

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.17.007

高糖状态下甲状旁腺素受体 1 对乳腺癌的作用机制研究*

梁华晟, 钟宇华

(广西医科大学第九附属医院内分泌代谢研究所, 广西北海 536000)

[摘要] **目的** 阐明高糖状态下甲状旁腺素受体 1(PTH1R)对乳腺癌细胞株 SHZ-88 的作用机制。**方法** 应用实时(real time)PCR 分别检测 0(对照组)、5、15、25 mmol/L 葡萄糖浓度下 PTH1R mRNA 水平;构建出 PTH1R 基因沉默(siPTH1R)的细胞模型后,分别应用 MTT 法、TUNEL-FITC/Hoechst33258 及 Western blot 法检测对照组、25 mmol/L 葡萄糖处理组(高糖组)、25 mmol/L 葡萄糖处理的阴性 PTH1R 基因序列组(高糖 siPTH1R-NC 组)及高糖阳性 PTH1R 基因序列组(高糖 siPTH1R 组)细胞活力、细胞凋亡情况及 Bax、Bcl-2 蛋白的表达。**结果** 随着葡萄糖浓度升高,PTH1R mRNA 水平增高,其中 25 mmol/L 葡萄糖处理后 PTH1R mRNA 水平最高(均 $P < 0.01$);高糖 siPTH1R 组细胞活力($P < 0.05$, $P < 0.01$ 及 $P < 0.01$)及 Bcl-2 表达(均 $P < 0.01$)低于对照组、高糖组及高糖 siPTH1R-NC 组;高糖 siPTH1R 组中细胞凋亡水平及 Bax 表达高于对照组、高糖组及高糖 siPTH1R-NC 组(均 $P < 0.01$);与对照组比较,高糖组细胞活力($P < 0.01$)及 Bcl-2 表达($P < 0.01$)增高,而 Bax 表达($P < 0.01$)降低。**结论** 高糖状态下 PTH1R 表达水平与 SHZ-88 细胞增殖能力有关,抑制 PTH1R 表达可能为糖尿病合并乳腺癌治疗有效靶点之一。

[关键词] 受体, 甲状旁腺激素 1; SHZ-88 细胞; 细胞存活; 葡萄糖

[中图分类号] R587.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)17-2324-03

Effect of parathyroid hormone 1 receptor on SHZ-88 cell under high glucose condition*

Liang Huasheng, Zhong Yuhua

(Endocrine Metabolism Research Institute, the Ninth Affiliated Hospital of Guangxi

Medical University, Beihai, Guangxi 536000, China)

[Abstract] **Objective** To clarify the effect of PTH1R on SHZ-88 cell under high glucose. **Methods** The expression of PTH1R mRNA of 0, 5, 15 and 25 mmol/L glucose groups were detected by realtime PCR. After the successful construction of recombinant PTH1R-siRNA vectors established in SHZ-88 cell model. Cell viability, cell apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 of Control groups(0 mmol/L glucose), high glucose (25 mmol/L glucose), high glucose + siPTH1R-Negative control group and high glucose + siPTH1R groups were measured by MTT, Annexin V and Western blot in SHZ-88 cell. **Results** SHZ-88 cell by stimulated 25 mmol/L glucose significantly promoted the level of PTH1R mRNA (all $P < 0.01$), this promotion effect is concentration dependent. Compared with Control groups, high glucose groups and high glucose + siPTH1R-NC control groups, the cell viability and the expression of Bcl-2 decreased in high glucose + siPTH1R groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.01$), but cell apoptosis and the expression of Bax increased (all $P < 0.01$). High glucose groups had lower cell apoptosis and higher cell viability ($P < 0.01$) level than others. High glucose could up-regulate the expression of Bcl-2 and down-regulate the expression of Bax (all $P < 0.01$). **Conclusion** There is a closely relationship between PTH1R and cell proliferation which is under the condition of high glucose. PTH1R maybe a good therapy target of diabetes complicat with breast cancer.

