文章编号:1000-5404(2012)01-0029-05

论著

大豆异黄酮激活 PPARγ 促进人前列腺癌 DU-145 细胞凋亡

韦红梅,周 静,戎 嵘,朱俊东 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市医学营养研究中心,重庆市营养与食品安全重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨染料异黄酮(genistein,GEN)和大豆苷元(daidzein,DAI)对人前列腺癌 DU-145 细胞凋亡的影响及其与过氧化物酶体增殖物激活体受体γ(peroxisome proliferators-activated receptorγ,PPARγ)的关系。**方法** 采用过氧化物酶体增殖物反应元件(peroxisome proliferator responsive element,PPRE)驱动的荧光素酶报告基因检测 GEN、DAI 对 DU-145 细胞 PPARγ 的激活作用;GEN、DAI 单独或联合 PPARγ 选择性拮抗剂 GW9662 处理 DU-145 细胞,采用免疫荧光化学染色方法观察 PPARγ 定位分布变化;TUNEL 法和 Annexin Ⅴ/PI 双染色流式细胞术检测细胞凋亡的变化。**结果** GEN、DAI 明显增强转染 PPRE-TK-Luc 质粒的 DU-145 细胞中荧光素酶表达活性,且这种作用可被 GW9662 所逆转。GEN 或 DAI 单独作用于 DU-145 细胞时,PPARγ 发生核移位;细胞凋亡率明显增加($P<0.05$)。GW9662 分别与 GEN 或 DAI 联合作用时,GEN、DAI 促进 PPARγ 核移位和诱导细胞凋亡的作用明显削弱($P<0.05$)。**结论** 大豆异黄酮可通过激活 PPARγ 信号途径,促进人前列腺癌 DU-145 细胞凋亡。

[关键词] 大豆异黄酮;前列腺癌;PPARγ;凋亡
[中图法分类号] R737.25;R151.2; R730.23 [文献标志码] A

Soy isoflavones promotes apoptosis in human prostate cancer DU-145 cells through PPARγ activation

Wei Hongmei, Zhou Jing, Rong Rong, Zhu Jundong (Department of Nutrition and Food Hygiene, Chongqing Medical Nutrition Research Center, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of genistein (GEN) and daidzein (DAI) on apoptosis in human prostate cancer DU-145 cells and their correlation with peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPARγ). **Methods** PPARγ activity in prostate cancer DU-145 cells treated with soy isoflavones was measured by peroxisome proliferator responsive element (PPRE)-driven luciferase reporter gene assay. DU-145 cells were respectively treated genistein and daidzein alone and either of them combined with GW9662, which was a selective inhibitor of PPARγ, for 48 h. The expression and distribution of PPARγ were detected by immunofluorescence staining. Cell apoptosis was determined by TUNEL assay and Annexin Ⅴ/PI dual-color flow cytometry. **Results** Genistein and daidzein significantly enhanced luciferase expression activity in DU-145 cells transfected with PPRE-TK-Luc plasmid, and the effect could be reversed by GW9662. The changes of PPARγ expression in DU-145 cells were not significant after treatment with either genistein or daidzein, but PPARγ translocation to nucleus increased. The apoptotic rate of DU-145 cells treated with genistein or daidzein increased significantly ($P<0.05$). When cells were treated with either genistein or daidzein combined with GW9662, the increased apoptosis rate and PPARγ nucleus translocation were significantly inhibited. **Conclusion** Soy isoflavones promote apoptosis in human prostate cancer DU-145 cells through PPARγ activation.

