

RAD001 对胃癌 MKN - 45 细胞生长影响的实验研究

蔡红星¹, 朱正秋², 朱祖安³

(1. 徐州医学院法医学教研室, 江苏 徐州 221004; 2. 徐州医学院附属医院肿瘤内科, 江苏 徐州 221002;
3. 徐州医学院附属医院消化内科)

摘要:目的 探讨 RAD001 对胃癌细胞株 MKN - 45 细胞生长的影响及可能作用机制。方法 体外培养 MKN - 45 细胞, 给予 RAD001 干预后通过细胞计数检测 MKN - 45 细胞数目, 流式细胞术检测细胞周期分布, Western - blot 检测核糖体 40S 小亚基 S6K 蛋白激酶 (p70S6K)、真核起始因子 4E (eIF - 4E) 结合蛋白 1 (4E - BP1)、S6 蛋白表达及磷酸化情况。结果 RAD001 作用于 MKN - 45 细胞 24 h; RAD001 对 MKN - 45 细胞的生长产生抑制作用, 抑制作用具有时间依赖性; MKN - 45 细胞细胞周期发生改变, 停滞在 G₀ - G₁ 期细胞比例增加; MKN - 45 细胞的 4E - BP1、p70S6K、S6 无明显变化, phosphate - p70S6K、phosphate - S6 表达缺失, phosphate 4E - BP1 表达下降。结论 RAD001 是通过抑制 mTOR 下游通路阻断 4E - BP1 及 p70S6K 的磷酸化和蛋白质翻译进而调节细胞周期以发挥抑制 MKN - 45 细胞生长的作用。

关键词:胃癌; MKN - 45 细胞; RAD001; 细胞生长; 抑制作用; 机制

中图分类号: R73 - 35⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000 - 2065 (2009) 10 - 0685 - 03

Experimental study of the effect of RAD001 on gastric carcinoma cell line MKN - 45

CAI Hongxing¹, ZHU Zhengqiu², ZHU Zu'an³

(1. Department of Forensic Medicine, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China;
2. Department of Medical Oncology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002;
3. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College)

Abstract: Objective To investigate the effect of RAD001 on gastric carcinoma cell line MKN - 45 and to explore the possible mechanism. **Methods** Gastric carcinoma MKN - 45 cell line were cultured in RPMI1640 with 10% fetal calf serum and treated by RAD001 (20 nmol/L); afterwards, the cell coulter, flow cytometry, western - blot array were used to detect the growth, cell cycle and protein expression of the tumor cells. **Results** Following RAD001 treatment, the MKN - 45 cells were inhibited in a time - dependence manner. There were changes in the cycle of the MKN - 45 cells, with an increase in the cell percentage of G₀ - G₁ phase stagnation. Meanwhile, there were no marked changes in the expressions of eukaryotic translation initiation factors eIF - 4E (eIF - 4E) and phosphate - 4E - BP1, ribosomal protein 40S kinase, and there was loss in the expression of phosphate - p70S6K and phosphate - S6, and the expression of phosphate 4E - BP1 was down - regulated. **Conclusion** RAD001 can inhibit the growth of gastric carcinoma cell line MKN - 45 by the adjustment of cell cycle via inhibition of the downstream pathway of mTOR and the consequent blockage of the phosphorylation and protein translation of p70S6K and 4E - BP1.

Key words: gastric carcinoma; MKN - 45 cell; RAD001; cell growth; inhibitory effect; mechanism

细胞生长和细胞增殖是相互不同但又相关的两个过程, 它们在器官的生长、组织的形成及肿瘤的生长中起着重要的作用。mTOR (mammalian target of rapamycin) 是雷帕霉素 (rapamycin) 的靶分子, 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在感受营养信号、调节细胞生长与增殖中起着关键性的作用^[1]。mTOR 信号通路调控异常与肿瘤发生密切相关, 是肿瘤治疗的靶点^[2-3]。RAD001 为雷帕霉素的衍生物, 为 mTOR 的抑制剂。本研究对 RAD001 对胃癌细胞株

