

- [3] Cai YL, Li J, Lu AY, et al. Diagnostic significance of combined detection of Epstein-Barr virus antibodies, VCA/IgA, EA/IgA, Rta/IgG and EBNA1/IgA for nasopharyngeal carcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(5): 2001-2006.
- [4] 周贞. D-二聚体检测在妇科恶性肿瘤中的临床意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(5): 1141-1142.
- [5] 杜满兴, 王伟佳. 联合检测 Rta-IgG、EBNA1-IgA 和 VCA-IgA 抗体对中山地区鼻咽癌的诊断价值研究[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(13): 1856-1860.
- [6] 中国鼻咽癌临床分期工作委员会. 鼻咽癌 92 分期修订报告[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2009, 18(1): 2-6.
- [7] 陈天游, 范行良. EB 病毒诊断学意义及其方法学进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2009, 37(3): 50-53.
- [8] 祝元雪, 李晓江. EB 病毒 Rta 在鼻咽癌早期诊断中的研究进展[J]. 现代肿瘤进展, 2013, 21(12): 2844-2846.
- [9] Chang LK, Chuang JY, Nakao M, et al. MCAF1 and synergistic activation of the transcription of Epstein-Barr virus lytic genes by Rta and Zta[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(14): 4687-4700.
- [10] 郑裕明, 蔡永林. EB 病毒 Rta/IgG 抗体检测在鼻咽癌诊断上的价值[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2009, 23(4): 285-287.
- [11] 陈文思, 曹开源. EB 病毒重组抗原 Rta 蛋白的表达及其在鼻咽癌筛查中的应用[D]. 广州: 中山大学, 2010.
- [12] 葛建新, 封革, 王平. 消化系统恶性肿瘤患者血浆 D-二聚体的临床意义[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(33): 3717-3719.
- [13] 朱明霞, 彭佳, 倪飞, 等. 恶性淋巴瘤患者血浆纤维蛋白原水平与功能测定的临床意义研究[J]. 血栓与止血学, 2010, 16(5): 210-212.
- [14] 任军, 张晓梅, 张晓光, 等. 以 Rta2/3 为抗原用于鼻咽癌病人检测的初步研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(11): 1057-1059.
- [15] 邱厚匡, 姚亚超, 李磊, 等. EB 病毒抗体及其 DNA 联合检测在鼻咽癌筛查和早期诊断中的价值[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(10): 1339-1344.
- [16] 蔡永林, 郑裕明, 成积儒, 等. EB 病毒 Rta/IgG、EBNA1/IgA、VCA/IgA 及 EA/IgA 抗体与鼻咽癌分期的关系[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(3): 509-511.
- [17] 郑岚, 刘刚, 钟春生, 等. 血浆 D-二聚体、纤维蛋白原和 β_2 -微球蛋白三项联检在恶性肿瘤中的应用[J]. 淮海医药, 2013, 31(5): 377-379.

(收稿日期: 2016-12-15 修回日期: 2017-01-06)

• 临床探讨 •

洛伐他汀联合塞来昔布对宫颈癌 Caveolin-1 的表达及下游信号分子的影响及意义分析

杜克先, 胡 敏

(湖北省咸宁市通城县人民医院检验科 437400)

