

糖皮质激素受体在 3 种人成骨肉瘤细胞株 MG63、U2 - OS 及 HOS 中表达及差异

袁赤亭 朱 敏 范利荣 雷新环 洪 盾

摘 要 **目的** 研究糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptors, GR) 在人成骨肉瘤细胞株 MG63、U2 - OS 及 HOS 的表达及差异。**方法** 人成骨肉瘤细胞株 MG63、U2 - OS 及 HOS 购买于 ATCC, 常规方法培养细胞。待细胞株生长良好时, 检测 3 种细胞株的细胞骨架、黏附力等细胞特性, 通过 realtime RT - PCR 和 Western blot 法检测 GR 表达情况。**结果** 3 种人成骨肉瘤细胞株有不同细胞特性, GR 在 3 种人成骨肉瘤细胞株中表达存在差异。**结论** GR 在不同功能的人成骨肉瘤细胞株中表达不同。

关键词 GR 骨肉瘤 MG63 U2 - OS HOS

[中图分类号] R738 [文献标识码] A

Expression and of Glucocorticoid Receptor in Osteosarcoma Lines MG63, U2 - OS and HOS and Its Differences. Yuan Chiting, Zhu Min, Fan Lirong, et al. Department of Orthopedics, The Affiliated Taizhou Hospital, Wenzhou Medical University, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To study the expression and differences of glucocorticoid receptor (GR) in osteosarcoma lines MG63, U2 - OS and HOS. **Methods** Human osteosarcoma lines MG63, U2 - OS and HOS were purchased from ATCC. Cells were fostered by conventional methods. When the cell lines grow well, we detected the character of three cell lines for cytoskeleton and adhesion properties. We performed realtime RT - PCR to examine GR expression. **Results** The character of three human osteosarcoma lines were different. The expression of GR was of significant difference between three human osteosarcoma lines. **Conclusion** The expression of GR were different between the different functions of human osteosarcoma lines.

Key words GR; Osteosarcoma; MG63; U2 - OS; HOS

骨肉瘤是最常见成骨的恶性肿瘤之一, 约占骨恶性肿瘤的 20% 左右, 特点是恶性程度高、易复发、易转移、预后差^[1]。研究报道目前治疗骨肉瘤的方法主要是手术扩大切除病灶和化疗, 术后 5 年存活率为 55% ~ 60%^[2, 3]。手术切除是根本性治疗方法, 而化疗是加强巩固治疗效果。临床上发现骨肉瘤患者在化疗中出现耐药, 这是导致骨肉瘤治疗失败的主要因素之一, 因此化疗效果对骨肉瘤患者生存及预后起到至关重要的作用。糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 是重要的皮质类固醇激素之一, 由于对某些肿瘤细胞具有促凋亡和抗增殖的作用而被广泛应用于临床治疗。随着 GC 不断应用临床, 某些肿瘤患者出现不同程度的耐药现象, 经过深入研究发现 GC 可能是增加某些肿瘤细胞对化疗药物抵抗的重要因素之一^[4]。研究者还发现 GC 是通过与细胞内 GR 结合, 激活或抑制 GR 基因表达, 才能选择性地启动 GR 相关基因网络, 发挥调节肿瘤细胞代谢的生物学效应^[5]。本研究在此基础上, 笔者检测 3 种人成骨肉瘤细胞株中 GR 表达情况。

材料与方法

1. 实验材料和试剂: ①高糖 DMEM: 北京赛默飞世尔生物化学制品公司; ②胰酶: Sigma - Aldrich 公司; ③鬼笔环肽: AAT Bioquest 公司; ④DAPI: 上海麦尔生物有限公司; ⑤层粘连蛋白: BD Biosciences 公司; ⑥TRIzol: Life Technologies 公司; ⑦7300 realtimePCR 系统: Applied Biosystems 公司; ⑧SYBR Green Masrer Mix: Roche 公司; ⑨引物: 上海捷瑞生物工程有限公司; ⑩蛋白裂解液: 上海碧云天生物技术研究所; ⑪GR 抗体: BD Biosciences 公司; ⑫反转录试剂盒: Thermo Scientific 公司; ⑬ECL 显影剂: GE 公司。

2. 细胞培养: 人成骨肉瘤细胞株 MG63、U2 - OS 及 HOS 购买于美国标准生物品收藏中心 (American type culture collection, ATCC), 3 种细胞株培养在 10% 小牛血清的高糖 DMEM 的培养液的培养瓶中, 置于 5% CO₂、37℃ 保湿的温箱中, 定期换液, 等细胞株密度为 80% ~ 90% 左右, 吸出细胞培养液, 用灭菌 PBS (pH7. 4) 清洗 3 次, 加入适量含 0. 02% EDTA 的 0. 25% 胰酶消化 30 ~ 60s 后, 显微镜下观察, 见细胞单层收缩突起出现空隙时, 加入适量培养基终止消化, 反复吹打细胞, 使其成细胞悬液, 将其移至离心管后, 室温 1000r/min 离心 5min, 吸出上清液, 加入培养基后, 将其吹打成细胞悬液, 以 1:2 接种到培养瓶中, 置于 5% CO₂、37℃ 保湿的温箱中。