[**Key words**] soy isoflavones; human prostate cancer; peroxisome proliferators-activated receptor γ; apoptosis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771793). Corresponding author: Zhu Jundong, E-mail: zjdnfs@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30771793)
[通信作者] 朱俊东,E-mail:zjdnfs@126.com

大豆及其制品是中国、日本等亚洲国家居民经常食用的食物，基于流行病学研究资料的Meta分析结果表明，中国、日本等亚洲国家男性前列腺癌发病风险显著低于西方白人男性与亚洲人日常膳食摄入高水平的大豆及其制品有关[1]。目前认为大豆中的两种主要异黄酮成分染料木黄酮(genistein，GEN)和大豆苷元(daidzein，DAI)是其主要抗癌活性成分。体内外实验研究发现，大豆异黄酮具有抑制肿瘤细胞增殖和侵袭转移、诱导细胞凋亡等抑制前列腺癌的作用，但其确切的作用机制尚未完全阐明[2]。近年研究发现，过氧化物酶体增殖物激活受体γ(peroxisome proliferator-activated receptor gamma，PPARγ)作为配体依赖性激活的核转录因子与肿瘤发生、发展密切有关，PPARγ配体被认为是潜在的肿瘤化学防治药物[3]。大豆异黄酮已被初步证实是PPARγ的天然配体[4-5]，但大豆异黄酮抑制前列腺癌的作用是否与其作为PPARγ配体激活肿瘤细胞PPARγ信号通路有关尚不清楚。本研究以人前列腺癌DU-145细胞为研究对象，采用荧光素酶报告基因检测、免疫荧光细胞化学染色、TUNEL染色和Annexin Ⅴ/PI双染色流式细胞术检测等方法，首先观察GEN和DAI对DU-145细胞PPARγ是否具有激活作用，然后比较GEN、DAI单独或联合PPARγ选择性拮抗剂GW9662处理DU-145细胞后，其PPARγ表达水平以及细胞凋亡的变化，以探讨大豆异黄酮对前列腺癌细胞凋亡的影响及其与PPARγ的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

人前列腺癌DU-145细胞株由中科院上海细胞所提供；RPMI1640培养基(HyClone公司)；新生胎牛血清(杭州四季青公司)；GEN、DAI、罗格列酮(rosglitazone，RGZ)、GW9662(美国Sigma公司)；荧光素酶报告基因质粒PPRE-TK-Luc由美国R. Evans教授惠赠；内对照质粒phRL-CMV(Promega公司)；Sofast基因转染试剂(厦门太阳马公司)；双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega公司)；PPARγ羊抗人单克隆抗体购自(北京博奥森公司)；FITC标记的兔抗山羊IgG抗体(美国Santa Cruz公司)；DAPI购自(Beyotime碧云天)；Annexin Ⅴ凋亡检测试剂盒(贝博生物)；TUNEL试剂盒(德国Roche公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 DU-145细胞培养于含10%胎牛血清、100 kU/L青霉素、100 kU/L链霉素的RPMI1640的培养液中，37 ℃、5% CO_2、100%饱和湿度条件下培养。

1.2.2 荧光素酶报告基因检测PPARγ转录活性

1.2.2.1 细胞转染及处理 取对数生长期的DU-145细胞，经常规消化后，调整细胞密度为2×10^5/ml，以每孔200 μl接种于96孔培养板，置于CO_2培养箱内孵育24 h后，将报告基因质粒PPRE-TK-Luc及内对照质粒phRL-CMV转入细胞。12 h后弃上清，以pH=7.2的PBS洗涤细胞后，按以下实验分组加入处理因素：溶剂对照组(DMSO)；GEN处理组；DAI处理组；RGZ处理组(阳性对照)；GEN+GW9662联合处理组；DAI+GW9662联合处理组；RGZ+GW9662联合处理组。GEN、DAI设0.5×10^{-5}、2×10^{-5}、8×10^{-5} mol/L 3个剂量，RGZ、GW9662的剂量分别为2×10^{-5}、1×10^{-5} mol/L。置于CO_2培养箱内孵育24 h后，弃上清，用pH=7.2的PBS洗涤细胞后，每孔加入100 μl细胞裂解液裂解细胞，收集细胞裂解产物进行报告基因检测。

