文章编号:1000-5404(2005)20-2035-04

论著

洛伐他汀对SP2/0骨髓瘤细胞增殖和凋亡的影响

毛应华,糜漫天,韦 娜,袁怀波 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨胆固醇自稳失调对SP2/0骨髓瘤细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 以去脂血清(LDL-deficient serum,LDS)和HMG-CoA还原酶抑制剂洛伐他汀(lovastatin,LOV)处理SP2/0骨髓瘤细胞,采用生长曲线、MTT法检测细胞增殖,流式细胞分析检测细胞周期和凋亡率,DNA梯形带检测细胞凋亡。**结果** LDS和/或LOV能抑制细胞增殖和诱导凋亡,阻滞细胞于G_2/M期,该作用有剂量—效应和时间依赖关系,甲羟戊酸(mevalonate, MVA)可以拮抗LOV引起的增殖抑制和诱导凋亡作用。**结论** LDS和/或LOV通过阻断小鼠SP2/0骨髓瘤细胞合成内源性胆固醇和摄取外源性胆固醇,使细胞胆固醇自稳失调,引起细胞增殖受抑,并诱导细胞凋亡。

关键词: 胆固醇;肿瘤;增殖;凋亡
中图法分类号: R329.2+8;R733.3;R972+.6 **文献标识码:** A

Effects of LDL-free and lovastatin on proliferation and apoptosis of SP2/0 myeloma cells

MAO Ying-hua, MI Man-tian, WEI Na, YUAN Huai-bo (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of perturbation of cholesterol homeostasis on proliferation and apoptosis of SP2/0 myeloma cells. **Methods** Cholesterol homeostasis of SP2/0 cells was disturbed using LDL-free serum and lovastatin, the inhibitor of HMG-CoA reductase, and accordingly divided into LDS group, LDS + 0.5 μmol/L LOV group, LDS + 1.0 μmol/L LOV group, LDS + 2.0 μmol/L LOV group and LDS + 2.0 μmol/L LOV + mevalonate (MVA) group as well as control group. MTT test and the cell growth curve were used to assay the proliferative capacity, and flow cytometry (FCM) and DNA ladder assay were used to evaluate the cell apoptosis. Cell cycle was determined by FCM. **Results** LDS and/or lovastatin at the dosages of 0.5 −2.0 μmol/L, significantly inhibited SP2/0 myeloma cells proliferation and induced apoptosis in a time- and dose-dependent manner. Cells were arrested in the G_2/M phase of cell cycle. Administration of MVA at the dose of 20 μmol/L prevented lovastatin-induced growth inhibition and apoptosis. **Conclusion** LDL-free serum and/or lovastatin have the antitumor activities of inhibiting SP2/0 cells proliferation, arresting cells in G_2/M phase, and inducing cells apoptosis.

Key words: cholesterol; tumor; proliferation; apoptosis

洛伐他汀(lovastatin, LOV)是他汀类(statins)药物的一种,作为羟甲基戊二酸单酰辅酶A(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA)还原酶强力和高度专一的竞争性抑制剂,能通过竞争性抑制作用显著降低HMG-CoA还原酶活性,有效地抑制胆固醇的合成,临床已普遍用于治疗高脂血症。近年来研究表明,他汀类药物还具有抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡及分化,降低肿瘤细胞侵袭转移能力的作用[1],而对正常细胞无明显的毒副作用,有望作为新的肿瘤治疗手段。本实验选择来自BALB/c小鼠的SP2/0骨髓瘤细胞为研究对象,以LOV抑制细胞内源性胆固醇的合成,以去脂血清(LDL-deficient serum, LDS)抑制细胞摄取外源性胆固醇,作为胆固醇自稳失调的细胞模型,采用生长曲线、MTT法、流式细胞分析、DNA梯形带检测等方法研究LDS和/或LOV对SP2/0细胞增殖和凋亡的影响。

作者简介:毛应华(1971-),男,浙江省义乌市人,硕士,主治医师,主要从事营养、免疫与肿瘤方面的研究,现在南京军区卫生防疫队工作。电话:(025)80867807
通讯作者:糜漫天,电话:(023)68752292
收稿日期:2004-09-24;修回日期:2005-06-12

