维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-0911-03

地塞米松对 K562 细胞增殖抑制作用及诱导凋亡机制的研究

刘 畅,金丹婷,钟 梁,刘北忠,王东生,郝 坡,王 翀,王春光

(重庆医科大学医学检验系教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究地塞米松对 K562 细胞的增殖抑制作用及诱导细胞凋亡的机制。方法:用不同浓度的地塞米松对 K562 细胞进行处理,检测细胞增殖抑制率,观察细胞凋亡的形态学变化,测定细胞端粒酶活性,Fas 表达及 NO 产生情况。结果:地塞米松能抑制 K562 细胞的增殖,降低端粒酶活性,使 Fas 表达上调,诱导细胞凋亡。但对 NO 的生成不具有显著性差异。结论:地塞米松可能通过抑制端粒酶的活性而诱导 K562 细胞的凋亡。同时,Fas 也可能参与了凋亡的调节。

【关键词】地塞米松;凋亡;端粒酶;K562 细胞

【中国图书分类法分类号】R733.73 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-11-02

The investigation of the proliferation inhibition and apoptosis of K562 ninduced by dexamethasone

LIU Chang, et al

(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of dexamethasone on the growth and the mechanism of apoptosis in K562 cells. *Methods*: Treat of different dosages of dexamethasone in K562 cell cultural to observe cell inhibitory rate and cell morphology variation. To detected telomerase activity, Fas expression and NO release. *Results*: Dexamethasone can inhibit the proliferation of K562 cell, decrease telomerase activity, increase Fas expression and induce apoptosis. But no significant effect on nitric oxide production. *Conclusion*: Inhibit telomerase activity and increase Fas expression maybe one of mechanism of apoptosis.

【Key words】 Dexamethasone; Apoptosis; Telomerase; K562 cell

白血病是严重危害人类健康的恶性肿瘤,儿童尤其多见。地塞米松作为肾上腺皮质激素药物,能诱导多种细胞系及肿瘤细胞的凋亡[1]。在白血病治疗方面,地塞米松与化疗药物联用,能增强药物诱导的白血病细胞的凋亡[2]。如今,地塞米松已广泛应用于急性粒细胞白血病、急性淋巴细胞白血病的诱导缓解和诱导缓解后的治疗[3]。

研究资料表明,在血液系统的恶性肿瘤中,地塞米松能抑制人类 T 淋巴白血病细胞等急性白血病细胞的生长并诱导其凋亡[4,5],但其诱导细胞凋亡的机制尚不完全清楚。同时地塞米松对 K562 细胞的增殖抑制及诱导凋亡的机制也鲜有报道。因此,本实验通过不同浓度的地塞米松对 K562 细胞进行体外作用,观察了其抑制细胞增殖及诱导凋亡情况,对药物可能的作用机制进行了初步的探讨。

作者介绍:刘 畅(1982-),女,硕士,研究方向:肿瘤的分子靶向治疗。

通讯作者:刘北忠,男,副教授,E-mail:liubeizhong@yahoo.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金(No.30300449),国家中医药管理局(No.02-03ZP52),重庆医科大学校级课题(No.XBYB2007104,No.XBYB2007108)。

1 材料与方法

1.1 材料

K562 细胞由本实验室保存,地塞米松(纯度 98%),MTT(四甲基偶氮唑蓝),DMSO(二甲基亚砜)购于美国 Sigma 公司,RPMI1640 培养液,小牛血清购于美国 Gibco 公司,端粒酶 TRAP-Hyb Kit 购于华美生物工程公司,Fas 单抗,S-P 试剂盒购于北京中山试剂公司,Griess 试剂购于 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 含用 10%小牛血清、青霉素、链霉素 0.1mg/ml 的 RPMI1640 培养基,在 37℃饱和湿度、5%CO_2 培养箱中常规培养。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.2 MTT 实验 取对数生长期细胞，离心计数，以 1.0×10^4 个接种 96 孔培养板，每孔 200μl，再加入终浓度分别 5、10、20、40、80μmol/L 的地塞米松，并设不加药的阴性对照孔，以上均行 5 个平行复孔。培养板置 37℃、饱和湿度、5% CO_2 培养箱中常规培养 48h。实验结束前 4h，每孔加入 5mg/ml 的 MTT 20μl，继续培养 4h。平板离心机 2 000r/min 离心 10min，去上清，每孔加 DMSO 100μl 终止反应，振荡至结晶完全溶解，酶标仪 492nm 测吸光度值 D_{492}。计算抑制率%=(1-$A_{处理}/A_{对照}$)×100%。

1.2.3 细胞形态学观察 收集 40μmol/L 地塞米松处理后 48h 的细胞离心，涂片后 Wright-Giemsa 染色，光学显微镜下观察细胞膜，细胞质及细胞核的各种变化。

