

Apoptózis indukálása mevastatinnal humán U266 myeloma sejtvonalon

Jánosi Judit,¹ Sebestyén Anna,² Bocsi József,² Barna Gábor,² Nagy Katalin,²
Vályi-Nagy István,¹ Kopper László²

¹Országos Gyógyintézeti Központ, Hematológiai és Hemosztazeológiai Osztály,

²Semmelweis Egyetem I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet

A statinok széles körben használt gyógyszerek a hypercholesterinaemia kezelésében. Emellett azt is igazolták, hogy tumorsejtvonalakon apoptózist indukálnak. Kísérleteinkben mevastatin (HMG-KOA-reduktáz-inhibitor) hatását vizsgáltuk U266 humán myeloma sejtvonalon. A mevastatin kaspázaktivitást és mitokondriumdepolarizációt okozva vezet apoptózishoz. Kimutattuk, hogy az apoptózis során a BCL-2 mRNS és fehérje mennyisége csökkent, a BAX-, illetve BCLxL-termelés azonban nem változott. A mitokondriális változásokat kaspáz-8- és BID-aktiválás kísérte. A halálligandokat neutralizáló antitestek (TRAIL-R2Fc, anti-TNF-a, anti-FASL) nem gátolták a mevastatin okozta apoptózist, ami az eddig ismert halálreceptoroktól független sejthalálra utal. Az apoptózis indukálása során a mevastatin elősegítette a myelomasejtek felszínéről a syndecan-1 levedlését. *Magyar Onkológia* 48:333–337, 2004

Statins have been used successfully in the treatment of hypercholesterinaemia. Moreover, in vitro studies have shown that statins can trigger apoptosis in a variety of tumor cell lines. In the present study we analysed the effect of mevastatin – a novel inhibitor of HMG-CoA reductase, the rate-limiting enzyme of the mevalonate pathway – on U266 human myeloma cells. Apoptosis induced by mevastatin was associated with increased caspase activity and depolarisation of mitochondrial membrane. Expression of BCL-2 mRNA and protein was down-regulated, with no change in BAX or BCLxL protein production. The mitochondrial program was supported by caspase-8 and cleaved BID activity. None of the antibodies neutralising death-ligand/death-receptor pathway – TRAIL-R2Fc, anti-TNF-a, anti FASL (NOK-1) – influenced the mevastatin-induced apoptosis. Mevastatin also stimulated shedding of syndecan-1 from the surface of myeloma cells. *Jánosi J, Sebestyén A, Bocsi J, Barna G, Nagy K, Vályi-Nagy I, Kopper L. Mevastatin induced apoptosis in U266 human myeloma cells. Hungarian Oncology* 48:333–337, 2004



Bevezetés

A malignus betegségek kemoterápiás kezelése még nem megoldott, így az új, elsősorban anti-proliferatív és proapoptotikus támadáspontú gyógyszerek kifejlesztése az érdeklődés közepontjában áll. A statinok gyakran alkalmazott gyógyszerek a hypercholesterinaemia kezelésében, illetve az arteriosclerosis megelőzésében (9);

hatásukat a mevalonát-szintézisben szerepet játszó HMG-CoA-reduktáz gátlásán át fejtik ki (2). Több vizsgálat igazolta, hogy in vitro a statinok gátolták a sejtproliferációt. A lovastatin (HMG-CoA-reduktáz-gátló) mind a tumoros, mind a normális sejtek proliferációját G1 fázisban gátolta (5, 19). Két klinikai vizsgálat eredménye alapján a pravastatint, illetve a simvastatint szedő betegeknek öt éves utánkövetés során csökkent a colorectalis daganatok gyakorisága (15, 17).

Ismert, hogy az apoptózis zavara szerepet játszhat a B-sejtes lymphomák kialakulásában (13, 21, 25). Ezen belül az antiapoptotikus folyamatoknak szerepük lehet a myeloma multiplex patomechanizmusában (22). Kísérleteink közvetlen célja a mevastatin hatásának vizsgálata volt U266 humán myeloma sejtvonalon.

Közlésre érkezett: 2004. június 21.

