

# PPAR $\alpha$ 活化增加肿瘤细胞对 EGCG 的敏感性的机制

罗居东<sup>1,2</sup>, 薛姣<sup>1</sup>, 葛欣<sup>1</sup>, 葛杨杨<sup>1</sup>, 曹建平<sup>1</sup>, 张舒羽<sup>1</sup>

1. 苏州大学医学部放射医学与防护学院; 江苏放射医学与防护重点实验室, 江苏苏州 215123

2. 苏州大学附属常州肿瘤医院放疗科, 江苏常州 213001

**摘要** 研究探索表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是否调节 PPAR $\alpha$  以及 PPAR $\alpha$  活化对 EGCG 的肿瘤抑制作用影响及其机制。首先利用 CCK-8 试剂盒检测细胞存活率, 之后分别采用 western blotting 和 real-time PCR 检测蛋白质和 mRNA 表达水平; 采用 PPAR $\alpha$  的特异性激动剂和特异性拮抗剂来改变 PPAR $\alpha$  的表达; 应用荧光素酶报告基因系统及染色质免疫共沉淀研究 PPAR $\alpha$  对 HO-1 的调控。结果表明, 随着 EGCG 浓度的增加, PANC1 和 A2780 细胞的存活率逐渐下降。当 EGCG 处理肿瘤细胞后, PPAR $\alpha$  蛋白水平会随着 EGCG 剂量的提高而增加。PPAR $\alpha$  的特异性激动剂—氯贝特(clofibrate)能增加胰腺癌 PANC1 和卵巢癌 A2780 细胞对 EGCG 的敏感性, 其机制是氯贝特能够抑制细胞保护性血红素加氧酶-1(HO-1)的诱导。荧光素酶报告基因实验和染色质免疫共沉淀实验(ChIP)表明, 活化的 PPAR $\alpha$  能结合到 HO-1 启动子上的 PPAR 结合元件(PPRE)上并抑制 HO-1 的表达。研究表明, PPAR $\alpha$  的活化能在转录水平对 HO-1 进行负调控, 同时增加肿瘤细胞对 EGCG 的敏感性。

**关键词** 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG); 过氧化物酶体增殖物活化受体  $\alpha$ (PPAR $\alpha$ ); 血红素加氧酶-1(HO-1); 增敏; 抗氧化

**中图分类号** R73.58

**文献标志码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2013.27.002

## Mechanism of Sensitizing Effect of PPAR $\alpha$ Activation on Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in Cancer Cells

LUO Judong<sup>1,2</sup>, XUE Jiao<sup>1</sup>, GE Xin<sup>1</sup>, GE Yangyang<sup>1</sup>, CAO Jianping<sup>1</sup>, ZHANG Shuyu<sup>1</sup>

1. School of Radiation Medicine and Protection; Jiangsu Provincial Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu Province, China

2. Department of Radiotherapy, Changzhou Tumor Hospital, Soochow University, Changzhou 213001, Jiangsu Province, China

**Abstract** Whether epigallocatechin-3-gallate (EGCG) regulates the expression of PPAR $\alpha$  and the effect of PPAR $\alpha$  on EGCG sensitivity. Firstly, CCK-8 kit was used to detect cell viability. Western blotting and real-time PCR was used to measure the protein and mRNA level, respectively. PPAR $\alpha$  agonist clofibrate and inhibitor GW6471 were used to alter PPAR $\alpha$  expression. Luciferase reporter system and chromatin immunoprecipitation (ChIP) were used to investigate the effect of PPAR $\alpha$  on HO-1 expression. EGCG inhibits the viability of cancer cell in a dose-dependent manner. When cancer cells were exposed to EGCG, the expression of PPAR $\alpha$  was increased at the protein level in a dose-dependent manner. The PPAR $\alpha$  agonist clofibrate attenuated heme oxygenase (HO-1) induction and sensitized cancer cells to EGCG-induced cell death. However, the PPAR $\alpha$  inhibitor GW6471 increased HO-1 expression. *In vivo* chromatin immunoprecipitation (ChIP) confirmed that PPAR $\alpha$  interacts with the peroxisome proliferator-responsive sequence of the HO-1 promoter. These results indicate that PPAR $\alpha$  is a direct negative regulator of HO-1 activation by EGCG and confers cell susceptibility to EGCG.

**Keywords** epigallocatechin-3-gallate (EGCG); peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ); heme oxygenases-1 (HO-1); sensitivity; anti-oxidative

收稿日期: 2012-12-21; 修回日期: 2013-07-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(81172597, 81102078); 《科技导报》博士生创新研究资助计划(kjdb200902-2); 常州市科技支撑-社会发展项目(CE20125026)

作者简介: 罗居东, 博士研究生, 研究方向为放射生物学, 电子信箱: 756035311@qq.com; 张舒羽(通信作者), 副教授, 研究方向为放射生物学, 电子信箱: zhang.shuyu@hotmail.com

