

基于 miR-181/NF- κ B 通路的辛伐他汀对结直肠癌小鼠血液高凝状态的改善研究^Δ

张蕊^{1*}, 常娜², 陈超³, 赵萌¹, 李博¹ (1. 唐山市人民医院药剂科, 河北唐山 063000; 2. 唐山市人民医院放疗五科, 唐山市肿瘤放射治疗学重点实验室, 河北唐山 063000; 3. 遵化市人民医院病理科, 河北遵化 064299)

中图分类号 R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124 (2022) 06-0690-06

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.06.013

摘要 目的: 基于微小 RNA (miR)-181/核因子 κ B (NF- κ B) 通路, 探讨辛伐他汀对结直肠癌小鼠肿瘤生长、血液高凝状态的影响。方法: 选取 BALB/C 裸鼠, 通过皮下注射人结直肠癌细胞系 SW480 的方法构建结直肠癌小鼠模型, 将 30 只模型小鼠随机分为对照组、辛伐他汀低和高剂量组。辛伐他汀低、高剂量组小鼠分别腹腔注射辛伐他汀 50、100 mg/kg, 1 日 1 次, 第 28 日分析小鼠肿瘤生长、血管生成和凝血情况。通过定量反转录聚合酶链反应、蛋白质印迹法检测肿瘤组织中 miR-181、NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α) 以及 NF- κ B mRNA 和蛋白表达水平。结果: 与对照组比较, 辛伐他汀低、高剂量组小鼠的肿瘤体积和重量, 细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1)、Ki67 和 B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2) 蛋白水平, 微血管密度、血管内皮生长因子 (VEGF) 水平和全血黏度, I κ B α 、NF- κ B mRNA 和蛋白表达水平均显著降低; 而 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、miR-181 水平显著升高, 血浆凝血酶原时间 (PT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT) 显著延长, 上述差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。辛伐他汀高剂量组小鼠的肿瘤体积和重量、微血管密度显著低于辛伐他汀低剂量组 [(171.74 $\pm$ 19.33) mm³ vs. (226.52 $\pm$ 26.38) mm³, (0.21 $\pm$ 0.03) g vs. (0.28 $\pm$ 0.04) g, (9.77 $\pm$ 1.85)% vs. (16.39 $\pm$ 2.11)%], CyclinD1、Ki67 和 Bcl-2 蛋白水平, VEGF 水平、全血黏度, I κ B α 、NF- κ B mRNA 和蛋白表达水平显著低于辛伐他汀低剂量组; Bax 蛋白、miR-181 水平显著高于辛伐他汀低剂量组, PT、APTT 显著长于辛伐他汀低剂量组, 上述差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 辛伐他汀可能通过调控 miR-181/NF- κ B 途径抑制结直肠癌模型小鼠的肿瘤生长和血管生成, 并缓解血液高凝状态。

关键词 结直肠癌; 辛伐他汀; 微小 RNA-181; 核因子 κ B; 凝血

Improvement of Blood Hypercoagulability in Mice with Colorectal Cancer by Simvastatin Based on miR-181/NF- κ B Pathway^Δ

ZHANG Rui¹, CHANG Na², CHEN Chao³, ZHAO Meng¹, LI Bo¹ (1. Dept. of Pharmacy, Tangshan Municipal People's Hospital, Hebei Tangshan 063000, China; 2. Dept. of Radiotherapy and Chemotherapy, Tangshan Municipal People's Hospital, Key Laboratory of Oncology Radiation Therapy of Tangshan, Hebei Tangshan 063000, China; 3. Dept. of Pathology, Zunhua People's Hospital, Hebei Zunhua 064299, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the effects of simvastatin on tumor growth, blood coagulation in mice with colorectal cancer based on microRNA (miR)-181/nuclear factor (NF)- κ B pathway. **METHODS:** The colorectal cancer mice model was established by subcutaneous injection of human colorectal cancer cell line SW480, and 30 model mice were randomly divided into the control group, simvastatin low-dose group and simvastatin high-dose group. The simvastatin low-dose group and simvastatin high-dose group were intraperitoneally injected with 50 mg/kg and 100 mg/kg simvastatin, qd. On the 28th day, tumor growth, angiogenesis, coagulation indicators were analyzed. The expression levels of miR-181, I κ B α and NF- κ B mRNA and protein in tumor tissues were detected by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and western blotting. **RESULTS:** Compared with the control group, the tumor volume, mass, CyclinD1 protein, Ki67 protein, Bcl-2 protein, microvessel density, vascular endothelial growth factor (VEGF) levels, whole blood viscosity, I κ B α and NF- κ B mRNA and protein expression levels of the simvastatin low-dose group and simvastatin high-dose group decreased significantly, while Bax protein and miR-181 levels increased, plasma prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) and miR-181 were

^Δ 基金项目: 河北省 2019 年度医学科学研究课题计划项目 (No. 20191618)

