

PPAR- γ 抑制剂 T0070907 对人鼻咽癌细胞的生长抑制作用

孙月丽¹, 吴明玮², 曾昭蕾², 孙健², 蔡于琛², 冼励坚², 赵擎宇^{1*}

(华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心 1. 重症监护室; 2. 实验研究部, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】探讨 PPAR- γ 选择性抑制剂 T0070907 影响鼻咽癌(NPC)细胞体外生长的作用机制。【方法】通过 RT-PCR 和 Western blotting 检测 PPAR- γ 受体在 5 株 NPC 细胞株(CNE1、CNE2、HONE1、SUNE1 和 5-8F)中 mRNA 和蛋白水平的表达;MTT 法检测 T0070907 对 NPC 细胞生长情况的影响;流式细胞术和 Western blotting 检测 T0070907 对 NPC 细胞的细胞周期和细胞周期相关蛋白表达的影响。【结果】PPAR- γ 在 5 株 NPC 细胞中均有表达;T0070907 对 NPC 细胞株有明显生长抑制作用,并呈浓度、时间依赖性;T0070907 作用于 NPC 细胞 CNE1 和 CNE2 后,G2/M 期细胞比例则逐渐增加,且随着处理浓度的增加而增加,各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。此外,随着 T0070907 处理浓度的增加,NPC 细胞的细胞周期相关蛋白 Cyclin A、Cyclin B1、Cdc2、Cdk2 蛋白的表达逐渐下降,无活性的 pCdc2 蛋白表达则逐渐增强。【结论】PPAR- γ 抑制剂 T0070907 能够抑制 NPC 细胞 PPAR- γ 的蛋白表达,并通过对细胞周期相关蛋白 Cyclin A、Cyclin B1、Cdc2、Cdk2、pCdc2 等蛋白的调控导致细胞周期 G2/M 期阻滞,从而抑制 NPC 细胞的生长。

关键词: PPAR- γ ; 鼻咽癌; T0070907; 细胞周期; G2/M 期

中图分类号: R739.91 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)03-0343-07

Growth Inhibition of a Selective PPAR- γ Inhibitor, T0070907, in Nasopharyngeal Carcinoma Cells

SUN Yue-li¹, WU Ming-wei², ZENG Zhao-lei², SUN Jian², CAI Yu-chen², XIAN Li-jian², ZHAO Qing-yu^{1*}

(1. Intensive Care Unit; 2. Department of Experiment and Research, State Key Laboratory of Oncology in South China// Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】 PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) antagonists have been documented to induce cancer cell proliferation inhibition and apoptosis. In the present study PPAR- γ 's effect on cell growth of NPC cell lines and the possible mechanism was investigated via its selective inhibitor T0070907. 【Methods】 PPAR- γ mRNA and protein expression in five human NPC cell lines (CNE1, CNE2, HONE1, SUNE1, and 5-8F) was detected with RT-PCR and Western blotting analysis. NPC cells growth inhibition by T0070907 was measured by MTT assay, and cell cycle arrest of NPC cells treated with T0070907 was assayed by fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis. Cell cycle-associated protein expression was detected by Western blotting. 【Results】 PPAR- γ was expressed both at mRNA and protein levels in five NPC cell lines. NPC cells' proliferation was significantly inhibited by T0070907, and the growth inhibition was dose- and time-dependent. CNE1 and CNE2 cells treated for 48 h with T0070907 markedly accumulated dose-dependently in the phase of G2/M, while they differed significantly ($P < 0.05$) in the phase as well. T0070907 suppressed expression of cell cycle-related proteins including Cyclin A, Cyclin B1, Cdc2, and Cdk2 but increased pCdc2 expression. 【Conclusion】 PPAR- γ inhibitor T0070907 could induce proliferation inhibition of NPC cells to the phase of G2/M, and this cell cycle arrest might result probably from regulation of Cyclin A, Cyclin B1, Cdc2, Cdk2, and pCdc2.

