

雷帕霉素衍生物对胰岛的毒性研究

张娟^{1,2,3}, 付嘉钊^{1,2,4}, 王路敏^{1,2}, 李艳萍^{1,2}, 江红⁵, 夏俊杰^{1,2}, 齐忠权^{1,2,6} (1.厦门大学器官移植研究所, 福建 厦门 361102; 2.福建省器官与再生重点实验室, 福建 厦门 361102; 3.上海市同济医院, 上海 200065; 4.上海长海医院, 上海 200433; 5.福建省微生物研究所, 福建 福州 350000; 6.广西大学医学院, 广西壮族自治区 南宁 530004)

【摘要】目的 探讨雷帕霉素及其衍生物依维莫司、地磷莫司、佐他莫司对胰岛的毒性作用。**方法** 采用小鼠胰岛素瘤细胞(MIN6)作为体外研究胰岛细胞的对象, 分别在含有依维莫司、地磷莫司、佐他莫司的培养基中孵育MIN6细胞48小时, 通过BrdU检测细胞增殖、CCK8检测细胞活力、PI检测细胞周期、流式细胞术检测细胞凋亡以及ELISA检测细胞分泌胰岛素功能, 观察3种雷帕霉素衍生物对MIN6细胞的影响。**结果** 我们发现3种雷帕霉素衍生物均会对MIN6细胞的增殖和活力产生抑制作用。在细胞周期和凋亡实验中, 与阴性对照组比较, 3种衍生物对MIN6细胞的影响呈现抑制G1期向S期转变的趋势和促进细胞凋亡的趋势, 但差异没有统计学意义。另外, 3种衍生物与雷帕霉素一样, 均可减少MIN6细胞分泌胰岛素, 差异具有统计学意义。**结论** 雷帕霉素及其衍生物依维莫司、地磷莫司、佐他莫司均对胰岛产生一定毒性。

【关键词】 雷帕霉素; 依维莫司; 地磷莫司; 佐他莫司; MIN6细胞; 毒性

The toxicity of rapamycin derivatives on islet

Zhang Juan^{1,2,3}, Fu Jiachao^{1,2,4}, Wang Lumin^{1,2}, Li Yanping^{1,2}, Jiang Hong⁵, Xia Junjie^{1,2}, Qi Zhongquan^{1,2,6}.
1.Organ Transplantation Institute, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China; 2.Fujian Key Laboratory of Organ and Tissue Regeneration, Xiamen 361102, Fujian, China; 3.Shanghai Tongji Hospital, Shanghai 200065, China; 4.Shanghai Changhai Hospital, Shanghai 200433, China; 5.Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou 350000, Fujian, China; 6.Medical College, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

Corresponding author: Qi Zhongquan, Email: oti@xmu.edu.cn

【Abstract】Objective To investigate the toxic effects of rapamycin and its derivatives, everolimus, cefotiam, zotarolimus on islets. **Methods** Experiments were performed on mouse insulinoma cells (MIN6) cells. MIN6 cells were cultured in a medium containing everolimus, dipospholimus, and zotarolimus for 48 hours, and cell proliferation was detected by Brdu. Cell viability was detected by CCK8, cell cycle was detected by PI, cell apoptosis was detected by flow cytometry, and insulin secretion by cells was detected by ELISA. The effects of three rapamycin derivatives on MIN6 cells were observed. **Results** We found that rapamycin derivatives impaired cell proliferation and viability. In the cell cycle and apoptosis experiments, the effect of three derivatives on MIN6 cells compared with the negative control, showed the trend of inhibited G1 phase to S phase transition and promoted apoptosis, but the difference had not statistically significant. So did Apoptosis experiment. Moreover, rapamycin derivatives treatment of MIN6 cells resulted in a loss of cell insulin secretion, the difference had statistically significant. **Conclusion** This report provides evidence that rapamycin derivatives, as the same as the rapamycin, had toxicity to islets.

