

PPAR γ 激动剂罗格列酮对人乳腺癌细胞生长抑制及诱导凋亡作用研究^{*}

陆海波 张清媛 周建华 王 影 鲁海玲

(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院 哈尔滨 150040)

摘要 目的: 观察氧化酶体激活物增殖受体(PPAR γ) 激动剂罗格列酮(ROZ) 在体外激活 PPAR γ 后对 MCF-7 细胞的生长抑制及诱导凋亡作用。方法: MTT 法检测 ROZ 对 MCF-7 细胞的生长抑制作用; 集落形成实验观察 ROZ 对 MCF-7 细胞集落形成的影响; 不同浓度 ROZ 作用 72h, Hoechst33342 染色观察 MCF-7 细胞的形态变化, 流式细胞光度分析术(FCM) 检测凋亡细胞百分率以及 ROZ 对细胞周期的影响; Western blot 方法检测 ROZ 对 MCF-7 细胞 Bcl-2、Caspase-3 表达的影响。结果: ROZ 可呈剂量依赖性抑制 MCF-7 细胞的生长及集落形成。ROZ 浓度为 6×10^{-5} M 和 3×10^{-4} M 时则 G1 期细胞数明显增加, S 期相应减少。Hoechst33342 染色经 ROZ 处理的肿瘤细胞染色质呈颗粒状, 且有凋亡小体出现。FCM 检测结果显示, ROZ 作用 72h 凋亡细胞数达 22.05%。Western blot 提示 ROZ 可抑制 Bcl-2 表达, 促进 Caspase3 表达。结论: ROZ 在体外可抑制 MCF-7 细胞的增殖并诱导其凋亡, 这可能与抑制 Bcl-2 表达、促进 caspase3 表达有关。提示 ROZ 有望成为乳腺癌治疗药或肿瘤治疗的辅助用药, PPAR γ 有潜力成为肿瘤治疗的新靶点。

关键词: 氧化酶体激活物增殖受体(PPAR γ); 罗格列酮; 生长抑制; 凋亡

Study on Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Activation in Inhibiting Tumor Growth and Inducing Apoptosis in Breast Cancer

LU Hai-bo¹, ZHANG Qing-yuan¹, ZHOU Jian-hua¹, WANG Ying², LU Hai-ling¹

¹ Department of oncology, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang, China

² Department of laboratory, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang, China

ABSTRACT Objective: To observe the effects of rosiglitazone(ROZ), a peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation, in the inhibition of tumor growth and inducement apoptosis in breast cancer in vitro. **Methods:** MTT was used to detect how ROZ inhibited the growth of MCF-7, observing ROZ how to influence the colony formation of MCF-7 by colony formation test. After different concentration of ROZ for 72 hours, the morphologic change of MCF-7 was seen by Hoechst33342 dyeing; the apoptosis percentage and cell cycle change were detected by FCM; the effects of ROZ in the expression of Bcl-2 and Caspase-3 of MCF-7 were evaluated by Western Blotting. **Results:** Using ROZ to treat breast cancer, with a dose-dependence, could inhibit cell growth and colony formation of MCF-7. The number of cells in G1 phase increased and the number of cells in S phase decreased when the concentration of ROZ was 6×10^{-5} M and 3×10^{-4} M. Through Hoechst33342 dyeing, there were granulochromatin and apoptotic body in tumor cells after being treated with ROZ for 72 hours, and the number of apoptosis cell reached 22.05% by FCM. ROZ inhibited the expression of Bcl-2 and enhanced the expression of Caspase-3. **Conclusion:** ROZ inhibited the cell proliferation and induced apoptosis in vitro, which may be relative to inhibiting the expression of Bcl-2 and enhancing the expression of Caspase-3. These results hint that ROZ is hoped to be the therapeutic drug or aid drug in tumor treatment. PPAR γ has great potentialities to be new target of tumor treatment.

