

辛伐他汀抑制人乳腺癌MCF-7细胞内多能干细胞标志物Oct3/4 Nanog和Sox-2表达*

凌桂琴 陈冬波 王保庆

摘要 目的:研究辛伐他汀(simvastatin, SIM)对人乳腺癌MCF-7细胞内多能干细胞标志物Oct3/4、Nanog和Sox-2表达的影响。**方法:**应用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)技术、免疫荧光染色方法、流式细胞仪和免疫印迹(Western blot)方法检测SIM对MCF-7细胞内多能干细胞标志物表达的影响。**结果:**qRT-PCR结果显示,10、50和100 $\mu\text{mol/L}$ SIM作用于MCF-7细胞48h后,能显著抑制细胞内Oct3/4、Nanog和Sox-2基因表达,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$),而SIM 1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组和对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。SIM 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组和10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组相比,抑制Oct3/4和Nanog的表达差异有统计学意义($P<0.05$),而对Sox-2的表达抑制,SIM 10、50 $\mu\text{mol/L}$ 和100 $\mu\text{mol/L}$ 各浓度组间差异无统计学意义($P>0.05$)。免疫荧光染色显示经10 $\mu\text{mol/L}$ SIM处理48 h后MCF-7细胞核内Oct3/4、Nanog和Sox-2蛋白表达减弱,部分细胞核无表达。流式细胞检测显示MCF-7细胞经10 $\mu\text{mol/L}$ SIM处理48 h后,Oct3/4阳性细胞数、Nanog阳性细胞数和Sox-2阳性细胞数显著减少($P<0.05$),Western blot进一步证实经10 $\mu\text{mol/L}$ SIM处理48 h后MCF-7细胞核内Oct3/4、Nanog和Sox-2蛋白表达显著减少($P<0.05$)。**结论:**SIM在体外能有效地抑制人乳腺癌MCF-7细胞内多能干细胞标志物Oct3/4、Nanog和Sox-2的表达,为SIM应用于癌症治疗提供实验依据。

关键词 辛伐他汀 乳腺癌 MCF-7细胞 多能干细胞标志物 Oct3/4 Nanog Sox-2

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20131409

Simvastatin inhibits expression of pluripotent markers Oct3/4, Nanog, and Sox-2 in human breast cancer MCF-7 Cells

Guiqin LING, Dongbo CHEN, Baoqing WANG

Correspondence to: Guiqin LING; E-mail: lingguiqin@126.com

Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221006, China

This work was supported by The Science and Technology Planning Project of Xuzhou City (No. XZZD1255)

Abstract Objective: To investigate the effect of simvastatin on expression of pluripotent markers Oct3/4, Nanog, and Sox-2 in human breast cancer MCF-7 cells. **Methods:** Quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction (qRT-PCR), immunofluorescent staining, flow cytometry, and Western blot were used to detect the expression of pluripotency markers Oct3/4, Nanog, and Sox-2 in human breast cancer MCF-7 cells treated with different doses of simvastatin. **Results:** qRT - PCR revealed the more significant inhibition of gene expressions of Oct3/4, Nanog, and Sox-2 in human breast cancer MCF-7 cells when subjected to high doses of simvastatin (10, 50, and 100 $\mu\text{mol/L}$) compared with the control group ($P<0.05$). By contrast, no significant difference was observed between the expressions of low-dose simvastatin treatment (1 $\mu\text{mol/L}$) and control ($P>0.05$). The inhibitory effect of simvastatin on the gene expressions of Oct3/4 and Nanog was more significantly apparent at 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ dosages than at 10 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.05$). By contrast, no significant difference in the inhibitory expression of Sox-2 was observed among the three high-dose treatments ($P>0.05$). Between the two higher-dose treatments (50 and 100 $\mu\text{mol/L}$), no significant difference in the inhibitory expressions of Oct3/4, Nanog, and Sox-2 in MCF-7 cells was found. Meanwhile, in the 10 $\mu\text{mol/L}$ simvastatin treatment, immunofluorescent staining showed a marked reduction in the protein expression of all three pluripotent markers in MCF-7 cells, and flow cytometry demonstrated a decrease of Oct3/4-, Nanog-, and Sox-2-positive cells ($P<0.05$). Western blot further revealed that the protein expression of Oct3/4, Nanog, and Sox-2 in MCF-7 cells was significantly declined by the same simvastatin dose ($P<0.05$). **Conclusion:** Simvastatin can inhibit the expression of pluripotent markers Oct3/4, Nanog, and Sox-2 in human breast cancer MCF-7 cells, proving the anti-cancer properties of simvastatin.