3. 人成骨肉瘤细胞株细胞骨架的检测: 将 MG63、U2 - OS

作者单位: 317000 临海, 温州医科大学附属台州医院骨科

通讯作者: 洪盾, 电子信箱: hongD@enzemed. com

及 HOS 细胞株接种到 24 孔板上,温箱中孵育 3 天后,取出 24 孔板,吸出培养液,4% 多聚甲醛固定细胞 10min,用 0.1% TritonX-100 处理细胞 30min,加入 5 μ g/ml 的鬼笔环肽(phalloidin)室温染色 30~60min,DAPI 复染细胞核 10min,以上每步骤后用 PBS 清洗细胞 3 次,每次 5min,用荧光显微镜下绿色通道拍摄 phalloidin 显示微丝微管结构和蓝色通道拍摄 DAPI 复染的细胞核,然后将两者图片重叠后得到完整图片。

4. 人成骨肉瘤细胞株细胞黏附力实验:用层粘连蛋白(laminin)检测人成骨肉瘤细胞的黏附力。实验重复 3 次及过程同 Fujiwara 等^[6]研究,3 个骨肉瘤细胞株在 5% CO₂、37℃ 保湿的温箱孵育 24h 后,用 MTT 方法检测其黏附力结果,收集、整理、统计数据。

5. 人成骨肉瘤细胞株总 RNA 的提取和 realtime RT-PCR:总 mRNA 提取:人成骨肉瘤细胞株培养后经消化、离心沉淀后,两者总 RNA 提取用 Trizol 方法,具体提取过程根据试剂说明书。通过测量在 260nm 和 280nm 处吸光度 RNA 浓度和纯度。通过反转录试剂盒说明书得到 cDNA。通过 7300 realtime PCR 系统检测 GR 和 GAPDH mRNA 表达情况,GR 和 GAPDH 引物的设计:GR(F:5'-GGGAGATGTGATGGACTT-3',R:5'-AAAGTCTTCGCTGCTTGG-3',127bp),GAPDH(F:5'-ACGACCACTTTGTCAAGCTC-3',R:5'-GGTCTACATGGCAACTGTGA-3',206bp)。PCR 扩增是通过 20 μ l 混合体系(1 μ l cDNA,0.05 μ mol/L 引物,10 μ l SYBR Green Masrer Mix)中完成,反应温度条件如下:58℃ 反转录 2min,95℃ 反转录酶失活 10min,40 个循环扩增(95℃ 15s,60℃ 1min),根据熔解曲

线分析判断 PCR 结果的特异性。通过 7300 real-time PCR 系统收集 PCR 结果数据。

6. 人成骨肉瘤细胞株 Western blot 法检测:人成骨肉瘤细胞株培养后经消化、离心沉淀后收集细胞,分别加入蛋白裂解液(PIPA/PMSF 为 100:1)裂解 3h,离心、收集、-20℃ 保存蛋白。配置 10% 分离胶、浓缩胶,上样结束开始电泳,浓缩胶时 80V,至分离胶时改为 100V,电泳至染料刚跑出即可终止电泳。用 PVDF 膜转膜(GR:15V、75min,GAPDH:15V、25min)及 5% 光明脱脂奶粉封闭 2h。加入 1:1000 稀释的 GR 抗体(鼠抗),4℃ 过夜后室温再摇动 2h。PVDF 膜用 10% PBST 漂洗 3 次,7 分/次,加入 1:5000 的二抗(抗鼠),室温摇动 1h。用 10% PBST 漂洗 4 次,7 分/次。ECL 显影,将胶片进行扫描或拍照,用 Quantity one 软件进行分析。

7. 统计学方法:所有数据采用 SPSS PASW Statistics 18.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本比较用方差分析及两两之间比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 人成骨肉瘤细胞株 MG63、U2-OS 及 HOS 细胞骨架结果:从图 1 可知,3 种细胞形态及大小不同,3 个体积大小为 U2-OS > MG63 > HOS(图 2),HOS 细胞呈长梭性,U2-OS 细胞基本呈偏圆形,MG63 细胞形态在两者之间,MG63 细胞有多个突起,而 HOS 和 U2-OS 细胞突起部不明显。

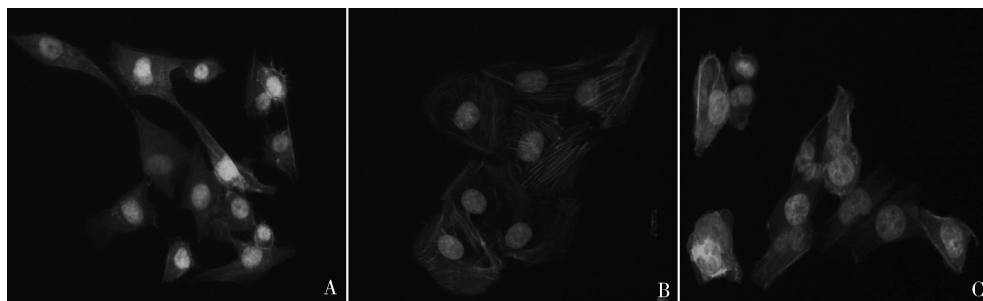


图 1 人成骨肉瘤细胞株 MG63、U2-OS、HOS 细胞骨架特点($\times 100$)