Elfogadva: 2004. augusztus 23.

Levelezési cím: Dr. Jánosi Judit, Országos Gyógyintézeti Központ, Hematológiai és Hemosztazeológiai Osztály, 1135 Budapest, Szabolcs u. 33-35. Telefon: 1-320-3092, E-mail: janosijudit@hotmail.com

Anyagok és módszerek

Sejtkultúra

Kísérleteinket U266 humán myeloma sejtvonalon végeztük. A sejteket RPMI médiumban (Sigma), 10% hőinaktivált főtális borjúsérummal (FCS) (GIBCO-BRL), L-glutaminnal és penicillin-streptomycinnel kiegészítve tenyésztettük 5% CO₂-koncentrációt biztosító termosztátban 37 °C-on. A sejteket mosás után (0,5 ml-ben 150 000 sejt) 48 lyukú tálcán előinkubáltuk (5% CO₂, 37 °C), majd 0,5–1–1,25 µg/ml dózisban mevastatinnal kezeltük 24–96 órán át.

Anyagok

A mevastatint (Sigma) DMSO-ban oldottuk (10 ng/ml), -20 °C-on tároltuk. Kísérleteink során a következő anyagokat használtuk: ZVAD-fmk (általános kaszpázgátló, Enzim System Product), Z-IETD-fmk (kaspáz-8-gátló, Pharmingen), Z-LEHD-fmk (kaspáz-9-gátló, Pharmingen). A kaszpázgátlókat 50–100 mM koncentrációban alkalmaztuk, a kezelés időtartama alatt (72–96 óra) minden 24 órában hozzáadva a sejtkultúrához.

Sejtmorfológia

Citospinnel történt kiülepítést követően a sejteket 80%-os metanolban fixáltuk, majd HE-festés után fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

Apoptózis mérése áramlási citométerrel a DNS-tartalom alapján

Mevastatin-kezelést követően a megfelelő ideig inkubált sejteket (500 000/ml) centrifugáltuk (300 g, 2 perc), a felülúszó leöntése után az összerázott pelletet -20°C fokos, 70%-os etanolban fixáltuk. A mintákat újra centrifugáltuk (300 g, 3 perc) és 800 µl 100 µg/ml RNáz A (Sigma) tartalmú extrakciós puffert (200 mM-os dinátrium-foszfát puffer, pH=7,8, citráttal beállítva), majd 5 µg/ml végkoncentrációban etidium-bromidot (Calbiochem) adtunk a mintákhoz. Az áramlási citométerrel (FACScan vagy FACScalibur, Becton-Dickinson) nyert adatok kiértékeléséhez Winlist 1.0 (Verity Software House) programot használtuk.

Western-blot analízis

A sejteket a fent leírtak szerint kezeltük mevastatinnal, majd mosás (PBS) és centrifugálás (1300 g, 5 perc) következett. Az üledéket lizispufferben (5 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 mM NaF, 0,5 mM Navonadát, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 10% glycerol) reszuszpendáltuk és 10 percig jégen inkubáltuk. Inkubációt követően a sejteket centrifugáltuk (4 °C, 20 perc, 15 000 g) majd a fehérjetartalmat BioRad Bradford-reagens segítségével határoztuk meg. A gélelektroforézist 12,5%-os akrilamidgélben végeztük. Az analízishez 30 µg fehérjét használtunk. Az ellenanyagokat a következő hígításban használtuk: monoklonális BCL-2 1:1000 (DAKO),

BID 1:1500 (Transduction Laboratories), poliklonális BAX 1:2000 (DAKO). Előhíváshoz Vectastain ABC Kitet (Vector Laboratories) és ECLPlus (Amersham Pharmacia Biothec, UK) kemilumineszcens szubsztrátot használtunk.