1.2.2.2 报告基因荧光素酶活性检测 取20 μl细胞裂解产物，采用Promega公司双荧光素酶报告基因检测试剂盒进行目的报告基因萤火虫荧光素酶及内对照海肾荧光素酶活性检测，PPARγ转录活性以萤火虫荧光素酶表达值与内对照海肾荧光素酶表达值的比值来表示。

1.2.3 免疫荧光细胞化学染色检测PPARγ的定位分布 DU-145细胞以每孔2×10^4个细胞接种于预先置有洁净盖玻片(8 mm×8 mm)的24孔培养板中，实验分组方法同1.2.2.1，GEN、DAI的剂量均为8×10^{-5} mol/L，RGZ、GW9662的剂量分别为2×10^{-5}、1×10^{-5} mol/L。处理48 h后，取出各组盖玻片，盖玻片上细胞经4%多聚甲醛室温固定30 min，PBS浸洗3次，0.3% H_2O_2-甲醇处理灭活内源性过氧化物酶，10%正常山羊血清封闭30 min后，加入1∶200的羊抗人PPARγ单克隆抗体，4 ℃孵育过夜。PBS浸洗3次后，加入1∶500的FITC标记兔抗山羊IgG二抗，室温孵育2 h后，DAPI显色3 min，PBS漂洗后，常规脱水，90%甘油封片，激光共聚焦显微镜下观察照相。

1.2.4 TUNEL法观察细胞凋亡 细胞爬片制备方法同1.2.3，盖玻片上细胞经4%多聚甲醛室温固定1 h，PBS浸洗3次，3% H_2O_2-甲醇溶液室温封闭10 min，PBS浸洗3次，以0.1% Triton X-100在冰上孵育2 min，PBS浸洗2次，按照试剂盒说明书操作，最后经NBT/BCIP显色，用DAPI显色剂染细胞核，然后用激光共聚焦扫描显微镜观察照相。

1.2.5 Annexin Ⅴ-PI双标记法检测细胞凋亡 取对数生长期的DU-145细胞，实验分组同1.2.3，处理48 h后，胰酶常规消化，离心、收集细胞，调整细胞密度为1×10^6/ml，2 000 r/min×5 min离心，弃上清，加入冰预冷PBS洗涤2次，2 000 r/min×5 min离心，弃上清，将细胞重悬于200 μl的缓冲液中，先加入5 μl Annexin Ⅴ-FITC，轻轻摇匀，置于室温下避光反应15 min后，再加入10 μl PI，4 ℃避光反应5 min后，上流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 17.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 GEN、DAI和RGZ对DU-145细胞PPARγ的激活作用

由表1可见，GEN、DAI和RGZ单独处理均可明显增强DU-145细胞中报告基因荧光素酶的表达活性($P<0.05$)，且

GEN、DAI 的激活作用存在剂量依赖性趋势。PPARγ 选择性拮抗剂 GW9662 分别与 GEN、DAI 和 RGZ 联合处理时，DU-145 细胞中荧光素酶的表达活性较单独处理组显著下降（$P<0.05$），并与对照组比较无显著差异（$P>0.05$）。

表 1 GEN、DAI 和 RGZ 对 DU-145 细胞转染荧光素酶报告基因表达活性的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	荧光素酶相对活性（倍）
对照组	3.12 ± 0.58
GEN 处理组	
0.5×10^{-5} mol/L	6.35 ± 0.44[a]
2×10^{-5} mol/L	8.67 ± 0.54[a]
8×10^{-5} mol/L	11.52 ± 0.41[a]
DAI 处理组	
0.5×10^{-5} mol/L	5.28 ± 0.82[a]
2×10^{-5} mol/L	7.82 ± 0.40[a]
8×10^{-5} mol/L	10.34 ± 0.83[a]
RGZ 处理组	14.08 ± 0.90[a]
GW9662 + GEN 处理组	
0.5×10^{-5} mol/L	3.22 ± 0.49[b]
2×10^{-5} mol/L	3.45 ± 0.42[b]
8×10^{-5} mol/L	4.16 ± 0.28[b]
GW662 + DAI 处理组	
0.5×10^{-5} mol/L	3.18 ± 0.37[b]
2×10^{-5} mol/L	3.31 ± 0.26[b]
8×10^{-5} mol/L	4.05 ± 0.65[b]
GW9662 + RGZ 处理组	4.32 ± 0.81[b]

