

• 论 著 •

mTOR 信号通路调控 1,25 二羟维生素 D₃ 抑制喉癌细胞 Hep-2 细胞增殖的研究*

桂明才¹, 李 兵^{2△}, 戚思国¹, 周长华¹

(1. 四川省达州市中心医院耳鼻咽喉头颈外科 635000; 2. 重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科, 重庆 400016)

摘要:目的 研究 1,25 二羟维生素 D₃ 抑制喉癌细胞 Hep-2 细胞增殖作用以及对雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路的影响。方法 用不同剂量 1,25 二羟维生素 D₃ (10⁻⁸ mol/L、10⁻⁷ mol/L、10⁻⁶ mol/L) 分别处理 Hep-2 细胞 24、48、72 h, 四甲基偶氮唑蓝法(MTT)检测 Hep-2 细胞的增殖情况, 并计算抑制率; 采用流式细胞仪分析 1,25 二羟维生素 D₃ 对 Hep-2 细胞周期分布的影响, Western blot 检测 1,25 二羟维生素 D₃ 对 mTOR 信号通路的影响。结果 不同浓度 1,25 二羟维生素 D₃ 均可抑制 Hep-2 细胞增殖, 改变细胞周期分布, 使 G₀/G₁ 期 Hep-2 细胞比例增高。1,25 二羟维生素 D₃ 干预后 Hep-2 细胞 TSC1、TSC2 蛋白表达较对照组增高(P<0.01), Rheb 蛋白表达明显降低; mTOR 蛋白及其磷酸化水平表达与对照组比较均降低(P<0.01), mTOR 蛋白磷酸化表达降低尤为明显(P<0.01); 4EBP-1 蛋白表达较对照组增高(P<0.01)。结论 1,25 二羟维生素 D₃ 改变喉癌细胞 Hep-2 细胞周期分布, 影响 mTOR 信号通路蛋白表达, 从而抑制细胞增殖。

关键词: 1,25 二羟维生素 D₃; Hep-2 细胞; 增殖抑制; 雷帕霉素靶蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.15.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)15-2065-03

mTOR signaling pathway for regulating inhibition of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on Hep-2 cells proliferation in laryngeal carcinoma*

GUI Mingcai¹, LI Bing^{2△}, QI Siguo¹, ZHOU Changhua¹

(1 Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Dazhou Municipal Central Hospital, Dazhou, Sichuan 635000, China; 2 Department of Otorhinolaryngology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the inhibition role of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on laryngeal cancer Hep-2 cell proliferation and its influence on mTOR signal pathway. **Methods** Hep-2 cells were treated with different concentrations of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ mol/L) for 24, 48, 72 h respectively. The proliferation situation of Hep-2 cells was detected by the MTT method and the inhibition rate was calculated. The effect of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on Hep-2 cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. The influence of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on mTOR signaling pathway was detected by Western blot. **Results** Different concentrations of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ could inhibit the proliferation of Hep-2 cells, changed the cell cycle distribution and increased the proportion of Hep-2 cells in G₀/G₁ phase. The expressions of TSC1 and TSC2 protein after 1,25 dihydroxyvitamin D₃ intervention were increased compared with the control group(P<0.01), while the Rheb protein expression was significantly decreased(P<0.01); mTOR protein and phosphorylation level were significantly decreased compared with the control group(P<0.01), the decrease of mTOR protein phosphorylation was especially obvious(P<0.01); 4EBP-1 protein expression was increased compared with the control group(P<0.01). **Conclusion** 1,25-dihydroxyvitamin D₃ alters the Hep-2 cell cycle distribution, affects the protein expression of mTOR signaling pathway, thus inhibits the cell proliferation.

