

国产雷帕霉素对人淋巴瘤细胞 Raji 增殖的影响

王 煜¹, 王志彬¹, 高玉环²

Effect of Rapamycin in Proliferation of Human Burkitt Lymphoma Cells

Wang Wei¹, Wang Zhibin¹, Gao Yuhuan²

1. Department of Hematology, The First Central Hospital of Baoding, Baoding 071000, China; 2. Department of Hematology, The Fourth Hospital of Hebei Medical University

Abstract: **Objective** To investigate rapamycin effects on growth inhibition and mTOR/p70S6K signaling pathway of human Burkitt lymphoma cell line Raji cells. **Methods** Proliferations of Raji cells under different concentrations (0, 1, 5, 10, 20, 40, 50 and 100 nmol/L) and different times (24, 48 and 72 h) were investigated by MTT assay. Apoptosis and cell cycle were analyzed via flowcytometry. The morphological alterations were confirmed by the optical microscope. The expressions of mTOR, p70S6K, p-p70S6K proteins were examined by Western blot technique in the rapamycin-treated and untreated Raji cells. **Results** Rapamycin inhibited the proliferation of Raji cells at concentrations more than 5 nmol/L ($P < 0.05$), in a dose and time dependent manner. After treatment with rapamycin, the number of cells at S phase and G₂/M phase was decreased gradually ($P < 0.05$), but significantly increased at G₀/G₁ phase in dose and time dependent manners ($P < 0.05$). However, evident apoptosis did not observed in Raji cells. The expression of mTOR, p-p70S6K proteins was decreased gradually while the expression of p70S6K protein was increased in a concentration - dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion** mTOR/p70S6K signaling pathway was constitutively activated in Raji cells and Rapamycin inhibited Raji cell proliferation by arrest at G₀/G₁ phase and inhibition of mTOR/p70S6K signaling pathway.

Key words: Rapamycin; Raji cell; Proliferation; mTOR; p-p70S6K

摘要: 目的 探讨国产雷帕霉素(宜欣可)对人淋巴瘤细胞株 Raji 细胞体外生长及对 mTOR/p70S6K 信号通路的影响。方法 MTT 法检测不同浓度(0、1、5、10、20、40、50、100 nmol/L)国产雷帕霉素作用不同时间(24、48、72 h)对 Raji 细胞增殖的影响。光学显微镜观察 Raji 细胞形态学变化。流式细胞仪测定国产雷帕霉素对 Raji 细胞周期分布和凋亡的影响。Western blot 方法检测国产雷帕霉素处理前后对 Raji 细胞 mTOR、p70S6K、p-p70S6K 蛋白的影响。结果 国产雷帕霉素对 Raji 细胞增殖有明显的抑制作用(不同浓度 $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)，呈现明显的剂量-效应和时间-效应依赖关系。国产雷帕霉素明显抑制 Raji 细胞周期发展($P < 0.05$)，但没有发生明显的凋亡($P > 0.05$)。0、10、50、100 nmol/L 国产雷帕霉素作用于 Raji 细胞的 mTOR、p-p70S6K，其蛋白量随药物浓度增大而降低($P < 0.05$)，p70S6K 随药物浓度增大而升高($P < 0.05$)。结论 人淋巴瘤细胞株 Raji 中存在 mTOR/p70S6K 信号通路激活状态，宜欣可可抑制该通路激活并通过阻滞细胞周期发展抑制 Raji 细胞增殖。

关键词: 国产雷帕霉素; Raji 细胞; 细胞增殖; mTOR; p-p70S6K

中图分类号: R733.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2012)02-0157-04

0 引言

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)在细胞生长调控中起重要作用, 是细胞生长的中心调控因子。mTOR 信号通路在细胞的生存、生长与增殖中起中心调控的作用, 它所介导的信号转导通路的异常与多种恶

性肿瘤发生发展相关, 已成为肿瘤治疗的新靶点^[1]。mTOR 的特异性抑制剂雷帕霉素(rapamycin, rapa)是大环内酯类抗生素, 对前列腺癌、乳腺癌及胰腺癌等多种恶性肿瘤均有疗效^[2]。Burkitt 淋巴瘤(Burkitt lymphoma, BL)是一种与 EB 病毒(Epstein Barr virus, EBV)感染相关的侵袭性淋巴瘤。本研究通过观察人淋巴瘤 Raji 细胞株中 mTOR 信号通路的存在情况及雷帕霉素对该通路的影响, 来探讨淋巴瘤发生的分子机制, 旨在为国产雷帕霉素治疗淋巴瘤的可行性奠定基础。

