

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01052

曲格列酮体外抑制大鼠垂体腺瘤 GH3 细胞增殖

陈富勇,王守森*,王水良,王如密

福建医科大学福总临床医学院,南京军区福州总医院神经外科,福州 350025

[摘要] 目的:探讨过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)高亲和力配体——噻唑烷二酮类药物曲格列酮对大鼠垂体腺瘤 GH3 细胞系增殖的影响,并初步探讨其作用机制。方法:不同浓度(10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L)曲格列酮作用于 GH3 细胞,另设空白对照组(F-12 培养液)和 0.01%二甲亚砜(DMSO)培养组,应用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测各组 GH3 细胞生长情况;用流式细胞技术检测各组 GH3 细胞周期的变化,用半定量 RT-PCR 方法检测各组 *CyclinD1* 基因 mRNA 表达。结果:曲格列酮干预 GH3 细胞 72 h 后,可剂量依赖性抑制 GH3 细胞增殖,并使 GH3 细胞被明显阻滞于 G₁/S 期,*CyclinD1* mRNA 表达较对照组明显减少($P < 0.05$)。结论:曲格列酮能明显抑制大鼠垂体腺瘤细胞的增殖,可能与其结合 PPAR- γ 后导致 *CyclinD1* mRNA 表达减少,细胞阻滞于 G₁ 期,促进肿瘤细胞死亡有关。

[关键词] 垂体腺瘤;过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ;曲格列酮;GH3 细胞;细胞增殖

[中图分类号] R 739.41 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)09-1052-04

Troglitazone inhibits proliferation of GH3 cell *in vitro*

CHEN Fu-yong, WANG Shou-sen*, WANG Shui-liang, WANG Ru-mi

Department of Neurosurgery, Fuzhou General Hospital, Clinical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, China

[ABSTRACT] **Objective:** To study the anti-proliferation effects of thiazolidinedione compounds-troglitazone, which is a high affinity ligand of PPAR- γ , on rat pituitary adenoma GH3 cell line and explore the related mechanisms. **Methods:** GH3 cells were separately treated with troglitazone (10^{-7} , 10^{-6} and 10^{-5} mol/L), dimethyl sulfoxide (DMSO) (DMSO control group) and phenol red- and serum-free F-12 medium (blank group). MTT was used to examine the cell growth in each group and FACS was used to detect the distribution of cell cycle. Semi-quantitative RT-PCR method was utilized to determine the expression of *CyclinD₁* mRNA. ANOVA was used for statistical analysis. **Results:** The 72 h treatment with troglitazone inhibited GH3 cell proliferation in a dose-dependent manner. The treatment also induced cell cycle arrest in G₁/S phase and significantly decreased the expression of *CyclinD₁* mRNA as compared to the other 2 groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Troglitazone can obviously inhibit the proliferation of GH3 cells; the molecular mechanism may be the decrease of *CyclinD₁* mRNA due to binding to PPAR- γ .

[KEY WORDS] pituitary adenoma; peroxisome proliferator-activated receptor γ ; thiazolidinedione compounds; troglitazone; GH3 cell; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(9):1052-1055]

垂体腺瘤(pituitary adenomas, PA)约占颅内肿瘤的 15%,是中枢神经系统常见的良性肿瘤,很少发生转移,常侵袭垂体周围组织,导致局部组织受压和激素过度分泌。对于垂体腺瘤的治疗,目前主要采用手术切除、放射治疗和药物治疗等 3 种途径。然而,大约 30%的垂体微腺瘤、25%的泌乳素腺瘤以及 80%的生长激素腺瘤和直径大于 1 cm 的无功能性腺瘤,全切除仍然很困难^[1];而放射治疗在治疗

的同时往往导致垂体功能低下^[2]。对一些分泌催乳素(prolactin, PRL)和生长激素(growth hormone, GH)的垂体腺瘤,多巴胺激动剂(溴隐亭)和生长抑素类似物能有效抑制 PRL 和 GH 的过度分泌,抑制肿瘤生长,缩小肿瘤。然而,仍有 15%的 PRL 腺瘤和 GH 腺瘤对于这些药物治疗无效^[3]。一些不分泌激素的垂体腺瘤(称为无功能性垂体腺瘤)通常都是巨大腺瘤,常导致视野缺损、头痛和垂体功能紊

