

下调 mTOR 基因表达对人肝癌细胞 SMMC-7721 热疗增敏效应的影响

王庆亮 郭宇 刘波 杨培生 华学锋 叶小鸣

【摘要】 目的 观察下调哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)基因表达对人肝癌细胞 SMMC-7721 热疗敏感性的影响并初步探讨其作用机制。方法 通过脂质体介导 mTOR 反义真核表达载体转染 SMMC-7721 细胞,分别采用 RT-PCR 和 Western blot 技术检测转染后 mTOR 基因 mRNA 及蛋白表达。SMMC-7721 细胞经转染后给予热疗处理,采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性,采用平板克隆实验检测克隆形成率,采用细胞划痕实验检测迁移能力,采用流式细胞仪检测细胞凋亡及周期变化情况。结果 SMMC-7721 细胞转染后其 mTOR 基因 mRNA 表达(0.23 ± 0.01)及蛋白表达(0.31 ± 0.02)均明显降低($P < 0.05$),提示反义载体能有效下调 SMMC-7721 细胞 mTOR 基因表达。SMMC-7721 细胞经转染后给予热疗处理,发现细胞增殖活性、克隆形成能力及细胞迁移能力均明显降低($P < 0.05$)。通过流式细胞仪检测发现,实验组 SMMC-7721 细胞经热疗后其凋亡率[$(52.27 \pm 3.72)\%$]较阴性对照组凋亡率[$(28.93 \pm 2.51)\%$]明显增高,其细胞周期呈现 S 期比例增加($P < 0.05$)及生长阻滞现象。结论 下调 mTOR 基因表达能提高人肝癌细胞 SMMC-7721 的热疗敏感性,其作用机制可能与诱导细胞凋亡及 S 期生长阻滞有关。

【关键词】 热疗; 癌,肝细胞; 基因表达

The effect of down-regulating the expression of mTOR on the thermosensitivity of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 WANG Qing-liang*, GUO Yu, LIU Bo, YANG Pei-sheng, HUA Xue-feng, YE Xiao-ming. * Department of General Surgery, Ling Nan Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510530, China
Corresponding author: YE Xiao-ming, Email: james007y@sina.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of hyperthermia on human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 after down-regulating the expression of mTOR, and its possible mechanisms. **Methods** An antisense mTOR (mammalian target of rapamycin) gene eukaryotic expression vector was transfected into SMMC-7721 cells. The expression of mTOR mRNA and protein were detected using RT-PCR and Western blotting, respectively. Hyperthermia was applied after the transfection, and the vitality of cell proliferation was evaluated using CCK-8 assays and the clone formation rate was determined by colony-forming assays. The migration of SMMC-7721 cells was measured using scratch assays. Apoptosis and the cell cycle were analyzed by flow cytometry. **Results** The expression of mTOR mRNA and protein were significantly decreased after transfection, indicating that the antisense vector could down-regulate the mTOR gene effectively. The proliferation, clone formation and migration of SMMC-7721 cells all were decreased markedly by hyperthermia after transfection. Flow cytometry showed that the rate of apoptosis was significantly increased. The number of cells in the S phase was increased and the cell cycle was induced to arrest at the S phase. **Conclusions** Down-regulating the expression of mTOR can increase the thermosensitivity of SMMC-7721 cells. The mechanism involves increased apoptosis and S phase arrest.

【Key words】 Hyperthermia; Carcinoma, hepatocellular; Gene expression

肿瘤热疗是通过应用各种致热源的热效应及继发效应,使全身或局部肿瘤组织达到有效治疗温度并维持一定时间从而杀灭肿瘤细胞的治疗方法^[1-2]。作为肿瘤的有效物理治疗方法之一,热疗已逐渐引起科研

