

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.01.011

· 基础研究 ·

雷帕霉素联合顺铂抑制人宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠移植瘤的生长及其机制

杨丽肖¹, 韩璐¹, 吴洁玲² (1. 大连市妇产医院 妇产科, 辽宁 大连 116033; 2. 大连市中心血站 血液成分采集科, 辽宁 大连 116001)

[摘要] **目的:**探讨雷帕霉素(rapamycin, RAPA)与顺铂(cisplatin, DDP)单独及联合应用对人宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠皮下移植瘤生长的抑制作用及其可能的机制。**方法:**裸鼠皮下接种 HeLa 细胞,建立人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤模型,随机分为对照组、RAPA 组、DDP 组、RAPA + DDP 组。治疗过程中检测肿瘤的质量、体积,RT-PCR、免疫组化及 Western blotting 检测低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)mRNA 及蛋白的表达。**结果:**RAPA + DDP 组与 RAPA 组相比,移植瘤的质量[(0.42 ± 0.04) vs (0.53 ± 0.03)g, $P < 0.05$],体积[(568.70 ± 36.12) vs (797.81 ± 111.98)mm³, $P < 0.01$]都明显减小。RAPA + DDP 组与 DDP 组相比,移植瘤的质量[(0.42 ± 0.04) vs (0.52 ± 0.04)g, $P < 0.05$],体积[(568.70 ± 36.12) vs (766.16 ± 132.27)mm³, $P < 0.01$]也明显减小。RT-PCR 及 Western blotting 结果显示:RAPA + DDP 组与 RAPA 组、DDP 组相比,移植瘤中 HIF-1 α mRNA 水平下调[(31.22 ± 0.71) vs (50.58 ± 1.25)、(48.63 ± 1.56), $P < 0.05$];HIF-1 α 蛋白水平也下调[(38.07 ± 0.09) vs (55.69 ± 3.60)、(59.50 ± 1.54), $P < 0.05$]。另外,RAPA + DDP 组移植瘤中 VEGF mRNA 水平与 RAPA 组、DDP 组相比明显降低[(46.64 ± 0.60) vs (62.20 ± 0.62)、(61.64 ± 1.21), $P < 0.05$];RAPA + DDP 组 VEGF 蛋白水平也下降[(119.28 ± 2.69) vs (150.31 ± 4.77)、(153.84 ± 3.39), $P < 0.05$]。免疫组化结果显示:RAPA + DDP 组与 RAPA 组、DDP 组相比,移植瘤中 HIF-1 α 的 AOD 值降低[(0.37 ± 0.03) vs (0.57 ± 0.06)、(0.55 ± 0.06), $P < 0.05$];RAPA + DDP 组移植瘤中 VEGF 的 AOD 值也降低[(0.48 ± 0.03) vs (0.62 ± 0.04)、(0.61 ± 0.07), $P < 0.05$]。**结论:**RAPA 与 DDP 联合应用可抑制宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠皮下移植瘤的生长,其机制可能与下调 HIF-1 α 、VEGF 的表达有关。

[关键词] 宫颈癌;雷帕霉素;顺铂;HeLa 细胞;低氧诱导因子-1 α ;血管内皮生长因子

[中图分类号] R737.33; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)01-0063-07

Inhibitory effect of rapamycin combined with cisplatin on growth of human cervical carcinoma HeLa cell subcutaneous xenografts in nude mice and the mechanisms

Yang Lixiao¹, Han Lu¹, Wu Jieling² (1. Department of Obstetrics and Gynecology, Dalian Obstetrics and Gynecology Hospital, Dalian 116033, Liaoning, China; 2. Blood Component Collection Branch, Dalian Blood Center, Dalian 116001, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effect of rapamycin (RAPA) and cisplatin (DDP) used alone or in combination on the growth of human cervical carcinoma HeLa cell subcutaneous xenografts in nude mice and the possible mechanisms. **Methods:** Nude mice were subcutaneously inoculated with HeLa cells to establish a subcutaneous transplantation tumor model of cervical cancer. Mice were randomly divided into a control group, RAPA group, DDP group, and RAPA + DDP group. The tumor weight and volume were observed during therapeutic process. The mRNA and protein expressions of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by RT-PCR, immunohistochemistry and Western blotting. **Results:** Compared with the RAPA group, the tumor weight [(0.42 ± 0.04) vs (0.53 ± 0.03)g, $P < 0.05$] and the tumor volume [(568.70 ± 36.12) vs (797.81 ± 111.98)mm³, $P < 0.01$] were

[基金项目] 大连市科技局社会发展基金资助(No. 2008E13SF195)。Project supported by the Social Development Foundation of Dalian Science and Technology Bureau (No. 2008E13SF195)

