

雷帕霉素对睾丸卵黄囊瘤细胞生长及凋亡的影响

林孝坤 王永彪 赵一鸣 姚贤明 蔡祖仁 吴大洲

【摘要】目的 研究雷帕霉素对睾丸卵黄囊瘤细胞的生长抑制和诱导凋亡作用。**方法** 用不同浓度的雷帕霉素(1、10、50、100nmol/L)处理睾丸卵黄囊瘤细胞,设空白组和阴性对照组。采用CCK-8法测定不同浓度雷帕霉素对细胞生长的影响;采用流式细胞仪检测不同浓度雷帕霉素对细胞周期及凋亡的影响。**结果** 雷帕霉素可以抑制睾丸卵黄囊瘤细胞生长,呈浓度依赖性和时间依赖性,除1nmol/L浓度组外,其余浓度组各时间点的细胞生长抑制率与阴性对照组比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。雷帕霉素可以诱导睾丸卵黄囊瘤细胞凋亡,使细胞停留在G0/G1期,除1nmol/L浓度组外,其余浓度组G0/G1期细胞比例及细胞凋亡率显著高于阴性对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** 雷帕霉素能够抑制睾丸卵黄囊瘤细胞的生长,促进细胞凋亡。

【关键词】 卵黄囊瘤 雷帕霉素 细胞生长 细胞凋亡

Effect of rapamycin on growth and apoptosis of testicular yolk sac tumor cells LIN Xiaokun, WANG Yongbiao, ZHAO Yiming, et al. Department of Pediatric Surgery, the Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of rapamycin on the growth and apoptosis in testicular yolk sac tumor(YST) cells. **Methods** The testicular YST cells were treated with rapamycin of different concentrations (1nmol/L, 10nmol/L, 50nmol/L and 100nmol/L). The growth rate for testicular YST cells was evaluated by CCK-8 method, the cell cycle and apoptosis rate were determined by flow cytometry. **Results** Rapamycin inhibited the growth of testicular YST cells in a concentration and time-dependent manner($P<0.05$). Rapamycin at all concentrations except 1nmol/L induced the apoptosis of testicular YST cells, and also induced cell cycle arrest at G0/G1 phase ($P<0.05$). **Conclusion** Rapamycin can significantly inhibit the cell growth and induce the apoptosis of testicular YST cells.

【Key words】 Yolk sac tumor Rapamycin Cell growth Cell apoptosis

卵黄囊瘤是由胚胎外系生殖细胞异常分化而形成的,又称为内胚窦瘤,是最常见且高度恶性的儿童生殖细胞肿瘤,约占儿童睾丸肿瘤发病率的50%^[1-2]。目前临床上睾丸卵黄囊瘤的治疗方法主要是手术治疗,同时辅以化疗或放疗,但联合化疗不良反应大,使化疗的作用受到限制,总疗效还欠理想^[3]。深入探讨睾丸卵黄囊瘤发病的分子机制,发现早期诊断的指标以及潜在的治疗靶点,是当前睾丸卵黄囊瘤研究的一项重要内容。哺乳动

物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种丝/苏氨酸蛋白激酶,不仅在细胞转录、翻译等生物学功能中发挥着重要作用,而且参与调控多种肿瘤细胞的生长、增殖、转移及凋亡等过程^[4]。雷帕霉素是一种mTOR特异性抑制剂,对多种恶性肿瘤如胃肠道神经内分泌瘤^[5]、胃癌^[6]、前列腺癌^[7]、头颈部鳞癌^[8]等具有一定的抑制作用,但对睾丸生殖细胞肿瘤的影响鲜有报道。本研究旨在探讨雷帕霉素对睾丸卵黄囊瘤细胞的生长抑制和诱导凋亡作用,为睾丸卵黄囊瘤的治疗提供一定的实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料和试剂 睾丸卵黄囊瘤细胞由复旦大学中山医院生物医学研究中心经原代培养建立,生长稳定,其生物学特性经过鉴定。雷帕霉素为美国Sigma公司产品;DMEM培养基、胰蛋白酶为美国Gibco公司产品,青

doi: 10.12056/j.issn.1006-2785.2017.39.22.2016-172

基金项目:温州市科技局资助项目(Y20140243);国家卫生计生委资助项目(2011C1-80)

