

共轭亚油酸单体诱导乳腺癌细胞 SKBr3 凋亡的 PPAR γ 信号通路研究*

袁贤琳** 何 峰 陈 青 杨湘玲 杨得坡 王冬梅 钟 翎***

(中山大学药学院, 广州 510006)

摘要 *cis9*, *trans11*-CLA 和 *trans10*, *cis12*-CLA 是共轭亚油酸(CLA)二种抑瘤活性最强的主要单体. 在以前报道二者诱导乳腺癌细胞凋亡的工作基础上, 进一步探讨共轭亚油酸单体诱导乳腺癌细胞 SKBr3 凋亡的途径及机制. 采用 RT-PCR 和 Western blot 等方法, 证实了 CLA 在 SKBr3 细胞中可显著提高 PPAR γ 的转录及蛋白质表达水平, 并发现 CLA 对 PPAR γ 与凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 和 caspase3 的表达影响呈同步相关性, 并表现出时间和剂量依赖性. 通过 PPAR γ 抑制剂 GW9662 实验表明它们之间存在协同关系. 首次提出了 PPAR γ -Bcl-2-Caspase3 信号通路的 SKBr3 细胞凋亡途径, 为 CLA 有望作为 PPAR γ 新型调节剂诱导肿瘤细胞凋亡在临床应用提供实验证据.

关键词 共轭亚油酸单体, 过氧化物酶体增殖蛋白激活受体 γ , 细胞凋亡, 人乳腺癌细胞系 SKBr3

学科分类号 Q291, R91

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00549

共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)是一组天然存在于牛肉、奶酪和乳脂中多不饱和脂肪酸, 是亚油酸(linoleic acid, LA)的几何异构体和位置异构体. 近来研究证实, CLA 具有显著的抗肿瘤活性并引起了极大关注, 而对其抗癌机制和信号传导途径的研究更是该领域的热点. 目前, 对 CLA 抑制肿瘤的作用机制主要有以下几个方面: a. CLA 在小鼠前胃癌中通过诱导脂质过氧化产物的形成抑制肿瘤^[1]; b. CLA 通过脂类代谢, 减少类二十碳烷酸的生成从而抑制肺腺肿瘤的形成^[2]; c. CLA 干扰结肠癌细胞周期正常运行, 抑制肿瘤细胞增殖^[3]; d. CLA 通过 ERK- MAPK 信号通路诱导上皮肿瘤细胞的凋亡^[4]. 由此可见, CLA 对不同的肿瘤细胞可通过不同的途径诱导细胞凋亡.

CLA 在体外培养细胞中对于乳腺癌细胞 MCF-7 的抑制作用近年来也有不少报道, 如 CLA 通过影响血管上皮生长因子 -A(VEGF-A)抑制细胞增殖^[5], CLA 对过氧化物酶体增殖蛋白激活受体 γ (PPAR γ)表达的影响导致 MCF-7 细胞 E-cadherin/ β -catenin 信号通路的修饰, 从而抑制细胞增殖^[6], 以及 CLA 对 MCF-7 和另一乳腺癌细胞系 SKBr3 通过影响 Bcl-2、P21 蛋白表达, 促进细胞凋亡^[7-9].

cis9, *trans11*-CLA (*c9*, *t11*-CLA) 和 *trans10*,

cis12-CLA (*t10*, *c12*-CLA) 是食物中含量最高也是抗癌活性最强的两个异构体, 在对肿瘤的抑制机制的研究中, 这两种异构体的活性并不完全一样. 本研究鉴定了 *c9*, *t11*-CLA 和 *t10*, *c12*-CLA 两个异构体对 SKBr3 细胞的促凋亡作用, 证实了 CLA 促凋亡作用与过氧化物酶体增殖蛋白激活受体 γ (peroxisome proliferators activated receptor, PPAR γ)密切相关, 首次提出了 PPAR γ -Bcl-2- Caspase3 信号通路的细胞凋亡途径, 为进一步探讨 CLA 的抗肿瘤机制提供新的证据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 化学试剂.

CLA 单体(*c9*, *t11*-CLA, *t10*, *c12*-CLA), 纯度为 98%, 购自南昌华兴生物科技有限公司. 配制成 200 mmol/L 的二甲基亚砜(DMSO)溶液, 分装

* 广东省科技计划项目 (2007B031406001, 2008A060202010) 和国家自然科学基金资助项目(30873457).

** 现工作单位: 广州市中医医院药剂科.

*** 通讯联系人.

Tel: 020-87334728; E-mail: lsszhl@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2008-10-16, 接受日期: 2008-11-25

储于-20℃备用。

GW9662: PPAR γ 抑制剂, 购于晶美生物工程广州分公司, 工作浓度: 1×10^{-6} mol/L。

Rosilitazone(罗格列酮): PPAR γ 激动剂, 购于晶美生物工程广州分公司, 工作浓度: 1×10^{-5} mol/L。

主要试剂: 提取总 RNA 的 TriZol 试剂为美国 Invitrogen 公司产品; 逆转录试剂 Oligo-dT、dNTP 由大连宝生生物工程有限公司提供; 逆转录酶 M-MLV 为 Promega 公司产品; 电泳用琼脂糖购于广州威佳公司。BCA 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司产品; 抗体: PPAR α 、PPAR γ 、 β -actin 和 Bcl-2, Bax 为美国 Cell signal 公司产品, Caspase3 购于北京中杉金桥公司(SantaCluz 产品)。PVDF 膜购于美国 Millipore 公司, 孔径 0.2 μ m, 型号为 ISEQ00010。

用于 RT-PCR 的引物由上海生工生物技术公司合成, 检测 PPAR γ 基因表达的上游引物序列为 5' tgtgaagccattga agaca 3', 下游引物 5' gagcgggtgaagactcatgt 3'; bcl-xL 基因表达的上游引物序列为 5' gtaactggggtcgctcattgt 3', 下游引物, 5' tggatccaaggtctaggtg 3'; bcl-xS 基因表达的上游引物序列为 5' caggacagcatatcagagc 3', 下游引物 5' caggaccagcggttgaag 3'; 内参 β -actin 上游引物序列 5' tgtatgcctctgctgtaccac 3', 下游引物 5' acagagtacttgcgctcaggag 3'。

