

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.04.006

干扰 mTOR 表达增强食管鳞癌 EC9706 细胞对雷帕霉素的敏感性

侯桂琴^a, 范天黎^b, 王莉莉^c, 陈秀英^a, 许博^a, 薛乐勋^c(郑州大学 a. 临床药学系; b. 基础医学院药理学教研室; c. 生物系细胞生物学研究室, 河南 郑州 450052)

[摘要] 目的: 观察哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)特异性小干扰 RNA(mTOR-siRNA)干扰 mTOR 表达后, 食管鳞癌 EC9706 细胞对雷帕霉素(rapamycin)敏感性的变化。方法: mTOR-siRNA 转染 EC9706 细胞, RT-PCR 检测干扰效果。mTOR-siRNA 转染前后的 EC9706 细胞用雷帕霉素处理, Western blotting 检测 EC9706 细胞中 mTOR 及其下游 p70S6K 蛋白的表达; 流式细胞术检测 EC9706 细胞的周期及凋亡, CCK-8 试剂盒检测 EC9706 细胞的增殖。结果: mTOR-siRNA 下调 EC9706 细胞中 mTOR mRNA 的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 雷帕霉素抑制 EC9706 细胞中 mTOR 和 p-p70S6K 蛋白的表达($P < 0.05$), 并促进 p70S6K 蛋白表达($P < 0.01$), 且 mTOR-siRNA 转染后此作用更明显($P < 0.05$)。雷帕霉素可诱导 EC9706 细胞凋亡($P < 0.01$)、抑制 EC9706 细胞增殖($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、使 EC9706 细胞阻滞于 G₁ 期($P < 0.01$), 且 mTOR-siRNA 转染后这些作用更强($P < 0.05$)。结论: mTOR-siRNA 能特异性下调食管鳞癌 EC9706 细胞中 mTOR 表达, 提高 EC9706 细胞对雷帕霉素的敏感性。

[关键词] 食管鳞癌; 小干扰 RNA; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR); p70S6K; 雷帕霉素

[中图分类号] R392.11; R735.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)04-0392-06

Interference of mTOR expression enhances sensitivity of esophageal squamous cell carcinoma EC9706 cells to rapamycin

HOU Gui-qin^a, FAN Tian-li^b, WANG Li-li^c, CHEN Xiu-ying^a, XU Bo^b, XUE Le-xun^c(a. Faculty of Clinical Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences; b. Department of Pharmacology, Basic Medical College; c. Laboratory for Cell Biology, Faculty of Biology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the sensitivity of esophageal squamous cell carcinoma EC9706 cells to rapamycin after silencing mTOR expression by small interfering RNA targeting mTOR (mTOR-siRNA). **Methods:** EC9706 cells were transfected with mTOR-siRNA and the interference effect was investigated by RT-PCR. EC9706 cells were treated with rapamycin before and after mTOR-siRNA transfection, and the expressions of mTOR and its downstream p70S6K were detected by Western blotting analysis. Cell cycle, apoptosis and proliferation of EC9706 cells were determined by flow cytometry and CCK-8 kit, respectively. **Results:** mTOR-siRNA down-regulated the expression of mTOR mRNA in EC9706 cells($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Rapamycin inhibited mTOR and phosphorylated p70S6K (p-p70S6K) expressions and increased p70S6K expression in EC9706 cells(all $P < 0.05$), and these effects of rapamycin were further enhanced by mTOR-siRNA transfection ($P < 0.05$). Rapamycin also induced apoptosis, inhibited proliferation and arrested cell cycle in G₁ phase of EC9706 cells (all $P < 0.01$), and transfection with mTOR-siRNA significantly promoted these effects of rapamycin in EC9706 cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** mTOR-siRNA can specifically down-regulate mTOR expression in esophageal squamous cell carcinoma EC9706 cells, and increase the sensitivity of EC9706 cells to rapamycin.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma; small interfering RNA; mammalian target of rapamycin(mTOR); p70S6K; rapamycin