Key words: PPAR- γ ; nasopharyngeal carcinoma; T0070907; cell cycle; G2/M arrest

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(3): 343-349]

收稿日期: 2009-11-03

基金项目: 广东省自然科学基金(031726)

作者简介: 孙月丽, 硕士研究生, 主要从事肿瘤学专业研究, E-mail: sy10107@163.com; * 通讯作者: 赵擎宇, 副教授, 主要从事肿瘤患者危重病医学, E-mail: zhao_qingyu@163.com

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ) 属于细胞核受体超家族成员, PPAR- γ 与激活配体结合才能被活化, 激活后与维甲类 X 受体 (RXR) 结合形成异二聚体, 该异二聚体与靶基因启动子的应答元件 (peroxisome proliferator response elements, PPREs) 结合, 同时招募共刺激因子调节靶基因的转录^[1], 由此在脂肪形成、糖脂代谢及炎症反应等生物学效应中发挥重要作用^[2]。近年来, PPAR- γ 与肿瘤的关系成为研究热点。业已证实 PPAR- γ 在多种恶性肿瘤组织中均有表达, 如肺癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌及乳腺癌等^[3]。许多研究表明, 通过抑制 PPAR- γ 的表达能够抑制诸如肝癌、食管癌等肿瘤细胞的生长, 诱导细胞凋亡、引起细胞周期阻滞、降低肿瘤细胞粘附及转移能力^[4-7], 提示 PPAR- γ 可以作为治疗肿瘤的分子靶点之一, 但其在我国广东地区高发的鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 中的研究仍未有报道。NPC 是我国常见的头颈部肿瘤, 95% 以上为低分化鳞癌和未分化癌, 恶性程度高, 生长快, 易发生转移, 75% 患者确诊时已属晚期, 单一放疗对于晚期患者疗效欠佳^[8], 目前化疗成为晚期 NPC 治疗的主要手段之一, 但现有化疗疗效不尽人意, 分子靶向药物的发展为 NPC 的治疗带来新的机遇, 为此我们选择 PPAR- γ 抑制剂 T0070907 进行研究, 探讨其作为治疗 NPC 分子靶向药物的可能性。T0070907 是一种新型合成的 PPAR- γ 抑制剂, 化学式为 $C_{12}H_8ClN_3O_3$, 对 PPAR- γ 具有较强的亲和力和较高的选择性, 通过影响 PPAR- γ 配体结合域第 12 螺旋的构象调节 PPAR- γ 和共刺激因子的相互作用而抑制 PPAR- γ 的活化^[9], 且其毒性较小^[10]。

1 材料与方 法

1.1 试剂及仪器

RPMI-1640 培养液由中山大学肿瘤防治中心实验研究部配制, 胎牛血清 (foetal calf serum, FCS) 购自杭州四季青公司; T0070907 为美国 Cayman 公司产品, MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) 为 Sigma 公司产品; Trizol 为美国 Invitrogen 公司产品, RT 一链合成试剂盒及 PCR Mix Perfectshot Taq 为大连宝生物有限公司 (Takara 公司) 产品; 兔抗人 PPAR- γ 、Cdk2、

Cyclin A、pCdc2 多克隆抗体及鼠抗人 Cyclin B1、Cdc2 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品; Thermo Multiskan MK3 酶联免疫检测仪来自 Thermo 公司, FACScaliber 流式细胞仪购自美国 BD 公司, 垂直电泳仪、电转装置及凝胶图像分析仪为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 细胞培养

人 NPC 细胞株 CNE1、CNE2、SUNE1、HONE1 及 5-8F 由中山大学肿瘤防治中心实验研究部提供, 其中 CNE1、CNE2 分别代表高分化和低分化 NPC 细胞株, HONE1 代表 EBV+ 的 NPC 细胞株; SUNE1 代表高转移性 NPC 细胞株; 5-8F 为 SUNE1 的亚株, 具有高转移性, 高成瘤性。所有细胞用含 100 mL/L 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基在 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 条件下培养。细胞呈单层贴壁生长, 细胞倍增时间约是 48 h。所有实验均在细胞对数生长期进行。

1.3 RT-PCR 法检测 PPAR- γ mRNA 的表达

用 Trizol 法分别提取各细胞总 RNA, 紫外分光光度法鉴定其浓度, 取 2 μ g RNA 进行逆转录, 以 GAPDH 基因的表达作为内参照进行 PCR 扩增, 每个样本重复 3 次。实验结果以均数表示。PPAR- γ 基因片段 (474 bp) 引物序列: 上游为 5'-TCTCTCCGTAATGGAAGACC-3', 下游为 5'-GCAT TATGAGACATCCCCAC-3'; GAPDH 基因片段 (322 bp) 引物上游序列为: 5'-CGGGAAGCTTGTCAT CAAT GG-3', 下游为 5'-GGCAGTGATGGCATGGACTG-3'。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。取反应产物 5 μ L, 在溴乙锭染色、1.5% 的琼脂糖凝胶下 130 V 电泳 30 min, 在紫外凝胶成像仪下观察并拍照。

