

胆固醇抑制剂洛伐他汀对 MCF-7 细胞增殖分化功能及形态结构的影响

周永, 糜漫天, 张乾勇, 郎海滨

Effect of cholesterol inhibitor —lovastatin on proliferation & differentiation and morphology of MCF-7 cells

ZHOU Yong, MI Man-tian, ZHANG Qian-yong, et al

Department of Nutrition and Food Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract: Objective To study the effect of lovastatin (LOV) on proliferation & differentiation and morphology of MCF-7 cells. **Methods** After treated MCF-7 cells with LOV for 1 ~ 3d, the proliferation of MCF-7 cells were examined with MTT test and the distribution of cell cycle with FCMass analysis. Meanwhile the morphological changes were observed. **Results** LOV could change the morphology and ultrastructure of MCF-7 cells significantly, inhibit the proliferation of MCF-7 cells, induced differentiation and arrest MCF-7 cells in the G₀/G₁ phase of cell cycle. However, apoptosis in MCF-7 cells treated with LOV was not obvious. **Conclusion** It suggests that LOV has the capabilities of inducing cellular morphological changes, inhibiting proliferation and arresting MCF-7 cells in G₀/G₁ phase of cell cycle. Meanwhile it induces the differentiation of MCF-7 cells.

Keywords: Lovastatin; Human breast cancer cell; Cholesterol; Differentiation; Proliferation

摘要:目的 探讨洛伐他汀(Lovastatin, LOV)对 MCF-7 细胞增殖、分化功能及细胞形态、结构的影响。方法 LOV 处理细胞 1~3d 后, MTT 比色法检测细胞增殖功能, 流式细胞仪分析细胞周期相分布及细胞凋亡率, 同时观察细胞形态、结构的改变。结果 LOV 可导致细胞形态、结构改变; 细胞增殖抑制, 生长阻滞于 G₀/G₁ 期; 同时 LOV 有诱导该细胞向正常细胞分化的趋势, 但诱导细胞凋亡的作用不明显。结论 LOV 可导致 MCF-7 细胞形态、功能改变, 细胞增殖受抑、生长阻滞于 G₀/G₁ 期, 并有诱导细胞向正常细胞分化的趋势。

关键词: 洛伐他汀; 乳腺癌; 胆固醇; 细胞增殖; 细胞分化

中图分类号: R979.1; R737.905 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2003)03-0210-04

0 引言

细胞内胆固醇或其代谢物与 DNA 合成的激发有关, 是维持细胞正常生长和保持活性状态所必需。正常细胞可通过自身合成内源性胆固醇以及低密度脂蛋白受体介导的外源性胆固醇内吞来维持细胞内胆固醇水平的相对稳定。羟甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶是细胞内源性胆固醇合成的限速酶, 其活性改变可导致细胞内胆固醇代谢紊乱。洛伐他汀(Lovastatin, LOV) 为他汀类(statins) 药物中的一种, 是 HMG-CoA 还原酶的抑制剂, 现临床已普遍用于治疗高脂血症^[1,2]。近年有研究报道, LOV 对肿瘤细胞有抑制增殖^[3]、诱导分化^[4,5] 或凋亡^[6] 作用, 但有关 LOV 对 MCF-7 细胞增殖、分化功能影响的报

道少见。本实验以人乳腺癌 MCF-7 细胞为研究对象, 探讨 LOV 对该细胞增殖、分化功能的影响, 为进一步研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Lovastatin (Fluka 公司产品): 以二甲亚砜(DMSO) 为溶剂, 配成 $3.2 \times 10^4 \mu\text{mol/L}$ 的储备液, 分装, -20℃ 保存; 四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma 公司产品): 用 0.1 mol/L PBS 配成 5mg/ml, 过滤除菌, 分装, -20℃ 保存; DMEM 高糖细胞培养液(Hyclone 公司产品) 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, CO₂ 培养箱, 37℃、5% CO₂ 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