* 主管药师。研究方向: 临床药学。E-mail: 719912795@qq.com

prolonged significantly, with statistically significant differences ($P < 0.05$). The tumor volume, mass and microvascular density in simvastatin high-dose group were significantly lower than those in simvastatin low-dose group [$(171.74 \pm 19.33) \text{ mm}^3$ vs. $(226.52 \pm 26.38) \text{ mm}^3$, $(0.21 \pm 0.03) \text{ g}$ vs. $(0.28 \pm 0.04) \text{ g}$, $(9.77 \pm 1.85) \%$ vs. $(16.39 \pm 2.11) \%$], CyclinD1, Ki67 and Bcl-2 protein levels, VEGF levels, whole blood viscosity, expression levels of I κ B α and NF- κ B mRNA and protein were significantly lower than those in simvastatin low-dose group; the levels of Bax protein and miR-181 were significantly higher than those of simvastatin low-dose group, PT and APTT were significantly longer than those of simvastatin low-dose group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Simvastatin may inhibit tumor growth and angiogenesis in colorectal cancer model mice by regulating the miR-181/NF- κ B pathway, and alleviate blood hypercoagulability.

KEYWORDS Colorectal cancer; Simvastatin; MicroRNA-181; Nuclear factor- κ B; Coagulation

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 为常见的消化道肿瘤, 手术、化疗和放疗是治疗 CRC 的主要方法, 但是临床发现 CRC 患者机体可能处于高凝状态, 并且手术和化疗均可能诱导高凝状态, 这不但会影响预后, 还会增加肺栓塞的发生风险^[1]。辛伐他汀能够通过抑制 3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGCR) 而降低胆固醇, 被广泛用于治疗高胆固醇血症, 且安全性良好。近年来, 有研究报道 HMGCR 与肿瘤细胞增殖密切相关^[2]。细胞和体内实验结果显示, 辛伐他汀可以抑制 CRC 细胞的增殖和血管生成能力^[3]。但其分子机制仍不清楚。此外, 有研究结果发现, 辛伐他汀具有缓解高凝状态的作用^[4]。但其是否具有缓解 CRC 高凝状态的作用仍不明确。核因子 κ B (NF- κ B) 信号转导通路的激活均会诱导其靶基因的过表达, 进而促进血管生成, 促进结直肠细胞的增殖、侵袭和转移; 同时, NF- κ B 通路和机体凝血过程和高凝状态密切相关^[5-6]。微小 RNA (miRNA) 可以通过靶向信使 RNA (mRNA) 的 3' 非翻译区 (UTR) 诱导 mRNA 降解, 研究结果已证实 miR-181 在 CRC 中具有促进肿瘤进展的作用^[7]; 并且, miR-181 也可以靶向抑制 NF- κ B 通路^[8]。本研究主要探讨辛伐他汀对 CRC 模型小鼠肿瘤生长、血液高凝状态和血管生成情况的影响, 并检测 miR-181/NF- κ B 的变化, 初步分析分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和细胞: BALB/C 裸鼠购自中国上海斯莱克实验动物中心; 人 CRC 细胞系 SW480 (CCL-228 细胞, 美国 ATCC 公司)。

1.1.2 仪器: MVIS-2035 型全自动血液流变分析仪 (重庆天海医疗设备有限公司); ABI7900 型 PCR 仪 (美国 ABI 公司); CX31 型显微镜 [奥林巴斯 (中国) 有限公司]。

1.1.3 药品与试剂: DMEM 培养基购自美国 Invitrogen 公司; PVDF 膜购自美国 Bio-Rad 公司; ECL 显色试剂盒购自美国赛默飞世尔公司; 酶联免疫吸附试验试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; TRIzol 试剂盒购自美国 Sigma 公司; MiScript SYBR-Green PCR 和 miScript kit 试剂盒购自德国 QIAGEN GmbH 公司; SYBR Premix Ex Taq 和 PrimeScript-RT 试剂盒购自日本 Takara 公司; 细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1)、Ki67 和 B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体和相应的二抗购自美国 Abcam 公司; 辛伐他汀 (江西大地制药有限公司

任公司, 批准文号: 国药准字 H20059672)。

1.2 分组和建模

将 BALB/C 裸鼠分为三组, 即对照组、辛伐他汀低剂量组和辛伐他汀高剂量组。将 DMEM 培养基中处于对数生长期的 SW480 细胞重新配置成浓度为 1×10^7 个/mL 的溶液, 所有小鼠于左侧前肢皮下注射细胞溶液 0.2 mL, 给药后第 7 日可以触摸到有瘤体生成提示建模成功。第 8 日, 辛伐他汀低、高剂量组小鼠分别腹腔注射辛伐他汀 50、100 mg/kg, 1 日 1 次。第 28 日, 小鼠称重后记录体重, 然后于小鼠眼眶静脉取血, 颈椎脱臼处死小鼠, 取出肿瘤组织。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 肿瘤生长情况: 观察并记录肿瘤生长情况, 第 28 日统计肿瘤体积。用游标卡尺测量瘤体长径和短径, 肿瘤体积 = $[(\text{长径} \times \text{短径}) / 2]^3 \times 0.5236$ 。建模后 28 d 处死小鼠, 收集肿瘤组织称取重量。