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂

SP2/0 骨髓瘤细胞购自中科院上海细胞所;RPMI1640 培养基为 Gibco 公司产品;新生小牛血清为天津 TBD 公司产品;Lovastatin 为德国 Fluka 公司产品;二甲基亚砜(DMSO)为 Amersco 公司产品;二甲基偶氮唑盐(MTT)和甲羟戊酸(mevalonate,MVA)为 Sigma 公司产品。

1.2 去脂血清的制备

参照 Corwin 等[2]方法并加以改进。将新生小牛血清与 -20 ℃丙酮按 1:9 (V/V) 混合,加血清过程中不断搅拌,置于 -20 ℃冰箱中,30 min 后过滤,沉淀用 -20 ℃丙酮洗 3 次,收集沉淀于烧杯中,吹风尽量挥去丙酮,沉淀溶解于与新生小牛血清等体积的 0.1 mol/L PBS 中,置 56 ℃水浴 1 h,使残留的丙酮挥发,2 000 r/min 离心 10 min,去掉不溶物质,过滤除菌,-20 ℃保存。

1.3 实验分组

以 SP2/0 细胞为实验对象,根据预实验结果分为 6 组:对照组、LDS 组、LDS + 0.5 μmol/L LOV 组,LDS + 1.0 μmol/L LOV 组,LDS +2.0 μmol/L LOV 组,LDS +2.0 μmol/L LOV +20 μmol/L MVA 组。

1.4 光镜观察细胞形态学变化

将处于对数生长期的 SP2/0 细胞以 1×10^5/ml 细胞密度接种于 25 ml 培养瓶中,以 LDS 和/或 LOV 处理,培养 3 d,各组于倒置显微镜下观察细胞生长情况并照像。

1.5 生长曲线测定

将处于对数生长期的 SP2/0 细胞以 5.0×10^4/ml 细胞密度接种于 24 孔培养板中,每孔 1 ml,以 LDS 和/或 LOV 处理,每组设 3 个平行孔,分别培养 1 ~4 d。每天用台盼蓝染色计数活细胞,并按下列公式计算细胞生长抑制率。

$$\text{生长抑制率}\quad GI=\frac{Nc-Nt}{Nc}\times100\%$$

Nc 和 Nt 分别为某一时相点对照组和处理组的细胞数。

1.6 MTT 比色法检测细胞增殖

将处于对数生长期的 SP2/0 细胞以 5.0×10^4/ml 细胞密度接种于 96 孔圆底培养板中,每孔 200 μl,以 LDS 和/或 LOV 处理,每组作 3 个平行孔,分别培养 1 ~4 d。每天收获细胞前4 h,每孔加入 5 mg/ml MTT 15 μl,37℃,5% CO_2,饱和湿度条件下继续培养 4 h,小心吸去培养液后,每孔加入 200 μl 异丙醇:DMSO(1:1,V/V),室温放置 30 min,用酶标仪在 492 nm 处测定 D 值。

1.7 流式细胞仪检测 SP2/0 细胞周期相分布及细胞凋亡率

SP2/0 细胞以 LDS 和/或 LOV 处理培养 3 d,常规收获细胞,70% 冷乙醇固定,RNase 消化,碘化丙啶(PI)染色,采用流式细胞仪对 DNA 进行定量分析,再结合计算机软件推算出各细胞周期相分布和凋亡率。

1.8 DNA 梯形带检测

参照文献[3]方法,检测各组处理 3 d 的 SP2/0 细胞凋亡情况。

1.9 统计学方法

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 行方差分析。

2 结果

2.1 胆固醇自稳失调对 SP2/0 细胞形态的影响

对照组 SP2/0 细胞形态比较规则,近似圆形,多数轻度贴壁生长,少量悬浮生长,细胞间的间隙小,排列紧密。LDS 组与对照组相比除悬浮生长细胞数增多外无明显变化。LDS 联合 LOV 处理组细胞大多数呈团状悬浮生长,轻度贴壁细胞明显减少。随着 LOV 处理剂量的增大、作用时间的延长,细胞的形态改变越明显,2.0 μmol/L LOV 处理组培养瓶中还可见较多的死亡细胞碎片,少量细胞伸出伪足,形态不规则。加入 20 μmol/L MVA 可使 LDS 联合 2.0 μmol/L LOV 处理组 SP2/0 细胞生长形态基本恢复(图 1 ~6)。