RT-PCR

Eszközeink RNáz-mentesítését követően 10x10⁶ sejtől izoláltunk RNS-t Rneasy Total RNA kit segítségével. A reverz transzkripciót 100 ng RNS-ből végeztük MMLV reverz transzkriptázzal és random primerekkel (Gibco BRL), 42 °C-on. A PCR során red-Taq polimerázt (Sigma) használtunk. A következő ciklusparamétereket alkalmaztuk: 65 °C 1 perc, 72 °C 1 perc, 28 ciklus. Belső standardként a b-aktint használtuk a cDNS minőségének megítélésére. Az alkalmazott primerek a következők voltak: b-aktin 538bp: 5,GTG-GGG-CGC-CCC-AGG-CAC-CA3, 5,CTC-CTT-AAT-GTC-ACG-CAG-GAT-TTC3; BCL-2, 389 bp: 5,CGA-CTT-CGC-CAG-GAT-GTC-CAG-CCA-G3; 5,ACT-TGT-GGC-TCA-GAT-AGG-CAC-CCA-G3, BAX, 517 bp: 5,CAT-GAA-GAC-AGG-GGC-CCT-T3, 5,CAT-CTT-CTT-CCA-GAT-GGT3. Az RNS-minták méret szerinti elválasztását agaróz-gélelektroforézissel végeztük (1,5% agaróz). A gélek értékelése UV mellett Eagle Eye Videodensitometerrel (Stratagene) történt.

Kaspáz-aktivitás mérése

A mintákat (500 000 sejt/Eppendorf-cső) centrifugáltuk (200 g, 3 perc), mostuk PBS-ben. A pelletehez kaszpázpuffert (100 mM HEPES, pH=7,5, 10% szaharóz, 0,1% CHAPS, 5 mM DTT) adtunk. A mintákat 96 lyukú tálcára helyeztük. 1 %-os triton X-100-zal feltártuk a sejteket, majd 20 µM DEVD-AMC (Sigma) kaszpázszubsztrát hozzáadásával indítottuk a reakciót. A fluoreszcencia intenzitását mérve AMC-hígítási sor alapján határoztuk meg a felszabadult AMC mennyiséget (Fluoroskan Ascent Fluorimet, Labsystem).

Mitochondriummembrán-depolarizáció mérése

Az élő sejtekhez (500 000 sejt/ml) 10 nM DIOC₆(3) festéket (3,3'-dihexiloxakarbocianin-jodid, Sigma) adtunk és 15 percig inkubáltuk (37 °C, 5% CO₂). Az áramlási citometria során mért fluoreszcenciából (530-620 nm) következtettünk a mitokondrium-depolarizáció mértékére, mert a depolarizált (pozitívabb töltésű) mitokondriumban kevesebb festék gyűlik össze, mint a polarizáltban.

BAX-transzlokáció vizsgálata

A mevastatinnal előkezelt sejteket 5 mM CMTMRos-gal inkubáltuk 15 percig, majd a sejteket PBS-ben mostuk és 80%-os metanolban fixáltuk. Immunhisztokémiai vizsgálathoz poliklonális BAX-antitestet (1:20, DAKO), Vectastain EliteABC kitet és streptavidin-FITC-et (DAKO) használtunk. Az analízis Confocal Laser Scanning mikroszkóppal történt (Bio-Rad).

TRAIL-, TNF-alfa-, FASL-neutralizáció

A halálreceptoroknak – TRAILR, TNFR, FAS – a mevastatin-indukált apoptózisban játszott szerepét, haláliligand-neutralizáló antitestekkel vizsgáltuk: rekombináns TRAIL-R2Fc (100 ng/ml Alexis), monoklonális anti-humán TNF-alfa (1 ng/ml Alexis), és NOK1 (anti-FASL antitest, 1 ng/ml Alexis).

Syndecan-1 meghatározása áramlási citometriával

Mevastatin-kezelést követően a sejteket 80%-os metanolban fixáltuk, majd 10⁶ sejtet jelöltünk két lépésben. Először a sejteket anti-humán syndecan-1 monoklonális antitesttel (1:200, Serotec MCA681), azután anti-egér Ig biotinált antitesttel inkubáltuk, mostuk, majd streptavidin-FITC-et adtunk a mintához. A méréseket FACScan áramlási citométerrel végeztük.

Statistikai analízis

A statisztikai analízis során a Student t-tesztet használtuk.