1.3.2 蛋白质印迹法检测蛋白水平: 肿瘤组织研磨后收集总蛋白并通过 BCA 试剂盒检测浓度。应用 SDS-PAGE (110 V, 100 min) 分离 30 μ g 的总蛋白。PVDF 膜转移, 添加对应的抗体 (1:500 稀释), 孵育过夜。室温 (25 $^{\circ}$ C) 下加入 HRP 标记的二抗 (1:5 000 稀释), 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。采用 ECL 检测蛋白印迹带。GAPDH 作为内参。通过检测灰度分析 CyclinD1、Ki67、Bcl-2 和 Bax 蛋白相对表达水平。CyclinD1、Ki67 表达水平反映肿瘤细胞增殖水平, Bcl-2、Bax 表达水平反映肿瘤细胞凋亡水平。

1.3.3 免疫组织化学染色: 采用免疫组化染色检测血管标志蛋白 CD34, 分析肿瘤组织中的微血管密度^[9]。肿瘤组织固定脱水, 石蜡包埋, 切片 (4 μ m)。加入 3% H_2O_2 , 室温静置 20 min, 加入 CD34 抗体 (1:400 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 洗涤后加入山羊抗兔 IgG 聚合物 100 μ L 于室温下孵育 50 min; 洗涤后加入 DAB 显色液, 苏木精染色孵育 20 s, 冲洗后显微镜观察, 检测染色部位面积占总视野面积的比例, 计算百分比为微血管密度。检测血管内皮生长因子 (VEGF) 的方法同 CD34, 通过半定量法确定染色强度, 根据染色深浅评分为 0~3 分, 根据染色范围评分为 0~4 分, 两者相乘得到最终免疫组化得分。

1.3.4 定量反转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 miR-181、NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α) 和 NF- κ B mRNA 表达: 通过 TRIzol 试剂盒提取肿瘤组织总 RNA, 利用 miScript 试剂盒将 miR-181

合成互补 DNA,采用 MiScript SYBR-Green PCR 试剂盒进行 qPCR 实验,内参为 U6。采用 SYBR Premix Ex Taq™ 和 PrimeScript-RT 试剂盒进行反转录(反应条件:60 min/42 ℃, 5 min/70 ℃,4 ℃下保存)和 qPCR(反应条件:95 ℃/10 min, 40 个循环,94 ℃/15 s,60 ℃/1 min,60 ℃/1 min,4 ℃下保存)实验,内参为 GAPDH。通过比较循环阈值(ΔΔCt)分析 RNA 的表达水平。

1.3.5 CRC 模型小鼠凝血功能检测:留取小鼠血液样本,采用全自动动物血液分析仪检测活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)和全血黏度。

1.4 统计学方法

统计分析使用 SPSS 19 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行 ANOVA 方差分析,两两比较通过 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辛伐他汀对 CRC 模型小鼠肿瘤的影响

建模后第 28 日,辛伐他汀高剂量组小鼠的肿瘤体积和重量明显低于辛伐他汀低剂量组,且辛伐他汀高、低剂量组小鼠的肿瘤体积和重量明显低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

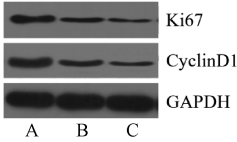
表 1 辛伐他汀对 CRC 裸鼠肿瘤体积和重量的影响($\bar{x} \pm s$)
Tab 1 Effects of simvastatin on tumor volume and mass in CRC nude mice($\bar{x} \pm s$)

组别	肿瘤体积/mm ³	肿瘤重量/g
对照组(<i>n</i> =10)	296.21±31.15	0.37±0.05
辛伐他汀低剂量组(<i>n</i> =10)	226.52±26.38 ^a	0.28±0.04 ^a
辛伐他汀高剂量组(<i>n</i> =10)	171.74±19.33 ^{ab}	0.21±0.03 ^{ab}
<i>F</i>	31.754	34.632
<i>P</i>	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与辛伐他汀低剂量组比较,^b $P < 0.05$
Note:vs. the control group, ^a $P < 0.05$; vs. the simvastatin low-dose group, ^b $P < 0.05$

2.2 辛伐他汀对 CRC 裸鼠模型细胞增殖的影响

辛伐他汀高剂量组小鼠 Ki67、CyclinD1 蛋白水平明显低于辛伐他汀低剂量组,且辛伐他汀高、低剂量组小鼠 Ki67、CyclinD1 蛋白水平明显低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 1、表 2。



A. 对照组;B. 辛伐他汀低剂量组;C. 辛伐他汀高剂量组
A. control grou; B. simvastatin low-dose group;
C. simvastatin high-dose group

图 1 辛伐他汀对 CRC 裸鼠 CyclinD1 和 Ki67 蛋白的影响
Fig 1 Effects of simvastatin on CyclinD1 and Ki67 proteins in CRC nude mice

2.3 辛伐他汀对 CRC 模型裸鼠细胞凋亡蛋白表达的影响

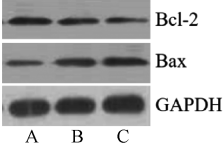
抗凋亡蛋白 Bcl-2 和凋亡蛋白 Bax 检测结果表明,辛伐他汀高剂量组小鼠肿瘤组织中 Bax 表达水平明显高于辛伐他汀

表 2 辛伐他汀对 CRC 裸鼠 CyclinD1 和 Ki67 蛋白的影响($\bar{x} \pm s$)
Tab 2 Effects of simvastatin on CyclinD1 and Ki67 proteins in CRC nude mice($\bar{x} \pm s$)

