

网络出版时间:2017-4-10 14:40 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170410.1440.012.html>

## 他莫昔芬与辛伐他汀 对人乳腺癌细胞 MCF-7 的协同效应及机制

金伟<sup>1</sup>, 袁媛<sup>2</sup>, 汤继春<sup>1</sup>, 彭佳<sup>3</sup>, 沈园园<sup>1</sup>, 潘跃银<sup>1</sup>

**摘要** **目的** 探究他莫昔芬(TAM)与辛伐他汀(SIV)对人乳腺癌细胞株(MCF-7)的增殖抑制作用及其潜在的作用机制。**方法** MTT检测TAM、SIV单独以及联合使用对MCF-7细胞株的增殖抑制作用,计算TAM与SIV单独作用时 $IC_{50}$ 值以及联合使用时对细胞作用的联合指数(CI),评价两药之间的相互作用。荧光显微镜下观察并拍摄各组中的细胞凋亡形态学变化。流式细胞术检测TAM组、SIV组、TAM+SIV组药物处理后的MCF-7细胞凋亡情况。Western blot法检测各组细胞Bcl-2、Bax的表达情况。**结果** MTT法表明,

TAM与SIV单药对MCF-7有增殖抑制作用,联合作用时抑制更为明显,且呈协同作用;荧光显微镜及流式细胞术显示TAM与SIV单药对MCF-7有诱导凋亡作用,联合时作用增强;Western blot法表明TAM+SIV组中Bcl-2表达量较细胞对照组及TAM组、SIV组下降而Bax表达量增加且更加明显。**结论** TAM与SIV联合使用时可显著抑制MCF-7细胞株的增殖,同时可明显诱导MCF-7细胞株凋亡,提示两药联合使用时,乳腺癌患者可能有更好的获益。

**关键词** 他莫昔芬;辛伐他汀;协同;乳腺癌

**中图分类号** R 737.9;R 979.1

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2017)05-0677-05

**doi**:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.012

2017-01-13 接收

基金项目:安徽省科技攻关项目(编号:1301042214);安徽高校省级自然科学基金重点项目(编号:KJ2012A157);安徽省卫生计生委中医药科研课题(编号:2016zy29)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院肿瘤科,合肥 230022

合肥市滨湖医院<sup>2</sup>中心实验室、<sup>3</sup>干部病房,合肥 230061

作者简介:金伟,男,硕士研究生;

潘跃银,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: yueyinpan@gmail.com

在美国女性恶性肿瘤诊断中,乳腺癌占据比例最大,且预后不佳<sup>[1]</sup>,目前中国女性乳腺癌发病率与欧美类似,在各种恶性肿瘤中位居第一。雌激素受体与乳腺癌密切相关,有文献<sup>[2]</sup>指出有雌激素受体(estrogen receptor, ER)表达的乳腺癌患者约占乳

## Role of HDAC3 in H9C2 cell ischemia-reperfusion injury and intervention mechanism

Zhan Hongying, Tao Hui, Xu Shengsong, et al

(Dept of Cardio-Thoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Cardiovascular Disease Research Center of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract** **Objective** To investigate the expression and the role of histone deacetylase 3 (HDAC3) on H9C2 cell ischemia reperfusion injury. **Methods** H9C2 myocardial cells were divided into 3 groups randomly: control group, I/R group, I/R + TSA group. The cell viability was detected by MTT. Lactate dehydrogenase (LDH) level was detected in culture. The protein expression of HDAC3 was tested by Western blot. The mRNA expression of HDAC3 was examined by qRT-PCR. **Results** MTT assay showed that cell viability decreased significantly in I/R group compared with the control group, increased significantly in I/R + TSA group compared with I/R group. The content of LDH in cell activity increased significantly in I/R group compared with the control group, decreased significantly in I/R + TSA group compared with I/R group. Western blot indicated that the protein expression of HDAC3 in I/R group was higher than the control group, the expression of HDAC3 in I/R + TSA group was lower than I/R group. qRT-PCR indicated that the mRNA expression of HDAC3 in I/R group was higher than the control group, the expression of HDAC3 in I/R + TSA group was lower than that in I/R group. **Conclusion** Upregulated HDAC3 plays an important role in H9C2 cell ischemia reperfusion injury.