Key words: 1,25 dihydroxyvitamin D₃; Hep-2 cell; proliferation; mTOR

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是一种重要的调节基因,通过调节细胞周期、蛋白质合成、细胞能量代谢等途径发挥生理功能,在细胞增殖、生长、分化过程中起核心调控作用。mTOR还参与感受营养信号、调节细胞生长与增殖^[1]。维生素D传统上被认为是一种脂溶性维生素。1,25二羟维生素D₃[1,25(OH)₂D₃]是维生素D的活性形式。1,25(OH)₂D₃除了经典的调节肾、肠道的钙、磷代谢外,还具有调节细胞生长和分化的作用^[2],其中对肿瘤细胞的影响近年来倍受关注。本

研究旨在观察 1,25(OH)₂D₃ 抑制喉癌细胞 Hep-2 细胞增殖及其对 mTOR 信号通路的影响,初步探讨 1,25(OH)₂D₃ 对 Hep-2 细胞增殖的影响及相关机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人喉上皮样癌 Hep-2 细胞株购自南京凯基生物有限公司; TSC1、TSC2、Rheb、mTOR、p-mTOR 和 β-actin 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶标记物山羊抗小鼠 IgG(二抗)购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 1,25

* 基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(cstc2013cyjA10059)。

作者简介:桂明才,男,主治医师,主要从事耳鼻咽喉头颈外科方面的研究。△ 通讯作者,E-mail:634339717@qq.com。

(OH)₂D₃ 及雷帕霉素购自美国 Sigma 公司,溶于 RPMI1640 培养基制成 10 mmol/L 的母液,过滤除菌后 -20 °C 备用。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 人喉癌 Hep-2 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1 640 培养液中,置入 37 °C、体积分数为 5% 的二氧化碳及饱和湿度培养箱中进行培养,取对数生长期细胞用于实验。按实验需要进行分组:对照组,干预组 1 [1, 25(OH)₂D₃ 浓度为 10⁻⁸ mol/L], 干预组 2 [1, 25(OH)₂D₃ 浓度为 10⁻⁷ mol/L], 干预组 3 [1, 25(OH)₂D₃ 浓度为 10⁻⁶ mol/L], 雷帕霉素组 (雷帕霉素浓度 20 nmol/L)。

1.2.2 细胞增殖抑制实验 (MTT 法) 细胞分别培养 24、48、72 h 后各取出 1 块培养板,每孔加入 MTT (5 g/L) 20 μL,孵育 4 h,弃上清液加入 DMSO 终止反应,振荡 10 min,于波长 570 nm 处测吸光度 (OD) 值。细胞抑制率 (%) = (OD_{阴性对照} - OD_{实验}) / OD_{阴性对照} × 100%。

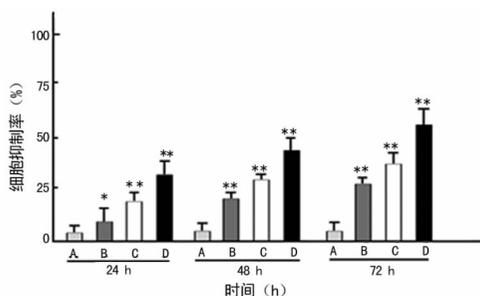
1.2.3 细胞周期检测 将培养 48 h 的细胞用 PBS 冲洗后快速注入装有预冷 750 mL/L 乙醇 1 mL 的 EP 管中,混匀,4 °C 过夜。将等体积的细胞悬液和碘化丙啶 (PI) 染液混合,4 °C 放置 30 min,以激发波长 488 nm 测定,死亡细胞呈红色荧光,以健康人淋巴细胞调节参数,数据用 Modifit1.0 软件分析。计算细胞增殖指数 (PI) = (S + G₂/M) / (S + G₂/M + G₀/G₁) × 100%。

