

• 基础研究 •

mTOR 抑制剂西罗莫司及其衍生物对黑色素瘤细胞株 A375 的抑制作用

福建省微生物研究所 (福州 350007) 陈晓明 蔡 蕾¹ 黄剑清¹ 黄舒燕¹ 郑从燊 黄卫东^{1,2}

【摘 要】 目的 比较临床上使用的 mTOR 抑制剂西罗莫司、依维莫司和替西罗莫司对黑色素瘤细胞株 A375 的抑制作用,为 mTOR 抑制剂治疗黑色素瘤提供参考。**方法** SRB 蛋白染色法检测药物对 A375 细胞增殖的影响,Annexin V-FITC/PI 双染法检测药物对 A375 细胞凋亡的影响,PI 标记检测药物对 A375 细胞周期的影响,Western blot 检测药物对 A375 细胞 mTOR 及其下游蛋白磷酸化的影响。**结果** mTOR 抑制剂西罗莫司、依维莫司和替西罗莫司具有很强的抑制黑色素瘤细胞株 A375 增殖的作用,能够诱导 A375 细胞凋亡、阻滞细胞周期于 G1 期,并抑制 A375 细胞 mTOR 及其下游蛋白激酶 4EBP1 和 p70S6K1 的磷酸化。在这 3 个 mTOR 抑制剂中,依维莫司较西罗莫司和替西罗莫司表现出对 A375 更强的活性。**结论** 依维莫司较替西罗莫司和西罗莫司在黑色素瘤的治疗上可能更有意义。

【关键词】 西罗莫司;依维莫司;替西罗莫司;黑色素瘤

【中图分类号】 R739.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2019)04-0110-05

Effectiveness of mTOR inhibitor Sirolimus and its derivatives on melanoma cell line A375 CHEN Xiaoming, CAI Lei, HUANG Jianqing, HUANG Shuyan, ZHENG Congshen, HUANG Weidong, Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou, Fujian 350007, China

【Abstract】 Objective To compare the effectiveness of clinic mTOR inhibitors Sirolimus, Everolimus and Temsirolimus on melanoma cell line A375, which will provide insights into clinic application of mTOR inhibitors in melanoma. **Methods** Sulforhodamine B (SRB) assay was used to investigate the effectiveness of inhibitors on A375 cell proliferation. Annexin V-FITC/PI staining was performed to detect apoptosis. Propidium iodide (PI) staining was to analyze the influence of inhibitors on cell cycle. Western blot was applied to determine the regulation of mTOR as well as its downstream signaling. **Results** All of three mTOR inhibitors showed potent cell growth inhibition on A375. Mechanistically, they can promote A375 cell apoptosis, lead to cell cycle arrest at G1 phase by blocking mTOR and phosphorylation of its downstream targets 4EBP1 and p70S6K1. Everolimus exhibited more potent activity against Sirolimus and Temsirolimus. **Conclusion** Everolimus is a more promising drug for melanoma treatment.

【Key words】 sirolimus; everolimus; temsirolimus; melanoma

人类皮肤黑色素瘤是具有异常侵袭性和高死亡率的肿瘤,且易复发,恶性程度高。虽然在皮肤癌中仅占 5%,但其死亡率占皮肤癌的 75%。黑色素瘤细胞由于能够渗透至组织、淋巴和血管,因此能够快速扩散,经常停留在淋巴结、脑、肝和其他器官中^[1]。发现在 50%~60% 的黑色素瘤中存在 BRAF 基因突变,最有效的化疗药达卡巴嗪对黑色素瘤的治疗收效甚微^[2]。近年来,随着 BRAF 突变并伴随丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号途径活化是驱动黑色素瘤发展的机制被揭示, BRAF 激酶抑制剂与

MAPK 途径抑制剂 (MEK 抑制剂) 的联合治疗大大改善了 BRAF 突变的黑色素瘤患者的生存期,但多种耐药机制导致大部分患者治疗 12 个月产生了获得性耐药,而 PI3K-Akt-mTOR 信号转导途径的持续激活是耐药机制之一^[2-3]。

