

硫利达嗪增强伊马替尼对慢性粒细胞白血病 细胞 K562 的抑制作用及机制

牛 伶¹ 夏雷鸣¹ 刘 柳¹ 李 坦¹ 李 斌¹ 鲍扬漪¹ 刘 欣²

摘要 目的 观察硫利达嗪 (THZ)、伊马替尼 (IM) 单药及联合对人慢性粒细胞白血病 (CML) 细胞 K562 的诱导作用, 并探讨其机制。方法 采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法测定 THZ、IM 单药及联合对细胞的抑制作用, 计算两药协同指数 (CI)。检测 THZ、IM 单药及联合对细胞凋亡的影响。Western blot 法检测凋亡蛋白 Cleaved-Bid、Procaspase 3, 凋亡调节蛋白 Bcl-2、Bax、pPI3K、pAKT 表达的变化。结果 THZ 16 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h 后 K562 细胞增殖明显抑制, 低剂量细胞毒性作用不明显。IM 低剂量即有较强的细胞毒性作用, 两药联合后经计算有较好的协同作用。根据 CI 值选定药物浓度作用 K562 细胞 24 h, 流式细胞术结果显示, THZ 单药组无明显细胞凋亡, IM 单药组、IM 联合 THZ 组均存在不同程度的细胞凋亡, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。Western blot 法结果显示各实验组细胞内 Cleaved-Bid 表达量增加, Procaspase 3 表达量下降。抗凋亡蛋白 Bcl-2、pPI3K、pAKT 下调, 促凋亡蛋白 Bax 表达明显上调, 各实验组与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 低剂量 THZ 联合 IM 对 CML 细胞 K562 具有显著的增殖抑制作用, 其作用较 IM 单用作用强, THZ 有明确增敏 IM 的作用。与 IM、THZ 单药组比较, IM 联合 THZ 组 Cleaved Bid 表达量上调, Procaspase 3 表达量下降, 其杀伤机制可能与线粒体通路及抑制 PI3K-AKT 通路均有关。

关键词 慢性粒细胞白血病; 硫利达嗪; 伊马替尼; 细胞凋亡; 凋亡蛋白; 凋亡调节蛋白

中图分类号 R 737.9; R 971.41

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)11-1597-06

慢性粒细胞白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) 是一种常见恶性血液系统肿瘤。伊马替尼 (imatinib, IM) 作为 CML 治疗的一线方案, 其疗效已得到广泛认可^[1], 分子缓解率 (molecular remission, MR) 达到 90% 以上^[2], 持续治疗可使大多数患者长期维持在慢性期, 生存期大大延长。80% 以上

的患者可以存活 8 年, 年死亡率低于 2%^[3]。但随着 IM 治疗经验的积累, 其局限性也被广泛报道。首先, IM 不能清除患者体内的白血病干细胞 (leukemia stem cells, LSCs), 目前认为 LSCs 是 CML 复发的根源^[4]。其次, 未获得完全分子学缓解 (complete molecular remission, CMR) 的患者在停药后出现复发的比例可能超过 60%, 甚至达到 100%^[5]。目前大量 IM 耐药病例被报道, 但是具体机制目前尚不明确^[6]。寻找与 IM 有协同作用的药物, 发挥更好的治疗效果成为新方向。多巴胺受体抑制剂硫利达嗪 (thioridazine, THZ) 被广泛用于治疗精神类疾病和抗耐药结核菌感染。近来 THZ 抗多种恶性肿瘤方面的作用被大量报道^[7-8]。该研究旨在观察 THZ、IM 对 CML-K562 细胞的效应, 并对两药协同在凋亡中的作用进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 680 全自动酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司); 8000DH 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司); CKX41 型倒置显微镜 (日本 OLYMPUS 公司)。

1.1.2 实验药物与细胞株 THZ (美国 Gibco 公司), IM (英国 Kinasechem 公司), K562 细胞株由安徽医科大学第三附属医院血液肿瘤科实验室传代保存。

1.1.3 主要试剂 1640 培养基、青霉素-链霉素双抗、二甲基亚砜 (DMSO)、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 流式抗体 Annexin V-FICT/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 检测试剂盒 (美国 Sigma 公司); 小鼠抗人 Cleaved-Bid、Procaspase 3、Bcl-2、Bax、pPI3K、pAKT 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 K562 细胞培养 细胞株培养于 10% 灭活胎牛血清的 1640 培养液中, 置于饱和湿度、5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中。实验前细胞培养 2 周。

