

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)11-0971-04

罗格列酮对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的体外抗肿瘤作用

章涛¹, 余华荣¹, 杨贵忠¹, 刘颖菊¹, 杨俊卿¹, 蒋建新², 周岐新¹¹重庆医科大学药理学教研室, 重庆 400016, ²第三军医大学创伤烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042

Antitumor effects of rosiglitazone on human breast cancer cell line MDA-MB-231 *in vitro*

ZHANG Tao¹, YU Hua-Rong¹, YANG Gui-Zhong¹, LIU Ying-Ju¹, YANG Jun-Qing¹, JIANG Jian-Xin², ZHOU Qi-Xin¹¹Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China, ²State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

【Abstract】 AIM: To study the antitumor effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) agonist rosiglitazone on human breast cancer cell line MDA-MB-231 and evaluate its underlying application value for breast cancer therapy.

METHODS: MTT assay was used to observe cytostatic effects of rosiglitazone on MDA-MB-231 cells. PPAR γ antagonist GW9662 was used to analyze the influence of rosiglitazone on the proliferation of MDA-MB-231 cells as well as its relationship to PPAR γ . The cell cycle distribution pattern was detected by flow cytometer.

Apoptotic cells were determined both by Annexin V staining and TUNEL assay. **RESULTS:** MTT analysis demonstrated that rosiglitazone inhibited the growth of MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner, with IC₅₀ being 5.2 μ mol/L. PPAR γ antagonist GW9662 (5 μ mol/L) could, at least in part, reverse the inhibitory effects of rosiglitazone on the proliferation of MDA-MB-231 cells. Cell cycle analysis showed that, with the increasing concentration of rosiglitazone treatment, the percentage of G₀/G₁ phase cells increased while S phase cells decreased accordingly.

Apoptotic effects by rosiglitazone showed that 100 μ mol/L rosiglitazone could result in cell apoptosis detected by TUNEL, and the apoptosis rate was (18.4 \pm 3.1)%, much the same as compared to Annexin V assay by flow cytometry [(16.6 \pm 2.7)%] ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Rosiglitazone treatment can inhibit the growth of MDA-MB-231 cell via PPAR γ by inducing G₀/G₁ arrest and high dose administration of rosiglitazone can also induce the

apoptosis of MDA-MB-231 cells, suggesting that PPAR γ represents a putative molecular target for chemopreventive therapy and its agonist rosiglitazone might be an effective agent for the treatment of breast cancer.

【Keywords】 peroxisome proliferator-activated receptor γ ; rosiglitazone; antineoplastic agents; breast neoplasms; MDA-MB-231 cells

【摘要】目的:研究过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 激动剂罗格列酮对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 体外生长影响,以评价其在人乳腺癌治疗上的应用潜力。方法:噻唑蓝(MTT)法检测罗格列酮对 MDA-MB-231 细胞体外生长抑制作用,应用 PPAR γ 拮抗剂 GW9662,分析罗格列酮对 MDA-MB-231 细胞增殖影响与 PPAR γ 受体关系,流式细胞仪分析细胞周期,Annexin V-FITC 和 TUNEL 法检测细胞凋亡。结果:罗格列酮干预下 MDA-MB-231 细胞 G₀/G₁ 期比例上升,而 S 期比例下降,呈量-效关系抑制其生长,IC₅₀ = 5.2 μ mol/L。PPAR γ 拮抗剂 GW9662 可部分逆转罗格列酮对 MDA-MB-231 细胞增殖抑制作用($P < 0.05$),100 μ mol/L 罗格列酮还可诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡,TUNEL 法检测的凋亡率(18.4 \pm 3.1)% 与 Annexin V-FITC 法检测的结果一致[(16.6 \pm 2.7)%] ($P > 0.05$)。结论:罗格列酮通过 PPAR γ 介导,使 MDA-MB-231 细胞 G₁ 期阻滞而抑制其增殖,高浓度时还可诱导其发生凋亡,罗格列酮有望成为治疗乳腺癌的有效药物。

【关键词】 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; 罗格列酮; 抗肿瘤药; 乳腺癌; MDA-MB-231 细胞

