

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110407. 1323. 005

mTOR 信号通路在 ishikawa 细胞增殖中的作用

邓守恒, 石建国, 柯贤柱, 陈萍, 李芳, 石小燕*
(湖北医药学院附属人民医院, 湖北 十堰 442000)

[摘要] 目的:观察经抑制剂作用后人子宫内膜癌细胞株 ishikawa 细胞生长和 mTOR 信号通路的变化,了解子宫内膜癌的发病机制。方法:MTT 法和细胞克隆形成法检测抑制剂对细胞增殖的影响;RT-PCR 和 Western blot 法从 mRNA 和蛋白质水平分别检测 mTOR mRNA 和下游磷酸化靶蛋白 S6K1 和 STAT3 表达。结果:雷帕霉素(rapamycin, RA)与酪氨酸磷酸化抑制剂(RG-14260, RG)可抑制 ishikawa 细胞增殖、降低其存活率,二者联合呈协同效应($P < 0.01$);ishikawa 细胞中存在 mTOR mRNA 和下游磷酸化靶蛋白 S6K1 和 STAT3 高表达,经 RA 单独或联合 RG 作用后,各指标均下降,且二者合用效果更明显($P < 0.01$)。结论:mTOR 信号通路参与了子宫内膜癌的形成和发展。

[关键词] 子宫内膜癌;酪氨酸磷酸化抑制剂(RG-14260);霉帕霉素;信号通路

[中图分类号] R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0223-04

Effect of mTOR Signal Transduction Pathway on Proliferation of Human Endometrial Carcinoma Cells Ishikawa *in vitro*

DENG Shou-heng, SHI Jian-guo, KE Xian-zhu, CHEN Ping, LI Fang, SHI Xiao-yan*
(Renming Hospital, Hubei Medical University, Shiyan 442000, China)

[收稿日期] 20110115(001)

[基金项目] 湖北省教育厅基金项目(Q20092401);湖北医药学院基金项目(2008CXZ02)

[第一作者] 邓守恒,博士,副教授,从事肿瘤药理研究, Tel:0719-8637939, E-mail:dshblue@163.com

[通讯作者] *石小燕,博士,副教授,从事妇科肿瘤研究, Tel:0719-8637939, E-mail:yichenping@163.com

[网络出版时间] 2011-04-07 13:23

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110407.1323.005.html>

神经元修复与再生。

雪旺氏细胞在神经损伤修复中起着重要作用,而黄芪富含微量元素硒,它能提高血浆环磷腺苷浓度^[7],对雪旺氏细胞的生长具有促增殖作用^[8],与当归、赤芍、川芎、桃仁、红花、地龙等活血通络药组成补阳还五汤,能促进周围神经轴突的再生、神经髓鞘的形成及结构完整,对周围神经损伤起治疗作用^[9-10]。

[参考文献]

- [1] Yone K, Saknn T, Kawauci Y, et al. Indication of fusion for lumbar spinal stenosis in elderly patients and its significance [J]. Spine, 1996, 21: 242.
- [2] 井上骏一. 腰痛疾患治疗成绩制定标准[J]. 日整会志, 1994, 58: 925.
- [3] 沈权, 侯筱魁, 叶澄宇. 黄芪预防术后硬膜外粘连的实

验研究[J]. 中国骨伤, 2001, 14(3): 152.

- [4] 单俊杰, 王顺春, 刘涤, 等. 黄芪多糖的化学和药理研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2000, 14(3): 61.
- [5] 马清钧, 王淑玲. 常用中药现代研究与临床[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1995: 556.
- [6] 朱谨波. 黄芪治疗慢性皮肤溃疡对血管生成过程的机理探讨[J]. 河北中医, 1996, 18(4): 21.
- [7] 高飞, 王明喜, 李新沁. 足印测定法评价补阳还五汤对周围神经再生的作用[J]. 中医正骨, 1997, 9(2): 20.
- [8] 李义凯, 石关桐, 石印玉. 黄芪、丹参对体外培养雪旺氏细胞影响的实验研究[J]. 中国中医骨伤科, 1994, 2(6): 1.
- [9] 王相利. "补阳还五汤"对周围神经再生影响的实验研究[J]. 山东医科大学学报, 1999, 37(1): 41.
- [10] 胡奇芬. 补阳还五注射剂药效机理研究[J]. 老年学杂志, 1990(2): 87.