Keywords: simvastatin, breast cancer, MCF-7 cells, pluripotency markers, Oct3/4, Nanog, Sox-2

乳腺癌目前仍然是女性最常见的恶性肿瘤之一,占女性肿瘤的23%,其死亡率仅次于肺癌位居第

二。美国癌症协会预计2013年仅美国将有23万多患者被诊断为乳腺癌,4万多患者死于乳腺癌^[1]。随

作者单位:江苏省徐州医学院第二附属医院肿瘤内科(江苏省徐州市221006)

*本文课题受徐州市科技计划项目(编号:XZZD1255)资助

通信作者:凌桂琴 lingguiqin@126.com

着我国生活水平的提高及家庭人口简单化,乳腺癌发生率呈持续上升趋势,且与西方发达国家相比,中位发病年龄提前10~15年,已经严重威胁妇女的身心健康^[2]。

近年的研究表明他汀类药物(statins)除了具有竞争性抑制3-羟-3-甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶降低血清胆固醇治疗高胆固醇血症功能之外,还能抑制肿瘤细胞的增殖,诱导细胞凋亡以及抑制肿瘤内血管生成等作用。文献报道他汀类药物包括洛伐他汀、辛伐他汀(simvastatin, SIM)、阿发他汀及普伐他汀等对结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌等肿瘤显示出较好的疗效^[3]。已有研究证实SIM能抑制人乳腺癌MCF-7细胞的增殖,诱导细胞凋亡^[4-5]。本组以前的研究表明乳腺癌MCF-7细胞高水平的表达多能干细胞标志物Oct3/4、Nanog和Sox-2^[6]。因此,本研究选用SIM处理人乳腺癌MCF-7细胞,探讨SIM对MCF-7细胞内多能干细胞标志物表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

MCF-7细胞株购自上海细胞生物所,DMEM/F12培养基、胰蛋白酶和胎牛血清购自Gibco公司。二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)和SIM均购自Sigma公司。RNA提取试剂盒购自GIAGEN,反转录试剂盒购自Invitrogen公司,目的基因和内参基因的引物和探针混合物均购自Applied Biosystems公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MCF-7细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM/F12的培养基中,37℃、5% CO₂细胞培养箱。取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 实时荧光定量反转录聚合酶链式反应(qRT-PCR) 将MCF-7细胞制成细胞悬液,以1×10⁶个细胞数接种于10 cm的细胞培养皿中,37℃、5% CO₂培养箱中培养。24 h后更换培养液加SIM, SIM浓度分别为0、1、10、50、100 μmol/L,培养48 h后收取细胞,按照试剂盒说明提取RNA,再反转录合成cDNA,反转录体系20 μL,然后进行目的基因扩增。PCR反应体系为30 μL,以无菌纯H₂O代替DNA模板作为阴性对照。PCR反应混合物包括:2×PCR Master Mix 15 μL,20×引物和探针混合物1.5 μL,cDNA模板3 μL,其余用无菌水补足。每个样品设3个复孔。反应条件:50℃ 2 min,95℃ 预变性10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min 40个循环,最后72℃延伸10 min。反应在Eppendorf realplex2荧光定量PCR分析仪上进行。各基因相关信息为:Oct3/4(Hs01895061_u1),Nanog

(Hs02387400_g1),Sox-2(Hs01053049_s1),GAPDH(4352934E)。每个基因均建立标准曲线计算起始拷贝数,目的基因的定量表达通过与内参基因GAPDH比较进行分析。

