

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.06.007

## mTORC1 抑制剂影响谷氨酰胺代谢抑制 人胰腺神经内分泌肿瘤细胞增殖\*

熊双龙, 龚玉竹, 谢贛丰, 李妮, 梁后杰<sup>△</sup>

(第三军医大学西南医院肿瘤科, 重庆 400038)

**摘要:**目的 体外研究雷帕霉素靶蛋白复合物 1(mTORC1)抑制剂对人胰腺神经内分泌肿瘤(pNET)细胞株 BON 增殖的影响,探讨谷氨酰胺(Gln)代谢在 mTORC1 抑制剂影响 BON 细胞增殖中的作用。方法 体外培养人胰腺神经内分泌肿瘤细胞 BON,分别用 1、5、10、25、50、100 nM 的雷帕霉素处理后,应用 CCK-8 检测 BON 的生长抑制率。用 100 nM 雷帕霉素处理 BON 细胞 12 h 后,检测其对 Gln 的吸收水平。在无葡萄糖(Glc)和(或)无谷氨酰胺(Gln)的情况下,应用 CCK-8 检测 BON 的增殖情况以及流式细胞术检测细胞周期情况。结果 雷帕霉素可明显抑制 BON 细胞的增殖,抑制率呈时间-浓度依赖性( $P < 0.05$ )。同时雷帕霉素影响 BON 对 Gln 的吸收,而 BON 明显依赖于 Gln 生长,Glc-/Gln+组、Glc-/Gln-组、Glc+/Gln-组生长速率较 Glc+/Gln+组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 mTORC1 抑制剂可能通过影响 Gln 代谢抑制 BON 细胞的增殖。

**关键词:**细胞增殖;谷氨酰胺代谢;mTORC1 抑制剂;胰腺神经内分泌肿瘤

中图分类号:R246.8

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)06-0738-03

**mTORC1 inhibitor inhibit human pancreatic neuroendocrine tumors cell proliferation by influence glutamine metabolism\***

Xiong Shuanglong, Gong Yuzhu, Xie Ganfeng, Li Ni, Liang Houjie<sup>△</sup>

(Department of Oncology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the effect of mTORC1 inhibitor on the proliferation in human pancreatic neuroendocrine tumors(pNET) cell line BON, to explore the function of glutamine metabolism in it. **Methods** In vitro cultured human pancreatic neuroendocrine tumors(pNET) cell line BON, BON cells were treated with different concentrations of rapamycin(1, 5, 10, 25, 50, 100 nM) for 12, 24 h. Then CCK-8 assay are used to calculate the growth inhibitory rate. Rapamycin treated with BON 12 h, test the glutamine uptake level compared with control. Then deprive of glucose and/or glutamine, CCK-8 assay were used in observation of cell proliferation, cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. **Results** Rapamycin significantly inhibited the growth of BON cells in a time-and dose-dependent manner( $P < 0.05$ ). Meanwhile, rapamycin can reduce the glutamine uptake level compared with control. BON obviously depends on glutamine for growth, without glucose and glutamine group have obvious difference in growth rate( $P < 0.05$ ). **Conclusion** mTORC1 inhibitor can inhibit BON cells proliferation and influence the glutamine uptake level, suggesting that mTORC1 inhibitor might inhibit BON cells proliferation by influenced the glutamine metabolic pathway.

