

DOI:10. 3724/SP. J. 1008. 2008. 00011

• 专题报道 •

曲格列酮体外对肝癌细胞 HepG2 生长及 β -catenin 信号通路的影响

周彦明^{1,2}, 温莹浩², 康晓燕², 钱海华², 李殿启², 杨甲梅², 李 滨¹, 殷正丰^{2*}

1. 福建医科大学附属厦门第一医院肝胆胰血管外科, 厦门 361003
2. 第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室, 上海 200438

[摘要] **目的:**观察过氧化物酶体增长因子活化受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) γ 激动剂——曲格列酮体外对肝癌细胞生长及 β -catenin 信号通路的影响, 初步探讨其可能的抗肝癌机制。 **方法:**体外培养肝癌细胞 HepG2, 以 MTT 法测定不同浓度曲格列酮(5、10、20、40、80、100 $\mu\text{mol/L}$)作用 120 h 后细胞存活率, 并与正常培养细胞(对照组)作比较; 应用流式细胞仪分析曲格列酮(10 $\mu\text{mol/L}$)处理组及对照组 HepG2 细胞周期; 免疫细胞化学法观察曲格列酮(10 $\mu\text{mol/L}$)处理组及对照组 HepG2 细胞 β -catenin 的亚细胞定位; Western 印迹法检测各自 cyclin D1 和 c-myc 蛋白的表达。 **结果:**5、10、20、40、80、100 $\mu\text{mol/L}$ 曲格列酮作用 120 h 后, HepG2 细胞存活率分别为 $(96.8 \pm 1.2)\%$ 、 $(53.4 \pm 1.2)\%$ 、 $(42.3 \pm 1.2)\%$ 、 $(31.4 \pm 1.0)\%$ 、 $(13.6 \pm 0.8)\%$ 和 $(9.6 \pm 0.7)\%$, 组间有统计学差异($P < 0.05$)。与对照组相比, 10 $\mu\text{mol/L}$ 曲格列酮处理组细胞 G_0/G_1 期细胞比例增加 $[(67.6 \pm 0.5)\% \text{ vs } (56.3 \pm 1.5)\%, P < 0.01]$, 而 S 期细胞比例减少 $[(20.6 \pm 0.5)\% \text{ vs } (25 \pm 1.0)\%, P < 0.01]$ 。对照组细胞 β -catenin 亚细胞定位于细胞核, 而曲格列酮处理组定位于细胞质; Western 印迹结果表明曲格列酮处理组细胞 c-myc 和 cyclin D1 蛋白表达低于对照组。 **结论:**曲格列酮体外能抑制肝癌细胞生长, 且随着浓度的增加, 其抑制作用逐渐增强; 其抑制作用可能与调控 β -catenin 信号通路, 调节相关靶蛋白表达有关。

[关键词] 过氧化物酶体增长因子活化受体; 曲格列酮; 肝肿瘤; β -catenin

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)01-0011-04

Influence of troglitazone on proliferation of human liver cancer cell line HepG2 *in vitro* and on β -catenin signaling pathway

ZHOU Yan-ming^{1,2}, WEN Ying-hao², KANG Xiao-yan², QIAN Hai-hua², LI Dian-qi², YANG Jia-mei², LI Bin¹, YIN Zheng-feng^{2*}
1. Department of Hepato-Biliary-Pancreato-Vascular Surgery, The First Hospital of Xiamen, Fujian Medical University, Xiamen 361003, China
2. Laboratory of molecular oncology research, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the influence of troglitazone, a potent peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma agonist, on proliferation and β -catenin signaling pathway of human liver cancer cell line HepG2 *in vitro*, and to discuss its possible anti-cancer mechanism. **Methods:** HepG2 cells were cultured *in vitro* and the cell growth was assessed by MTT assay after exposure to different concentrations of troglitazone (5, 10, 20, 40, 80 and 100 $\mu\text{mol/L}$) for 120 h, and the results were compared with that of the control cells (cultured normally). Flow cytometry was used to assess cell cycle of HepG2 cells treated with troglitazone at 10 $\mu\text{mol/L}$ and of normal control cells. The subcellular location of β -catenin was investigated by immunocytochemistry in troglitazone(10 $\mu\text{mol/L}$)-treated and control cells. Expression of cyclin D1 and c-myc proteins was examined by Western blotting assay. **Results:** MTT assay demonstrated that, after treatment with 5, 10, 20, 40, 80 and 100 $\mu\text{mol/L}$ of troglitazone, the cell survival rates were $(96.8 \pm 1.2)\%$, $(53.4 \pm 1.2)\%$, $(42.3 \pm 1.2)\%$, $(31.4 \pm 1.0)\%$, $(13.6 \pm 0.8)\%$ and $(9.6 \pm 0.7)\%$, respectively. Compared with control cells, cells treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ troglitazone showed an increased proportion of cells at the G_0/G_1 phase $[(67.6 \pm 0.5)\% \text{ vs } (56.3 \pm 1.5)\%, P < 0.01]$ and decreased proportion of cells at the S phase $[(20.6 \pm 0.5)\% \text{ vs } (25 \pm 1.0)\%, P < 0.01]$. β -catenin was located in the nucleus of the control cells and in the cytoplasm of the troglitazone-treated cells. Western blotting analysis showed that the expression of c-myc and cyclin D1 proteins in

