基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-0992-04

活性氧与谷胱甘肽在辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡时的变化及机制探讨

曾娅莉[1],黄文芳[2],杨永长[2],邓建军[1],何 静[1],昔国强[3],刘 文[3]

(1. 四川绵阳四〇四医院检验科,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;3. 重庆医科大学医学检验系,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究辛伐他汀(simvastatin)诱导 K562 细胞凋亡过程中细胞内活性氧与谷胱甘肽的变化及凋亡中发生的时间顺序,以探讨辛伐他汀诱导 K562 凋亡的机制。方法:20 μmol/L 浓度辛伐他汀处理 K562 细胞,48 h 光学显微镜观察细胞形态学。12、24、48、72 h MTT 法检测细胞活力,荧光染料流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞内活性氧,化学比色法检测细胞内谷胱甘肽。结果:辛伐他汀作用 K562 细胞 48 h 后出现典型的凋亡形态学改变;12、24、48、72 h 细胞抑制率为 0、(19.02 ± 0.92)%、(56.4 ± 3.20)%、(74.4 ± 5.54)%,K562 细胞生长被抑制;细胞凋亡率升高为:(2.55 ± 0.25)%、(6.1 ± 0.35)%、(14.15 ± 0.42)%、(30.70 ± 0.65)%;活性氧的荧光强度升高为:1.61 ± 0.15、13.1 ± 1.54、10.0 ± 1.05、8.10 ± 0.87,与不同时间的对照组相比较均显著升高($P<0.05$)。细胞内谷胱甘肽含量为:274.7 ± 11.5、262.5 ± 9.8、272.4 ± 10.5、(357.2 ± 16.8) mg/gprot,与不同时间的对照组相比较均显著降低($P<0.05$)。结论:辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡时细胞内发生了氧化还原体系失衡,它可能是细胞凋亡的早期上游事件。

【关键词】辛伐他汀;细胞凋亡;活性氧;谷胱甘肽;

【中国图书分类法分类号】R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-12

The mechanism investigation of the reactive oxygen species and glutathione changes in the process of K562 cells induced by simvastatin

ZENG Ya-li, et al

(*Department of Laboratory Medicine, 404 Hospital of Mianyang*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the changes of reactive oxygen species (ROS)and Glutathione (GSH) and their chronological order in the apoptosis of K562 cells induced by simvastatin to explore the apoptosis mechanism . *Methods*: K562 cells cultivated in routine method for 24h were exposed in the simvastatin 20 μmol/L. Cell morphological analysis were conducted at 48h and the vitalities of K562 cells were cultivated detected with MTT at different times (12,24,48,72 h) respectively. Fluorochrome flow cytometry was performed to detect cell apoptotic ratio and changes of intracellular ROS. The content of intracellular GSH in K562 cells was measured by colorimetric method. *Results*: K562 cells presented typical apoptosis morphological changes the treatment of simvastatin for 48h.cell inhibition ratio at different times (12,24,48, and 72 h) were 0,(19.02 ± 0.92)%,(56.4 ± 3.20)%,(74.4 ± 5.54)% respectively and cell growth of K562 was inhibited. The apoptotic ratio were(2.55 ± 0.25)%,(6.1 ± 0.35)%,(14.15 ± 0.42)%,and(30.70 ± 0.65)% respectively. Furthermore, the changes of fluorescence intensity of ROS were also significantly increased ($P<0.05$) in K562 cells compared with the control groups, the changes of fluorescence intensity were 1.61 ± 0.15,13.1 ± 1.59,10.0 ± 1.05,and 8.10 ± 0.87mg/gprot respectively groups at different times (12,24,48 and 72h). The content of intracellular GSH in K562 cells GSH were 274.7 ± 11.5,262.5 ± 9.8,272.4 ± 10.5,and 357.2 ± 16.8 mg/gprot at different times (12,24,48 and 72 h) respectively. And there was a markedly decrease of the intracellular GSH in K562 cells compared with the control groups($P<0.05$). *Conclusion*: K562 cells could be induced apoptosis by simvastatin. The increase of the GSH and decrease of the ROS are the early events of the K562 cells apoptosis induced by simvastatin. The potential mechanism of the K562 cells apoptosis may be related to the disequilibrium of oxidation-reduction system.