1.2.4 端粒酶活性的检测 采用 PCR-TRAP 法检测端粒酶活性，培养细胞 1.0×10^6 个经 4 000r/min 离心 10min，沉淀加入裂解液，取上清 2μl 做 TRAP 反应模板。在 PCR 反应管中各加入反应混合物 45μl，混匀，离心 5s，置 25℃水浴 30min。PCR 仪扩增，各孔加入杂交反应液反应，洗板，加显色剂，37℃避光显色 10min，加终止液，在酶标仪上测得 D_{450}/D_{595} 值，判断端粒酶活性。

1.2.5 Fas 的检测 取对照组及不同浓度地塞米松处理 48h 后细胞，用 PBS 洗 3 次，涂片。按照试剂盒进行免疫细胞化学 S-P 染色，设立不加一抗的阴性对照，镜下计数阳性细胞，并计算阳性表达率。

1.2.6 一氧化氮(NO)水平测定 按 Griess 反应原理，将地塞米松处理 48h 细胞培养上清经离心后 100μl 中加入等量的 Griess 反应液(1%磺胺、0.1%N-I- 萘乙二胺)混匀，室温放置 10min，用酶标仪于 540nm 处进行吸光度测定 D_{540}。以细胞培养上清液中 NO^{2-} 水平反映 NO 的生成。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，统计学处理用 SPSS11.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结 果

2.1 地塞米松对 K562 细胞增殖抑制作用

MTT 结果显示不同浓度的地塞米松对 K562 细胞增殖抑制作用见表 1。地塞米松能抑制 K562 细胞的增殖，且随着药物作用浓度的增加，其抑制作用增强。在最低药物浓度 10μmol/L 作用下，抑制率与对照组比较差别具有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 细胞形态学观察

经 40μmol/L 的地塞米松处理 48h 后的细胞镜下观察可见细胞生长受抑制，活细胞数量减少。40μmol/L 的地塞米松作用组，处理 48h 后可就可见部分细胞体积缩小，细胞质凝固，细胞核内染色质浓缩成块，呈现凋亡变化(图 1)。

表 1 地塞米松对 K562 细胞增殖抑制作用($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

地塞米松作用浓度(μmol/L)	吸光度值	抑制率(%)
对照组	0.54 ± 0.03	-
5	0.52 ± 0.02	3.7
10	0.47 ± 0.02*	12.9
20	0.38 ± 0.03*	29.6
40	0.31 ± 0.01*	42.6
80	0.22 ± 0.02*	59.3

注：*$P<0.05$，与对照组比较

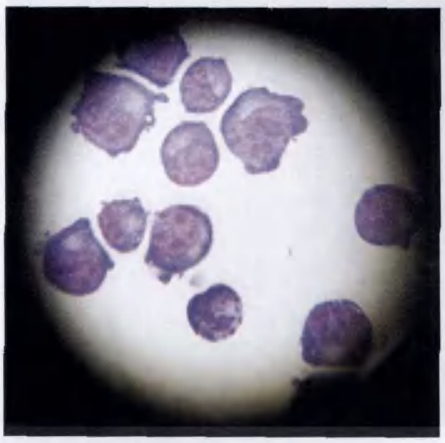


图 1 40μmol/L 地塞米松作用 48h 后细胞形态变化 (Wright-Giemsa ×400)

2.3 端粒酶活性检测

40μmol/L 地塞米松作用 K562 细胞 48、72h 与 96h 后，其吸光度值分别为 0.65 ± 0.05，0.49 ± 0.03 与 0.34 ± 0.05，提示随着地塞米松作用时间增加，K562 细胞端粒酶活性明显降低，与对照组 1.8 ± 0.05 比较，其差别具有显著性意义($P<0.05$)。

2.4 Fas 的检测

Fas 在对照组 K562 细胞有一定表达，其阳性表达率为 13.3%。经 5~80μmol/L 地塞米松处理后的 K562 细胞，其 Fas 的表达随药物浓度的增加而上调，由 5μmol/L 的 15.76%上升到 80μmol/L 的25.32%。5~80μmol/L 地塞米松处理组与对照组比较，差别具有显著性意义($P<0.05$)(表 2)。

2.5 地塞米松对 NO 产生的影响

培养上清中 NO^{2-} 的浓度间接反映了 NO 的分泌量。如表 3 所示，5~80μom/L 地塞米松作用后细胞培养上清中的 NO 量均低于对照组，但与对照组比较差别没有统计学意义($P>0.05$)(表 3)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 地塞米松对 K562 细胞 Fas 抗原表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

地塞米松作用浓度(μmol/L)	Fas 阳性表达率
对照组	13.30 ± 2.44
5	15.76 ± 3.17
10	19.65 ± 3.51*
20	22.12 ± 6.26*
40	24.83 ± 5.42*
80	25.32 ± 4.67*

