

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00422

• 研究快报 •

胰岛素样生长因子 2 引起 Rh1 肉瘤细胞 mTOR 信号的背景变化

黄文峰*

三峡大学医学院形态学部, 宜昌 443002

[摘要] **目的** 观察胰岛素样生长因子(IGF)2对Rh1肉瘤细胞生长活性和mTOR信号背景的影响。**方法** 常规培养Rh1细胞,均用无血清培养液消除内源性因子影响后再用IGF-2(终浓度为10 ng/ml)刺激,72 h后用流式细胞仪检测细胞生长活性;蛋白质印迹方法观察IGF-2刺激细胞5、10、20、30、60 min后S6、Akt(s473)的动态变化。**结果** 与对照组相比,IGF-2刺激可促进Rh1细胞存活,降低细胞凋亡率;IGF-2刺激细胞后可使S6磷酸化随着时间的延长逐渐增强;IGF-2亦导致Akt(s473)位点的磷酸化,其磷酸化状态相对稳定。**结论** IGF-2刺激Rh1细胞时,mTOR信号通路中S6功能逐渐增强,Akt功能则相对稳定。

[关键词] 胰岛素样生长因子 II; Rh1 肉瘤细胞; mTOR

[中图分类号] R 730.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)04-0422-03

Insulin-like growth factor- II induces mTOR pathway change in Rh1 sarcoma cells

HUANG Wen-feng*

Department of Morphology, Medical College, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of insulin-like growth factor-II (IGF-2) on the growth and the mTOR pathway of Rh1 sarcoma cells. **Methods** Rh1 cells were cultured routinely, and were treated with IGF-2 at a final concentration of 10 ng/ml after starving with pure RPMI 1640 medium. The growth of cells was analyzed by flow cytometry 72 h after IGF-2 treatment. The phosphorylation of S6 and Akt (s473) proteins were examined by Western blotting analysis at 5, 10, 20, 30, and 60 min after IGF-2 treatment. **Results** IGF-2 treatment promoted the survival and inhibited the apoptosis of Rh1 cells compared with the control group. IGF-2 also increased the phosphorylation of S6 in a time-dependent manner. However, the phosphorylation of Akt(s473) was relatively stable in Rh1 cells. **Conclusion** IGF-2 can gradually increase the function of S6 in the mTOR pathway, and the function of Akt (s473) is kept relatively stable.

[Key words] insulin like growth factor II; Rh1 sarcoma cells; mTOR

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(4): 422-424]

分子靶向治疗模式是一种新的肿瘤生物治疗模式,即以特异性单克隆抗体、小分子抑制剂及反义的寡核苷酸等来阻断生长因子信号通路的过度激活。该模式可以单独或者与其他治疗方式共同发挥抗癌作用,为有效治疗肿瘤疾病带来了新的希望^[1-2]。

胰岛素样生长因子(IGF)信号途径是一类具有促进许多肿瘤细胞增殖、分化以及血管形成的生长因子信号通路,IGF-1和IGF-2可分别激活该通路。通常PI3K/Akt/mTOR途径是介导IGF-2抗凋亡作用最主要的信号通路,另外MAPKase的活化也参与IGF-2信号的转导^[3]。针对IGF信号途径已经

设计了众多的分子靶向药物,有的已进入临床试验^[4]。mTOR由TORC1和TORC2两种复合物组成,包括IGF-2在内的多种因素可以激活其功能,IGF-2可以和胞膜上的相应受体结合后再激活PI3K/Akt/mTOR信号^[5]。现在认为,mTOR在肿瘤生长信号中处于中心地位,抑制其功能将影响到肿瘤细胞的正常代谢和生长,由此也设计出了多种以该条通路为靶点的特异性分子靶向药物^[6]。通常,TORC1可以磷酸化S6,而TORC2则可以磷酸化Akt,S6和Akt的磷酸化状态也就分别代表TORC1和TORC2的功能,成为这些分子靶向药物

[收稿日期] 2010-07-21 **[接受日期]** 2011-03-07

[基金项目] 湖北省卫生厅科研基金指导性项目(JX3C09)。Supported by Science Research Foundation of Health Department of Hubei Province (JX3C09).