组别	CyclinD1	Ki67
对照组(<i>n</i> =10)	3.27±0.30	2.85±0.25
辛伐他汀低剂量组(<i>n</i> =10)	1.53±0.15 ^a	1.62±0.16 ^a
辛伐他汀高剂量组(<i>n</i> =10)	0.91±0.09 ^{ab}	1.08±0.10 ^{ab}
<i>F</i>	59.582	51.833
<i>P</i>	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与辛伐他汀低剂量组比较,^b $P < 0.05$
Note:vs. the control group, ^a $P < 0.05$; vs. the simvastatin low-dose group, ^b $P < 0.05$

低剂量组,而 Bcl-2 表达水平明显低于辛伐他汀低剂量组;且辛伐他汀高、低剂量组小鼠肿瘤组织中 Bax 表达水平明显高于对照组,而 Bcl-2 表达水平明显低于对照组,上述差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 2、表 3。



A. 对照组;B. 辛伐他汀低剂量组;C. 辛伐他汀高剂量组
A. control grou; B. simvastatin low-dose group; C. simvastatin high-dose group

图 2 蛋白质印迹法检测辛伐他汀对 CRC 裸鼠 Bcl-2 和 Bax 蛋白的影响
Fig 2 Effects of western blot detection for simvastatin on Bcl-2 and Bax protein in CRC nude mice

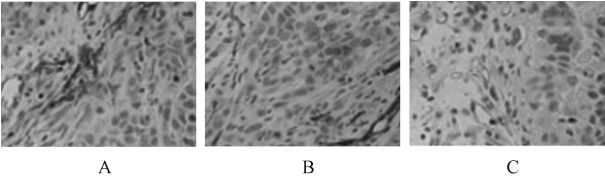
表 3 辛伐他汀对 CRC 裸鼠 Bcl-2 和 Bax 蛋白的影响($\bar{x} \pm s$)
Tab 3 Effects of simvastatin on Bcl-2 and Bax protein in CRC nude mice($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2	Bax
对照组(<i>n</i> =10)	3.41±0.32	0.97±0.09
辛伐他汀低剂量组(<i>n</i> =10)	2.24±0.21 ^a	2.31±0.26 ^a
辛伐他汀高剂量组(<i>n</i> =10)	1.58±0.16 ^{ab}	3.04±0.33 ^{ab}
<i>F</i>	47.654	53.073
<i>P</i>	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与辛伐他汀低剂量组比较,^b $P < 0.05$
Note:vs. the control group, ^a $P < 0.05$; vs. the simvastatin low-dose group, ^b $P < 0.05$

2.4 辛伐他汀对 CRC 裸鼠模型微血管密度的影响

辛伐他汀高剂量组小鼠微血管密度明显低于辛伐他汀低剂量组,且辛伐他汀高、低剂量组小鼠微血管密度均低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 3、表 4。图 3 中,蓝色为细胞核,棕色为 CD34 阳性染色,表示微血管。



A. 对照组;B. 辛伐他汀低剂量组;C. 辛伐他汀高剂量组
A. control grou; B. simvastatin low-dose group; C. simvastatin high-dose group

图 3 免疫组化法检测辛伐他汀对 CRC 裸鼠 CD34 的影响($\times 200$)
Fig 3 Effects of immunohistochemical staining for simvastatin on CD34 in CRC nude mice ($\times 200$)

表 4 辛伐他汀对 CRC 裸鼠微血管密度的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Effects of simvastatin on microvessel density in CRC nude mice ($\bar{x}\pm s$)	
组别	微血管密度/%
对照组 ($n=10$)	24.63 $\pm$ 2.86
辛伐他汀低剂量组 ($n=10$)	16.39 $\pm$ 2.11 ^a
辛伐他汀高剂量组 ($n=10$)	9.77 $\pm$ 1.85 ^{ab}
<i>F</i>	41.594
<i>P</i>	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与辛伐他汀低剂量组比较,^b $P<0.05$
Note:rs. the control group, ^a $P<0.05$; rs. the simvastatin low-dose group, ^b $P<0.05$

2.5 辛伐他汀对 CRC 裸鼠模型 VEGF 的影响

辛伐他汀高剂量组小鼠 VEGF 水平明显低于辛伐他汀低剂量组,且辛伐他汀高、低剂量组小鼠 VEGF 水平均低于对照组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),见图 4、表 5。图 4 中,蓝色为细胞核,棕色为 VEGF 阳性颜色。

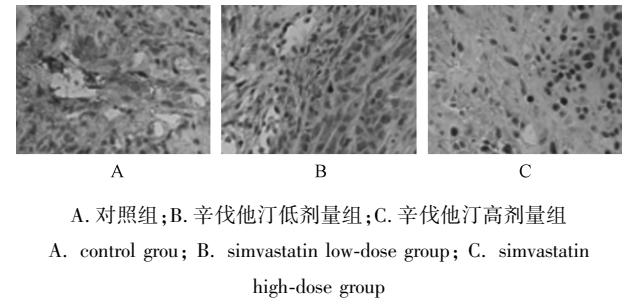


图 4 免疫组化法检测辛伐他汀对 CRC 裸鼠 VEGF 水平的影响 ($\times 200$)