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与对应的单独处理组比较

2.2 GEN、DAI 和 RGZ 对 DU-145 细胞 PPARγ 分布的影响

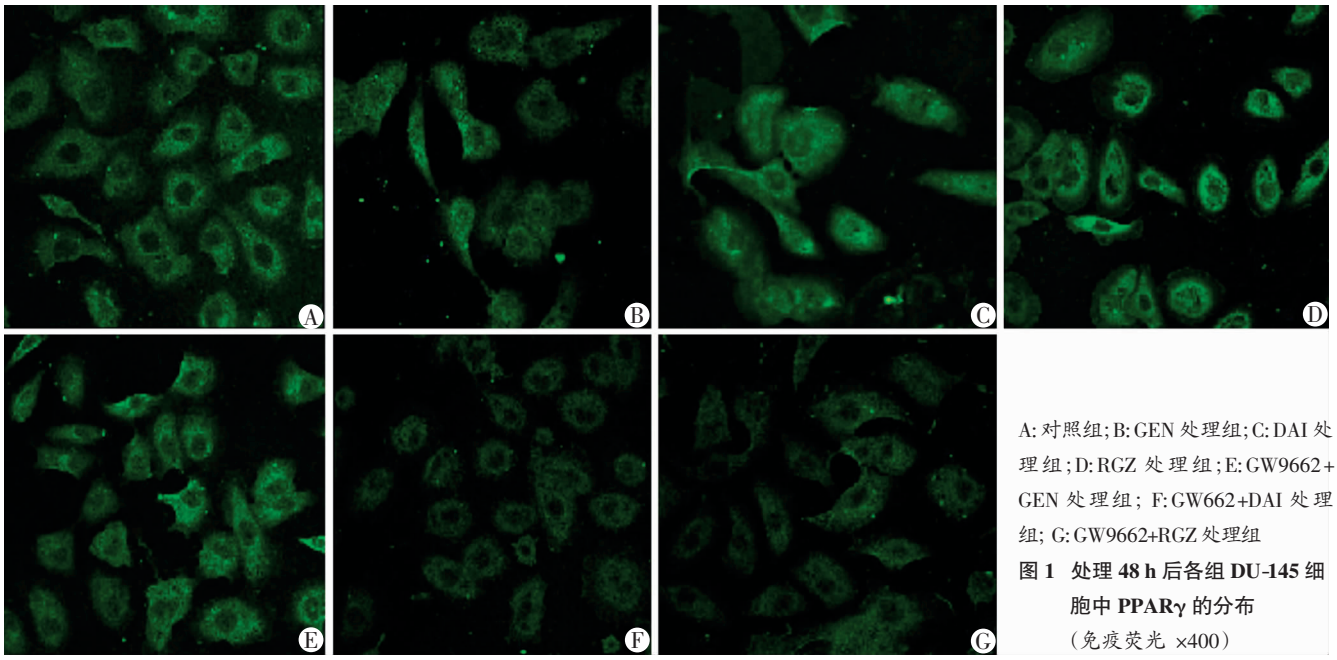
PPARγ 染色为绿色荧光，对照组细胞中绿色荧光主要分布在胞浆中，胞核中很少，GEN、DAI 和 RGZ 处理组细胞中绿色荧光在胞浆和胞核均有分布，而 GW9662 与 GEN、DAI 和 RGZ 联合处理组细胞中绿色荧光分布特征与对照组相似，胞浆中分布较多，胞核较少，表明 GEN、DAI 和 RGZ 具有促进 PPARγ 核移位的作用，但这种促进作用可被 GW9662 削弱。见图 1。

