丙戊酸钠对慢性粒细胞白血病细胞株K562增殖和凋亡的影响

张祥忠[1], 尹爱华[2], 许多荣[1], 朱小玉[1], 何 敏[1], 丁 倩[1], 李 娟[1], 陈运贤[1]
(1.中山大学附属第一医院血液科,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细胞株(K562细胞)增殖的影响及其可能机制。【方法】利用CCK-8法检测药物对细胞生长的影响;利用流式细胞仪检测药物处理后的细胞凋亡和细胞周期情况。【结果】VPA对K562细胞生长具有浓度-时间依赖性抑制作用;同时引起细胞凋亡增加(11.47% ± 0.25%),与正常对照组(4.77% ± 0.40%)比差异有统计学意义($P < 0.05$);G_0/G_1期细胞增多(82.30% ± 9.41%),S期细胞减少(12.88% ± 6.99%),细胞被阻滞在在G_0/G_1期($P < 0.05$)。【结论】VPA能够阻滞K562细胞于G_0/G_1期,最终抑制肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡。

关键词:丙戊酸钠; 慢性粒细胞白血病; K562细胞; 增殖; 凋亡
中图分类号:R733.72 **文献标识码**:A **文章编号**:1672-3554(2008)05-0562-04

Effects of Sodium Valproate on Proliferation and Apoptosis of Chronic Myeloid Leukemia Cell Line K562

ZHANG Xiang-zhong[1], YIN Ai-hua[2], XU Dong-rong[1], ZHU Xiao-yu[1], HE Min[1], DING Qian[1], LI Juan[1], CHEN Yun-xian[1]
(1.Department of Hematology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080; 2.Prenatal Diagnostic Center, Maternal and Children Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510010, China)

Abstract:【Objective】To investigate the effects of sodium valproate(VPA) on the proliferation of chronic myeloid leukemia cell line K562, and to explore possible mechanisms. 【Methods】K562 cells were treated with VPA. Cell proliferation was determined by CCK-8 assay. Cell apoptosis and cell cycle were analyzed by flow cytometry (FCM). 【Results】VPA inhibited the proliferation of K562 cells in concentration- and time-dependent manners. The apoptosis rate was significantly higher in the cells treated with VPA than in untreated cells[(11.47%±0.25%)*vs*(4.77%±0.40%), $P < 0.05$]. After treatment of VPA, cell cycle was arrested obviously at G_0/G_1 phase ($P < 0.05$). 【Conclusions】VPA could induce G_0/G_1 phase arrest, inhibit the proliferation and induce the apoptosis of K562 cells in vitro.

Key words: sodium valproate; chronic myeloid leukemia; K562 cell; proliferation; apoptosis
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2008,29(5):562-565]

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的情况[5]。所以为了克服耐药,临床上迫切需要开发新一代作用于*Bcr/Abl*

收稿日期:2008-04-25
基金项目:广东省医学科学技术基金(A2006193)
作者简介:张祥忠(1971-),男,安徽怀宁人,主治医师,E-mail:zxzxuer@yahoo.com.cn;陈运贤,通讯作者,教授,E-mail:cyx1228@21cn.com

融合基因的靶向药物或其他不同机制的抗肿瘤药物。本实验探讨了 VPA 对慢性粒细胞白血病急变期细胞株 K562 细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响。

1　材料和方法

1.1　主要试剂

VPA 购自法国赛诺菲安万特公司。1640 培养基为 Gibco 公司产品，胎牛血清(fetal calf serium，FCS) 购自杭州四季青生物公司。CCK-8 试剂盒为碧云天公司产品，AnnexinV-FITC 凋亡和细胞周期分析试剂盒为 Becton Dickinson 公司产品。K562 细胞株由中山大学肿瘤研究所提供。

1.2　方　法

1.2.1　*细胞培养*　K562 细胞用含 100 g/L 灭活 FCS 的 RPMI 1640 培养液重悬后，置于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养，每 2 ~ 3 天换液 1 次。

1.2.2　*CCK-8 方法分析细胞增殖活性*　取对数生长期的 K562 细胞，调整细胞终密度为 1×10^5/mL 接种于 96 孔板，分别加入 0.5、1、2、5、10 和 25 mmol/L 的 VPA，每孔总体积为 200 μL，另设空白孔和对照孔，每个浓度设 3 个复孔，于加药后 72 h 检测，每孔避光加入 20 μL CCK-8，继续孵育 2 h 后用酶标仪检测 A 值，波长 450 nm。实验重复 3 次，取平均值。以药物浓度为横坐标，生长抑制率为纵坐标，绘制浓度-生长抑制率曲线。生长抑制率=$[(A_{对照}-A_{空白})-(A_{实验}-A_{空白})]/(A_{对照}-A_{空白})\times 100\%$。另外，通过上述试验结果计算出 IC_{50} 值，然后以接近 IC_{50} 值的浓度的 VPA 处理 K562 细胞，分别于加药后 0，12，24，36，48，60 和 72 h 检测，并计算出生长抑制率，以分析作用时间对细胞增殖的影响。

