

• 临床检验研究论著 •

PPAR $\gamma$  和 Skp2 在乳腺癌中的表达及临床意义

王贵生, 蒙杰

(广西医科大学附属第四医院检验科, 广西柳州 545005)

**摘要:**目的 探讨过表达过氧化物酶增殖物激活受体(PPAR $\gamma$ )对 Skp2 表达的调节作用,以及 PPAR $\gamma$  和 Skp2 在乳腺癌中的关系,进而解释 PPAR $\gamma$  在乳腺癌细胞中发挥生物学效应的机制,为肿瘤的特异疗法提供靶向作用。方法 采用 Western blot、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、细胞转染等技术研究 PPAR $\gamma$  和 Skp2 在乳腺癌中的关系。结果 PPAR $\gamma$  蛋白在乳腺癌中的表达明显低于乳腺癌旁组织,Skp2 蛋白在乳腺癌中的表达明显高于乳腺癌旁组织;过表达 PPAR $\gamma$  在 MDA-MB-231 细胞促进 Skp2 mRNA 和蛋白水平降低。结论 激活 PPAR $\gamma$  可能是治疗雌激素受体阴性乳腺癌的一种新途径。

**关键词:**乳腺肿瘤; 基因表达; PPAR $\gamma$ ; S 期激酶相关蛋白质类

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)09-1047-02

Clinical significance of PPAR $\gamma$  and Skp2 expression in human breast carcinoma

Wang Guisheng, Meng Jie

(Department of Clinical Laboratory, The Fourth Hospital Affiliated to Guangxi Medical University, Liuzhou, Guangxi 545005, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of peroxisome proliferators-activated receptor(PPAR $\gamma$ ) overexpression on Skp2 expression in breast cancer cell lines and correlations between PPAR $\gamma$  and Skp2 in progression of human breast cancer to supply diagnostic indicators for targeted treatment. **Methods** Western-blot, reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and transfection technique were used to study the relationship between PPAR $\gamma$  and Skp2. **Results** Expression level of PPAR $\gamma$  was lower, but of Skp2 was higher in human breast cancer than those in adjacent tissues. Overexpression of PPAR $\gamma$  could down-regulate the expression of Skp2 mRNA and protein in MDA-MB-231 cell. **Conclusion** Activation of PPAR $\gamma$  might serve as a new path for treatment of estrogen receptor negative breast carcinoma.

**Key words:** breast neoplasms; gene expression; PPAR gamma; S-phase kinase-associated proteins

2003 年美国哈佛大学医学院一项研究表明,高动物性脂肪饮食明显增加患乳腺癌风险<sup>[1]</sup>。国外报道还指出美国妇女多患乳腺癌与其膳食总热量 40% 来自脂肪及所摄取的总热量较高密切相关<sup>[2]</sup>。可见高脂肪饮食促进乳腺癌的发生。由此作者设想由于高脂肪饮食导致参与体内脂质代谢的调控因子及相关信号传导通路改变可能在乳腺癌发病中起重要作用。大量研究发现过氧化物酶增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR $\gamma$ ) 目标基因直接参与脂肪细胞的分化、成熟,并影响体内脂肪合成及蓄积,因而 PPAR $\gamma$  被认为是脂肪细胞系统调节的总开关<sup>[3-4]</sup>。

PPAR $\gamma$  属于核激素受体超家族成员,是一类由配体激活的核转录因子,与维甲酸 X 受体(RXR)形成功能性异二聚体,参与体内脂质、糖代谢等重要生理过程的调节。PPAR $\gamma$  生物学功能复杂多样,除调节脂肪细胞终末分化外,还能抑制炎症反应,诱导肿瘤细胞分化和凋亡,抑制肿瘤血管生成<sup>[5]</sup>。15-脱氧- $\Delta$ 12,14 前列腺素 J2(15d-PGJ2)和抗糖尿病药噻唑烷二酮(thiazolidindiones, TZD)分别是 PPAR $\gamma$  天然和合成配体。Troglitazone(Tro)是 PPAR $\gamma$  的一种合成配体,其已经显示了在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中以 PPAR $\gamma$  依赖的方式诱导细胞周期停滞和凋亡<sup>[6]</sup>。目前 PPAR $\gamma$  在调控肿瘤细胞增殖、分化中的作用日益受到关注,Suzuki 等<sup>[7]</sup>用免疫组化方法检测了 238 例人浸润性乳腺癌样品发现 PPAR $\gamma$  表达强度与肿瘤组织学分级呈负相关,与雌激素受体表达呈正相关,而与其他临床病理特征无关。因此,PPAR $\gamma$  已成为最有希望的肿瘤治疗靶点之一。

