

# 辛伐他汀通过 AMPK/mTOR 信号通路及氧化应激对鼻咽癌细胞凋亡和侵袭转移的作用研究

陈洪昌<sup>1</sup>, 廖 蕾<sup>1</sup>, 周光耀<sup>2</sup>, 张惠琴<sup>3</sup>

(1.成都市新都区人民医院耳鼻咽喉科,四川 成都 610500;2.四川大学华西医院耳鼻咽喉头颈外科;  
3.贵州医科大学耳鼻咽喉头颈外科)

**摘要:**目的:研究辛伐他汀对体外人鼻咽癌细胞 CNE-2 增殖抑制、细胞凋亡及侵袭转移的影响,并对其潜在作用机制进行研究探讨。方法:采用 MTT 实验测不同浓度梯度辛伐他汀(0、0.1、1、10mmol/L)对 CNE-2 细胞增殖抑制作用;细胞凋亡情况的检测采用流式细胞术,Transwell 实验检验细胞侵袭迁移能力,Western blot 检测细胞中 Bax、Bcl-2、AMPK、pAMPK、mTOR 蛋白表达水平,检测分析丙二醛量(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)活性的前后变化。结果:与对照组相比,辛伐他汀对 CNE-2 细胞的增殖抑制率明显升高,凋亡率明显升高,且侵袭转移能力明显降低,具有明显的剂量和时间依赖关系,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ),此外,与对照组相比,辛伐他汀能够显著增强 Caspase-3 的活性,使得 AMPK/pAMPK/Bax 蛋白表达增加,mTOR/Bcl-2 蛋白表达下降,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。辛伐他汀能够增加 MDA 含量,减少 SOD 活性,以上作用均具有剂量依赖性,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:辛伐他汀对鼻咽癌细胞增殖抑制、诱导细胞凋亡和抑制侵袭转移的作用,可能与 AMPK/mTOR 通路及氧化应激有关。

**关键词:**辛伐他汀;鼻咽癌细胞 CNE-2;细胞凋亡;AMPK/mTOR;氧化应激

中图分类号: R765

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2020)03-0288-05

鼻咽癌临床常见,恶性程度高,治疗手段主要为手术及放化疗。但术后容易复发,预后差,严重威胁病患生命健康。虽然目前有新型化疗药物使用,但临床实际应用效果仍差,寻找有效的抗鼻咽癌药物,仍是鼻咽癌治疗的重要研究方向。

辛伐他汀(simvastatin, SIM)是一个经典的降血脂药物,近年来,多项研究显示,辛伐他汀能够降低病人肿瘤的发病率,甚至可以提高恶性肿瘤病人的生存率,进而引起研究者们广泛兴趣<sup>[1-3]</sup>。研究发现,辛伐他汀具有抗肿瘤细胞生物活性,在体内外均能抑制肿瘤细胞的生长,并且能够增强肿瘤放化疗的敏感性<sup>[4,5]</sup>。目前辛伐他汀已被用于多项癌症病人的临床治疗研究<sup>[6]</sup>。有研究发现,辛伐他汀能够抑制鼻咽癌细胞生长及促进凋亡,但是机制不明<sup>[5,7]</sup>。因此为观察辛伐他汀对鼻咽癌的抗肿瘤作用,本文的研究对象为人鼻咽癌 CNE-2 细胞,并通过临床药物辛伐他汀作用观察药物对鼻咽癌 CNE-2 细胞的生命周期影响状况。

AMPK/mTOR 信号通路和氧化应激在肿瘤生

长、代谢、凋亡过程等过程中作用关键,有报道显示,辛伐他汀通过调控 AMPK/mTOR 信号通路、氧化应激系统对肺癌、胰腺癌起诱导凋亡的作用。目前辛伐他汀抗肿瘤的研究多见于乳腺癌、胰腺癌、胃癌、肺癌等等,关于辛伐他汀与鼻咽癌相关研究较少<sup>[8]</sup>,本研究进一步观察了辛伐他汀对鼻咽癌细胞的作用及其与 AMPK/mTOR 信号通路和氧化应激的关系,为进一步临床研究和应用提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 CNE-2 细胞培养及传代