注:*$P<0.05$,与对照组比较

表 3 地塞米松对细胞培养液中 NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

地塞米松作用浓度(μmol/L)	NO(mmol/L)
对照组	18.19 ± 1.48
5	12.85 ± 1.61
10	13.29 ± 1.30
20	15.02 ± 1.07
40	17.29 ± 1.99
80	16.28 ± 1.56

注:$P>0.05$,与对照组比较

3 讨 论

大量研究表明,地塞米松对多种血液系统的肿瘤细胞具有生长抑制作用,并能诱导其凋亡。本研究通过地塞米松对 K562 细胞的作用表明,地塞米松能抑制 K562 细胞的增殖,从细胞形态学观察发现细胞体积缩小,胞膜皱缩,胞核凝固成块,出现凋亡变化。同时,实验通过对地塞米松作用后 K562 细胞端粒酶活性,Fas 抗原表达,NO 产生情况几个不同途径凋亡指标的检测,对药物诱导凋亡的可能机制进行了初步探讨。检测结果表明,细胞端粒酶的活性随着药物作用时间的延长,其活性明显降低。Fas 则随着地塞米松作用浓度的增加其表达上调,但 NO 的产生却无显著性差异。

端粒酶是一种特殊的核糖核蛋白酶,具有逆转录酶的功能。该酶的激活能以自身的 RNA 为模板合成端粒 DNA,使端粒的长度保持相对稳定,使细胞获得"永生化"状态,因此端粒酶的激活与恶性肿瘤的发生、发展密切相关。研究报道,发生于不同组织部位及造血系统的恶性肿瘤,普遍检测出端粒酶的活性,其中以急性白血病端粒酶活性最强[6,7]。有资料显示,端粒酶在细胞的凋亡过程中,可能起着重要的调节作用,其活性的抑制可以增加急性白血病细胞的凋亡率[8]。本研究也发现,地塞米松抑制 K562 细胞增殖同时端粒酶的活性降低,推测可能机制是通过抑制端粒酶活性,破坏端粒稳定性引起细胞凋亡。

地塞米松作为免疫抑制剂,通过诱导不成熟胸腺细胞的凋亡和抑制成熟 T 细胞生成细胞因子两种途径来发挥其作用。前期研究报道,用抗 CD_3 抗体与激活 T 细胞的 TCR 结合而诱导的激活 T 细胞凋亡时,伴有 Fas 表达增加[9]。Fas 作为一种细胞凋亡信号受体,与其配体结合后,通过信号转导,可诱导 Fas 蛋白所在的细胞凋亡。Fas 在造血系统多种肿瘤上都有表达。本实验经地塞米松处理后的 K562 细胞 Fas 蛋白表达率随药物浓度增加表达上调,提示 Fas 蛋白表达上调可能与药物诱导的细胞凋亡相关。

NO 这种泛肽信号分子也调节多种细胞的凋亡。一定浓度水平的 NO 能损伤 DNA,增强表达 P53,进而上调促凋亡蛋白 Bax 和细胞周期素依赖蛋白激酶 P21 的表达,使细胞停止于 G_1 期,促进细胞的凋亡[10]。有研究报道,1~100 μmol/L 的地塞米松能抑制 T 淋巴瘤细胞中 NO 的释放[11]。但本实验用不同浓度地塞米松处理 K562 细胞后,其 NO 水平却无显著差异,推测地塞米松诱导的 K562 细胞的凋亡可能不依赖于 NO 通路。

研究结果表明地塞米松能抑制 K562 细胞增殖并诱导凋亡,能降低端粒酶活性,使 Fas 表达上调,提示地塞米松诱导细胞凋亡可能有不同的独立通路,其中可能与抑制端粒酶的活性,Fas 所调节的凋亡途径相关。

参 考 文 献

[1] Mogil RJ,Shi Y,Bissonnette RP,et al. Role of DNA fragmentation in T cell activation-induced apoptosis in vitro and in vivo[J]. Immunology,1994;152(4):1674-1983.

[2] Shi JH,Xu XP,Zhang ZL,et al. Inhibition of activation of nuclear factor-kappaB enhanced apoptosis of leukemic cells induced by homoharringtonine[J]. Chinese Journal of Internal Medicine,2003;42(5):292-295.

[3] 肖志坚,郝玉书.急性白血病治疗现况与未来[J]. 白血病·淋巴瘤,2006;15(1):78-80.

