

# 辛伐他汀对非小细胞肺癌细胞增殖和免疫逃逸的影响

刘冰, 阳洁

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(编号:81201622); 国家自然科学基金地区资助项目(编号:81260324)

作者单位: 510006 广州, 广东药学院药科学院药理系(刘冰); 530021 南宁, 广西医科大学药学院药理学教研室(阳洁)

作者简介: 刘冰(1982-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 肿瘤药理学。E-mail: liubing52000@163.com

通讯作者: 阳洁(1978-), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤药理学。E-mail: yangjz2005@126.com

**[摘要]** 目的 观察辛伐他汀对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞增殖和免疫逃逸的影响,并探讨其机制。方法 用改进 MTT 法检测不同浓度辛伐他汀、RhoA siRNA 处理后 A549 细胞的增殖情况;用 Real-time RT-PCR 检测抗免疫逃逸相关因子即主要组织相容性复合体 I 类(MHC I, 又称 HLA-A)和肽转运蛋白(TAP1)的基因表达;用 RhoA 活性测定法观察 RhoA 活性变化;用 Lipofectamine 2000 转染 siRNA。结果 辛伐他汀能浓度依赖性(10~30  $\mu\text{mol/L}$ )地抑制 A549 细胞增殖,增强 HLA-A 和 TAP1 基因表达,抑制 RhoA 活性( $P < 0.05$  或  $< 0.01$ )。用 0.1  $\mu\text{mol/L}$  RhoA siRNA 抑制 RhoA 活性后,也能显著抑制 A549 细胞增殖,增加 HLA-A 和 TAP1 基因表达( $P < 0.01$ )。但 RhoA siRNA 联合应用辛伐他汀不能产生协同效应,而与单用 RhoA siRNA 的作用相似( $P > 0.05$ )。结论 辛伐他汀主要依赖于抑制 A549 细胞的 RhoA 活性,从而增加 HLA-A 和 TAP1 表达,减少免疫逃逸和细胞增殖。

**[关键词]** 辛伐他汀; 非小细胞肺癌; 细胞增殖; 免疫逃逸; RhoA

**[中图分类号]** R 96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2013)08-0729-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.08.01

**Effects of simvastatin on cell proliferation and immune escape of non-small cell lung cancer** LIU Bing, YANG Jie. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the effects of simvastatin on cell proliferation and immune escape of human non-small cell lung cancer(NSCLC) as well as the underlying mechanisms. **Methods** Cell proliferation was determined using a modified MTT assay after the treatment with different concentrations of simvastatin, or RhoA siRNA in A549 cells. The gene expression of anti-immune escape factor, major histocompatibility complex class I (MHC I, also known as HLA-A) and peptide transporter protein(TAP1) were detected by real-time RT-PCR. The change of RhoA activity was measured by a microplate reader in A549 cells treated with simvastatin, or RhoA siRNA. siRNA transfection was done using lipofectamine 2000. **Results** Simvastatin(10~30  $\mu\text{mol/L}$ ) significantly reduced the proliferation, enhanced gene expression of HLA-A and TAP1 and inhibited RhoA activity of A549 cells in concentration-dependent manner( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Moreover, inhibition of RhoA activity with 0.1  $\mu\text{mol/L}$  RhoA siRNA also resulted in a substantial inhibition of proliferation and increased gene expression of HLA-A and TAP1 of 549 cells( $P < 0.01$ ). However, combination treatment of RhoA siRNA and simvastatin exerted no synergistic effects in 549 cells compared with the specific siRNA treatment alone( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Simvastatin can suppress A549 cells proliferation and immune escape primarily through inhibition of RhoA activity and thereby increasing the gene expression of HLA-A and TAP1.

**[Key words]** Simvastatin; Non-small cell lung cancer(NSCLC); Cell proliferation; Immune escape; RhoA

大多数非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC) 患者确诊时已属晚期或发生转移,失去手术治疗的机会,需要化学药物治疗<sup>[1]</sup>。虽然近年来分子靶向化疗药物如吉非替尼等的运用使 NSCLC 治疗取得了一些进展,但其 5 年生存率并未显著改善,复发率仍高,预后很差。研究表明,肿瘤免疫逃逸是导致肿瘤发生、发展的关键原因<sup>[2]</sup>,尤其 NSCLC 是非免疫原性肿瘤,不能有效激活宿主的免疫系统,因此能逃避免疫监视和攻击,发生免疫逃逸<sup>[3]</sup>。近年来研究发现,他汀类降血脂药辛伐他汀能显著抑制乳腺癌、前列腺癌、胶质瘤等多种肿瘤细胞增殖<sup>[4]</sup>,具有较好的抗肿瘤潜能。但至今,辛伐他汀在 NSCLC 细胞增殖及免疫逃逸中的作用仍不清楚。本研究旨在探讨辛伐他汀对 NSCLC 的 A549 细胞增殖及抗免疫逃逸相关因子的影响及可能机制,为 NSCLC 的临床治疗提供新的思路。

