

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.01.001

• 基础研究 •

Bodipy-C12 在癌细胞过氧化物酶体中富集

高关刚[#] 盛园园[#] 张嘉杰 刘佳明 徐 俐[△]

(清华大学生命科学学院 北京 100084)

摘要 目的:研究并比较 Bodipy 标记的月桂酸(Bodipy-C12)在癌细胞与正常细胞中的亚细胞定位。**方法:**在多种癌细胞和正常细胞的培养基中加入 Bodipy-C12 (1 $\mu\text{g/mL}$), 利用共聚焦显微镜活细胞定时间隔拍摄, 结合不同细胞器的分子标记蛋白, 观察 Bodipy-C12 五分钟内不同细胞器中的定位。**结果:**在人肝癌细胞系 HepG2 细胞中, Bodipy-C12 信号不仅仅存在于线粒体和脂滴, 同时富集于过氧化物酶体中。我们分别采用 Pex3-GFP、Pex14-GFP、GFP-Pex16、GFP-SKL 和 GFP-Pmp34 等特异性定位的过氧化物酶体蛋白, 确认 Bodipy-C12 信号富集于过氧化物酶体。此外, 过氧化物酶体中 Bodipy-C12 信号的富集发生在更多的癌细胞系中, 例如结肠癌细胞 HCT116 和乳腺癌细胞 MCF7。不同的是, 在正常细胞系如 3T3-L1、NRK 和 COS7 中, Bodipy-C12 信号存在于线粒体和脂滴中, 但未在过氧化物酶体中检测到。**结论:**Bodipy-C12 信号存在于正常细胞和癌细胞的脂滴和线粒体中, 且其在癌细胞过氧化物酶体中富集, 而不存在于正常细胞的过氧化物酶体中, 预示癌细胞中过氧化物酶体脂代谢的差异。

关键词:脂肪酸; 线粒体; 脂滴; 过氧化物酶体; Bodipy-C12

中图分类号: Q591.5; Q291; Q244; R730.231 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)01-01-07

Bodipy-C12 can be Enriched in Peroxisomes of Cancer Cells

GAO Guan-gang[#], SHENG Yuan-yuan[#], ZHANG Jia-jie, LIU Jia-ming, XU Li[△]

(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

ABSTRACT Objective: To investigate and compare the subcellular localization of Bodipy-labeled lauric acid (Bodipy-C12) in cancer cells and normal cells. **Methods:** Various cancer cells and normal cells were cultured in medium with Bodipy-C12 (1 $\mu\text{g/mL}$). We detected the signal of Bodipy-C12 in different organelles labeled by specific molecular marker proteins with using live-cell time-lapse confocal microscope in 5 minutes. **Results:** In a human hepatocellular carcinoma cell line HepG2, the signal of Bodipy-C12 was not only detected in lipid droplet and mitochondria, but it can also be enriched in peroxisomes. The co-localization of Bodipy-C12 signal with specific molecular protein markers, including Pex3-GFP, Pex14-GFP, GFP-Pex16, GFP-SKL and GFP-Pmp34, verified the existence of Bodipy-C12 in peroxisomes. Further, the enrichment of Bodipy-C12 in peroxisomes occurred to more cancer cell lines such as colorectal cancer cell HCT116 and breast cancer cell MCF7. Differently, Bodipy-C12 signal was detected only in lipid droplet and mitochondria, but not in peroxisomes of normal cell lines such as 3T3-L1, NRK, COS7. **Conclusions:** Bodipy-C12 signal existed in lipid droplet and mitochondria of normal cells and cancer cells, and it can be enriched in peroxisomes of cancer cells, but not in peroxisomes of normal cells, indicating a different lipid metabolism of the peroxisomes in cancer cells.

Key words: Fatty acid; Mitochondria; Lipid droplet; Peroxisomes; Bodipy-C12

Chinese Library Classification(CLC): Q591.5; Q291; Q244; R730.231 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)01-01-07

前言

过氧化物酶体是真核细胞中的一种细胞器^[1-3], 在多种细胞代谢中发挥作用, 主要参与极长链脂肪酸(very long chain fatty acids, VLCFA)和支链氨基酸(branched chain fatty acid, BCFA)的分解代谢以及活性氧化簇(reactive oxygen species, ROS)特别是过氧化物的清除。

癌症经常与异常的细胞代谢过程联系在一起。越来越多的

证据表明, 癌细胞中脂肪酸的吸收和从头合成增加, 另一方面参与甘油三酯合成的酶显著上调, 重编程的脂肪酸代谢在癌症发展过程中提供能量、膜合成和脂质信号中的大分子方面发挥了重要作用^[5,6]。尽管如此, 癌症过程中过氧化物酶体中其他脂肪酸代谢是否异常的研究仍然有限。

Bodipy-C12 是十二碳脂肪酸月桂酸的衍生物, 被广泛用于标记细胞内脂滴(lipid droplet, LD)以及用于研究脂肪酸摄入和细胞内转运、代谢^[12-14]。Bodipy-C12 在被细胞摄入之后, 和正常

[#] 为共同第一作者

作者简介: 高关刚, 男, 博士研究生, 主要研究方向: 生物学, E-mail: ggg12@mails.tsinghua.edu.cn;

盛园园, 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 生物学, E-mails: chengyy12@mails.tsinghua.edu.cn

[△] 通讯作者: 徐俐, 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要研究方向: 生物学, E-mail: xulilulu@tsinghua.edu.cn, 电话: 010-62797133

(收稿日期: 2019-07-11 接受日期: 2019-08-08)

