

[文章编号] 1674-8115(2011)03-0275-04

· 论著 ·

## 雷帕霉素对人非小细胞肺癌细胞株 A549 生长及增殖的影响

李文艳，朱 琦

(上海交通大学附属胸科医院药剂科，上海 200030)

[摘要] 目的 探讨雷帕霉素对人非小细胞肺癌细胞株 A549 生长和增殖的影响。方法 分别以 0(阴性对照组)、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、5  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素干预 A549 细胞(雷帕霉素干预组)24、48、72 h, MTT 比色法检测细胞活力。分别以 0(阴性对照组)、0.01、0.05、0.1、0.5、1  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素干预 A549 细胞(雷帕霉素干预组)48 h, 光学显微镜观察细胞形态变化, PI 单染流式细胞仪分析细胞周期。结果 MTT 比色法检测结果显示:雷帕霉素干预组细胞生长抑制率显著高于阴性对照组( $P < 0.05$ ),其中以 5  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素干预 72 h 组的细胞生长抑制率最高。与阴性对照组比较,经不同浓度雷帕霉素干预 48 h 后的 A549 细胞变圆缩小,伪足缩短,细胞间距增大;细胞周期检测结果显示:与阴性对照组比较,雷帕霉素干预组  $G_0/G_1$  期细胞百分率明显增加,S 期细胞百分率显著减少( $P < 0.05$ )。结论 雷帕霉素对人肺癌细胞株 A549 的生长和增殖具有明显抑制作用,并呈现一定的时间和浓度依赖性。

[关键词] 雷帕霉素;肺癌;增殖;细胞周期

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.03.006

[中图分类号] R734.2; Q26

[文献标志码] A

## Effects of rapamycin on growth and proliferation of human non-small cell lung cancer cell line A549

LI Wen-yan, ZHU Jun

(Department of Pharmacy, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

[Abstract] Objective To investigate the effects of rapamycin on the growth and proliferation of human non-small cell lung cancer cell line A549. Methods A549 cells were cultured with 0 (negative control group), 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 and 5  $\mu\text{mol/L}$  rapamycin (rapamycin intervention group) for 24 h, 48 h and 72 h, and cell viability was detected by MTT assay. A549 cells were cultured with 0 (negative control group), 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1  $\mu\text{mol/L}$  rapamycin (rapamycin intervention group) for 48 h, cell morphology was observed by light microscopy, and cell cycle was analysed by flow cytometry with PI simple staining. Results MTT assay revealed that the cell growth inhibition rate in rapamycin intervention group was significantly higher than that in negative control group ( $P < 0.05$ ), and the cell growth inhibition rate was most significant after culture with 5  $\mu\text{mol/L}$  rapamycin for 72 h. Compared with negative control group, A549 cells tended to maintain a round shape by contracting the pseudopod, and the gaps between cells enlarged after culture with different concentrations of rapamycin for 48 h. Cell cycle detection indicated that compared with negative control group, the percent of cells in  $G_0/G_1$  phase significantly increased, and the percent of cells in S phase significantly decreased in rapamycin intervention group ( $P < 0.05$ ). Conclusion Rapamycin has significant inhibitory effects on the growth and proliferation of human lung cancer cell line A549 in a time- and concentration-dependent manner.

[Key words] rapamycin; lung cancer; proliferation; cells cycle

雷帕霉素作为免疫抑制剂已在临幊上广泛使  
用<sup>[1-4]</sup>,通过结合免疫亲和蛋白 FKBP12 的靶蛋白  
m-TOR 影响多种肿瘤细胞的体外增殖和生长周  
期<sup>[5-8]</sup>。鉴于雷帕霉素对非小细胞肺癌细胞形态影

响的研究甚少,且对于其对细胞增殖和周期的影响  
尚存争议,本研究选择以不同浓度的雷帕霉素干预  
非小细胞肺癌细胞株 A549,观察细胞形态、生长增殖  
和细胞周期的变化。