**Key words:** cell proliferation; glutamine metabolism; mTORC1 inhibitor; pancreatic neuroendocrine tumors

细胞生长和凋亡的失衡在肿瘤的发生、发展中扮演关键角色,而哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是参与其中重要的信号分子。mTOR 在真核生物体以两种复合物的形式存在,即雷帕霉素靶蛋白复合物 1(mTORC1)及 mTORC2,研究证实 mTORC1 特异性抑制剂可显著抑制肿瘤细胞增殖并促进细胞凋亡,表现出显著的临床疗效<sup>[1]</sup>。近年来相关研究表明 mTORC1 的激活和营养物的代谢相关。细胞代谢异常是恶性肿瘤重要的特征,肿瘤在其发生、发展过程中常伴随着代谢途径的重塑<sup>[2]</sup>。既往对肿瘤代谢的研究主要集中于葡萄糖(Glc)代谢,临床上正电子发射计算机断层显像(PET-CT)检查也正是根据肿瘤细胞高糖酵解这一特点得以实现<sup>[3]</sup>。但不是所有恶性肿瘤 PET 显像都呈阳性,例如近 50% 的胰腺神经内分泌癌 PET-CT 检查表现为阴性<sup>[4-5]</sup>,所以并非所有的肿瘤细胞都表现为糖酵解增强,而是主要依赖于其他代谢方式。例如有研究报导乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 及宫颈癌细胞株 HeLa 都是以谷氨酰胺(Gln)代谢为主<sup>[6]</sup>,并发现谷氨酰胺剥夺后可以引起人肝癌细胞株

Hep3B、人骨肉瘤细胞株(143B 和 143B206)和人乳腺癌细胞株 MCF7 生长停滞<sup>[7]</sup>。为此作者推测,mTORC1 抑制剂在某些特殊肿瘤中,如神经内分泌肿瘤,可能主要是通过影响 Gln 代谢途径而抑制细胞增殖。本研究检测了 mTORC1 抑制剂能够抑制 BON 细胞的增殖,并且影响 Gln 代谢途径。这为胰腺神经内分泌肿瘤(pancreatic endocrine tumor, pNET)的治疗提供了新的思路。

### 1 材料与方法

**1.1 试剂与材料** BON 细胞株由意大利 Verona 大学 Scarpa 实验室馈赠,由本实验室传代保种。胎牛血清、DMEM/F12 培养基购自 Gibco 公司;DMEM 粉末、谷氨酰胺、葡萄糖、酚红、DMSO 购自 Sigma 公司;CCK-8 试剂购自日本同仁公司;雷帕霉素购自大连美仑公司;细胞周期检测试剂盒购自贝博公司。

**1.2 细胞培养** 人 pNET 细胞系 BON 培养于含 10% 胎牛血清和 20 mM Gln(Sigma, 美国)的 DMEM/F12 培养基中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 无菌恒温培养箱中培养,常规培养传代。

**1.3 雷帕霉素对 BON 细胞增殖能力的影响** CCK-8 检测细

\* 基金项目:中国临床肿瘤学科学基金(Y-N2013-006)。 作者简介:熊双龙(1989-),在读硕士,主要从事神经内分泌肿瘤的代谢研究。

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: lianghoujie@sina.com。

胞增殖抑制率:取对数生长期的 BON 细胞制成  $5 \times 10^4$  /mL 培养基,以 5 000 个/孔铺入 96 孔板,每组 3 个复孔。培养 24 h 后,加入含雷帕霉素的培养液 100  $\mu$ L,用 DMSO 溶解使终浓度分别为 1、5、10、25、50、100 nM,分别于 12、24 h 后吸掉原培养基,每孔加入 100  $\mu$ L DMEM/F12 完全培养基和 10  $\mu$ L CCK-8 溶液,再培养 2 h 后置酶标仪上检测 450 nm 处的吸光度值。

**1.4 液闪仪检测  $L$ -[ $^2,3,4$ - $^3$ H]-Gln 吸收水平** 取对数生长期的 BON 细胞消化后调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  /mL,以 100  $\mu$ L/孔铺入 96 孔板,贴壁后换成无 Gln 的培养基,并用浓度为 100 nM 的雷帕霉素处理 BON 细胞 12 h 后设为用药组,另设加等量 DMSO 的为对照组,培养结束前 10 min 加入 4 mM  $L$ -[ $^2,3,4$ - $^3$ H]-Gln,培养结束后用胰酶消化细胞至细胞成球形,收集细胞至玻璃纤维滤纸上,置于闪烁液中,液闪仪测定。