Key words: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; Rosiglitazone; Growth inhibiting; Apoptosis

1 引言

氧化酶体激活物增殖受体(PPAR γ) 属于配体激活的转录因子, 共分三个亚型: PPAR α 、PPAR β 和 PPAR γ 。PPAR γ 除具有促进脂肪形成及抗炎作用外, 还有抑制肿瘤细胞增殖的作用。研究结果表明 PPAR γ 激活后可诱导肿瘤细胞分化及细胞周期

发生改变^[1]。罗格列酮(Rosiglitazone, ROZ) 是 PPAR γ 的合成配体, 既然至少有 160 万左右患者服用列酮类药物治疗糖尿病, 有必要明确 PPAR γ 的功能, 包括其在肿瘤中所起的作用^[2]。在动物模型中发现列酮类药物抑制肿瘤细胞增殖的非毒性治疗作用。但在乳腺癌中的研究不多, 本研究探讨在体外 ROZ 对乳腺癌细胞 MCF-7 生长抑制、细胞周期和凋亡的影响, 以期对 ROZ 的临床应用提供实验依据。

* 基金资助: 黑龙江省卫生厅医学科研课题资助(2005-061)

作者简介: 陆海波, 女, (1969-), 在读博士, 副主任医师, 主要从事消化道肿瘤的基础及临床研究。

TEL: 0451-86906080 Fax: 0451-86626177 E-mail: lu-haibo200@126.com

通讯作者: 张清媛, 教授, 博士生导师

(收稿日期: 2006-02-08 接受日期: 2006-02-26)

2 材料与方法

2.1 试剂与细胞

罗格列酮(中美史克公司生产马来酸罗格列酮)在体外试验中以 DMSO 溶解。鼠抗 Caspase- 3、Bcl- 2 单克隆抗体、马抗小鼠二抗购自北京中山生物技术有限公司。鼠抗人 PPAR γ 一抗购自 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. Hoechst33342 显色剂购自 Promega 公司。人乳腺癌细胞株 MCF- 7 由黑龙江省肿瘤研究所惠赠。

2.2 实验方法

2.2.1 MTT 法测定肿瘤细胞存活率:按下述公式计算 ROZ 对 MCF- 7 抑制率,并按中效方程计算 IC₅₀:抑制率= $\frac{\text{对照组 OD 均值}-\text{给药组 OD 均值}}{\text{对照组 OD 均值}} \times 100\%$

2.2.2 根据 MTT^[3] 法算得的 IC₅₀ 基数确定 ROZ 的 5 组给药浓度 2.4×10^{-6} , 1.2×10^{-5} , 6.0×10^{-5} , 3.0×10^{-4} , 1.5×10^{-3} , 集落形成实验观察不同 ROZ 浓度对 MCF- 7 细胞集落形成的影响,计算集落形成率。

2.2.3 用 Hoechst33342 染色,观察对数生长期的 MCF- 7 细胞,加入不同浓度的 ROZ, 72h 后荧光显微镜下观察细胞凋亡形态并照相^[4]。流式细胞仪分析细胞凋亡百分率及测定细胞周期各期 DNA 含量^[5]。Western Blotting 检测方法检测不同浓度 ROZ 对 MCF- 7 细胞 Bcl- 2、Caspase- 3 表达的影响。

3 结果

3.1 ROZ 对 MCF- 7 细胞增殖的影响

用 MTT 方法观察不同浓度 ROZ 对 MCF- 7 细胞生长的影响,结果表明 ROZ 抑制 MCF- 7 细胞的生长,其半数抑制浓度 (IC₅₀) 是 1.6×10^{-4} M。集落形成试验也证明 ROZ 可明显抑制 MCF- 7 细胞集落的形成, EC₅₀ 值为 7.5×10^{-5} M, 结果表明 ROZ 可抑制 MCF- 7 细胞的生长,且呈剂量依赖性。