PI3K-Akt-mTOR 信号转导途径是一条与癌症发生、发展相关的信号转导途径。mTOR 整合细胞因子、营养成分 (如氨基酸等) 和细胞的能量水平 (如 ATP 和 AMP 的比率) 调控与细胞生长、细胞周期、自吞噬及细胞凋亡相关的蛋白质翻译, mTOR 信号转导途径的失调造成肿瘤细胞的发生、

基金项目:福建省自然科学基金资助项目 (2015J01362);福州市临床重点专科建设项目 (201807111);福州市皮肤病与医学中心建设项目 (2018080309)

1 福建省福州市皮肤病防治院;2 通信作者, Email: dr117hwd@sina.com

发展和转移。mTOR 激酶上游的 PI3K、TSC 及 PTEN 的突变均能激活 mTOR^[4]。而且, mTOR 信号转导途径与癌症相关的其他信号途径如 Notch、Wnt 和 Hippo 形成代谢网络。高度活化的 Notch 信号增加了 mTORC1 中 mTOR 伴随蛋白 Raptor 的表达, 促进 Raptor 与 mTOR 的相互作用从而激活 mTOR; Wnt 信号通过抑制 TSC 激活 mTOR; Hippo 信号通过下调 PTEN 的翻译激活 PI3K-Akt-mTOR 通路。因此, 这 3 条途径的紊乱均能造成 mTOR 信号途径的激活^[5]。BRAF/MEK 抑制剂的长期使用使 MAPK 途径再度激活, 导致胞外信号调节激酶的活化, 刺激包括 PI3K-Akt-mTOR 信号转导途径等的表达^[3]。已发现 73% 的恶性黑色素瘤患者细胞内 PI3K-Akt-mTOR 信号转导途径过度激活^[6], 此通路的激活严重影响恶性黑色素瘤的治愈率^[7], 因此 mTOR 成为治疗恶性黑色素瘤的潜在靶位。目前, mTOR 抑制剂西罗莫司 (Sirolimus, 也称雷帕霉素, Rapamycin) 衍生物依维莫司 (Everolimus) 和替西罗莫司 (Temsirolimus) 已作为抗癌药物应用于临床。此外, 西罗莫司及其衍生物对黑色素瘤细胞株也具有抑制作用, 如依维莫司能够抑制对 BRAF 抑制剂 Vemurafenib 抗性的黑色素瘤细胞的生长^[8], 替西罗莫司与顺铂联用对人黑色素瘤细胞株小鼠移植瘤具有抑制作用^[9], 西罗莫司也具有抑制黑色素瘤细胞生长的作用^[10]。本文比较 3 个临床上使用的 mTOR 抑制剂对恶性黑色素瘤细胞株 A375 的抑制作用, 为其进一步开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料: 1) 西罗莫司 (纯度 >99%, 由福建科瑞药业有限公司生产)、依维莫司 (纯度 >98%, 购自成都雅途生物技术公司) 和替西罗莫司 (纯度 >99%, 福建省微生物研究所合成) 分别用二甲亚砜配成 1 mmol/L 储存液, -20 °C 保存备用。2) 黑色素瘤细胞株 A375 购自中科院上海细胞库, 细胞培养在含 10% 胎牛血清、80 000 U/L 庆大霉素的 F12 培养基中, 置于 37 °C、含 5% CO₂ 的饱和湿度条件下。3) 兔抗 mTOR、p-mTOR (Ser2448)、p70S6K1、P-p70S6K1 (Thr389)、4EBP1、p-4EBP1 (Ser65) 和 GAPDH 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司, HRP 标记的兔抗羊 IgG 二抗购自 Bioworld Technology 公司。4) F12 培养基、胎牛血清、消化胰酶和磷酸盐缓冲液 (PBS) 购自 Gibco 公司。5) NC 膜和 ECL 发光试