收稿日期: 2011-08-01; 修回日期: 2011-10-19

作者单位: 1. 071000 河北保定, 保定市第一中心医院血液科; 2. 河北医科大学第四医院暨河北省肿瘤医院血液科

作者简介: 王煜(1975-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事血液病研究

1 材料与方法

1.1 细胞株及培养

人淋巴瘤细胞株 Raji 细胞由河北省医科大学第四医院科研中心提供。将细胞于含 10% 的胎牛血清(FBS)、100 u/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 37°C、饱和湿度和 5% CO₂ 条件下培养。

1.2 实验药物和主要试剂

国产雷帕霉素(宜欣可)由华北制药集团新药研究开发有限责任公司惠赠(批号 060801)。胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, RPMI1640 培养液: 美国 GIBCO 公司。HRP 羊抗鼠 IgG、HRP 兔抗鼠 IgG、四甲基偶氮唑盐(MTT)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、二硫苏糖醇、过硫酸铵、十二烷基磺酸钠、四甲基乙二胺均使用 Sigma 公司产品。mTOR、p70S6K、p-p70S6K 抗体购自 Santa Cruz 公司。RIPA 细胞裂解液购自北京 Solarbio 生物技术公司。PVDF 膜购自 Millipore 公司。化学增强发光试剂盒(Western blot Chemiluminescence Reagent Kit)使用 Santa Cruz 公司产品。

1.3 MTT 法分析细胞增殖

取处于对数生长期的 Raji 细胞, 加入 96 孔板, 每孔 200 μl , 加入不同浓度的国产雷帕霉素(终浓度分别为 1、5、10、20、40、50、100 nmol/L), 同时设对照组。分别于 37°C 培养 24、48、72 h, 在实验结束前, 于每孔加入 20 μl 5 mg/ml 的 MTT, 培养 4 h, 1 000 r/min 离心, 5 min 去上清液后每孔加入 150 μl DMSO, 振荡溶解, 用酶联免疫检测仪测定每孔吸光度, 测定波长 570 nm, 参考波长 620 nm。抑制率(%) = (1 - 实验组吸光度值/对照组吸光度值) × 100%。以细胞抑制率对剂量的对数作图, 通过线性回归拟合法可求出国产雷帕霉素对 Raji 细胞的 IC₅₀ 值。

1.4 流式细胞术分析细胞周期和细胞凋亡

收集经不同浓度国产雷帕霉素、处理不同时间的 Raji 细胞, 70% 冰乙醇 4°C 固定 12 h, PBS 洗涤、离心, 加入碘化丙啶(PI)染液, 4°C 避光染色 30 min。流式细胞仪(Coulter EPICS-XL II 型)测定细胞周期和细胞凋亡。用 Muticycle AV 分析软件对 DNA 细胞周期进行拟合分析。计算出 G₀/G₁、S、G₂/M 各期细胞的分布百分比, 以 S 期细胞百分比来表示细胞群体的增殖状态和 DNA 合成速度。

1.5 Western blot 分析 Raji 细胞 mTOR、p70S6K、p-p70S6K 表达

将处于对数生长期的 Raji 细胞置于培养瓶中, 分别加入含国产雷帕霉素(浓度分别为 0、10、50、100 nmol/L)的培养液进行培养, 于 24 h 时终止培养, 提取细胞总蛋白, Bradford 法蛋白定量, 行 SDS-

PAGE 电泳分离, 电转移法将蛋白质转入 PVDF 膜, PBS 洗膜后, 室温下 5% 脱脂奶粉溶液封闭 4~6 h。加入一抗, 4°C 反应过夜, TBST 洗膜, 加入二抗, 室温反应 1 h, 采用化学发光试剂检测。配置新鲜发光液均匀涂布于 PVDF 膜上, 室温下孵育 1 min, 将 PVDF 膜与 X 线片一同放入暗盒内曝光 5~15 min 后, X 线片显影后清水漂洗定影。

1.6 统计学方法

所有数据采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析, 结果以均数±标准差表示, 各组细胞周期分布和抑制率比较采用单因素方差分析。α=0.05 为检验水准。