2.2 胆固醇自稳失调对 SP2/0 细胞增殖功能的影响

细胞生长曲线结果显示,以 LDS 和/或 LOV 处理 SP2/0 细胞 1 ~4 d,有明显的抑制细胞增殖作用(图 7)。LDS 单独处理时抑制细胞增殖作用较弱,抑制率为 7.5% ~16.5%;与 LOV 联合作用后抑制作用明显增强,0.5、1.0、2.0 μmol/L LOV 联合 LDS 处理的抑制率分别为 23.7% ~31.0%、24.4% ~51.8%、29.0% ~65.8%;加入 20 μmol/L MVA 能拮抗 2.0 μmol/L LOV 的抑制增殖作用,抑制率为 3.6% ~16.0%,与 LDS 单独处理时的作用相近。在未用 LDS 和 LOV 处理的 SP2/0 细胞培养液中加入 20 μmol/L MVA 并无促进细胞增殖的效果,提示 LOV 引起的细胞增殖抑制作用是通过 MVA 途径实现的,并非 LOV 的细胞毒性作用所致。MTT 比色结果也显示,SP2/0 细胞经 LDS 和/或 LOV 处理 1 ~4 d 后,D(492)值分别比对照组明显下降,20 μmol/L MVA 可以基本消除 2.0 μmol/L LOV 对 SP2/0 细胞增殖的抑制作用(表 1)。

表 1 MTT 法检测胆固醇自稳失调对 SP2/0 细胞增殖功能的影响 [D(492), $\bar{x}\pm s$, $n=3$]

Tab 1 Effect of LDS and/or LOV on the proliferative capacity of SP2/0 cells [D(492), $\bar{x}\pm s$, $n=3$]

Groups	1 d	2 d	3 d	4 d
Control	0.304 ±0.013	0.594 ±0.004	1.044 ±0.006	1.319 ±0.032
LDS	0.292 ±0.007	0.588 ±0.007	0.986 ±0.011 **	1.158 ±0.017 **
LDS +0.5 μmol/L LOV	0.279 ±0.004 *	0.562 ±0.015 *	0.717 ±0.084 **	0.747 ±0.042 **
LDS +1 μmol/L LOV	0.224 ±0.030 **	0.530 ±0.016 **	0.570 ±0.022 **	0.641 ±0.021 **
LDS +2 μmol/L LOV	0.228 ±0.026 **	0.460 ±0.021 **	0.495 ±0.007 **	0.565 ±0.038 **
LDS +2 μmol/L LOV +20 μmol/L MVA	0.294 ±0.008	0.587 ±0.045	0.973 ±0.033 **	1.161 ±0.009 **