1.4 Western blot 检测 PPAR- γ 蛋白及细胞周期相关蛋白的表达

收集对数生长期细胞, 加入 2 \times SDS 细胞裂解液提取细胞总蛋白, 用紫外分光光度法检测蛋白浓度。调整蛋白浓度, 用 8% 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行分离, 然后转移至硝酸纤维素膜上, 50 mL/L 的脱脂牛奶封闭 2 h, 加入 PPAR- γ 、Cyclin A、Cyclin B1、Cdc2、Cdk2、pCdc2 及 GAPDH 一抗 (1:200), 4 $^{\circ}$ C 电动摇床孵育过夜, 用三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水 (tris-

buffered saline tween 20, TBST)洗膜,加入相应二抗,室温下孵育 1 h, TBST 洗膜后用 ECL 试剂盒 (Cell Signal 公司)感光,冲片,扫描后用 Quantity-One 软件进行灰度分析。

1.5 MTT 法检测 PPAR- γ 抑制剂 T0070907 对 NPC 细胞增殖的影响

将细胞以每孔 2500 的密度种植于 96 孔板,实验分为 T0070907 组、阳性对照组和阴性对照组。带 24 h 细胞贴壁后加入药物,阳性对照组加入顺铂 (Cisplatin, DDP),阴性对照组不加任何药物处理。每个浓度设 3 个平行孔,置 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 条件下培养 68 h,然后加入 20 μ L 5 mg/mL MTT,继续培养 4 h,弃培养液,加入 200 μ L DMSO 原液,在微量振荡器上振荡 10 min,待完全显色后,用酶联免疫检测仪于 570 nm 和 630 nm 波长处测每孔的吸光度值(A 值)。Bliss 法计算程序求出半数抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC₅₀)。按下述公式求出增殖抑制率,抑制率 = (对照组 A 均值 - 用药组 A 均值)/对照组 A 均值 \times 100%。所有实验均重复 3 次。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期阻滞情况

将 NPC 细胞以 6×10^4 /mL 接种于 6 孔板,培养 24 h 后加入不含血清的不同浓度的 T0070907,作用 48 h 后收集各细胞,用预冷的 PBS 液洗涤 2 次,70%冰乙醇固定过夜,514 \times g 离心 10 min,弃去乙醇,再次悬浮于 PBS,细胞经碘化丙啶 (PI) 10 μ g/mL 染色 5 min,4 $^{\circ}$ C 避光 30 min 后,在流式细胞仪上检测细胞 DNA 含量,根据 DNA 含量在流式细胞仪中得出每份样品的 G₁、S 和 G₂/M 期细胞分布图以及各时期所占比例。LYSIS 软件 (Becton-Dickinson 公司)进行细胞周期分析。

1.7 统计学分析

用 SPSS 10.0 统计软件处理数据,采用单因素方差分析进行多个样本均数的比较。统计学处理 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PPAR- γ 在 NPC 细胞株中的表达情况

RT-PCR 和 Western blotting 检测结果显示,PPAR- γ 在 NP69、CNE1、CNE2、HONE1、SUNE1、5-8F 细胞中均有表达,各条带灰度与对照组灰度比值统计分析显示,条带间差异有统计学意义($P <$

0.05),且 PPAR- γ 的表达在 NPC 细胞株中明显较正常鼻咽上皮细胞株 NP69 高,低分化细胞株 CNE2 较高分化细胞株 CNE1 高,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。

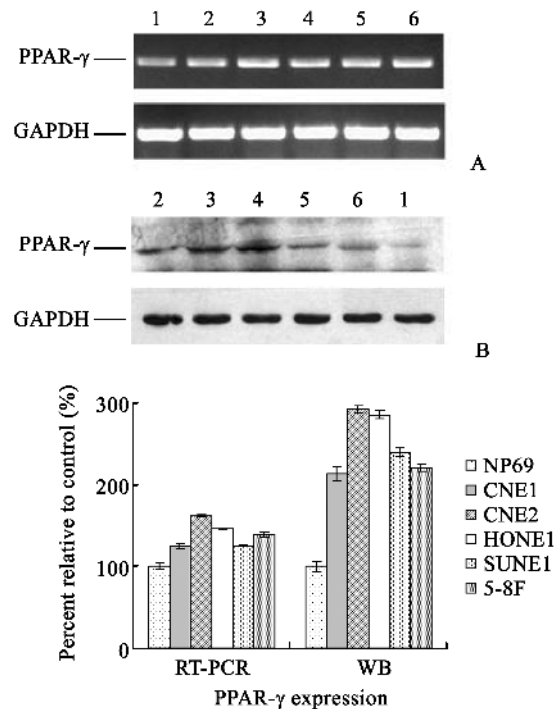


图 1 RT-PCR 和 Western blotting 法检测 PPAR- γ 基因和蛋白在正常鼻咽上皮细胞 (NP69) 和 5 株 NPC 细胞中的表达

Fig.1 PPAR- γ gene and protein expression in human nasopharyngeal epithelial cell line (NP69) and five NPC cell lines measured by RT-PCR (A) and Western blotting (B)

