

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.03.003

阿托伐他汀对 K562 细胞的抗增殖作用及凋亡作用的研究

孔春芳¹,周江龙²,丁伟荣³,丁江华³,陈国安³,程洪波³,金成豪³

(1. 江西省人民医院,南昌 330006;2. 江西省南昌市第三医院 330006;3. 南昌大学第一附属医院 330006)

[摘要] **目的** 观察阿托伐他汀对 K562 细胞增殖及凋亡的影响,并探讨其作用机制。**方法** 不同浓度的阿托伐他汀处理 K562 细胞,CCK-8 法检测细胞增殖;AnnexinV-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡;流式细胞仪检测细胞周期;比色法检测半胱氨酸蛋白水解酶(caspase)-3、-8、-9 的活性;qRT-PCR 检测 Bcl-2、程序性死亡因子(PDCD5)mRNA 的表达。**结果** 阿托伐他汀至浓度和时间依赖性地抑制 K562 细胞增殖($P<0.05$)并诱导细胞凋亡($P<0.01$);阿托伐他汀作用 K562 细胞后, G_0/G_1 期细胞百分比增加($P<0.01$),S 期细胞百分比下降($P<0.01$),且呈浓度依赖性($P<0.01$);阿托伐他汀以浓度依赖性活化 caspase-3、-8、-9($P<0.01$),下调 Bcl-2 mRNA 表达和上调 PDCD5 mRNA 的表达($P<0.01$)。**结论** 阿托伐他汀可抑制 K562 细胞增殖并诱导其凋亡。

[关键词] 细胞增殖;细胞凋亡;阿托伐他汀;K562 细胞
[中图法分类号] R733.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)03-0299-03

Antiproliferative and apoptosis effect of atorvastatin on K562 cells

KONG Chunfang¹,ZHOU Jianglong²,DING Weirong³,DING Jianghua³,CHEN Guoan³,CHENG Hongbo³,JIN Chenghao³
(1. Jiangxi Provincial People's Hospictal,Nanchang,Jiangxi 330006,China;2. The Third Hospital of Nanchang,Nanchang,Jiangxi 330006,China;3. The First Affiliated Hospital of Nanchang University,Nanchang,Jiangxi 330006,China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of atorvastatin on the proliferation and apoptosis of K562 cells andto investigate its mechanisms. **Methods** The cells were treated by different concentrations of atorvastatin. The CCK-8 assay was employed to detect the cell proliferation. The cell apoptosis was detected by AnnexinV-FITC/PI dual staining;the flow cytometry was used to detect the cellular cycle;the activities of caspase-3,-8,-9 were detected by the colorimetric method;qRT-PCR was employed to measure the mRNA expression levels of Bcl-2 and PDCD5 in K562 cells. **Results** Atorvastatin could inhibit the proliferation of K562 cells in a time- and dose-dependent manner($P<0.05$);and induced the apoptosis of K562 cells,the percentage of G_0/G_1 phase cells was increased after atorvastatin treating k562 cells($P<0.01$),while the percentage of S phase cells was decreased($P<0.01$),moreover which showing the concentration dependence($P<0.01$);atorvastatin activated the caspase-3,-8,-9($P<0.01$);down-regulated Bcl-2 mRNA expression and up-regulated PDCD5 mRNA expression in a concentration dependence($P<0.01$). **Conclusion** Atorvastatin can inhibit the proliferation and induce apoptosis in K562 cells.

