

辛伐他汀联合 5-FU 对 K562 细胞增殖及凋亡的影响

何金花, 吴风云, 刘冠杰, 张小鹰, 廖晓丽, 蒋建伟

(暨南大学医学院生化教研室, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 探讨辛伐他汀(Sim)联合 5-FU 对白血病 K562 细胞增殖及凋亡的影响, 探讨其作用机制。方法: 体外培养人白血病 K562 细胞, 用 MTT 法观察 Sim 联合 5-FU 对细胞的增殖抑制作用, 实时荧光定量 RT-PCR 观察对 bcr/abl 融合基因 mRNA 表达水平的影响。流式细胞术、Hoechst33258 染色观察 Sim 与 5-FU 联合应用诱导细胞凋亡的作用。结果: 低浓度的 Sim 与 5-FU 联合应用在抑制细胞的增殖, 诱导细胞凋亡, 均较各单一高浓度用药组的作用明显增强, 并且下调 bcr/abl 融合基因 mRNA 表达。结论: Sim 与 5-FU 联用具有明显的协同抑制细胞增殖的作用, 其作用机制可能与诱导细胞凋亡, 下调 bcr/abl 融合基因的表达有关。

[关键词] 辛伐他汀; 5-氟尿嘧啶; K562 细胞; 凋亡

[中图分类号] R73-36 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)06-0578-05

Effects of the combination of Simvastatin and 5-FU on proliferation and apoptosis of K562 cells

HE Jin-hua, WU Feng-yun, LIU Guang-jie, ZHANG Xiao-ying, LIAO Xiao-li, JIANG Jian-wei
(Department of Biochemistry, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To study the effects of combination of simvastatin with 5-FU on K562 cells in vitro and their antitumor mechanisms. **Methods:** MTT assay was used to determine the inhibitory effects of the drugs on k562 cells and real time fluorescent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (FQ-PCR) used to determine the mRNA levels of bcr/abl fusion gene. Apoptosis was analyzed by using flow cytometry and Hoechst33258 staining technique. **Results:** At lower concentrations, combination of simvastatin with 5-FU had greater inhibitory effects on growth and proliferation of the leukemia cells, and also induced apoptosis, when comparing with the higher concentrations of the drugs. It was found that all concentrations of the drugs used in this study showed to be able to suppress the expression of the fusion gene bcr/abl. **Conclusion:** Combination of simvastatin with 5-FU has a significantly synergic anti-cancer effect. The antitumor mechanism may be associated with induction of apoptosis and suppression of the fusion gene bcr/abl of K562 cells.

[Key words] simvastatin; 5-fluorouracil; leukemia; apoptosis

[收稿日期] 2008-07-18

[基金项目] 广东省医学科研基金资助项目(A2007322)

[作者简介] 何金花(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤基因治疗

通讯作者: 蒋建伟, Tel: 020-85220256; E-mail: jjw703@163.com

他汀类药物已普遍用于临床治疗高胆固醇血症,近年来实验证明:他汀类药物能抑制多种恶性肿瘤细胞增殖,诱导细胞凋亡,而对正常细胞影响较少的作用^[1]。5-氟尿嘧啶(5-FU)能阻断 DUDP 向 DTDP 的转变,抑制 DNA 的生物合成,属周期特异性药物,是治疗肿瘤、预防肿瘤复发和肿瘤复发后化疗最常用的药物之一,但副作用较大。目前国内外关于他汀类药物联合化疗药物对癌细胞作用的影响研究较少,通过检测辛伐他汀(simvastatin, Sim)与 5-FU 联合对白血病 K562 细胞生长的影响,以及探讨两者的协同抗癌作用,以期对白血病的治疗提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人慢性粒细胞白血病 K562 细胞由暨南大学医学院血液病研究所惠赠。辛伐他汀(北京双鹭药业,批号:20071101),RPMI-1640 培养液(美国 Gibco 公司),小牛血清(美国 GM 公司),TRIZOL 试剂(美国 Invitrogen 公司),M-MLV 逆转录酶(美国 Promega 公司),Taq 酶(美国 TaKaRa 公司),琼脂糖(西班牙 Biowest 公司),Genefinder 染料(美国 MBI 公司),RealMasterMix(美国 TaKaRa 公司)。引物由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

