

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.02.004

文章编号: 1005-8982(2016)02-0019-05

论著

雷帕霉素对人淋巴瘤细胞株 Raji 细胞增殖抑制与自噬的机制研究

王炜¹, 殷玉红¹, 王志彬¹, 林鹏¹, 高玉环²

(1.河北省保定市第一中心医院 血液科, 河北 保定 071000; 2.河北医科大学第四医院暨河北省肿瘤医院 血液科, 河北 石家庄 050011)

摘要:目的 探讨雷帕霉素(宜欣可)对人淋巴瘤细胞株 Raji 细胞体外生长影响及诱导自噬的发生,并探讨可能的分子机制。**方法** MTT 法检测不同浓度(0、1、5、10、20、40、50 及 100 nmol/L)雷帕霉素作用不同时间(24、48 及 72 h)对 Raji 细胞增殖的影响。流式细胞仪测定雷帕霉素对 Raji 细胞周期分布和凋亡的影响。透射电镜观察 Raji 细胞形态学变化。Western blot 方法检测雷帕霉素处理前后对 Raji 细胞自噬蛋白 Beclin1 的影响。**结果** 雷帕霉素对 Raji 细胞增殖有明显的抑制作用($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。呈现明显的剂量-效应和时间-效应依赖关系。雷帕霉素明显抑制 Raji 细胞周期发展($P < 0.05$),但没有发生明显的凋亡($P > 0.05$)。透射电镜观察到经 100 nmol/L 雷帕霉处理 72 h 后的 Raji 细胞胞质内有大量自噬体和自噬溶酶体。Western blot 方法检测到 0、1、10 及 100 nmol/L 雷帕霉处理 72 h 后 Beclin1 蛋白表达逐渐上升,且呈浓度依赖性。**结论** 雷帕霉素通过阻滞细胞周期发展抑制 Raji 细胞增殖,诱导 Raji 细胞发生自噬但不能诱导其凋亡。

关键词: 雷帕霉素;淋巴瘤;细胞增殖;自噬

中图分类号: R733.4

文献标识码: A

Rapamycin inhibits proliferation and induces autophagy of human Burkitt lymphoma cells

Wei Wang¹, Yu-hong Yin¹, Zhi-bin Wang¹, Peng Lin¹, Yu-huan Gao²

(1. Department of Hematology, the First Central Hospital of Baoding, Baoding, Hebei 071000, China; 2. Department of Hematology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Rapamycin on growth and autophagy of human Burkitt lymphoma cell line Raji cells and the possible mechanism. **Methods** Effect of Rapamycin in different concentrations (0, 1, 5, 10, 20, 40, 50 and 100 nmol/L) on proliferation of Raji cells at different time (24, 48 and 72 h) was detected by MTT assay. Apoptosis and cell cycle were analyzed using flow cytometry. The morphological changes were confirmed using transmission electron microscopy. The expression of Beclin1 protein was examined by Western blot technique in the Rapamycin-treated and untreated Raji cells. **Results** Rapamycin inhibited the proliferation of Raji cells at concentrations higher than 5 nmol/L ($P < 0.05$) and in a dose- and time-dependent manner. After treatment with Rapamycin, the number of cells in S phase and G₂/M phase gradually decreased ($P < 0.05$), but that in G₀/G₁ phase significantly increased in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.05$). However, it did not cause evident apoptosis in Raji cells. Using electron microscope, some large autolysosomes and vacuoles were observed in Raji cells treated with 100 nmol/L Rapamycin for 72 h. Raji cells treated with 0, 1, 10 and 100 nmol/L Rapamycin showed a dose-dependent up-regulation of expression of Beclin1 protein, the classic marker for antophagy. **Conclusions** Rapamycin inhibits Raji cell pro-

liferation by cell cycle arrest in G₀/G₁ phase and induces autophagy.

Keywords: Rapamycin; lymphoma; proliferation; autophagy

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是重要的信号传导分子,其介导的信号转导通路异常与多种肿瘤的发生有关,已成为肿瘤治疗的新靶点^[1]。自噬作为真核生物的细胞降解、再利用大分子和细胞器的一条主要的分解代谢途径,在生理和各种病理过程中均可被激活^[2],其在肿瘤的发生、发展中具有重要作用。有研究表明^[3], mTOR 对细胞自噬起负向调控作用,提示 mTOR 的特异性抑制剂雷帕霉素(rapamycin, RAPA)可能通过激活自噬来达到抗肿瘤作用。Burkitt 淋巴瘤(Burkitt lymphoma, BL)是一种与 EB 病毒(Epstein Barr virus, EBV)感染相关的侵袭性淋巴瘤。本研究利用雷帕霉素作用于人 Burkitt 淋巴瘤 raji 细胞株,观察其对肿瘤细胞的影响,并研究自噬在其过程中所扮演的角色,为未来的肿瘤治疗提供新的治疗依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及培养