Fig 4 Effects of immunohistochemical staining for simvastatin on VEGF in CRC nude mice ($\times 200$)

表 5 辛伐他汀对 CRC 裸鼠 VEGF 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, 分)

Tab 5 Effects of simvastatin on VEGF in CRC nude mice ($\bar{x}\pm s$, scores)	
组别	VEGF 免疫组化染色评分
对照组 ($n=10$)	9.21 $\pm$ 1.26
辛伐他汀低剂量组 ($n=10$)	6.08 $\pm$ 0.89 ^a
辛伐他汀高剂量组 ($n=10$)	3.32 $\pm$ 0.38 ^{ab}
<i>F</i>	53.481
<i>P</i>	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与辛伐他汀低剂量组比较,^b $P<0.05$
Note:rs. the control group, ^a $P<0.05$; rs. the simvastatin low-dose group, ^b $P<0.05$

2.6 辛伐他汀对 CRC 裸鼠模型血液流变学指标的影响

三组小鼠血液流变学指标比较,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。与对照组比较,辛伐他汀低、高剂量组小鼠的全血黏度降低,PT 和 APTT 延长,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);且辛伐他汀高剂量组小鼠的全血黏度低于辛伐他汀低剂量组,PT 和 APTT 长于辛伐他汀低剂量组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),见表 6。

2.7 辛伐他汀对 CRC 裸鼠模型 miR-181、I κ B α 和 NF- κ B mRNA 和蛋白表达的影响

三组小鼠 miR-181、I κ B α 和 NF- κ B mRNA 表达水平比较,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。辛伐他汀低、高剂量组小鼠的 miR-181 表达水平显著高于对照组,I κ B α 和 NF- κ B mRNA 表达水平显著低于对照组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);

表 6 辛伐他汀对 CRC 裸鼠血液流变学指标的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 6 Effects of simvastatin on hemorheological indicators in CRC nude mice ($\bar{x}\pm s$)					
组别	全血低切黏度/(mPa·s)	全血中切黏度/(mPa·s)	全血高切黏度/(mPa·s)	PT/s	APTT/s
对照组 ($n=10$)	9.53 $\pm$ 0.98	7.85 $\pm$ 0.77	5.15 $\pm$ 0.43	15.04 $\pm$ 0.75	18.74 $\pm$ 1.09
辛伐他汀低剂量组 ($n=10$)	8.41 $\pm$ 1.21 ^a	6.93 $\pm$ 0.91 ^a	4.58 $\pm$ 0.54 ^a	17.15 $\pm$ 0.92 ^a	21.43 $\pm$ 1.23 ^a
辛伐他汀高剂量组 ($n=10$)	7.06 $\pm$ 1.14 ^{ab}	6.12 $\pm$ 0.87 ^{ab}	4.06 $\pm$ 0.47 ^{ab}	19.43 $\pm$ 1.14 ^{ab}	24.15 $\pm$ 1.37 ^{ab}
<i>F</i>	19.266	16.323	11.754	18.584	21.643
<i>P</i>	0.004	0.016	0.021	0.005	0.002

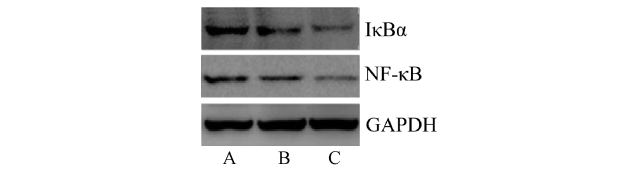
注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与辛伐他汀低剂量组比较,^b $P<0.05$
Note:rs. the control group, ^a $P<0.05$; rs. the simvastatin low-dose group, ^b $P<0.05$

且辛伐他汀高剂量组小鼠的 miR-181 表达水平显著高于辛伐他汀低剂量组,I κ B α 和 NF- κ B mRNA 表达水平显著低于辛伐他汀低剂量组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),见表 7。三组小鼠 I κ B α 和 NF- κ B 蛋白表达水平比较,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。辛伐他汀高剂量组小鼠 NF- κ B、I κ B α 蛋白表达水平低于低剂量组,辛伐他汀低、高剂量组小鼠的 I κ B α 和 NF- κ B 蛋白表达水平低于对照组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),见图 5、表 8。

表 7 辛伐他汀对 CRC 裸鼠 I κ B α 、NF- κ B mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 7 Effects of simvastatin on I κ B α and NF- κ B mRNA in CRC nude mice ($\bar{x}\pm s$)			
组别	miR-181	I κ B α mRNA	NF- κ B mRNA
对照组 ($n=10$)	1.00 $\pm$ 0.10	4.96 $\pm$ 0.48	4.22 $\pm$ 0.41
辛伐他汀低剂量组 ($n=10$)	2.26 $\pm$ 0.23	3.31 $\pm$ 0.32 ^a	3.06 $\pm$ 0.31 ^a
辛伐他汀高剂量组 ($n=10$)	3.61 $\pm$ 0.35	2.05 $\pm$ 0.19 ^{ab}	1.82 $\pm$ 0.18 ^{ab}
<i>F</i>	38.164	42.167	41.842
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与辛伐他汀低剂量组比较,^b $P<0.05$
Note:rs. the control group, ^a $P<0.05$; rs. the simvastatin low-dose group, ^b $P<0.05$