(1)辛伐他汀处理 参照文献的方法^[2]将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 2 h,调 pH 至 7.20,过滤除菌,浓度为 10 mmol/L,分装后于 -20 ℃保存备用,使用前用 RPMI-1640 稀释后加入培养体系。5-FU 用无菌生理盐水稀释至相应浓度。

(2)细胞培养 K562 用含体积分数为 10 % 小牛血清、青霉素 100 μg/mL、链霉素 100 μg/mL 的 RPMI-1640 培养液,在 37 ℃、95 % 饱和湿度、体积分数为 5 % CO₂ 培养箱中常规培养,每 2~3 天换液传代培养。

(3)MTT 法 实验分组:A 组:单加辛伐他汀,终浓度为 8.0、16.0、32.0 μmol/L;B 组:单加 5-FU,终质量浓度为 5、10、20 μg/mL;C 组:联合用药(Sim + 5-FU 叠加:8.0 μmol/L + 5 μg/mL,16.0 μmol/L + 10.0 μg/mL,32.0 μmol/L + 20 μg/mL;空白对照组:不加药物。将细胞以浓度为 1 × 10⁵/mL 接种于

96 孔板中,每孔 180 μL,分别加入不同浓度的 Sim,5-FU,Sim + 5-Fu,其终浓度为上述浓度。每个浓度每个时间点设置 5 个复孔,置于恒温孵育箱内继续培养。第 24、48、72 h 后常规 MTT 法于 570 nm 波长测定各孔吸光值(A),并计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率 = (1 - 实验组 A 值/对照组 A 值) × 100%

(4)药物联合作用评价^[3] 采用金氏公式 $Q = E_{a+b}/(E_a + E_b - E_a \times E_b)$ 判断两药不同药物浓度相互作用是否有协同作用,式中 E_{a+b} 为合用药物的抑制率, E_a 、 E_b 分别为 A 药、B 药单独用药的抑制率。若 Q 在 0.85 ~ 1.15 内为两药合用单纯相加, $Q > 1.15$ 为有协同作用, $Q < 0.85$ 则表示两药合用有拮抗作用。

(5)流式细胞术 取对数生长期的 K562 细胞,以浓度为 1 × 10⁶/mL 接种于 12 孔板中,每孔 800 μL,A 组加 32.0 μmol/L 的 Sim;B 组加 20.0 μg/mL 的 5-FU;C 组为 Sim + 5-FU 的叠加浓度;设未加干预的为阴性对照组细胞,每个浓度设 3 个复孔,培养 48 小时后收集细胞,用预冷 PBS 洗 2 次,体积分数为 70% 的乙醇 4 ℃固定过夜,以 20 μg/mL 碘化丙锭处理 30 min,加入碘化丙锭染色液至终质量浓度 50 μg/mL,避光染色 30 min,经流式细胞仪检测亚二倍体率。

(6)Hoechst33258 染色 细胞处理同上,细胞培养 48 h 后,收集细胞,预冷 0.01 mol/L PBS 反复洗涤后,留少许上清,用微量加样器吸取细胞在洁净载玻片上涂片,室温自然干燥,甲醇:冰醋酸固定液固定 15 min,Hoechst 33258 染色工作液(10 μg/mL)避光染色 30 min,流水冲洗 5 min,荧光显微镜观察细胞凋亡形态。

(7)实时荧光定量 RT-PCR 细胞处理同上,培养 48 h 后,收集各组细胞,用 TRizol 试剂提取总 RNA。逆转录反应体系:4 μL 5 × 缓冲液、0.75 μL 上下游引物、1.3 μL dNTPs、1 μL orligodT、0.5 μL RNA 酶抑制剂、1 μL M-MLV 逆转录酶、2 μL 总 RNA,用蒸馏水补足到 20 μL,混匀后于 37 ℃反应 1 h。95 ℃反应 10 min,瞬时离心,置于 -20 ℃保存。25 μL 的 PCR 反应体系:模板 1 μL,上下游引物各 1 μL,11.25 μL 的 SYBRgreen 混合染料,补足无 RNA 酶的水至 25 μL。混匀后,放入热循环仪中进行反应。条件设置如下:95 ℃ 15 s 预变性,95 ℃

