

• 论 著 •

乳腺癌细胞中过表达 S 期激酶相关蛋白 2 对曲格列酮敏感性的影响*

蒙 杰, 邹 燕, 覃凤娟, 韦晓谋, 王贵生, 吴 昊, 戴盛明[△]

(广西医科大学第四附属医院检验科, 广西柳州 545005)

摘要:目的 本文主要研究过表达 S 期激酶相关蛋白 2(Skp2)能否影响曲格列酮(TRG)对乳腺癌细胞的敏感性,致力于发展一种新的药物来提高患者的生存率,最终达到治愈的目的。方法 荧光报告基因方法观察过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR) γ 型转录活性的变化;流式细胞和 CCK-8 法研究 Skp2 过表达影响 TRG 对乳腺癌细胞生长和凋亡的改变。结果 Skp2 过表达能抑制 PPAR γ 的活性,耐受 TRG 对乳腺癌细胞生长和凋亡的影响。结论 Skp2 过表达的乳腺癌细胞能耐受 TRG 的敏感性,因此通过下调 Skp2 可能会增强 TRG 对乳腺癌细胞的生长抑制。

关键词: S 期激酶相关蛋白 2; 曲格列酮; 乳腺癌细胞; 敏感性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.07.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)07-0865-03

Effects of Skp2 overexpression on sensitivity of troglitazone in breast cancer cells

Meng Jie, Zou Yan, Qing Fengxian, Wei Xiaomou, Wang Guisheng, Wu Hao, Dai Shengming[△]

(Department of Clinical Laboratory, Fourth Affiliated Hospital of Guangxi

Medical University, Liuzhou, Guangxi 545005, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Skp2 overexpression on the sensitivity of troglitazone(TRG) in breast cancer cells and to devote to develop a novel drug for increasing the patient survival rate and eventually reaching the cure goal. **Methods** The transcription activities of PPAR γ were analyzed on peroxisome proliferators response element(PPRE) luciferase reporter. The flow cytometry analysis and CCK-8 assay were adopted to study that overexpression of Skp2 was associated with resistance to TRG-mediated inhibition growth and apoptosis of breast cancer cells. **Results** Our study found that overexpression of Skp2 inhibited the transcriptional activity of the endogenous PPAR γ and resisted to TRG-mediated inhibition growth and apoptosis of breast cancer cells. **Conclusion** Overexpressed Skp2 breast cancer cells is able to be resistant to TRG-induced sensitivity of breast cancer cells. Furthermore down-regulating Skp2 will significantly enhance the growth inhibition of TRG on breast cancer cells.

Key words: skp2; troglitazone; breast cancer cells; sensitivity

乳腺癌是基于多种信号通路失调导致的严重危害妇女健康的常见恶性肿瘤。很少的治疗方法能够应用,因为绝大多数的放化疗均不能延长患者的生存时间。因此,遗传和分子改变在乳腺癌的演进过程已经导致新型药物的开发,导致我们发展新的药物来攻克这一难题。

过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)是一种由配体激活的转录因子,是核激素受体(NHR)超家族的成员之一^[1-2]。PPAR 有 3 种亚型(PPAR α , β/δ , γ)^[3-4]。PPAR γ 配体[如噻唑烷二酮类药物(TZD)]最近已经被认为是预防和治疗某些人类肿瘤的潜在靶点^[3]。用 PPAR γ 配体曲格列酮(TRG)处理乳腺癌细胞,能明显诱导细胞凋亡和细胞形态转化,阻滞细胞周期,上调肿瘤抑制基因的表达,抑制肿瘤细胞生长及克隆形成能力^[4-6]。Suh 等^[7]在大鼠体内实验亦证实 PPAR γ 配体能明显降低乳腺癌的发生率,缩小肿瘤体积。PPAR γ 的配体根据其来源不同可分为两大类:天然配体和合成配体。前列腺素 D2 的代谢产物 15D-PGJ2 曾被认为是 PPAR γ 最强的天然配体。PPAR γ 在脂肪组织和许多人类肿瘤组织中呈高表达,包括乳腺癌患者组织中^[8]。

S 期激酶相关蛋白 2(Skp2)是一种癌基因,它在某些肿瘤

中的扩增和过表达通常与肿瘤的恶性程度相关。Skp2 是 SCFSkp2 泛素连接酶复合物里对底物识别的一种 F-box 蛋白^[9],它靶向多种蛋白的泛素化和后来的降解。此外,Skp2 的致癌潜在在体内已经得以证实。Gstaiger 等^[10-11]已经证实 Skp2 在雌激素受体(ER)和人表皮生长因子受体 2(HER-2)呈阴性的乳腺癌中或者在原发性、局部复发性和转移性乳腺癌中高表达;Skp2 和肿瘤的不良预后的相关性也有报道。研究发现高 Skp2 表达和低 p27 表达提示多种肿瘤患者预后不良,如弥漫大 B 细胞淋巴瘤^[12]、乳腺癌^[13]等。已有研究发现在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中过表达 PPAR γ 能够下调 Skp2 的 mRNA 和蛋白水平的表达^[14],但是否 Skp2 能影响 PPAR γ 的功能尚不清楚的。