2 结果

2.1 国产雷帕霉素对 Raji 细胞生长的影响

MTT 结果显示 5 nmol/L 以上浓度的国产雷帕霉素能明显抑制 Raji 细胞增殖($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 且随着药物浓度的增加及作用时间延长抑制作用逐渐增强。国产雷帕霉素作用 24、48、72 h 对 Raji 细胞的 IC₅₀ 值分别为 (440.2 ± 3.7) nmol/L、(218.1 ± 1.2) nmol/L、(24.5 ± 1.4) nmol/L, 见图 1。

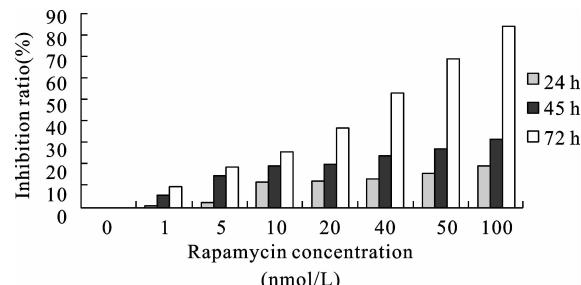


图 1 MTT 法检测国产雷帕霉素对 Raji 细胞的抑制作用

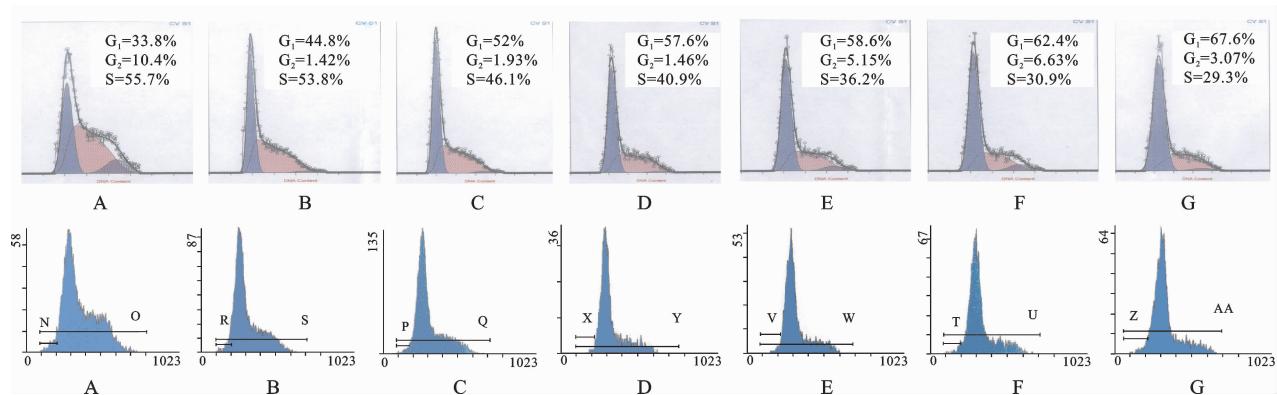
Figure 1 Inhibition ratio of rapamycin-treated

Raji cells identified by MTT assay

正常对数生长期的 Raji 细胞呈圆形, 外观饱满, 折光性好, 成团悬浮生长。国产雷帕霉素作用后细胞体积较前缩小, 折光性和立体感减弱, 胞内出现细微黑色颗粒, 成团现象不明显或单个细胞悬浮存在。

2.2 国产雷帕霉素可诱导 Raji 细胞周期停滞, 但不诱导细胞凋亡

国产雷帕霉素作用于 Raji 细胞 48 h 后, 可明显抑制细胞周期发展($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 随着药物浓度逐渐增加, S 期细胞比例从 55.7% 逐渐降至 29.3%, 同时 G₀/G₁ 期细胞比例从 33.8% 逐渐增加至 67.6%。提示细胞进入增殖期的减少, DNA 合成速度减慢, 细胞被阻滞于 G₀/G₁ 期。然而, 无论是延长药物作用时间还是增大药物浓度, 均未见到亚二倍体峰, 与对照组相比亦无明显差别, 故提示国产雷帕霉素不能诱导 Raji 细胞的凋亡, 见图 2。



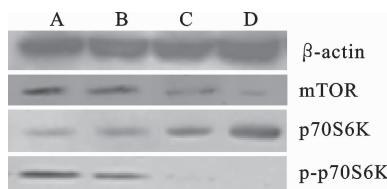
A: control group; B: 5 nmol/L; C: 10 nmol/L; D: 20 nmol/L; E: 40 nmol/L; F: 50 nmol/L; G: 100 nmol/L