Skp2 是一种癌基因,其在某些肿瘤中扩增和过表达通常与肿瘤恶性程度相关。Skp2 致癌潜能已经在体内得以证实<sup>[8-9]</sup>。Signorette 等<sup>[9]</sup>已证实 Skp2 在雌激素受体(ER)和人

表皮生长因子受体 2(HER-2)均阴性的乳腺癌中或在原发性、局部复发性和转移性乳腺癌中高表达。本文主要从组织、细胞和分子水平等方面研究 PPAR $\gamma$  和 Skp2 在乳腺癌中的表达和临床意义。

## 1 资料与方法

**1.1 细胞株** 人类正常乳腺上皮细胞株 HBL-100 和乳腺癌细胞株 MCF-7(ER+),MDA-MB-231(ER-),MDA-MB-435(ER-)由上海复旦大学肿瘤医院乳腺癌研究所惠赠。

**1.2 组织标本** 8 对人乳腺癌及癌旁新鲜组织来自南通大学附属医院普外科乳腺癌患者。

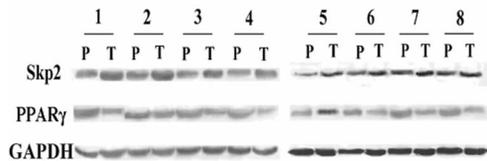
**1.3 Western blot 检测蛋白表达** 提取细胞总蛋白,定量后与上样缓冲液按比例混匀,100 °C 5 min,8%SDS-PAGE 电泳后电转移至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入一抗,4 °C 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。加入二抗,37 °C 孵育 45 min,TBST 洗涤 3 次,每次 15 min,在暗室中压片,然后显影、定影。

**1.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 mRNA 表达** 分别提取总 RNA,定量后进行 RT-PCR,以 GAPDH 为内参,PPAR $\gamma$  上游引物序列 5'-GCC CTG AAA GAT GCG GAT GG-3',下游引物序列 5'-GAT GCC ACA GGC CGA GAA GG-3',PCR 条件:94 °C 预变性 3 min,然后 94 °C 变性 40 s,58 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,30 个循环后再 72 °C 终末延伸 7 min;Skp2 上游引物序列 5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG-3',下游引物序列 5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3',PCR 条件:94 °C 预变性 3 min,然后 94 °C 变性 40 s,58.5 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,30 个循环后再 72 °C 终末延伸 7 min。取产物进行琼脂糖凝胶电泳。

**1.5 统计学处理** 所有实验重复 3 次, 所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 STATA7.0 统计软件处理数据, 使用单因素方差分析进行 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 PPAR $\gamma$  和 Skp2 在 8 对人乳腺癌及癌旁新鲜组织中的表达** 在 8 对乳腺癌组织中 PPAR $\gamma$  蛋白表达水平有 7 对明显低于相对应癌旁组织, 而 Skp2 蛋白在乳腺癌中的表达水平明显高于相对应癌旁组织(图 1)。



T: 乳腺癌组织; P: 相对应癌旁组织; GAPDH: 内参对照。

图 1 人乳腺癌及癌旁新鲜组织中 PPAR $\gamma$  和 Skp2 的表达

**2.2 PPAR $\gamma$  和 Skp2 在正常乳腺上皮细胞和乳腺癌细胞中的表达** PPAR $\gamma$  在 MDA-MB-231(ER-) 乳腺癌细胞中的表达明显低于 MCF-7(ER+) 乳腺癌细胞, 因此, 在后续实验中作者选取 PPAR $\gamma$  表达较低的 MDA-MB-231 细胞进行转染。而 Skp2 在 ER- 乳腺癌细胞中的表达明显高于 ER+ 细胞的表达(图 2)。

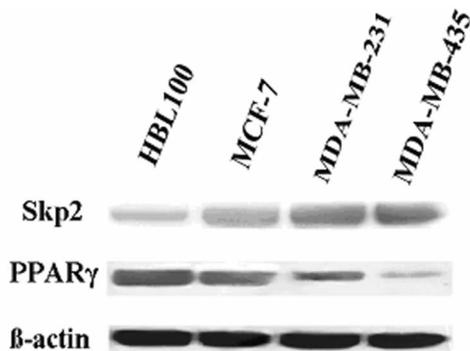


图 2 Western blot 检测乳腺上皮细胞和乳腺癌细胞中 PPAR $\gamma$  和 Skp2 的表达

**2.3 PPAR $\gamma$  对 Skp2 表达的调节作用** 过表达 PPAR $\gamma$  在 MDA-MB-231 细胞促进 Skp2 mRNA 和蛋白水平降低, 转染 Myc-PPAR $\gamma$  后 Skp2 mRNA 和蛋白水平相对于转染空质粒均降低; 在经 5  $\mu$ M Tro 处理的 Myc-PPAR $\gamma$  转染细胞中 Skp2 mRNA 和蛋白水平降低更明显(图 3)。

