

## · 短篇论著 ·

## 曲格列酮对绒癌 JEG-3 细胞凋亡的作用

孟君 李淑娟 常子强

**【摘要】** 目的 探讨过氧化物酶体增殖物激活型受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 及配体曲格列酮(TGZ)对绒癌 JEG-3 细胞系凋亡的作用。方法 通过 Hoechst 33258 染色和透射电镜观察 PPAR $\gamma$  激动配体 TGZ 作用后细胞形态变化,流式细胞仪检测细胞凋亡的改变。结果 Hoechst 染色及透射电镜观察到典型的凋亡细胞形态,流式细胞仪检测结果显示,细胞经不同浓度 TGZ 处理后凋亡率明显增加,与对照比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且呈剂量依赖性关系。结论 PPAR $\gamma$  激动配体 TGZ 可诱导绒癌 JEG-3 细胞发生凋亡,为今后进一步研究 PPAR $\gamma$  及配体在绒癌治疗中可能的临床应用提供了理论依据和实验基础。

**【关键词】** PPAR $\gamma$ ; 配体; 细胞凋亡; 曲格列酮

过氧化物酶体增殖物激活型受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, PPAR $\gamma$ ) 是配体依赖的核转录因子,研究发现 PPAR $\gamma$  被配体激活后在转录水平上抑制多种肿瘤和细胞的恶性增殖、侵袭、分化和凋亡<sup>[1-3]</sup>。Keelan 等<sup>[4]</sup> 研究证实,PPAR $\gamma$  天然配体 15-脱氧-前列腺素 J2 [15-Deoxy-Delta (12, 14)-prostaglandin J (2), 15-d-PGJ2] 可诱导绒癌 JEG-3 细胞系发生凋亡。本研究通过荧光染色及透射电镜观察,流式细胞测定分析研究 PPAR $\gamma$  及配体曲格列酮 (troglitazone, TGZ) 诱导绒癌 JEG-3 细胞凋亡的情况,以探讨其对绒癌凋亡的作用,为今后进一步研究 PPAR $\gamma$  及配体在绒癌治疗中的可能的临床应用提供理论依据和实验基础。

## 一、材料与方法

1. 实验对象:绒癌 JEG-3 细胞株购自中国医学科学院细胞库。

2. 主要试剂和仪器:PPAR $\gamma$  激动配体 TGZ 购自美国 Cayman 公司,溶于二甲基亚砜中制成原液, -20 °C 保存,FD 培养基购自 Hyclon 公司,Hoechst 33258 染色试剂盒购自碧云天生物试剂公司,流式检测试剂盒购自美国 BD 公司,流式细胞仪为美国 BD 公司产品,倒置荧光显微镜及透射电镜为日本 Olympus 公司产品。

3. 细胞培养:绒癌 JEG-3 细胞接种于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素的 FD (F12: DMEM = 1:1) 培养液中,置 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,待培养液变黄后换液,按 1:2 传代,取对数生长期细胞进行实验。

4. 细胞凋亡的诱导:取对数生长期细胞,分为对照组和实验组,实验组分别加入浓度为 0.1  $\mu$ mol/L、1  $\mu$ mol/L 和 10  $\mu$ mol/L 的 TGZ,作用 24 h 后诱导细胞凋亡。

5. 细胞凋亡-Hoechst 染色:取对数生长期的细胞接种在 24 孔培养板上,待细胞长成单层后,加入处理因素培养 24 h 后弃掉培养液,加入 0.5 ml 固定液固定 10 min,用 PBS 洗 2 次,每次 3 min,吸尽液体加入 0.5 ml Hoechst 33258 染色液,染色 5 min,滴抗荧光淬灭封片剂,置倒置荧光显微镜下观察并摄片。

6. 透射电镜检测: TGZ 处理细胞 24 h 后,收集细胞,用 2.5% 戊二醛固定 2 h, PBS 洗 3 次, 10 min/次,接着用 1% 四氧化锇 4 °C 固定 15 ~ 30 min,再用梯度 (50% ~ 100%) 丙酮脱水,经过浸透,包埋,修块后制备切片,电子染色后置透射电镜下观察凋亡细胞并摄片。

7. 流式细胞仪测定:实验使用 TGZ 浓度分别为 0 (对照组)、0.1  $\mu$ mol/L、1  $\mu$ mol/L 和 10  $\mu$ mol/L,每一浓度设 6 个复孔,处理细胞 24 h 后,细胞先用 0.25% 胰蛋白酶消化,制成单个细胞悬液调整细胞的密度为  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  个/ml,取 1 ml 细胞以 1000 r/min (离心机半径 10 cm) 4 °C 离心 10 min,后弃上清,加 1 ml 冷的 PBS 使细胞悬浮,再离心 10 min 后去上清,重复上述步骤两次。将细胞重悬浮于 200  $\mu$ l 流式缓冲液,加 10  $\mu$ l Annexin-V-FITC (荧光素 FITC 标记的膜联蛋白 V) 和 5  $\mu$ l 碘化丙啶 (PI) 混匀避光室温反应 15 min,加 300  $\mu$ l 流式缓冲液后立即上流式细胞仪检测。