人淋巴瘤细胞株 Raji 细胞由河北省医科大学第四医院科研中心提供。将细胞于含 10%的胎牛血清(FBS)、100 IU/ml 青霉素和 100 IU/ml 链霉素 RPMI 1640 培养基中,37℃饱和湿度和 5%二氧化碳浓度条件下培养。

1.2 实验药物和主要试剂

雷帕霉素(宜欣可)由华北制药集团新药研究开发有限责任公司惠赠(批号 060801)。胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, RPMI 1640 培养基:美国 GIBCO 公司, HRP 羊抗兔 IgG、四甲基偶氮唑盐(MTT)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、二硫苏糖醇、过硫酸铵、十二烷基磺酸钠、四甲基乙二胺均使用 Sigma 公司产品, Beclin1 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, RIPA 细胞裂解液购自北京 Solarbio 生物技术公司, PVDF 膜购自美国 Millipore 公司, 化学增强发光试剂盒(Western blot Chemiluminescence Reagent Kit)使用美国 Santa Cruz 公司产品。

1.3 MTT 法分析细胞增殖

取处于对数生长期的 Raji 细胞,加入 96 孔板,每孔 200 μ l,加入不同浓度的雷帕霉素(终浓度分别为 1、5、10、20、40、50 及 100 nmol/L),同时设对照组。分别于 37℃培养 24、48 及 72 h,在实验结束前,于每

孔加入 20 μ l 5 mg/ml 的 MTT,培养 4 h,1 000 r/min 离心 5 min 去上清液后每孔加入 150 μ l DMSO,震荡溶解,用酶联免疫检测仪测定每孔吸光度,测定波长 570 nm,参考波长 620 nm。抑制率(%)=(1- 实验组光吸收值 / 对照组光吸收值) \times 100%。以细胞抑制率对剂量的对数作图,通过线性回归拟合合法可求出雷帕霉素对 Raji 细胞的 IC₅₀ 值。

1.4 流式细胞术分析细胞周期和细胞凋亡

收集经不同浓度、不同时间雷帕霉素处理后的具有活性的 Raji 细胞,70%冰乙醇 4℃固定 12 h, PBS 洗涤、离心,加 Binding Buffer 液重悬,加入 Annexin V-FITC,室温染色 15 min 后加入碘化丙啶(PI)染液,4℃避光染色 30 min。流式细胞仪(Coulter EPICS-XL II 型)测定细胞周期和细胞凋亡。用 Muticycle AV 分析软件对 DNA 细胞周期进行拟合分析。计算出 G₀/G₁、S、G₂/M 各期细胞的分布百分比,以 S 期细胞百分比来表示细胞群体的增殖状态和 DNA 合成速度。

1.5 Western blot 免疫印迹法检测自噬目的蛋白 Beclin1 的表达分析

将处于对数生长期的 Raji 细胞置于培养瓶中,分别加入不同浓度雷帕霉素(终浓度分别为 0、1、10 及 100 nmol/L)的培养液进行培养,于 72 h 时终止培养,提取细胞总蛋白,Bradford 法蛋白定量,行 SDS-PAGE 电泳分离,电转移法将凝胶中的蛋白质转入 PVDF 膜, PBS 洗膜后,室温下 5%脱脂奶粉溶液封闭 4 h。加入一抗,4℃反应过夜, TBST 洗膜 3 次,加入二抗,室温反应 1 h, TBST 洗膜 3 次,采用化学发光试剂检测。配置新鲜发光液均匀涂布于 PVDF 膜上,室温下孵育 1 min,将 PVDF 膜与 X 光片一同放入暗盒内曝光 5~10 min 后, X 光片显影后清水漂洗定影。

1.6 透射电镜形态学观察

收集细胞,以 PBS 洗涤 2 次,1 000 r/min 离心,沿管壁逐滴加入 3%戊二醛固定,包埋切片后,定位观察并照相。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行数据分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较用 *t* 检验,3 组及 3 组以上的两两比较用单因素方差分

析。描述样本在不同时间点上某指标的变化情况用重复测量设计方差分析(Repeated Measurement Design ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雷帕霉素对 Raji 细胞生长的影响

