

[文章编号] 1000-4718(2008)09-1726-04

丙戊酸钠诱导 K562 细胞周期阻滞和凋亡并上调 p^{21WAF1} 基因 mRNA 的表达*

张祥忠¹, 尹爱华², 刘建华³, 朱小玉¹, 何敏¹, 丁倩¹, 陈运贤^{1△}(中山大学¹附属第一医院血液科,³附属第三医院期刊中心, 广东 广州 510080;²广东省妇幼保健院产前诊断中心, 广东 广州 510010)

[摘要] 目的: 探讨丙戊酸钠(VPA)对慢性粒细胞白血病急变期细胞株(K562 细胞)细胞周期和凋亡的影响及其可能机制。方法: 利用流式细胞仪检测药物处理后的细胞周期和细胞凋亡情况; 利用 RT-PCR 方法检测 p^{21WAF1} 基因的 mRNA 的表达。结果: VPA 引起 K562 细胞凋亡增加[(11.47 ± 0.25)% vs (4.77 ± 0.40)%], ($P < 0.05$) 和细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期[(82.30 ± 9.41)% vs (40.13 ± 2.12)%], ($P < 0.05$)。同时处理后的细胞中 p^{21WAF1} 基因 mRNA 的表达增加[(1.65 ± 0.91) vs (0.25 ± 0.04)], ($P < 0.05$)。结论: VPA 可能通过上调 p^{21WAF1} 基因, 导致 K562 细胞周期阻滞并引起细胞凋亡。

[关键词] 丙戊酸; 白血病, 髓样, 慢性; K562 细胞; 细胞周期; 细胞凋亡; 基因, p^{21WAF1}

[中图分类号] R733.72

[文献标识码] A

Sodium valproate induces cycle arrest, apoptosis and elevates p^{21WAF1} mRNA expression in chronic myeloid leukemia cell line K562

ZHANG Xiang-zhong¹, YIN Ai-hua², LIU Jian-hua³, ZHU Xiao-yu¹, HE Min¹, DING Qian¹, CHEN Yun-xian¹

(¹Department of Hematology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; ²Prenatal Diagnostic Center, Maternal and Children Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510010, China; ³Center for Journal Publishing, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China. E-mail: cyx1228@21cn.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effects of sodium valproate (VPA) on the cell cycle and apoptosis of chronic myeloid leukemia cell line K562, and to explore the possible mechanisms. **METHODS:** K562 cells were treated with VPA. Cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. The expression of p^{21WAF1} mRNA was detected by RT-PCR. **RESULTS:** After treatment with VPA, cell cycle was arrested obviously at G₀/G₁ phase [(82.30 ± 9.41)% vs (40.13 ± 2.12)%], ($P < 0.05$). The apoptotic rate was significantly higher in the cells treated with VPA than that in untreated cells [(11.47% ± 0.25%) vs (4.77% ± 0.40%)], ($P < 0.05$). The level of p^{21WAF1} mRNA was increased [(1.65 ± 0.91) vs (0.25 ± 0.04)], ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** VPA induces elevated expression of p^{21WAF1} mRNA in K562 cells, resulting in G₀/G₁ phase arrest and apoptosis *in vitro*.

[KEY WORDS] Valproate acid; Leukemia, myeloid, chronic; K562 cells; Cell cycle; Apoptosis; Genes, p^{21WAF1}

近年来研究发现, 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitors, HDACI) 可诱导多种肿瘤细胞生长阻滞、分化及凋亡^[1-3]。丙戊酸钠 (sodium valproate, VPA) 是一种传统的抗癫痫药物, 其在抗癫痫有效治疗浓度时也表现出很强的 HDACI 活

性^[4]。慢性粒细胞白血病是临床上一种比较常见的恶性血液病, t(9;22) 形成 Ph 染色体是其特征性细胞遗传学改变, 由此形成的 Bcr/Abl 融合基因是其发病的分子机制和新药物 (如格列卫) 作用靶点。尽管格列卫取得了极好的疗效, 但临床仍然观察到耐药

[收稿日期] 2008-04-16 [修回日期] 2008-07-09

* [基金项目] 广东省医学科学技术基金资助项目 (No. A2006193)