3.2 ROZ 对 MCF- 7 细胞周期的影响

ROZ 3.0×10^{-4} M 处理细胞 72h 后,可检测到 ROZ 使 S 期细胞所占比例明显降低,而 G1 期细胞的比例相应升高,该结果提示,ROZ 可使 MCF- 7 细胞生长阻滞于 G1 期,抑制其增殖^[6],结果见表 1 及图 1、图 2。

表 1 ROZ 对 MCF- 7 细胞周期的影响

组别	剂量(mol/L)	%G1	%S	%G2+M
对照组		53.82	46.18	0
	3.0×10^{-4} M	59.60	33.18	7.21

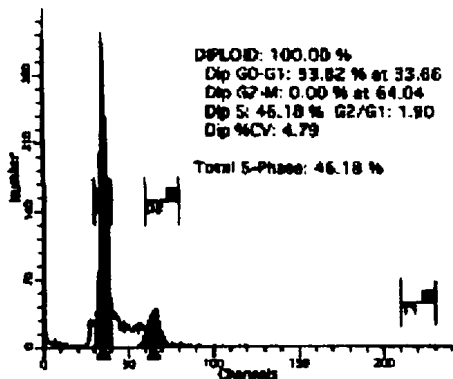


图 1:流式细胞仪分析 MCF- 7 细胞周期比例。

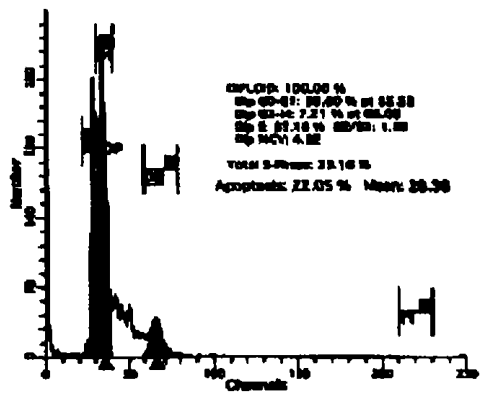


图 2:流式细胞仪分析 ROZ 3.0×10^{-4} M 处理 MCF- 7 细胞后细胞周期比例。

流式细胞仪分析显示,以 ROZ 处理的细胞,“亚 G1”细胞群所占比例呈剂量依赖性地升高,在 3.0×10^{-4} M 浓度下,凋亡细胞比例可达 22.05%,在 1.5×10^{-3} M 浓度下,凋亡细胞比例可达 42.5%,结果见表 2。

表 2 ROZ 对 MCF- 7 细胞凋亡的影响

组别	剂量(M)	凋亡细胞(%)
对照组		1.80
ROZ	1.2×10^{-5}	1.98
	6.0×10^{-5}	5.64
	3.0×10^{-4}	22.05
	1.5×10^{-3}	42.5

3.3 ROZ 对 MCF- 7 细胞凋亡的影响

以 ROZ 3.0×10^{-4} M 处理细胞 72h 后, Hoechst33342 染色,可见明显的细胞形态改变,染色质呈颗粒状、核固缩且伴有凋亡小体形成。结果见图 3。

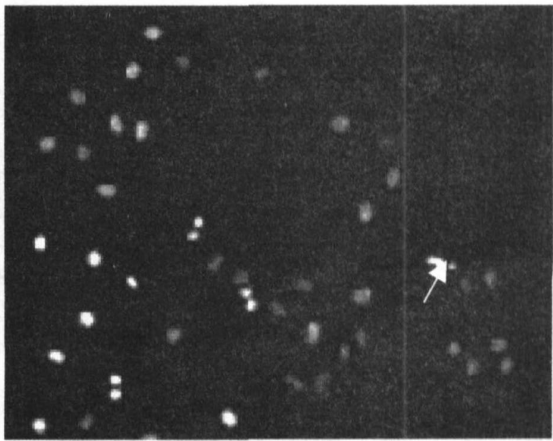


图 3 ROZ 对 MCF- 7 形态的影响(Hoechst33342 染色)

