基础研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0892-03

辛伐他汀通过氧化应激诱导 K562 细胞凋亡

黄文芳[1],杨永长[1],曾娅莉[2],刘 华[1],肖代雯[1],胥国强[3],刘 文[3]

(1. 四川省医学科学院·四川省人民医院检验科,成都 610072;2. 绵阳市第四人民医院检验科,绵阳 621000;3. 重庆医科大学医学检验系,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察辛伐他汀对 K562 细胞凋亡的影响,探讨辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡的分子机制。方法:不同浓度辛伐他汀处理 K562 细胞,Annexin V-FITC/PI 双染法检测辛伐他汀对 K562 细胞凋亡的影响。辛伐他汀处理 K562 细胞 48 h,流式细胞仪检测活性氧(Reactive oxygen species,ROS)浓度,免疫组织化学法测定突变 P53 蛋白表达。RT-PCR 测定 c-jun mRNA 表达。结果:Annexin V-FITC/PI 双染法检测结果显示,5、10、20 μmol/L 辛伐他汀作用 K562 细胞 48~72 h 能诱导其凋亡。辛伐他汀作用 K562 细胞后,与对照组比较,处理组细胞内 ROS 明显升高。辛伐他汀处理 K562 细胞后突变 P53 蛋白表达明显下调,c-jun mRNA 表达上调。结论:辛伐他汀改变 K562 细胞内氧化还原状态,细胞氧化应激,下调突变 P53 蛋白表达,上调 c-jun 表达诱导 K562 细胞凋亡。

【关键词】辛伐他汀;氧化应激;细胞凋亡

【中国图书分类法分类号】R733.72 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-18

Simvastatin induces K562 cell apoptosis by oxidative stress

HUANG Wen-fang, et al

(*Department of Clinical Laboratory, Sichuan Medical Science Academy, Sichuan Provincial People's Hospital*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of simvastatin on K562 cells apoptosis and elucidate its molecular mechanisms. *Methods*: K562 cells were treated with various concentrations of simvastatin for different time, and then Annexin V-FITC/PI staining was performed to confirm the apoptosis of K562 cells. Flow cytometry was employed to measure ROS level; mutant P53 protein expression level in K562 cells was measured by immunohistochemistry method. RT-PCR was employed to analyze the mRNA expression levels of c-jun. *Results*: K562 cells were induced to undergo apoptosis after 5, 10 μmol/L and 20 μmol/L simvastatin treatment for 48 h and 72 h. After the treatment of 10 μmol/L and 20 μmol/L simvastatin for 48 h, compared with the control group, ROS level in K562 cells increased obviously. Immunohistochemistry results indicated that simvastatin could inhibit protein expression levels of mutant-type P53. RT-PCR results showed that simvastatin could increase the mRNA expression levels of c-jun significantly. *Conclusion*: Simvastatin induces K562 cells apoptosis by down-regulating mutant P53 protein and up-regulating c-jun mRNA expression which might be caused by changes of intracellular redox state.

【Key words】Simvastatin; Oxidative stress; Apoptosis

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。研究发现,CML 具有 BCR/ABL 融合基因,其表达蛋白可持续激活 Ras 信号通路,使 CML 凋亡受阻。我们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 Caspase-3、Caspase-9 蛋白活性明显增加[1],但其诱导凋亡的机制目前尚不明确。氧化应激是细胞损害的因素之一,研究显示,氧化应激与细胞凋亡有关[2]。本实验采用流式细胞术测定细胞凋亡率和活性氧(Reactive oxygen species, ROS)水平,免疫组织化学法测定突变 P53 蛋白表达,RT-PCR 方法检测 c-jun mRNA 表达,探讨辛伐他汀是否通过氧化应激诱导 K562 细胞凋亡。