[收稿日期] 2008-05-26 **[接受日期]** 2008-07-05

[作者简介] 陈富勇,博士生. E-mail: bjgnsjwk@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:0591-24937080, E-mail: wshsen@126.com

乱^[4]。目前对于无功能性垂体腺瘤尚无有效治疗药物。

过氧化物酶体增殖激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ) 是一类由配体激活的核转录因子,属 II 型核受体超家族成员,和特定的反应元件结合后可介导配体依赖的转录调节作用。研究表明,PPAR- γ 激活可抑制一些肿瘤细胞,如非小细胞肺癌^[5]、胃癌^[6]的生长。高亲和力的 PPAR- γ 配体包括自然配体和合成配体,如长链脂肪酸、花生四烯酸、噻唑烷二酮类药物以及非噻唑烷二酮类药物(GW7845)。曲格列酮是属于噻唑烷二酮类药物的一种胰岛素增敏剂。Heaney^[7]应用免疫组化技术发现,在人的各亚型垂体腺瘤组织中均有 PPAR- γ 的异常高表达,而同时 PPAR- γ 在正常垂体组织中低表达;进一步研究发现,PPAR- γ 与其高亲和力的配体结合后可以抑制体外培养的 PRL 腺瘤、GH 腺瘤和 LH 腺瘤细胞增殖,并且能在体内抑制肿瘤生长。以上结果提示 PPAR- γ 作为一个新的分子靶点,在治疗无功能性腺瘤、PRL 腺瘤、GH 腺瘤中,尤其是常规药物治疗无效的垂体腺瘤中可能发挥重要作用。然而,介导 PPAR- γ 配体抑制垂体腺瘤细胞增殖的基因及其确切机制尚不清楚。由于垂体腺瘤 GH3 细胞系可分泌 PRL 和 GH,因此,本研究以体外培养的 GH3 细胞作为研究对象,观察曲格列酮在体外对 GH3 细胞增殖的影响,并初步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养及药物 大鼠垂体腺瘤细胞 GH3 细胞系购自中国医学科学院细胞中心,用无酚红无血清的 Ham F-10 培养基(美国 Gibco 公司)培养,内含 15% 的胎牛血清(美国 PAA 公司)、2.5% 的热灭活马血清(美国 Gold 公司)、2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺(美国 PAA 公司)、0.25 ng/ml 两性霉素 B 和 80 μ g/ml 庆大霉素(均为美国 Sigma 公司)。细胞常规在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95% O₂、100% 湿度的孵箱(NAPCO 公司)中培养。细胞每 2 d 换液 1 次,4~5 d 以 0.25% 的胰蛋白酶(美国 Gibco 公司)消化传代 1 次。所有化学试剂均购自生物科技公司,包括二甲亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司),四甲基偶氮唑蓝(厦门泰京生物科技有限公司),RNA 抽提试剂盒(Qiagen 公司),MBI 逆转录试剂盒(Fermentas 公司)和 PCR 试剂盒(博亚公司)。

1.2 实验分组 实验细胞随机分为空白对照组(只加 Ham 无酚红、无血清 F-12 培养液)、0.01% DMSO 对照组、曲格列酮干预组(又分为 10⁻⁷、10⁻⁶ 和 10⁻⁵ mol/L 浓度组)。

1.3 细胞生长分析 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测垂体腺瘤细胞生长。以内含 10% 小牛血清、2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺、0.25 ng/ml 两性霉素 B、80 μ g/ml 庆大霉素的 Ham 无酚红、无血清的 F-12 全培养液将消化后的 GH3 细胞稀释成 5 \times 10⁴/ml 单细胞悬液,接种于 96 孔培养板,每孔 200 μ l。曲格列酮溶解于 DMSO 溶液中,以预定的浓度加入各培养孔,每组复种 5 孔;两个对照组分别加入 0.01% DMSO 和 F-12 培养液。分别在作用 24、48、72、96、120 h 后,反应结束前 4 h,吸去培养上清液,每孔加 5 mg/ml MTT 溶液 50 μ l,继续在培养箱培养 4 h,待反应产物 formazan 结晶形成后,小心吸去上清液,每孔加入 150 μ l DMSO 充分溶解其还原产物。于酶标仪上(上海长明公司)检测 490 nm 波长光密度(D)值。