[作者简介] 李文艳(1978—),女,药师,硕士;电子信箱: lwy2975@126.com。

[通信作者] 朱 琦,电子信箱: jone\_zhu@163.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及主要试剂

人肺癌细胞株 A549 由上海交通大学附属胸科医院肺部肿瘤实验室惠赠。雷帕霉素和 MTT 溶液 (Sigma); 0.25% 胰蛋白酶 (Gibco); 碘化吡啶 (PI) (上海生工生物工程技术服务有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 MTT 比色法检测细胞生长** 复苏人肺癌细胞株 A549, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM-HamF12 培养液培养至对数生长期, 按  $1 \times 10^4$  个/mL 的密度接种至 96 孔板中, 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 过夜贴壁后, 加入雷帕霉素干预(雷帕霉素干预组), 雷帕霉素终浓度分别为 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、5  $\mu\text{mol/L}$ , 以不添加雷帕霉素的细胞作为阴性对照组, 每组设 5 个复孔。培养板置细胞培养箱中, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下继续培养 24、48、72 h; 终止培养前 4 h, 各孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20  $\mu\text{L}$ , 终止培养时吸尽各孔内上清液, 加入 150 mL DMSO, 振荡 10 min, 在酶联免疫检测仪上测定各孔 D (570 nm), 并计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率 = [1 - 雷帕霉素干预组 D (570 nm)/阴性对照组 D (570 nm)] × 100%。

**1.2.2 细胞形态观察** 取对数生长期 A549 细胞, 以  $3 \times 10^5$  个/mL 的密度接种至 6 孔板 (2 mL/孔), 加入雷帕霉素干预(雷帕霉素干预组)48 h, 雷帕霉素终浓度分别为 0(阴性对照组)、0.01、0.05、0.1、0.5、1  $\mu\text{mol/L}$ 。光学显微镜观察细胞形态。

**1.2.3 PI 单染流式细胞仪检测细胞周期** 取对数生长期 A549 细胞,  $1 \times 10^6$  个/mL 的密度接种至 6 孔板中; 细胞贴壁后, 弃上清; 加入雷帕霉素干预(雷帕霉素干预组)48 h, 雷帕霉素终浓度分别为 0(阴性对

照组)、0.01、0.05、0.1、0.5、1  $\mu\text{mol/L}$ 。用 0.25% 胰蛋白酶消化收集所有细胞, 用预冷的 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 清洗 1 次, 弃上清, 加入 1 mL 预冷的 70% 乙醇固定, 4 °C 过夜。收集所有固定标本, 离心弃上清, 用 PBS 清洗 1 次, 加入浓度为 1 mg/mL 的 RNaseA, 用 PI 染液 (50  $\mu\text{g/mL}$ ), 室温下避光染色 30 min, 流式细胞仪进行细胞周期 DNA 含量分析, 确定细胞周期分布 ( $G_0/G_1$  期和 S 期细胞百分率)。