[Key words] receptors, parathyroid hormone 1; SHZ-88 cell; cell survival; glucose

近年来,流行病学研究提示,在糖尿病患者中,乳腺癌的发生率显著高于非糖尿病患者群^[1]。但具体的机制仍然未阐明。G 蛋白耦联受体甲状旁腺激素受体 1(type 1 receptor parathyroid hormone, PTH1R)发现于 20 世纪 80 年代,是甲状旁腺素相关蛋白(parathyroid hormone-related protein, PTHrP)的作用受体,PTHrP 是一种与细胞增殖与凋亡调控相关的生长因子,既往本课题组研究发现乳腺浸润性导管癌组织中,糖尿病患者 PTH1R 阳性表达率高于非糖尿病患者^[2]。为此,本实验拟进行在高糖状态下探讨 PTH1R 对乳腺癌细胞株中的作用,为寻求糖尿病与乳腺癌之间的内在联系、糖尿病患者合并乳腺癌的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株选择及培养 选用大鼠乳腺癌细胞系 SHZ-88

(中科院)进行研究,采用 RPMI1640 基础培养基(Gibco 公司),置于 37 °C 含 5% CO₂ 培养箱内。每周换液 2~3 次。

1.2 实时(real time)PCR 检测 PTH1R mRNA 表达 分别以 0、5、15、25 mmol/L 葡萄糖为研究浓度,作用 48 h 后应用 real time PCR 检测不同浓度下 PTH1R mRNA 表达情况。采用 Sybrgreen I 染料法,总 RNA 的抽提与互补 DNA(cDNA)的合成按照试剂盒说明书进行。本实验设定 β -actin 为内参基因。采用 Primer 5.0 软件设计相应 PTH1R 和 β -actin 引物。PTH1R 引物序列,正向:5'-AGT ACC GGA AGC TGC TCA GGT C-3',反向:5'-GCA TCT GGA TCT GCC ACA AT-3',扩增片段 120 bp; β -actin 引物序列,正向:5'-CCT AGG CAC CAG GGT GTG AT-3',反向:5'-TTG GTG ACA ATG CCG TGT TC-3',扩增片段为 122 bp。各组 PTH1R mRNA 分别在

* 基金项目:广西科技厅自然科学基金资助项目(桂科自 0991294、桂科自 2010GXNSFA013132);广西北海市科学研究与技术开发计划项目(北科合字 200901059)。 作者简介:梁华晟(1977-),副主任医师,博士,主要从事糖尿病及其并发症发病机制研究。

荧光定量 PCR 仪上进行 real time PCR 反应,△△Ct 方法进行计算和统计。

1.3 PTH1R 基因沉默 SHZ-88 细胞的构建及鉴定 参考本研究课题组所构建 PTH1R 基因沉默的细胞模型进行试验^[7],共筛选出 3 个阳性克隆及一个阴性克隆。应用 pSUPERretro-GFP/Neo 载体(美国 OligoEngine 公司)合成干扰片段后,经过菌落 PCR 及测序鉴定,应用 Lipofectamine2000(美国 Invitrogen 公司)转染 SHZ-88 细胞,48 h 后 Western blot 检测 PTH1R 蛋白表达筛选出最佳的 PTH1R 干扰片段的 SHZ-88 细胞模型。

1.4 MTT 检测 SHZ-88 细胞活力 取浓度为 25 mmol/L 葡萄糖为研究浓度。无糖培养基组(对照组);高糖状态(25 mmol/L D-葡萄糖,后同)培养基组(高糖组);高糖状态下的阴性基因序列组(高糖 siPTH1R-NC 组);高糖状态下的阳性基因序列组(高糖 siPTH1R 组)。在处理 48 h 进行以下实验。取对数生长期 SHZ-88,按每孔约 3×10^4 个接种于 6 孔培养板中,待细胞贴壁后,吸去原有 RPMI 1640 培养液,换为含 10% 小牛血清(FCS)培养液,培养 24 h 使所有细胞的生长同步化。在 37 °C,5% CO₂ 条件下培养 2 d,每孔细胞均为每 24 小时换液 1 次。分别在 8、16、24 及 48 h MTT(南京凯基生物技术公司)法检测细胞增殖情况。以于酶标仪上检测 490 nm 波长吸光度(A)值。

1.5 SHZ-88 细胞凋亡情况 将细胞种于干净盖玻片上。PBS 洗细胞 3 次,5 min/次。4% 甲醛固定 20 min。70% 乙醇 -20 °C 30 min。PBS 洗 3 次,5 min/次。0.1% Triton X-100/0.1% 柠檬酸三钠溶液破膜,室温 10 min。PBS 洗 3 次,5 min/次。3% H₂O₂ 室温孵育 10 min 封闭内源性过氧化物酶。PBS 洗 3 次,5 min/次。TdT 酶反应液(buffer; TdT 酶; FITC-dUTP 为 45:4:1)37 °C 湿盒避光孵育 90 min。PBS 洗 2 次,2 min/次,避光。Hoechst33258 复染核,室温 20 min,避光。0.5% Tween 20-PBS 洗 3 次,2 min/次,避光。缓冲甘油封片,拍照。实验结果以 Olympus BX51 荧光显微镜拍照(×250)。结果判定:TUNEL-FITC 染色阳性,同时 Hoechst33258 染色为强蓝色为凋亡细胞。TUNEL-FITC 染色阴性,同时 Hoechst33258 染色浅蓝色为正常细胞。