MTT 结果显示,5 nmol/L 以上浓度的雷帕霉素能明显抑制 Raji 细胞增殖 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且随着药物浓度的增加及作用时间延长抑制作用逐渐增强。雷帕霉素作用 24、48 及 72h 对 Raji 细胞的 IC_{50} 值分别为 (440.2 ± 3.7) nmol/L、 (218.1 ± 1.2) nmol/L、 (24.5 ± 1.4) nmol/L(见图 1)。

2.2 雷帕霉素可导致 Raji 细胞周期停滞,但不诱导细胞凋亡

雷帕霉素作用于 Raji 细胞 48 h 后,可明显抑制细胞周期发展($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),随着药物浓度逐渐增加,S 期细胞比例从 55.7%逐渐降至 29.3%,同时 G_0/G_1 期细胞比例从 33.8%逐渐增加至 67.6%。

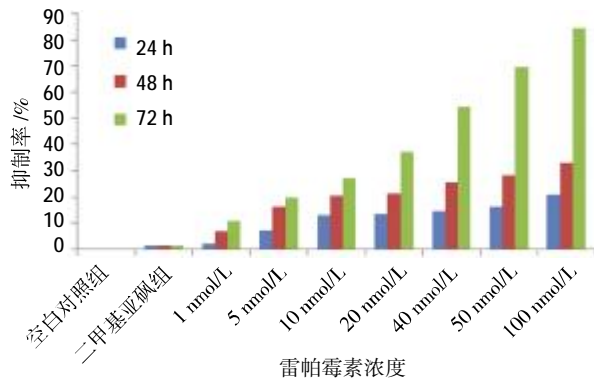


图 1 MTT 法检测国产雷帕霉素对 raji 细胞的抑制作用

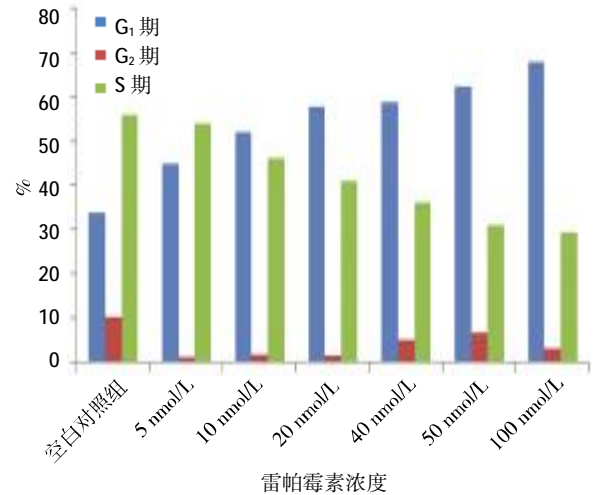
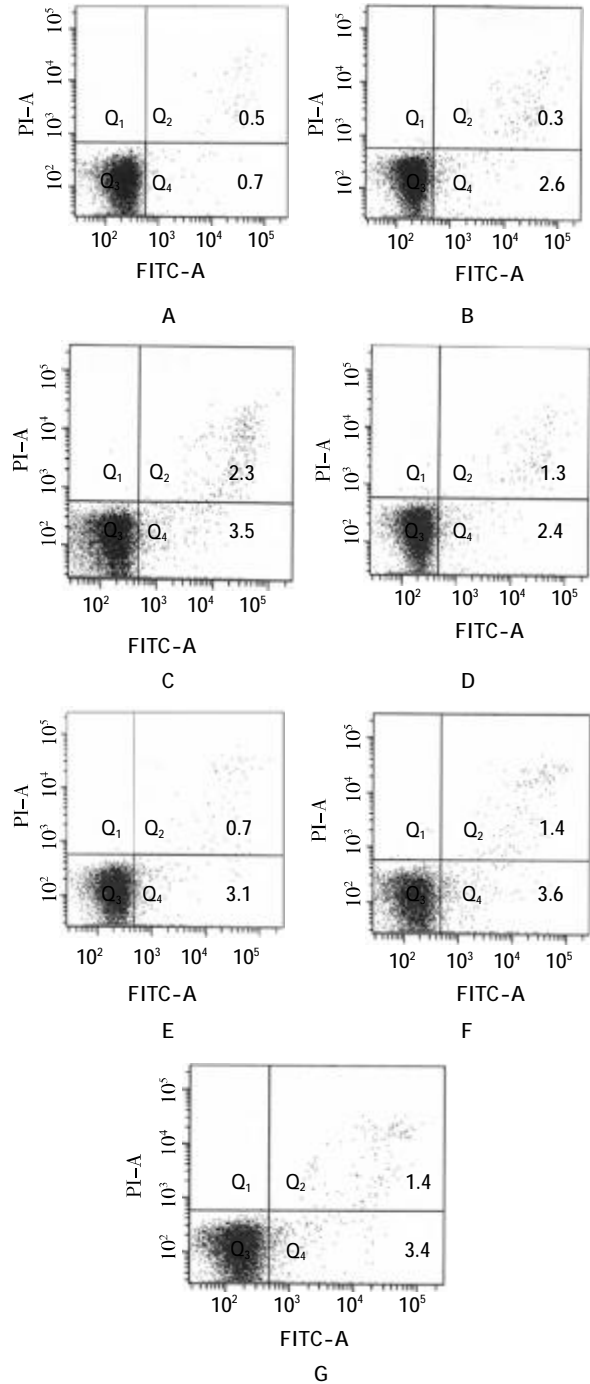


