

## 瑞舒伐他汀对人胶质瘤 U251 细胞增殖和凋亡的影响

刘明<sup>1</sup>, 刘熙鹏<sup>1</sup>, 丁奇<sup>2</sup>, 许峥嵘<sup>1\*</sup>

1. 河北北方学院附属第一医院, 河北 张家口 075000

2. 张家口市第一医院, 河北 张家口 075000

**摘要:** **目的** 探讨瑞舒伐他汀对人神经胶质瘤 U251 细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 体外培养人神经胶质瘤 U251 细胞, 分别采用 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  瑞舒伐他汀进行干预, 培养 24、48、72、96 h, 采用 MTT 比色法检测细胞增殖活性, 流式细胞仪检测 U251 细胞周期的变化。**结果** 处理 96 h 后, 570 nm 处吸光度 ( $A_{570\text{nm}}$ ) 值变化最明显, 瑞舒伐他汀每个浓度组  $A_{570\text{nm}}$  值与对照组比较均显著下降 ( $P < 0.01$ )。瑞舒伐他汀处理细胞 48 h 后, 与对照组比较, G0/G1 期细胞增多, S 期和 G2/M 期细胞减少, 且瑞舒伐他汀浓度越大, 该作用越强。使用不同浓度瑞舒伐他汀处理 48~72 h 能诱导 U251 细胞凋亡。随着瑞舒伐他汀浓度的增加、作用时间的延长, 凋亡峰更加明显, 并呈浓度-效应和浓度-时间相关性。**结论** 瑞舒伐他汀对胶质瘤 U251 细胞增殖具有一定的抑制作用, 可以诱导胶质瘤 U251 细胞凋亡。

**关键词:** 瑞舒伐他汀; 人胶质瘤 U251 细胞; 增殖; 凋亡

**中图分类号:** R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2016)04-0415-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.04.002

## Effects of rosuvastatin on proliferation and apoptosis of human glioma U251 cells

LIU Ming<sup>1</sup>, LIU Xi-peng<sup>1</sup>, DING Qi<sup>2</sup>, XU Zheng-rong<sup>1</sup>

1. The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

2. Zhangjiakou First Hospital, Zhangjiakou 075000, China

**Abstract: Objective** To explore the influence of rosuvastatin on proliferation and apoptosis of human glioma U251 cells. **Methods** Human glioma U251 cells were cultured *in vitro*, and treated by rosuvastatin with the concentrations of 5, 10, and 20  $\mu\text{mol/L}$ . After cultivation for 24, 48, 72, and 96 h, proliferation activities and cell cycle distribution were determined by MTT colorimetric assay and flow cytometer. **Results** Compared with the control group,  $A_{570\text{nm}}$  values of rosuvastatin groups had obvious changes, and were significantly decreased after being treated for 96 h ( $P < 0.01$ ). Compared with the control group, cells in G0/G1 phase were increased, but those in S and G2/M phases were decreased after being treated for 96 h by rosuvastatin, which had dose-effect dependence. Apoptosis of human glioma U251 cells were induced by rosuvastatin with various concentrations treated for 48 — 72 h. With the increase of the concentrations and action time of rosuvastatin, the apoptotic peaks were more obvious, and showed concentration-effect dependent and time-concentration dependent. **Conclusion** Rosuvastatin can inhibit the proliferation of human glioma U251 cells, and induced their apoptosis.

**Key words:** rosuvastatin; human glioma U251 cells; proliferation; apoptosis

他汀类药物是用于治疗高胆固醇血症及其产生的心血管疾病最常见的药物。几项大的随机对照实验已经证实他汀类药物的疗效, 因此目前这些药物是降低胆固醇的首选。现已证实他汀类药物具有多效性, 对细胞生存、增殖、迁移、血管生成以及其

他生命过程产生影响。胶质瘤占原发性颅内肿瘤的 60%~70%。因多数呈浸润性生长, 手术不易全切, 复发率高, 预后普遍较差, 使得恶性胶质瘤的中位生存期仅 13 个月。本实验拟通过瑞舒伐他汀体外干预胶质瘤细胞增殖实验, 探讨瑞舒伐他汀对人 U251

收稿日期: 2015-12-25

基金项目: 河北省科技计划项目 (132777107D)

作者简介: 刘明 (1980—), 男, 山西霍州人, 主治医师, 硕士, 主要从事颅内肿瘤疾病研究。Tel: (0313)8046920 E-mail: lmltx2009@126.com

\*通信作者 许峥嵘 (1981—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向为糖尿病与甲状腺疾病。E-mail: xuzhengrong3@126.com

胶质瘤增殖的影响。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人胶质瘤细胞系 U251 购于中国科学院上海细胞库。