1.1.2 细胞培养. 人乳腺癌细胞系 SKBr3 细胞在含有青链霉素和 10%新生牛血清(PAA 公司)的 RPMI 1640 (Gibco 公司生产) 培养液中, 于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养。

1.2 方法

1.2.1 细胞生长曲线. SKBr3 细胞接种于 24 孔培养板, 4.0×10^4 个 / 孔, 37℃、5% CO₂ 培养过夜, 分别加入浓度为 50、100 μ mol/L 的 CLA(c9, t11-CLA 或 t10, c12-CLA), 继续培养, 分别在 1~8 天终止培养, 胰蛋白酶消化, 制成细胞悬液, 苔盼蓝染色, 未被着色的细胞为活细胞。用血球计数板计数存活细胞, 计算均值。以培养时间为横轴, 细胞数为纵轴绘制细胞生长曲线, 每个样品设 3 组复孔作统计分析, 计算细胞增殖抑制率。增殖抑制率(%) = (对照组细胞总数 - 实验组细胞总数) / 对照组细胞总数 $\times 100$ 。

1.2.2 细胞凋亡荧光显微镜观察. SKBr3 细胞接种于 12 孔培养板, 37℃、5% CO₂ 培养过夜, 分别加入浓度为 0, 50, 100 μ mol/L 的 c9, t11-CLA 或

t10, c12-CLA, 继续培养 48 h 后, PBS 清洗细胞。用 Hoechst33342 荧光染料染色, 无水甲醇固定。倒置荧光显微镜观察细胞核形态变化。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞周期. SKBr3 细胞接种于 6 孔培养板, 3×10^5 个 / 孔, 在对数生长期分别加入 c9, t11-CLA 或 t10, c12-CLA 50、100 μ mol/L, 培养 48 h 后, 将细胞制成单细胞悬液, 2 500 r/min 离心 10 min, PBS 清洗 2 次, 重悬浮于 4℃ 预冷 70%乙醇, 冰浴 30 min。测前加 1 ml 碘化丙锭(PI)综合染液(2.5 mg PI, 10 mg 核糖核酸酶, 25 ml Triton X-100, 32.4 ml 生理盐水, 50 mg 柠檬酸, 加蒸馏水至 50 ml), 混匀后避光染色 30 min, 上流式细胞仪(美国库尔特公司 ELITE)检测。对样品进行单参数 DNA 含量分析。每个样品设 3 组复孔, 采用 Mod Fix LT 软件进行细胞 DNA 含量分析。

1.2.4 RT-PCR. 人乳腺癌细胞系 SKBr3 细胞接种于 6 孔板, 3×10^5 个 / 孔, 培养过夜后, 分别加入 0, 25 和 50 μ mol/L 的 c9, t11-CLA 或 t10, c12-CLA, 48 h 后用 TriZol 试剂提取 RNA。RT-PCR 按如下方法进行: 10 μ l RNA (1~5 μ g) 加入 3 μ l Oligo-dT (100 mg/L), 以 75℃ 保温 10 min, 迅速在冰上冷却, 加入 2 μ l dNTP(10 mmol/L), 4 μ l 5 $\times$ 缓冲液, 1 μ l M-MLV 逆转录酶, 加水至 20 μ l, 于 42℃ 保温 30 min 合成 cDNA, 70℃ 5 min 终止反应。PCR 扩增程序为: 94℃ 变性 4 min 后, 94℃ 变性 1 min 51℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 循环; 最后 72℃ 保温 10 min。PCR 产物在 1.5%琼脂糖胶中电泳, 美国 UVP 公司(GDS8000)凝胶成像系统显像观察、拍照并以 Labwork4.5 软件分析图像。以 β -actin 作为内参, 通过电泳条带密度与 β -actin 条带密度的比值进行灰度分析定量评估。

1.2.5 Western blot 检测 PPAR γ 和凋亡相关蛋白.

SKBr3 细胞接种于 6 孔板, 在对数生长期分别加入两种 CLA 异构体处理细胞, 继续培养 1~4 天, 收集细胞, 加入 40 μ l 裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.02% NaN₃, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% 去氧胆酸钠, 1 mmol/L EDTA), 4 μ l 蛋白酶抑制剂 Protease Inhibitor Cocktail, 于 4℃ 振荡 15 min。于 4℃ 下 12 000 r/min 离心 30 min。上清转移至新 EP 管中, 以 BCA 法测定蛋白质浓度。

取 40 μ g 蛋白质在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳, 90 V、90 min 湿法电转移至 PVDF 膜

上. Western blot 检测: 5%牛血清白蛋白(BSA)封闭 2 h. 分别加入兔抗人 PPAR γ 、Bcl-2、 β -actin 或 caspase3 单克隆抗体(1:1 500) 4℃ 过夜, 1×TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:10 000)室温 1 h, 1×TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, ECL 化学发光试剂显色, X- 光片放射自显影. 以目的片段与 β -actin 的吸光度比值进行灰度分析.

2 结 果

2.1 *c9*, *t11*-CLA 和 *t10*, *c12*-CLA 可显著抑制 SKBr3 的生长

实验结果显示(图 1), 对照组(DMSO)SKBR3 细胞在数量上增长很快, 实验组在两种 CLA 异构体 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 细胞生长可见明显的抑制作用. *c9*, *t11*-CLA 各浓度组在第 8 天抑制率分别为 33.5%、66.9%; *t10*, *c12*-CLA 各浓度组在第 8 天抑制率分别为 66.3%和 65.4%. 经 SPSS 统计软件进行方差分析结果表明, *c9*, *t11*-CLA 和 *t10*, *c12*-CLA 各组与对照组相比均有显著性差异($P < 0.05$, $n = 3$), 并且 *t10*, *c12*-CLA 对 SKBR3 细胞生长的抑制作用明显强于 *c9*, *t11*-CLA 的作用.

