

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.06.009

雷帕霉素抑制胆囊癌 GBC-SD 细胞的生长和转移

刘兆龙, 阎波*, 罗芸葆, 王永兵, 韩策然, 宋安, 俞士勇, 侯坤(上海市浦东新区人民医院 外科, 上海 201200)

[摘要] 目的: 研究雷帕霉素(rapamycin)对胆囊癌 GBC-SD 细胞生长和转移的影响, 探讨雷帕霉素治疗胆囊癌的临床应用前景。方法: 采用 MTT 法检测不同浓度(12.5、25、50 nmol/L)的雷帕霉素对胆囊癌细胞增殖的影响, 以流式细胞术检测不同浓度的雷帕霉素对细胞凋亡和细胞周期的变化, Transwell 小室检测雷帕霉素对细胞迁移能力的影响, 利用 Western blotting 检测胆囊癌细胞中雷帕霉素哺乳动物靶标(mammalian target of rapamycin, mTOR)及其磷酸化 p-mTOR 水平。结果: 雷帕霉素可显著抑制胆囊癌 GBC-SD 细胞中 mTOR 的磷酸化, 但对 mTOR 表达无影响。雷帕霉素显著抑制胆囊癌细胞的生长, 并呈剂量依赖性抑制($P < 0.01$)。雷帕霉素可引起胆囊癌细胞周期 G₁/S 阻滞和细胞凋亡; 可显著抑制胆囊癌细胞的转移($P < 0.01$)。结论: 雷帕霉素能显著抑制胆囊癌细胞生长及转移, 其机制可能与抑制 p-mTOR 通路、诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡有关。

[关键词] 雷帕霉素; 雷帕霉素哺乳动物靶标(mTOR); 胆囊肿瘤

[中图分类号] R735.8; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)06-0600-04

Rapamycin inhibits growth and metastasis of gallbladder cancer GBC-SD cells

LIU Zhao-long, YAN Bo*, LUO Yun-bao, WANG Yong-bing, HAN Ce-ran, SONG An, YU Shi-yong, HOU Kun(Department of General Surgery, People's Hospital of Pudong New Area of Shanghai, Shanghai 201200, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of rapamycin on cell growth and migration of gallbladder cancer GBC-SD cells, and to discuss its potential in clinical therapy of gallbladder cancer. **Methods:** Proliferation of GBC-SD cells treated with different concentrations of rapamycin (12.5, 25, and 50 nmol/L) was examined by MTT assay. Cell cycle distribution and apoptosis of GBC-SD cells treated with different concentrations of rapamycin were determined by flow cytometry. Migration ability of GBC-SD cells was assessed by Transwell assay. The expression of mTOR (mammalian target of rapamycin) and its phosphorylation in GBC-SD cells were examined by Western blotting assay. **Results:** Rapamycin significantly inhibited the phosphorylation of mTOR, but had no influence on the expression of mTOR in GBC-SD cells. Rapamycin significantly inhibited the growth of GBC-SD cells in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). Rapamycin induced apoptosis of GBC-SD cells and arrested them at the G₁/S phase. Furthermore, rapamycin also significantly suppressed migration of GBC-SD cells as showed by Transwell assay ($P < 0.01$). **Conclusion:** Rapamycin can remarkably inhibit the growth and migration of gallbladder cancer cells, probably by inhibition of p-mTOR pathway, induction of apoptosis and cell cycle arrest of gallbladder cancer cells.

[Key words] rapamycin; mammalian target of rapamycin(mTOR); gallbladder neoplasms

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(6): 600-603]

近年来,胆囊癌的发病率不断上升,其恶性程度较高,早期诊断困难,手术根治率低,化疗效果欠佳。细胞信号转导通路参与肿瘤的发生和发展,针对肿瘤细胞信号转导通路的分子靶向治疗成为一种很有前景的肿瘤治疗策略。雷帕霉素哺乳动物靶标(mammalian target of rapamycin, mTOR)相关的信号转导通路在细胞增殖、凋亡、转录、翻译、代谢等重要的细胞生物学过程起着重要作用,继而影响肿瘤的发生和发展^[1-2]。雷帕霉素哺乳动物靶标磷酸化酶

(简称 mTOR 磷酸化酶)是新近发现的一个重要靶点,研究^[3]发现 mTOR 的磷酸化与胆囊癌的浸润深度、组织分化和 Nevin 分期密切相关,提示 mTOR 的磷酸化与胆囊癌的发生及进展相关。有关 mTOR 抑制剂雷帕霉素(rapamycin)对肿瘤的治疗有较多的研究,在许多肿瘤组织培养和动物模型中雷帕霉