【中图分类号】 R966; R737.9; R969 **【文献标识码】** A

0 引言

由罗格列酮、吡格列酮和环格列酮等组成的噻唑烷二酮类(thiazolidinedione, TZD)人工合成过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 激动剂已被广泛应用于糖尿病的临床治疗当中^[1]。近年来的研究显示, TZD 等 PPAR γ 激动剂可抑制多种肿瘤细胞的增殖并促进其凋亡,激活 PPAR γ 受体极有希望成为治疗多种恶性肿瘤的新途径^[2]。但目前为止,尚无罗格列酮对人 MDA-MB-231 乳腺癌细胞体外抗肿瘤的系统的研究报道。鉴于此,我们就细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡等方面探讨罗格列酮对 MDA-MB-231 细胞的体外生物

收稿日期 2006-10-16; 接受日期 2007-03-07

基金项目 国家自然科学基金(30572353)

通讯作者 周岐新. Tel (023) 68485038 Email zqzhouqx@yahoo.com.cn

作者简介 章涛. 博士, 讲师. Tel (023) 60561372 Email 'oceanzt@

163.com

学效应,为未来临床抗肿瘤应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞株购自中科院上海细胞库。罗格列酮购自重庆康尔威药业公司(批号:2005-1,纯度 > 0.99);四甲基偶氮唑蓝(MTT)、PPAR γ 受体拮抗剂 GW9662 购自 Sigma 公司;TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒购自南京凯基生物;Annexin V-FITC Kit 为 Beckman Coulter 公司产品;RPMI-1640 培养基、小牛血清购自 HyClone 公司;其它试剂均为分析纯。Coulter counter 细胞计数仪(Beckman Coulter 公司);Safire 全波长酶标仪(TECAN 公司);FACS Calibur 流式细胞仪(Becton-Dickinson 公司)。由于罗格列酮和 GW9662 难溶于水,用 DMSO 制成 0.1 mol/L 的母液,-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MDA-MB-231 细胞培养于含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中,常规加入青霉素(10 5 U/L)与链霉素(100 mg/L),于 37 $^{\circ}$ C,50 mL/L CO $_2$ 培养箱中培养。

1.2.2 MTT 检测细胞增殖抑制率 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,计数并调整密度为 1.2 \times 10 8 /L,以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中培养,15 h 后更换培养基,设置对照组和不同浓度药物组(罗格列酮 1 \times 10 $^{-8}$,1 \times 10 $^{-7}$,1 \times 10 $^{-6}$,1 \times 10 $^{-5}$,1 \times 10 $^{-4}$ mol/L),每组设 8 个复孔。继续培养 24 h 后,加入 10 μ L MTT(5 g/L),继续孵育 4 h,弃上清,每孔加入 100 μ L DMSO,振荡 10 min 待结晶溶解,于酶标仪上测定 570 nm 波长的 A 值,计算不同浓度罗格列酮对 MDA-MB-231 细胞的生长抑制率。细胞抑制率(%)=[1-试验组 A $_{570\text{nm}}$ /对照组 A $_{570\text{nm}}$] \times 100%。将药物浓度的对数值和抑制率拟合后计算出 IC $_{50}$ 。试验重复 3 次。

1.2.3 细胞增殖能力检测 取对数生长期细胞,细胞计数并调整密度为 5 \times 10 7 /L,以每孔 1 mL 接种于 6 孔板中培养。第 2 日更换含不同药物组合的新鲜培养基,包括 1 mL/L DMSO,1 μ mol/L 罗格列酮、5 μ mol/L GW9662 以及 1 μ mol/L 罗格列酮与 5 μ mol/L GW9662 联用共 4 个组,每 48 h 更换含相应药物的新鲜培养基。分别于用药后第 2,4,6 日收集细胞计数,每组计 3 个复孔,求其平均值。试验重复 3 次。

1.2.4 细胞周期分析 取对数生长期细胞,调整密度为 3 \times 10 8 /L,以每孔 1 mL 接种于 6 孔板中培养。第 2 日更换含不同浓度罗格列酮(1 \times 10 $^{-6}$,1 \times 10 $^{-5}$,1 \times 10 $^{-4}$ mol/L)的新鲜培养基,继续培养 24 h 后消化收集细胞,PBS 洗涤一次,750 mL/L 乙醇固定 4 $^{\circ}$ C

冰箱保存。检测前用 PBS 洗 2 次,PI 染色,流式细胞仪(FCM)检测群体细胞中 G $_0$ /G $_1$,S,G $_2$ /M 各期细胞百分比。每个药物浓度做 3 个复孔,同时设不加药物的对照组。