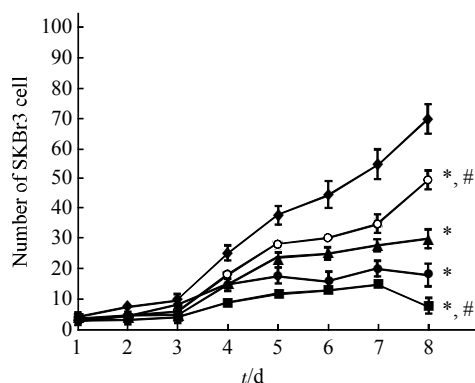


Fig. 1 Cell growth curve of SKBr3 cell treated with *c9*, *t11*-CLA and *t10*, *c12*-CLA

* $P < 0.05$, compared with control "DMSO". # $P < 0.05$ compared with the cells treated with the same dose of *t10*, *c12*-CLA. $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$: Control (DMSO); $\circ$ — $\circ$: *c9*, *t11*-CLA (50 $\mu\text{mol/L}$); $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$: *t10*, *c12*-CLA (50 $\mu\text{mol/L}$); $\bullet$ — $\bullet$: *t10*, *c12*-CLA (100 $\mu\text{mol/L}$); $\blacksquare$ — $\blacksquare$: *c9*, *t11*-CLA (100 $\mu\text{mol/L}$).

2.2 *c9*, *t11*-CLA 和 *t10*, *c12*-CLA 可促进 SKBr3 细胞的凋亡

2.2.1 凋亡细胞荧光显微镜观察. 荧光 Hoechst33342 染料能特异性结合细胞内的 DNA, 如图 2 所示, 正常细胞细胞核(对照组)呈弥漫均匀

荧光, 荧光较弱, 实验组可见典型的凋亡细胞核, 细胞核体积明显变小, 皱缩, 呈浓染致密的颗粒块状强荧光, 甚至可见核固缩或片段化. 从图 2 中可看出, 在 *t10*, *c12*-CLA 较低浓度(50 $\mu\text{mol/L}$) 时即呈现明显的凋亡细胞核, 诱导细胞凋亡强于 *c9*, *t11*-CLA.

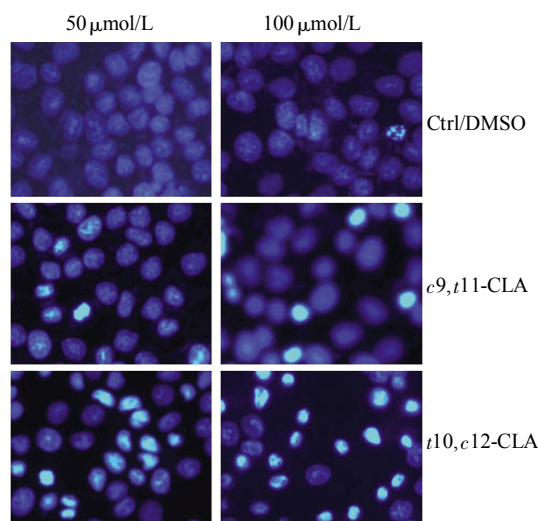


Fig. 2 Morphological changes of SKBr3 cell nuclear treated with *c9*, *t11*-CLA and *t10*, *c12*-CLA by Hoechst33342 staining (20 $\times$)

2.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞周期.

分别用 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ *c9*, *t11*-CLA 和 *t10*, *c12*-CLA 处理 SKBr3 细胞 72 h 后, 流式细胞仪测得凋亡率逐渐升高($P < 0.05$), *t10*, *c12*-CLA 在低浓度时抑制作用强于 *c9*, *t11*-CLA, 而 *c9*, *t11*-CLA 在高浓度时抑制细胞增殖的作用显著强于 *t10*, *c12*-CLA. 50 $\mu\text{mol/L}$ *c9*, *t11*-CLA 和 *t10*, *c12*-CLA 浓度组诱导的 SKBR3 凋亡率分别为 6.4%和 8.8%, 与对照相比未见显著差异(数据未显示), 而在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组中可见到明确的凋亡峰(如图 3), 凋亡率分别为 20.5%和 13.4%.

利用流式细胞术在相同条件下发现细胞周期分布也发生了明显改变: DMSO 对照组的 G0/G1 期细胞比例为 60.1%, S 期为 7.8%, 而用 50 或 100 $\mu\text{mol/L}$ *c9*, *t11*-CLA 处理后, G0/G1 期分别降为 56.5%和 46.1%, S 期分别升高为 14.7%和 35.3%, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ *t10*, *c12*-CLA 处理后 G0/G1 期为 54.2%和 49.2%, S 期分别为 23.9%和 28.9%. 可见随着药物浓度增加, 细胞 S 期延长, G0/G1 期缩短, 50 $\mu\text{mol/L}$ *t10*, *c12*-CLA 的 S 期延长的幅度高于 *c9*, *t11*-CLA, 而 100 $\mu\text{mol/L}$ *c9*, *t11*-CLA 的 S 期延长的幅度显著高于 *t10*, *c12*-CLA(图 4).

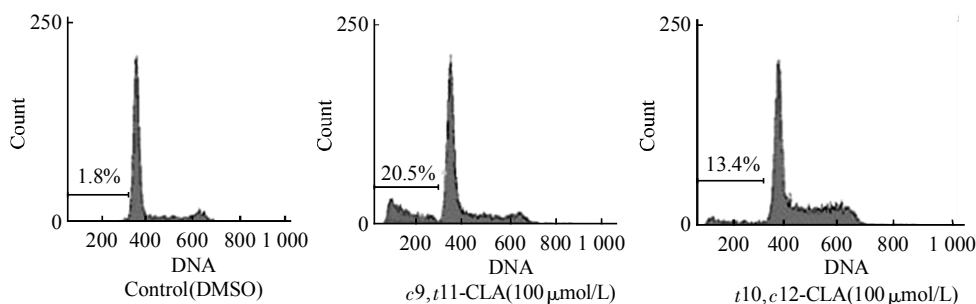


Fig. 3 Apoptosis rate of SKBr3 cell treated with *c9, t11*-CLA and *t10, c12*-CLA by flow cytometry