及临床工作者们高度重视。近年来研究发现,热疗在杀伤肿瘤细胞同时,还能激活促进损伤修复的热休克蛋白及抗凋亡、促细胞增殖的信号通路(如 PI3K/Akt/mTOR、Ras/Raf/MEK/ERK 及 p38/MAPK 等)^[3],从而使肿瘤细胞产生“热抵抗”,在一定程度上降低了热疗疗效。本研究通过抑制肿瘤细胞哺乳动物雷帕霉素靶蛋白基因(mammalian target of rapamycin, mTOR)后给予热疗处理,以观察下调 mTOR 基因表达是否可以增强热疗疗效并初步探讨其作用机制。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.09.003

基金项目:广东省科技计划项目(2011B031300016)

作者单位:510530 广州,中山大学附属第三医院岭南医院普通外科(王庆亮、刘波、杨培生、叶小鸣),肝移植科(郭宇),肾移植科(华学锋)

通信作者:叶小鸣,Email:james007y@sina.cn

材料与方法

一、实验材料

人肝癌细胞 SMMC-7721 购自上海中国科学研究院细胞所,反义真核表达载体 pEGFP-C1-mTOR 为前期构建成且经测序及酶切鉴定。主要实验仪器包括:美国 Forma Series II 3110 型细胞培养箱、日本 Nikon TE2000-U 型倒置相差荧光显微镜、美国 BD 公司 FACS Calibur 流式细胞仪、美国 ABI 2700 型 PCR 仪、美国 Bio-Rad Mode 680 型酶标仪。主要试剂包括 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司)、胎牛血清(杭州四季青公司)、脂质体 Lipofectamine 2000™、Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)、RT-PCR 试剂盒(日本 TAKARA 公司),引物由上海生工公司合成;BCA(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒购自北京康为生物公司,兔抗人 mTOR 单克隆抗体购自美国 Cell Signal 公司,兔抗人 β -actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗及 DAB 显色试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司,CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo 公司,Annexin V-PE/7AAD 细胞凋亡试剂盒、细胞周期检测试剂盒均购自南京凯基生物公司。

二、实验方法

1. 细胞培养及转染:SMMC-7721 细胞用含 10% 灭活胎牛血清的 DMEM 培养基培养于 37 °C、5% CO₂、90% 相对湿度的恒温培养箱中,实验所用细胞均处于对数生长期。转染前 1 天按适当密度接种于多孔板中,待细胞生长至 80% 融合状态时,按转染试剂说明书进行操作,待转染 4 h 后更换培养基。

2. mTOR 基因检测:于转染前按每孔 5×10^5 个细胞接种于 6 孔板中,转染后在镜下观察绿色荧光蛋白表达情况;并于转染后 36 h 时收集细胞,采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,按试剂盒说明书进行 RT-PCR 检测,观察 mTOR 基因 mRNA 表达情况。mTOR 上游引物序列为 5-CGCTGTCATCCCTTTATCG-3,下游引物序列为 5-ATGCTCAAACACCTCCACC-3; β -actin 上游引物序列为 5-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3,下游引物序列为 5-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3。PCR 产物经电泳分离后,置于紫外灯下观察分析各样本吸光度值,以 mTOR 条带与内参条带吸光度比值反映 mTOR mRNA 表达水平。提取转染后 36 h 时及相对未转染 SMMC-7721 细胞的总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,经 SDS-PAGE 电泳分离后,通过电转移至硝酸纤维膜上。将膜与 1:400 一抗 4 °C 孵育过夜后加入二抗,37 °C 孵育 1 h,经 DAB 显色液显色,通过凝胶成像系统拍照并分析各条带吸光度值,以 mTOR 条带与内

参条带吸光度比值反映 mTOR 蛋白表达水平。

3. CCK-8 法检测细胞增殖活性:将 SMMC-7721 按每孔 10^4 个细胞接种于 96 孔板中,分别设置实验组、阴性对照组及空白对照组。实验组细胞于转染后 12 h 时给予热疗处理,将细胞培养箱温度调节至 42 °C 持续 1 h。阴性对照组细胞亦于相同时间点给予热疗处理(热疗温度与实验组一致),空白对照组细胞未给予特殊处理。于热疗处理结束 24 h、48 h 时分别采用 CCK-8 试剂检测各组细胞吸光度值。