**1.5 CCK-8 检测 Glc 和 Gln 对 BON 细胞增殖速率的影响** 取对数生长期的 BON 细胞,以 3 000 个/孔铺入 96 孔板,每组 3 个复孔,设空白对照孔。配置条件培养基:将无 Glc(Glc-)、无 Gln(Gln-)的 DMEM 粉末(Sigma,美国)加 1 L 超纯水、2.0 g 碳酸氢钠、9.3 mg 酚红混匀置成空白培养基,再分别制备为:(1)空白培养基+25 mM Glc+4 mM Gln(对应培养的细胞为 Glc+/Gln+组)、(2)空白培养基+4 mM Gln(Glc-/Gln+组)、(3)空白培养基+25 mM Glc(Glc+/Gln-组)、(4)空白培养基(Glc-/Gln-组),过滤后制成含 10%胎牛血清的 4 组条件培养基,6 h 细胞贴壁后,吸掉原培养基,每孔加入 100  $\mu$ L DMEM/F12 完全培养基和 10  $\mu$ L CCK-8 溶液,培养 2 h 后置酶标仪上检测 450 nm 处的吸光度值。剩余每孔条件处理细胞后连续检测 6 d。

**1.6 Glc 和 Gln 对 BON 细胞细胞周期的影响** 将  $1 \times 10^5$  个细胞接种于六孔板中,贴壁后分别用(1)空白培养基+25 mM Glc+4 mM Gln;(2)空白培养基+4 mM Gln;(3)空白培养基+25 mM Glc;(4)空白培养基,条件培养基处理 BON 细胞 24 h,收集细胞后流式细胞仪检测细胞周期情况。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件分析处理实验数据,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较使用  $t$  检验,检验水准为  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 雷帕霉素对 BON 细胞增殖的影响** CCK-8 结果显示雷帕霉素可明显抑制 BON 细胞的增殖,不同浓度用药组不同处理时间之间生长抑制率差异有统计学意义( $P<0.05$ )。抑制率呈时间-浓度依赖性。见图 1。

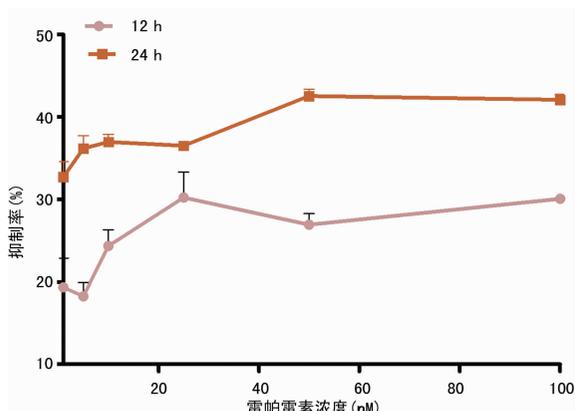


图 1 不同浓度雷帕霉素作用 12、24 h 后 BON 生长抑制率检测

**2.2 雷帕霉素对 BON 细胞吸收 Gln 的影响** 100 nM 的雷帕霉素处理 BON 细胞 12 h 后,BON 对吸收 Gln 的能力明显下降,用药组和对照组差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 2。

