基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1317-04

一氧化氮信号在辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡过程的作用

张 娟[1],曾娅莉[2],黄文芳[3],刘 华[3],杨永长[3],刘 俭[2],何 静[2]

(1. 重庆医科大学医学检验系,重庆 400016;2. 四川绵阳四零四医院检验科,绵阳 621000;3. 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:观察一氧化氮(Nitric oxide,NO)信号在辛伐他汀(Simvastain)诱导 K562 细胞凋亡过程中变化,推测一氧化氮信号与 K562 细胞凋亡之间关系。方法:20 μmol/L 辛伐他汀处理 K562 细胞 24、48 和 72 h;流式细胞技术检测细胞凋亡率;比色法测定 K562 细胞内总一氧化氮浓度;RT-PCR 检测诱导型一氧化氮合成酶(Inducible nitric oxide synthase, iNOS)基因;一氧化氮抑制剂和 20 μmol/L 辛伐他汀共同培养,观察不同时间细胞凋亡率。结果:与对照组比较,24、48 h 和 72 h 处理组细胞凋亡率增加 6.1%±0.4%,14.2%±0.4%,30.7%±0.6%,差异具有显著性;不同时间处理诱导性一氧化氮基因均显著上调;处理组细胞内总一氧化氮浓度增加为(0.3±0.1) mg/ml,(2.8±0.2) mg/ml,(3.8±0.4) mg/ml,与对照组比较显著升高;一氧化氮抑制剂能显著降低处理组细胞凋亡率。结论:辛伐他汀能诱导 K562 细胞凋亡,细胞内升高的一氧化氮浓度可能是辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡的信号机制之一。

【关键词】辛伐他汀;一氧化氮;细胞凋亡

【中国图书分类法分类号】R969 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-10

Effect of intracellular nitric oxide on the apoptosis of K562 cell induced by simvastatin

ZHANG Juan, et al

(*Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the variation of nitric oxide and investigate its relationship with apoptosis in apoptotic K562 cells induced by simvastatin. *Methods*: K562 cells were exposed to 20 μmol/L concentrations of simvastatin at different times (24, 48 and 72 h). Flow cytometry were performed to confirm cell apoptotic ratio. Colorimetric method was used to measure level of intracellular nitric oxide. Reverse transcription-polymerase chain reaction was used to detect the quantity of iNOS mRNA.The apotontic ratio of K562 cells treated with nitric oxide inhibitor and simvastatin were detected at different times. *Results*: K562 cells could undergo apoptosis after the treatment of 20 μmol/L simvastatin for 24, 48 and 72 h, and the apoptotic ratios were 6.1%±0.4%, 14.2%±0.4%, 30.7%±0.6%, respectively. Furthermore, the intracellular nitric oxide levels and iNOS mRNA of K562 cells in treated group were increased remarkably in contrast to the control group. The intracellular nitric oxide levels in the K562 cells of treated group were (0.3±0.1) mg/ml, (2.8±0.2) mg/ml, (3.8±0.4) mg/ml. The cell apoptotic ratios of treated group decreased by addition of nitric oxide inhibitor, as compared with the control group. *Conclusion*: K562 cells could be induced to apoptosis by simvastatin, the underlying mechanism of which might be related to regulation of increased intracellular nitric oxide levels.

【Key words】Simvastatin; Nitric oxide; Apoptosis

一氧化氮 (Nitric oxide, NO)在许多生理和病理过程中发挥着重要作用,这种泛肽信号分子调节多种细胞的凋亡, 它具有活跃而广泛的生化活性,研究资料[1,2]显示它对多种细胞凋亡具有双重影响,高浓度的 NO 会启动和增强细胞凋亡, 低浓度时则会延缓细胞凋亡, 细胞内 NO 浓度和细胞的凋亡密切相关。辛伐他汀(Simvastatin)是他汀类药物,它长期作为有效降脂药物运用于临床,近年来研究[3,4]表明它能导致多种肿瘤细胞凋亡,且对正常细胞无明显的毒副作用,具有研究和开发的潜力。但是关于辛伐他汀诱导人红白血病细胞株 K562 细胞的凋亡研究不多,机制尚不明确,NO 是细胞凋亡的重要早期调节信号[5],它是否参与了辛伐他汀诱导 K562 细