4. 平板克隆实验:同上分组并处理细胞,待热疗处理结束后 2 h 采用胰酶消化收集各组细胞。分别按每孔 10^3 个细胞接种于 6 孔板中,每组设 3 个复孔,继续培养 14 d 后终止。弃去培养液,经磷酸盐缓冲液清洗后加入 4% 多聚甲醛固定 15 min,弃去固定液,再加入适量 Gimsa 染色 30 min,经流水缓慢洗去染色液,空气干燥,显微镜下计数每孔 > 50 个细胞的克隆数并计算克隆形成率,克隆形成率 = (克隆数/接种的细胞数量) \times 100%。

5. 划痕实验:将 SMMC-7721 按每孔 5×10^4 个细胞接种于 24 孔板中,待细胞长至 80% 融合时,采用无菌 10 μ l 移液器枪头沿培养板底部做“—”字形划痕,经无血清培养液冲洗后同前所述分组并处理细胞,待热疗处理结束后各组细胞换用含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 72 h,镜下拍照记录培养 72 h 内细胞迁移情况。

6. 细胞凋亡检测:将 SMMC-7721 按每孔 5×10^4 个细胞接种于 24 孔板中,同前分组并处理细胞,继续培养 18 h 后收集各组细胞,按凋亡试剂盒说明书进行流式细胞仪检测。

7. 细胞周期分析:细胞分组及处理同凋亡检测环节,继续培养至转染 48 h 后收集各组 10^6 个细胞,置于 70% 冰乙醇中重悬,4 °C 固定 24 h 后离心去除固定液,加入 100 μ l RnaseA 孵育(37 °C) 30 min,再加入 400 μ l 碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色,4 °C 闭光孵育 30 min 后行流式细胞仪检测。

三、统计学分析

本研究所得计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 16.0 版统计学软件包进行数据处理,计量资料组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、转染反义载体对 mTOR 基因表达的影响

转染反义载体后镜下可见 SMMC-7721 细胞中有绿色荧光蛋白表达;RT-PCR 产物电泳结果显示,未转染组及转染组 mTOR 基因 mRNA 的相对表达量分别为(0.74 ± 0.04)和(0.23 ± 0.01),提示转染后 mTOR

基因 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。Western blot 检查结果显示,未转染组及转染组 mTOR 蛋白相对表达量分别为 (0.65 ± 0.03) 和 (0.31 ± 0.02) ,提示转染后 mTOR 蛋白表达明显下调 ($P < 0.05$),与 RT-PCR 检测结果一致,具体情况见图 1。

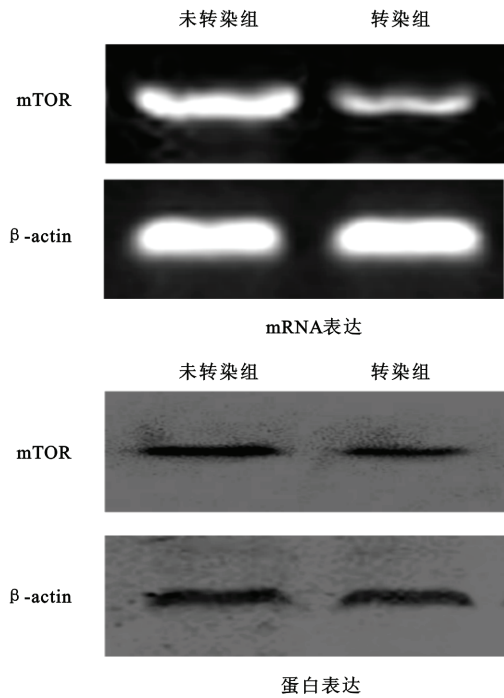


图 1 转染后 SMMC-7721 细胞 mTOR 基因 mRNA 及蛋白表达分析

二、细胞增殖活性分析

CCK-8 检测结果显示,实验组细胞在热疗后 24 h 和 48 h 时的吸光度值均明显低于阴性对照组及空白对照组水平 ($P < 0.01$),具体数据见表 1,提示 SMMC-7721 细胞增殖活性在处理 24 h 及 48 h 时均显著降低。