**Key words** ischemia reperfusion injury; HDAC3; myocardial cell

腺癌患者总数的 75%, 此部分乳腺癌被称为 ER 阳性 (ER+) 乳腺癌。他莫昔芬 (tamoxifen, TAM) 是一种常见的选择性 ER 调节剂 (selective ER modulator, SERM), 其可与 ER 结合, 切断雌激素对乳腺癌细胞的作用通路, 阻止癌细胞的增殖, 因而对 ER+ 乳腺癌患者疗效较好<sup>[3-4]</sup>。他汀类药物是临床上较为常见, 常用于控制患者血脂水平, 大量研究<sup>[5-6]</sup> 结果均提示, 他汀类药物具有抗癌效果, 其机制可能为抑制肿瘤细胞增殖、阻止肿瘤血管生成、阻止肿瘤扩散和促进肿瘤凋亡作用。该实验选取 TAM 和辛伐他汀 (simvastatin, SIV) 单药及联合作用于 MCF-7 乳腺癌细胞株, 通过观察 TAM 和 SIV 单药以及联合给药对 MCF-7 细胞株的增殖抑制作用并探讨其潜在机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** DMEM 培养液、胎牛血清购于美国 Hyclone 公司; DMSO、MTT 购于美国 Sigma 公司; Bcl-2、Bax、 $\beta$ -actin 抗体购于北京中杉金桥公司; Western blot 化学发光试剂购于美国 Millipore 公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** MCF-7 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 链霉素、100 U/ml 青霉素的 10 ml DMEM 培养液, 放置于恒温培养箱, 1 d 传代 1 次, 待细胞增殖到对数期用于实验。

**1.2.2 MTT 法** 实验组分为 TAM 组、SIV 组、TAM + SIV 组, 对照组分为细胞对照组 (含培养基和细胞) 及空白对照组 (只含培养基)。取 MCF-7 细胞, 制成细胞悬浮液, 种于 96 孔板, 培养箱培养 24 h 后, 加入 5 组不同浓度 TAM (0.1 ~ 10  $\mu$ mol/L) 与 SIV (1 ~ 40  $\mu$ mol/L), 分别测得各自的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) 值, 再按照 TAM 与 SIV 单药加药浓度依次相加 (0.1 + 1 ~ 10 + 40  $\mu$ mol/L), 恒温培养箱培养 96 h, 加 MTT, 培养箱中 4 h, 弃上清液, 加 DMSO, 上酶标仪, 490 nm 的波长下读数。计算细胞抑制率, 细胞抑制率 (%) =  $[1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值}) / (\text{细胞对照组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值})] \times 100\%$ 。计算 IC<sub>50</sub> 值和联合指数 (combination index, CI)。对于后续的细胞凋亡实验、Western blot 实验均采用 TAM (2.677  $\mu$ mol/L)、SIV (16.239  $\mu$ mol/L) 浓度作为处理细胞的实验组用药浓度。

**1.2.3 荧光显微镜** 取 MCF-7 细胞,  $1 \times 10^5$ /ml 的浓度接种于 6 孔板, 贴壁后加入 3 组药物, 实验组分别为 TAM 组 (2.7  $\mu$ mol/L)、SIV 组 (16.2  $\mu$ mol/L)

和 TAM + SIV 组 (TAM 2.6  $\mu$ mol/L + SIV 16.2  $\mu$ mol/L), 仅含培养基和细胞的为细胞对照组。24 h 后, 按照说明书操作加入试剂, 覆盖 6 孔板的底面, 4  $^{\circ}$ C 冰箱避光反应 15 min, 荧光显微镜下观察及拍照。

**1.2.4 流式细胞术** 取对数生长期细胞, 以  $1 \times 10^5$ /ml 的浓度接种于小皿, 细胞贴壁后加入 3 组药物, 分别为细胞对照组、TAM 组 (2.7  $\mu$ mol/L)、SIV 组 (16.2  $\mu$ mol/L) 和 TAM + SIV 组 (TAM 2.7  $\mu$ mol/L + SIV 16.2  $\mu$ mol/L) 作用 24 h, 收集细胞, PBS 洗涤两遍, 按使用说明加入试剂, 上流式细胞仪测细胞凋亡情况。

**1.2.5 Western blot 法** 收集药物实验的细胞新鲜样本, BCA 法蛋白定量, 加入 Loading Buffer 后 95  $^{\circ}$ C 变性 15 min, 12 000 r/min 离心 10 min, -80  $^{\circ}$ C 冰箱中保存, 用于蛋白表达水平检测。将样品 (10  $\mu$ l / 孔) 加入 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺电泳分离。电泳 120 V 90 min 分离完毕后切胶, 制做三文治盒。冰水中转膜 2 h。5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗 (Bcl-2、Bax、Actin, 1 : 1 000) 常温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 12 min, 二抗 (1 : 5 000) 常温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 8 min, 加 ECL 发光液后, 转入暗室, 化学发光法曝光感光底片, 显影定影洗涤后烘干裁片保存。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计学软件处理, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 实验重复 3 次, 多组均数间比较采取方差分析。检验水准  $P < 0.01$ 。