1.2.4 Western blotting 检测 各实验组培养 48 h 后提取细胞总蛋白。凝胶电泳,转膜。封闭后加稀释一抗抗体 (靶蛋白抗体) 4 °C 过夜。加入稀释的二抗室温孵育 2 h,显色,曝光、显影和定影。吸光度扫描分析后计算各组细胞靶蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 20.0 for Windows 统计软件分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,根据资料性质行方差分析或 *t* 检验;以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 1, 25(OH)₂D₃ 对 Hep-2 细胞增殖的抑制作用 1, 25(OH)₂D₃ 在 10⁻⁶ ~ 10⁻⁸ mol/L 浓度对 Hep-2 细胞增殖均有抑制作用,但程度不同,各剂量组对癌细胞的抑制率见图 1。3 个剂量组对喉癌细胞的抑制率随作用时间的延长以及药物浓度的上升而增加,且呈时间-剂量效应关系。各实验组与对照组之间差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。



注: A 为对照组; B 为 1, 25(OH)₂D₃ 浓度 10⁻⁸ mmol/L; C 为 1, 25(OH)₂D₃ 浓度 10⁻⁷ mmol/L; D 为 1, 25(OH)₂D₃ 浓度 10⁻⁶ mmol/L。与对照组比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01。

图 1 1, 25(OH)₂D₃ 对 Hep-2 细胞增殖能力的影响

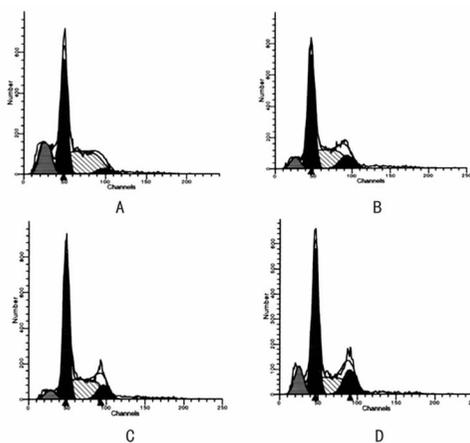
2.2 1, 25(OH)₂D₃ 对喉癌细胞周期影响 1, 25(OH)₂D₃ 对

细胞株 Hep-2 干预后,细胞周期分布及细胞增殖指数见表 1 和图 2。不同浓度 1, 25(OH)₂D₃ 作用 48 h 后, G₀/G₁ 期细胞较对照组明显增多 (*P* < 0.05), 细胞增殖指数明显减少 (*P* < 0.05)。

表 1 1, 25(OH)₂D₃ 作用 48 h 后 Hep-2 细胞周期分布 ($\bar{x} \pm s, \%, n = 3$)

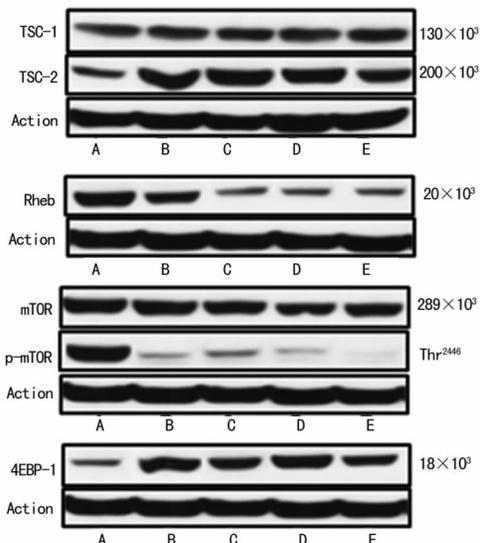
组别	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
对照组	38.89 ± 3.23	49.21 ± 4.77	11.90 ± 6.47
干预组 1	48.15 ± 1.26*	32.41 ± 4.76*	19.44 ± 3.78*
干预组 2	51.42 ± 1.95*	28.17 ± 1.27*	20.41 ± 1.79*
干预组 3	61.86 ± 2.53**	20.11 ± 2.74**	18.03 ± 1.47**

注: 与对照组比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01。



注: A 为对照组; B 为 1, 25(OH)₂D₃ 浓度 10⁻⁸ mmol/L; C 为 1, 25(OH)₂D₃ 浓度 10⁻⁷ mmol/L; D 为 1, 25(OH)₂D₃ 浓度 10⁻⁶ mmol/L。