### 1.2 试剂

瑞舒伐他汀购自中国食品药品检定研究院, 质量分数为 90% 以上, 以无水乙醇溶解, 无菌滤过后再分装, 终质量浓度为 1 000  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 1.3 仪器

96 孔板细胞培养板购自美国 Corning 公司。二氧化碳孵箱为美国 SIM 公司产品, 离心机为德国 Eppendorf 公司产品, 普通倒置显微镜为日本 Olympus 产品, 荧光倒置显微镜为日本 Nikon 公司产品。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞系及细胞培养

在含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPM1640 培养基中培养 U251 细胞, 所有的培养基中均加入青霉素 (100 U/mL) 和链霉素 (100 U/mL), 细胞置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  及饱和湿度下的细胞培养箱中, 常规传代, 取生长状态良好细胞用于实验。

### 2.2 分组

实验分为对照组和实验组, 对照组为未处理的 RPM1640 培养基; 根据预实验结果, 实验组用瑞舒伐他汀处理, 分为 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  3 个浓度组, 处理后的细胞继续置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。

### 2.3 MTT 实验

用 RPM1640 培养基调整细胞悬液浓度, 取对数生长期的细胞均匀接种于 96 孔培养板中, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$ , 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中孵育, 直至细胞单层铺满 96 孔板的孔底。对照组于 0 h 加入 PBS 定容到 100  $\mu\text{L}$ ; 实验组每孔加入终浓度分别为 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  的瑞舒伐他汀, 分别培养 24~96 h。各组到预定培养时间后, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液, 继续孵育 4 h, 终止培养, 小心吸出培养液, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜, 震荡 10 min, 使结晶物充分溶解。以培养基为空白, 同法操作。使用全自动酶标仪 570 nm 处测定各孔吸光度 ( $A$ ) 值, 计算抑制率。抑制率正值表示对细胞有杀伤作用, 负值表示对细胞有促增殖作用。上述实验重复 3 次。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.4 流式细胞仪检测 U251 细胞凋亡情况

收集 U251 细胞后用胰酶消化, 1 000 r/min 离心 6 min; 实验组加入瑞舒伐他汀继续培养; 对照组、48、72 h 组分别在 48、72 h 检测 U251 细胞的凋亡水平。用 PBS 洗涤细胞 2 次, 并用胰酶消化, 1 500 r/min 离心 5 min, 然后用 PBS 清洗细胞, 加入 500  $\mu\text{L}$  Binding buffer 悬浮细胞; 加入 Annexin V-FITC 染液并混匀, 然后加入 Propidium Iodide; 避光反应 15 min 后移入流式细胞仪专用的离心管, 采用流式细胞仪对细胞的 DNA 进行定量分析, 结合计算机软件计算细胞周期的时相分布和凋亡率, 并计算增殖指数。

$$\text{增殖指数} = (S + G2/M) / (G0/G1 + S + G2/M)$$

### 2.5 统计学处理

所有变量以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间均数比较采用  $t$  检验, 若方差不齐采用  $t'$  检验。多组间比较采用方差分析, 进一步两组比较采用 LSD 和 SNK 检验。

## 3 结果

### 3.1 瑞舒伐他汀对细胞增殖的影响

随着瑞舒伐他汀处理浓度的增大、作用时间的延长,  $A_{570\text{nm}}$  值逐渐下降。处理 96 h 后,  $A_{570}$  值变化最明显, 瑞舒伐他汀每个浓度组  $A_{570\text{nm}}$  与对照组比较均显著下降 ( $P < 0.01$ ), 结果见表 1。抑制率由 1.64%~49.57% 增至 82.82%~88.29%。瑞舒伐他汀作用 U251 细胞 48 h 的  $\text{IC}_{50}$  为 (11.33  $\pm$  0.16)  $\mu\text{g/mL}$ , 即瑞舒伐他汀对 U251 细胞增殖抑制作用有浓度-效应和浓度-时间相关性, 结果见表 2。

### 3.2 瑞舒伐他汀对细胞周期的影响

瑞舒伐他汀处理细胞 48 h 后, 与对照组比较, G0/G1 期细胞增多, S 期和 G2-M 期细胞减少, 且瑞舒伐他汀浓度越大, 该作用越强, 结果见表 3。

### 3.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率

U251 细胞未经瑞舒伐他汀处理时自然凋亡率很低, 为 1% 左右。使用不同浓度瑞舒伐他汀处理 48~72 h 能诱导 U251 细胞凋亡, DNA 含量直方图上可观察到 G0/G1 峰前出现明显的亚二倍体峰 (AP 峰), 与对照组细胞比较具有特征性, 见图 1。