【Key words】 Rapamycin; Everolimus; Deforolimus; Zotarolimus; MIN6 cell; Toxicity

DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2018.02.005

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31271038, 81302546)

通讯作者: 齐忠权, Email: oti@xmu.edu.cn

免疫抑制剂的开发与运用一直推动着器官移植领域的发展^[1]。自Edmonton方案被提出以后,移植领域发生了质的飞跃^[2],尤其是雷帕霉素与他克莫司的开发与利用,使得该方案得到广泛的认可与临床运用。近年来,雷帕霉素广泛应用于器官移植术后排斥反应治疗中,包括抑制皮肤、心脏、肾脏、肝脏等器官移植后的排斥反应^[3-5]。随着研究的不断深入,研究者们发现免疫抑制剂在延长移植物存活时间的同时^[6-7],也给胰岛本身带来了严重的毒性作用,包括抑制胰岛细胞增殖、促进胰岛细胞凋亡、抑制胰岛细胞分泌胰岛素等^[8-16]。依维莫司作为抗肿瘤药物应用于临床时也会诱发高血糖的现象^[17-20]。因此,如何避免免疫抑制剂对胰岛的毒副作用从而延长胰岛移植物的存活,是胰岛移植面临的一大难题。雷帕霉素是胰岛移植应用中最常用的免疫抑制剂之一,但是系列研究表明它对胰岛本身存在一定毒性作用,所以新型免疫抑制剂的开发迫在眉睫。

依维莫司、地磷莫司、佐他莫司是雷帕霉素的衍生物,随着雷帕霉素对肿瘤及移植的作用不断被开发和深入探讨,这几种衍生物的开发也相继问世。其中依维莫司在临床器官移植中较多见,已经应用于肾^[21]、心^[22]、肝^[23]、肺^[24]及胰岛移植^[25-26],但是地磷莫司、佐他莫司、替西罗莫司在移植领域研究甚少,尤其是对胰岛的研究。本文首次详细阐述并对比3种雷帕霉素衍生物(依维莫司、地磷莫司、佐他莫司)对胰岛的毒性作用。通过体外实验来研究雷帕霉素的3种衍生物对胰岛是否具有毒性。进一步探讨雷帕霉素衍生物是否能避免胰岛毒性而更能优于雷帕霉素在移植领域得到广泛的应用。

1 材料与方法

1.1 实验细胞:小鼠胰岛素瘤细胞(MIN6细胞)培养在DMEM高糖培养基,含10%胎牛血清、0.01%β-巯基乙醇和1%青链霉素。

1.2 主要试剂:雷帕霉素(LClabs)、依维莫司、地磷莫司、佐他莫司(福建微生物研究所馈赠),环孢素A(Selleck),三氧化二砷(北京双鹭),细

胞增殖检测试剂盒(Roche),Annexin V凋亡检测试剂盒(BD PharMingen),碘化丙啶(propidium iodide, PI)(Sigma),Rnase 酶(天根生化科技有限公司),细胞增殖及毒性检测试剂盒(CCK8, 全式金),小鼠胰岛素检测试剂盒(Millipore)。

1.3 免疫抑制剂的配制:雷帕霉素配制需称取1 mg雷帕霉素,用99.9%无水乙醇配制成浓度为1 mg/ml的储存液,0.22 μm的过滤器过滤,保存于-80℃冰箱,再用DMEM培养基稀释成工作液浓度,保存于-20℃冰箱备用。依维莫司、地磷莫司、佐他莫司、环孢素A配制同前。

1.4 免疫抑制剂的浓度:雷帕霉素及其衍生物设100 μg/L为研究浓度,环孢素A浓度为10 mg/L作为阳性对照。

1.5 检测细胞的增殖能力:MIN6细胞接种至96孔平底培养板内,待细胞贴壁后,饥饿24小时;之后分组刺激细胞,按照雷帕霉素、衍生物以及环孢素A的浓度,各组设置3个副孔,培养48小时。按5-溴脱氧尿嘧啶核苷法(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)提供的说明书进行实验操作。

1.6 检测细胞活力:细胞准备同前。检测前加入10% CCK8(即每孔加入10 μl CCK8, 90 μl完全培养基),继续放入5% CO₂培养箱续培养1~4小时,注意观察培养基的颜色,若各组间颜色差异明显则可准备上机检测。在450 nm波长处测定吸光度(A)值。

1.7 PI检测细胞周期:准备细胞后,雷帕霉素及其衍生物(100 μg/L)刺激细胞48小时,PI染色,过滤,上机检测(Partec流式细胞仪)。

1.8 Annexin V/PI双染法检测MIN6细胞的凋亡:雷帕霉素及其衍生物(100 μg/L)和三氧化二砷(5 μmol/L)刺激细胞48小时;按照BD FITC Annexin V细胞凋亡试剂和提供的说明书进行实验操作。

1.9 检测细胞分泌胰岛素功能:准备细胞。加药处理培养48小时,磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗细胞, KRBH液平衡30分钟,再换用含葡萄糖浓度为2.8 mmol/L和16.7 mmol/L

