

辛伐他汀诱导裸鼠体内 K562 细胞凋亡过程中 NF- $\kappa$ B 通路的分子变化Molecular changes of NF- $\kappa$ B pathway in simvastatin-induced apoptosis of K562 cells of nude mice *in vivo*周定安<sup>1</sup>, 黄文芳<sup>2\*</sup>, 曾亚莉<sup>1</sup>, 刘文<sup>1</sup>, 胥国强<sup>1</sup>, 李林海<sup>3</sup>

(1. 重庆医科大学检验系, 临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室, 重庆 400016; 2. 四川省医学科学院, 四川省人民医院检验科, 成都 610072; 3 重庆医科大学第一临床学院, 重庆 400016)

**[摘要]** **目的:**探讨辛伐他汀在裸鼠体内引起的 K562 细胞 NF- $\kappa$ B 信号通路的分子变化, 以说明辛伐他汀是否依赖 NF- $\kappa$ B 信号通路参与 K562 细胞凋亡发生。**方法:**体外培养慢性粒细胞白血病细胞株 K562 细胞, 接种于 18 只 BALB/c-nu/nu 裸小鼠皮下, 构建移植瘤模型。随机分为 3 组, 每组 6 只。对照组腹腔注射生理盐水 0.2 ml, 两个处理组分别注射 0.2 g/L 的辛伐他汀 0.25 ml(0.05 mg) 和 0.4 ml(0.08 mg)。均隔日注射, 连续 6 次。采用 TUNEL 法检测 K562 细胞早期凋亡的变化, RT-PCR 检测 K562 细胞中 NF- $\kappa$ B 信号通路 IKK- $\beta$ 、I $\kappa$ B- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B1 mRNA 的差异表达。**结果:**不同剂量的辛伐他汀能够诱导裸鼠体内 K562 细胞发生明显的凋亡, 且高剂量组凋亡率高于低剂量组( $P < 0.01$ ); 不同剂量的辛伐他汀能够引起 IKK- $\beta$ 、I $\kappa$ B- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B1 mRNA 的表达下调( $P < 0.01$ )。**结论:**辛伐他汀可诱导 K562 细胞凋亡, 可能与 NF- $\kappa$ B 通路基因的表达下调有关。

**[关键词]** 辛伐他汀; K562 细胞; NF- $\kappa$ B 信号通路; 细胞凋亡**[中图分类号]** R 733.72**[文献标识码]** B**[文章编号]** 0258-879X(2007)10-1128-03

慢性粒细胞白血病(CML)是与费城染色体 t(9;22)有关的骨髓造血祖肿瘤性疾病。CML 细胞中表达的 Bcr-Abl 与 CML 细胞的转化活性有关, 能使细胞产生增殖失控和对化疗药物产生耐受。p21<sup>ras</sup> 和 PI3K 的上游激活可启动 Bcr-Abl 诱导的转化, 然而其下游靶标仍未完全清楚<sup>[1]</sup>。有研究<sup>[2]</sup>表明, Bcr/Abl 融合蛋白的表达可激活 NF- $\kappa$ B 的转录, 并促进 NF- $\kappa$ B 的核移位, NF- $\kappa$ B 是 Bcr-Abl 信号转导通路中的一个重要成分。在发生急变的 CML 中, Bcr-Abl 癌蛋白酪氨酸激酶的异常激活能够使细胞分化停滞、细胞增殖并对凋亡产生耐受。Bcr-Abl 能激活几种机制以抑制凋亡的发生<sup>[3]</sup>, 这些机制包括诱导 AKT、NF- $\kappa$ B、STAT 等的激活。他汀类药物对急性恶性肿瘤的疗效是不同的, 临床 I 期和 II 期实验结果显示该药疗效显著, 但是剂量限制性毒性(肌无力、肌痛、横纹肌溶解、厌食症、恶心、腹泻等)显示高剂量(>25 mg/kg)的摄入是患者难以忍受的<sup>[4]</sup>, 因为对急性肿瘤的肿瘤细胞而言他汀类药物促进凋亡的发生是受限的, 而且这种凋亡将以一种时间和剂量依赖的方式发生<sup>[5]</sup>。这些研究表明, 稳定的低剂量摄入方式将是一种有效的促进肿瘤细胞凋亡的有效策略。然而, 哪些分子的特征性变化将提示肿瘤细胞对他汀类药物的阳性反应仍不清楚<sup>[6]</sup>, 为了有效地应用这种新型的抗癌疗法, 很有必要阐明他汀类药物的抗癌作用机制。因此, 我们结合有关文献<sup>[7]</sup>, 通过观察和检测辛伐他汀体内作用于裸鼠身上 CML 组织的 K562 细胞凋亡变化以及 NF- $\kappa$ B 通路 mRNA 水平的变化, 研究辛伐他汀是否通过诱导 NF- $\kappa$ B 通路 mRNA 水平的变化参与 K562 细胞凋亡的发生。