8. 统计学分析:实验所得数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 二、结果

1. Hoechst 33258 荧光染色观察结果:对照组:荧光染色下见正常细胞核较大,染色质分布均匀,呈弥散微弱均匀荧光(图 1A); TGZ 处理组:荧光染色下见部分细胞核固缩变小,细胞核呈致密浓染,部分染色质边缘化,或呈碎块状,可见浓染致密颗

粒块状荧光以及明显核形态变化(图1B)。

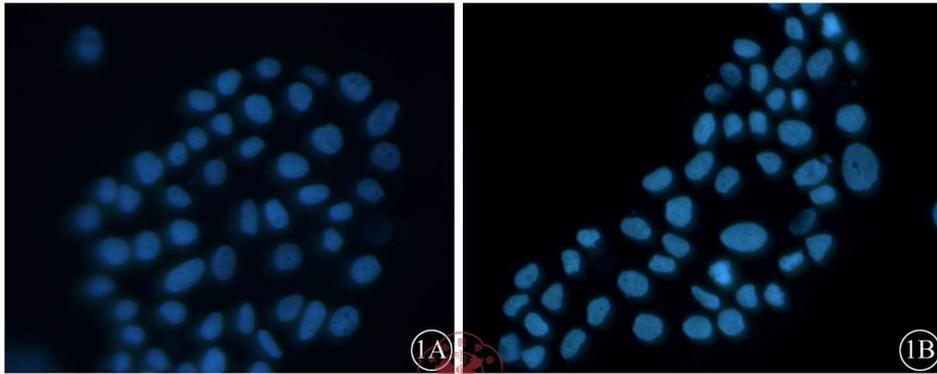


图1 Hoechst 33258荧光染色( $\times 200$ ) 1A: 对照组; 1B: 10  $\mu\text{mol/L}$  TGZ处理组

2. 透射电镜观察结果:正常细胞可见胞膜表面有微绒毛,核染色质均匀、松散的分布在细胞核内(图2A);而经过 PPAR $\gamma$  激动配体 TGZ 处理后,部分绒癌 JEG-3 细胞出现凋亡,电镜下观察到凋亡细胞体积缩小,胞膜表面微绒毛消失,核膜断裂,细胞核染色质浓缩,密度增加,聚集成境界分明的块状(图2B)。

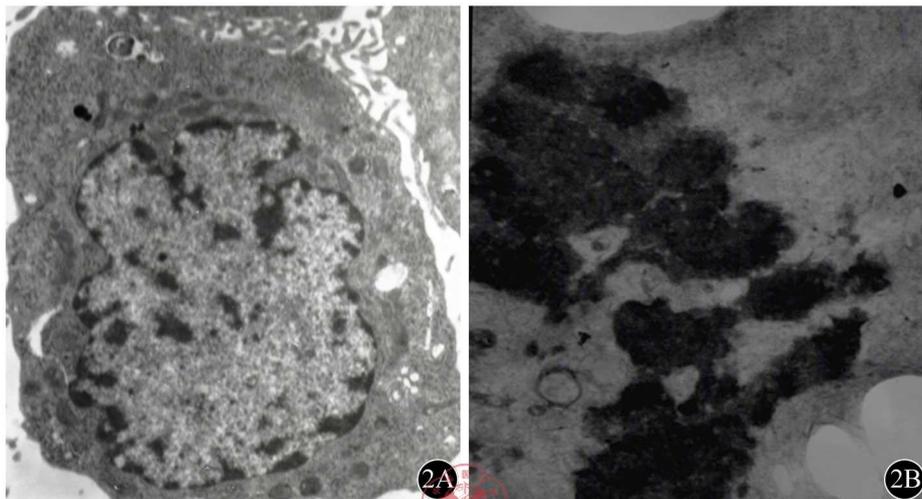


图2 透射电镜观察( $\times 8000$ ) 2A: 对照组; 2B: 10  $\mu\text{mol/L}$  TGZ处理组

3. 流式细胞仪检测:本实验使用 Annexin-V-FITC/PI 双染流式细胞仪进行检测,能区分正常细胞、早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞及坏死细胞。图3中流式细胞图左下象限(LL)表示正常细胞百分率,右下象限(LR)表示早期凋亡细胞,左上(UL)及右上(UR)象限认为是晚期凋亡和坏死细胞。本研究仅对各实验组早期凋亡(LR)的结果进行统计分析。绒癌 JEG-3 细胞经不同浓度 TGZ 处理 24 h 后,细胞凋亡率明显增加,当 TGZ 浓度为 0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  时,流式检测细胞凋亡率分别为(2.87  $\pm$  0.37)%、(7.73  $\pm$  0.77)% 和 (14.54  $\pm$  1.19)%,与对照组凋亡率(0.77  $\pm$  0.07)% 比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。且随着 TGZ 浓度的增加,细胞凋亡率也逐渐增加,具有剂量依赖关系。