本文所选用的试验材料为本单位保存的人鼻咽癌细胞 CNE-2,细胞培养液主要组成成分为 10% 胎牛血清,去定量的人鼻咽癌细胞 CNE-2 并将其置于 37℃,含 5%CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中进行培养,人鼻咽癌细胞 CNE-2 为单层贴壁生长。隔两天传代,试验中以对数生长期细胞进行处理。

### 1.2 主要仪器与试剂

收稿日期: 2020-02-25; 修回日期: 2020-05-05

基金项目: 2016 年四川省卫生和计划生育委员会科研课题(16PJ057)

作者简介: 陈洪昌(1971-),男,成都市新都区人民医院耳鼻咽喉科副主任医师。

辛伐他汀、DMSO、MTT等试剂和药物均采购于美国Sigma公司,Annexin V-FITC/PI双染流式细胞检测试剂盒采购于美国Invitrogen公司,Gallios流式细胞仪,Caspase-3检测试剂盒则采购于碧云天生物技术研究所,考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒购于上海美季生物技术有限公司;SDS-聚丙烯酰胺、PBST溶液、GIS-2020D凝胶图像分析系统采购于Sigma公司;试验中所用的抗体如:bcl-2、bax、AMPK、pAMPK及mTOR等抗体均采购于美国Abcam公司。

### 1.3 MTT测细胞存活率

提取本单位培养的对数生长期CNE-2细胞并在其中加入胰酶予以处理,随后完成计数和调整密度等工作,在孔板中进行接种,当CNE-2细胞贴壁后去除原培养液并向其中加入含药物的新培养液,试验用药物为辛伐他汀稀释液,实验分为4组,各组中辛伐他汀终浓度分别为0 mmol/L、0.1mmol/L、1mmol/L、10mmol/L,其中辛伐他汀0mmol/L为对照组,在细胞培养24h、48h、72h时添加,并向孔板中加入5mg/mL MTT每孔20 $\mu$ L,静置4h后弃上清液并向其中加入150 $\mu$ L的DMSO随后进行振荡,在波长为570nm的光源照射下测吸光度值。试验重复三次。

### 1.4 Annexin V-FITC/PI流式细胞仪检测

提取本单位培养的对数生长期CNE-2细胞并将细胞浓度为 $5 \times 10^4$ /mL的进行接种处理,采用不同浓度辛伐他汀对每组细胞作用相同时间,均为48h,并向其中按 $1 \times 10^6$ /mL密度混入缓冲液重悬,根据Annexin V-FITC/PI双染试剂盒测试指导说明完成相应的检测操作,加入5 $\mu$ L Annexin V-FITC,避光10min后在离心机中进行离心处理,弃上清,并加入缓冲液重悬,加入10 $\mu$ L PI染色液充分混合后在温度为4 $^{\circ}$ C的恒温箱中进行避光染色15min,处理完成后在0.5h内完成检测。试验重复三次。

### 1.5 Transwell实验测细胞侵袭迁移能力

CNE-2细胞接种于24孔板,调整细胞浓度为 $2 \times 10^5$ /mL,加入药物处理48h后,在Transwell小室上、下室之间的微孔膜上铺上Matrigel溶液50 $\mu$ L,并置于温度为37 $^{\circ}$ C恒温箱中完成聚合,聚合时间为30min。随后将不同实验组细胞进行洗涤和消化。在完成细胞收集后分别置于培养箱中培养1d,向每组中加入0.5%结晶紫染液并完成室温孵育10min。去基质胶和上室内细胞,观察并统计穿过滤膜的细胞个数,随机选取5个视野计数均值。迁移能力测定则transwell小室上室无需采用Matrigel溶液包被,其余步骤同前。