△通讯作者 Tel: 87332200-8911; E-mail: cyx1228@21cn.com

的情况^[5]。为了克服耐药,临床上迫切需要开发新一代作用于 Bcr/Abl 融合基因的靶向药物或其它不同机制的抗肿瘤药物。本实验探讨 VPA 对慢性粒细胞白血病急变期细胞株 K562 细胞周期和凋亡的影响,同时观察在此过程中细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin dependent kinase inhibitor, CDI) p21 WAF1 基因 mRNA 的表达情况。

材 料 和 方 法

1 主要试剂

VPA 购自法国赛诺菲安万特公司。RPMI - 1640 培养基为 Gibco 产品,胎牛血清(fetal calf serum, FCS) 购自杭州四季青生物公司。细胞周期分析试剂盒为 Becton Dickinson 产品。Ttizol 购自 Invitrogen; 逆转录试剂盒购自 Fermentas; Taq DNA 聚合酶购自 Fermentas。PCR 引物由 Invitrogen 合成。K562 细胞株由中山大学肿瘤研究所提供。

2 方法

2.1 细胞培养 人慢性粒细胞白血病急变期细胞株 K562 细胞用含 10% 灭活 FCS 的 RPMI - 1640 培养液重悬后,置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,每 2 - 3 d 换液 1 次。

2.2 流式细胞仪检测细胞周期 取对数生长期的 K562 细胞以 5×10^9 cells/L 种于 6 孔板中,分为对照组、VPA (2 mmol/L) 组,加药 48 h 后,收集各组细胞, PBS 洗 2 次,离心弃上清,70% 冷乙醇 4 °C 固定过夜后,离心弃去固定液,3 mL PBS 重悬 5 min,400 目的筛网过滤 1 次,再离心 5 min,弃去 PBS。用 1 mL PI 染液染色,4 °C 避光 30 min。上机检测,进行结果分析。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期的 K562 细胞以 5×10^9 cells/L 种于 6 孔板中,分为对照组、VPA (2 mmol/L) 组,加药 48 h 后,收集各组细胞, PBS 洗 2 次,离心弃上清,悬溶于结合缓冲液中,调整细胞浓度为 1×10^9 cells/L。加 10 μL 异硫氰酸荧光素(FTIC) 标记的连接素(Annexin) 和 10 μL 20 mg/L 普匹碘氨(PI),混匀,避光室温孵育 10 min(以下同改)。用结合缓冲液洗 1 次后用 Coulter Elite 流式细胞仪(Coulter) 进行分析。Annexin V(-) PI(-) 为活细胞,Annexin V(-) PI(+) 为机械损伤细胞,Annexin V(+) PI(-) 为早期凋亡细胞,Annexin V(+) PI(+) 为晚期凋亡细胞,实验中以 Annexin V(+) 作为凋亡细胞。

2.4 半定量 RT-PCR 测定 p^{21WAF1} 基因的表达 收集 2 mmol/L VPA 处理 36h 和 48h 后的 K562 细胞,提取 RNA。步骤按照 Trizol 试剂说明书进行,所提

取的 RNA 用紫外分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度($A_{260}/A_{280} > 1.8$)。RT-PCR 步骤按照逆转录试剂盒说明书进行。吸取 2 μg RNA 样本在 20 μL 反应体系中进行逆转录反应,取逆转录产物 5 μL,使用 PE9600 基因扩增仪(PE)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL: 5 × PCR 反应缓冲液 5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 0.5 μL, dNTP 混合物(每种浓度为 10 mmol/L) 0.25 μL, 上游及下游引物(25 μmol/L) 各 1 μL, Taq DNA 聚合酶(5×10^6 U/L) 0.25 μL, 加入灭菌水至 25 μL。p^{21WAF1} 和 β-actin 的 cDNA 上下游引物见表 1。扩增条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 40 s, 56 °C 40 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。取 PCR 产物 5 μL 在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳(100 V, 30 min)。凝胶成像系统成像,经薄层扫描求得每个待测产物与 β-actin 产物吸光度值之比,进行半定量分析。

表 1 p^{21WAF1} 的 cDNA 引物序列

Tab 1 The primer sequence of cDNA of p^{21WAF1}

Gene	Forward primer(5'→3')	Reverse primer(5'→3')
p ^{21WAF1} (151 bp)	GGACAGCAGAGCAAGACCATGT	TGGAGTCGTAGAAATCTGTCACTCC
β-actin(101 bp)	GGCCCTGAGGCACTCTTCCA	GCCGATGTCCACCTCACA