[Key words] cell proliferation;apoptosis;atorvastatin;K562 cells

慢性髓系白血病(chronic myeloid leukemia,CML)是一种发生在多能造血干细胞的恶性骨髓增殖性疾病,目前,CML 急变患者治疗效果仍较差,探索对 CML 急变期有效的新型药物很有必要。他汀类药物是一类 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂,主要用于预防和治疗心脑血管疾病。近期研究证实:他汀类药物对多种实体肿瘤具有抗癌作用^[1]。作为第三代他汀类代表,阿托伐他汀临床应用非常广泛。有研究发现,阿托伐他汀等可影响 K562 细胞的增殖,但具体机制尚不清楚^[2]。因此,本研究以 K562 细胞系为实验对象,探讨阿托伐他汀对其的作用及机制,旨在为阿托伐他汀临床治疗 CML 急变提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人 CML 急变期细胞系 K562 细胞由南昌大学第一附属医院血液科实验室提供。主要实验试剂包括:阿托伐他汀、RNA 酶(RNAase)、碘化丙啶(PI)均购自美国 Sigma 公司,CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所),AnnexinV-FITC/PI 试剂盒(美国 BD 公司),半胱氨酸蛋白水解酶(caspase)-3、-8、-9 活性测定试剂盒(碧云天公司),RNA 提取试剂盒(Qiagen 公司),Quant cDNA 第一链合成试剂盒(Tiagen 公司),Real-MasterMix(SYBR Green,Tiagen 公司)。实验主要仪器为 BD

FACS 流式细胞仪与 Mx3000P 荧光定量 PCR 仪。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 K562 细胞培养于 10%胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640 培养液中,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 实验分组 分为不同浓度阿托伐他汀组(12.5、25.0 和 50.0 μmol/L)与阴性对照组(阿托伐他汀 0 μmol/L)。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖抑制 收集对数生长期细胞,调整细胞浓度为 1×10⁵ 个/mL。接种细胞(1×10⁴ 个/孔)于 96 孔板,按上述实验分组加入不同浓度阿托伐他汀,同时设立空白对照组(无细胞悬液,不加阿托伐他汀),每组设 3 个重复孔。置培养箱内分别孵育 24、48 及 72 h,每孔加入 CCK-8 试剂 20 μL,继续培养 1 h,酶标仪检测各孔吸光度(A)值,实验重复 3 次。细胞增殖抑制率 = 100% - [(A_{给药组} - A_{空白孔}) / (A_{阴性对照组} - A_{空白孔})] × 100%。

1.2.4 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率 分不同浓度阿托伐他汀组(即 12.5、25.0 和 50.0 μmol/L)与阴性对照组(阿托伐他汀 0 μmol/L)后置培养箱内孵育 72 h,收集各组细胞,4℃预冷磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤细胞 2 次,调整细胞浓度为 1×10⁶ 个/mL。加入 500 μL 结合缓冲液,离心弃上

清,再加入 100 μL 结合缓冲液混匀后,分别加入 5 μL Annexin V-FITC 与 5 μL PI,充分混匀;室温避光反应 15 min。最后加入结合缓冲液 400 μL ,1 h 内流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期 分不同浓度阿托伐他汀组(即 12.5、25.0 和 50.0 $\mu\text{mol/L}$)与阴性对照组(阿托伐他汀 0 $\mu\text{mol/L}$)置培养箱内孵育 72 h,收集各组细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,调整细胞浓度为 1×10^6 个/ mL ,重悬于 0.5 mL PBS,加入 2~3 mL 70%预冷乙醇中混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜。次日离心弃乙醇,再用 PBS 缓冲液洗涤 2 次,加入 PI/RNase,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,流式细胞仪测定细胞周期。

1.2.6 比色法检测细胞 caspase-3、-8、-9 活性 分不同浓度阿托伐他汀组(即 12.5、25.0 和 50.0 $\mu\text{mol/L}$)与阴性对照组(阿托伐他汀 0 $\mu\text{mol/L}$)后置培养箱内孵育 72 h,收集各组细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 个/ mL ,提取蛋白后按 Bradford 法检测蛋白水平,调整蛋白水平在 1~3 mg/ mL 范围。最后根据 caspase-3、-8、-9 活性测定试剂盒说明书,分别检测 caspase-3、-8、-9 活性。

