

西罗莫司对肝癌HepG2细胞的增殖及mTOR、HIF-1 α 的抑制作用

王渝, 熊晶, 程恒辉, 周晟, 赵秋

王渝, 熊晶, 程恒辉, 周晟, 华中科技大学同济医学院附属同济医院病理科 湖北省武汉市 430030

赵秋, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

作者贡献分布: 此课题由赵秋与王渝设计; 研究过程由王渝与周晟操作完成; 数据分析由王渝、熊晶及程恒辉完成; 本论文写作由赵秋与王渝完成。

通讯作者: 赵秋, 教授, 430030, 湖北省武汉市汉口区解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。

tongji461@sina.com

电话: 027-83663611

收稿日期: 2009-09-10 修回日期: 2009-10-22

接受日期: 2009-10-26 在线出版日期: 2009-11-08

Sirolimus inhibits cell proliferation and downregulates mTOR and HIF-1 α expression in human hepatic carcinoma HepG2 cells

Yu Wang, Jing Xiong, Hen-Hui Cheng, Sheng Zhou, Qiu Zhao

Yu Wang, Jing Xiong, Hen-Hui Cheng, Sheng Zhou, Department of Pathology, Tongji Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Qiu Zhao, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Qiu Zhao, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Avenue, Hankou District, Wuhan 430030, Hubei Province, China. tongji461@sina.com

Received: 2009-09-10 Revised: 2009-10-22

Accepted: 2009-10-26 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effects of sirolimus on cell proliferation and mammalian target of rapamycin (mTOR) and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression in human hepatic carcinoma HepG2 cells, and explore the potential mechanisms involved in the therapeutic effects of sirolimus against hepatic carcinoma.

METHODS: HepG2 cells were cultured under hypoxic conditions. Different concentrations of sirolimus (0.1-1000 nmol/L) were incubated

with HepG2 cells for 24 hours. Cell proliferation was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The expression of mTOR and HIF-1 α proteins was determined by Western blot.

RESULTS: Sirolimus could significantly inhibit the proliferation of HepG2 cells in a concentration-dependent manner (all $P < 0.05$). The expression levels of mTOR and HIF-1 α proteins were significantly lower in sirolimus-treated HepG2 cells than in untreated cells (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Sirolimus exerts anticancer activity possibly by downregulating HIF-1 α expression and inducing apoptosis in HepG2 cells under hypoxia conditions via a mechanism dependent on the mTOR signaling pathway.

Key Words: Sirolimus; Hepatic carcinoma; Mammalian target of rapamycin; hypoxia inducible factor-1 α

Wang Y, Xiong J, Cheng HH, Zhou S, Zhao Q. Sirolimus inhibits cell proliferation and downregulates mTOR and HIF-1 α expression in human hepatic carcinoma HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3241-3243

摘要

目的: 观察西罗莫司对体外培养的肝癌HepG2细胞增殖及mTOR、HIF-1 α 基因的抑制作用, 探讨以mTOR为靶点治疗肝癌可能的细胞内信号转导机制。

方法: 缺氧培养HepG2细胞, 外源性给予不同浓度的西罗莫司(0.1-1000 nmol/L)刺激细胞24 h, MTT法检测不同浓度药物对肝癌细胞增殖的影响。Western blot法检测药物刺激后HepG2细胞内mTOR和HIF-1 α 蛋白的表达。

结果: 西罗莫司可显著抑制肝癌细胞HepG2的增殖, 其抑制率随药物浓度的增加而上升(均 $P < 0.05$)。在西罗莫司的干预下, HepG2细胞中mTOR和HIF-1 α 蛋白的表达水平显著下降, 实验组与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

背景资料

西罗莫司, 原称雷帕霉素, 是从吸水性链霉菌发酵液中提取出的一种大环内酯类抗生素, 是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)特异性抑制剂, 起初作为一种器官移植抗排斥的新型高效免疫抑制剂, 新近研究发现他还具有良好的抗肿瘤活性, 但其抗肿瘤分子机制尚待进一步研究。

同行评议者
党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

创新盘点

本文通过外源性给予不同浓度的西罗莫司,观察缺氧条件下药物对肝癌细胞增殖及mTOR、HIF-1 α 基因表达的影响,探讨以mTOR为靶点治疗肝癌的可行性及分子生物学基础。

结论:在缺氧条件下,西罗莫司可通过mTOR信号转导途径下调肝癌HepG2细胞内HIF-1 α 蛋白表达,诱导细胞凋亡,这可能是西罗莫司发挥抗肿瘤效应的机制之一。

关键词:西罗莫司;肝癌;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;缺氧诱导因子-1 α

王渝,熊晶,程恒辉,周晟,赵秋.西罗莫司对肝癌HepG2细胞的增殖及mTOR、HIF-1 α 的抑制作用.世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3241-3243