1 资料与方法

1.1 细胞培养 2 种乳腺癌细胞株 MCF-7(ER+)和 MDA-MB-231(ER-)由上海复旦大学肿瘤医院乳腺癌研究所惠赠。使用含 10%热灭活的胎牛血清、100 U/mL 的青霉素/链霉素的 RPMI1640(GBICO)培养基,37 °C 5% CO₂ 培养。

1.2 表达质粒和瞬时转染 全长的 Skp2 质粒上游引物 5'-GCG AAT TCA TGC ACG TAT TTT AAA CTC C-3',下游

引物:5'-GAC TCG AGA CTT CAT AGA CAA CTG GGC T-3',载体为 pcDNA3.1-myc 表达载体,转染使用脂质体 2000 试剂进行转染。

1.3 流式细胞仪(FCM)检测细胞周期及凋亡 收集对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基配成每毫升 4×10^4 个细胞浓度接种在 50 mL 的培养瓶中。设实验组及健康对照组。将两组细胞在 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养,在处理后不同时间点分别收集,用 0.25% 胰蛋白酶消化,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次(1 000 r/min, 5 min),70% 乙醇固定过夜。将固定于 70% 乙醇中的细胞离心,弃上清液,再以 PBS 洗涤一次;细胞沉淀中加入 150 μL RNA 酶 A(0.1 mg/mL),重悬细胞,4 °C 避光孵育 30 min;再加入 120 μL PI(0.1 mg/mL),4 °C 避光孵育 10 min;用 300 目尼龙毛过滤细胞,去除细胞团块;1 h 内上流式细胞仪分析细胞 DNA 水平分布,Modfit 2.0 软件分析。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖活性 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞制成浓度为每毫升 3×10^4 个细胞的细胞悬液,加入 96 孔培养板中,每孔 100 μL。设空白对照组、正常对照组和实验组。24 h 后,处理细胞,每个剂量设 3 个平行孔。分别于细胞处理后不同时间点取出培养板,每孔中加入 10 μL 的 CCK-8 试剂,避光继续培养 1 h 后用自动酶标仪(Tenon, Sunrise)在 490 nm 波长处,测定各孔的吸光度(OD)值。

1.5 统计学处理 采用 Stata 7.0 统计分析系统,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Skp2 对乳腺癌细胞中 PPAR γ 活性的影响 通过在 MCF-7 细胞中转染 Myc-Skp2 表达质粒,转染效率之前结果已得到验证。接着将调查 Skp2 在 TRG 处理的乳腺癌细胞中的作用。首先,通过荧光报告酶系统,发现 TRO 和 ROZ 都能激活 PPAR γ 的活性,然而在 Skp2 过表达的细胞中,PPAR γ 的活性是降低的(图 1),这说明 Skp2 上调能抑制 TRO 对乳腺癌细胞中 PPAR γ 的转录活性。

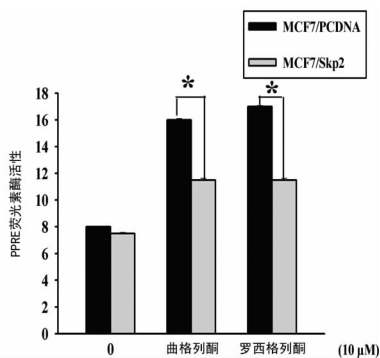


图 1 Skp2 对乳腺癌细胞中 PPAR γ 活性的影响

2.2 Skp2 对 PPAR γ 配体诱导细胞增殖的影响 MCF-7 细胞以 1×10^4 细胞/孔的密度接种在 96 孔板中,转染 PCDNA 空载体或 Myc-Skp2 质粒 24 h 后,50 μM 的 TRG 用来处理细胞额外的 48 h。细胞增殖使用 CCK-8 法观察(图 2)。结果显示过表达 Skp2 能够逆转 TRG 对乳腺癌细胞的抑制作用。