[作者简介] 杨丽肖(1980-),女,河北省濮阳市人,硕士,临床医师,主要从事妇科肿瘤治疗的基础和临床研究。E-mail: hanludl@yahoo.com.cn

[通信作者] 韩璐(Han Lu, corresponding author),E-mail: 13940801858@163.com

significantly reduced in the RAPA + DDP group. Moreover, in comparison with the DDP group, the tumor weight ($[0.42 \pm 0.04]$ vs $[0.52 \pm 0.04]$ g, $P < 0.05$) and the tumor volume ($[568.70 \pm 36.12]$ vs $[766.16 \pm 132.27]$ mm³, $P < 0.01$) were significantly reduced in the RAPA + DDP group. RT-PCR and Western blotting results showed that the expression of *HIF-1 α* mRNA in transplanted tumors was down-regulated in the RAPA + DDP group compared with the RAPA and DDP groups ($[31.215 \pm 0.706]$ vs $[50.58 \pm 1.25]$, $[48.63 \pm 1.56]$, $P < 0.05$), and the expression of HIF-1 α protein was also down-regulated ($[38.07 \pm 0.09]$ vs $[55.69 \pm 3.60]$, $[59.50 \pm 1.54]$, $P < 0.05$). Moreover, the expression of *VEGF* mRNA in transplanted tumors was significantly decreased in the RAPA + DDP group compared with the RAPA and the DDP groups ($[46.64 \pm 0.60]$ vs $[62.20 \pm 0.62]$, $[61.64 \pm 1.21]$, $P < 0.05$), and decreased VEGF protein expression can be shown in the RAPA + DDP group ($[119.28 \pm 2.69]$ vs $[150.31 \pm 4.77]$, $[153.84 \pm 3.39]$, $P < 0.05$). Immunohistochemistry showed that the AOD value of HIF-1 α in transplanted tumors was decreased in the RAPA + DDP group compared with the RAPA and the DDP groups ($[0.37 \pm 0.03]$ vs $[0.57 \pm 0.06]$, $[0.55 \pm 0.06]$, $P < 0.05$), and decreased AOD value of VEGF can also be shown in the RAPA + DDP group ($[0.48 \pm 0.03]$ vs $[0.62 \pm 0.04]$, $[0.61 \pm 0.07]$, $P < 0.05$). **Conclusion:** RAPA combined with DDP shows an inhibitory effect on growth of human cervical carcinoma HeLa cell subcutaneous xenografts. The possible underlying mechanism is related to the down-regulation of HIF-1 α and VEGF expressions.

[**Key words**] cervical carcinoma; rapamycin (RAPA); cisplatin (DDP); HeLa cell; HIF-1 α ; VEGF

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(1): 63-69]

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,顺铂(cisplatin, DDP)作为同步放化疗治疗晚期或复发性宫颈癌患者的一线化疗药物被广泛应用,但因其明显的毒性作用和耐药性,成为晚期宫颈癌患者无法继续治疗的主要原因^[1]。随着分子生物学技术的不断进展,分子靶向治疗已成为较具前景的肿瘤治疗手段。近年来的研究^[2-4]发现,以雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)为靶点的 mTOR 抑制剂雷帕霉素(rapamycin, RAPA)及其衍生物除具有免疫抑制作用外,在多种肿瘤细胞和肿瘤动物模型中还具有抑制肿瘤生长的作用,且 RAPA 与 DDP 的联合应用可部分恢复肿瘤细胞对 DDP 的敏感性^[5]。本研究旨在探讨 RAPA 增强 DDP 对人宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠移植瘤生长的抑制作用及其机制,为宫颈癌的分子靶向治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人宫颈癌 HeLa 细胞株购自辽宁省大连生物化学研究所。RAPA 购自美国 Sigma 公司, DDP 购自江苏豪森药业公司,鼠抗人 VEGF 单克隆抗体购自 Santa Cruz 生物技术公司,兔抗人 HIF-1 α 多克隆抗体购自武汉博士德公司,二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自 Amresco 公司。SP-9000 免疫组化染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, RT-PCR 试剂盒、DL2000DNA Marker 购自 TaKaRa 公司, TRIzol 试剂购 Invitrogen 公司, HIF-1 α 、