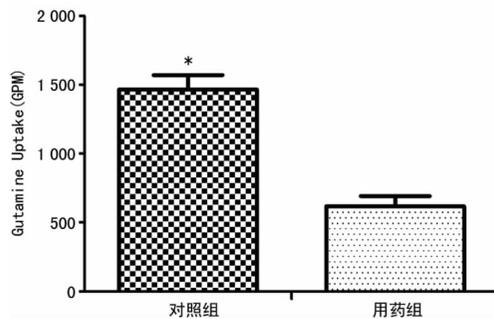


图 2 雷帕霉素作用 BON 影响 BON 对谷氨酰胺的吸收

**2.3 Glc 和 Gln 对 BON 细胞增殖的影响** BON 细胞在无 Gln 的情况下完全不能存活,在无 Glc 的情况下生长明显减慢( $P<0.05$ ),说明 BON 细胞更依赖于 Gln 生长,见图 3。

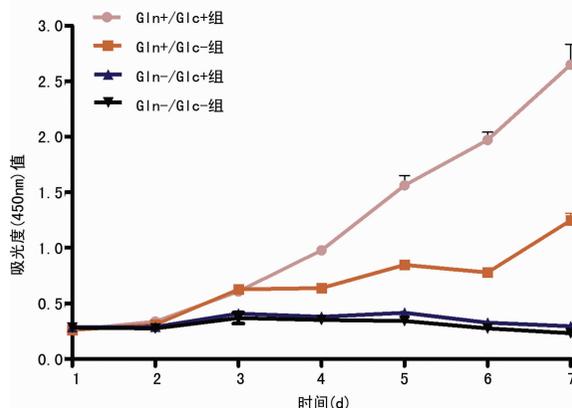
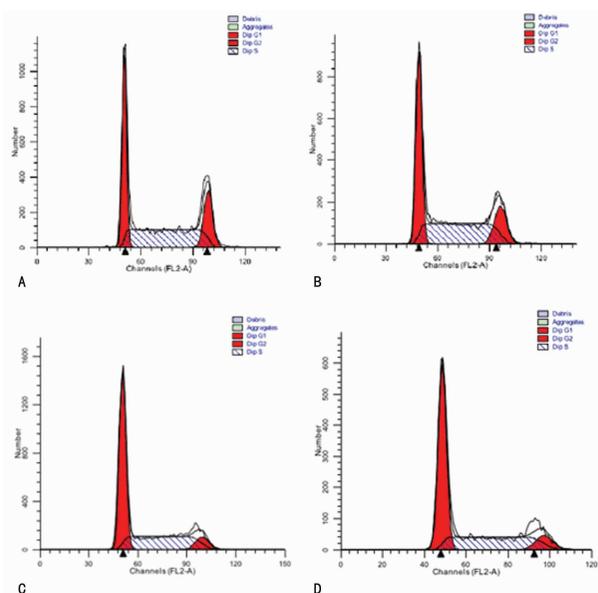


图 3 Glc 和 Gln 对 BON 细胞增殖的影响

**2.4 Glc 和(或)Gln 对 BON 细胞周期的影响** 相对于 Glc+/Gln-组、Glc-/Gln+组细胞周期阻滞更明显,表现为  $G_1$  期细胞数量增多,S 期细胞比例下降。见图 4。



A: Glc+/Gln+组; B: Glc-/Gln+组; C: Glc+/Gln-组; D: Glc-/Gln-组。

图 4 Glc 和 Gln 对 BON 细胞周期的影响

### 3 讨 论

pNET 是一组起源于肽能神经元和神经内分泌细胞的异质性肿瘤,人群发病率约在 1/10~4/10 万,可发生于任何年龄,近年来呈稳步上升趋势<sup>[8]</sup>。PNET 的诊断与治疗近年来取得了快速的发展,分子靶向治疗致力于控制 pNET 细胞生长和在血管生成的重要信号通路中寻找治疗靶点。目前最受关注的为血管内皮生长因子(VEGF)受体信号通路以及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)。PI3K/Akt/mTOR 受体信号通路在 pNET 肿瘤细胞的生长、增殖、代谢和血管生成中发挥了重要作用。依维莫司(Everolimus)作为一种新型的口服 mTORC1 抑制剂,早在 2011 年就被美国 FDA 批准用于治疗不可手术切除或已经扩散到身体其他部位的晚期 pNET。尽管大部分的 pNET 包含 PI3K/Akt 过度表达以及 pTEN、TSC1/2、LKB1 缺失导致 mTORC1 的异常激活<sup>[9]</sup>,但实际上 pNET 患者对依维莫司治疗的反应不一。

