阿托伐他汀通过抑制 RhoA 活性减少非小细胞肺癌的增殖

刘 冰[1],阳 洁[2] (1. 广东药学院药科学院药理系,广东 广州 510006;2. 广西医科大学药学院药理学教研室,广西 南宁 530021)

[摘 要] **目的** 观察阿托伐他汀(ATV)对非小细胞肺癌(NSCLCs)细胞增殖的影响并探讨其机制。**方法** 用改进 MTT 法检测不同浓度 ATV、RhoA 特异性抑制剂 C3 转移酶(C3 transferase)、RhoA siRNA 处理后 A549 细胞、H358 细胞、Calu3 细胞的增殖情况。用 RhoA 活性测定法观察 C3 transferase 及不同浓度、不同时间 ATV 处理后 NSCLCs 细胞的 RhoA 活性变化。用 Lipofectamine 2000 转染 RhoA siRNA,Western blot 检测 RhoA 的蛋白表达。**结果** ATV 浓度依赖性(0.1 ~ 25.0 μmol/L)地抑制三株 NSCLCs 细胞增殖($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。ATV 浓度依赖性(0.1 ~ 25.0 μmol/L)和时间依赖性(12 ~ 96 h、48 ~ 96 h)地抑制不同 NSCLCs 细胞的 RhoA 活性($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。C3 transferase 能显著降低三株 NSCLCs 细胞的 RhoA 活性并抑制 NSCLCs 细胞增殖($P<0.01$)。RhoA siRNA 在有效沉默 RhoA 蛋白表达后,也明显抑制 NSCLCs 细胞增殖($P<0.01$)。但 ATV 联合应用 C3 transferase 或 RhoA siRNA 不能产生协同抑制效应,而与单用 C3 transferase 或 RhoA siRNA 的抑制增殖作用相似($P>0.05$)。**结论** ATV 主要通过抑制 RhoA 活性从而抑制 NSCLCs 细胞增殖。

[关键词] 阿托伐他汀;非小细胞肺癌;细胞增殖;RhoA

[中图分类号] R734.2;R329.28 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)04-0410-03

Atorvastatin reduces proliferation of non-small cell lung carcinomas via inhibition of RhoA activity

LIU Bing, YANG Jie (Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong 510006, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of atorvastatin (ATV) on proliferation of non-small cell lung carcinomas (NSCLCs) as well as the underlying molecular mechanisms. **Methods** Cell proliferation was measured by a modified MTT assay after the treatment with different concentrations of ATV, RhoA specific inhibitor C3 transferase and RhoA siRNA in A549, H358, and Calu3 cells. The change of RhoA activity was measured by a microplate reader in NSCLCs cells treated with C3 transferase or atorvastatin at different doses and different times. Transfection of NSCLCs with RhoA siRNA was done using Lipofectamine 2000. Expression levels of RhoA protein were determined by Western blot. **Results** Atorvastatin significantly reduced the proliferation of three NSCLCs cell lines in concentration-dependent manner (0.1 ~ 25.0 μmol/L) ($P<0.05$ or $P<0.01$). Atorvastatin substantially inhibited the RhoA activity of different NSCLCs cell lines in a concentration-dependent (0.1 ~ 25.0 μmol/L) and time-dependent manner (12 ~ 96 hours, and 48 ~ 96 hours) ($P<0.05$ or $P<0.01$). C3 transferase significantly inhibited the RhoA activity of the three NSCLCs cell lines and resultantly inhibited NSCLCs cells proliferation ($P<0.01$). Moreover, knockdown of RhoA expression with RhoA siRNA also resulted in a significant inhibition of NSCLCs cells proliferation ($P<0.01$). However, additional atorvastatin administration exerted no additional growth inhibition in C3 transferase-treated or RhoA siRNA-treated NSCLC cells compared with the inhibitor or specific siRNA treatment alone ($P>0.05$). **Conclusion** Atorvastatin can suppress NSCLCs cells proliferation primarily through inhibition of RhoA activity.