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(4): 392-397]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30901778); 郑州大学引进人才基金资助项目。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30901778), and the Foundation for Introduced Talents of Zhengzhou University

[作者简介] 侯桂琴(1977 -), 女, 河南省浚县人, 博士, 讲师, 硕士生导师, 主要从事肿瘤分子生物学的研究。E-mail: hougluo@126.com

[通信作者] 薛乐勋(XUE Le-xun, corresponding author), E-mail: xuelx@371.net

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在进化上非常保守,作为一种重要的信号转导分子参与多种病理生理过程,是细胞生长调控的中心因子。p70S6 激酶(p70S6K)是 mTOR 的直接作用底物,被 mTOR 磷酸化后激活,从而促进翻译。研究^[1-6]证明,mTOR/p70S6K 信号通路在细胞的存活与增殖中起中心调控作用,其信号转导通路的异常与多种恶性肿瘤相关,已成为肿瘤治疗的新靶点。雷帕霉素(rapamycin, Rapa)及其类似物 CCI-779 等是 mTOR 的特异性抑制剂^[7]。

食管鳞癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,尤其在河南省林州市,食管鳞癌的发生率及病死率均很高。作者前期研究已证实了 mTOR/p70S6K 信号通路在食管鳞癌中的异常激活及雷帕霉素对通路的抑制作用^[8]。本研究利用人食管鳞癌细胞株 EC9706,采用 RT-PCR、Western blotting、流式细胞术及细胞增殖实验检测 mTOR-siRNA 特异性沉默 mTOR 的表达,进而抑制 mTOR/p70S6K 信号通路后,EC9706 细胞对雷帕霉素敏感性的变化,为食管鳞癌的分子靶向治疗提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 细胞株和试剂

食管鳞癌细胞株 EC9706 由中国医学科学院肿瘤医院研究所分子肿瘤学国家重点实验室提供。细胞培养条件为:含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,细胞置于 5% CO₂、37 °C 的饱和湿度培养箱中培养。RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶及胎牛血清购自美国 Gibco 公司,β-actin、mTOR(sc-8319)和 p70S6K(sc-8418)抗体及 mTOR-siRNA(sc-35409)、control-siRNA(sc-36869)购自美国 Santa Cruz 公司,p-p70S6K(#9206)抗体购自美国 Cell Signaling 公司,Taq 酶、dNTP 和 DNA marker 购自大连宝生物公司,碘化吡啶(PI)购自美国 Sigma 公司,转染试剂(脂质体)购自日本 Mirus 公司。Annexin V-FITC 试剂盒购自美国 BD Biosciences 公司,ECL 化学发光检测试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司,反转录试剂盒购自上海生物工程有限公司,CCK-8 细胞增殖试剂盒购自碧云天生物有限公司。

1.2 引物

实验中应用到的引物包括:mTOR,上游 P1,5'-CGCTGTCATCCCTTTATCG-3';下游 P2,5'-ATGCTCAAACACCTCCACC-3';长度为 193 bp。内参 GAPDH,上游 P1,5'-GCACCGTCA AGGCTGAGAA-3';下

游 P2,5'-AGGTCCACCACTGACACGTTG-3';长度为 570 bp。引物由上海生物工程有限公司合成。

1.3 siRNA 转染 EC9706 细胞

将处于对数生长期的 EC9706 细胞接种 6 孔板,使细胞在第 2 天达到 60%~80% 融合。用转染试剂将 mTOR-siRNA 及对照 control-siRNA 转入 EC9706 细胞,siRNA 终浓度为 150 nmol/L^[9]。转染方法按转染试剂说明书操作。

1.4 RT-PCR 检测 siRNA 转染后 EC9706 细胞中 mTOR mRNA 的表达

收集 mTOR-siRNA 转染 24、48、72 和 96 h 的 EC9706 细胞,并分别提取 RNA,反转录成 cDNA,使用 mTOR 引物进行 RT-PCR,检测 mTOR mRNA 的表达。反应条件为 95 °C 预变性 3 min,然后 95 °C、30 s,49 °C、30 s,72 °C、1 min,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。扩增结束后,取 5 μl PCR 产物进行电泳。每次实验均至少重复 3 次。结果用 Band Scan 5.0 进行相对表达量分析,用未转染及转染 control-siRNA 的 EC9706 细胞作为对照。