## 2 结果

**2.1 MTT 检测结果** MCF-7 细胞在 TAM 组、SIV 组作用 96 h 后的 IC<sub>50</sub> 值分别为 (2.677  $\pm$  0.130)  $\mu$ mol/L、(16.239  $\pm$  2.780)  $\mu$ mol/L, TAM 与 SIV 两药对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用随着药物浓度的增加而增强, 具有浓度依赖性, 见图 1。检测两药联合作用时, 采用各梯度浓度 SIV 组与 TAM 组同时处理 MCF-7 细胞, 显示两药联合时, CI 值  $< 1$ , 呈协同作用, 见图 2。倒置光学显微镜 ( $\times 200$ ) 下观察细胞形态, 可见经药物处理后, 正常贴壁细胞逐渐减少、细胞轮廓不清、体积缩小、间隙增加, 细胞外形改变, 漂浮状细胞增多, 见图 3。

**2.2 荧光显微镜观察** TAM 组、SIV 组及 TAM + SIV 组浓度作用 MCF-7 细胞 24 h 后, 与细胞对照组比较, 实验组凋亡增多 (荧光增多), 而 TAM + SIV 组较 TAM 组、SIV 组细胞凋亡增多, 见图 4。

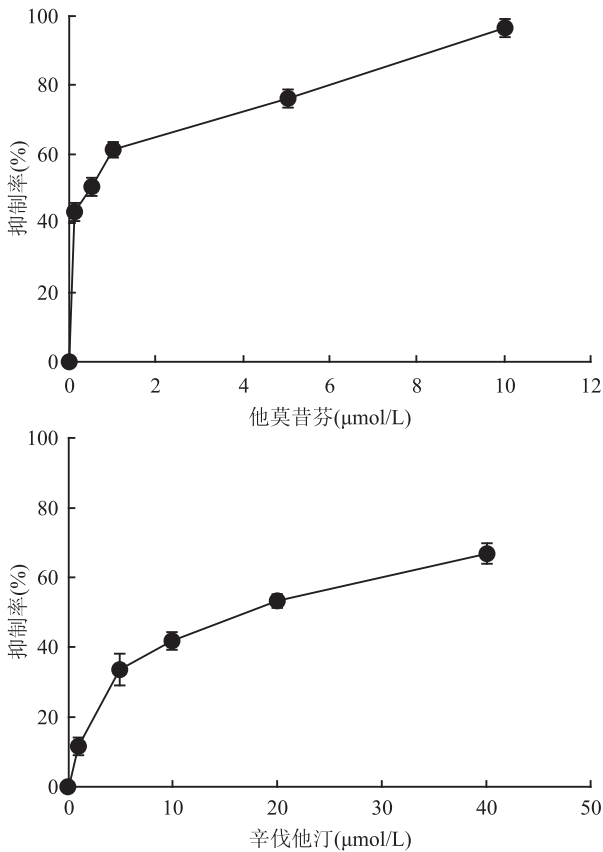


图1 MTT法检测TAM、SIV对MCF-7细胞的体外抑制作用

**2.3 流式细胞术** TAM及SIV浓度作用于MCF-7细胞24h后,经Annexin V-FITC和PI荧光染色,观察到细胞凋亡率不同,SIV组、TAM组及TAM+SIV组凋亡率分别为:(4.57±0.53)%、(15.59±0.99)%、(24.66±0.92)%。TAM+SIV组较TAM组、SIV组细胞凋亡增多,各组间差异有统计学意义

( $F = 434.11, P < 0.01$ )。见图5。

**2.4 Western blot法** 与细胞对照组相比,TAM组、SIV组及TAM+SIV组均可以上调MCF-7细胞中Bax和下调Bcl-2水平的表达,其中联合组作用更为明显,差异有统计学意义( $F = 97.017、90.619, P < 0.01$ ),见图6。