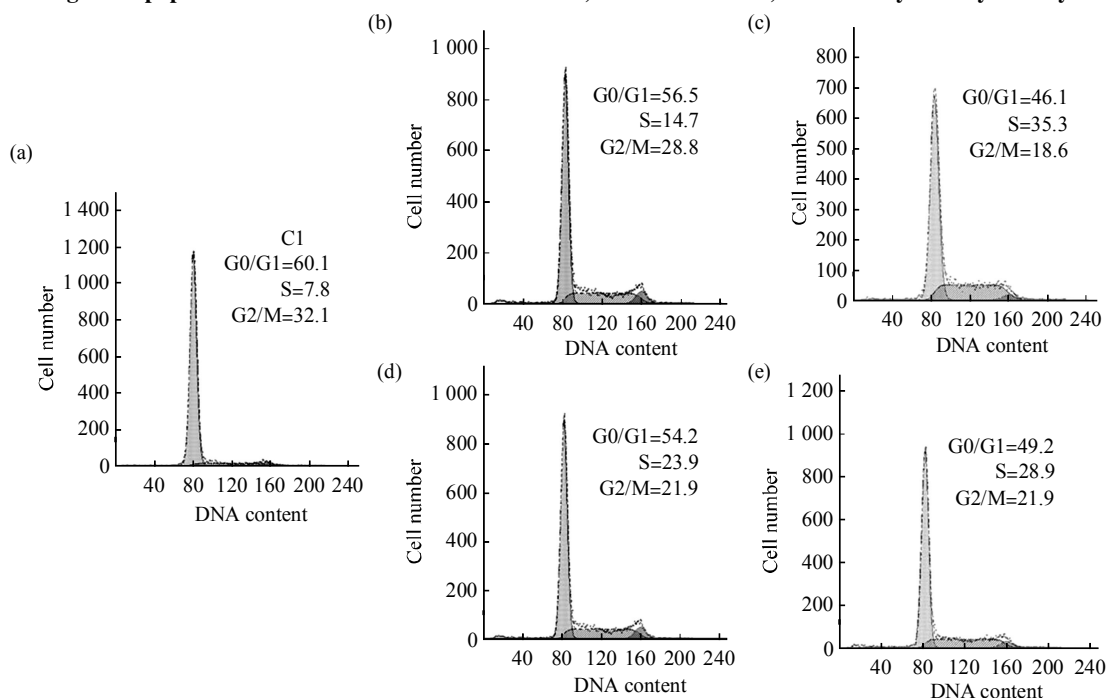


Fig. 4 The cell cycle of SKBr3 cell treated with *c9, t11*-CLA and *t10, c12*-CLA by flow cytometry

(a) Control(DMSO). (b) 50 $\mu\text{mol/L}$ *c9, t11*-CLA. (c) 100 $\mu\text{mol/L}$ *c9, t11*-CLA. (d) 50 $\mu\text{mol/L}$ *t10, c12*-CLA. (e) 100 $\mu\text{mol/L}$ *t10, c12*-CLA.

2.3 CLA 可影响 PPAR γ 的表达, 但对 PPAR α 无影响

我们通过 Western blot 进一步验证了两个 CLA 异构体与 PPAR γ 和 PPAR α 的关系, 即 SKBr3 细胞在两个异构体分别为 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 200 $\mu\text{mol/L}$, 48 h 对 PPAR γ 和 PPAR α 表达水平的影响. 结果

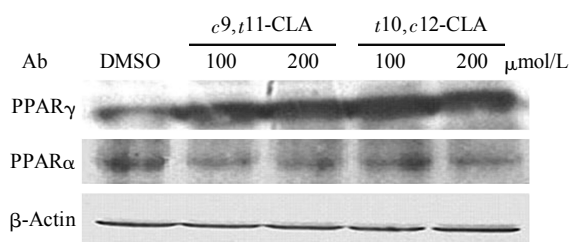


Fig. 5 Western blot detected PPAR γ and PPAR α proteins expressional change in SKBr3 cell treated with *c9, t11*-CLA and *t10, c12*-CLA for 48 h

表明, 各实验组均能够明显增加 PPAR γ 的蛋白含量(图 5), 但 PPAR α 的表达未见变化, 提示 CLA 只对 PPAR γ 具有激活作用, 而对 PPAR α 未有任何影响.

2.4 CLA 可显著增加 PPAR γ 的转录活性及蛋白质表达活性, 且与凋亡相关蛋白的变化同步

2.4.1 RT-PCR 检测转录活性.

利用 RT-PCR 技术, 我们检测了 *c9, t11*-CLA 和 *t10, c12*-CLA 处理乳腺癌细胞 SKBr3 48 h 之后对 PPAR γ 基因 mRNA 转录活性的影响. 结果显示, 与对照组相比, 随着 *c9, t11*-CLA 浓度增加, PPAR γ 的表达明显增强, 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 达到最强, 而 *t10, c12*-CLA 浓度仅在 50 $\mu\text{mol/L}$ 时 PPAR γ 即出现高表达. 表明 CLA 可促进 PPAR γ 的转录(图 6).

我们同时还检测了两个异构体对凋亡相关基因 *bcl-xS* 和 *bcl-xL* 转录的影响. 结果显示, 同样条件下, 促凋亡基因 *bcl-xS* 随浓度增加逐渐增强, 在 *c9, t11*-CLA 100 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最强, 而 *t10, c12*-CLA 在 50 $\mu\text{mol/L}$ 时就表现明显上调. 抑凋亡基因 *bcl-xL* 随着 *c9, t11*-CLA 浓度增加表达降低, 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时表达最弱, 而 *t10, c12*-CLA 作用后在 50 $\mu\text{mol/L}$ 时最弱. 从 *bcl-xS* 与 *bcl-xL* 的比率可见 50 $\mu\text{mol/L}$ *t10, c12*-CLA 和 100 $\mu\text{mol/L}$ *c9, t11*-CLA 明显高于其他实验组, 其差异具有统计学意义($P < 0.01$) (图 6).

以上结果表明, *c9, t11*-CLA 和 *t10, c12*-CLA 可显著影响 PPAR γ 和凋亡相关基因的转录水平, 且对它们的影响是同步的.