## 0 引言

茶是日常生活中使用量最大的饮料之一。茶树栽培和茶叶加工源于中国,中国也是世界主要产茶国之一<sup>[1]</sup>。表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是绿茶多酚提取物儿茶素的主要成分,通过诱导人肺癌、胃癌、大肠癌、前列腺癌、白血病、鼻咽癌等多种肿瘤细胞凋亡从而抑制肿瘤细胞的生长<sup>[2]</sup>。基于EGCG的抗癌活性,目前人们已经把EGCG作为一种预防肿瘤的预防药物并进行广泛研究和探索。细胞实验、动物模型以及人类流行病学的研究均表明,绿茶中的这种多酚提取物可以预防多种癌症<sup>[3]</sup>。EGCG的抗肿瘤效应与其抗氧化活性及凋亡诱导能力有关<sup>[4]</sup>。

EGCG能够抗氧化,是由于多酚类物质的存在。多酚类物质对氧化十分敏感并可产生苯醌类物质。EGCG能够使氧化应激相关的酶类水平增加,例如谷氨酸半胱氨酸连接酶、超氧化物歧化酶(SOD)以及血红素加氧酶-1(HO-1)等<sup>[5]</sup>。HO-1又名热休克蛋白32(HSP32),主要由诱导产生,是一种重要的由氧化应激诱导产生的细胞保护酶<sup>[6]</sup>。HO-1可被血红素、金属离子、氧化应激、紫外照射、化学物质、高温等因素诱导表达<sup>[7]</sup>。在绿茶的各种组成成分中,EGCG具有最强的HO-1诱导能力,通过转录因子Nrf-2诱导HO-1的表达<sup>[8]</sup>。

过氧化物酶体增殖物活化受体(PPAR)是一种核受体,它作为核受体超家族的一员,1990年由Issemann等发现<sup>[9]</sup>,它能参与多种代谢活动和细胞功能的调节<sup>[10]</sup>。PPAR已发现3种不同的亚型(PPAR $\alpha$ ,PPAR $\beta$ ,PPAR $\gamma$ ),它们之间有较高的序列同源性和共同的结构特征。由于靶基因和组织分布的差异,这3种类型的过氧化物酶体增殖物活化受体具有不同的生理功能。PPAR $\alpha$ 在脂类代谢、脂肪酸氧化、葡萄糖内稳态和炎症反应等过程中发挥很重要的作用。PPAR $\alpha$ 通过与维甲酸X受体形成异二聚体并与靶基因上PPAR $\alpha$ 的结合元件(PPRE)相结合来调节靶向基因的转录水平。HO-1的上游启动子序列中含有两段PPAR结合元件。在血管内皮细胞中,

HO-1是PPAR $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ 的靶基因<sup>[11]</sup>。有报道,PPAR $\alpha$ 和HO-1在抵抗氧化应激引起的细胞凋亡的过程中均具有至关重要的作用<sup>[12]</sup>。EGCG是否调节PPAR $\alpha$ ,以及PPAR $\alpha$ 活化对EGCG的肿瘤抑制效果的影响尚未见报道。

本研究探索PPAR $\alpha$ 活化是否调节肿瘤细胞对EGCG的敏感性及其机制,通过荧光素酶报告基因检测、染色质免疫共沉淀、免疫印迹、荧光定量PCR等实验,研究EGCG是否调节PPAR $\alpha$ ,以及PPAR $\alpha$ 活化对EGCG的肿瘤抑制作用的影响及其机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

含有HO-1启动子(相对于翻译起始位点-1724~+16)的荧光素酶报告基因载体由上海翰宇生物科技有限公司合成。氯贝特和GW6471购于Sigma-Aldrich公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细胞培养

胰腺PANC1细胞培养使用DMEM培养基,卵巢癌A2780细胞培养使用RPMI1640培养基(均添加10%胎牛血清、100单位/mL青霉素G和100单位/mL链霉素)。细胞培养于37°C、含有5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中。

#### 1.2.2 RNA提取合成及实时荧光定量PCR

按照Trizol试剂进行总RNA的提取,采用1mL Trizol试剂裂解细胞后加入200 $\mu$ L氯仿,剧烈振荡15s后,室温静置15min。离心收集上清,加入500 $\mu$ L异丙醇并混匀,室温静置10min后离心获取RNA沉淀。以70%乙醇洗涤两次,真空干燥RNA沉淀,最后溶于20 $\mu$ L去离子水。紫外分光光度计测定OD<sub>260</sub>值并计算RNA浓度。

cDNA合成:总RNA5 $\mu$ g、Oligo dT引物1 $\mu$ L、逆转录酶1 $\mu$ L、dNTP混合物2 $\mu$ L、RnaseA抑制剂1 $\mu$ L,补水至20 $\mu$ L,上述混合物于42°C反应1h后,置于冰上待用;实时荧光定量PCR反应引物如表1所示。

表1 实时荧光定量PCR反应引物

Table 1 Real-time quantitative PCR primer sequences

基因	正向引物	反向引物
内参 GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'
PPAR $\alpha$	5'-CAATGCACTGGAAGTGGATG-3'	5'-AAGATATCGTCCGGGTGCTT-3'