4 s, 60 ℃ 15 s, 72 ℃ 15 s 共 45 个循环。所有的样本检测均包含一个不加模板的阴性对照,以排除假阳性的结果。制作标准曲线,确定目的基因扩增效率的一致性,计算参照文献[4],运用计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值来

比较对照组和实验组的目的基因 mRNA 的相对表达量的差异,以 $\Delta\Delta Ct$ 值($\bar{x} \pm s$)为定量结果进行统计分析;检测基因及内参照的引物序列(见表 1)。

表 1 检测基因引物序列

基因	正向引物	反向引物	产物长度
bcr/abl	5'-CCGGGAGCAGCAGAAGAAGTGT-3'	5'-CCGCTGAAGGGCTTTTGAAGTC-3'	214 bp
GAPDH	5'-AGTGCCAGCCTCGTCTCATA-3'	5'-TTGAAGTTGCCGTGGGTACA-3'	296 bp

1.3 统计学方法

采用 SPSS13. 0 统计软件进行分析。采用完全随机设计的单因素方差分析(one-way ANOVA)分析组间差异的显著性,显著性差异定为($P < 0. 05$),所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 Sim 及 5-FU 对 K562 细胞增殖的影响

不同浓度的的 Sim、5-FU 单独和联合应用均可以抑制人白血病细胞 K562 细胞的增殖,并具有明显的量-效关系,但是 Sim + 5-FU 联合用药组抑制作用较单一用药组更强($P < 0. 05$),其中中浓度的联合用药组对白血病细胞的生长抑制率增加更为明显(见表 2)。

表 2 Sim 及 5-FU 对 K562 细胞增殖($\bar{x} \pm s, n = 3$)的影响

组别	抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h
对照组	0	0	0
Sim8 μmol/L	11. 32 ± 0. 86 ¹⁾	16. 22 ± 0. 21 ¹⁾	22. 39 ± 0. 56 ¹⁾
Sim16 μmol/L	19. 31 ± 0. 28 ¹⁾	24. 32 ± 1. 51 ¹⁾	32. 08 ± 1. 25 ¹⁾
Sim32 μmol/L	30. 21 ± 1. 75 ¹⁾	36. 80 ± 0. 28 ¹⁾	49. 12 ± 1. 34 ¹⁾
5-FU5 μg/mL	16. 11 ± 0. 36 ²⁾	24. 36 ± 0. 51 ²⁾	27. 63 ± 0. 65 ²⁾
5-FU10 μg/mL	23. 6 ± 1. 69 ²⁾	30. 60 ± 0. 15 ²⁾	40. 75 ± 0. 61 ²⁾
5-FU20 μg/mL	33. 12 ± 1. 58 ²⁾	40. 23 ± 2. 30 ²⁾	49. 56 ± 1. 23 ²⁾
Sim8 μmol/L + 5-FU5 μg/mL	32. 02 ± 1. 63 ³⁾	45. 33 ± 1. 25 ³⁾	54. 26 ± 0. 74 ³⁾
Sim16 μmol/L + 5-FU10 μg/mL	49. 12 ± 1. 34 ³⁾	58. 37 ± 0. 61 ³⁾	64. 07 ± 1. 36 ³⁾
Sim32 μmol/L + 5-FU20 μg/mL	60. 36 ± 0. 25 ³⁾	65. 35 ± 0. 64 ³⁾	70. 74 ± 2. 01 ³⁾

与对照组比较,1)、2)、3) $P < 0. 05$;与 Sim 组比较,3) $P < 0. 05$;与 5-FU 组比较,3) $P < 0. 05$

2.2 两药作用效果分析

两药联合应用对 K562 细胞作用 24、48、72 h 后,低浓度,中浓度联合时具有协同作用,高浓度联合表现为相加作用(见表 3)。

表 3 Sim 与 5-FU 联合作用于 K562 细胞的 Q 值

组别	24 h	48 h	72 h
Sim 8 μmol/L + 5-FU5 μg/mL	1. 23	1. 24	1. 23
Sim16 μmol/L + 5-FU10 μg/mL	1. 26	1. 22	1. 07
Sim32 μmol/L + 5-FU20 μg/mL	1. 13	1. 04	0. 948