【Key words】Simvastatin; Apoptosis; Reactive oxygen species; Glutathione

随着诱导细胞凋亡药物的深入研究,新的药物不断被发现。辛伐他汀作为治疗高脂血症有效药物长期应用于临床,近年来研究表明它具有抑制多种

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

通讯作者:黄文芳,男,主任技师,E-mail:Huangwf 2002@21cn.com。

基金项目:四川省卫生厅科研基金资助(课题编号 060119)。

肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡的新用途,且它对正常细胞无明显毒副作用,具有研究和开发的潜力[1,2]。目前关于辛伐他汀诱导人红白血病细胞株K562细胞凋亡的研究不多,凋亡机制尚不完全明确。研究资料显示作为细胞内重要的氧化物质-活性氧(Reactive oxygen species,ROS)的过剩和抗氧化代谢物质-谷胱甘肽(Glutathione,GSH)的耗竭都可以启动细胞凋亡[3,4]。但是关于辛伐他汀诱导K562细胞凋亡时是否有ROS和GSH的失衡及其凋亡发生时间顺序尚不清楚,本研究采用荧光染料流式细胞术与化学比色法,在K562细胞凋亡的不同时间分别检测ROS和GSH的变化水平,以探讨辛伐他汀诱导K562细胞凋亡的机制。

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 主要试剂与仪器

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等摩尔的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,活性氧检测试剂盒购自碧云天(江苏海门),谷胱甘肽与细胞裂解液试剂盒购自南京建成,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RPMI 1640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 细胞形态观察

取对数生长期细胞,调整浓度1×10^5个/ml,培养24 h后加入辛伐他汀使终浓度20 μmol/L,对照组加入等浓度溶剂(乙醇),培养48 h后收集细胞涂片,瑞姬氏染色,光镜下观察细胞形态。

1.5 MTT噻唑蓝法检测细胞增殖抑制率

取对数生长期细胞以1×10^5个/ml浓度接种于96孔培养板,培养24 h后加入辛伐他汀至20 μmol/L,对照组加入等浓度溶剂(乙醇);每个时间点设5个平行复孔,同时设空白对照调零。37℃、5%CO_2培养箱内分别孵育12、24、48、72 h;每孔加入5 mg/ml的MTT 10 μl,继续培养4 h;离心去上清;加入100 μl DMSO终止反应;完全溶解紫黑色结晶,492 nm波长测定吸光度(A),以A值间接反映存活细胞数量,计算不同时间辛伐他汀对K562增殖抑制率,细胞增殖抑制率=$(A_{对照组}-A_{实验组})/A_{对照组}\times100\%$。

1.6 Annexin V-FITC检测细胞凋亡

收集各组细胞,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。

1.7 细胞内ROS的测定

收集各组细胞1×10^6个,1 ml无血清培养液悬浮细胞,加入2',7'-二氯荧光乙酰乙酸(2',7'-Dichloro fluorescein diacetate,DCFH-DA)使其终浓度为10 μmol/L,37℃避光孵育20min,PBS洗涤3次,流式细胞仪检测荧光强度。辛伐他汀诱导K562细胞ROS变化的荧光强度变化为$\triangle F=F_{530\ 处理组}-F_{530\ 对照组}$(激发波长485 nm,发射波长为530 nm)。

1.8 细胞内GSH的测定

收集各组细胞1×10^6个,PBS洗涤3次,每组细胞加100 μl细胞裂解液充分裂解细胞,高速离心去掉细胞碎片,留上清液测定蛋白含量。按照试剂盒说明溶解标准和试剂1、2、3,同时设定空白管、标准管、测定管、测定空白管;按照操作说明步骤加入样本和试剂1、2、3后混匀,室温静置5 min,412 nm处波长测A值。计算公式为细胞GSH(mg/gprot)=$(A_{测定}-A_{空白})\times$标准管浓度$\times30^7$(GSH分子量)/裂解细胞上清液的蛋白(gprot/L)。