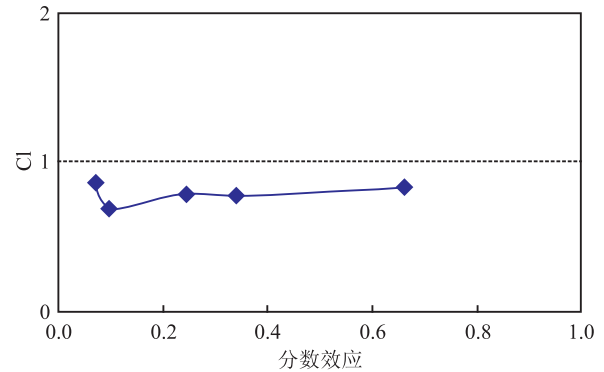


图2 MTT法检测TAM与SIV对MCF-7细胞协同效应

### 3 讨论

乳腺癌是目前对中国女性健康危害最大的恶性肿瘤,内分泌治疗对多数乳腺癌病患有很好的疗效。TAM是目前临床上最常见的用于治疗乳腺癌的内分泌治疗药物之一,有临床研究<sup>[7-8]</sup>显示TAM可以有效降低ER+乳腺癌患者的复发死亡风险。通过降低乳腺癌细胞中抗凋亡Bcl-2表达,增加促凋亡Bax表达从而促使癌细胞凋亡可能是其作用机制之一<sup>[9-10]</sup>。

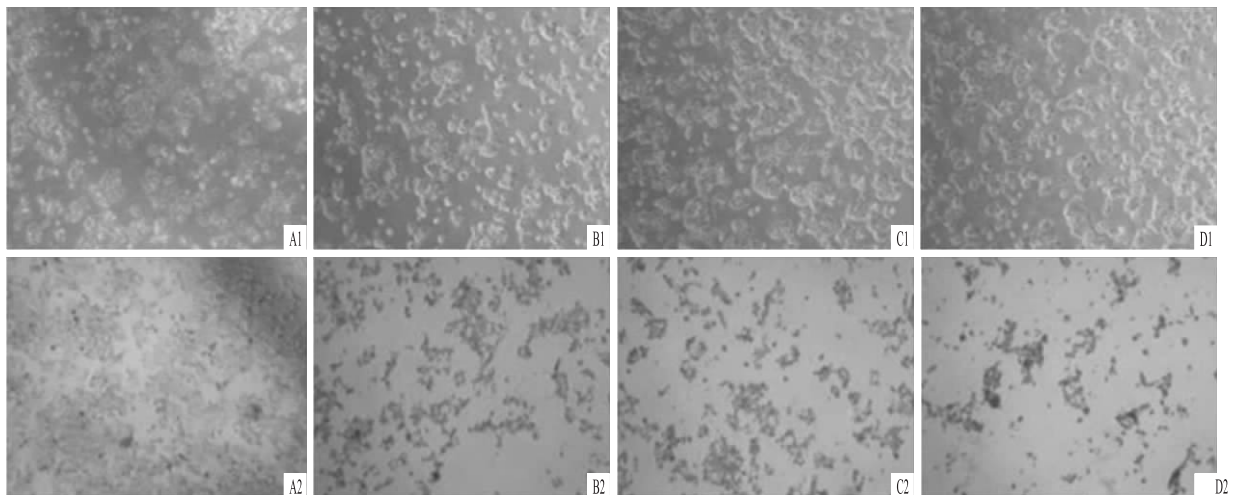


图3 TAM和SIV作用后对MCF-7细胞形态学的影响 ×200

A:细胞对照组;B:SIV组;C:TAM组;D:SIV+TAM组;1:0h;2:24h

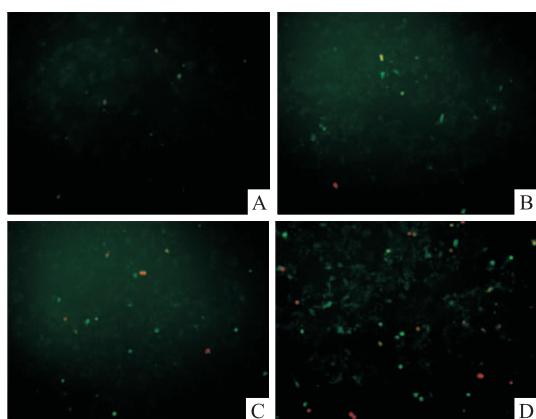


图4 荧光显微镜下 TAM 及 SIV 单药及联合处理后对 MCF-7 细胞凋亡的影响 ×400  
A:细胞对照组;B:SIV 组;C:TAM 组;D:SIV + TAM 组