1.6 Western blot方法检测辛伐他汀对人鼻咽癌细胞CNE-2的BAX、BCL-2、AMPK、pAMPK、mTOR等相关蛋白的表达影响

提取本单位培养的对数生长期CNE-2细胞并将浓度为 $5 \times 10^4$ /mL的细胞接种于培养皿中,采用药物作用细胞48h,向其中加入胰酶完成消化收集,将收集的细胞作为观察组并取与收集细胞等量的蛋白质进行12% SDS-PAGE凝胶电泳处理,并转入PVDF膜向其中加入5%脱脂奶粉,随后置于恒温4 $^{\circ}$ C保温箱中过夜,将封闭过夜的细胞稀释于0.5% BSA液中,在印迹膜室温孵育2h并取出,利用TBST洗膜10min $\times$ 3次,然后用0.5%BSA液稀释的二抗与印迹膜在室温孵育2h加入TBST液洗膜15min $\times$ 3次,通过凝胶成像仪进行成像观察分析。

1.7 辛伐他汀对CNE-2鼻咽癌细胞中丙二醛量(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

取对数生长期细胞CNE-2,用0.5%的胰蛋白酶消化,并以培养液调整成 $1 \times 10^5$ /mL的单细胞悬液。按2mL/孔接种单细胞悬液于6孔细胞培养板,置37 $^{\circ}$ C培养箱中培养48h。然后换含有辛伐他汀的培养液,浓度同前,培养48h后收集细胞,采用超声波破碎(功率300w,破碎25s,间歇25s)。离心收集上清,选用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒分别对MDA和SOD进行检测,蛋白含量采用brandford法进行测定。

### 1.9 统计分析

上述试验所得数据通过Mean $\pm$ SD予以表示,并采用SPSS17.0软件完成统计学检测,服从正态分布的数据采用单因素方差分析(One-way ANOVA)中Tukey's法完成比较,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异, $P < 0.01$ 为有高度统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MTT测辛伐他汀对CNE-2细胞存活率的影响

以对照组存活率作为100%,辛伐他汀0.1mmol/L作用24h、48h、72h人鼻咽癌CNE-2细胞存活率分别为 $88.3\% \pm 3.72\%$ 、 $82.4\% \pm 4.59\%$ 、 $78.3\% \pm 5.29\%$ 。辛伐他汀1mmol/L作用24h、48h、72h存活率分别为 $80.8\% \pm 5.14\%$ 、 $73.7\% \pm 4.98\%$ 、 $60.8\% \pm 6.38\%$ 。辛伐他汀10mmol/L作用24h、48h、72h存活率分别为 $66.3\% \pm 4.85\%$ 、 $57.3\% \pm 5.24\%$ 、 $45.7\% \pm 7.26\%$ 。使用辛伐他汀处理后,CNE-2的细胞存活率显著下降,且细胞存活率对照组 $>$ 辛伐他汀

0.1mmol/L >1mmol/L >10mmol/L, 辛伐他汀各组细胞存活率 24h>48h>72h, 说明辛伐他汀对人鼻咽癌 CNE-2 细胞具有一定抑制功能, 且药物浓度和作用时间同抑制人鼻咽癌 CNE-2 细胞增值效果呈现正相关关系。其中, 辛伐他汀浓度为 0.1mmol/L 作用 24h 及 48h 与对照组相比差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 其余各组与对照组相比均具有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (见图 1)。

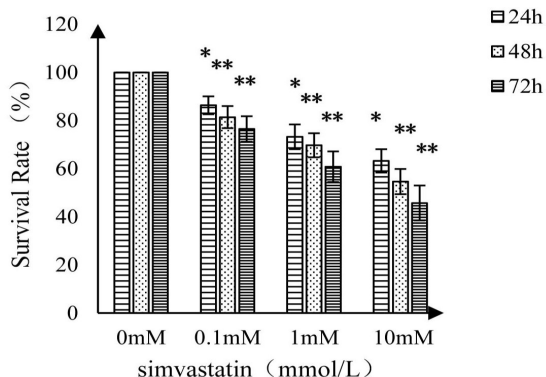


图 1 MTT 测辛伐他汀对鼻咽癌 CNE-2 细胞存活率的影响 (\*与对照组相比,  $P < 0.05$ ; \*\*与对照组相比,  $P < 0.01$ )