## 1 材料和方法

1.1 药品、试剂、动物 辛伐他汀购自中国药品生物制品检定所, 以无水乙醇溶解辛伐他汀, 再加入与辛伐他汀等摩尔的 NaOH, 50℃ 水浴 2 h, 使不溶于水的内酯转化为水溶性的钠盐, 调 pH 至 7.20, 过滤除菌, 调整至 0.2 mg/ml, 供注射裸鼠用。

噻唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)、PI 和 RNase 购自美国 Sigma 公司; 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司。TUNEL 试剂盒为美国 Roche 公司产品。TRIzol 逆转录试剂 Rever TraAce 购自日本 Bioflux 公司, 目的基因和内参的引物由英骏生物技术有限公司合成, PCR 试剂由北京天为时代科技有限公司提供。健康裸鼠, 4 周龄大小, 购自四川大学华西医学中心, 并饲养于 SPF 标准的实验室。

1.2 细胞培养 K562 细胞以含 100 ml/L 灭活小牛血清, 100 万 U/L 青霉素, 80 万 U/L 链霉素的 RPMI 1640 培养液于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

1.3 CML 动物模型的构建 取对数生长期的 K562 细胞用 PBS 洗涤 2 次, 调整至  $5 \times 10^{10}$  /L, 于裸鼠右前腋下皮下注射 0.4 ml, 待接种 K562 细胞的 5 只裸鼠身上的肿瘤组织长到 2 cm<sup>3</sup> 左右时, 处死裸鼠。取肿瘤组织均匀地分成体积相当的小块组织进行另外 18 只裸鼠的皮下移植。待皮下移植的肿瘤组织长到 0.2 cm<sup>3</sup> 左右时, 将 18 只裸鼠(雌性 13 只, 雄性 5 只)分成 3 组, 每组 6 只: 对照组腹腔注射生理盐水 0.2 ml; 辛伐他汀低剂量组(T1 组)注射 0.2 g/L 的辛伐他汀 0.25 ml(0.05 mg), 高剂量组(T2 组)注射 0.2 g/L 的辛伐他汀 0.4 ml(0.08 mg)。均隔日注射, 连续 6 次。同时测定裸鼠肿瘤组织体积变化情况, 最后取下肿瘤组织称质量。

1.4 原位末端转移酶标记法(TUNEL)检测肿瘤组织细胞的凋亡率 按试剂盒说明书的步骤进行操作, 切片经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱二甲苯后, 水洗。用 PBS 洗片, 滴加混合反应液(酶溶液和标记液按 1:9 混合), 滴加 AP 标记的抗体,

**[基金项目]** 四川省卫生厅基金(303005002061011)。Supported by Foundation of Health Department of Sichuan Province(303005002061011)。

**[作者简介]** 周定安, 硕士, 技师。E-mail: zhoudinan@sina.com

\* Corresponding author. E-mail: HuangWF@21cn.com

37℃ 孵育 30 min. 冲洗, 滴加底物 AP, 25℃ 暗室反应 10 min, 再冲洗, 封片, 光镜下观察. 同时设立阴性对照和阳性对照.