### 三、讨论

细胞凋亡是在多基因调控下主动的自杀过程,又称为细胞的程序性死亡,具有特殊的形态学和生化学特征,其生物学意义是在发育中清除多余的、有害的和已完成任务的细胞,并参与免疫系统的发育和克隆选择等<sup>[5]</sup>。目前,对细胞凋亡的研究已达到分子水平,揭示了不同基因及其产物的调控以及细胞因子等信号传递系统的正负调节<sup>[6]</sup>。肿瘤细胞凋亡的减少助长了肿瘤的恶性生长,放化疗的抗肿瘤机制体现在诱导肿瘤细胞的凋亡上<sup>[7]</sup>。绒癌是滋养细胞异常增生引起的恶性疾病,许多化学药物对滋养细胞的杀伤作用可能是通过诱导滋养细胞凋亡实现的<sup>[8-10]</sup>。因此,进一步研究 PPAR $\gamma$  及配体与绒癌细胞凋亡的关系具有重要意义。

PPAR $\gamma$  属于核激素受体(nuclear hormone receptor)超家族的新成员,是由配体激活的转录因子,PPAR $\gamma$  配体包括天然配体及合成配体,其中 TGZ 为其合成激动配体,与 PPAR $\gamma$  结合活性较强,也是研究较多的配体。PPAR $\gamma$  被配体激活后,在转录水平上抑制多种细胞的增殖、侵袭、分化和凋亡。研究亦表明,PPAR $\gamma$  配体 TGZ 可诱导内皮细胞产生 caspase 依赖性的细胞凋亡,高水平表达 PPAR $\gamma$  的人脂肪肉瘤,用 PPAR $\gamma$  特异性配体激活后细胞周期受抑并出现末端分化; PPAR $\gamma$  配体还通过 P63