三、细胞克隆形成率比较

通过倒置相差显微镜观察发现,空白对照组单个克隆形成数量及单个克隆集落细胞数量均较多,实验组克隆集落细胞数较少,克隆形成率亦较低,与空白对照组及阴性对照组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$),具体数据见表 1。

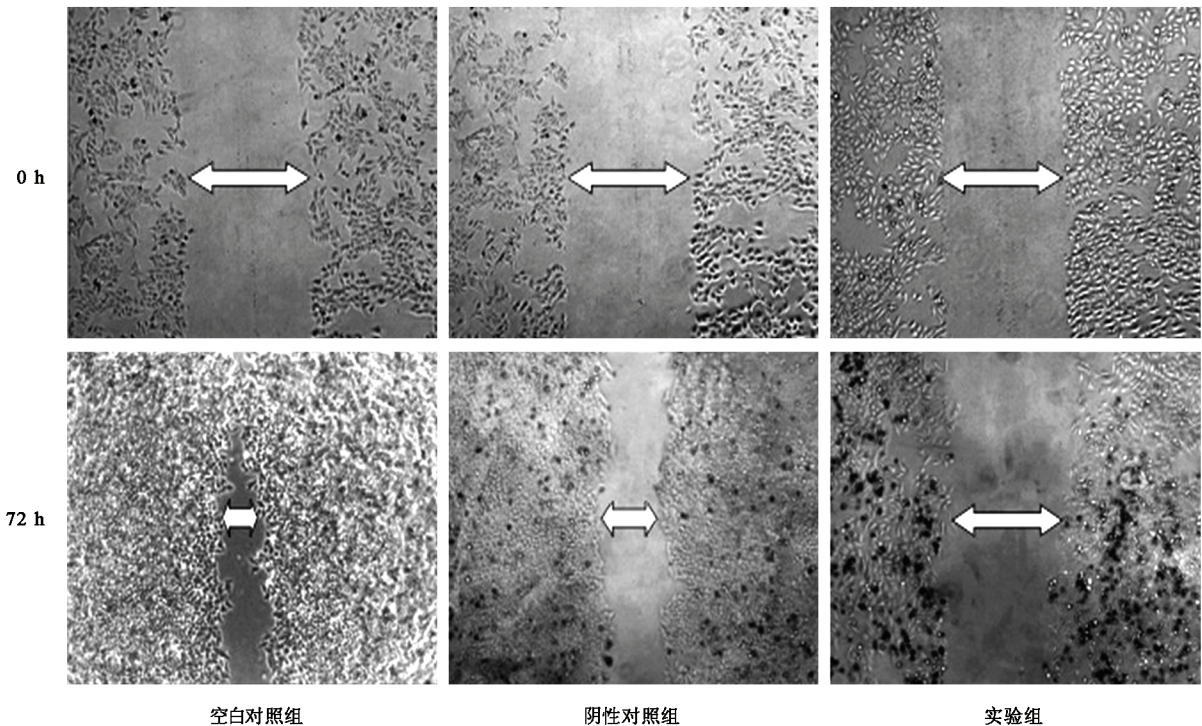
表 1 各组细胞增殖活性及克隆形成率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CCK-8 检测		克隆形成率 (%)
	热疗后 24 h 时吸光度值	热疗后 48 h 时吸光度值	
空白对照组	0.915 ± 0.047	2.024 ± 0.046	14.50 ± 2.45
阴性对照组	0.762 ± 0.008	1.677 ± 0.038	9.05 ± 1.97
实验组	0.371 ± 0.015^a	0.760 ± 0.031^a	1.98 ± 0.61^a