图 2 国产雷帕霉素作用于 raji 细胞 48 h 后对细胞周期的流式检测

提示细胞进入增殖期的减少,DNA 合成速度减慢,细胞被阻滞于 G_0/G_1 期(见图 2)。Annexin V-FITC/PI 双染色流式细胞术分析检测显示,雷帕霉素处理组 raji 细胞 48 h 后,细胞凋亡率并不随 rapa 浓度的升高而增加,与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(见图 3)。



A: 对照组;B:5 nmol/L rapa;C:10 nmol/L rapa;D:20 nmol/L rapa; E: 40 nmol/L rapa;F:50 nmol/L rapa;G: 100 nmol/L rapa

图 3 不同浓度国产雷帕霉素作用于 raji 细胞 48 h 后的凋亡率

2.3 雷帕霉素对 Raji 细胞 Beclin1 自噬蛋白的影响

不同浓度雷帕霉素作用于 Raji 细胞 72 h 后, Beclin1 蛋白的表达量随雷帕霉素浓度增高显著升高,呈浓度依赖性($P < 0.05$)。见图 4。

2.4 细胞超微结构的电镜观察

雷帕霉素作用 Raji 细胞 72h 后,电镜下可观察到细胞胞质内有呈圆形、新月形的自噬小体,呈双层膜液泡结构,有包绕胞浆成分的趋势;有多个溶酶体和自噬溶酶体。见图 5。

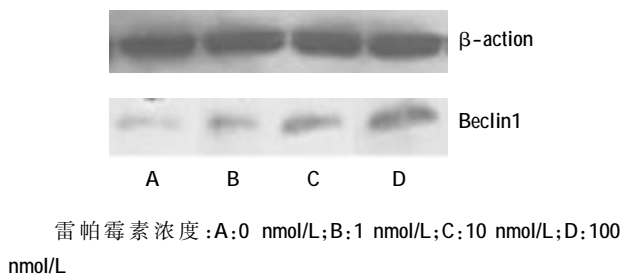
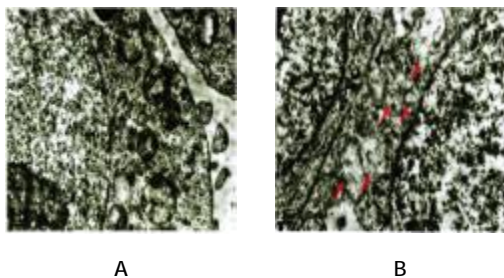


图 4 雷帕霉素处理 raji 细胞 72 h 后 Beclin1 蛋白的表达



A: 未经雷帕霉素处理时;B: 经雷帕霉素处理后

图 5 雷帕霉素处理 raji 细胞 72h 后自噬现象的电镜观察

3 讨论

哺乳动物 mTOR 是 P13K/Akt 信号通路下游的效应分子,在人类肿瘤中起普遍调节作用,与细胞增殖、DNA 损伤修复等密切相关^[4],许多肿瘤的发生与 mTOR 信号通路的异常激活有关。mTOR 是凋亡和自噬的共同信号通路之一,当细胞面临压力刺激时,压力刺激所产生的信号传导可通过激活 mTOR 抑制自噬触发凋亡;而当凋亡途径的关键蛋白被剔除或功能受抑而解除自噬的抑制,或将凋亡缺陷的细胞转向自噬状态;自噬可保护细胞免于死亡,但也可通过大量自噬破坏大部分的胞浆和细胞器引起细胞死亡,或自噬过程激活凋亡信号引起细胞发生凋亡^[5]。