随着瑞舒伐他汀浓度的增加、作用时间的延长, 凋亡峰更加明显, 凋亡率最高可达 21.63%。提示瑞舒伐他汀可以诱导 U251 细胞凋亡, 并呈浓度-效应和浓度-时间相关性, 见图 2。

表 1 瑞舒伐他汀对 U251 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Effects of rosuvastatin on proliferation of U251 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$A_{570\text{ nm}}$			
		24 h	48 h	72 h	96 h
对照	—	1.241±0.011	1.274±0.016	1.285±0.010	1.337±0.039
瑞舒伐他汀	5	1.036±0.035**	0.905±0.020**	0.847±0.016**	0.770±0.035**
	10	0.807±0.014**	0.781±0.026**	0.756±0.024**	0.608±0.021**
	20	0.708±0.022**	0.663±0.009**	0.542±0.015**	0.498±0.011**

与对照组比较: \*\* $P<0.01$

\*\* $P<0.01$  vs control group

表 2 瑞舒伐他汀对 U251 细胞抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effects of rosuvastatin on inhibition ratio of U251 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	抑制率/%			
	24 h	48 h	72 h	96 h
5	1.64	30.92	48.46	82.82
10	34.26	50.46	72.43	87.85
20	49.57	64.63	77.05	88.29

表 3 瑞舒伐他汀处理 U251 细胞 48 h 对细胞周期分布的影响 ( $n=3$ )

Table 3 Effects of rosuvastatin treated for 48 h on cell cycle distribution ( $n=3$ )

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	细胞周期比例/%			增殖指数
		G0/G1	S	G2/M	
对照	—	44.17±1.27	29.64±2.21	26.19±0.86	55.83
瑞舒伐他汀	5	55.33±3.25**	26.57±1.59**	18.10±2.09**	44.67
	10	64.40±3.54**	19.37±3.57**	17.23±0.42**	36.60
	20	79.47±2.40**	10.13±3.26**	10.40±1.41**	20.53

与对照组比较: \*\* $P<0.01$

\*\* $P<0.01$  vs control group

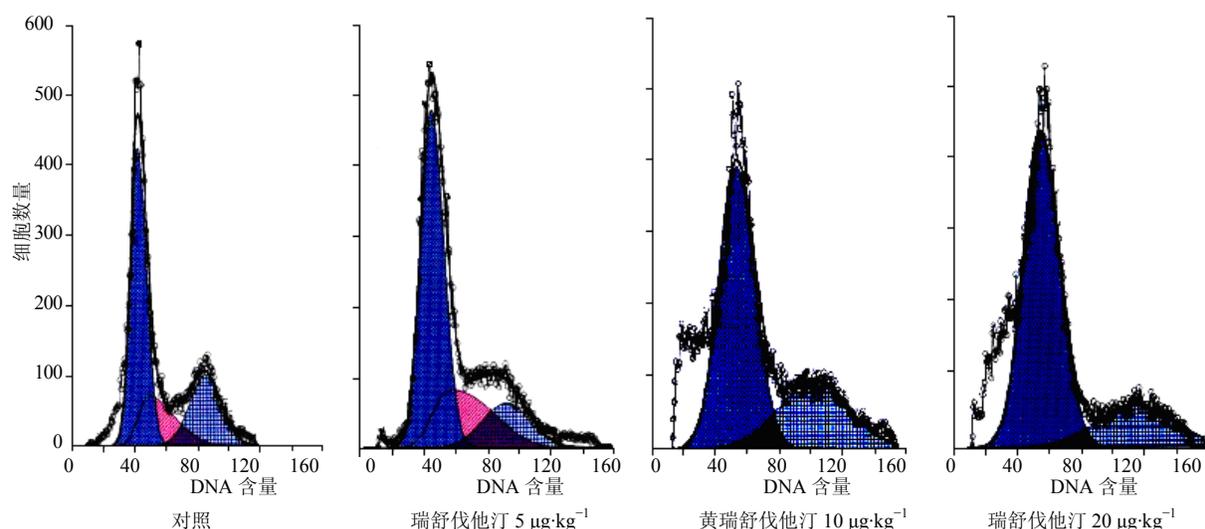


图 1 瑞舒伐他汀处理 U251 细胞 48 h 细胞周期分布的影响

Fig. 1 Effects of treatment with rosuvastatin for 48 h on apoptosis in U251 cells

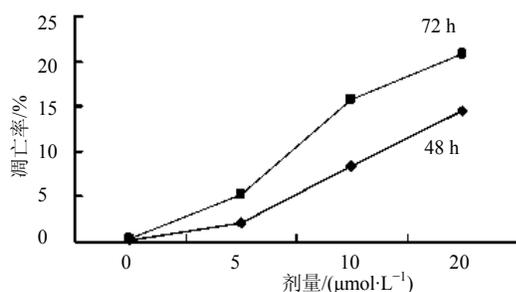


图 2 瑞舒伐他汀对 U251 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effects of rosuvastatin on apoptotic of U251 cells