2.3 Skp2 对 PPAR γ 配体诱导的细胞凋亡的影响 流式细胞分析结果显示 TRG 处理 MCF-7 细胞引起 15.8% 的细胞凋亡,而转染了 Skp2 质粒后,凋亡细胞降低到 4.5%,差异有统

计学意义($P < 0.05$)。

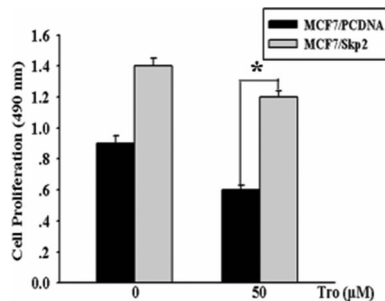


图 2 Skp2 对 PPAR γ 配体诱导的细胞增殖的影响

3 讨 论

噻唑烷二酮类药物(TZDs)是一种广泛使用在治疗 2 型糖尿病患者的合成性的 PPAR γ 激动剂,具有抑制细胞生长的活性。一旦与配体结合后,PPAR γ 与维甲酸 X 受体形成异源二聚体,转位到核内,反式激活定位在靶基因启动子区的 ppar 反应原件(PPRE)。TRG 与细胞的增殖、凋亡的敏感性也有报道。在某些肿瘤细胞中激活 PPAR γ 被报道能诱发细胞的凋亡。这一现象与本研究的结果相一致。

TZD 是 PPAR γ 合成性配体,已广泛用于治疗 2 型糖尿病以及显示具有细胞生长抑制效应。基于配体绑定后,PPAR γ 与维甲酸 X 受体形成功能性的异源二聚体,转位到细胞核内,反式激活 PPAR 的反应元件^[15]。

Skp2 经常过表达在肿瘤细胞系中,包括乳腺癌细胞系。相关研究显示 Skp2 在 ER 阳性的 MCF-7 细胞中低表达,在 ER 阴性并具有较高浸润能力的 MDA-MB-231 细胞中高表达。因此,本研究选取 Skp2 低表达的 MCF-7 细胞进行后续的过表达实验。本研究结果显示 Skp2 在拮抗 TZD 诱导乳腺癌细胞敏感性具有重要作用。以下几点理由支持这一结论:(1)Skp2 抑制了 TRG 对 PPAR γ 的活性;(2)Skp2 抑制了 TRG 对乳腺癌细胞生长的影响;(3)Skp2 抑制了 TRG 对乳腺癌细胞凋亡的影响。

本研究运用 Skp2 表达载体共转染技术对 Skp2 的表达进行了过表达,证明了 Skp2 基因在耐受 TRG 对乳腺癌细胞的敏感性中发挥重要作用,为 Skp2 基因作为乳腺癌基因治疗的新靶点提供了实验依据。

参考文献

[1] Lemberger T, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996, 12(3): 335-363.
 [2] Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs[J]. Annu Rev Med, 2002, 53(4): 409-435.
 [3] Allred CD, Kilgore MW. Selective activation of PPARgamma in breast, colon, and lung cancer cell lines[J]. Mol Cell Endocrinol, 2005, 235(1): 21-29.
 [4] Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma[J]. Mol Cell, 1998, 1(3): 465-470.
 [5] Yu HN, Lee YR, Noh EM, et al. Induction of G1 phase arrest and apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells by troglitazone, a synthetic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligand[J]. Cell Biol Int, 2008, 32(8): 906-912. (下转第 869 页)

59 d^[9]。但是, NAT 检测技术要求较高,成本也非常昂贵,因此 NAT 的普及应用还需进行评估,相信在不远的将来 NAT 检测将在全国普及。

本文对深圳市 2009~2013 年共 330 633 例标本进行血液筛查,发现 ALT、HBsAg、抗-HCV、梅毒等项目的阳性检出率趋势在近 5 年变化不大(图 1),而献血者抗-HIV 的阳性率则明显呈逐年升高,2013 年的检出率比 2009 年高 4 倍(图 2),这与疾控中心对 HIV 监测的结果类似^[10],说明献血者人群虽然以健康人群为绝大多数,但对 HIV 的血液筛查必须严格把关。330 633 例标本筛查出 932 份 ALT>40 U/L 的不合格血液标本,占总献血人次的 0.282%,低于其他地区报道^[11-13],这可能与血站使用了干化学试纸条进行 ALT 初筛有关。其中,图 2 可见 2012 年的 ALT 不合格率明显升高,但相对应年份的 HBsAg 与抗-HCV 阳性率则稍降低,这说明 ALT 值升高与病毒性肝炎没有直接相关。98.176% ALT 单项不合格样品而病毒性肝炎检测阴性,ALT 不合格且病毒性肝炎阳性的标本仅占 1.824%;经过统计学 McNemar 检验分析得到,ALT 阳性率与病毒性肝炎的阳性率不一致($P=0.003$),不具有相关性。因此,ALT 检测项目在献血者血液筛查是否继续沿用还有待商榷。若 ALT 筛查仍作为血液筛查中的非特异性指标,首先应当加强献血前注意事项的宣传,应避免服用药物、饮酒、休息不好之后献血,以降低因干扰因素而造成 ALT 异常增高;其次应当重新探索 ALT 筛查的参考区间上限值;最后,是否可以考虑以 NAT 方法检测对 ALT 筛查异常的样品进一步确证,达到既不浪费血液又不致检验成本过多提高。若放弃 ALT 检测,可考虑以 NAT 替代 ELISA 方法筛查血液样品 ALT,既可以大大地缩短窗口期,同时也可减少假阴性。

参考文献

[1] 赵彩萍,王雪峰. 无偿献血者 ALT 增高的相关因素分析[J]. 医学信息, 2010, 9(25): 2582-2583.