GAPDH was used as an internal control. The relative amount of each protein was calculated based on its GAPDH. Sample results of three different experiments were demonstrated as mean \pm SD. PPAR- γ expression in NP69 was much lower than that in NPC cell lines. PPAR- γ mRNA levels of CNE1 and CNE2 differed significantly as well as their protein expression ($P < 0.05$).

Lane1: NP69; Lane 2: CNE1; Lane 3: CNE2; Lane 4: HONE1; Lane 5: SUNE1; Lane 6: 5-8F.

2.2 T0070907 对 NPC 细胞 PPAR- γ 蛋白表达的影响

CNE1、CNE2 分别为高分化和低分化的 NPC 细胞株,Western blotting 检测结果显示,用不同浓度的 T0070907 (6.25、12.5、25 μ mol/L) 处理后,CNE1、CNE2 细胞中 PPAR- γ 蛋白的表达下降,且随着药物浓度的升高下降越明显。各浓度组之间

的差异有统计学意义 (CNE1 组: $F = 159.58, P < 0.05$; CNE2 组: $F = 178.03, P < 0.05$)。相同 T0070907

浓度的 CNE1、CNE2 细胞间的 PPAR- γ 蛋白的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2)。

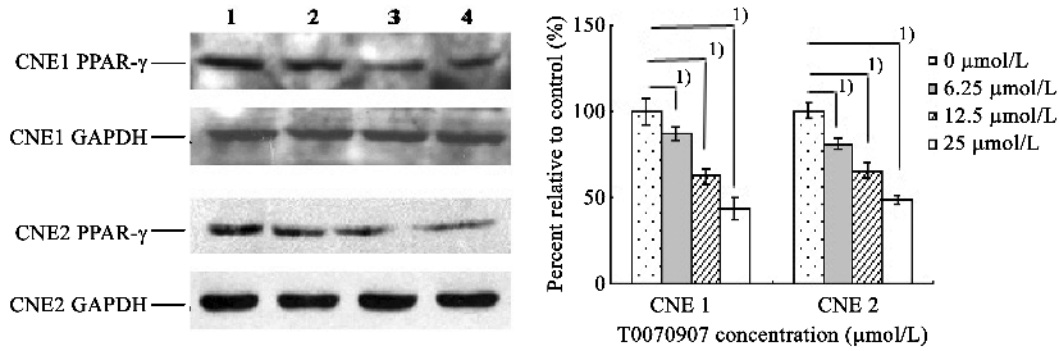


图 2 不同浓度 T0070907 处理 48 h 对 CNE1、CNE2 细胞 PPAR- γ 蛋白表达的影响

Fig.2 PPAR- γ proteins expression of CNE1 and CNE2 cells treated with T0070907 (0, 6.25, 12.5, and 25 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h evaluated by Western blotting, 1) $P < 0.05$

The relative amount of each protein was calculated based on its GAPDH level. Results are expressed as mean \pm SD of three different experiments. There were significant differences between the samples and the control ($P < 0.05$).

Lane 1: control; Lane 2-4: T0070907 at 6.25, 12.5, and 25 $\mu\text{mol/L}$.

2.3 T0070907 对 NPC 细胞增殖的影响

MTT法结果显示, 不同浓度的 T0070907 对 5 种 NPC 细胞均有增殖抑制作用, 且随药物浓度的增加, 抑制作用更趋明显(图 3)。T0070907 对 CNE1、CNE2、HONE1、SUNE1、5-8F 细胞的 IC_{50} 值分别为 12.61 ± 0.48 、 14.40 ± 0.71 、 20.5 ± 0.35 、

$(26.93 \pm 1.03) \mu\text{mol/L}$ 以及 $(19.23 \pm 1.31) \mu\text{mol/L}$, 除 5-8F 和 HONE1 细胞外, 各组间差异均有统计学意义 ($F = 131.2, P < 0.05$)。对 CNE1、CNE2 细胞的增殖抑制情况结果显示, 随着作用时间的延长, 增殖抑制作用越明显。所以, T0070907 的增殖抑制作用呈浓度和时间依赖性(图 4)。