1.9 统计学处理

所有数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,$n=3$,采用SPSS11.0统计学软件分析,组间均数比较采用单因素方差分析,$P\leq0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞形态学变化

20 μmol/L辛伐他汀作用K562细胞48 h后,经瑞士姬母沙染色,光镜下可见典型的凋亡形态学改变,表现为细胞体积缩小、胞膜不完整、胞浆中出现空泡、核染色质浓缩、碎裂成块状,并可见凋亡小体,箭头标识,见图1。

2.2 细胞增殖抑制率

不同时间(12、24、48、72 h)辛伐他汀对K562细胞的细胞增殖抑制率随着药物作用时间延长细胞增殖抑制率增大,具有时间依赖效应,12 h的$P>0.05$无统计学意义,24、48、72 h相应P值为(0.003、0.001、0.000 1),见表1。

2.3 辛伐他汀诱导K562细胞凋亡率

流式细胞仪AnnexinV/PI双染色法是敏感的凋亡检测方法,利用荧光染AnnexinV标记探针,AnnexinV能特异的与凋亡细胞表面外翻的磷脂酰丝氨酸结合,早期凋亡细胞以AnnexinV-FITC染色为主,晚期凋亡细胞为AnnexinV-FITC/PI双染色。结果显示辛伐他汀作用K562细胞24 h后细胞凋亡率变化明显,随时间延长细胞凋亡率逐渐增高,与对照组之

间差异具有统计意义，相应 P 值为(0.025、0.016、0.006、0.000 1)，见图 2。

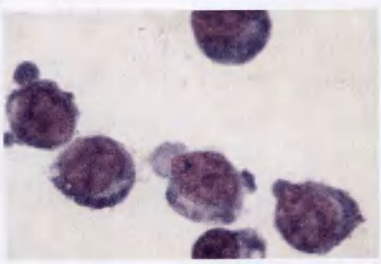
荧光染料 DCFH-DA 能自由扩散进入细胞，被酯酶水解成 DCFH，在 ROS 存在时氧化成 DCF，其荧光强度与细胞内 ROS 的含量呈正相关。结果显示辛伐他汀作用 K562 细胞 12 h 后处理组的 ROS 开始升高，24 h 达峰值，然后维持在相对较高水平，与对照组之间差异具有统计意义，相应 P 值为(0.016、0.000 1、0.002、0.001)，见图 3。

2.5　细胞内 GSH 的测定

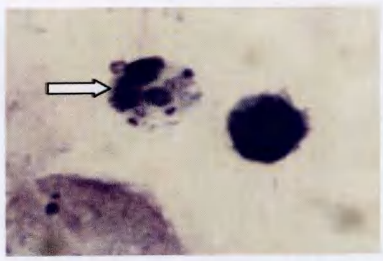
GSH 的测定原理为三硫代二硝基苯甲酸与 GSH 的巯基反应能产生一种黄色化合物，此化合物可在 412 nm 处比色定量。检测结果显示药物作用 K562 细胞 12 h 后 GSH 含量迅速降低，12～48 h 维持在较低水平，48～72 h 期间逐渐恢复正常。12、24、48 h 的处理组与相应对照组之间 GSH 的含量相比较具有统计学意义，P 值分别为0.000 1、0.000 1、0.000 1，72 h 处理组与对照组相比差异无统计学意义，P>0.05。见图 4。

3　讨　论

辛伐他汀是 20 世纪 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有效药物长期运用于临床[5]，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[1,2,6]，但是目前对这种几乎无毒药物的诱导凋亡机制不清。国内

