基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0277-04

辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡过程中细胞内钙离子浓度、Calbindin-D28K 和 calpain 基因的变化

曾娅莉[1],黄文芳[2],刘 华[2],杨永长[2],邓建军[1],刘 俭[1]

(1. 四川绵阳四 0 四医院、川北医学院附属第二医院检验科,绵阳 621000;2. 四川省医学科学院、四川省人民医院检验科,成都 610072)

【摘 要】目的:观察辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡时细胞内 Ca^{2+} 浓度、Ca^{2+} 调节蛋白(Calbindin-D28K,D28K)和 Ca^{2+} 激活蛋白(calpain)基因变化,以探讨 K562 细胞凋亡机制。方法:常规培养细胞 24 h,20 μmol/L 辛伐他汀处理 K562 细胞 48 h;流式细胞技术检测细胞凋亡率和 Ca^{2+} 浓度,PCR 技术检测 D28K 和 calpain 基因。结果:20 μmol/L 辛伐他汀作用 K562 细胞 24、48、72 h 凋亡率改变分别为(6.10 ± 0.35)%、(14.15 ± 0.42)%、(30.70 ± 0.65)%,随药物作用时间延长细胞凋亡率增加;辛伐他汀作用 K562 细胞 12、24、48、72 h,游离钙荧光强度变化为 52.93 ± 2.85、19.63 ± 1.56、13.81 ± 1.05、7.84 ± 0.98,各处理组荧光强度与对照组相比升高($P<0.05$);与相同时间对照组比较,calpain 和 D28K 基因分别在辛伐他汀作用 K562 细胞 24 h 和 48 h 后上调($P<0.05$)。结论:辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡时细胞内 Ca^{2+} 浓度显著升高,细胞内 Ca^{2+} 浓度调节蛋白 D28K 和 calpain 基因上调,这些改变可能是辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡的机制之一。

【关键词】辛伐他汀;D28K;细胞内钙离子;钙离子激活蛋白;细胞凋亡

【中国图书分类法分类号】R965.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-07-27

Changes of expression levels of Ca^{2+}, D28K(Calbindin-D28K) and calpain in K562 cell in the process of apoptosis induced by simvastatin

ZENG Ya-li, et al

(*Department of Laboratory, the Mianyang 404 Hospital, the Second Affiliated Hospital, North Sichuan Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To observe the changes of Ca^{2+} level and calbindin-D28K and calpain gene, and investigate the mechanism in the process of simvastatin-induced apoptosis of K562 cells. *Methods*: K562 cells cultivated 24h were exposed in different concentrations of 20 μmol/L simvastatin. Flow cytometry was performed to confirm cell apoptotic ratio and analyze Ca^{2+} level. The gene expression of D28K and calpain were analyzed by RT-PCR (reverse transcription-PCR). *Results*: K562 cells could be induced to apoptosis after 20 μmol/L simvastatin treatment for 24 h, 48 h and 72 h, and the apoptotic ratios were 6.1% ± 0.35%, 14.15% ± 0.42%, and 30.70% ± 0.65% respectively by flow cytometric assay (Annexin V/PI double staining). There was a significant increase in the drug-treated groups compared with the control groups after 24 h. The Ca^{2+} level was detected by Fluo-3AM and was markedly increased in treated groups compared with the control groups at different time points ($P<0.05$). The mRNA of D28K and calpain expression levels in drug-treated group were up-regulated. *Conclusion*: K562 cells could be induced to apoptosis by simvastatin. The free of Ca^{2+} may take part in the apoptosis in early period. The potential mechanism of the K562 cell apoptosis might be related tothe up-regulated calbindin-D28k and calpain gene.

【Key words】simvastatin; calbindin-D28K; calcium; calpain; apoptosis

随着诱导细胞凋亡药物研究逐渐深入,新的药物不断被发现。近年研究资料表明,他汀类药物能诱导多种肿瘤细胞凋亡,且对正常细胞无明显毒副作用,是抗肿瘤另一新药[1-3]。慢性粒细胞白血病(Chronic myelocytic leukemia, CML)是一类起源于造血干细胞的恶性疾病,其发病机制十分复杂,至今尚不完全清楚。前期研究显示辛伐他汀能诱导 K562 细胞凋亡,并且在凋亡过程中经过了线粒体途径和内质网途径[4,5],但其诱导凋亡的机制目前尚不完全明确。细胞内 Ca^{2+} 稳态失衡是凋亡过程中普遍存在的一个生化事件,升高的 Ca^{2+} 参与了凋亡早期信号传导和执行阶段。D28K 是细胞内 Ca^{2+} 缓冲剂,

