

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.03.006

雷帕霉素对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖和 HIF-1 α 及 VEGF 表达的影响

韩璐, 翟晶

Effect of Rapamycin on Proliferation of Human Cervical Carcinoma HeLa Cell and Expression of HIF-1 α and VEGF

Han Lu, Zhai Jing

Gynaecological Oncology, Dalian Maternity Hospital, Dalian 116033, China

Abstract: Objective To explore the effects of different concentrations of rapamycin on growth inhibition and influence on HIF-1 alpha, VEGF expression in HeLa cervical cancer cells. **Methods** Using four methylazo thiazole blue (MTT) colorimetric method to detect the inhibition ratio of *in vitro* human cervical cancer HeLa cells processed with different concentrations of rapamycin, the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to detect mRNA and protein levels of HIF-1 alpha and VEGF. **Results** Different concentrations of rapamycin inhibited HeLa cervical cancer cells growth significantly, with a dose-dependent mode; with increasing concentration of rapamycin, both mRNA and protein levels of HIF-1 alpha, VEGF were reduced. **Conclusion** Rapamycin inhibited HeLa cervical cancer cells growth with a dose-dependent mode, and rapamycin obviously down-regulated HIF-1 alpha, VEGF at both mRNA and protein levels.

Key words: Rapamycin; HIF-1 α ; VEGF; HeLa cell

摘要:目的 探讨不同浓度雷帕霉素对宫颈癌 HeLa 细胞生长的抑制作用及对 HIF-1 α 、VEGF 表达的影响。**方法** 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测分别以不同浓度雷帕霉素处理的体外培养人宫颈癌 HeLa 细胞的抑制率,采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、Western blot 法检测各组细胞 HIF-1 α 、VEGF mRNA 和蛋白的表达。**结果** 不同浓度雷帕霉素对宫颈癌 HeLa 细胞的生长有明显的抑制作用,并呈剂量依赖性;随雷帕霉素浓度增加细胞内 HIF-1 α 、VEGF mRNA 和蛋白的表达均呈下调趋势。**结论** 雷帕霉素对宫颈癌 HeLa 细胞的生长有抑制作用并呈剂量依赖性,雷帕霉素具有明显下调 HIF-1 α 、VEGF mRNA 和蛋白表达的作用。

关键词: 雷帕霉素;缺氧诱导因子-1 α ;血管内皮生长因子;HeLa 细胞

中图分类号: R737.3 **文献标识码:** A

0 引言

宫颈癌是妇女常见的恶性肿瘤,其发病率有明显增高并呈年轻化趋势。宫颈癌的传统治疗方法如手术、放化疗,或因适应症局限、严重不良反应、耐药等对晚期、复发病例的临床应用受到限制。研究表明缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)参与包括血管内皮生长因子(VEGF)在内的多种基因的转录调控,可上调 VEGF 的表达,诱导肿瘤新生血管的形成^[1],抑

制血管生成已成为肿瘤治疗新的发展方向。近年来,研究者还发现雷帕霉素能在转录和翻译水平阻断 HIF-1 α 表达,起到抗肿瘤的作用^[2]。本课题拟以不同浓度雷帕霉素处理体外培养的宫颈癌 HeLa 细胞,研究雷帕霉素对体外宫颈癌细胞的抑制效应,及对 HIF-1 α 与 VEGF mRNA 和蛋白表达的影响。为雷帕霉素可否进一步应用于临床抗肿瘤和放、化疗相结合的综合治疗提供新的实验数据、方法和思路。

1 材料和方法

1.1 材料

人宫颈癌 HeLa 细胞株由辽宁省大连生物化学研究所惠赠。雷帕霉素购自美国 Sigma 公司;Tr-

收稿日期:2012-06-14;修回日期:2012-08-20

基金项目:大连市科技局社会发展基金资助课题(2008E13SF195)

作者单位:116033 辽宁大连,大连市妇产医院妇科肿瘤科

作者简介:韩璐(1963-),女,博士,主任医师,主要从事妇科肿瘤研究

izol reagent 总 RNA 提取液购自美国 Invitrogen 公司;RT-PCR 试剂盒、DNA 标记购自 TaKaRa 宝生物工程(上海)有限公司;兔抗人 HIF-1 α 单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;鼠抗人 VEGF 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;通用型 SP 9000 试剂盒、氨基联苯胺(DAB)显色剂购自北京中杉生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞于含 10%胎牛血清、100 u/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液中,37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 饱和湿度培养箱中培养,细胞呈贴壁生长。