[作者简介] 黄文峰,博士。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0717-6397198, E-mail: xyyxy1999@yahoo.com.cn

的筛选靶点^[7]。

人横纹肌肉瘤细胞(Rh1)是一株近年来发现的对IGF-2刺激敏感的间叶组织来源的肿瘤细胞系,已用于相关单抗的药物筛选。但目前尚无文献报道IGF-2在该细胞引起的mTOR信号通路的基础变化,因此在评价这些新型单克隆抗体对Rh1细胞的疗效时,应考虑到磷酸化的S6和Akt(s473)的背景变化,科学评价受试药物可能存在的药理活性和差异性。本研究以Rh1为对象,观察IGF-2对Rh1细胞存活性的影响以及对S6和Akt(s473)的背景变化。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 人横纹肌肉瘤细胞株Rh1细胞由Peter教授(美国St. Jude儿童研究医院)提供。Rh1细胞用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液在37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下常规培养,每2~3d传代1次。

1.2 抗体及特殊试剂 IGF-2购自Sigma公司;Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自Biosciences公司;BCA蛋白定量试剂盒及ECL显色试剂盒为Pierce公司产品;所有抗体均为Cell Signaling Technology公司产品。

1.3 流式细胞仪检测凋亡 取总数为10⁴个Rh1细胞种于培养瓶中,用含10%胎牛血清的培养液培养27h,充分洗涤后再用不含胎牛血清的RPMI 1640的单纯培养液继续培养,同时加入IGF-2(终浓

度为10 ng/ml)刺激,细胞在单纯培养液中生长72h。制备细胞悬液,离心弃上清后用预冷的PBS缓冲液洗2次,取总数为10⁶个细胞用于测定。异硫氰酸荧光素(FITC)标记的Annexin V和碘化丙啶(PI)染色方法参考说明书,最后用流式细胞仪行凋亡分析。

1.4 蛋白质印迹检测Akt(s473)和S6磷酸化情况 取10⁵个Rh1细胞种于6孔板中,用含10%胎牛血清的培养液培养27h后再用单纯RPMI 1640培养液继续培养14h,用IGF-2(终浓度为10 ng/ml)分别刺激细胞5、10、20、30、60 min后收集总蛋白,用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,取20 μg蛋白质用于SDS-PAGE电泳,电转移至PVDF膜上,各种抗体封闭过夜后用ECL显色获取结果,均用tubulin蛋白作为内参。

1.5 统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件进行t检验,检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 IGF-2促进Rh1细胞的生长 由图1可见,Rh1细胞在无血清的单纯培养液中生长72h,流式细胞仪检测其凋亡率为(28.0±2.0)%;当在单纯培养液中给予IGF-2(10 ng/ml)刺激时流式细胞仪检测其凋亡率为(12.3±1.6)% ,与未加IGF-2者相比明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明IGF-2有促进细胞生长而减少细胞凋亡的作用。

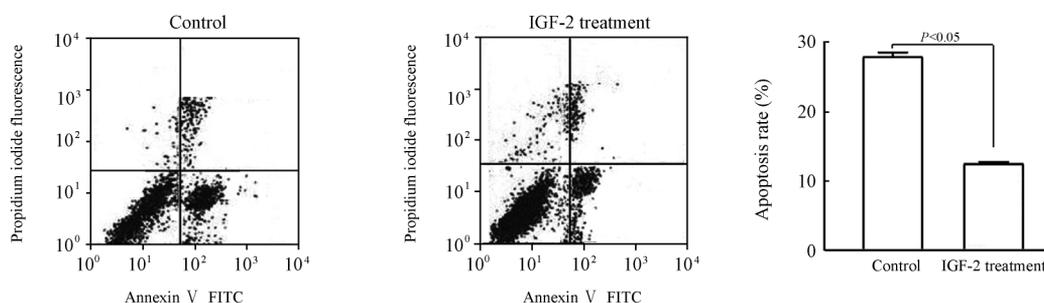


图1 流式细胞术示IGF-2减少Rh1细胞的凋亡

Fig 1 Flow cytometry showing IGF-2 decreased apoptosis rate of Rh1 cells

2.2 IGF-2刺激时Akt(s473)和S6背景变化 Rh1细胞分别用IGF-2(10 ng/ml)刺激不同时间时,蛋白质印迹结果(图2)发现,S6位点的磷酸化随着时间的延长而逐渐增强的趋势非常明显,在60 min时可见最大化;IGF-2刺激也引起Akt(s473)位点的磷酸化,但随着时间的延长,其磷酸化状态变化不明显;S6和Akt(s473)总蛋白量没有变化。此结