1.2.7 qRT-PCR 检测 Bcl-2 及程序性死亡因子(PDCD5)基因表达 分不同浓度阿托伐他汀组(即 25.0、50.0 $\mu\text{mol/L}$)与阴性对照组(阿托伐他汀 0 $\mu\text{mol/L}$)后置培养箱内孵育 72 h,收集各组细胞,调整细胞浓度为 1×10^7 个/ mL 。用 Qiagen 试剂盒提取总 RNA,紫外分光光度法检测 RNA 含量,A260/A280 在 1.8~2.0 之间说明 RNA 纯度较好,用于反转录。根据试剂盒说明配制反转录反应体系,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min。最后按 SYBRGreen 说明书进行荧光定量 PCR 扩增。引物设计:从文献中检索所需要的 Bcl-2、PDCD5、 β -actin 基因引物,后进行验证,通过软件进行评价并选取最优引物,送至上海生物工程公司合成,见表 1。

表 1 PCR 引物序列和产物长度		
基因	引物序列	产物长度(bp)
Bcl-2	5'-GCTACCTAAGAAAAACCTGG-3'	132
	5'-CAAGAAACAAGGTCAAAGGG-3'	
PDCD5	5'-AGCACTTGTAAGCCTGAAA-3'	96
	5'-CCTTGTTCTGATACCTTCTC-3'	
β -actin	5'-TGTGGCATCCACGAAACTAC-3'	182
	5'-GGAGCAATGATCTTGATCTTCA-3'	

1.2.8 琼脂糖电泳检测扩增产物 分别取 Bcl-2、PDCD5、 β -actin 扩增产物及 DNA 梯状标志,将上样缓冲液和待测 DNA 样品混匀,依次加至加样孔中,电泳结束后观察结果并拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据符合正态性分布及方差齐性分析,多

组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK- q 法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 阿托伐他汀对 K562 细胞增殖的影响 12.5、25.0 与 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度阿托伐他汀处理 K562 细胞 24 h 后细胞增殖抑制率分别为(6.11 $\pm$ 0.74)、(12.50 $\pm$ 1.24)、(27.46 $\pm$ 1.43)%;48 h 后分别为(13.74 $\pm$ 1.33)、(26.01 $\pm$ 0.62)、(39.33 $\pm$ 1.90)%;72 h 后分别为(25.29 $\pm$ 1.08)、(37.68 $\pm$ 1.04)、(59.24 $\pm$ 0.81)%,均高于同时间段阴性对照组($P<0.05$)。随作用时间延长,阿托伐他汀对 K562 细胞增殖抑制率亦相应增强($P<0.05$)。提示阿托伐他汀对 K562 细胞增殖抑制作用呈浓度与时间依赖性,见图 1。

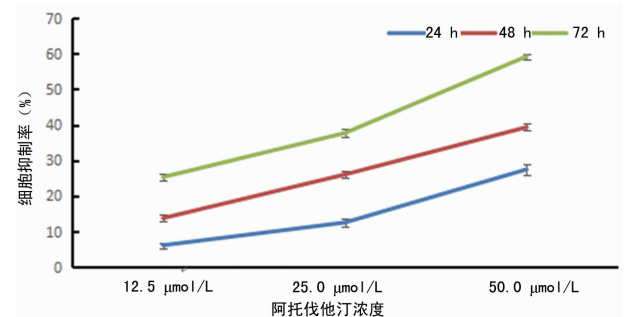


图 1 不同浓度阿托伐他汀作用 K562 细胞 24、48、72 h 细胞增殖抑制率

2.2 阿托伐他汀对 K562 细胞凋亡的影响 12.5、25.0 与 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀处理 K562 细胞 72 h,细胞凋亡率分别为(14.11 $\pm$ 1.12)、(22.89 $\pm$ 0.87)、(47.35 $\pm$ 1.41)%,显著高于阴性对照组(4.85 $\pm$ 0.91)%($P<0.01$),且 3 组浓度阿托伐他汀的细胞凋亡率组间比较差异有统计学意义($P<0.01$),见图 2。