2.3 TUNEL 法检测 DU-145 细胞凋亡

TUNEL 染色阳性呈绿色荧光，DAPI 染色阳性呈蓝色荧光，凋亡细胞为胞核 TUNEL 和 DAPI 染色双阳性细胞，即在双色荧光的 Merge 图中胞核呈蓝绿色荧光。对照组中未见胞核呈蓝绿色荧光的凋亡细胞，GEN、DAI 和 RGZ 单独处理组中均可见一定数量的胞核呈蓝绿色荧光的凋亡细胞，而 GW9662 分别与 GEN、DAI 和 RGZ 联合处理时，胞核呈蓝绿色荧光的凋亡细胞数量较对应的单独处理组要少。见图 2。

2.4 Annexin V/PI 双标记检测 DU-145 细胞凋亡

Annexin V/PI 双参数流式细胞分析散点分布图的左上、左下、右上、右下四个象限分别代表坏死细胞、正常细胞、晚期凋亡细胞、早期凋亡细胞，细胞凋亡率以早期凋亡与晚期凋亡细胞数之和占总细胞数的百分比表示。实验结果显示，GEN、DAI 和 RGZ 单独处理 DU-145 细胞 48 h 后，细胞凋亡率分别是（41.31 ± 1.27）%、（39.48 ± 0.83）%、（28.29 ± 0.11）%，较对照组（1.98 ± 1.40）% 相比有显著增加（$P<0.05$）；而 GW9662 分别与 GEN、DAI 和 RGZ 联合处理细胞时，细胞凋亡率分别是（34.18 ± 1.50）%、（31.71 ± 0.07）%、（21.90 ± 0.80）%，各组细胞凋亡率较对应的单独处理组均有明显下降（$P<0.05$）。见图 3。



A：对照组；B：GEN 处理组；C：DAI 处理组；D：RGZ 处理组；E：GW9662+GEN 处理组；F：GW662+DAI 处理组；G：GW9662+RGZ 处理组