的 KRBH 液 500 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 分别作为基础胰岛素分泌 (basic insulin secretion, BIS) 和糖刺激的胰岛素分泌 (glucose stimulated insulin secretion, GSIS), 收集上清液。后续根据 Millipore 试剂盒的步骤进行。

1.10 统计学分析: 体内试验各组间数据比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 多重检验采用 Bonferroni 校正。各组间数据比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有统计学分析均出自 GraphPad Prism[®] 5 软件计算结果。

2 结果

2.1 雷帕霉素衍生物抑制 MIN6 细胞增殖 (图 1): 我们用 100 μ g/L 的药物浓度处理细胞 48 小时, 与阴性对照 (无水乙醇) 相比, 发现依维莫司、地磷莫司、佐他莫司和雷帕霉素一样, 都会抑制细胞增殖, 差异具有统计学意义。

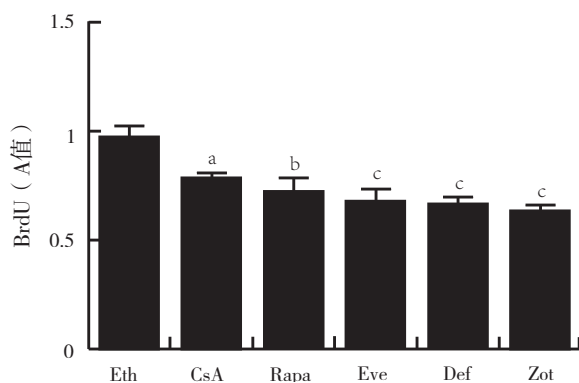


图 1 雷帕霉素及衍生物对 MIN6 细胞增殖的影响

注: Eth 为无水乙醇, CsA 为环孢素 A, Rapa 为雷帕霉素, Eve 为依维莫司, Def 为地磷莫司, Zot 为佐他莫司; 与 Eth 相比 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$, $^cP < 0.001$

2.2 雷帕霉素衍生物抑制 MIN6 细胞活力 (图 2): 结果发现, 与阴性对照 (无水乙醇) 相比, 3 种衍生物与雷帕霉素均能抑制细胞活力, 差异具有统计学意义。

2.3 雷帕霉素衍生物在 MIN6 细胞周期中的研究 (图 3): 结果发现, 衍生物与溶剂无水乙醇相比, 都有增加 G1 期的比例和减少 S 期比例的趋势, 但差异并无统计学意义。这种趋势也与上述增殖实验和细胞活力实验中的结果得到相互印证。雷帕霉素

及其衍生物也许通过抑制细胞周期, 抑制了 MIN6 细胞的增殖。

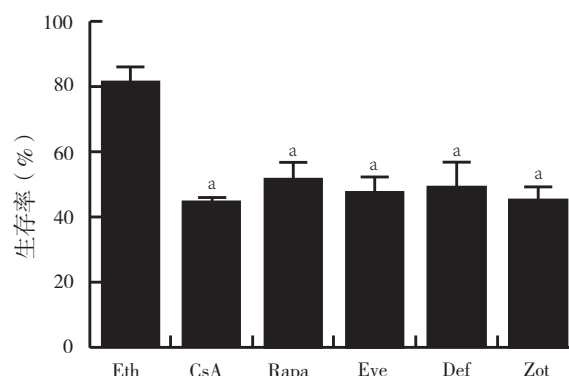


图 2 雷帕霉素及衍生物对 MIN6 细胞活力的影响

注: Eth 为无水乙醇, CsA 为环孢素 A, Rapa 为雷帕霉素, Eve 为依维莫司, Def 为地磷莫司, Zot 为佐他莫司; 与 Eth 相比 $^aP < 0.001$