### 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** 辛伐他汀(舒降之,美国默克)用二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma)溶解,储存液为 100 mmol/L,每次实验前在培养基中稀释。DMEM、胎牛血清(美国 Gibco);青霉素、链霉素、噻唑蓝(美国 Sigma);Trizol、SYBR Green I 绿色核酸凝胶染料(美国 Invitrogen);RhoA siRNA、control siRNA、单克隆抗 RhoA 抗体(美国 Santa Cruz);Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen);Rho-GTP 亲和力测试板(美国 Cytoskeleton)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** NSCLC 细胞株 A549 细胞(购自美国 ATCC,由广东药学院药科学院药理系实验室保存)用含 10% 胎牛血清及 0.1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基,于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养、传代。

**1.2.2 细胞增殖实验** 采用改进的 MTT 法测定细胞增殖情况,取对数生长期的 A549 细胞,用无血清 DMEM 重悬后,以 1 × 10<sup>5</sup>/ml 接种于 96 孔板,每孔 100 μl,细胞培养过夜待细胞贴壁后,用 10 μmol/L、20 μmol/L、30 μmol/L 的辛伐他汀或 RhoA siRNA、control siRNA 分别处理细胞 48 h 或 72 h 后,每孔加入 5 mg/ml 的噻唑蓝 20 μl,培养 4 h 后,终止培养,吸去孔内培养液,每孔加入 150 μl 二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解,用酶标仪在波长 570 nm 处测量各孔的吸光值(OD)。同时设置阴性对照组(仅加 DMSO,不加药物处理)、空白对照组(无细胞,仅加无血清 DMEM),各组均设 3 个复孔,实验重复 5 次。细胞增殖率(%) = OD 处

理组 - 空白对照组/OD 阴性对照组 - 空白对照组 × 100%。

**1.2.3 Real-time RT-PCR 检测** 用于检测 NSCLC 抗免疫逃逸相关因子即主要组织相容性复合体 I 类(major histocompatibility complex, MHC I),又称人类白细胞抗原 A (human leucocyte antigen-A, HLA-A) 和肽转运蛋白(peptide transporter protein 1, TAP1)的基因表达情况。用 10 μmol/L、20 μmol/L、30 μmol/L 的辛伐他汀分别处理 A549 细胞 48 h 后,按 Trizol 试剂说明书从 A549 细胞提取分离 RNA,然后取 2 μg RNA 用 iScript 逆转录酶试剂合成 cDNA;用 SYBR Green I 绿色核酸凝胶染料在 Mx3000P QPCR 系统(Stratagene 公司)进行 RT-PCR 分析,以 GAPDH 为内参基因;用 ΔσCt 法计算各组 HLA-A 和 TAP1 基因的相对表达量。扩增 HLA-A 基因的引物序列如下:上游 5'-ACCCTCGTCCTGCTACTCTC-3',下游 5'-CTGTCTCCTCGTCCCAATACT-3'。扩增 TAP1 基因的引物序列如下:5'-ACTGCTACTTCTCGCCGACT-3'和 5'-CTGCGTTTTGCTCTTGGAG-3'。

**1.2.4 RhoA 活性测定** 用 10 μmol/L、20 μmol/L、30 μmol/L 辛伐他汀或 0.1 μmol/L RhoA siRNA 处理 A549 细胞 48 h 后,采用 Sterpetti 的方法<sup>[5]</sup>收集 A549 细胞的膜提取物 25 μg,在 Rho-GTP 亲和力测试板上孵育 45 min,再与抗体检测试剂孵育 2 h,用酶标仪测定发光信号,观察 RhoA 活性变化,实验重复 5 次。