### 2.2 Annexin V-FITC/PI 流式细胞仪检测辛伐他汀对 CNE-2 细胞凋亡率的影响

对照组细胞凋亡率  $2.5\% \pm 0.5\%$ , 药物浓度分别为 0.1、1、10mmol/L 时凋亡率分别为  $6.1\% \pm 1.3\%$ 、 $24.3\% \pm 3.9\%$ 、 $44.1\% \pm 4.8\%$ , 结果表明辛伐他汀对人鼻咽癌 CNE-2 细胞具有抑制增值和诱导细胞凋亡的作用, 且诱导效果同药物浓度与作用时间呈正相关关系。辛伐他汀各组凋亡率与对照组相比具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ) (见图 2, 3)。

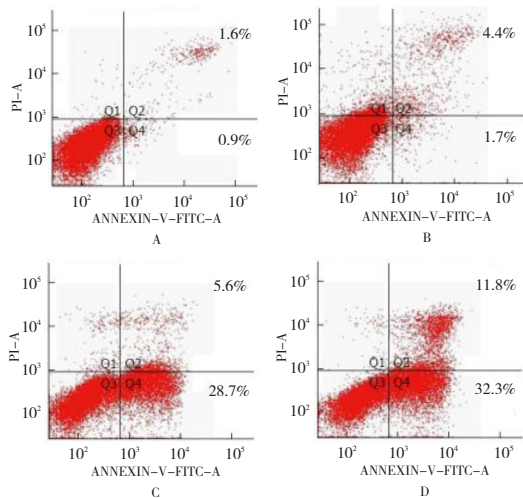


图 2 流式细胞仪测辛伐他汀对鼻咽癌 CNE-2 细胞凋亡率的影响 (A: control 组; B: 辛伐他汀 0.1mmol/L; C: 辛伐他汀 1mmol/L; D: 辛伐他汀 10mmol/L。)

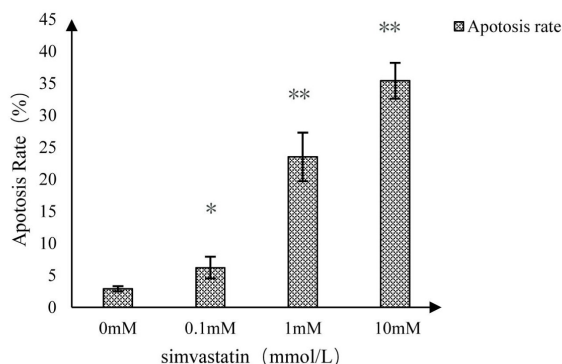


图 3 不同浓度辛伐他汀对鼻咽癌 CNE-2 细胞凋亡率的比较 (\*与对照组相比,  $P < 0.05$ ; \*\*与对照组相比,  $P < 0.01$ )

### 2.3 辛伐他汀对人鼻咽癌 CNE-2 细胞侵袭转移的影响

随着辛伐他汀药物浓度不断升高, 鼻咽癌 CNE-2 细胞迁移细胞数和侵袭细胞数也明显减少, 均少于对照组。辛伐他汀 0.1mmol/L 与对照组相比具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ); 辛伐他汀 1、10 mmol/L 与对照组相比具有显著统计学差异 ( $P < 0.01$ )。此结果提示辛伐他汀对鼻咽癌 CNE-2 细胞的侵袭和转移具有抑制作用 (见图 4)。

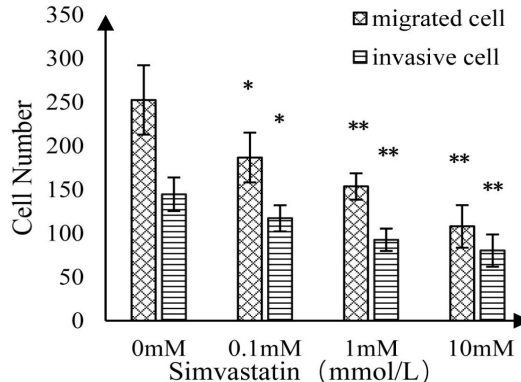


图 4 辛伐他汀对 CNE-2 细胞迁移侵袭细胞数的影响 (\*与对照组相比,  $P < 0.05$ ; \*\*与对照组相比,  $P < 0.01$ )

