

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.04.007

· 基础研究 ·

mTOR 抑制剂 FIM-A 对人骨肉瘤细胞株 MG-63 的抑制作用及其机制

罗鸿斌^{1,2}, 刘蔚楠^{1,5}, 林建华^{1,2}, 程元荣³, 张俐⁴, 黄捷³, 吴朝阳², 林金奎^{1,2}, 蓝文彬¹(1. 福建医科大学第一临床医学院, 福建福州 350005; 2. 福建医科大学附属第一医院 骨科, 福建福州 350005; 3. 福建省微生物研究所, 福建福州 350007; 4. 福建中医药大学骨伤学院, 福建福州 350108; 5. 福建中医药大学附属人民医院 骨科, 福建福州 350004)

[摘要] **目的:** 观察新型哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)抑制剂含磷西罗莫司衍生物 FIM-A 对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖及凋亡的影响。**方法:** 不同浓度($1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L) FIM-A 处理 MG-63 细胞后, 采用 CCK-8 法检测 MG-63 细胞的增殖, 流式细胞术检测 MG-63 细胞周期和凋亡情况, ELISA 法检测血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)和低氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的分泌量, RT-PCR 和 Western blotting 分别检测 FIM-A 对 MG-63 细胞中 mTOR、p70 核糖体 S6 激酶(p70S6 kinase protein, p70s6k)及 4E 结合蛋白 1(4E-binding protein 1, 4E-BP1) mRNA 和蛋白表达的影响。**结果:** 与人成骨 hF-OB1.19 细胞相比, 人骨肉瘤 MG-63 细胞中 mTOR、p70s6k 及 4E-BP1 mRNA 的表达水平明显升高($P < 0.05$)。FIM-A 可有效抑制 MG-63 细胞的增殖($P < 0.05$), 且呈剂量依赖性($r = 0.940, P < 0.01$)。 1×10^{-6} mol/L FIM-A 处理 24 h 后与对照组相比, G₀/G₁ 期 MG-63 细胞比例明显增加[(56.4 ± 3.2)% vs (43.4 ± 6.9)% , $P < 0.05$], 而 MG-63 细胞的凋亡率没有明显改变。不同浓度 FIM-A 作用 24 h 后, MG-63 细胞中 HIF-1 α 和 VEGF 表达均明显低于对照组($P < 0.05$), 且具有剂量依赖性(HIF-1 $\alpha, r = -0.988, P < 0.01$; VEGF, $r = -0.998, P < 0.01$)。同时, FIM-A 对 MG-63 细胞中 mTOR($r = -0.919, P < 0.01$)、p70s6k($r = -0.843, P < 0.01$)及 4EBP1($r = -0.818, P < 0.01$)蛋白的磷酸化也具有浓度依赖性抑制作用。**结论:** FIM-A 能抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞的增殖, 并阻滞细胞周期于 G₀/G₁ 期, 其机制可能与影响 mTOR 信号通路蛋白磷酸化有关。

[关键词] mTOR 抑制剂; FIM-A; 骨肉瘤; MG-63 细胞; mTOR

[中图分类号] R738.1; R979.1; R730.54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2013)04-0419-06

Inhibitory effect of FIM-A, a mTOR inhibitor, on the proliferation and apoptosis of human MG-63 osteosarcoma cell line and its mechanism

Luo Hongbin^{1,2}, Liu Weinan^{1,5}, Lin Jianhua^{1,2}, Cheng Yuanrong³, Zhang Li⁴, Huang Jie³, Wu Zhaoyang², Lin Jinluan^{1,2}, Lan Wenbin¹(1. First Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian, China; 2. Department of Orthopedics, First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian, China; 3. Province Institute of Microbiology Fujian, Fuzhou 350007, Fujian, China; 4. School of Traumatology and Orthopedics, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, Fujian, China; 5. Department of Orthopaedic, People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of phosphorus sirolimus derivatives FIM-A, a new mammalian mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor, on the proliferation and apoptosis of human MG-63 osteosarcoma cell line. **Methods:** Human MG-63 osteosarcoma cells and hF-OB1.19 osteoblasts were cultured *in vitro* and incubated with different concentrations of FIM-A ($1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-5}$ mol/L) for 24 hours. CCK-8 assay was used to evaluate the cell proliferation. The cell cycle and apoptosis were analyzed using flow cytometry. ELISA was used to detect the secretions of vascular endo-

