DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.026
第25卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 2
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

文章编号:1000-5404(2003)02-0151-04

论著

细胞内 Ca^{2+} 在 HMG-CoA 还原酶抑制剂抑制 MCF-7 细胞增殖中的作用

周 永,糜漫天,韦 娜,杨志祥 (第三军医大学预防医学系营养与食品卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨HMG-CoA还原酶抑制剂洛伐他汀(LOV)对人乳腺癌MCF-7细胞增殖功能和细胞内游离 Ca^{2+} 浓度([Ca^{2+}]i)变化的影响。方法 4、8、16 μmol/L LOV处理MCF-7细胞1~3 d后,MTT比色法检测细胞增殖功能,流式细胞仪测定细胞周期相的分布及凋亡率,激光共聚焦显微技术观察细胞[Ca^{2+}]i变化以及RT-PCR方法分析LOV对MCF-7细胞质膜钙泵PMCA1 mRNA表达的影响。结果 LOV对MCF-7细胞增殖有明显的抑制作用,并使细胞的生长阻滞于 G_0/G_1 期,该作用存在一定的剂量和时间关系,但其诱导MCF-7细胞凋亡的作用不明显;同时LOV可持续升高MCF-7细胞[Ca^{2+}]i,但对MCF-7细胞质膜钙泵PMCA1 mRNA表达无明显影响。结论 LOV导致的[Ca^{2+}]i持续升高可能与LOV影响MCF-7质膜PMCA1功能有关;[Ca^{2+}]i的升高及相关信号通路的变化可能参与了LOV对MCF-7细胞增殖抑制作用的调控。

关键词:HMG-CoA还原酶抑制剂;lovastatin;乳腺癌;胆固醇;[Ca^{2+}]i;钙泵;细胞周期
中图法分类号:R348.2;R730.23;R972.6 文献标识码:A

Role of intracellular calcium in proliferation inhibition of MCF-7 cells induced by HMG-CoA reductase inhibitor

ZHOU Yong, MI Man-tian, WEI Na, YANG Zhi-xiang (Department of Nutrition and Food Hygiene, Third Military Medical Universty, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of HMG-CoA reductase inhibitor, lovastatin (LOV), on the proliferation of human breast cancer cell MCF-7 and the role of intracellular calcium concentration ([Ca^{2+}]i) in this event. **Methods** After treated with LOV at the dosages of 4, 8 and 16 μmol/L for 1—3 d respectively, the proliferation of MCF-7 cells was examined with MTT, and the distributions of cell cycles with FCM assay. Meanwhile, the change of [Ca^{2+}]i of MCF-7 cells was observed with laser scanning confocal microscopy, and the expression of plasma membrane calcium ATPase isoform 1 (PMCA1) mRNA with RT-PCR. **Results** Lovastatin, inhibited the proliferation of MCF-7 cells and arrested MCF-7 cells in the G_0/G_1 phase of cell cycle, in a dose- and time-dependent manner. However, apoptosis of LOV-treated MCF-7 cells was not obvious. Simultaneously, LOV increased [Ca^{2+}]i of MCF-7 cells, but didn't change the expression of PMCA1 mRNA. **Conclusion** The results suggest that LOV has the capabilities of inhibiting the proliferation of MCF-7 cells and arresting them in G_0/G_1 phase. These effects of LOV maybe correlate with LOV changing the function of PMCA1and increasing [Ca^{2+}]i of MCF-7 cells.

Key words: lovastatin; human brest cancer cell; HMG-CoA reductase inhibitor; cell cycle; cholesterol; [Ca^{2+}]i; plasma membrane calcium ATPase

羟甲基戊二酸单酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶是细胞内胆固醇和异戊二烯生物合成途径的限速酶,其催化产物甲羟戊酸(MVA)为胆固醇、法呢化蛋白质(如p21Ras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、细胞内信号转导、细胞周期进展等许多生物学过程。洛伐他汀(Lovastatin, LOV)是HMG-CoA还原酶的抑制剂,临床已普遍用于治疗高脂血症[1,2]。近年来有研究报道显示,LOV对多种肿瘤细胞(如髓性白血病、神经胶质瘤等)有抑制增殖、诱导凋亡的作用[3,4],但有关于LOV对MCF-7细胞增殖功能影响的报道少见。另外,细胞内游离的 Ca^{2+} 作为第二信使,在细胞生命活动中具有非常重要的调控作用。已有报道,细胞内游离钙离子浓度([Ca^{2+}]i)升高与肿瘤细胞的增殖抑制或凋亡有关[5,6]。本实验以人乳腺癌MCF-7细胞为研究对象,探讨LOV对MCF-7细胞增殖功能和[Ca^{2+}]i的影响,目的在于认识LOV抗肿瘤作用的分子机制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271128)
作者简介:周 永(1972—),女,重庆市人,博士研究生,助教,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68752291
收稿日期:2002-06-14;修回日期:2002-08-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Lovastatin(Fluka 公司产品); 四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma 公司产品); Pluronic F-127(Molecular probes 公司产品); Fluo-3/AM(Ca 荧光标记探剂, Sigma 公司产品)以及 RT-PCR 相关的试剂等。