1.2.3 免疫荧光染色 将MCF-7细胞制成细胞悬液,以1×10⁴细胞数接种于24孔的细胞培养板中,37℃、5% CO₂培养箱中培养。24 h后更换培养液加SIM, SIM浓度分别为0和10 μmol/L,培养48 h后用BD公司的Cytotfix/Cytoperm固定液固定细胞,猴血清封闭20 min后,一抗4℃冰箱内孵育过夜,二抗为罗丹明红标记的荧光抗体。一抗分别为:羊抗Oct3/4抗体(1:200, sc-8628),Santa Cruz生物技术公司提供,鼠抗Sox-2抗体(1:100, MAB 4343),Millipore生物技术公司提供,Nanog抗体为甲硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗体,由NeoBioscience公司提供,1:50直接染色观察。Olympus1×51荧光显微镜拍照。

1.2.4 流式细胞仪检测 将MCF-7细胞制成细胞悬液,以1×10⁴细胞数接种于24孔的细胞培养板中,37℃、5% CO₂培养箱中培养。24 h后更换培养液加SIM, SIM浓度分别为0和10 μmol/L,培养48 h后用BD公司的Cytotfix/Cytoperm固定液固定细胞,Oct3/4阳性细胞的定量染色为:羊抗Oct3/4抗体(1:50)4℃冰箱内孵育过夜,二抗为藻红蛋白(PE)标记的抗体(1:50, Santa Cruz公司)。Nanog阳性细胞的定量染色为直接染色,FITC标记的抗体1:25 4℃孵育30 min。Sox-2阳性细胞的定量染色为:鼠抗Sox-2抗体(1:50),4℃冰箱内孵育过夜,二抗为PE标记的抗体。对照组用相应的荧光标记的同型对照抗体染色。BD FACSC流式细胞仪(BD公司)检测,Weasel软件分析结果。

1.2.5 Western Blot定量分析 将MCF-7细胞制成细胞悬液,以1×10⁴细胞数接种于24孔的细胞培养板中,37℃、5% CO₂培养箱中培养。24 h后更换培养液加SIM, SIM浓度分别为0和10 μmol/L,培养48 h后用RIPA细胞裂解液(南京生兴生物技术有限公司)处理,BCA蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度,细胞裂解物经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,用硝化纤维素膜电转系统(美国BioRad公司)转膜后进行免疫印迹,5%脱脂奶粉封闭2 h,羊抗Oct3/4抗体(1:500),鼠抗Nanog(1:200, sc-33759, SantaCruz公司)抗体,鼠抗Sox-2抗体(1:500)及内参基因GAPDH抗体(1:5 000, SantaCruz公司)4℃冰箱内孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗孵育1h后,用ECL超敏化学发光液显色曝光,所用其它试剂均由莱兹生物科技有限公司提供。Image J软件分析实验结果。

1.3 统计学处理

以上实验均重复3次,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 16.0统计学软件分析,组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SIM对MCF-7细胞内Oct3/4、Nanog和Sox-2基因表达的影响

qRT-PCR结果显示,10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ SIM作用于MCF-7细胞48h后,能显著地抑制细胞内Oct3/4、Nanog和Sox-2基因表达,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),而SIM 1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组和对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。但是SIM抑制Oct3/4、Nanog和Sox-2基因的作用不是随着剂量的增加而增大。SIM 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组与10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组相比,Oct3/4和Nanog的表达差异有统计学意义($P < 0.05$),Sox-2的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),SIM 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组和100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组相比差异无统计学意义($P > 0.05$,表1,图1)。

表1 SIM对MCF-7细胞内Oct3/4、Nanog、和Sox-2 mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of simvastatin on gene expression of Oct3/4, Nanog, and Sox-2 in MCF-7 cells

Groups	Samples	Oct3/4 mRNA	Nanog mRNA	Sox-2 mRNA
Control	3	1.725±0.206	2.074±0.196	0.938±0.139
1 $\mu\text{mol/L}$	3	1.875±0.203	1.87±0.094	1.065±0.208
10 $\mu\text{mol/L}$	3	1.202±0.183 ^{ab}	1.506±0.156 ^{ab}	0.670±0.059 ^{ab}
50 $\mu\text{mol/L}$	3	0.810±0.100 ^{abc}	1.184±0.110 ^{abc}	0.682±0.106 ^{ab}
100 $\mu\text{mol/L}$	3	0.860±0.108 ^{abc}	1.079±0.140 ^{abc}	0.605±0.200 ^{ab}