[4] 何 莉,刘云鹏,侯科佐,等.地塞米松诱导 OEM 细胞凋亡过程

(下转第 979 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

护勃起功能的设想是正确的,并且上述结果很可能是吡哆胺通过抑制糖尿病高血糖状态下产生的过量 AGEs 对 L-arg-NO-cGMP 通路的损害而发挥作用的。但同时我们也应注意到,①DM+PM 组的阴茎海绵体 NO、NOS、cGMP 水平仍明显低于正常对照组,勃起功能也较正常对照组明显下降,提示单用吡哆胺还不能很好的起到保护勃起功能和预防糖尿病 ED 的作用;②吡哆胺对于 L-arg-NO-cGMP 通路保护作用的具体作用机制仍不清楚,尚有待进一步研究。但本实验的结果终究说明对糖尿病个体早期给予吡哆胺在保护勃起功能、延缓 ED 的发生方面仍有一定的积极作用。

参 考 文 献

[1] Ledda A.Diabetes,hypertension and erectile dysfunction[J]. Curr Med Res Opin,2000;16(suppl 1):S17-S20.

[2] Seftel AD,Vaziri ND,Ni Z,et al. Advanced glycation end products in human penis:Elevation in diabetic tissue,site of deposition, and possible effect through iNOS or eNOS[J]. Urology,1997;50(6): 1016-1026.

[3] Alderson NL,Chachich ME,Frizzell N,et al.Effect of antioxidants and AGE inhibition on chemical modification of proteins and progression of nephropathy in the streptozotocin diabetic rat[J]. Diabetologia, 2004;47(8):1385-1395.

[4] Heaton JP,Warrin SJ,Morales A.The char acterization of a bio-assay of erectile function in a rat mode[J]. J Urol,1991;145(5): 1099-1101.

[5] Reddy S,Bichler J,Wells-Knecht KJ,et al.N epsilon-(Carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins[J]. Biochemistry,1995;34(34):10872-10878.

[6] 林炜栋.糖尿病 AGEs 的形成与生物学效应[J]. 中华国际医学杂志,2001;6(1):61-63.

[7] Usta MF,Birvalacqua TJ,Yang DY,et al.The protective effect of aminoguanidine on eretile function in streptozotocin diabetic rats[J]. J Urol,2003;170(4 Pt 1):1437-1442.

[8] Nagaraj RH,Sarkar P,Mally A,et al. Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats:characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal[J]. Arch Biochem Biophys,2002;402(1):110-119.

[9] Booth AA,Khalifah RG,Hudson BG.Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation end-products:comparison with aminoguanidine [J]. Biochem Biophys Res Commun,1996;220(1):113-119.

[10] Hudson BG,Khalifah RG,Baynes JW,et al. Amadorins:novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions[J]. Biochem Biophys Res Commun,1999;257(2):251-258.

[11] Khalifan RG,Baynes JW,Hudson BG.Amadorins:novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions[J]. Biochem Biophys Res Commun,1999;257(2):251.

[12] Jain SK,Lim G.Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation,protein glycosylation,and (Na+-K+)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes[J]. Free Radical Biol Med,2001;300(3):232.

[13] Voziyan PA,Motz TO,Baynes JW,et al. A post-Amadori inhibitor pyridoxamine also inhibits chemical modification of proteins by scavenging Carbonyl intermediates of carbohydrate and lipid degradation[J]. J Biol Chem,2002;277(5):3397.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 913 页)

中 Survivin 和 Caspase-3 基因表达的研究[J].中华肿瘤防治杂志, 2006;13(19):1464-1467.

[5] Renner K,Amberger A,Konwalinka G,et al. Changes of mitochondrial respiration, mitochondrial content and cell size after induction of apoptosis in leukemia cells[J]. Biochim Biophys Acta,2003; 1642(1-2):115-123.

[6] Ohyashikl JH,Sashida G,Tauchi T. Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia[J]. Oncogene,2002;21(4):1680-1987.

[7] Shay JW,Werbin H,Wright WE. Telomeres and telomerase in human Leukemias[J]. Leukemia,1996;10(8):1255-1261.

[8] Nakajima A,Tauchi T,Sashida G. Telomerase inhibition enhances apoptosis in human acute leukemia cells:possibility of antitelomerase therapy[J]. Leukemia,2003;17(3):1560-1567.

[9] Costas M,Trapp T,Pereda MP,et al. Molecular and functional evidence for in vitro cytokine enhancement of human and murine target cell sensitivity to glucocorticoids. TNF-alpha priming increases glucocorticoid inhibition of TNF-alpha-induced cytotoxicity/apoptosis [J]. Clin Invest,1996;98(6):1409-1416.

[10] Kolb JP. Mechanisms involved in the pro-and anti-apoptotic role of NO in human leukemia[J]. Leukemia,2000;14(9):1685-1694.

[11] Li YH,Yan ZQ,rauner A,et al. Meconium induces expression of inducible NO synthase and activation of NF-kappaB in rat alveolar macrophages[J]. Pediatr Res,2001;49(6):820-825.

(责任编辑:冉明会)