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3241.asp>

0 引言

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种高度保守的蛋白质,具有蛋白激活酶的活性,在许多人类肿瘤中高表达;与肿瘤的发生、发展,正常细胞向癌细胞转化以及癌细胞的生长增殖密切相关^[1]。西罗莫司,是mTOR特异性抑制剂,起初作为一种器官移植抗排斥新型高效免疫抑制剂。近年来,有研究发现他具有良好的抗肿瘤活性。本研究拟选取人肝癌HepG2细胞系,观察不同浓度的西罗莫司对HepG2细胞增殖及mTOR和HIF-1 α 基因表达的影响,探讨以mTOR为靶点治疗肝癌的可行性及分子生物学基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌HepG2细胞株由本所冻存。西罗莫司购自福建科瑞药业,兔抗人mTOR多克隆抗体购自Santa Cruz,鼠抗人HIF-1 α mAb购自RnD。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:常氧培养:细胞置于37℃、50 mL/L CO₂的普通CO₂培养箱内培养。缺氧培养:细胞置于37℃、10 mL/L O₂、50 mL/L CO₂、940 mL/L N₂的三气培养箱中培养。

1.2.2 分组:将细胞随机分为4组:(1)常氧对照组,不添加任何药物;(2)缺氧对照组,不添加任何药物;(3)低剂量药物组(10 nmol/L西罗莫司);(4)高剂量药物组(1000 nmol/L西罗莫司)。细胞常氧培养24 h后,将后3组细胞转置于缺氧培养箱中缺氧培养24 h。

1.2.3 MTT法检测西罗莫司对HepG2细胞增殖的抑制作用:取对数生长期的细胞制成单细胞悬液,按每孔 1×10^4 个细胞接种进96孔板中,常氧培养24 h后,分别加入终浓度为0.1、1、10、100、1000 nmol/L的西罗莫司,每浓度设4个复孔,以不含西罗莫司培养基的细胞作为阴性对

照,空白孔调零。继续培养24 h后,每孔加MTT 20 μ L,4 h后弃上清,每孔加DMSO 150 μ L,振荡10 min,492 nm测定各孔的吸光值(A值)。按以下公式计算抑制率:抑制率(%) = (1-试验组平均A值/对照组平均A值) \times 100%

1.2.4 Western blot法检测各组细胞内mTOR、HIF-1 α 蛋白的表达:提取各组细胞总蛋白,测定蛋白含量。蛋白经SDS-PAGE电泳分离,电转至NC膜上,50 g/L的脱脂奶粉37℃封闭2 h。分别加入兔抗人mTOR一抗(1:200)、兔抗人HIF-1 α 一抗(1:200)和鼠抗人 β -actin一抗(1:100)4℃孵育过夜,TBST洗3次,1:3000加入HRP标记的羊抗兔IgG或羊抗鼠IgG,37℃孵育1 h,ECL显色,压片曝光,洗片。

统计学处理 所有实验数据均以mean \pm SD,用SPSS13.0统计软件进行数据分析,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用S-N-K检验。

2 结果

2.1 西罗莫司对SW1990细胞增殖的影响 MTT结果显示,不同浓度的西罗莫司均能有效抑制HepG2细胞的增殖,且其抑制率随药物浓度的增加而上升。在0.1、1、10、100、1000 nmol/L药物梯度,细胞生长的抑制率分别为39.35% \pm 3.47%、43.47% \pm 4.25%、51.12% \pm 2.31%、60.23% \pm 1.76%、69.52% \pm 2.60%。随着药物作用浓度的增大,细胞生长抑制率呈显著上升趋势(均 $P < 0.05$)。

2.2 西罗莫司对mTOR、HIF-1 α 蛋白表达的影响 Western blot结果显示(图1),mTOR蛋白在缺氧对照组细胞内的表达与空白对照组相比无明显差异;空白对照组细胞内HIF-1 α 蛋白的表达较弱,缺氧对照组HIF-1 α 蛋白的表达明显增强,2组间存在显著性差异($P < 0.05$)。在不同药物浓度组,西罗莫司均可明显抑制HepG2细胞内mTOR、HIF-1 α 蛋白的表达,并且这种抑制作用与药物作用浓度密切相关(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

西罗莫司(silormimus),原称雷帕霉素(rapamycin),是Ayerst研究所从太平洋Easter岛土壤样品中分离的大环内酯类抗生素。起初作为一种器官移植抗排斥的新型高效免疫抑制剂,近年来研究发现他还具有良好的抗肿瘤活性。西罗莫司在哺乳动物细胞内的靶点是mTOR,他进入细胞后与FKBP12结合,形成一种“功能获得性”复合物-rapamycin/FKBP12,强烈抑制mTOR的蛋白激酶催化活性,使之对其下游底物的磷酸化调节作用减弱或消失^[2-4]。目前,西罗莫司对肿