的脂肪酸一样能够通过长链脂酰辅酶 A 合成酶(Long-chain acyl-CoA synthetase, ACSL)作用转变成脂酰辅酶 A,一方面合成甘油三酯存储在脂滴,另一方面还能进入线粒体参与 β -氧化途径^[13,14]。本研究主要通过活细胞共聚焦显微镜定时隔观察多种癌细胞中 Bodipy-C12 在五分钟内被摄入细胞后的细胞器定位,包括内质网(Endoplasmic reticulum, ER),线粒体,脂滴,过氧化物酶体,内吞体,自噬体以及溶酶体。如之前的报道, Bodipy-C12 可定位于线粒体和脂滴^[13,14]。并且我们首次发现 Bodipy-C12 富集于癌细胞的过氧化物酶体,而正常细胞中并无此现象发生,预示癌细胞过氧化物酶体代谢的差异,为肿瘤发生与发展过程中过氧化物酶体脂代谢改变及其对调控作用提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞系 HepG2、人宫颈癌细胞系 HeLa、小鼠前脂肪细胞系 3T3-L1 和非洲绿猴肾细胞 COS7 购于美国 ATCC;其他癌细胞系包括人肝癌细胞系 Huh-7、人结肠癌细胞系 HCT116 和 SW480、人乳腺癌细胞系 MCF7,MDA-MB-231,MDA-MB-468、人非小细胞肺癌细胞系 A549 以及大鼠肾细胞系 NRK 来自于清华大学俞立课题组。胎牛血清购自 Biological Industries 公司;DMEM 细胞培养基,青霉素和链霉素($100\times$),活细胞培养皿, Bodipy 493/503, Bodipy-C12, 转染试剂 Lipofectamine 2000 和荧光二抗购于 Thermo Fisher Scientific 公司。Pex19 抗体(A5476)购自 Abclonal 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 GFP-Sec16l/GFP-Sec16s/GFP-Sec23a/GFP-CB5/GFP-HPOS 为实验室之前构建。GFP-DAG/PIS-GFP 按照文献构建^[15]。Rab5a 和 Rab7a 全长基因以 3T3-L1 的 cDNA 作为模板通过 PCR 得到,并通过酶切连接的方式放入 pEGFP-C1 载体(clontech 公司)。Pex3、Pex14、Pex16 和 Pmp34 全长基因以 293T 的 cDNA 作为模板通过 PCR 得到。Pex3 和 Pex14 通过酶切连接的方式放入 pEGFP-N1 载体 (clontech 公司)。Pex16/Pmp34 通过酶切连接的方式放入 pEGFP-N1 载体 (clontech 公司)。SKL 片段通过 PCR 的方式连接在 EGFP/mCherry 序列 3' 端并通过 Bamh I/Not I 位点插入 pEGFP-N1 和 pmCherry-N1 载体(clontech 公司)。标记线粒体和自噬体所使用的质粒来自于清华大学俞立课题组。

1.2.2 细胞培养 本研究中使用的所有细胞均在含有 10% 血清的 DMEM 培养基(含有 $1\times$ 青霉素和链霉素)中进行培养,培养箱设置为 37°C , 5% 的 CO_2 浓度, 80% 的湿度。

1.2.3 细胞转染 HepG2, 3T3-L1 和 NRK 细胞通过电转(electroporation)的方式进行质粒和 siRNA 的转染。细胞经过消化、离心后,使用 $100\ \mu\text{L}$ 电转缓冲液重悬细胞,转移至 $1.5\ \text{mL}$ EP 管中,将需要转染的质粒或 siRNA 和细胞混匀后再转移到电转杯中,使用 Amaxa Nucleofector II (Lonza 公司)电转仪设定的电转程序进行转染。电转后细胞用 10% 血清的 DMEM 培养基重悬,接种到活细胞培养皿或预先放置细胞爬片的细胞皿中。其他细胞使用转染试剂 lipofectamine 2000(ThermoFisher Scientific 公司)进行质粒转染。

1.2.4 活细胞实时观察 将细胞置于 37°C , 5% CO_2 的活细胞工作站中稳定一段时间,将活细胞皿中培养基换成含有 Bodipy-C12($1\ \mu\text{g/mL}$)的新鲜培养基后,立即使用尼康 A1R+ 扫描共聚焦显微镜进行实时拍摄。

1.2.5 cDNA 获取和实时荧光定量 PCR 使用 Trizol (Invitrogen 公司)-三氯甲烷-异丙醇沉淀的方法提取转染 siRNA 48 h 后的 HepG2 细胞内总 RNA,取 $5\ \mu\text{g}$ 总 RNA 作为模板使用 Invitrogen Superscript 反转试剂盒进行反转录得到 cDNA,稀释 100 倍后基因 PCR 或使用 ABI7500 荧光定量 PCR 进行实验。荧光定量 PCR 使用的是 ABI 7500 型号的实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司)。使用的 PCR 引物(5' 到 3')为:Actin 正向引物:CATGTACGTTGCTATCCAGGC;Actin 反向引物:CTCCTTAATGTCACGCACGAT;Pex5 正向引物:AAGCCTTTGGGAGTAGCTTCT;Pex5 反向引物:GGACACAAGGGGTGCATTC。

1.2.6 siRNA 序列 实验所用的 siRNA 序列(5' 到 3')为:siPex5-1#:AGAAGCUACUCCCAAAGGC,siPex5-2#:GCCUUUGGGAGUAGCUUCU。

1.2.7 免疫荧光染色 细胞爬片用 PBS 缓冲液洗涤两次后使用 4% 的多聚甲醛固定 20 分钟,之后再使用 PBS 清洗两次。使用含有 0.1%(v/v) Triton-X100 的 PBS 通透细胞 20 分钟后,含有 10% 山羊血清的 PBS 封闭 1 小时。将 Pex19 抗体以 1:100 稀释于封闭液中,浸润爬片, 4°C 孵育过夜。第二天,使用 PBS 清洗三遍 5 分钟,接着加入 1:500 稀释在 PBS 中的荧光二抗,避光室温孵育 1 小时。之后再使用 PBS 清洗三遍后,封片。使用尼康 A1R+ 扫描共聚焦显微镜进行观察。

1.2.8 图像处理 共聚焦显微镜获得的原始图片使用 Nikon Nis-element 软件进行反卷积处理,经过 Adobe illustrator CS6 排版后导出图片。

1.3 统计学分析

使用双尾学生 t 检验(two tailed student's t test)比较不同组数据之间的差异, P 值小于 0.05 认为存在明显差异。 P 小于 0.05 时用一个 * 表示, P 小于 0.01 时用两个 ** 表示, P 小于 0.001 时用三个 *** 表示。

