

洛伐他汀对喉鳞状细胞癌细胞系 Hep-2 细胞增殖和凋亡的影响

屠建棋 高文明 窦姗姗 徐旭东[△]

(济宁医学院基础学院, 山东 济宁 272067)

摘要 目的 探讨阿伐他汀对喉鳞状细胞癌(LSCC)细胞系 Hep-2 细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 给予体外培养 Hep-2 细胞阿伐他汀处理,MTT 法检测细胞活力,流式细胞仪检测细胞凋亡率,并分析超氧化物生成情况。**结果** 阿伐他汀降低了 Hep-2 细胞活力,引起了 Hep-2 细胞凋亡,超氧化物水平升高。**结论** 阿伐他汀对 LSCC 具有潜在的治疗作用。

关键词 喉鳞状细胞癌;Hep-2;阿伐他汀;超氧化物;凋亡

中图分类号:R739.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-9760(2013)10-317-03

Effects of lovastatin on the proliferation and apoptosis of Hep-2 cells in vitro

TU Jian-qi, GAO Wen-ming, DOU Shan-shan, et al

(Academy of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of lovastatin on the proliferation and apoptosis of Hep-2 cells in vitro. **Methods** Hep-2 cells were treated with lovastatin. Cell viability was measured by MTT assay. The apoptosis was detected by flow cytometry. And reactive oxygen species(ROS)production were analyzed. **Results** Lovastatin induced the decrease of cell viability in Hep-2 cells. The apoptotic rate of Hep-2 cells and the production of ROS increased after lovastatin treatment. **Conclusion** Lovastatin could be used potentially for the treatment of laryngeal squamous cell carcinoma.

Key words: Laryngeal squamous cell carcinoma; Hep-2; Lovastatin; Reactive oxygen species; Apoptosis

喉癌是耳鼻咽喉科常见恶性肿瘤,喉鳞状细胞癌是其主要病理类型,目前对喉癌的治疗主要是手术为主,辅以放化疗,但手术和放化疗并发症多、毒副作用大。因此,探索喉鳞状细胞癌(LSCC)新的治疗方式具有重要意义。

他汀类药物是羟甲基戊二酸单酰辅酶 A(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA)还原酶的竞争性抑制剂,能够降低 HMG-CoA 还原酶活性,抑制细胞内胆固醇合成。另外还能阻滞甲羟戊酸途径,对多种肿瘤细胞增殖具有抑制作用,诱导分化和凋亡,增强放化疗的作用。体外实验证实,洛伐他汀引起了前列腺癌和卵巢癌细胞凋亡^[1-3]。本研究探讨洛伐他汀对 LSCC 细胞系 Hep-2 细胞系增殖和凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

LSCC 细胞株 Hep-2 细胞(ATCC 公司);RPMI 1640 培养基(Invitrogen 公司);10%胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)(Gibco 公司);碘化丙啶(PI)(Sigma 公司);二甲基亚砜(上海生工公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT)(Sigma 公司);2',7'-二氯二荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)(Sigma 公司);洛伐他汀(Sigma 公司)

1.2 细胞培养

在 37℃ 5% CO₂ 培养箱内,将 Hep-2 细胞置于含 10% FBS 的 RPMI 1640 中培养,每 2 天传代 1 次,取对数生长期 Hep-2 细胞用于实验,给予 Hep-2 细胞不同浓度的洛伐他汀(5μmol/L、10μmol/L、15μmol/L 和 20 μmol/L)分别作用 24 h、48 h,做如下检测。

1.3 细胞活力测定

给予 Hep-2 细胞不同浓度的洛伐他汀(5μmol/L、10μmol/L、15μmol/L 和 20 μmol/L)分别作用 24 h、48 h 后,去除培养基,每孔加入 20 μl

[△][通信作者]徐旭东,E-mail:xxdong8687@sina.com

5 mg/ml MTT 溶液,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱内继续培养 4h,去除培养液,然后每孔加入 200 μl DMSO,振荡 10 min,充分溶解后,酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光度值,细胞活力以对照组的百分比表示。

1.4 细胞凋亡测定

给予 Hep-2 细胞不同浓度的洛伐他汀 (5 μmol/L、10 μmol/L、15 μmol/L 和 20 μmol/L) 作用 24 h 后,收集细胞悬液离心获取细胞沉淀,然后用 70% 冷乙醇重悬浮于 4℃ 冰箱固定 24 h,离心后 PBS 冲洗 3 遍,加入 RNase 37℃ 处理 1 h,离心弃去液体,加入 100 μg/ml 的 PI 避光染色 30 min,经尼龙网过滤,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.5 超氧化物检测