1.2.2 MTT 法检测细胞生长抑制率 取对数生长期 HeLa 细胞,调整细胞浓度为 2×10^6 个/毫升,加入 96 孔板,每孔 100 μ l,待细胞贴壁后,加入含不同浓度的雷帕霉素 1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50、100、200 nmol/L 的完全培养液 100 μ l,每组设 6 个复孔,加不含药物等量培养液细胞作对照组,以空白孔调零。药物作用 72 h 后,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μ l,4 h 后弃上清液,加入 DMSO 100 μ l 振荡,上机检测 570 nm 处吸光度 A 值。细胞生长抑制率 = (对照组平均 A 值 - 实验组平均 A 值)/对照组平均 A 值 $\times 100\%$ 。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.3 RT-PCR 法检测 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 的表达 Trizol 一步法提取雷帕霉素终浓度为 5、20、80 nmol/L 用药组作用 72 h 后及对照组的各组细胞总 RNA,取 1 μ g 为模板反转录合成 cDNA,PCR 扩增 HIF-1 α 、VEGF,同时扩增 β -actin 作为内参照。检测 HIF-1 α 上游引物序列: AACAAAA-CACAGCGAAGC,下游引物序列: ATAGTGAAT-GTGGCCTGTG,产物长度 124 bp; VEGF 上游引物序列: AGGGCAGAACATCACGAAG,下游引物序列: ACTCCAGGCCCTCGTCATTG,产物长度: 182 bp; β -actin 上游引物序列: TCCTTCTGCATC-CTGTGGCA,下游引物序列: CAAGAGATGC-CACGGCTGCT,产物长度: 275 bp。PCR 引物由 TaKaRa 公司合成。PCR 循环条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,扩增 30 个循环。反应结束后,PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳后,经 UVP 凝胶成像分析系统半定量分析,分别用 HIF-1 α / β -actin、VEGF/ β -actin 的比值 K 表示两种基因的相对表达量。

1.2.4 Western blot 法检测 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达 裂解提取雷帕霉素终浓度为 5、20、80 nmol/L 用药组及对照组 HeLa 细胞总蛋白,测蛋白浓度。煮沸变性,以每泳道 100 μ g 总蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳,截取目的蛋白凝胶片段,转膜。5%脱脂奶粉室温封闭 2 h。置膜于兔抗 HIF-1 α 单克隆抗体(1:100),鼠抗人 VEGF 单克隆抗体(1:200),兔抗 β -actin 抗体(1:1 000)一抗中,4 $^{\circ}$ C 过夜。加即用型二抗 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,DAB 显色。采用 UVP (CA91786)凝胶成相系统照相,记录条带 OD 值。蛋白表达量以 HIF-1 α / β -actin、VEGF/ β -actin 比值 K 表示。

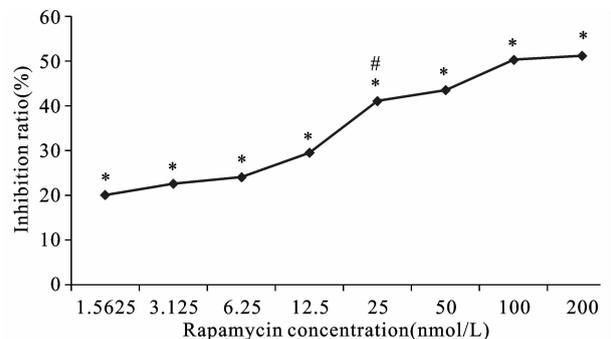
1.3 统计学方法

所有数据用 SPSS 15.0 统计分析软件进行统计学处理。检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用完全随机设计资料的方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度雷帕霉素对宫颈癌 HeLa 细胞生长的影响

雷帕霉素作用宫颈癌 HeLa 细胞 72 h 后,对细胞生长有明显的抑制作用并呈剂量依赖性,随药物浓度的增加(1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50、100、200 nmol/L)其抑制作用越明显;用药各组分别与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);相邻浓度 12.5 nmol/L 组与 25 nmol/L 组抑制率比较差异有统计学意义($P < 0.05$);余各相邻浓度组两两比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。

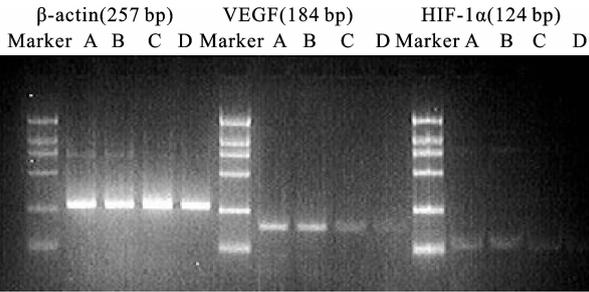


* : $P < 0.05$, vs. control group; # : $P < 0.05$, vs. 12.5 nmol/L rapamycin groups