1.2.3　*流式细胞仪检测细胞周期*　取对数生长期的 K562 细胞以 5×10^6/mL 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，700 mL/L 冷乙醇 4 ℃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，离心 5 min，弃去 PBS。用 1 mL PI 染液染色，4 ℃避光 30 min。上机检测，进行结果分析。

1.2.4　*流式细胞仪检测细胞凋亡*　取对数生长期的 K562 细胞以 5×10^6/mL 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 1×10^6 个/mL。加 10 μL 异硫氰酸荧光素(FTIC) 标记的连接素(Annexin) 和 10 μL 的 20 mg/ L 的普匹碘氨(PI) ，混匀，避光室温孵育 10 min。用结合缓冲液洗 1 次后用 Coulter Elite 流式细胞仪 (Coulter 公司) 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。

1.2.5　*统计分析*　用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计分析，结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较进行单因素方差分析，两组间均数比较采用 t 检验，$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结　果

2.1　VPA 对 K562 细胞的增殖抑制作用

不同浓度(0.5 ~ 25 mmol/L)的 VPA 均可抑制 K562 细胞生长，差异有统计学意义(F=15.32，$P < 0.05$)；并且 VPA 对 K562 细胞生长的抑制作用在一定浓度范围内呈浓度依赖性(图 1)。用接近 IC_{50} 浓度(2 mmol/L)的 VPA 处理 K562 细胞不同时间后，结果显示随着孵育时间延长其生长抑制作用明显增强，差异有统计学意义(F=103.77，$P < 0.05$)。这反映 VPA 对 K562 细胞生长的抑制作用在一定时间内也具有时间依赖性(图 2)。

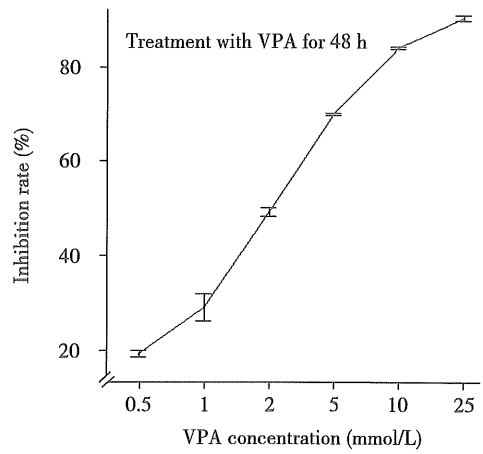


图 1　VPA 处理后浓度-细胞生长抑制率曲线。

Fig.1　Inhibitory effect of sodium valproate (VPA) with different concentration on proliferation of K562 cell

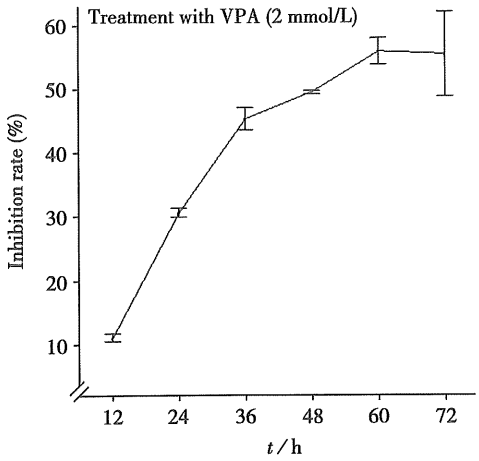


图2 VPA处理后的时间-细胞生长抑制率曲线

Fig.2 Inhibitory effect of sodium valproate (VPA) within different time on proliferation of K562 cells

2.2 流式细胞仪检测K562细胞凋亡

用2 mmol/L的VPA处理K562细胞在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处理组细胞凋亡率高于未处理对照组，差异有统计学意义($t = 24.375$, $P < 0.05$，表1)。

2.3 流式细胞仪分析K562细胞周期

用2 mmol/L的VPA作用K562细胞48 h后，细胞周期进程被阻滞，G_0/G_1期细胞明显较未处理组增加($t = 7.561$, $P = 0.002$)，而S期细胞较未处理组明显减少($t = 8.70$, $P = 0.001$)，差异均有统计学意义(表1，图3)。

3 讨 论

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[6]。近年来研究表明，表观遗传学改变在肿瘤发生中扮演一个重要角色。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[7]。HDACI可以通过抑制HDAC活性，诱导组蛋白高乙酰化，调节基因表达，从而发挥抗肿瘤效应[8]。目前已有多种HDACI进入了Ⅰ/Ⅱ期临床试验。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，

表1 VPA处理48 h后细胞凋亡率和各期细胞比率

Table 1 Proportion of apoptotic cell and cell cycle distribution of K562 cells treated with VPA for 48 h (%)

