

文章编号 1006-8147(2023)03-0280-08

论 著

富脂微环境通过 PPAR γ /ABCG2 途径促进三阴性乳腺癌细胞的多药耐药

刘俊汝, 郁春艳, 郑小燕, 刘子璇, 陈思琦, 邓为民

(天津医科大学基础医学院免疫学系, 国家教育部免疫微环境与疾病重点实验室, 天津 300070)

摘要 目的:探讨富脂微环境(ARM)对三阴性乳腺癌(TNBC)细胞多药耐药(MDR)的影响及机制。方法:选择 MDA-MB-231 细胞作为研究模型,应用 CCK-8 检测过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR) γ 拮抗剂 GW9662、PPAR γ 激动剂曲格列酮和 ABC 转运蛋白 G 家族成员 2(ABCG2)抑制剂 KO143 在时间和剂量效应下对细胞增殖的影响。应用油红 O 染色检测人脂肪组织提取液(HATES)对细胞脂滴积累的影响。利用 HATES 模拟 ARM,应用顺铂(DDP)和紫杉醇(PTX)作为化疗药物,通过细胞形态、CCK-8 及流式 Annexin V-PE/7-AAD 双染凋亡检测 HATES 对 MDA-MB-231 细胞 MDR 的影响。荧光素酶报告基因检测 HATES、GW9662、曲格列酮对 MDA-MB-231 细胞 ABCG2 转录活性的影响。Western 印迹检测 HATES、GW9662 对 MDA-MB-231 细胞 PPAR γ 和 ABCG2 蛋白表达的影响。Western 印迹、CCK-8 及流式 Annexin V-PE/7-AAD 双染凋亡检测 HATES 对 PPAR γ -siRNA 瞬时转染 MDA-MB-231 细胞 PPAR γ 及 ABCG2 蛋白表达、化疗时细胞增殖和凋亡的影响。CCK-8 及流式 Annexin V-PE/7-AAD 双染凋亡检测 HATES、GW9662、KO143 对 MDA-MB-231 化疗时细胞增殖和凋亡的影响。结果:25 μ mol/L GW9662、25 μ mol/L 曲格列酮及 10 μ mol/L KO143 处理细胞 2 h 均不影响细胞增殖,在此基础上进行后续实验。应用的 HATES 浓度可促进 MDA-MB-231 细胞脂滴形成且不影响 MDA-MB-231 细胞的形态、增殖及凋亡(均 $P>0.05$),但在化疗药物存在时可促进细胞增殖并减少细胞凋亡(均 $P<0.05$)。HATES 可提高 MDA-MB-231 细胞的 ABCG2 转录活性,而阻断 PPAR γ 可抑制该效应($P<0.001$)。HATES 促进细胞的 MDR,沉默 PPAR γ 和使用 GW9662 及 KO143 减弱 HATES 对 MDR 的影响(均 $P<0.001$)。结论:HATES 通过 PPAR γ /ABCG2 途径促进 MDA-MB-231 细胞的 MDR。

关键词 HATES;三阴性乳腺癌;多药耐药;PPAR γ ;ABCG2

中图分类号 R737.31

文献标志码 A

The adipocyte-rich microenvironment promotes multidrug resistance in triple-negative breast cancer cells via the PPAR γ /ABCG2 pathway

LIU Jun-ru, YU Chun-yan, ZHENG Xiao-yan, LIU Zi-xuan, CHEN Si-qi, DENG Wei-min

(Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Key Laboratory of Diseases and Microenvironment of Ministry of Education of China, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the effect and mechanism of adipocyte-rich microenvironment(ARM) on multidrug resistance(MDR) in triple-negative breast cancer(TNBC) cell. **Methods:** MDA-MB-231 cells were selected as the research model to detect the time and dose effects of peroxisome proliferator-activating receptor(PPAR) γ antagonist GW9662, PPAR γ agonist troglitazone and ABC transporter G family member 2(ABCG2) inhibitor KO143 on cell proliferation. Oil red O staining was used to detect the effect of human adipose tissue extract(HATES) on cell lipid droplets accumulation. The effect of HATES on MDA-MB-231 cells was detected by cell morphology, CCK-8 and flow cytometry Annexin V-PE/7-AAD double-stained apoptosis by using HATES to simulate ARM, cisplatin(DDP) and paclitaxel(PTX) as chemotherapy drugs. Effect of luciferase reporter gene detection of HATES, GW9662, troglitazone on ABCG2 transcriptional activity in MDA-MB-231 cells. Western blotting examined the effects of HATES and GW9662 on the expression of PPAR γ and ABCG2 proteins in MDA-MB-231 cells. Western blotting, CCK-8 and flow cytometry Annexin V-PE/7-AAD double-chromatic apoptosis detected by HATES on the expression of PPAR γ and ABCG2 proteins in PPAR γ -siRNA transient transfection of MDA-MB-231 cells, cell proliferation and apoptosis during chemotherapy. CCK-8 and flow cytometry Annexin V-PE/7-AAD double-chromatic apoptosis detected by HATES, GW9662 and KO143 on cell proliferation and apoptosis during MDA-MB-231 chemotherapy. **Results:** In this experiment, 25 μ mol/L GW9662, 25 μ mol/L Troglitazone and 10 μ mol/L KO143 treated cells did not affect cell proliferation for 2 h, and subsequent experiments were carried out on this basis. The HATES concentration applied in this experiment promoted the formation of lipid droplets in MDA-MB-231 cells without affecting the morphology, proliferation and apoptosis of MDA-MB-231 cells(all $P>0.05$), but promoted cell proliferation and reduced apoptosis(all $P<0.05$) in the presence

基金项目 京津冀基础研究合作专项(20JCZXC00140);国家自然科学基金资助项目(82273340)

作者简介 刘俊汝(1997-),女,硕士在读,研究方向:肿瘤免疫;通信作者:邓为民, E-mail: dengweimin@tmu.edu.cn。

of chemotherapy drugs. HATES increased the ABCG2 transcriptional activity of MDA-MB-231 cells, while blocking PPAR γ inhibited this effect ($P<0.001$). HATES promoted MDR in cells, silenced PPAR γ and used GW9662 and KO143 to attenuate the effect of HATES on MDR(all $P<0.001$). **Conclusion:** HATES promotes MDR in MDA-MB-231 cells through the PPAR γ /ABCG2 pathway.

