

• 基础实验研究论著 •

雷帕霉素对急性髓系白血病细胞株 Kasumi-1 的 mTOR/p70S6K 信号通路的影响

柳光芬

(重庆消防总队医院检验科, 重庆 400060)

摘要:目的 探讨雷帕霉素对急性髓系白血病(AML)细胞株 Kasumi-1 mTOR/p70S6K 通路的影响。方法 免疫荧光检测雷帕霉素处理前后 Kasumi-1 细胞中 mTOR 和 p70S6K 的光密度变化,再逆转录-PCR、Western blot 分别从 RNA 和蛋白水平研究雷帕霉素对该信号通路的影响。结果 经雷帕霉素处理后 mTOR 的 mRNA 和蛋白水平均下调,而其下游靶点 p70S6K 的 mRNA 和蛋白水平表达增加。结论 雷帕霉素对细胞增殖和凋亡产生的影响可能是通过 mTOR/p70S6K 信号通路发生作用。

关键词:雷帕霉素; 急性髓系白血病; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.06.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)06-0657-02

Effect of rapamycin on mTOR/p70S6K pathway in acute myeloid leukemia cell line Kasumi-1

Liu Guangfen

(Department of Clinical Laboratory, Chongqing Fire Corps Hospital, Chongqing 400060, China)

Abstract:Objective To study the effect of rapamycin on mTOR/p70S6K pathway in human acute myeloid leukemia(AML) cell line Kasumi-1. **Methods** The change of optical density of mTOR/p70S6K before and after the rapamycin treatment was detected by the immunofluorescence method. Then the effect of rapamycin on the signal pathway was studied from the RNA and protein level by the reverse transcription-PCR and Western blot. **Results** The mRNA and protein expressions of mTOR were down-regulated after rapamycin treatment. However mRNA and the protein level of the downstream target p70S6K of mTOR was increased. **Conclusion** Rapamycin could play the effect on the cell proliferation and apoptosis by the mTOR/p70S6K pathway.

Key words: rapamycin; acute myelogenous leukemia; polymerase chain reaction

雷帕霉素又叫西罗莫司,最初是一种抗真菌和免疫抑制剂。有研究发现雷帕霉素能够抑制多种肿瘤细胞株的增殖,并导致细胞凋亡。该药物对多种癌症如非小细胞性肾细胞癌、乳腺癌、卵巢癌等有治疗作用。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和其下游的核糖体蛋白 S6 激酶(p70S6K)可以调控基因转录、蛋白翻译、细胞凋亡等多项功能,是调控细胞生长、分化和增殖的重要因子。雷帕霉素对白血病的治疗还处于探索阶段,本文拟通过 mTOR/p70S6K 信号通路研究雷帕霉素对急性髓系白血病(AML)细胞株 Kasumi-1 增殖和凋亡的影响,以期揭示其在白血病治疗中的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和处理 AML 细胞株 Kasumi-1 购自上海细胞所。培养基使用加入 10% 胎牛血清和 100 U/mL 双抗的 RPMI-1640, 37 ℃、5% CO₂, 饱和湿度的培养箱中开放培养,每隔 72 h 传代 1 次。取对数生长期的 Kasumi-1 细胞, PBS 洗涤后重悬,调整密度后重新铺板。用最适浓度 100 ng/mL 的雷帕霉素处理细胞 36 h^[1],并设立空白对照。

1.2 逆转录-PCR(RT-PCR) Kasumi-1 细胞经雷帕霉素处理后,胰酶消化收集, Trizol 法提取细胞总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 纯度,选择合格的 RNA 逆转录为 cDNA 备用。Syber-green 法检测处理组和对照组的 cDNA 表达情况。PCR 引物为: mTOR-S 5'-CGC TGA TCC CTT TAT CG-3', mTOR-A 5'-ATG CTC AAA CAC CTC CAC C-3', 引物长度为 193 bp。p70S6K-S 5'-TAG AGC CTG TGG GAC ACT ATG A-3', p70S6K-A 5'-TTT CGC ACC TGG AAC ACC-3',

引物长度为 142 bp。使用 GAPDH 为内参, GAPDH-S 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3', GAPDH-A 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3', 引物长度为 168 bp。