troglistazone-treated cells was lower than that in the control cells. **Conclusion:** Troglitazone can inhibit the proliferation of HepG2 cells in a dose-dependent manner, which may be associated with regulation of the β -catenin signaling pathway and inhibition of target protein expression.

[KEY WORDS] peroxisome proliferator-activated receptor; troglitazone; liver neoplasms; β -catenin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(1): 11-14]

过氧化物酶体增长因子活化受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)属于核激素受体超家族,目前已鉴别出3种PPAR亚型(PPAR α 、PPAR γ 和PPAR δ),其中对PPAR γ 的研究最为广泛^[1]。PPAR γ 被激动剂激活后可与维甲酸X受体(RXR)形成异二聚体PPAR γ /RXR,后者作为转录调节因子与过氧化物酶体增长因子反应元件相互作用,调节目的基因的表达,参与调节脂质代谢与糖代谢、脂肪细胞分化和能量平衡、炎症反应、动脉粥样硬化及肿瘤细胞的分化与凋亡等生理和病理过程^[2]。国内外研究^[3-6]证实,绝大多数人类肿瘤表达PPAR γ ,PPAR γ 激动剂具有显著的抗肿瘤作用,但其确切的分子机制尚未完全阐明。Date等^[7]研究发现肝癌细胞株HepG2可内源性表达PPAR γ 。因此,本研究以HepG2细胞株为研究对象,观察PPAR γ 激动剂——曲格列酮对体外培养的肝癌细胞株HepG2生长的影响,并探讨其可能的作用机制,为临床上进一步应用此类药物治疗肝癌奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 曲格列酮(美国Caymen公司产品,购自晶美生物工程有限公司)溶于二甲基亚砜(DMSO),DMSO最终体积分数 $<0.1\%$, -20°C 保存;噻唑蓝试剂(MTT, Sigma公司产品),胎牛血清为Gibco公司产品;S-P免疫化学超敏试剂盒(KIT-9710, Zymed公司),抗 β -catenin抗体(clone CAT-5H10)、抗c-myc抗体(clone 9E/11)和抗cyclin D1抗体(clone DCS/6)购于美国NeoMarkers公司。小鼠抗人 β -actin抗体为美国Santa Cruz公司产品。

1.2 细胞培养 人肝癌HepG2细胞(本实验室保存)置于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,于 37°C 、 CO_2 体积分数5%培养箱中培养。

1.3 MTT法观察HepG2细胞生长 培养细胞至对数生长期,接种96孔板,细胞密度 2×10^4 /孔,培养24 h细胞贴壁后,分为对照组及不同浓度曲格列酮(5、10、20、40、80、100 $\mu\text{mol/L}$)处理组。培养

120 h后加入10 μl MTT试剂(5 mg/ml)于 37°C 继续孵育,4 h后终止培养。每孔加DMSO 75 μl ,震荡10 min,使结晶物充分溶解,酶标仪560 nm波长下测定光密度值(D_{560}),计算细胞存活率。细胞存活率($\%$)=(试验孔 D_{560} 值/对照孔 D_{560} 值) $\times 100\%$,实验重复2次,每浓度均设6孔。