剂均购自 Biorad 公司。6) 磺酰罗丹明 B (SRB) 购自 Sigma 公司, 以 1% 乙酸配制成 0.4% 溶液, 4 °C 储存。7) Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡试剂盒和细胞周期检测试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司。8) BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。9) 硫酸庆大霉素产自福建汇天生物药业有限公司。

1.2 方法: SRB 蛋白染色法检测药物对 A375 细胞增殖的影响、Annexin V-FITC/PI 双染法检测药物对 A375 细胞凋亡的影响、PI 标记检测药物对 A375 细胞周期的影响以及 Western blot 检测药物对 A375 细胞 mTOR 及其下游蛋白磷酸化的影响均按杨丹等^[11]修改的方法进行。

2 结果

2.1 依维莫司对 A375 增殖的抑制作用强于西罗莫司和替西罗莫司: 采用 SRB 进行的抑制肿瘤细胞增殖的研究表明, 在试验的 10⁻⁸ ~ 1 μmol/L 浓度范围内, 依维莫司具有比西罗莫司和替西罗莫司更强的抑制 A375 增殖的作用, 替西罗莫司的作用也强于西罗莫司 (图 1)。3 个化合物对 A375 增殖抑制作用的相对 IC₅₀ 差异具有统计学意义, 依维莫司与替西罗莫司相比, $P < 0.01$; 替西罗莫司与西罗莫司相比, $P < 0.05$ (表 1)。