图 1 处理 48 h 后各组 DU-145 细胞中 PPARγ 的分布（免疫荧光 ×400）

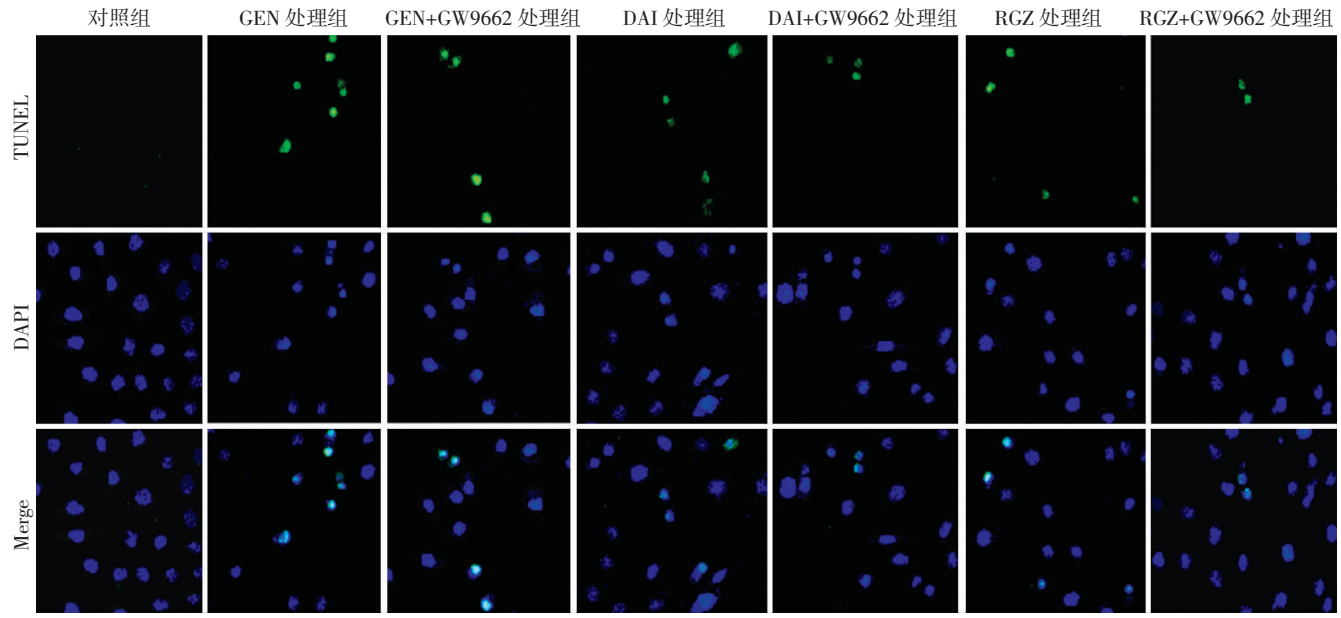
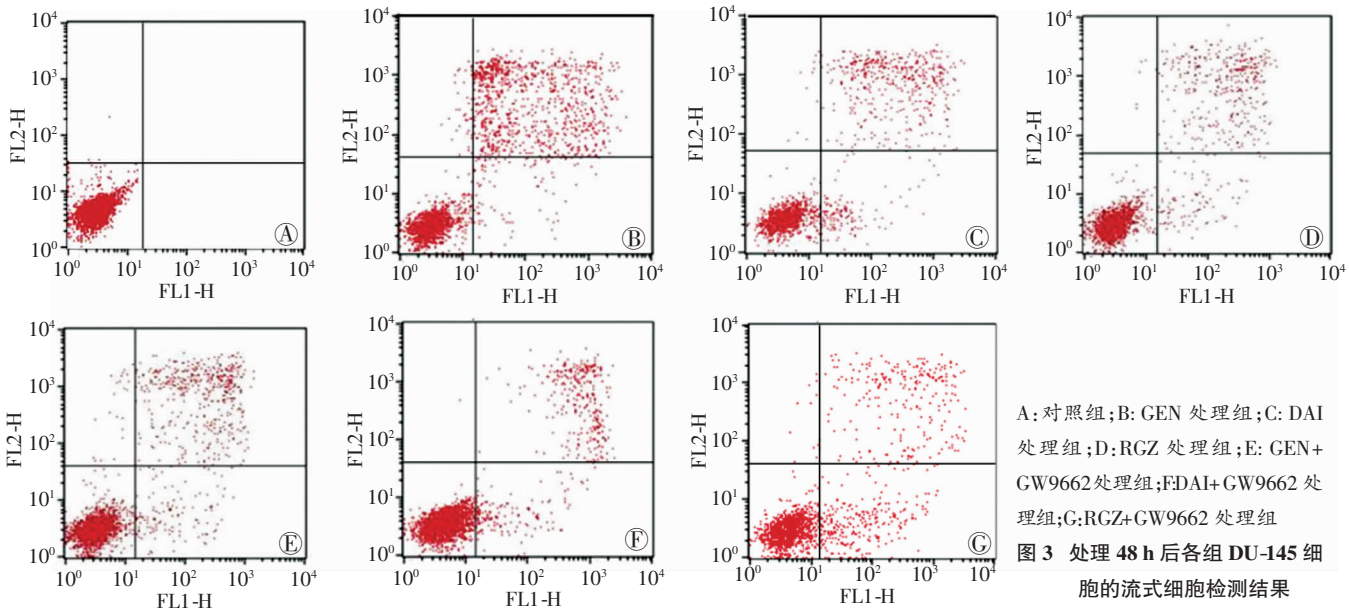


图 2　激光共聚焦显微镜观察处理 48 h 后各组 DU-145 细胞凋亡情况　（TUNEL ×200）



A：对照组；B：GEN 处理组；C：DAI 处理组；D：RGZ 处理组；E：GEN+GW9662处理组；F:DAI+GW9662 处理组；G:RGZ+GW9662 处理组