1.2 细胞培养与处理

人乳腺癌 MCF-7 细胞株, 购自中科院上海细胞所。用含 10%小牛血清的 DMEM 高糖培养液培养细胞, CO_2 培养箱, 37℃、5% CO_2 常规培养传代。LOV 处理细胞的终浓度分别为 0、4、8、16 μmol/L, 各组培养液中 DMSO 的终浓度为 0.05%。

1.3 MTT 比色法检测细胞增殖功能

将细胞接种于 96 孔培养板, 加入不同浓度的处理因素, 每个剂量组作 3 个平行孔, 培养 1~3 d。收获细胞前 4 h, 每孔分别加入 15 μl(5 mg/ml)MTT, CO_2 培养箱, 37℃、5% CO_2 饱和湿度条件下培养 4 h, 去掉培养液后每孔分别加入 200 μl 异丙醇、二甲亚砜混合液(1∶1, v/v), 室温 30 min, 用酶标仪在 492 nm 处测定吸光度(A)值。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期相分布及细胞凋亡率

细胞经 LOV 处理 1~3 d 后, 每日收获各组细胞, 碘化丙啶染色后用流式细胞仪对 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。

1.5 激光共聚焦扫描技术观察细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化

将细胞接种在已放有盖玻片的 12 孔培养板内, 待细胞贴壁后用不同浓度的 LOV 分别处理细胞, 每剂量组作一个平行, 24、48、72 h 后分别取出已负载了细胞的盖玻片, 用不含有血清的 DMEM 液冲洗盖玻片 3 次, 洗掉细胞表面杂质, 在盖玻片上分别滴加含有 4 μmol/L Fluo-3/AM 和 1.0 μl 12.5% pluronic F-127的 0.5 ml 无血清的 DMEM 液, 37℃负载 45 min, 再用无血清和荧光探剂的 DMEM 液洗涤盖玻片 3 次, 充分洗掉没有进入细胞内的荧光探剂, 滴加少许无血清 DMEM 液, 以免除在观察过程中细胞变形或死亡, 激光共聚焦显微镜观察并照相。

1.6 RT-PCR 检测 MCF-7 细胞质膜钙泵 PMCA1 mRNA 水平

参照文献[9]的方法设计钙泵 PMCA1 的引物(分别为 5′-TGGTGCAAATTCCATAGACATCTC-3′, 5′-GAGCTGCGGGCTCTCATG-3′), 其 RT-PCR 扩增产物长度为 88 bp; 参照文献[10]的方法设计人 β-actin 的引物(作为内参照)(分别为 5′-GGGTCAGAAG-GATTCCTAATG-3′, 5′-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3′), 其 RT-PCR 扩增片段长度为 237 bp。引物均由上海博亚生物技术有限公司合成提供。扩增条件为 95℃ 5 min 后, 94℃ 20 s; 62℃ 1 min; 45 个循环。

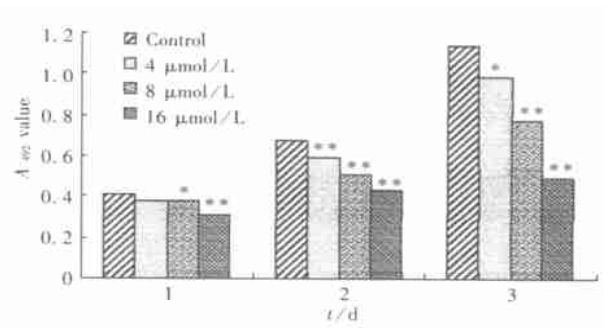
1.7 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用第四军医大学统计教研室 SPLM 软件行 t 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 MTT 比色法结果

4~16 μmol/L LOV 处理细胞 1~3 d 后, 与对照组比较, 处理组细胞 A_{492} 值均不同程度的下降, 并随 LOV 处理浓度的增大、作用时间的延长, A_{492} 值逐渐下降。除 4 μmol/L 剂量组 1 d 外, 每个剂量组、每个时相点 A_{492} 值与对照组比较均显著下降($P<0.05$)。即随着 LOV 处理剂量的增大, 作用时间的延长, MCF-7 细胞增殖功能降低, 见图 1。