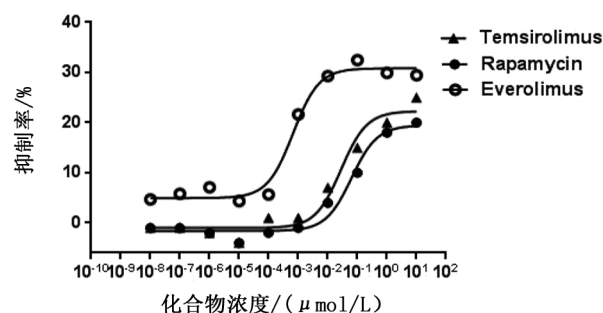


图 1 西罗莫司、替西罗莫司和依维莫司对 A375 细胞增殖的抑制率

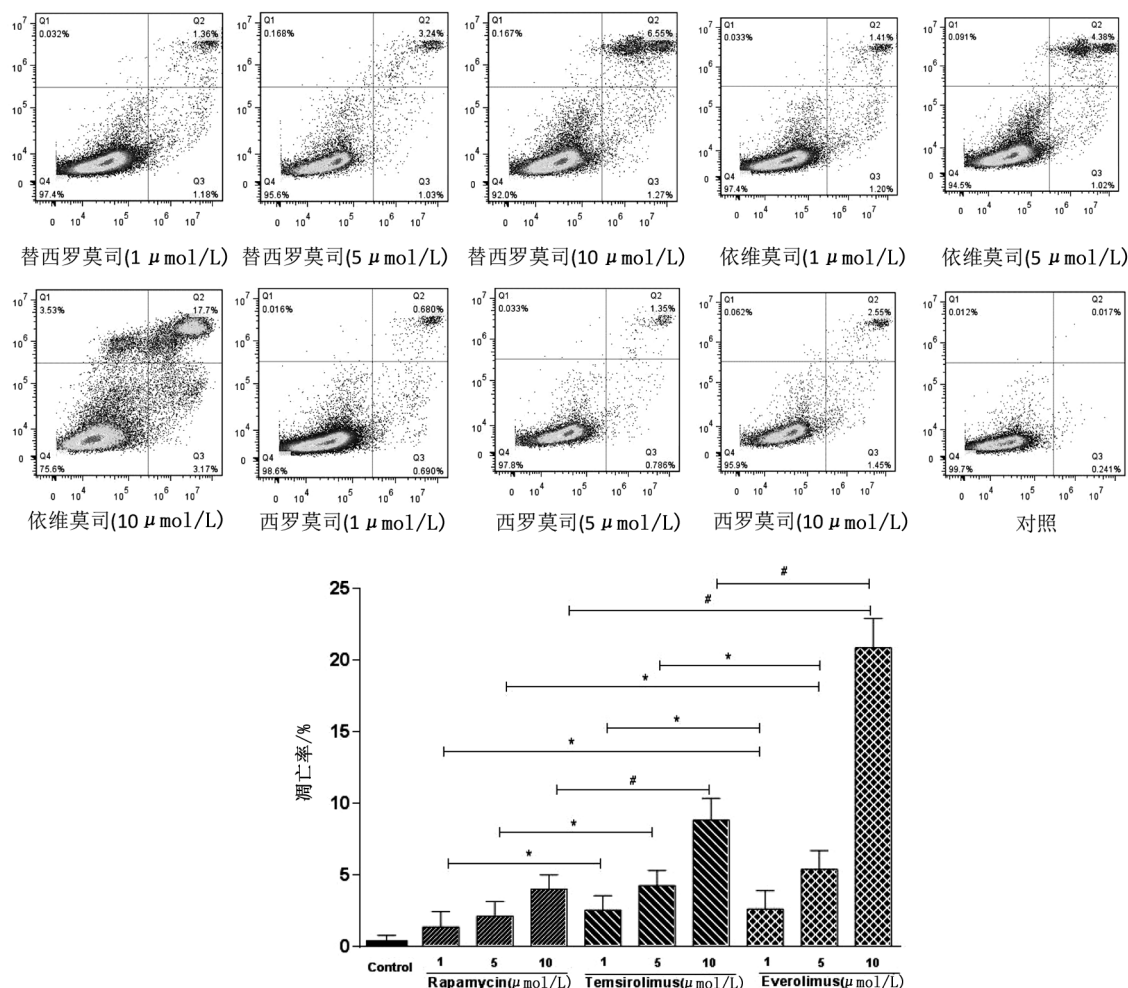
表 1 西罗莫司、替西罗莫司和依维莫司对 A375 细胞增殖的抑制作用

化合物	IC ₅₀ / (nmol/L)
替西罗莫司	30.9 ± 1.9 [#]
依维莫司	7.6 ± 1.1 [*]
西罗莫司	59.0 ± 3.1

注: 依维莫司与西罗莫司和替西罗莫司比较, $* P < 0.01$; 替西罗莫司与西罗莫司比较, $^{\#} P < 0.05$ 。

2.2 依维莫司诱导 A375 凋亡的效果优于西罗莫司和替西罗莫司：mTOR 抑制剂具有诱导细胞凋亡的作用^[12]，采用流式细胞仪分析的结果表明，在试验的 1~10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下，依维莫司对 A375

凋亡的诱导效果优于西罗莫司和替西罗莫司，替西罗莫司的效果也优于西罗莫司，差异具有统计学意义（图 2）。3 个 mTOR 抑制剂诱导 A375 细胞凋亡的效果与它们抑制 A375 细胞增殖的活性相对应。