图 3　处理 48 h 后各组 DU-145 细胞的流式细胞检测结果

3　讨论

前列腺癌是欧美国家男性常见的泌尿系统恶性肿瘤，近年来我国的发病率也呈明显上升趋势，对男性健康危害极大。膳食营养因素与前列腺癌的发生、发展有密切关系，流行病学研究证据表明，富含大豆及其制品的膳食可降低前列腺癌发病率和死亡率[6]。体内外实验研究结果证实，大豆中的植物化学物 GEN、DAI 等可通过阻滞细胞周期进程，抑制肿瘤血管生成和侵袭转移，诱导细胞凋亡等途径发挥抑制前列腺癌的作用[7]。体外实验研究发现，GEN 促进人前列腺癌 PC3、LNCaP 细胞凋亡[8-10]，但确切的分子机制尚未完全阐明。本实验结果显示，GEN 和 DAI 可促进雄激素非依赖性的人前列腺癌 DU-145 细胞凋亡，进一步支持大豆异黄酮诱导细胞凋亡是其抑制前列腺的作用途径之一。

PPARγ 是核受体超家族成员之一，作为配体依赖性激活的转录因子，当 PPARγ 配体与其结合后被激活，并与靶基因启动子上的过氧化物酶体增殖物反应元件（PPRE）结合，调控靶基因转录表达水平，进而发挥各种生物学功能。近年研究发现，PPARγ 与肿瘤发生、发展密切有关，许多 PPARγ 配体如噻唑烷二酮类抗糖尿病药物罗格列酮、曲格列酮等具有抑制包括前列腺癌细胞在内的多种肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡和抑制侵袭转移等抗肿瘤作用，PPARγ 配体被认为是潜在的肿瘤化学防治药物[11]。2003 年，大豆异

黄酮被证实为 PPARγ 的天然配体,并认为激活 PPARγ 与其降血脂、降血糖等作用有关[4-5]。近年来,关于 PPARγ 信号途径与大豆异黄酮的各种生物学效应之间的关系开始逐渐受到关注。Xiang 等[12]研究发现,GEN 对心血管的保护作用部分是通过 PPARγ 信号途径介导的。大豆异黄酮抑制前列腺癌的作用是否与 PPARγ 有关的相关研究报道较少。

本实验采用荧光素酶报告基因分析方法检测了大豆异黄酮对前列腺癌 DU-145 细胞 PPARγ 的影响,实验结果显示 0.5×10^{-5}、2×10^{-5}、8×10^{-5} mol/L 3 个剂量的 GEN、DAI 和 2×10^{-5} mol/L 的阳性对照罗格列酮(RGZ)对转染 PPRE 驱动的荧光素酶报告基因质粒的 DU-145 细胞中荧光素酶表达活性均具有明显增强作用,而这种增强作用可被 PPARγ 选择性拮抗剂 GW9662 所逆转,表明 GEN 和 DAI 对 DU-145 细胞的 PPARγ 具有激活作用。大量研究发现,PPARγ 作为转录因子在静息状态下主要存在于细胞的胞浆中,当 PPARγ 配体与其结合后被激活,移行至细胞核,进而调控靶基因转录表达水平[13-14]。本实验采用 PPARγ 免疫荧光细胞化学染色方法观察了 GEN、DAI 和 RGZ 对 PPARγ 亚细胞定位的影响,结果显示 GEN、DAI 和 RGZ 可促进 PPARγ 核移位,但这种促进作用可被 GW9662 削弱,进一步提示 GEN、DAI 和 RGZ 对 DU-145 细胞 PPARγ 具有激活作用。近年研究发现,PPARγ 配体可通过激活肿瘤细胞 PPARγ 信号途径,上调凋亡促进蛋白如 Bax、Bad 等的表达,降低凋亡抑制蛋白如 Bcl-2 的表达,抑制肿瘤细胞存活信号途径 PI3K/Akt,进而促进肿瘤细胞凋亡[15-16]。为明确大豆异黄酮诱导前列腺癌细胞凋亡是否与 PPARγ 激活有关,本实验对比观察了 GEN、DAI 和 RGZ 单独或联合 GW9662 处理对 DU-145 细胞凋亡的影响,结果显示 GW9662 分别与 GEN、DAI 和 RGZ 联合处理细胞时,GEN、DAI 和 RGZ 促进细胞凋亡的作用明显减弱,提示 GEN 和 DAI 促进前列腺癌 DU-145 细胞凋亡的作用与其激活 DU-145 细胞的 PPARγ 有关。