3 统计学处理

数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS11.5 统计软件包进行统计分析,组间比较进行单因素方差分析。

结 果

1 VPA 引起 K562 细胞周期阻滞

用 2 mmol/L VPA 作用 K562 细胞 48 h 后,细胞周期进程被阻滞, G₀/G₁ 期细胞明显较未处理组增加(82.30% ± 9.41%), 而 S 期(12.88% ± 6.99%) 细胞较未处理组明显减少,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 2、图 1。

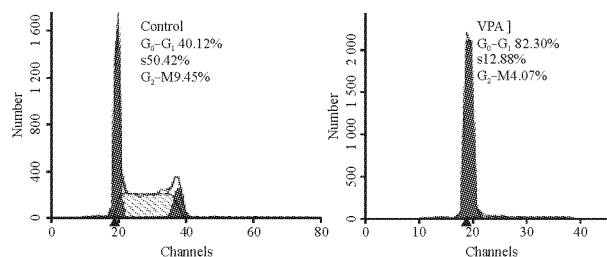


Fig 1 Results of cell cycle detected by FCM.

图 1 流式细胞仪检测细胞周期结果

2 VPA 引起 K562 细胞凋亡增加

VPA 作用 K562 细胞 48 h 后,以 Annexin V/PI 双标记后通过流式细胞仪检测,结果显示 VPA 处理

组细胞凋亡率 (11.47% ± 0.25% vs 40.13% ± 2.12%) 高于未处理对照组 (4.77% ± 0.40% vs 50.42% ± 2.65%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2、图 2。

表 2 VPA 处理后细胞周期和凋亡情况

Tab 2 Proportion of apoptotic cell and cell cycle distribution of K562 cells treated with VPA for 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	G ₀ /G ₁ phase (%)	S phase (%)	G ₂ /M phase (%)	Apoptotic rate (%)
VPA	82.30 ± 9.41 *	12.88 ± 6.99 *	4.07 ± 3.61	11.47 ± 0.25 *
Control	40.13 ± 2.12	50.42 ± 2.65	9.45 ± 0.54	4.77 ± 0.40

* $P < 0.05$ vs control.

3 VPA 上调 p^{21WAF1} mRNA 的表达

用 2 mmol/L VPA 处理 K562 细胞 36 h 和 48 h

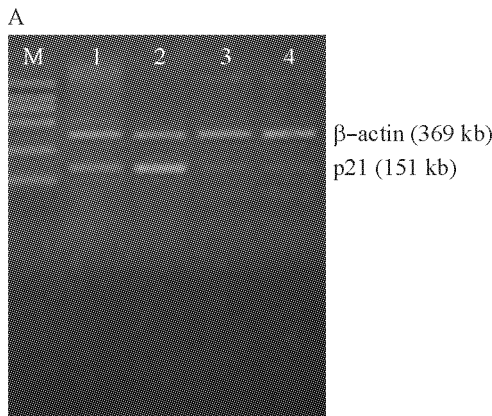


Fig 3 Detection of β -actin and p^{21WAF1} mRNA expression by RT-PCR. A: M: marker; 1: VPA group (treated for 36 h); 2: VPA group (treated for 48 h); 3: control (treated for 36 h); 4: control (treated for 48 h); B: The statistical result of the expression of p^{21WAF1} mRNA. $\bar{x} \pm s, n = 3$. * $P < 0.05$ vs control.

图 3 RT-PCR 检测 p^{21WAF1} 的表达

讨 论

慢性粒细胞白血病是临床上一种比较常见的恶性血液病, 尽管近几年来以 Bcr/Abl 融合基因的产物 P²¹⁰ 蛋白作为靶点的新药——伊马替尼 (格列卫) 取得了极好的临床效果, 但是仍然出现了原发性和继发性耐药的现象^[5]。所以临床上需要开发新一代作用于 P²¹⁰ 融合蛋白的靶向药物或其他不同机制的抗肿瘤药物。