哺乳动物 mTORC1 受营养、能量信号的调控而且对雷帕霉素敏感。现在很多研究显示,mTORC1 信号通路的激活参与了多种肿瘤的发生,如乳腺癌、胶质瘤、宫颈癌和肾癌等<sup>[10]</sup>。既往有研究表明,细胞内的亮氨酸可通过独立于 PI3K-Akt-TSC-Rheb 通路的某种特殊方式进行传递,并最终激活 mTORC1 信号<sup>[11]</sup>。最近的一项研究表明,亮氨酸通过 RagB-GDP-RagCGTP 突变体可直接激活 mTORC1 信号<sup>[12-13]</sup>,从而促进肿瘤的生长,抑制自噬。本研究表明 mTORC1 抑制剂通过影响 Gln 代谢抑制 BON 细胞的增殖,“Gln 代谢”是肿瘤细胞除了 Warburg 效应之外又一重要的能量代谢方式,迅速增殖的肿瘤细胞通过消耗 Gln 来提供其生长和增殖所需的能量和生物大分子原料,维持细胞内氧化还原平衡和参与细胞内信号通路的转导,由于肿瘤对 Gln 的大量消耗,有人把肿瘤描述成“氮陷阱”(nitrogen trap)<sup>[14-15]</sup>。本研究发现 BON 细胞的增殖明显依赖于 Gln 代谢,BON 细胞不能在无 Gln 的培养基里生长,增加培养基里 Gln 的浓度可刺激 BON 细胞的生长,这意味着对 BON 细胞而言,Gln 已从必需氨基酸转变成必需氨基酸。而且雷帕霉素可以降低其对 Gln 的吸收,影响 Gln 代谢,说明 pNET 的生长是 mTORC1 通路依赖性的。靶向其代谢的关键环节对 pNET 的治疗具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] Csibi A, Fendt SM, Li C, et al. The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4[J]. *Cell*, 2013, 153(4): 840-854.
- [2] 易梅, 向波, 李小玲, 等. 代谢重编程: 肿瘤的平衡之舞[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2013, 38(11): 1177-1187.
- [3] Robey IF, Stephen RM, Brown KS, et al. Regulation of the

Warburg effect in early-passage breast cancer cells[J]. *Neoplasia*, 2008, 10(8): 745-756.

- [4] Ma WW, Jacene H, Song D, et al. [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography correlates with Akt pathway activity but is not predictive of clinical outcome during mTOR inhibitor therapy[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(16): 2697-2704.
- [5] Jaini S, Dadachova E. FDG for therapy of metabolically active tumors[J]. *Semin Nucl Med*, 2012, 42(3): 185-189.
- [6] Dang CV. MYC, microRNAs and glutamine addiction in cancers[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(20): 3243-3245.
- [7] Lawrence B, Gustafsson BI, Chan A, et al. The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2011, 40(1): 1-18.
- [8] Meng M, Chen S, Lao T, et al. Nitrogen anabolism underlies the importance of glutaminolysis in proliferating cells[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(19): 3921-3932.
- [9] Inoki K, Li Y, Zhu T, et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling[J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(9): 648-657.
- [10] Duran RV, Oppliger W, Robitaille AM, et al. Glutaminolysis activates rag-mTORC1 signaling[J]. *Mol Cell*, 2012, 47(3): 349-358.
- [11] Smith EM, Finn SG, Tee AR, et al. The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(19): 18717-18727.
- [12] Han JM, Jeong SJ, Park MC, et al. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway[J]. *Cell*, 2012, 149(2): 410-424.
- [13] Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, et al. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(8): 935-945.
- [14] 张淑香, 李东晓, 朱明龙, 等. 谷氨酰胺限制对杂交瘤细胞生长, 代谢和单抗生产的影响[J]. *高效化学工程学报*, 2008, 22(1): 77-82.
- [15] DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer[J]. *Oncogene*, 2010, 29(3): 313-324.

(收稿日期: 2014-10-08 修回日期: 2014-12-10)

(上接第 737 页)

al. Serum amyloid A as indicator of distant metastases but not as early tumor marker in patients with renal cell carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(1): 85-92.

- [12] Le L, Chi K, Tyldesley S, et al. Identification of serum

amyloid A as a biomarker to distinguish prostate cancer patients with bone lesions[J]. *Clin Chem*, 2005, 51(4): 695-707.

(收稿日期: 2014-11-08 修回日期: 2014-12-15)