VEGF、 β -actin 引物由 TaKaRa 公司合成。

1.2 HeLa 细胞裸鼠皮下移植瘤的制备

将人宫颈癌 HeLa 细胞置于含 10% 小牛血清与青霉素、链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度下连续培养。待细胞长满培养瓶壁 70% ~ 80% 时, 胰蛋白酶消化、传代培养。取对数生长期 HeLa 细胞, 计数后调整细胞密度为 4×10^7 / ml。BALB/c 雌性裸鼠(SPF 清洁级) 20 只, 4 ~ 6 周龄, 体重 14 ~ 20 g, 购自大连医科大学 SPF 动物实验中心[动物合格证号: SCXK(辽)2009], 在 SPF 环境中饲养。取 0.2 ml HeLa 细胞悬液无菌条件下接种于裸鼠背侧近左颈部皮下。接种第 6 天可见肿瘤结节生长, 呈菜花状, 色红、质硬, 表面不平, 待肿瘤生长至直径约 7 mm(约 14 d)时, 动物模型建立成功。

1.3 荷瘤裸鼠皮下移植瘤抑制实验

将 20 只荷瘤鼠随机分为 4 组, 每组 5 只, 对照组(生理盐水组)、RAPA 组(3 mg/kg)、DDP 组(5 mg/kg)、RAPA(3 mg/kg) + DDP(2 mg/kg)组。分别给予等体积溶液 0.2 ml 腹腔注射, RAPA 每日一次, DDP 隔 2 日一次, 疗程 2 周。注射药物期间, 每日观察荷瘤裸鼠的一般状况及皮下移植瘤的生长状态, 隔日用游标卡尺测量肿瘤的最长径(a)和最短径(b), 计算肿瘤体积^[6]: $V = (1/6\pi)ab^2$; 绘制荷瘤裸鼠皮下移植瘤生长曲线。末次给药 48 h 后脱臼处死荷瘤小鼠, 取出肿瘤组织称瘤质量, 部分置于液氮中备用, 其余以 10% 甲醛固定供病理组织学检查。抑瘤率(%) = (对照组瘤质量或体积 - 实验组

瘤质量或体积)/对照组瘤质量或体积 $\times 100\%$ 。

1.4 免疫组织化学法检测肿瘤组织中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达

将甲醛固定的肿瘤组织标本梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡包埋、切片(厚度 2~3 μm),按试剂盒要求操作,加入鼠抗人 VEGF 抗体(工作浓度为 1:100)或兔抗人 HIF-1 α 多克隆抗体(工作浓度为 1:150),孵育后滴加 HRP 标记的二抗 IgG 工作液,室温孵育、DAB 显色、苏木精复染、脱水、封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。HIF-1 α 定位在胞质和/或胞核出现棕黄色颗粒,VEGF 为胞质棕黄色颗粒。在高倍显微镜下选取 5 个视野,用彩色医学图文分析系统测定平均吸光度值(average optical density, AOD)。

1.5 RT-PCR 检测肿瘤组织中 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 的表达

取肿瘤组织,TRIzol 法提取组织总 RNA,逆转录合成 cDNA,PCR 扩增 HIF-1 α 、VEGF,同时扩增 β -actin 作为内参照。检测 HIF-1 α 上游引物序列:5'-AACAAAAACACAGCGAAGC-3',下游引物序列:5'-ATAGTGAATGTGGCCTGTG-3',产物长度 124 bp;VEGF 上游引物序列:5'-AGGGCAGAACATCAGC AAG-3',下游引物序列:5'-ACTCCAGGCCCTCGT-CATTG-3',产物长度:182 bp; β -actin 上游引物序列:5'-TCCTTCTGCATCCTGTCCGCA-3',下游引物序列:5'-CAAGAGATGGCCACGGCTGCT-3',产物长度:23 bp。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min;扩增 35 个循环。反应结束后,取 8 μl RT-PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳,经 UVP 凝胶成像系统照相记录。以 β -actin 为内参照分析 HIF-1 α 、VEGF 各条带灰度值。

1.6 Western blotting 检测移植瘤组织中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达

称取裸鼠移植瘤组织 100 mg,剪切成细小碎片,加入蛋白裂解液充分裂解。BCA 试剂盒检测蛋白浓度,每条泳道蛋白上样量为 60 μg ,100 $^{\circ}\text{C}$ 加热变性 5 min,SDS-PAGE 分离后,湿转到 PVDF 膜,转膜液中浸泡 30 min,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,将膜置于鼠抗人 VEGF 单克隆抗体(1:200)或兔抗人 HIF-1 α 多克隆抗体(1:400)中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,预冷含 Tween-20 磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline with Tween-20, PBST)洗膜 10 min,3 次。加入 HRP 标记二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,预冷 PBST 洗膜 10 min,3 次。ECL 化学发光显色液显色,X 线片显色曝光,洗片。采用 UVP 凝胶成像系统照相,以 β -actin 为内

参照记录各条带的灰度值。

1.7 统计学处理

采用 SPSS11.5 软件,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用 t 检验,多组间数据比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RAPA、DDP 单独或联合治疗对荷瘤裸鼠体质量及一般情况的影响