1.5 RT-PCR 检测 IKK- $\beta$ 、I $\kappa$ B- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B1 mRNA 的差异表达 先将肿瘤组织称质量, 取质量相等的肿瘤组织进行冰上匀浆, 按照 Bioflux 公司的 Biozol 总 RNA 提取试剂说明书, 加入 1 ml TRIzol 提取总 RNA, Smart spec plus 紫外分光光度仪定量; RNA 逆转录合成 cDNA, 逆转录体系 40  $\mu$ l, 其中总 RNA 2  $\mu$ g, 42℃ 水浴 50 min, 然后进行 PCR 扩增. IKK- $\beta$ 、I $\kappa$ B- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B1 引物自行设计, 各基因引物序列见表 1.

表 1 扩增基因引物序列和 PCR 产物长度

基因	引物序列	PCR 产物长度 (bp)
IKK- $\beta$	F 5'-TGC CTC TGC GCT TAG ATA CC-3'	150
	R 3'-GAC CTA GTC CCG TCA GAA AC-5'	
NF- $\kappa$ B1	F 5'-TGA AGT GAT CCA GGC AGC CT-3'	150
	R 3'-CAC CTC TGT AGG AAG GCG TT-5'	
I $\kappa$ B- $\alpha$	F 5'-GGT CCC TTG TAG GAT CCA GT-3'	132
	R 3'-TCT ACC CCT CTG AAG TCG TG-5'	
GAPDH	F 5'-GGC CTC CAA GGA GTA AGA CC-3'	147
	R 3'-AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG-5'	

PCR 反应体系为: 总体积 25  $\mu$ l, cDNA 模板 3  $\mu$ l, 上下游引物各 1  $\mu$ l, 2 $\times$ master mix 12.5  $\mu$ l, 用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu$ l. 扩增条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 59℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min; 4℃ 30 min. 取 10  $\mu$ l 目的基因扩增产物和 4  $\mu$ l GAPDH 扩增产物进行 25 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察, 用 Quantity One 软件分析基因的表达.

1.6 统计学处理 组间均数比较采用 SPSS 10.0 软件进行单因素方差分析以及 LSD-*t* 检验.

## 2 结果

2.1 辛伐他汀诱导肿瘤组织细胞凋亡 凋亡细胞判断及评价标准: 根据凋亡细胞呈散在分布, 细胞核被染成蓝黑色即形态符合凋亡特征, 见图 1. 用 Image pro-plus 5.1 分析对照、T1 组、T2 组各 15 张片子的累计光密度值 (IOD). 对照组的 IOD 为 274.32  $\pm$  57.08, T1 组的 IOD 为 930.93  $\pm$  222.60, T2 组的 IOD 为 2 057.44  $\pm$  389.28, 三组比较有统计学差异 ( $P \approx 0.000$ ).

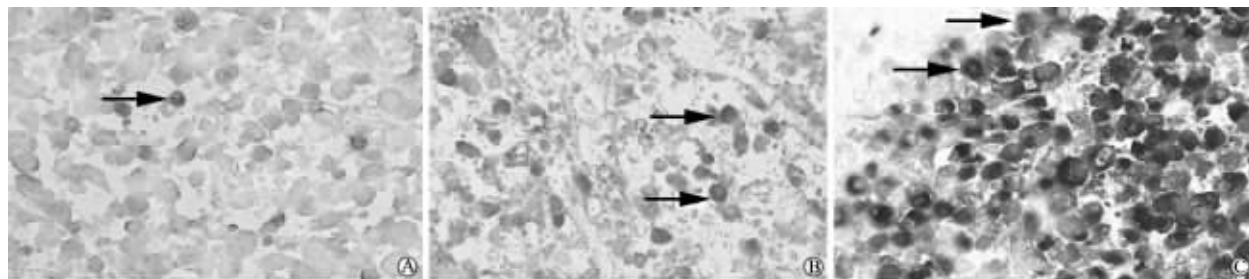


图 1 裸鼠 CML 组织 K562 细胞 TUNEL 结果 ( $\times 400$ )