图 2 国产雷帕霉素作用于 Raji 细胞 48 小时后对细胞周期(上组)和凋亡(下组)的影响

Figure 2 Suppressive effects of rapamycin on cell cycle(up panel) and apoptosis(below panel) of Raji cells treated under different concentrations for 48 h

2.3 国产雷帕霉素对 Raji 细胞 mTOR、p70S6K、p-p70S6K 蛋白的影响

国产雷帕霉素作用于 Raji 细胞 24 h 后, 随药物浓度的增大 mTOR 和 p-p70S6K 的蛋白表达量逐渐减少; p70S6K 蛋白表达量逐渐增多($P < 0.05$), 见图 3。



A: 0 nmol/L; B: 10 nmol/L; C: 50 nmol/L; D: 100 nmol/L

图 3 国产雷帕霉素处理 Raji 细胞后对 mTOR、p70S6K 和 p-p70S6K 蛋白表达的影响

Figure 3 Effects of rapamycin on expression of mTOR, p70S6K, p-p70S6K proteins in Raji cells detected by Western blot

3 讨论

PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路在许多肿瘤中显示高度活化, 所以, 该信号途径目前已经被认为是某些癌症治疗的靶标^[3]。围绕这一信号通路所做的大量研究表明在多种肿瘤中 mTOR 均处于激活状态, 并且它可将这种激活信号通过磷酸化其下游的重要效应蛋白 p70S6K 进行传递。雷帕霉素是 mTOR 的特异性抑制剂, 通过与 mTOR 分子结合抑制其功能。其可能的机制包括: 诱导肿瘤细胞凋亡或自噬性细胞死亡; 诱导细胞周期阻滞; 抑制肿瘤侵袭和肿瘤血管生成等^[4]。在肿瘤细胞中, 雷帕霉素阻断 mTOR 是通过抑制 p70S6K 效应而抑制细胞增殖^[5]。故雷帕霉素已被认为是新一类细胞生长抑制的抗癌药物。

本研究结果显示不同浓度国产雷帕霉素作用于

Raji 细胞后其活力降低, 并出现明显的 G₀/G₁ 期停滞, 抑制了细胞的增殖, 但并没有引起明显的细胞凋亡。在某些血液肿瘤细胞株的研究中也发现了类似的情况^[6], 但更多的关于肿瘤细胞的研究显示雷帕霉素不但能抑制其生长而且可诱导细胞凋亡^[7-9]。mTOR 信号途径的激活, 控制编码细胞周期进展蛋白的 RNA 翻译, 所以上述情况可能是由于在包括我们所研究的细胞株在内的某些细胞株中, 雷帕霉素与 mTOR 分子结合后影响了细胞周期蛋白翻译而造成了细胞周期的停滞。但也有人认为这可能激活了细胞的自噬作用^[10]。我们将在未来的研究中进行自噬经典相关蛋白 Beclin1 的检测以探寻确切机制。

p70S6K 是 mTOR 下游的效应蛋白之一。被 mTOR 磷酸化激活后的 p70S6K1(p-p70S6K1)使核糖体 40 S 小亚基 S6 蛋白磷酸化后参与活跃的核糖体翻译, 对含 5' TOP (5' terminal oligopyrimidine tract)mRNA 的翻译起始起上调作用。5' TOP mRNA 占细胞总 mRNA 的 20%, 它的主要翻译产物包括许多翻译元件成分如核糖体蛋白、延伸因子 EF1、EF2 和 poly(A)结合蛋白等^[11]。所以 p70S6K 的活化状态 P-p70S6K 能代表 mTOR 信号通路的活化。在本研究中 Western blot 结果显示, 国产雷帕霉素能够降低 mTOR 和 p-p70S6K 的表达, 并且使 p70S6K 表达升高, 从而通过抑制翻译过程影响相关蛋白质的合成, 最终抑制肿瘤细胞的生长。这就说明 mTOR 途径在 Raji 细胞株中呈现活化状态, 而且国产雷帕霉素可以抑制这种信号的传导。

综上所述, 雷帕霉素可直接抑制 Raji 细胞的生长, 有时间-剂量依赖性。雷帕霉素对 mTOR 信号途径下游的 p70S6K 的磷酸化有抑制作用。

参考文献:

- [1] Jiang BH, Liu LZ. Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment[J]. Drug Resist Updat, 2008, 11(3): 63-76.
- [2] Murakami D, Tsujitani S, Osaki T, et al. Expression of phosphorylated Akt(pAkt) in gastric carcinoma predicts prognosis and efficacy of chemotherapy[J]. Gastric Cancer, 2007, 10(1): 45-51.
- [3] Baldo P, Cecco S, Giacomini E, et al. mTOR pathway and mTOR inhibitors as agents for cancer therapy[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8(8): 647-665.
- [4] Kapoor A, Figlin RA. Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin for the treatment of advanced renal cell carcinoma[J]. Cancer, 2009, 115(16): 3618-3630.
- [5] Boffa DJ, Luan F, Thomas D, et al. Rapamycin Inhibits the Growth and Metastatic Progression of Non-Small Cell Lung Cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(1 Pt 1): 293-300.
- [6] Guo X, Zhou CY, Gao J, et al. Rapamycin reverses glucocorticoid resistance in human T-cell acute lymphoblastic leukemia CEM-C1 cells[J]. J Clin Pediatr, 2010, 28(s): 414-418. [郭霞, 周晨燕, 高举, 等. 雷帕霉素逆转急性淋巴细胞白血病 CEM-C1 细胞对糖皮质激素耐药的研究[J]. 临床儿科杂志, 2010, 28(5): 414-418.]
- [7] Hipp S, Ringshausen I, Oelsner M, et al. Inhibition of the mammalian target of rapamycin and the induction of cell cycle arrest in mantle cell lymphoma cells[J]. Haematologica, 2005, 90(10): 1433-1434.
- [8] Wang QY, Hou GQ, Wang LL. Effects of rapamycin inhibiting mTOR signaling path may on growth and apoptosis of esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. J Zhengzhou Univ (Medsci), 2010, 45(3): 356-359. [王琼叶, 侯桂琴, 王莉莉. 雷帕霉素抑制 mTOR 信号通路对 EC9706 细胞生长及凋亡的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2010, 45(3): 356-359.]
- [9] Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, et al. Blockade of mTOR signaling potentiates the ability of histone deacetylase inhibitor to induce growth arrest and differentiation of acute myelogenous leukemia cells[J]. Leukemia, 2008, 22(12): 2159 - 2168.
- [10] Zeng XH, Kinsella TJ. Mammalian target of rapamycin and S6 kinase 1 positively regulate 6-thioguanine-induced autophagy [J]. Cancer Res, 2008, 68(7): 2384-2390.
- [11] Wang XM, Proud CG. The mTOR pathway in the control of protein synthesis[J]. Physiology, 2006, 21(4): 362 - 369.

[编辑:周永红;校对:刘红武]

• 简讯 •

《肿瘤防治研究》杂志征订征稿启事

《肿瘤防治研究》杂志创刊于1973年,是我国第一本独立的全国性肿瘤专业高级学术刊物。中华人民共和国卫生部主管,中国抗癌协会、湖北省肿瘤医院主办。杂志是中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库来源期刊(CSCD)、湖北省优秀医学期刊、中国抗癌协会系列刊物。被美国 CA、CSA、Ulrich PD、波兰 IC、英国 CABI、Global Health、日本 JST 及国内所有大型数据库收录。

主要栏目有:专题论坛、基础研究、临床研究、临床诊断、临床应用、流行病学、研究简报、技术交流、论著摘要、综述、短篇个案、简讯等。它是我国肿瘤防治研究领域的一面镜子和窗口。

希望广大朋友们一如既往地给予本刊以热忱的关注:将优秀稿件投往《肿瘤防治研究》以支持我国学术期刊的发展;订阅《肿瘤防治研究》以关注我国肿瘤防治研究事业取得的进步。同时,编辑部将进一步加强自身的建设,努力提升自己的办刊能力,紧紧围绕内容为王、快速反应的要旨,竭尽全力打造精品期刊,以回报朋友们的支持与厚爱。

邮发代号:38-70; 国外代号:MO6482; 订价:15.00 元/册; 出版周期:月刊

中国标准连续出版物号:ISSN 1000-8578 CN 42-1241/R

投稿网站:<http://www.zlfzyj.com> E-mail:zlfzyj@263.net.cn

电话/传真:0086-27-87670126

通信地址:武汉市武昌卓刀泉南路 116 号《肿瘤防治研究》编辑部 邮政编码:430079