MKN - 45 细胞生长的影响及其机制进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器 RAD001、胃癌细胞株 MKN - 45 细胞为奥地利大学 Volker Wachek 博士馈赠。RAD001 用二甲基亚砜 (DMSO) 配成 1 mmol/L 贮备液, 实验时用 RPMI 1640 稀释为 20 nmol/L。RPMI 1640、小牛血清购自美国 GIBCO 公司, 其他试剂均为分析纯。PI 染液、RNase 购自美国 BD Bioscience

公司, p70S6K (9202, rabbit)、phosphate - p70S6K (9204, rabbit)、4E - BP1 (9452, rabbit)、phosphate - 4E - BP1 (9451, rabbit)、S6 (2217, rabbit)、phosphate - S6 (4838, rabbit)、Actin (4968, rabbit) 购自美国 Cell Signaling 公司, 1 - block、CSPD、Assay buffer 购自美国 Tropix 公司, Marker 购自美国 Fermentas 公司, 型号 00012835。细胞计数仪为美国 Beckman 公司产品, 流式细胞仪为美国 BD 公司产品, 电泳仪为美国 Bio - Rad 公司产品。

1.2 细胞培养及分组 细胞培养, 生长分裂期细胞用于本实验研究。实验分为: ①阴性对照组, 干预药物为 RPMI 1640; DMSO 对照组, 干预药物为 DMSO; RAD 组, 干预药物为 RAD001 (20 nmol/L)。

1.3 指标检测

1.3.1 Western - blot 检测 取生长分裂期 MKN - 45 细胞, 胰酶消化后置于 6 孔板内, 每孔约 1×10^5 个细胞, 体积 5 ml, 24 h 细胞附壁后移去所有上清, 根据分组加入相应干预药物, 每孔最终体积 5 ml。于药物作用 24 h 后, 反复冻溶后加入蛋白裂解液, 收集细胞, 提取蛋白, 并行蛋白定量。取 15 μ g 蛋白上样进行 SDS - PAGE 凝胶电泳, 湿转至硝酸纤维膜上, 分别加入一抗 p70S6K (1:1000)、4E - BP1 (1:1000)、phosphate - p70S6K (1:1000)、S6 (1:1000)、phosphate - 4E - BP1 (1:1000)、phosphate - S6

(1:1000)、Actin (1:5000), 4 $^{\circ}$ C 摇床震荡过夜后洗涤并加入羊抗兔二抗 (1:5000), 室温孵育 30 min, Assay buffer 洗涤后, CSPD 系统检测后转入暗室, 将 X 线胶片压在膜上于不同时间曝光, 自动洗片机洗片成像。实验中选择 Actin 作为内参照。

1.3.2 细胞计数 取生长分裂期 MKN - 45 细胞, 胰酶消化后置于 24 孔板内, 每孔约 1×10^4 个细胞, 体积 1 ml, 24 h 细胞附壁后, 根据分组加入相应干预药物, 每孔最终体积 1.5 ml, 分别于用药后 24、48、72 h 用细胞计数仪进行细胞计数。实验重复 3 次。

1.3.3 细胞周期检测 取生长分裂期 MKN - 45 细胞, 胰酶消化后置于 6 孔板内, 每孔约 1×10^5 个细胞, 体积 5 ml, 24 h 细胞附壁后移去上清, 根据分组加入相应干预药物, 每孔最终体积 5 ml, 24 h 后收集细胞, 流式细胞仪检测细胞周期。实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 应用 Stata 10.0 进行数据处理, 细胞计数及细胞周期数据采用单因素方差分析及两两比较进行差异分析。检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 Western - blot 检测结果 RAD001 作用 MKN - 45 细胞 24 h, p70S6K、4E - BP1、S6 无明显变化, phosphate - p70S6K、phosphate - S6 表达缺失, phosphate 4E - BP1 表达下降。见图 1。