1.4 流式细胞仪测定HepG2细胞周期 将HepG2细胞接种于6孔板长至40%融合,分为对照组、曲格列酮(10 $\mu\text{mol/L}$)处理组。对照组常规培养;曲格列酮(10 $\mu\text{mol/L}$)处理组加入10 $\mu\text{mol/L}$ 曲格列酮,继续培养120 h后收集细胞,离心5 min,弃去培养液,与PI染液混匀后用流式细胞仪对DNA进行定量分析,以Cell Quest software (Becton Dickinson and Beckman-Coulter, San Jose, CA, USA)计算各期细胞所占比例。实验重复3次。

1.5 免疫细胞化学染色检测HepG2细胞 β -catenin亚细胞定位 准备6孔板,将玻片放于孔内。将HepG2细胞接种于6孔板长至40%融合,分为对照组和曲格列酮(10 $\mu\text{mol/L}$)处理组,对照组常规培养,曲格列酮处理组加入10 $\mu\text{mol/L}$ 曲格列酮,继续培养120 h后取出玻片,预冷0.01 mol/L PBS浸洗2次,之后置于10%中性甲醛固定30 min。80%、95%、99%乙醇梯度脱水各10 min。行S-P法免疫细胞化学染色。

1.6 Western印迹法检测HepG2细胞c-myc和cyclin D1蛋白的表达 HepG2细胞接种于6孔板长至40%融合,分为对照组、曲格列酮(10 $\mu\text{mol/L}$)处理组,对照组常规培养,曲格列酮处理组加入10 $\mu\text{mol/L}$ 曲格列酮,继续培养120 h后提取蛋白,BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,取50 μg 样品上样行SDS-PAGE,将一抗用TBST稀释至适当比例(cyclin D1, 1:500; c-myc, 1:500),ECL显色。

1.7 统计学处理 应用SPSS 11.0软件进行统计处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验进行比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度曲格列酮对HepG2细胞生长的影响

MTT 检测结果显示:不同浓度(5、10、20、40、80、100 $\mu\text{mol/L}$)曲格列酮作用 HepG2 细胞 120 h 后,细胞存活率分别为 $(96.8\pm1.2)\%$ 、 $(53.4\pm1.2)\%$ 、 $(42.3\pm1.2)\%$ 、 $(31.4\pm1.0)\%$ 、 $(13.6\pm0.8)\%$ 和 $(9.6\pm0.7)\%$,组间有统计学差异($P<0.05$)。半数效量(EC_{50})浓度为 13.4 $\mu\text{mol/L}$ 。与对照组相比,10、20、40、80、100 $\mu\text{mol/L}$ 曲格列酮作用组细胞存活率明显降低,差异有统计学意义($P<0.001$)。结果表明曲格列酮体外以剂量依赖性方式抑制 HepG2 细胞生长。

2.2 曲格列酮对 HepG2 细胞周期的影响 与对照组相比,10 $\mu\text{mol/L}$ 曲格列酮处理 HepG2 细胞 120 h 后, G_0/G_1 期细胞比例增加 $[(67.6\pm0.5)\% \text{ vs } (56.3\pm1.5)\%, t=12.02, P<0.01]$,而 S 期细胞比例减少 $[(20.6\pm0.5)\% \text{ vs } (25\pm1.0)\%, t=6.5, P<0.01]$ 。这表明曲格列酮干预后,产生了 G_0/G_1 期阻滞作用,使 HepG2 细胞生长减慢。

2.3 曲格列酮对 HepG2 细胞 β -catenin 亚细胞定位的影响 对照组 β -catenin 亚细胞定位于细胞核(图 1A);10 $\mu\text{mol/L}$ 曲格列酮处理 120 h 后, β -catenin 亚细胞定位于细胞质(图 1B)。这提示曲格列酮能诱导 HepG2 细胞 β -catenin 移位。

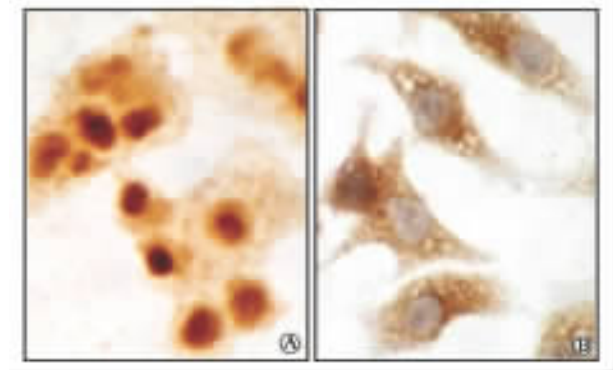


图 1 对照组及曲格列酮处理组
HepG2 细胞的 β -catenin 亚细胞定位
Fig 1 Subcellular location of β -catenin in
HepG2 cells in control and
troglitazone-treated groups