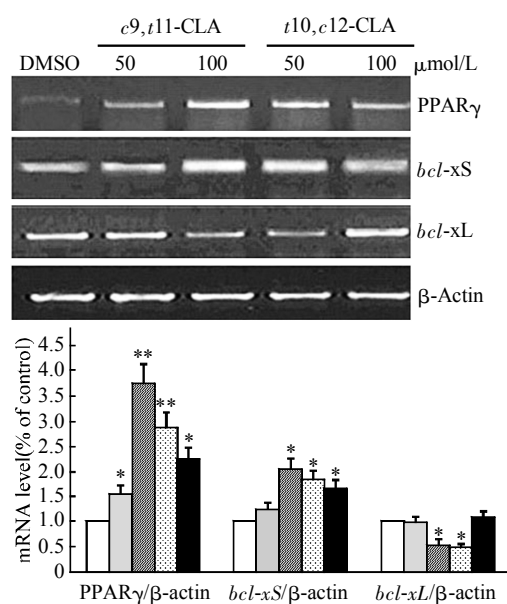


Fig. 6 Detection of PPAR γ and *bcl-xL/S* mRNA transcription in SKBr3 cell treated with *c9, t11*-CLA and *t10, c12*-CLA for 48 h by RT-PCR

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control "DMSO". □: DMSO; ▤: *c9, t11*-CLA (50 $\mu\text{mol/L}$); ▨: *c9, t11*-CLA (100 $\mu\text{mol/L}$); ▩: *t10, c12*-CLA (100 $\mu\text{mol/L}$); ■: *t10, c12*-CLA (50 $\mu\text{mol/L}$).

2.4.2 CLA 影响 PPAR γ 和凋亡相关蛋白的剂量效应. 为了考察 CLA 与 PPAR γ 和凋亡相关蛋白之间的关系, 我们首先在剂量方面考察了 CLA 对 SKBr3 细胞中 PPAR γ 以及 Bax、Bcl-2 和 caspase3 的影响. 在 25, 50, 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下 CLA 两异构体处理 48 h 后, PPAR γ 和凋亡相关蛋白表达出现明显的剂量依赖性(图 7), PPAR γ , 促凋亡蛋白 Bax 和 caspase3 (小片段) 的表达随着 CLA 浓

度增加而增强, 抑凋亡蛋白 Bcl-2 随加药浓度增加而逐渐减弱, 但两种异构体的剂量效应有所不同: *c9, t11*-CLA 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时变化最显著; *t10, c12*-CLA 在 50 $\mu\text{mol/L}$ 时表达最明显($P < 0.05$). 有趣的是, CLA 两个异构体对 PPAR γ 的影响和对凋亡相关蛋白的变化具有相同的趋势, 且与上述 RT-PCR 结果是一致的.

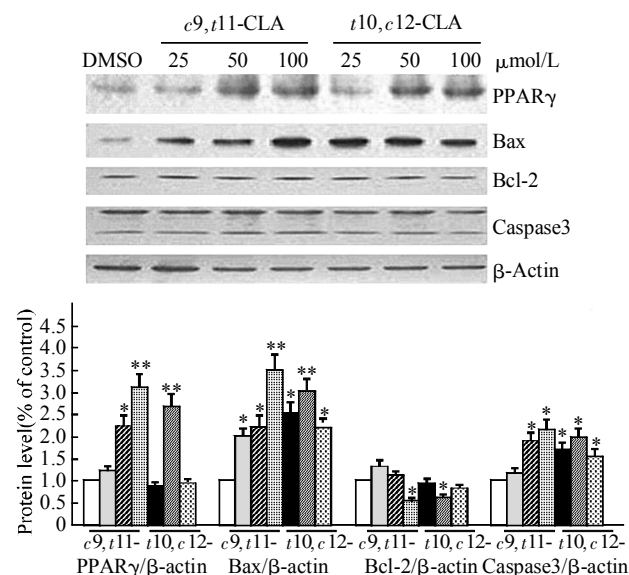


Fig. 7 Dose effects of PPAR γ and apoptotic proteins

Bax, Bcl-2 and caspase3 in SKBr3 cell treated with *c9, t11*-CLA and *t10, c12*-CLA for 48 h by Western blot

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with "DMSO" control. □: DMSO; ▤: *c9, t11*-CLA (25 $\mu\text{mol/L}$); ▨: *c9, t11*-CLA (50 $\mu\text{mol/L}$); ▩: *c9, t11*-CLA (100 $\mu\text{mol/L}$); ■: *t10, c12*-CLA (25 $\mu\text{mol/L}$); ▦: *t10, c12*-CLA (50 $\mu\text{mol/L}$); ▧: *t10, c12*-CLA (100 $\mu\text{mol/L}$).

2.4.3 CLA 影响 PPAR γ 和凋亡相关蛋白的时间效应.

在时间效应方面, 我们考察了 100 $\mu\text{mol/L}$ *c9, t11*-CLA 分别作用 12、24、48、72 h 上述各蛋白质的表达情况. *c9, t11*-CLA 作用于 SKBr3 细胞后 PPAR γ 、Bax 和 caspase3 (小片段) 表达随时间增加而增强, 在 48 h 时表达最强, Bcl-x 变化不明显(图 8).

同时我们还考察了 50 $\mu\text{mol/L}$ *t10, c12*-CLA 分别作用 12、24、48、72 h 上述各蛋白质的表达情况. 结果表明, PPAR γ 、Bax 和 caspase3 (小片段) 表达在 24 h 时最强, Bcl-2 则相反, 加药组比对照组的表达要弱(图 9).

以上结果同样反映出 PPAR γ 与凋亡相关蛋白一致的变化趋势.