1 材料与方法

1.1 材料

K562 细胞株购自四川大学华西免疫室,辛伐他汀购自

作者介绍:黄文芳(1957-),男,研究员,博士,研究方向:肿瘤防治基础研究。

基金项目:四川省卫生厅基金(060119)。

中国药品生物制品检定所，RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco，小牛血清购自美国 GM，Annexin V-FITC 试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司，总 RNA 提取试剂购自美国 Invitrogen，RNasin，D*Nase* Ⅰ，AMV 逆转录酶，dNTPs，oligo（dT）18，Taq DNA 聚合酶均购自大连宝生物，琼脂糖购自英国 OXOID，DNA Marker 购自北京天为时代，c-jun 引物由北京塞百盛合成。抗人 P53 抗体购自 Dako 公司，ROS 检测试剂盒购自江苏碧云天，细胞培养箱购自德国 Heraeus，倒置显微镜购自日本 Olympus，流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter，PCR 扩增仪 PTC-200，数字核酸成像仪购自 Bio-Rad。

1.2 *实验方法*

1.2.1 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率 取对数生长期细胞，离心计数，调整细胞浓度为 1.0×10^5 个 /ml，实验组加入辛伐他汀，终浓度分别为 5、10、20 μmol/L，每个浓度均行 3 个复孔，同时设溶剂对照，相同条件下培养 48 h，72 h 收集细胞。去离子水稀释结合缓冲液，4℃预冷 PBS 洗细胞 2 次，250 μl 结合缓冲液重新悬浮细胞，调整细胞浓度为 1.0×10^6 个 /ml。取 100 μl 细胞悬液于 5 ml 流式管，加入 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl PI，室温避光孵育 15 min。反应管中加 400 μl PBS，流式细胞仪检测。

1.2.2 流式细胞术测定细胞内 ROS 取对数生长期细胞，调整浓度 1.0×10^5 个 /ml，实验组加入辛伐他汀，同时设溶剂对照，相同条件下培养后收集细胞，RPMI 1640 悬浮细胞，加入荧光染料 2',7'- 二氯荧光乙酰乙酸（2',7'-dichloro-fluorescein diacetate，CDFH-DA）使其终浓度为 10 μmol/L，37℃避光孵育 20 min，PBS 洗涤 3 次，流式细胞仪检测荧光强度（激发波长 485 nm，吸收波长为 530 nm）。ROS 浓度变化：$\triangle F=F_{530\ 处理组}-F_{530\ 对照组}$。

1.2.3 免疫细胞化学法检测 P53 蛋白表达 收集对数生长期细胞，调整细胞浓度为 1.0×10^5 个 /ml，实验组加入辛伐他汀，并设溶剂对照。相同条件下培养 48 h 收集细胞，PBS（pH7.4）洗 2 次，加适量 PBS 重悬后涂片。涂片晾干后，细胞固定液固定 15 min。蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 min。3%H_2O_2 室温孵育 10 min，蒸馏水冲洗，PBS 洗 3 次，每次 2 min。滴加特异性一抗（鼠抗人 P53 单抗，1:150 稀释）或 PBS，37℃孵育 30 min 或 4℃过夜。PBS 洗 3 次，每次 2 min。滴加酶标二抗 EnVision，37℃孵育 30 min。PBS 洗 3 次，每次 2 min。DAB 染液显色，显微镜下观察，显色后将玻片放入蒸馏水中终止染色。苏木素作核衬染，自来水冲洗，梯度酒精脱水，二甲苯透明 5 min，中性树脂封片。显微镜观察结果，照相并储存图片。随机计数 1 000 个细胞，根据阳性细胞数进行半定量分析。

1.2.4 RT-PCR 检测基因表达变化

1.2.4.1 RNA 提取 取对数生长期细胞，调整细胞浓度为 1.0×10^5 个 /ml，实验组加入辛伐他汀，终浓度分别为 10、20 μmol/L，并设溶剂对照，相同条件下培养 72 h 收集细胞。按总 RNA 提取试剂说明书提取 K562 细胞 RNA，*Dnase* Ⅰ消化提取 RNA 中残留的基因组 DNA，纯化 RNA，琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性，紫外分光光度仪对 RNA 进行定量，同时计算 A_{260}/A_{280} 比值，分析 RNA 纯度。