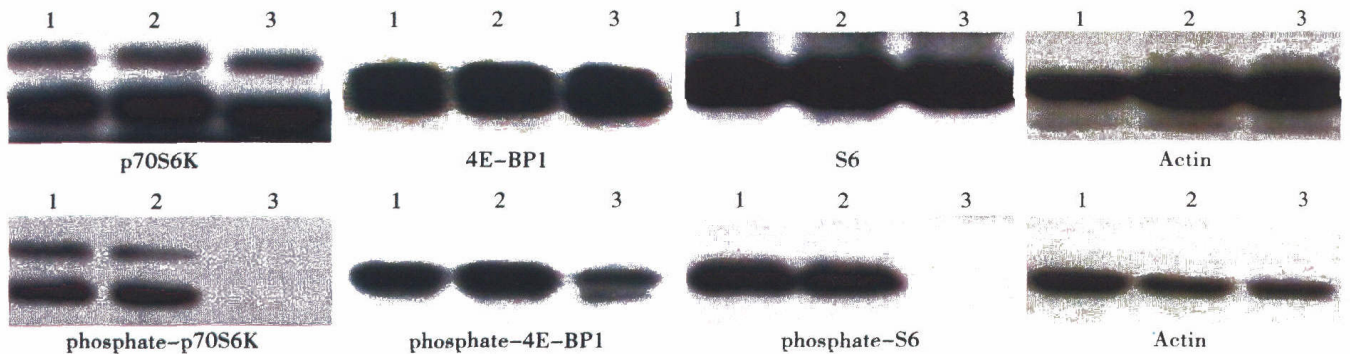


图 1 RAD001 作用 MKN - 45 细胞 24 h 后 Western - blot 检测蛋白结果
1. 阴性对照组; 2. DMSO 对照组; 3. RAD 组

2.2 细胞生长情况 RAD001 作用 24 h 即开始出现对 MKN - 45 细胞生长的抑制作用, 随着作用时间延长至 48、72 h, 抑制作用逐渐增强, 72 h 时 RAD 组抑制率为 40.11%, 与阴性对照组、DMSO 对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。阴性对照组与 DMSO 对照组之间无差异。见表 1。

2.3 细胞周期的改变 RAD001 作用 24 h, MKN - 45 细胞细胞周期发生改变, 停滞在 $G_0 - G_1$ 期细胞比例增加, RAD 组 $G_0 - G_1$ 期细胞比例与阴性对照

组、DMSO 对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 阴性对照组与 DMSO 对照组间无差异。见表 2。

表 1 各组不同时点 MKN - 45 细胞计数 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组 别	24 h	48 h	72 h
阴性对照组	449 \pm 137	1 587 \pm 489	4 283 \pm 929*
DMSO 对照组	468 \pm 110	1 666 \pm 374	4 119 \pm 977*
RAD 组	428 \pm 178	1 050 \pm 307	2 565 \pm 535

与 RAD 组比较: * $P < 0.05$

表2 各组 MKN-45 细胞细胞周期分布($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	G ₀ -G ₁ 期	G ₂ -M期	S期
阴性对照组	48.8 ± 2.0*	17.5 ± 2.7	33.7 ± 1.2
DMSO 对照组	48.2 ± 0.9*	18.0 ± 0.8	33.8 ± 0.9
RAD组	52.7 ± 0.9	14.1 ± 0.9	33.2 ± 1.4

与 RAD 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

mTOR 基因位于人常染色体 1p36.2 上 (Gene ID: 2475), 编码全长 2549 个氨基酸的 mTOR 蛋白 (相对分子质量 289×10^3), mTOR 被认为是磷脂酰肌醇 3-激酶相关激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase, PIKK) 蛋白质家族成员。在 mTOR 激酶中存在 FAT、FRB、FATC 结构域, FATC/FAT 以相互结合的形式在分子内协同作用调节 mTOR 激酶活性。FRB 是 FKBP-rapamycin 复合物结合区, 在雷帕霉素特异性抑制 mTOR 的过程中起着连接作用^[1,4], 雷帕霉素与其细胞内的受体 FKBP12 (FK506 结合蛋白) 结合, 形成 FKBP-rapamycin 复合物, 再与 mTOR 的 FRB 相结合, 从而抑制 mTOR 激酶活性^[5]。雷帕霉素是早期研究出的 mTOR 特异抑制剂, RAD001 为雷帕霉素类似物, 同样可以与 mTOR 的 FKBP12 蛋白结合位点结合形成复合物后发挥抑制作用。本实验体外给予药物后发现 RAD001 可抑制 MKN-45 细胞生长, 抑制作用具有时间依赖性。