Keywords: atorvastatin; non-small cell lung carcinomas; cell proliferation; RhoA

肺癌中 80% 为非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinomas, NSCLCs),早期诊断率极低,大多数患者确诊时已属晚期或发生转移,失去手术治疗的机会,需要化学药物治疗[1]。近年的研究表明,他汀类还能显著抑制前列腺癌、乳腺癌、胃癌、食管癌等多种肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡[2-3]。但阿托伐他汀(ATV)能否影响 NSCLCs 的增殖仍不清楚。本实验旨在研究阿托伐他汀对三株 NSCLCs 细胞(A549 细胞、H358 细胞、Calu3 细胞)增殖的影响及其可能的作用机制,为 NSCLCs 的临床治疗提供新的思路。

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201304026

[收稿日期] 2013-05-03 [修回日期] 2013-06-10

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 阿托伐他汀,DMEM、胎牛血清,青霉素、链霉素、噻唑蓝、二甲基亚砜,RhoA siRNA、control siRNA、单克隆抗 RhoA 抗体、辣根过氧化物酶标记的抗兔抗体、β-actin 抗体,Lipofectamine 2000,RhoA 特异性抑制剂 C3 transferase,增强化学发光检测试剂盒,Rho-GTP 亲和力测试板。

1.1.2 NSCLCs 细胞株 A549 细胞、H358 细胞、Calu3 细胞

用含 10% 胎牛血清及 0.1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中常规培养、传代。

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖实验 采用改进的 MTT 法测定细胞增殖情况[4]。取对数生长期的 A549 细胞、H358 细胞、Calu3 细胞，用无血清 DMEM 重悬后，以 5×10^5/mL 接种于 96 孔板，每孔 100 μl，细胞培养过夜，待细胞贴壁后，用不同浓度的阿托伐他汀和 RhoA siRNA、control siRNA、RhoA 特异性抑制剂（RhoA inhibitor）C3 transferase 处理细胞，同时设置阴性对照组（细胞不加药物处理）、空白对照组（无细胞、仅加无血清 DMEM），各组均设 3 个复孔，72 h 后，每孔加入 5 mg/mL 的噻唑蓝 20 μl，培养 4 h 后终止培养，吸去孔内培养液，每孔加入 150 μl 二甲基亚砜，置摇床上低速振荡 10 min，使结晶物充分溶解，用酶标仪在波长 570 nm 处测量各孔的吸光值（OD）。实验重复 3 次。细胞的相对增殖率（%）=（OD 处理组 − 空白对照组）/（OD 阴性对照组 − 空白对照组）×100%。

1.2.2 siRNA 转染 三株细胞常规培养至 50% ~70% 以上融合时进行转染。RhoA siRNA、control siRNA 转染采用 Lipofectamine2000 转染试剂进行[5]，细胞孵育过夜后，再培养 48 h。同时设置空脂质体组，每组设 3 个复孔，实验重复 3 次。用 Western blotting 检测 RhoA 的蛋白表达，观察 siRNA 的干扰效果。

1.2.3 Western blotting 根据文献[6]的方法，裂解细胞、提取总蛋白并测定浓度，SDS-PAGE 凝胶电泳，转移到硝酸纤维素膜，在含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中封闭 30 min，单克隆抗 RhoA 抗体（1∶2 000）4 ℃孵育过夜，TBST 洗膜，辣根过氧化物酶标记的抗兔抗体（1∶1 000）室温孵育 1 h，TBST 洗膜后，用增强化学发光检测试剂盒显色，凝胶成像仪扫描并分析图像。实验重复 3 次。

1.2.4 RhoA 活性测定 采用 Sterpetti 的方法[7]，收集细胞膜提取物 25 μg，在 Rho-GTP 亲和力测试板上孵育 45 min，再与抗体检测试剂孵育 2 h，酶标仪测定发光信号，观察 RhoA 活性的变化，实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用 SPSS 17.0 统计软件行 t 检验及单因素方差分析。

2 结果

2.1 ATV 对 NSCLCs 细胞增殖的影响

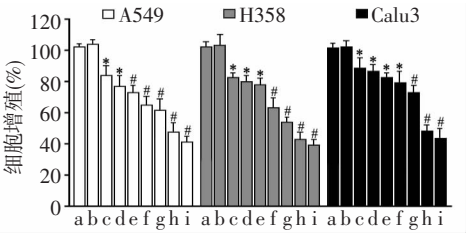
与未处理组（control）相比，0.1% DMSO 溶剂对照组对三株 NSCLCs 细胞的增殖无明显影响（$P>0.05$）；与 DMSO 溶剂对照组比较，0.1 ~25.0 μmol/L 的 ATV 能明显抑制三株 NSCLCs 细胞增殖，且呈浓度依赖性（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），见图 1。