1.2.2 THZ、IM 单药和联合 K562 细胞株细胞光

2015-07-01 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1508085MH195)

作者单位: ¹安徽医科大学第三附属医院 (合肥市第一人民医院) 血液肿瘤科, 合肥 230061

²安徽省立医院血液内科, 合肥 230001

作者简介: 牛 伶, 女, 副主任医师;

鲍扬漪, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 761760565@qq.com

镜、细胞活性率、细胞凋亡 细胞光镜: 取对数生长期 CML 细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 重复 2 次, 调整细胞数量为 4×10^4 个/ml, 100 μ l/孔种至 96 孔板, 对照组和 THZ 单药组、IM 单药组、IM 联合 THZ 组均设 3 个复孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。实验组设计如下: THZ 取 0、2、4、8、16 μ mol/L 加入 THZ 单药组、IM 取 0、0.1、1、10、100 μ mol/L 加入 IM 单药组, 16 μ mol/L THZ 联合 0、0.1、1、10、100 μ mol/L IM 作为联合用药组, 对照组加入培养基, 分别培养 0、24、48 h, 倒置显微镜下观察细胞形态学变化。

细胞抑制率: 每孔加入 10 μ l MTT (5 g/L), 避光孵育 4 h, 吸弃上清液, 每孔加入 100 μ l DMSO, 室温振荡 10 min, 以酶标仪在 490 nm 双波长检测相应的吸光度 (absorbance, A), 细胞抑制率 (%) = 死细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数) \times 100%。实验重复 3 次。

细胞凋亡: 取对数生长期 K562 细胞, 调整细胞数量至 3×10^4 个/ml, 每孔 2 ml 种于 6 孔板, 实验组 3 孔, 对照组 1 孔。THZ、IM 分别以 2 μ mol/L、1 μ mol/L 及联合加入实验组孔, 对照组换液不加药, 收集细胞 (包括上清液中细胞), 预冷的 PBS 洗涤 2 次, 调整细胞密度为 1×10^6 /ml, 取 60 μ l 悬液加入流式管中, 以 10 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI 标记, 震荡混匀后室温避光孵育 15 min, PBS 洗涤 2 遍后加入 400 μ l 流式鞘液, 以流式细胞术检测细胞凋亡程度。Annexin V-FITC 和 PI 标记的细胞即为凋亡细胞。细胞凋亡率 (%) = 凋亡细胞数 / 总细胞数 \times 100%。实验重复 3 次。

1.2.3 THZ、IM 联合 PI3K-AKT-mTOR 信号通路蛋白 Western blot 分析 取对数生长期细胞, 调整细胞数目 3×10^4 个/ml 培养于 6 孔板中, 每孔 2 ml, 实验组 3 孔, 对照组 1 孔。37 $^{\circ}$ C 孵育过夜, THZ、IM 分别以 2 μ mol/L、1 μ mol/L 及联合加入实验组孔, 培养 24 h, PBS 洗涤 2 遍, 收集细胞。蛋白裂解液冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 30 min 提取总蛋白。BCA 法蛋白定量后加入 5 \times Loading Buffer, 100 $^{\circ}$ C 变性 15 min, 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 按照 30 μ g/孔上样, 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 恒压 80 V 电泳至分离胶, 恒压 120 V 至电泳结束, 电转印至 PVDF 膜上 (220 mA、120 min), TBST 配制 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 加入小鼠抗 Bcl-2 (1 : 1 000)、小鼠抗 Bax (1 : 1 000)、小鼠抗 pPI3K (1 : 1 000)、小鼠抗 pAKT (1 : 1 000) 一抗室温孵育 1 h, TBST 冲洗 3 次, 每次 10 min, 辣根过氧化酶标记山羊抗小鼠二

抗 (1 : 5 000) 室温孵育 1 h, TBST 冲洗 3 次, 每次 10 min, ECL 显影, 暗室曝光成像。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有数据均重复 3 次, 取中位数为实验数据, 采用 CompuSyn 软件计算药物协同指数 (combination index, CI), CI < 1 为具有协同效应。组间比较采用单因素方差分析及 SNK- q 检验。