Eredmények

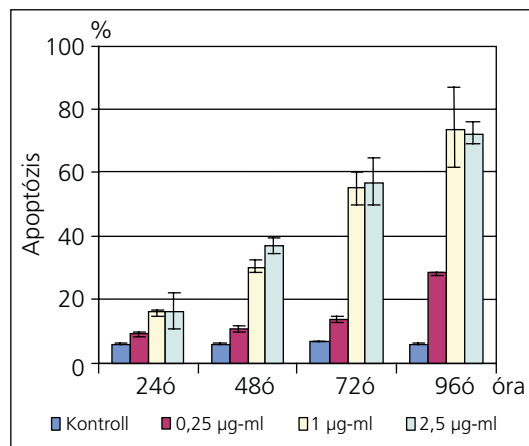
Mevastatin hatása U266 sejtvonalon

A mevastatin-indukált apoptózis U266 humán myeloma sejtvonalon dózis- (0,25–2,5 µg/ml) és

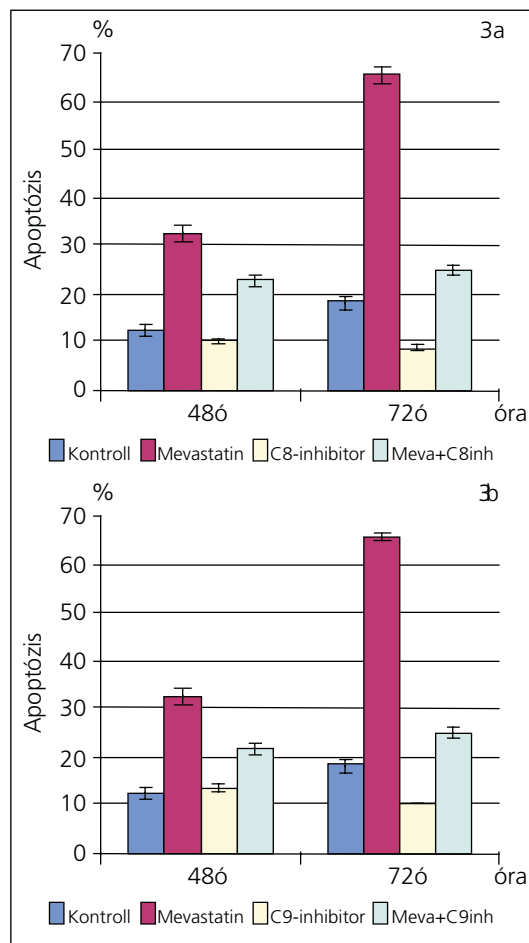
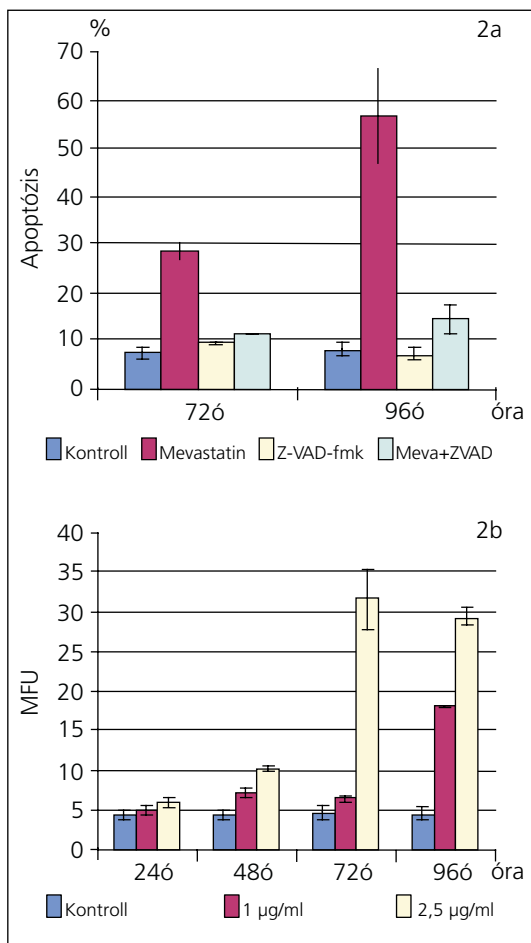
időfüggő (24-96 óra) volt. Az apoptózis viszonylag lassan, a kezelés megkezdését követően 48 órával alakult ki, maximumát a 96. órában érte el (1. ábra). Mindezt a sejtek jellegzetes morfológiai változása kísérte.