[责任编辑] 邹晓翠]

[**Abstract**] **Objective:** To observe the change of the growth and mTOR signal transduction pathway after treatment with inhibitor in human endometrial carcinoma cell ishikawa *in vitro*. To provide an experimental foundation of the research on the pathogenesis of human endometrial carcinomas. **Method:** MTT and Clone formation test were used to determine the proliferative effects of two inhibitors on tumor cells. The mRNA levels of mTOR, the downstream phosphorylated substrate S6K1 and STAT3 protein were assayed by RT-PCR and Western blot, respectively. **Result:** Rapamycin alone or combined with RG-14260 could inhibit cell proliferation and lower survival rate of ishikawa cells. The effect of rapamycin combined with RG-14260 was better than that of RG-14260 and rapamycin alone. There were high expression of mTOR mRNA and downstream phosphorylated substrate S6K1 and STAT3 protein in ishikawa cells. But these index above were decreased after treatment with inhibitor. The effect of Rapamycin combined with RG-14260 was more obvious than that of Rapamycin alone. **Conclusion:** mTOR signal transduction pathway play an important role in the formation and progress of endometrial carcinoma cells.

[**Key words**] *Endometrial carcinoma*; RG-14260; rapamycin; signal pathway

子宫内膜癌是常见的女性生殖道恶性肿瘤,其发病率呈逐年上升,但发病机制仍然不太清楚。mTOR(mammalian target of rapamycin)是雷帕霉素在哺乳动物细胞内的靶蛋白,也是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[1],可通过激活 PI3K/Akt 磷酸化来影响细胞周期,调节细胞的增殖凋亡等^[2],mTOR 信号通路在胰腺癌、肺癌、乳腺癌等肿瘤中存在高表达和活化^[3-4],但在子宫内膜癌中的表达状况却鲜有报道。本研究拟以人子宫内膜癌细胞株 ishikawa 的 mTOR 信号通路为靶点,采用特异性阻断剂干扰相关信号通路以观察细胞增殖能力的变化,从分子水平上去研究 mTOR 信号通路的改变以明确 mTOR 通路在子宫内膜癌形成和发展中的作用,为以 mTOR 通路为靶点的子宫内膜癌治疗提供重要的理论依据。

1 材料

表皮生长因子(EGF,批号 0309-012)、噻唑啉(MTT,批号 9004-67-5)、甲基纤维素(CPS4000,批号 9004-67-5)为 Sigma 产品;表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂 RG-14620(RG,批号 61253-2005)、mTOR 抑制剂雷帕霉素(RA,批号 YS-1992R)购自美国 Biomol 公司,DMEM 培养基(批号 p0594-F12 购自美国 GIBCO 公司),兔抗人磷酸化 S6K1(p-S6K1,批号 10126-MM10)、磷酸化 STAT3(p-STAT3,批号 M59506-6-PU)及 β -actin 单抗(批号 E021010)及山羊抗兔的二抗(批号 E032220)购于北京中杉金桥生物技术有限公司,Trizol 总 RNA 抽提试剂盒(批号 102001)、RevertAid™ First strand cDNA synthesis kit(批号 K1621)为 Fermentas 产品,Mod 550 型全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),BMP 型

倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),AMPLITRON II 型 PCR 扩增仪(美国 Barnscreed/Thermolyne 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及分组 子宫内膜癌细胞株 ishikawa 由本院临床医学研究所提供,培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基内,于 37 °C、饱和湿度,5% CO₂ 条件下培养,细胞经 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EGF 预处理 2 h 后分别给予 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RG,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RA,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RG + 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RA,另设空白对照细胞(未给予任何信号通路抑制剂)。

2.2 细胞克隆法检测细胞增殖 参照文献[5]配制半固体培养基,收集经不同抑制剂处理 24 h 后的各组细胞,PBS 洗去药物,离心 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}\times 3$ min,用含 20% 小牛血清的培养液稀释为 7.0×10^3 个/mL 单细胞悬液,于 24 孔板预加 1.2% 甲基纤维素培养基 1.0 mL/孔,加入单细胞悬液 50 μL ,使每孔细胞数为 350 个,每个浓度设 4 个复孔,混匀后置 37 °C,5% CO₂ 培养箱中孵育 12 ~ 14 d 后于倒置显微镜下计数细胞克隆数,计算细胞存活率(给药组平均克隆数/未给药组平均克隆数 $\times 100\%$),实验重复 3 次。

2.3 MTT 法检测细胞增殖 经不同抑制剂处理 24 h 后的各组细胞以 1×10^4 个/mL 接种至 96 孔板,每孔 100 μL ,每组设 4 个复孔,培养 24 h 后每孔加入 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 10 μL ,作用 2 h 后弃去上清液,150 μL 二甲基亚砷作用 30 min,上全自动酶标液在 570 nm 波长下读取各孔吸光度(A),计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = (A_{\text{对照组}} - A_{\text{药物组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$$