2.2 ATV 对 NSCLCs 细胞 RhoA 活性的影响

与未处理组（control）相比，0.1% DMSO 溶剂对照组对三株 NSCLCs 细胞的 RhoA 活性无明显影响（$P>0.05$）；0.1 ~25.0 μmol/L 的 ATV 处理细胞 48 h 后，能明显抑制 A549 细胞、H358 细胞的 RhoA 活性，0.5 ~25.0 μmol/L 的 ATV 能明显抑制 Calu3 细胞的 RhoA 活性，均呈浓度依赖性（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），见图 2A。此外，2.5 μmol/L ATV 能持续地抑制三株细胞的 RhoA 活性至 96 h，且均呈时间依赖性（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），但 2.5 μmol/L ATV 在处理 Calu3 细胞细胞 48 h 后才明显抑制细胞的 RhoA 活性，并持续抑制到 96 h（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），见图 2B。

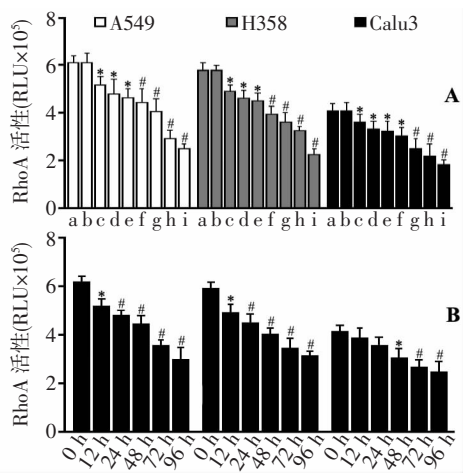
2.3 RhoA 特异性抑制剂对 NSCLCs 细胞增殖的影响

与未处理组（control）比较，用 1 g/mL 的 RhoA 特异性抑制剂 C3 transferase 预处理细胞 1 h 后，能使 A549 细胞、H358 细胞、Calu3 细胞的 RhoA 活性分别显著下降 70.79%（$P<0.01$）、79.60%（$P<0.01$）、77.75%（$P<0.01$），见图 3A。与未处理组（control）比较，单用 2.5 μmol/L ATV、单用 10.0 μmol/L ATV、单用 1 g/mL 的 RhoA 特异性抑制剂 C3 transferase、合用 1 g/mL C3 transferase + 2.5 μmol/L ATV、合用 1 g/mL C3 transferase + 10.0 μmol/L ATV 等 5 个组均能明显抑制 A549 细胞、H358 细胞、Calu3 细胞增殖（$P<0.01$）。但是，与单用 1 g/mL 的 RhoA 特异性抑制剂 C3 transferase 组比较，合用 1 g/mL C3 transferase + 2.5 μmol/L ATV、合用 1 g/ml C3 transferase + 10.0 μmol/L ATV 两个组均无显著差异（$P>0.05$），见图 3B。



a：control；b：DMSO；c：0.1 μmol/L ATV；d：0.5 μmol/L ATV；e：1.0 μmol/L ATV；f：2.5 μmol/L ATV；g：5.0 μmol/L ATV；h：10.0 μmol/L ATV；i：25.0 μmol/L ATV；*：与 DMSO 组比较，$P<0.05$；#：与 DMSO 组比较，$P<0.01$

图 1 ATV 对 NSCLCs 细胞增殖的影响

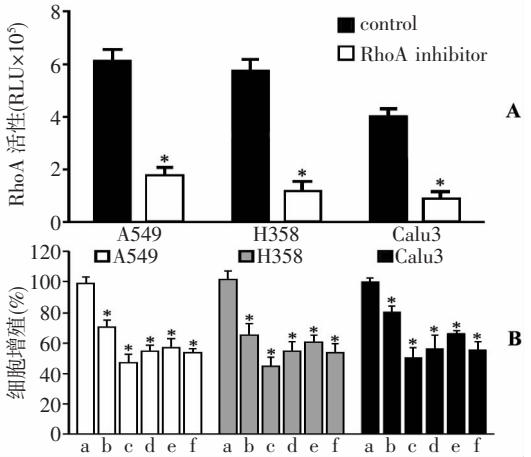


A：不同浓度 ATV 对 RhoA 活性的影响（a：control；b：DMSO；c：0.1 μmol/L；d：0.5 μmol/L；e：1.0 μmol/L；f：2.5 μmol/L；g：5.0 μmol/L；h：10.0 μmol/L；i：25.0 μmol/L）；B：2.5 μmol/L ATV 不同作用时间对 RhoA 活性的影响；*：与 DMSO 组或 0 h 组比较，$P<0.05$；#：与 DMSO 组或 0 h 组比较，$P<0.01$