1.2.4.2 cDNA 合成 反应体系为 2.0 μl RNA，1.5 μl Oligo（dT）18，混匀后 70℃水浴 5 min 变性，立即转入冰上，加入 1.0 μl Rnasin（40 U/μl），4.0 μl 5×逆转录缓冲液，4.0 μl dNTPs，1.0 μl AMV 逆转录酶（5 U/μl），混匀后 37℃水浴 1 h。95℃ 5 min 灭活 AMV 逆转录酶。分装，-20℃保存。

1.2.4.3 PCR 扩增 c-jun 采用 c-jun 特异的上下游引物，分别用对照组和处理组的逆转录产物 cDNA 为模板，以 β-actin 为内对照进行 PCR 扩增。c-jun 引物序列为 F5'-ATGACTGCAAAGATGGAAACGACC-3'，R5'-GATGTGCCCGTTGCTGGACTGGAT-3'，产物长度 264 bp。β-actin 引物序列 F5'-AAGTACTCCGTGTGGATCGG-3'，R5'-TCAGTTGGGGGACAAAA AG-3'，产物长度 615 bp。PCR 反应体系为 5.0 μl 10×PCR buffer，0.5 μl Taq DNA 聚合酶（5 U/μl），4.0 μl dNTPs，上下游引物各 1.5 μl。1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物，在 Bio-Rad 凝胶成像分析仪上观察结果并照相。用凝胶成像系统 Quantity one 软件分析结果，以目的基因与 β-actin 条带的相对含量表示。

1.3 *统计学处理*

计量资料实验结果以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，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

Annexin V-FITC 结果显示 5、10、20 μmol/L 辛伐他汀作用 K562 细胞 48 h，细胞凋亡率分别为 4.00%±0.13%、6.24%±0.18% 和 9.41%±0.22%，与对照组 1.88%±0.14% 比较，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。相同浓度辛伐他汀作用 K562 细胞 72 h，细胞凋亡率分别为 7.62%±0.21%、12.41%±0.32% 和 19.08%±0.26%，与对照组 4.20%±0.19% 比较，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。

2.2 辛伐他汀增加 K562 细胞 ROS 含量

荧光染料 DCFH-DA 能自由扩散进入细胞，被酯酶水解成 2',7'-二氢二氯荧光黄，在 ROS 存在时氧化成 2',7'-二氯荧光黄，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 细胞后荧光强度分别升高 5.26±0.65、10.0±1.05，见图 1。

2.3　辛伐他汀对 K562 细胞突变 P53 蛋白表达的影响

突变型 P53 蛋白呈棕黄色散在分布的颗粒，定位于 K562 细胞浆和细胞核内。随机计数 1 000 个细胞，根据阳性细胞数进行半定量分析。对照组突变型 P53 过度表达，10、20 μmol/L 辛伐他汀作用 K562 细胞 48h 突变型 P53 蛋白表达有所减少，与对照组比较，差异具有统计学意义（$P<0.01$），见图 2，表 1。

2.4　辛伐他汀对 K562 细胞 c-jun 表达的影响

10、20 μmol/L 辛伐他汀处理 K562 细胞 72 h，c-jun 表达增加，见图 3。c-jun 相对表达量分别上升了 0.41 倍和 1.03 倍。