1.5 Western blotting 检测 EC9706 细胞中 mTOR、p70S6K 及 p-p70S6K 蛋白的表达

收集 mTOR-siRNA 和雷帕霉素单独及联合处理的 EC9706 细胞,提取总蛋白。取 50 μg 总蛋白进行丙烯酰胺凝胶电泳,电泳后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上。5% 脱脂奶粉封闭,一抗为 1:200 稀释的 mTOR、1:200 稀释的 p70S6K、1:2 000 稀释的 p-p70S6K 和 1:500 稀释的 β-actin,二抗为 1:8 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的 IgG。硝酸纤维素膜依次与抗体结合后,与 ECL 化学发光检测试剂反应,X 线曝光,显影、定影后分析 EC9706 细胞中 mTOR、p70S6K 及 p-p70S6K 蛋白表达的变化。用未转染及转染 control-siRNA 的 EC9706 细胞作为对照。

1.6 流式细胞术检测 EC9706 细胞的凋亡

收集用 mTOR-siRNA 和雷帕霉素单独或联合处理 48 h 的 EC9706 细胞,按 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒操作说明处理细胞,30 min 内用流式细胞仪检测 EC9706 细胞凋亡。以未染色细胞调零,以 Annexin V-FITC 单染管和 PI 单染管做为基准参照,利用 Cell Quest 3.0 软件进行参数获取和资料分析,计算 EC9706 细胞的凋亡率。

1.7 流式细胞术检测 EC9706 细胞的细胞周期

收集各组 EC9706 细胞,用 PBS 洗 2 遍,加入 70% 冰乙醇固定,4 °C 过夜。弃去乙醇,PBS 洗 3 遍,加入 1 ml PBS 制成细胞悬液,加 RNase A(终质

量浓度为 50 μg/ml), 室温放置 1 h, 调整细胞密度至 1 × 10⁶/ml, 加 1 ml PI (100 μg/ml) 避光 30 min, 用流式细胞仪检测细胞周期。未转染及转染 control-siRNA 的 EC9706 细胞作为对照。

1.8 CCK-8 法检测 EC9706 细胞的增殖

将转染 mTOR-siRNA 24 h 的 EC9706 细胞接种 96 孔板, 培养 24 h 后加入不同浓度的雷帕霉素 (0、20、50、100、150 和 200 nmol/L) 继续培养, 24 h 后加入 10 μl CCK-8 试剂, 孵育 4 h 后, 用酶标仪在 450 nm 处检测光密度值 (D)。每组设 3 个复孔。未转染及转染 control-siRNA 的 EC9706 细胞作为对照。

1.9 统计学处理

所有实验均重复 3 次, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 统计软件行单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。PCR 结

果采用 Band Scan5.0 进行灰度分析, Western blotting 结果采用 Total Lab 2.0 软件进行分析。

2 结果

2.1 mTOR-siRNA 转染抑制 EC9706 细胞中 mTOR mRNA 的表达

RT-PCR 结果表明, 与未转染 EC9706 细胞相比, 转染 mTOR-siRNA 的 EC9706 细胞中 mTOR mRNA 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 并且在 72 h 降到最低 ($P < 0.01$), 而在 96 h mTOR mRNA 的表达水平又有所升高 (图 1); 而转染 control-siRNA 的 EC9706 细胞中 mTOR mRNA 的表达水平与未转染组相比则无明显差异 ($P > 0.05$)。说明 mTOR-siRNA 能显著抑制 EC9706 细胞中 mTOR mRNA 的表达, 并且在 72 h 时抑制作用最强。