作者介绍:张 娟(1981-),女,助教,
研究方向:肿瘤药物研究。

通讯作者:曾娅莉,女,副主任技师,E-mail:yaya1118810@yahoo.com.cn。

基金项目:四川省卫生厅科研基金资助(编号:060119)。

胞的凋亡调控未见报道。本研究采用流式细胞术、比色法、RT-PCR 和 NO 信号抑制剂技术检测了辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡率，细胞内总 NO 浓度和诱导性一氧化氮合成酶 (Inducible nitric oxide synthase, iNOS)基因变化，以探讨 NO 与细胞凋亡信号之间关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 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。

1.1.2 主要试剂 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浓度的 NaOH，50℃水浴 2 h，调整 pH 至 7.20，浓度为 10 μmol/L，过滤除菌，分装后于 -20℃保存备用。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生物工程有限公司，总 NO 试剂检测试剂盒购自南京建成生物技术有限公司，总 NO 抑制剂 L-NAME 和 RIPA 细胞裂解液购自江苏碧云天生物有限公司，RNA 提取试剂购自美国 Invitrogen，逆转录反应体系购自成都博瑞克公司，Master Mix 购自北京天为时代生物有限公司，流式细胞仪购自美国贝克曼公司，电泳仪器和凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 K562 细胞用含 10%胎牛血清、100 kU/L 青霉素、100 kU/L 链霉素的 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。

1.2.2 Annexin V-FITC 检测细胞凋亡 取对数生长期细胞，调整浓度 1×10^8 个 /L，培养 24 h 后加入辛伐他汀使终浓度为 20 μmol/L，对照组加入等浓度溶剂(乙醇)，培养 24、48、72 h，收集各组细胞，4℃预冷 PBS 洗细胞 3 次，悬浮细胞并调节细胞浓度为 1×10^9 个 /L；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。

1.2.3 细胞内总 NO 测定 取对数生长期细胞，调整浓度 $(2\sim3)10^8$ 个 /L，培养 24 h 后加入辛伐他汀使其终浓度 20 μmol/L，对照组加入等浓度溶剂(乙醇)，培养 24、48 h 和 72 h；收集各组细胞 1.0×10^6 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；用 RIPA 把 10 mmol/L KNO_3 稀释成 5、10、20、50、100 μmol/L。加约 1 ml 蒸馏水或 Milli-Q 级纯水至 5 mg NADH 中，颠倒混匀溶解后，用 DH_2O 定容至 3.2 ml，配制成 2 mmol/L NADH；按照说明进行酶混合液的配制，按照 30 μl/孔，在 96 孔板中加入标准品或样品，同时以相应的等量适当溶液设置空白对照；每孔加入 30 μl 酶混合液，轻轻混匀，30℃反应 20 min；每孔加入 50 μl 室温 Griess Reagent Ⅰ和Ⅱ轻轻混匀；540 nm 测定吸光度，根据标准品计算出样品中 NO 浓度。

1.2.4 RT-PCR 检测 iNOS mRNA

1.2.4.1 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，使用分光光度计检测 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。

1.2.4.2 逆转录合成 cDNA 逆转录聚合酶链反应：采用博瑞克公司一步法 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。

1.2.4.3 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，iNOS 上游引物序列为 F 5'-ggagcgagttgtggattgtt-3'；下游引物为 R 5'-gtggggttgttgctgaactt-3'，基因长度为 270 bp；GAPDH 上游引物序列为 F 5'-ggcctccaaggagtaagacc-3'，下游引物为 R 5'-aggggtctacatggcaactg-3'，基因长度为 150 bp；以逆转录产物 cDNA 为模板，GAPDH 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，2.0×10^3 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。caspase-3 退火温度为 59℃ 45 s，HSP70 退火温度为 55℃ 45 s。