2.4 Western blot 法检测蛋白表达量 收集经不同抑制剂处理 24 h 后的各组细胞, PBS 洗 2 次, 裂解, 离心, 收集上清, 即为细胞总蛋白, 进行蛋白定量, 调节每份样品蛋白浓度, 加等量蛋白于上样缓冲液, 煮沸, 在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳, 电泳后转膜, 依次加入 p-S6K1, p-STAT3 一抗和二抗, 加入底物液显色, 拍照。蛋白条带用 Quanti Scan 软件进行密度扫描分析。

2.5 RT-PCR 检测 mTOR mRNA 表达 用 Trizol 提取细胞总 RNA, cDNA 合成体系 20 μL , 小鼠白血病病毒 (moloney murine leukemia virus, M-MLV) 逆转录酶 200 U, 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, RNA 酶抑制剂 (RNase inhibitor, RNasin) 20 U, 4 种脱氧核苷酸混合物 (dNTP) 20 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 随机引物 100 ng, RNA 模板 1 μg , 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 灭活逆转录酶, 冰浴 1 min。PCR 反应引物为, mTOR 上游引物: 5'-CGCTGTCATCCCTTTATCG-3', 下游引物: 5'-ATGCTCAAACACCTCCACC-3', 扩增产物为 193 bp, 反应体系 25 μL , 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 49 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 34 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min 结束反应。 β -actin 上游引物: 5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GGC TGC G-3', 下游引物为 5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3', 扩增产物为 838 bp。取 10 μL 扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察并照相, 经凝胶图像分析仪分析, 根据 mTOR 与 β -actin 灰度比值, 进行目的基因表达的半定量分析。

2.6 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 13.0 统计软件进行 One Way ANOVA 方差分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 抑制剂对细胞增殖的抑制作用 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RG 和 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RA 作用 24 h 对 ishikawa 细胞增殖抑制率分别为 44.5% 和 40.7% ($P < 0.05$, $P < 0.05$), 二者合用, 则抑制率提高至 77.1% ($P < 0.01$), 合用产生抑制率大于两药单独使用。抑制剂单独或联合作用对 ishikawa 细胞克隆形成率也有明显的抑制作用, 细胞存活率显著下降 ($P < 0.05$), 尤其以二药联合作用效果最为明显 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 RA 与 RG 单独和合用对 ishikawa 细胞存活率和抑制率影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$) %

组别	存活率	抑制率
ishikawa	-	-
ishikawa + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RG	52.7 \pm 5.3 ¹⁾	44.5 \pm 3.2 ¹⁾
ishikawa + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RA	48.6 \pm 4.6 ¹⁾	40.7 \pm 4.8 ¹⁾
ishikawa + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RG + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RA	28.9 \pm 2.7 ²⁾	77.1 \pm 3.9 ²⁾

注: 与 ishikawa 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 抑制剂对 ishikawa 细胞 p-S6K1 及 p-STAT3 蛋白表达影响 Western blot 定量检测结果发现, ishikawa 细胞中存在着 p-S6K1 及 p-STAT3 蛋白的表达, 经 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RA 及 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RA 联合 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RG 作用 24 h 后, 细胞内两磷酸化蛋白表达量均有不同程度的下调, 尤其以二抑制剂合用效果更为明显。ishikawa 细胞内 p-S6K1 的灰度值为 0.867 \pm 0.032, 经 RA 及 RA 联合 RG 作用后, 灰度值则分别降至 0.654 \pm 0.029 ($P < 0.05$) 和 0.389 \pm 0.037 ($P < 0.01$)。p-STAT3 灰度值为 1.165 \pm 0.035, 经抑制剂作用后, 则分别降至 0.702 \pm 0.041 ($P < 0.05$) 和 0.297 \pm 0.0374 ($P < 0.01$), 见图 1。

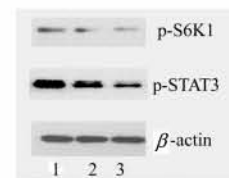


图 1 RA 与 RG 单独和合用对 ishikawa 细胞 p-S6K1 及 p-STAT3 蛋白表达影响

1 ~ 3. ishikawa, ishikawa + RA, ishikawa + RA + RG

3.3 抑制剂对 ishikawa 细胞 mTOR mRNA 表达的影响 RT-PCR 检测结果表明, ishikawa 细胞高表达 mTOR, 经 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RA 及 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RA 联合 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RG 作用 24 h 后, ishikawa 细胞 mTOR mRNA 表达量明显降低, 尤其以二药合用后效果更为明显。RA 单用, 表达量下降了 (45.4 \pm 2.3)%, 有统计学意义 ($P < 0.05$), 二者合用, 则下降了 (66.2 \pm 3.1)%, 有显著统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 2。