**1.3 统计学方法** 采用 Excel 和 SPSS 11.0 软件包进行统计学分析。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 表明差异有统计学意义。

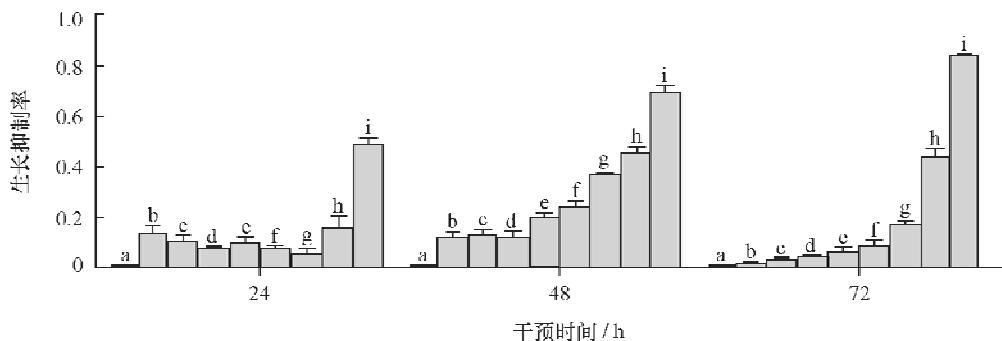
## 2 结 果

### 2.1 雷帕霉素干预对细胞生长的影响

0.1 ~ 5  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素干预 48 h 组和 0.5 ~ 5  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素干预 72 h 组的细胞生长抑制率显著高于阴性对照组 ( $P < 0.05$ ), 在上述范围内细胞生长抑制率随雷帕霉素干预浓度的增加呈现上升趋势。在 0.01 ~ 0.5  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素干预浓度区间, 干预 48 h 的细胞生长抑制率显著高于干预 24 h 和 72 h ( $P < 0.05$ ); 在 > 0.5  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素干预浓度区间, 则呈现时间依赖性, 即细胞生长抑制率随干预时间的延长而上升(图 1)。

### 2.2 雷帕霉素干预对细胞形态和细胞周期的影响

与阴性对照组比较, 雷帕霉素干预组 A549 细胞变圆缩小, 伪足缩短, 细胞间距增大; 随着雷帕霉素干预浓度的增加上述变化更为明显(图 2)。干预后 48 h, 与阴性对照组比较, 雷帕霉素干预组  $G_0/G_1$  期细胞百分率显著增加 ( $P < 0.05$ ) (图 3), S 期细胞百分率明显减少 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。



a. 阴性对照组; b ~ i. 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、5  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素干预组。

图 1 不同浓度雷帕霉素干预不同时间对 A549 细胞生长的影响

Fig 1 Effects of culture with different concentrations of rapamycin for different time on growth of A549 cells

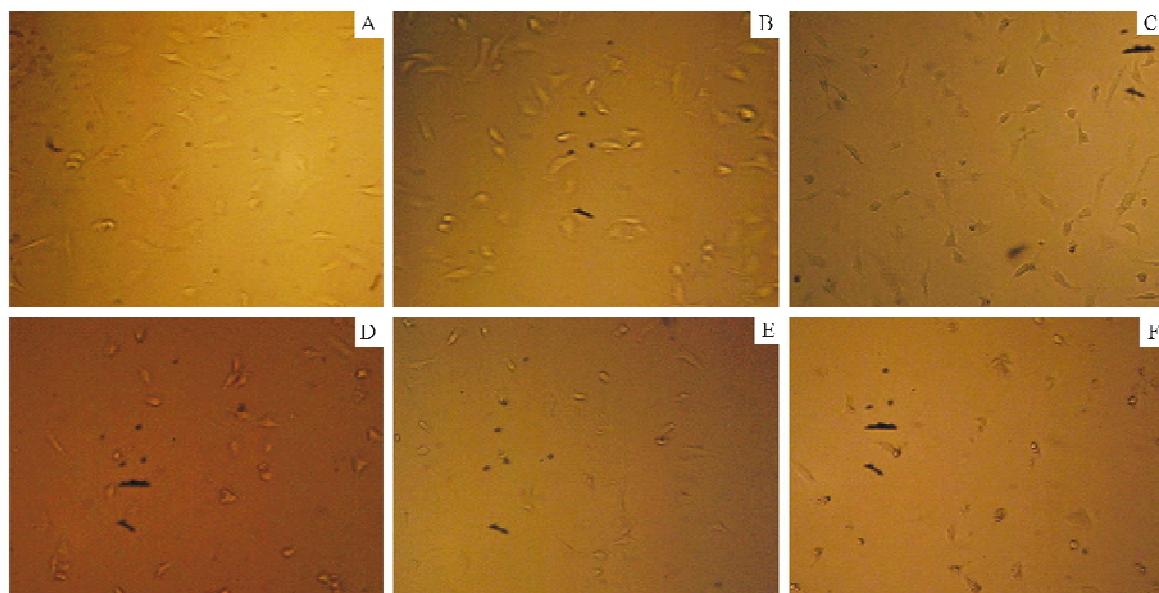
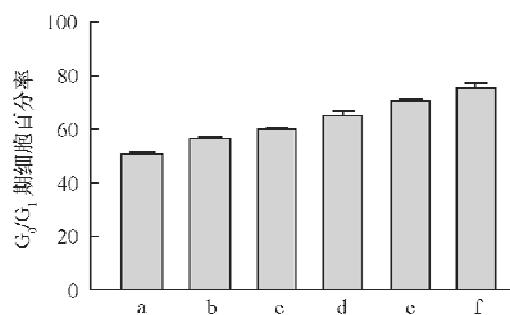
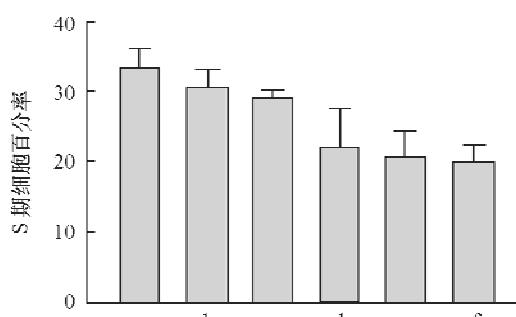
A. 阴性对照组; B ~ F. 0.01、0.05、0.1、0.5、1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  雷帕霉素干预组。图 2 不同浓度雷帕霉素干预对 A549 细胞形态的影响  $\times 250$ Fig 2 Effects of culture with different concentrations of rapamycin on morphology of A549 cells  $\times 250$ a. 阴性对照组; b ~ f. 0.01、0.05、0.1、0.5、1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  雷帕霉素干预组。图 3 各组  $G_0/G_1$  期细胞百分率Fig 3 Percents of cells in  $G_0/G_1$  phase in each groupa. 阴性对照组; b ~ f. 0.01、0.05、0.1、0.5、1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  雷帕霉素干预组。