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院、温州医科大学附属育英儿童医院小儿外科(林孝坤、王永彪、赵一鸣、蔡祖仁、吴大洲);杭州市儿童医院小儿外科(姚贤明)

通信作者:王永彪, E-mail: qtwyb@163.com

链霉素双抗为美国 Invitrogen 公司产品;FBS 为美国 Hyclone 公司产品;EDTA 为美国 Amersco 公司产品;CCK-8 试剂盒、流式凋亡试剂盒为日本同仁化学研究所产品;二甲基亚砜为上海华舜生物工程公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 睾丸卵黄囊瘤细胞培养在含有 10% FBS、100U/ml 青霉素及 100 μ g/ml 链霉素双抗的高糖 DMEM 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的细胞培养箱中。

1.2.2 CCK-8 法测定细胞生长率 以 1 \times 10⁴/孔的密度将睾丸卵黄囊瘤细胞接种于 96 孔板内,培养 24h 细胞贴壁后,采用不同浓度(1nmol/L、10nmol/L、50nmol/L、100nmol/L)的雷帕霉素溶于 DMSO 中处理细胞,设空白组(无细胞仅有培养液)和阴性对照组(有细胞但不加药),每组设 6 个复孔。分别于加药后 24、48、72h 每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂,培养箱孵育 2h,酶标仪测定 450nm 波长处的吸光度(OD)值,计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率=(对照组吸光度值-实验组吸光度值)/(对照组吸光度值-空白组吸光度值)。实验操作重复 3 次。

1.2.3 PI 染色法测定细胞周期 以 1 \times 10⁵/孔的密度将睾丸卵黄囊瘤细胞接种于 6 孔板,用不同浓度(1、10、50、100nmol/L)的雷帕霉素溶于 DMSO 中处理细胞,设立阴性对照组(有细胞但不加药)。处理 24h 后,胰酶消化细胞,PBS 洗涤 2 次,70%冷乙醇固定细胞 2h,用含 RNA 酶的 PI 溶液染色,采用流式细胞仪分析细胞 DNA 含量,实验操作重复 3 次。

1.2.4 Annexin V/PI 双染色法测定细胞凋亡 以 1 \times 10⁵/孔的密度将睾丸卵黄囊瘤细胞接种于 6 孔板,用不同浓度(1、10、50、100nmol/L)的雷帕霉素溶于 DMSO 中处理细胞,设立阴性对照组(有细胞但不加药)。处理 24h 后,采用细胞凋亡检测试剂盒测定细胞凋亡,按照试剂盒说明书进行操作:胰酶消化细胞,PBS 洗涤 2 次,用 1 \times 结合缓冲液重悬细胞。加入 Annexin V-FITC,室温下在暗室孵育 10min;PI 溶液共染色细胞,流式细胞仪分析。实验操作重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较方差齐性采用 LSD-*t* 检验,方差不齐采用 Dunnett's *T*₃ 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度雷帕霉素对睾丸卵黄囊瘤细胞生长抑制率比较 见表 1。

由表 1 可见,除 1nmol/L 浓度组外,其余 3 个浓度

表 1 不同浓度雷帕霉素对睾丸卵黄囊瘤细胞生长抑制率比较(%)

组别	细胞生长抑制率		
	24h	48h	72h
1 nmol/L 浓度组	3.90 \pm 0.80	8.20 \pm 0.61 [△]	13.17 \pm 0.95 [△]
10 nmol/L 浓度组	10.56 \pm 0.78*	20.13 \pm 1.32* [△]	30.50 \pm 2.76* [△]
50 nmol/L 浓度组	17.40 \pm 1.25*	26.70 \pm 2.05* [△]	37.42 \pm 2.25* [△]
100 nmol/L 浓度组	24.97 \pm 1.78*	35.61 \pm 0.96* [△]	45.43 \pm 3.32* [△]
阴性对照组	2.23 \pm 0.42	6.03 \pm 0.66 [△]	11.16 \pm 0.92 [△]

注:与阴性对照组比较,* $P<0.05$;与 24h 比较,[△] $P<0.05$

组各时间点的细胞生长抑制率与阴性对照组比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。随药物浓度的提高和作用时间的延长,雷帕霉素对睾丸卵黄囊瘤细胞的生长有明显的抑制作用,呈浓度和时间依赖性。