Key words HATES; triple-negative breast cancer; multidrug resistance; PPAR γ ; ABCG2

乳腺癌是最常见的女性癌症类型,也是女性癌症死亡的最常见原因^[1]。三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)是乳腺癌的一种高度异质性亚型,预后较差^[2]。由于缺乏靶向治疗,以紫杉烷或铂类为基础的化疗是三阴性乳腺癌患者的主要治疗方法^[3],但致癌驱动因素的异质性和多药耐药(multidrug resistance, MDR)的发展导致疗效有限^[4]。脂肪细胞是 TNBC 肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中的主要细胞成分。越来越多的证据表明,肿瘤相关脂肪细胞会加重肿瘤进展,加剧免疫抑制性 TME 并影响治疗效果^[5]。脂肪细胞产生大量的脂肪因子(包括细胞因子),参与肿瘤的发生、进展和转移^[6]。不同的脂肪因子如瘦素、脂联素、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α 等可通过多种功能机制诱导不同肿瘤细胞的耐药^[7]。因此,探寻富脂微环境(adipocyte-rich microenvironment, ARM)促进肿瘤耐药的潜在机制,对提高化疗疗效具有重要意义。本实验利用人脂肪组织提取液(human adipose tissue extracting solution, HATES)模拟 ARM^[8],探讨 HATES 对 TNBC 细胞 MDR 的影响及机制。

MDR 是阻碍肿瘤药物成功治疗的一个严重问题。MDR 最突出的机制之一是 ATP 结合盒(ABC)转运蛋白的过表达^[9]。ABC 转运蛋白通过细胞膜主动泵送多种底物^[10],其中 ABC 转运蛋白 G 家族成员 2(ATP binding cassette subfamily G member 2, ABCG2),又称乳腺癌抵抗蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP),在赋予肿瘤细胞干性表型方面具有潜在作用,并且能够外排抗肿瘤药物,在肿瘤 MDR 的发生、发展中发挥重要作用^[11]。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPAR γ)属于类固醇受体超家族的核受体,在脂肪组织的发育和脂代谢中起着重要作用^[12]。PPAR γ 作为重要的脂代谢调节分子,参与树突状细胞^[13],胎盘绒毛膜癌^[14]中 ABCG2 的调节。抑制 PPAR γ 可降低 ABCG2 介导的 M2 巨噬细胞的外排活性^[15]。此外,本实验室前期生物信息学数据分析发现,在脂质相关肿瘤上皮性卵巢癌中,PPAR γ 是促进化疗耐药的脂相关的关键分子。因此,本研究旨在 TNBC 细胞中探讨 HATES 是否通过 PPAR γ /ABCG2 途径促进 MDR。

1 材料与方法

1.1 材料 人 TNBC 细胞 MDA-MB-231 由天津医科大学肿瘤医院郭晓静教授惠赠;胎牛血清(FBS)购自 GIBCO 公司;DMEM 培养基、CCK-8 检测试剂盒均购自江苏凯基生物技术股份有限公司;紫杉醇(PTX)购自扬子江药业集团有限公司;顺铂(DDP)购自齐鲁制药有限公司;Annexin V-PE/7-AAD 凋亡试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司;荧光素酶报告基因试剂盒购自 Promega 公司;PPAR γ 激动剂曲格列酮 Troglitazone、PPAR γ 拮抗剂 GW9662 均购自 Selleck 公司;ABCG2 抑制剂 KO143 购自 MCE 公司;人 PPAR γ 抗体购自 Abcam 公司;ABCG2 抗体购自江苏凯基生物技术股份有限公司;GAPDH 抗体购自 CST 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 MDA-MB-231 细胞以含 10% FBS 的 DMEM 培养基,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,每 2~3 天更换培养液并消化传代。

1.2.2 人脂肪组织提取液 HATES 制备 参考 Nie 等^[16]的方法制备 HATES,即乳腺癌患者的肿瘤邻近脂肪组织在术后 1 h 内全程无菌送至实验室,用含 1×青链霉素混合液的 Hanks 缓冲液清洗脂肪组织并剔除筋膜及血块,进行称重,将脂肪组织剪切成 2 mm 左右的小块,200 目滤网研磨,按 0.8 g 脂肪/mL DMEM 的标准加入适量含 1×青链霉素混合液的 DMEM,收集全部滤液,1 000 g/10 min 离心。0.22 μ mol/L 的过滤器收集后分装冻存备用。使用时应用 20% FBS 1:1 稀释,终浓度为 0.4 g 脂肪/mL。

1.2.3 CCK-8 检测细胞增殖 将对数生长期的 MDA-MB-231 细胞以 7×10^3 /孔密度接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,按分组处理细胞:(1)不同浓度的 GW9662 及曲格列酮(0.5、10、20、40、60 μ mol/L)及不同浓度的 KO143(0.1、5、10、20、50 μ mol/L)处理 24 h。(2)GW9662(25 μ mol/L)、曲格列酮(25 μ mol/L)及 KO143(10 μ mol/L)处理不同时间(0、2、6、8、12、24 h)。(3)GW9662(25 μ mol/L)、KO143(10 μ mol/L)预处理 2 h;HATES(0.4 g/mL)、DDP(30 μ mol/L)、PTX(7 nmol/L)等处理 48 h。每组设置 3 个复孔。细胞培养结束前 30 min,观察每组细胞形态变化,并拍照记录。按 CCK-8 检测试剂盒说明书孵育细胞,

酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值(OD450),利用 GraphPad prism 9 进行统计学分析。

1.2.4 油红 O 染色检测 HATES 对 MDA-MB-231 细胞脂肪酸摄取的情况 将 MDA-MB-231 细胞接种于 24 孔板,密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,细胞贴壁后处理不同浓度的 HATES(0、0.2、0.4、0.8 g/mL)培养 24 h。培养结束后,按照油红 O 检测试剂盒说明书进行操作,显微镜下拍照分析。

1.2.5 流式 Annexin V-PE/7-AAD 双染凋亡检测 HATES、DDP、PTX 对细胞生长、增殖、凋亡的影响 将对数生长期的 MDA-MB-231 细胞以 $2.5 \times 10^5/\text{孔}$ 密度接种于 12 孔板,待细胞贴壁后,按分组处理细胞。培养结束后用 0.25 %胰酶(不含 EDTA)消化收集细胞,加入含 2% FBS 的 Hanks 洗涤 2 次。弃去上清,每管加入 100 μL 试剂盒中的 1 \times Annexin V Binding Buffer 重悬细胞,实验组先加入 5 μL 的 Annexin V 溶液,再加入 5 μL 的 7-AAD 溶液,混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 20 min。细胞通过 400 目筛网过滤成单细胞悬液备检。用流式细胞仪进行检测,用空白管和单染管调节电压和荧光补偿,利用 FlowJo 软件进行数据分析。

1.2.6 Western 印迹检测 HATES 对该细胞 PPAR γ 及 ABCG2 蛋白表达 将对数生长期的 MDA-MB-231 细胞以 $5 \times 10^5/\text{孔}$ 密度接种于 6 孔板,待细胞贴壁后,根据实验要求按分组处理细胞,将 RIPA、蛋白酶抑制剂以 1 000:1 配置裂解液,提取细胞总蛋白。BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度,配置 10% 的分离胶,将 40 μg /孔的蛋白用 10% SDS-PAGE 进行电泳分离。电泳后将蛋白转印于 PVDF 膜,100 V 转膜 1 h,用 3% 牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 2 h 后,加入特异性一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。加入 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h。TBST 清洗后化学发光底物检测试剂盒进行检测。将目的蛋白与内参的灰度比值作为蛋白的相对表达丰度。