[2] 廖丽梅. 无偿献血者单项 ALT 不合格相关因素调查[J]. 现代医院, 2014, 4(1): 70-71.

(上接第 866 页)

[6] Bonofiglio D, Gabriele S, Aquila S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activates fas ligand gene promoter inducing apoptosis in human breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 113(3): 423-434.

[7] Suh N, Wang Y, Williams CR, et al. A new ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), GW7845, inhibits rat mammary carcinogenesis[J]. Cancer Res, 1999, 59(22): 5671-5673.

[8] Ikezoe T, Miller CW, Kawano S, et al. Mutational analysis of the peroxisome proliferator-activated receptor γ gene in human malignancies[J]. Cancer Res, 2001, 61(50): 5307-5310.

[9] Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(5): 369-381.

[10] Gstaiger M, Jordan R, Lim M, et al. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(9): 5043-5048.

[11] Signoretti S, Di Marcotullio L, Richardson A, et al. Oncogenic role

[3] Khakoo SI, Soni PN, Brown D, et al. A clinical evaluation of a new method for HBV DNA quantitative in patients with chronic hepatitis B[J]. J Med Virol, 1996, 50(3): 112-116.

[4] 贺岩, 罗梅, 孙艳艳, 等. HBV DNA 载量与 HBsAg、HBeAg 和 ALT 水平的相关性[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(19): 2400-2401.

[5] 谷娅楠, 朱鸿, 程艳杰, 等. 丙型肝炎患者血清 HCV-RNA 载量、抗-HCV 及 ALT 的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(4): 487-488.

[6] 周艳, 李晶, 冯卓, 等. 结合核酸检测探讨 ALT 与 HBT、HCV 的相关性[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(1): 51-52.

[7] 季阳, 王迅, 郑忠伟, 等. 重新评估献血者 ALT 检测的意义[J]. 中国输血杂志, 2009, 22(7): 521-522.

[8] Notari EP, Orton SL, Cable RG, et al. Seroprevalence of known and putative hepatitis markers in United States blood donors with ALT levels at least 120 IU per L[J]. Transfusion, 2001, 41(6): 751-755.

[9] Yoshikawa A, Tom asaka D, Simasaku L, et al. Hepatitis B NST virus positive blood donors in the early and late stages of HBV infection: analyses of the window period and kinetics of HBV DNA [J]. Vox Sang, 2007, 88(1): 77-86.

[10] 胥加耕, 梅志锋, 袁中行. 盐都区 2012 年艾滋病哨点人群 HIV、梅毒及 HCV 监测结果[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(17): 2277-2278.

[11] 于佳妮, 王博, 景孟玲, 等. 山西地区健康成人血清 ALT 正常值参考范围的调查[J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2013, 7(2): 230-233.

[12] 高美霞, 肖建宇, 陈妍, 等. 无偿献血者 ALT 检测结果分析[J]. 临床输血与检验, 2007, 9(1): 64-65.

[13] 程颖, 李维, 程燃. 重庆市 2008~2012 年无偿献血者 HBsAg, ALT 及抗 HIV、抗 HCV、抗 TP 抗体检测结果的分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(10): 1297-1298.

(收稿日期: 2014-12-18)

of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer[J]. J Clin Invest, 2002, 110(5): 633-641.

[12] Seki R, Ohshima K, Fujisaki T, et al. Prognostic significance of S-phase kinase-associated protein 2 and p27kip1 in patients with diffuse large B-cell lymphoma: effects of rituximab[J]. Ann Oncol, 2010, 21(4): 833-841.

[13] Traub1 F, Mengel1 M, Hans J, et al. Prognostic impact of Skp2 and p27 in human breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 99(2): 185-191.

[14] Meng J, Ding Y, Yan MJ, et al. Overexpression of PPAR γ can down-regulate Skp2 expression in MDA-MB-231 breast tumor cells[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 345(1-2): 171-180.

[15] Theocharis S, Margeli A, Vielh P, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands as cell-cycle modulators [J]. Cancer Treat Rev, 2004, 30(5): 545-554.

(收稿日期: 2014-12-10)