### 3 讨论

他汀类药物即 3-羟 3-甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-coA) 还原酶抑制剂是目前临床中最常用的降脂药物。美伐他汀是第一个应用于此的药物, 由 Endo 等于 1976 从真菌桔青霉 *Penicillium citrinum* 中发现<sup>[1]</sup>。此后有 9 种药物经验证后进入临床。其中辛伐他汀和洛伐他汀被证实具有抑制血管形成和抗癌作用。瑞舒伐他汀最初是由日本盐野义制药公司在 20 世纪 80 年代末经筛选合成的一种氨基密啶衍生物, 并于 2002 年在美国正式获得 FDA 批准上市。瑞舒伐他汀作为理想他汀类药物被制药界誉为“超级他汀”。但其抗肿瘤作用尚无报道。

研究表明, 在人脑星形胶质瘤组织中, 随着肿瘤恶性级别的升高, 凋亡细胞密度呈逐渐减低的趋势, 提示细胞凋亡受抑可能在胶质瘤发生发展过程中起重要作用。选择性的诱导肿瘤细胞凋亡已成为近年来肿瘤生物治疗的新靶点。本研究通过培养人胶质瘤 U251 细胞系, 进行瑞舒伐他汀干预后检测细胞增殖活性和细胞凋亡情况, 结果提示采用瑞舒伐他汀处理 U251 细胞后, 细胞增殖下降, 细胞存活率明显下降, 细胞凋亡率明显升高, 且细胞存活率随着处理时间的延长呈下降趋势, 细胞凋亡水平随着处理时间的延长呈上升趋势, 提示瑞舒伐他汀对胶质瘤的增殖具有抑制作用。结果与辛伐他汀诱导神经胶质瘤细胞凋亡的结果相类似<sup>[2]</sup>。

他汀类药物的抗肿瘤作用机制尚不明确, 可能通过以下途径来实现: (1) 抑制 Ras、Rho 原癌基因激活。Ras、Rho 均为小 G 蛋白超家族, 共同参与细胞周期和凋亡的调控, 他汀类药物可导致胞浆

内的 Ras 和 Rho 增加, 而细胞内的小 GTP 酶 Ras、Rho 激活受到抑制, 进而影响到细胞周期和凋亡<sup>[3]</sup>; (2) 通过降低细胞内胆固醇含量, 破坏细胞完整性细胞内外信息交换的基本物质。通过抑制 HMG-coA 还原酶减少甲羟戊酸的合成, 阻止细胞在增殖过程中从 G1 期进入 S 期, 进而抑制了细胞的增殖; (3) 抗血管生成。血管生成是实体肿瘤生成所必须的, 以血管生成为靶点已经成为癌症治疗的新策略。除了通过对肿瘤细胞直接作用以外, 他汀类药物还可抑制血管生成来抑制实体肿瘤生长<sup>[4]</sup>; (4) 抗炎反应。他汀类药物在多种组织内具有抗炎效应, 其通过激活过氧化物酶增殖因子激活受体, 从而影响细胞增殖活性<sup>[5]</sup>。

本研究通过培养人胶质瘤 U251 细胞系, 进行瑞舒伐他汀干预后检测细胞增殖活性和细胞凋亡情况, 研究结果提示用瑞舒伐他汀处理胶质瘤 U251 细胞后, 细胞增殖下降, 细胞存活率明显下降, 细胞凋亡率明显升高, 且细胞存活率随着处理时间的延长呈下降趋势, 细胞凋亡水平随着处理时间的延长呈上升趋势, 提示瑞舒伐他汀对胶质瘤的增殖具有抑制作用。在今后的实验研究中, 本课题组将深入研究瑞舒伐他汀对人体胶质瘤的作用机制, 期望研究成果为临床应用提供理论依据和实验基础, 并为人神经胶质瘤的综合治疗提供了新的选择。

### 参考文献

- [1] Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum* [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1976, 29(12): 1346-1348.
- [2] 李伟, 姜迭, 赵运涛. 辛伐他汀诱导神经胶质瘤细胞凋亡的实验研究 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2007, 34(7): 549-553.
- [3] Hoque A, Chen H, Xu X C. Statin induces apoptosis and cell growth arrest in prostate cancer cells [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17(1): 88-94.
- [4] 贾卡, 李进. 抗血管形成靶向药物的研究进展 [J]. *癌症*, 2008, 27(4): 442-446.
- [5] Jain M K, Ridker P M. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(12): 977-987.