A: β -catenin was present predominantly in the nucleus of the untreated cells; B: After exposing HepG2 cells to 10 $\mu\text{mol/L}$ of troglitazone for 120 h, β -catenin completely translocated from the nucleus into the cytoplasm. Original magnification: $\times 400$

2.4 曲格列酮对 HepG2 细胞 c-myc 和 cyclin D1 蛋白表达的影响 Western 印迹检测显示,与对照组相比,10 $\mu\text{mol/L}$ 曲格列酮处理 HepG2 细胞 120 h

后,c-myc 和 cyclin D1 蛋白明显下降(图 2)。这说明曲格列酮处理能抑制 HepG2 细胞 c-myc 和 cyclin D1 蛋白表达。

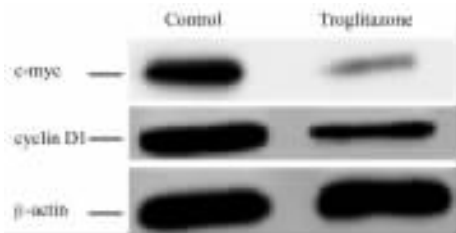


图 2 对照组及曲格列酮处理组 HepG2 细胞
c-myc 和 cyclin D1 蛋白的表达
Fig 2 Expression of c-myc and cyclin D1 of HepG2
cell in control and troglitazone-treated groups

3 讨论

β -catenin 是一种多功能胞质蛋白,既是上皮钙黏附素复合体的重要组分,又是 Wnt 信号转导通路中的关键调节因子。研究证实 β -catenin 基因在许多人类肿瘤,如膀胱癌^[8]、结直肠癌^[9]以及肝癌中发生了突变。这些基因突变会导致 β -catenin 的异常积累并激发 Wnt 信号通路靶基因的活化,诱导肿瘤的产生。Cui 等^[10]研究发现,44.1% 的人肝细胞癌存在 β -catenin 基因外显子 3 突变。 β -catenin 基因外显子 3 编码 β -catenin 蛋白 NH2 末端,此区含有多个与糖原合成酶激酶 3 结合的磷酸化位点。其突变会导致 β -catenin 蛋白不能与糖原合成酶激酶 3 结合而免于降解,引起胞质中 β -catenin 积聚,游离的 β -catenin 进入核内作用于相应的靶基因,激活相关蛋白的表达,包括与细胞增殖、凋亡、分化功能密切相关的 c-myc、cyclin D1、MMP-7、CD44 等蛋白^[11],最终诱导肿瘤的发生。

细胞周期机制的破坏是肿瘤发生发展的关键环节之一。细胞周期存在 G_1/S 期转换及 G_2/M 期转换两个关卡点,其中以 G_1/S 转换点最为重要。因为细胞一旦从 G_1 期跨入 S 期,则可以不再依赖外界信息刺激而很快自动完成分裂过程。细胞周期蛋白 cyclin D1 是调控这一转换点最关键的蛋白之一,主要通过结合并激活细胞周期相关激酶 CDK4 或 CDK6,促使细胞由 G_1 期进入 S 期。当 cyclin D1 过度表达时, G_1/S 期进程加速,造成细胞增殖失控而导致肿瘤的发生。国内外研究^[12-13]发现,30% 的肝细胞癌存在 *cyclin D1* 基因扩增,而蛋白过表达则高

达58%~70%,其表达水平与肿瘤的恶性进展密切相关。核蛋白 *c-myc* 具有促使细胞无限增殖、获得永生化功能并促进细胞分裂的作用,*c-myc* 基因主要通过扩增、染色体易位、重排、点突变、启动子插入等方式激活,与人类多种肿瘤的发生、发展和演变转归有重要关系^[14]。Wang 等^[15]研究证实,肝癌中*c-myc* 基因主要通过扩增激活,且多见于转移和复发患者,与患者预后密切相关。