$F=38.14$; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control

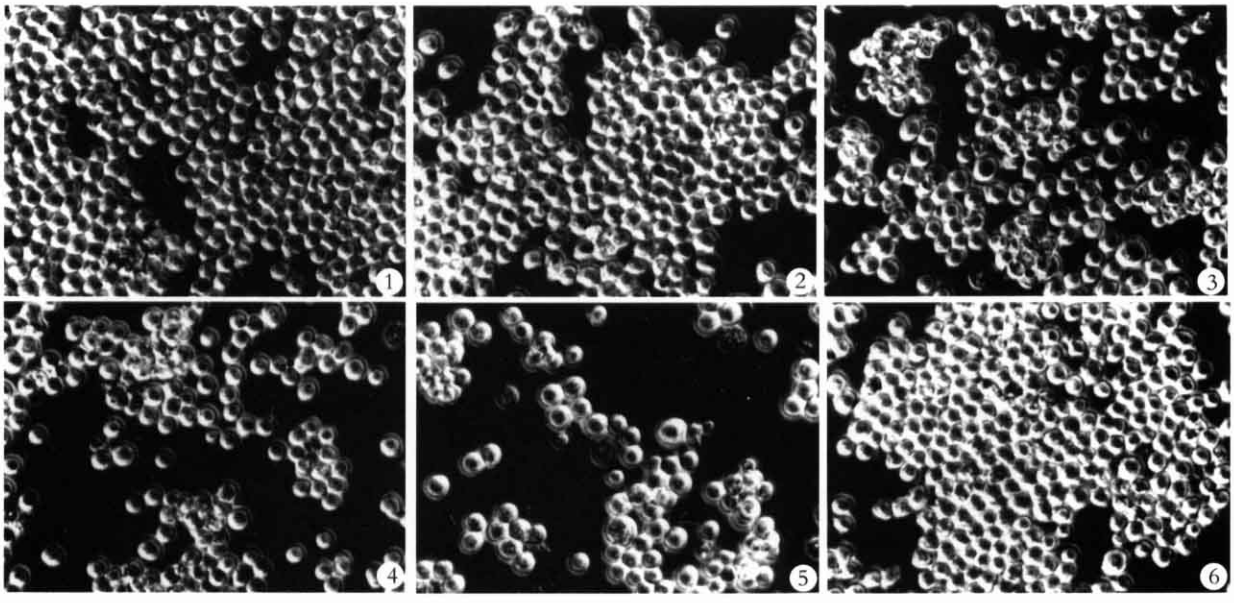


图 1　正常 SP2/0 细胞形态（×200）
Fig 1　The morphology of SP2/0 cells cultured with normal medium（×200）
图 2　LDS 处理 3 d 的 SP2/0 细胞形态（×200）
Fig 2　The morphology of SP2/0 cells treated with LDS for 3 d（×200）
图 3　LDS 联合 0.5 μmol/L LOV 处理 3 d 的 SP2/0 细胞形态（×200）
Fig 3　The morphology of SP2/0 cells treated with LDS and 0.5 μmol/L LOV for 3 d（×200）
图 4　LDS 联合 1.0 μmol/L LOV 处理 3 d 的 SP2/0 细胞形态（×200）
Fig 4　The morphology of SP2/0 cells treated with LDS and 1.0 μmol/L LOV for 3 d（×200）
图 5　LDS 联合 2.0 μmol/L LOV 处理 3 d 的 SP2/0 细胞形态（×200）
Fig 5　The morphology of SP2/0 cells treated with LDS and 2.0 μmol/L LOV for 3 d（×200）
图 6　LDS 联合 2.0 μmol/L LOV 及 20 μmol/L MVA 处理 3 d 的 SP2/0 细胞形态（×200）
Fig 6　The morphology of LDS and 2.0 μmol/L LOV-treated SP2/0 cells replenished with 20 μmol/L MVA for 3 d（×200）

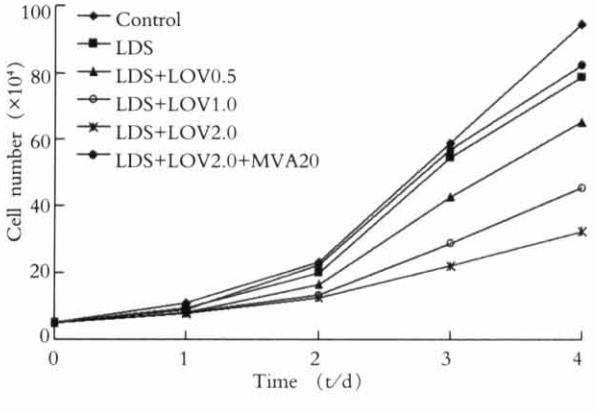


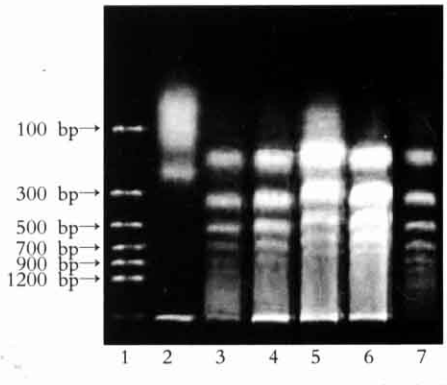
图 7　胆固醇自稳失调对 SP2/0 细胞生长曲线的影响
Fig 7　The growth curve of SP2/0 cells disturbed by LDS and/or LOV