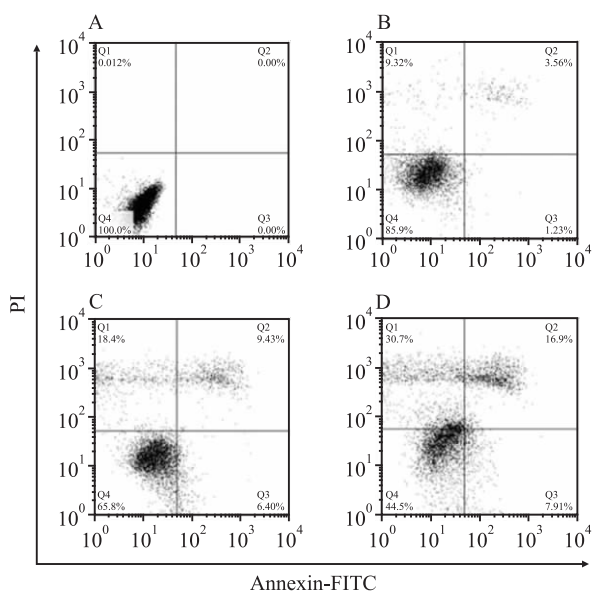


图5 流式细胞术 TAM 及 SIV 单药及联合处理对 MCF-7 细胞凋亡率的影响  
A:细胞对照组;B:SIV 组;C:TAM 组;D:SIV + TAM 组

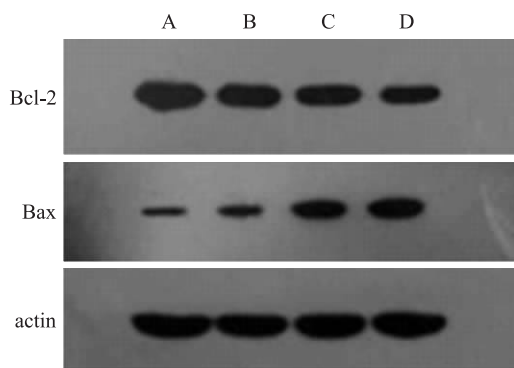


图6 TAM,SIV 单药及联合处理后对 MCF-7 细胞中 Bcl-2、Bax 表达的影响  
A:细胞对照组;B:SIV 组;C:TAM 组;D:SIV + TAM 组

SIV 在临床上常用于降低患者血脂,最近有研究<sup>[11]</sup>显示 SIV 具有抗癌作用。实验人员发现,SIV 可通过下调 Bcl-2,增加 Bax 表达来诱导不同肿瘤细胞发生凋亡<sup>[12]</sup>。本实验也显示 TAM 与 SIV 单药都可抑制 MCF-7 细胞增殖,而两药联合时抑制作用增强。荧光显微镜及流式细胞实验则显示 TAM 及 SIV 作用于 MCF-7 时可诱导细胞发生凋亡,两药联合时细胞凋亡率增加。

在不利因素的影响下,细胞会在基因的调控下发生自动死亡,这个过程称为凋亡。凋亡是细胞自发过程,对维持细胞正常活动有重要作用。凋亡程序的启动相当复杂,其中 Bcl-2 家族和促凋亡蛋白(Bax)是常见的与凋亡相关的蛋白<sup>[13]</sup>。Bcl-2 对维持线粒体外膜的完整性有着相当重要的意义,通过保持线粒体的完整,Bcl-2 可防止线粒体内细胞色素 C 等促凋亡分子进入胞内,防止细胞发生凋亡。而 Bax 蛋白对线粒体膜有破坏作用,通过促进各种促凋亡分子从线粒体中释放,可促进细胞发生凋亡<sup>[14]</sup>。在正常情况下,Bcl-2 和 Bax 可形成二聚体,相当于细胞中死亡通路中的开关,在受到外界条件刺激后,细胞内的 Bcl-2 表达可能会异常增高,进而引起 Bax 二聚体发生分离,抑制细胞出现凋亡,继而引发肿瘤。已有研究<sup>[10,12]</sup>证实 TAM 和 SIV 可以降低肿瘤细胞内 Bax 表达上升,Bcl-2 表达下降,本实验亦显示 TAM 及 SIV 单独作用于 MCF-7 细胞 48 h 后,Bax 表达上升,Bcl-2 表达下降;TAM 与 SIV 联合作用于 MCF-7 细胞 48 h 后,Bax 表达上升及 Bcl-2 表达下降且较单药更为明显,暗示两药联合应用于乳腺癌治疗的潜在性。