至于其作用机制, 激活后的 mTOR 通过调节 2 条不同的下游通路 (4E-BP1, p70S6K) 来促进细胞周期转换, 促进细胞增殖。在酵母中, 雷帕霉素处理或 TOR1、TOR2 基因的失活都可导致细胞停滞在 G₁ 期, 因为 TOR 失活引起部分细胞周期蛋白合成的不足从而改变细胞周期分布, 抑制细胞增殖^[5]。4E-BP1 和 p70S6K 是最广泛研究的 mTOR 的底物, 它们是蛋白翻译的关键因子。4E-BP1 是一个低分子蛋白质, 通过和 eIF-4E 的 mRNA 帽结合亚单位的结合抑制翻译起始。4E-BP1 和 eIF-4E 的结合依赖于 4E-BP1 的磷酸化状态, 在一般状态下主要是去磷酸化的状态。当有生长因子激活时, 4E-BP1 被 mTOR 磷酸化, 降低了和 eIF-4E 的结合亲和力, 使 eIF-4E 能与 eIF-4G/-4B/-4A 结合形成多亚单位的 eIF-4F 复合物, 从而导致蛋白质翻译的起始^[6]。p70S6K 是核糖体 40S 小亚基 S6K 蛋白激酶, mTOR 可使 p70S6K 的第 412 位苏氨酸残基磷

酸化, p70S6K 又使核糖体 40S 小亚基 S6 蛋白磷酸化, 从而使 40S 小亚基参与活跃的多糖核糖体翻译, 对含 5' 末端寡聚嘧啶的 mRNA 的翻译起始起上调作用^[7]。

本实验结果显示 RAD001 作用 MKN-45 细胞 24 h 后, p70S6K、4E-BP1、S6 无明显变化, phosphate-p70S6K、phosphate-S6 表达缺失, phosphate 4E-BP1 表达下降; 流式细胞仪检测细胞周期结果显示 RAD001 作用后 MKN-45 细胞细胞周期发生改变, 停滞在 G₀-G₁ 期细胞比例增加。因而提示 RAD001 通过抑制 mTOR 所调节的下游 4E-BP1、p70S6K-S6 通路, 使 MKN-45 细胞停滞在 G₀-G₁ 期比例增加, 从而阻滞肿瘤细胞从 G₁ 期向 S 期的进程, 发挥其抑制 MKN-45 细胞生长的作用。

在胃癌细胞的分裂与生长过程中, mTOR 途径也扮演着重要角色。mTOR 过度活化后加可快细胞周期的调控, 影响肿瘤的进展及对化疗药物的敏感性。而这个过程却可以被 mTOR 特异性抑制剂所抑制。因而, 结合本实验结果, 我们认为, 进一步研究 mTOR 通路可为使用 RAD001 治疗胃癌提供更多的理论依据, 对于 mTOR 特异性抑制剂 RAD001 在胃癌中的研究将具有广阔的前景。

参考文献:

- [1] Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression[J]. *Oncogene*, 2004, 23 (18): 3151-3171.
- [2] Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2003, 3(4): 371-377.
- [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] Asnaghi L, Bruno P, Priulla M, et al. mTOR: a protein kinase switching between life and death[J]. *Pharmacol Res*, 2004, 50 (6): 545-549.
- [5] Jacinto E, Hall MN. Tor signalling in bugs, brain and brawn[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(2): 117-126.
- [6] Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(7): 807-826.
- [7] Martin KA, Blenis J. Coordinate regulation of translation by the PI 3-kinase and mTOR pathways[J]. *Adv Cancer Res*, 2002, 86: 1-39.

收稿日期: 2009-06-21 修回日期: 2009-10-09

本文编辑: 孙立杰