

辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡过程中 Caspase-3、Caspase-9 活性变化

黄文芳¹, 杨永长², 刘 华¹, 陈 江², 周定安²

Changes of Caspase-3 and Caspase-9 Activity during the Simvastatin-induced Apoptosis in K562 Cells

HUANG Wenfang¹, YANG Yongchang², LIU Hua¹, CHEN Jiang², ZHOU Ding'an²

1. Department of Clinical Laboratory, Sichuan Medical Science Academy Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Chongqing University of Medical Sciences

Abstract :Objective To observe the variations of Caspase-3 and Caspase-9 activities in the process of simvastatin-induced apoptosis in K562 cells. **Methods** K562 cells were exposed to different concentrations of simvastatin, cell morphological analysis and flow cytometry were performed to confirm cell apoptosis. Colorimetric method was used to measure Caspase-3 and Caspase-9 activities. **Results** K562 cells could be induced to undergo apoptosis after 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ simvastatin treatment for 48h, and the apoptotic rate was $(4.00 \pm 0.13) \%$, $(6.24 \pm 0.18) \%$ and $(9.41 \pm 0.22) \%$ respectively, compared with the control group, it was significantly higher ($P < 0.01$). At 72h, K562 cells were apoptotic with a rate of $(7.62 \pm 0.21) \%$, $(12.41 \pm 0.32) \%$ and $(19.08 \pm 0.26) \%$ respectively, compared with the control group, it was markedly higher ($P < 0.01$). Furthermore, Caspase-3 and Caspase-9 activity in K562 cells elevated remarkably after 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ simvastatin treatment for 48h and 72h, compared with the control group, it was markedly higher ($P < 0.01$). **Conclusion** K562 cells can be induced to undergo apoptosis by simvastatin, the underlying mechanism might be related to upregulation of Caspase-9 activity which subsequently transforms Caspase-3 into its active form.

Key words: Simvastatin; Caspase; Apoptosis

摘要:目的 观察辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡过程中 Caspase-3、Caspase-9 活性的变化。方法 不同浓度辛伐他汀处理 K562 细胞,用细胞形态学、流式细胞技术检测细胞凋亡,比色法测定 Caspase-3、Caspase-9 活性。结果 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀作用 K562 细胞 48h 后出现核固缩、核碎裂和凋亡小体等形态学改变,其凋亡率分别为 $(4.00 \pm 0.13) \%$ 、 $(6.24 \pm 0.18) \%$ 、 $(9.41 \pm 0.22) \%$,与对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。作用 72h 后细胞凋亡率分别为 $(7.62 \pm 0.21) \%$ 、 $(12.41 \pm 0.32) \%$ 、 $(19.08 \pm 0.26) \%$,与对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。同时 Caspase-3、Caspase-9 活性明显升高,10 $\mu\text{mol/L}$ 与 20 $\mu\text{mol/L}$ 组 Caspase-3、Caspase-9 活性与对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 辛伐他汀可能通过活化 Caspase-9,并进而活化 Caspase-3 诱导 K562 细胞凋亡。

关键词:辛伐他汀;Caspase;细胞凋亡

中图分类号:R733.7 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)01-0039-03

0 引言

凋亡受阻是恶性肿瘤细胞的显著特征,寻找有效途径诱导肿瘤细胞凋亡是当今医学界研究的热点之一。他汀类(statins)药物是内源性胆固醇合成限速酶--羟甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶竞争抑制剂,能抑制甲羟戊酸途径,影响胞内信号

转导。近年研究表明,他汀类药物能诱导间皮瘤^[1]、神经胶质瘤^[2]、急性髓样白血病^[3]和黑色素瘤^[4]等多种肿瘤细胞凋亡,且对正常细胞无明显的毒副作用,但其凋亡的机制尚不完全明确。半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(CysteinyI aspartate specific protease, Caspase)与细胞凋亡密切相关,研究表明他汀类药物诱导黑色素瘤和人横纹肌肉瘤细胞凋亡过程中均有 Caspase 的活化^[4,5]。目前有关辛伐他汀诱导人慢性粒细胞白血病 K562 细胞凋亡过程中是否有 Caspase 的活化未见报道,本研究采用分光光度法测定 Caspase-3、Caspase-9 活性,观察其在辛