[基金项目] 福建省科技重大专项资助项目(No. 2011YZ0002-1)。Project supported by the Major Science and Technology Foundation of Fujian Province (No. 2011YZ0002-1)

[作者简介] 罗鸿斌(1981-),男,福建省云霄县人,硕士,主治医师,主要从事骨肿瘤及脊柱外科的研究。E-mail: robin1752@hotmail.com

[通信作者] 林建华(Lin Jianhua, corresponding author), E-mail: jianhua@126.com

[网络出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130722.1346.007.html

thelial cell growth factor (VEGF) and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α). The expressions of *mTOR*, p70S6 kinase protein (*p70s6k*) and 4E-binding protein 1 (*4E-BP1*) mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results:** The expressions of *mTOR*, *p70s6k* and *4E-BP1* mRNA in MG-63 osteosarcoma cells were significantly higher than that in the hF-OB1.19 osteoblasts ($P < 0.05$). The proliferation of the MG-63 osteosarcoma cells were significantly inhibited after FIM-A treatment. The proliferation inhibition rate of MG-63 cells was significantly higher than that of the negative control group after the treatment of 1×10^{-7} mol/L FIM-A ($[37.64 \pm 2.07]\%$ vs 0 , $P < 0.05$), and the cell proliferation inhibition rate increased along with FIM-A concentrations in a dose-dependent manner ($r = 0.940$, $P < 0.01$). After the treatment of 1×10^{-6} mol/L FIM-A for 24 hours, the proportion of MG-63 cells in G_0/G_1 phase was significantly increased compared with the control group ($[56.4 \pm 3.2]\%$ vs $[43.4 \pm 6.9]\%$, $P < 0.05$). No obvious changes were found in the apoptotic rate of MG-63 cells compared with the control group. The expression levels of HIF-1 α and VEGF in MG-63 cells were significantly lower than those of the control group after the treatment of different concentrations of FIM-A for 24 hours ($P < 0.05$), and as concentrations increased, the level of HIF-1 α ($r = 0.988$, $P < 0.01$) and VEGF ($r = 0.998$, $P < 0.01$) decreased gradually in a dose-dependent manner. Meanwhile, the inhibitory effect of FIM-A on phosphorylations of p-mTOR ($r = -0.919$, $P < 0.01$), p-p70s6k ($r = -0.843$, $P < 0.01$) and p-4EBP1 ($r = -0.818$, $P < 0.01$) proteins in MG-63 cells was also in a dose-dependent manner. **Conclusion:** FIM-A can significantly inhibit human MG-63 osteosarcoma cells and induce G_0/G_1 phase cell cycle arrest, and its anti-tumor effect was probably through the intervention of *mTOR* pathway.

[**Key words**] *mTOR* inhibitor; FIM-A; osteosarcoma; MG-63 cell; *mTOR*

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(3): 419-424]

骨肉瘤是最常见的原发性恶性骨肿瘤, 发病率约为 3/100 万^[1], 其恶性程度较高, 易早期发生肺部转移, 预后较差。以新辅助化疗、手术为主要内容的综合治疗, 使骨肉瘤的五年存活率达到 60% ~ 80%^[2-5], 然而近 30 年来, 骨肉瘤的化疗既无新药诞生, 化疗方案也无较大进展。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalia target of rapamycin, *mTOR*) 在细胞的增殖、生长、分化过程中起着中心调控点的作用, 一直被认为是抗肿瘤药物的重要靶点^[2-5]。第一个 *mTOR* 蛋白抑制剂雷帕霉素在多个鼠类和人类肿瘤细胞株上显示出抑制肿瘤生长的作用^[6], 它的同系物 (*temsirolimus*、*everolimus*) 已由 FDA 批准作为晚期肾癌等癌症的治疗药物应用于临床。AP23573 (*ridaforolimus*) 对多种肉瘤细胞株具有抑制作用^[7], 但国外尚未上市, 国内暂无相关研究。FIM-A 是我国自主合成的含磷雷帕霉素衍生物, 结构和 AP23573 相似。本研究通过观察 FIM-A 对骨肉瘤细胞的作用, 旨在为骨肉瘤新的治疗方案提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及设备