荷瘤裸鼠 RAPA、DDP 单独或联合治疗前饮食、饮水及活动情况良好,各组间裸鼠体质量无差异。给药后对照组、RAPA 组、RAPA + DDP 组荷瘤裸鼠食欲良好、活动正常、皮毛有光泽,荷瘤裸鼠体质量均随鼠龄增长而增加。而 DDP 组荷瘤裸鼠表现出明显的食欲减退、活动迟缓、皮肤无光泽,随鼠龄的增长体重明显降低,且治疗过程中有 2 只荷瘤裸鼠死亡,荷瘤裸鼠死亡时体质量明显减轻,消瘦,有精神萎靡等严重的化疗反应。其余各组荷瘤裸鼠均存活到实验结束。给药后对照组、RAPA 组及 RAPA + DDP 组荷瘤裸鼠体质量与 DDP 组比较,均大于 DDP 组($P < 0.05$);而对照组、RAPA 组与 RAPA + DDP 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。结果显示:DDP 治疗组荷瘤裸鼠体重明显降低,RAPA 可减轻 DDP 组荷瘤裸鼠体质量降低的程度。

表 1 RAPA 减缓 DDP 治疗组荷瘤裸鼠体质量的降低($\bar{x} \pm s, \text{m/g}$)

Tab.1 RAPA alleviated the decrease of the weight of the nude mice in DDP treatment group ($\bar{x} \pm s, \text{m/g}$)

Group	Before treatment	After treatment
Control	21.20 \pm 1.79	24.40 \pm 1.67
RAPA	19.20 \pm 1.79	23.20 \pm 2.28
DDP	20.67 \pm 1.15	15.33 \pm 1.15*
RAPA + DDP	20.40 \pm 2.61	22.80 \pm 2.68 $^{\Delta}$

* $P < 0.05$ vs control group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs DDP group

2.2 联合用药组裸鼠移植瘤抑瘤率增高

与对照组相比,荷瘤裸鼠移植瘤质量在 RAPA 组[(0.53 \pm 0.03) vs (0.92 \pm 0.08) $P < 0.05$], DDP 组[(0.52 \pm 0.04) vs (0.92 \pm 0.08) $P < 0.05$]及 RAPA + DDP 组[(0.42 \pm 0.04) vs (0.92 \pm 0.08), $P < 0.05$]中均减小;RAPA + DDP 组荷瘤裸鼠移植

瘤质量与 RAPA 组、DDP 组相比出现减小 ($P < 0.05$); 而 RAPA 组与 DDP 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果提示: RAPA、DDP 单独用药能有效抑制荷瘤裸鼠移植瘤的生长, RAPA 与 DDP 联合用药对荷瘤裸鼠移植瘤的生长抑制作用更为明显。

2.3 RAPA 增强 DDP 对移植瘤生长的抑制作用

观察荷瘤裸鼠皮下移植瘤体积, 可见对照组体积增长迅速, 肿瘤表面可见明显血管样结构, 肿瘤呈粉红色, 周边部可见坏死组织; 各实验组移植瘤体积增长相对缓慢, 周边偶见坏死组织。结果(图1)显示, 与对照组相比, 用药7 d 后荷瘤裸鼠移植瘤体积在 RAPA 组 [(797.81 ± 111.98) vs (1227.46 ± 56.65) , $P < 0.01$], DDP 组 [(766.16 ± 132.27) vs (1227.46 ± 56.65) , $P < 0.01$] 及 RAPA + DDP 组 [(568.70 ± 36.12) vs (1227.46 ± 56.65) , $P < 0.01$] 中均减小; 且 RAPA + DDP 组荷瘤裸鼠移植瘤体积与 RAPA 组、DDP 组相比, 进一步减小; 而 RAPA 组与 DDP 组之间无统计学意义 ($P > 0.05$)。因此, RAPA、DDP 单独用药组对移植瘤生长具有抑制作用, RAPA 与 DDP 联合对移植瘤生长产生抑制作用更为明显。

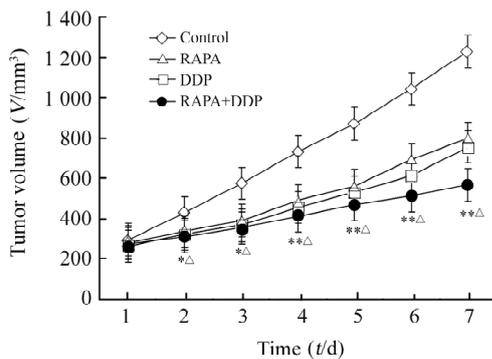


图1 RAPA 增强 DDP 对裸鼠皮下移植瘤生长的抑制作用
Fig.1 RAPA enhanced the inhibitory effect of DDP on the growth of subcutaneous xenograft in tumor-bearing nude mice