2 结果

2.1 IM、THZ 单药及联合对 K562 细胞凋亡的影响 MTT 实验结果显示: 2、4、8 μ mol/L THZ 对 K562 细胞影响小, 药物作用 24 h 后抑制率 (%) 分别为 6 ± 5 、 7 ± 2 、 9 ± 5 , 16 μ mol/L THZ 处理 K562 细胞 24 h 的抑制率 (%) 约为 65 ± 2 , 处理 48 h 后抑制率 (%) 为 97 ± 1.5 ; 0.1、1、10 和 100 μ mol/L IM 对 K562 细胞抑制率均有明显影响, 0.1、1、10、100 μ mol/L IM 处理 K562 细胞 24 h 的抑制率 (%) 分别为 50 ± 12 、 70 ± 11 、 74 ± 14 、 85 ± 11 ; 16 μ mol/L THZ 联合不同浓度的 IM 对 K562 细胞均有明显的抑制作用。THZ 单药 16 μ mol/L 作用 24、48 h 与对照组比较差异均有统计学意义 ($F = 170.008$, $F = 471.222$; $P < 0.01$)。IM 单药各种浓度作用 24、48 h 与对照组比较差异均有统计学意义 ($F = 24.906$, $F = 26.983$; $P < 0.01$)。IM 联合 THZ 中 16 μ mol/L THZ + 1 μ mol/L IM、16 μ mol/L THZ + 10 μ mol/L IM 两组作用 24、48 h 与对照组比较差异均有统计学意义 ($F = 9.025$, $F = 5.429$; $P < 0.01$)。见图 1。THZ、IM 单加及联合作用 K562 细胞 24 h 的杀伤效应, 经 CompuSyn 软件计算两者的 CI, 结果显示两者具有良好的协同效应。见表 1、图 2。根据 CI 值, 选定 2 μ mol/L THZ 和 1 μ mol/L IM 进行单药联合实验, 药物作用 24 h。细胞光镜 ($\times 200$) 下观察, THZ、IM 单药及联合作用 24 h 后, 对照组细胞轮廓明确、清楚, 生长旺盛, 而随着药物浓度的增加, 细胞明显轮廓不清、体积缩小、边缘透亮、间隙增加。见图 3。流式细胞仪结果显示 2 μ mol/L THZ、1 μ mol/L IM 及联合作用 24 h 后 K562 的抑制率 (%) 分别为 12.4 ± 5.7 、 71.75 ± 4.9 、 87.31 ± 6.4 。IM 联合 THZ 组与 IM 单药、THZ 单药组比较, 差异有统计学意义 ($F = 192.4$, $P < 0.01$)。见图 4。