FIM-A 由福建省微生物研究所提供, 双抗、DMEM、胎牛血清 (fetal calf serum FBS) 购自 Gibco 公司, CCK-8 试剂盒购自江苏碧云天生物公司,

DNA-Prep 试剂盒购自美国贝克曼公司, Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒购自南京凯基公司, VEGF 和 HIF-1 α ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司, 逆转录试剂盒为加拿大 Fermentas 公司生产, *mTOR*、p70 核糖体 S6 激酶 (p70S6 kinase protein, *p70s6k*) 及 4E 结合蛋白 1 (4E-binding protein 1, *4E-BP1*) 抗体均购自美国 CST 公司。*mTOR*、*p70s6k* 及 *4E-BP1* mRNA 引物为上海生工公司设计并合成。MK3 型酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司, Coulter EpicsXL 流式细胞仪购自美国贝克曼公司, PCR 仪购自美国 ABI 公司, 垂直电泳仪购自北京六一公司。

1.2 细胞培养

人骨肉瘤细胞株 MG-63 和人成骨 hF-OB1.19 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基和含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基, 分别将人骨肉瘤 MG-63 细胞和人成骨 hF-OB1.19 细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 肿瘤细胞铺满 80% 瓶底时, 以 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 离心、重悬细胞, 按 1:3 传代培养。

1.3 RT-PCR 检测 FIM-A 对 *mTOR*、*p70s6k* 及 *4E-BP1* mRNA 表达的影响

分别收集处于对数生长期的人骨肉瘤 MG-63 细胞和 hF-OB1.19 细胞 (对照), 制成单细胞悬液, 接种于 6 孔培养板中, 5×10^4 个/孔。采用 TRIzol

法提取细胞总 RNA 进行逆转录。*mTOR* 上游引物: 5'-TTGGAGACGGTTTGGTGA-3'; 下游引物: 5'-GTTTGTTCGCTGTAGGGT-3'; 扩增片段长度为 157 bp; *p70s6k* 上游引物: 5'-GCTGAACTCTTAGGCACA-3'; 下游引物: 5'-TCCCATCCTACAACGAAG-3'; 扩增片段长度为 115 bp; *4E-BP1* 上游引物: 5'-AGC-CCTTCTCCCTCACTCA-3'; 下游引物: 5'-ATCCAAC-TACACGAACCCTT-3'; 扩增片段长度为 243 bp; 内参 β -actin 引物上游引物: 5'-TGCTGTCCCTGTATGC-CTCT-3'; 下游引物: 5'-GGTCTTTACGGATGT-CAACG-3', 扩增片段长度为 462 bp。采用 RT-PCR 法分析 *mTOR*、*p70s6k* 及 *4E-BP1* mRNA 在 MG-63 细胞中的表达, 采用有效抑制浓度 1×10^{-6} mol/L FIM-A 处理 MG-63 细胞 24 h 后, 检测 MG-63 细胞株中 *mTOR*、*p70s6k* 及 *4E-BP1* mRNA 表达的变化, Quantity One 软件进行灰度值定量分析。

1.4 CCK-8 法检测 FIM-A 对 MG-63 细胞增殖的影响

分别收集处于对数生长期的 MG-63 细胞, 制成单细胞悬液, 吸取 200 μ l 的细胞悬液, 接种于 96 孔培养板中 (2×10^3 个/孔), 同时设置空白对照组(不加细胞, 加入等量的培养基)以及阴性对照组(不含药物), 设 6 个复孔。细胞贴壁后, 加入不同浓度 FIM-A (1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L) 处理 72 h 后, 用 PBS 洗涤两次, 每孔加入 90 μ l 培养液及 CCK-8 检测试剂 10 μ l, 继续培养 2 h 后, 于波长 450 nm 处测出用药 72 h 后各孔光密度 (*D*) 值, 并计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 (%) = $[1 - (\text{实验组 } D \text{ 值} - \text{空白组 } D \text{ 值}) / (\text{对照组 } D \text{ 值} - \text{空白组 } D \text{ 值})] \times 100\%$ 。