图 2 ATV 对 NSCLCs 细胞 RhoA 活性的影响

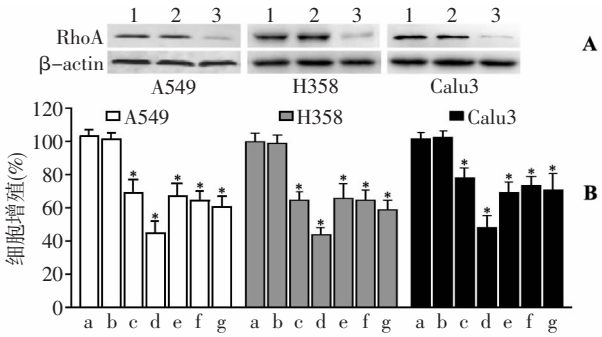
2.4 RhoA siRNA 对 NSCLCs 细胞增殖的影响

各组间 β-actin 表达无显著差异($P>0.05$),表明各组间蛋白的上样量基本一致。与未转染组比较,A549 细胞、H358 细胞、Calu3 细胞被转染 control siRNA 后,三株细胞内 RhoA 表达无显著变化($P>0.05$);但细胞被转染 RhoA siRNA 后,RhoA 蛋白的表达明显下降,其抑制率分别为(76.23 ± 8.05)%、(73.83 ± 6.04)%、(77.97 ± 10.98)%,表明转染 RhoA siRNA 能有效沉默三株 NSCLCc 细胞的 RhoA 蛋白表达,见图 4A。与未转染组(control)比较,转染 control siRNA 组的细胞增殖无显著变化($P>0.05$);转染 control siRNA 并合用 2.5 μmol/L ATV 组、转染 control siRNA 并合用 10.0 μmol/L ATV 组、转染 RhoA siRNA 组、转染 RhoA siRNA 并合用 2.5 μmol/L ATV 组、转染 RhoA siRNA 并合用 10.0 μmol/L ATV 组均能显著抑制三株细胞增殖($P<0.01$)。但是,与仅转染 RhoA siRNA 组比较,转染 RhoA siRNA 并合用 2.5 μmol/L ATV 组、转染 RhoA siRNA 并合用 10.0 μmol/L ATV 组均无显著差异($P>0.05$),见图 4B。



A:RhoA 特异性抑制剂预处理 1 h 后细胞 RhoA 活性;B:RhoA 特异性抑制剂、ATV 及合用对细胞增殖的影响(a:control;b:2.5 μmol/L ATV;c:10.0 μmol/L ATV;d:RhoA inhibitor;e:RhoA inhibitor + 2.5 μmol/L ATV;f:RhoA inhibitor + 10.0 μmol/L ATV);*:与 control 组比较,$P<0.01$

图 3 RhoA 特异性抑制剂对 NSCLCs 细胞增殖的影响



A:RhoA 蛋白的表达(1:未转染组;2:转染 control siRNA 组;3:转染 RhoA siRNA 组);B:RhoA siRNA 和 ATV 对细胞增殖的影响(a:control;b:control siRNA;c:control siRNA + 2.5 μmol/L ATV;d:control siRNA + 10.0 μmol/L ATV;e:RhoA siRNA;f:RhoA siRNA + 2.5 μmol/L ATV;g:RhoA siRNA + 10.0 μmol/L ATV);*:与 control 组比较,$P<0.01$

图 4 RhoA siRNA 对 NSCLCs 细胞增殖的影响

3 讨论

近年来发现,他汀类药物还对肿瘤细胞具有抑制增殖、诱导分化或凋亡、抑制血管生成及降低侵袭转移能力等作用[8]。ATV 对乳腺癌、膀胱癌、胰腺癌、结肠癌、前列腺癌等肿瘤细胞增殖均有显著抑制作用[9],是一种很有潜力的抗肿瘤药物。