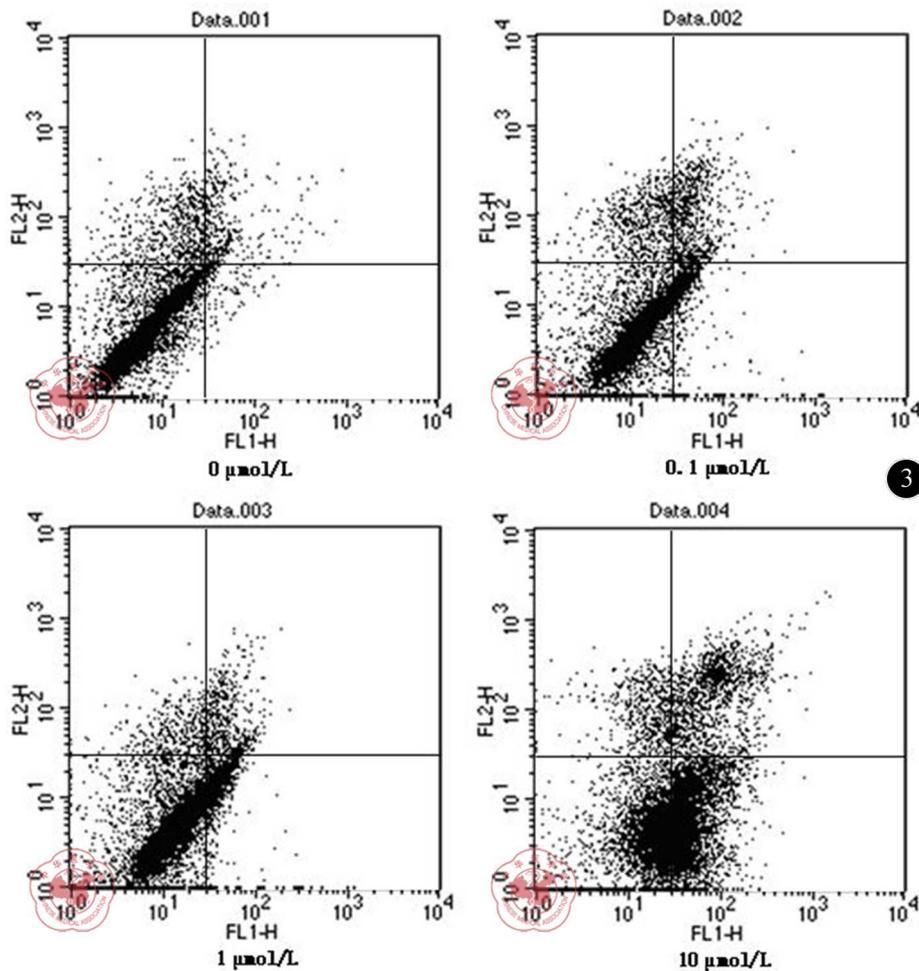


图3 不同浓度TGZ作用24 h后JEG-3细胞凋亡变化

和 P73 途径诱导人卵巢癌细胞系发生凋亡<sup>[11]</sup>; PPAR $\gamma$  配体亦参与了肝癌 HepG2 细胞发生凋亡的过程<sup>[12]</sup>。这些研究都说明 PPAR $\gamma$  的激活与细胞凋亡有关,值得深入研究。

本研究使用绒癌 JEG-3 细胞进行绒癌细胞凋亡的相关研究,应用不同浓度的 PPAR $\gamma$  激动配体 TGZ 刺激培养的绒癌 JEG-3 细胞,通过流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化,并通过 Hoechst 33258 染色和透射电镜从形态学上进一步观察其对滋养细胞凋亡的影响,初步探明了 PPAR $\gamma$  及配体 TGZ 对滋养细胞凋亡的调节作用。流式细胞检测结果显示,随着 TGZ 浓度从 0.1 增加到 10  $\mu\text{mol/L}$  细胞凋亡率明显增加,呈剂量依赖性关系,Hoechst 33258 染色和透射电镜结果亦显示,JEG-3 细胞经 TGZ 处理后,部分细胞出现明显的凋亡形态改变。以上结果提示,PPAR $\gamma$  激动配体 TGZ 可诱导绒癌细胞发生凋亡。

滋养细胞疾病与滋养细胞凋亡异常密切相关,关于滋养细胞凋亡及其相关基因的研究具有广阔前景。PPAR $\gamma$  被配体激活在多种细胞系中促进细胞凋亡的观点越来越受到重视,本研究证实 PPAR $\gamma$  被配体激活后可诱导绒癌滋养细胞发生凋亡,通过本实验为今后进一步研究 PPAR $\gamma$  及配体在绒癌临床治疗中的应用提供理论依据和实验基础。

#### 参 考 文 献

- [1] Takada I, Kato S. PPARs target genes. *Nippon Rinsho*, 2005, 63: 573-577.
- [2] Kopij M, Rapak A. The role of nuclear receptors in cell death. *Postepy Hig Med Dosw*, 2008, 62: 571-581.
- [3] Okumura T. *Nippon Rinsho*. Anti-cancer action by PPAR $\gamma$  ligand. *Nippon Rinsho*, 2010, 68: 267-272.
- [4] Keelan JA, Sato TA, Marvin KW, et al. 15-Deoxy-Delta (12, 14)-prostaglandin J(2), a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, induces apoptosis in JEG3 choriocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 262: 579-585.
- [5] He X, Wei C, Song T, et al. Proliferating cell nuclear antigen destabilizes c-Abl tyrosine kinase and regulates cell apoptosis in response to DNA damage. *Apoptosis*, 2009, 14: 268-275.
- [6] Lalier L, Carton PF, Juin P, et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis*, 2007, 12: 887-896.
- [7] 刘钢, 史火喜, 袁义能, 等. 凋亡抑制基因 Survivin 在甲状腺癌组织中的表达及意义[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5:

840-843.

- [8] 王涛,安瑞芳,王姝. 生存素在5-氟尿嘧啶诱导人绒癌细胞株JAR凋亡中的作用. 西安交通大学学报:医学版,2008,29:315-317.
- [9] Munir S, Xu G, Wu Y, et al. Nodal and ALK7 inhibit proliferation and induce apoptosis in human trophoblast cells. J Biol Chem, 2004, 279: 31277-31286.
- [10] Rak-Mardyla A, Gregoraszcuk E. Effect of ghrelin on proliferation, apoptosis and secretion of progesterone and hCG in the placental JEG-3 cell line. Reprod Biol, 2010, 10: 159-165.
- [11] Kim S, Lee JJ, Heo DS. PPAR $\gamma$  ligands induce growth inhibition and apoptosis through p63 and p73 in human ovarian cancer cells. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 406: 389-395.
- [12] Maggiora M, Oraldi M, Muzio G, et al. Involvement of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  in apoptosis and proliferation of human hepatocarcinoma HepG2 cells. Cell Biochem Funct, 2010, 28: 571-577.

(收稿日期:2011-05-10)

(本文编辑:戚红丹)

孟君,李淑娟,常子强. 曲格列酮对绒癌JEG-3细胞凋亡的作用[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2011,5(16):4885-4888.