1.5 流式细胞术检测 FIM-A 对 MG-63 细胞周期及凋亡的作用

分别收集处于对数生长期的 MG-63 细胞, 接种于 6 孔培养板中 (5×10^4 个/孔), 同时设置阴性对照组。细胞贴壁后, 实验组予 1×10^{-6} mol/L 浓度的 FIM-A 处理, 阴性对照组予不含药物的培养基处理, 24 h 后用 0.25% 胰酶消化 20 min, 制备单细胞悬液, PBS 洗 2 次, 300 $\times g$ 离心 5 min 收集细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 个/ml, 300 目筛网过滤。按 DNA 检测试剂盒说明书操作, 流式细胞术检测 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 个细胞的细胞周期及凋亡。

1.6 ELISA 法检测 FIM-A 对 MG-63 细胞 VEGF、HIF-1 α 分泌的影响

按 ELISA 法试剂盒说明书操作收集细胞上清液样本, 用酶标仪检测不同浓度 FIM-A 对 MG-63 细胞 VEGF、HIF-1 α 分泌的影响, 于波长 450 nm 处检

测不同浓度 FIM-A 干预后各孔光密度 (*D*) 值, 同时绘出标准曲线, 计算出 MG-63 细胞中 VEGF、HIF-1 α 的含量。

1.7 Western blotting 检测 FIM-A 对 mTOR、p70s6k 及 4E-BP1 蛋白表达的影响

收集处于对数生长期的 MG-63 细胞, 实验组以不同浓度 FIM-A 处理, 对照组加入等量细胞培养液, 24 h 后, 提取总蛋白, 行 SDS-PAGE, 转膜、封闭、4 $^{\circ}$ C 过夜。加入兔抗鼠 mTOR、p70s6k、4E-BP1 以及磷酸化 mTOR、p70s6k 及 4E-BP1 的一抗 (1:3 000), 室温孵育 2 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 再加入二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 依 ECL 发光试剂盒说明书进行曝光、显影, Quantity One 软件进行灰度值定量分析。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用方差分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FIM-A 增强人骨肉瘤 MG-63 细胞中 mTOR、p70s6k 及 4E-BP1 mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果 (图 1) 显示, 与人成骨 hF-OB1.19 细胞相比, 人骨肉瘤 MG-63 细胞中 *mTOR*、*p70s6k* 及 *4E-BP1* mRNA 的表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。应用 1×10^{-6} mol/L FIM-A 处理人骨肉瘤 MG-63 细胞后, 细胞中 *mTOR*、*p70s6k* 及 *4E-BP1* mRNA 的表达无明显变化 ($P > 0.05$), 提示 FIM-A 不影响人骨肉瘤 MG-63 细胞中 *mTOR*、*p70s6k* 及 *4E-BP1* mRNA 的表达。

2.2 不同浓度 FIM-A 对骨肉瘤 MG-63 细胞增殖的抑制作用

CCK-8 法检测 FIM-A 对 MG-63 细胞增殖的影响, 结果显示, 不同浓度 FIM-A (1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L) 作用 MG-63 细胞 24 h 后, 各给药组 MG-63 细胞的增殖抑制率分别为 (18.19 ± 3.16)%、(27.65 ± 2.07)%、(37.64 ± 2.07)%、(42.19 ± 3.16)%、(43.00 ± 1.65)%, 均较阴性对照组显著升高 ($P < 0.05$); 且随着 FIM-A 浓度的增加, 细胞增殖抑制率逐渐升高, 表明 FIM-A 对 MG-63 细胞增殖的抑制作用具有浓度依赖性 ($r = 0.940$, $P < 0.01$)。当 FIM-A 的浓度达到 1×10^{-6} mol/L 时, 继续增加 FIM-A 浓度, MG-63 细胞的增殖抑制率无明显改变, 提示 FIM-A 的最大抑制浓度为 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L。