2.3 PI 单染流式细胞术检测结果

单用高浓度的 Sim、5-FU,和联合用药作用细胞 48 h 后,凋亡率随着联合用药浓度的增加而显著增加,各组药物作用于细胞后,凋亡率较空白对照组相比,有显著差异($P < 0. 05$),Sim 联合 5-FU 具有共同促进 K562 细胞凋亡的作用(见表 4,图 1)。

表 4 Sim 及 5-FU 作用于 K562 细胞亚二倍
倍率($\bar{x} \pm s, n = 3$)的比较

组别	细胞凋亡率/%
对照组	3. 26 ± 0. 68
Sim32 μmol/L	8. 65 ± 0. 12 ¹⁾
5-FU20 μg/mL	9. 36 ± 1. 13 ¹⁾
Sim8 μmol/L + 5-FU 5 μg/mL	13. 0 ± 0. 36 ²⁾
Sim16 μmol/L + 5-FU 10 μg/mL	22. 39 ± 1. 56 ²⁾
Sim32 μmol/L + 5-FU20 μg/mL	29. 68 ± 2. 01 ²⁾

与对照组比较,1) $P < 0. 05$,2) $P < 0. 01$

2.4 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡形态学变化

空白对照组未见明显的凋亡现象,而 Sim、5-FU、联合用药组可见细胞凋亡的形态学改变:核固缩、核碎裂,出现大小不一碎片,及凋亡小体(见图 2)。

2.5 实时荧光定量 RT-PCR 检测结果

bcr/abl 融合基因 PCR 产物的熔解曲线峰值在 86. 0 ℃, GAPDH 的峰值在 85 ℃。熔解曲线分析可见只有单峰值,排除了非特异性扩增。实验组较对照组目的基因 mRNA 的相对表达量明显降低,有显著性差异($P < 0. 01$),目的基因 mRNA 的相对表达量随联合用药浓度的增加而减少,具有量效关系(见图 3)。