图 2 1, 25(OH)₂D₃ 对 Hep-2 细胞周期的影响



注: A 为对照组; B 为 1, 25(OH)₂D₃ 浓度 10⁻⁸ mmol/L; C 为 1, 25(OH)₂D₃ 浓度 10⁻⁷ mmol/L; D 为 1, 25(OH)₂D₃ 浓度 10⁻⁶ mmol/L; E 为雷帕霉素干预组。

图 3 1, 25(OH)₂D₃ 对 Hep-2 细胞 mTOR 信号通路蛋白表达的影响

2.3 Western blotting 检测蛋白表达结果 如图 3 所示, Hep-

2 细胞 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 干预组与对照组比较 TSC1、TSC2 蛋白表达均增高, TSC2 蛋白表达增高尤为明显 ($P < 0.01$), 随 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 浓度增加, 蛋白表达增高尤为明显, 而雷帕霉素组表达改变不明显 ($P > 0.05$); Rheb 蛋白在 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 干预后表达降低, 不同浓度表达差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 雷帕霉素组表达也降低 ($P < 0.05$); mTOR 蛋白及其磷酸化水平在 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 干预后表达降低, mTOR 蛋白磷酸化表达降低尤为明显 ($P < 0.01$), 雷帕霉素组 mTOR 蛋白改变不明显 ($P < 0.05$), 而 mTOR 蛋白磷酸化表达降低明显 ($P < 0.01$); 4EBP-1 在 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 干预后表达增高, 不同浓度表达差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 雷帕霉素组表达也增高 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

喉鳞状细胞癌 (LSCC) 是头颈部常见的恶性肿瘤之一, 占人类所有恶性肿瘤的 2%^[3-4]。虽然近几十年来传统的喉癌治疗方式已有很大提高, 但喉癌患者总体生存率一直没有提高, 因此寻求高效、低毒的抗肿瘤药物成为研究的热点。近年来研究发现, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对乳腺癌、卵巢癌、白血病、淋巴瘤等肿瘤细胞均有抑制作用^[5]。本实验发现 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可以抑制喉癌细胞株 Hep-2 细胞生长, 该作用呈时间和剂量依赖关系, 在作用 48 h 后抑制作用最为显著。细胞周期是细胞生命活动的基本过程, 细胞增殖最终发生在细胞周期水平。以调节细胞周期为策略是抗肿瘤治疗的新途径, 细胞周期阻滞包括 G_0/G_1 期阻滞和 G_2/M 期阻滞。本研究结果显示, 随着 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 浓度的增加, Hep-2 细胞 G_0/G_1 期所占比例逐渐上升, 而 G_2/M 期细胞和 S 期细胞所占比例逐渐下降。表明 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能使 Hep-2 细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期。

mTOR 是肿瘤发生过程中的一个关键因子, 主要是通过 PI-3K/AKT/mTOR 及 AKT/TSC1-TSC2/mTOR 信号通路对细胞的生长和增殖产生调控作用, 信号通路的过度激活和调控异常与肿瘤的发生密切相关^[6]。1994 年由 PaulWorley 发现 Rheb, 最初研究表明 Rheb 在诱导癫痫后的神经元表达增高, 推测 Rheb 对外界应激反应中具有突触可塑性^[7]。更有研究证明 Rheb 是 TSC 基因下游作用因子, 具有内源性 GTP 酶活性, 作为 TSC2 的靶分子, 与有 GTP 酶激活蛋白 (GAP) 的 TSC2 直接作用^[8], 而且在 TSC 患者中 mTOR 通路异常激活, 而 TSC 蛋白和 Rheb 蛋白分别为 mTOR 通路的负性和正性调控因子^[9]。