3.4 ROZ 对作用后 bcl- 2, caspase3 的表达

Western blotting 结果显示,ROZ 1.2×10^{-5} M, 6.0×10^{-5} M, 3.0×10^{-4} M, 1.5×10^{-3} , 作用 72h 后,可明显降低处理组细胞 bcl- 2 的表达水平、升高 caspase3 表达,推测 ROZ 诱导凋亡的作用可能通过降低 bcl- 2 表达,激活 caspase3 来实现^[7,8,9],结果见图 4、5。

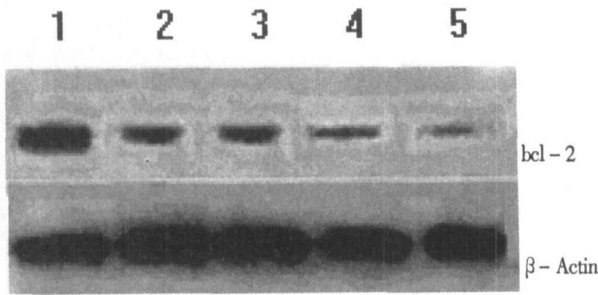


图4 ROZ对MCF-7细胞Bel-2表达的影响

1. 对照组; 2. ROZ 2.4×10^{-6} M; 3. ROZ 1.2×10^{-5} M; 4. 6.0×10^{-5} M; 5. 3.0×10^{-4} M

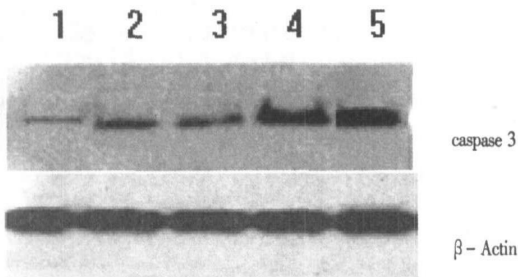


图5 ROZ对MCF-7细胞caspase-3表达的影响

1. 对照组; 2. ROZ 2.4×10^{-6} M; 3. ROZ 1.2×10^{-5} M; 4. 6.0×10^{-5} M; 5. 3.0×10^{-4} M

4 讨论

PPARs 属于核受体超家族的成员。过去十几年的研究表明,PPAR γ 配体可诱导许多肿瘤的凋亡与分化。PPAR γ 激活后在体内外可抑制脂肪瘤、乳腺癌、结肠腺癌等的生长,据此推断 PPAR 激动剂对上述肿瘤有一定的治疗和预防作用。PPAR γ 激动剂的抗肿瘤作用机制还不完全清楚,在不同的肿瘤其作用机制可能略有不同。

PPAR γ 在人结肠腺癌细胞系、非小细胞肺癌中均表达增高,给相应激动剂后,细胞生长受到抑制,停滞于 G1 期,且伴有与细胞分化相一致的形态学改变^[10]。

本研究显示 PPAR γ 在乳腺癌组织以及乳腺癌细胞系中的表达,在体外研究发现 PPAR γ 激动剂 ROZ 对人乳腺癌细胞系 MCF-7 通过影响细胞周期及诱导细胞凋亡而抑制其生长,与报导结果一致。

我们的结果显示,ROZ 可明显地抑制 MCF-7 细胞的生长。以往的研究也表明 PPAR γ 激动剂引起的细胞生长抑制有可能是由于影响肿瘤细胞的周期分布所致,本研究的结果显示,ROZ 可减少 S 期细胞所占比例,而 G1 期细胞的比例增加,据此推测 ROZ 可能是通过使细胞生长阻滞在 G1 期而发挥其抑制生长作用^[11]。