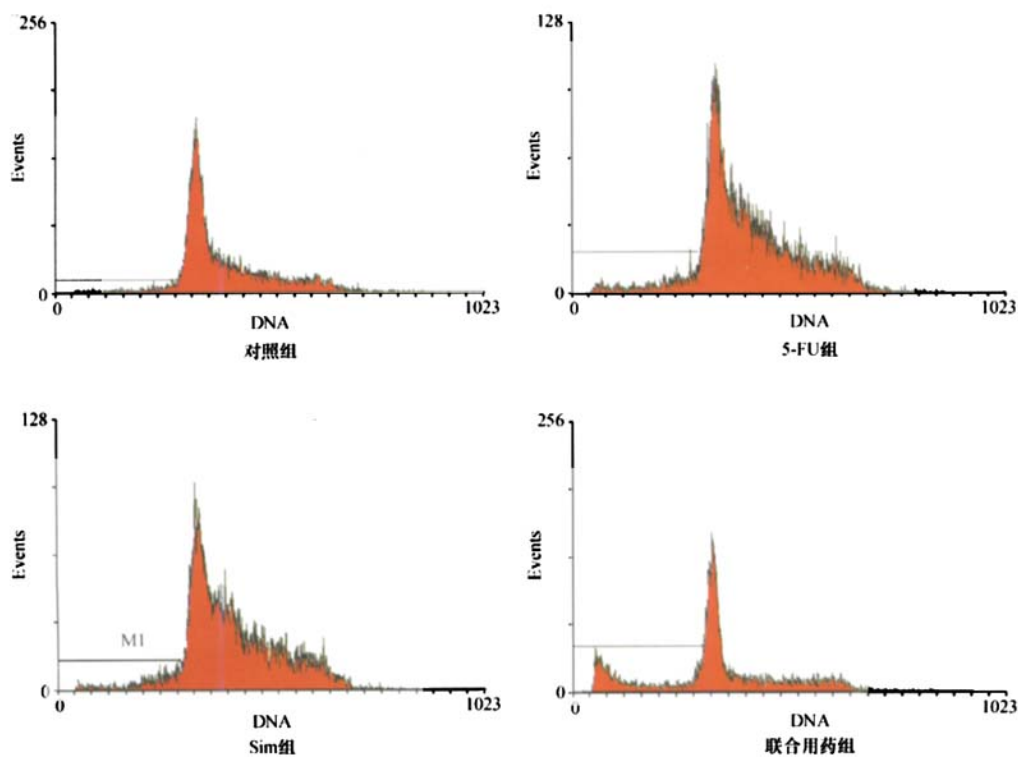


图 1 PI 单染流式细胞仪检测结果代表图

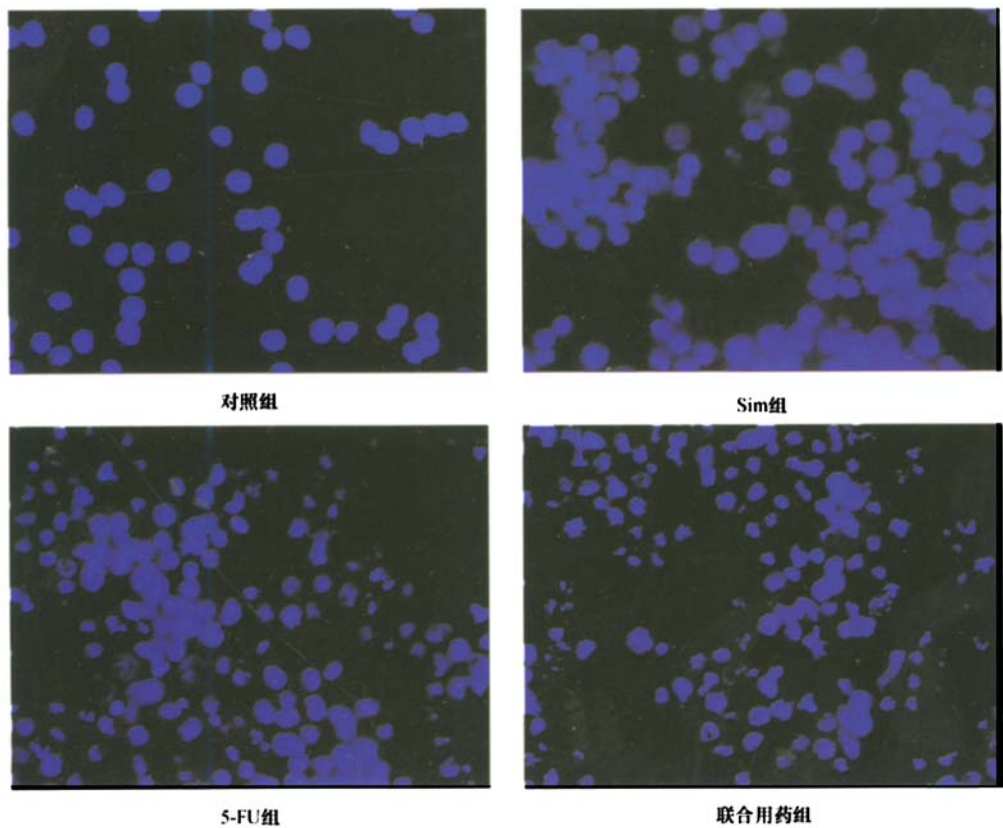
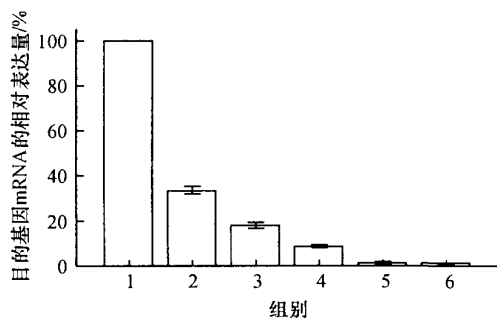


图 2 Sim 及 5-FU 致细胞凋亡的形态学改变(×20)



1. 对照组; 2. 5-FU20 $\mu\text{g/mL}$; 3. Sim32 $\mu\text{mol/L}$; 4. Sim8 $\mu\text{mol/L}$ + 5-FU 5 $\mu\text{g/mL}$; 5. Sim16 $\mu\text{mol/L}$ + 5-FU 10 $\mu\text{g/mL}$; 6. Sim32 $\mu\text{mol/L}$ + 5-FU20 $\mu\text{g/mL}$. 实验组与对照组比较, $P < 0.01$