2.3 FIM-A 阻滞骨肉瘤细胞 MG-63 周期于 G₀/G₁ 期

流式细胞术检测结果(表 1)显示, FIM-A 对骨肉瘤细胞 MG-63 细胞周期具有明显的阻滞作用。当 MG-63 骨肉瘤细胞与 1×10^{-6} mol/L 的 FIM-A 共培养 24 h 后, 和对照组比较, G₀/G₁ 期 MG-63 细胞比例明显增加 [(56.4 ± 3.2)% vs (43.4 ± 6.9)% , $P < 0.05$], S 期细胞数量减少 [(24.8 ± 5.1)% vs (44.4 ± 5.5)% , $P < 0.05$], 而 G₂ 期细胞数量差异无统计学意义。提示, FIM-A 明显减少了处于 DNA 合成期的细胞, 使骨肉瘤细胞停滞于 G₀/G₁ 期, 从而抑制了 MG-63 细胞的增殖。

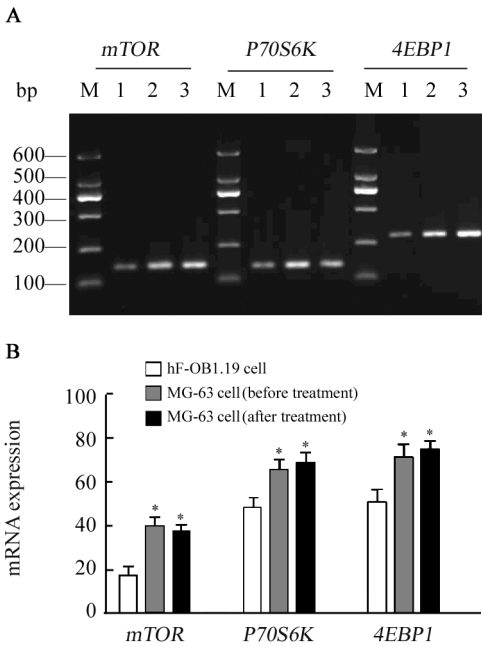


图 1 FIM-A 处理 24 h 后 MG-63 细胞中 mTOR、p70s6k 及 4E-BP1 mRNA 的表达

Fig. 1 Expressions of mTOR, P70S6K and 4E-BP1 mRNAs in MG-63 cells 24 h after FIM-A treatment

A: RT-PCR; B: Relative expression level of mRNA
1: hF-OB1.19 cell; 2 MG-63 cell (before treatment);
3: MG-63 cell (after treatment)
* $P < 0.05$ vs hF-OB1.19 cell

2.4 FIM-A 不影响骨肉瘤 MG-63 细胞的凋亡

流式细胞术检测结果(图 2)显示, 当骨肉瘤 MG-63 细胞与 1×10^{-6} mol/L 的 FIM-A 共同培养 24 h 后, 骨肉瘤 MG-63 细胞的凋亡率为 (1.6 ± 0.3)%, 和对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$); 继续培养到 48 h 和 72 h, 仍没有观察到 FIM-A 明显的凋

亡作用, 表明 FIM-A 对 MG-63 细胞的凋亡没有明显的影响。

2.5 不同浓度的 FIM-A 对骨肉瘤 MG-63 细胞 HIF-1 α 、VEGF 分泌的影响

ELISA 结果(图 3)显示, 不同浓度 FIM-A 作用 MG-63 细胞 24 h 后, 各实验组的 HIF-1 α 和 VEGF 含量均明显低于对照组 ($P < 0.05$), 且随着 FIM-A 作用浓度的增加, HIF-1 α 和 VEGF 含量逐渐降低, 表明 FIM-A 对 MG-63 细胞 HIF-1 α 、VEGF 分泌的抑制作用具有浓度依赖性(HIF-1 α , $r = -0.988$, $P < 0.01$; VEGF, $r = -0.998$, $P < 0.01$)。

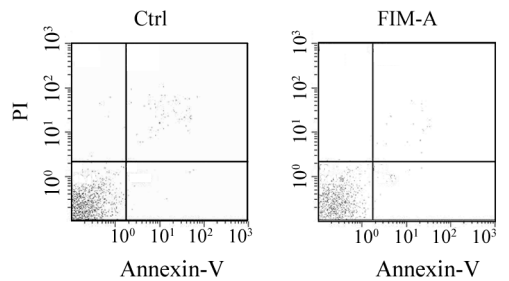


图 2 FIM-A 处理 24 h 后对骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的影响
Fig. 2 Impact of FIM-A on apoptosis of osteosarcomas MG-63 cells 24 hours post-treatment