2.3 阿托伐他汀对 K562 细胞周期变化的情况 12.5、25.0 与 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀作用 K562 细胞 72 h 后, G_0/G_1 期细胞百分比分别为(20.93 $\pm$ 1.35)、(40.18 $\pm$ 1.07)、(53.29 $\pm$ 1.09)%,显著高于阴性对照组(16.35 $\pm$ 0.75)%($P<0.01$);同样,3 组 S 期细胞百分比分别为(68.29 $\pm$ 0.66)、(49.98 $\pm$ 1.14)、(39.09 $\pm$ 0.87)%,显著高于阴性对照组(71.17 $\pm$ 1.25)%($P<0.01$),表明阿托伐他汀呈浓度依赖性诱导 K562 细胞阻滞于 G_1/S 期,见图 3。

2.4 阿托伐他汀作用 K562 细胞 caspase-3、-8、-9 活性的变化 12.5、25.0 与 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀作用 K562 细胞 72 h,与阴性对照组相比较,caspase-3、-8、-9 活性明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。表明阿托伐他汀可能通过活化 caspase-3、-8、-9 诱导 K562 细胞凋亡,见图 4。

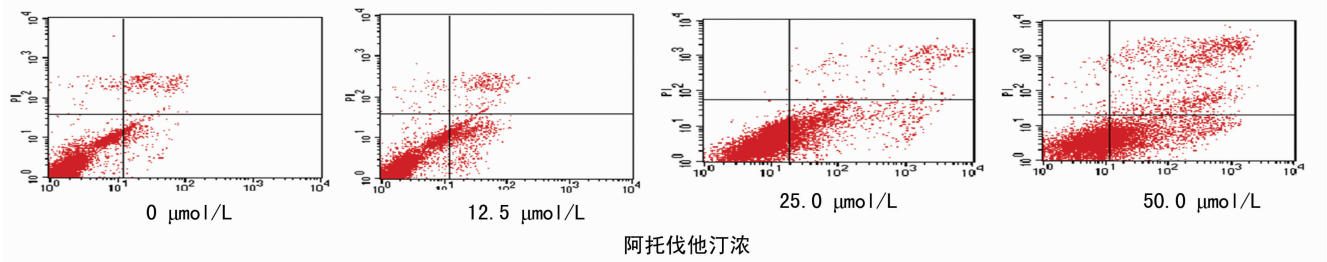


图 2 不同浓度阿托伐他汀作用 K562 细胞 72 h 的细胞凋亡率

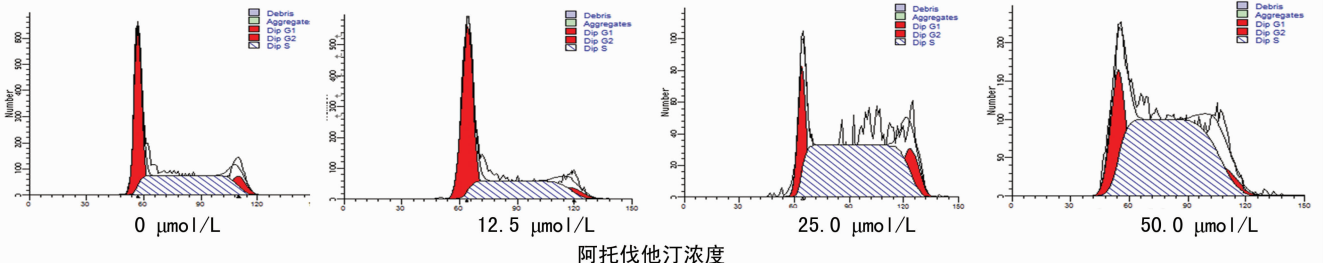


图 3 不同浓度阿托伐他汀作用 K562 细胞 72 h 的细胞周期变化

2.5 阿托伐他汀作用 K562 细胞 Bcl-2 及 PDCD5 基因表达变化 与阴性对照组比较,25.0,50.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀处理 K562 细胞 72 h, Bcl-2 mRNA 分别下降了 25.7% 和 53.6% ($P<0.01$);而 PDCD5 mRNA 表达分别上升至 5.627 倍和 17.815 倍($P<0.01$),见图 5。