2 结果

2.1 Bodipy-C12 进入 HepG2 细胞早期形成点状结构

在人肝癌细胞系 HepG2 的培养基中加入 Bodipy-C12 ($1\ \mu\text{g/mL}$)之后 5 分钟,细胞中出现大量点状结构(图 1A)。这些点状结构明显区别于绿色 Bodipy 493/503 染色的脂滴。Bodipy-C12 除了与少量的脂滴定位,同时也和线粒体标记蛋白 Tom20-GFP 共定位。此外,Bodipy-C12 还存在不同于脂滴或者线粒体定位的点状结构(图 1B)。

细胞中也有大量类似点状分布的结构或者细胞器,例如内吞体(endosomes)、自噬体(autophagosomes)和溶酶体(lysosomes)^[15]。通过分别转染早期内吞体(early endosomes)标记质粒 GFP-Rab5a、晚期内吞体(late endosomes)标记质粒 GFP-Rab7a、自噬体标记质粒 GFP-LC3 和溶酶体标记质粒 GFP-LAMP1,我们发现 Bodipy-C12 形成的点状结构均不是上述细胞器或结构(图 1C)。进一步通过转染内质网标记质粒

GFP-CB5 和初生脂滴(nascent LD) 的标记质粒 GFP-HPOS, 我们发现这些点状结构不属于 GFP-HPOS 标记的初生脂滴^[14], 而是出现在 GFP-CB5 标记的内质网附近(图 1D)。由于初生脂滴源于内质网^[16,17], 表明这些 Bodipy-C12 点状结构定位于内质网上非初生脂滴的其他结构。进一步, 我们检测了这些结构是否和内质网相关的内质网排出位点(ER exit site, ERES)或内质网到高尔基运输的 COPII 小泡^[18]共定位。我们发现: 在转染了 ERES 标记质粒 GFP-Sec16l/GFP-Sec16s^[18]或 COPII 标记质粒

GFP-Sec23a^[18,19]的 HepG2 细胞中, Bodipy-C12 点状结构并没有和这些蛋白共定位(图 1E)。另外, 之前有研究发现二酰甘油(Diacylglycerol, DAG)和磷脂酰肌醇(Phosphatidylinositol, PI)能够使用 GFP-DAG 和 PIS-GFP 质粒标记, 并在内质网固定区域形成点状结构^[15]。因此我们构建了这两个质粒, GFP-DAG 和 PIS-GFP 质粒在 HepG2 细胞中表达, 呈现绿色点状分布的结构, 但这些结构与 Bodipy-C12 都没有很好的共定位(图 1F)。

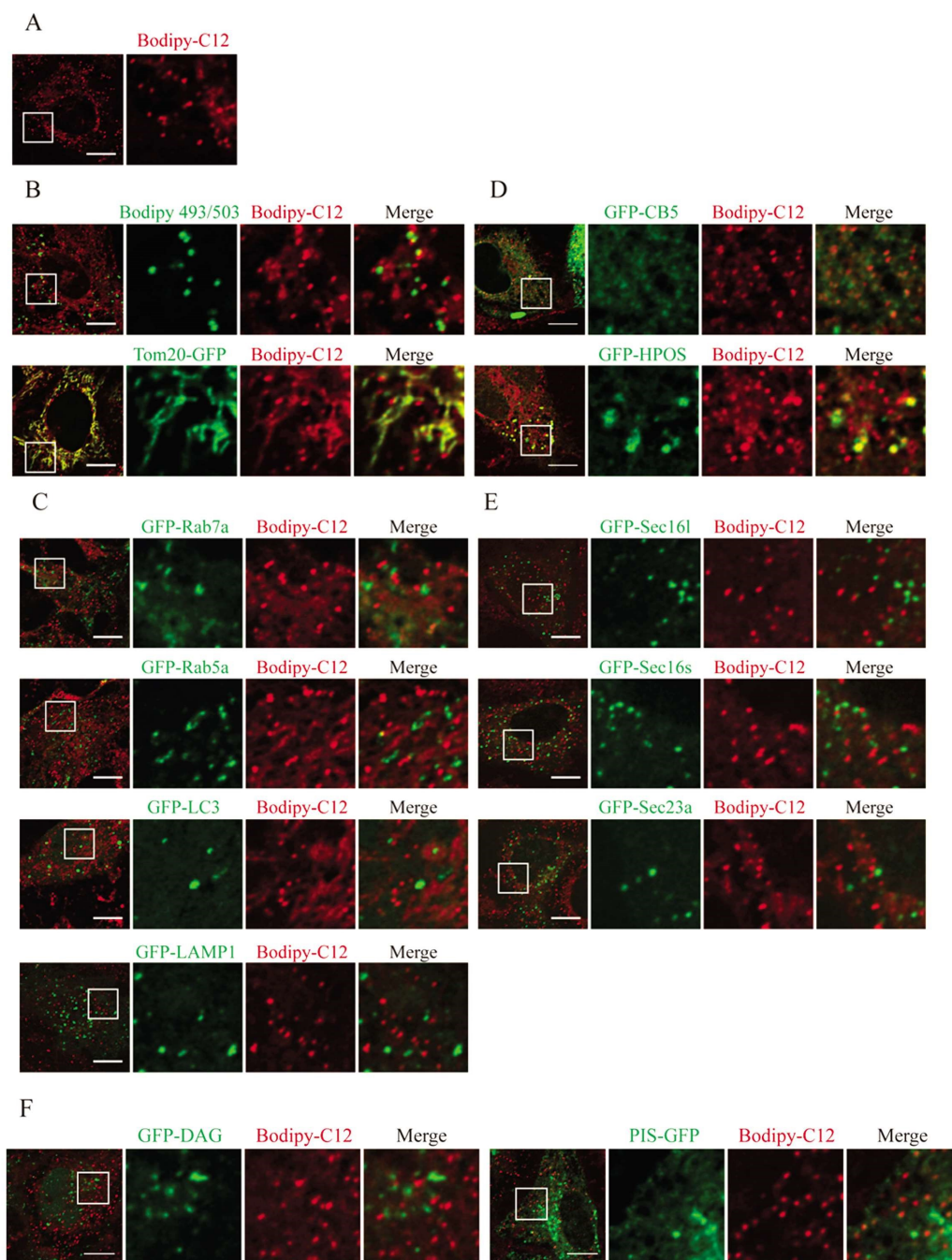


图 1 活细胞拍摄 Bodipy-C12 点状结构和细胞器的定位

(A) Bodipy-C12 点状结构; (B) Bodipy-C12 点状结构和脂滴或线粒体; (C) Bodipy-C12 点状结构和内吞体或自噬小体或溶酶体; (D) Bodipy-C12 点状结构和内质网或初生脂滴; (E) Bodipy-C12 点状结构和 ERES; (F) Bodipy-C12 点状结构和 DAG 或 PIS 结构。标尺 = 10 μm 。