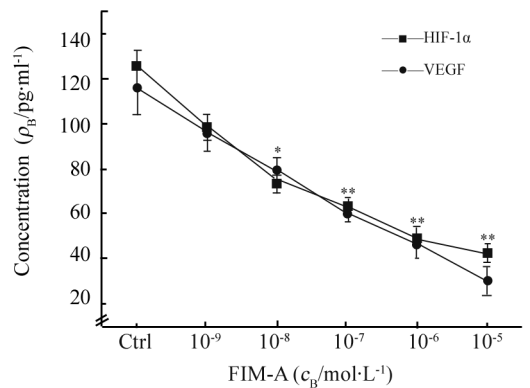


图 3 FIM-A 抑制骨肉瘤 MG-63 细胞 HIF-1 α 及 VEGF 的分泌
Fig. 3 FIM-A inhibited secretions of HIF-1 α and VEGF in osteosarcomas cells
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl group

2.6 FIM-A 抑制骨肉瘤 MG-63 细胞中 mTOR4E-BP1、及 p70s6k 蛋白的磷酸化

Western blotting 结果(图 4)显示, 与对照组相比, 1×10^{-7} mol/L 浓度 FIM-A 就能抑制 MG-63 细胞中的 p-mTOR、p-4EBP1 及 p-p70s6k 蛋白的表达 ($P < 0.05$), 且随着 FIM-A 作用浓度的增加, FIM-A

对 MG-63 细胞 p-mTOR、p-4EBP1 及 p-p70s6k 蛋白表达的抑制作用越明显,说明 FIM-A 对 MG-63 细胞 mTOR、4EBP1 及 p70s6k 蛋白磷酸化的抑制作用具有浓度依赖性(p-mTOR, $r = -0.919$, $P < 0.01$; p-4EBP1, $r = -0.818$, $P < 0.01$; p-p70s6k, $r = -0.843$, $P < 0.01$)。

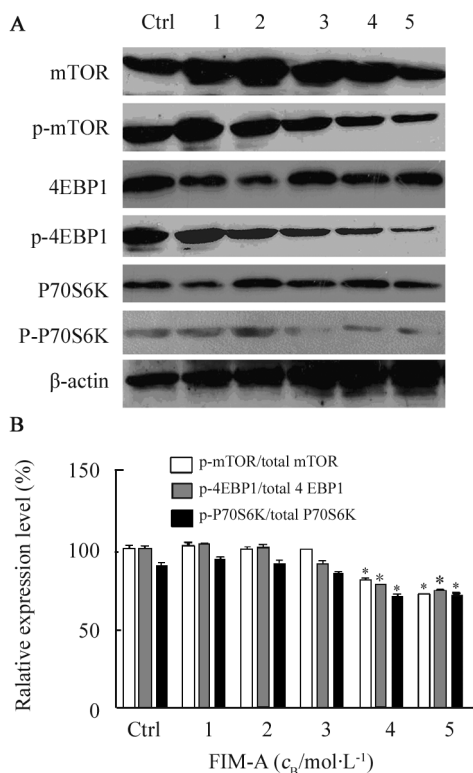


图4 FIM-A 抑制骨肉瘤 MG-63 细胞中 mTOR、p70s6k 及 4E-BP1 蛋白的磷酸化

Fig. 4 Phosphorylation of mTOR, 4E-BP1 and p70s6k proteins inhibited by FIM-A in osteosarcomas cells

A: Western blotting; B: Relative expression level

1: 1×10^{-9} mol/L FIM-A; 2: 1×10^{-8} mol/L FIM-A;

3: 1×10^{-7} mol/L FIM-A; 4: 1×10^{-6} mol/L FIM-A;