摘要:目的 探讨洛伐他汀联合塞来昔布对宫颈癌 Caveolin-1 的表达及下游信号分子的影响。方法 分别将不同水平的塞来昔布、洛伐他汀联合塞来昔布与 HeLa 细胞体外共孵育, 采用 MTT 法分别检测其对 HeLa 细胞增殖的影响。采用流式细胞术检测塞来昔布、洛伐他汀联合塞来昔布对 HeLa 细胞凋亡的影响。同时采用蛋白免疫印迹(Western-blot)检测 Caveolin-1 及下游信号分子磷酸化的转录活化因子 3(p-STAT3)和 p-Akt 的蛋白表达情况。**结果** HeLa 细胞经过不同水平的塞来昔布、洛伐他汀联合塞来昔布处理 24 h 后, 塞来昔布的 IC₅₀ 值为 50 μ M, 洛伐他汀联合塞来昔布的 IC₅₀ 值为 30 μ M; 塞来昔布、洛伐他汀联合塞来昔布均能抑制 HeLa 细胞的增殖, 诱导 HeLa 细胞的凋亡, 且呈剂量和时间依赖性, 洛伐他汀联合塞来昔布作用更显著; 塞来昔布与 HeLa 细胞共孵育 24 h 后, Caveolin-1 的蛋白表达轻微上调, 而洛伐他汀联合塞来昔布能够显著增加 Caveolin-1 的表达; 塞来昔布能抑制 p-STAT3 和 p-Akt 的表达, 而洛伐他汀联合塞来昔布共同处理 HeLa 细胞后, p-STAT3 和 p-Akt 的表达进一步下降。**结论** 洛伐他汀联合塞来昔布能够显著抑制 HeLa 细胞的增殖, 诱导其凋亡, 同时上调宫颈癌 Caveolin-1 的表达, 从而抑制下游信号分子的激活。

关键词: 洛伐他汀; 塞来昔布; 宫颈癌; 下游信号分子**DOI:** 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.08.056 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)08-1188-03

宫颈癌是女性中最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率位居女性肿瘤的第 2 位, 且近年呈年轻化趋势^[1]。研究显示, 宫颈癌的发生与人乳头状瘤样病毒(HPV)感染有关, 而 HPV 感染可能引起机体内源性因素的改变, 如癌基因的激活、抑癌基因的失活和机体免疫调节机制的失衡等, 这些改变均可能引起细胞的增殖与凋亡发生异常, 从而导致组织癌变^[2-3]。Caveolin-1 是近年来新发现的一个抑癌基因, 研究显示该基因不仅能够调节机体胆固醇的运输、维持内环境稳态, 还可能参与调控肿瘤发生发展的各个环节^[4-5]。洛伐他汀和塞来昔布分别为 COX-

2 特异性抑制剂和 HMG-CoA 还原酶抑制剂, 本研究就洛伐他汀联合塞来昔布对宫颈癌 Caveolin-1 的表达及下游信号分子的影响进行探讨, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂 人宫颈癌 HeLa 细胞株购于中国科学院上海细胞库细胞, Caveolin-1 抗体和 β -actin 兔抗人单克隆抗体购于 santacruz 公司; p-STAT3 和 p-Akt 鼠抗人单克隆抗体购于 Cell signaling technology 公司; 细胞总蛋白提取试剂盒 Sigma 公司, MTT 检测试剂盒购于碧云天; 洛伐他汀和塞来昔布

标准品均购于中国药品生物制品检定所。

1.2 细胞培养 HeLa 细胞生长于完全培养基中,于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的条件下培养,每 1~2 d 换一次液,在荧光倒置显微镜下观察,当细胞生长达到约 80%融合时,用 0.25%胰蛋白酶消化传代。收集细胞培养瓶中的细胞于离心管中,1 500 r/min 离心 5 min 后,弃去上清液,加入培养基,将聚集在离心管底部的细胞轻轻吹散,加入适量至细胞培养板中,在 37℃、5% CO₂ 的环境中培养至形成融合单层,开始实验。

1.3 MTT 法测定 HeLa 细胞的增殖情况 采用培养基配制不同水平的给药培养基,塞来昔布(0、40、60、80、100 μM)和洛伐他汀联合塞来昔布(0、40、60、80、100 μM)。将 HeLa 细胞接种于 96 孔板内并与不同水平的药物共孵育 24 h,每孔加入用 DMEM 稀释至 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL,37℃继续温孵 4 h 后,吸去 MTT 溶液,每孔加入 200 μL 二甲基亚砜,37℃振摇温孵 10 min,使甲臞充分溶解,然后采用酶标仪在 490 nm 波长处测定各孔吸光度得到相应的 OD 值。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡 将一系列水平的药物,包括塞来昔布(0、40、60、80、100 μM)和洛伐他汀联合塞来昔布(0、40、60、80、100 μM)加入含 HeLa 细胞的培养瓶中,同时设无水乙醇溶媒作为对照组,于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的条件下分别培养 24 h 和 48 h,用 0.25%胰蛋白酶消化,收集细胞后 70%乙醇固定,4℃过夜。取 200 μL 细胞样品(1×10⁵/mL),加入 200 μL 的 IRNase 溶液(10 μg/mL),置于 37℃水浴摇床中 30 min,将成团细胞过滤除去,加入 100 μL 碘化吡啶染液