1.4 流式细胞技术检测细胞周期 GH3 细胞经药物作用 72 h 后,用 0.01 mol/L PBS 洗涤,0.25% 的胰蛋白酶消化,6 225 \times g 离心 2 min,根据 Coulter 公司说明书操作,加入碘化丙啶。制备 1 \times 10⁶ 细胞数的单细胞悬液,并用流式细胞技术分析,通过光通道检测被碘化丙啶标记的核的荧光强度。

1.5 RT-PCR 分析 *CyclinD1* mRNA 的表达 药物作用 72 h 后,用 Qiagen RNA 抽提试剂盒(Qiagen 公司)抽提细胞总 RNA,1 \times 10⁶ 个细胞/组。采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术检测 *CyclinD1*,以及内参照 GAPDH mRNA 的表达。在药物作用 72 h 后,细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,置于高速离心机(黑马公司)中以 6 500 \times g 离心 1 min,用 0.01% PBS 洗涤 2 次。采用 Chomczynski 等^[8]的方法分离细胞总 RNA。同时检测总 RNA 的完整性。取上述 Qiagen 试剂盒提取的总 RNA 5 μ g,依次加入引物(0.5 μ g/ μ l)1 μ l,5 \times 反应缓冲液 4 μ l (含 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 10 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L KCl),Ribolock RNA 酶抑制剂(20 U/ μ l)1 μ l,10 mmol/L dNTP 混合物 2 μ l,加入 RevertAid 逆转录酶(200 U/ μ l)1 μ l,终反应体系容积 20 μ l。PCR 反应体系为:总体积 20 μ l,10 \times

PCR 缓冲液 2 μl, 1.5 μl dNTP (10 mmol/L), 1 μl 引物, 0.5 μl DNA 聚合酶和 2 μl RT 产物。

引物序列如下: *CyclinD1* 引物, 上游序列 5'-TGC AAA TGG AAC TGC TTC TG-3', 下游序列 5'-CTT GGG ATC GAT GTT CTG CT-3'; GAPDH 引物, 上游序列 5'-GGG TGT GAA CCA CGA GAA AT-3', 下游序列 5'-ATG TAG GCC ATG AGG TCC AC-3'。PCR 反应条件: 94℃ 变性 4 min → 94℃ 变性 1 min → 57℃ 退火 1 min → 72℃ 延伸 1 min → 30 个循环 → 72℃ 最终延伸 5 min; PCR 反应产物取 10 μl 加入溴酚蓝溶液 2 μl, 在 1.5 g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 并在 Flour-S 图像分析系统分析实验结果。

1.6 统计学处理 实验分析至少在 2 个不同场合重复 3 次。实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用方差分析, 各实验组与 DMSO 对照组比较采用 Dunnett-t 检验, 所有统计学数据均用 SPSS 10.0 软件处理。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 曲格列酮对 GH3 细胞增殖的影响 在曲格列酮作用 24、48、72、96、120 h 后, MTT 实验显示: 药物作用 72 h 以后, 10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L 的曲格列酮均能显著抑制 GH3 细胞生长, 并呈剂量和时间依赖性, 与空白和 DMSO 对照组的比较差异有统计学意义 (P < 0.05, 图 1)。

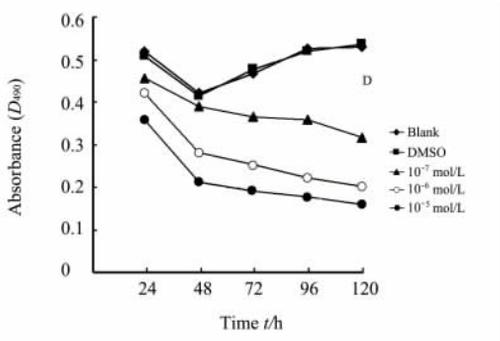


图 1 曲格列酮对 GH3 细胞增殖的抑制作用
Fig 1 Anti-proliferative effects of troglitazone on rat pituitary adenoma cell line GH3