[作者简介] 刘兆龙(1976-),男,山东省聊城市人,硕士,临床医师,主要从事肿瘤分子生物学方面的研究

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: bo_yan@smmail.cn

素具有浓度依赖的抑制肿瘤细胞生长的能力,尤其在肾癌、乳腺癌的治疗上取得了一定的效果^[4],但雷帕霉素对胆囊癌细胞生物学行为的影响未有报道。本研究观察雷帕霉素对胆囊癌细胞生长及转移的影响,探讨雷帕霉素对胆囊癌治疗的临床前景。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料与细胞培养

雷帕霉素购自 Sigma-aldrich 公司。Western blotting 所用的抗体包括抗 mTOR 和 p-mTOR 抗体购自 Cell Signaling Technology (Beverly, MA), Actin 抗体购自 Sigma 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗兔/鼠 IgG 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司。0.2 μm 硝酸纤维素膜(Whatman, Schleicher & Schuell)、化学发光检测底物 SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate 购自 Pierce 公司。Vybrant 凋亡检测试剂盒购自 Invitrogen 公司。

人胆囊癌细胞株 GBC-SD 购自中科院上海分院细胞所细胞库,用 RPMI 1640 培养基(含 10% FCS)培养,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养。

1.2 Western blotting 检测胆囊癌 GBC-SD 细胞蛋白的变化

收集细胞, PBS 洗 1 次,适量细胞裂解液(Cell Signaling Technology 公司)中 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 30 min,以 12 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 高速离心 10 min 后收集上清。蛋白样品定量采用 BCA 法。将蛋白样品加 6 \times 上样缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L DTT, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油, pH6.8)混匀,沸水煮沸 5 min 后,进行 10% SDS-PAGE。随后以 100 V 恒定电压, 70 min 于冰浴下将聚丙烯酰胺中的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,丽春红染色并标记大小和方向。在封闭液(含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液)室温孵育 1 h 后,将膜与适当浓度的一抗溶液(稀释于含 5% BSA 的 TBST 中)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST 中洗 5 次,每次 10 min,然后与稀释于抗体稀释液中的 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 5 次,每次 10 min。加入化学发光底物室温作用 1 min 后,迅速封膜和自显影。

1.3 MTT 检测胆囊癌 GBC-SD 细胞的增殖

将 3×10^3 /孔胆囊癌细胞接种于 96 孔平底板,并各设 3 个复孔,培养 24 h 后,经不同浓度的雷帕霉素处理 24 h。检测当天,加入含 10% MTT(5 mg/ml)的培养基 100 μl ,继续孵育 4 h,小心吸弃上清再加入 150 μl /孔 DMSO, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 溶解细胞内的 formazan,用酶联仪测定 570 nm 波长的 D 值^[5]。

1.4 流式细胞仪分析胆囊癌 GBC-SD 细胞周期

收集细胞,用 PBS 洗涤 3 次,70% 的冰乙醇 1 ml 固定细胞,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,6 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心去除 70% 乙醇,冰 PBS 洗涤 3 次,加入 0.1% Triton X-100 1 打孔,室温 20 min,加入 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA 酶(Sigma)100 μl 降解 RNA,室温放置 20 ~ 30 min,再加入 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PI (Sigma) 50 μl ,标记 5 min 后,流式细胞术检测细胞周期分布情况^[6]。

1.5 AnnexinV/PI 检测胆囊癌 GBC-SD 细胞凋亡

收集细胞,将细胞悬浮于 50 l 的 Binding-buffer,加入 1 l AnnexinV 作用 15 min,加入终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PI 标记 5 min 后, FACS 和 CellQuest software (BD Biosciences)软件分析^[7]。

1.6 Transwell 检测胆囊癌 GBC-SD 细胞迁移

利用 Transwell Chambers 法检测,具体方法如下:胆囊癌细胞血清饥饿 24 h,将 5×10^4 细胞悬浮于不同浓度雷帕霉素的 RPMI 1640 中,加在 Transwell 小室的上层,小室下层为含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液。24 h 后,用棉签擦除上层的细胞,下层迁移的细胞用姬姆萨染色 15 min,计数^[8]。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 10.2 统计学软件,采用非配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 雷帕霉素对胆囊癌 GBC-SD 细胞中 p-mTOR 表达的影响