**1.2.5 siRNA 转染** A549 细胞常规培养达 50% ~ 70% 以上融合时,采用 Lipofectamine2000 试剂转染 RhoA siRNA、control siRNA,严格按其说明书操作,细胞孵育过夜后,再培养 48 h。同时设置空脂质体组,每组设 3 个复孔,实验重复 5 次。

**1.3 统计学方法** 应用 SPSS20.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,不同时间比较采用重复测量资料两因素两水平方差分析,均数间两两比较采用 SNK-q 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 辛伐他汀不同浓度和时间对 A549 细胞增殖的影响** 与空白对照组比较,用 10 μmol/L、20 μmol/L、30 μmol/L 辛伐他汀作用 A549 细胞 48 h 和 72 h 后,均能明显抑制 A549 细胞增殖,呈浓度依赖性(P < 0.01),但三个浓度的辛伐他汀在 48 h 和 72 h 的作用差异无统计学意义(P > 0.05)。见表 1。

表1 辛伐他汀不同浓度和时间对 A549 细胞增殖的影响 [ (x̄ ± s), 细胞增殖率% ]

组别	例数	48 h	72 h
空白对照组	5	1.039 ± 0.091	1.019 ± 0.076
10 μmol/L 辛伐他汀组	5	0.801 ± 0.081 *	0.733 ± 0.090*
20 μmol/L 辛伐他汀组	5	0.535 ± 0.070 *	0.432 ± 0.063*
30 μmol/L 辛伐他汀组	5	0.373 ± 0.078 *	0.319 ± 0.029*
F <sub>组间</sub>	-	72.413	
F <sub>时间</sub>	-	6.588	
F <sub>组间 × 时间</sub>	-	0.524	
P <sub>组间</sub>	-	0.000	
P <sub>时间</sub>	-	0.033	
P <sub>组间 × 时间</sub>	-	0.678	

注:与48 h空白对照组比较,\*P < 0.01;与72 h空白对照组比较,\*P < 0.01

2.2 辛伐他汀对 A549 细胞抗免疫逃逸相关因子 HLA-A 和 TAP1 基因表达的影响 与空白对照组比较,10 μmol/L、20 μmol/L、30 μmol/L 辛伐他汀作用 A549 细胞 48 h 后,明显增强 A549 细胞抗免疫逃逸相关因子 HLA-A 和 TAP1 基因的相对表达量,呈浓度依赖性(P < 0.01)。见表2。

表2 辛伐他汀对 A549 细胞免疫逃逸相关因子基因表达的影响 [ (x̄ ± s), fold change ]

组别	例数	HLA-A	TAP1
空白对照组	5	1.028 ± 0.061	1.004 ± 0.087
10 μmol/L 辛伐他汀组	5	1.354 ± 0.100 *	1.248 ± 0.052 *
20 μmol/L 辛伐他汀组	5	1.524 ± 0.066 *	1.351 ± 0.052 *
30 μmol/L 辛伐他汀组	5	1.656 ± 0.076 *	1.474 ± 0.088 *
F	-	36.947	23.097
P	-	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,\*P < 0.01

2.3 辛伐他汀对 A549 细胞 RhoA 活性的影响 与空白对照组相比,10 μmol/L、20 μmol/L、30 μmol/L 辛伐他汀作用 A549 细胞 48 h 后,能明显抑制 A549 细胞 RhoA 活性,呈浓度依赖性(P < 0.05 或 < 0.01)。见表3。

表3 辛伐他汀对 A549 细胞 RhoA 活性的影响 [ RLU × 10<sup>5</sup>, (x̄ ± s) ]

组别	例数	RhoA 活性
空白对照组	5	6.966 ± 0.874
10 μmol/L 辛伐他汀组	5	5.242 ± 0.383 *
20 μmol/L 辛伐他汀组	5	2.833 ± 0.518 ▲
30 μmol/L 辛伐他汀组	5	2.173 ± 0.640 ▲
F	-	36.955
P	-	0.000