1.6 Western blot 检测 PTH1R、凋亡因子 Bax 及抑凋亡因子 bcl-2 表达 进行常规细胞裂解获取蛋白后,与预染蛋白 marker 一起上样,经分离胶和浓缩胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,完后将蛋白质电转印到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,将膜放入含 100 g/L 脱脂奶粉的 TBST 中封闭,4 °C 过夜,然后与一抗[鼠抗 PTH1R(1:1 000)、Bax(1:1 000)及 Bcl-2(1:750)均为美国 Santa Cruz 公司]室温孵育 90 min 或 4 °C 过夜,用 TBST 液洗膜 3 次,每次 5 min,PVDF 膜与辣根过氧化物酶标记的相应二抗(武汉 Boster 公司,1:1 000)室温孵育 45 min 后,TBST 液洗膜 3 次,每次 5 min。ECL 显色试剂盒显示目的条带。

1.7 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,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 不同葡萄糖浓度对 SHZ-88 细胞株 PTH1R mRNA 水平及细胞活性的影响 应用 real time PCR 检测不同浓度葡萄糖对 SHZ-88 细胞中 PTH1R mRNA 水平,结果发现 25 mmol/L 葡萄糖作用 SHZ-88 细胞 PTH1R mRNA 水平高于其他 3 组葡萄糖浓度,差异有统计学意义($P < 0.01$)。且 PTH1R mRNA

水平随着葡萄糖浓度升高而升高,提示 SHZ-88 细胞中 PTH1R mRNA 水平具有葡萄糖浓度依赖性。为进一步检测不同浓度葡萄糖对 SHZ-88 细胞活性的影响,研究将应用 MTT 检测各组细胞活力,结果发现 SHZ-88 细胞活性具有葡萄糖浓度依赖性,25 mmol/L 葡萄糖浓度刺激下 SHZ-88 细胞活性高于 0、5、15 mmol/L 葡萄糖的作用。见表 1。

表 1 不同浓度葡萄糖对 PTH1R mRNA 及细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$)

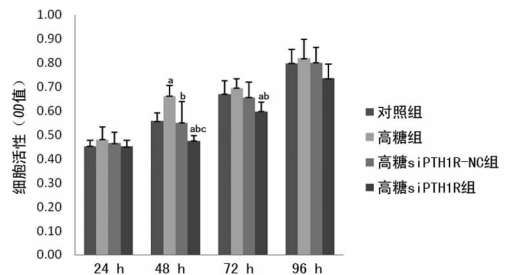
葡萄糖浓度(mmol/L)	PTH1R mRNA	细胞活性(%)
0	1.00 ± 0.00	0.55 ± 0.04
5	1.13 ± 0.11	0.57 ± 0.02
15	1.18 ± 0.05 ^a	0.61 ± 0.03 ^a
25	1.57 ± 0.11 ^{bcd}	0.68 ± 0.01 ^{bcd}

^a: $P < 0.05$,与 0 mmol/L 葡萄糖比较;^b: $P < 0.01$,与 0 mmol/L 葡萄糖比较;^c: $P < 0.01$,与 5 mmol/L 葡萄糖比较;^d: $P < 0.01$,与 15 mmol/L 葡萄糖比较。

2.2 通过 PTH1R 基因沉默 SHZ-88 细胞模型确定 PTH1R mRNA 水平及细胞 Western blot 结果提示转染 48 h 后 siPTH1R-2 中 PTH1R 蛋白表达抑制率达到 60% 以上,高于 siPTH1R-1 及 siPTH1R-3,故此,siPTH1R-2 基因序列为最佳 PTH1R 抑制基因序列,用于后续研究。