Fig.1 Bodipy-C12 puncta and cellular organelles location

(A) Bodipy-C12 puncta in HepG2 cells; (B) Bodipy-C12 puncta with LD or mitochondria in HepG2 cells; (C) Bodipy-C12 puncta with endosomes or autophagosomes or lysosomes in HepG2 cells; (D) Bodipy-C12 puncta with ER or nascent LD in HepG2 cells; (E) Bodipy-C12 puncta with ERES or COPII in HepG2 cells; (F) Bodipy-C12 puncta with DAG or PIS structure in HepG2 cells. White arrowheads indicating Bodipy-C12 puncta. Scale Bar: 10 μm .

2.2 标记蛋白 GFP-SKL 特异性定位于过氧化物酶体

过氧化物酶体在细胞内也是点状结构的存在,其直径在 0.1-1 μm 之间^[1,20],那么 Bodipy-C12 形成的点状结构是否为过氧化物酶体。为了进一步验证,我们根据报道构建了含有 1 型过氧化物酶体靶向序列 (peroxisomal targeting sequence 1, PTS1)-即 SKL (Serine-Lysine-Leucine) 序列的过氧化物标记质粒 GFP-SKL 和 mCherry-SKL^[21,22]。在 HepG2 细胞中,过表达的 mCherry-SKL 呈现点状分布。我们还通过免疫荧光的手段检测发现 mCherry-SKL 能够和过氧化物酶体表面蛋白 Pex19 有特异性的共定位(图 2A),证明 mCherry-SKL 的确定位于过氧化物酶体。Pex5 蛋白是 PTS1 (SKL 序列) 蛋白受体,SKL 序列包含蛋白可以通过 Pex5 的介导进入过氧化物酶体^[1,20]。Pex5 基因的敲除会导致 SKL 包含蛋白无法正确进入过氧化物酶体,而呈现细胞内弥散分布^[23]。进一步,我们通过敲低 Pex5,观测 GFP-SKL 细胞内定位。与报道的结果一致,在 Pex5 基因敲低后的细胞中,GFP-SKL 不再呈现点状结构在,而表现出明显的弥散分布(图 2B 和 2C),进而证明 GFP-SKL 定位于过氧化物酶体的可靠性。之前的研究还发现过氧化物酶体来源于内质网和线粒体^[24],是否 GFP-SKL 与线粒体和内质网定位有关系。我们发现细胞中的 GFP-SKL 与 mito-dsRED 和 RFP-KDEL 分别标记的线粒体和内质网均没有完全的共定位(图 2D),进一步说明 GFP-SKL 的过氧化物酶体定位具有特异性,因此后面的研究我们以 GFP-SKL 可以作为过氧化物酶体的标记蛋白。

2.3 Bodipy-C12 早期点状结构和过氧化物酶体共定位

研究表明,过氧化物酶体可以在内质网上生成,构成过氧化物酶体 Pex3/Pex16 等膜蛋白来自内质网^[1,2]。过氧化物酶体可以分解极长链脂肪酸,对于中长链脂肪酸的代谢也有报道^[25],因此我们对于 Bodipy-C12 和过氧化物酶体的共定位进行了检测。结果显示:在转染过氧化物酶体标记蛋白 Pex3-GFP 和 Pex14-GFP 的 HepG2 细胞中,过氧化物酶体呈点状分布。并且,Bodipy-C12 加入 5 min 后,Bodipy-C12 点状结构与过氧化物酶体完全共定位(图 3A)。我们也在转染了过氧化物酶体其他标记蛋白的细胞中发现同样的结果:GFP-Pex16、GFP-SKL 或 GFP-Pmp34 标记的过氧化物酶体和 Bodipy-C12 点状结构完全共定位(图 3B)。因此,我们所观察到的早期 Bodipy-C12 形成的点状结构为过氧化物酶体。

2.4 Bodipy-C12 可在多种癌细胞中定位于过氧化物酶体

接着,我们在不同种类的癌细胞中进行了 Bodipy-C12 定位的观察。与 HepG2 相似(图 2A),在另一人肝癌细胞系 Huh-7 中,Bodipy-C12 也定位于 GFP-SKL 标记的过氧化物酶体(图 4A)。同样地,在人结肠癌细胞 HCT116 和 SW480 中,Bodipy-C12 定位于 GFP-SKL 标记的过氧化物酶体(图 4B)。我们也在三株乳腺癌细胞中进行了测试,结果显示:无论是在 MDA-MB-231、MDA-MB-468 还是 MCF7 细胞中,Bodipy-C12 与过氧化物酶体都有很好地共定位(图 4C)。在宫颈癌细胞 HeLa 和非小细胞肺癌 A549 中,GFP-SKL 标记的过氧化物酶体共定位 Bodipy-C12 点状结构(图 4D)。我们对这些定位进行了长时间观察,发现 20 小时后 Bodipy-C12 主要富集在脂滴中,但仍然能在这些癌细胞的过氧化物酶体上观察到 Bodipy-C12 的定位(未公开数据)。因此,Bodipy-C12 可以普遍