A: 对照组; B: T1 组; C: T2 组;  $\rightarrow$ : 凋亡细胞

2.2 辛伐他汀所引起 CML 肿瘤组织细胞 IKK- $\beta$ 、I $\kappa$ B- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B1 mRNA 的差异表达 结果见图 2. 辛伐他汀能够引起 NF- $\kappa$ B 信号通路基因的差异表达. 对照组与 T1、T2 组 IKK- $\beta$  mRNA 的差异表达分别都具有统计学意义 ( $P \approx 0.000$ ), IKK- $\beta$  mRNA 在 T1、T2 组之间也有统计学意义 ( $P \approx 0.000$ ). T1 组和对照组之间及 T2 组和对照组之间

I $\kappa$ B- $\alpha$  mRNA 差异表达分别都有统计学意义 ( $P \approx 0.000$ ,  $P = 0.003$ ) 且 T1、T2 组之间 I $\kappa$ B- $\alpha$  mRNA 的差异表达也有统计学意义 ( $P \approx 0.000$ ). T1 组和对照组之间及 T2 组和对照组之间 NF- $\kappa$ B1 mRNA 差异表达明显 ( $P \approx 0.000$ ), 但 T1、T2 组之间表达差异无统计学意义 ( $P = 0.074$ ).

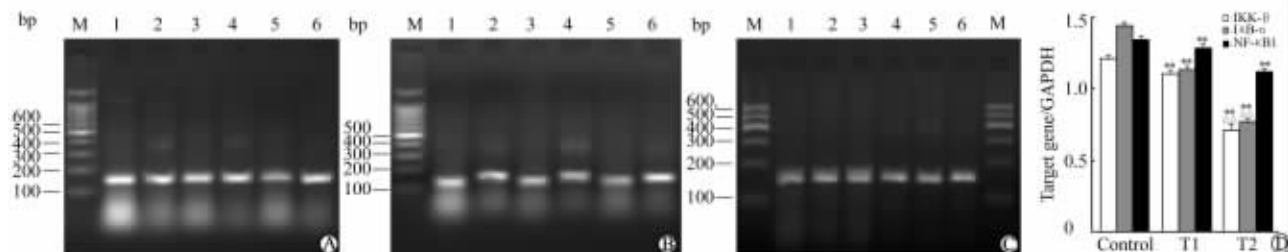


图 2 RT-PCR 结果

A: IKK- $\beta$  mRNA [M: Marker; 1, 3, 5 是对照组、T1 组和 T2 组的 IKK- $\beta$  (150 bp); 2, 4, 6 是对照组、T1 组和 T2 组的 GAPDH (147 bp)]; B: I $\kappa$ B- $\alpha$  mRNA [(M: Marker; 1, 3, 5 是对照组、T1 组和 T2 组的 I $\kappa$ B- $\alpha$  (132 bp); 2, 4, 6 是对照组、T1 组和 T2 组的 GAPDH (147 bp)]; C: NF- $\kappa$ B1 mRNA [M: Marker; 1, 2, 3 是 T2 组、T1 组、对照组的 NF- $\kappa$ B1 (150 bp); 4, 5, 6 是 T2 组、T1 组、对照组的 GAPDH (147 bp)]; D: RT-PCR 结果的统计分析比较 (\* \*  $P < 0.01$  与对照比较,  $\Delta \Delta P < 0.01$  与 T1 组比;  $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