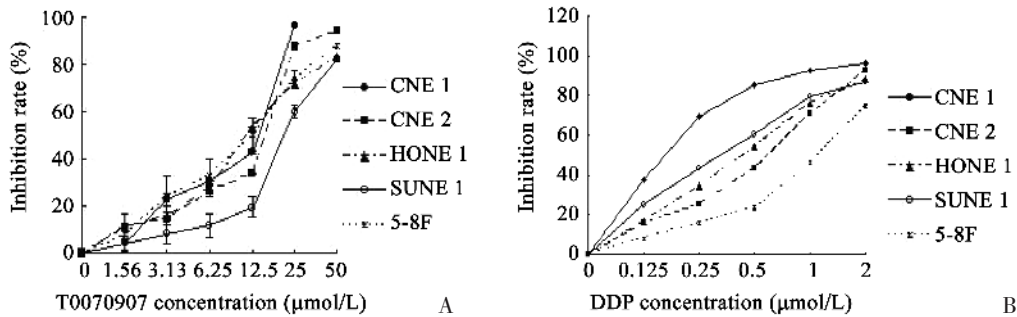


图 3 MTT 法测得 T0070907 和 DDP 对 NPC 细胞的增殖抑制作用

Fig.3 MTT assay indicated proliferation inhibition of NPC cell lines treated with T0070907 and DDP

A: T0070907; B: DDP

2.4 T0070907 对 NPC 细胞周期的影响

T0070907 对 CNE1、CNE2 细胞增殖抑制作用比较明显, 且两种细胞分别为高分化和低分化细胞株, 故检测 T0070907 对这两种细胞周期的影响。结果显示, T0070907 可以使 CNE1、CNE2 细胞 G_2/M 期比例增加, 随着用药浓度的增加, 处于 G_1

期的细胞比例降低, S 期细胞比例变化不大, 而 G_2/M 期的细胞比例明显增加, 各浓度组间差异有统计学意义 (CNE1 组: $F = 110.4, P < 0.05$, CNE2 组: $F = 308.2, P < 0.05$), 而 CNE1、CNE2 相同浓度组 G_2/M 期阻滞的细胞数差异没有统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

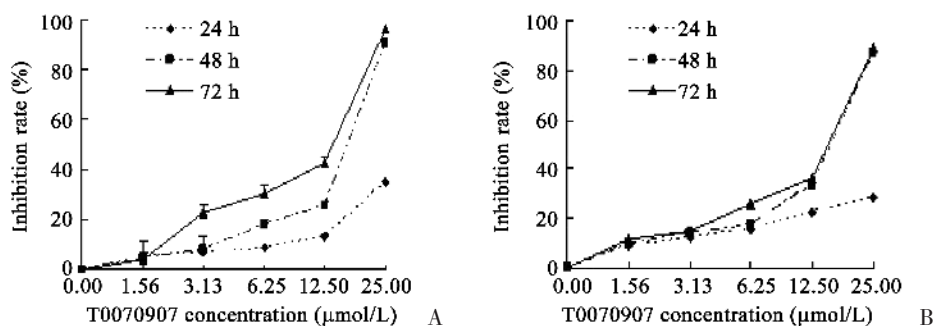


图4 T0070907 处理 24、48 h 及 72 h 后对 CNE1(A)、CNE2(B)细胞的增殖抑制作用

Fig.4 The proliferation inhibition of CNE1(A) and CNE2(B) cells after 24-, 48-, and 72-hour treatment with T0070907 indicated by MTT assay.

表1 T0070907 对 CNE1 和 CNE2 细胞周期分布的影响

Table 1 Distribution of CNE1 and CNE2 cell cycle after T0070907 treatment

Percent (%)	CNE1 ($\mu\text{mol/L}$)			CNE2 ($\mu\text{mol/L}$)		
	0	12.5	25.0	0	12.5	25.0
G2/M ¹⁾	7.5 \pm 0.2	15.1 \pm 2.4	25.7 \pm 1.1	7.6 \pm 0.8	11.8 \pm 1.4	27.6 \pm 0.8
G1	64.5 \pm 3.1	46.6 \pm 3.4	45.4 \pm 0.6	69.0 \pm 4.3	54.7 \pm 4.1	45.1 \pm 3.1
S	28.0 \pm 3.3	38.3 \pm 1.2	27.6 \pm 0.8	23.3 \pm 4.8	35.1 \pm 3.8	27.2 \pm 2.4

1) $P < 0.05$ between groups. Results presented as mean \pm SD.