肿瘤是一类细胞周期调节失控性疾病。正常情况下, 细胞周期有若干个检查点 (checkpoint), 以便使 DNA 复制错误的细胞终止细胞周期进程, 并进行 DNA 修复。如果不能修复则启动细胞凋亡程序使其凋亡。一旦细胞周期调节失控不能发现和修复损伤的 DNA, 导致带有遗传不稳定性的细胞继续分裂增

后, p^{21WAF1} mRNA 的表达均较对照组增加 [(1.65 ± 0.91) vs (0.25 ± 0.04)], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

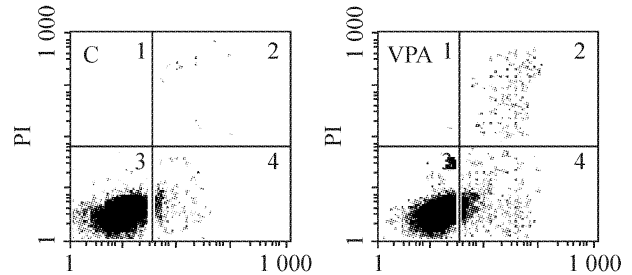
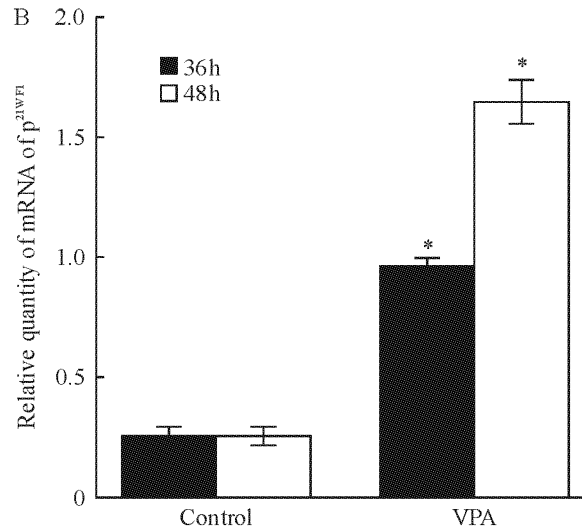


Fig 2 Scatter plot of apoptotic cell detected by FCM. C: control; VPA: K562 cells treated with VPA.

图 2 流式细胞仪检测细胞凋亡的散点图



殖就会产生肿瘤细胞。p^{21WAF1} 基因是 p53 下游的一个重要靶基因, 定位于第 6 号染色体短臂上 (6p21.2), 该基因上游 2.4 kb 处含有一个 P53 蛋白的特异性结合位点, 可与活化的野生型 P53 结合而被诱导表达。p^{21WAF1} 是第一个被证实的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (cyclin dependent kinase inhibitor, CDI)。p^{21WAF1} 与周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 结合, 抑制 CDK 活性, 使细胞周期停滞在 G₁ 期, DNA 复制受抑制, 从而使受损的细胞有充分的时间修复。如果不能修复则诱导细胞凋亡。p53 失活时, p^{21WAF1} 基因表达降低或消失, 损伤的细胞不能依靠阻滞 G₁ 期来修复受损的 DNA, 从而导致细胞 DNA 的错误复制、细胞异化或恶变^[6]。所以诱导 p^{21WAF1} 上调有助于抑制肿瘤细胞增殖和诱导其凋亡。

表观遗传学修饰是基因表达的主要调节方式,包括 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化和 RNA 干扰等。表观遗传在基因转录调控上起着极为重要的作用,组蛋白高乙酰化和 DNA 启动子序列低甲基化可促进基因表达,而组蛋白去乙酰化和 DNA 启动子序列高甲基化可抑制基因的表达,这两种机制相互协调,共同实现对基因表达的精细调控^[7]。近年来研究表明,表观遗传学改变在肿瘤发生中扮演着一个重要角色。肿瘤发生的主要表观遗传学改变是抑制肿瘤生长的基因发生 DNA 启动子序列过甲基化和染色质中的组蛋白去乙酰化修饰。恶性肿瘤的发生、发展过程中常涉及组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)的异常聚集,引起在细胞发育、分化、凋亡过程中起重要作用的基因表达受抑,导致肿瘤的发生^[8]。HDACi 可以通过抑制 HDAC 活性,导致组蛋白乙酰化水平增高,染色质呈开放构型引起一系列基因转录活化。目前普遍认为乙酰化修饰可能是通过分解组蛋白氨基末端的二级结构,并中和组蛋白所带的正电荷,以及疏水的乙酰基团产生的空间阻力,降低了组蛋白与 DNA 亲和力,使核小体松解,导致转录因子易于接近 DNA,从而活化转录反应^[9]。近年来研究发现,在体内和体外 HDACi 均可诱导多种肿瘤细胞的生长阻滞、分化及凋亡^[1-3]。丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)是一种传统的抗癫痫药物,毒副作用轻微,长期使用患者耐受性好,其在抗癫痫有效治疗浓度时表现出很强的 HDACi 活性,可通过诱导细胞周期停滞、凋亡和分化而抑制肿瘤细胞的生长增殖^[4];对肿瘤细胞有选择性细胞毒性,而对正常造血细胞无严重毒性,且与多种化疗药物有协同作用^[10]。