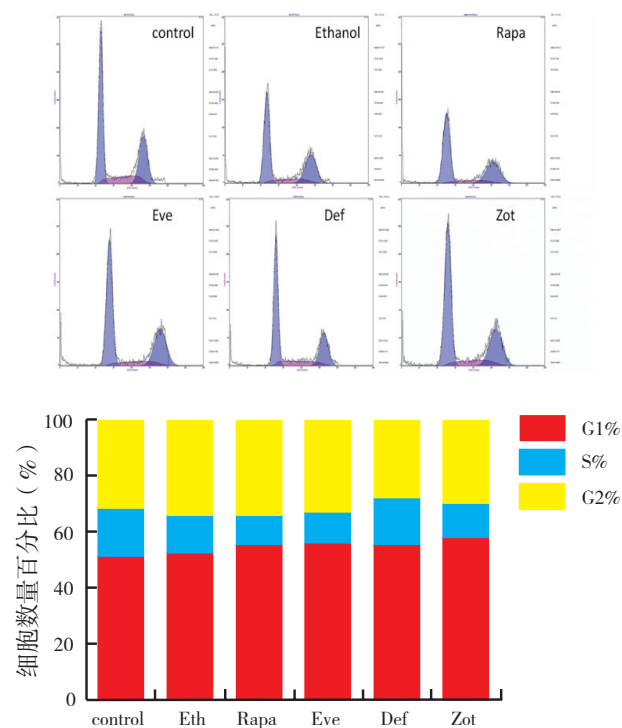


图 3 雷帕霉素及衍生物对 MIN6 细胞周期的影响

注: Eth 为无水乙醇, Rapa 为雷帕霉素, Eve 为依维莫司, Def 为地磷莫司, Zot 为佐他莫司

2.4 雷帕霉素衍生物对 MIN6 细胞凋亡的影响 (图 4): 三氧化二砷作为阳性对照 (本实验室通过前期研究发现三氧化二砷能明显促进细胞凋亡, 因此我们选择三氧化二砷作为阳性对照, 其浓度为 5 μ m/L)。通过上述实验, 我们发现 3 种衍生物均

抑制细胞的增殖和活力，作为阳性对照的三氧化二砷明显诱导了细胞凋亡，而雷帕霉素及其衍生物也不同程度地诱导了 MIN6 细胞的凋亡，虽然凋亡细胞比例稍大于无水乙醇作用下 MIN6 细胞凋亡的比例，但无统计学意义。雷帕霉素、依维莫司、地磷莫司、佐他莫司 4 种药之间相比，对 MIN6 细胞凋亡的诱导也无明显差异。实验结果显示，雷帕霉素及其衍生物也许并非通过诱导 MIN6 细胞凋亡来控制其增殖和细胞活力。

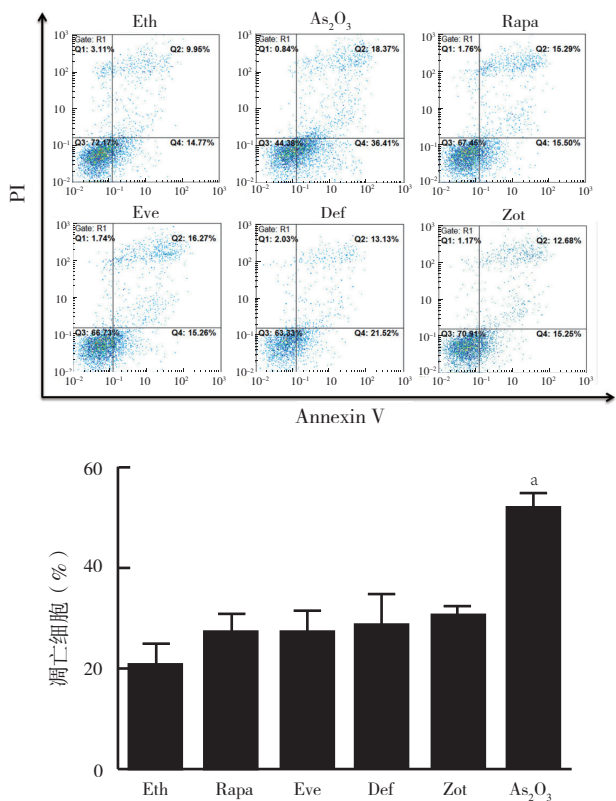


图 4 雷帕霉素及衍生物对 MIN6 细胞凋亡的影响
注: Eth 为无水乙醇, Rapa 为雷帕霉素, Eve 为依维莫司, Def 为地磷莫司, Zot 为佐他莫司, As₂O₃ 为三氧化二砷; 与 Eth 相比 ^aP < 0.05