1.2.5 总 NO 抑制剂对细胞凋亡率影响 取对数生长期细胞，调整浓度 $(2\sim3)\times10^8$ 个 /L 培养 12 h；对照和处理组分别加入终浓度为 40 mg/ml 总 NO 抑制剂 L-NAME；继续培养 12 h；处理组加入终浓度 20 μmol/L 辛伐他汀，对照组加入等浓度溶剂(乙醇)，继续培养 24、48、72 h；收集各组细胞，检测凋亡率，具体方法见 1。

1.2.6 统计学处理 以上实验均重复 3 次，所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，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，$P<0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 辛伐他汀作用 K562 细胞的凋亡率

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，晚期凋亡细胞则以 AnnexinV-FITC/PI 双染色。结果显示 20 μmo/L 辛伐他汀作用 K562 细胞 24、48、72 h，细胞凋亡率变化分别是 6.1% ± 0.4%，14.2% ± 0.4%，30.7% ± 0.6%。随着辛伐他汀作用 K562 细胞的时间增加凋亡率逐渐升高，与辛伐他汀作用时间成正相关($r=0.9$)，各处理组和同时间对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)，见图 1。

2.2 细胞内总 NO 测定

总 NO 的检测原理为硝酸盐还原酶还原硝酸盐为亚硝酸盐，然后通过经典的 Griess Reagent 试剂检测亚硝酸盐，从而测定出总 NO。检测结果显示 24 h 后处理组细胞总 NO 浓度含量显著增加，48 h 和 72 h 的处理组与相应时间对照组之间比较差异具有统计学意义($P<0.05$)，见图 2。

2.3 细胞内诱导型 NO 合成酶(iNOS)mRNA 测定

iNOS 为诱导型 NO 合成酶，细胞在各种内外因素刺激作用下诱导 iNOS 基因表达上调，然后合成大量的 NO，促进细胞凋亡。检测结果显示 24～72 h 处理组 iNOS 基因表达明显高于对照组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。推测 iNOS 基因上调导致 iNOS 合成增加，合成 NO 增快，从而使细胞内 NO 浓度升高，见图 3。

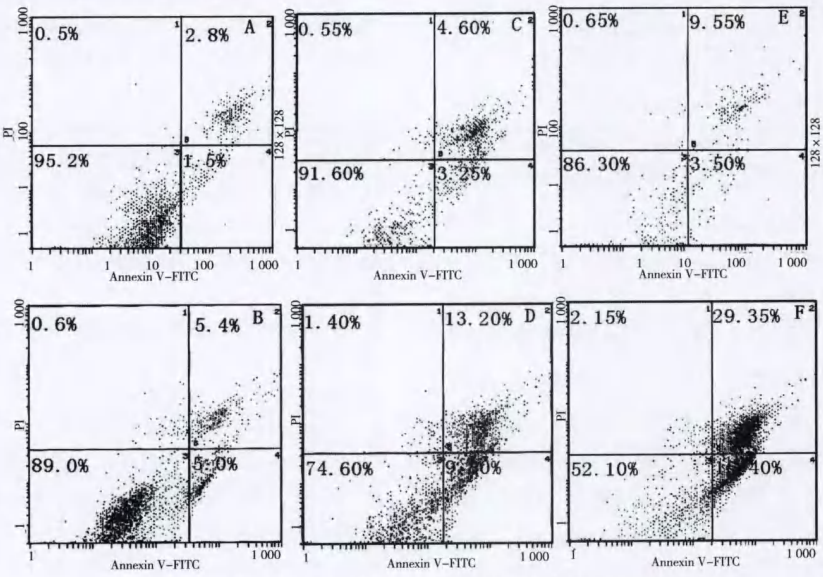
2.4 总 NO 抑制剂对细胞凋亡作用

结果显示与未加抑制剂的处理组相比较，加入 L-NAME 预处理组 K562 细胞凋亡率部分减少（$P<0.05$），可见阻断细胞 NO 内生成后，辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡率降低，因此推测升高的 NO 参与了辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡的信号传递，结果见表 1。