图 1 不同浓度雷帕霉素对 HeLa 细胞增殖抑制率的影响
Figure 1 Dose-effect of rapamycin on proliferation of human cervical cancer HeLa cells by MTT

2.2 不同浓度雷帕霉素对 HeLa 细胞 HIF-1 α 与 VEGF mRNA 表达的影响

随雷帕霉素浓度增加细胞内 HIF-1 α 、VEGF mRNA 的表达均呈下调趋势。低、中、高不同浓度组 HIF-1 α mRNA (0.315 ± 0.070 、 0.170 ± 0.141 、 0.165 ± 0.212) 与对照组 (0.385 ± 0.035)，中、高浓度组 VEGF mRNA (0.380 ± 0.057 、 0.365 ± 0.064) 与对照组 (0.665 ± 0.050) 相比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)；低浓度组 VEGF mRNA (0.600 ± 0.141) 与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。相邻浓度组间两两比较：低、中浓度组间 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；中、高浓度组间 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见图 2。



A : 0 nmol/L; B: 5 nmol/L; C: 20 nmol/L; D: 80 nmol/L

图 2 雷帕霉素对人宫颈癌 HeLa 细胞 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 表达的影响

Figure 2 The effect of rapamycin on the expression of human cervical cancer HeLa cells HIF-1 α and VEGF mRNA

2.3 不同浓度雷帕霉素对 HeLa 细胞 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达的影响

在 120 kD 和 23 kD 位置可见 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白条带，随雷帕霉素浓度的增加细胞内 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达均呈下调趋势。不同浓度雷帕霉素组 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达与对照组比较：低浓度组 HIF-1 α 、VEGF (0.570 ± 0.144 、 0.304 ± 0.122) 与对照组 (0.590 ± 0.076 、 0.322 ± 0.052) 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；中、高浓度组 HIF-1 α 和 VEGF 分别为 (0.416 ± 0.070 、 0.174 ± 0.065) 和 (0.192 ± 0.142 、 0.052 ± 0.034) 与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)；相邻浓度组间两两比较结果显示：低、中浓度组间和中、高浓度组间 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见图 3。

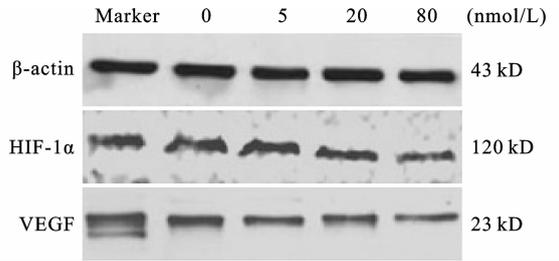


图 3 雷帕霉素对人宫颈癌 HeLa 细胞 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白表达的影响

Figure 3 The effect of rapamycin on the expression of human cervical cancer HeLa cells HIF-1 α and VEGF protein

3 讨论

近年来研究发现免疫抑制剂雷帕霉素 (Rapamycin) 具有抗肿瘤活性，美国国立癌症研究所发现雷帕霉素对乳腺癌、卵巢癌、白血病、肺癌、肾癌等肿瘤细胞株的生长明显抑制^[3]。雷帕霉素是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 特异性抑制剂，mTOR 是细胞生长和增殖的关键调节分子，通过 PI3K/AKT/mTOR 途径发挥作用，该途径在肿瘤中常被过度激活，使细胞周期调节失控，引起细胞转化和肿瘤进展^[4]。

本研究结果显示 1.5625 nmol/L 浓度雷帕霉素处理 HeLa 细胞时即表现出明显抑制作用，并随着药物浓度的倍比增加增殖抑制率呈上升趋势。药物浓度为 12.5 nmol/L 与 25 nmol/L 时抑制率差异有统计学意义，药物浓度小于 12.5 nmol/L 及大于 25 nmol/L 时，抑制率虽随药物浓度增加但差异无统计学意义，故推断雷帕霉素最佳浓度范围可能在 12.5~25 nmol/L 之间，与临床上推荐的雷帕霉素安全血药浓度 5~20 nmol/L^[5] 是相符的。杨莹等^[6] 研究证明雷帕霉素在 1~20 nmol/L 剂量范围内可诱导肝癌细胞的死亡，并具有剂量依赖性。王伟等^[7] 研究也证明了雷帕霉素可直接抑制人淋巴瘤 Raji 细胞的生长，并有时间-剂量依赖性。