1.2.7 小干扰 RNA(siRNA)的合成和转染 PPAR-siRNA 和阴性对照-siRNA 由中国吉凯公司基因合成和构建。将对数生长期的 MDA-MB-231 细胞以 $1 \times 10^5/\text{孔}$ 密度接种于 24 孔板。待细胞贴壁后,按照 Lipofectamine 3000 说明书转染 siRNA 至细胞中培养 72 h。培养结束后 Western 印迹验证转染效果。

1.2.8 荧光素酶报告基因检测 HATES、GW9662、曲格列酮对 MDA-MB-231 细胞 ABCG2 转录活性的影响 委托中国吉凯基因公司构建 ABCG2-promoter-Luc 质粒及空载体 GV238-Luc 质粒和 β -gal 质粒备用。将对数生长期的 MDA-MB-231 细胞以

$2 \times 10^5/\text{孔}$ 密度接种于 24 孔板中。待细胞贴壁后,按照 Lipofectamine 3000 说明书转染质粒至细胞中。转染 6 h 后将培养基更换至含不同处理因素的常规培养基进行培养 48 h,其中曲格列酮浓度 25 $\mu\text{mol/L}$ 。培养结束后,按照 Promega “荧光素酶报告基因试剂盒”说明书裂解细胞,避光加入 100 μL 荧光素酶底物,用 Promega 荧光素酶标仪检测 ABCG2-promoter Luciferase 的活性。同时吸取 20 μL 裂解上清,避光加入 80 μL ONPG,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后,检测 β -gal 活性。Luciferase 的相对活性为 Luciferase 的活性与 β -gal 活性的比值,GraphPad prism 9 统计并作图。

1.2.9 统计学处理 采用 GraphPad prism 9 软件进行统计学分析和作图。正态分布的计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间相互比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PPAR γ 拮抗剂 GW9662 及激动剂曲格列酮与 ABCG2 抑制剂 KO143 对 MDA-MB-231 细胞的剂量和时间效应 本研究侧重探讨 ARM 对肿瘤细胞的效应,首先确定 GW9662、曲格列酮及 KO143 等试剂的最适浓度和时间,CCK-8 实验结果显示,GW9662、曲格列酮及 KO143 对细胞作用 24 h 的 IC50 分别为 26.91、26.57、13.57 $\mu\text{mol/L}$ 。根据 IC50 结果选取 25 $\mu\text{mol/L}$ GW9662、25 $\mu\text{mol/L}$ 曲格列酮与 10 $\mu\text{mol/L}$ KO143 进行时间效应实验。如图 1B 结果显示 25 $\mu\text{mol/L}$ GW9662、25 $\mu\text{mol/L}$ 曲格列酮与 10 $\mu\text{mol/L}$ KO143 处理 2 h 均不影响细胞增殖(均 $P > 0.05$)。结合预期结果,选取 25 $\mu\text{mol/L}$ GW9662、25 $\mu\text{mol/L}$ 曲格列酮与 10 $\mu\text{mol/L}$ ABCG2 预处理细胞 2 h,在不影响细胞增殖的情况下进行后续实验(图 1)。

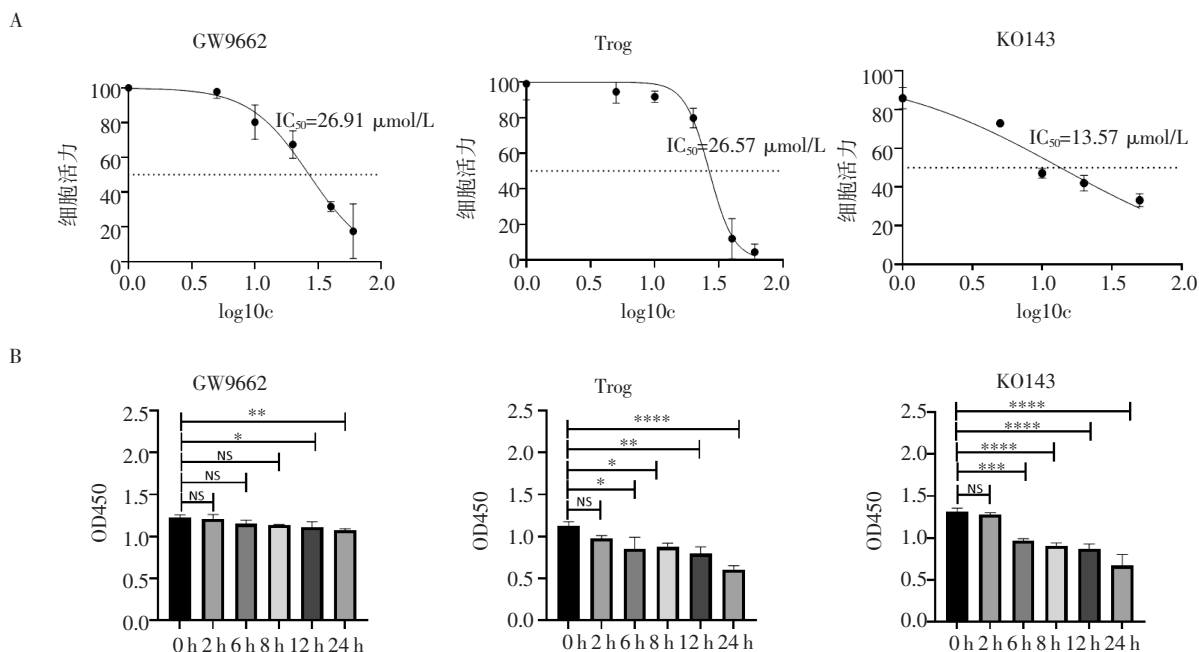
2.2 HATES 促进 MDA-MB-231 细胞脂滴的积累 如图 2 结果显示,0.4 g/mL HATES 和 0.8 g/mL HATES 均显著促进细胞脂滴的积累,但与对照组相比 0.8 g/mL HATES 处理组,细胞形态明显改变,皱缩变圆。结合细胞状态最终选择 0.4 g/mL HATES 进行后续实验。

2.3 HATES 促进 MDA-MB-231 细胞 MDR 结果显示,与对照组相比,HATES 浓度未影响细胞生长、增殖及凋亡(均 $P > 0.05$,图 3A、3B、3C)。如图 3B CCK-8 结果显示,与对照组相比,DDP 组和 PTX 组细胞增殖显著降低($t=7.95、16.11$,均 $P < 0.000 1$)。与单独 DDP 相比,DDP+HATES 组细胞增殖明显增强($t=3.76,P < 0.05$);PTX+HATES 组与之类似($t=8.54,P <$