实时荧光定量PCR结果分析:根据Ct值计算目的基因PPAR $\alpha$ 相对于内参GAPDH基因的表达式。

### 1.2.3 细胞存活检测

为研究药物EGCG、氯贝特和GW6471对胰腺癌PANC1细胞和卵巢癌A2780细胞生长的影响,收集细胞,调整细胞悬液浓度,每孔加100 $\mu$ L,铺96孔板使待测细胞浓度1 $\times$ 10<sup>4</sup>/孔;细胞生长24h后分别加入0.50、100 $\mu$ mol/L的EGCG、200 $\mu$ mol/L氯贝特或5 $\mu$ mol/L GW6471等药物分别处理PANC1和A2780细胞24h后,收集细胞用CCK-8试剂检测

PANC1和A2780细胞的相对存活率(对照组细胞存活率设为100%)。采用96孔酶标仪测定结果。细胞存活率=实验组OD值/对照组OD值。

### 1.2.4 细胞转染及荧光素酶报告基因检测

细胞转染采用Lipofectamine 2000转染试剂。为了研究EGCG诱导的PPAR $\alpha$ 是否调节HO-1的转录,将HO-1转录起始位点上游的启动子片段克隆到荧光素酶基因上游,以此检测PPAR $\alpha$ 活化对HO-1的转录的影响。将含有HO-1启动子的荧光素酶报告基因质粒转入胰腺癌PANC1细胞后,分别加入DMSO(空白组)、100 $\mu$ mol/L EGCG、

200 $\mu\text{mol/L}$  氯贝特、100 $\mu\text{mol/L}$  EGCG 联合 200 $\mu\text{mol/L}$  氯贝特 孵育细胞 24h。荧光素酶报告基因检测采用 Promega 公司双 荧光报告基因检测试剂盒进行,启动子的转录活性根据萤火虫 荧光素酶和海肾荧光素酶活性的比值校正转染效率后计算。

1.2.5 染色质免疫共沉淀实验

染色质免疫共沉淀实验按照 Upstate 公司 EZ CHIP 试剂 盒说明进行。

PCR 引物序列为:上游引物 5'-CATCACCAGACCCGA- GACAGA-3';下游引物 5'-AGAGGCTACCCAGCCTTTT-3'。

1.2.6 免疫印迹 (western blotting)

用 0、50 或 100 $\mu\text{mol/L}$  EGCG 处理细胞后孵育 24h, 收集 细胞, 加入细胞裂解液裂解细胞, Bradford 法测定蛋白浓度。 99 $^{\circ}\text{C}$  蛋白变性 5min, 取等量蛋白上样, 进行 SDS-PAGE 电泳。 电泳完成后将蛋白转移到 PVDF (聚偏氟乙烯) 膜上, 5% 脱脂 奶粉封闭, 加入一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; 加入二抗, 孵育 1h, 加入 ECL (化学发光试剂) 显色、显影、曝光, 检测 PPAR $\alpha$  的蛋白相 对表达量。

一抗, HO-1; Goat polyclonal; Nrf2; Rabbit polyclonal IgG; PPAR $\alpha$ : Rabbit polyclonal IgG; GAPDH: Mouse monoclonal IgG; 购于 Santa Cruz 公司, 美国。

二抗, Goat-anti Mouse HRP-IgG; Donkey-anti Goat HRP- IgG; Mouse-anti Rabbit HRP-IgG; 购于 Santa Cruz 公司, 美国。

1.2.7 统计学分析

所有试验重复 3 次以上。实时荧光定量 PCR 结果均分别 校正内参 GAPDH 表达量。组间数据采用 Student's *t* 检验比 较; 两组以上数据用 ANOVA 方法比较。统计学分析用 SPSS 软件分析。若  $P < 0.05$ , 则考虑数据有统计学意义。

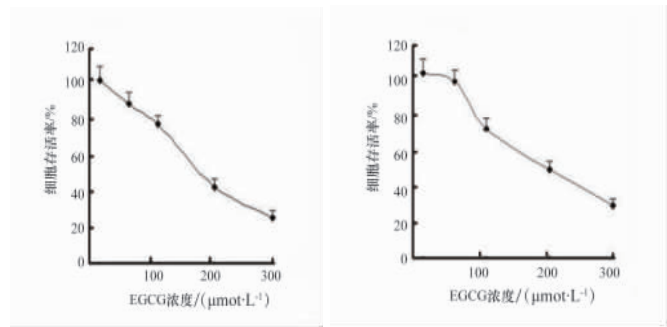
2 实验结果

2.1 EGCG 诱导肿瘤细胞中 PPAR $\alpha$  的表达

CCK-8 试剂检测 0~200 $\mu\text{mol/L}$  EGCG 对 PANC1 和 A2780 细胞的相对存活率 (对照组细胞存活率设为 100%)。EGCG 对 于 PANC1 和 A2780 细胞的抑制作用呈现浓度依赖的趋势 (图 1(a)、(b))。在 PANC1 及 A2780 细胞中, 随着 EGCG 浓度 的增加, 细胞存活率逐渐降低。