2.2 IM 联合 THZ 作用 K562 细胞株凋亡相关蛋白表达变化 凋亡蛋白 Cleaved-Bid、Procaspase-3 活性检测结果显示, 药物作用 24 h 后, 不同药物组

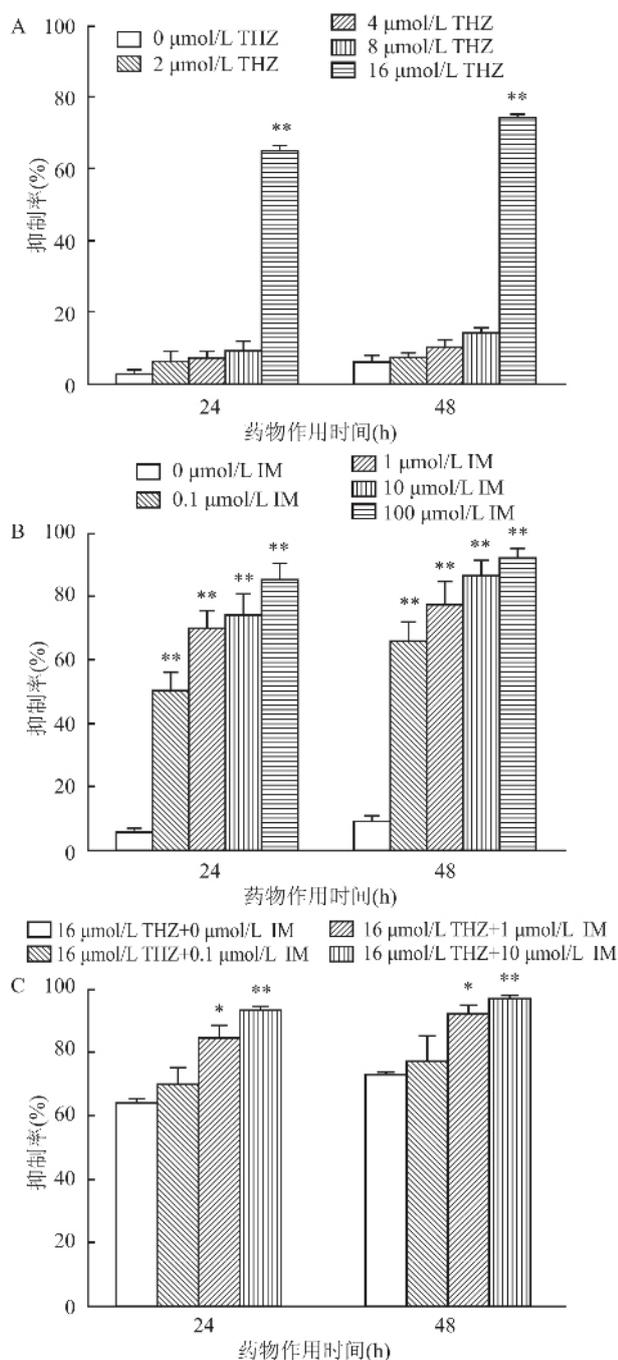


图1 THZ、IM 单药、THZ 联合 IM 作用 24、48 h 后对 K562 细胞的抑制作用

A、B: 各浓度 THZ、IM 作用 24、48 h 对 K562 细胞的抑制作用; C: 16 μmol/L THZ 联合不同浓度 IM 作用 24、48 h 对 K562 细胞的抑制作用; 与相应对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

K562 的 Cleaved-Bid、Procaspase-3 表达水平较对照组出现差异, THZ 组较对照组 Cleaved-Bid 表达升高、Procaspase 3 表达下降, IM 单药、IM 联合 THZ 组变化更明显。方差分析 F 值, Cleaved-Bid: $F = 16.515$, Procaspase 3: $F = 62.859$ 。组间差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 5。凋亡调节蛋白在不同药物组中药物作用 24 h 后, Western blot 检测结果

表1 THZ、IM 单药和联合作用 K562 细胞 24 h 的毒性效应值及对应 CI

IM 剂量	IM 毒性	THZ 剂量	THZ 毒性	药物联合 毒性	CI
2.0	0.06	0.1	0.50	0.54	0.860 33
2.0	0.06	1.0	0.70	0.74	0.229 27
2.0	0.06	10	0.74	0.79	0.577 70
4.0	0.07	0.1	0.50	0.56	0.726 19
4.0	0.07	1.0	0.70	0.78	0.162 51
4.0	0.07	10	0.74	0.81	0.395 56
8.0	0.09	0.1	0.50	0.57	0.816 41
8.0	0.09	1.0	0.70	0.88	0.118 79
16.0	0.65	0.1	0.50	0.7	0.537 68
16.0	0.65	1.0	0.70	0.85	0.284 12
16.0	0.65	10	0.74	0.94	0.140 62