综上所述,TAM 和 SIV 对乳腺癌细胞株 MCF-7 存在增殖抑制及诱导凋亡效应,而两药联合作用时对 MCF-7 作用更强,并且联合使用时可以降低 TAM 的使用剂量,有利于减少其副反应,这提示两药联合使用可能使乳腺癌患者受益。需要说明的是本实验为细胞基础实验,TAM 和 SIV 联合使用在动物体内的抗肿瘤作用及机制未被研究,值得深入研究探讨。

参考文献

[1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin,2014,64(1):9-29.  
[2] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin,2015,65(1):5-29.  
[3] Goss P E, Ingle J N, Pritchard K I, et al. Extending aromatase-inhibitor adjuvant therapy to 10 years [J]. N Engl J Med,2016,375(3):209-19.

- [4] Masuda N, Sagara Y, Kinoshita T, et al. Neoadjuvant anastrozole versus tamoxifen in patient receiving goserelin for premenopausal breast cancer (STAGE): a double-blind, randomised phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(4): 345–52.
- [5] Li M, Huang Y, Dong X, et al. Simvastatin downregulated C35 expression and inhibited the proliferation of colon cancer cells Lovo and HT29 *in vitro* [J]. *Biosci Trends*, 2016, 10(3): 227–30.
- [6] Woschek M, Kneip N, Jurida K, et al. Simvastatin reduces cancerogenic potential of renal cancer cells *via* geranylgeranyl pyrophosphate and mevalonate pathway [J]. *Nutr Cancer*, 2016, 68(3): 420–7.
- [7] Patani N, Martin L A. Understanding response and resistance to oestrogen deprivation in ER-positive breast cancer [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 382(1): 683–94.
- [8] Davies C, Pan H, Godwin J, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial [J]. *Lancet*, 2013, 381(9869): 805–16.
- [9] Vethakanraj H S, Babu T A, Sudarsanan G B, et al. Targeting ceramide metabolic pathway induces apoptosis in human breast cancer cell lines [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464(3): 833–9.
- [10] Darakhshan S, Ghanbari A. Tranilast enhances the anti-tumor effects of tamoxifen on human breast cancer cells *in vitro* [J]. *J Biomed Sci*, 2013, 20: 76.
- [11] Fu H, Wang Q S, Luo Q, et al. Simvastatin inhibits apoptosis of endothelial cells induced by sepsis through upregulating the expression of Bcl-2 and downregulating Bax [J]. *World J Emerg Med*, 2014, 5(4): 291–7.
- [12] Buranrat B, Senggunprai L, Prawan A, et al. Simvastatin and atorvastatin as inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in human cholangiocarcinoma cells [J]. *Life Sci*, 2016, 153: 41–9.
- [13] Ganesan V, Colombini M. Regulation of ceramide channels by Bcl-2 family proteins [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(10): 2128–34.
- [14] Deming P, Kornbluth S. Study of apoptosis *in vitro* using the Xenopus egg extract reconstitution system [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 322: 379–93.

## Synergistic effect of Tamoxifen and Simvastatin on MCF-7 human breast cancer cells and related mechanism

Jin Wei<sup>1</sup>, Yuan Yuan<sup>2</sup>, Tang Jichun<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>2</sup>Central Laboratory of Binhu Hospital, Hefei 230061)

**Abstract Objective** To investigate the synergistic effect of Tamoxifen (TAM) and Simvastatin (SIV) on MCF-7 human breast cancer cells (MCF-7). **Methods** MTT assay was used to detect antiproliferative effects of TAM, SIV and TAM + SIV on growth of MCF-7 cells. Synergistic interaction between the two drugs was appraised *in vitro* by using the combination index (CI) method. The cell apoptosis morphological change was detected by the fluorescent microscope. The diversifications of the cell the apoptosis in TAM, SIV and TAM + SIV were analyzed by flow cytometry. The expressions of Bcl-2 and Bax were investigated by Western blot. **Results** MTT assays indicated that the viability of MCF-7 was markedly reduced when SIV was combined with TAM compared to single drug treatment (CI < 1). Furthermore, when SIV in combination with TAM exhibited a synergistic inhibition of proliferation and induction of apoptosis in MCF-7. Moreover, the combination use of TAM and SIV produced a stronger inhibitory effects on Bcl-2 and Bax expression than control or single drug treatment. **Conclusion** The combination use of TAM and SIV can obviously increase the effect in comparison with single drug treatment, indicating that combination treatment may be a more effective therapy to breast cancer.

**Key words** Tamoxifen; Simvastatin; combination; breast cancer