细胞的增殖并诱导其凋亡,与化疗药物联合应用能提高K562细胞对化疗药物的敏感性。然而,辛伐他汀对慢性髓细胞白血病K562细胞中参与细胞周期调节和细胞凋亡的P53途径的分子水平变化的影响仍不清楚。我们通过体外用辛伐他汀处理K562细胞,检测P53途径和细胞周期相关基因的分子水平变化,试图从一个角度说明P53途径在辛伐他汀诱导K562细胞增殖抑制和凋亡的可能分子机制。

基金项目:四川省卫生厅基金(303005002061011)
Supported by the Foundation of Public Health Department of Sichuan Province (303005002061011)

作者简介:周定安(1978-),男,贵州省贵阳市人,硕士研究生,技师,主要从事抗肿瘤药物开发和机制方面的研究。电话:13452370842,E-mail:zhoudinan@sina.com

通讯作者:黄文芳,电话:(028)87394056,E-mail:HuangWF@21cn.com

收稿日期:2006-12-11;**修回日期**:2007-04-30

1　材料与方法

1.1　主要试剂及配制方法

辛伐他汀购自中国药品生物制品检定所，以无水乙醇溶解，再加入与辛伐他汀等物质的量的 NaOH，50 ℃ 水浴 2 h，调节 pH 值至 7.20，过滤除菌，调整浓度为 20 μmol/L。RNase 购自 Sigma 公司；培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司。AnnexinV/PI 双染色法凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司。Trizol 和逆转录试剂 Rever TraAce 购自 Bioflux 公司，目的基因和内参的引物由上海英骏生物技术有限公司合成，PCR 试剂由北京天为时代科技有限公司提供，羊抗人的 P21 单克隆抗体由 Santa Cruz 生物技术公司提供。

1.2　细胞培养

K562 细胞购自四川大学华西医学中心，以含 10% 灭活小牛血清，100 U/ml 青霉素，100 U/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。

1.3　流式细胞仪检测细胞周期

收集对数生长期细胞，调整细胞浓度为 1.0×10^5/ml，实验组加入 20 μmol/L 辛伐他汀 20 μl，连续作用 K562 细胞 24、48、72 h，对照组加入无水乙醇 20 μl，连续作用 K562 细胞 24、48、72 h，同时设立空白对照组。待作用时间足够时，各自取细胞 1 000 r/min 离心 5 min，PBS 洗 2 次，调节细胞浓度为 5.0×10^5/ml，加入 -20 ℃ 预冷，70% 乙醇 2 ml 固定，RNase 消化，4 ℃ 放置 24 h，PBS 冲洗 2 次。每管加入碘化丙啶（50 μg/ml）1 ml，用流式细胞仪检测。所有资料用 Multicycle 软件分析，并计算细胞增殖指数（PI）。

$PI=(G_2/M+S)/(G_0/G_1+G_2/M+S)$。

1.4　流式细胞术检测辛伐他汀诱导 K562 细胞的凋亡率

按照 AnnexinV/PI 双染色法凋亡检测试剂盒说明操作，采用流式细胞仪检测辛伐他汀处理 K562 细胞 24、48、72 h 和对照组的凋亡率[4]。

1.5　RT-PCR 检测 p53、p21、cyclin D2、cyclin B1 mRNA 表达变化

按照 Bioflux 公司的 Biozol 总 RNA 提取试剂说明书，提取总 RNA 和进行逆转录。p53、p21、cyclin D2、cyclin B1 基因引物序列分别是 p53 正义链：5′-TTGGCTCTGACTGTACCACC-3′，反义链 5′-GAACATCTCGAAGCGCTCAC-3′，产物长度为 350 bp。p21：正义链 5′-CCATGTGGACCTGTCACTGT-3′，反义链 5′-AAGATCAGCCGGCGTTTGGA-3′，产物长度为 150 bp。cyclin D2：正义链 5′-GAGCACATCTTGCGCAAGCT-3′，反义链 5′-TGGTCCAGTTCATCCTCCGA-3′，产物长度 350 bp。cyclin B1：正义链 5′-GATGTGCCCCTGCAGAAGAA-3′，反义链 5′-GTTTCCAGTGACTTCCCGAC-3′，产物长度 200 bp。内参 GAPDH：正义链 5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′，反义链 5′-ATGTCGTTGTCCCACCACCT-3′，产物长度为 450 bp。反应体系为：总体积 25 μl，cDNA 模板 3 μl，上下游引物各 1 μl，2 × Mater Mix 12.5 μl，用 ddH_2O 补足至 25 μl。扩增条件 94 ℃ 5 min，94 ℃ 1 min，59 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，30 循环；72 ℃ 10 min，4 ℃ 30 min。用 Quantity One 软件分析基因的差异表达。