4 讨论

子宫内膜癌的发生、发展与一些信号通路的活

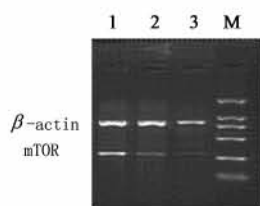


图 2 RA 与 RG 单独和合用对 ishikawa 细胞 mTOR mRNA 表达的影响

M. Marker; 1~3. ishikawa; ishikawa + RA; ishikawa + RA + RG

性改变密切相关, 以往的研究多集中在表皮生长因子受体(EGFR)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)2条信号通路^[6]。现已发现, 许多肿瘤中还存在着 mTOR 信号通路的过度激活^[7]。mTOR 通路不仅在正常的细胞增殖中起着主要作用, 还参与调控与肿瘤发生密切相关的多种生理过程, 如细胞生长增殖、细胞周期调控、细胞迁移等, 可以说 mTOR 是细胞生长的中心调控因子^[8], mTOR 通路正逐渐成为肿瘤靶向治疗的研究热点。

本研究中, 笔者采用 EGFR 酪氨酸磷酸化抑制剂 RG 及其下游 mTOR 通路抑制剂 RA 单独和联合作用于体外培养的子宫内膜癌细胞株 ishikawa, 采用 MTT 法和克隆形成法检测细胞增殖, 发现无论是单独还是合用二抑制剂均能对细胞增殖产生强烈的抑制作用, 尤其以合用效果更为显著。由于克隆形成法可反映出单个细胞的增殖潜力, 故此结果不仅说明二抑制剂对增殖期 ishikawa 细胞很敏感, 可产生强烈的抑制作用, 而且还提示其对肿瘤干细胞也有明显的生长抑制作用, 这比单纯抑制或杀死癌细胞本身具有更大的参考价值^[9]。为进一步明确 mTOR 通路在子宫内膜癌细胞增殖抑制中所起的作用, 笔者又进一步采用 RT-PCR 和免疫印迹法检测 mTOR 基因 mRNA 及其下游的磷酸化 S6K1 和 STAT3 底物蛋白表达量, 结果发现子宫内膜细胞中 mTOR 通路处于被激活状态, 表现为 mTOR 基因 mRNA 水平以及磷酸化 S6K1 和 STAT3 蛋白含量高, 而经二抑制剂单独和联合作用后, 以上指标都出现了下调, 且合用效果更显著, 说明了 mTOR 通路确实参与了子宫内膜癌的形成和发展。

已知人 10 号染色体上缺失的磷酸酶和张力蛋白类似物(PTEN)突变在子宫内膜癌发生中是一个早期事件^[10], 而 50% 以上 PTEN 突变肿瘤对 PI3K/AKT/mTOR 或相关 MAPK 抑制剂相当敏感^[11], I 型子宫内膜癌中存在着 PTEN 缺失, 而 II 型则无此改

变^[12], 故 mTOR 通路在子宫内膜癌中的作用尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Janus A, Robak T, Smolewski P. The mammalian target of the rapamycin (mTOR) kinase pathway: its role in tumorigenesis and targeted antitumour therapy[J]. Cell Mol Biol Lett, 2005, 10(2):479.
- [2] Xu G, Zhang W, Bertram P, et al. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN/AKT/ mTOR pathway in common human tumor[J]. Int J Oncol, 2004(4):901.
- [3] STEPHAN S, DATTA K, WANG E, et al. Effect of rapamycin alone and in combination with antiangiogenesis therapy in an orthotopic model of human pancreatic cancer [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(20):6993.
- [4] Rathmell W K, Wright T M, Rini B I. Molecularly targeted therapy in renal cell carcinoma[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2005, 5(6):1031.
- [5] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京:北京医科大学 中国协和医科大学联合出版社, 1996:284.
- [6] Ortega E, Marti R M, Yeramian A, et al. Targeted therapies in gynecologic cancers and melanoma [J]. Semin Diagn Pathol, 2008, 25(4):262.
- [7] Lto D, Fujimoto K, Mori T, et al. *In vivo* antitumor effect of the mTOR inhibitor CCI2779 and gemcitabine in xenograft models of human pancreatic cancer[J]. Int J Cancer, 2006, 118(12):2337.
- [8] Asano T, Yao Y, Zhu J, et al. The rapamycin analog CCL2779 is potent inhibitor of pancreatic cancer cell proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 331(15):295.
- [9] 潘启超, 胥彬. 肿瘤药理学及化学治疗学[M]. 广州:广东高等教育出版社, 1989:45.
- [10] Bakiewicz A, Gozdzik J, Sporny S. Pten gene expression in the endometrial mucosa [J]. Ginekol Pol, 2006, 77(4):323.
- [11] Steelman L S, Pohnert S C, Shelton J G, et al. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis [J]. Leukemia, 2004, 18(2):189.
- [12] Para J, Gallardo A, Catusus I, et al. Endometrial carcinoma: pathol and genetics [J]. Pathology, 2007, 39(5):72.

[责任编辑 邹晓翠]