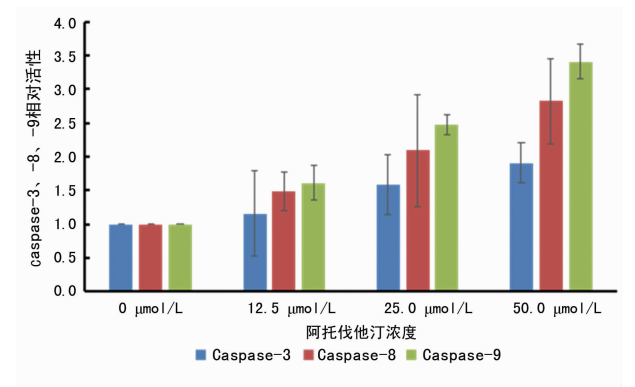


图 4 不同浓度阿托伐他汀作用 K562 细胞 72 h 后 caspase-3、-8、-9 相对活性

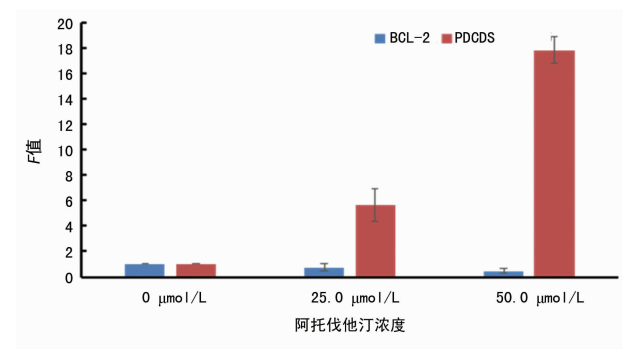


图 5 不同浓度阿托伐他汀作用 K562 细胞 Bcl-2、PDCD5 mRNA 表达变化

3 讨 论

近年来,CML 的治疗从传统的化疗药物到造血干细胞移植再到酪氨酸激酶抑制剂的应用,其临床疗效得到显著的提高;然而,CML 急变期的患者仍对该类药物存在原发或继发耐药^[3]。因此探索 CML 急变期新的高效低毒的化疗药物仍非常有必要。研究发现,他汀类药物可抑制肿瘤细胞增殖,诱导细胞凋亡或分化,影响细胞周期及信号传导等作用,而对正常细胞毒副作用不明显^[4]。阿托伐他汀作为第三代他汀类的代表药物,不良反应小,其抗肿瘤作用也逐渐成为研究热点。在本实验中,阿托伐他汀呈浓度和时间依赖性抑制 K562 细胞增殖,与 BESSLER 等^[2]研究结果相似,提示阿托伐他汀在 K562 细胞中具有抗白血病作用。

抗肿瘤药物在影响肿瘤细胞增殖的同时还可诱导细胞凋亡、导致细胞周期变化。BURANRAT 等^[5]发现阿托伐他汀可诱导人胆管癌细胞株的凋亡,同时能提升 caspase-3 及 p21 的水平。AJITH 等^[6]发现阿托伐他汀通过诱导淋巴瘤细胞凋亡,发挥抗淋巴瘤的效应。WOLFE 等^[7]发现辛伐他汀可抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖和迁移并诱导细胞阻滞于 G₁/S 期。本实验证实:阿托伐他汀呈浓度依赖性的诱导细胞凋亡并阻滞 K562 细胞周期于 G₁/S。caspase 家族在细胞凋亡中起关键作用。KANUGULA 等^[8]发现氟伐他汀通过提高 caspase-3、-8 活性,诱导乳腺癌细胞凋亡。在本实验中,阿托伐他汀可激活 caspase-3、-8、-9 的活性,诱导 K562 细胞凋亡。Bcl-2 家族在细胞凋亡中起至关重要作用,其异常表达与 CML 细胞的恶性增殖与存活密切相关^[9]。SCHOINTUCH 等^[10]发现辛伐他汀明显上调 caspase-3 表达,而下调 Bcl-2,诱导子宫内膜癌细胞凋亡。WOOD 等^[11]发现,高浓度的辛伐他汀可能通过抑制 Bcl-2 的表达诱导肿瘤细胞凋亡。PDCD5 是一种新的促凋亡基因。本实验结果发现阿托伐他汀明显下调 Bcl-2,上调 PDCD5 表达。