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group;
△ $P < 0.05$ vs RAPA or DDP group

2.4 RAPA 联合 DDP 下调移植瘤中 HIF-1α 和 VEGF mRNA 和蛋白的表达

RT-PCR 结果(图2)显示, RAPA 组、DDP 组移植瘤组织中 HIF-1α mRNA 的表达较对照组降低 [(50.58 ± 1.25) 、 (48.63 ± 1.56) vs (67.66 ± 0.80) , $P < 0.05$], 且 RAPA 联合 DDP 后, 移植瘤中

HIF-1α mRNA 水平进一步降低 [(31.22 ± 0.71) vs (50.58 ± 1.25) 、 (48.63 ± 1.56) , $P < 0.05$]; Western blotting 结果(图3)进一步证实, RAPA、DDP 单独处理可降低移植瘤中 HIF-1α 蛋白的表达水平 [(55.69 ± 3.60) 、 (59.50 ± 1.54) vs (85.78 ± 2.79) , $P < 0.05$], 同样, RAPA 联合 DDP 作用后, 移植瘤组织中 HIF-1α 蛋白水平较 RAPA、DDP 单独处理组降低 [(38.07 ± 0.09) vs (55.69 ± 3.60) 、 (59.50 ± 1.54) , $P < 0.05$].

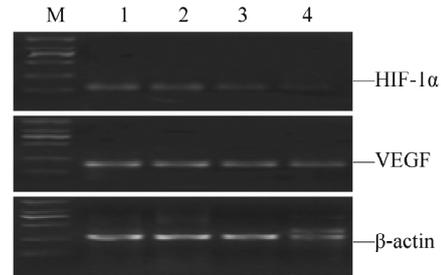


图2 RAPA 联合 DDP 治疗后移植瘤组织中 HIF-1α 和 VEGF mRNA 的表达
Fig. 2 Expressions of HIF-1α and VEGF mRNA in xenograft tissues after RAPA and DDP combination treatment

M: Marker; 1: Control; 2: RAPA;
3: DDP; 4: RAPA + DDP

此外, RT-PCR 结果(图2)显示, RAPA 组、DDP 组移植瘤组织中 VEGF mRNA 的表达较对照组降低 [(62.20 ± 0.62) 、 (61.64 ± 1.21) vs (74.22 ± 1.82) , $P < 0.05$], 且 RAPA 联合 DDP 后, 移植瘤组织中 VEGF mRNA 水平进一步降低 [(46.64 ± 0.60) vs (62.20 ± 0.62) 、 (61.64 ± 1.21) , $P < 0.05$]; Western blotting 结果(图3)进一步证实, RAPA、DDP 单独处理可降低移植瘤中 VEGF 蛋白的表达水平 [(150.31 ± 4.77) 、 (153.84 ± 3.39) vs (183.17 ± 1.15) , $P < 0.05$], 同样, RAPA 联合 DDP 作用后, 移植瘤中 VEGF 蛋白表达水平较 RAPA、DDP 单独处理组降低 [(119.28 ± 2.69) vs (150.31 ± 4.77) 、 (153.84 ± 3.39) , $P < 0.05$]. 因此, RAPA、DDP 单独用药可下调移植瘤组织中 HIF-1α 和 VEGF mRNA 及蛋白的表达, 联合用药后 HIF-1α 和 VEGF mRNA 及蛋白表达下调更为明显(图4)。

2.5 RAPA 与 DDP 联合用药降低移植瘤组织中 HIF-1α 和 VEGF 的表达

免疫组化结果(图5)显示 HIF-1α 在胞质及胞

核中均着色,而 VEGF 着色主要分布在胞质。各实验组 HIF-1 α 及 VEGF 的阳性细胞数均少于对照组。进一步分析 RAPA 组、DDP 组及 RAPA + DDP 组平均光密度值(AOD)值发现,RAPA + DDP 组、RAPA 组、DDP 组的 AOD 值显著低于对照组($P < 0.05$),且 RAPA + DDP 组 AOD 值低于 RAPA 组和 DDP 组($P < 0.05$);而 RAPA 组与 DDP 组 AOD 值之间差异无统计学意义($P > 0.05$,表 2)。因此,RAPA、DDP 单独用药降低了移植瘤组织中 HIF-1 α 和 VEGF 阳性细胞数和 AOD 值,而 RAPA 与 DDP 联合用药组较 RAPA、DDP 单独用药组的 HIF-1 α 和 VEGF 阳性细胞数和 AOD 值降低更为明显。