1.6　免疫组化 LDP 法检测辛伐他汀处理 K562 细胞 P21 蛋白的表达情况

PBS 冲洗 5 min，3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶，室温下放置 15 min，流水洗片后入 PBS 缓冲液，分别滴加第一抗体：P21（1∶50）4 ℃ 冰箱内过夜。PBS 液冲洗切片，5 min × 3 次，滴加 EnVision™ 试剂，37 ℃ 孵箱内 20 min。PBS 冲洗，5 min × 3 次，DAB/H_2O_2 显色，光镜下控制，自来水终止呈色反应。Harris 苏木精淡染细胞核 1 min。常规脱水至封片。相同切片以 PBS 替代一抗作空白对照。采用 Image Pro Plus 5.1 计算辛伐他汀处理 K562 细胞 24、48、72 h 后 P21 蛋白的累积光密度值。

1.7　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析和 LSD-t 检验。

2　结果

2.1　辛伐他汀对 K562 细胞细胞周期的影响

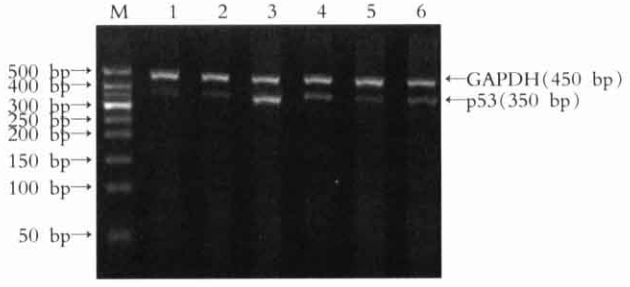
流式细胞仪分析细胞周期相分布，结果显示：20 μmol/L 辛伐他汀作用 K562 细胞 24、48、72 h 后，48 h G_0/G_1 期百分比升高明显，72 h 有所降低，但仍高于 24 h，而对照组 72 h 的 G_0/G_1 期百分比低于 24 h，说明随药物作用时间的延长，辛伐他汀能够引起 K562 细胞细胞周期的 G_0/G_1 期停滞。

2.2　辛伐他汀对 K562 细胞凋亡率的影响

流式细胞仪 AnnexinV/PI 双染色法检测结果显示，辛伐他汀作用 K562 细胞 24 h 后细胞凋亡率已明显发生变化，即随着时间的延长，细胞凋亡率逐渐增高。

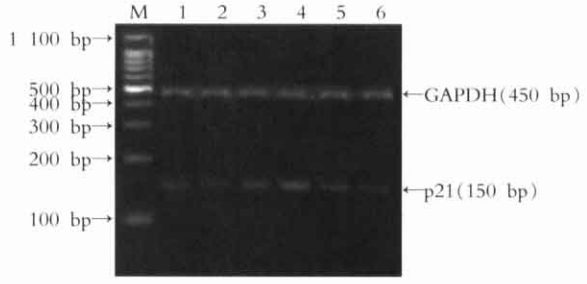
2.3　辛伐他汀对 K562 细胞 P53 通路和细胞周期基因表达的影响

对照组 p53 mRNA 随药物作用时间的延长，上调不明显。实验组的 p53 mRNA 在辛伐他汀作用 48 h 时即出现明显上调，见图 1。辛伐他汀处理 K562 细胞 24 h 和 48 h 以及 48 h 和 72 h 之间的 p53 mRNA 的表达差异具有统计学意义（$P<0.01$），但 24 h 和 72 h 之间的 p53 mRNA 表达差异不具有统计学意义（$P>0.05$）。实验组的 p21 mRNA 在药物作用 48 h 时即出现明显上调，而对照组的 p21 mRNA 的水平随药物时间的延长表达出现下调，药物处理 K562 细胞 24、48、72 h 的 p21 mRNA 表达差异均具有统计学意义（$P<0.01$），见图 2。比较对照组和实验组的 p21 mRNA 的吸光度值，二者差异显著（$P<0.05$）。