作者介绍:曾娅莉(1972-),女,副主任技师,硕士,研究方向:肿瘤药物研究。

通信作者:黄文芳,男,教授,Email:Huangwf2002@21cn.com。

基金项目:四川省卫生厅科研基金资助项目(编号:060119)。

在维持细胞内 Ca^{2+} 稳态起到重要作用[6],关于 D28K 和细胞凋亡的关系仅有少量报道[7]。钙依赖性蛋白激酶(Calpain)是 Ca^{2+} 依赖性蛋白,升高的细胞内 Ca^{2+} 浓度直接激活 Calpain,激活后的 Calpain 促进细胞凋亡发生[8]。目前关于辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡过程中 Ca^{2+} 稳态与 Ca^{2+} 调节蛋白 D28K 及钙激活蛋白 calpain 的基因表达关系还不清楚,本研究采用流式细胞技术和 RT-PCR 技术,在不同时间检测辛伐他汀诱导K562 细胞凋亡时细胞内 Ca^{2+} 浓度变化、D28K 和 calpain 基因表达,从而有助于揭示辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人红白血病 K562 细胞株购自四川大学华西校区基础与法医学院免疫室。

1.2 试剂和仪器

辛伐他汀由中国药品生物制品检定所提供,无水乙醇溶解后加入与辛伐他汀相同摩尔浓度的 NaOH,50℃水浴 2 h,调 pH 至 7.20,浓度为 10 mmol/L,过滤除菌,分装后保存于-20℃。RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司,小牛血清购自美国GM 公司,Annexin V-FITC 试剂盒购自深圳晶美,逆转录反应体系购自成都博瑞克公司,PCR 扩增体系 2XPCR PLUS PCR Master Mix 购自北京天为时代公司。Fluo-3AM(Biotium 美国)、CO_2 培养箱(Heraeus 法国)、流式细胞仪(BEACKMAN 美国)、酶标仪(Bio-Rad 美国)。

1.3 细胞培养

K562 细胞用含 10%小牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml 的 RPMI1640 培养基,37℃饱和湿度 5%CO_2 培养箱中培养,2 ~ 3 d 换液传代。

1.4 Annexin V-FITC 检测细胞凋亡

收集细胞,4℃预冷 PBS 洗细胞 2 次,悬浮细胞并调节细胞浓度为 1×10^6 个/ml;加入 Annexin V-FITC 和碘化丙锭溶液;混匀室温避光孵育 30 min,流式细胞仪检测。辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡率 = 处理组细胞凋亡率 - 对照组细胞凋亡率

1.5 细胞内 Ca^{2+} 测定

收集细胞,D-Hank's 洗涤 3 次,离心去上清,收集细胞 $(1 \sim 2) \times 10^6$ 个;加入 1 ml 10 μmol/L 荧光染料 Fluo-3AM,孵育缓冲液悬浮细胞。37℃、5% CO_2 的培养箱避光孵 1 h;离心除上清,D-hank's 洗涤 3 次,再加 1ml D-Hank's 平衡 10 min,流式细胞仪检测(激发波长 506 nm,吸收波长 526 nm)1 万个细胞平均荧光强度。游离 Ca^{2+} 变化:$\triangle F = F526_{处理组} - F526_{对照组}$。

1.6 RT-PCR 检测 D28K 和 calpain mRNA

1.6.1 总 RNA 提取 收集各组细胞 5×10^6 个于离心管中,离心去上清;加入 TRIzol 试剂,按照说明书操作步骤提取 RNA,使用分光光度仪器检测 RNA 质量和浓度,要求 D_{260}/D_{280} 比值在 2.0 左右,进行纯化和鉴定。

1.6.2 逆转录合成 cDNA 逆转录聚合酶链反应:博瑞克公司一步法 RT-PCR 反应体系,逆转录反应严格按说明进行,总体系体积为 25 μl,42℃ 30 ~ 50 min,-20℃保存。

1.6.3 PCR 扩增目的基因 各基因特异的上、下游引物设计用 primer 5.0 软件,D28K 和 calpain 引物序列相关信息见表 1。以逆转录产物 cDNA 为模板,GAPDH (450 bp)为内参进行 PCR 扩增,1.5%琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物,BIO-RAD 凝胶成像分析仪上观察结果并照相。Quantity one 软件分析结果,以目的基因与 GAPDH 条带的相对含量表示。PCR 反应体系组成:cDNA 模板 2 μl,上、下游引物各 1 μl,2 × Master Mix 12.5 μl,DH_2O 8.5 μl,总体积 25 μl,混匀,2.0×10^4 g 瞬时离心,PCR 仪上扩增。扩增条件 94℃5 min;94℃ 30 s,56℃ 45 s,72℃ 90 s,30 循环;最后 72℃延伸 5 min。D28K 退火温度为 59℃ 45 s,calpain 退火温度为 55℃ 45 s。