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control group

图 1 LOV 对 MCF-7 细胞增殖功能的影响

Fig 1 Effect of LOV on the proliferation of MCF-7 cells

2.2 LOV 对 MCF-7 细胞细胞周期分布和细胞凋亡的影响

流式细胞仪分析显示: 不同浓度 LOV 处理细胞后, 与对照组比较, G_0/G_1 期细胞增多, S 期和 G_2/M 期细胞减少, 而且处理剂量越高、作用时间越长, 该作用越强。处理 3 d 后 G_0/G_1 期细胞增加最为显著, 高达 80%左右, 见表 1。另外, 在 LOV 处理细胞的 1~3 d 过程中, 均无指示细胞凋亡的亚 G_1 期"凋亡峰"出现, 这提示 LOV 可使 MCF-7 细胞的生长阻滞于 G_0/G_1 期, 但其诱导 MCF-7 细胞凋亡的作用不明显, 见图 2。

表 1 LOV 对 MCF-7 细胞细胞周期分布的影响(%)

Tab 1 Distributions of cell cycles in MCF-7 cells treated with LOV(%)

Group	1 d			2 d			3 d		
	G_0/G_1	S	G_2/M	G_0/G_1	S	G_2/M	G_0/G_1	S	G_2/M
Control	44.17	25.87	26.19						
4 μmol/L	44.98	29.48	20.71	58.70	18.50	18.30	75.60	11.50	10.30
8 μmol/L	54.21	20.28	24.06	71.86	9.05	17.63	81.41	6.30	10.70
16 μmol/L	64.43	15.15	14.36	79.96	8.36	8.34	81.74	7.94	5.85

2.3 LOV 对 MCF-7 细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响

激光共聚焦扫描显微镜观察发现, LOV 处理组细胞内荧光强度都有不同程度的增强, 且细胞内荧光强度的变化与处理因素之间存在一定的剂量-效应关系, 即 LOV 处理的剂量越高, 细胞内荧光强度越强; 另外, 细胞内荧光强度的强弱与 LOV 处理时间的长短也有一定关系, 即 LOV 处理时间越长, 细胞内荧光强度增强。也就是说: LOV 可以使 MCF-7 细胞内 Ca^{2+} 浓度增高, 且该作用与 LOV 的作用剂量大小和作用时间长短有一定的关系, 见表 2, 图 3~5。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

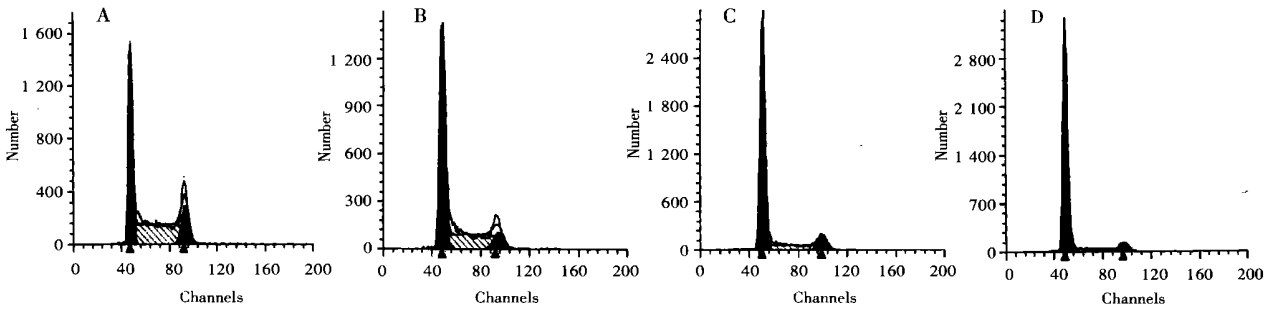


图 2　LOV 对 MCF-7 细胞细胞周期分布的影响(处理细胞 2 d)

Fig 2　Cell cycle analyses of MCF—7 cells on the 2nd day of LOV treatment

表 2　LOV 对 MCF-7 细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响　($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of LOV on the [Ca^{2+}] i of MCF-7 cells($\bar{x}\pm s$)

Group	[Ca^{2+}] i		
	1 d	2 d	3 d
Control	38.15±14.31		
Lovastatin			
4 μmol/L	41.83±15.05	53.17±23.69 *	70.98±28.42 *
8 μmol/L	66.86±25.25△	99.19±27.22 *△	116.57±37.99 *△
16 μmol/L	82.75±23.91△#	111.04±38.40 *△#	161.58±33.46 *△#