综上所述,阿托伐他汀可作为一种潜在的抗白血病药物。由于本研究属于体外实验,有必要进一步探讨其在体内的抗白血病效应及与化疗药物的协同作用,这有望为 CML 急变期的患者设计一些靶向新疗法以提高患者生存质量。

参考文献

[1] BOUDREAU D M, YU O, JOHNSON J. Statin use and cancer risk; a comprehensive review[J]. Expert Opin Drug Saf, 2010, 9(4): 603-621.

[2] BESSLER H, SALMAN H, BERGMAN M, et al. On the factors modulating the effect of statins on malignant cell proliferation[J]. Cancer Invest, 2007, 25(5): 279-284.

[3] NAKA K, HOSHII T, HIRAO A. Novel therapeutic approach to eradicate tyrosine kinase inhibitor resistant chronic myeloid leukemia stem cells[J]. Cancer Sci, 2010, 101(7): 1577-1581.

[4] VALLIANOU N G, KOSTANTINO A, KOUGIAS M, et al. Statins and cancer [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2014, 14(5): 706-712.

[5] BURANRA T B, SENGGUNPRAIL, PRAWAN A A. Simvastatin and atorvastatin as inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in human cholangiocarcinoma cells[J]. Life Sci, 2016, 153(5): 41-49.

[6] AJITH T A, ANU V, RIJI T. Antitumor and apoptosis promoting properties of atorvastatin, an (下转第 305 页)

统计学意义($P<0.05$),而这种差异主要来自两者间复发率明显的不同。同时本研究也发现了疾病缓解程度的不同也影响着患者的远期疗效,即达到 CR 但 MRD 阳性和 MRD 阴性两者间移植后 OS 和 LFS 差异有统计学意义($P<0.05$)。因此笔者认为移植前充分有效的化疗促使白血病达到深度缓解(即 MRD 达到阴性)是移植后患者获得长期生存,甚至治愈的基础。对于有条件移植的患者,笔者主张在适当的时机如 MRD 转阴后及时介入移植,而反对将造血干细胞移植作为反复化疗复发后所谓“挽救性治疗”手段。

综上所述,allo-HSCT 治疗 AML 患者疗效较好,可使多数患者获得长期生存,在无 HLA 全合供者的情况下,亲缘单倍体移植是较好的选择。随着移植技术的提高,移植相关死亡率逐渐降低。因此移植后复发逐渐成为当前面临的首要问题。包括本课题组在内的多个移植中心均证明了移植前积极有效的诱导化疗使患者达到更深层次的缓解(CR 及 MRD 转阴)对于移植后患者长期生存具有重要意义。

参考文献

[1] BRISSOT E,MOHTY M. Which acute myeloid leukemia patients should be offered transplantation? [J]. *Semin Hematol*,2015,52(3):223-231.

[2] BARRETT A J,ITO S. The role of stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia in the 21st century [J]. *Blood*,2015,125(21):3230-3235.

[3] 赵晓甦,许兰平,刘代红,等. 成人人类白细胞抗原全相合与不相合造血干细胞移植后急性移植物抗宿主病的临床特点与预后[J]. *中华内科杂志*,2014,53(1):35-39.