早期研究结果提示 PPAR γ 激活可促进许多肿瘤细胞的凋亡及分化。本研究结果表明 ROZ 处理组细胞的形态发生明显改变,染色质呈颗粒状,核固缩并出现凋亡小体。FCM 观察到经 ROZ 处理细胞 72h,凋亡细胞所占比例明显升高。上述数据显示,ROZ 抑制 MCF-7 细胞的生长可能部分地与其诱导肿瘤细胞凋亡有关。

Bcl-2 是一种较为肯定的抗细胞凋亡基因,可抑制肿瘤

细胞凋亡。近来有很多报道表明, Caspase 蛋白酶家族在凋亡过程中起着关键作用。其中 Caspase-3 的激活是多种刺激引起凋亡的汇集点。在肿瘤细胞中 caspase 激活或表达升高可引起肿瘤的生长抑制以及抑制肿瘤的侵袭、转移和演进过程,这种 caspase 依赖的肿瘤生长停滞现象往往是由于肿瘤细胞发生凋亡造成的。在许多肿瘤组织中,procasp-3 高表达,当其被激活后,便可发挥诱导凋亡的作用。本研究中,Western blotting 结果显示 ROZ 可明显降低 bcl-2 的表达水平,明显升高 caspase3 的表达,从而推测 ROZ 可能通过影响 bcl-2 的表达,以及通过激活 caspase3 的途径诱导凋亡作用。

综上所述,ROZ 有望成为乳腺癌治疗药亦或肿瘤治疗的辅助用药,PPAR γ 有潜力成为肿瘤治疗的新靶点,进一步的体内体外实验正在进行中。

参考文献

- [1] Gelman L, Fruchart JC, Auwerx J. An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferators-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer [J]. Cell Mol Life Sci, 1999, 55: 932-43
- [2] Chenguang Wang, Zhiping Li, Yinan Lu, Richard G. Pestell, Cyclin D1 regulation of PPAR γ function [C]. 第三届中国肿瘤学术大会教育集, 广州, 中国抗癌学会, 2004: 522-523
- [3] Ming-Yi Li, Hua Deng, Jia-Ming Zhao. PPAR γ pathway activation results in apoptosis and COX-2 inhibition in HepG2 cells [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(2): 1220-1226
- [4] Ming-Yi Li, Hua Deng, Jia-Ming Zhao. Peroxisome proliferators-activated receptor gamma ligands inhibit cell growth and induce apoptosis in human liver cancer Bel7402 cells [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(3): 1683-1688
- [5] Takahashi N, Okumura T, Motomura W. Activation of PPAR gamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells [J]. FEBS Lett, 1999, 455: 135-139
- [6] Takashima T, Fujiwara, Y, Higuchi K. PPAR- gamma ligands inhibit growth of human esophageal adenocarcinoma cells through induction of apoptosis, cell cycle arrest and reduction of ornithine decarboxylase activity [J]. Int J Oncol, 2001, 10: 465-471
- [7] Chen GG, Lee JF, Wang SH, Chan UP. Apoptosis induced by activation of peroxisome-proliferator activated receptor- gamma is associated with Bcl-2 and NF- κ B in human colon cancer [J]. Life Sci, 2002, 70: 2631-2646
- [8] Zhang XL, Liu L, Jiang HQ. Salvia miltiorrhiza monomer IH764-3 induces hepatic stellate cells apoptosis via caspase-3 activation [J]. World J Gastroenterol, 2002, 8: 515-519
- [9] Li HL, Ren XD, Zhang HW. Synergism between heparin and adriamycin on cell proliferation and apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells [J]. Acta Pharmacol sin, 2002, 23: 167-172
- [10] Venkateshwar G, Keshanouni, Raju C Reddy. Peroxisome proliferators-activated receptor- γ activation inhibits tumor progression in non-small-cell lung cancer [J]. Oncogene, 2004, 23: 100-108
- [11] Itami A, Watanabe G, Shimada Y, et al. Ligands for peroxisome proliferators-activated receptor gamma inhibit growth of pancreatic cancers both in vitro and in vivo [J]. Int J Cancer, 2001, 94: 370-376