收稿日期: 2002-06-20; 修回日期: 2002-10-08

作者单位: 400038 重庆, 第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室

组培养液中 DMSO 的终浓度均为 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 1~3d。收获细胞前 4h,每孔分别加入 15 μ l (5mg/ml) MTT,CO₂ 培养箱,37℃、5%CO₂ 饱和湿度条件下培养 4h,去掉培养液后每孔分别加入 200 μ l 异丙醇、二甲亚砷混合液(1:1,v/v),室温 30min,用酶标仪在 492nm 处测定 OD 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 1~3d 后,每日收获各组细胞,碘化丙啶染色后用 FACS-440 型(美国)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。每次检测的细胞数目均为 1 \times 10⁴ 个。

1.5 光镜、电镜观察细胞形态、结构变化

LOV 处理细胞 1~3d,每天收获细胞,一部分细胞在光学显微镜下观察并照相;另一部分细胞,3%戊二醛固定细胞,石蜡包埋,超薄切片,透射电镜观察细胞超微结构的变化。

2 结果

2.1 MTT 比色法结果

LOV 处理细胞 1~3d 后,与对照组比较,处理组细胞 OD₄₉₂ 值均有不同程度的下降;且随着 LOV 处理浓度的增大、作用时间的延长,OD₄₉₂ 值逐渐下降。处理 3d 后,OD₄₉₂ 值变化最明显,每一个剂量组 OD₄₉₂

值与对照组比较均显著下降(P<0.05)。即 LOV 对 MCF-7 细胞增殖抑制功能有剂量-效应和时间依赖关系,见表 1。

表 1 LOV 对 MCF-7 细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	OD ₄₉₂		
	1d	2d	3d
对照组	0.412 ±0.018	0.675 ±0.025	1.142 ±0.021
LOV 组			
4 μ mol/L	0.382 ±0.025	0.589 ±0.032 **	0.986 ±0.016 *
8 μ mol/L	0.376 ±0.019 *	0.512 ±0.022 **	0.775 ±0.035 **
16 μ mol/L	0.315 ±0.023 **	0.432 ±0.031 **	0.495 ±0.029 **

*: P<0.05 与对照组比较; **: P<0.01 与对照组比较

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,LOV 处理细胞后,与对照组比较,G₀/G₁ 期细胞增多,S 期和 G₂/M 期细胞减少,即 LOV 可使 MCF-7 细胞的生长阻滞于 G₀/G₁ 期,且 LOV 处理剂量越高、作用时间越长,该作用越强。LOV 处理 3d 后,G₀/G₁ 期细胞增加最为显著,高达 80% 左右,见表 2。另外在 LOV 处理细胞 1~3d 过程中,均无指示细胞凋亡的亚 G₁ 期“凋亡峰”出现,提示 LOV 诱导 MCF-7 细胞凋亡的作用不明显,见图 1。

2.3 LOV 对 MCF-7 细胞形态以及超微结构的影响

2.3.1 普通光学显微镜观察结果

未加 LOV 处理组的细胞形态较规则,呈椭圆形,无伪足,细胞间的间隙小且贴壁成团生长,细胞团

表 2 LOV 对 MCF-7 细胞细胞周期分布的影响

组别	1d			2d			3d		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	44.17	25.87	26.19						
LOV 组									
4 μ mol/L	44.98	29.48	20.71	58.70	18.50	18.30	75.60	11.50	10.30
8 μ mol/L	54.21	20.28	24.06	71.86	9.05	17.63	81.41	6.30	10.70
16 μ mol/L	64.43	15.15	14.36	79.96	8.36	8.34	81.74	7.94	5.85