图 4 各组 S 期细胞百分率

Fig 4 Percents of cells in S phase in each group

### 3 讨 论

本研究选用人非小细胞肺癌细胞株 A549 作为实验对象,观察和分析雷帕霉素干预对肺癌细胞株

生长和增殖的影响。鉴于在体和离体情况的不同,本实验选取的雷帕霉素工作浓度区间为 0.01 ~ 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ,既涵盖了器官移植所用的推荐剂量(5 ~ 20 ng/mL),又扩大了浓度范围。MTT 法检测发现,雷帕霉素干预 48 h 细胞生长抑制率与阴性对照组比较有统计学意义的浓度区间较广(0.1 ~ 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ),因此在之后的细胞形态观察和细胞周期检测中选择的雷帕霉素干预时间均为 48 h,干预浓度区间为 0.01 ~ 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。本研究发现,0.01 ~ 0.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  雷帕霉素干预 72 h 的细胞生长抑制率显著低于干预 48 h,这可能与雷帕霉素在体外实验条件下稳定性不高有关<sup>[9]</sup>,亦或与雷帕霉素打破 mTORC<sub>1</sub>与 mTORC<sub>2</sub>产生的平衡体系有关。

mTOR 不同结构域与不同蛋白结合在细胞内可形成两种主要不同复合物,即 mTORC<sub>1</sub> 和 mTORC<sub>2</sub> 复合物,雷帕霉素通过与 mTOR 复合体结合后控制蛋白合成,从而调控细胞增殖。目前公认的结论是:由于 mTORC<sub>1</sub>可以使细胞的蛋白合成增加及生存和增殖增强,雷帕霉素通过抑制 mTORC<sub>1</sub>生成发挥作用,使体外培养的肿瘤细胞增殖减弱。而对于某些肿瘤细胞而言,雷帕霉素作用时间延长后,某个浓度区间可能通过阻止 mTORC<sub>2</sub> 复合物的形成,阻碍由 mTORC<sub>2</sub> 调节的细胞生长和增殖,这又会反馈性增强 mTORC<sub>1</sub> 作用,使雷帕霉素对细胞的增殖抑制作用减弱。已有研究<sup>[10 ~ 11]</sup>证实雷帕霉素对多种肿瘤细胞