3 讨 论

随着诱导细胞凋亡药物的深入研究，新的药物不断被发现，辛伐他汀是临床常用降脂药物。近年来发现他汀类药物对不同肿瘤细胞具有诱导凋亡作用，且毒副作用较小[3,4]，这种安全的诱导凋亡药物使人们对它的凋亡机制产生了新兴趣。资料[1,2]显示 NO 是细胞凋亡重要调节信号，细胞内不同 NO 浓度决定细胞生存与否。在辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡过程中细胞内 NO 是否参与了 K562 细胞凋亡过程目前还未见报道。K562 细胞是慢性粒细胞白血病病变细胞株，证实 NO 信号在辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡的信号传导作用，这对于慢性粒细胞白血病的诊断、治疗和防治具有重要意义。

本实验用流式荧光技术和比色法检测了细胞凋亡的指标 AnnexinV，证实了辛伐他汀能诱导 K562 细胞凋亡。RT-PCR 技术和比色法证实了 K562 细胞凋亡时细胞内 NO 浓度和 iNOS 基因均上调。白细胞内存在的 NO 合成酶主要为 iNOS，它在静息细胞内不表达，当细胞受到细胞因子或物质时，iNOS 催化合成非生理浓度的大量 NO，产生一系列病理作用[6]。随着辛伐他汀作用 K562 细胞时间延长，处理组细



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

图 1 不同时间 20 μmol/L 辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡率变化

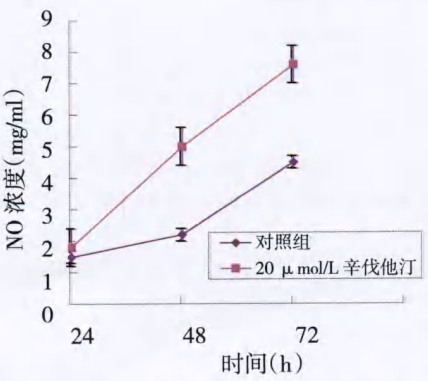
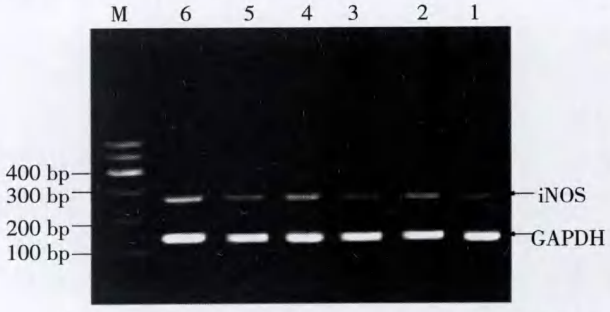


图 2 20 μmol/L 辛伐他汀作用 K562 细胞不同时间总 NO 浓度



注：条带 M. marker；条带 1、3、5. 24、48、72 h 对照组；Line 2、4、6. 24、48、72 h 处理组

图 3 20 μmol/L 辛伐他汀作用 K562 细胞不同时间 iNOS mRNA 表

表 1 加入总 NO 抑制剂后不同时间处理组 K562 细胞凋亡率

组别	时间(h)		
	24	48	72
对照组	4.3 ± 0.12	7.85 ± 0.56	13.05 ± 1.54
处理组	10.4 ± 0.78	24.0 ± 2.45	45.75 ± 3.36
抑制剂处理组	7.4 ± 0.50	16.2 ± 1.83	30.8 ± 2.75

注:n=3,和相同时间的处理组比较 P<0.01

胞内 NO 浓度和 iNOS mRNA 表达显著升高,证实了辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡与细胞内 NO 浓度和凋亡率呈正相关,这和大多数资料报道一致。加入 NO 抑制剂 L-NAME 后,不同时间处理组细胞凋亡率显著降低,NO 抑制剂能阻断了细胞内 NO 生成,NO 参与的凋亡信号途径,这使细胞凋亡率降低,这与 Chamberlain[7]报道的资料一致。