A mevastatin-indukált apoptózis mechanizmusa

A kaszpázok szerepére utal, hogy a mevastatin-indukált apoptózis az általános kaszpázgátló Z-VAD-fmk-val blokkolható volt (2a. ábra). Ugyanakkor az apoptózis kialakulásával párhuzamosan nőtt a DEVD-AMC fluoreszcenciája, amely fokozott kaszpáz-3-aktivitásra utal (2b. ábra). Az apoptózt mind kaszpáz-8-, mind kaszpáz-9 inhibitorral gátolni lehetett (3a,b. ábra).



1. ábra. Mevastatin-indukált apoptózis. A mevastatin-kezelés dózis- és időfüggő apoptózt okozott U266 humán myeloma sejtvonalon.



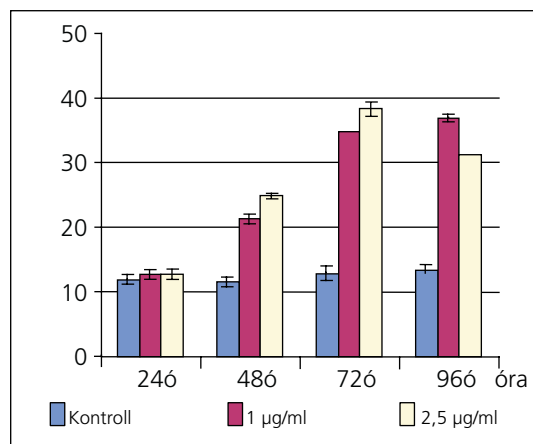
2a. ábra. ZVAD-fmk hatása a mevastatin okozta apoptózisra. Az általános kaszpáz-gátló ZVAD-fmk (100 mg/ml) gátolta a mevastatin (1 µg/ml, Meva) indukálta apoptózt.

2b. ábra. Kaszpáz-3-aktiváció. A mevastatin-indukált apoptózis során időfüggő kaszpáz-3-aktiváció alakult ki, amit DEVD-AMC-fmk segítségével vizsgáltunk (MFU = mikrofluoreszcens unit)

3. ábra. Kaszpáz-8- és kaszpáz-9-inhibitor hatása a mevastatin okozta apoptózisra. A kaszpáz-8 (C8) inhibitor Z-IEDT-fmk (a) és a kaszpáz-9 (C9) inhibitor Z-LEDH-fmk (b) gátolta a mevastatin-indukált apoptózt (2,5 µg/ml, Meva).

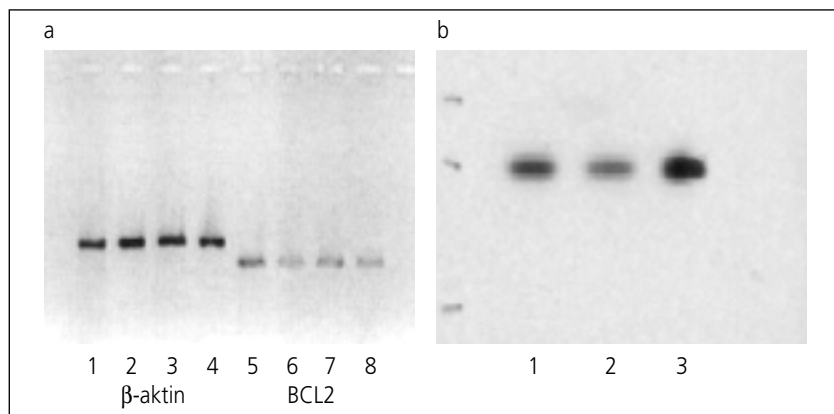
DiOC₆ segítségével kimutattuk, hogy 48 órával a mevastatin-kezelést követően mitokondrium-depolarizáció alakul ki (4. ábra). A mitokondrium membrán permeabilitását befolyásoló tényezők közül a BCL-2 mRNS mennyisége csökkent (5a. ábra), míg a BAX- és BCL_{xL}-expresszió változatlan maradt (nem közölt adat). Western blot analízis