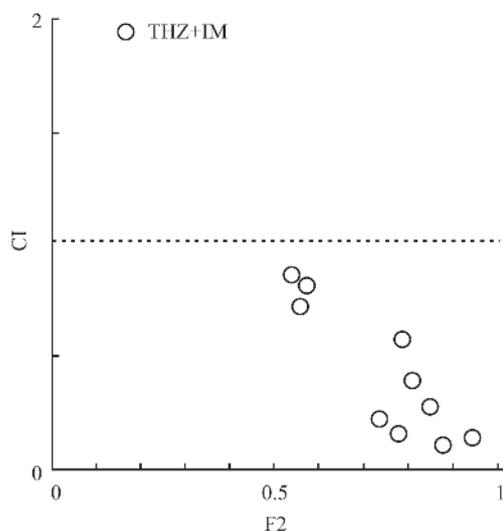


图2 THZ、IM 联合作用 K562 细胞 24 h 的协同曲线

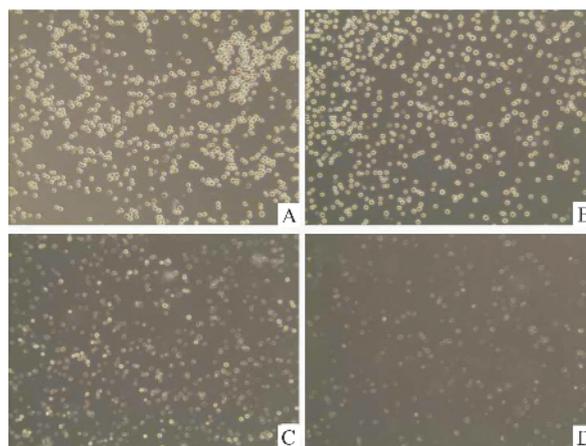


图3 THZ、IM 单药及联合作用 24 h 对 K562 细胞形态学的影响 SP × 200

A: 对照组; B: 2 μmol/L THZ 组; C: 1 μmol/L IM 组; D: 2 μmol/L THZ + 1 μmol/L IM 组

显示, 各实验组线粒体通路抗凋亡蛋白 Bcl-2 下调、促凋亡蛋白 Bax 表达明显上调, PI3K-AKT 通路中,

pPI3K、pAKT 各实验组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 6。

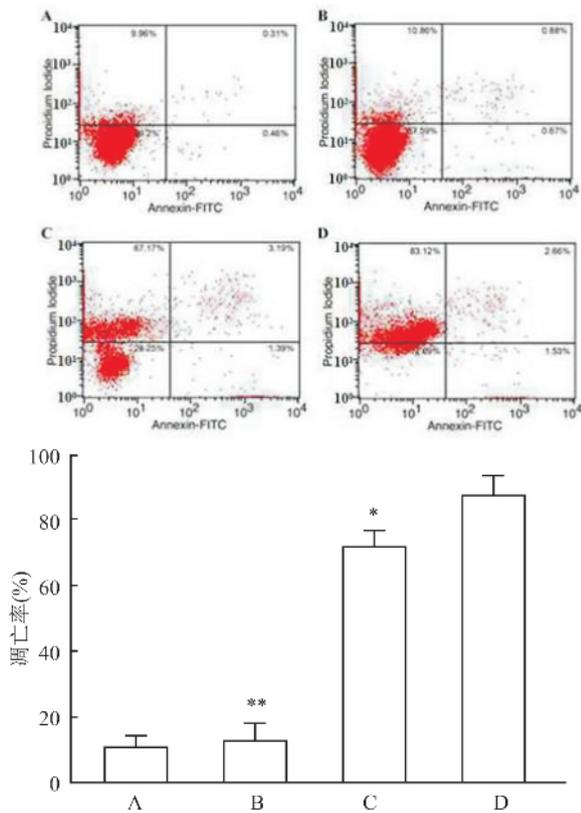


图 4 THZ、IM 单药及联合作用 24 h 后对 K562 细胞凋亡的影响
A: 对照组; B: 2 μmol/L THZ 组; C: 1 μmol/L IM 组; D: 2 μmol/L THZ + 1 μmol/L IM 组; 与 D 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

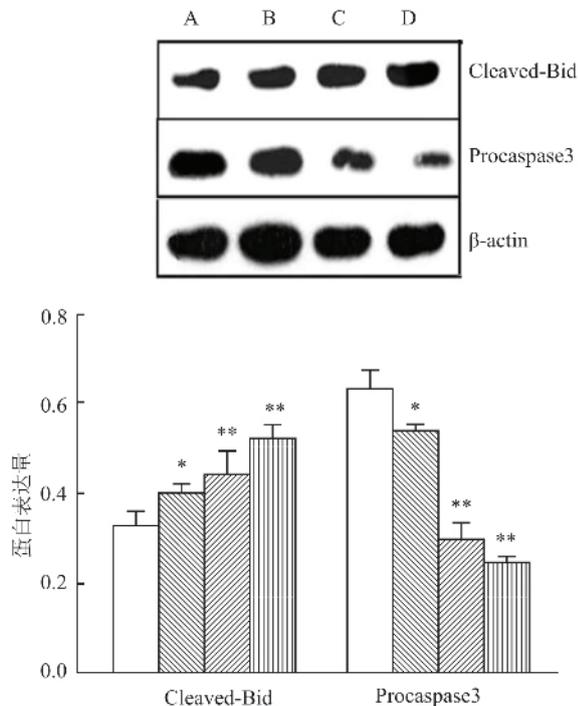


图 5 THZ、IM 单药及联合作用 24 h 后 K562 细胞凋亡蛋白的变化
A: 对照组; B: 2 μmol/L THZ 组; C: 1 μmol/L IM 组; D: 2 μmol/L THZ + 1 μmol/L IM 组; 与相应对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