给予 Hep-2 细胞不同浓度的洛伐他汀 (5 μmol/L、10 μmol/L、15 μmol/L 和 20 μmol/L) 作用 24 h 后,弃去培养液,加入 8 μmol/ml DCFH-DA (无血清培养基 RPMI 1640 配制) 1ml,置于 37℃ 培养箱内避光作用 20 min,弃去液体,无血清

RPMI 1640 培养基冲洗 3 次,荧光分光光度计检测氧化型二氯荧光素 (DCF) 的荧光强度,DCF 荧光强度反映了超氧化物的水平 (激发波长: 485 nm, 发射波长: 535 nm)。以对照组为 100%, 分析实验组超氧化物水平变化。

1.6 统计学方法

采用 SPSS16.0 软件进行统计处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析 (One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 洛伐他汀对 Hep-2 细胞活力的影响

给予 Hep-2 细胞不同浓度的洛伐他汀 (5 μmol/L、10 μmol/L、15 μmol/L 和 20 μmol/L) 分别作用 24 h、48 h 后,洛伐他汀引起了 Hep-2 细胞活力下降,随着洛伐他汀浓度升高和作用时间的延长,细胞活力逐渐下降,组间差异具有统计学意义,表明洛伐他汀对 Hep-2 具有毒性 (表 1)。

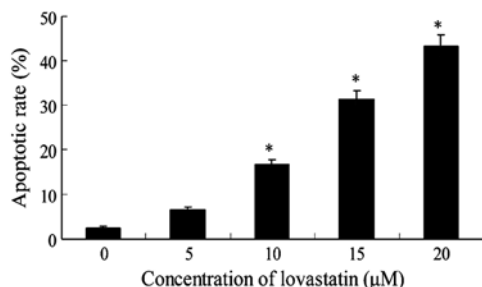
表 1 洛伐他汀对 Hep-2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

	0	5	10	15	20
24h	100.00 ± 4.35	94.24 ± 7.04	83.36 ± 5.72*	62.77 ± 6.89*	41.80 ± 5.76*
48h	98.93 ± 5.97	83.46 ± 6.13#▲	65.17 ± 6.44#▲	53.57 ± 5.18#▲	30.21 ± 6.48#▲

洛伐他汀作用时间相同时,与对照组相比较, * $P < 0.05$; 洛伐他汀作用时间相同时,与对照组相比较, # $P < 0.05$; 洛伐他汀浓度相同时,与作用时间 24 h 相比较, ▲ $P < 0.05$ 。

2.2 洛伐他汀对 Hep-2 细胞凋亡的影响

Hep-2 细胞经不同浓度的洛伐他汀 (5 μmol/L、10 μmol/L、15 μmol/L 和 20 μmol/L) 作用 24 h 后,引起了细胞凋亡,凋亡率随着阿伐他汀浓度的升高而增加,表明洛伐他汀可导致 Hep-2 细胞凋亡 (图 1)。

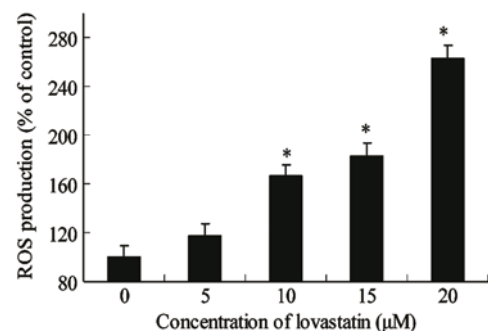


与对照组相比较, * $P < 0.05$

图 1 洛伐他汀对 Hep-2 细胞凋亡的影响

2.3 洛伐他汀对 Hep-2 细胞超氧化物生成的影响

Hep-2 细胞经不同浓度的洛伐他汀 (5 μmol/L、10 μmol/L、15 μmol/L 和 20 μmol/L) 作用 24 h 后,引起了超氧化物水平升高,并随着阿伐他汀浓度的升高而增加 (图 2)。