的生长和增殖具有抑制作用;对于本研究中 0.01~0.5 μmol/L 雷帕霉素干预 72 h 的细胞生长的抑制率降低是否与 mTORC<sub>1</sub> 和 mTORC<sub>2</sub> 的作用有关,或者在雷帕霉素影响非小细胞肺癌细胞生长方面还可能存在其他机制,有待进一步的分子生物学实验研究加以探讨。

雷帕霉素通过 PI3K/Akt/mTOR 信号转导途径发挥作用。非小细胞肺癌细胞的生长与胞膜上受体分子和相关配体结合有关,如 c-met、c-mit、IGFR-1R 等,PI3K 下游信号分子如 Akt 在某些肺癌细胞中呈现高活性,PI3K/Akt 下游分子如 mTOR 在肺癌细胞中也呈现出磷酸化的活化状态。因此,雷帕霉素及其衍生物也可能作用于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路各个环节中的蛋白分子,阻断 mTOR 作用,亦或反馈性地调节整个信号通路的表达,进而影响肺癌细胞的生存和进展,亦或一定浓度的雷帕霉素产生促增殖的作用。另外,临幊上雷帕霉素单药应用仅使小部分肺癌患者受益,因此联合雷帕霉素及其衍生物和针对 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路中特定蛋白靶向药物使用,肺癌细胞的生长增殖可能真正得到广泛抑制,肺癌患者才可广泛受益,针对其中机制的研究尚有很大空间。

## [参考文献]

- [1] Vezina G, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle [J]. J Antibiot (Tokyo), 1975, 28(10): 721~726.
- [2] Martel RR, Klicius J, Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic [J]. Can J Physiol Pharmacol, 1977, 55(1): 48~51.
- [3] Eng CP, Sehgal SN, Vezina G. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors [J]. J Antibiot (Tokyo), 1984, 37(10): 1231~1237.
- [4] Ingle GR, Sievers TM, Holt CD. Sirolimus: continuing the evolution of transplant immunosuppression [J]. Ann Pharmacother, 2000, 34(9): 1044~1055.
- [5] Chang SB, Miron P, Miron A, et al. Rapamycin inhibits proliferation of estrogen-receptor-positive breast cancer cells [J]. J Surg Res, 2007, 138(1): 37~44.
- [6] Fechner G, Classen K, Schmidt D, et al. Rapamycin inhibits *in vitro* growth and release of angiogenic factors in human bladder cancer [J]. Urology, 2009, 73(3): 665~668.
- [7] Shen Y, Wang X, Xia W, et al. Antiproliferative and overadditive effects of rapamycin and FTY720 in pancreatic cancer cells *in vitro* [J]. Transplant Proc, 2008, 40(5): 1727~1733.
- [8] Parker EM, Monopoli A, Ongini E, et al. Rapamycin, but not FK506 and GPI-1046, increases neurite outgrowth in PC12 cells by inhibiting cell cycle progression [J]. Neuropharmacology, 2000, 39(10): 1913~1919.
- [9] Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, et al. Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-independent apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells [J]. Cancer Res, 1999, 59(4): 886~894.
- [10] Butzal M, Loges S, Schweizer M, et al. Rapamycin inhibits proliferation and differentiation of human endothelial progenitor cells *in vitro* [J]. Exp Cell Res, 2004, 300(1): 65~71.
- [11] Heuer M, Benkő T, Cincinnati VR, et al. Effect of low-dose rapamycin on tumor growth in two human hepatocellular cancer cell lines [J]. Transplant Proc, 2009, 41(1): 359~365.
- [12] Boffa DJ, Luan F, Thomas D, et al. Rapamycin inhibits the growth and metastatic progression of non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(1 Pt 1): 293~300.

[收稿日期] 2010-10-13

[本文编辑] 王淑平