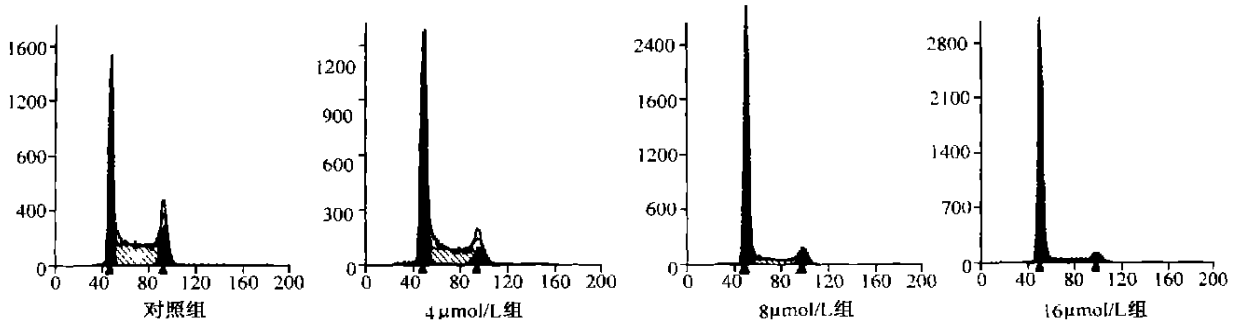


图 1 LOV 对 MCF-7 细胞细胞周期分布的影响(处理细胞 2d)



图2 MCF-7 细胞超微结构
观察(×2500)

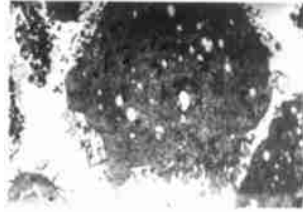


图3 16μmol/LLOV 处理 MCF-7
细胞 2d 超微结构变化(×2500)



图4 16μmol/LLOV 处理 MCF-7
细胞 2d 胞浆超微结构变化(×6000)

内细胞的边界不清;LOV 处理后,细胞变小,形态不规则,呈长梭形,甚至尖形,并出现大量的伪足,细胞团内相邻细胞间的间隙加大,细胞贴壁能力不同程度的减弱;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。16μmol/LLOV 处理细胞 3d 后,细胞形态改变最为严重,有的细胞伪足过度的延伸,形态上类似于神经细胞,还有的细胞甚至缩小成圆形,并伴有大量的细胞脱壁死亡,游离于培养液中。

2.3.2 透射电镜观察结果

未加 LOV 处理的细胞,其核大、深染,核浆比例大,核仁大、多,核内异染色质多;线粒体、内质网等细胞器数量少且发育不良,即细胞器和胞浆内结构“单纯化”;细胞膜上的突起少等等,呈低分化状态,见图 2。LOV 处理后,与对照组比较,细胞内线粒体增多,内质网扩张、增多且排列较整齐,细胞膜上突起增多,见图 3,胞内出现微腺腔,见图 4,细胞核固缩、染色质致密等细胞分化的一些改变。提示 LOV 有诱导 MCF-7 细胞向正常细胞分化的趋势。另外,LOV 处理后的细胞没有发现凋亡小体的存在,再一次提示 LOV 诱导 MCF-7 细胞凋亡的作用不明显。

3 讨论

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、异戊烯腺嘌呤、法呢基化蛋白质(如 p21^{ras}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、电子传递、细胞内信号转导、细胞周期进展等许多重要的生物学过程。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。研究发现,LOV 可抑制细胞内 HMG-CoA 还原酶活性,使细胞内源性胆固醇合成受抑,导致细胞内 DNA 复制和细胞增殖速度下降,细胞周期受阻于 G₀/G₁ 期,并在一定程度上诱导细胞凋亡^[7]。LOV 还可通过抑制 MVA 途径,阻止细胞内一些蛋白质(如 ras 蛋白,核纤层蛋白等)异戊二烯化,影响