Western blotting 检测观察了 12.5、25 和 50 nmol/L^[9]雷帕霉素对胆囊癌细胞细胞中 mTOR 和 p-mTOR 表达的影响,结果发现雷帕霉素作用 24 h 后,胆囊癌细胞 GBC-SD 细胞中 p-mTOR 明显降低,并且随着浓度的不断增加 p-mTOR 受抑制的程度愈强(图 1, $P < 0.01$)。结果说明雷帕霉素可显著抑制 GBC-SD 细胞 mTOR 的磷酸化,并且呈剂量依赖。

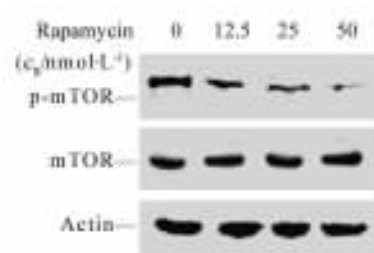


图 1 雷帕霉素对 GBC-SD 细胞中 p-mTOR 表达的影响
Fig. 1 Effect of rapamycin on expression of p-mTOR in GBC-SD cells

2.2 雷帕霉素对胆囊癌 GBC-SD 细胞生长的抑制

通过 MTT 检测了 Rapamycin 对 GBC-SD 细胞增殖的影响, 结果发现, 与对照相比, 12.5 nmol/L ($P < 0.05$) 和 25 nmol/L ($P < 0.01$) 雷帕霉素可显著抑制胆囊癌 GBC-SD 细胞生长, 在 50 nmol/L 作用下效果最显著 ($P < 0.01$, 图 2)。由此可见雷帕霉素对胆囊癌细胞具有显著的生长抑制作用, 并且这种抑制作用表现为剂量依赖关系。

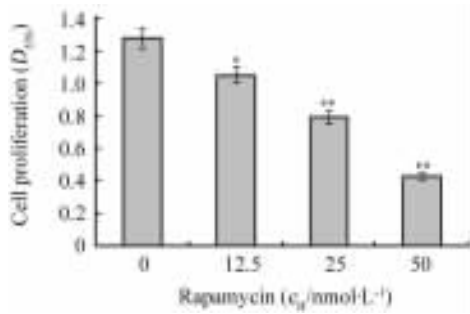


图 2 雷帕霉素对 GBC-SD 细胞生长抑制效应
Fig. 2 Inhibitory effect of rapamycin on cell growth of GBC-SD cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 nmol/L rapamycin

2.3 雷帕霉素对胆囊癌 GBC-SD 细胞细胞周期和凋亡的影响

流式细胞仪分析了不同浓度的雷帕霉素对 GBC-SD 细胞的细胞周期分布的影响。结果显示, 经雷帕霉素处理的 GBC-SD 细胞 G₀/G₁ 期的细胞明显增多。与对照组相比, 12.5、25 和 50 nmol/L 雷帕霉素 G₀/G₁ 期细胞分别增加 9.7%、17.8% 和 23.4% ($P < 0.05$, $P < 0.01$, 图 3); 而 S/G₂/M 期细胞分别减少 11.73%、21.11% 和 25.03%。这一结果提示 Rapamycin 可影响 GBC-SD 细胞的细胞周期分布, 导致细胞周期 G₁/S 期阻滞。

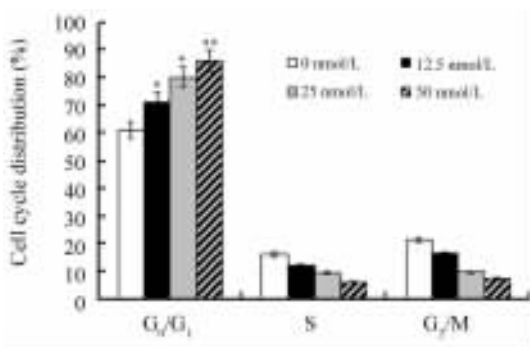


图 3 雷帕霉素对 GBC-SD 细胞周期的影响

Fig. 3 Effect of rapamycin on cell cycle of GBC-SD cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 nmol/L rapamycin

进一步用流式细胞仪检测 Rapamycin 对 GBC-SD 细胞凋亡的影响, 结果发现雷帕霉素处理 24 h 后, 12.5、25、50 nmol/L 组细胞的凋亡率分别为 10.76%、17.72%、25.36%, 而对照组细胞凋亡率为 1.17%, 实验组和对照组之间的差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$, 图 3)。说明 RPM 可促进胆囊癌 GBC-SD 细胞凋亡, 随着浓度增大而凋亡率增高。