M：标准；1，3，5：辛伐他汀处理 K562 细胞 24、48、72 h；2，4，6：无水乙醇处理 K562 细胞 24、48、72 h

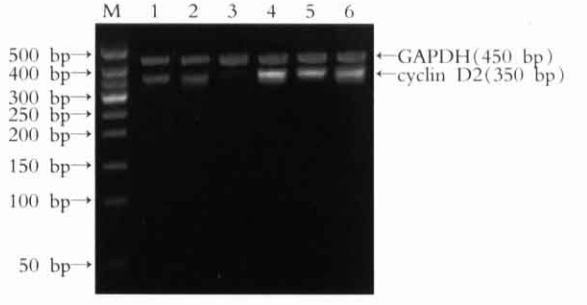
图 1　辛伐他汀和无水乙醇处理 K562 细胞 24、48、72 h 后 p53 mRNA 的 RT-PCR 结果



M:标准;1,3,5:无水乙醇处理 K562 细胞 24、48、72 h;2,4,6:辛伐他汀处理 K562 细胞 24、48、72 h

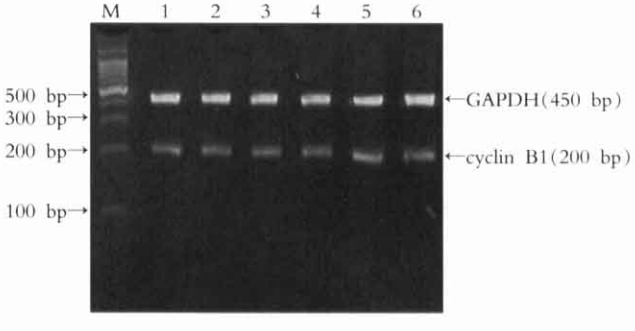
图 2 辛伐他汀和无水乙醇处理 K562 细胞 24、48、72 h 后 p21 mRNA RT-PCR 结果

实验组 cyclin D2 mRNA 在辛伐他汀处理 48 h 后就出现明显下调,72 h 仍低于 24 h,见图 3。实验组 24 h 与 72 h 以及 48 h 与 72 h 之间的 cyclin D2 mRNA 表达差异具有统计学意义($P<0.01$)。对照组和实验组之间 cyclin D2 mRNA 表达差异具有统计学意义($P<0.05$)。对照组的 cyclin B1 mRNA 随药物作用时间的延长,表达出现上调。而实验组的 cyclin B1 mRNA 表现出下调的趋势,以 48 h 最明显,实验组 24、48、72 h 之间 cyclin B1 mRNA 的表达差异均具有统计学意义($P<0.01$)。对照组和实验组之间 cyclin B1 mRNA 表达差异也具有统计学意义($P<0.01$)。见图 4。



M:标准;1,3,5:辛伐他汀处理 K562 细胞 24、48、72 h;2,4,6:无水乙醇处理 K562 细胞 24、48、72 h

图 3 辛伐他汀和无水乙醇处理 K562 细胞 24、48、72 h 后 cyclin D2 mRNA 的 RT-PCR 结果



M:标准;1,3,5:辛伐他汀处理 K562 细胞 24、48、72 h;2,4,6:无水乙醇处理 K562 细胞 24、48、72 h

图 4 辛伐他汀和无水乙醇处理 K562 细胞 24、48、72 h 后 cyclin B1 mRNA 的 RT-PCR 结果

2.4 辛伐他汀对 K562 细胞 P21 蛋白表达的影响

用 Image Pro Plus 5.1 计算辛伐他汀处理 K562 细胞 24、48、72 h 后 P21 蛋白的累积光密度值,结果显示,与辛伐他汀处理 K562 细胞 24 h 相比,在 48 h 后,辛伐他汀能够诱导 P21 蛋白表达上调($P<0.05$);处理 72 h 时,与 24 h 的 P21 蛋白表达之间也有显著性差异($P<0.05$)。