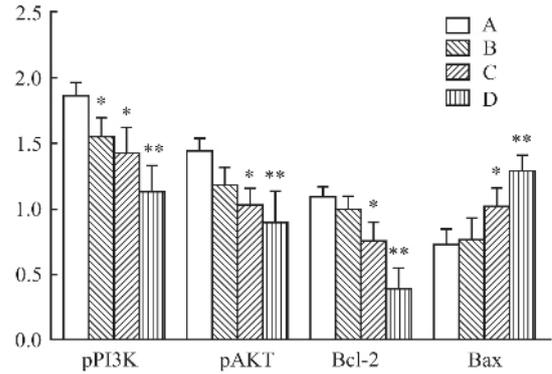
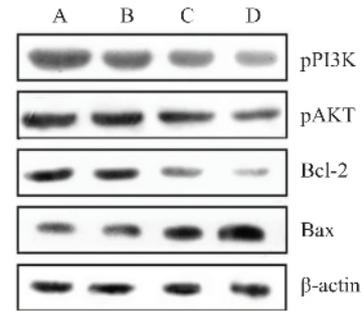


图 6 THZ、IM 单药及联合作用 24 h 后对 K562 细胞凋亡调节蛋白的影响

A: 对照组; B: 1 μmol/L THZ 组; C: 2 μmol/L IM 组; D: 1 μmol/L THZ + 2 μmol/L IM 组; 与相应对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

Druker et al^[1]指出在 IM 一期试验中,接受 IM 治疗 4 周后 54 例患者中有 53 例获得完全的血液学反应(complete hematologic responses ,CHR) ,IM 治疗超过一年的患者 96% 为 CHR。Kantarjian et al^[9]在二期试验中,532 例每天接受 400 mg IM 治疗的患者在中位随访时间 18 个月内,95% 获得 CMR,89% 疾病未进展。但临床上耐药以及严重不良反应的发生越来越多^[10],且现主流观点认为 IM 并不能清除骨髓中 CML-LSCs,而只是导致疾病复发的根源^[4]。寻找新的能够作用于 CML-LSCs 的药物成为 CML 治疗的新方向。目前 THZ 的杀伤作用研究较多,该药可作用于广泛类别的肿瘤,特别是对肿瘤干细胞有杀伤作用,但不会影响正常干细胞^[11]。THZ 杀伤肿瘤细胞的机制尚未完全明确,多条与凋亡有关的通路可能与该机制有关^[12]。线粒体凋亡途径是凋亡的重要途径,激活后线粒体膜通透性增高导致细胞凋亡。其中 Bcl-2 超家族蛋白关键因子,Bcl-2 家族中的 Mcl-1 是抗凋亡蛋白,可维持线粒体膜的稳定性,Bax 是促凋亡蛋白,正常时 Bax 和 Bcl-2 可形成异源二聚体共同维持线粒体膜稳定性,出现病理

变化时 Bax-Bcl-2 二聚体解离, Bax 同源二聚体增多, 形成膜孔道, 改变线粒体膜电位, 促凋亡因子被释放到细胞质中, 导致细胞凋亡。PI3K-AKT 通路诱导细胞的增殖、分化, 避免细胞发生凋亡, 此信号通路作为细胞生长增殖的重要转导通路, 在维持细胞恶性生物学特性中起重要作用^[13]。