综上所述,大豆异黄酮具有促进前列腺癌 DU-145 细胞凋亡的作用,这一作用与其激活 PPARγ 有关,但 PPARγ 信号途径下游的确切分子机制还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Hwang Y W, Kim S Y, Jee S H, *et al*. Soy food consumption and risk of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies[J]. Nutr Cancer, 2009, 61(5): 598-606.

[2] de-Souza P L, Russell P J, Kearsley J H, *et al*. Clinical pharmacology of isoflavones and its relevance for potential prevention of prostate cancer[J]. Nutr Rev, 2010, 68(9): 542-555.

[3] Grommes C, Landreth G E, Heneka M T. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists[J]. Lacent Oncol, 2004, 5(7): 419-429.

[4] Dang Z C, Audinot V, Papapoulos S E, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein[J]. J Biol Chem, 2003, 278(2): 962-967.

[5] Mezei O, Banz W J, Steger R W, *et al*. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells[J]. J Nutr, 2003, 133(5): 1238-1243.

[6] Yan L, Spitznagel E L. Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis[J]. Am J Clin Nutr, 2009, 89(4): 1155-1163.

[7] Jian L. Soy, isoflavones, and prostate cancer[J]. Mol Nutr Food Res, 2009, 53(2): 217-226.

[8] Onozawa M, Fukuda K, Ohtani M, *et al*. Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP[J]. Jpn J Clin Oncol, 1998, 28(6): 360-363.

[9] Li Y, Sarkar F H. Inhibition of nuclear factor kappaB activation in PC3 cells by genistein is mediated *via* Akt signaling pathway[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(7): 2369-2377.

[10] Cao F, Jin T Y, Zhou Y F. Inhibitory effect of isoflavones on prostate cancer cells and PTEN gene[J]. Biomed Environ Sci, 2006, 19(1): 35-41.

[11] Matsuyama M, Yoshimura R. A novel approach to anticancer therapies: peroxisome proliferator activator-receptor-gamma as a new target therapy in the treatment of human urological cancer[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2009, 9(1): 76-83.

[12] Xiang Q, Lin G, Fu X, *et al*. The role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and estrogen receptors in genistein-induced regulation of vascular tone in female rat aortas[J]. Pharmacology, 2010, 86(2): 117-124.

[13] Burgermeister E, Seger R. MAPK kinases as nucleo-cytoplasmic shuttles for PPARgamma[J]. Cell Cycle, 2007, 6(13): 1539-1548.

[14] Kawai M, Green C B, Lecka-Czernik B, *et al*. A circadian-regulated gene, Nocturnin, promotes adipogenesis by stimulating PPAR-gamma nuclear translocation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(23): 10508-10513.

[15] Shim J, Kim B H, Kim Y I, *et al*. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands, pioglitazone and 15-deoxy-Delta(12, 14)-prostaglandin J(2), have antineoplastic effects against hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma cells[J]. Int J Oncol, 2010, 36(1): 223-231.

[16] Cao L Q, Chen X L, Wang Q, *et al*. Upregulation of PTEN involved in rosiglitazone-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(6): 879-887.

(**收稿**:2011-09-01;**修回**:2011-10-28)

(编辑 吴培红)