注：* $P < 0.05$ ；# $P < 0.01$ 。

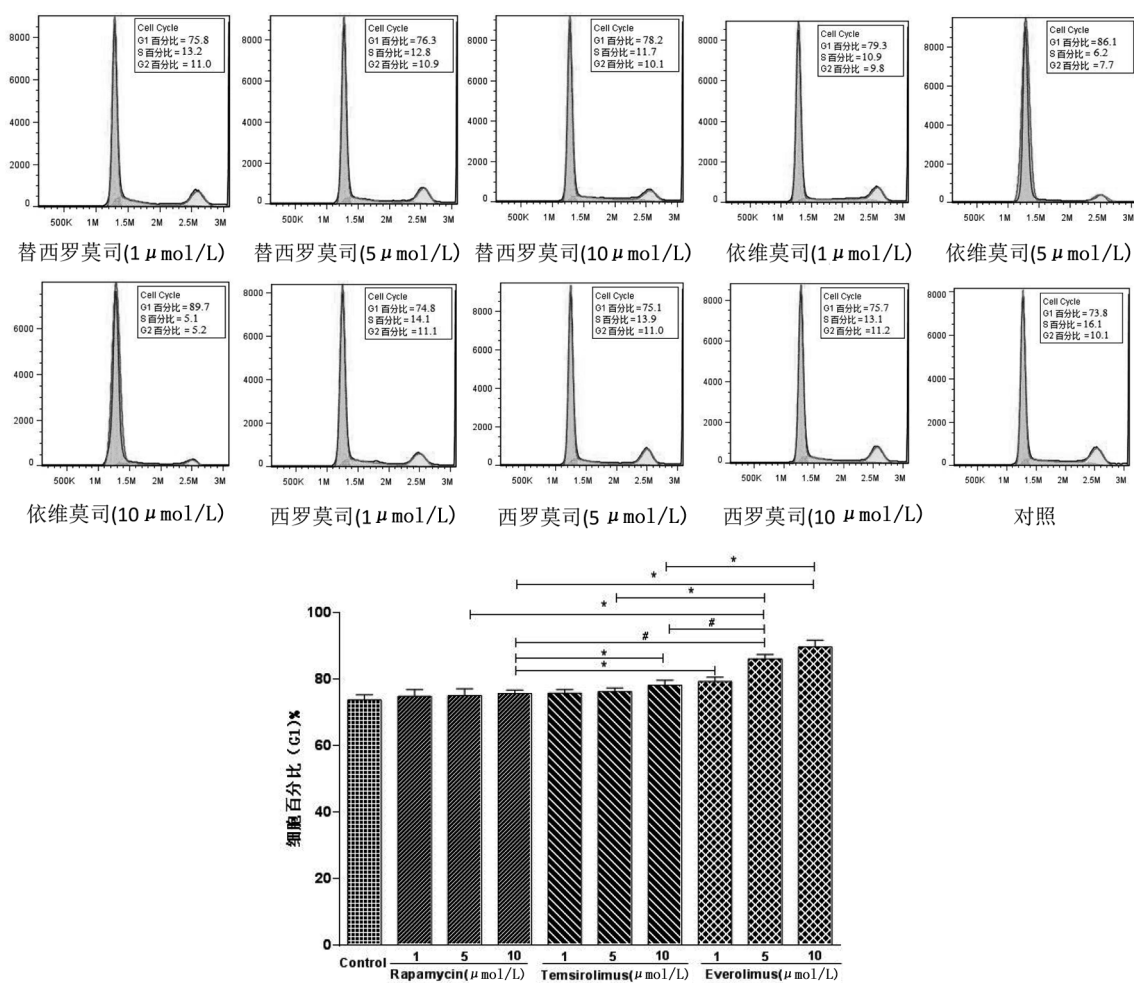
图 2 替西罗莫司、依维莫司和西罗莫司对 A375 细胞凋亡的影响

2.3 依维莫司阻止 A375 细胞周期于 G1 期的作用强于西罗莫司和替西罗莫司：mTOR 信号通路与细胞的增殖、生长密切相关，mTOR 下游 p70S6K1 和 4EBP1 参与核糖体蛋白和细胞周期相关蛋白的合成，抑制 mTOR 信号通路阻滞细胞周期于 G1 期^[11]。研究表明，在 1~10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内，依维莫司阻止 A375 细胞周期于 G1 期的作用强于西罗莫司和替西罗莫司，而且 1 $\mu\text{mol/L}$ 依维莫司的阻滞作用强于 10 $\mu\text{mol/L}$ 的西罗莫司，5 $\mu\text{mol/L}$ 依维莫司的阻滞作用强于 10 $\mu\text{mol/L}$ 替西罗莫司；10 $\mu\text{mol/L}$ 替西罗莫司的作用效果也优于 10 $\mu\text{mol/L}$ 的西罗莫司，差异均具有统计学意义（图 3）。