4. ábra.
Mitokondrium-depolarizáció változása. A mevastatin-kezelést (Meva) követően mitokondrium-depolarizáció alakult ki, amit DiOC₆ festék (20 nM) segítségével vizsgáltunk



5a. ábra. BCL-2-expresszió változása. A mevastatin (2,5 µg/ml, Meva) indukálta apoptózis során csökkent a BCL2-expresszió. A BCL2-expresszió vizsgálata RT-PCR-rel történt, belső standardként β-aktint használtunk (1., 5.: kontroll, 2., 6.: 24 óra, 3., 7.: 48 óra, 4., 8.: 72 óra).

5b. ábra. Intracelluláris BCL-2-koncentráció változása. Western-blot-analízissel vizsgálva, a mevastatin-kezelést követő 72. órában csökkent az intracelluláris BCL2 fehérje koncentrációja (1.: 2,5 µg/ml Meva, 2.: 1 µg/ml Meva, 3.: kontroll)



1. táblázat. Halálligandok szerepe a mevastatin-indukált apoptózisban. A halálligandok szerepét neutralizáló antitestekkel (anti-TRAIL, anti-TNFα, anti-FASL) vizsgáltuk. A mevastatin-indukált apoptózis az ismert halálligandoktól független folyamatnak bizonyult.

	48 óra (%)	72 óra (%)
Kontroll	10,61±0,49	12,45±1,48
Mevastatin	49,65±4,17	64,5±7,77
Anti-FASL	10,33±0,61	11,09±1,23
Anti-TNFα	9,75±0,31	13,18±1,38
Anti-TRAIL	13±10,41	15±0
Mevastatin+anti-FASL	39±4,24	60±4,27
Mevastatin+anti-TNFα	43,5±3,52	58±5,65
Mevastatin+Aanti-TRAIL	46±2,82	56±2,86

során igazoltuk, hogy a BCL-2 fehérje mennyisége is csökkent (5b. ábra), a proapoptotikus BAX mennyisége változatlan maradt, így a BCL-2/BAX arány csökkent. Ugyancsak csökkent a kimutatható BID-fragmentek mennyisége. A BAX aktiválódását lokalizációjának változása mutatja. Esetünkben konfokális mikroszkóppal azt találtuk, hogy a kezdeti homogén citoplazmatikus BAX eloszlás a mevastatin-kezelés után 72 órával mitokondriális elrendeződésűvé vált.

Kérdés, hogy a halálreceptorok szerepet játszanak-e a mevastatin-indukált apoptózisban. Az a tény, hogy neutralizáló antitestek (TRAIL-R2FC, anti-TNF-alfa, NOK1) nem befolyásolták a mevastatin által előidézett apoptózist (1. táblázat), arra utal, hogy a kimutatott kaspáz-8-aktiváció – és az apoptózisindukció lépései – az ismert halálreceptoroktól függetlenek.

Syndecan-1-vedlés

Ismert, hogy a myelomasejtek apoptózisuk során levedlik felszínükről a syndecan-1 extracelluláris doménjét. Áramlási citometriás vizsgálatunk igazolta, hogy a mevastatin-kezelés (2,5 µg/ml) által indukált apoptózis során időfüggést mutatón csökkent a syndecan-1-pozitív sejtek aránya (24–72 óra, kontroll sejtek: 53-57%; kezelt sejtek: 32%, 29%, 6%)

Megbeszélés

Több vizsgálat igazolta, hogy a statinok különböző malignus sejtvonalakon apoptózist indukálnak. A mevastatin apoptózist indukált CaCo2 humán adenocarcinoma sejtvonalon (24). A lovastatin, egy másik HMG-COA-inhibitor, apoptózist indukált myeloma, prostatacarcinoma, acut myeloid leukaemia, pancreas- és colonicarcinoma sejtvonalakon (1, 10, 14, 23, 28). AML sejtvonalon a lovastatin okozta apoptózis során a kaspáz-3 aktiválódott, a BCL-2-expresszió – mind RNS-, mind fehérjeszinten – csökkent (4, 27).