1.2.5 Annexin V/PI 法流式细胞仪检测细胞凋亡 细胞接种密度及用药同细胞周期检测。罗格列酮作用 24 h 后消化收集细胞,PBS 洗 2 遍,用 100 μ L 结合缓冲液重悬细胞,加 5 μ L Annexin V-FITC 和 2.5 μ L PI 混匀,避光于冰上孵育 10 min,PBS 洗 1 次,400 μ L 结合缓冲液重悬细胞,细胞样品逐一上机检测,同一浓度设 3 个复孔,试验同时设置不加药物的空白对照组。

1.2.6 TUNEL 法检测细胞凋亡 将预铺多聚赖氨酸的盖玻片放入 6 孔培养板中,每孔接种 3 \times 10 5 个细胞,第 2 日更换为含 1 \times 10 $^{-6}$,1 \times 10 $^{-5}$,1 \times 10 $^{-4}$ mol/L 3 种不同浓度罗格列酮的新鲜培养基。药物作用 36 h 后弃培养液,PBS 洗 1 次,40 g/L 多聚甲醛室温固定 25 min,按照原位检测试剂盒说明操作,最后以 DAB 显色、甲基绿衬染,每个浓度作 2 个复孔。在高倍镜(\times 200)视野下,随机选取 10 个视野,以凋亡细胞在全部细胞中所占的比例计算凋亡率。

统计学处理:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 软件包对实验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA)并用 LSD- t 检验进行均数间的多重比较。

2 结果

2.1 对 MDA-MB-231 细胞体外增殖的影响 对细胞生长的抑制作用随药物浓度增加而加剧,呈明显的量-效关系,除 1 \times 10 $^{-8}$ 和 1 \times 10 $^{-7}$ mol/L 2 个浓度间的抑制率比较无统计学差异外[(11.2 \pm 2.0)%,(15.5 \pm 2.5)%, P >0.05],其余各组之间均存在统计学差异[(32.1 \pm 3.2)%,(62.0 \pm 5.1)%,(74.9 \pm 6.4)%, P 均<0.01]。IC $_{50}$ 为 5.2 μ mol/L。

2.2 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响 随着罗格列酮浓度的增高,G $_0$ /G $_1$ 期细胞在细胞周期中所占的比例逐步上升,而 S 期细胞比例逐渐降低(表 1)。

2.3 罗格列酮抑制 MDA-MB-231 细胞增殖与 PPAR γ 受体的关系 给药后第 2,4,6 日,罗格列酮(1 μ mol/L)组细胞计数(起始接种细胞数为 5 \times 10 4 个/孔)分别为(1.06 \pm 0.14) \times 10 5 (3.85 \pm 0.69) \times 10 5 和(7.45 \pm 1.30) \times 10 5 个/孔,与 1 mL/L DMSO 对照组(2.46 \pm 0.44) \times 10 5 (17.10 \pm 1.69) \times 10 5 和(28.82 \pm 2.79) \times 10 5 个/孔比较,两组差异具有统计学意义(P 均<0.01),而 PPAR γ 受体拮抗剂 GW9662(5 μ mol/L)与罗格列酮(1 μ mol/L)联用组

的细胞计数分别为 $(1.72 \pm 0.20) \times 10^5$ 、 $(6.63 \pm 0.58) \times 10^5$ 和 $(11.90 \pm 1.21) \times 10^5$ 个/孔, 高于罗格列酮组 (P 均 < 0.05)。GW9662 ($5 \mu\text{mol/L}$) 组的细胞计数结果与 1 mL/L DMSO 对照组比较, 差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。