0.01)。如图 3C、3D 流式凋亡检测结果显示,与对照组相比,DDP 和 PTX 组大量细胞凋亡 ($t=33.62$ 、 34.90 , 均 $P<0.0001$); 与单独 DDP 组相比,DDP+HATES 组细胞凋亡显著降低 ($t=19.68$, $P<0.0001$); PTX+HATES 组与之类似 ($t=29.24$, $P<0.0001$)。细胞的增殖和凋亡与形态图趋势一致。

2.4 HATES 通过调节 PPAR γ 上调 ABCG2 表达 本课题组前期生物信息学分析数据表明,PPAR γ 是促进化疗耐药的脂相关的关键分子,ABCG2 是其下游重要靶基因之一。为了确定 HATES 是否通过 PPAR γ 促进 ABCG2 的转录,进行荧光素酶报告基

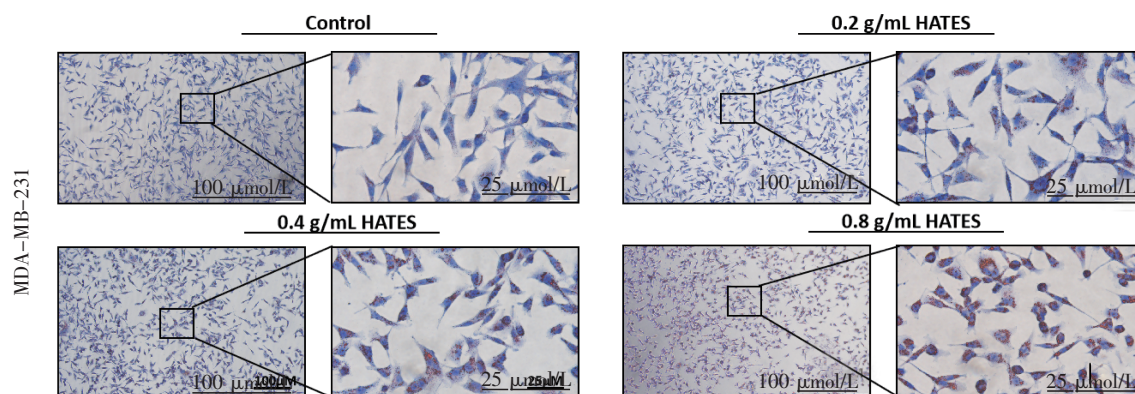
因检测(图 4A、4B)。结果显示,与空载体组相比,PPAR γ 拮抗剂 GW9662 显著降低 ABCG2 的转录活性 ($t=18.45$, $P<0.0001$),曲格列酮可显著提高 ABCG2 的转录活性 ($t=29.01$, $P<0.0001$)。HATES 组 ABCG2 的转录活性显著增强 ($t=4.69$, $P<0.01$)。与 HATES 组相比,HATES+GW9662 组 ABCG2 的转录活性显著降低 ($t=5.39$, $P<0.001$),HATES+曲格列酮组 ABCG2 的转录活性显著增强 ($t=8.18$, $P<0.0001$)。此外,Western 印迹结果显示 HATES 处理促进细胞 PPAR γ 和 ABCG2 蛋白表达,而 GW9662 降低了 HATES 的促进作用(图 4C、4D)。



注:A:CCK-8 检测不同浓度 GW9662、曲格列酮及 KO143 对 MDA-MB-231 细胞的 IC₅₀;B:CCK-8 检测 GW9662、曲格列酮及 KO143 处理 MDA-MB-231 细胞不同时间细胞活性;GW9662:过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 拮抗剂;KO143:三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2 抑制剂; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$; NS:差异无统计学意义

图1 GW9662、曲格列酮与 KO143 对 MDA-MB-231 细胞增殖的剂量和时间效应

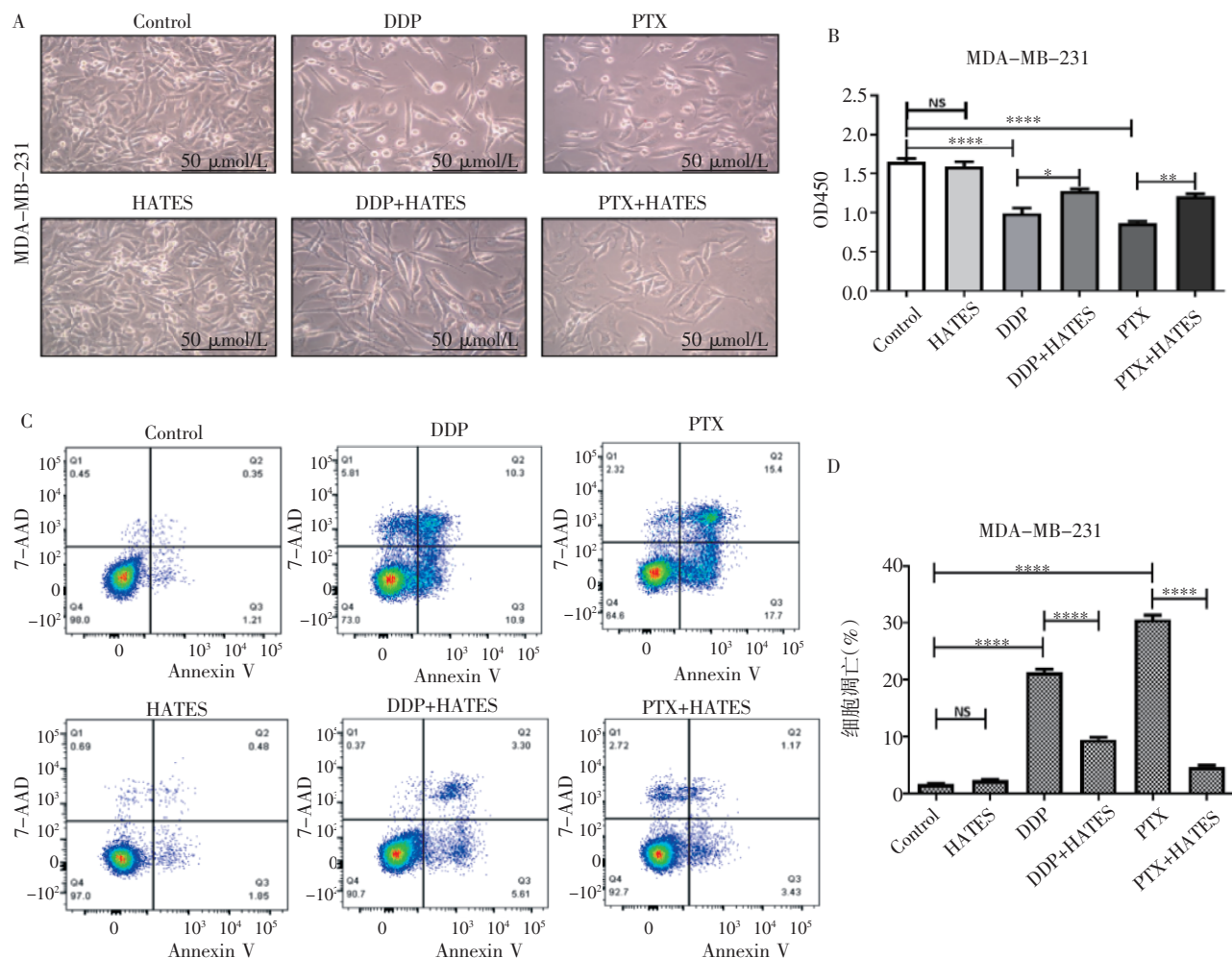
Fig 1 Dose and time effects of GW9662, Troglitazone and KO143 on the proliferation of MDA-MB-231 cells