2.4 依维莫司对 mTOR 信号通路的抑制作用强于替西罗莫司和西罗莫司：mTOR 抑制剂通过抑制 mTOR 信号通路抑制细胞增殖、阻滞细胞周期并促进细胞凋亡。采用 Western blot 检测依维莫司、西罗莫司和替西罗莫司对 A375 细胞 mTOR 及其下游蛋白激酶 p70S6K1 和 4EBP1 磷酸化的抑制作用表明，在相同浓度下，依维莫司对 mTOR 磷酸化的抑制作用强于西罗莫司，高浓度下也强于替西罗莫司；对 p70S6K1 磷酸化的抑制作用，依维莫司强于替西罗莫司和西罗莫司；而且，相同浓度下依维莫司对 4EBP1 磷酸化的抑制作用均强于替西罗莫司和西罗莫司。上述差异均有统计学意义（图 4）。该结果充分说明由于依维莫司具有比替西罗莫

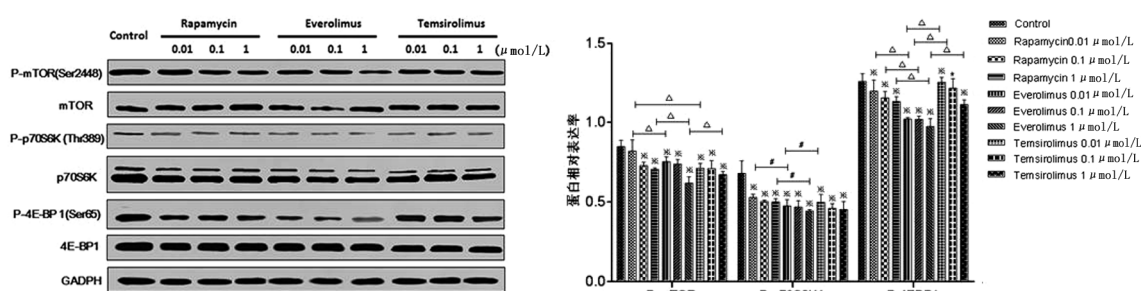
司和西罗莫司更强的抑制 A375 细胞 mTOR 信号通路的作用, 因此, 依维莫司抑制 A375 细胞增殖、

阻滞 A375 细胞周期和诱导 A375 细胞凋亡的作用均强于西罗莫司和替西罗莫司。



注: * $P < 0.05$; # $P < 0.01$ 。

图 3 替西罗莫司、依维莫司和西罗莫司对 A375 细胞周期的阻滞作用



注: 药物组与对照比较, * $P < 0.05$; 药物组与对照比较, ※ $P < 0.01$; 依维莫司组与替西罗莫司组或西罗莫司组比较, # $P < 0.05$; 依维莫司组与替西罗莫司组或西罗莫司组比较, △ $P < 0.01$ 。

图 4 替西罗莫司、依维莫司和西罗莫司对 A375 细胞 mTOR 信号通路相关蛋白磷酸化的影响

3 讨论

西罗莫司、依维莫司和替西罗莫司是临床正在使用的 mTOR 抑制剂, 它们通过对 mTOR 的抑制作用抑制细胞的增殖、生长和代谢。西罗莫司和依

维莫司是器官移植的抗排斥反应药物和预防冠状动脉再狭窄的药物支架涂层, 依维莫司和替西罗莫司是 mTOR 靶向抗肾癌等的药物, 依维莫司还是治疗与 TSC 相关的罕见病及起源于肺、胃和胰腺等