注:与空白对照组、阴性对照组比较,^a $P < 0.01$

四、细胞迁移能力分析

通过观察划痕实验结果发现,转染后 72 h 时空白对照组划痕区细胞覆盖率较高,而实验组及阴性对照组划痕愈合趋势不明显(图 2),实验组与其它各组比较,其细胞迁移能力进一步降低,同时还观察到大量细胞坏死。



注:箭头示细胞划痕恢复情况

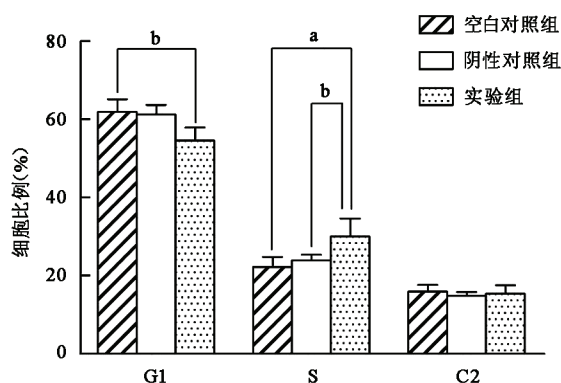
图 2 各组细胞划痕实验结果比较(倒置相差显微镜, $\times 40$)

五、各组细胞凋亡情况比较

通过流式细胞仪检测发现,阴性对照组细胞凋亡率为 $(28.93 \pm 2.51)\%$,实验组细胞凋亡率高达 $(52.27 \pm 3.72)\%$,而空白对照组细胞凋亡率仅为 $(10.14 \pm 2.66)\%$,各组细胞凋亡率间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

六、各组细胞生长周期情况比较

通过流式细胞仪检测发现,阴性对照组与空白对照组比较,2组各期细胞比例组间差异均无统计学意义(图3);实验组G1期细胞比例较阴性对照组减少,S期、G2期细胞比例增加,但G1、G2期细胞比例与阴性对照组间差异并无统计学意义($P > 0.05$),提示下调mTOR基因表达能导致SMMC-7721细胞生长停滞在S期。



注:组间比较,^a $P < 0.01$;^b $P < 0.05$

图3 各组细胞生长周期情况比较

讨 论

目前采用热疗手段治疗肿瘤已逐渐引起临床重视,如何优化热疗条件、增加癌细胞热疗敏感性、提高热疗疗效是当前研究的热点内容。mTOR基因作为细胞生长的核心因子,在细胞生长、增殖、分化、凋亡、周期调控、肿瘤形成及侵袭转移等多个方面均发挥重要作用。已有不少研究证实,mTOR通路在肝癌细胞中过度激活^[4],其激活程度与预后具有负相关性^[5]。一些基于mTOR调控的研究也表明,下调mTOR基因表达能增加肝癌细胞对化疗药物的敏感性^[6];已有实验证实,抑制mTOR通路能增强乳腺癌及肺癌细胞对热疗的敏感性^[7-8],但目前关于肝癌细胞对热疗敏感性的研究报道相对较少。

下调mTOR基因表达的方法有小分子抑制剂(如雷帕霉素及衍生物)、单克隆抗体、反义核酸技术及RNA干扰等。通过转染前期构建合成的靶向mTOR基因反义核酸载体pEGFP-C1-mTOR,镜下观察证实SMMC-7721细胞可获得瞬时表达;进一步对转染后