为检测 EGCG 处理肿瘤细胞后 PPAR $\alpha$  的表达水平, 采 用 western blotting 方法检测 PPAR $\alpha$  的蛋白表达量。如图 2(a) 所示, 在胰腺癌 PANC1 细胞中, 当 EGCG 浓度由 0 增加至 50 $\mu\text{mol/L}$  时, PPAR $\alpha$  蛋白表达量有所增加; 当浓度增加至 100 $\mu\text{mol/L}$  时, PPAR $\alpha$  蛋白表达量有显著提升; 如图 2(b) 所 示, EGCG 也可诱导卵巢癌 A2780 细胞中 PPAR $\alpha$  的蛋白表 达。PANC1 和 A2780 细胞均呈现出 PPAR $\alpha$  的蛋白表达量随 EGCG 的浓度增加而升高的特点。

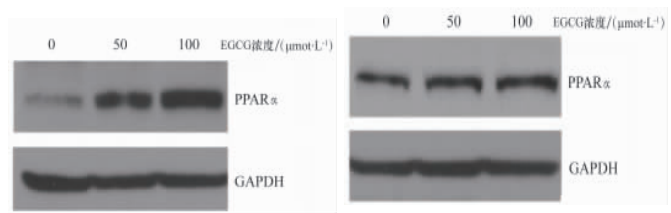
为了研究 EGCG 是否改变 PPAR $\alpha$  的 mRNA 水平, 用 EGCG 处理胰腺癌 PANC1 细胞和卵巢癌 A2780 细胞 24h 后, 采用实时荧光定量 PCR 检测 PPAR $\alpha$  的相对 mRNA 水平。如 图 3 (a)、(b) 所示, 在 PANC1 及 A2780 细胞中, 50 或 100 $\mu\text{mol/L}$  的 EGCG 对 PPAR $\alpha$  mRNA 水平均无明显影响。



(a) PANC1 (b) A2780

图 1 不同浓度的 EGCG 对 PANC1 细胞 (a) 和 A2780 细胞 (b) 存活率的影响

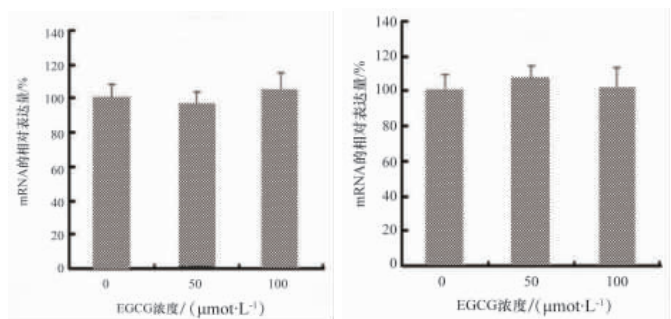
Fig. 1 Viability of PANC1 (a) and A2780 (b) treated with different concentrations of EGCG



(a) PANC1 (b) A2780

图 2 不同浓度 EGCG 处理 PANC1 细胞 (a) 和 A2780 细胞 (b) 后 PPAR $\alpha$  的蛋白表达水平

Fig. 2 Expression of PPAR $\alpha$  protein induced by EGCG in PANC1 (a) and A2780 (b)



(a) PANC1 (b) A2780

图 3 不同浓度 EGCG 处理 PANC1 细胞 (a) 和 A2780 细胞 (b) 后 PPAR $\alpha$  的 mRNA 表达水平

Fig. 3 Effect of EGCG on PPAR $\alpha$  mRNA level in PANC1 (a) and A2780 (b) cells

上述实验结果表明, EGCG 能够增加肿瘤细胞中 PPAR $\alpha$  的蛋白表达水平, 但对 PPAR $\alpha$  的 mRNA 表达量无明显影响。

2.2 PPAR $\alpha$  活化后肿瘤细胞对 EGCG 敏感性的变化

为了研究 PPAR $\alpha$  的活化是否影响肿瘤细胞对 EGCG 的 敏感性, 采用 PPAR $\alpha$  的特异性激动剂—氯贝特 (clofibrate)<sup>[19]</sup> 以及 PPAR $\alpha$  的特异性拮抗剂—GW6471<sup>[19]</sup>。研究分别设定 DMSO 处理组 (对照组)、100 $\mu\text{mol/L}$  EGCG 单处理组、200 $\mu\text{mol/L}$  氯贝特单处理组、5 $\mu\text{mol/L}$  GW6471 单处理组、100 $\mu\text{mol/L}$

LEGCG 联合 200 $\mu\text{mol/L}$  氯贝特组和 100 $\mu\text{mol/L}$  EGCG 联合 5 $\mu\text{mol/L}$  GW6471 组。结果表明,用 200 $\mu\text{mol/L}$  氯贝特或 5 $\mu\text{mol/L}$  GW6471 处理胰腺癌 PANC1 和卵巢癌 A2780 细胞后不会引起明显的细胞毒性。而 EGCG 联合 PPAR $\alpha$  特异性激动剂氯贝特时,细胞存活率较 EGCG 单处理组明显下降约 50%(图 4(a)、(b))。与之相反,EGCG 联合 PPAR $\alpha$  特异性拮抗剂 GW6471 能显著增加 PANC1 的细胞存活率。上述结果表明,PPAR $\alpha$  活化能够增加肿瘤细胞对 EGCG 的敏感性,增强 EGCG 的抗肿瘤效应。