本研究显示, 低剂量 THZ 对 K562 细胞无明显抑制作用, IM 单药细胞毒性作用较强, Compusyn 软件分析 CI 显示低剂量 THZ 联合低剂量 IM 有良好的协同作用。关于低剂量 THZ 和 IM 作用 K562 细胞凋亡作用, 实验中以 Cleaved-Bid、Procaspase 3 蛋白加以验证: 低剂量 THZ 作用于 K562 细胞 24 h 后 Cleaved-Bid、Procaspase 3 蛋白表达无明显变化, 低剂量 IM、低剂量 IM 联合 THZ 作用 K562 细胞 24 h 后 Cleaved-Bid、Procaspase 3 表达量均有变化, 但联合后 Cleaved-Bid、Procaspase 3 蛋白表达量变化更明显。本研究进一步分析了 THZ、IM 单药及联合作用于 K562 细胞的线粒体、PI3K-AKT 凋亡通路调节蛋白的表达量以期分析其可能的作用机制。结果显示低剂量 IM 单药及低剂量 IM 联合 THZ 在两条通路中均起作用, 两条通路凋亡相关蛋白均上调, 抑凋亡相关蛋白均下调。

参考文献

- [1] Druker B J, O'Brien S G, Cortes J, et al. Chronic myelogenous leukemia [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2002, (1): 111-35.
- [2] Druker B J, Sawyers C L, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome [J]. *N Engl J Med* 2001, 344(14): 1038-42.
- [3] Hochhaus A, O'Brien S G, Guilhot F, et al. Six-year follow-up of

- patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia [J]. *Leukemia* 2009, 23(6): 1054-61.
- [4] Peng C, Chen Y, Li D, et al. Role of Pten in leukemia stem cells [J]. *Oncotarget* 2010, 1(2): 156-60.
 - [5] Rea D, Rousselot P, Guilhot F, et al. Discontinuation of second generation tyrosine kinase inhibitors in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with stable undetectable bcr-abl transcripts [J]. *Blood (ASH annual Meeting Abstracts)* 2012, 120: 916.
 - [6] Alves R, Fonseca A R, Gonçalves A C, et al. Drug transporters play a key role in the complex process of Imatinib resistance *in vitro* [J]. *Leuk Res* 2015, 39(3): 355-60.
 - [7] Min K J, Seo B R, Bae Y C, et al. Antipsychotic agent thioridazine sensitizes renal carcinoma Caki cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated inhibition of Akt signaling and downregulation of Mcl-1 and c-FLIP(1) [J]. *Cell Death Dis* 2014, 5(2): e1063.
 - [8] Fox G, Popanda O, Edler L, et al. Preferential inhibition of DNA polymerases α , δ , and ϵ from Novikoff hepatoma cells by inhibitors of cell proliferation [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996, 122(2): 78-94.
 - [9] Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia [J]. *N Engl J Med* 2002, 346(9): 645-52.
 - [10] Rostami G, Hamid M, Yaran M, et al. Incidence and clinical importance of BCR-ABL1 mutations in Iranian patients with chronic myeloid leukemia on imatinib [J]. *J Hum Genet* 2015, 60(5): 253-8.
 - [11] Ke X Y, Lin Ng V W, Gao S J, et al. Co-delivery of thioridazine and doxorubicin using polymeric micelles for targeting both cancer cells and cancer stem cells [J]. *Biomaterials* 2014, 35(3): 1096-108.
 - [12] Kang S, Dong S M, Kim B R, et al. Thioridazine induces apoptosis by targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in cervical and endometrial cancer cells [J]. *Apoptosis* 2012, 17(9): 989-97.
 - [13] 耿英华, 武文娟, 夏瑞祥, 等. LY294002 靶向抑制 PI3K/Akt 信号通路干预 K562 细胞增殖的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(3): 295-9.

Inhibition and mechanism of imatinib for chronic myeloid leukemia enhanced by thioridazine

Niu Ling¹, Xia Leiming¹, Liu Liu², et al

¹Dept of Hematology and Oncology, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230061;

²Dept of Hematology Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001

Abstract Objective To study the effects of thioridazine (THZ) and imatinib (IM) on chronic myeloid leukemia (CML) cells (K562 cells). **Methods** The K562 cells were treated by different concentrations of IM (0, 0.1, 1, 10 and 100 $\mu\text{mol/L}$) and THZ (0, 2, 4, 8 and 16 $\mu\text{mol/L}$) for 24 and 48 h. The effects of each drug on the inhibition of cells were examined by the MTT assay. Then K562 cells were treated by different concentrations of IM (2, 4, 8 and 16 $\mu\text{mol/L}$) and THZ (0.1, 1 and 10 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h alone or in combination. The inhibition of cells