注:油红 O 染色检测 HATES 的最适浓度显微镜下观察(10 \times 、40 \times);Control:对照;HATES:人脂肪组织提取液

图2 HATES 促进 MDA-MB-231 细胞脂滴的积累

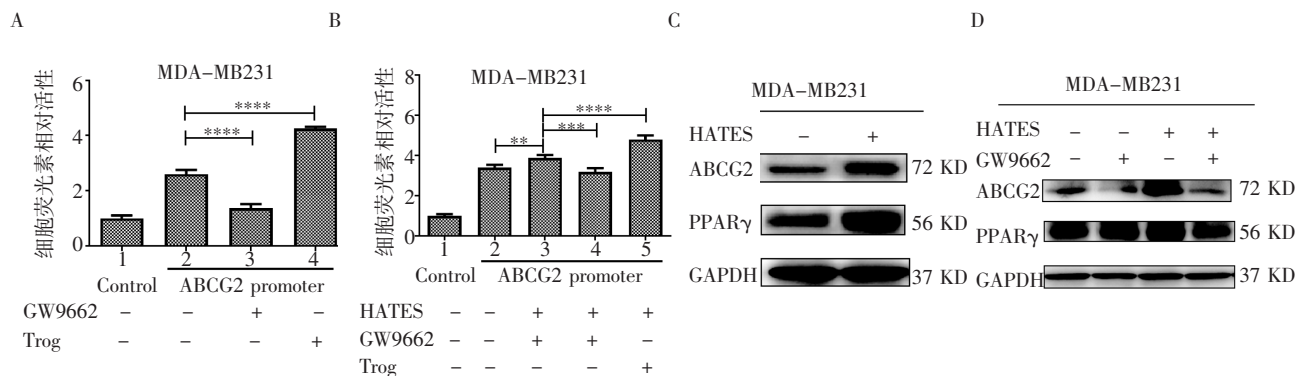
Fig 2 The accumulation of lipid droplets in MDA-MB-231 cells promoted by HATES



注:A:HATES、DDP、PTX 处理 MDA-MB-231 细胞后显微镜下观察细胞形态(20 \times);B:CCK-8 检测 HATES、DDP、PTX 处理 MDA-MB-231 细胞增殖;C:流式检测 HATES、DDP、PTX 处理 MDA-MB-231 细胞凋亡;D:流式检测凋亡 3 次统计结果;Control:对照;HATES:人脂肪组织提取液;DDP:顺铂;PTX:紫杉醇;* $P<0.05$;** $P<0.01$;*** $P<0.0001$;NS:差异无统计学意义

图 3 HATES 促进 MDA-MB-231 细胞 MDR

Fig 3 MDA-MB-231 cell MDR promoted by HATES



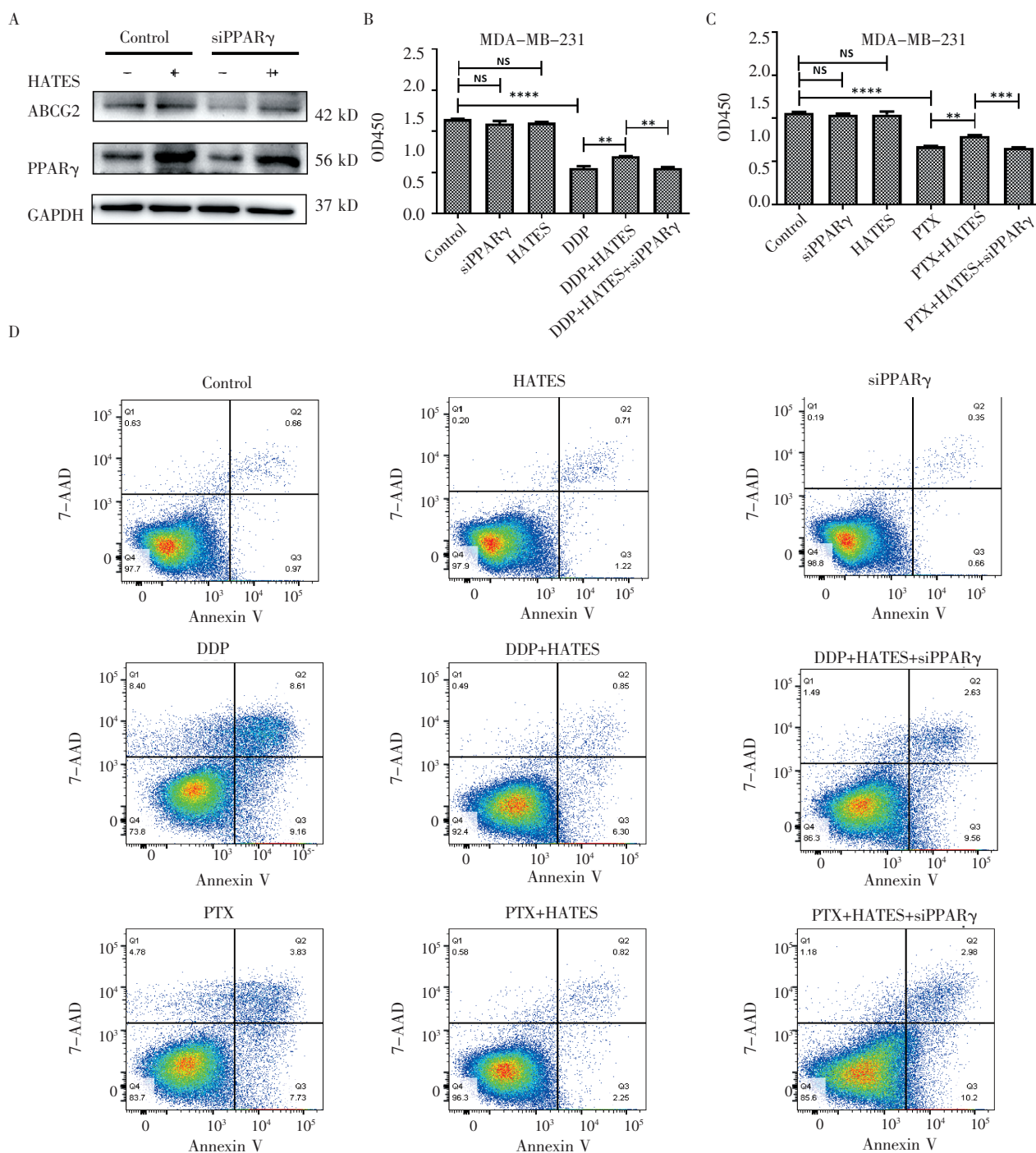
注:A:GW9662、曲格列酮处理含有 ABCG2 promoter-luc MDA-MB-231 细胞荧光素相对活性;B:HATES、GW9662、曲格列酮处理含有 ABCG2 promoter-luc MDA-MB-231 细胞荧光素相对活性;C:Western 印迹检测 HATES 处理 MDA-MB-231 细胞 PPAR γ 、ABCG2 蛋白表达;D:Western 印迹检测 HATES、GW9662 处理 MDA-MB-231 细胞 PPAR γ 、ABCG2 蛋白表达;HATES:人脂肪组织提取液;PPAR γ :过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ;GW9662:PPAR γ 拮抗剂;曲格列酮:PPAR γ 激动剂;ABCG2:三磷酸核苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2;GAPDH:内参蛋白;** $P<0.01$;*** $P<0.001$;**** $P<0.0001$