[4] WANG Y,HUANG X. Immunotherapy of leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Int J Blood Transfus Hematol*,2010,33(1):18-22.

[5] 王昱,刘开彦,许兰平,等. 异基因造血干细胞移植治疗高危恶性血液病[J]. *中华内科杂志*,2007,46(11):903-906.

[6] 张青宜,黄文荣,窦丽萍,等. 亲缘外周造血干细胞移植治疗急性髓系白血病 64 例疗效及预后分析[J]. *中国实验血液学杂志*,2014,22(2):429-433.

[7] 宋阿霞,杨栋林,魏嘉磷,等. 异基因造血干细胞移植治疗 75 例完全缓解期急性髓系白血病的疗效及预后分析[J]. *中国实验血液学杂志*,2010,18(1):161-166.

[8] SHAW P J,KAN F Y,WOO A K,et al. Outcomes of pediatric bone marrow transplantation for leukemia and myelodysplasia using matched sibling,mismatched related,or matched unrelated donors[J]. *Blood*,2010,116(19):4007-4015.

[9] LEE S J,KANG B W,MOON J H,et al. Comparable analysis of outcomes for allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from matched related and matched unrelated donors in acute myeloid leukemia [J]. *Acta Haematol*,2012,127(2):81-89.

[10] APPELBAUM F R. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia when a matched related donor is not available[J]. *Hematology Am Soc Hematol Edus Program*,2009,2008(1):412-417.

[11] 孙竞,毛玉景. 难治愈急性白血病患者造血干细胞移植后感染相关死亡的分析[J]. *南方医科大学学报*,2012,32(9):1377-1380.

[12] BAZARBACHI A,LABOPIN M,GHAVAMZADEH A,et al. Allogeneic matched-sibling hematopoietic cell transplantation for AML;comparable outcomes between Eastern Mediterranean (EBMT) and European (EBMT) centers[J]. *Bone Marrow Transplant*,2013,48(8):1065-1069.

[13] LUZNIK L,FUCHS E J. High-dose,post-transplantation cyclophosphamide to promote graft-host tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Immunol Res*,2010,47(1):65-77.

[14] LUZNIK L,JONES R J,FUCHS E J. High-dose cyclophosphamide for graft-versus-host disease prevention[J]. *Curr Opin Hematol*,2010,17(6):493-499.

(收稿日期:2017-06-24 修回日期:2017-09-03)

(上接第 301 页)

inhibitor of HMG-CoA reductase,against Dalton's Lymphoma Ascites tumor in mice[J]. *Exp Ther Oncol*,2008,7(4):291-298.

[7] WOLFE A R,DEBEB B G,LACERDA L,etal. Simvastatin prevents triple-negative breast cancer metastasis in pre-clinical models through regulation of FOXO3a [J]. *Breast Cancer Res Treat*,2015,154(3):495-508.

[8] KANUGULA A K,GOLLAVILLI P N,KARNEWAR S,etal. Statin-induced inhibition of breast cancer proliferation and invasion involves attenuation of iron transport:intermediacy of nitric oxide and antioxidant defence mechanisms[J]. *FEBS J*,2014,281(16):3719-3738.

[9] STRNAD M. Expression of Bcl-2 protein and the amplification of c-myc gene in patients with chronic myeloid leukemia[J]. *Vojnosanit Pregl*,2006,63(4):364-369.

[10] SCHOINTUCH M N,GILLIAM T P,STINE J E,etal. Simvastatin,an HMG-CoA reductase inhibitor,exhibits anti-metastatic and anti-tumorigenic effects in endometrial cancer[J]. *Gynecol Oncol*,2014,134(2):346-355.

[11] WOOD W G,IGBAVBOA U,MULLER W E. etal. Statins,Bcl-2,and apoptosis:cell death or cell protection? [J]. *Mol Neurobiol*,2013,48(2):308-314.

(收稿日期:2017-06-26 修回日期:2017-09-04)