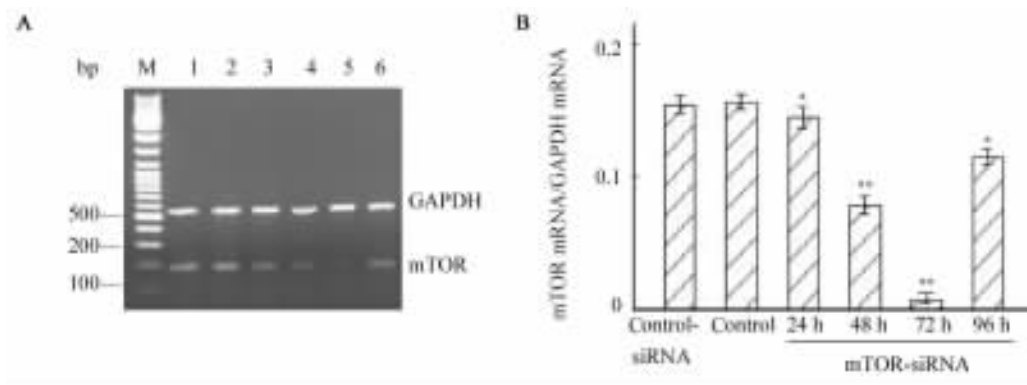


图 1 mTOR-siRNA 转染抑制 EC9706 细胞中 mTOR mRNA 的表达

Fig. 1 mTOR-siRNA transfection down-regulated expression of mTOR mRNA in EC9706 cells

A: RT-PCR; B: mTOR expression level vs GAPDH

M: Marker; 1: Control-siRNA; 2: Control; 3: 24 h; 4: 48 h; 5: 72 h; 6: 96 h; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs control-siRNA

2.2 mTOR-siRNA 和雷帕霉素协同抑制 EC9706 细胞中 mTOR 蛋白的表达

用不同方式处理 EC9706 细胞后, EC9706 细胞中 mTOR 蛋白表达的变化如图 2 所示。与未处理 EC9706 细胞相比, mTOR-siRNA 和雷帕霉素单用及二者联合处理的 EC9706 细胞中 mTOR 蛋白的表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 而联合处理组 EC9706 细胞中 mTOR 蛋白表达水平降低尤为明显 ($P < 0.01$), 其表达量仅为未转染细胞的 1/3, 而且低于 mTOR-siRNA 转染组或雷帕霉素组 ($P < 0.05$), 表达量不到 mTOR-siRNA 组或雷帕霉素组的 1/2, 但 mTOR-siRNA 转染组或雷帕霉素组之间没有明显差

异 ($P > 0.05$)。

2.3 mTOR-siRNA 增强雷帕霉素对 EC9706 细胞中 p70S6K 蛋白磷酸化的抑制效应

与未处理 EC9706 细胞相比, mTOR-siRNA 和雷帕霉素单用及两者联合处理的 EC9706 细胞中 p70S6K 和其磷酸化形式 p-p70S6K 的表达也有明显变化, p70S6K 表达明显升高, 但 p-p70S6K 的表达明显降低 ($P < 0.05$), 以两者联用时效果尤其明显 ($P < 0.01$, 图 3)。结果说明, mTOR-siRNA 及雷帕霉素能抑制 mTOR/p70S6K 信号通路的活性, 并且 mTOR-siRNA 转染后, 雷帕霉素对 mTOR/p70S6K 通路的抑制作用更为明显。

2.4 mTOR-siRNA 增强雷帕霉素诱导 EC9706 细胞凋亡的作用

流式分析结果(图 4)显示,mTOR-siRNA 对细胞凋亡的作用与雷帕霉素相似,均能诱导 EC9706 细胞凋亡,与未处理细胞相比,mTOR-siRNA 处理组早期凋亡细胞率(II 区)从 4% 增加到 30% ($P < 0.01$),而联用组细胞凋亡率更高,达到 57%,显著