2.5 T0070907 对 NPC 细胞周期相关蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示, T0070907 (6.25、12.5、25 $\mu\text{mol/L}$) 处理后, 细胞周期相关蛋白 Cyclin A、Cyclin B1、Cdc2、Cdk2 的表达较空白对照组明显下降, 且随着处理药物浓度的增加下降越明显, 磷酸化的 Cdc2 表达则逐渐增强 ($P < 0.05$, 图 5、6)。

3 讨论

3.1 PPAR- γ 在肿瘤中的表达

PPAR- γ 在人类多种肿瘤细胞中均有表达, 并对增殖、分化及凋亡具调节作用^[3-4]。细胞水平的检测结果显示, PPAR- γ 在正常鼻咽上皮细胞和 NPC 细胞中均有表达, 但前者的表达明显低于后

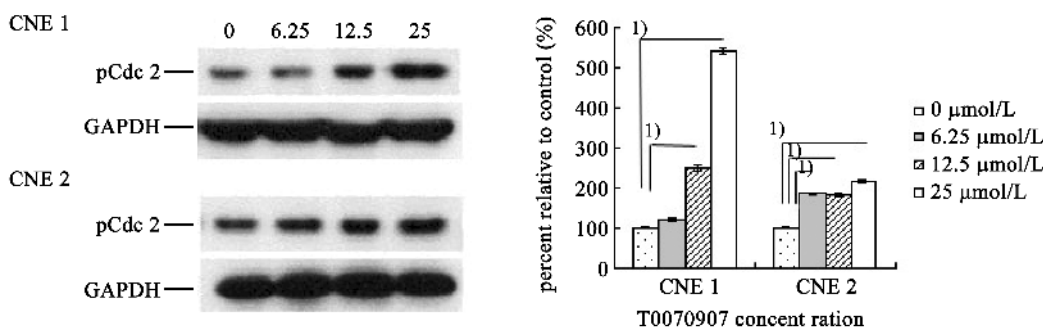


图5 Western blotting 检测 T0070907(0、6.25、12.5、25 $\mu\text{mol/L}$)处理 CNE1、CNE2 细胞 48 h 后对磷酸化的 Cdc2 表达的影响

Fig.5 pCdc2 protein expression of CNE1 and CNE2 cells treated with T0070907(0, 6.25, 12.5, and 25 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h evaluated by Western blotting; 1) $P < 0.05$

The relative amount of each protein was calculated based on its GAPDH level. Results are expressed as mean \pm SD of three different experiments. There were significant differences between the samples and the control ($P < 0.05$) except pCdc2 protein of CNE1 at 6.25 $\mu\text{mol/L}$.