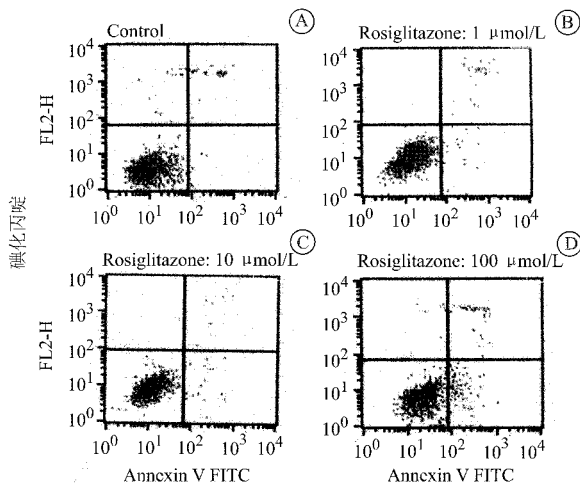
表1 罗格列酮对 MDA-MB-231 细胞周期分布的影响

($n=3$, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	61.1 ± 4.9	28.7 ± 3.4	10.2 ± 1.7
罗格列酮 (mol/L)			
1×10^{-6}	69.5 ± 6.4	21.8 ± 2.3 ^b	8.7 ± 1.1
1×10^{-5} ^b	79.9 ± 6.6	15.8 ± 1.8	4.3 ± 0.6
1×10^{-4} ^b	94.7 ± 3.7	3.5 ± 0.6	1.8 ± 0.2

^b $P < 0.01$ vs 对照。

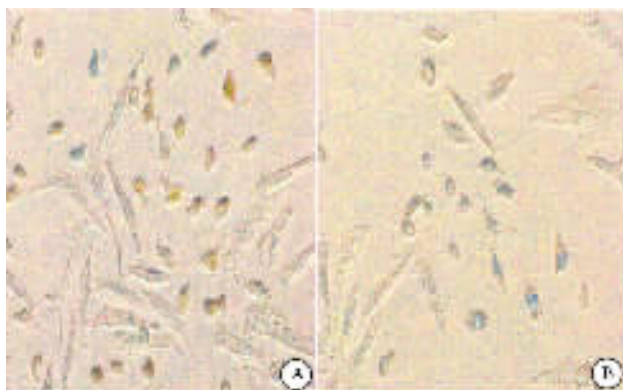
2.4 罗格列酮诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡 对照组细胞的凋亡发生率为 $(0.6 \pm 0.2)\%$, 而 10^{-4} mol/L 罗格列酮处理 24 h 后细胞凋亡发生率上升至 $(16.6 \pm 2.7)\%$ ($P < 0.01$, 图1)。TUNEL 法检测的结果表明(图2) 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} 、 $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 3 种不同浓度罗格列酮作用细胞 36 h 后, 仅 10^{-4} mol/L 浓度可出现形态皱圆、细胞核呈棕黄色的凋亡细胞, 其凋亡发生率为 $(18.4 \pm 3.1)\%$, 与上述流式细胞检测的凋亡结果无统计学差异 ($P > 0.05$)。



A: 对照; B: $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; C: $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$; D: $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$. 图1 流式细胞术分析罗格列酮对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

3 讨论

近年来发现, 包括 TZD 在内的一些 PPAR γ 激动剂能抑制多种肿瘤细胞的增殖, 其抗肿瘤机制还不甚明了, 可能涉及肿瘤细胞增殖、细胞凋亡和细胞分化



A: $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 罗格列酮处理 36 h; B: 阴性对照组(不加 TdT 酶)。

图2 TUNEL 法检测罗格列酮诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡 $\times 200$

等多方面的调节机制。曲格列酮可诱导肝癌细胞周期素依赖蛋白激酶(CDK)抑制因子 P21 的表达, 使细胞出现 G₁ 期阻滞³¹。在对大鼠 C6 神经胶质瘤细胞的研究中发现, PPAR γ 激动剂环格列酮和 PG-J2 可使促凋亡蛋白 BAX 和 BAD 表达上调, 通过细胞色素 C 的释放和随后激活几种 caspases 蛋白而引发细胞凋亡⁴¹。

研究表明, 小鼠和人乳腺组织以及人乳腺癌细胞系均表达 PPAR γ , 我们的研究也证实 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞表达 PPAR γ 。Yin 等⁵¹报道, 曲格列酮可下调人乳腺癌 MCF-7 细胞 cyclin D1 的表达, 致使 Rb 蛋白磷酸化受阻, 引发细胞周期的捕获, G₁ 期细胞比例增加, 从而抑制细胞增殖。本研究表明, $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 的罗格列酮即可显著抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖, 随着药物浓度的增高, 罗格列酮对 MDA-MB-231 细胞的生长抑制效应增强, 量-效关系明显, 并且 G₀/G₁ 期细胞比例也随药物浓度的增加而增高, 说明罗格列酮可通过细胞周期捕获而抑制 MDA-MB-231 细胞增殖。