A. 对照组; B. 辛伐他汀低剂量组; C. 辛伐他汀高剂量组
A. control group; B. simvastatin low-dose group; C. simvastatin high-dose group

图 5 蛋白质印迹法检测辛伐他汀对 CRC 裸鼠 I κ B α 、NF- κ B 蛋白表达的影响

Fig 5 Effects of western blot detection for simvastatin on I κ B α and NF- κ B protein in CRC nude mice

3 讨论

一项全球性的统计结果显示,2018 年结肠和直肠原发性肿瘤患者分别为 1 096 601 例和 704 376 例,分别占有肿瘤患者的 6.1%和 3.9%,分别居第 4 位和第 8 位;每年死于结肠癌和直肠癌的患者分别占有肿瘤患者的 5.8%和 3.2%,分别居第 5 位和第 10 位^[10]。虽然新的诊断和治疗 CRC 的方法被不断应用于临床,但是 CRC 患者的生存情况仍不能令人满意。在临床上,CRC 转移是导致治疗失败的主要因素,会使生存率降低。此外,CRC 患者的高凝状态也会显著影响手术预

表 8 辛伐他汀对 CRC 裸鼠 IκBα、NF-κB 蛋白表达的影响 (x̄±s)

Tab 8 Effects of simvastatin on IκBα and NF-κB protein in CRC nude mice (x̄±s)

组别	IκBα 蛋白	NF-κB 蛋白
对照组 (n=10)	3.46±0.33	2.14±0.21
辛伐他汀低剂量组 (n=10)	2.37±0.25	1.22±0.11
辛伐他汀高剂量组 (n=10)	1.05±0.12	0.66±0.08
F	53.765	43.943
P	0.000	0.000

注:与对照组比较, ^aP<0.05;与辛伐他汀低剂量组比较, ^bP<0.05
Note:rs. the control group, ^aP<0.05; rs. the simvastatin low-dose group, ^bP<0.05

后^[11]。但目前临床上尚无可以有效抑制 CRC 和缓解高凝状态的特效药物。

有研究结果显示,他汀类药物具有抗肿瘤作用,与未使用他汀类药物者相比,使用他汀类药物者的全因死亡率和恶性肿瘤特异性死亡率降低了 15%^[12]。临床前研究结果表明,辛伐他汀在抑制肿瘤增殖、诱导细胞凋亡和抑制肿瘤转移中起着重要的作用^[13-14]。本研究通过皮下注射的方法构建了 CRC 小鼠模型,并通过辛伐他汀干预,发现辛伐他汀能够抑制细胞增殖,减少血管生成,抑制肿瘤组织生长,促进肿瘤细胞凋亡,并存在一定的剂量依赖性。HMGCR 为内质网驻留酶,研究结果显示,其可以促进肿瘤血管生成,从而抑制肿瘤的转移^[15]。作为 HMGCR 抑制剂,辛伐他汀在 CRC 中也发挥抑癌作用。一项单臂 II 期临床研究结果显示,在 XELOX 方案(卡培他滨+奥沙利铂)和贝伐单抗的基础上联合辛伐他汀作为 CRC 患者一线化疗方法,具有优秀的抗肿瘤效果^[16]。血管生成是 CRC 细胞转移的关键,肿瘤细胞会通过新生的血管系统进入血液循环,并定植于肺部等部位^[17]。Wang 等^[18]的研究结果显示,辛伐他汀可激活 AMP 活化蛋白激酶通路和抑制缺氧诱导因子-1α 的水平,抑制乳腺癌的血管生成。此外,辛伐他汀还具有抗凝作用。赵涛等^[19]的研究结果显示,辛伐他汀可以降低急性心肌梗死患者的全血黏度,延长 PT。有研究结果显示,口服辛伐他汀会明显降低接受结直肠癌手术患者的高凝状态^[20]。本研究结果发现,辛伐他汀可以剂量依赖性地抑制 CRC 细胞的增殖和血管生成,并诱导细胞凋亡,从而抑制小鼠模型的肿瘤生长,并且可以剂量依赖性地缓解 CRC 模型小鼠的高凝状态,但其分子机制仍需进一步分析。

基因表达的转录调控机制是近年来的研究热点,miRNA 可通过碱基配对识别并结合 mRNA,进而诱导 mRNA 的降解或者抑制翻译^[21]。miR-181 是近年来新发现的与恶性肿瘤发生发展密切相关的 miRNA,研究结果显示,其具有抑制结直肠癌肿瘤进展的作用^[22]。体外研究结果也证实,miR-181 会抑制 CRC 细胞的增殖^[23]。miR-181 具有靶向调控 NF-κB 通路的作用,如卵巢癌中,miR-181 通过抑制 NF-κB 通路蛋白水平发挥抗肿瘤作用^[24]。Zhu 等^[25]的研究结果显示,miR-181 通过抑制 NF-κB 通路调控炎症反应。研究结果显示,在 2 型糖尿病患者中,血浆 miR-181 与凝血状态呈负相关,miR-181 会调控 D-二聚体的水平并缓解高凝状态和减少血栓形成^[26]。NF-κB 信号通路参与脂多糖诱导的细胞凝血和纤溶因子表达异常,