2.3 PTH1R 对高糖状态下 SHZ-88 细胞增殖及凋亡的影响

应用 MTT 检测 24~96 h 的 SHZ-88 细胞活力,以阐明细胞增殖能力,结果在 48 h 时,高糖组细胞活力高于对照组、高糖 siPTH1R-NC 组及高糖 siPTH1R 组(均 $P < 0.01$),同时与对照组及高糖 siPTH1R-NC 组比较,高糖 siPTH1R 组细胞活力受显著抑制(均 $P < 0.01$),见图 1。为进一步观察 PTH1R 对 SHZ-88 细胞凋亡的影响,应用 TUNEL-FITC/Hoechst33258 检测细胞凋亡,结果如图 2 所示高糖 siPTH1R 组细胞凋亡水平(9.13 ± 1.61)%,显著高于对照组(0.88 ± 0.21)%、高糖组(0.71 ± 0.23)%及高糖 siPTH1R-NC 组(0.96 ± 0.12)%差异有统计学意义($P < 0.05$)。该系列结果说明高糖状态下 PTH1R 表达水平可能影响了 SHZ-88 细胞的增殖及凋亡。在高糖 siPTH1R-NC 组较高糖组细胞增殖水平降低、凋亡增高,考虑可能与转染试剂的细胞毒性有关。



^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.01$,与高糖组比较;^c: $P < 0.01$,与高糖 siPTH1R-NC 组比较。

图 1 PTH1R 对高糖状态下 SHZ-88 细胞增殖能力的影响

2.4 PTH1R 对高糖状态下 SHZ-88 细胞中 Bax 及 Bcl-2 表达的影响 与对照组、高糖组及高糖 siPTH1R-NC 组比较,PTH1R 干扰处理后,促凋亡因子 Bax 表达上调,同时促增殖因子 Bcl-2 表达下调(均 $P < 0.01$),高糖组中 Bax 表达低于对照组,Bcl-2 表达高于对照组(均 $P < 0.01$),进一步提示高糖状态下 PTH1R 可能通过影响 Bax 及 Bcl-2 的表达水平调控了

SHZ-88 细胞的存活能力。见图 3。

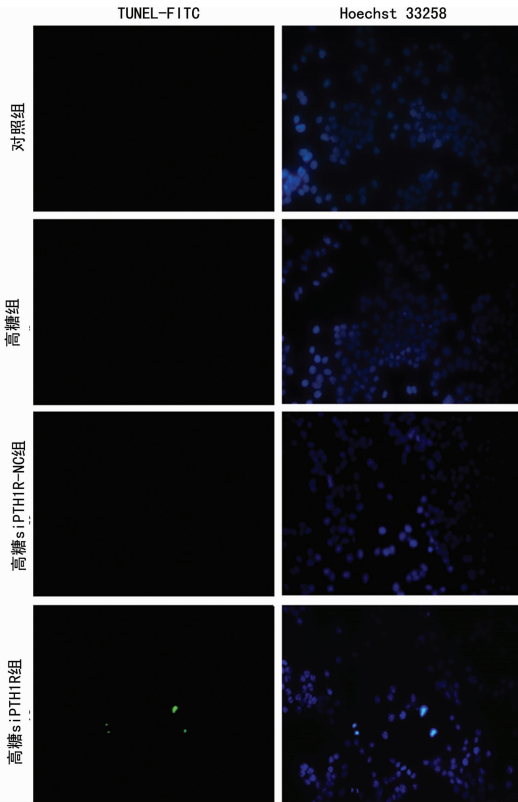
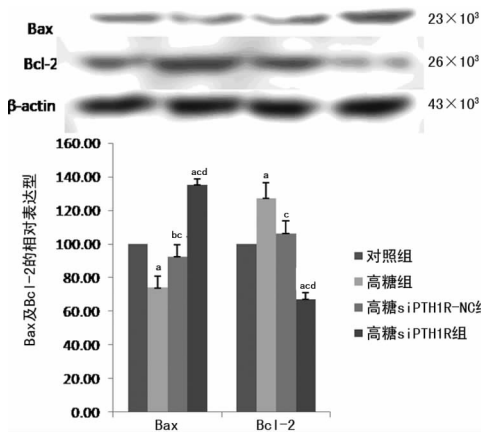


图 2 细胞凋亡水平检测



^a: $P < 0.01$; ^b: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^c: $P < 0.01$, 与高糖组比较; ^d: $P < 0.01$, 与高糖 siPTH1R-NC 组比较。