注:与空白对照组比较,\*P < 0.05,▲P < 0.01

2.4 RhoA siRNA 对 A549 细胞增殖和免疫逃逸相关

因子 HLA-A 和 TAP1 基因表达的影响 用 0.1 μmol/L 的 RhoA siRNA 处理 A549 细胞 48 h 后,能使 RhoA 活性显著下降(P < 0.01),并能显著抑制 A549 细胞增殖(P < 0.01),表明 RhoA 活性与 A549 细胞增殖密切相关。见表4。为进一步探讨 RhoA 活性是否与辛伐他汀抑制 A549 细胞增殖和增强抗免疫逃逸相关因子有关,我们用 0.1 μmol/L 的 RhoA siRNA 观察其单独应用 48 h 及与 30 μmol/L 辛伐他汀合用 48 h 对 A549 细胞增殖和抗免疫逃逸相关因子的影响。结果显示,control siRNA 单独应用 48 h 或与 30 μmol/L 辛伐他汀合用 48 h 对 A549 细胞增殖和抗免疫逃逸相关因子均无明显影响(P > 0.05)。单用 RhoA siRNA 48 h 或与 30 μmol/L 辛伐他汀合用 48 h 均能显著增加抗免疫逃逸相关因子 HLA-A 和 TAP1 基因的相对表达量(P < 0.01)。但 RhoA siRNA 与 30 μmol/L 辛伐他汀合用组与单用 RhoA siRNA 组比较,两组差异无统计学意义(P > 0.05)。见表5。

表4 RhoA siRNA 对 A549 细胞 RhoA 活性和细胞增殖的影响 (x̄ ± s)

组别	例数	RhoA 活性 (RLU × 10 <sup>5</sup> )	细胞增殖率 (%)
空白对照组	5	6.980 ± 0.666	1.026 ± 0.088
0.1 μmol/L control siRNA 组	5	6.737 ± 0.826	1.009 ± 0.112
0.1 μmol/L RhoA siRNA 组	5	1.130 ± 0.621 *	0.391 ± 0.072 *
F	-	65.262	46.179
P	-	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,\*P < 0.01

表5 RhoA siRNA 和辛伐他汀对 A549 细胞免疫逃逸相关因子基因表达的影响 [ fold change, (x̄ ± s) ]

组别	例数	HLA-A	TAP1
空白对照组	5	1.004 ± 0.087	0.997 ± 0.074
0.1 μmol/L control siRNA 组	5	0.979 ± 0.082	0.974 ± 0.099
30 μmol/L 辛伐他汀组	5	1.638 ± 0.087 *	1.439 ± 0.106 *
0.1 μmol/L control siRNA + 30 μmol/L 辛伐他汀组	5	1.622 ± 0.124 *	1.409 ± 0.087 *
0.1 μmol/L RhoA siRNA 组	5	1.689 ± 0.109 *	1.550 ± 0.064 *
0.1 μmol/L RhoA siRNA + 30 μmol/L 辛伐他汀组	5	1.638 ± 0.059 **	1.463 ± 0.141 **
F	-	39.471	19.796
P	-	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,\*P < 0.01;与 0.1 μmol/L RhoA siRNA 组比较,\*\*P > 0.05

### 3 讨论

**3.1** 辛伐他汀是目前临床上治疗高胆固醇血症的一线药物之一,能选择性地抑制内源性胆固醇合成限速酶 3-羟基-3-甲基戊二酰基辅酶 A 还原酶,从而阻断甲羟戊酸形成,最终有效降低细胞内的胆固醇合成。近年来研究发现,辛伐他汀能显著抑制乳腺癌、前列腺癌、胶质瘤、黑色素瘤等多种肿瘤细胞增殖<sup>[4]</sup>。本研究发现,辛伐他汀能浓度依赖性地抑制 NSCLC 的 A549 细胞增殖,具有较好的抗肿瘤潜能。

**3.2** 肺癌是世界上发病率和病死率最高的恶性肿瘤,在中国,肺癌的发病率和病死率分列男性肿瘤首位、女性肿瘤第二位和第一位。肺癌 85% 为 NSCLC,复发率高,预后很差。研究表明,肿瘤免疫逃逸是导致肿瘤发生、发展的关键原因。特别是 NSCLC 为非免疫原性肿瘤,易发生免疫逃逸。目前普遍认为,发生肿瘤免疫逃逸的主要机制是肿瘤源性的 MHC I 即 HLA-A 的表达缺失或下调;此外, TAP1 的表达缺失或下调也被证明能导致免疫逃逸和增加肿瘤的发生<sup>[6]</sup>。特别是在 NSCLC 中,已被证实存在 HLA-A 和 TAP1 的表达下调或缺失<sup>[7]</sup>。本研究显示,辛伐他汀能浓度依赖性地增强 A549 细胞的抗免疫逃逸相关因子 HLA-A 和 TAP1 基因的相对表达量,提示辛伐他汀对减少 NSCLC 的免疫逃逸可能有重要作用。