关于 NO 细胞凋亡机制有很多报道,NO 引发的凋亡其启动方式在不同生物的细胞中是有所不同的,在通常情况下,NO 是通过线粒体介导的途径引起细胞凋亡的[8],线粒体通路通常是凋亡的主要通路。在这个途径中,NO 将线粒体作为其靶标,抑制细胞呼吸,导致一连串的凋亡效应,例如膜电位的下降,运输通道的开放以及细胞色素 C 的释放等[9],从而导致细胞发生程序性死亡。我们前期的研究也证实了辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡时经过了线粒体途径,和上述观点一致[10]。但是 NO 对细胞作用是双重性的,低剂量 NO 具有广泛抗凋亡功能,caspases 家族是凋亡联级反应的中心组成部分,低剂量的 NO 能够通过降低线粒体通透性从而妨碍 Caspases 的激活,阻止 Caspases 活性形式的生成,使其无法释放出凋亡信号,进而阻断细胞的凋亡路径[11]。本文证实的是升高细胞内 NO 浓度会促进辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡,这个机制的证实将为开发 NO 类药物治疗慢性粒细胞白血病提供理论新依据,Moriya[12]曾报道 NO 类药物不仅可以提高胰腺癌细胞对于 5-氟尿嘧啶化疗药物的敏感性,同时还可减轻由于用药量过大而产生的不良反应,与本文报道相似。

综上所述,细胞凋亡的调控是一个复杂的网络过程,受许多不同的信号和胞内小分子物质调控,其复杂程度因细胞种类而异,细胞内 NO 浓度大小决定着和影响细胞存活方向。其中可能还涉及许多凋亡基因,如 Bcl-2、C-myc 和 P53 等,它们之间必然存在复杂的网络关系,关于 NO 在辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡的调控中仍有不少问题有待解决,随着研究的不断深入,人们一定会对 NO 与细胞凋亡的关系更明确,开发出更多新的 NO 类药物或新的治疗途径应用于临床。

参 考 文 献

[1] Kim Y M, Bombeck C A, Billiar T R, et al. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis[J].Circ Res,1999,84(3):253-256.

[2] Dineva J D, Vangelov I M, Nikolov G G, et al. Nitric oxide stimulates the production of atrial natriuretic peptide and progesterone by human granulosa luteinized cells with an antiapoptotic effect[J]. Endocr Regul, 2008,42(2-3):45-51

[3] 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): 2121-2127.

[4] Von T B, Von Strandmann EP, Sasse S, et al. Simvastatin-dependent apoptosis in Hodgkin's lymphoma cells and growth impairment of human Hodgkin's tumors in vivo[J]. Haematologica, 2007, 92(5): 682-685.

[5] Ergun M A, Konac E, Erbas D, et al.Apoptosis and nitric oxide release induced by thalidomide, gossypol and dexamethasone in cultured human chronic myelogenous leukemic K-562 cells[J].Cell Biol Int,2004,28(3):237-242.

[6] Hosogi S, Iwasaki Y, Yamada T, et al. Effect of inducible nitric oxide synthase on apoptosis in Candida-induced acute lung injury [J]. Biomed Res, 2008, 29(5):257-266.

[7] Chamberlain C G, Mansfield K J, Cerra A. Nitric oxide, a survival factor for lens epithelial cells[J]. Mol Vis, 2008, 28(14):983-991.

[8] Yang J, Wu L J, Tashino S, et al. Reactive oxygen species and nitric oxide regulate mitochondria-dependent apoptosis and autophagy in evodiamine-treated human cervix carcinoma HeLa cells[J]. Free Radic Res, 2008,42(5):492-504.

[9] Qian Y, Banerjee S, Grossman C E T, et al. Ransaldolase deficiency influences the pentose phosphate pathway, mitochondrial homoeostasis and apoptosis signal processing[J]. Biochem J, 2008,415(1):123-134.

[10] 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(12):776-779.

[11] Wang H, Wang Z, Chen J, et al. Apoptosis induced by NO via phosphorylation of p38 Mapk that stimulates NF-kappaB, p53 and caspase-3 activation in rabbit articular chondrocytes[J]. Cell Biol Int, 2007, 31(9):1027-1035.

[12] Moriya R, Uehara T, Nomura Y.Mechanism of nitric oxide-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells[J].FEBS Lett, 2002,484(3):253-260.

(责任编辑:关蕴良)