SMMC-7721细胞mTOR基因表达分析后发现,无论是在mRNA水平、或是蛋白水平均可以显著降低其表达,为进一步分析mTOR基因对热疗敏感性的影响提供了基础。

前期研究结果证实,SMMC-7721细胞对热疗干预较敏感^[9]。大量文献表明,热疗对细胞的杀伤作用通常分为两个阶段,在临界温度以下,呈线性杀伤或只起到生长抑制作用,超过临界温度后则呈现指数级杀伤效应^[10]。细胞的临界温度也因细胞种类不同而有很大差异,大多数细胞的临界温度为 $42 \sim 44\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[11],而 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 也被认可为全身热疗的适合温度^[12-13]。本研究通过CCK-8试剂检测SMMC-7721细胞增殖活性时发现,下调mTOR基因表达后,热疗能促使细胞增殖活性明显下降,提示下调mTOR基因表达能增加热疗对SMMC-7721细胞增殖活性的抑制作用。CCK-8试剂检测的是细胞整体生存状态,是细胞增殖、凋亡等多因素共同作用的结果,而克隆形成实验可在体外检测单个细胞的自我更新及增殖潜能。本实验结果显示,实验组细胞克隆形成率明显降低,表明下调mTOR基因表达能增强热疗抑制单个细胞的克隆形成能力,减弱细胞自我更新及增殖潜能。外周侵袭及转移是评价肝癌恶性程度的重要指标^[14],本研究结果表明热疗能使SMMC-7721细胞迁移能力减弱,并且实验组细胞经转染后,其迁移能力进一步降低,提示下调mTOR基因表达能增强热疗对细胞迁移能力的影响。

热疗对SMMC-7721细胞增殖能力具有显著的抑制作用,其干预机制主要有直接杀伤作用(致热效应)和间接作用(非致热效应)。前者主要表现为直接破坏癌细胞膜性结构及诱导细胞凋亡,后者主要通过诱导形成超氧化物及自由基等间接损伤肿瘤细胞。本研究结果显示实验组细胞凋亡率明显高于阴性对照组,提示下调mTOR基因水平能增强SMMC-7721细胞热疗时的凋亡效应,进一步表明mTOR基因高表达是导致SMMC-7721细胞抵抗热疗凋亡效应的重要因素。细胞周期阻滞及凋亡是抑制细胞增殖的两大方面,目前关于热疗对肿瘤细胞生长周期的影响各报道结果不尽相同,对于大多数细胞而言,热疗通常诱导G1期细胞生长阻滞,关于阻滞G2/M期细胞生长的报道较少^[15]。本研究对SMMC-7721细胞给予热疗处理,发现其各期细胞比例与空白对照组间无明显差异,而实验组细胞G1期比例减少,S期细胞比例增加,但并没有向G2期转化,提示下调mTOR基因表达延缓了细胞分裂,导致S期生长阻滞。S期为DNA合成期,热疗杀伤肿瘤细胞的基本原理就是改变了细胞生存微环境,诱导其染色体畸变,形成多核细胞,分裂后不稳定,增加了凋亡与坏死机率,同时S期细胞对热疗干预较敏感,其DNA

合成酶活性降低,间接增强了热效应,抑制了细胞生长及分化,该结果也提示临床可选用 S 期敏感药物或干预措施进行深入研究。细胞周期“靶向”治疗是临床肿瘤化疗中的重要策略,科学联用针对不同细胞周期药物可提高疗效、降低单药剂量及毒副作用^[16],本研究也为临床制订联合化疗方案时提供了参考资料。