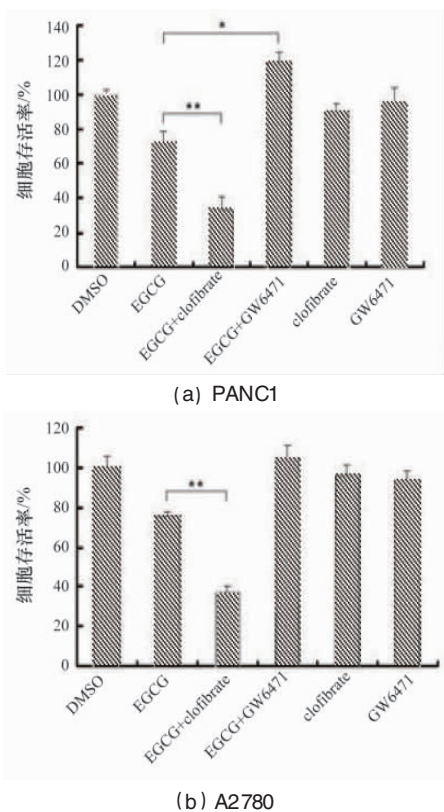


图 4 不同药物处理对 PANC1 细胞(a)和 A2780 细胞(b)存活率的影响  
Fig. 4 Viability of PANC1 (a) and A2780 (b) treated with different drugs

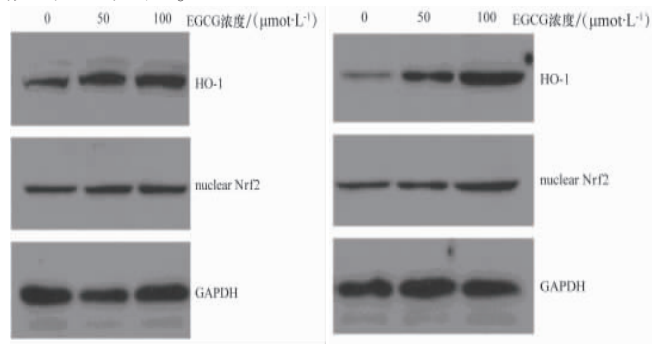
注: \*表示 EGCG 处理组与 EGCG+GW6471 组的 PANC1 细胞存活率相比,存在统计学差异,  $P < 0.05$ ; \*\*表示 EGCG 处理组与 EGCG+clofibrate 组的 PANC1 和 A2780 细胞的存活率相比,具有明显的统计学差异  $P < 0.01$ 。

Notes: \*, compared with EGCG-treated cells, EGCG plus GW6471 showed significant difference of cell viability in PANC1 cells,  $P < 0.05$ ; \*\*, compared with EGCG-treated cells, EGCG plus clofibrate showed significant difference of cell viability in PANC1 and A2780 cells  $P < 0.01$ .

### 2.3 PPAR $\alpha$ 的激活对 EGCG 诱导 HO-1 水平的影响

推测 EGCG 诱导 PPAR $\alpha$  后,后者可进一步调节 HO-1 的表达,从而影响肿瘤细胞对 EGCG 的耐受。如图 5 所示,用 50、100 $\mu\text{mol/L}$  EGCG 处理 PANC1 和 A2780 细胞 24h 后,EGCG 能诱导的 HO-1 表达水平明显增高,同时伴随着细胞

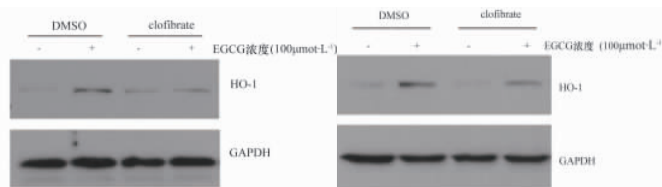
核中 Nrf2 转录因子的水平有微弱增加,这与王显红等的研究报道是一致的<sup>[10]</sup>。



(a) PANC1 (b) A2780  
图 5 EGCG 对 PANC1 细胞(a)和 A2780 细胞(b)中 HO-1、Nrf2 表达水平的影响

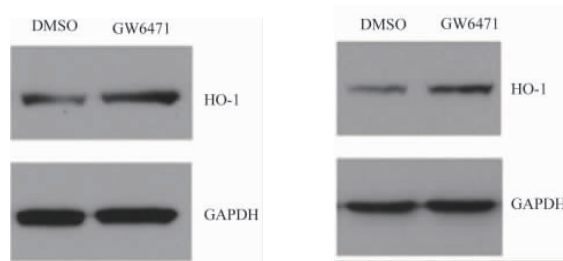
Fig. 5 Expression of HO-1 and Nrf2 in PANC1 (a) and A2780 (b) cells induced by EGCG