这些蛋白质正常功能的发挥,从而抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡^[4,8]。有人证实,在细胞培养体系中加入 MVA 可以阻断 LOV 的抑制增殖及诱导凋亡的作用^[9]。本实验发现,LOV 处理 MCF-7 细胞后,细胞的生长均受到不同程度的抑制,同时细胞的形态、超微结构也发生明显的改变,该作用存在剂量-效应和时间依赖关系。16μmol/LLOV 处理细胞 3d 后,抑制率高达 75.80%,而且细胞形态改变最为严重,并伴有大量的细胞死亡。流式细胞分析结果提示 LOV 不仅能显著抑制 MCF-7 细胞增殖,并能阻滞细胞的生长于 G₀/G₁ 期。而 G₀/G₁ 期细胞增多、S 期细胞减少的这种 G₁-S 期转换的抑制,已被认为是处于分化过程中的细胞所具有的共同特征,提示 LOV 有一定的诱导 MCF-7 细胞分化的趋势。另外,研究结果还显示,LOV 对 MCF-7 细胞的影响主要是抑制细胞增殖、诱导分化,而诱导 MCF-7 细胞的凋亡作用不明显。有关于 LOV 抑制 MCF-7 细胞增殖、诱导分化的详细分子机制还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] Sabia H, Prasad P, Smith HT, 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] Ben ghazi R, Bortolini M, Jia Y, et al. Frequency of creatine kinase elevation during treatment with fluvastatin [J]. *Am J Cardiol*, 2002, 89 (2): 231-233.
- [3] Germano D, Pacilio C, Cancemi M, et al. Inhibition of human breast cancer cell growth by blockade of the mevalonate-protein prenylation pathway is not prevented by overexpression of cyclin D₁ [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2001, 67 (1): 23-33.
- [4] Guo F, Cen J, Chen Z. In vitro effect of fluvastatin on NB4 promyelocytic leukemia cells [J]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2001, 22 (11): 584-588.
- [5] Dimitroulakos J, Thai S, Wasfy GH, et al. Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid leukemias [J]. *Leuk Lymphoma*, 2000, 40 (1-2): 167-178.
- [6] Xia Z, Tan MM, Wong WW, et al. Block in protein geranylgeranylation is essential for lovastatin-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells [J]. *Leukemia*, 2001, 15 (9): 1398-1407.
- [7] Lishner M, Bar-Sela A, Elis A, et al. Effect of simvastatin alone and

incombinationwith cytosinearabinosideonthe proliferationof 60cells[J].PharmacolToxicol,2000,86 (2) :83-91.
 myeloidleukemiacelllines[J].InvestigMed,2001,49 (4) :319-324.
 [8]Wan gIK,Lin -shiauSY,LinJK.Inhibitionofa poptosisb ylovastatin throu ghactivationofcas pase-3andDNase - inleukemiaHL - 572-579.
 [9]ChoiJW,Jun gSE.Lovastatin -induced proliferationinhibitionand apoptosisinC6 gliacells[J].JPharmacolExp pTher,1999,289 (1) : (刘红武校对)

短篇个案

胃角癌的临床内镜研究

任刚,蔡嵘,程普选,丁文熙,许幼如,陈强

关键词:胃癌;内镜;幽门螺杆菌
 中图分类号:R735.2 文献标识码:D
 文章编号:1000-8578(2003)03-0213-01

0 引言

胃小弯和胃角是胃癌的最好发的部位,了解该部位恶性病变的发生和表现特征,将有助于提高胃癌特别是早期胃癌的检出率,从而改善患者的预后。本文收集了 40 例胃角癌患者的临床和内镜资料,并作出初步的分析,以期能提供一些有益的借鉴。

1 资料与方法

1.1 资料 1999 年 7 月~2001 年 7 月在我院行胃镜检查的胃角癌患者 40 例入组研究,所有病例均经病理证实。男性 22 例,女性 18 例。年龄最小 43 岁,最大 84 岁,平均年龄 62 岁,其中 40~59 岁 18 例,60~79 岁 20 例,80 岁 2 例。

1.2 方法

1.2.1 内镜及活检 常规术前准备。插镜至十二指肠球部,部分患者至十二指肠降部,退镜观察。所有患者均进行病变部位的黏膜活检。隆起病灶取其顶部及其基底部的组织,平坦性病变在病灶周边黏膜皱襞中断处及中央处取活检,溃疡凹陷性病变在溃疡隆起边缘上及溃疡边缘内侧交界处取活检。