高于未处理组($P < 0.01$)和单独应用 mTOR-siRNA 或雷帕霉素处理组($P < 0.01$)。而且,各处理组晚期凋亡细胞率(I 区)明显高于未处理组($P < 0.05$),但单用组和联用组之间晚期凋亡细胞结果无明显差异($P > 0.05$)。结果说明,mTOR-siRNA 增强了雷帕霉素的凋亡诱导作用。

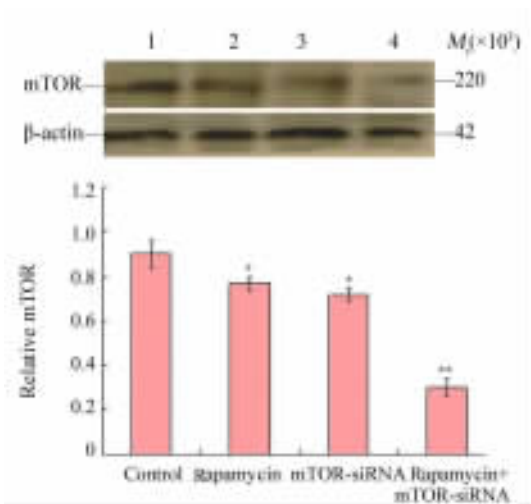


图 2 mTOR-siRNA 和雷帕霉素单独及联合处理抑制 EC9706 细胞中 mTOR 蛋白的表达
Fig.2 mTOR-siRNA and rapamycin used alone or in combination inhibited expression of mTOR protein in EC9706 cells

1: Control; 2: Rapamycin; 3: mTOR-siRNA;
4: mTOR-siRNA + Rapamycin;
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

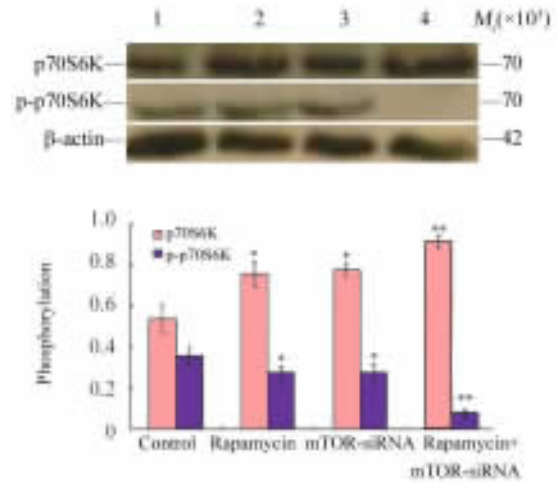


图 3 雷帕霉素和 mTOR-siRNA 单独或联合处理抑制 EC9706 细胞中 p70S6K 蛋白的磷酸化
Fig.3 Rapamycin and mTOR-siRNA used alone or in combination inhibited phosphorylation of p70S6K protein in EC9706 cells

1: Control; 2: Rapamycin; 3: mTOR-siRNA;
4: mTOR-siRNA + Rapamycin;
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

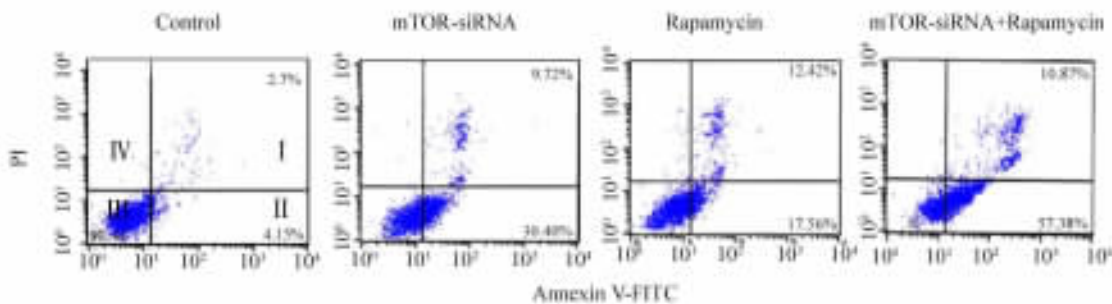


图 4 雷帕霉素和 mTOR-siRNA 单独及联合处理诱导 EC9706 细胞的凋亡
Fig.4 mTOR-siRNA and rapamycin used alone or in combination induced apoptosis of EC9706 cells