### 2.4 辛伐他汀对人鼻咽癌 CNE-2 细胞 AMPK/pAMPK/mTOR/Bcl-2 蛋白表达的影响

AMPK 是一种重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是胆固醇合成和脂肪代谢关键酶的上游调节因子, 在能量代谢中起着非常重要的调控作用, 又被称为“能量传感器”<sup>[18]</sup>。辛伐他汀对 CNE-2 细胞蛋白表达的影响程度为: CNE-2 细胞在药物浓度分别为 0、0.1、1、10mmol/L 的条件下, AMPK/pAMPK/BAX 和 mTOR/Bcl-2 表达分别随药物浓度增高而逐渐上升和下降, 观察组和对照组的比较差异具有统计学意义 (见图 5)。

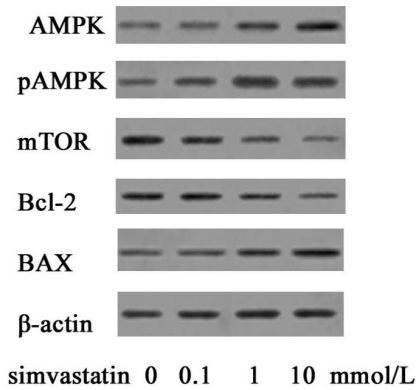


图5 辛伐他汀对CNE-2细胞各蛋白表达量的影响

### 2.5 辛伐他汀对人鼻咽癌CNE-2细胞MDA含量及SOD活力的影响

鼻咽癌CNE-2细胞MDA含量随着辛伐他汀浓度升高而升高,SOD活力随着辛伐他汀浓度升高而下降,其中,辛伐他汀浓度为0.1mmol/L与对照组相比差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),辛伐他汀浓度为1、10mmol/L与对照组相比均具有显著统计学意义( $P<0.01$ )(见图6)。

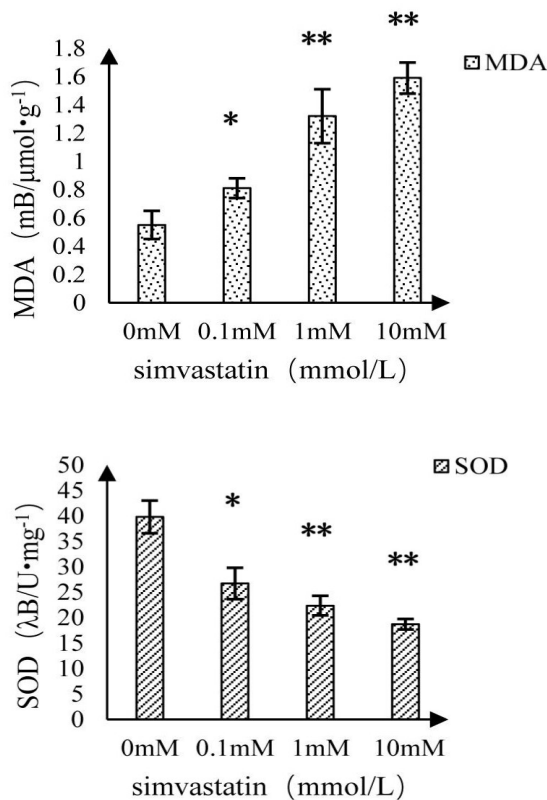


图6 辛伐他汀对CNE-2细胞MDA及SOD活性的影响 (与对照组相比,\*为  $P<0.05$ ; \*\*为  $P<0.01$ )