的神经内分泌瘤药物。本文研究表明 mTOR 抑制剂西罗莫司、依维莫司和替西罗莫司通过抑制黑色素瘤细胞株 A375 细胞 mTOR 信号通路,诱导 A375 细胞凋亡,阻滞细胞周期于 G1 期,从而抑制了 A375 的增殖,具有治疗黑色素瘤的潜力。在这 3 个临床使用的 mTOR 抑制剂中,依维莫司较西罗莫司和替西罗莫司表现出对 A375 更强的活性,在黑色素瘤的治疗上可能更有潜力。mTOR 在细胞中与其伴随蛋白组成了 mTORC1 和 mTORC2 复合物^[13]。西罗莫司及其衍生物为 mTOR 变构抑制剂,通过与 FKBP12 结合,解聚 mTORC1 二聚体,抑制 mTORC1 的活性^[14]。p70S6K1 和 4EBP1 是 mTORC1 的直接底物,mTOR 通过对它们的磷酸化促进蛋白质的合成。mTORC1 对 p70S6K1 磷酸化,促进了 5'端富含寡聚尿嘧啶的 mRNA (5'TOP mRNAs) 的翻译,这些 mRNA 编码大多数蛋白质翻译过程所需的成分;mTORC1 对 4EBP1 的磷酸化使其与真核翻译起始因子 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E) 解离,后者启动依赖帽 (cap-dependent) 的蛋白质翻译^[13]。对西罗莫司的研究表明,西罗莫司对 mTORC1 的抑制,彻底抑制了 p70S6K1 的活性,但对 4EBP1 抑制不彻底^[15]。本研究表明,依维莫司较西罗莫司和替西罗莫司具有更强的抑制 4EBP1 的活性,这是否与依维莫司抑制 A375 细胞增殖的活性强于西罗莫司和替西罗莫司有关还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Uzdensky A B, Demyanenko SV, Bibov M Y. Signal transduction in human cutaneous melanoma and target drugs [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13 (8): 843-866.
- [2] Arozarena I, Wellbrock C. Overcoming resistance to BRAF inhibitors [J]. *Ann Transl Med*, 2017, 5 (19): 387.
- [3] Welsh SJ, Rizos H, Scolyer R A, et al. Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: Where to next? [J]. *Eur J Cancer*, 2016, 62: 76-85.
- [4] Yecies J L, Manning B D. mTOR links oncogenic signaling to tumor cell metabolism [J]. *J Mol Med*, 2011, 89 (3): 221-228.
- [5] Shimobayashi M, Hall M N. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15 (3): 155-162.
- [6] Karbowniczek M, Spittle CS, Morrison T, et al. mTOR is activated in the majority of malignant melanomas [J]. *J Invest. Dermatol*, 2008, 128 (4): 980-987.
- [7] Lasithiotakis KG, Sinnberg T W, Schitteck B, et al. Combined inhibition of MAPK and mTOR signaling inhibits growth, induce cell death, and abrogates invasive growth of melanoma cells [J]. *J. Invest. Dermatol*, 2008, 128 (8): 2013.
- [8] Ruzzolini J, Peppicelli S, Andreucci E, et al. Everolimus selectively targets vemurafenib resistant BRAF (V600E) melanoma cells adapted to low pH [J]. *Cancer Lett*, 2017 (408): 43-54.
- [9] Thallinger C, Poepl W, Pratscher B, et al. CCI-779 plus cisplatin is highly effective against human melanoma in a SCID mouse xenotransplantation model [J]. *Pharmacology*, 2007, 79 (4): 207-213.
- [10] Bundscherer A, Hafner C, Maisch T, et al. Antiproliferative and proapoptotic effects of rapamycin and celecoxib in malignant melanoma cell lines [J]. *Oncol Rep*, 2008, 19 (2): 547-553.
- [11] 杨丹, 陈晓明, 谢立君等. 雷帕霉素的三氮唑新衍生物 FIM-X13 对人胃癌细胞株 AGS 的作用及机制的初步研究 [J]. *中国生物技术杂志*, 2016, 11 (3): 224-228.
- [12] Ciołczyk-Wierzbicka D, Zarzycka M, Gil D, et al. mTOR inhibitor Everolimus-induced apoptosis in melanoma cells [J]. *J Cell Commun Signal*, 2019, Mar 8.
- [13] Laplante M and Sabatini D M. mTOR signaling in growth control and disease [J]. *Cell*, 2012, 149 (2): 274-293.
- [14] Yip C K, Murata K, Walz T, et al. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition [J]. *Molecular Cell*, 2010, 38 (5): 768-774.
- [15] Choo AY, Yoon S, Kim S G, et al. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation [J]. *PNAS*, 2008, 105 (45): 17414-17419.