(250 μg/mL),置 4℃ 30 min,采用流式细胞仪(贝克曼公司)检测凋亡细胞。

1.5 蛋白免疫印迹(Western-blot)测定方法 细胞与药物处理结束后用细胞裂解液(江苏碧云天)对细胞进行裂解处理,然后按照细胞总蛋白提取试剂盒的说明书进行 SDS-PAGE(十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)。电泳结束后将凝胶蛋白转印到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,然后将 PVDF 膜放入用 TBST 溶液配制 5%脱脂奶粉悬液,室温封闭 2 h。封闭结束后,分别与 Caveolin-1、p-STAT3 和 p-Aktt 一抗 4℃孵育过夜。次日 37℃摇床孵育 1 h, TBST 荡洗后与 HRP 标记的 IgG 二抗 37℃摇床孵育 2 h,最后在凝胶成像仪中避光显色,曝光 10 s,采用天能软件分析灰度值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件分析所有数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 组以上比较运用单因素方差分析,两两比较用 LSD 法或者 SNK 法;以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同用药方式对 HeLa 细胞增殖的影响 MTT 实验结果显示,0~100 μM 的塞来昔布、洛伐他汀联合塞来昔布均能抑制 HeLa 细胞的增殖,且抑制作用随着给药水平的增加而增强,呈显著的水平依赖性,差异有统计学意义($P < 0.05$),塞来昔布的 IC₅₀ 值为 50 μM,洛伐他汀联合塞来昔布的 IC₅₀ 值为 30 μM。见表 1。

表 1 不同用药方式对 HeLa 细胞增殖的抑制情况($\bar{x} \pm s, \%$)

用药方式	<i>n</i>	0 μM	40 μM	60 μM	80 μM	100 μM
塞来昔布	6	0.943±0.011	0.638±0.017	0.476±0.014	0.321±0.009	0.293±0.010
洛伐他汀联合塞来昔布	6	0.938±0.018	0.432±0.010	0.377±0.006	0.276±0.013	0.219±0.006

表 2 不同用药方式对 HeLa 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

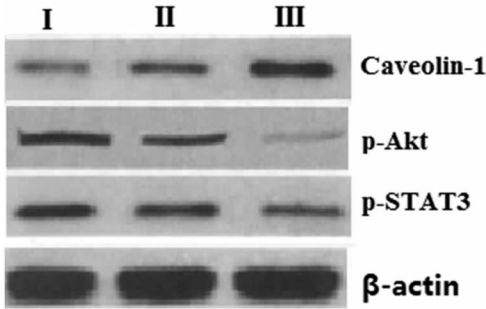
孵育条件	对照组 (<i>n</i> =6)	塞来昔布 (<i>n</i> =6)	洛伐他汀联合 塞来昔布(<i>n</i> =6)
24 h			
40 μM	2.1±0.2	5.6±0.7*	8.9±1.0#
60 μM	4.6±0.5	8.7±0.9*	13.4±1.6#
80 μM	7.4±0.7	12.2±1.4*	16.5±1.8#
100 μM	9.8±1.2	15.5±1.8*	21.3±2.0#
48 h			
40 μM	5.6±0.8	11.4±1.3*	15.2±0.9#
60 μM	10.3±1.1	16.9±1.5*	22.4±1.4#
80 μM	15.1±2.0	20.1±1.8*	29.4±1.9#
100 μM	18.6±1.8	22.3±2.1*	29.0±1.1#