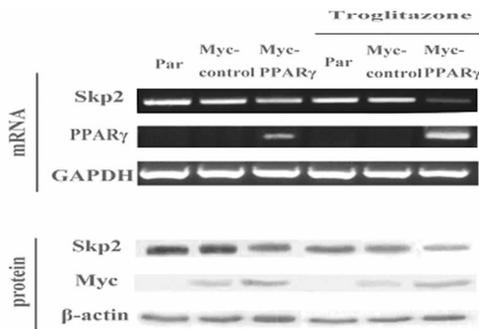


图 3 过表达 PPAR $\gamma$  在 MDA-MB-231 细胞促进 Skp2 mRNA 和蛋白水平降低

**3 讨 论**

PPAR $\gamma$  是一类由配体激活的核转录因子, 属于核激素受体超家族成员, 其主要表达在脂肪组织中。近年来发现 PPAR $\gamma$  也表达在肿瘤中包括乳腺癌。用 PPAR $\gamma$  配体包括

15d-PGJ2 和 TZD(如 Tro) 处理乳腺癌细胞, 能够抑制癌细胞的生长<sup>[10]</sup>。PPAR $\gamma$  专一的抑制细胞的生长是通过诱导 CDKI 和减弱细胞周期相关转录因子(E2F)的转录活性<sup>[11]</sup>。有研究表明在多发性骨髓瘤细胞中过表达 PPAR $\gamma$  能够减少增殖和诱导凋亡<sup>[12]</sup>。作者发现增加 PPAR $\gamma$  的表达能够抑制乳腺癌细胞的增殖和诱导凋亡甚至在缺少外源性配体的情况下, 那么存在外源性 PPAR $\gamma$  配体 Tro 的时候细胞过表达 PPAR $\gamma$  能够明显抑制细胞的增殖和诱导凋亡, 进一步支持了 PPAR $\gamma$  在调节乳腺癌细胞生长方面扮演重要的角色。

有研究表明 PPAR $\gamma$  配体 Tro 的肿瘤抑制活性可能牵涉到抑制 Skp2 信号。Skp2 转染胃癌细胞能够耐受放线菌素诱导的凋亡。本研究结果显示, 过表达 PPAR $\gamma$  在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中能够降低 Skp2 mRNA 和蛋白的表达, 尤其是经 Tro 处理后这种效应更加明显, 因此, PPAR $\gamma$  和 Skp2 可能将成为治疗乳腺癌新的靶标, 通过激活 PPAR $\gamma$  使其发挥抑制癌基因的表达和诱发癌细胞凋亡的作用, 为治疗雌激素受体阴性乳腺癌提供一种新途径。

**参考文献:**

- [1] Cho E, Spiegelman D, Hunter DJ, et al. Premenopausal fat intake and risk of breast cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2003, 95(14): 1079-1085.
- [2] Winters BL, Mitchell DC, Smiciklas-Wright H, et al. Dietary patterns in women treated for breast cancer who successfully reduce fat intake; the Women's Intervention Nutrition Study(WINS)[J]. J Am Diet Assoc, 2004, 104(4): 551-559.
- [3] Fontaine C, Dubois G, Duguay Y, et al. The orphan nuclear receptor Rev-Erba1 is a peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR) gamma target gene and promotes PPARgamma-induced adipocyte differentiation[J]. J Biol Chem, 2003, 278(39): 37672-37680.
- [4] Rosen ED, Hsu CH, Wang X, et al. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma; a unified pathway[J]. Genes Dev, 2002, 16(1): 22-26.
- [5] Chen YX, Zhong XY, Qin YF, et al. 15d-PGJ2 inhibits cell growth and induces apoptosis of MCG-803 human gastric cancer cell line[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(10): 2149-2153.
- [6] 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.
- [7] Suzuki T, Hayashi S, Miki Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human breast carcinoma; a modulator of estrogenic actions[J]. Endocr Relat Cancer, 2006, 13(1): 233-250.
- [8] Gstaiger M, Jordan R, Lim M, et al. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers[J]. Proc Natl Acad, 2001, 98(9): 5043-5048.
- [9] Signoretto S, Di-Marcotullio L, Richardson A, et al. Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer[J]. J Clin Invest, 2002, 110(5): 633-641.
- [10] Koutnikova H, Auwerx J. PPARgamma, an X-ceptor for Xs[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 967: 28-33.
- [11] 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.
- [12] Garcia-Bates TM, Bernstein SH, Phipps RP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression suppresses growth and induces apoptosis in human multiple myeloma cells[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(20): 6414-6425.