果表明,IGF-2刺激时S6的磷酸化有自然增强的过程,而Akt(s473)的磷酸化则比较稳定。

3 讨论

分子靶向治疗已经将癌症的治疗带入了一个崭新的领域,其能够针对性地作用于肿瘤信号转导通路中的关键信号分子,阻断特异信号向下游传递,最

终影响肿瘤细胞的生长和代谢,导致肿瘤细胞死亡,从而起到治疗肿瘤的目的。

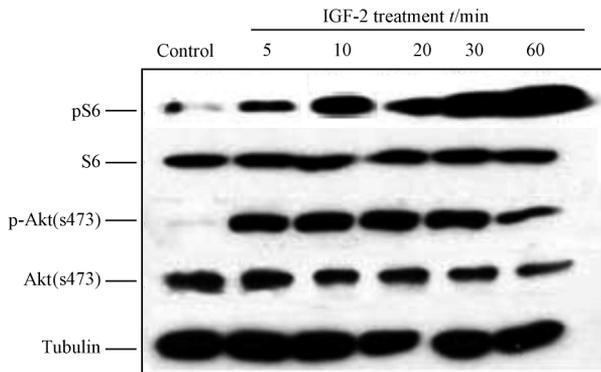


图2 IGF-2 刺激时 Akt (s473)和 S6 的背景变化
Fig 2 Phosphorylation of S6 and Akt (s473) after IGF-2 treatment

本研究发现,在 Rh1 细胞中,S6 位点的磷酸化随着时间的延长逐渐增强,在 60 min 时可见最大值,表明 TORC1 的功能在逐渐增强;IGF-2 亦可使 Akt (s473)位点磷酸化,但其磷酸化状态变化相对稳定,表明 TORC2 的功能无波动性变化。S6 和 Akt(s473)总蛋白没有明显变化,表明 IGF-2 并不影响 S6 和 Akt(s473)的基因表达。此结果表明,S6 的磷酸化有自然增强的过程,而 Akt (s473)的磷酸化则相对稳定;相应的,IGF-2 刺激时 TORC1 的功能逐渐增强,而 TORC2 的功能则相对稳定。

因此,在以 Rh1 细胞为对象评价针对 mTOR 信号通路的分子靶向药物时,应当考虑到上述 S6 和 Akt (s473) 的背景变化,通过综合分析,以反映 TORC1 和 TORC2 的功能变化情况。另外,一般认为当 TORC2 磷酸化 Akt (s473) 后,反过来又激活

TORC1,但我们的结果发现 TORC1 和 TORC2 的功能变化并非同步变化,Rh1 细胞在 IGF-2 刺激时,S6 的磷酸化改变较 Akt (s473)敏感,所以一方面 S6 的磷酸化更能反映受试药物的抑瘤活性;另一方面,在 Rh1 细胞,能够激活 TORC1 的可能不仅仅是 Akt(s473),其他的激酶也可能激活 TORC1^[8],这方面的研究尚需进一步深入。

[参考文献]

[1] 罗荣城,姚广裕. 肿瘤分子靶向治疗与生物化疗进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2009,16:101-105.

[2] Assouline S, Culjkovic B, Cocolakis E, Rousseau C, Beslu N, Amri A, et al. Molecular targeting of the oncogene eIF4E in acute myeloid leukemia (AML): a proof-of-principle clinical trial with ribavirin[J]. Blood, 2009, 114: 257-260.

[3] Gualberto A, Pollak M. Clinical development of inhibitors of the insulin-like growth factor receptor in oncology[J]. Curr Drug Targets, 2009, 10: 923-936.

[4] Kurmasheva R T, Dudkin L, Billups C, Debelenko L V, Morton C L, Houghton P J. The insulin-like growth factor-1 receptor-targeting antibody, CP-751, 871, suppresses tumor-derived VEGF and synergizes with rapamycin in models of childhood sarcoma [J]. Cancer Res, 2009, 69: 7662-7671.

[5] 陈洪菊,李晋辉,屈艺,母得志. mTOR 信号通路调节[J]. 医学分子生物学杂志, 2009, 6: 542-546.

[6] Sparks C A, Guertin D A. Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy [J]. Oncogene, 2010, 29: 3733-3744.

[7] Opel D, Poremba C, Simon T, Debatin K M, Fulda S. Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma [J]. Cancer Res, 2007, 67: 735-745.

[8] Dibble C C, Asara J M, Manning B D. Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29: 5657-5670.

[本文编辑] 孙岩

• 书 讯 •

《中国腔道泌尿外科手术视频图谱》已出版

《中国腔道泌尿外科手术视频图谱》由孙颖浩主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-5481-0057-7,定价 260.00 元。

《中国腔道泌尿外科手术视频图谱》由国内泌尿外科微创领域有较深造诣和丰富经验的学者编写而成,除了对各种腔道泌尿外科手术进行了简洁而实用的文字说明以外,更创新地结合电子出版物的优势,为临床广泛开展的各类微创泌尿外科手术配以规范、清晰的手术视频,从而更加清晰地展示出作者的手术思路和精湛的技艺。

全书简明易懂,生动直观,对腔道泌尿外科手术的初学者和具有一定操作经验的泌尿外科医生均有较高的参考价值。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通信地址:上海市翔殷路 800 号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

http://www.smmup.com