2.5 mTOR-siRNA 增强雷帕霉素对 EC9706 细胞周期的阻滞

图 5 显示,mTOR-siRNA 对 EC9706 细胞周期具有与雷帕霉素相似的作用,同样能使处于 G₁ 期的

EC9706 细胞比例增加;与未处理 EC9706 细胞相比,处于 G₁ 期 EC9706 细胞的比例从 63% 上升到 75% ($P < 0.05$)。而联用处理组处于 G₁ 期的 EC9706 细胞比例更高,达到 79%,显著高于未处理

组 ($P < 0.01$) 和单独用 mTOR-siRNA 或雷帕霉素处理组 ($P < 0.05$), 说明 mTOR-siRNA 增强雷帕霉素对 EC9706 细胞周期的阻滞。

2.6 mTOR-siRNA 增强雷帕霉素对 EC9706 细胞增殖的抑制作用

如图 6 所示, 与对照 EC9706 细胞组相比, 雷帕霉素可抑制 EC9706 细胞的增殖, 且随浓度升高其

抑制作用逐渐增强; 与对照 EC9706 细胞组相比, 单独用 mTOR-siRNA 明显抑制 EC9706 细胞的增殖 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 转染 mTOR-siRNA 后联用不同浓度雷帕霉素, 与单独用相应浓度的雷帕霉素组相比, EC9706 细胞的存活率均明显下降, 各组间相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

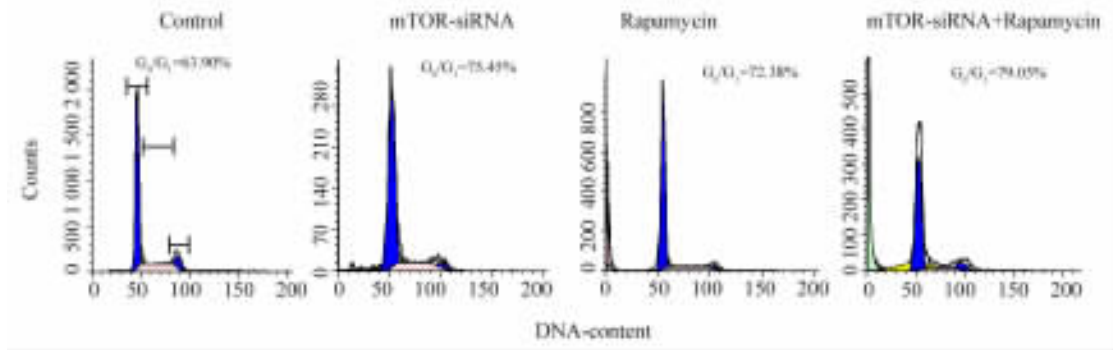


图 5 雷帕霉素和 mTOR-siRNA 单独及联合处理对 EC9706 细胞周期的影响

Fig. 5 Effects of mTOR-siRNA and rapamycin used alone or in combination on cell cycle of EC9706 cells

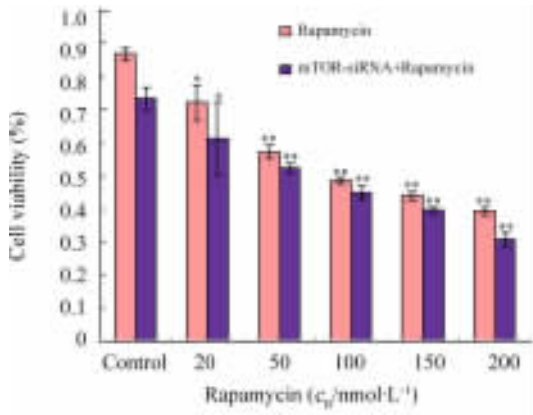


图 6 mTOR-siRNA 增强雷帕霉素对 EC9706 细胞增殖的抑制作用
Fig. 6 mTOR-siRNA enhanced inhibitory effect of rapamycin on proliferation of EC9706 cells by mTOR-siRNA