^a: $P < 0.05$, experimental group vs. control; ^b: $P < 0.05$, experimental group vs. SIM 1 $\mu\text{mol/L}$; ^c: $P < 0.05$, experimental group vs. SIM 10 $\mu\text{mol/L}$

2.2 SIM对MCF-7细胞内Oct3/4、Nanog和Sox-2表达的影响

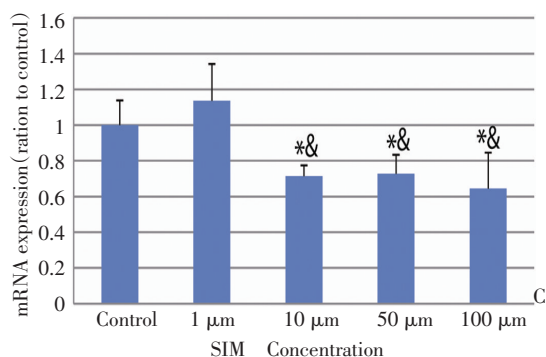
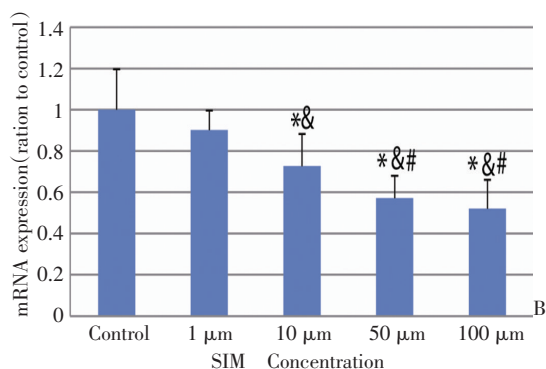
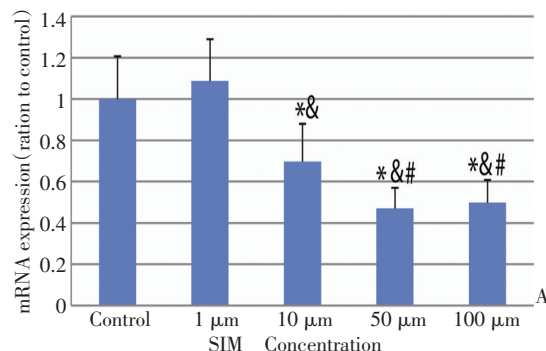
免疫荧光染色结果显示,对照组多能干细胞标志物Oct3/4、Nanog和Sox-2表达在MCF-7细胞核内,Oct3/4(图2A)和Sox-2(图2C)为强红色荧光,Nanog为绿色荧光(图2E),而经10 $\mu\text{mol/L}$ SIM处理48h后,MCF细胞核内Oct3/4、Nanog和Sox-2蛋白表达荧光减弱,部分细胞核无表达(图1B, D, F)。

2.3 Oct3/4阳性细胞数、Nanog阳性细胞数和Sox-2阳性细胞数的变化

图3显示MCF-7细胞经10 $\mu\text{mol/L}$ SIM处理48h后,Oct3/4阳性细胞数由(4.25±1.03)%减少到(0.96±0.24)%,Nanog阳性细胞数由(4.39±0.87)%减少到(0.76±0.21)%,Sox-2阳性细胞数有(6.73±2.04)%减少到(1.47±0.58)%,统计分析差异均有显著性($P < 0.05$)。

2.4 SIM对MCF-7细胞内Oct3/4、Nanog和Sox-2蛋白表达的影响

Western blot结果显示,SIM处理48h后,MCF-7细胞内多能干细胞标志物Oct3/4、Nanog和Sox-2蛋白表达均减少(图4A),通过与内参基因GAPDH比较,Image J软件分析显示条带的灰度有显著性差异($P < 0.05$,图4B)。