图 4 HATES 通过调节 PPAR γ 上调 ABCG2 表达

Fig 4 HATES upregulated ABCG2 expression by regulating PPAR γ

2.5 HATES 通过 PPAR γ /ABCG2 途径内源性促进 MDA-MB-231 细胞 MDR 如图 5A Western 印迹结果显示,沉默 PPAR γ 不仅降低了 ABCG2 的蛋白表达,还减弱了由 HATES 引起的 PPAR γ 和 ABCG2 蛋白表达的增强效应。如图 5B、5C 结果显示,应用 DDP

和 PTX 时,HATES 促进细胞的增殖,而沉默 PPAR γ 可抑制该效应($t=9.14, P<0.01; t=12.84, P<0.001$)。同样,如图 5D 流式凋亡检测结果所示,应用 DDP 和 PTX 时,HATES 抑制细胞的凋亡,沉默 PPAR γ 减弱了此影响($t=4.763, 16.25$, 均 $P<0.0001$)。



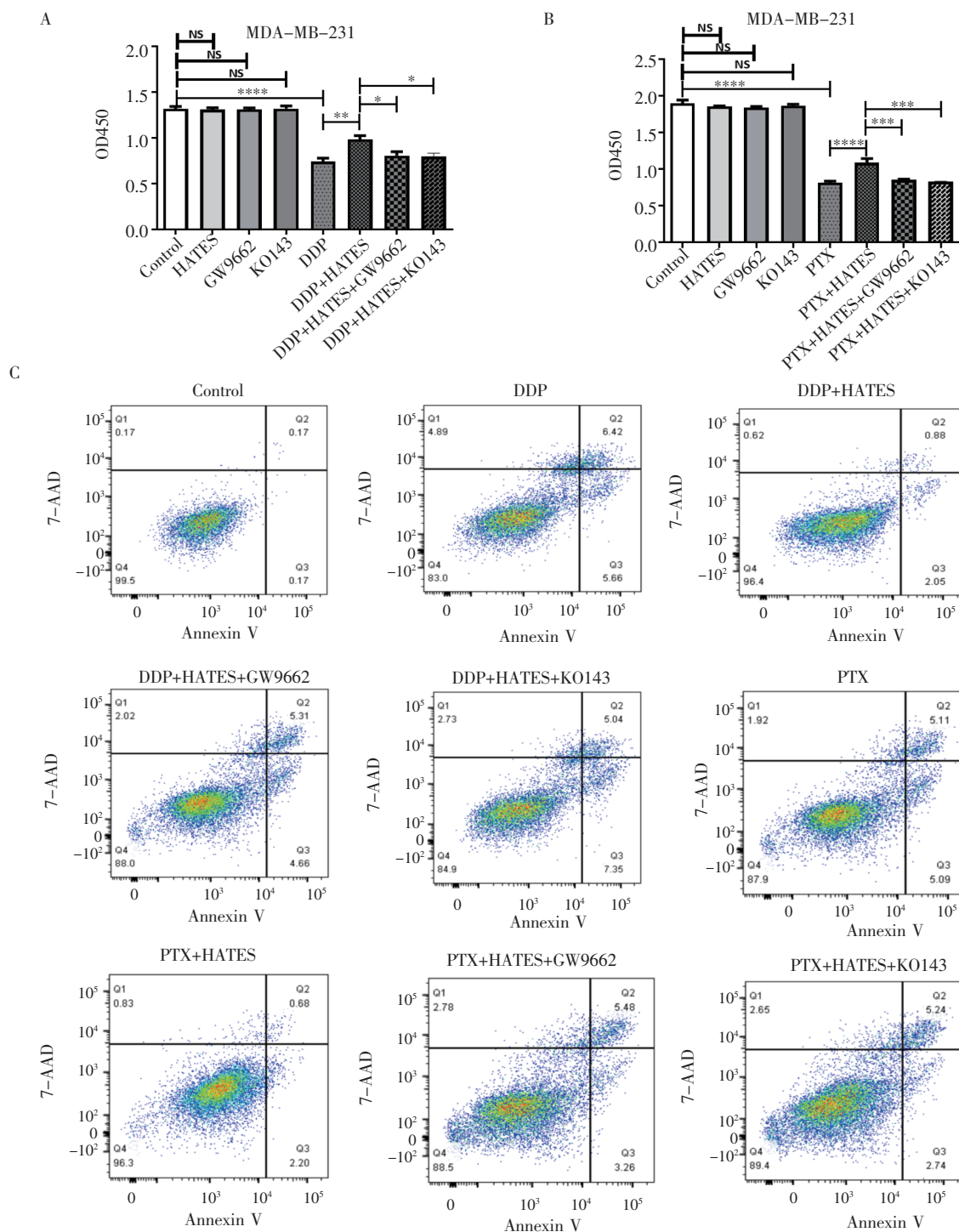
注:A: Western 印迹检测 HATES 处理 PPAR γ -siRNA 瞬时转染 MDA-MB-231 细胞 PPAR γ 、ABCG2 蛋白表达;B 和 C:CCK-8 检测 HATES、DDP/PTX 处理 PPAR γ -siRNA 瞬时转染 MDA-MB-231 细胞增殖;D: 流式检测 HATES、DDP/PTX 处理 PPAR γ -siRNA 瞬时转染 MDA-MB-231 细胞凋亡;HATES: 人脂肪组织提取液;PPAR γ : 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ;ABCG2: 三磷酸核苷转运蛋白 G 超家族成员 2;GAPDH: 内参蛋白;DDP: 顺铂;PTX: 紫杉醇; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$; NS: 差异无统计学意义