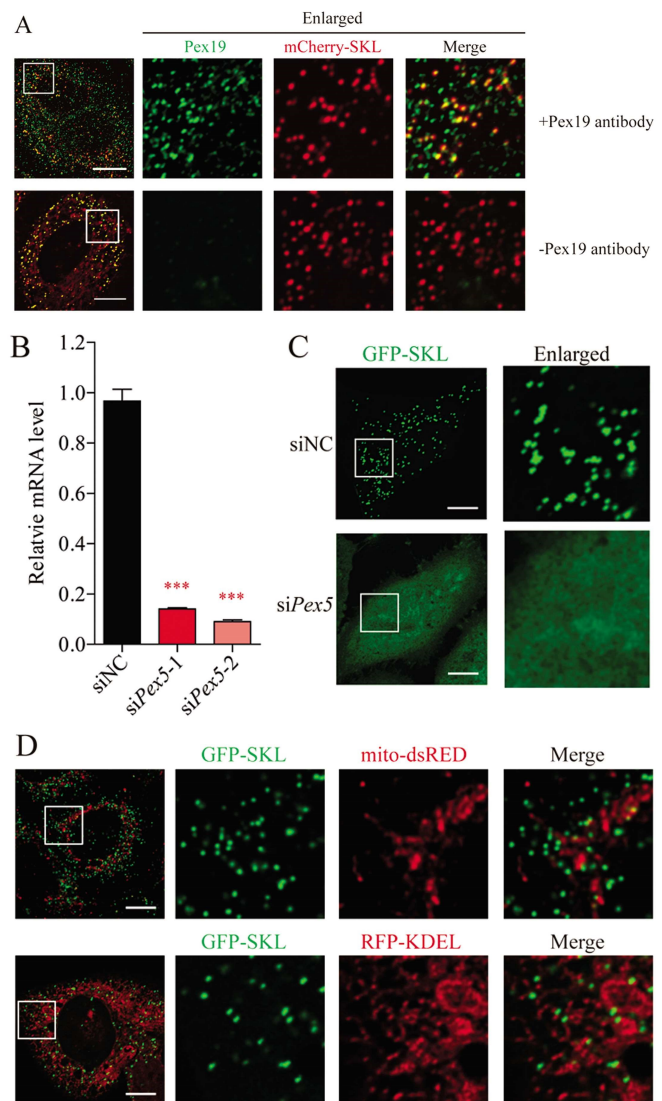


图 2 GFP-SKL 标记过氧化物酶体

(A) GFP-SKL 和过氧化物酶体蛋白 Pex19 的共定位;(B) Pex5 的 siRNA 敲低效率;(C) HepG2 细胞中 Pex5 敲低抑制 GFP-SKL 进入过氧化物酶体;(D) HepG2 细胞中 GFP-SKL 标记的点状结构与线粒体和内质网的定位。标尺 = 10 μm 。

Fig.2 GFP-SKL marked peroxisomes

(A) Images showing mCherry-SKL colocalization with Pex19 in HepG2 cells; (B) Knockdown efficiency as indicated genes in HepG2 cells by q-PCR; (C) Images showing GFP-SKL diffusion in Pex5 knock-down HepG2 cells; (D) Images showing GFP-SKL labeled puncta structure and mito-dsRED marked mitochondria or RFP-KDEL marked ER in HepG2 cells. Scale Bar: 10 μm .

在癌细胞中定位于过氧化物酶体,这可能与癌细胞中脂代谢发生改变有关^[26,27]。癌细胞中脂肪酸吸收和从头合成增加,参与甘油三酯的合成的酶显著上调^[5,6]。

2.5 Bodipy-C12 点状结构不存在于 3T3-L1/NRK/COS7 非癌细胞中

接着我们在 3T3-L1、NRK 和 COS7 等非癌细胞中观察 bodipy-C12 的定位。结果显示:3T3-L1、NRK 和 COS7 细胞中过氧化物酶体呈现点状分布,与 HepG2 中的过氧化物酶体并无明显差别。但不同的是,Bodipy-C12 处理 5 分钟时,其并未出

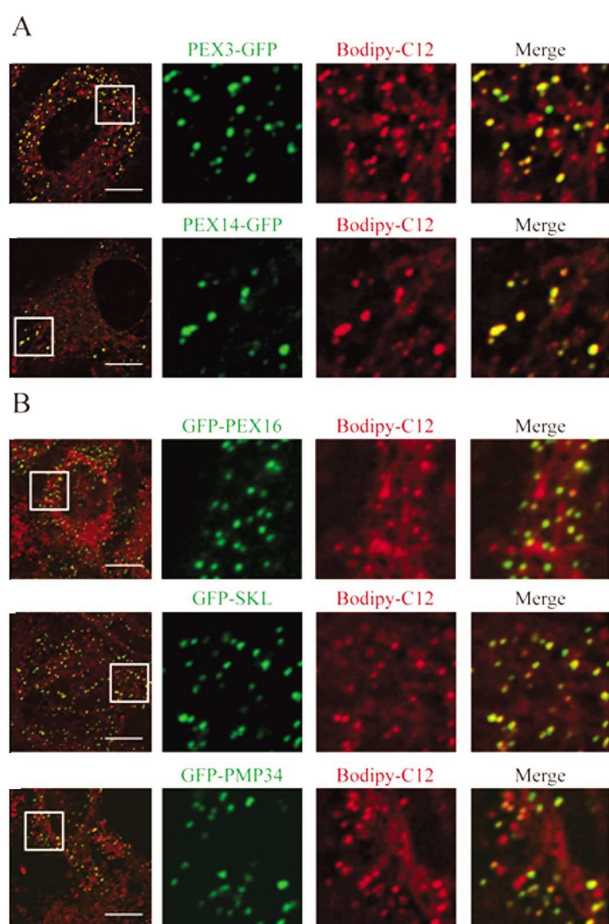


图3 Bodipy-C12 点状结构和过氧化物酶体共定位

(A) 图片显示 Bodipy-C12 点状结构和 Pex3-GFP/Pex14-GFP 标记的过氧化物酶体共定位;(B) 图片显示 Bodipy-C12 点状结构和 GFP-Pex16/GFP-SKL/GFP-Pmp34 标记的过氧化物酶体共定位。标尺 = 10 μm 。

Fig.3 Colocalization of Bodipy-C12 puncta with peroxisomes

(A) Images showing colocalization of Bodipy-C12 puncta with Pex3-GFP/Pex14-GFP labeled peroxisomes; (B) Images showing colocalization of Bodipy-C12 puncta with GFP-Pex16/GFP-SKL/GFP-Pmp34 labeled peroxisomes. Scale Bar: 10 μm .