3 讨论

研究表明,CML K562 细胞株与其他白血病细胞株相比,对化疗药物诱导的细胞凋亡有很强的抵抗性[5],这是 CML 细胞克隆难以清除的主要原因[2]。寻找有效地诱导 CML 细胞凋亡的药物是提高 CML 治疗效果的关键。近年来的研究表明,辛伐他汀的同类物洛伐他汀同时具有诱导急性髓系白血病(AML)和前列腺癌等肿瘤细胞凋亡的作用[6,7]。慢性阶段的 CML 保持 P53 的功能,表明它的肿瘤抑制作用能够延缓疾病进程。有研究表明,在 bcr/abl 表达的细胞中,P53 发挥肿瘤抑制作用的能力依靠 P53 和 bcr/abl 的相对表达量。在像 bcr/abl 高水平表达的 K562 细胞中,P53 伴随着的高水平表达能够发挥其肿瘤抑制基因的活性和诱导凋亡、分化的作用。P53 通路所涉及的生长抑制、凋亡和分化等受细胞外刺激、细胞癌基因组成、应急条件的强度、细胞类型等因素的影响[2],细胞周期的停滞需要 P53 依赖的转录。P21 的转录是通过抑制 Cdk 的活性,特别是 cyclin D-Cdk4/6 和 cyclin A、E-Cdk2来调节 P53 依赖的细胞 G 期阻滞,因为 cyclinD-Cdk4/6 和 cyclin A、E-Cdk2 参与 Rb 蛋白的磷酸化。

在实验中,我们观察到实验组的 p53 mRNA 在辛伐他汀作用 48 h 时即出现明显上调,这与细胞周期在 48 h 发生 G_0/G_1 期阻滞的时间相一致。实验组的 p21 mRNA 也在药物作用 48 h 时即出现明显上调,这也与 P53 和 K562 细胞在 48 h 发生 G_0/G_1 期阻滞的时间相一致,可见辛伐他汀处理 K562 细胞 48 h 后诱导 P53、P21 参与 K562 细胞 G_0/G_1 期的阻滞。同时 P21 也能结合 PCNA(增殖细细胞核抗原),可避免 PCNA 免受 DNA 多聚酶(rou)的作用而抑制细胞周期进程[6]。此外,最近的研究表明 P21 的亚细胞定位决定,p21 基因是抑制细胞周期进程还是诱导凋亡。不成熟单核细胞中易位表达的 P21 定位于细胞核能够诱导细胞周期的停滞。P21 的核表达和随后发生的细胞 G_1 期停滞允许在前体细胞中进行的分化过程继续进行,此时,P21 又重新定位于细胞质,细胞质 P21 的表达又伴随着一种抗凋亡的细胞表现型。因此,我们实验中检测到的辛伐他汀诱导 P21 的表达上调,有可能在 48 h 时参与了辛伐他汀诱导的 K562 细胞 G_0/G_1 期停滞,而后有发生核 P21 细胞质的重新定位参与 K562 细胞凋亡诱导的发生,因为细胞周期在 48 h 是发生明显的 G_0/G_1 期停滞,而辛伐他汀诱导的 K562 细胞的凋亡率是随着

药物作用时间的延长而逐渐升高的，并以72 h凋亡率最高。

P21是细胞周期蛋白依赖性抑制剂，能够作用于细胞周期素cyclin Es和cyclin Ds而改变细胞周期进程，影响细胞增殖的生物学活性。cyclin D2 mRNA随药物作用时间的延长，表达出现下调。因此，P21表达的上调可能通过诱导cyclin D2的表达下调而抑制K562的细胞周期进程。

P53途径除了影响细胞向G_1/S期过渡外，还影响了G_2/M期进程，即P53可作用于G_2/M期的检查点。当药物等外界刺激引起DNA损伤后，可引起P53和P21的表达上调，而P21等G_2/M期调节分子又可将与cyclin B1结合的CDC2(CDK1)蛋白激酶Thr-14/Tyr-15的磷酸基团去磷酸化，使CDC2不能激活，同时，CDC2与cyclin B1的结合是G_2/M期事件启动和进行的必要条件，这样可实现G_2/M期阻滞[7]。本实验中，辛伐他汀引起p53、p21 mRNA在48 h明显上调，导致K562细胞发生G_0/G_1期阻滞后，我们可以看到实验组的cyclin B1 mRNA在48 h时也出现明显下调，这与细胞周期结果的G_2/M期由12.5%下降到1.4%存在相同的时相性。因此，我们可以看到，辛伐他汀不仅通过P53途径引起K562细胞的G_0/G_1期停滞，同时影响其G_2/M期进程。

参考文献：

[1] Goldberg Z, Levav Y, Krichevsky S, *et al*. Treatment of chronic myeloid leukemia cells with imatinib (STI571) impairs p53 accumulation in response to DNA damage[J]. Cell Cycle, 2004, 3(9): 1188-1195.