1.7 统计学分析

以上实验均重复 3 次,计量资料实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用单因素方差分析,多组比较采用方差分析,组间比较采用 SNK 法,计数资料用 χ^2 检验。所有实验数据采用 SPSS 10.0 统计学软件分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡率

AnnexinV/PI 双染法是敏感的凋亡检测方法,早期凋亡细胞以 AnnexinV-FITC 染色为主,晚期凋亡细胞则 Annexin V-FITC/PI 双染色。结果显示,20 μmol/L 辛伐他汀作用 24、48、72 h 细胞凋亡率改变分别为(6.10 ± 0.35)%、(14.15 ± 0.42)%、(30.70 ± 0.65)%,随着辛伐他汀作用时间延长细胞凋亡率逐

表 1 基因信息及引物序列

基因	基因库位置和起始点	上、下游引物序列	扩增长度/bp
D28K	NM004929,414~797	F5'-TGGCTCACGTATTACCCACA-3' R5'-GTATCCATTGCCGTCCTGAT-3'	383
calpain	NM001146068,1595~1291	F5'-AGGATGAGACGAGGAGGAT-3' R5'-TTTCAGAAAAGACCCGGATG-3'	326
GAPDH	LOC376706,534~983	F5'-GTGGACATCCGCAAAGAC-3' R5'-AAAGGGTGTAACGCAATCAA-3'	450

渐增高，与对照组之间差异具有统计意义（$P<0.05$），见图 1。

2.2 细胞内游离 Ca^{2+}浓度测定

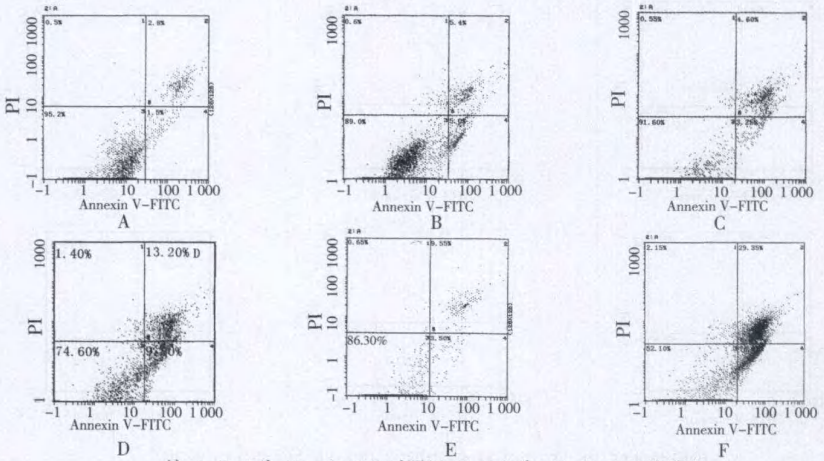
荧光染料 Fluo-3AM 不能与游离 Ca^{2+} 结合，但能穿过细胞膜进入细胞内，进入细胞的 Fluo-3AM 被细胞内非特异性酯酶水解成 Fluo-3，Fluo-3 与细胞内游离 Ca^{2+} 结合发出荧光，荧光强度和细胞内游离 Ca^{2+} 的含量成正比。检测结果显示 12、24、48 h 和 72 h 细胞内游离钙荧光强度变化为52.93 ± 2.85、19.63 ± 1.56、13.81 ± 1.05、7.84 ± 0.98，各处理组荧光强度与相应时间对照组相比显著升高，处理组与相应时间对照组之间差异具有统计意义（$P<0.05$），见图 2。

2.3 细胞内 Ca^{2+}结合蛋白 D28K mRNA 测定

D28K 是一种重要的 Ca^{2+} 结合蛋白，它可以和细胞内升高的游离 Ca^{2+} 结合，以降低升高的 Ca^{2+} 浓度。检测结果显示 D28K 的基因在 48 ~ 72 h 显著升高，处理组与相应时间对照组之间差异具有统计意义（$P<0.05$），见图 3。

2.4 细胞内 Ca^{2+}调节蛋白 calpain mRNA 测定

calpain 是一种重要的 Ca^{2+} 激活蛋白，它和细胞内升高的游离 Ca^{2+} 结合，以降低升高的 Ca^{2+} 浓度。检测结果显示 calpain 基因在 24 h 显著升高，处理组与相应时间对照组之间差异具有统计意义（$P<0.05$），见图 4。