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs control

3 讨论

TOR 在 1994 年筛选啤酒酵母免疫抑制剂雷帕霉素抗性株时被发现并克隆^[12]。随后, 在哺乳动物也发现了结构和功能保守的 TOR 蛋白, 称为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)。雷帕霉素是一种大环内酯类抗生素, 它可与细胞内受体 FK506-结合蛋白 (FKBP12) 相互作用形成抑制复合物, FKBP12 能与 TOR 蛋白的 C 端区域结合, 抑制 TOR 的活性^[10-11]。

mTOR 信号转导通路在人类多种肿瘤中异常表达, 与肿瘤发生密切相关。mTOR 可调控细胞增殖、细胞周期、细胞迁移等, 也可调节 cyclin-D/myc 等多种癌基因在翻译水平的表达^[12-13]。p70S6K 是 mTOR 的直接作用底物^[4-5, 14-16], 被 mTOR 磷酸化后激活, 能促进含 5'-TOP 结构的 mRNA 的翻译^[17-18]; 磷酸化 p70S6K (p-p70S6K) 促翻译活性比未磷酸化的 p70S6K 高 100 倍左右^[19], 最终促进细胞的增殖。

越来越多的证据显示, 细胞恶性转化与 mTOR/p70S6K 信号通路异常有关, 如慢性髓系白血病中 p70S6K 的持续激活, 可能通过 mTOR 调节下游靶分子的翻译^[12-13, 20]。雷帕霉素最初作为免疫抑制剂应用于临床, 后来发现它具有抗肿瘤活性, 可阻止细胞由 G₁ 期进入 S 期, 促进细胞凋亡, 是 mTOR 的特异性抑制剂。此外, 雷帕霉素衍生物 CCI-779、RAD001、AP23573 等也具有类似作用。大量临床试验^[5-6, 21-22]证明, mTOR 抑制剂具有很好的抗肿瘤活性, 对前列腺、乳腺、胰腺及肾脏等肿瘤均有一定的疗效。前期研究已证实了 mTOR/p70S6K 信号通路在食管鳞癌中的异常激活以及雷帕霉素对通路的抑制作用^[8], 但是此通路的激活状态与细胞对雷帕霉素敏感性的关系尚未见相关报道。本研究采用 mTOR-siRNA 干扰食管鳞癌 EC9706 细胞中 mTOR 的表达, 观察 mTOR-siRNA 干扰前后 EC9706 细胞对雷帕霉素敏感性的变化。结果发现, mTOR-siRNA

能有效地下调 EC9706 细胞中 mTOR 的表达。雷帕霉素单独处理时也能下调 EC9706 细胞中 mTOR 的表达,并抑制 p70S6K 蛋白的磷酸化,使 EC9706 细胞周期阻滞在 G₁ 期,诱导 EC9706 细胞凋亡,并抑制 EC9706 细胞增殖;而当其与 mTOR-siRNA 联用时,这些作用更加明显。因此,mTOR-siRNA 能提高 EC9706 细胞对雷帕霉素的敏感性。