2.3　胆固醇自稳失调对 SP2/0 细胞周期相分布和细胞凋亡的影响

SP2/0 细胞经 LDS 和/或 LOV 处理 3 d 后，收获细胞，流式细胞分析细胞周期相分布和细胞凋亡百分率，结果显示：经 LDS 和/或 0.5、1.0、2.0 μmol/L LOV 作用后，与对照组比较，S 期细胞减少，从 72.24% 下降到 34.16%，G_2/M 期细胞增多，从 5.54% 提高到 42.58%，而 G_1/G_0 细胞所占比例无明显变化；细胞凋亡率增加，结果分别为 0%、3.70%、5.70%、7.32%、9.71%，处理剂量越高，作用越强。20 μmol/L MVA 可以基本拮抗 2.0 μmol/L LOV 引起的细胞周期分布改变和细胞凋亡作用。

2.4　DNA 梯形带检测胆固醇自稳失调诱导 SP2/0 细胞凋亡

DNA 梯形带检测发现 LDS 和/或 LOV 处理 3 d 的 SP2/0 细胞出现明显的 DNA 梯形带（图 8），提示 LDS 和/或 LOV 处理能诱导 SP2/0 细胞凋亡，与流式细胞分析结果相一致。



1：DNA ladder marker；2：Control；3：LDS；4：LDS + 0.5 μmol/L LOV；5：LDS + 1.0 μmol/L LOV；6：LDS + 2.0 μmol/L LOV；7：LDS + 2.0 μmol/L LOV + 20 μmol/L MVA

图 8　DNA 梯形带检测各组处理 3 d 的 SP2/0 细胞凋亡情况
Fig 8　DNA ladder assay of SP2/0 cells treated with LDS and /or LOV for 3 d

3 讨论

细胞膜是细胞内外环境的屏障,胆固醇是哺乳动物细胞膜的主要成分之一,与膜的生物物理特性、脂区形成及膜蛋白的结构和功能密切相关。正常情况下细胞胆固醇的水平在多个不同层次受到严格调控,通过调控胆固醇合成的限速酶——HMG-CoA 还原酶,以获得细胞自身合成的内源性胆固醇,以及调控 LDL-R 介导的内吞以提供细胞外源性胆固醇。本实验以 LOV 抑制细胞内源性胆固醇的合成,以 LDS 阻断外源性胆固醇供给,造成细胞胆固醇自稳失调,能抑制 SP2/0 骨髓瘤细胞增殖和诱导凋亡,阻滞细胞于 G_2/M 期,该作用有剂量-效应和时间依赖关系。综合国内外近年来的研究结果,LDS 和/或 LOV 抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡的机制可能与以下几方面有关。

胆固醇对细胞膜的正常结构和功能起着关键的调节作用,适宜的胆固醇水平有利于维持膜蛋白的结构和功能。胆固醇和鞘脂在细胞膜上形成功能各异的脂区(lipid domain),如脂筏(lipid raft)和膜穴样内陷(caveolae),它们参与膜转运和信号转导等许多重要细胞事件[4,5],胆固醇在脂筏和 caveolae 的形成中起重要作用。肿瘤细胞具有无限增殖的特性,需要通过不断合成内源性胆固醇和受体介导的 LDL 内吞来满足细胞对胆固醇及其活性代谢产物的需要。细胞膜胆固醇水平降低会削弱细胞膜脂质双层核心的疏水屏障作用,使细胞膜的通透性增加,脂区的完整性和功能受到破坏[6],细胞膜的结构、生物物理特性和功能以及膜蛋白如受体蛋白、载体蛋白、离子通道蛋白的结构和功能受到影响,使细胞对外源性信号接收、跨膜信号传递以及细胞代谢等功能发生紊乱,最后导致细胞死亡。