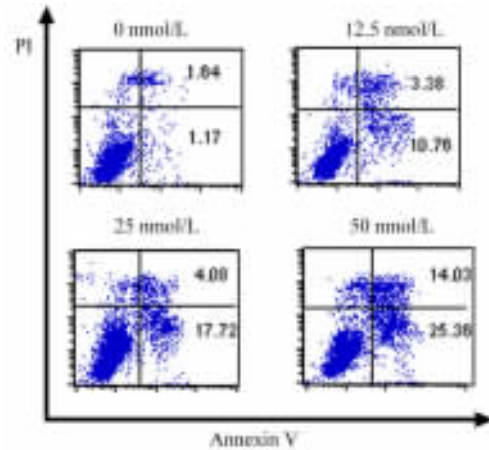


图 4 雷帕霉素对 GBC-SD 细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of rapamycin on apoptosis of GBC-SD cells

2.4 Rapamycin 对胆囊癌 GBC-SD 细胞细胞迁移的影响

Transwell 小室观测了不同浓度的雷帕霉素对胆囊癌细胞 GBC-SD 细胞迁移能力的影响, 结果发现, 与对照组相比, 雷帕霉素处理组迁移的细胞数目明显减少 ($P < 0.01$, 图 5)。因此可见, 雷帕霉素可显著抑制胆囊癌细胞的迁移。

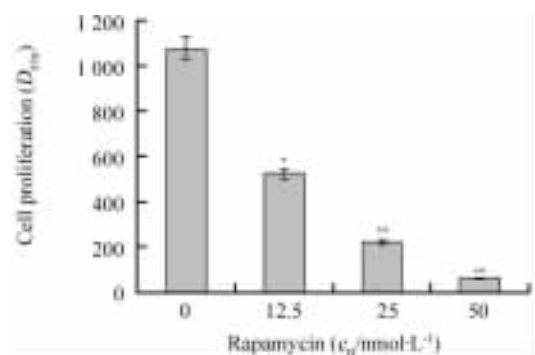


图 5 雷帕霉素对 GBC-SD 细胞迁移的影响

Fig. 5 Effect of rapamycin on migration of GBC-SD cells

** $P < 0.01$ vs 0 nmol/L rapamycin

3 讨论

随着分子生物学技术不断发展, 胆囊癌的分子生物学研究日益受到重视。癌基因与抑癌基因、细胞周期和细胞凋亡调控异常以及胆囊癌的分子转移

机制等与胆囊癌的发生、发展、转移,及诊断、治疗和转归相关^[10]。随着人们对肿瘤发生分子机制的不断深入研究,分子靶向治疗成为目前肿瘤治疗的较具前景的策略。以往的研究^[3]发现 p-mTOR 与胆囊癌的浸润深度、组织分化和 Nevin 分期密切相关,提示 p-mTOR 的磷酸化与胆囊癌的发生及进程相关,同时这也提示靶向 p-mTOR 可能成为治疗胆囊癌的一种策略。本研究观察 mTOR 抑制剂雷帕霉素对胆囊癌细胞生物学行为的影响,旨在探讨雷帕霉素对胆囊癌治疗潜能。

细胞的异常生长可导致肿瘤的发生,细胞的生长受到胞内严格的调控。mTOR 在肿瘤细胞生长过程中起着重要作用,其活化形式为磷酸化 mTOR (p-mTOR),与胃癌、子宫颈癌、胆道肿瘤及其预后密切相关^[11-12],大量研究^[13]发现 mTOR 抑制剂具有治疗肿瘤的潜能,本课题前期研究^[3]发现雷帕霉素可显著抑制胆囊癌细胞 GBC-SD 细胞的增殖,并呈剂量依赖性抑制。本实验进一步探讨雷帕霉素对 GBC-SD 细胞生长抑制作用机制,结果发现在低剂量组(12.5 nmol/L)即可引起细胞周期 G₁/S 期的阻滞,在中高剂量组(25,50 nmol/L)中周期阻滞现象更明显。进一步发现雷帕霉素可诱导 GBC-SD 细胞发生凋亡,并呈剂量依赖形式。以往研究发现 PI3K、Akt/PKB 活化 mTOR 后,激活其下游因子 S6K1 和 4EBP-1,导致细胞周期 G₁/S 阻滞,并伴随着停留在 G₁ 期细胞发生凋亡^[14]。因此,本研究说明了 p-mTOR 在胆囊癌细胞周期从 G₁ 期向 S 期转换过程中起重要作用,雷帕霉素通过抑制 p-mTOR 通路,诱导细胞周期 G₁/S 期的阻滞在期,从而触发细胞凋亡。上述研究说明雷帕霉素具有较强的体外抑制胆囊癌细胞生长的能力,Wu^[15]等发现小鼠体内注射雷帕霉素可显著抑制胆囊癌的生长。因此,本研究认为雷帕霉素可能具有较强的体内、体外抑制胆囊癌生长的潜力。