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$ 。

2.2 不同用药方式对 HeLa 细胞凋亡的影响 流式细胞术检测结果显示,塞来昔布、洛伐他汀联合塞来昔布诱导 HeLa 细胞凋亡的作用随着时间和给药水平的递增而增强,其中 80 μM 的洛伐他汀联合塞来昔布与 HeLa 细胞共孵育 48 h 的凋亡率

最高,约为 29.4%。见表 2。

2.3 不同用药方式对 HeLa 细胞 Caveolin-1、p-STAT3 和 p-Aktt 蛋白表达的影响 塞来昔布与 HeLa 细胞共孵育 24 h 后,Caveolin-1 的蛋白表达轻微上调,而洛伐他汀联合塞来昔布能够显著增加 Caveolin-1 的表达;此外,塞来昔布能抑制 p-STAT3 和 p-Akt 的表达,当洛伐他汀联合塞来昔布共同处理 HeLa 细胞后,p-STAT3 和 p-Akt 的表达进一步下降。见图 1、表 3。



注:I 为阴性对照组;II 为 50 μM 塞来昔布;III 为 30 μM 塞来昔布+30 μM 洛伐他汀。

图 1 不同用药方式对 HeLa 细胞 Caveolin-1、p-STAT3 和 p-Aktt 蛋白表达的影响

表 3 不同用药方式对 HeLa 细胞 Caveolin-1、p-STAT3 和 p-Aktt 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	Caveolin-1	p-STAT3	p-Aktt
I	23.2±2.9	85.2±4.4	87.1±5.0
II	39.2±3.1 [*]	71.4±3.0 [*]	64.2±2.3 [*]
III	58.2±5.7 [#]	30.3±3.7 [#]	27.8±3.0 [#]

注:与对照组比较, ^{*} $P<0.05$, [#] $P<0.01$ 。

3 讨 论

宫颈癌是女性常见恶性肿瘤之一,其发病率在发展中国家的女性中位居第一,而在全球范围内其发病率位居第二,仅次于乳腺癌^[6]。宫颈癌的发生机制尚未完全阐明,目前认为其与以下因素有关:(1)HPV 感染,该病毒在宫颈癌标本中的检出率较高,是宫颈癌的首要病因;(2)相关癌基因与抑癌基因,HPV 与相关癌基因与抑癌基因作用后导致 C-erbB-2、c-myc 和 c-fos 等癌基因激活,Bcl、p53 和 Rb 等抑癌基因失活;(3)免疫因素,研究显示宫颈癌的发病率在人类免疫缺陷病毒感染者的发病率较高^[7-8]。此外,龚玉芳等^[9]就 Caveolin-1 在正常宫颈组织和宫颈癌组织中的表达进行测定,发现 Caveolin-1 在正常宫颈组织中的表达远高于宫颈癌组织,认为 Caveolin-1 表达的减少和缺失可能与宫颈癌的发生发展密切相关。STAT3 在机体大部分组织中均有表达,而磷酸化的 STAT3(即激活的 STAT3)通过启动一系列的信号通路和诱导,导致细胞增殖、分化和凋亡相关的基因出现表达异常,从而阻碍肿瘤细胞的凋亡,促进细胞恶性增殖而发生肿瘤^[10]。研究发现,激活的蛋白激酶 B(Akt)可以通过改变细胞周期而促进细胞增殖和抑制细胞凋亡,多种恶性肿瘤组织中均有 p-Akt 的表达^[11]。