本实验结果显示 VPA 可引起慢性粒细胞白血病急变期细胞株——K562 细胞发生细胞周期阻滞,主要表现为 G₀/G₁ 期细胞比例增加,同时 S 期细胞比例下降。同时还发现 VPA 处理后, K562 细胞中 p^{21WAF1} 表达较未处理组明显增加,细胞凋亡也较未处理组增加。这与国外已有的相关报道比较一致。如 Rocchi 等^[11]发现, HDACi 可明显抑制人神经母细胞瘤细胞株(SJN-KP、AF8)的生长, p^{21WAF1} 的表达也明显增多。Sakura 等^[12]将 VPA 和 SAHA(suberoylanilide hydroxamic acid, HDACi 的一种)作用于 14 种淋巴系统肿瘤细胞株后,细胞发生了 G₁ 或 G₂/M 阻滞和凋亡,并且 p53、p21 和 p27 基因的表达上调。我们推测 VPA 可能是通过抑制 K562 细胞的 p^{21WAF1} 基因启动子和结构基因处的 HDAC, 改变染色质构象, 使该基因染色质重塑为转录活化的类型, 从而导致 p^{21WAF1} 转录上调。表达增多的 p^{21WAF1} 与 CDK 结合,

抑制 CDK 活性, 从而引起细胞周期停滞, 最终可能抑制肿瘤细胞的增殖并诱导其凋亡。

[参 考 文 献]

- [1] Takai N, Desmond J C, Kumagai T, et al. Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(3): 1141 - 1149.
- [2] Li XN, Shu Q, Su JM, et al. Valproic acid induces growtharrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(12): 1912 - 1922.
- [3] 邹 琛, 周 俊, 陆国平. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂与细胞周期和凋亡关系的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(12): 2487 - 2490.
- [4] Gurvich N, Tsygankova OM, Meinkoth JL, et al. Histone deacetylase is a target of valproic acid - mediated cellular differentiation [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(3): 1079 - 1086.
- [5] Tony H. Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to imatinib [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(8): 2036 - 2043.
- [6] El-Dery WS, Tokino Y, Velculescu VE, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression [J]. *Cell*, 1993, 75(4): 817 - 825.
- [7] 李新刚, 陈 燕, 吴 青, 等. 姜黄素对人淋巴瘤 Raji 细胞组蛋白 H3 乙酰化作用的影响 [J]. *癌症*, 2006, 25(5): 582 - 586.
- [8] Minucci S, Nervi C, Lo Coco F, et al. Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? [J]. *Oncogene*, 2001, 20(24): 3110 - 3115.
- [9] Weidle UH, Grossmann A. Inhibition of histone deacetylases: a new strategy to target epigenetic modifications for anticancer treatment [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(3A): 1471 - 1485.
- [10] Tang R, Faussat A M, Majdak P, et al. Valproic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells expressing P-gp and MRP1 [J]. *Leukemia*, 2004, 18(7): 1246 - 1251.
- [11] Rocchi P, Tonelli R, Camerin C, et al. p^{21WAF1/Cip1} is a common target induced by short-chain fatty acid HDAC inhibitors (valproic acid, tributyrin and sodium butyrate) in neuroblastoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2005, 13(6): 1139 - 1144.
- [12] Sakura S, Takashi K, Norihiko K, et al. Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoid cancer cell lines [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(1): 53 - 61.