RhoA 属于 GTP/GDP 结合 GTP 酶的 Ras 超家族,已被证明在促进肿瘤细胞的增殖和凋亡中发挥重要作用[10]。RhoA 在多种肿瘤细胞中过度表达和过度激活[11]。过度活化的 RhoA 能触发后续的 PI3K-Akt 通路的激活,而该通路被认为是调节细胞生成及细胞增殖的关键通路[12]。Fromigue 等[13]研究发现,高剂量的 ATV(10 μmol/L)可有效抑制 RhoA 介导的基质金属蛋白酶的激活,从而抑制骨肉瘤细胞生长和侵袭。然而,ATV 能否影响 NSCLCs 细胞的 RhoA 活性以及 RhoA 激活是否与 NSCLCs 细胞增殖有关仍不清楚。本研究中,ATV 呈浓度依赖性地显著抑制 NSCLCs 细胞增殖,并且呈浓度依赖性和时间依赖性地显著抑制 NSCLCs 细胞的 RhoA 活性。用 RhoA 特异性抑制剂 C3 transferase 降低 RhoA 活性会明显抑制 NSCLCs 细胞增殖。我们进一步用 RhoA siRNA 转染 NSCLCs 细胞,证实在有效沉默 RhoA 蛋白表达后,也会明显抑制 NSCLCs 细胞增殖。该结果提示,ATV 能有效地抑制 NSCLCs 细胞增殖,其机制与其降低 NSCLCs 细胞的 RhoA 活性密切相关。

此外,本研究发现,用 RhoA 特异性抑制剂 C3 transferase 或 RhoA siRNA 抑制 RhoA 活性时,联合应用 ATV 不能产生抑制 NSCLCs 细胞增殖的协同效应,而是与单用 RhoA 特异性抑制剂 C3 transferase 或 RhoA siRNA 的作用相似。这提示,在 RhoA 活性被抑制后,ATV 不能抑制 NSCLCs 细胞增殖。如果 ATV 抑制 NSCLCs 细胞增殖不是通过抑制 RhoA 活性而产生,那么在 RhoA 活性被抑制后,ATV 还应发挥本身对 NSCLCs 细胞增殖的抑制作用。相似结果在其他文献中也有报道,如 Wang 等研究发现[14],重组的人肝细胞生长因子(rh-HGF)能促进骨肉瘤细胞生存从而抵消顺铂的治疗作用,用抗 HGF 中和抗体治疗能明显增强顺铂的细胞毒性,但用 Akt siRNA 阻断 Akt 表达时,rh-HGF 和抗 HGF 的中和抗体对顺铂的细胞毒性仅为微弱作用或无作用。因此 Wang 等认为 rh-HGF 和抗

(下转第 415 页)

骨梳韧带,耻骨肌孔位于更深的层次,是腹内压直接作用的位置。腹膜前间隙补片修补术将足够大的补片从内侧覆盖整个耻骨肌孔,使补片与耻骨肌孔四周的肌性或骨性结构在比较大的范围产生粘连和同化,符合压力学原理,从解剖学的角度更趋于合理。

腹膜前修补时,将精索和输精管自内环水平的腹膜向近端游离,使其与下方紧贴的腹膜分开,即"壁化精索",目的是使补片放置在精索和腹膜之间。腹膜前疝修补术中,通过手术对腹股沟区的解剖观察,补片放置的部位不是平面结构,而是一个凸面向前外下方的三维结构,精索与补片的关系和 Lichtenstein 术式不同,后入路以及 TEP 手术精索血管已经转到了后方的髂腰肌表面,补片覆盖了肌耻骨孔以后精索血管位于补片的后下方。由于骨盆与垂直面的夹角大约是 60°[9],因此腹膜前修补放置的补片较之 Lichtenstein 术式放置的补片更适合该处的解剖三维结构。

[参考文献]

[1] Memon MA, Quinn TH, Cahill DR. Transversalis fascia: historical aspects and its place in contemporary inguinal herniorrhaphy[J]. J Laparoendosc Adv Surg Tech A, 1999, 9(3): 267 - 272.

[2] Read RC. The preperitoneal approach to the groin and the inferior epigastric vessels[J]. Hernia, 2005, 9(1): 79 - 83.

[3] Condon RE. Reassessment of groin anatomy during the evolution of preperitoneal hernia repair[J]. Am J Surg, 1996, 172(1): 5 - 8.

[4] 江 浩,丁 锐,姚琪远,等. 腹股沟区腹膜前解剖和疝修补术[J]. 中国临床解剖学杂志, 2008, 26(2): 209 - 211.