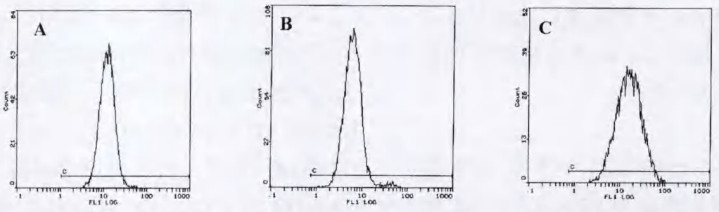
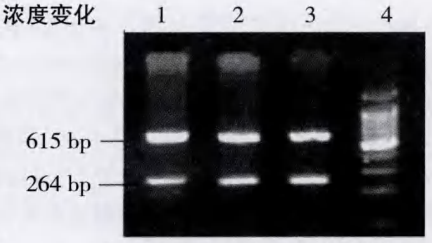


图 1　辛伐他汀作用 K562 细胞 48 h 细胞内 ROS 浓度变化



对照组（×100）　10 μmol/L 辛伐他汀（×100）　20 μmol/L 辛伐他汀（×100）

图 2　辛伐他汀对 K562 细胞突变 P53 蛋白表达的影响



1. 对照组；2. 10 μmol/L 辛伐他汀；3. 20 μmol/L 辛伐他汀；4. DNA Marker

图 3　RT-PCR 检测 c-jun mRNA 表达水平

表 1　辛伐他汀对 K562 细胞突变 P53 蛋白表达的影响

组数	总细胞数	阳性细胞数	突变 P53 蛋白阳性细胞比率（%）
对照组	1 000	424	42.40%
10 μmol/L	1 000	348	34.80%*
20 μmol/L	1 000	284	28.40%*

注：* 与对照组比较，$P<0.01$

3　讨　论

体外研究表明，他汀类药物具有抑制肿瘤细胞增殖、诱导其凋亡或分化，以及放疗增敏作用，而对正常细胞无明显的毒副作用[3-5]。我们前期实验证实了 HMG CoA 还原酶抑制剂辛伐他汀能诱导 K562 细胞凋亡，同时观察到凋亡过程中线粒体凋亡通路中 Caspase9 活性增加，但其诱导凋亡的机制目前尚不清楚。

氧化应激是细胞损害的因素之一，研究发现细胞凋亡与 ROS 升高有关。ROS 是指氧的某些衍生物如超氧负离子、羟自由基和过氧化氢等，当细胞内产生过多 ROS 时，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[6]。同时 ROS 可攻击细胞膜，损伤 DNA，影响线粒体膜完整性和能量代谢等途径。

辛伐他汀作用 K562 细胞后，MVA 途径受阻，抑制下游产物泛醌的产生，细胞内电子传递链与 ATP 形成之间的偶联被打破，导致细胞所处的氧化还原状态发生改变。当抗氧化防御体系不足以清除 ROS 时，细胞出现氧化应激诱导 DNA 损伤，野生型 p53 基因表达使细胞停滞于 G_1 期，DNA 得以修复。如 DNA 损伤不能修复，野生型 p53 持续高表达，通过诱导 p53 下游的凋亡相关基因或与 DNA 合成、修复及凋亡的蛋白结合成蛋白复合体诱导细胞凋亡。

p53 基因突变是人类肿瘤中最常发生的一种现象，几乎所有组织中均可发生 p53 的突变。通过肿瘤大量突变体分析，证实大部分突变是位于 4 个突变热点（aa129~146、171~179、234~260、270~287）的错义突变，这 4 个突变热点正对应于 p53 基因进化最保守区域，体外实验证实突变体失去特异位点的结合能力。突变 P53 蛋白能抑制野生型 p53 基因的活性或使之失活，这种抑制作用可能是通过突变体 P53 蛋白与野生型 P53 结合形成失活的寡聚复合物

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0895-04

胰岛素样生长因子-1(IGF-1)在HIE新生兔的表达

林迳苍,朱世泽,杜翠琼,黄 煌,许相洋
(福建省泉州医学高等专科学校,泉州 362000)