	G_0/G_1 Phase	S Phase	G_2/M Phase	Apoptosis rate
VPA group	82.30 ± 9.41[1)]	12.88 ± 6.99[1)]	4.07 ± 3.61	11.47 ± 0.25[1)]
Control group	40.13 ± 2.12	50.42 ± 2.65	9.45 ± 0.54	4.77 ± 0.40

1) $P < 0.05$, vs.control

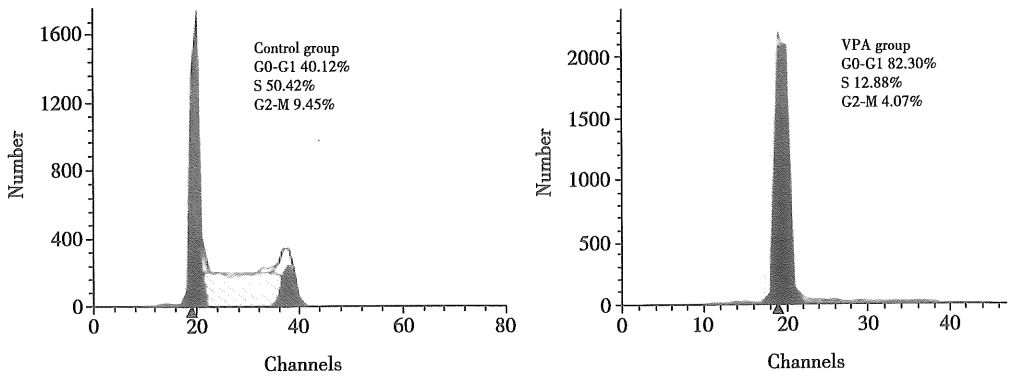


图3 流式细胞仪检测细胞周期的结果

Fig.3 Results of cell cycle detected by FCM

其在抗癫痫有效治疗浓度时也表现出很强的 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[4,9];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]。HDACI 的应用标志着一种全新的肿瘤治疗途径,因此研究 HDACI 是通过何种机制来发挥抗肿瘤作用有着积极的实际意义。

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 P^{210} 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,但是在加速期和急变期患者中仍然观察到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 P^{210} 融合蛋白的靶向药物或其他不同机制的抗肿瘤药物。

本实验结果证实了传统的抗癫痫药物同时也是一种 HDACI 的 VPA 对 K562 细胞的生长具有剂量-时间依赖性的抑制作用;同时 2 mmol/L 的 VPA 作用 48 h 后 K562 细胞凋亡较对照组增加。这说明 VPA 可能是通过诱导细胞凋亡来抑制 K562 细胞增殖的。VPA 引起细胞凋亡的具体分子机制现在尚未完全阐明。Caspase-3 是凋亡效应分子之一,其可以被多种内外源性凋亡诱导因子激活从而引起细胞发生凋亡。有研究发现 VPA 可引起多种白血病细胞株发生 caspase-3 依赖性的凋亡,同时它还可以通过不依赖 caspase-3 活化的途径引起细胞凋亡[11]。所以我们推测其引起 K562 细胞凋亡的分子机制也有可能比较复杂,需要进一步研究。

此外,现在发现 HDACI 对肿瘤细胞具有阻滞周期进程的作用。Sakura 等[12]将 VPA 和 SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid)这两种 HDACI 作用于 14 种淋巴系统肿瘤细胞株后,细胞发生了 G_1 或 G_2/M 阻滞及凋亡,并且与细胞周期调节有关的 p53、p21 和 p27 基因出现表达上调。本实验中VPA 处理后 G_0/G_1 期细胞比例增加,同时 S 期细胞比例下降。这说明 VPA 可以使 K562 细胞周期进程受到阻滞。其分子机制也可能是上调 p^{21WAF1} 等细胞周期调节基因的表达,而增多的 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。

本实验结果表明,VPA 能够抑制慢性粒细胞白血病细胞株 K562 细胞的生长,并可诱导其凋亡和细胞周期阻滞,这为慢性粒细胞白血病患者的治疗提供了新的途径及一定的理论依据。

参考文献:

[1] Takai N, Desmond JC, 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 growth arrest, 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] 薛红漫,李文益,郭海霞,等. 丙戊酸诱导白血病细胞凋亡机理的实验研究[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(12):894-898.

[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] 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.

[7] 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.

[8] Weidle U H, Grossmann A. Inhibition of histone deacetylases: a new strategy to target epigenetic modifications for anticancer treatment [J]. Anticancer Res, 2000, 20(3A):1471-1485.

[9] 王重韧,黄　强. 脂肪酸类药物诱导分化脑胶质瘤分子机制研究[J].中华神经医学杂志,2005,4(2):197-200.

[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] Kawagoe R, Kawagoe H, Sano K. Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspase-dependent and-independent apoptotic signaling pathways [J]. Leuk Res, 2002, 26(5):495-502.

[12] Sakura S, Takashi K, Norihiko K, et al. Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoidcancer cell lines [J]. Exp Hematol, 2005,33(1):53-61.

(编辑　孙慧兰)