Vizsgálatunkban az U266 humán myeloma sejtvonalon a mevastatin apoptózist indukált. Az apoptózis során kaspáz-3-aktiváció alakult ki. A kaspáz-3-aktiváció szinte minden esetben az apoptózis központi végrehajtó lépése. Ezt segíti elő a kaspáz-8 és/vagy a kaspáz-9 aktiválása. A kaspáz-8-at mind a halálreceptorok, mind más kaspázok (pl. kaspáz-3) aktiválhatják. Az U266 sejtvonalon a mevastatin-indukált apoptózis halálligandoktól függetlennek bizonyult, mert neutralizáló antitestek (TRL-R2FC, anti-TNF-alfa, NOK1) nem gátolták az apoptózist. A kaspáz-8 a BID hasításán át elősegíti a mitokondriumból a citokróm-C felszabadulását. A citokróm-C az apoptozóma részeként aktiválja az effektor kaspázokat, főleg a kaspáz-3-at (12).

Számos adat bizonyítja, hogy a mevastatin elsősorban az apoptózis mitokondriális útját aktiválja. DiOC₆ segítségével igazoltuk, hogy az apoptózis során a kezelést követően 48 órával mitokondrium-depolarizáció alakul ki. A folyamat során a BCL-2-expresszió csökken, mind mRNS-,

mind fehérjeszinten. A BAX-expresszió változatlan maradt, de konfokális mikroszkóppal igazoltuk, hogy a BAX a citoszolból a mitokondriumba transzlokálódott, azaz aktiválódott. A mitokondriális út szerepére utal az is, hogy kaszpáz-9-inhibitorral gátolható volt az apoptózis, valamint, hogy az apoptózis viszonylag lassan, a mevastatin-kezelés 48. órájában alakult ki.

Több vizsgálat igazolta, hogy mind a plazmaszövetek, mind a myelomasejtek expresszálnak syndecan 1-et (transzmembrán heparánszulfát-proteoglikán) (16, 26). A syndecan-1 pontos szerepe még nem ismert. In vitro vizsgálatban igazolták, hogy a myelomasejtek apoptózisuk során levedlik felszínükről a syndecan extracelluláris doménjét (3). Ezt a jelenséget mi is megfigyeltük mevastatin-kezelés után. Több klinikai vizsgálat igazolta a szolubilis syndecan-1 prognosztikai szerepét myeloma multiplexben (6, 18).

Számos klinikai vizsgálatban használták a statinokat a kemoterápia kiegészítésére. Fázis I vizsgálatban egy anaplasticus astrocytomában szenvedő betegnél havonta egy hétig per os 30–35 mg/kg/nap dózisú lovastatin-kezelést alkalmazva klinikai válasz alakult ki (20). Hatástalan volt a lovastatin-terápia emlő-, prostata-, ovarium, illetve primer központi idegrendszeri daganatok esetén (20). Fázis II vizsgálatban nagy dózisú lovastatin (35 mg/kg/nap per os négy hetente egy hétig) 14, gyomorrák miatt kezelt betegből 1 beteg esetén eredményezett klinikai választ. A lovastatin-kezelést a betegek jól tolerálták, sem neurológiai, sem vese- vagy hepatotoxicitás nem jelentkezett (8). Egy idősebb, relabált AML miatt kezelt betegnél 54 napos, 2 mg/kg/nap dózisú lovastatin-kezelés csökkentette a blasztszámot a gyógyszeresedés ideje alatt (11). Hepatocellularis carcinoma esetén 5-FU és 0,5 mg/kg/nap pravastatin kombinált kezelés megkettőzte az átlagos túlélést (7).

A fenti eredmények alapján a mevastatin a daganatsejtek apoptózisának indukciójával a kemoterápia kiegészítéseként javíthatja a terápiás választ myeloma multiplex esetén.