【摘 要】目的:探索慢性宫内缺氧时胰岛素样生长因子-1(Insulin-like growth factor-1,IGF-1)在新生兔脑组织和血清中的表达规律。方法:取孕中晚期新西兰兔24只,随机分为对照组、缺氧组以及中药干预缺氧组,对比3组新生兔的脑组织和血清的IGF-1表达与变化。结果:IGF-1在脑组织的表达经χ^2检验,各组间差异均有统计学意义($P<0.01$),缺氧组明显高于中药干预组,且中药干预组高于对照组。ELISA法定量测定血清IGF-1含量,缺氧组的血清IGF-1的含量低于对照($P<0.01$),中药干预组的血清IGF-1的含量低于对照组($P<0.05$)。结论:缺氧缺血性脑病(Hypoxic ischemic encephalopathy,HIE)新生兔的体内IGF-1进行了重新分布。脑组织内为保护神经细胞发生应激反应,调集外周血中的IGF-1进入中枢神经系统,参与内源性保护机制。

【关键词】胰岛素样生长因子-1;HIE;新生兔;脑组织;血清
【中国图书分类法分类号】R722.12 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-23

The expressions of IGF-1 in HIE neonatal rabbits

LIN Jing-cang, et al
(*Department of Hisology and Embrgdgy, Quanzhou Medical College*)

【Abstract】*Objective*: Searching after the regularity of the expressions the insulin-like growth factors (IGF-1) inside the neonatal rabbits with chronic intrauterine anoxemia give to brain Tissues and serums. *Methods*: Choosing 24 Zelanian rabbits that have been in afternoon pregnancy, we divide them into three stochastic contratest group by chance: the control group, the

作者介绍:林迳苍(1969-)男,硕士,
研究方向:围生期发育,缺血缺氧脑病。

基金项目:福建省教育厅基金项目(JB07203);泉州市科技局基金项目(2007Z50)。

产生的。本研究中,辛伐他汀作用K562细胞48 h,实验结果显示细胞内ROS明显升高,突变P53表达水平下降。突变P53蛋白表达下调解除其对正常P53蛋白功能的抑制,正常P53功能得以实现,通过一系列机制诱导K562细胞凋亡[7]。

c-jun编码分子量为39 kD含334个氨基酸残基的蛋白质Jun。在细胞中,Jun与Fos结合形成Fos/Jun异二聚体,即稳定的高活性复合物AP-1转录因子,通过亮氨酸拉链结合于DNA上,参与基因表达的复杂调控网络。Turi等[8]研究表明氧化应激可激活AP-1。Taimor等[9]曾报道AP-1介导NO诱导的心肌细胞凋亡。本研究结果显示,辛伐他汀作用K562细胞72 h,c-jun mRNA表达增强。提示辛伐他汀可能通过增强c-jun表达,激活AP-1诱导K562细胞凋亡。

参 考 文 献

[1] 黄文芳,杨永长,刘 华,等.辛伐他汀诱导K562细胞凋亡过程中Caspase-3、Caspase-9活性变化[J].肿瘤防治研究,2007,34(1):39-41.

[2] 符跃强,许 峰,卢仲毅,等.氧化应激对肺泡Ⅱ型上皮细胞的损伤作用及JNK信号转导机制[J].重庆医科大学学报,2007,32(11):1150-1153.

[3] Dimitroulakos J, Thai S, Wasfy G H, et al. Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid leukemias [J]. Leuk Lymphoma, 2000, 40(1-2): 167-178.

[4] Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, et al. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells [J]. Carcinogenesis, 2005, 26(5): 883-891.

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

[6] 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.

[7] 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.

[8] Turi J L, Jaspers I, Dailey L A, et al. Oxidative stress activates anion exchange protein 2 and AP-1 in airway epithelial cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 283(4): L791-L798.

[9] Taimor G, Rakow A, Piper H M. Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes[J]. FASEB J, 2001, 15(13): 2518-2520.

(责任编辑:冉明会)