*: $P<0.01$ *vs* control group; △: $P<0.01$ *vs* 4 μmol/L group; #: $P<0.01$ *vs* 8 μmol/L group



图 3　4 μmol/L LOV 处理 MCF-7 细胞 2 d 胞内 Ca^{2+} 浓度变化

Fig 3　Change of [Ca^{2+}] i of MCF-7 cells on the 2nd day of 4 μmol/L LOV treatment

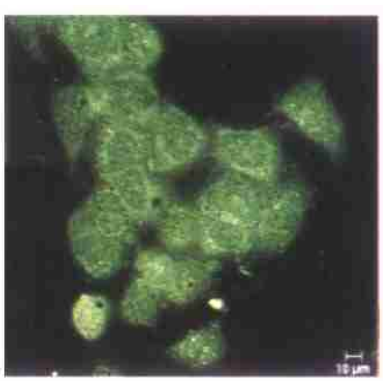


图 4　8 μmol/L LOV 处理 MCF-7 细胞 2 d 胞内 Ca^{2+} 浓度变化

Fig 4　Change of [Ca^{2+}] i of MCF-7 cells on the 2nd day of 8 μmol/L LOV treatment



图 5　16 μmol/L LOV 处理 MCF-7 细胞 2 d 胞内 Ca^{2+} 浓度变化

Fig 5　Change of [Ca^{2+}] i of MCF-7 cells on the 2nd day of 16 μmol/L LOV treatment

2.4　LOV 对 MCF-7 细胞质膜钙泵 PMCA1 mRNA 表达的影响

RT-PCR 分析结果显示,LOV 处理细胞后,MCF-7 细胞质膜钙泵 PMCA1 mRNA 的表达没有明显的变化,其表达在量上基本一致。提示 LOV 对 MCF-7 细胞质膜钙泵 PMCA1 的表达在转录水平上无影响。

3　讨论

胆固醇是维持细胞正常生长和保持活性状态所必需的,细胞内胆固醇或其代谢物与 DNA 合成的激发有关。正常细胞内胆固醇在多个层次上受到严格调控,HMG-CoA 还原酶、LDL-R 以及类固醇调节子结合蛋白(SREBP)形成一调节网络有效的控制细胞内胆固醇水平。处于分裂增殖中细胞需要通过不断合成内源性胆固醇和受体介导的 LDL 内吞来满足细胞对固醇类物质的需要。近年来有研究显示,LOV 可通过抑制细胞内源性胆固醇合成的限速酶 HMG-CoA 还原酶活性,使细胞内胆固醇合成受抑,而对肿瘤细胞有抑制增殖、诱导分化或凋亡的作用[3,4]。本研究显示,LOV 能抑制 MCF-7 细胞增殖,但诱导该细胞凋亡的作用不明显。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

此外，LOV 还能阻滞 MCF-7 细胞的生长于 G_0/G_1 期，该作用存在一定的剂量-效应和时间依赖关系。

Ca^{2+} 是细胞内重要的信号转导分子，在细胞生命活动中起重要的调控作用。在正常情况下，细胞内的钙离子浓度低于细胞外，这种胞内低钙的稳定状态对于维持细胞的正常活动非常重要。目前许多研究显示，肿瘤细胞[Ca^{2+}]i 持续升高是一些药物抗肿瘤作用中的重要事件，[Ca^{2+}]i 升高常伴有肿瘤细胞增殖抑制或凋亡的发生[5,6]。用 Ca^{2+} 载体(如 A23187，ionomycin 等)人为的使肿瘤细胞内[Ca^{2+}]i 水平升高后发现，细胞的增殖受抑并发生凋亡，这更加证实了胞内高钙对肿瘤细胞增殖的影响[7,8]。本实验研究显示，LOV 在抑制MCF-7 细胞增殖的同时，细胞内钙稳态被破坏，[Ca^{2+}]i 持续升高。故推测，[Ca^{2+}]i 升高及相关信号通路的变化可能参与了 LOV 对 MCF-7 细胞增殖抑制的调控。质膜钙泵(PMCA)，又称质膜 ATPase，是非肌肉细胞维持胞内低钙的关键之一。正常情况下，PMCA 以ATP 水解提供的能量逆浓度梯度将渗入胞内的 Ca^{2+} 排出。已证实，哺乳类动物细胞膜上有四种 PMCA 同工酶，其中 PMCA1 存在于 MCF-7 细胞膜上[9]。LOV 处理细胞后，对 MCF-7 细胞质膜钙泵 PMCA1 的表达在转录水平上无影响。胆固醇是细胞膜上的主要成分之一，其含量的改变可导致膜脂质微环境的改变而影响质膜上包括钙泵在内的多种膜蛋白的结构、功能，以及膜上侧向运动和跨膜转运[10]。LOV 是 HMG-CoA 还原酶的抑制剂，其可抑制细胞内胆固醇的合成。结合本实验结果推测，LOV 可能是通过改变质膜脂质构成而影响 PMCA1 的功能，导致 MCF-7 细胞[Ca^{2+}]i 持续升高。但有关于质膜钙泵 PMCA1 的活性和[Ca^{2+}]i 升高的详细分子机制将进一步探讨。