5: 1×10^{-5} mol/L FIM-A

* $P < 0.05$ vs Ctrl cell

3 讨论

骨肉瘤是最常见的原发性恶性骨肿瘤,早期出现肺部转移是患者死亡的主要原因。化疗的应用使得患者 5 年生存率明显提高,但是近 20 年来,骨肉瘤的治疗没有明显的进展或突破,使得其 5 年生存率没有明显改变^[8]。Mahalingam 等^[9]研究发现,各种肉瘤亚型存在着一些分子通路的异常活化,这可能与其发病机制有关。

mTOR 蛋白在细胞的增殖、生长、分化过程中起

着中心调控点的作用,一直被认为是抗肿瘤药物的重要靶点^[2-5]。雷帕霉素作为第一个 mTOR 蛋白抑制剂,对多种肿瘤细胞有明显的抑制作用^[6];而它的衍生物,又称 AP23573,研究^[10]证实其对恶性骨组织与软组织肿瘤有很好的抗肿瘤效果,能在体外抑制 11 种肉瘤细胞以及 6 种内膜细胞的增殖,并对多种人类移植瘤模型有抑制作用。目前 AP23573 国外还未上市,国内还未开展该药物的研究,对骨肉瘤的研究亦未涉足。

福建省微生物研究所通过化学结构修饰得到含磷的西罗莫司衍生物 FIM-A,结构确证其与 AP23573 同质,对肺癌等 8 种肿瘤细胞株具有一定的抑制能力^[11]。本研究通过 RT-PCR 法测量骨肉瘤 MG-63 细胞中 mTOR 及其下游 p70s6k、4E-BP1 mRNA 的表达情况,结果显示:与正常成骨 hF-OB1.19 细胞相比,骨肉瘤 MG-63 细胞中 mTOR、p70s6k 及 4E-BP1 基因的表达明显升高($P < 0.05$)。说明骨肉瘤可能与 mTOR 信号通路的过度表达有关,从而为 mTOR 特异性靶向治疗骨肉瘤提供了可行性依据。

雷帕霉素是最早发现的 mTOR 抑制剂,研究发现其抗肿瘤机制包括:抑制细胞周期从 G₁ 期进入 S 期^[12]、诱导细胞凋亡^[13-17]、抑制肿瘤血管的形成^[12]。本研究发现 FIM-A 对骨肉瘤 MG-63 细胞具有体外抗肿瘤活性。FIM-A 能够明显抑制骨肉瘤细胞的增殖,并呈一定的浓度依赖性,有效浓度在 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L 之间。进一步研究发现, FIM-A 能够影响骨肉瘤细胞的细胞周期,使之停滞于 G₁ 期(DNA 合成前期),从而减少 S 期(DNA 合成期)细胞数量。但是本研究没有发现 FIM-A 具有促进骨肉瘤细胞凋亡的作用,这与某些国外研究一致:Gazitt 等^[18]研究表明,雷帕霉素在促进肉瘤 HOS 和 KHOS 细胞凋亡方面的作用很弱。同时,RT-PCR 结果发现, 1×10^{-7} mol/L 浓度的 FIM-A 处理前后骨肉瘤 MG-63 细胞的 mTOR、p70s6k 及 4E-BP1 基因表达无统计学差异,说明该药物对骨肉瘤的抑制作用不是通过直接下调 mTOR、p70s6k 及 4E-BP1 基因发挥作用的。

为了进一步探索 FIM-A 对骨肉瘤抗肿瘤活性的机制,本课题组通过 Western blotting 检测 FIM-A 对 mTOR 信号通路中 mTOR、p70s6k 及 4E-BP1 蛋白磷酸化的影响。结果发现, FIM-A 能够显著抑制骨肉瘤细胞在这 3 种蛋白的磷酸化,但是对这 3 种蛋白的表达水平没有影响。

研究^[19]表明,包括骨肉瘤在内的人体多数肿瘤

组织, HIF-1 α 表达水平较高, 肿瘤细胞表达的 VEGF 量也明显高于正常组织。在肿瘤细胞中, mTOR 异常活化, 细胞生长旺盛导致出现低氧, 其下游的 HIF-1 α 可通过调控编码 VEGF 的基因从而使其呈高表达, 并进一步促进血管生成, 这为肿瘤组织迅速提供营养物质创造了良好条件^[20]。FIM-A 能够减少骨肉瘤细胞 HIF-1 α 的分泌, 阻滞其上调 VEGF 的表达, 从而抑制骨肉瘤细胞的增殖。