MDA-MB-231 为雌激素受体阴性乳腺癌细胞, 对激素治疗不敏感, 治疗效果不佳, 寻找新的治疗策略和药物显得尤为迫切。目前为止, 有关 TZD 对 MDA-MB-231 的作用研究还极为欠缺。由于曲格列酮肝毒性发生率高, 采用曲格列酮治疗乳腺癌的 II 期临床实验也因此被终止⁶¹。罗格列酮是 PPAR γ 高亲和力配体, 可抑制 MKN45 人胃癌细胞在裸鼠体内的生长⁷¹。在对甲状腺癌细胞的研究中, 罗格列酮可增加其 P21、P27 的表达, 并减少 cyclin D1 的表达, 导致细胞周期捕获从而抑制细胞增殖, 并降低 bcl-XL 表达, 激活 caspase-3、7 而诱导细胞凋亡⁸¹。在多种类型肿

瘤患者的药物安全性检测 I 期临床实验中,罗格列酮显示良好的耐受性,而无毒副作用^[9]。Mody 等^[10]在 2005 年美国癌症协会年会上报道了罗格列酮对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用。我们不仅进一步证实了罗格列酮通过细胞周期捕获抑制 MDA-MB-231 细胞增殖,同时还发现,高浓度罗格列酮(1×10^{-4} mol/L)可诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡,这为罗格列酮的临床应用提供了新的实验依据。

由于一些肿瘤细胞对 TZD 诱导的生长抑制敏感性与其 PPAR γ 受体蛋白表达水平不相关^[11],加之 PPAR γ 受体激动剂诱导肿瘤细胞凋亡与激活 PPAR γ 受体无必然联系,因此,有学者认为 PPAR γ 受体激动剂抗肿瘤作用与激动 PPAR γ 受体无关^[12]。然而本研究中 PPAR γ 拮抗剂 GW9662 可部分逆转罗格列酮对 MDA-MB-231 细胞增殖抑制作用,因此,至少可以认为,罗格列酮抑制 MDA-MB-231 细胞增殖的机制与激动 PPAR γ 受体有关。

【参考文献】

- [1] Kanzer-Lewis G. Early combination therapy with a thiazolidinedione for the treatment of type 2 diabetes[J]. *Diabetes Educ*, 2003, 29(6):954 - 958, 961.
- [2] Weng JR, Chen CY, Pinzone JJ, et al. Beyond peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling: The multi-facets of the anti-tumor effect of thiazolidinediones[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2006, 13(2) #01 - 413.
- [3] Koga H, Sakisaka S, Harada M, et al. Involvement of p21(WAF1/ Cip1), p27(Kip1), and p18(INK4c) in troglitazone-induced cell-cycle arrest in human hepatoma cell lines[J]. *Hepatology*, 2001, 33(5) 1087 - 1097.
- [4] Zander T, Kraus JA, Grommes C, et al. Induction of apoptosis in human and rat glioma by agonists of the nuclear receptor PPARgamma[J]. *J Neurochem*, 2002, 81(5):1052 - 1060.
- [5] Yin F, Wakino S, Liu Z, et al. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 286(5) 916 - 922.
- [6] Burstein HJ, Demetri GD, Mueller E, et al. Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: A phase II study[J]. *Breast Cancer Res Treat* 2003, 79(3) 391 - 397.
- [7] Leung WK, Bai AH, Chan VY, et al. Effect of peroxisome proliferator activated receptor gamma ligands on growth and gene expression profiles of gastric cancer cells[J]. *Gut* 2004, 53(3) 331 - 338.
- [8] Aiello A, Pandini G, Frasca F, et al. Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma agonists induce partial reversion of epithelial-mesenchymal transition in anaplastic thyroid cancer cells[J]. *Endocrinology* 2006, 147(9) #463 - 4475.
- [9] Read WL, Bagstrom MQ, Adkins D, et al. A phase I study of bexarotene and rosiglitazone in patients with refractory cancers[C]. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2006, 24(18S): Abstr 13094.
- [10] Mody M, Dharker N, Glickman T, et al. Rosiglitazone inhibits growth of MDA-MB-231 and T47D cells in a dose- and time-dependent manner, but only at suprapharmacologic doses[C]. *Proc Am Soc Cancer Res* 2005, 46: Abstr 1360.
- [11] Huang JW, Shiau CW, Yang YT, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent ablation of cyclin D1 by thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells[J]. *Mol Pharmacol* 2005, 67(4) 1342 - 1348.
- [12] Shiau CW, Yang CC, Kulp SK, et al. Thiazolidinediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(4) 1561 - 1569.

编辑 井晓梅