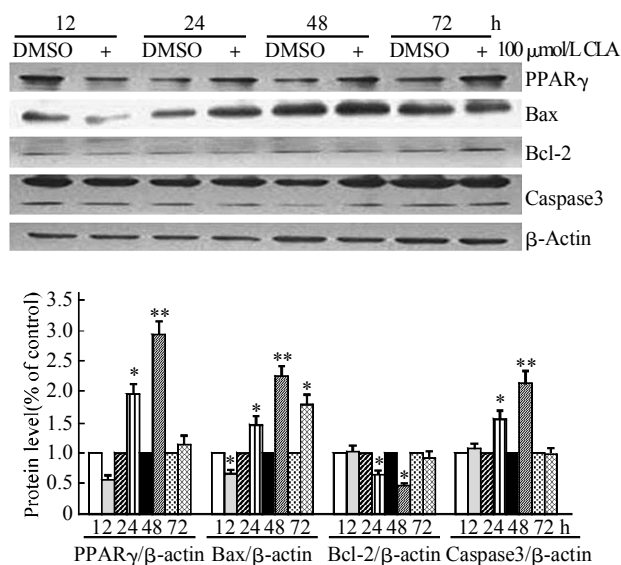


Fig. 8 Time effects of PPAR γ and apoptotic proteins Bax, Bcl-2 and caspase3 in SKBR3 cell treated with 100 μ mol/L *c9, t11*-CLA by Western blot

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with "DMSO" control. □: DMSO 12 h; □: *c9, t11*-CLA 12 h; ▨: DMSO 24 h; ▩: *c9, t11*-CLA 24 h; ■: DMSO 48 h; ▤: *c9, t11*-CLA 48 h; ▥: DMSO 72 h; ▦: *c9, t11*-CLA 72 h.

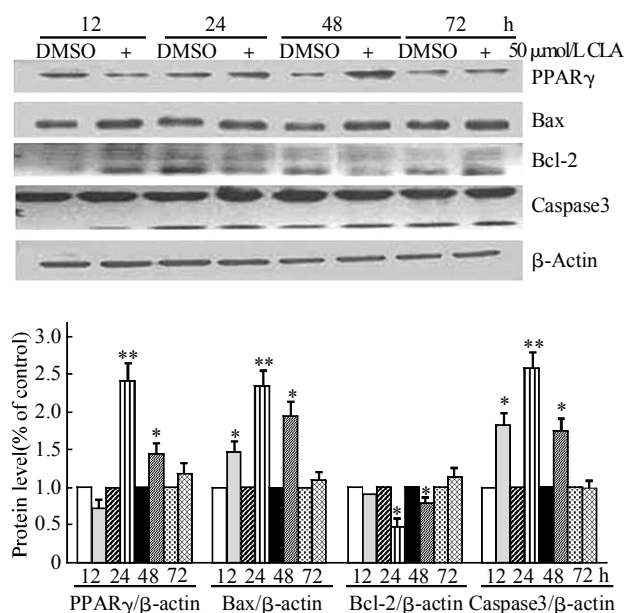


Fig. 9 Time effect of PPAR γ and apoptotic proteins Bax, Bcl-2 and caspase3 in SKBR3 cell treated with 50 μ mol/L *t10, c12*-CLA by Western blot

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with "DMSO" control. □: DMSO 12 h; □: *t10, c12*-CLA 12 h; ▨: DMSO 24 h; ▩: *t10, c12*-CLA 24 h; ■: DMSO 48 h; ▤: *t10, c12*-CLA 48 h; ▥: DMSO 72 h; ▦: *t10, c12*-CLA 72 h.

2.5 CLA 通过 PPAR γ 诱导细胞凋亡蛋白

从上述结果来看, 不论是从剂量还是时间方面, CLA 诱导 PPAR γ 表达与 Bax 的变化呈同步关

系, 那么在二者之间是否确实存在着相关关系? 为此, 我们将 CLA 与 PPAR γ 抑制剂 GW9662 共处理 SKBR3 细胞, PPAR γ 激动剂罗格列酮 (Rosiglitazone) 作为正对照, 观察 Bax、Bcl-2 和 caspase3 的变化。

从图 10 可看出: 在用浓度为 100 μ mol/L 的 *c9, t11*-CLA 或 50 μ mol/L *t10, c12*-CLA 处理细胞, 48 h 后, PPAR γ 表达显著增强, 促凋亡蛋白 Bax 和 caspase3 (小片段) 表达也随着增强, 比加 PPAR γ 激动剂 Rosiglitazone 的样品稍强. 加入 PPAR γ 抑制剂 GW9662 后促凋亡蛋白 Bax 表达减弱, 回复到比对照稍弱的水平. 抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达则相反, 其表达在加入抑制剂之后增强. 相比两个异构体 *c9, t11*-CLA 和 *t10, c12*-CLA, 后者则表现更加出色, 由此可见, 由于 PPAR γ 的抑制剂 GW9662 抑制了 PPAR γ 的表达, 致使凋亡相关蛋白随之变化, 并呈现密切的相关性. 据此我们推测 CLA 是作为 PPAR γ 的配体激活其表达, 进而诱导凋亡相关蛋白的表达, 最终导致肿瘤细胞凋亡。

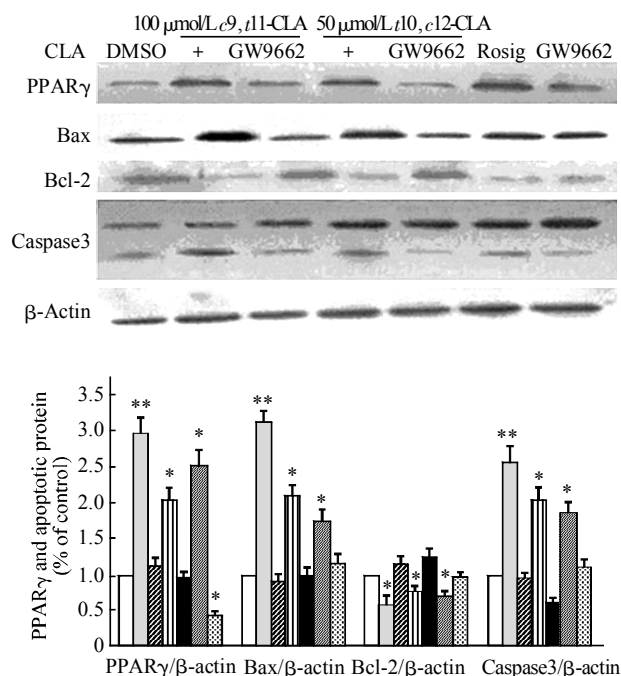


Fig. 10 The relationship of PPAR γ and apoptotic protein expression in SKBR3 cell treated with *c9, t11*-CLA and *t10, c12*-CLA by Western blot

GW9662: PPAR γ inhibitor; Rosig: PPAR γ activator. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs "DMSO" control. □: DMSO; □: *c9, t11*-CLA; ▨: *c9, t11*-CLA+GW9662; ▩: *t10, c12*-CLA; ■: *t10, c12*-CLA+GW9662; ▤: Rosig; ▥: GW9662.