### 3 讨论

NF- $\kappa$ B最显著的特征之一是诱导NF- $\kappa$ B激活的信号多样性,这些信号包括应激信号,感染或许多炎症前的细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1),所有这些信号都能引起IKK复合物的激活,IKK复合物包括IKK- $\alpha$ 和IKK- $\beta$ 两组激酶,它们能直接磷酸化I $\kappa$ B- $\alpha$ 和I $\kappa$ B- $\beta$ 。IKK复合物一旦激活就能在32位和36位丝氨酸残基上磷酸化I $\kappa$ B- $\alpha$ ,然后I $\kappa$ B- $\alpha$ 开始结合泛素而被降解,I $\kappa$ B- $\alpha$ 的降解暴露NF- $\kappa$ B二聚体的核定位信号,诱导NF- $\kappa$ B二聚体的快速核转移。事实上,新生成的I $\kappa$ B- $\alpha$ 能够通过核定位信号进入细胞核内,将NF- $\kappa$ B复合物从DNA上释放,通过其核输出信号(NES)将NF- $\kappa$ B二聚体输出到细胞质,这种机制有利于NF- $\kappa$ B的短暂激活<sup>[8]</sup>。我们的研究发现,辛伐他汀能够引起NF- $\kappa$ B信号通路的基因明显下调,这与辛伐他汀能够诱导裸鼠体内K562细胞发生凋亡,并随药物剂量的增加凋亡细胞明显增多的变化相一致,说明辛伐他汀可能依赖NF- $\kappa$ B信号通路参与K562细胞的发生。在K562细胞NF- $\kappa$ B信号通路中,辛伐他汀可能首先诱导IKK- $\beta$  mRNA的表达下调,使其对I $\kappa$ B- $\alpha$ 磷酸化作用减弱,I $\kappa$ B- $\alpha$ 不被激活,I $\kappa$ B- $\alpha$  mRNA也就不出现表达上调。同时,I $\kappa$ B- $\alpha$  mRNA的表达下调也使其对NF- $\kappa$ B1的激活转录作用减弱,NF- $\kappa$ B1 mRNA出现相应的表达下调。

NF- $\kappa$ B是细胞信号转导通路中的重要环节,也是预防癌症以及增强化疗敏感性的一个理想的治疗靶位点<sup>[9]</sup>。同时Lu等<sup>[1]</sup>的研究表明,K562细胞通过非典型蛋白激酶C- $\text{PKC}_{\text{L}}$ (一种Bcr-Abl的下游激酶)来发挥其对抗肿瘤药物凋亡的耐受。因此,结合我们实验中NF- $\kappa$ B1 mRNA的表达下调,NF- $\kappa$ B1很可能是辛伐他汀诱导K562细胞凋亡的一个重要作用靶点,同时辛伐他汀可能是通过作用NF- $\kappa$ B信号通路的一系列分子表达下调来诱导NF- $\kappa$ B1的表达下调的。

### [参考文献]

- [1] Lu Y, Jamieson L, Brasier A R, et al. NF- $\kappa$ B/RelA transactivation is required for atypical protein kinase C $_{\text{L}}$ -mediated cell survival[J]. *Oncogene*, 2001, 20: 4777-4792.
- [2] Deininger M W N, Goldman J M, Melo J V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2000, 96: 3343-3356.
- [3] George P, Bali P, Annavarapu S, et al. Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3[J]. *Blood*, 2005, 105: 1768-1776.
- [4] Kim W S, Kim M M, Choi H J, et al. Phase II study of high-dose lovastatin in patients with advanced gastric adenocarcinoma[J]. *Invest New Drugs*, 2001, 19: 81-83.
- [5] Dimitroulakos J, Thai S, Wasfy G H, et al. Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid leukemias [J]. *Leuk Lymphoma*, 2000, 40: 167-178.
- [6] Wu J, Wong W W, Khosravi F, et al. Blocking the Raf/MEK/ERK pathway sensitizes acute myelogenous leukemia cells to lovastatin-induced apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 6461-6468.
- [7] Denoyelle C, Albanese P, Uzan G, et al. Molecular mechanism of the anti-cancer activity of cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, on aggressive human breast cancer cells[J]. *Cell Sign*, 2003, 15: 327-338.
- [8] Kfoury Y, Nasr R, Hermine O, et al. Proapoptotic regimes for HTLV-I-transformed cells: targeting Tax and the NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(Suppl 1): 871-877.
- [9] Bharti A C, Aggarwal B B. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64: 883-888.

[收稿日期] 2007-03-20

[修回日期] 2007-06-12

[本文编辑] 尹 茶