从而导致高凝状态^[27]。王慧莲等^[28]的研究结果显示,NF-κB 会通过促进炎症反应,引起类风湿关节炎患者血液高凝状态,而 miR-155 通过靶向调控 NF-κB 通路缓解高凝状态。本研究结果显示,辛伐他汀可以促进 miR-181 表达,抑制 NF-κB 通路中 IκBα、NF-κB mRNA 和蛋白的水平,且呈剂量依赖性。提示辛伐他汀可能通过诱导 miR-181 的表达和抑制 NF-κB 通路来抑制 CRC 小鼠模型的肿瘤生长和血管生成,并缓解高凝状态。

综上所述,在 CRC 裸鼠模型中,辛伐他汀不但可以诱导 CRC 细胞的凋亡和抑制血管生成,还可以缓解高凝状态,其作用可能与 miR-181/NF-κB 有关。但是,关于辛伐他汀在 CRC 中的作用和调控 miR-181/NF-κB 的分子机制仍需要进一步研究。

参考文献

[1] STEWART C L, WARNER S, ITO K, et al. Cytoreduction for colorectal metastases: liver, lung, peritoneum, lymph nodes, bone, brain. When does it palliate, prolong survival, and potentially cure? [J]. Curr Probl Surg, 2018, 55(9): 330-379.

[2] ZHONG C, FAN L, LI Z, et al. SREBP2 is upregulated in esophageal squamous cell carcinoma and co-operates with c-Myc to regulate HMGCR expression [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(4): 3003-3010.

[3] 李刚, 郑君华, 徐斌, 等. 辛伐他汀抑制过表达 HER2 型结直肠癌的肿瘤血管生成 [J]. 实用药物与临床, 2019, 22(5): 465-470.

[4] 吕晓春, 蔡国龙, 许强宏, 等. 脓毒症大鼠血清假性血友病因子、血栓调节蛋白、血小板活化因子、抗凝血酶-Ⅲ变化及辛伐他汀的干预作用 [J]. 中华内科杂志, 2020, 59(1): 52-57.

[5] ZHU G W, CHENG Z B, HUANG Y J, et al. MyD88 mediates colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via NF-κB/AP-1 signaling pathway [J]. Int J Mol Med, 2020, 45(1): 131-140.

[6] YAO X L, LIU H, LI P, et al. Aqueous extract of *Whitmania Pigra* whitman alleviates thrombus burden via sirtuin 1/NF-κB pathway [J]. J Surg Res, 2020, 245: 441-452.

[7] 余惠君, 刘青, 崔胜金, 等. 结直肠癌组织 lncRNA CRNDE、miR-181 a 表达变化及其与患者临床病理特征的关系 [J]. 山东医药, 2019, 59(19): 57-59, 81.

[8] 梁珍珍, 解玉东, 张艳莉, 等. 上调 miR-181a 抑制香烟提取物诱导的支气管上皮细胞致炎因子生成与 collagen IV、fibronectin 和 α-SMA 表达 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(3): 500-505.

[9] 吴涛, 姚艺慧, 王慧利, 等. 西罗莫司联合肝动脉化疗栓塞术对兔肝移植瘤相关因子表达和血管密度的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(23): 3049-3051.

[10] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[11] 王辉, 谢荣俊, 李峰, 等. 腹腔镜结直肠癌手术对患者高凝状态及免疫功能的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(27): 103-106.

[12] NIELSEN S F, NORDESTGAARD B G, BOJESSEN S E. Statin use and reduced cancer-related mortality [J]. N Engl J Med, 2012, 367