图3 bcr/abl 融合基因 mRNA 的相对表达量

3 讨论

辛伐他汀是他汀类药物的一种,是临床上治疗高胆固醇血症主要药物;他汀类药物除具有降胆固醇的作用外,对恶性肿瘤具有治疗作用,其机制与抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡有关^[5-6]。5-FU 是临床一线抗癌药物,但体内副作用大,临床上多联合用药,其目的在于分散毒性,延缓或防止耐药。

单一运用 Sim 和 5-FU 对 K562 细胞生长均有不同程度的抑制作用,但二者联合应用,具有更强的抑制 K562 细胞生长的作用。MTT 法结果表明:不同浓度辛伐他汀与 5-FU 联合应用时,抑制率均较单一一种药物提高,而中浓度抑制率增大更为明显,且呈时间、剂量依赖效用。两药效果分析显示:低浓度,中浓度联合具有协同作用,而高浓度联合则表现为相加作用,亦即用低、中浓度辛伐他汀与低、中浓度 5-FU 联合用药,取得与单用辛伐他汀或单用 5-FU 高浓度相等的疗效或单药高浓度所不能达到的疗效,且两药低、中浓度联合具有协同抑制细胞增殖的作用,对指导临床用药具有重要意义。

细胞凋亡及其调控机制的异常是肿瘤发生发展和肿瘤治疗效果的重要因素。本实验应用流式细胞术结果显示:Sim 或 5-FU,单一高浓度用药组均可诱导 K562 细胞发生凋亡,但联合用药组细胞凋亡较单一用药组显著,同样其凋亡率差别也具有统计学意义($P < 0.05$);说明:中浓度的联合用药对促进细胞凋亡的作用较单用高浓度要强,以及高浓度所不能达到的效果。提示两者联合应用促进细胞凋亡方面具有协同效用,这对评价肿瘤治疗效果和预后具有重要的意义。

bcr/abl 是 CML 细胞的增殖和存活至关重要,是 CML 发病的关键^[7-8]。运用实时荧光定量 RT-

PCR 检测 bcr/abl mRNA 表达水平的变化。单一用药组和联合用药组均能下调 bcr/abl 融合基因的表达,且随着联合用药浓度的增加,目的基因 mRNA 的相对表达量随联合用药浓度的增加而减少,具有量效关系,认为辛伐他汀联合 5-FU 具有协同抗癌作用与 bcr/abl 融合基因的表达下调有关。

Agarwal 等^[9]报道运用他汀药物预处理细胞可以增加由氟尿嘧啶和顺铂诱导的凋亡,并且伴有凋亡抑制基因 Bcl-2 的表达的下降,以及促凋亡基因 Bax 表达的增高。辛伐他汀与 5-FU 联合运用时,低浓度和中浓度联合时具有协同抑制细胞增殖的作用,且其抑制细胞增殖和促进细胞凋亡的作用较单用药物强,甚至具有单用高浓度药物所不能达到的效果,其机制可能为辛伐他汀联合 5-FU 可下调 bcr/abl 融合基因 mRNA 的表达,诱导细胞凋亡。

[参考文献]

- [1] 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(23): 212 - 217.
- [2] 黄文芳, 杨永长, 刘 华. 辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡过程中 Caspase-3、Caspase-9 活性变化[J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(1): 39 - 41.
- [3] 戴体俊. 合并用药的定量分析[J]. *中国药理学通报*, 1998, 14(5): 479 - 480.
- [4] LIVA K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression in data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ methods [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 - 408.
- [5] 任汉云, 张念先, 徐 红. 胆固醇合成抑制剂辛伐他汀对 K562 细胞增殖和凋亡的作用[J]. *中华血液学杂志*, 2001, 22(2): 72 - 75.
- [6] YG, RIBBLE D, MILLER L, et al. Lovastatin-induced in human melanoma cell lines [J]. *Melanoma Res*, 2005, 15(2): 83 - 89.
- [7] KIMY C, SONGS B, LEEM H, et al. Simvastatin induces caspase-independent apoptosis LPS-activated RAW264.7 macrophage cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 339(3): 1007 - 1014.
- [8] AICHBERGERK J, MAYERHOFER M, KRAUTH M T, et al. Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatiniband mcl-1 antisense oligonucleotides [J]. *Blood*, 2005, 10(5): 3303 - 3311.
- [9] AGARWAL B, BHENDWAL S, HALMOS B, et al. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(8): 2223 - 2229.

[责任编辑:朱颖娜]