现定位于 Pex3 或者 Pex14 标记的过氧化物酶体的 Bodipy-C12 荧光信号(图 5A)。同样的,在大鼠肾细胞 NRK 和非洲绿猴子肾细胞 COS7 中, Bodipy-C12 与 Pex3-GFP、Pex14-GFP 或者 GFP-SKL 标记的过氧化物酶体几乎没有共定位(图 5B 和 5C),而与 Tom20-GFP 标记的线粒体有很好的共定位(图 5D),表明在非癌细胞类型, Bodipy-C12 脂脂肪酸不定位于过氧化物酶体。因此我们推断: Bodipy-C12 或者十二碳脂肪酸在正常细胞中很少或者几乎不定位于过氧化物酶体上,而在癌细胞中,十二碳脂肪酸可能在过氧化物酶体中的代谢异常旺盛,暗示癌细胞中由过氧化物酶体参与的脂代谢活动不同于正常细胞。

3 讨论

脂脂肪酸快速和大量定位于癌细胞系过氧化物酶体,不同于正常细胞,是本研究的重要发现。本研究中,我们首先在 HepG2 细胞中发现 Bodipy-C12 除了定位于原先报道的线粒体或者脂滴^[13,14],还能定位于过氧化物酶体。并在多种癌细胞系中进一步

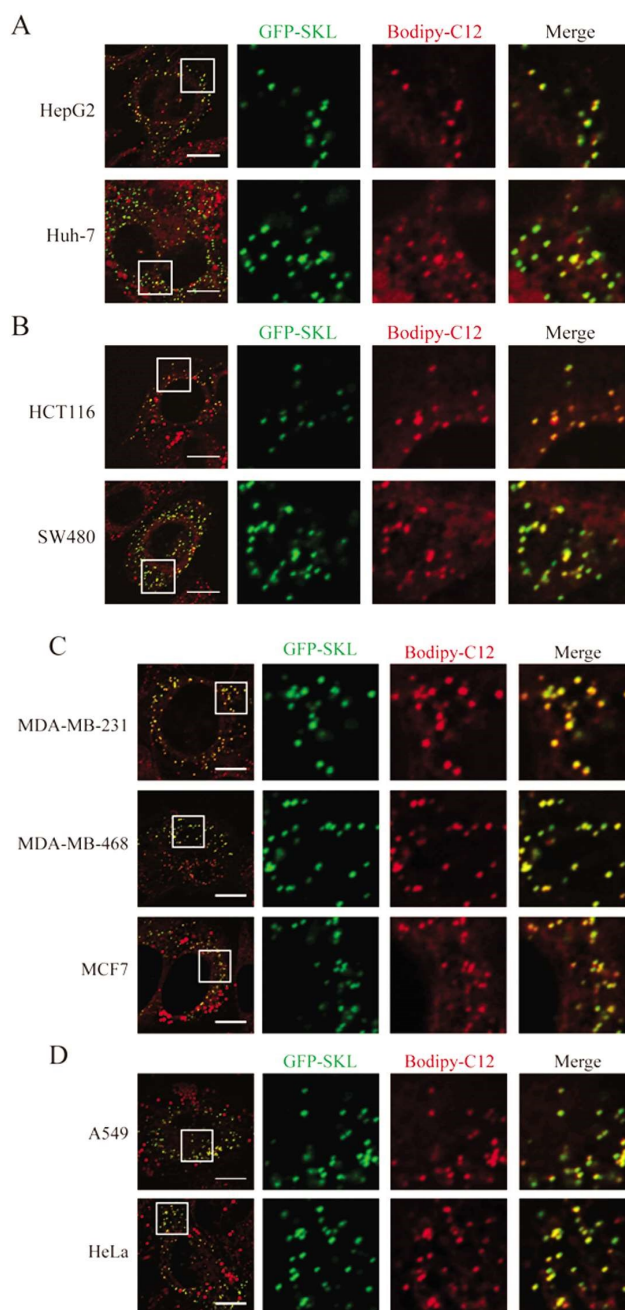


图4 Bodipy-C12 在多种癌细胞中定位于过氧化物酶体

(A) Bodipy-C12 在 HepG2/Huh-7 细胞中定位于过氧化物酶体;
(B) Bodipy-C12 在 HCT116/SW480 细胞中定位于过氧化物酶体;
(C) Bodipy-C12 在 MDA-MB-231/MDA-MB-468/MCF7 细胞中定位于过氧化物酶体;
(D) Bodipy-C12 在 A549/HeLa 细胞中定位于过氧化物酶体。GFP-SKL 指示过氧化物酶体。标尺 = 10 μm 。

Fig.4 Bodipy-C12 location on peroxisomes in kinds of different carcinoma

cells (A) Bodipy-C12 peroxisome location in HepG2/Huh-7 cells
(B) Bodipy-C12 peroxisome location in HCT116/SW480 cells;
(C) Bodipy-C12 peroxisome location in MDA-MB-231/MDA-MB-468/MCF7 cells; (D) Bodipy-C12 peroxisome location in A549/HeLa cells. GFP-SKL indicating peroxisomes. Scale Bar: 10 μm .

证明癌细胞中十二碳脂肪酸 -Bodipy-C12 定位于过氧化物酶体中,然而正常细胞系(如 3T3-L1, NRK 和 COS7)中并无此现象。这可能预示癌细胞中过氧化物酶体脂脂肪酸代谢异于正常细胞