目前,临床上对宫颈癌的主要治疗方式包括手术治疗和放疗,其中化疗在宫颈癌晚期复发转移的患者中应用较多,且存在化疗药物与塞来昔布联合应用的情况,如顺铂和塞来昔布联合应用^[12]。塞来昔布为一种高选择性 COX-2 特异性抑制剂,胃肠道反应和肾脏毒性均较低,已被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于预防家族性肠息肉肉病的恶性变^[13]。此外,不少报道显示塞来昔布能够抑制多种肿瘤细胞的生长,包括人宫颈癌 HeLa 细胞^[14]。王小敏等^[15]的研究显示,塞来昔布能够抑制体外培养的 HeLa 细胞环氧合酶-2 的表达,从而诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡。本研究探讨了洛伐他汀联合塞来昔布对宫颈癌 Caveolin-1 及下游信号分子表达的影响,结果发现相较于塞来昔布,洛伐他汀联合塞来昔布对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的抑制作用更强,且能显著诱导 HeLa 细胞凋亡。洛伐他汀联合塞来昔布能够显著增加 Caveolin-1 的表达,表明洛伐他汀联合塞来昔布可能通过增加 Caveolin-1 的表达抑制宫颈癌发生发展。此外,塞来昔布能抑制 p-STAT3 和 p-Akt 的表达。当洛伐他汀联合塞来昔布共同处理 HeLa 细胞后,p-STAT3 和 p-Akt 的表达进一步下降,说明药物导致宫颈癌细胞 Caveolin-1 改变,能抑制下游信号分子的激活,从而促进肿瘤细胞凋亡。

综上所述,洛伐他汀联合塞来昔布能够显著抑制 HeLa 细胞的增殖,诱导其凋亡,同时上调宫颈癌 Caveolin-1 的表达,从

而抑制下游信号分子的激活。

参考文献

[1] World Health Organization. Comprehensive Cervical Cancer Control: A Guide to Essential Practice[J]. World Health Org,2014(4667):1436.

[2] Xiaoxia H,Schwarz JK,Lewis JS,et al. A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis[J]. Cancer Res,2010,70(4):1441-1448.

[3] Anttila A,Hakama M,Laurila P,et al. Rate of cervical cancer,severe intraepithelial neoplasia,and adenocarcinoma in situ in primary HPV DNA screening with cytology triage;Randomised study within organised screening programme[J]. BMJ,2010,340(16):1646-1647.

[4] 杨育生,刘斌,邢传平. Caveolin-1 蛋白与肿瘤的侵袭和转移[J]. 中国肿瘤临床与康复,2006,13(2):184-186.

[5] 张惠球,刘奕生,沈浩贤. Caveolin-1 蛋白在乳腺癌组织中的表达及意义[J]. 中国医药指南,2010,8(10):32-33.

[6] 王季青,周春慧. 宫颈癌危险因素的流行病学调查分析[J]. 中外医学研究,2014,18(3):79-80.

[7] 张晓金,归绥琪. 宫颈癌发病机制的研究进展[J]. 中国妇幼保健研究,2008,19(1):56-59.

[8] 程静,潘光鑫,周素. 宫颈癌发病机制的探讨[J]. 中国妇幼保健,2014,29(13):37-41.

[9] 龚玉芳,郝祥俊,关丽华. caveolin-1 在宫颈癌中的表达及临床生物学意义[J]. 中国妇幼保健,2011,26(13):2022-2023.

[10] Iliopoulos D,Jaeger SA,Hirsch HA,et al. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer[J]. Mol Cell,2010,39(4):493-506.

[11] Shouye W,Basson MD. Akt directly regulates focal adhesion kinase through association and serine phosphorylation;implication for pressure-induced colon cancer metastasis[J]. Ame J Physiol Cell,2011,300(3):C657.

[12] 霍巧玲,李颖. 宫颈癌治疗研究进展[J]. 武警医学,2013,14(2):171-173.

[13] 梁彩霞,江丹贤,庞雅君. 塞来昔布对女性常见恶性肿瘤细胞株的放疗增敏作用[J]. 实用临床医药杂志,2014,18(3):72-75.

[14] 董文辉,吕玉人,刘永茂. 塞来昔布对宫颈癌 Hela 细胞增殖及凋亡的影响及作用机制[J]. 中国老年学杂志,2011,18(18):3570-3571.

[15] 王小敏,彭伟,凌学民. 塞来昔布对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及环氧合酶-2 表达的影响[J]. 中国癌症杂志,2011,21(2):110-114.