转移是恶性肿瘤的基本生物学特征,也是肿瘤患者死亡的主要原因,因此,抗肿瘤转移是提高患者预后及生存质量关键。肿瘤转移是一个复杂的过程,受多种因素的调控。近年来人们发现,Akt 不仅作为癌基因促进肿瘤细胞生长、抑制凋亡,而且还在肿瘤的浸润和转移中起重要作用。肿瘤因子活化因子 VII (TF-FVIIa)通过磷酸化 mTOR 促进乳腺癌细胞转移^[16]。本研究同样发现 mTOR 抑制剂雷帕霉素可抑制 GBC-SD 细胞的迁移,因此,靶向 mTOR 分子在胆囊癌的治疗中起到重要作用。

[参考文献]

- [1] Lang SA, Gaumann A, Koehl GE, *et al.* Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(8): 1803-1810.
- [2] Elit L. Drug evaluation: AP-23573--an mTOR inhibitor for the treatment of cancer [J]. *Drugs*, 2006, 9(9): 636-644.
- [3] 刘兆龙, 阎波, 罗芸葆, 等. 磷酸化 mTOR 在胆囊癌中的表达及其临床意义 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(6): 571-574.
- [4] Kim SH, Zukowski K, Novak RF. Rapamycin effects on mTOR signaling in benign, premalignant and malignant human breast epithelial cells [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(4): 1143-1150.
- [5] Alley MC, Scudiero DA, Monks A, *et al.* Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay [J]. *Cancer Res*, 1988, 48(3): 589-601.
- [6] Lu KP, Means AR. Regulation of the cell cycle and calmodulin [J]. *Endocr Rev*, 1993, 14(1): 40-48.
- [7] Michallet MC, Saltel F, Flacher M, *et al.* Cathepsin-d-dependent apoptosis triggered by supraoptimal activation of T lymphocytes: a possible mechanism of high dose tolerance [J]. *J Immunology*, 2004, 172(9): 5405-5414.
- [8] Peng TL, Chen J, Mao W, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor pathway activation enhances gastric cancer cell invasiveness likely through a c-Jun-dependent induction of matrix metalloproteinase-9 [J]. *BMC Cell Biol*, 2009, 10(1): 27.
- [9] Kidd M, Eick GN, Modlin IM, *et al.* Further delineation of the continuous human neoplastic enterochromaffin cell line, KRJ-I, and the inhibitory effects of lanreotide and rapamycin [J]. *J Mol Endo*, 2007, 38(1-2): 181-192.
- [10] Hassid VJ, Orlando FA, Awad ZT, *et al.* Genetic and molecular abnormalities in cholangiocarcinogenesis [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(4): 1151-1156.
- [11] Lang SA, Gaumann A, Koehl GE, *et al.* Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(8): 1803-1810.
- [12] Herberger B, Puhalla H, Lehnert M, *et al.* Activated mammalian target of rapamycin is an adverse prognostic factor in patients with biliary tract adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(16): 4795-4799.
- [13] 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.
- [14] Mita MM, Mita A, Rowinsky EK. Mammalian target of rapamycin: a new molecular target for breast cancer [J]. *Clin Breast Cancer*, 2003, 4(2): 126-137.
- [15] Wu Q, Kiguchi K, Kawamoto T, *et al.* Therapeutic effect of rapamycin on gallbladder cancer in a transgenic mouse model [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8): 3794-3800.
- [16] Jiang X, Zhu S, Panetti TS, *et al.* Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex induces activation of the mTOR pathway which regulates migration of human breast cancer cells [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 100(1): 127-133.

[收稿日期] 2009-10-10

[修回日期] 2009-11-18

[本文编辑] 韩丹