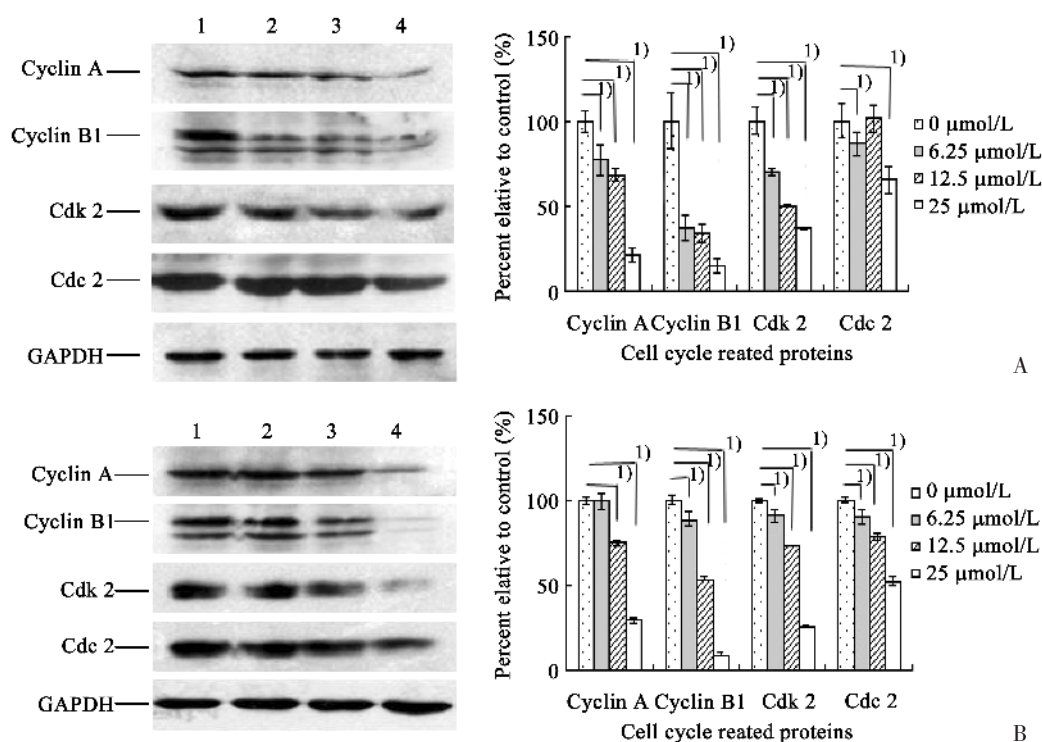


图 6 不同浓度 T0070907 处理 48 h 后对 CNE1(A)、CNE2(B) 细胞周期相关蛋白 Cyclin A、Cyclin B1、Cdc2、Cdk2 表达的影响
Fig.6 Cyclin A, Cyclin B1, Cdc2 and Cdk2 proteins expression of CNE1 (A) and CNE2 (B) cells treated with T0070907(0, 6.25, 12.5, 25 μmol/L) for 48 h evaluated by Western blotting, 1) $P < 0.05$

The relative amount of each protein was calculated based on its GAPDH level. Results are expressed as mean \pm SD of three different experiments. There were significant differences between the samples and the control ($P < 0.05$) except Cdc2 protein of CNE1 at 12.5 μmol/L and Cyclin A of CNE2 at 6.25 μmol/L.

Lane 1: control; Lane 2-4: T0070907 at 6.25, 12.5, and 25 μmol/L.

者, 高分化 NPC 细胞 CNE1 中的表达低于低分化 NPC 细胞 CNE2 中的表达。Zhang 等^[11]研究表明 PPAR- γ 在正常卵巢中无表达, 8 例良性和 10 例边界性肿瘤中仅各有 1 例胞浆中的微弱表达, 而 28 例恶性卵巢肿瘤中有 26 例表达。Sahin 等^[12]应用免疫组织化学方法检测甲状腺滤泡状腺瘤 (FA)、滤泡状腺癌 (FTC) 和 Hurthle 细胞瘤 (HCN) 中 PPAR- γ 的表达情况, 发现 FTC 中的表达较 HCN、FA 中明显增高 (57% vs. 4%、13%), 说明 PPAR- γ 的表达可能与细胞恶性程度有关。

3.2 PPAR- γ 抑制剂的抗肿瘤作用

有关 PPAR- γ 抑制剂的抗肿瘤作用已有报道。Burton 等^[4]用 PPAR- γ 的抑制剂 T0070907、GW9662 对 7 株造血细胞来源的和 9 株上皮细胞来源的癌细胞的体外细胞增殖抑制作用进行了研究, 结果表明, T0070907 和 GW9662 具有明显的增殖抑制作用。Schaefer 等^[6]报道 T0070907 抑制 PPAR- γ 后可阻止肝癌细胞细胞外基质的粘附, 诱导细胞失巢凋亡; Nakajima 等^[13]报道 T0070907 能够明显抑

制胰腺癌的动物模型中肿瘤的转移能力。本研究同样发现, PPAR- γ 抑制剂 T0070907 抑制了 NPC 细胞株 PPAR- γ 的表达, 对该肿瘤细胞生长具抑制作用。

3.3 PPAR- γ 抑制剂 T0070907 抗肿瘤作用的机制

从文献报道来看, PPAR- γ 抑制剂抗肿瘤作用的机制主要涉及细胞周期阻滞、细胞凋亡诱导、抑制血管生成和降低细胞侵袭力等几个方面。本研究结果显示 PPAR- γ 抑制剂 T0070907 对 NPC 细胞的增殖抑制主要与细胞周期的阻滞有关, NPC 细胞经 T0070907 处理后明显被阻滞于 G_2/M 期。

CDK2 与 cyclin A 结合是 G_2 期事件启动和进行的必要条件, 有丝分裂促进因子即 Cdc2/Cyclin B1 复合物是细胞从 G_2 期进入 M 期的重要调节因子, Cyclin B1 的表达直接影响 Cdc2 的活性^[14]。本实验结果显示, 经 T0070907 处理后的 NPC 细胞, 细胞周期相关蛋白 Cyclin A、Cyclin B1、Cdc2 和 Cdk2 等的表达明显下降, 而磷酸化的 Cdc2 蛋白的表达逐渐增强, 由此我们推测, T0070907 抑制