收稿日期:2005-12-05;修回日期:2006-04-06

作者单位:1. 610072 成都,四川省医学科学院 四川省人民医院检验科;2. 重庆医科大学医学检验系

作者简介:黄文芳(1957-),男,博士,主任技师,主要从事肿瘤防治基础研究

伐他汀诱导 K562 细胞凋亡中的变化。

1 材料与方 法

1.1 细胞株 人慢性粒细胞白血病 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 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物质的量浓度的 NaOH,50 ℃水浴 2h,调 pH 至 7.20,过滤除菌,浓度为 10mmol/L,分装后于 -20 ℃保存备用,使用前用 RPMI1640 稀释后加入培养体系。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,Caspase-3、Caspase-9 分光光度试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.3 细胞培养 K562 用含 10%小牛血清、青霉素 100U/ml、链霉素 100U/ml 的 RPMI 1640 培养基,在 37 ℃、饱和湿度、5%CO₂ 培养箱中常规培养,每 2~3 天换液传代培养。

1.4 细胞形态观察

取对数生长期细胞,将不同浓度辛伐他汀加入培养体系,培养 48h 后收集细胞涂片,瑞氏染色后光镜观察细胞形态。

1.5 Annexin V-FITC 检测细胞凋亡

收集对数生长期细胞,调整细胞浓度为 1 × 10⁵ 个/ml,实验组加入辛伐他汀,其终浓度分别为 5、10、20μmol/L,每个浓度均行 3 个复孔,同时设阴性对照组,相同条件下培养 48、72h。收集各组细胞,4 ℃预冷的 PBS 洗细胞两次,结合缓冲液重新悬浮细胞,调节细胞浓度为 1 × 10⁶ 个/ml。取 100μl 的细胞悬液于 5ml 流式管中,加入 5μl Annexin V-FITC 和 10μl 碘化丙锭溶液,混匀后室温避光孵育 15min,反应管中加 400μl PBS,流式细胞仪检测。

1.6 Caspase-3、Caspase-9 活性测定

收集对数生长期细胞,调整细胞浓度为 1 × 10⁵ 个/ml,实验组加入辛伐他汀,其终浓度分别为 5、10、20μmol/L,每个浓度均行 3 个复孔,同时设阴性对照,相同条件下培养 48h、72h。收集各组细胞,PBS 洗涤 2 次,2 000r/min 离心 5min,收集 3~5 × 10⁶ 细胞,用 60μl 冰冷 Lysis Buffer 悬浮细胞,-20 ℃放置 20min,4 ℃10 000r/min 离心 3min,测定细胞裂解液上清蛋白浓度,并调整蛋白浓度为 1.8μg/μl。每孔吸取 50μl 含 90μg 蛋白的细胞裂解液上清,同时取 50μl Lysis Buffer 作空白对照。每 50μl 2 × Reaction Buffer 加入 0.5μl DTT,每孔吸取 50μl 已配制 2 × Reaction Buffer,再加入 5μl

Caspase-3 Substrate 或 Caspase-9 Substrate,37 ℃避光孵育 4h,酶标仪测定 A₄₀₅。

1.7 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 统计学软件分析,多组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学变化

5、10、20μmol/L 辛伐他汀作用 K562 48h 后,光镜下可见典型的凋亡形态学改变,表现为细胞体积缩小,细胞膜完整,胞浆中出现空泡,核染色质浓缩、碎裂成块状弥散在胞浆中,并可见凋亡小体。