注：A、C、E 为：24、48、72 h 对照组；B、D、F 为：24、48、72 h 处理组

图 1 不同时间 20 μmol/L 辛伐他汀诱导 K562 细胞的凋亡率

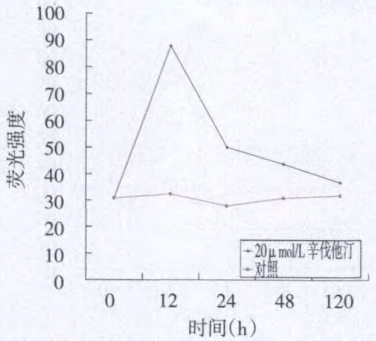
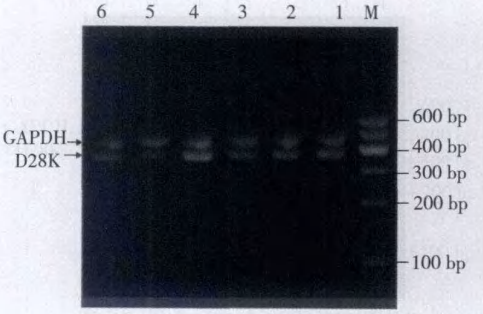
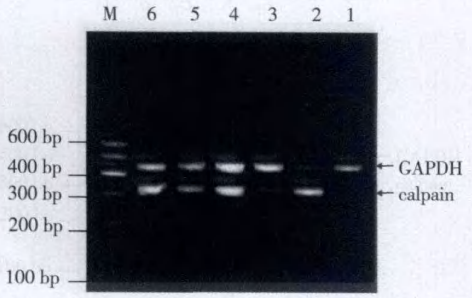


图 2 20 μ mol/L 辛伐他汀作用 K562 细胞不同时间细胞内 Ca^{2+} 浓度变化



注：M. marker；1、3、5. 24、48、72 h 阴性组；2、4、6. 24、48、72 h 药物处理组

图 3 20 μ mol/L 辛伐他汀作用 K562 细胞不同时间 D28K mRNA 表达



注：M. marker；1、3、5. 24、48、72 h 阴性组；2、4、6.24、48、72 h 药物处理组

图 4 20 μ mol/L 辛伐他汀作用 K562 细胞不同时间 calpain mRNA 表达

3 讨 论

辛伐他汀是 80 年代后期开发的一类胆固醇合成抑制剂，作为治疗动脉粥样硬化症长期运用于临床。近年来发现他汀类药物对不同肿瘤细胞具有增殖抑制和诱导凋亡作用[1-3]。本实验用辛伐他汀处理人红白血病细胞株 K562 细胞，通过流式细胞术检测细胞凋亡情况，证实了辛伐他汀能抑制 K562 细胞增殖和诱导凋亡作用，随着时间延长其作用增加，具有时间依赖性。细胞内 Ca^{2+} 浓度在 K562 细胞凋亡过程中明显升高，D28K 和 calpain 的基因表达也随之上调。

细胞内 Ca^{2+} 的升高参与了凋亡的早期信号传导和凋亡的执行阶段，Ca^{2+} 失衡以及 Ca^{2+} 稳态的调节因子在诱导细胞凋亡过程中扮演着重要角色[9]。细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高受很多因素的调节如 D28K、calpain、ROS、Bcl-2 家族、内质网、三磷酸肌醇信号系统等。D28K和 calpain 分别是钙离子浓度重要的调节蛋白和钙离子激活蛋白酶，关于 D28K和 calpain 基因表达在细胞内钙离子浓度的调节及细胞凋亡时的作用研究不多，机制不清楚。本实验结果显示 20 mol/L 辛伐他汀作用 K562 细胞 12 h 时，细胞内游离 Ca^{2+} 浓度迅速升高，然后缓慢降低；辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡时细胞的 Ca^{2+} 浓度处于失衡状态，失衡的高峰时间为加入辛伐他汀 12 h，比D28K 基因上调表达的时间早（D28K 基因在 24 h 变化不大，48 h时开始升高），推测这可能是由于细胞内游离 Ca^{2+} 浓度迅速升高导致 D28K 基因和蛋白应急性上调，上调的 D28K 蛋白和细胞内游离 Ca^{2+} 结合以降低 Ca^{2+} 浓度，D28K 的升高可以对抗细胞内 Ca^{2+} 浓度失衡导致的细胞凋亡，推测 D28K 基因升高可能与细胞的一种保护机制有关。也有资料认为 D28K 能直接抑制凋亡的执行者 caspase-3 的蛋白活性[10] 而避免细胞凋亡。另外辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡时 D28K 基因表达上调，与 K562 细胞凋亡指数成正相关，推测 D28K 基因属于促凋亡基因，这和 Liu Y 报道结果一致[11]。

辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡时 calpain 基因在 24 h 即显著性升高，按照发生的时间顺序，calpain 基因上调的时间比 D28K 基因上调时间早（D28K mRNA 显著上调时间为48～72 h，calpain 显著上调时间为 24 h），推测细胞内游离 Ca^{2+} 的升高是否是导致 Ca^{2+} 依赖性激活 calpain 蛋白酶表达增加的原因之一呢？还没有得到证实，而 calpain 在凋亡的具体作用还不清楚，但 calpain 酶激活后参与细胞凋亡的作用已被证实[7]。本实验的结果显示辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡时calpain基因表达上调，也证实了 calpain 表达上调和细胞凋亡正相关，上调的 calpain 可能参与了辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡的机制。已有研究资料[12]显示 calpain 是钙依赖性蛋白，升高的钙离子浓度激活 calpain 蛋白酶，分解底物，导致细胞凋亡。已有研究显示 calpain 参与凋亡的机制可能有如下几个方面：①calpain 裂解 caspase-3、6、7、12 产生活性片段，介导凋亡；②calpain 裂解 Bax 等凋亡相关蛋白，介导凋亡；③calpain 激活 caspase-3 后，活性 caspase-3 水解 calpastatin，增加 calpain 活性，促进凋亡。

关于细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高受多因数因素的调节，D28K 和 calpain 是细胞内钙离子失衡重要的调节因子，但是关于辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡时 D28K 和 calpain 在钙离子浓度调节的具体作用不清楚，围绕线粒体 Ca^{2+} 稳态失调和 D28K、calpain 调节蛋白的功能和机制的深入研究，将有助于解释凋亡的启动及信号传导机制，并为各种凋亡相关疾病的诊治及药物开发提供新的思路。

参 考 文 献

[1] Koyuturk M, Ersoz M, Altiok N. Simvastatin induces proliferation inhibition and apoptosis in C6 glioma cells via c-jun N-terminal kinase[J]. Neurosci Lett, 2004, 370(2-3): 212-217.

[2] Wong W W, Tan M M, Xia Z, et al. Cerivastatin triggers tumor-specific apoptosis with higher efficacy than lovastatin[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(7): 2067-2075.

[3] Werner M, Sacher J, Hohenegger M. Mutual amplification of apoptosis by statin-induced mitochondrial stress and doxorubicin toxicity in human rhabdomyosarcoma cells[J]. Pharmacol, 2004, 143(6): 715-724.

[4] 黄文芳，曾娅莉，刘 华，等. 辛伐他汀通过线粒体途径诱导 K562 细胞凋亡[J]. 沈阳药科大学学报，2007，24(17)：776-779.

[5] 胥国强，黄文芳，刘 华，等. 辛伐他汀通过内质网应激途径诱导 K562 细胞凋亡[J]. 药学学报，2008，43(4)：371-377.

[6] Laure-Kamionowska M, Maślińska D. Calbindin positive Purkinje cells in the pathology of human cerebellum occurring at the time of its development[J]. Folia Neuropathol, 2009, 47(4): 300-305.

[7] Verdes J M, Moraña J A, Battes D, et al. D28k expression and the absence of apoptosis in the cerebellum of Solanum bonariense L-intoxicated bovines [J]. Vet Pathol, 2010, 47(3): 569-572.

[8] Nimmrich V, Reymann K G, Strassburger M, et al. Inhibition of calpain prevents NMDA-induced cell death and beta-amyloid-induced synaptic dysfunction in hippocampal slice cultures[J]. Br J Pharmacol, 2010, 159(7): 1523-1531.

[9] Quintanar-Escorza M A, González-Martínez M T, del Pilar I O, et al. Oxidative damage increases intracellular free calcium $[Ca^{2+}]i$ concentration in human erythrocytes incubated with lead[J]. Toxicol In Vitro, 2010, 24(5): 1338-1346.

[10] Teresita B, Michael H, Mihali R P, et al. Calbindin-D28K is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity[J]. J Biol Chem, 2002, 275(34): 26328-26332.

[11] Liu Y, Porta A, Peng X, et al. Prevention of glucocorticoid-induced apoptosis in osteocytes and osteoblasts by calbindin-D28K[J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(3): 479-490.

[12] Vosler P S, Sun D, Wang S, et al. Calcium dysregulation induces apoptosis-inducing factor release: cross-talk between PARP-1 and calpain-signaling pathways[J]. Exp Neurol, 2009, 218(2): 213-220.

（责任编辑：冉明会）