Irodalom

1. Agarwal B, Halmos B, Moss SF, et al. Lovastatin sensitizes colon cancer HT-29 cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Proc Am Assoc Cancer Res* 39:68, 1998
2. Alberts AW. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *Am J Cardiol* 62:10J-15J, 1988
3. Dhodapkar M, Abe E, Theus A, et al. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor survival, growth and bone cell differentiation. *Blood* 91:2679-2688, 1998
4. Dimitroulakos J, Thai S, Wasfy GH, et al. Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 40:167-178, 2000
5. Jakobiosal M, Bruno S, Skierski JS, Darzynkiewicz Z. Cell cycle-specific effect of lovastatin. *Proc Nat Acad Sci (Wash)* 88:3628-3632, 1991
6. Jánosi J, Sebestyén A, Mikala G, et al. Soluble syndecan-1 levels in different plasma cell dyscrasias and different stages of multiple myeloma. *Haematologica* 89:370-371, 2004
7. Kawata S, Yamasaki E, Naogese E, et al. Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. *Br J Cancer* 84: 886-891, 2001
8. Kim WS, Kim HM, Choi HJ, et al. Phase II study of high-dose lovastatin in patients with advanced gastric adenocarcinoma. *Invest New Drugs* 19:81-83, 2001
9. Korman L, Borysink L. Replacing lovastatin with pravastatin: effect on serum lipids and cost. *Am J Health Syst Pharm* 52:1078-1082, 1995
10. Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Gastroenterol* 122: 308-317, 2002
11. Minden MD, Dimitroulakos J, Notrynek D, Penn LZ. Lovastatin induced control of blast cell growth in an elderly patient with acute myeloblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 40:659-662, 2001
12. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, et al. Intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human multiple myeloma cells. *Blood* 99:2162-2171, 2002
13. Nashimoto N, Shina Y, Yoshizaki K, Kishimoto T. Myeloma biology and therapy: present status and future developments. *Haematol Oncol Clin North Am* 11:159-172, 1997
14. Park C, Lee I, Kang WK. Lovastatin-induced E2F-1 modulation and its effect on prostate cancer cell death. *Carcinogenesis* 10:1727-1731, 2001
15. Pederson TR, Berge K, Cook TJ, et al. Safety and tolerability of cholesterol lowering agents with simvastatin during 5 years in Scandinavian Simvastatin Survival Study. *Arch Intern Med* 156:3085-3092, 1996
16. Ridley R, Xiao H, Hata H, et al. Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen. *Blood* 81:767-774, 1993
17. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patient with average cholesterol level. Cholesterol and Recurrent Event Trial Investigators. *N Engl J Med* 335:1001-1009, 1996
18. Seidel C, Sundan A, Hjøth M, et al. Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood* 95:388-392, 2000
19. Sumi S, Beauchamp Rd, Townsend CM, et al. Lovastatin inhibits pancreatic cancer growth regard less of RAS mutation. *Pancreas* 5:657-661, 1994
20. Thibault A, Samid D, Tompkins AC, et al. Phase I study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, in patient with cancer. *Clin Cancer Res* 2:483-491, 1996
21. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462, 1995
22. Tu Y, Renner S, Xu F, et al. BCL-XL expression in multiple myeloma, possible indicator of chemoresistance. *Cancer Res* 58:256-262, 1998
23. Van De Donk NW, Kamphuis MM, Lakhorsz HM, Bloem AC. The cholesterol lowering drug lovastatin induced cell death in myeloma plasma cells. *Leukemia* 16:1362-1371, 2002
24. Wachtershauser A, Akoglen B, Stein J. HMG-CoA reductase inhibitor mevastatin enhances the growth inhibitory effect of butyrate in the colorectal carcinoma cell line CaCo2. *Carcinogenesis* 22:1061-1067, 2001
25. Wickremosinghe R, Hoffbrand AV. Biochemical and genetic control of apoptosis relevance to normal haematopoiesis and haematological malignancies. *Blood* 93:3587-3600, 1999
26. Wijdenes J, Vooijis WC, Clement C, et al. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 94:318-323, 1996
27. Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* 16:508-519, 2002
28. Xia Z, Tan M, Wong WW. Blocking protein geranylgeranylation is essential for lovastatin-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 9:1398-1407, 2001