为了研究 PPAR $\alpha$  是否抑制 EGCG 上调 HO-1,用 EGCG 联合 PPAR $\alpha$  的特异性激动剂氯贝特(clofibrate)处理细胞。如图 6 所示,加入氯贝特后,由 EGCG 诱导的 HO-1 表达水平明显降低。如图 7 所示,用 100 $\mu\text{mol/L}$  EGCG、100 $\mu\text{mol/L}$  EGCG+200 $\mu\text{mol/L}$  氯贝特处理细胞后孵育 24h,PPAR $\alpha$  的特异性拮抗剂 GW6471 (10 $\mu\text{mol/L}$ ) 能促进 PANC1 和 A2780 细胞中 HO-1 的表达。上述实验结果表明,PPAR $\alpha$  的激活能抑制 EGCG 诱导的 HO-1 表达。



(a) PANC1 (b) A2780

图 6 PPAR $\alpha$  激动剂氯贝特对 PANC1 细胞(a)和 A2780 细胞(b)HO-1 表达水平的影响  
Fig. 6 Effect of PPAR $\alpha$  activation on HO-1 expression in PANC1 (a) and A2780 (b) cells



(a) PANC1 (b) A2780

图 7 PPAR $\alpha$  拮抗剂 GW6471 对 PANC1 细胞(a)和 A2780 细胞(b)细胞 HO-1 表达水平的影响  
Fig. 7 Effect of PPAR $\alpha$  inhibition on HO-1 expression in PANC1 (a) and A2780 (b) cells

### 2.4 PPAR $\alpha$ 对调控 HO-1 基因转录的影响

研究以胰腺癌 PANC1 细胞为实验对象,采用荧光素酶报告基因系统的方法,研究 EGCG 诱导的 PPAR $\alpha$  是否调节 HO-1 的转录。分别加入 DMSO(空白组)、100 $\mu$ mol/L EGCG、200 $\mu$ mol/L 氯贝特、100 $\mu$ mol/L EGCG+200 $\mu$ mol/L 氯贝特孵育细胞 24h。如图 8 所示,EGCG 单处理组较 DMSO 对照组荧光素酶活性明显增强,表明 EGCG 能从转录水平诱导 HO-1 的表达。氯贝特单处理组和 EGCG+氯贝特的荧光素酶活性组均较 DMSO 处理的对照组显著降低,表明氯贝特能从转录水平抑制 HO-1 的本底表达诱导表达。结果表明,PPAR $\alpha$  的活化能从转录水平抑制 HO-1 的表达。

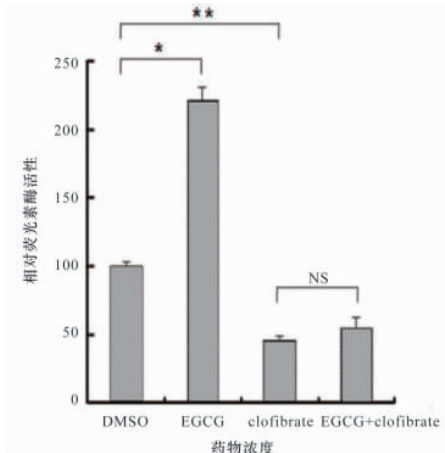


图 8 PPAR $\alpha$  活化对 HO-1 启动子活性的影响  
Fig. 8 Luciferase activity of HO-1 promoter after PPAR $\alpha$  activation

注:\* 表示 EGCG 处理组的相对荧光素酶活性和阴性对照组相比有统计学差异, $P<0.05$ ; \*\* 表示氯贝特处理组较对照组有显著的统计学差异, $P<0.01$ ; NS 表示 EGCG 单处理组与 EGCG 联合氯贝特处理组相比较,不具有统计学差异。

Notes: \*, compared with the negative control group, EGCG-treated cells showed significant difference in luciferase activity,  $P<0.05$ ; \*\*, compared with the control group, clofibrate-treated cells showed significant difference in luciferase activity,  $P<0.01$ ; NS, EGCG plus clofibrate showed no significant difference with EGCG-treated group.

进一步采用染色质免疫共沉淀实验(ChIP)检测 PPAR $\alpha$  是否直接结合在 HO-1 启动子的区域。如图 9 所示,在 PANC1 细胞中,HO-1 启动子 PPRE 区域不与 Pdx-1 蛋白及 IgG(阴性对照)存在结合,而与 PPAR $\alpha$  存在特异性的结合。上述结果表明,PPAR $\alpha$  的活化后能结合在 HO-1 启动子上并抑制 HO-1 基因表达。

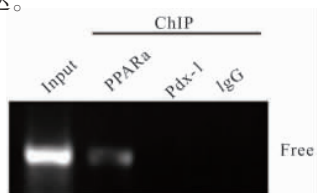


图 9 染色质免疫共沉淀检测 PPAR $\alpha$  与 HO-1 启动子结合  
Fig. 9 ChIP analysis of PPAR $\alpha$  binding in PANC1 cells