- (19): 1792-1802.
- [13] WANG F J, LIU W, NING J F, et al. Simvastatin suppresses proliferation and migration in non-small cell lung cancer via pyroptosis[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(4): 406-417.
 - [14] KATO S, LIBERONA M F, CERDA-INFANTE J, et al. Simvastatin interferes with cancer ‘stem-cell’ plasticity reducing metastasis in ovarian cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2018, 25(10): 821-836.
 - [15] LIU L, CHAI L, RAN J J, et al. BAI1 acts as a tumor suppressor in lung cancer A549 cells by inducing metabolic reprogramming via the SCD1/HMGCR module[J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(12): 1724-1734.
 - [16] KIM Y, KIM T W, HAN S W, et al. A single arm, phase II study of simvastatin plus XELOX and bevacizumab as first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients[J]. *Cancer Res Treat*, 2019, 51(3): 1128-1134.
 - [17] CALIBASI-KOCAL G, PAKDEMIRLI A, BAYRAK S, et al. Curcumin effects on cell proliferation, angiogenesis and metastasis in colorectal cancer[J]. *J BUON*, 2019, 24(4): 1482-1487.
 - [18] WANG J C, LI X X, SUN X, et al. Activation of AMPK by simvastatin inhibited breast tumor angiogenesis via impeding HIF-1 α -induced pro-angiogenic factor[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(5): 1627-1637.
 - [19] 赵涛, 李三喜, 谢昌鸿. 红花注射液联合辛伐他汀对急性心肌梗死患者的临床疗效[J]. *中成药*, 2019, 41(3): 563-566.
 - [20] ALEXANDER Z E, SU'A B, HILL C T, et al. The effect of oral simvastatin on fibrinolytic activity after colorectal surgery-a pilot study[J]. *J Surg Res*, 2016, 205(1): 28-32.
 - [21] LU X, LIU R, WANG M N, et al. MicroRNA-140 impedes DNA repair by targeting FEN1 and enhances chemotherapeutic response in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2020, 39(1): 234-247.
 - [22] 周杰, 郑远明, 沈宗坤, 等. MiR-181a 和 miR-181b 靶向调控 FUT1 对结直肠癌进展的影响[J]. *中华检验医学杂志*, 2018, 41(11): 841-846.
 - [23] LAI F F, DENG W, FU C H, et al. Long non-coding RNA SNHG6 increases JAK2 expression by targeting the miR-181 family to promote colorectal cancer cell proliferation[J]. *J Gene Med*, 2020, 24(8): e3262.
 - [24] LIN Z L, LI D H, CHENG W J, et al. MicroRNA-181 functions as an antioncogene and mediates NF- κ B pathway by targeting RTKN2 in ovarian cancers[J]. *Reprod Sci*, 2019, 26(8): 1071-1081.
 - [25] ZHU L M, YANG M. The suppression of miR-181 inhibits inflammatory responses of osteoarthritis through NF- κ B signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(13): 5567-5574.
 - [26] WITKOWSKI M, WITKOWSKI M, SAFFARZADEH M, et al. Vascular miR-181b controls tissue factor-dependent thrombogenicity and inflammation in type 2 diabetes[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2020, 19(1): 20.
 - [27] LIU B, WU Y Q, WANG Y H, et al. NF- κ B p65 knock-down inhibits TF, PAI-1 and promotes activated protein C production in lipopolysaccharide-stimulated alveolar epithelial cells type II[J]. *Exp Lung Res*, 2018, 44(4/5): 241-251.
 - [28] 王慧莲, 李松伟, 孟庆良, 等. 基于 miR-155/NF- κ B 信号通路探讨宣痹方改善类风湿关节炎患者血液高凝状态的机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(2): 97-100.

(收稿日期:2021-03-30 修回日期:2022-02-18)

(上接第 689 页)

- [4] 段雨婷, 蒙凌华. 多靶点抗肿瘤天然产物研究进展[J]. *药学报*, 2021, 56(2): 403-413.
- [5] 魏欢, 杨建文, 颜小捷, 等. 核桃青皮的化学成分研究——酚类化合物[J]. *广西植物*, 2018, 38(4): 463-468.
- [6] 殷田田, 石伟峰, 闫福林. 核桃青皮化学成分及其抗肿瘤活性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(12): 2104-2109.
- [7] 高杨, 李盛涛, 郝文伟. 核桃青皮提取物调控 IL-6/STAT3 抑制胃癌细胞增殖和迁移的作用研究[J]. *河北医药*, 2020, 42(14): 2095-2099.
- [8] RACHAKHOM W, KHAUW-ON P, POMPIMON W, et al. Dihydrochalcone derivative induces breast cancer cell apoptosis via intrinsic, extrinsic, and ER stress pathways but abolishes *EGFR*/MAPK pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 7298539.
- [9] 遼安航, 陈瑾, 翟康欣, 等. 连翘归尾煎对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、迁移、凋亡和周期的影响[J]. *山西医科大学学报*, 2021, 52(5): 565-571.
- [10] 苏羽岫, 曾智锐, 荣冬芸, 等. 芥子碱硫酸盐对人皮肤鳞状细胞癌 SCL-1 细胞增殖、上皮间质转化、转移的影响及其机制研究[J]. *中国药房*, 2021, 32(8): 952-960.
- [11] 孙红亚, 袁爱娟, 李纪鹏. 胡桃醌对人卵巢癌 SKOV3 和 IOSE80 细胞增殖和侵袭的抑制作用及其机制研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2019, 24(1): 32-37.
- [12] 曹志友, 王树鹏, 杨淑艳, 等. 核桃青皮提取物通过 cyclinD1 和 TNF- α 调控肺癌细胞的生长[J]. *中国农村卫生事业管理*, 2017, 37(7): 873-874.
- [13] LU H Y, GUO Y, GUPTA G, et al. Mitogen-activated protein kinase (MAPK): new insights in breast cancer[J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2019, 38(1): 51-59.
- [14] YUE J C, LÓPEZ J M. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2346.
- [15] WEN S Y, HOU Y X, FU L X, et al. Cancer-associated fibroblast (CAF)-derived IL32 promotes breast cancer cell invasion and metastasis via integrin β 3-p38 MAPK signalling[J]. *Cancer Lett*, 2019, 442: 320-332.
- [16] OHMORI T, YAMAOKA T, ANDO K, et al. Molecular and clinical features of *EGFR*-TKI-Associated lung injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 792.
- [17] LIAO W S, HO Y, LIN Y W, et al. Targeting *EGFR* of triple-negative breast cancer enhances the therapeutic efficacy of paclitaxel and cetuximab-conjugated nanodiamond nanocomposite[J]. *Acta Biomater*, 2019, 86: 395-405.
- [18] LIU K, MA R. MicroRNA-615-5p regulates the proliferation and apoptosis of breast cancer cells by targeting HSF1[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(3): 192.

(收稿日期:2022-02-09 修回日期:2022-03-14)