1.3 细胞免疫荧光 处理细胞 36 h 后,多聚甲醛固定细胞爬片,正常山羊血清封闭,同时加入 mTOR 和 p70S6K 一抗 4 ℃ 孵育过夜。随后加入 FITC(mTOR)和 TRITC(p70S6K)荧光二抗,37 ℃ 孵育 1 h 后 DAPI 染液染色 30 min,抗淬灭封片剂封片。激光共聚焦显微镜观察并照相。

1.4 Western bolt 对照和实验组的蛋白上样量均为 50 μg,聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转至硝酸纤维素膜,脱脂牛奶封闭抗原,1:200 加入 mTOR 和 p70S6K 抗体,4 ℃ 过夜。洗膜,随后加入二抗,37 ℃ 杂交 1 h,洗涤后 DAB 显色。GAPDH 为内参。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计学软件进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雷帕霉素处理后细胞后 mTOR 和 p70S6K 的 mRNA 表达变化 经 RT-PCR 检测实验组和对照组 Kasumi-1 细胞中 mTOR 和 p70S6K 的 mRNA 的表达情况发现:和对照组相比经 100 ng/mL 的雷帕霉素处理后,实验组中 mTOR 人表达水平显著下降(0.53 ± 0.068),差异有统计学意义($P < 0.05$),而 p70S6K 的表达水平则显著上升(1.68 ± 0.115),差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。提示经雷帕霉素可以抑制 mTOR 的 mRNA 表达,同时上调 mTOR 下游靶点 p70S6K 的 mRNA 表达水平。

2.2 素处理后细胞前后 mTOR 和 p70S6K 免疫荧光结果和对照组相比,100 ng/mL 雷帕霉素处理组细胞,表示 mTOR 的绿色荧光表达水平下降,而 p70S6K 的红色荧光表达却相对增加,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3 雷帕霉素处理细胞前后 mTOR 和 p70S6K 的 Western blot 结果 Western blot 结果显示,100 ng/mL 雷帕霉素处理后,实验组细胞中表示 mTOR 表达显著下降,和预计结果相符合,而 mTOR 下游靶蛋白 p70S6K 的表达显著增加,见图 3。

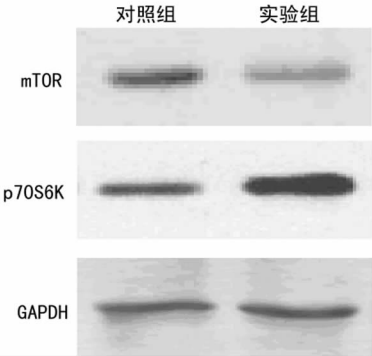


图 3 雷帕霉素处理 Kasumi-1 细胞前后 mTOR 和 p70S6K 的蛋白表达情况

3 讨 论

AML 是一种由于多种因素所引起的骨髓性白细胞异常增殖从而阻滞了正常造血细胞而产生的恶性肿瘤。目前常用的化学治疗法虽然可以使病情得到暂时缓解,但其复发率高,患者 5 年后的生存率仅仅为 20%^[2]。信号通路的异常往往是导致正常造血祖细胞过度增殖,转录因子功能出现异常而分化为白血病细胞的重要原因^[3]。有报道指出 PI3K/AKT、mTORC1、ERK/MAPK、STAT3/5、Wnt/ β -catenin 和 NF- κ B 等信号通路均和 AML 相关。因此,针对上述信号通路的研究逐渐成为近年来 AML 治疗的热点。本文拟采用雷帕霉素为 mTOR 的抑制剂,研究用药前后 mTOR 和其下游靶基因 p70S6K 的变化情况,以探索治疗 AML 的新途径。

本研究发现,使用早先实验中确定的可以达到最大抑制率的雷帕霉素浓度 100 ng/mL 处理 Kasumi-1 细胞后,mTOR 的 mRNA 和蛋白表达水平均受到有效抑制。mTOR 是一种保守的丝/苏氨酸蛋白激酶,其在细胞的增殖、生长、凋亡和血管生成过程中发挥着重要作用。有研究结果显示 mTOR 在超过 70% 的 AML 病例中都表现为高表达^[4-5],通过调节其下游 p70S6K 和 4EBP1 两个和翻译过程相关的蛋白来调控细胞的增殖过程^[6-7]。