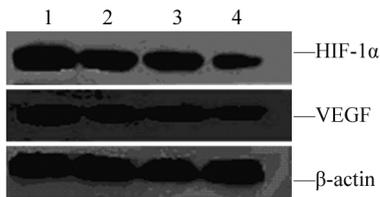


图 3 RAPA 联合 DDP 治疗后移植瘤组织中 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白的表达

Fig.3 Protein expressions of HIF-1 α and VEGF in xenograft tissues after RAPA and DDP combination treatment

1: Control; 2: RAPA; 3: DDP; 4: RAPA + DDP

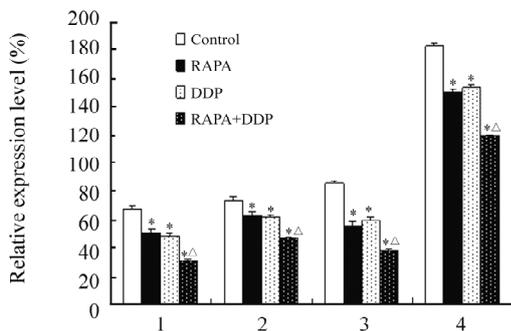


图 4 RAPA 与 DDP 协同抑制移植瘤组织中 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 及蛋白的表达

Fig.4 RAPA combined with DDP synergistically inhibited mRNA and protein expressions of HIF-1 α and VEGF in xenograft tissues

1: HIF-1 α mRNA; 2: VEGF mRNA;
3: HIF-1 α protein; 4: VEGF protein

* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs RAPA or DDP group

表 2 RAPA 联合 DDP 治疗后移植瘤组织中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Expressions of HIF-1 α and VEGF proteins in xenograft tissues after RAPA and DDP combination treatment ($\bar{x} \pm s$)

Group	HIF-1 α	VEGF
Control	1.16 \pm 0.03	1.32 \pm 0.05
RAPA	0.57 \pm 0.07*	0.62 \pm 0.04*
DDP	0.55 \pm 0.06*	0.61 \pm 0.07*
RAPA + DDP	0.37 \pm 0.03* Δ	0.48 \pm 0.03* Δ

* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs RAPA or DDP group

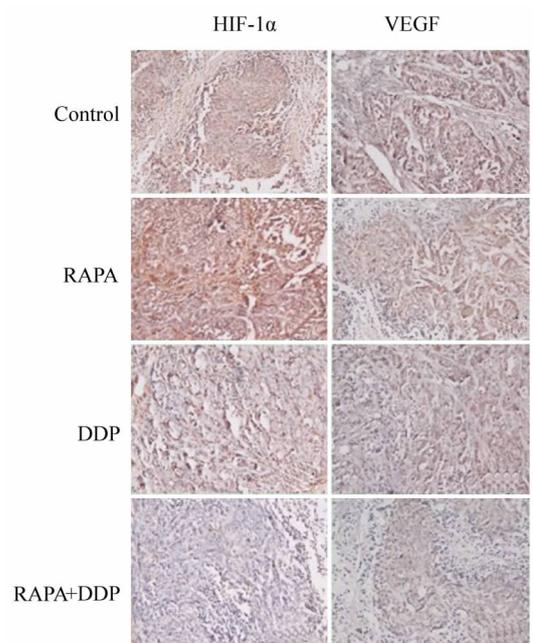


图 5 RAPA 与 DDP 联合用药后移植瘤组织中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达($\times 400$)

Fig.5 Expressions of HIF-1 α and VEGF proteins in xenograft tissues after RAPA and DDP combination treatment ($\times 400$)

3 讨论

mTOR 是细胞增殖相关信号分子,与多种肿瘤的发生、发展密切相关^[7-9]。近年来针对肿瘤信号通路的分子靶向治疗成为一种很有前景的肿瘤治疗策略^[10-12]。mTOR 抑制剂 RAPA 及其衍生物以其强效的抗肿瘤增殖的性能而被广泛认知^[13]。除作为单药使用外,RAPA 与多种化疗药物具有协同应用,可恢复肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,提高化疗药物在肿

瘤治疗中的疗效^[4]。

DDP 是一种广泛使用的化疗药物, 已被认为是治疗包括宫颈癌在内的各种实体肿瘤最有效的临床药物之一, 但因其非特异性的毒性作用尤其在高剂量时的肾毒性、神经毒性, 限制了其在临床上的使用及其疗效。Yuan 等^[14]在卵巢癌、乳腺癌, Liu 等^[4]在肺癌中的研究发现, mTOR 活性增强是导致 DDP 耐药的原因, 提示 mTOR 抑制剂 RAPA 可逆转 DDP 的耐药。RAPA 和 DDP 在多种肿瘤细胞中通过抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡而表现出协同效应。BaeJump 等^[15]研究证明, RAPA 联合 DDP 对体外培养的子宫内膜癌细胞株有强大的协同抑制作用; 刘勇等^[16]的研究也证明了 RAPA 联用 DDP 对体外培养的宫颈癌 HeLa 细胞增殖的协同抑制作用, 且这种抑制作用呈时间依赖性。