参考文献：

[1] Sabia H, Prasad P, Smith H T, *et al*. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of an extended-release formulation of fluvastatin administered once daily to patients with primary hypercholesterolemia[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2001, 37(5): 502—511.

[2] Benghozi R, Bortolini M, Jia Y, *et al*. Frequency of creatine kinase elevation during treatment with fluvastatin[J]. Am J Cardiol, 2002, 15, 89(2): 231—233.

[3] 国 风，岑建农，陈子兴，等. 胆固醇合成抑制剂洛伐他汀对 NB_4 细胞体外作用的研究[J]. 中华血液学杂志，2001，22(11)：584—588.

[4] Holstein S A, Hohl R J. Interaction of cytosine arabinoside and lovastatin in human leukemia cells[J]. Leuk Res 2001, 25(8): 651—660

[5] Zhang T C, Cao E H, Li J F, *et al*. Induction of apoptosis and inhibition of human gastric cancer MGC-803 cell growth by arsenic trioxide[J]. Eur J Cancer, 1999, 35(8): 1258—1263.

[6] Florio T, Thellung S, Arena S, *et al*. Somatostatin and its analog lanreotide inhibit the proliferation of dispersed human non-functioning pituitary adenoma cells *in vitro*[J]. Eur J Endocrinol, 1999, 141(4): 396—408.

[7] Miyake H, Hara I, Yamanaka K, *et al*. Calcium ionophore, ionomycin inhibits growth of human bladder cancer cells both *in vitro* and *in vivo* with alteration of Bcl-2 and Bax expression levels[J]. J Urol, 1999, 162(3 Pt 1): 916—921.

[8] Popescu B O, Cedazo-Minguez A, Popescu L M, *et al*. Caspase cleavage of exon 9 deleted presenilin-1 is an early event in apoptosis induced by calcium ionophore A 23187 in SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. J Neurosci Res, 2001, 66(1): 122—134.

[9] Roberts-Thomson S J, Holman N A, *et al*. Development of a real-time RT-PCR assay for plasma membrane calcium ATPase isoform 1 (PMCA1) mRNA levels in a human breast epithelial cell line[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2000, 44(3): 513—517.

[10] Gastman B R, Atarshi Y, Reichert T E, *et al*. Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes[J]. Cancer Res, 1999, 15, 59(20): 5 356—3 564.

(编辑 陈聪连)

(上接 150 页)

表现，以致漏诊长达 3 年之久。高皮质醇血症可抑制肠钙吸收，增加尿钙排泄(肾结石形成)，使血钙降低，引起继发性甲状旁腺功能亢进[2]。加之性腺功能受抑制，成骨细胞活性受抑，引发高转换型骨质疏松，骨密度减低，致双下肢骨痛发生。高皮质醇血症还引起肌肉消耗性萎缩，更加重下肢行走困难。长期的高皮质醇血症可抑制 T_4 脱碘形成 T_3，引起持续存在的“低 T_3 综合征”[3]。因此，当患者出现不明原因的骨痛伴肾结石并持续存在“低 T_3 综合征”时，结合相关的临床表现，应考虑库兴综合征的可能，及时作相关检查，以免漏诊。

关键词：库兴综合征；骨痛；肾结石
中图法分类号：R586.2 文献标识码：B

参考文献：

[1] Bochicchio D, Losa M, Buchfelder M, *et al*. Factors influencing the immediate and late outcome of Cushing's disease treated by transsphenoidal surgery: a retrospective study by the European Cushing's disease Survey Group[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1995, 80(11): 3114—3120.

[2] Manolagas S C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis[J]. Endocr Rev, 2000, 21(2): 115—137.

[3] P. K Taylor. Thyrotoxicosis [A]. In: Ashley G. Clinical Endocrinology [M]. 西安：世界图书出版公司，1999.330

(编辑 张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net