PPAR- γ 后可能通过下调 NPC 细胞 Cyclin B1 的表达使得 Cdc2 发生磷酸化,抑制了 Cdc2 的活性,导致细胞阻滞于 G₂/M 期。T0070907 对 CDK2 与 cyclin A 的下调也使得细胞无法进行有丝分裂。

作为 PPAR- γ 的抑制剂,T0070907 与 PPAR- γ 的 Cys313 共轭结合引起分子构象的改变,阻止了 PPAR- γ /RXR 异二聚体转录共激活因子的募集,由此抑制 PPAR- γ 的激活。但抑制 PPAR- γ 活化后如何调控细胞周期相关蛋白仍不清楚。Schaefer 等^[15]曾报道 PPAR- γ 抑制剂 GW9662 和 T0070907 通过微管蛋白的丢失引起了结肠癌细胞发生了凋亡和细胞形态改变,细胞被阻滞于 M 期。

我们推测,PPAR- γ 抑制剂 T0070907 对 NPC 细胞的增殖抑制作用可能通过以下途径实现:T0070907 与 PPAR- γ 结合后,抑制了 PPAR- γ 的活化,影响了某些基因的转录,从而调节细胞周期相关蛋白的表达。Cyclin B1 的表达下降,磷酸化 Cdc2 表达增多,Cdc 2 活性降低,加上 CDK2 与 cyclin A 的下调,使得细胞阻滞于 G₂/M 期,这方面更具体机制尚待进一步研究。

综上所述,PPAR- γ 抑制剂 T0070907 可明显抑制 NPC 细胞 PPAR- γ 的表达,并且引起细胞周期 G₂/M 期阻滞,其机制可能是调控 Cyclin A、Cyclin B1、Cdc2、Cdk2、pCdc2 等蛋白的表达抑制了 NPC 细胞的增殖。

参考文献:

- [1] Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, et al. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signaling pathways through heterodimer formation of their receptors [J]. *Nature*, 1992, 358(6389): 771-774.
- [2] Michael L, Mitchell AL. The many faces of PPAR- γ [J]. *Cell*, 2005, 123(6): 993-999.
- [3] Grommes C, Landreth GE, Heneka MT. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists [J]. *Lancet Oncol*, 2004, 5(7):419-429.
- [4] Burton JD, Castillo ME, Goldenberg DM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma antagonists exhibit potent antiproliferative effects versus many hematopoietic and epithelial cancer cell lines [J]. *Anticancer Drugs*, 2007, 18(5): 525-534.
- [5] Takahashi H, Fujita K, Fujisawa T, et al. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity in esophageal carcinoma cells results in a drastic decrease of invasive properties [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(9): 854-860.
- [6] Schaefer KL, Wada K, Takahashi H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibition prevents adhesion to the extracellular matrix and induces anoikis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(6): 2251-2259.
- [7] Schaefer KL. PPAR gamma inhibitors as novel tubulin-targeting agents [J]. *PPAR Res*, 2008, 2008:785405. [PubMed-in process]
- [8] 谷铎之,殷蔚伯,刘泰福,等. 肿瘤放射治疗学 [M]. 2 版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993: 443-479.
- [9] Lee G, Elwood F, McNally J, et al. T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(22): 19649-19657.
- [10] Burton JD, Goldenberg DM, Blumenthal RD. Potential of peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist compounds as therapeutic agents for a wide range of cancer types [J]. *PPAR Res*, 2008, 2008: 494161.[PubMed-in process]
- [11] Zhang GY, Ahmed N, Riley C, et al. Enhanced expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in epithelial ovarian carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(1): 113-119.
- [12] Sahin M, Allard BL, YatesM, et al. PPARgamma staining as a surrogate for PAX8/PPARgamma fusion oncogene expression in follicular neoplasms: clinicopathological correlation and histopathological diagnostic value [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(1): 463-468.
- [13] Nakajima A, Tomimoto A, Fujita K, et al. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity suppresses pancreatic cancer cell motility [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(10): 1892-1900.
- [14] Chi, Y, Welcker, M, Hizli, AA, Posakony, JJ, et al. Identification of CDK2 substrates in human cell lysates [J]. *Genome Biol*, 2008, 9(10): R149.
- [15] Schaefer KL, Takahashi H, Morales VM, et al. PPARgamma inhibitors reduce tubulin protein levels by a PPARgamma, PPARdelta and proteasome-independent mechanism, resulting in cell cycle arrest, apoptosis and reduced metastasis of colorectal carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(3): 702-713.