A: The effect of SIM on the expression of Oct3/4; B: The effect of SIM on the expression of Nanog; C: The effect of SIM on the expression of Sox-2
*: $P < 0.05$, experimental group vs. control; &: $P < 0.05$, experimental group vs. SIM 1 $\mu\text{mol/L}$; #: $P < 0.05$, experimental group vs. SIM 10 $\mu\text{mol/L}$

图1 SIM对MCF-7细胞内Oct3/4、Nanog、和Sox-2 mRNA表达的影响

Figure 1 Effects of simvastatin on gene expression of Oct3/4, Nanog, and Sox-2 in MCF-7 cells

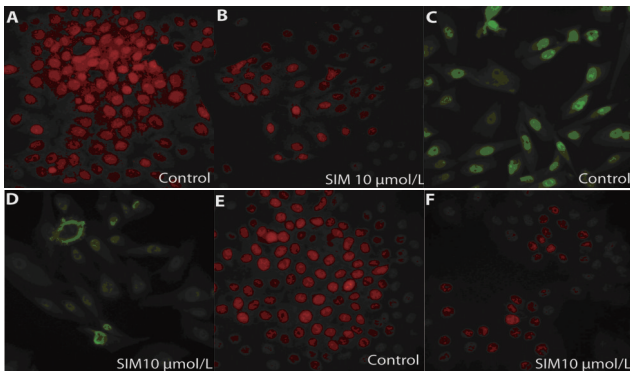


图2 SIM作用48 h后对MCF-7细胞内Oct3/4、Nanog和Sox-2表达的影响(x400)

Figure 2 Expression of Oct3/4 (A, B), Nanog (C, D), and Sox-2 (E, F) in MCF-7 cells treated with 10 μmol/L SIM. A, C, E: control group; B, D, F: treatment group

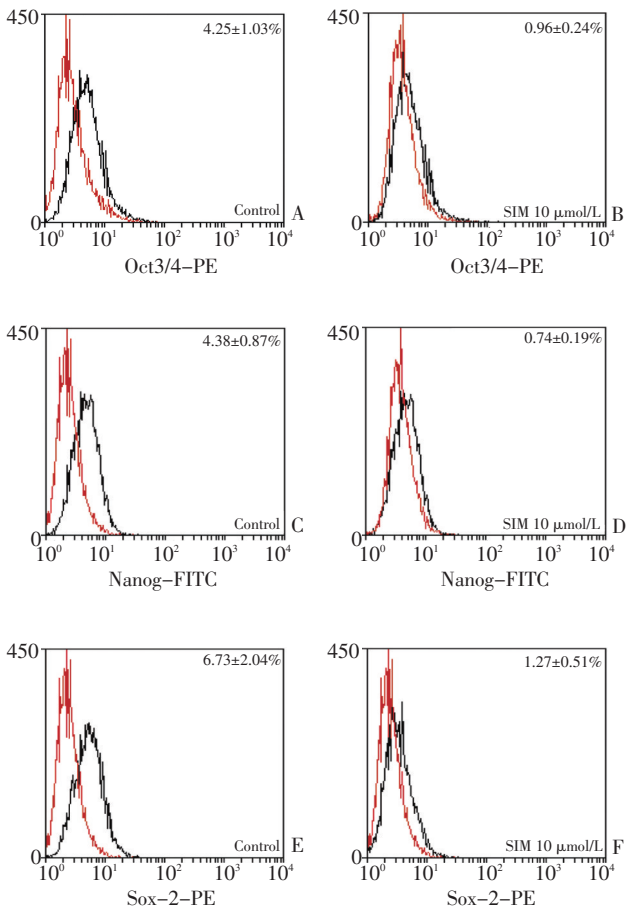


图3 MCF-7细胞经SIM处理48h后Oct3/4阳性细胞数、Nanog阳性细胞数和Sox-2阳性细胞数的变化

Figure 3 Oct3/4-positive cells (A, B), Nanog-positive cells (C, D), and Sox-2-positive cells (E, F) were significantly reduced by 10 μmol/L SIM treatment for 48 h ($P < 0.05$)