2.2 不同浓度雷帕霉素对睾丸卵黄囊瘤细胞周期及凋亡的影响 见图 1、表 2。

由图 1、表 2 可见,除 1nmol/L 浓度组外,其余 3 个浓度组 G0/G1 期细胞比例及细胞凋亡率显著高于阴性对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。

3 讨论

睾丸卵黄囊瘤是小儿外科最常见的恶性肿瘤之一,好发于 3 岁以内的婴幼儿,不仅恶性程度较高,而且病情进展快,病死率高^[9]。基于肿瘤分期的静脉化疗是当前手术治疗睾丸卵黄囊瘤之外最重要的手段之一。虽然这两者的结合提高了患儿的生存率,但是由于化疗药物的不良反应及肿瘤的耐药性使得其治疗上受到了严重的限制^[10]。而 mTOR 抑制剂不仅可以通过抑制 mTOR 信号通路从而起到肿瘤抑制作用,同时与传统的化疗药物相比其毒副反应较低,特异性较强。

雷帕霉素是一种从大环内酯类抗生素,最初用作抗真菌药物,随后由于发现其免疫抑制功能而在临床上主要用于器官移植后的抗排异作用。目前已有多项研究发现雷帕霉素可以通过抑制肿瘤细胞生长、抑制血管内皮生长、诱导细胞凋亡等发挥其抗肿瘤作用^[11-13]。本研究结果表明,1、10、50、100nmol/L 的雷帕霉素作用睾丸卵黄囊瘤细胞 24、48 和 72h 后,对睾丸卵黄囊瘤细胞有明显的生长抑制作用,且这种抑制效应与药物浓度和作用时间密切相关。这也表明雷帕霉素作为 mTOR 的抑制剂,可以通过抑制睾丸卵黄囊瘤细胞生长增殖过程中 mTOR 信号通路中的关键因子 mTOR 活性,从而起到一定的抑制肿瘤生长作用。因此,深入研究 mTOR 抑制剂的机制及作用,有望为睾丸卵黄囊瘤的静脉化疗提供新的治疗方案,也有望成为睾丸卵黄囊瘤治疗的新靶点。

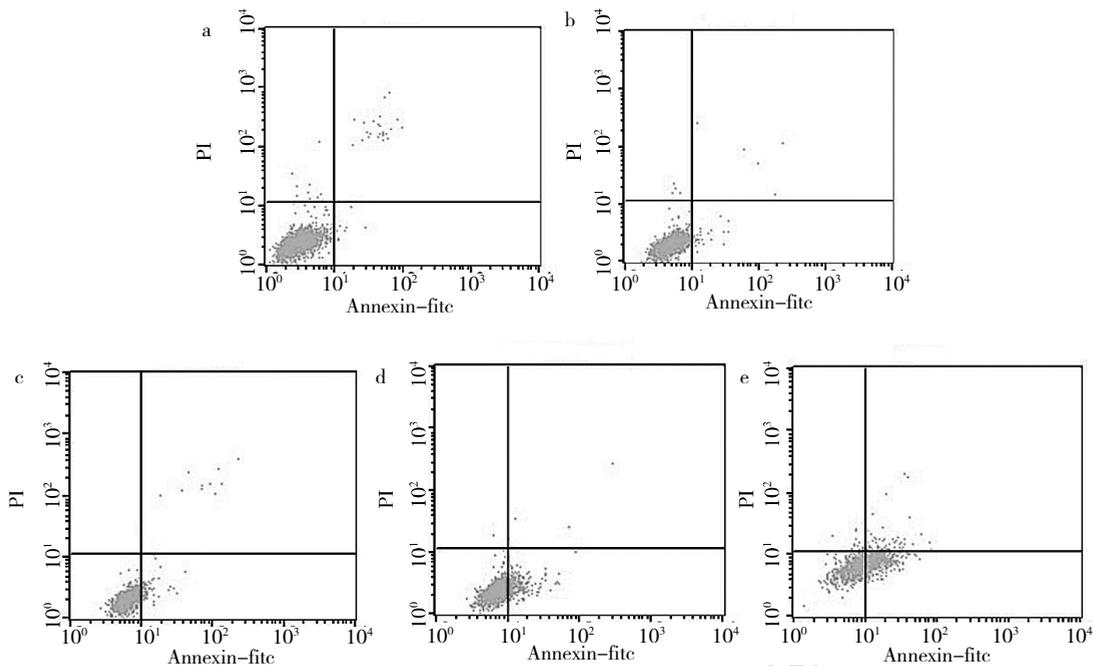


图 1 不同浓度雷帕霉素对睾丸卵黄囊瘤细胞凋亡影响的流式细胞图(a:阴性对照组;b:1nmol/L 浓度组;c:10nmol/L 浓度组;d:50nmol/L 浓度组;e:100nmol/L 浓度组;Annexin-fit:异硫氰酸工荧光素标记膜联蛋白 V;PI:碘化丙啶)