应用要点

本研究结果提示,mTOR信号转导通路有望成为癌症分子治疗中又一极具潜力的靶点,为恶性肿瘤的靶向治疗提供新的途径。

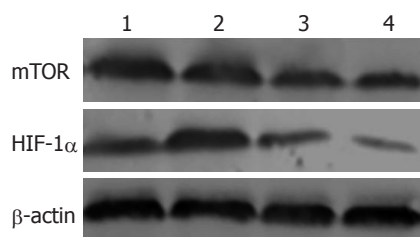


图1 西罗莫司对肝癌细胞mTOR、HIF-1 α 蛋白表达的影响。1: 常氧对照组; 2: 缺氧对照组; 3: 低剂量药物组(10 nmol/L西罗莫司); 4: 高剂量药物组(1000 nmol/L西罗莫司)。

瘤细胞生长的抑制作用和促进凋亡的作用已经在多种肿瘤中得到证实^[5-7]。mTOR作为一种重要的调节基因, 不仅在正常细胞的生长增殖中起着极其重要的作用, 而且与正常细胞向癌细胞转化以及癌细胞的生长增殖密切相关, 是细胞生长、分化的中心调控者^[8-9]。因此深入研究mTOR基因及其信号通路, 可能为肿瘤的靶向治疗提供新的思路和方法。本研究通过给予不同浓度的西罗莫司干预人肝癌HepG2细胞, 采用Western blot法检测各组中mTOR的表达水平, 发现西罗莫司对mTOR的表达有明显抑制作用, 且西罗莫司作用浓度越高, 其抑制作用越强。

HIF-1 α 是目前发现的氧依赖的信号传递途径当中极其重要的一个转录因子, 其高水平表达与肿瘤的发生、发展和转移密切相关^[10-12]。HIF-1 α 能激活多种缺氧适应性基因如VEGF、EPO、NOS等的表达, 对维持肿瘤细胞的能量代谢、刺激新血管生成、促进肿瘤增殖和转移起重要作用^[13-15]。有研究提示^[16]西罗莫司作为一种高度特异的mTOR抑制剂, 既能抑制HIF-1 α 的合成, 又能增加其降解, 并能调节HIF-1 α 基因调控的其他基因的表达。本研究结果显示, 不同浓度的药物均可显著抑制HIF-1 α 蛋白的表达。此外, 随着药物作用浓度的增高, HIF-1 α 蛋白的表达水平呈下降趋势, 进一步表明西罗莫司可通过mTOR信号途径在蛋白水平上调控HIF-1 α 基因的表达。

总之, 西罗莫司对肝癌HepG2细胞的增殖有明显的抑制作用。在缺氧条件下, 西罗莫司可显著抑制HepG2细胞中mTOR、HIF-1 α 的表达, 表明西罗莫司可能通过抑制mTOR信号转导途径下调HepG2细胞内HIF-1 α 的表达, 进而抑制肿瘤的增殖。本研究结果提示mTOR信号转导通路有望成为癌症分子治疗中又一极具潜力的靶点, 为恶性肿瘤的靶向治疗提供新的途径。

4 参考文献

- Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000; 103: 253-262
- Huang S, Houghton PJ. Inhibitors of mammalian target of rapamycin as novel antitumor agents: from bench to clinic. *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3: 295-304
- Chen F, Omasa M, Kondo N, Fujinaga T, Shoji T, Sakai H, Bando T. Sirolimus treatment for recurrent lymphangioleiomyomatosis after lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 2009; 87: e6-e7
- Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004; 18: 1926-1945
- Hidalgo M, Rowinsky EK. The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene* 2000; 19: 6680-6686
- Benito AI, Furlong T, Martin PJ, Anasetti C, Appelbaum FR, Doney K, Nash RA, Papayannopoulou T, Storb R, Sullivan KM, Witherspoon R, Deeg HJ. Sirolimus (rapamycin) for the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 2001; 72: 1924-1929
- Cejka D, Preusser M, Fuehrer T, Sieghart W, Werzowa J, Strommer S, Wacheck V. mTOR inhibition sensitizes gastric cancer to alkylating chemotherapy in vivo. *Anticancer Res* 2008; 28: 3801-3808
- Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol* 2005; 16: 525-537
- Pene F, Claessens YE, Muller O, Viguié F, Mayeux P, Dreyfus F, Lacombe C, Bouscary D. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene* 2002; 21: 6587-6597
- Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000; 88: 1474-1480
- Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; 394: 485-490
- Jung HJ, Park JW, Lee JS, Lee SR, Jang BC, Suh SI, Suh MH, Baek WK. Silibinin inhibits expression of HIF-1 α through suppression of protein translation in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 71-76
- Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732
- Wang W, Xu GL, Jia WD, Wang ZH, Li JS, Ma JL, Ge YS, Xie SX, Yu JH. Expression and correlation of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor and microvessel density in experimental rat hepatocarcinogenesis. *J Int Med Res* 2009; 37: 417-425
- Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 705-713
- Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 7004-7014

同行评价
本研究设计合理, 结论对于阐述西罗莫司发挥抗肿瘤效应的机制有一定的意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