本课题组对 FIM-A 的初步研究表明, mTOR 靶向药物 FIM-A 在骨肉瘤细胞上显示出较强的抗肿瘤活性, 可能是通过干预 mTOR 信号通路相关因子, 进而影响细胞周期及干预肿瘤血管生长相关因子等起作用的。FIM-A 专一性强, 几乎无细胞毒性, 和传统化疗药物联用有望在减少毒性作用的同时提高肿瘤患者的生存率, 但有待体内试验和临床试验证实。

[参 考 文 献]

- [1] Picci P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma) [J]. Orphanet J Rare Dis, 2007, 2(1): 6-9.
- [2] Goberdhan DC, Boyd CA. mTOR: Dissecting regulation and mechanism of action to understand human disease [J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(Pt 1): 213-216.
- [3] Jiang BH, Liu LZ. Role of mTOR in anticancer drug resistance: Perspectives for improved drug treatment [J]. Drug Resist Updat, 2008, 11(3): 63-76.
- [4] Fasolo A, Sessa C. mTOR inhibitors in the treatment of cancer [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2008, 17(11): 1717-1734.
- [5] Figlin R, Brown E, Armstrong A, et al. NCCN Task Force Report: mTOR inhibition in solid tumors [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2008, 6 (Suppl 5): S1-S20.
- [6] Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents [J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(8): 671-688.
- [7] Rizzieri DA, Feldman E, DiPersio JF, et al. A phase 2 clinical trial of deforolimus (AP23573, MK-8669), a novel mammalian target of rapamycin inhibitor, in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14 (9): 2756-2762.
- [8] Chou A J, Geller DS, Gorlick R. Therapy for osteosarcoma: Where do we go from here? [J]. Pediatric Drugs, 2008, 10(5): 315-327.
- [9] Mahalingam D, Mita A, Sankhala K, et al. Targeting sarcomas: Novel biological agents and future perspectives [J]. Curr Drug Targets, 2009, 10(10): 937-949.
- [10] Squillace RM, Miller D, Cookson M, et al. Antitumor activity of ridaforolimus and potential cell-cycle determinants of sensitivity in sarcoma and endometrial cancer models [J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(10): 1959-1968.
- [11] 黄捷, 杨国新, 余辉, 等. 西罗莫司 F904 及其衍生物 FIM-A (AP23573) 的体外抗癌活性 [J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2010, 26(5): 63-66.
- [12] Guba M, Breitenbuch P von, Steinbauer M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: Involvement of vascular endothelial growth factor [J]. Nat Med, 2002, 8(2): 128-135.
- [13] Stephan S, Datta K, Wang E, et al. Effect of rapamycin alone and in combination with antiangiogenesis therapy in an orthotopic model of human pancreatic cancer [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10 (20): 6993-7000.
- [14] Zha J, Harada H, Yang E, et al. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L) [J]. Cell, 1996, 87(4): 619-628.
- [15] Moumen A, PatanéS, Porras A, et al. Met acts on Mdm2 via mTOR to signal cell survival during development [J]. Development, 2007, 134(7): 1443-1451.
- [16] Easton JB, Kurmasheva RT, Houghton PJ. IRS-1: Auditing the effectiveness of mTOR inhibitors [J]. Cancer cell, 2006, 9(3): 153-155.
- [17] Cross D, Watt PW, Shaw M, et al. Insulin activates protein kinase B, inhibits glycogen synthase kinase-3 and activates glycogen synthase by rapamycin-insensitive pathways in skeletal muscle and adipose tissue [J]. Febs Lett, 1997, 406(1/2): 211-215.
- [18] Gazit Y, Kolaparthi V, Moncada K, et al. Targeted therapy of human osteosarcoma with 17AAG or rapamycin: Characterization of induced apoptosis and inhibition of mTOR and Akt/MAPK/Wnt pathways [J]. Int J Oncol, 2009, 34(2): 551-561.
- [19] Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion [J]. Bull Cancer, 2006, 93(8): E73-E80.
- [20] 顾始伟, 韩晓艳. 血管内皮细胞生长因子 VEGF 与细胞黏附分子 CD15 在骨肉瘤中的表达及意义的研究现状 [J]. 医学信息, 2010, 23(6): 1903-1903.

[收稿日期] 2013-02-15

[修回日期] 2013-04-12

[本文编辑] 周玲琳

《中国肿瘤生物治疗杂志》欢迎投稿、欢迎订阅