### 3 讨论

EGCG 是绿茶中儿茶素的重要组成成分,其抗癌作用尤为显著。过氧化物酶体增殖物活化受体(PPARs)的作用非常广泛,包括脂质和脂蛋白代谢、葡萄糖代谢、细胞增殖分裂和凋亡等<sup>[1]</sup>。本实验发现,EGCG 能诱导 PPAR $\alpha$  的表达,PPAR $\alpha$  能抑制抗凋亡的血红素加氧酶-1 (HO-1),并增加细胞对 EGCG 的敏感性。EGCG 的抗肿瘤效应已被广泛报道,然而肿瘤细胞对 EGCG 的应答机制尚不完全清楚。抑制细胞抵抗蛋白或者相关通路能够提高 EGCG 的肿瘤杀伤效应。HO-1 是一种重要的细胞防御分子,在细胞的氧化应激条件下,HO-1 在凋亡抵抗过程中具有至关重要的作用<sup>[10]</sup>。HO-1 启动子上具有多个顺式作用元件,包括抗氧化反应元件(ARE)、过氧化物酶体增殖物活化受体结合元件(PPRE)以及乏氧反应元件(HRE)等,都能精确地调控 HO-1 对于特定环境及条件的应答<sup>[7]</sup>。例如,当用 EGCG 处理细胞后,胞浆中 Nrf2 与 Keap1 解离并被激活进入细胞核。激活的 Nrf2 可与 ARE 结合,促进 HO-1 的表达。HO-1 不仅在机体生理状态下发挥作用,更主要是在机体应激状态时发挥作用。HO-1 是一种诱导亚型,它能对应激做出反应,如氧化应激、缺氧、重金属、细胞因子等。HO-1 启动子中含有两段已被证实的 PPAR $\alpha$  的结合元件(PPRE)。

PPRE 的共同序列包含一段直接重复的 AGGTCA 序列。Meers 等<sup>[18]</sup>采用染色质免疫共沉淀分析实验研究了 PPAR $\alpha$  在肝癌 HepG2 细胞内的结合位点。在 HepG2 细胞中,HO-1 的启动子并不是 PPAR $\alpha$  的靶点。因而 PPAR $\alpha$  的下游效应分子可能具有细胞特异性。PPAR $\alpha$  能够通过 HIF-1 $\alpha$  信号通路对 HO-1 进行负性调控<sup>[19]</sup>。本研究表明,在 EGCG 诱导下,PPAR $\alpha$  能直接结合在 HO-1 启动子上进行负调控。PPAR $\alpha$  可能并非是 HO-1 启动子中的基本组成型转录因子。由于 EGCG 的激活,PPAR $\alpha$  能够结合在 HO-1 启动子上并抑制 HO-1 的转录。PPAR $\alpha$  有可能通过抑制包括 HO-1 在内的多靶点,来实现细胞对 EGCG 的增敏。

PPAR $\alpha$  活化后的生物学效应具有细胞特异性。PPAR $\alpha$  活化能够通过抑制自由基生成抑制顺铂介导的肾小管基底细胞的死亡及阿霉素引发的细胞凋亡<sup>[20]</sup>。同时,相反结果表明,PPAR $\alpha$  及 PPAR $\gamma$  的激活可引起人类单核白细胞衍生出的巨噬细胞的凋亡<sup>[21]</sup>。PPAR $\alpha$  的敲除能够通过激活 NF- $\kappa$ B 并增强 IAPs 的表达来抑制小鼠肾脏细胞中由辐射诱导的细胞凋亡<sup>[22]</sup>。高浓度的氯贝特(>500 $\mu$ mol/L)能够引起 PANC1 及 A2780 细胞中的细胞死亡。在本实验中,采用低浓度的氯贝特及 GW6471,能够维持 90%以上的细胞存活率;但是 EGCG 联合氯贝特则能引起明显的细胞死亡。有研究表明,PPAR $\alpha$  还能增加肿瘤细胞对二十二碳六烯酸(DHA)等的敏感性<sup>[23]</sup>。

### 4 结论

本研究表明 EGCG 能诱导肿瘤细胞中 PPAR $\alpha$  的表达; PPAR $\alpha$  活化能够通过转录水平抑制 HO-1 的表达,从而增加