2.2 曲格列酮对 GH3 细胞周期的影响 流式细胞术分析显示: 药物作用 72 h 以后, 与空白对照组和 DMSO 对照组比较, 10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L 的曲格列酮能明显导致 GH3 细胞阻滞于 G₁ 期, 并且阻止细胞进入 S 期 (P < 0.05, 图 2)。

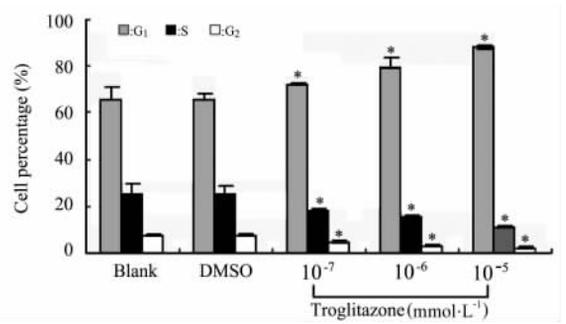


图 2 曲格列酮干预后 72 h 各组 GH3 细胞的细胞周期分布
Fig 2 Cell-cycle of GH3 cell line after treated with troglitazone for 72 hours
* P < 0.05 vs blank group; n = 5, $\bar{x} \pm s$

2.3 曲格列酮对 GH3 细胞 *CyclinD1* 基因转录的影响 利用 GAPDH 作为内参照, 计算各组 *CyclinD1* 的表达指数, 药物干预后 72 h 各组之间比较发现, 与空白对照组 (63.74 ± 3.62) 和 DMSO 对照组 (63.68 ± 3.19) 相比, 10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L 的曲格列酮能显著抑制 *CyclinD1* mRNA 的表达 (图 3), 且差异有统计学意义 (43.28 ± 2.89, 34.68 ± 3.06, 8.32 ± 2.17, P < 0.05)。

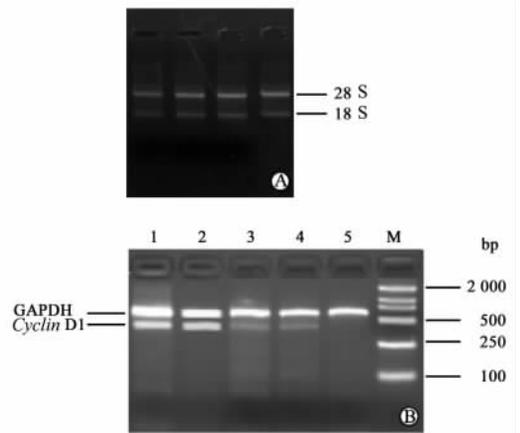


图 3 曲格列酮干预后 72 h 各组细胞 *CyclinD1* mRNA 的表达
Fig 3 Effects of troglitazone on *CyclinD1* gene expression in each group

A: The integrity of RNA was tested. B: After treated for 72 hours. M: DL-2000 ladder; 1: Blank group; 2: DMSO group; 3: 10⁻⁷ mol/L troglitazone group; 4: 10⁻⁶ mol/L troglitazone group; 5: 10⁻⁵ mol/L troglitazone group

3 讨论

大约 80% 的无功能性腺瘤和 GH 腺瘤, 25% 的 PRL 腺瘤在临床上都是巨大腺瘤, 它们经常侵袭海绵窦和压迫视交叉^[1]。到目前为止对于无功能性腺瘤尚无有效治疗药物。大约 10% ~ 25% 的患者对

多巴胺激动剂溴隐亭治疗无效^[3]。约 5%~10% 的患者不能忍受溴隐亭治疗的副作用,包括眩晕、恶心、心律失常、胃肠道反应和体位性低血压等。一部分 GH 腺瘤对生长抑素类似物治疗亦无效,而对于此类患者,目前尚没有安全有效的治疗药物。对于垂体巨大腺瘤,尤其是侵袭海绵窦的垂体腺瘤,外科手术难以做到全切除^[1]。因此,开发新的药物治疗垂体腺瘤,尤其是治疗那些常规治疗无效的难治性垂体腺瘤势在必行。