[2] Di-Bacco A, Keeshan K, McKenna S L, *et al*. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis [J]. Oncologist, 2000, 5(5): 405-415.

[3] 任汉云，张先念，徐 红，等. 胆固醇合成抑制剂辛伐他汀对K562细胞增殖和凋亡的作用[J]. 中华血液学杂志，2001，22(2)：72-75.

[4] 周定安，黄文芳，张明川，等. 辛伐他汀对K562细胞PI3K-AKT信号通路分子变化影响的体内外比较[J]. 第三军医大学学报，2007，29(21)：2049-2055.

[5] 戴碧涛，蒋纪恺，王付丽，等. 苦参碱联合抗肿瘤药抑制K562细胞增殖的研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(5)：392-394.

[6] Waga S, Hannon G J, Beach D, *et al*. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA [J]. Nature, 1994, 369(6481): 574-578.

[7] Weinert T. A DNA damage checkpoint meets the cell cycle engine[J]. Science, 1997, 277(5331): 1450-1451.

(编辑 龙 亮)

文章编号：1000-5404(2007)22-2163-01

个案与短篇

长期拄拐致右上肢血管闭塞1例

胡 银，姚国恩，蒋晓江，刘 娟，周俊英 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科，重庆 400042)

1 临床资料

患者，男性，41岁，因“右上肢麻木、疼痛半个月余”，于2007年2月10日来我院诊治。患者出生后8个月患脊髓灰质炎，遗留右下肢挛缩、屈曲畸形，长期靠右上肢拄拐行走。患者半个月前出现右食指、中指及无名指麻木，感右上肢远端发冷，热敷无效。入院前4 d并出现右上肢疼痛，持续性存在，尤以活动后明显。查体：体温、呼吸、脉搏正常，左上肢血压130/80 mmHg，右上肢血压不能测出，右侧桡动脉、肱动脉、腋动脉未触及搏动。右上肢皮肤苍白、皮温低，肌肉无萎缩，肌力、肌张力、痛觉均正常，右侧霍夫曼征(-)。右下肢挛缩、短小，肌肉萎缩，膝关节呈屈曲位，不能伸直。双侧股动脉、胭动脉、足背动脉及左侧桡动脉搏动正常。辅助检查：64排CTA示右侧锁骨下动脉及分支走行、形态未见明显异常，右侧肱动脉中段闭塞，远端通过侧支循环显影。入院后给予罂粟碱、贝前列腺素钠、银杏达莫、阿司匹林等治疗，疗效不佳。外周血管DSA示主动脉弓及肾动脉各血管开口正常，右侧肱动脉闭塞，远端血管经侧支循环供血显影，闭塞长度约11 cm。见图1。由于患者血管闭塞段较长，且血管盲端开口不明，导丝疏通易导致动脉夹层或血管破裂，遂转本院血管外科行血管搭桥术，术后患者右上肢麻木、疼痛症状缓解，桡动脉搏动恢复，于2007-03-11出院。

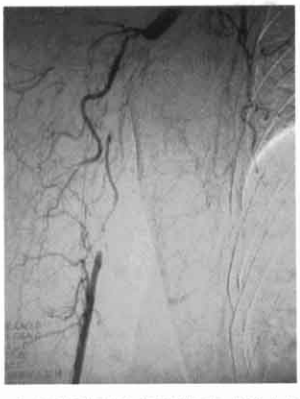


图1 右上肢肱动脉闭塞数字减影血管造影

作者简介：胡 银(1981-)，男，重庆市人，医师，主要从事脑血管病方面的研究。电话：(023)68757863

收稿日期：2007-04-18；修回日期：2007-06-20

(下转2167页)