1.2.2 病理 将胃镜活检标本常规固定、包埋、切片、HE 染色,同时辨认幽门螺杆菌。

2 结果

2.1 病变类型及表现 溃疡型 32 例(80%,32/40),隆起型 3 例(7.5%,3/40),隆起溃疡型 3 例(7.5%,3/40),凹陷型 1 例(2.5%,1/40),糜烂型 1 例(2.5%,1/40)。病灶边缘不规则隆起或结节样增生 23 例,污秽苔 22 例,病灶质地硬或脆 21 例,触之易出血 17 例,病灶周围黏膜充血、水肿 7 例,溃疡底部高低不平 4 例,幽门偏位或狭窄 4 例,胃小弯缩短 3 例,蠕动差或消失 2 例,胃底潴留 1 例,新鲜出血 1 例。

2.2 病理类型 腺癌 19 例(47.5%,19/40),低分化腺癌 13 例(包括低分化腺癌部分印戒细胞癌 2 例)(32.5%,13/40),印戒细胞癌 7 例(17.5%,7/40),鳞状细胞癌 1 例(2.5%,1/40)。

2.3 幽门螺杆菌 HP(-)24 例(60%,24/40),HP(+)16 例(40%,16/40)。

3 讨论

绝大部分患者(80%)内镜下主要表现为溃疡型,隆起型和隆起溃疡型较少,另有 2 例分别表现为凹陷型和糜烂型。这种表现和我们既往有关胃底贲门癌及胃小弯癌的表现不同,后者均以隆起溃疡型最多。作者认为,两者的差别可能的解释是:(1)胃角部位的血供较差,

而恶性肿瘤的生长速度快,从而造成肿瘤组织的糜烂、坏死直至肿瘤形成。(2)胃角部位本身就是胃内良性溃疡最好发的部位,其中的部分病例在致癌因子的长期作用下恶变。(3)该部位低分化腺癌和印戒细胞癌的发生率较高,而这两类肿瘤有向黏膜下生长的特点,从而有助于溃疡的形成。国内一般将胃癌的病理类型分为乳头状腺癌、管状腺癌、低分化腺癌、粘液腺癌(印戒细胞癌)、未分化癌、特殊型癌。本文资料中,腺癌最多,低分化腺癌次之,符合一般报道。可惜的是,19 例腺癌由于取材表浅和病理技术方面的原因未能作进一步的分型,这是以后工作努力的方向。有趣的是,印戒细胞癌也占有一定的比例,这比胃底贲门癌和胃小弯癌中的发生率高,这是否是胃角癌的病理特征尚不清楚。

幽门螺杆菌和胃癌的发生有密切关系,WHO 已将其列为 I 类致癌物,我们以往的研究也表明两者有正相关性,且对其致癌机制进行了初步的探讨^[1-3]。但在本文中,Hp 的感染率仅有 32%,这可能和检测方法和检测对象的不同有关,另外 Hp 一般分布于胃窦区,同时胃黏膜发生癌变后不适合 Hp 的定居而造成其迁徙和死亡也可能是原因之一。

参考文献:

- [1] 任刚,蔡嵘,陈强,等. 幽门螺杆菌和胃癌关系的分子研究[J]. 肿瘤防治研究, 1999,26 (6) :401-402.
- [2] 任刚,蔡嵘,陈强,等. 幽门螺杆菌和胃癌相关性的研究[J]. 中国慢性病预防与防治, 2000,8 (3) :126-127.
- [3] 任刚,蔡嵘,陈强,等. 幽门螺杆菌感染与 ras 和 p53 基因的关系[J]. 中华内科杂志, 2000,39 (11) :762.

(周永红校对)

收稿日期:2002-03-20; 修回日期:2002-05-20
 作者单位:200092 上海第二医科大学附属新华医院肿瘤中心