Heaney 研究^[7]发现,在人的各亚型垂体腺瘤组织中,包括 PRL 腺瘤、GH 腺瘤、LH 腺瘤、ACTH 腺瘤以及无功能性腺瘤中,PPAR- γ 均异常高表达,而 PPAR- γ 在正常垂体组织中低表达;进一步研究发现,PPAR- γ 与其高亲和力的配体结合后可以抑制体外培养的这些垂体腺瘤细胞增殖,并且能在体内抑制腺瘤生长。我们的实验也显示了 PPAR- γ 配体曲格列酮能抑制 GH3 垂体腺瘤细胞生长,导致细胞在 G₁ 期阻滞,并且诱导细胞死亡,这种作用呈明显的剂量和时间依赖性。本研究结果显示,体外能有效抑制垂体腺瘤增殖的曲格列酮浓度为 10⁻⁷~10⁻⁵ mol/L,该浓度范围与之前研究显示的能有效抑制胰腺癌^[9]、膀胱癌^[10] 的浓度类似,但是该浓度高于曲格列酮调节胰岛素作用的浓度^[11]。

本研究结果显示,曲格列酮导致垂体腺瘤 GH3 细胞周期阻滞和诱导细胞死亡,可能与其降低 *CyclinD1* mRNA 的表达有关。*CyclinD1* 是细胞周期启动因子,作用于 G₁/S 期的转换过程,促使细胞从 G₁ 期进入 S 期。*CyclinD1* 减少,G₁/S 期转换受阻,细胞被阻滞于 G₁ 期,G₁ 期延长意味着细胞增殖周期延长、增殖缓慢。本实验结果还提示,较高剂量的曲格列酮有望能成为垂体腺瘤,尤其是常规治疗无效的难治性垂体腺瘤的治疗药物。噻唑烷二酮类药物是一类口服的抗糖尿病药物,临床研究显示噻唑烷二酮类药物单药或联合用药治疗 2 型糖尿病患者是安全、有效的^[12]。但是该类物质是否能通过血脑屏障,达到抑制肿瘤增殖所需的药物浓度,尚需要进行体内实验进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Ciric I S,Zhao J. Transsphenoidal microsurgery: past,present and future[J]. Expert Rev Anticancer Ther,2006,6(Suppl 9): S75-S78.
- [2] Thomas C W. Stereotactic radiosurgery for pituitary adenoma [J]. Neurosurg Focus,2003,14:1-12.
- [3] James K L,William T C. Contemporary management of prolactinomas[J]. Neurosurg Focus,2004,16:7-17.
- [4] Nobel F R. The long-term treatment with the dopamine agonist quinagolide of patients with clinical nonfunctioning pituitary adenoma[J]. Eur J Endocrinol,2000,143:615-621.
- [5] Chang T H,Szabo E. Induction of differentiation and apoptosis by ligands of peroxisome proliferators-activated receptor gamma in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Res, 2000, 60: 1129-1138.
- [6] Sato H, Ishihara S, Kawashima K, Moriyama N, Suetsugu H, Kazumori H, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma in gastric cancer and inhibitory effects of PPAR gamma agonists [J]. Br J Cancer, 2000, 83: 1394-1400.
- [7] Heaney A P. Novel pituitary ligands: peroxisome proliferator activating receptor-gamma [J]. Pituitary, 2003, 6: 153-159.
- [8] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA-isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162: 156-159.
- [9] Sawai H, Liu J, Reber H A, Hines O J, Eibl G. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma decreases pancreatic cancer cell invasion through modulation of the plasminogen activator system [J]. Mol Cancer Res, 2006, 4: 159-167.
- [10] Lodillinsky C, Umerez M S, Jasnin M A, Casabé A, Sandes E, Eiján A M. Bacillus Calmette-Guérin induces the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bladder cancer cells [J]. Int J Mol Med, 2006, 17: 269-273.
- [11] Nolan J J, Ludvik B, Beerdsen P, Joyce M, Olefsky J. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone [J]. N Engl Med, 1994, 331: 1188-1193.
- [12] Hull S S, Sheridan B, Atkinson A B. Pre-operative medical therapy with rosiglitazone in two patients with newly diagnosed pituitary-dependent Cushing's syndrome [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2005, 62: 259-261.

[本文编辑] 邓晓群