### 3 讨论

鼻咽癌是临床常见头部恶性肿瘤,发病率逐年增长,病人家庭和社会负担沉重。目前,鼻咽癌治疗多为手术、化疗、放疗及分子靶向治疗模式,但五年生存率低,治疗效果欠佳<sup>[9]</sup>。临床鼻咽癌病人的治疗迫切需要寻找有效的抗鼻咽癌药物。

辛伐他汀(simvastatin, SIM)是一个经典的降血脂药物,近年来,多项研究显示,辛伐他汀能够降低病人肿瘤的发病率,甚至可以提高恶性肿瘤病人的生存率,进而引起研究者们广泛兴趣,成为研究热点<sup>[9,10]</sup>。研究发现该药物在临床治疗鼻咽癌具有抑制肿瘤细胞生长的作用,目前辛伐他汀已被用于多项癌症病人的临床治疗研究<sup>[11]</sup>。

BAX和BCL-2是BCL-2基因家族中常见的促进细胞凋亡的蛋白质,对于控制肿瘤细胞凋亡具有重要作用。本研究显示,同对照组相对,观察组采用辛伐他汀(0.1、1、10mmol/L)作用于鼻咽癌CNE-2细胞后细胞存活率显著下降,凋亡率升高( $P<0.05$ ),且试验效果具有剂量-反应关系,不仅如此该药物作用后还能增强Caspase-3的活性,促使BAX蛋白过量表达,并抑制Bcl-2蛋白表达水平,试验结果表明辛伐他汀可用于临床治疗鼻咽癌,与其他报道相符<sup>[12]</sup>。

AMPK/mTOR信号通路在细胞增殖、存活、凋亡、糖代谢、基因转录和细胞迁移中扮演了重要的角色,AMPK作为一种抑癌基因蛋白,是目前肿瘤研究的靶点之一,激活AMPK能够抑制mTOR的磷酸化,发挥抗肿瘤效应,能够影响肿瘤细胞的增殖、凋亡等多种生物学行为<sup>[13]</sup>。研究显示,辛伐他汀能够作用于AMPK/mTOR途径进而起到抗胶质瘤、卵巢癌、肝癌等肿瘤作用。本研究显示,辛伐他汀能够使得AMPK及pAMPK蛋白表达增加,mTOR蛋白表达水平降低,观察组和对照组试验结果差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),说明辛伐他汀对鼻咽癌CNE-2细胞的抑制增殖、诱导凋亡的作用可能与AMPK/mTOR通路有关。

丙二醛(MDA)反映氧自由基对组织细胞的损害程度,超氧化物歧化酶(SOD)能够清除氧自由基,两者是氧化应激系统的标记性物质。本研究结果表明,辛伐他汀能够增加MDA含量,减少SOD活性,由此可见辛伐他汀抗鼻咽癌作用可能与氧化应激有关。综上所述,辛伐他汀对鼻咽癌细胞增殖抑制、诱导细胞凋亡和抑制侵袭转移(下转第303页)

- Cognitive Dysfunction in Elderly Patients Undergoing Major Elective Noncardiac Surgery: A Randomized Clinical Trial [J]. *JAMA Surg*, 2017;20:15-17
- [8] Hwang W, Lee J, Park J, et al. Dexmedetomidine versus remifentanyl in postoperative pain control after spinal surgery: a randomized controlled study[J]. *BMC Anesthesiol*, 2015;15:21
- [9] 张小宁. 右美托咪定对渥曼青霉素引起的海马 CA1 区神经元凋亡的影响[J]. *广东医学*, 2012;3(7):912-914
- [10] Alali AS. Economic Evaluations in the Diagnosis and Management of Traumatic Brain Injury: A Systematic Review and Analysis of Quality. [J]. *Value in Health*, 2015;18(5):721-734
- [11] Skaper SD, Facci L, Giusti P. Neuroinflammation, microglia and mast cells in the pathophysiology of neurocognitive disorders: a review[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2014; 13(10):1654-1666
- [12] Bridge DJ, Voss JL. Hippocampal binding of novel information with dominant memory traces can support both memory stability and change[J]. *J Neurosci*, 2014;34(6):2203-2213
- [13] Rodrigues JQ, et al. Differential regulation of a trial contraction by P2-purinoceptors in normotensive and spontaneously hypertensive rats [J]. *Hypertens Res*, 2014; 37(3):210-219
- [14] Sperlagh B, Illes P. P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2014;35:537-547
- [15] Bartlett R, Stokes L, Sluyter R. The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease [J]. *Pharmacol Rev*, 2014;66:638-675