与对照组相比较, * $P < 0.05$

图 2 洛伐他汀对 Hep-2 细胞超氧化物生成的影响

3 讨论

研究表明,他汀类药物对多种肿瘤细胞生长具有抑制作用。体外实验发现,辛伐他汀引起了结肠癌 HCT116 细胞凋亡,p53 磷酸化和乙酰化水平升

高,活化了 p38 MAPK^[4]。洛伐他汀、氟伐他汀和辛伐他汀对肝癌 HepG2 细胞均具有毒性作用^[5]。在前列腺癌 PC3 细胞中,阿伐他汀增强了放疗的敏感性^[6]。洛伐他汀还引起了卵巢癌细胞凋亡,增强了阿霉素的抗肿瘤作用^[2]。氧化应激在药物抗肿瘤中发挥重要作用,ROS 生成过多或清除能力降低导致氧化应激,引起脂质过氧化、DNA 损伤和蛋白质表达异常,细胞发生凋亡。他汀类药物在抑制肿瘤生长的过程中引起了氧化应激,导致肿瘤细胞凋亡^[7]。在我们实验中,洛伐他汀引起了喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞凋亡,可能与洛伐他汀引起了 Hep-2 超氧化物生成增加有关。

参考文献:

- [1] Hoque A,Chen H,Xu XC. Statin induces apoptosis and cell growth arrest in prostate cancer cells[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2008,17(1):88-94.
- [2] Martirosyan A,Clendening JW,Goard CA, et al. Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin;potential therapeutic relevance[J]. BMC cancer,

2010,10:103.

- [3] Platz EA, Till C, Goodman PJ, et al. Men with low serum cholesterol have a lower risk of high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18 (11): 2807-2813.
- [4] Chang HL, Chen CY, Hsu YF, et al. Simvastatin induced HCT116 colorectal cancer cell apoptosis through p38MAPK-p53-survivin signaling cascade[J]. Biochimica et biophysica acta,2013,1830(8):4053-4064.
- [5] Kah J,Wustenberg A,Keller AD,et al. Selective induction of apoptosis by HMG-CoA reductase inhibitors in hepatoma cells and dependence on p53 expression[J]. Oncology reports,2012,28(3):1077-1083.
- [6] He Z, Mangala LS, Theriot CA, et al. Cell killing and radiosensitizing effects of atorvastatin in PC3 prostate cancer cells [J]. Journal of radiation research,2012,53(2):225-233.
- [7] Shi Y, Felley-Bosco E, Marti TM, et al. Differential effects of lovastatin on cisplatin responses in normal human mesothelial cells versus cancer cells; implication for therapy[J]. PloS one, 2012,7(9):e45354.

(收稿日期 2013-07-25)

(上接第 316 页)

的脑组织中检测到,而且 mOX2R 的 2 个受体在小鼠脑中差异表达^[9]。

小鼠 Orexin 2 型受体 C 末端选择性剪接产生 2 个受体 mOX2 α R 和 mOX2 β R,后者的 C 末端比前者的多 17 个氨基酸^[8-9]。本文利用分子克隆技术,通过对 mOX2 β R C 末端进行基因突变,成功构建了 mOX2 β R C 末端不同部位突变的 3 个突变体。进一步,我们将采用共聚焦显微镜、免疫共沉淀、生物发光共振能量转移、生物发光共振能量转移及细胞增殖等实验技术系统地对 2 个受体的 C 末端的功能序列进行进一步的探究。阐明哪些氨基酸残基在信号转导途径中起重要和关键作用,为探寻相关疾病治疗的新突破点及新药开发奠定理论基础。

参考文献:

- [1] Ida T,Nakahara K,Katayama T,et al. Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite-stimulating neuropeptide,orexin and neuropeptide Y,on the various behavioral activities of rats[J]. Brain Res,1999,821(2):526-529.
- [2] Takahashi N,Okumura T,Yamada H, et al. Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats[J]. Biochem Biophys Res Commun,1999,254

(3):623-627.

- [3] Malendowicz,LK,Tortorella C, and Nussdorfer GG. Orexins stimulate corticosterone secretion of rat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1999, 70 (4-6):185-188.
- [4] Karteris E, Chen J, Randeve HS. Expression of human prepro-orexin and signaling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004,89(4):1957-1962. (K E and Chen J joint first authors)
- [5] Samson WK,Gosnell B,Chang JK,et al. Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain [J]. Brain Res, 1999,831(1-2):248-253.
- [6] Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice;molecular genetics of sleep regulation [J]. Cell,1999,98(4):437-451.
- [7] Karteris E,Machado R,Chen J,et al. Food deprivation differentially modulates orexin receptor expression and signaling in rat hypothalamus and adrenal cortex[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab,2005,288(6):E1089-E1100.
- [8] Chen J, Randeve HS. Genomic organization of mouse orexin receptors;characterization of two novel tissue-specific splice variants[J]. Mol Endocrinol,2004,18(11):2790-2804.
- [9] Chen J,Karteris E,Collins D,et al. Differential expression of mouse orexin receptor type-2 (OX2R) variants in the mouse brain[J]. Brain Res,2006,1103(1):20-24.

(收稿日期 2013-08-20)