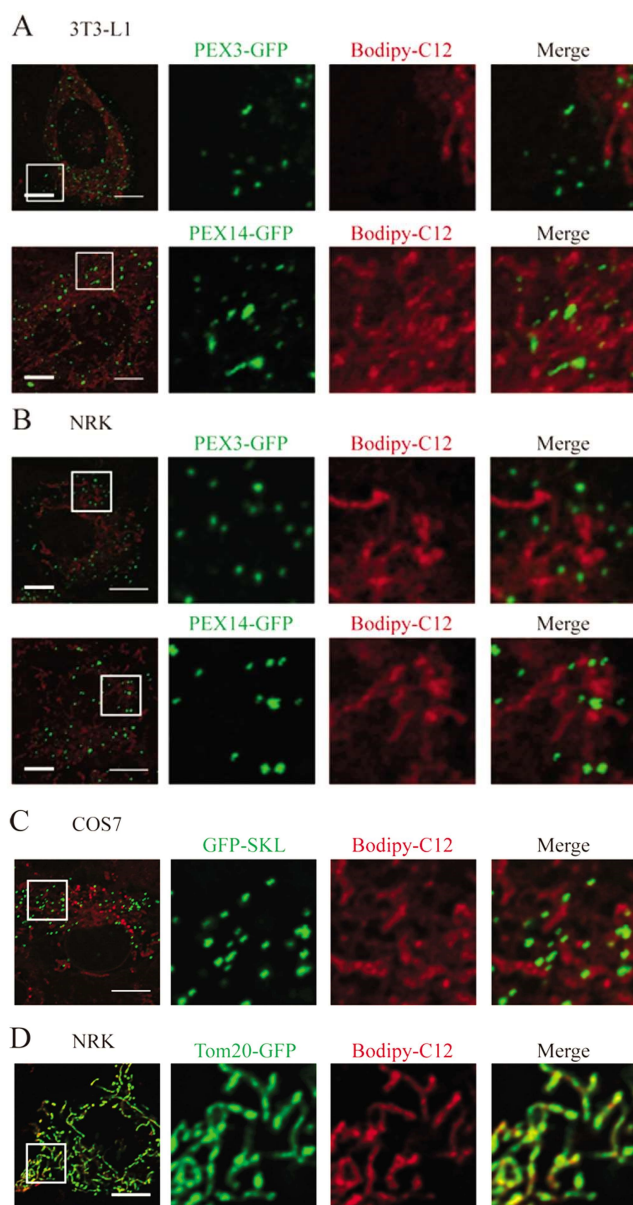


图5 Bodipy-C12 和过氧化物酶体在 3T3-L1/NRK/COS7 细胞中的定位

(A) 图片显示 Bodipy-C12 和 Pex3-GFP/Pex14-GFP 标记的过氧化物酶体在 3T3-L1 细胞中的定位;(B) 图片显示 Bodipy-C12 和 Pex3-GFP/Pex14-GFP 标记的过氧化物酶体在 NRK 细胞中的定位;(C) 图片显示 Bodipy-C12 和 GFP-SKL 标记的过氧化物酶体在 COS7 细胞中的定位;(D) 图片显示 NRK 细胞中摄入的 Bodipy-C12 与 Tom20-GFP 标记的线粒体共定位。标尺 = 10 μm 。

Fig.5 Bodipy-C12 and peroxisomes location in 3T3-L1/NRK/COS7 cells

(A) Images showing Bodipy-C12 and Pex3-GFP/Pex14-GFP labeled peroxisomes location in 3T3-L1 cells; (B) Images showing Bodipy-C12 and Pex3-GFP/Pex14-GFP labeled peroxisomes location in NRK cells; (C) Images showing Bodipy-C12 and GFP-SKL labeled peroxisomes location in COS7 cells; (D) Images showing colocalization of Bodipy-C12 and Tom20-GFP labeled mitochondria in NRK cells. Scale Bar: 10 μm .

胞,十二碳脂肪酸定位于肿瘤细胞的过氧化物酶体的机制及其功能,有待于进一步的探索。

正常细胞中,中链脂肪酸一旦进入细胞,通过合成甘油三酯的方式存储在脂滴中,而在细胞受到脂解信号或者饥饿压

力时,通过分解甘油三酯的方式释放脂肪酸,这些脂肪酸重新进入线粒体通过 β -氧化为细胞提供能量^[13]。本研究显示在癌细胞中脂肪酸更多地进入过氧化物酶体。已知过氧化物酶体参与长链或极长链的脂肪酸进入过氧化物酶体后转变成较短链的脂肪酸,通过运输到线粒体参与 β -氧化过程^[28]。本研究使用的 C12 是中链脂肪酸,也能快速进入癌细胞中的过氧化物酶体,目前对于癌细胞而言,中链脂肪酸(C6-C12)在过氧化物酶体中代谢和其功能缺少报道,这也是日后研究的重要内容。

已有报道指出癌细胞和正常细胞的不同,脂代谢在癌细胞中发生改变^[26,29]。并且越来越多的证据表明癌细胞在脂肪酸代谢的不同方面有特定的变化。除了脂肪酸代谢,胆固醇和磷脂代谢的改变也在癌细胞中被发现,并可能在癌症发展过程中发挥重要作用^[5,6]。首先,脂肪酸结合蛋白介导的脂肪酸吸收和细胞内转运与癌症发展密切相关^[30,31]。另外,在一些癌细胞中增加的脂肪酸从头合成被认为是癌症的标志^[32],脂肪酸从头合成的关键酶 FASN 的表达在许多类型的癌细胞中都有显著提高^[33]。这些增加合成的脂肪酸可以转化成甘油三酯,而多种证据表明甘油三酯的合成和储存对于支持癌细胞生长十分关键^[34]。脂肪水解或脂解包括细胞外甘油三酯通过脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)水解和细胞内甘油三酯通过 ATGL、HSL 和 MAGL 连续水解。一些研究已证明,脂蛋白脂肪酶在许多癌症中的表达增加,包括乳腺癌、脂肪肉瘤、前列腺癌和浸润性宫颈鳞状细胞癌^[35,36]。以上涉及的癌细胞脂代谢途径的改变包括脂肪酸吸收、合成、储存和释放的协调提高,代表着脂质代谢过程中流通的增加,可能为癌细胞快速生长过程中的磷脂合成提供必要的底物^[37]。过氧化物酶体蛋白质和代谢物已被报道能够促进肿瘤发生^[7,8,38],然而过氧化物酶体中脂肪酸特别是中链脂肪酸的代谢异常与癌症之间的联系目前的研究较少。

总之,本研究发现了癌细胞中过氧化物酶体脂肪酸代谢流不同于正常细胞,其功能与分子机制都有待于进一步的研究,对癌细胞代谢和癌症治疗有重要意义。

参考文献(References)

- [1] Smith J J, Aitchison J D. Peroxisomes take shape[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(12): 803-817
- [2] Theodoulou F L, Bernhardt K, Linka N, et al. Peroxisome membrane proteins: multiple trafficking routes and multiple functions? [J]. Biochem J, 2013, 451: 345-352
- [3] Fujiki Y, Okumoto K, Mukai S, et al. Peroxisome biogenesis in mammalian cells[J]. Front Physiol, 2014, 5: 307
- [4] Walker C L, Pomatto L C D, Tripathi D N, et al. Redox Regulation of Homeostasis and Proteostasis in Peroxisomes [J]. Physiol Rev, 2018, 98(1): 89-115
- [5] Currie E, Schulze A, Zechner R, et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer[J]. Cell Metab, 2013, 18(2): 153-161
- [6] Chen Y Y, Li P. Fatty acid metabolism and cancer development[J]. Sci Bull, 2016, 61(19): 1473-1479
- [7] Benjamin D I, Cozzo A, Ji X D, et al. Ether lipid generating enzyme AGPS alters the balance of structural and signaling lipids to fuel cancer pathogenicity[J]. P Natl Acad Sci USA, 2013, 110(37): 14912-14917
- [8] Piano V, Benjamin D I, Valente S, et al. Discovery of Inhibitors for the