**3.3** RhoA 属于 GTP/GDP 结合 GTP 酶的 Ras 超家族,已被证明对促进肿瘤细胞增殖有重要作用<sup>[8]</sup>。RhoA 在包括 NSCLC 在内的多种肿瘤细胞中过度表达和过度激活<sup>[9]</sup>。过度活化的 RhoA 能触发后续的 PI3K-Akt 通路的激活,而该通路被认为是调节细胞生成及细胞增殖的关键通路<sup>[10]</sup>。Fromigue 等<sup>[11]</sup>研究发现,阿托伐他汀能有效抑制 RhoA 介导的基质金属蛋白酶激活,从而抑制骨肉瘤细胞生长和侵袭。本研究发现,辛伐他汀能浓度依赖性地抑制 A549 细胞的 RhoA 活性,并且用 RhoA siRNA 降低 RhoA 活性后,也会显著抑制 A549 细胞增殖,增加抗免疫逃逸相关因子 HLA-A 和 TAP1 基因的相对表达量。这提示辛伐他汀抑制 A549 细胞增殖,减少其免疫逃逸的机制可能与其抑制 RhoA 活性密切相关。我们进一步研究还发现, RhoA siRNA 联合应用辛伐他汀并不能产生协同效应,而是与单用 RhoA siRNA 的作用相似,也就是说, RhoA 活性被抑制后,辛伐他汀不能发挥作用。相似结果在其他文献中也有报道,如 Wang 等<sup>[12]</sup>研究发现重组的人肝细胞生长因

子(rh-HGF)能促进骨肉瘤细胞生存从而抵消顺铂的治疗作用,用抗 HGF 中和抗体治疗能明显增强顺铂的细胞毒性。但用 Akt siRNA 阻断 Akt 表达时, rh-HGF 和抗 HGF 中和抗体对顺铂的细胞毒性仅为微弱作用或无作用,因此 Wang 等认为 rh-HGF 和抗 HGF 中和抗体对顺铂疗效的影响主要是依赖于对 PI3K-Akt 通路的抑制。本研究也证实了此观点。因此,我们认为,辛伐他汀主要依赖于抑制 A549 细胞的 RhoA 活性,从而增加抗免疫逃逸相关因子 HLA-A 和 TAP1 表达,减少 A549 细胞的免疫逃逸和细胞增殖。

### 参考文献

- 1 Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(11):760-774.
- 2 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5):646-674.
- 3 Thomas A, Hassan R. Immunotherapies for non-small-cell lung cancer and mesothelioma[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(7):e301-310.
- 4 Boudreau DM, Yu O, Johnson J. Statin use and cancer risk: a comprehensive review[J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2010, 9(4):603-621.
- 5 Sterpetti P, Hack AA, Bashir MP, et al. Activation of the Lbc Rho exchange factor proto-oncogene by truncation of an extended C terminus that regulates transformation and targeting[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(2):1334-1345.
- 6 Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes[J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(11):999-1005.
- 7 Korkolopoulou P, Kaklamanis L, Pezzella F, et al. Loss of antigen-presenting molecules(MHC class I and TAP-1) in lung cancer[J]. *Br J Cancer*, 1996, 73(2):148-153.
- 8 Aznar S, Lacal JC. Rho signals to cell growth and apoptosis[J]. *Cancer Lett*, 2001, 165(1):1-10.
- 9 Touge H, Chikumi H, Igishi T, et al. Diverse activation states of RhoA in human lung cancer cells: contribution of G protein coupled receptors[J]. *Int J Oncol*, 2007, 30(3):709-715.
- 10 Denoyelle C, Albanese P, Uzan G, et al. Molecular mechanism of the anti-cancer activity of cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, on aggressive human breast cancer cells[J]. *Cell Signal*, 2003, 15(3):327-338.
- 11 Fromigue O, Hamidouche Z, Marie PJ. Blockade of the RhoA-JNK-c-Jun-MMP2 cascade by atorvastatin reduces osteosarcoma cell invasion[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(45):30549-30556.
- 12 Wang K, Zhuang Y, Liu C, et al. Inhibition of c-Met activation sensitizes osteosarcoma cells to cisplatin via suppression of the PI3K-Akt signaling[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2012, 526(1):38-43.

[收稿日期 2013-05-06][本文编辑 黄晓红 韦颖]