3 讨 论

1983 年 Pariza 等^[10]最先发现烧烤牛肉的提取物具有抗癌作用, 接着对提取物的分析鉴定确认抗癌成分是共轭亚油酸. Clement 等在研究 CLA 对直肠癌的作用中首次观察到细胞中染色质浓缩和 DNA 交联等凋亡现象, 还用免疫组化的方法观察到 CLA 降低凋亡调节蛋白 Bcl-2 的表达. 这一发现提示 CLA 可以通过诱导凋亡抑制癌症的发生和发展^[11]. 本研究证实, CLA 对乳腺癌 SKBr3 细胞的增殖有明显的抑制作用, 经 Hochesst 染色, *c9*, *t11*-CLA 和 *t10*, *c12*-CLA 均可引起细胞凋亡形态学改变, 利用流式细胞术, 我们还检测到 *t10*, *c12*-CLA 使细胞在凋亡率和细胞周期发生的变化.

细胞凋亡的信号传导途径主要有两条, 即死亡受体途径和线粒体途径, 无论哪条途径, 均是在凋亡刺激因子的作用下, 引发胞内 caspase 级联反应, 导致凋亡的发生^[12], 故 caspase 的激活是两条途径的共同途径. Caspase3 是最关键的凋亡执行蛋白, caspase3 的活性增加, 即小片段的产生说明细胞内的凋亡机制已被启动. Bcl-2 家族的表达和调控是影响细胞凋亡的关键因素之一, 在细胞凋亡信号传导途径中发挥重要作用. 凋亡的发生并不仅仅与 Bax 或 Bcl-2 中某一种蛋白质的表达增加或降低有关, 更重要的是依赖于 Bax 和 Bcl-2 异源二聚体的严格化学比. 本实验利用 Bcl-2 蛋白家族和细胞凋亡通路的关系证明了凋亡的发生: 促凋亡蛋白 Bax 蛋白表达增强, 而抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达减弱 (Bax/Bcl-2 比值升高), 进一步使 caspase3 酶原激活, 引起 caspase3 小片段的表达增强, 并最终导致细胞凋亡.

过氧化物酶体增殖蛋白激活受体 (peroxisome proliferators activated receptor, PPAR) 作为调节目标基因表达的核内受体转录因子超家族成员^[13], 具有复杂的生物学功能. 根据 PPAR 的结构及功能可分为 3 种不同亚型: PPAR α 、PPAR β 和 PPAR γ . 其中 PPAR γ 位于机体多种信号传导的交叉点, 具有多种生物学效应, 可促进脂肪细胞分化和脂肪生成、增强机体对胰岛素的敏感性^[14]、调节体内糖平衡、抑制炎症因子生成及炎症形成、影响肿瘤生长、对心血管产生保护效应^[15]等, 且与肿瘤关系最为密切^[16]. 若被配体激活不仅可抑制一些肿瘤细胞的增殖, 而且可导致肿瘤细胞的凋亡, 从而成为新的肿

瘤治疗靶点^[17]. 它通过与配体结合活化, 再与视黄酸受体 (retinoic X receptor, RXR) 形成异二聚体, 与目的基因上游的 PPRE 靶基因的特异性 DNA 序列, 即过氧化物酶体增殖物反应元件 (peroxisome proliferator responsive element, PPRE) 结合, 而发挥其转录后调控作用. 在本研究中我们通过一系列实验结果表明, *c9*, *t11*-CLA 和 *t10*, *c12*-CLA 可诱导 SKBr3 细胞的 PPAR γ 转录活性并使蛋白质表达水平明显增强, 其影响呈现剂量和时间上的依赖性. 我们推测 CLA 可作为 PPAR γ 的调节剂与其结合, 激活 PPAR γ 的表达.

已确认的含有 PPRE 结构基因即 PPAR γ 调控的靶基因包括: 脂酰辅酶 A 氧化酶、过氧化物酶体双功能酶、肝脏脂肪酸结合蛋白、微粒体 CYP4A、细胞色素 P450、脂肪酸 co- 羧化酶、SOD 和一些生长凋亡基因如 c-myc、c-jun、erg-1、c-fos、c-Ha-ras 等^[18~21]. 目前对于凋亡相关基因是否也含有 PPRE 结构从而成为 PPAR γ 的调控靶基因, 未见任何报道. 令人感兴趣的是, 我们通过一系列的实验证实, CLA 对 PPAR γ 表达的增强趋势, 特别是 *c9*, *t11*-CLA 和 *t10*, *c12*-CLA 异构体在剂量和时间效应方面均与凋亡相关蛋白 Bax, Bcl-2 和 caspase3 (小片段) 的变化趋势相一致, 这一结果提示我们, PPAR γ 与肿瘤细胞凋亡相关, 且与凋亡相关蛋白 Bcl-2 蛋白家族有某种联系.

通过 PPAR γ 抑制剂 GW9660 实验, 证明了 PPAR γ 与凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 和 caspase3 (小片段) 之间的协同关系. 此结果进一步证实了 CLA 作为 PPAR γ 调节剂激活 PPAR γ 的推测, 通过 PPAR γ -Bcl-2-Caspase3 信号通路, 与 Bcl-2 家族基因上游结合, 进一步激活或抑制其下游的基因表达, 从而诱导 SKBr3 细胞凋亡. 当然这一推测尚需更多的实验证据支持.