3 讨论

越来越多的研究支持乳腺癌起源于乳腺癌肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)和/或祖细胞的观点。乳腺癌肿瘤干细胞是存在于乳腺中具有自我更

新和分化能力的一小群细胞,与正常胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)类似但具有异常的自我更新通路^[7]。研究表明乳腺癌肿瘤干细胞也是乳腺癌形成、进展、转移、复发及耐药的源泉^[8-9]。因此,针对乳腺癌肿瘤干细胞的治疗能为耐药的乳腺癌预防和治疗提供有前途的治疗方法。

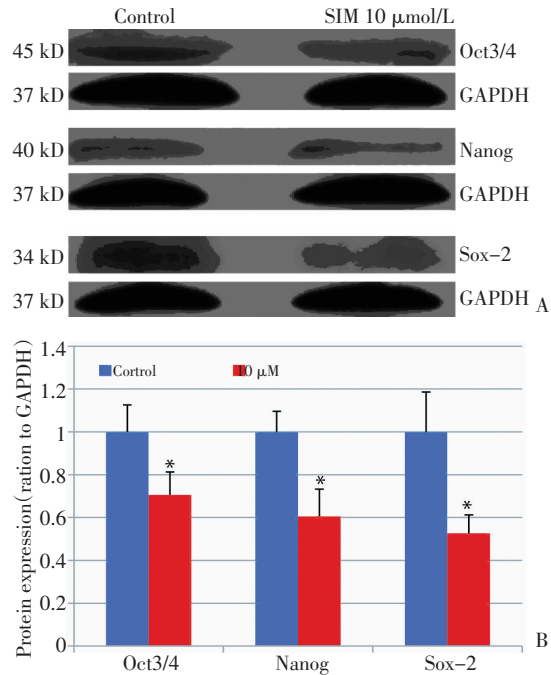


图4 SIM作用48小时对MCF-7细胞内Oct3/4、Nanog和Sox-2蛋白表达的影响

Figure 4 Western blot analysis for Oct3/4, Nanog, and Sox-2 expression in MCF-7 cells treated with 10 μmol/L SIM (A). Quantitative assessment of protein expression showed significantly reduced expressions of Oct3/4, Nanog, and Sox-2 in MCF cells treated with 10 μmol/L SIM compared with the controls ($P < 0.05$) (B)

他汀类药物(statins)由于抑制胆固醇合成限速酶HMG-CoA还原酶,阻断甲羟戊酸通路,从而抑制内源性胆固醇的合成而降低血胆固醇,目前已成为临床上治疗高胆固醇血症的主要药物。近年的研究表明,他汀类药物除降血脂的作用外,还具有改善内皮细胞功能、稳定动脉粥样硬化斑块、抗炎和免疫调节作用、神经保护、促进骨代谢、改善慢性肾病的进展以及抗肿瘤等多种功能^[10-11]。许多体外和临床前试验研究发现,多种他汀类药物尤其是脂溶性的例如SIM对包括乳腺癌在内的多种癌症细胞,通过多渠道发挥抗肿瘤作用:抑制肿瘤细胞增殖、抗血管生成、降低肿瘤细胞侵袭转移能力、放疗增敏作用及诱导肿瘤细胞凋亡与分化^[12-14]。Sánchez等^[5]人研究报告SIM抑制人乳腺癌MCF-7细胞的增殖与细胞周期停止而引起的细胞凋亡有关。Gopalan等^[12]报道SIM联合生育三烯酚能清除耐药MCF-7细胞中乳腺癌肿