综上所述,本研究结果表明,下调 mTOR 基因表达可通过诱导细胞凋亡及 S 期生长阻滞提高人肝癌细胞 SMMC-7721 对热疗的敏感性,从而一定程度上克服其“热抵抗”效应,但相关 mTOR 通路上、下游分子及热休克蛋白在热疗时的表达变化还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Palazzi M, Maluta S, Dall'Oglio S, et al. The role of hyperthermia in the battle against cancer. *Tumori*, 2010, 96:902-910.
- [2] 陈雪琴, 马胜林. 肿瘤热疗作用机制研究进展. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27:562-564.
- [3] Rossi A, Ciafre S, Balsamo M, et al. Targeting the heat shock factor 1 by RNA interference; a potent tool to enhance hyperthermochemotherapy efficacy in cervical cancer. *Cancer Res*, 2006, 66:7678-7685.
- [4] Parent R, Kolippakkam D, Booth G, et al. Mammalian target of rapamycin activation impairs hepatocytic differentiation and targets genes moderating lipid homeostasis and hepatocellular growth. *Cancer Res*, 2007, 67: 4337-4345.
- [5] Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Lang H, et al. Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection. *J Hepatol*, 2008, 48:83-90.
- [6] Tam KH, Yang ZF, Lau CK, et al. Inhibition of mTOR enhances chemosensitivity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, 2009, 273: 201-209.
- [7] Ma N, Jin J, Lu F, et al. The role of protein kinase B (PKB) in modulating heat sensitivity in a human breast cancer cell line. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 50:1041-1050.
- [8] Ohnishi K, Yasumoto J, Takahashi A, et al. LY294002, an inhibitor of PI-3K, enhances heat sensitivity independently of p53 status in human lung cancer cells. *Int J Oncol*, 2006, 29:249-253.
- [9] Yan S, Zhang D, Gu N, et al. Therapeutic effect of Fe₂O₃ nanoparticles combined with magnetic fluid hyperthermia on cultured liver cancer cells and xenograft liver cancers. *J Nanosci Nanotechnol*, 2005, 5: 1185-1192.
- [10] Aravindan N, Shanmugasundaram K, Natarajan M. Hyperthermia induced NFkappaB mediated apoptosis in normal human monocytes. *Mol Cell Biochem*, 2009, 327:29-37.
- [11] Roti RJ. Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): cell killing and molecular events. *Int J Hyperthermia*, 2008, 24:3-15.
- [12] Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002, 43:33-56.
- [13] 叶小鸣, 黄文起, 程权永, 等. 体外循环全身热灌注疗法治疗恶性肿瘤 81 例报告. *中国实用外科杂志*, 2006, 26:51-54.
- [14] Schafer DF, Sorrell MF. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 1999, 353: 1253-1257.
- [15] Zolzer F, Streffer C. Quiescence in S-phase and G1 arrest induced by irradiation and/or hyperthermia in six human tumour cell lines of different p53 status. *Int J Radiat Biol*, 2000, 76:717-725.
- [16] Jin C, Li H, He Y, et al. Combination chemotherapy of doxorubicin and paclitaxel for hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136:267-274.

(修回日期:2013-08-16)

(本文编辑:易 浩)

· 外刊摘英 ·

Tanezumab versus naproxen for chronic low back pain

BACKGROUND AND OBJECTIVE Over two thirds of all adults experience an episode of low back pain (LBP) in their lifetime. Treatment of LBP is a difficult clinical problem, with treatment approaches including pharmacologic and nonpharmacologic methods. Tanezumab is a humanized monoclonal antibody which inhibits nerve growth factor, a key mediator in the generation and potentiation of pain signals. This study compared the effects tanezumab with those of a nonsteroidal anti-inflammatory drug, naproxen, for the treatment of LBP.

METHODS This large, randomized, double-blind, placebo controlled, parallel group phase 2B study involved 1347 patients with chronic LBP. Eligible patients were randomized to receive either tanezumab at five, 10 or 20 mg every eight weeks, naproxen at 500 mg twice daily or a placebo. The primary efficacy endpoint was the mean change in daily average LBP intensity from baseline to week 16. Secondary endpoints included the change from baseline to week 16 in Roland Morris Disability Questionnaire scores and in patients' global assessments of LBP.

RESULTS Efficacy was similar with tanezumab 20 mg and 10 mg, with both showing significantly greater improvements than with either placebo or naproxen in the primary efficacy endpoint, as well as both key secondary endpoints. Adverse events were similar across all tanezumab doses, but higher than with placebo or naproxen. The most common of these were arthralgia, pain in an extremity, headache and paresthesias.

CONCLUSION This study of patients with chronic low back pain found intravenous tanezumab to be superior to naproxen for the improvement of pain, function and global assessment scores.

[摘自:Kivitz AJ, Gimbel JS, Bramson C, et al. Efficacy and safety of tanezumab versus naproxen in the treatment of chronic low back pain. *Pain*, 2013, 154: 1009-1021.]