雷帕霉素是 mTOR 的特异性抑制剂,通过与 mTOR 分子结合抑制其功能。Eum 等发现^[6]雷帕霉素

能抑制 mTOR 诱发自噬而具有抗肿瘤作用。其可能的机制包括:诱导肿瘤细胞凋亡或自噬性细胞死亡;诱导细胞周期阻滞;抑制肿瘤侵袭和肿瘤血管生成等^[7]。

本研究结果显示,不同浓度雷帕霉素作用于 Raji 细胞后其活力降低,并出现明显的 G₀/G₁ 期停滞,虽然抑制了 Raji 细胞的增殖,但并没有引起明显的细胞凋亡。在某些血液肿瘤细胞株的研究中也发现类似的情况^[8],有人认为这可能与激活细胞的自噬作用相关^[9]。本研究通过透射电子显微镜观察到自噬体的形成,并运用免疫印迹分析检测自噬蛋白 Beclin1 的表达,发现随雷帕霉素浓度的增大,自噬的发生逐渐增多,呈浓度依赖性,该结果提示在 Raji 细胞中雷帕霉素可以激活自噬并藉此发挥抗肿瘤作用。

以往多项研究表明,自噬活性的改变存在于多种恶性肿瘤中,且对肿瘤的作用是一把“双刃剑”^[10-11]:一方面,肿瘤细胞可以通过提高自噬活性来增强对代谢应激的耐受能力,从而维持其生存;另一方面,自噬通过吞噬受损的细胞器或者胞质蛋白,从而降低畸变细胞器对细胞癌变的刺激,且细胞可能会因为过度自噬而导致死亡^[12]。

在白血病和肝癌的研究中均发现雷帕霉素诱导肿瘤细胞自噬,进而通过相关机制提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性促进凋亡的发生。自噬究竟在肿瘤细胞的转归中扮演怎样的角色可能与肿瘤细胞的种类和生物学特性相关。自噬在肿瘤中的作用和具体的机制未完全明了,但越来越多的证据表明自噬与肿瘤发生、进展及对抗癌治疗的反应中有着直接或间接地联系。

综上所述,雷帕霉素可引起 Raji 细胞的自噬机制启动,但不会导致其发生凋亡。在其他肿瘤细胞株中发现了雷帕霉素对化疗药物的增敏作用,这为联合用药后降低化疗药物的剂量、减轻毒副作用提供了线索。笔者将进一步在淋巴瘤细胞株中研究雷帕霉素与化疗药物联合应用的情况,为其在淋巴瘤治疗中的应用提供证据。

参 考 文 献:

- [1] Ramalingam SS, Harvey RD, Saba N, et al. Phase 1 and pharmacokinetic study of everolimus, a mammalian target of rapamycin inhibitor, in combination with docetaxel for recurrent/refractory nonsmall cell lung cancer[J]. Cancer, 2010, 116(16): 3903-3909.
- [2] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights

- disease through cellular self-digestion[J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-1075.
- [3] Rosenfeldt MT, Ryan KM. The multiple roles of autophagy in cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(7): 955-963.
- [4] Abraham RT, Eng CH. Mammalian target of rapamycin as a therapeutic target in oncology[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2008, 12(2): 209-222.
- [5] Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(9): 741-752.
- [6] Eum KH, Lee M. Targeting the autophagy pathway using ectopic expression of Beclin-1 in combination with rapamycin in drug-resistant v-Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells[J]. *Mol Cells*, 2011, 31(3): 231-238.
- [7] Kapoor A, Figlin RA. Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin for the treatment of advanced renal cell carcinoma[J]. *Cancer*, 2009, 115(16): 3618-3630.
- [8] 郭霞,周晨燕,高举,等.雷帕霉素逆转急性淋巴细胞白血病 CEM-C1 细胞对糖皮质激素耐药的研究[J]. *临床儿科杂志*, 2010, 28(5): 414-418.
- [9] Zeng XH, Kinsella TJ. Mammalian target of rapamycin and S6Kinase positively regulate 6-thioguanine-induced autophagy[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(7): 2384-2390.
- [10] Apel A, Zentgraf H, Buchler MW, et al. Autophagy-A double-edged sword in oncology[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(5): 991-995.
- [11] 孙广涛,陈皓,邱伟华.自噬在肝癌中的表达及相关机制研究进展[J]. *中华实验外科杂志*, 2010, 27(5): 679-680.
- [12] Choi KS. Autophagy and cancer[J]. *Exp Mol Med*, 2012, 44(2): 109-120.

(张蕾 编辑)