[5] Peiper C, Junge K, Prescher A, et al. Abdominal musculature and the transversalis fascia: an anatomical viewpoint[J]. Hernia, 2004, 8(4): 376 - 380.

[6] Skandalakis JE, Gary SW, Skandalakis LJ, et al. The surgical anatomy of the inguinal area[J]. World J Surg, 1989, 13(5): 490 - 498.

[7] Nyhus LM. The posterior(preperitoneal) approach and iliopubic tract repair of inguinal and femoral hernias-an update[J]. Hernia, 2003, 7(2): 63 - 67

[8] Ceriani V, Faleschini E, Bignami P, et a1. Kugel hernia repair: open "mini-invasive" techniqu. Personal experience on 620 patients[J]. Hernia, 2005, 9(4): 344 - 347

[9] Fitzgibbons RJ, Greenburg AG. Nyhus and Condon's Hernia 5th ed[M]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 55 - 58.

(编辑:杨 颖)

(上接第 412 页)

HGF 中和抗体对顺铂疗效的影响主要是依赖于对 PI3K-Akt 通路的抑制。本研究的上述结果也证实了此观点。因此,本文认为,RhoA 激活与 NSCLCs 细胞增殖密切相关,ATV 主要依赖于抑制 RhoA 活性从而减少 NSCLCs 细胞增殖。这提示,ATV 可能作为一种有潜力的抗肿瘤药物用于 NSCLCs 的治疗,但其具体的作用机制和信号途径仍需进一步阐明。

[参考文献]

[1] Pao W, Chmielecki J. Rational, bologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(11): 760 - 774.

[2] 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.

[3] Kotamraju S, Williams CL, Kalyanaraman B. Statin-induced breast cancer cell death: role of inducible nitric oxide and arginase-dependent pathways[J]. Cancer Res, 2007, 67(15): 7386 - 7394.

[4] Kim WH, Chon CY, Moon YM, et al. Effect of anticancer drugs and desferrioxamine in combination with radiation on hepatoma cell lines[J]. Yonsei Med J, 1993, 34(1): 45 - 56.

[5] Chen J, Hou J, Zhang J, et al. Atorvastatin synergizes with IFN-gamma in treating human non-small cell lung carcinomas via potent inhibition of RhoA activity[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 682(1 - 3): 161 - 170.

[6] Liu B, Wang G, Yang J, et al. Berberine inhibits human hepatoma cell invasion without cytotoxicity in healthy hepatocytes[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e21416.

[7] Sterpetti P, Hack AA, Bashar MP, et al. Activation of the Lbc Rho exchange factor proto-oncogene by truncation of an extended C terminus that regulates transformation and targeting[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(5): 1334 - 1345.

[8] Miraglia E, Hogberg J, Stenius U. Statins exhibit anticancer effects through modifications of the pAkt signaling pathway[J]. Int J Oncol, 2012, 40(3): 867 - 875.

[9] Parada B, Reis F, Pinto A, et al. Chemopreventive Efficacy of Atorvastatin against Nitrosamine-Induced Rat Bladder Cancer: Antioxidant, Anti-Proliferative and Anti-Inflammatory Properties[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(7): 8482 - 8499.

[10] Aznar S, Lacal JC. Rho signals to cell growth and apoptosis[J]. Cancer Lett, 2001, 165(1): 1 - 10.

[11] Touge H, Chikumi H, Igishi T, et al. Diverse activation states of RhoA in human lung cancer cells: contribution of G protein coupled receptors[J]. Int J Oncol, 2007, 30(3): 709 - 715.

[12] Denoyelle C, Albanese P, Uzan G, et al. Molecular mechanism of the anti-cancer activity of cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, on aggressive human breast cancer cells[J]. Cell Signal, 2003, 15(3): 327 - 338.

[13] Fromigue O, Hamidouche Z, Marie PJ. Blockade of the RhoA-JNK-c-Jun-MMP2 cascade by atorvastatin reduces osteosarcoma cell invasion[J]. J Biol Chem, 2008, 283(45): 30549-30556.

[14] Wang K, Zhuang Y, Liu C, et al. Inhibition of c-Met activation sensitizes osteosarcoma cells to cisplatin via suppression of the PI3K-Akt signaling[J]. Arch Biochem Biophys, 2012, 526(1): 38 - 43.

(编辑:余汇洋)