肿瘤细胞对 EGCG 敏感性。PPAR $\alpha$  激动剂氯贝特联合 EGCG 为临床肿瘤治疗提供了一个新方案。

### 参考文献 (References)

- [1] 丁银秀, 田建英, 马江波. EGCG 对体外培养的胚鼠皮层神经细胞的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(1): 105-113.  
Ding Yinxiu, Tian Jianying, Ma Jiangbo. Chinese Pharmacological Bulletin, 2008, 24(1): 105-113.
- [2] 张瑜, 邹国林, 彭少君. 表没食子儿茶素没食子酸酯研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 1998, 20(4): 51-54.  
Zhang Yu, Zou Guolin, Peng Shaojun. Amino Acids & Biotic Resources, 1998, 20(4): 51-54.
- [3] 王江红, 徐莉, 董扬, 等. EGCG 联合紫杉醇对肺癌 A549 细胞增殖、凋亡的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(4): 301-310.  
Wang Jianghong, Xu Li, Dong Yang, et al. Journal of Chongqing Medical University, 2012, 37(4): 301-310.
- [4] Khan S G, Katiyar S K, Agarwal R, et al. Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: Possible role in cancer chemoprevention[J]. Cancer Research, 1992, 52(14): 4050-4052.
- [5] Singh B N, Shankar S, Srivastava R K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate(EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications [J]. Biochemical Pharmacology, 2011, 82(12): 1807-1821.
- [6] 高漓, 张天禹, 尤剑鹏, 等. EGCG 诱导前列腺癌细胞 PC-3 凋亡及对 Survivin 蛋白表达的影响[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2011, 40(5): 580-576.  
Gao Li, Zhang Tianyu, You Jianpeng, et al. Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong, 2011, 40(5): 580-576.
- [7] Liu T T, Liang N S, Li Y, et al. Effects of long-term tea polyphenols consumption on hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes and liver function in Wistar rats [J]. World Journal of Gastroenterology, 2003, 9(12): 2742-2744.
- [8] 徐建平, 练庆林. 血红素加氧酶系统与氧化应激[J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 2002, 22(4): 371-373.  
Xu Jianping, Lian Qinglin. Foreign Medical Sciences. Section of Pathophysiology and Clinical Medicine, 2002, 22(4): 371-373.
- [9] 过新增, 周岐新. 血红素加氧酶系统研究现状[J]. 生命科学研究, 2001, 5(3): 190-197.  
Guo Jianzeng, Zhou Qixin. Life Science Research, 2001, 5(3): 190-197.
- [10] Wu C C, Hsu M C, Hsieh C W, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 by epigallocatechin-3-gallate via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways[J]. Life Sciences, 2006, 78(25): 2889-2897.
- [11] 王显红, 陈明. 过氧化物酶体增殖物激活受体与心肌缺血再灌注损伤[J]. 心血管病学研究进展, 2006, 27(1): 97-99.  
Wang Xianhong, Chen Ming. Advances in Cardiovascular Diseases, 2006, 27(1): 97-99.
- [12] Patterson A D, Slanar O, Krausz K W, et al. Human urinary metabolomic profile of PPARalpha induced fatty acid beta-oxidation [J]. Journal of Proteome Research, 2009, 8(9): 4293-4300.
- [13] Kronke G, Kadl A, Ikonomu E, et al. Expression of heme oxygenase-1 in human vascular cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors [J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2007, 27(6): 1276-1282.
- [14] Shan Y, Pepe J, Lu T H, et al. Induction of the heme oxygenase-1 gene by metalloporphyrins[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000, 380(2): 219-227.
- [15] Jiang Y J, Hatch G M, Mymn D, et al. Modulation of cytosolic phospholipase A (2) by PPAR activators in human preadipocytes [J]. Journal of Lipid Research, 2001, 42(5): 716-724.
- [16] Kim Y I, Hirai S, Takahashi H, et al. 9-oxo-10 (E), 12 (E)-Octadecadienoic acid derived from tomato is a potent PPAR alpha agonist to decrease triglyceride accumulation in mouse primary hepatocytes [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2011, 55(4): 585-593.
- [17] Beck K, Wu B J, Ni J, et al. Interplay between heme oxygenase-1 and the multifunctional transcription factor yin yang 1 in the inhibition of intimal hyperplasia[J]. Circulation Research, 2010, 107(12): 1490-1497.
- [18] van der Meer D L, Degenhardt T, Vaisanen S, et al. Profiling of promoter occupancy by PPARalpha in human hepatoma cells via ChIP-chip analysis[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(9): 2839-2850.
- [19] Zhou J, Zhang S, Xue J, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha(PPARalpha) suppresses hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) signaling in cancer cells [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(42): 35161-35169.
- [20] Lin H, Hou C C, Cheng C F, et al. Peroxisomal proliferator-activated receptor-alpha protects renal tubular cells from doxorubicin-induced apoptosis[J]. Molecular Pharmacology, 2007, 72(5): 1238-1245.
- [21] Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, et al. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(40): 25573-25580.
- [22] Zhao W, Iskandar S, Kooshki M, et al. Knocking out peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha inhibits radiation-induced apoptosis in the mouse kidney through activation of NF-kappaB and increased expression of IAPs[J]. Radiation Research, 2007, 167(5): 581-591.
- [23] Tuller E R, Brock A L, Yu H, et al. PPARalpha signaling mediates the synergistic cytotoxicity of clioquinol and docosahexaenoic acid in human cancer cells[J]. Biochemical Pharmacology, 2009, 77(1): 1480-1486.

(责任编辑 吴晓丽)

### 《科技导报》征集“封面文章”

为快速反映中国最新科技研究成果,《科技导报》拟利用刊物最显著位置——封面将最新科研成果第一时间予以突出报道。来稿要求:研究成果具创新性或新颖性;反映该领域中国乃至世界前沿研究水平;可以图片形式予以反映,图片美观、清晰、分辨率超过 300dpi;文章篇幅不限,要说明研究的背景、方法、取得的结果,以及结论。在线投稿:www.kjdb.org。