总之, CLA 将有望作为 PPAR γ 的新型调节剂在临床应用. CLA 是体内正常代谢物, 对机体无毒副作用, 所以若能投入临床治疗疾病将会为患者带来无限的福音. 因此如何完善和深入 CLA 的临床前研究, 如何合理开发 CLA 成为有效药物将是今后最有前景的一个发展方向, 也是未来很长一段时间为之奋斗的目标.

参 考 文 献

- 1 Ha Y L, Storkson J, Pariza M W. Inhibition of benzo (a) pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. Cancer Res, 1990, 50 (4): 1097~1101

- 2 Schonberg S, Krokan H E. The inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives (CLA) of linoleic acid on the growth of human tumor cell lines in part due to increased lipid peroxidation. *Anticancer Res*, 1995, **15**(4): 1241~1246
- 3 Cho H J, Kim E J, Lim S S, *et al.* *Trans*-10, *cis*-12, not *cis*-9, *trans*-11, conjugated linoleic acid inhibits G1-S progression in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr*, 2006, **136**(4): 893~898
- 4 Bocca C, Bozzo F, Gabriel L, *et al.* Conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 cell growth *via* ERK-MAPK signaling pathway. *J Nutr Biochem*, 2007, **18**(5): 332~340
- 5 Wang L S, Huang Y W, Sugimoto Y, *et al.* Effects of human breast stroma cell on conjugated linoleic acid (CLA) modulated vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) expression in MCF-7 cell. *Anticancer Res*, 2005, **25**(6B): 4061~4068
- 6 Bocca C, Bozzo F, Francica S, *et al.* Involvement of PPAR γ and E-cadherin/ β -catenin pathway in the antiproliferative effect of conjugated linoleic acid in MCF-7 cells. *Int J Cancer*, 2007, **121**(2): 248~256
- 7 O'Shea M, Devery R, Lawless F, *et al.* Milk fat conjugated linoleic acid (CLA) inhibits growth of human mammary MCF-7 cancer cells. *Anticancer Res*, 2000, **20**(5B): 3591~3601
- 8 Majumder B, Wahle KW, Moir S, *et al.* Conjugated linoleic acids (CLAs) regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer cells. *The FASEB J*, 2002, **16**(11): 1447~1449
- 9 Wongtangtharn S, Oku H, Iwasaki H, *et al.* Incorporation of branched-chain fatty acid into cellular lipids and caspase-independent apoptosis in human breast cancer cell line, SKBR-3. *Lipids in Health and Disease*, 2005, **4**: 29
- 10 Pariza M W, Loretz L J, Storkson J M, *et al.* Mutagens and modulator of mutagenesis in fried ground beef. *Cancer Res*, 1983, **43** (5 Suppl.): 2444s~2446s
- 11 Ip C, Ip M M, Loftus T, *et al.* Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of the rat mammary gland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000, **9** (7): 689~696
- 12 Sato T, Hanada M, Bodrug S, *et al.* Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (20): 9238~9242
- 13 Fenner M H, Elster E. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands for the treatment of breast cancer. *Expert Opin Investing Drugs*, 2005, **14**(6): 557~568
- 14 Kubota N, Terauchi Y, Miki H, *et al.* PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*, 1999, **4**(4): 597~609
- 15 Barak Y, Nelson M C, Ong E S, *et al.* PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*, 1999, **4**(4): 585~595
- 16 Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet*, 1999, **354**(9173): 141~148
- 17 Pighetti G M, Novosad W, Nicholson C, *et al.* Therapeutic treatment of DMBA-induced mammary tumors with PPAR ligands. *Anticancer Res*, 2001, **21**(2A): 825~830
- 18 Nolte R T, Wisely G B, Westin S, *et al.* Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-Gamma. *Nature*, 1998, **395**(6698): 137~143
- 19 Kotani T, Yamashita M. Discrimination of the roles of MPF and MAP kinase in morphological changes that occur during oocyte maturation. *Dev Biol*, 2002, **252**(2): 271~286
- 20 Willson T M, Brown P J, Sternbach D D, *et al.* The ppar's: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem*, 2000, **43** (4): 527~550
- 21 Tzameli I, Fang H, Ollero M, *et al.* Regulated production of a PPARgamma ligand during an early phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 2004, **279**(34): 36093~36102

Studies on PPAR γ Signal Pathway of Conjugated Linoleic Acid Isomers Induce Apoptosis of Human Breast Cancer Cell Line SKBr3*

YUAN Xian-Lin**, HE Feng, CHEN Qing, YANG Xiang-Ling,
YANG De-Po, WANG Dong-Mei, ZHONG Ling***

(School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract *Cis*9, *trans*11 and *trans*10, *cis*12-CLA are two major isomers of conjugated linoleic acid, which have stronger activities of anti-tumor. Based the previous studies, it was explored the pathway and mechanism of inducing apoptosis in human breast cancer cell line SKBr3 by *c*9, *t*11-CLA and *t*10, *c*12-CLA. It was confirmed that CLA could increase obviously the transcription and protein expression levels of PPAR γ by RT-PCR and Western blot. The synchronism and correlation between PPAR γ and apoptotic proteins Bax, Bcl-2, caspase3 changes were found with a dose- and time-dependent manner. PPAR γ inhibitor GW9662 experimental result showed that there is cooperative relation between them. This is the first report that CLA induces apoptosis in SKBr3 cell by the signal pathway of PPAR γ -Bcl-2-Caspase3. These observations indicated that CLA will be useful for clinic therapy of anti-tumor as a new regulator of PPAR γ in the future.

Key words conjugated linoleic acid isomer, peroxisome proliferators activated receptor γ (PPAR γ), apoptosis, human breast cancer cell line SKBr3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00549

*This work was supported by grants from the Scientific Technology Project of Guangdong Province in China(2007B031406001, 2008A060202010) and The National Natural Science Foundation of China(30873457).

**Current work unit: Pharmacy Department, TCM Hospital of Guangzhou.

***Corresponding author.

Tel: 86-20-87334728, E-mail: lsszhl@mail.sysu.edu.cn

Received: October 16, 2008 Accepted: November 25, 2008