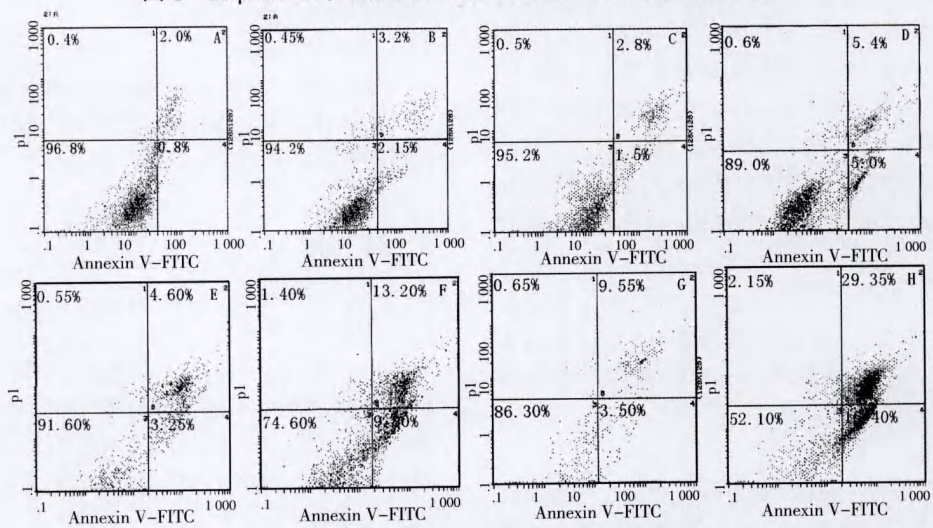


48 h 阴性组细胞（×1 000）



48 h 处理组细胞（×1 000）

图 1　20 μ mol/L 辛伐他汀处理 K562 细胞 48 h 的形态学改变



注. A、C、E、G 分别表示 12、24、48、72 h 对照组；B、D、F、H 表示 12、24、48、72 h 处理组

图 2　不同时间 20 μmol/L 辛伐他汀诱导 K562 细胞的凋亡率

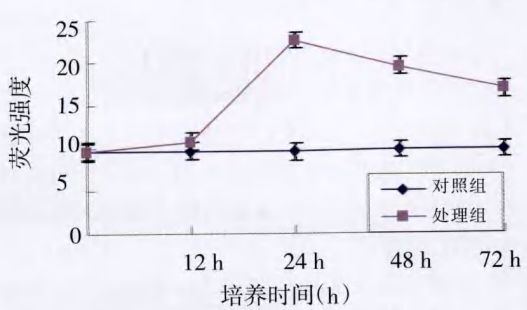


图 3　不同时间 20 μmol/L 辛伐他汀诱导 K562 细胞内 ROS 的影响

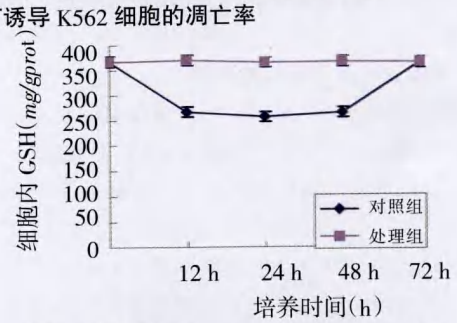


图 4　不同时间 20 μmol/L 辛伐他汀诱导 K562 细胞内 GSH 的影响

表 1 辛伐他汀作用 K562 细胞的增殖抑制率

组别	培养时间(h)			
	12	24	48	72
对照组(A)	0.13 ± 0.02	0.20 ± 0.05	0.60 ± 0.08	1.04 ± 0.14
处理组(A)	0.13 ± 0.02	0.16 ± 0.04	0.27 ± 0.05	0.26 ± 0.04
抑制率(%)	0.00 ± 0.00	19.02 ± 0.92	56.4 ± 3.20	74.8 ± 5.54