总之,本研究结果初步显示,mTOR 是食管鳞癌分子治疗的一个重要靶点,阻断此靶点可提高 EC9706 细胞对雷帕霉素的敏感性,为食管鳞癌分子治疗提供了实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Pene F, Claessens YE, Muller O, Viguié F, Mayeux P, Dreyfus F, et al. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and mTOR/p70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma [J]. *Oncogene*, 2002, 21(43): 6587-6597.
- [2] Faried LS, Faried A, Kanuma T, Aoki H, Sano T, Nakazato T, et al. Expression of an activated mammalian target of rapamycin in adenocarcinoma of the cervix: A potential biomarker and molecular target therapy [J]. *Mol Carcinog*, 2008, 47(6): 446-457.
- [3] Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(16): 1926-1945.
- [4] Zhang YJ, Dai Q, Sun DF, Xiong H, Tian XQ, Gao FH, et al. mTOR signaling pathway is a target for treatment of colorectal cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16(9): 2617-2628.
- [5] Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, Reddy SA. The rapamycin analog CCI-779 is a potent inhibitor of pancreatic cancer cell proliferation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(1): 295-302.
- [6] Smolewski P. Recent developments in targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase pathway [J]. *Anti cancer Drugs*, 2006, 17(5): 487-494.
- [7] 郭琳,王强. PI3K/Akt/mTOR 信号传导通路与恶性肿瘤浸润和转移的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(8): 1585-1589.
- [8] Hou G, Xue L, Lu Z, Fan T, Tian F, Xue Y. mTOR/p70S6K signaling pathway constitutively activated in esophageal squamous cell carcinoma cell lines and inhibition of the pathway by rapamycin and siRNA against mTOR [J]. *Cancer Lett*, 2007, 253(2): 236-248.
- [9] 侯桂琴. 食管鳞癌中 mTOR/p70S6K 信号通路的作用及其阻断策略 [D]. 郑州: 郑州大学. 2007.
- [10] Chen J, Zheng XF, Brown EJ, Schreiber SL. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(11): 4947-4951.
- [11] Choi J, Chen J, Schreiber SL, Clardy J. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP [J]. *Science*, 1996, 273(5272): 239-242.
- [12] Rowinsky EK. Targeting the molecular target of rapamycin (mTOR) [J]. *Curr Opin Oncol*, 2004, 16(6): 564-575.
- [13] Taga M, Hirooka E, Ouchi T. Essential roles of mTOR/Akt pathway in Aurora-A cell transformation [J]. *Int J Biol Sci*, 2009, 5(5): 444-450.
- [14] Montagne J, Stewart MJ, Stocker H, Hafen E, Kozma SC, Thomas G. Drosophila S6 kinase: A regulator of cell size [J]. *Science*, 1999, 285(5436): 2126-2129.
- [15] Meng Q, Xia C, Fang J, Rojanasakul Y, Jiang BH. Role of PI3K and Akt specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway [J]. *Cell Signal*, 2006, 18(12): 2262-2271.
- [16] Stolovich M, Lerer T, Bolker Y, Cohen H, Meyuhos O. Lithium can relieve translational repression of TOP mRNAs elicited by various blocks along the cell cycle in a glycogen synthase kinase-3- and S6-kinase-independent manner [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(7): 5336-5342.
- [17] Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G. Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70S6k [J]. *EMBO J*, 1997, 16(12): 3693-3704.
- [18] Schwab MS, Kim SH, Terada N, Edfjall C, Kozma SC, Thomas G, et al. p70(S6K) controls selective mRNA translation during oocyte maturation and early embryogenesis in *Xenopus laevis* [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(4): 2485-2494.
- [19] Mendez R, Myers MG, White MF, Rhoads RE. Stimulation of protein synthesis, eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation, and PHAS-I phosphorylation by insulin requires insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(6): 2857-2864.
- [20] Piguet AC, Semela D, Keogh A, Wilkens L, Stroka D, Stoupis C, et al. Inhibition of mTOR in combination with doxorubicin in an experimental model of hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2008, 49(1): 78-87.
- [21] Ravaud A, Bernhard JC, Gross-Goupil M, Digue L, Ferriere JM. mTOR inhibitors: Temsirolimus and everolimus in the treatment of renal cell carcinoma [J]. *Bull Cancer*, 2010, 97: 45-51.
- [22] Chang SM, Wen P, Cloughesy T, Greenberg H, Schiff D, Conrad C, et al. Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme [J]. *Invest New Drugs*, 2005, 23(4): 357-361.

[收稿日期] 2010 - 04 - 20

[修回日期] 2010 - 05 - 16

[本文编辑] 徐红梅