- Ether Lipid-Generating Enzyme AGPS as Anti-Cancer Agents[J]. *Acs Chem Biol*, 2015, 10(11): 2589-2597
- [9] Dahabieh M S, Ha Z Y, Di Pietro E, et al. Peroxisomes protect lymphoma cells from HDAC inhibitor-mediated apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(11): 1912-1924
- [10] Zomer A W, van Der Burg B, Jansen G A, et al. Pristanic acid and phytanic acid: naturally occurring ligands for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha [J]. *J Lipid Res*, 2000, 41(11): 1801-1807
- [11] Wright M E, Bowen P, Virtamo J, et al. Estimated phytanic acid intake and prostate cancer risk: a prospective cohort study [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(6): 1396-1406
- [12] Kolahi K S, Valent A M, Thornburg K L. Real-time microscopic assessment of fatty acid uptake kinetics in the human term placenta [J]. *Placenta*, 2018, 72-73: 1-9
- [13] Rambold A S, Cohen S, Lippincott-Schwartz J. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics[J]. *Dev Cell*, 2015, 32(6): 678-692
- [14] Xu D J, Li Y Q, Wu L Z, et al. Rab18 promotes lipid droplet (LD) growth by tethering the ER to LDs through SNARE and NRZ interactions[J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(3): 975-995
- [15] Kim Y J, Guzman-Hernandez M L, Balla T. A Highly Dynamic ER-Derived Phosphatidylinositol-Synthesizing Organelle Supplies Phosphoinositides to Cellular Membranes [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(5): 813-824
- [16] Kassan A, Herms A, Fernandez-Vidal A, et al. Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains [J]. *J Cell Biol*, 2013, 203(6): 985-1001
- [17] Salo V T, Belevich I, Li S, et al. Seipin regulates ER-lipid droplet contacts and cargo delivery[J]. *EMBO J*, 2016, 35(24): 2699-2716
- [18] Su L, Zhou L, Chen F J, et al. Cideb controls sterol-regulated ER export of SREBP/SCAP by promoting cargo loading at ER exit sites [J]. *EMBO J*, 2019, 38(8): e100156
- [19] Kim S D, Pahuja K B, Ravazzola M, et al. SEC23-SEC31 the Interface Plays Critical Role for Export of Procollagen from the Endoplasmic Reticulum [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (13): 10134-10144
- [20] Purdue P E, Lazarow P B. Peroxisome biogenesis [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, 17: 701-752
- [21] Huber N, Guimaraes S, Schrader M, et al. Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutants of GDAP1 dissociate its roles in peroxisomal and mitochondrial fission [J]. *EMBO Rep*, 2013, 14(6): 545-552
- [22] Valm A M, Cohen S, Legant W R, et al. Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome[J]. *Nature*, 2017, 546(7656): 162-167
- [23] Ahlemeyer B, Vogt J F, Michel V, et al. Microporation is an efficient method for siRNA-induced knockdown of PEX5 in HepG2 cells: evaluation of the transfection efficiency, the PEX5 mRNA and protein levels and induction of peroxisomal deficiency[J]. *Histochemistry and cell biology*, 2014, 142(5): 577-591
- [24] Sugiura A, Mattie S, Prudent J, et al. Newly born peroxisomes are a hybrid of mitochondrial and ER-derived pre-peroxisomes [J]. *Nature*, 2017, 542(7640): 251-254
- [25] Violante S, Achetib N, van Roermund C W T, et al. Peroxisomes can oxidize medium- and long-chain fatty acids through a pathway involving ABCD3 and HSD17B4[J]. *Faseb J*, 2019, 33(3): 4355-4364
- [26] Rohrig F, Schulze A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(11): 732-749
- [27] Vriens K, Christen S, Parik S, et al. Evidence for an alternative fatty acid desaturation pathway increasing cancer plasticity [J]. *Nature*, 2019, 566(7744): 403-406
- [28] Wanders R J A. Metabolic functions of peroxisomes in health and disease[J]. *Biochimie*, 2014, 98: 36-44
- [29] Chen T T, Li H. Fatty acid metabolism and prospects for targeted therapy of cancer[J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2017, 119(10)
- [30] Liu R Z, Graham K, Glubrecht D D, et al. Association of FABP5 expression with poor survival in triple-negative breast cancer: implication for retinoic acid therapy [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178 (3): 997-1008
- [31] Thumser A E, Moore J B, Plant N J. Fatty acid binding proteins: tissue-specific functions in health and disease[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2014, 17(2): 124-129
- [32] Santos C R, Schulze A. Lipid metabolism in cancer[J]. *FEBS J*, 2012, 279(15): 2610-2623
- [33] Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy [J]. *Brit J Cancer*, 2009, 100(9): 1369-1372
- [34] Bozza P T, Viola J P. Lipid droplets in inflammation and cancer[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2010, 82(4-6): 243-250
- [35] Kuemmerle N B, Rysman E, Lombardo P S, et al. Lipoprotein lipase links dietary fat to solid tumor cell proliferation[J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(3): 427-436
- [36] Carter S A, Foster N A, Scarpini C G, et al. Lipoprotein lipase is frequently overexpressed or translocated in cervical squamous cell carcinoma and promotes invasiveness through the non-catalytic C terminus[J]. *Brit J Cancer*, 2012, 107(4): 739-747
- [37] Iorio E, Ricci A, Bagnoli M, et al. Activation of phosphatidylcholine cycle enzymes in human epithelial ovarian cancer cells [J]. *Cancer research*, 2010, 70(5): 2126-2135
- [38] Box A, Alshalalfa M, Hegazy S A, et al. High alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR) is associated with ERG expression and with adverse clinical outcome in patients with localized prostate cancer[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9): 12287-12299