瘤干细胞样细胞。但SIM对人乳腺癌MCF-7细胞内多能干细胞标志物表达的影响未见报道。

本研究采用实时qRT-PCR技术、免疫荧光染色、流式细胞分析以及Western blot方法检测SIM对乳腺癌MCF-7细胞内多能干细胞标志物Oct3/4、Nanog和Sox-2表达的影响。研究结果表明10、50和100 μmol/L SIM作用于MCF-7细胞48 h后,能显著地抑制细胞内Oct3/4、Nanog和Sox-2基因表达,与对照组比较差异有统计学意义;SIM 50、100 μmol/L浓度组和10 μmol/L浓度组相比,抑制Oct3/4和Nanog的表达差异有统计学意义,而对Sox-2的表达抑制作用差异无统计学意义, SIM 50 μmol/L浓度组和100 μmol/L浓度组相比差异无统计学意义,表明SIM能抑制乳腺癌MCF-7细胞内多能干细胞标志物Oct3/4、Nanog和Sox-2基因的表达,但其作用并非随着浓度的增加而逐渐加大。免疫荧光染色显示经10 μmol/L SIM处理48 h后MCF-7细胞核内Oct3/4、Nanog和Sox-2蛋白表达荧光减弱,部分细胞核呈现无表达,Western blot进一步证实10 μmol/L SIM处理48 h后MCF-7细胞核内Oct3/4、Nanog和Sox-2蛋白表达显著减少,表明SIM也能抑制乳腺癌MCF-7细胞内多能干细胞标志物Oct3/4、Nanog和Sox-2蛋白的表达。Oct3/4、Nanog和Sox-2是首先在ESCs细胞中明确的维持干细胞多潜能性和自我更新的重要调控因子,广泛用作ESCs细胞多潜能性鉴定的标志分子^[15]。因此,本实验结果提示抑制人乳腺癌MCF-7细胞内多能干细胞标志物的表达,是SIM抗肿瘤的另一可能机制,为临床应用他汀类药物作为抗癌药物提供实验依据。

参考文献

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1):11-30.
- 2 熊安稳,王雅杰.WWOX基因与乳腺癌的研究进展[J].医学研究杂志,2013,42(2):186-189.
- 3 Boudreau DM, Yu O, Johnson J. Statin use and cancer risk:a comprehensive review[J]. Expert Opin Drug Safety, 2010, 9(4):603-621.
- 4 Koyuturk M, Ersoz M, Altioek N. Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells:p53 and estrogen receptor independent pathway requiring signaling through JNK[J]. Cancer Lett, 2007, 250(2):220-228.
- 5 Sánchez CA, Rodríguez E, Varela E, et al. Statin-induced inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation is related to cell cycle arrest and apoptotic and necrotic cell death mediated by an enhanced oxidative stress[J]. Cancer Invest, 2008, 26(7):698-707.
- 6 Ling G, Chen D, Wang B, et al. Expression of the pluripotency markers Oct3/4, Nanog and Sox2 in human breast cancer cell lines [J]. Oncology Lett, 2012, 4(6):1264-1268.
- 7 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7):3983-3988.
- 8 Liu S, Wicha MS. Targeting breast cancer stem cells[J]. Clin Onco, 2010, 28(25):4006-4012.
- 9 Iqbal J, Chong PY, Tan PH. Breast cancer stem cells: an update[J]. J Clin Pathol, 2013, 66(6):485-490.
- 10 Osmak M. Statins and cancer: current and future prospects[J]. Cancer Lett, 2012, 324(1):1-12.
- 11 王磊,胡昌华.他汀类药物抗癌作用新机制[J].中国药学杂志,2010, 45(23):1796-1999.
- 12 Gopalan A, Yu W, Sanders BG, et al. Eliminating drug resistant breast cancer stem-like cells with combination of simva-statin and gamma-tocotrienol[J]. Cancer Lett, 2013, 328(2):285-296.
- 13 Park YH, Jung HH, Ahn JS, et al. Statin induces inhibition of triple negative breast cancer(TNBC) cells via PI3K pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439(2):275-279.
- 14 杨士杰,李栋,姜达.辛伐他汀对荷瘤小鼠抑瘤作用的实验研究[J].河北医药,2006,28(7):573-574.
- 15 Chambers I, Tomlinson SR. The transcriptional foundation of pluripotency[J]. Development, 2009, 136(14):2311-2322.

(2013-08-25收稿)

(2013-10-28修回)

(本文编辑:郑莉)