本研究选用宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠皮下移植瘤为实验模型, 进一步探讨 RAPA 联合 DDP 对移植瘤生长的影响, 结果显示: RAPA 联合 DDP 较单独应用 RAPA 及 DDP, 对移植瘤生长的抑制作用更明显。本研究中联合用药组 DDP 的剂量减少了 3/5, 不仅降低了 DDP 的毒性作用, 且联合 RAPA 后产生了较两药单用更明显的疗效, 因此 RAPA 不仅可抑制肿瘤的生长, 还提高了 DDP 的效果。本研究结果还显示: RAPA 组、RAPA + DDP 组裸鼠体质量增加、生长良好, 而 DDP 单独治疗组裸鼠体质量减轻并死亡 2 只, 说明 RAPA 联合 DDP 较 DDP 单药应用具有较轻的毒性反应。Podsypanina 等^[17]研究表明, RAPA 虽对肿瘤细胞具有杀伤作用, 但不会杀伤正常细胞。但 RAPA 联合 DDP 应用于宫颈癌荷瘤裸鼠模型体内实验, 并未得到 BaeJump 等^[15]在子宫内膜癌体外实验中那样强大的协同抑制作用, 其原因尚待进一步研究。

宫颈癌组织高表达 HIF-1 α 是导致多种抗肿瘤治疗失败的重要原因。HIF-1 α 可调节多种靶基因如 VEGF 的表达, 影响肿瘤新生血管的生成、促进肿瘤的增殖和转移。本课题组前期研究^[18]表明, HIF-1 α 可在转录水平调控 VEGF 的表达, 因此, 可通过抑制 HIF-1 α 及 VEGF 表达达到治疗肿瘤的目的。RAPA 能在转录和翻译水平阻断 HIF-1 α 的表达, 抑制 HIF-1 α 对血管内皮细胞生长的刺激作用, 以及 VEGF 诱导的血管内皮细胞的生长和迁移, 具有抗肿瘤作用。本研究进一步采用免疫组化、RT-PCR 及 Western blotting 等技术检测移植瘤组织中 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 及蛋白的表达, 结果均显示: 联合用药组移植瘤组织中, HIF-1 α 和 VEGF mRNA 及蛋白的表达明显下调。提示 RAPA 与 DDP 联合用药抑制移植瘤生长

的可能机制之一为: RAPA 下调移植瘤组织中 HIF-1 α 、VEGF 基因的转录和表达, 抑制肿瘤血管形成, 进一步提高肿瘤细胞对化疗药物 DDP 的敏感性, 高效抑制肿瘤细胞的生长。Jiang 等^[19]在卵巢癌裸鼠皮下移植瘤体内实验中的结果同样显示: 联合应用 RAPA 与紫杉醇可抑制移植瘤组织中 HIF-1 α 和 VEGF 的表达, 降低肿瘤微血管密度。Huang 等^[20]研究表明, RAPA 使肿瘤细胞较多的阻滞于 G₁ 期, DDP 可明显杀伤 G₁ 期细胞, 并且随着时间和 DDP 浓度的增加而增加。本实验中 RAPA 与 DDP 联合应用显著抑制宫颈癌裸鼠移植瘤的生长, 也可能是在细胞周期阻滞方面具有协同作用。

综上所述, RAPA 与 DDP 联合应用可显著抑制宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠皮下移植瘤的生长, 下调移植瘤组织中 HIF-1 α 、VEGF 的表达是其可能的机制之一。RAPA 可以考虑作为一种辅助药物与化疗药物配伍应用, 可在产生同等疗效的前提下减少 DDP 的用量, 减轻 DDP 的毒性反应, 从而为宫颈癌分子靶向治疗配伍辅助化疗提供了一种新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] Hidalgo M, Rowinsky EK. The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy [J]. *Oncogene*, 2000, 19(56): 6680-6686.
- [2] Bae-Jump VL, Zhou C, Boggess JF, et al. Rapamycin inhibits cell proliferation in type I and type II endometrial carcinomas: A search for biomarkers of sensitivity to treatment [J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 119(3): 579-585.
- [3] 刘兆龙, 阎波, 罗芸葆, 等. 雷帕霉素抑制胆囊癌 GBC-SD 细胞的生长和转移 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(6): 600-603.
- [4] 王炜, 高玉环, 王彬, 等. 雷帕霉素对人淋巴瘤 Raji 细胞株增殖影响及其机制的探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2011, 18(23): 1843-1846.
- [5] Liu LZ, Zhou XD, Qian GS, et al. AKT1 amplification regulates cisplatin resistance in human lung cancer cells through the mammalian target of rapamycin/p70s6k1 pathway [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(13): 6325-6332.
- [6] Guba M, von Breitenbuch P, Steinbuehler M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by anti-angiogenesis: Involvement of vascular endothelial growth factor [J]. *Nat Med*, 2002, 8(2): 128-135.
- [7] Lin HJ, Hsieh FC, Song H, et al. Elevated phosphorylation and activation of PDK-1, AKT pathway in human breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(12): 1372-1381.
- [8] Majumder PK, Sellers WR. Akt-regulated pathways in prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2005, 24(50): 7465-7474.
- [9] Tsurutani J, West KA, Sayyah J, et al. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway

- but not the MEK/ERK pathway attenuates laminin-mediated small cell lung cancer cellular survival and resistance to imatinib methylate or chemotherapy [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(18): 8423-8432.
- [10] 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.
- [11] Noh WC, Kim YH, Kim MS, et al. Activation of the mTOR signaling pathway in breast cancer and its correlation with the clinic pathologic variables [J]. *Breast Cancer Treat*, 2008, 110(3): 477-483.
- [12] Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, et al. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/ mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients [J]. *Oncotarget*, 2010, 1(2): 89-103.
- [13] Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: A target for cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(5): 335-348.
- [14] Yuan ZQ, Richard IF, Gene ES, et al. AKT2 inhibition of cisplatin induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(26): 23432-23440.
- [15] BaeJung VL, Zhou C, Boggess JF, et al. Synergistic effect of rapamycin and cisplatin in endometrial cancer cells [J]. *Cancer*, 2009, 115(17): 3887-3896.
- [16] 刘勇, 方勇, 汪辉, 等. 雷帕霉素在顺铂诱导 HeLa 细胞凋亡中的协同作用 [J]. *华中医学杂志*, 2009, 33(6): 300-303.
- [17] Podsypanina K, Lee RT, Politis C, et al. An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in PTEN^{+/-} mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(18): 10320-10325.
- [18] 韩璐, 尤庆山, 曲学龄, 等. HIF-1 α 基因转染宫颈癌细胞对 VEGF 表达的影响 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2006, 22(4): 287-288.
- [19] Jiang H, Feng Y. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) correlated with tumor growth and apoptosis in ovarian cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(Suppl): 405-412.
- [20] Huang S, Liu L N, Hosoi H, et al. p53/p21(CIP1) cooperate in enforcing rapamycin-induced G₁ arrest and determine the cellular response to rapamycin [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(8): 3373-3381.
- [收稿日期] 2012 - 10 - 07 [修回日期] 2012 - 11 - 21
[本文编辑] 周玲琳

· 读者 · 作者 · 编者 ·

常见参考文献著录格式示例

1 专著

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 其他责任者(例如翻译者). 版本项(1 版不著录). 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

- [1] Abrams WB, Beers MH, Berkow R. 默克老年病手册 [M]. 陈灏珠, 王赞舜, 刘厚钰, 等. 译. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 22-25.

2 专著析出文献

著录格式: 析出文献主要责任者. 文献题名[文献类型标志]//专著主要责任者. 专著题名. 版本项. 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

- [1] Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms [M]//Soderman WA Jr, Soderman WA. Pathologic physiology: Mechanisms of disease. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-472.

3 期刊文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页-止页.

- [1] Nobles KN, Guan Z, Xiao K, et al. The active conformation of beta-arrestin 1: Direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins 1 and -2 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(29): 21370-21381.

4 专利文献

著录格式: 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利号[文献类型标志]. 公告日期或公开日期.

- [1] 钱其军, 李琳芳, 吴红平, 等. 一种多功能免疫杀伤转基因细胞(PIK)、其制备方法及应用: 中国, 2010101496839 [P]. 2010-10-14.

5 学位论文

著录格式: 责任者. 题名[文献类型标志]. 学位授予单位所在地: 学位授予单位, 年.

- [1] 曹新广. Cathepsin L 和 Cystatin B 的表达与大肠癌生物学行为的关系 [D]. 郑州, 郑州大学, 2007.

6 电子文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志/文献载体标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页-止页(更新或修改日期) [引用日期]. 获取和访问路径.

- [1] Christine M. Plant physiology: Plant biology in the genome era [J/OL]. *Science*, 1998, 281: 331-332 [1998-09-23]. <http://www.sciencemag.org/cgi/collection/anatmorp>.
- [2] Hopkinson A. UNIMARC and metadata: Dublin core [EB/OL]. [1999-12-08]. <http://www.ifla.org/IV/ifla64/138-161e.htm>.