HIF-1 α 是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体的一种转录因子，对维持肿瘤细胞能量代谢、细胞增殖及肿瘤血管生成具有重要作用。VEGF 是一种特异的血管内皮细胞刺激因子，可刺激肿瘤血管内皮细胞增生、增加血管的通透性，为肿瘤生长、

浸润和转移提供适合的物质基础。HIF-1 α 基因参与包括 VEGF 在内的多种基因的转录调控,上调 VEGF 的表达,诱导肿瘤新生血管的形成。大量研究已表明,宫颈癌组织中有 HIF-1 α 、VEGF mRNA 及蛋白的高表达,并与病理分级、临床分期、淋巴转移情况密切相关。雷帕霉素作为高度特异的 mTOR 抑制剂,能通过 mTOR 信号途径抑制 HIF-1 α 基因的合成、增加其降解,抑制 HIF-1 α 的表达^[8],并调节 HIF-1 α 基因下游基因 VEGF 的表达。

本研究分别采用 RT-PCR 法和 Western blot 法检测不同浓度雷帕霉素对宫颈癌 HeLa 细胞的 HIF-1 α 、VEGF mRNA 和蛋白表达的影响,结果显示随着雷帕霉素浓度的增加,两者 mRNA 和蛋白的表达均呈下调趋势。Hudson 等^[9]研究发现 mTOR 抑制剂雷帕霉素可以抑制前列腺癌细胞 HIF-1 α 的表达及 HIF-1 α 对靶基因如 VEGF 等的转录激活作用。Jiang 等^[10]通过卵巢癌裸鼠皮下移植瘤实验研究了雷帕霉素和紫杉醇单独或联合应用可抑制 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达,降低肿瘤微血管密度。

综上所述,雷帕霉素有望成为一种应用于宫颈癌的辅助治疗手段,尤其适用于晚期宫颈癌无法手术和化疗的患者。可否通过与常规化疗药物联合来增加疗效,或辅助其他治疗手段来提高雷帕霉素对宫颈癌的敏感度有待进一步研究。

参考文献:

[1] Han L, You QS, Qu XL, et al. HIF-1 α gene ZhuanRan cervical cancer cells of VEGF the influence of expression[J]. Zhongguo Shi Yong Fu Ke Yu Chan Ke Za Zhi, 2006, 37 (4): 287-8. [韩

璐, 尤庆山, 曲学铃, 等. HIF-1 α 基因转染宫颈癌细胞对 VEGF 表达的影响[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2006, 37 (4): 287-8.]

- [2] Belozero VE, Van Meir EG. Hypoxia-inducible factor-1: a novel target for cancer therapy[J]. Anticancer Drugs, 2005, 16 (9): 901-9.
- [3] Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex[J]. Science, 2005, 307(5712): 1098-101.
- [4] Ji J, Zheng PS. Activation of mTOR signaling pathway contributes to survival of cervical cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2010, 117(1): 103-8.
- [5] Mahalati K, Kahan BD. Clinical pharmacokinetic of sirolimus [J]. Clin Pharmacokinet, 2001, 40(8): 573-85.
- [6] Yang Y, Feng H, Jing XG, et al. Rapamycin induces cell death of hepatoma cells via Upregulation of Beclin 1[J]. Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu, 2011, 38 (12): 1367-9. [杨莹, 冯浩, 景晓红, 等. 雷帕霉素上调 Beclin 1 诱导肝癌细胞死亡的体外研究[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(12): 1367-9.]
- [7] Wang W, Wang ZB, Gao YH. Effect of Rapamycin in proliferation of human burkitt lymphoma cells[J]. Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu, 2012, 39(2): 157-60. [王伟, 王志彬, 高玉环. 国产雷帕霉素对人淋巴瘤细胞 Raji 增殖的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(2): 157-60].
- [8] Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer [J]. Trends Mol Med, 2005, 11(8): 353-61.
- [9] Hudson CC, Liu M, Chiang GG, et al. Regulation of hypoxia inducible factor 1 alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22 (20): 7004-14.
- [10] Jiang H, Feng Y. Hypoxia-inducible factor 1 alpha(HIF-1 alpha) correlated with tumor growth and apoptosis in ovarian cancer[J]. Int J Gynecol Cancer, 2006, 16(Suppl 1): 405-12.

[编辑: 黄园玲; 校对: 杨 卉]