2001 年任汉云[7]首次报道了用同位素渗入法和DNA末端标记法检测不同浓度辛伐他汀对 K562 细胞的增殖抑制和凋亡。周定安等[8]认为 P53 信号途径参与了辛伐他汀诱导 K562 细胞的凋亡。本实验用辛伐他汀处理 K562 细胞,通过细胞形态学,MTT 流式细胞术等检测细胞增殖与凋亡情况,证实了辛伐他汀能抑制 K562 细胞增殖和诱导凋亡,随着药物作用时间延长其增殖率被抑制,凋亡率逐渐增加,具有时间依赖性。

细胞凋亡是一个程序性的动态可调节过程,受一系列细胞内信号及凋亡相关基因调控,因此凋亡事件的发生具有时间顺序。辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡过程中,Annexin Ⅴ、ROS、GSH 都能检测到变化。从出现峰值的时间显示:GSH 显著降低的时间为辛伐他汀作用 K562 细胞 12 h,ROS 升高的峰值时间为 24 h,Annexin Ⅴ在药物作用 72 h 后还持续升高。因此推测 ROS、GSH 的失衡是辛伐他汀诱导 K562 凋亡的早期事件。

随着对凋亡的分子生物学机制的深入研究,许多凋亡诱导剂诱导细胞凋亡的分子机制和 ROS 的升高与 GSH 耗竭有关。当细胞内产生过多 ROS 时,一方面这些 ROS 可以作为第二信使促进线粒体膜通透孔开放,上调促凋亡蛋白 bax 表达,激活 Caspase,诱导细胞凋亡[9];另一方面 ROS 通过氧化应激,攻击细胞膜,损伤 DNA,影响线粒体膜完整性和能量代谢等途径,因此 ROS 在诱导细胞凋亡过程中扮演着重要角色。但是当 ROS 大量产生的同时,细胞内也存在着一套抵抗和分解 ROS 的分子机制,GSH 是诸多 ROS 清除酶的重要还原底物之一,它能被氧化生成氧化态 GSH,从而有效清除过量生成的 ROS,保护细胞正常功能,通常细胞内氧化还原物质处于平衡之中,这种平衡决定细胞生存状态。本研究也证实:辛伐他汀作用 K562 细胞 12 h 后氧化物质 ROS 开始升高,24 h 达峰值,48~72 h 处于较高水平,而抗氧化物质—GSH 在加入辛伐他汀后显著降低,12~48 h GSH 处于较低水平。本实验也证实了辛伐他汀作用 K562 细胞后,细胞一边在发生凋亡,另一方面细胞内氧化还原系统处于失衡中,这种失衡的结果可能是导致 K562 细胞凋亡的早期原因,这一现象与三氧化砷诱导血液肿瘤细胞凋亡过程中细胞内抗氧化能力的变化相类似[10]。

综上所述,细胞内氧化还原体系的失衡可能是辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡的发生早期机制之一,这种失衡的结果与辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡所引起哪些基因、蛋白质的表达以及信号传导等关系还不清楚,有待进一步研究,以揭示辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡的机制。

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 higherefficacy than lovastatin [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(7): 2067-2075.

[3] Coffey R N, Watson R W, Hegarty P K, et al. Priming prostate carcinoma cells for increased apoptosis is associated with up-regulation of the caspases [J]. Cancer, 2001, 92(9): 2297-2308.

[4] Davis W, Ronai Z, Tew K D. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug2induced apoptosis[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 296(1): 1-6.

[5] 袁侨英, 覃 数. 辛伐他汀抑制急性心肌梗死后心肌氧化损伤的实验研究[J]. 重庆医学, 2004, 33(11): 1664-1665.

[6] Shellman Y G, Ribble D, Miller L, et al. Lovastatin-induced apoptosis in human melanoma cell lines [J]. Melanoma Res, 2005, 15(2): 83-89.

[7] 任汉云, 张念先, 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.

[8] 周定安, 黄文芳, 刘 文, 等. P53 途径在辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(22): 2160-2163.

[9] Zhou L J, Zhu X Z. Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 293(3): 982-988.

[10] Dai J, Weinberg R S, Waxman S, et al. Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system [J]. Blood, 1999, 93(1): 268-277.

(责任编辑:冉明会)