2.2 辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡

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 AnnexinV-FITC/PI 双染色。表明辛伐他汀作用 K562 后,细胞凋亡率显著增高,见表 1、图 1。

表 1 辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡效应(凋亡率%, $\bar{x} \pm s$)

group	48h	72h
control	1.88 ± 0.14	4.20 ± 0.19
5μmol/L	4.00 ± 0.13 *	7.62 ± 0.21 *
10μmol/L	6.24 ± 0.18 *	12.41 ± 0.32 *
20μmol/L	9.41 ± 0.22 *	19.08 ± 0.26 *

注:n=3,与对照组比较 * $P < 0.01$

2.3 辛伐他汀活化 Caspase-3、Caspase-9

Caspase-3、Caspase-9 活性检测结果如表 2 所示,10μmol/L、20μmol/L 辛伐他汀作用 K562 细胞 48h、72h 后 Caspase-3、Caspase-9 活性明显升高,与对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$),表明辛伐他汀能活化 Caspase-3、Caspase-9。

3 讨论

随着细胞凋亡的深入研究,诱导细胞凋亡的药物不断被发现。流式细胞 AnnexinV/PI 双染色法利用 AnnexinV 能与凋亡细胞表面的磷脂酰丝氨酸特异结合,PI 能特异透过死细胞膜使其染色的原理,可将凋亡早期、晚期细胞以及死细胞区分开,是目前常用的细胞凋亡检测方法。本实验用辛伐他汀处理 K562 细胞,通过流式细胞 AnnexinV/PI 双染色法证实辛伐他汀能明显诱导 K562 细胞凋亡。

在细胞凋亡的机制研究中,目前提出了两条主要信号途径,即线粒体途径和死亡受体途径^[6]。Caspase-9 是线粒体凋亡途径的关键蛋白酶,处于 Caspase“瀑布式”激活的顶端,它的活化对线粒体凋

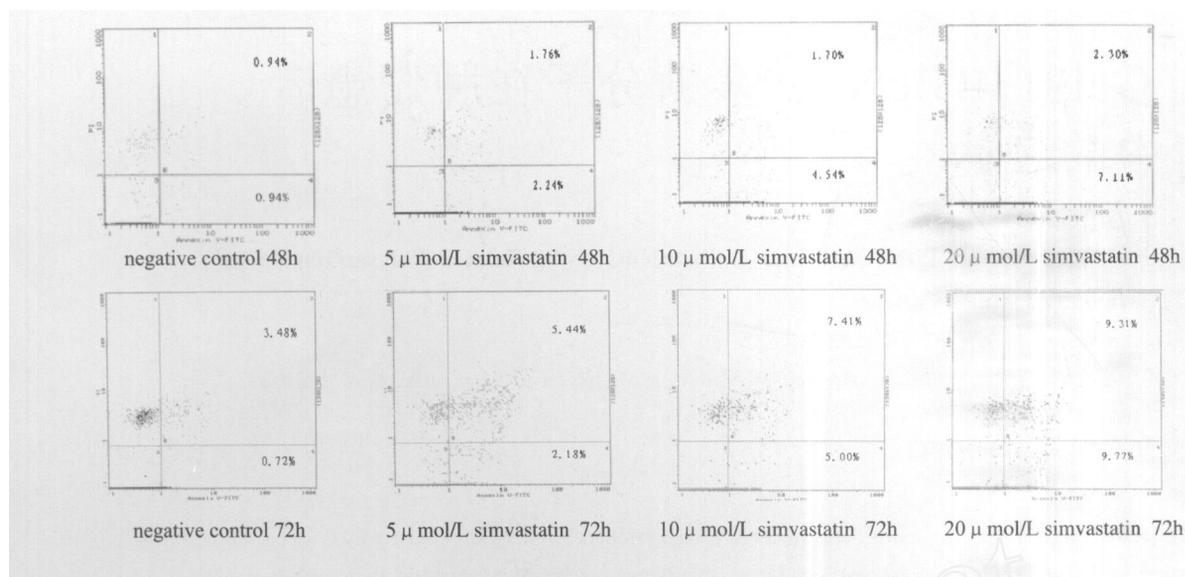


图 1 不同浓度辛伐他汀作用 K562 细胞 48、72h 后诱导细胞凋亡情况

表 2 辛伐他汀处理 K562 细胞后 Caspase-3、Caspase-9 活性测定结果($\bar{x} \pm s$)