雷帕霉素处理 Kasumi-1 细胞后,mTOR 下游靶基因 p70S6K 的 mRNA 和蛋白水平均显著上升,提示两者的表达变化呈负相关。有研究证实 mTOR 被 PI3K/Akt 信号传导通路介导的增生信号激活后从胞浆进入胞核,并且直接使其下游的 p70S6K 的 Thr389 位点磷酸化,p-p70S6K 的促翻译活性是未磷酸化的 100 倍左右^[8],p-p70S6K 使 40S 核糖体蛋白 S6 磷酸化,S6 磷酸化使 40S 亚单位参与活跃的多核糖体翻译,从而增加包括编码核糖体蛋白、延长因子、胰岛素生长因子在内的含有 5 末端寡聚嘧啶的 mRNAs 的翻译^[9],抑制该通路可以使细胞周期停滞,从而导致细胞凋亡。本实验中雷帕霉素处理组 mTOR 表达下调,则使 p70S6K 的磷酸化过程减弱^[10],因而 p70S6K 非磷酸化的 p70S6K 表达上调。

本研究结合前期实验基础,发现雷帕霉素可能是通过 mTOR/p70S6K 途径调控 AML 细胞株 Kasumi-1 的增殖并使其发生凋亡。研究者认为在对进作用的分子机制进一步研究后,雷帕霉素有望成为 AML 靶向治疗的新药物^[11-16]。

参考文献

[1] 柳光芬,曹柯林. 西罗莫司抑制急性髓系白血病细胞株 Kasumi-1 增殖的研究[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(14):1556-1557.

[2] Rowe JM. Why is clinical progress in acute myelogenous leukemia so slow[J]. Best Pract Res Clin Haematol,2008,21(1):1-3.

[3] Cilliland DG. Molecular genetics of human leukemias;new insights into therapy[J]. Semin Hematol,2002,39(4):6-11.

[4] Tamburini J,Elie C,Barder V,et al. Constitutive phosphoinositide 3-kinase/Akt activation represents a favorable prognostic factor in de novo acute myelogenous leukemia patients [J]. Blood,2007,10(3):1025-1028.

[5] Chen W,Drakos E,Grammatikakis I,et al. mTOR signaling is activated by FLT3 kinase and promotes survival of FLT3-mutated acute myeloid leukemia cell[J]. Mol Cancer,2010,9(1):292-283.

[6] 刘梅. PI3K/Akt/mTOR 通路与急性早幼粒细胞白血病关系的研究进展[J]. 医学综述,2011,17(7):966-969.

[7] 陈衍,韩晟,刘文超. PI3K/AKT/mTOR 通路调控乳腺癌细胞 FASN 过表达的分子机制[J]. 现代肿瘤医学,2013,21(1):1-4.

[8] Garber K. Rapamycin's resurrection; a new way to target the cancer cell cycle[J]. J Natl Cancer Inst,2001,93(20):1517-1519.

[9] Park S,Chapuis N,Tamburini J,et al. Role of PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia[J]. Haematologica,2010,95(5):819-828.

[10] Altman JK, Sassano A, Plataniias L. Targeting mTOR for the treatment of AML. New agents and new directions[J]. Oncotarget,2011,2(6):510-517.

[11] 李丽,张日. mTOR 信号通路与白血病靶向治疗研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志,2007,30(2):168-172.

[12] 张丽红,林凤茹. 雷帕霉素靶蛋白与白血病治疗[J]. 白血病:淋巴瘤,2008,17(6):469-471.

[13] Ikezoe T, Nishioka C, Tasaka T, et al. The antitumor effects of sunitinib (formerly SU11248) against a variety of human hematologic malignancies; enhancement of growth inhibition via inhibition of mammalian target of rapamycin signaling[J]. Mol Cancer Ther,2006,5(10):2522-2530.

[14] Yu SY, Liu L, Li P, et al. Rapamycin inhibits the mTOR/p70S6K pathway and attenuates cardiac fibrosis in adriamycin-induced dilated cardiomyopathy[J]. Thorac Cardiovasc Surg,2013,61(3):223-228.

[15] Perl AE, Kasner MT, Shank D, et al. Single-cell pharmacodynamic monitoring of S6 ribosomal protein phosphorylation in AML blasts during a clinical trial combining the mTOR inhibitor sirolimus and intensive chemotherapy[J]. Clin Cancer Res,2012,18(6):1716-1725.

[16] Liu LL, Long ZJ, Wang LX, et al. Inhibition of mTOR pathway sensitizes acute myeloid leukemia cells to aurora inhibitors by suppression of glycolytic metabolism[J]. Mol Cancer Res,2013,11(11):1326-1336.