图 5 HATES 通过 PPAR γ /ABCG2 途径内源性促进 MDA-MB-231 细胞 MDR

Fig 5 HATES promoted MDA-MB-231 cell MDR via PPAR γ /ABCG2 pathway endogenously

2.6 HATES 通过 PPAR γ /ABCG2 途径外源性促进 MDA-MB-231 细胞 MDR 如图 6A,6B 结果所示,与 DDP+HATES 组相比,DDP+HATES+GW9662 组与 DDP+HATES+KO143 组的细胞增殖显著下降($t=3.02, 3.41$, 均 $P<0.05$);与 PTX+HATES 组相比,PTX+HATES+GW9662 组与 PTX+HATES+KO143 组的细胞

增殖显著下降($t=4.93, 4.59$, 均 $P<0.001$)。如图 6C 显示,与 DDP+HATES 组相比,DDP+HATES+GW9662 组与 DDP+HATES+KO143 组细胞凋亡率显著增高($t=9.06, 14.14$, 均 $P<0.0001$);与 PTX+HATES 组相比,PTX+HATES+GW9662 组与 PTX+HATES+KO143 组细胞凋亡率显著增高($t=13.72, 12.20$, 均 $P<0.0001$)。



注:A、B:CCK-8 检测 HATES,DDP,PTX,GW9662,KO143 处理 MDA-MB-231 细胞增殖;C: 流式检测 HATES,DDP,PTX,GW9662,KO143 处理 MDA-MB-231 细胞凋亡;Control:对照;HATES:人脂肪组织提取液;DDP:顺铂;PTX:紫杉醇,PPAR γ :过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ;GW9662:PPAR γ 拮抗剂;ABCG2:三磷酸核苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2;KO143:ABCG2 抑制剂;* $P<0.05$;*** $P<0.001$;**** $P<0.0001$;NS:差异无统计学意义

图 6 HATES 通过 PPAR γ /ABCG2 途径外源性促进 MDA-MB-231 细胞 MDR

Fig 6 HATES promoted MDA-MB-231 cell MDR via PPAR γ /ABCG2 pathway exogenously

3 讨论

TNBC 占有乳腺癌病例的 10%~15%,是最致命的乳腺癌亚型^[7]。TNBC 缺乏雌激素(ER)和孕激素受体(PR),表达低水平的人表皮生长因子受体 2(HER2),因此对激素或抗 HER2 治疗无反应^[18]。因其具有高异质性,侵袭性和缺乏治疗选择,化疗仍然是 TNBC 的标准疗法,但患者经常产生耐药性^[19]。脂肪细胞在构成乳腺组织的细胞中占最大比例,被认为是乳腺癌肿瘤微环境中的关键细胞类型^[20]。脂肪细胞来源的条件培养基有助于乳腺癌、胰腺导管癌和人类黑色素瘤对化疗和靶向治疗的抵抗^[21]。因此迫切需要探究 ARM 对 TNBC 化疗耐药的影响,以确定新的靶点来减弱或逆转化疗耐药。本研究通过 HATES 模拟 ARM,发现其在化疗药物存在情况下促进 TNBC 细胞增殖并减少细胞凋亡,证实 HATES 促进 TNBC 细胞的 MDR。

肿瘤细胞中的 MDR 与许多机制有关,包括 DNA 修复和损伤,药物代谢改变,抑制细胞凋亡和外排转运蛋白的过表达等^[22]。ABCG2 可有效的将广谱化疗药物排出肿瘤细胞,引起临床 MDR^[23]。因此,发现有效的调节剂以规避 ABCG2 介导肿瘤的 MDR 非常重要。PPAR γ 主要在脂肪组织、造血细胞和大肠中表达^[12]。脂肪酸是 PPAR γ 的天然激动剂。一项关于人脑树突状细胞研究显示 PPAR γ 是 ABCG2 新的调节剂^[13]。此外,在胎盘滋养层细胞中使用 PPAR γ 激动剂显著促进了 ABCG2 的表达^[14]。本研究荧光素酶报告基因结果表明 HATES 通过 PPAR γ 提高 ABCG2 的转录活性。

在各种富含脂肪细胞的相关肿瘤中,脂肪细胞在肿瘤进展中起着至关重要的作用。脂肪细胞-卵巢癌细胞共培养导致脂质从脂肪细胞直接转移到卵巢癌细胞,并促进体外和体内肿瘤细胞生长^[24]。同时脂肪细胞通过脂肪酸转运蛋白(FATPs)推动黑色素瘤的进展^[25]。本实验主要关注 HATES 通过 PPAR γ /ABCG2 影响 TNBC 细胞耐药,因此实验中 HATES 调整为不影响肿瘤细胞增殖、凋亡的浓度,以排除其影响耐药造成的干扰。在膀胱癌中, GW9662 及曲格列酮处理 48~96 h 均对细胞增殖有影响^[26],本实验通过探索 GW9662、曲格列酮及 KO143 的使用浓度及处理时间,结合细胞活性及状态选择 GW9662、曲格列酮及 KO143 预处理细胞 2 h^[27-28],在药物本身不改变肿瘤细胞增殖和凋亡以避免干扰的情况下,探讨 HATES 是否通过 PPAR γ /ABCG2 途径参与 MDR。在乳腺癌中,肿瘤细胞自分泌产生的脂肪因子 IL-6 可以上调 ABCG2

的表达,从而促进 MDR 水平^[7]。在本实验中, HATES 通过 PPAR γ /ABCG2 途径促进 TNBC 细胞的 MDR,但由于 HATES 成分复杂,且本研究中获取 HATES 需进行研磨和过滤等操作,会损失一部分发挥作用的效应因子,因此后续将应用脂质组学分析检测 HATES 中起主要作用的脂质代谢物,以及细胞因子芯片分析 HATES 中发挥主要作用的脂肪因子。

综上所述,本研究通过体外实验证实 HATES 通过 PPAR γ /ABCG2 途径促进 TNBC 细胞的 MDR,对临床干预 TNBC 提供潜在的治疗靶点具有指导意义。

参考文献:

- [1] BENVENUTO M, FOCACCETTI C, IZZI V, et al. Tumor antigens heterogeneity and immune response—targeting neoantigens in breast cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 72: 65–75.
- [2] LIU Y, TENG L, FU S, et al. Highly heterogeneous—related genes of triple—negative breast cancer; potential diagnostic and prognostic biomarkers[J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 644.
- [3] GE J, ZUO W, CHEN Y, et al. The advance of adjuvant treatment for triple—negative breast cancer[J]. *Cancer Biol Med*, 2021, 19(2): 187–201.
- [4] DEEPAK KGK, VEMPATI R, NAGARAJU G P, et al. Tumor microenvironment; challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 153: 104683.
- [5] LIU Y, TIRUTHANI K, WANG M, et al. Tumor—targeted gene therapy with lipid nanoparticles inhibits tumor—associated adipocytes and remodels the immunosuppressive tumor microenvironment in triple—negative breast cancer[J]. *Nanoscale Horiz*, 2021, 6(4): 319–329.
- [6] CHA Y J, KOO J S. Adipokines as therapeutic targets in breast cancer treatment[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22(11): 941–953.
- [7] LI Y, YU C, DENG W. Roles and mechanisms of adipokines in drug resistance of tumor cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 899: 174019.
- [8] LIU L, WU Y, ZHANG C, et al. Cancer—associated adipocyte—derived G—Csf promotes breast cancer malignancy via STAT3 signaling[J]. *J Mol Cell Biol*, 2020, 12(9): 723–737.
- [9] KATHAWALA R J, GUPTA P, JR ASHBY C R, et al. The modulation of Abc transporter—mediated multidrug resistance in cancer; a review of the past decade[J]. *Drug Resist Updat*, 2015, 18: 1–17.
- [10] AMAWI H, SIM H M, TIWARI A K, et al. Abc transporter—mediated multidrug—resistant cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1141: 549–580.
- [11] KUKAL S, GUIN D, RAWAT C, et al. Multidrug efflux transporter Abcg2: expression and regulation[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(21/22): 6887–6939.
- [12] MARION—LETELLIER R, SAVOYE G, GHOSH S. Fatty acids, eicosanoids and ppar gamma[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 785: 44–49.
- [13] SZATMARI I, VAMOSI G, BRAZDA P, et al. Peroxisome proliferator—activated receptor gamma—regulated Abcg2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(33): 23812–23823.

(下转第 294 页)

- for developing depressive symptoms in Parkinson's disease[J]. *J Neurol Sci*, 2021, 429: 117615.
- [12] SUN Y, WANG Z, HU K, et al. α and θ oscillations in the subthalamic nucleus are potential biomarkers for Parkinson's disease with depressive symptoms[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2021, 90: 98–104.
- [13] JAWORSKA N, BLIER P, FUSEE W, et al. Alpha power, alpha asymmetry and anterior cingulate cortex activity in depressed males and females[J]. *J Psychiatr Res*, 2012, 46(11): 1483–1491.
- [14] MENDONÇA I P, DUARTE-SILVA E, CHAVES-FILHO A J M, et al. Neurobiological findings underlying depressive behavior in Parkinson's disease: a review[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 83: 106434.
- [15] SU W, LIU H, JIANG Y, et al. Correlation between depression and quality of life in patients with Parkinson's disease[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2021, 202: 106523.
- [16] GALTS C P C, BETTIO L E B, JEWETT D C, et al. Depression in neurodegenerative diseases: Common mechanisms and current treatment options[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 102: 56–84.
- [17] LI Y, HUANG P, GUO T, et al. Brain structural correlates of depressive symptoms in Parkinson's disease patients at different disease stage[J]. *Psychiatry Res Neuroimaging*, 2020, 296: 111029.
- [18] IYER K K, AU T R, ANGWIN A J, et al. Theta and gamma connectivity is linked with affective and cognitive symptoms in Parkinson's disease[J]. *J Affect Disord*, 2020, 277: 875–884.
- [19] KIM Y D, JEONG H S, SONG I U, et al. Brain perfusion alterations in depressed patients with Parkinson's disease[J]. *Ann Nucl Med*, 2016, 30(10): 731–737.
- [20] LIU K, MA Q, WANG M. Comparison of quantitative electroencephalogram during sleep in depressed and non-depressed patients with Parkinson's disease[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 1046–1052.
- (2022–10–31 收稿)

+++++
(上接第 287 页)

- [14] LIN Y, BIRCSAK K M, GORCZYCA L, et al. Regulation of the placental bcrp transporter by ppar gamma[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2017, 31(5): 10.
- [15] KIM C E, PARK H Y, WON H J, et al. Repression of ppargamma reduces the Abcg2-mediated efflux activity of M2 macrophages[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2021, 130: 105895.
- [16] NIE J, ZHANG J, WANG L, et al. Adipocytes promote cholangiocarcinoma metastasis through fatty acid binding protein 4[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 183.
- [17] WON K A, SPRUCK C. Triple-negative breast cancer therapy: current and future perspectives (review)[J]. *Int J Oncol*, 2020, 57(6): 1245–1261.
- [18] BAI X, NI J, BERETOV J, et al. Triple-negative breast cancer therapeutic resistance: where is the achilles' heel?[J]. *Cancer Lett*, 2021, 497: 100–111.
- [19] NEDELJKOVIC M, DAMJANOVIC A. Mechanisms of chemotherapy resistance in triple-negative breast cancer-how we can rise to the challenge[J]. *Cells*, 2019, 8(9): 957.
- [20] CHOI J, CHA Y J, KOO J S. Adipocyte biology in breast cancer: from silent bystander to active facilitator[J]. *Prog Lipid Res*, 2018, 69: 11–20.
- [21] CAO Y. Adipocyte and lipid metabolism in cancer drug resistance[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(8): 3006–3017.
- [22] ZHANG Y K, WANG Y J, GUPTA P, et al. Multidrug resistance proteins (Mrps) and cancer therapy[J]. *AAPS J*, 2015, 17(4): 802–812.
- [23] HSU H H, CHEN M C, BASKARAN R, et al. Oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells is mediated via activation of Abcg2 to alleviate stress induced apoptosis[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(7): 5458–5467.
- [24] NIEMAN K M, KENNY H A, PENICKA C V, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth[J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1498–1503.
- [25] ZHANG M, DI MARTINO J S, BOWMAN R L, et al. Adipocyte-derived lipids mediate melanoma progression via fatp proteins[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(8): 1006–1025.
- [26] LV S, WANG W, WANG H, et al. Ppargamma activation serves as therapeutic strategy against bladder cancer via inhibiting PI3K-Akt signaling pathway[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 204.
- [27] YUAN X, ZHANG Z, GONG K, et al. Inhibition of reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinases pathway by pioglitazone attenuates advanced glycation end products-induced proliferation of vascular smooth muscle cells in rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(5): 618–623.
- [28] FLORI E, ROSATI E, CARDINALI G, et al. The alpha-melanocyte stimulating hormone/peroxisome proliferator activated receptor-gamma pathway down-regulates proliferation in melanoma cell lines[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 142.
- (2022–12–03 收稿)