group	48h		72h	
	Caspase-3	Caspase-9	Caspase-3	Caspase-9
control	0.066 ± 0.014	0.053 ± 0.013	0.061 ± 0.011	0.055 ± 0.012
5μmol/L	0.075 ± 0.019	0.068 ± 0.014	0.087 ± 0.011	0.094 ± 0.012
10μmol/L	0.151 ± 0.011 *	0.114 ± 0.010 *	0.189 ± 0.016 *	0.141 ± 0.011 *
20μmol/L	0.224 ± 0.010 *	0.214 ± 0.017 *	0.264 ± 0.013 *	0.275 ± 0.012 *

注: n = 3, 与对照组比较 * P < 0.01

亡通路的激活尤为重要。Caspase-9 酶原经蛋白酶水解成大小亚单位,在细胞色素 C,凋亡蛋白酶活化因子-1(Apaf-1)和 dATP 的参与下形成有活性的二聚体,进一步激活 Caspase-3。活化的 Caspase-3 能裂解 DNA 修复相关分子、凋亡抑制蛋白、细胞外基质蛋白及骨架蛋白等,促使细胞凋亡。Shellman 等^[4]研究发现洛伐他汀诱导人黑色素瘤细胞凋亡中有 Caspase-3 的活化。Wang 等^[7]研究表明,洛伐他汀诱导 HL60 细胞凋亡过程中能激活 Caspase-3, Caspase-3 抑制剂能抑制 Caspase 活性和 DNA 片段化。Cafforio 等^[8]在研究他汀类药物诱导人骨髓瘤 MCC-2 细胞凋亡中发现,他汀类药物可活化 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9, Caspase-9 抑制剂能明显降低细胞凋亡率,而 Caspase-8 抑制剂却不能,表明他汀类药物主要通过 Caspase-9 活化并进一步激活 Caspase-3 诱导骨髓瘤细胞凋亡。本研究中,我们以不同浓度辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡,用分光光度法检测 Caspase-3、Caspase-9 活性,结果

发现辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡过程中 Caspase-3、Caspase-9 活性明显增高,提示 Caspase-3、Caspase-9 参与了辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡的调控。辛伐他汀可能通过活化 Caspase-9 并进一步激活 Caspase-3 诱导 K562 细胞凋亡。

参考文献:

- [1] Rubins JB, Greatens T, Kratzke RA, et al. Lovastatin induces apoptosis in malignant mesothelioma cells [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157(5 Pt 1): 1616-1622.
- [2] Koyuturk M, Ersoz M, Altioek N. Simvastatin induces proliferation inhibition and apoptosis in C6 glioma cells via c-jun N-terminal kinase [J]. Neurosci Lett, 2004, 370(2): 212-217.
- [3] Wong WW, Tan MM, Xia Z, et al. Cerivastatin triggers tumor-specific apoptosis with higher efficacy than lovastatin [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(7): 2067-2075.
- [4] Shellman YG, Ribble D, Miller L, et al. Lovastatin-induced apoptosis in human melanoma cell lines [J]. Melanoma Res, 2005, 15(2): 83-89.
- [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] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis [J]. Nature, 2000, 407(12): 770-776.
- [7] Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin J K. Induction of apoptosis by lovastatin through activation of caspase-3 and DNase II in leukemia HL-60 cells [J]. Pharmacol Toxicol, 2000, 86(2): 83-91.
- [8] 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.

[编辑:周永红]