图 3 PTH1R 对高糖状态下 SHZ-88 细胞 Bax 及 Bcl-2 表达影响

3 讨论

近年来,由于糖尿病患者乳腺癌发病人数的迅猛增长,糖尿病和乳腺癌的关系受到越来越多的关注。大量流行病学证据表明糖尿病患者乳腺癌的发病率和病死率较非糖尿病患者显著增加^[1]。糖尿病患者高发乳腺癌的原因及其机制目前仍不十分清楚,一般认为和高糖、胰岛素抵抗和(或)高胰岛素血症等因素有关。流行病学研究表明 PTHrP 及其受体 PTH1R 与恶性肿瘤的发生发展有着密切的关系,特别在乳腺癌的转移发生发展中扮演着重要的角色。目前,有关 PTH1R 与乳腺癌相关方面的研究较少,既往本课题组已经发现糖尿病合并乳腺癌患者的 PTH1R 表达水平显著高于非糖尿病乳腺癌患者^[2],但其作用机制尚未完全清楚。

为进一步阐明高糖诱导 PTH1R 表达后对 SHZ-88 细胞生

物学行为的影响,本研究将引入 PTH1R 基因沉默的细胞模型进行观察。结果发现,在高糖状态下 PTH1R 基因沉默的 SHZ-88 细胞活力分别比较高糖组及高糖 siPTH1R-NC 组下降,而且 PTH1R 低表达能显著促进 SHZ-88 细胞凋亡,诱导促凋亡因子 Bax 表达上调,抑制促增殖因子 Bcl-2 表达,相应在高糖状态下 SHZ-88 细胞增殖活性显著高于对照组。由于葡萄糖是刺激或维系肿瘤细胞生长主要营养物质,Okumura 等^[3]研究发现高浓度葡萄糖(25 mmol/L 葡萄糖)能刺激人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞增殖,既往的研究还发现各种与葡萄糖调节有关的细胞因子或激素,包括胰岛素、葡萄糖转运蛋白 4、葡萄糖调节蛋白 78 等均是调控乳腺癌增殖的重要转录因子,该系列因子由葡萄糖诱导表达后,能显著促进乳腺癌细胞增殖,抑制凋亡^[4-7]。Dittmer 等^[8]在应用基因干扰技术沉默 PTHrP 后也发现能抑制乳腺癌细胞株的增殖。

既往本课题研究也已经提示,由于 PTHrP 及其受体 PTH1R 在恶性肿瘤的发生发展中起着重要的作用,PTH1R 的激活与肿瘤生物学行为密切相关,PTH1R 阳性的肿瘤比阴性的肿瘤有更大的恶性倾向,高糖状态下乳腺癌细胞 PTH1R 表达升高,并与其预后相关^[2]。结合本研究的结果提示高糖可以直接刺激 PTH1R 的表达,从而影响乳腺癌细胞的增殖,PTH1R 可能是高糖状态下肿瘤细胞生存保护性因素之一。也逆向提示了抑制 PTH1R 的表达可能是治疗糖尿病合并乳腺癌的有效靶点之一。

参考文献

- [1] Michels KB, Solomon CG, Hu FB, et al. Type 2 diabetes and subsequent incidence of breast cancer in the Nurses' Health Study[J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(6): 1752-1758.
- [2] 黄宇, 梁华晟, 钟宇华, 等. 甲状腺激素受体 1 在糖尿病合并乳腺浸润性导管癌患者的表达及意义[J]. *山东医药*, 2012, 52(36): 40-41.
- [3] Okumura M, Yamamoto M, Sakuma H, et al. Leptin and high glucose stimulate cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells: reciprocal involvement of PKC- α and PPAR expression[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1592(2): 107-116.
- [4] Schmidt M, Voelker HU, Kapp MA, et al. Glycolytic phenotype in breast cancer: activation of Akt, up-regulation of GLUT1, TKTL1 and down-regulation of M2Pk [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(2): 219-225.
- [5] Gunter MJ, Hoover DR, Yu HA, et al. Insulin, Insulin-Like growth Factor-I, and risk of breast cancer in postmenopausal women[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101(1): 48-60.
- [6] Yeung B, Kwan B, He QY, et al. Glucose-regulated protein 78 as a novel effector of BRCA1 for inhibiting stress-induced apoptosis[J]. *Oncogene*, 2008, 27(53): 6782-6789.
- [7] Kuo SJ, Wu YC, Chen CP, et al. Expression of glucose transporter-1 in Taiwanese patients with breast carcinoma—a preliminary report[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2006, 22(7): 339-345.
- [8] Dittmer A, Vetter M, Schunke D, et al. Parathyroid hormone-related protein regulates tumor-relevant genes in breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(21): 14563-14572.