HMG-CoA 还原酶是细胞内胆固醇生物合成途径的限速酶,其催化产物甲羟戊酸是胆固醇、长醇、泛醌、血红素 A、异戊烯腺嘌呤、法呢化蛋白质如 Ras 蛋白和核纤层蛋白等多种重要产物的前体,它们参与构成细胞膜的完整性、糖蛋白合成、线粒体呼吸链电子传递、细胞内信号转导、细胞周期进展等重要的生物学过程。LOV 通过抑制 HMG-CoA 还原酶活性抑制了 MVA 途径,蛋白质异戊二烯化所需的焦磷酸法呢酯(farnesyl pyrophosphate, FPP)和焦磷酸香叶酯(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)合成受抑,一些重要蛋白质异戊二烯化受阻,从而引发一系列生物学效应。有实验证实,在细胞培养体系中加入 MVA 可以阻断 LOV 的抑制增殖和诱导凋亡的作用[7],本研究也得到了类似的结果。

研究表明,他汀类药物能通过调控细胞周期蛋白(cyclins)、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)及细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CKIs) p21、p27 等的表达而影响细胞周期进程,阻滞髓样白血病细胞、乳腺癌细胞、结肠癌细胞、前列腺癌细胞等多种肿瘤细胞于 G_1期。本室最近的研究结果也显示,LOV 阻滞 MCF-7 乳腺癌细胞于 G_0/G_1 期,显著降低胞浆 IκBα、CDK4、pRb 蛋白的表达,同时提高核 IκBα 蛋白水平,对 p16 蛋白无影响[8]。本实验研究结果显示 LDS 和/或 LOV 阻滞 SP2/0 细胞于 G_2/M 期,与 Martinez-Botas 等[9]的实验结果一致,可能与胆固醇缺乏使无活性的高磷酸化 $p34^{cdc2}$ 增加有关,$p34^{cdc2}$-cyclinB 复合物参与调控细胞通过 G_2 和 M 期。LOV 诱导肿瘤细胞凋亡还与 caspase 家族及 Bcl-2 家族中的一些凋亡相关基因有关[7,10]。

参考文献:

[1] Chan K K, Oza A M, Siu L L. The statins as anticancer agents[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(1): 10-19.

[2] Corwin L M, Humphrey L P, Shloss J. Effect of lipids on the expression of cell transformation[J]. Exp Cell Res, 1977, 108(2): 341-347.

[3] 熊世勤, 朱锡华, 黄云辉. 一种快速分离细胞凋亡片段化 DNA 的简单方法——NP-40 法[J]. 免疫学杂志, 2000, 16(3): 228-231.

[4] Massimino M L, Griffoni C, Spisni E, *et al*. Involvement of caveolae and caveolae-like domains in signalling, cell survival and angiogenesis [J]. Cell Signal, 2002, 14(2): 93-98.

[5] Ikonen E. Roles of lipid rafts in membrane transport[J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13(4): 470-477.

[6] Kabouridis P S, Janzen J, Magee A L, *et al*. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes[J]. Eur J Immunol, 2000, 30(3): 954-963.

[7] Zhong W B, Wang C Y, Chang T C, *et al*. Lovastatin induces apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells *via* inhibition of protein geranylgeranylation and de novo protein synthesis[J]. Endocrinology, 2003, 144(9): 3852-3859.

[8] 韦 娜, 糜漫天, 张乾勇, 等. 洛伐他汀对 MCF-7 细胞核转录因子和细胞周期调控蛋白表达的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2003, 25(4): 332-334.

[9] Martinez Botas J, Suarez Y, Ferruelo A J, *et al*. Cholesterol starvation decreases p34(cdc2) kinase activity and arrests the cell cycle at G2 [J]. FASEB J, 1999, 13(11): 1359-1370.

[10] Agarwal B, Bhendwal S, Halmos B, *et al*. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(8): 2223-2229.

(编辑 栾 嘉)