(上接第 291 页)

的作用,可能与 AMPK/mTOR 通路和氧化应激有关。本研究为鼻咽癌的治疗提供新的思路,还有待进一步深入研究和探讨。

#### 参考文献

- [1] Kato S, Liberona M F, Cerda-Infante J, et al. Simvastatin interferes with cancer 'stem-cell' plasticity reducing metastasis in ovarian cancer[J]. *ENDOCRINE-RELATED CANCER*, 2018;25(10):821-836
- [2] Kou X, Jiang X, Liu H, et al. Simvastatin functions as a heat shock protein 90 inhibitor against triple-negative breast cancer. [J]. *Cancer science*, 2018
- [3] Karimi B, Ashrafi M, Shomali T, et al. Therapeutic effect of simvastatin on DMBA-induced breast cancer in mice. [J]. *Fundamental & clinical pharmacology*, 2018
- [4] Chen Y, Shih H, Lin Y, et al. Simvastatin Sensitizes Radioresistant Prostate Cancer Cells by Compromising DNA Double-Strand Break Repair[J]. *FRONTIERS IN PHARMACOLOGY*, 2018,9
- [5] Chen M, Cheng A, Lee M, et al. Simvastatin induces G(1) arrest by up-regulating GSK3 and down-regulating CDK4/cyclin D1 and CDK2/cyclin E1 in human primary colorectal cancer cells[J]. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY*, 2018;233(6):4618-4625
- [6] Wang S, Ho H J, Lin J, et al. Simvastatin-induced cell cycle arrest through inhibition of STAT3/SKP2 axis and activation of AMPK to promote p27 and p21 accumulation in hepatocellular carcinoma cells[J]. *CELL DEATH & DISEASE*, 2017, 8(10):1654-1666
- [7] Castellanos-Esparza Y C, Wu S, Huang L, et al. Synergistic promoting effects of pentoxifylline and simvastatin on the apoptosis of triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*, 2018;52(4):1246-1254
- [8] Lian B S X, Lo K, Khoo A S, et al. SIMVASTATIN EXERTS AN ANTI-PROLIFERATIVE EFFECT ON NASOPHARYNGEAL CARCINOMA CELL LINES HK1 AND C666-1[J]. *Malaysian Applied Biology*, 2018;47(3):169-174
- [9] Sekine Y, Nakayama H, Miyazawa Y, et al. Simvastatin in combination with meclofenamic acid inhibits the proliferation and migration of human prostate cancer PC-3 cells via an AKR1C3 mechanism[J]. *ONCOLOGY LETTERS*, 2018;15(3):3167-3172
- [10] Karagkounis G, Devecchio J, Ferrandon S, et al. Simvastatin enhances radiation sensitivity of colorectal cancer cells[J]. *SURGICAL ENDOSCOPY AND OTHER INTERVENTIONAL TECHNIQUES*, 2018;32(3):1533-1539
- [11] Jin Y, Xu K, Chen Q, et al. Simvastatin inhibits the development of radioresistant esophageal cancer cells by increasing the radiosensitivity and reversing EMT process via the PTEN-PI3K/AKT pathway[J]. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH*, 2018;362(2):362-369
- [12] Seah S, Wang T, Lee S C. A distinct role of RhoB in simvastatin-induced cytotoxicity in breast cancer cells[J]. *CANCER RESEARCH*, 2017, 7713
- [13] 郭闽廷,熊丽娇,陈丽. 二甲双胍对体外培养人乳腺癌细胞 MCF-7 的抑制作用研究[J]. *赣南医学院学报*, 2018;(08):749-752