2.5 雷帕霉素衍生物抑制 MIN6 细胞分泌胰岛素 (图 5): 雷帕霉素对胰岛的毒性主要是抑制胰岛细胞分泌胰岛素, 所以接下来我们研究 3 种雷帕霉素衍生物对胰岛素分泌功能的影响。实验中, 我们分别加入低浓度和高浓度的葡萄糖来刺激细胞分泌胰岛素, 得到结果显示雷帕霉素及 3 种衍生物与阴性对照组相比, 明显抑制 MIN6 细胞分泌胰岛素的功能。

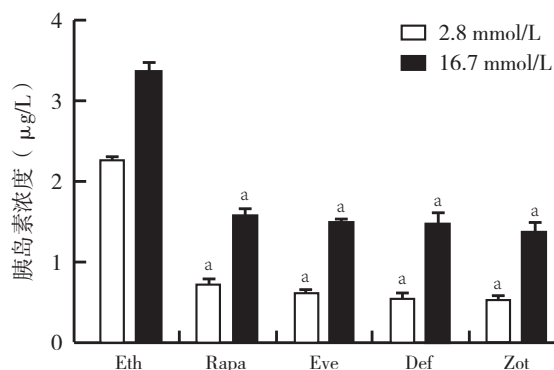


图 5 雷帕霉素及其衍生物抑制 MIN6 细胞分泌胰岛素
注: Eth 为无水乙醇, Rapa 为雷帕霉素, Eve 为依维莫司, Def 为地磷莫司, Zot 为佐他莫司, 与 Eth 相比 ^aP < 0.001

3 讨论

随着 Edmonton 方案的问世, 胰岛移植获得了巨大的进步, 雷帕霉素也被越来越多的运用及研究。免疫抑制剂的广泛开发及应用也给移植领域带了新的生机与希望^[27]。但免疫抑制剂本身在发挥抑制免疫的优势时, 同时也带来了诸多不良反应。雷帕霉素在发挥其免疫抑制作用来延长胰岛移植生存期的同时, 也加重了其对胰岛的损伤。

雷帕霉素对胰岛的毒性主要体现在影响细胞增殖、活力、凋亡以及分泌胰岛功能等方面, 而依维莫司、地磷莫司、佐他莫司是雷帕霉素的最常见的 3 种衍生物, 这 3 种衍生物对胰岛是否具有毒性作用, 至今鲜有研究。所以我们研究了 3 种雷帕霉素衍生物对 MIN6 细胞的增殖、细胞活力、细胞周期、凋亡以及分泌胰岛素功能的影响。在实验中发现 3 种雷帕霉素衍生物与雷帕霉素一样, 均能抑制细胞增殖及细胞活力, 同时, 我们发现它们也能明显抑制细胞分泌胰岛素的功能, 但是对细胞周期及凋亡并无明显意义。我们分析了药物影响细胞增殖的原因, 认为 3 种衍生物的细胞周期和凋亡或许并不是直接导致细胞增殖受到抑制的主要原因。