维生素 D 参与钙、磷代谢和维持骨稳态的调节。而较多研究发现其新的功能, 研究表明, 维生素 D 具有广泛的生物学活性, 不仅在机体骨骼发育中发挥重要作用, 而且具有调节细胞生长、分化、增殖和凋亡的重要作用^[10-11]。在抗凋亡机制的研究中发现, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能够在转录水平诱导 DDIT4 表达, 后者可通过调控 mTOR 信号通路中 TSC1/2 复合物及 Rheb 的活性来抑制 mTOR 激活, 而激活后的 mTOR 通过调控 4EBP-1 表达, 从而抑制肿瘤细胞增殖。

本实验发现 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 干预 Hep-2 细胞 TSC1、TSC2 蛋白表达与对照组比较均增高。而干预组 Rheb 蛋白表达降低、mTOR 蛋白及其磷酸化水平降低、4EBP-1 蛋白表达增高。同时设立 mTOR 抑制剂雷帕霉素作为对照, 检测 mTOR 下游蛋白表达情况, 发现 mTOR 蛋白及其磷酸化水平、4EBP-1 蛋白表达水平与 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 干预组类似。由此可见, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 抑制 Hep-2 细胞中 Rheb 表达、mTOR 蛋白及其磷

酸化水平, 增加 4EBP-1 蛋白水平表达, 抑制 mTOR 信号通路, 影响 TSC1/2/Rheb/mTOR/4EBP-1 信号通路蛋白表达, 从而抑制 Hep-2 细胞增殖。

本实验不足之处在于尽管参照了较多研究的文献进行 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 浓度选择, 但是就本部分实验的完整性而言需要进一步选择不同 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的作用浓度进行研究; 检测了 mTOR 总的蛋白, 而没有进行细胞核蛋白和膜蛋白的分别检测, 这也是本课题组后期拟进一步检测的内容; 本实验仅反映体外实验, 尚无体内实验研究, 需要进一步进行动物实验研究。本课题组将在后期实验中完善这一部分。

参考文献

- [1] Dann SG, Selvaraj A, Thomas G. mTOR complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer [J]. Trends Mol Med, 2007, 13(6): 252-259.
- [2] Gocek E, Studzinski GP. Vitamin D and differentiation in cancer [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2009, 46(4): 190-209.
- [3] Jiang T, Zhu Y, Luo C, et al. Matrine inhibits the activity of translation factor eIF4E through dephosphorylation of 4E-BP1 in gastric MKN45 cells [J]. Planta Med, 2007, 73(11): 1176-1181.
- [4] Calder KB, Khalil FK, Schlauder S, et al. Immunohistochemical expression of survivin in cutaneous sebaceous lesions [J]. Am J Dermatopathol, 2008, 30(6): 545-548.
- [5] Ling X, Cheng Q, Black JD, et al. Forced expression of survivin-2B abrogates mitotic cells and induces mitochondria-dependent apoptosis by blockade of tubulin polymerization and modulation of Bcl-2, Bax, and survivin [J]. J Biol Chem, 2007, 282(37): 27204-27214.
- [6] Yamagata K, Sanders LK, Kaufmann WE, et al. Rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel ras-related protein [J]. J Biol Chem, 1994, 269(23): 16333-16339.
- [7] Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, et al. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins [J]. Nat Cell Biol, 2003, 5(6): 578-581.
- [8] Tee AR, Manning BD, Roux PP, et al. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb [J]. Curr Biol, 2003, 13(15): 1259-1268.
- [9] Rogers CS, Yedjou CG, Sutton DJ, et al. Vitamin D₃ potentiates the antitumor effects of Arsenic trioxide in human leukemia (HL-60) cells [J]. Exp Hematol Oncol, 2014, 3(1): 9-12.
- [10] 彭昌能, 谷苗, 李国庆. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 用于抗肿瘤的研究进展 [J]. 中国现代医药杂志, 2010, 12(10): 127-130.
- [11] Lisse TS, Hewison M. Vitamin D: a new player in the world of mTOR signaling [J]. Cell Cycle, 2011, 10(12): 1888-1889.