盐酸帕罗西汀对卵巢切除大鼠学习记忆能力及血清雌激素水平的影响

谢双燕* 胡佳佳* 周伯荣 刘远波

摘要 目的 探讨抗抑郁剂盐酸帕罗西汀对卵巢切除大鼠学习记忆能力、血清雌激素水平及大鼠海马雌激素受体表达的影响。方法 采用 SD 雌鼠双侧卵巢切除(OVX)作为雌激素波动引起的抑郁与认知障碍模型,用 Morris 水迷宫实验来测试大鼠的学习记忆功能。实验共分为正常对照组、OVX 对照组、OVX 药物组。予 5-羟色胺重摄取抑制剂类药物:盐酸帕罗西汀 10 mg/(kg·d) 干预 4 周。采用 ELISA 法测量 SD 大鼠血清黄体生成素、卵泡刺激素、雌激素。免疫组化法检测大鼠海马雌激素受体 α (ER α) 和雌激素受体 β (ER β) 的阳性细胞表达数。结果 ① Morris 水迷宫实验中,OVX 对照组和 OVX 药物组的逃避潜伏期明显缩短,停留在平台

时间百分比明显增加。② OVX 药物组的血清雌激素较 OVX 对照组明显增加($P < 0.05$)。③ 药物组与非药物组的 ER α 、ER β 表达无明显差异。结论 帕罗西汀增加 OVX 大鼠血清雌激素水平和改善学习记忆能力,而对海马 ER α 、ER β 表达无明显影响。

关键词 卵巢切除;学习记忆;雌激素;雌激素受体

中图分类号 R 741.05

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)11-1602-04

2015-07-25 接收

基金项目:广东省科技计划项目(编号:2011B060300027);广州医科大学附属第三医院项目(编号:2012Y01)

作者单位:广州医科大学附属第三医院神经内科,广州 510150

作者简介:谢双燕,女,医师;

周伯荣,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:zhoubr8@aliyun.com

* 对本文具有同等贡献

抑郁和认知障碍共同发生的现象或者说共病的发病率较高。Meta 分析显示老年抑郁、轻度认知障碍及老年痴呆可能是一个临床疾病的连续症状^[1]。目前,关于抑郁与认知障碍共病的具体分子机制尚不清楚,但不管是抑郁还是认知障碍,女性的发病率远远高于男性,所以雌激素作为区别于男女性别的重要激素而被关注。雌激素对情感和认知都有一定的影响,文献^[2]报道雌激素水平的改变可以引起抑郁与认知障碍,雌激素也有治疗女性抑郁,改善女性认知障碍的作用。雌激素在大脑功能实现的信号通

was examined by the MTT assay. The combinational index (CI) was calculated by the CompuSyn software. Next K562 cells were treated by IM of 1 $\mu\text{mol/L}$ and THZ of 2 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h alone or in combination. Apoptosis was detected by the Annexin V/PI staining and flow cytometry. Apoptosis related proteins, pPI3K and pAKT were detected by the Western blotting. **Results** Results of the MTT assay indicated that being treated by THZ of low concentrations alone had no significant influence on the inhibition of K562 cells, while being treated by THZ of 16 $\mu\text{mol/L}$ showed significant effect on inducing death of K562 cells. IM alone had effect on inducing death of K562 cells of a low concentration. K562 cells being treated by IM combined with THZ had a good synergistical effect on inducing death. Then K562 cells were treated with selected drug concentration according to CI values for 24 h, it revealed that thioridazine group had no significant apoptosis effect by flow cytometry, while in imatinib group, two-drug combination group there had different degree of apoptosis effect, and the control group was statistically significant ($P < 0.01$). Meanwhile, results of the Western blot showed that the increased expression of Cleaved Bid in each experimental group cells, while decreased expression of Procaspase 3. Up-regulation of anti apoptosis protein (Bcl-2, pPI3K and pAKT) expression and downregulation of apoptosis protein Bax expression demonstrated that the difference was statistically significant ($P < 0.01$) comparing each experimental groups with the control group.

Conclusion IM plus THZ can synergistically induce caspase-independent apoptosis of K562 cells. The killing mechanism may be associated with the mitochondrial pathway and inhibition of the PI3K-AKT pathway.

Key words chronic myeloid leukemia; Thioridazine; Imatinib; apoptosis; apoptosis related proteins; apoptosis regulating protein; PI3K-AKT pathway