本研究结果发现,随着剂量的增加,曲格列酮抑制 HepG2 细胞生长的效应随之增强,提示曲格列酮以剂量依赖性方式抑制肝癌细胞生长。后续实验中,我们选择接近 EC_{50} 剂量的 $10\ \mu\text{mol/L}$ 曲格列酮作用于 HepG2 细胞 120 h,发现 G_0/G_1 期细胞的比例显著增高,而 S 期细胞减少。这表明用曲格列酮干预后,产生了 G_0/G_1 期阻滞作用,使 HepG2 细胞生长减慢。 $10\ \mu\text{mol/L}$ 曲格列酮处理 HepG2 细胞 120 h 后, β -catenin 亚细胞定位由细胞核转入细胞质;同时, β -catenin 靶基因产物 cyclin D1 和 *c-myc* 蛋白表达水平相应明显下降。这些结果提示曲格列酮可能通过诱导 β -catenin 移位,进而影响 cyclin D1 和 *c-myc* 蛋白的表达而发挥其抑制肿瘤细胞生长作用;当然,也有可能是通过直接抑制 cyclin D1 和 *c-myc* 蛋白的表达而发挥作用,具体机制尚需进一步的研究证实。

综上所述,PPAR γ 激动剂具有抑制肝癌细胞体外生长的作用,其机制可能与调控 β -catenin 信号通路有关,是一类潜在的抗肝癌药物,值得进一步研究以应用于临床。

[参考文献]

- [1] Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, Devchand P, Francis S, Kadakia M, et al. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation[J]? J Intern Med, 2007, 262: 184-198.
- [2] Thompson E A. PPAR gamma physiology and pathology in gastrointestinal epithelial cells[J]. Mol Cells, 2007, 24: 167-176.
- [3] Zhang Y Q, Tang X Q, Sun L, Dong L, Qin Y, Liu H Q, et al. Rosiglitazone enhances fluorouracil-induced apoptosis of HT-29 cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor

gamma[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13: 1534-1540.

- [4] Coras R, Hölsken A, Seufert S, Hauke J, Eyüpoglu I Y, Reichel M, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist troglitazone inhibits transforming growth factor-beta-mediated glioma cell migration and brain invasion[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6: 1745-1754.
- [5] Shigeto T, Yokoyama Y, Xin B, Mizunuma H. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands inhibit the growth of human ovarian cancer[J]. Oncol Rep, 2007, 18: 833-840.
- [6] 周彦明,殷正丰,杨甲梅. PPAR γ 激动剂抗肿瘤作用的研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26: 1290-1292.
- [7] Date M, Fukuchi K, Morita S, Takahashi H, Ohura K. 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J2, a ligand for peroxisome proliferators-activated receptor-gamma, induces apoptosis in human hepatoma cells[J]. Liver Int, 2003, 23: 460-466.
- [8] Shiina H, Igawa M, Shigeno K, Terashima M, Deguchi M, Yamanaka M, et al. Beta-catenin mutations correlate with over expression of *C-myc* and *cyclin D1* genes in bladder cancer[J]. J Urol, 2002, 168: 2220-2226.
- [9] Yamada Y, Oyama T, Hirose Y, Hara A, Sugie S, Yoshida K, et al. beta-Catenin mutation is selected during malignant transformation in colon carcinogenesis[J]. Carcinogenesis, 2003, 24: 91-97.
- [10] Cui J, Zhou X, Liu Y, Tang Z, Romeih M. Wnt signaling in hepatocellular carcinoma: analysis of mutation and expression of beta-catenin, T-cell factor-4 and glycogen synthase kinase 3-beta genes[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003, 18: 280-287.
- [11] Doucas H, Garcea G, Neal C P, Manson M M, Berry D P. Changes in the Wnt signalling pathway in gastrointestinal cancers and their prognostic significance[J]. Eur J Cancer, 2005, 41: 365-379.
- [12] 胥健敏,文剑明,张萌,吕国丽,吴立志,汪维生. 肝细胞癌细胞周期蛋白 D1 基因的扩增和表达[J]. 中华病理学杂志, 2004, 33: 26-30.
- [13] Joo M, Kang Y K, Kim M R, Lee H K, Jang J J. Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma[J]. Liver, 2001, 21: 89-95.
- [14] Knoepfler P S. Myc goes global: new tricks for an old oncogene[J]. Cancer Res, 2007, 67: 5061-5063.
- [15] Wang Y, Wu M C, Sham J S, Zhang W, Wu W Q, Guan X Y. Prognostic significance of *c-myc* and *AIB1* amplification in hepatocellular carcinoma. A broad survey using high-throughput tissue microarray[J]. Cancer, 2002, 95: 2346-2352.

[本文编辑] 贾泽军