表 2 不同浓度雷帕霉素对睾丸卵黄囊瘤细胞周期及凋亡的影响(%)

组别	细胞周期			凋亡率
	G0/G1	S	G2/M	
1 nmol/L 浓度组	67.37 ± 1.66	25.53 ± 0.59	7.10 ± 0.95	3.71 ± 1.02
10 nmol/L 浓度组	74.03 ± 2.08*	22.44 ± 0.55*	3.53 ± 1.53*	7.58 ± 1.27*
50 nmol/L 浓度组	78.63 ± 1.94*	18.50 ± 0.75*	2.87 ± 1.30*	16.99 ± 1.82*
100 nmol/L 浓度组	83.20 ± 1.01*	14.01 ± 0.36*	2.79 ± 0.87*	46.49 ± 2.29*
阴性对照组	64.63 ± 1.47	26.60 ± 1.65	8.77 ± 1.20	2.57 ± 0.48

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$

肿瘤细胞生长增殖的过程主要有 DNA 合成前期(G0/G1 期)、DNA 合成期(S 期)、DNA 合成后期(G2/M 期)3 个时期。如果将肿瘤细胞生长过程的任一周期阻断,则可以阻滞肿瘤细胞的增殖和抑制肿瘤的生长。本研究流式细胞仪测定结果表明,与阴性对照组相比,10、50、100nmol/L 的雷帕霉素作用于睾丸卵黄囊瘤细胞 24h 后,G0/G1 期细胞比例明显增加,而 S 期与 G2/M 期细胞则减少,同时睾丸卵黄囊瘤细胞的凋亡率则明显增加,差异均有统计学意义,且具有药物浓度依赖性。这也进一步表明雷帕霉素将睾丸卵黄囊瘤细胞生长过程中细胞周期阻滞在了 G0/G1 期,并诱导细胞凋亡,从而抑制了睾丸卵黄囊瘤细胞的增殖。

综上所述,本次研究所采用 mTOR 靶向抑制剂雷帕霉素作用于体外培养的小儿睾丸卵黄囊瘤细胞,可以抑制肿瘤细胞生长增殖,并且导致细胞凋亡明显增加,

为下一步动物实验提供了一定的实验依据,亦为探讨 mTOR 能否作为小儿卵黄囊瘤治疗分子靶点提供可行性,但其具体作用机制仍有待进一步研究。

4 参考文献

- [1] Sievers S, Alemazkour K, Zahn S, et al. IGF2/H19 imprinting analysis of human germ cell tumors (GCTs) using the methylation-sensitive single-nucleotide primer extension method reflects the origin of GCTs in different stages of primordial germ cell development[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005, 44(3):256-264.
- [2] Smiraglia D J, Szymanska J, Kraggerud S M, et al. Distinct epigenetic phenotypes in seminomatous and nonseminomatous testicular germ cell tumors[J]. *Oncogene*, 2002, 21(24):3909-3916.
- [3] Steffens J, Treiyer A, Calaminus G. Management of pediatric testicular tumors:diagnosis, therapy, and follow-up[J]. *Urologe A*, 2009, 48(4):359-363.
- [4] Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(12):1926-1945.
- [5] Shida T, Kishimoto T, Furuya M, et al. Expression of an activated mammalian target of rapamycin (mTOR) in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 65(5):889-893.
- [6] Xu D Z, Geng Q R, Tian Y, et al. Activated mammalian target of rapamycin is a potential therapeutic target in gastric cancer[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10:536.
- [7] Kaarbø M, Mikkelsen O L, Malerød L, et al. PI3K-AKT-mTOR pathway is dominant over androgen receptor signaling in prostate cancer cells[J]. *Cell Oncol*, 2010, 32(1):11-27.

(下转第 2026 页)