依维莫司、地磷莫司、佐他莫司这 3 种衍生物均对胰岛具有毒性。雷帕霉素衍生物对胰岛产生毒性的作用机制和它们是否可以替代雷帕霉素

在 Edmonton 方案中的角色有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王战. 免疫抑制剂在器官移植中的应用及进展[J]. 中国医刊, 2006, 41(10): 50-52.
- [2] Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen [J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(4): 230-238.
- [3] Euvrard S, Ulrich C, Lefrancois N. Immunosuppressants and skin cancer in transplant patients: focus on rapamycin [J]. *Dermatol Surg*, 2004, 30(4 pt 2): 628-633.
- [4] Edelman ER, Danenberg HD. Rapamycin for cardiac transplant rejection and vasculopathy: one stone, two birds? [J]. *Circulation*, 2003, 108(1): 6-8.
- [5] Hamashima T, Yoshimura N, Ohsaka Y, et al. In vivo use of rapamycin suppresses neither IL-2 production nor IL-2 receptor expression in rat transplant model [J]. *Transplant Proc*, 1993, 25(1 pt 1): 723-724.
- [6] Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355(13): 1318-1330.
- [7] 闫美玲, 刘立玮, 张弋. 药物基因组学与免疫抑制剂的个体化用药[J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2017, 5(1): 72-76.
- [8] Fabian MC, Lakey JR, Rajotte RV, et al. The efficacy and toxicity of rapamycin in murine islet transplantation. In vitro and in vivo studies [J]. *Transplantation*, 1993, 56(5): 1137-1142.
- [9] Yang SB, Lee HY, Young DM, et al. Rapamycin induces glucose intolerance in mice by reducing islet mass, insulin content, and insulin sensitivity [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2012, 90(5): 575-585.
- [10] Whiting PH, Woo J, Adam BJ, et al. Toxicity of rapamycin—a comparative and combination study with cyclosporine at immunotherapeutic dosage in the rat [J]. *Transplantation*, 1991, 52(2): 203-208.
- [11] Fuhrer DK, Kobayashi M, Jiang H. Insulin release and suppression by tacrolimus, rapamycin and cyclosporin A are through regulation of the ATP-sensitive potassium channel [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2001, 3(6): 393-402.
- [12] Barlow AD, Xie J, Moore CE, et al. Rapamycin toxicity in MIN6 cells and rat and human islets is mediated by the inhibition of mTOR complex 2 (mTORC2) [J]. *Diabetologia*, 2012, 55(5): 1355-1365.
- [13] Marcelli-Tourville S, Hubert T, Moerman E, et al. In vivo and in vitro effect of sirolimus on insulin secretion [J]. *Transplantation*, 2007, 83(5): 532-538.
- [14] Fraenkel M, Ketzinel-Gilad M, Ariav Y, et al. mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2008, 57(4): 945-957.
- [15] Bell E, Cao X, Moibi JA, et al. Rapamycin has a deleterious effect on MIN-6 cells and rat and human islets [J]. *Diabetes*, 2003, 52(11): 2731-2739.
- [16] Bussiere CT, Lakey JR, Shapiro AM, et al. The impact of the mTOR inhibitor sirolimus on the proliferation and function of pancreatic islets and ductal cells [J]. *Diabetologia*, 2006, 49(10): 2341-2349.
- [17] Doi T, Muro K, Boku N, et al. Multicenter phase II study of everolimus in patients with previously treated metastatic gastric cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(11): 1904-1910.
- [18] Yoon DH, Ryu MH, Park YS, et al. Phase II study of everolimus with biomarker exploration in patients with advanced gastric cancer refractory to chemotherapy including uoropyrimidine and platinum [J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(6): 1039-1044.
- [19] Baselga J, Campone M, Piccart M, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(6): 520-529.
- [20] Yee KW, Zeng Z, Konopleva M, et al. Phase I / II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(17): 5165-5173.
- [21] Campistol JM, de Fijter JW, Nashan B, et al. Everolimus and long-term outcomes in renal transplantation [J]. *Transplantation*, 2011, 92(3 Suppl): S3-26.
- [22] Certican (Everolimus) in heart transplantation: from clinical trial to clinical experience. Proceedings of a meeting, Vienna, Austria, September 9, 2004 [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2005, 24(4 Suppl): S183-S211.
- [23] Alegre C, Jiménez C, Manrique A, et al. Everolimus monotherapy or combined therapy in liver transplantation: indications and results [J]. *Transplant Proc*, 2013, 45(5): 1971-1974.
- [24] de Pablo A, Santos F, Solé A, et al. Recommendations on the use of everolimus in lung transplantation [J]. *Transplant Rev (Orlando)*, 2013, 27(1): 9-16.
- [25] di Francesco F, Cautero N, Vincenzi P, et al. One year follow-up of steroid-free immunosuppression plus everolimus in isolated pancreas transplantation [J]. *Transplantation*, 2008, 86(8): 1146-1147.
- [26] Sato E, Yano I, Shimomura M, et al. Larger dosage required for everolimus than sirolimus to maintain same blood concentration in two pancreatic islet transplant patients with tacrolimus [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2009, 24(2): 175-179.
- [27] 刘树人, 罗显荣, 陈小平, 等. 调整免疫抑制剂对肝移植感染预后的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2009, 21(2): 85-88.

(收稿日期: 2017-12-18)

张娟, 付嘉钊, 王路敏, 李艳萍, 江红, 夏俊杰, 齐忠权. 雷帕霉素衍生物对胰岛的毒性研究[J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2018, 6(2): 103-107.