A. MG63; B. U2-OS; C. HOS

2. 人成骨肉瘤细胞株 MG63、U2-OS 及 HOS 黏附力试验结果:从图 2 可知,3 个细胞株黏附力强弱顺序为 HOS > MG63 > U2-OS,经统计学分析后,3 种细胞株间的黏附力存在明显统计学差异($P < 0.05$)。

3. 人成骨肉瘤细胞株 MG63、U2-OS 及 HOS 的 real-time RT-PCR 结果:从图 3 可知,U2-OS 中 GR 表达最低,GR 在 3 种人成骨肉瘤细胞株中表达差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

4. 人成骨肉瘤细胞株 MG63、U2-OS 及 HOS 的 Western blot 法检测结果:从图 4 和图 5 可知,U2-OS

中 GR 无表达,在 HOS 中表达最高,GR 在 3 种人成骨肉瘤细胞株中表达差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

本实验首先检测 3 种细胞株的细胞骨架、黏附力试验等细胞特性,因为相关文献报告这些细胞特性与肿瘤细胞功能有着密切关系^[7-9]。细胞骨架相关成分主要包括 α -平滑肌肌动蛋白、波形蛋白(Vimentin)及 β -连环蛋白(β -catenin),Pardo 等^[10]和 Zhang 等^[11]研究发现,Vimentin 与骨肉瘤侵袭、转移

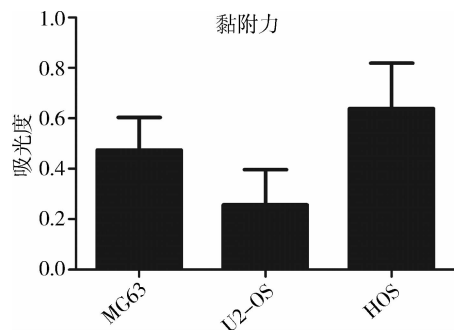


图2 人成骨肉瘤细胞株 MG63、U2-OS 及 HOS 黏附力实验结果
两两比较, P 均 < 0.05

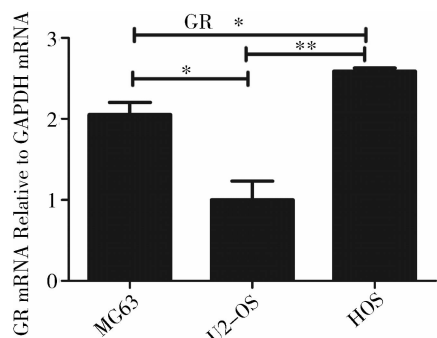


图3 人成骨肉瘤细胞株 MG63、U2-OS 及 HOS 中 GR mRNA 的情况
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

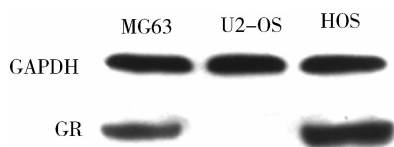


图4 人成骨肉瘤细胞株 MG63、U2-OS 及 HOS 中 GR 蛋白表达情况

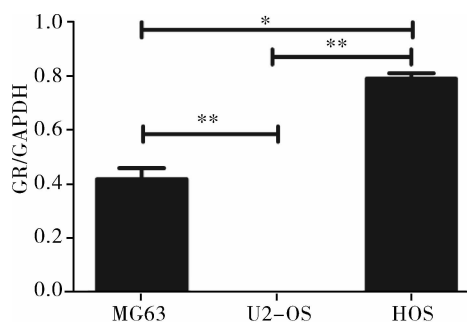


图5 人成骨肉瘤细胞株 MG63、U2-OS 及 HOS 细胞中 GR 和 GAPDH 蛋白表达的图像灰度值比 (GR/GAPDH)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

和侵袭力发生改变,这些研究提示细胞骨架与骨肉瘤细胞凋亡及侵袭力等细胞特性有关。根据本实验结果,细胞骨架结果提示3种细胞的大小和形态存在差异,尤其是细胞形态存在明显差异。细胞黏附力结果提示3种人成骨肉瘤细胞株的黏附力存在着统计学差异。结合本实验和相关文献报道,笔者认为3种人成骨肉瘤细胞株 MG63、U2-OS 及 HOS 具有不同细胞特性及功能,相当于3种不同类型骨肉瘤,这可能会导致某种重要基因在3种细胞株中表达及作用存在差异,将对笔者研究骨肉瘤疾病具有重要意义。

综合研究结果表明,GR 被激活后可调节多种肿瘤相关基因的转录,这种调节主要体现在 GR 对细胞抗凋亡影响^[15~19]。目前 GC 通过 GR 诱导不同肿瘤细胞抗凋亡作用机制是不同的,主要存在4条抗凋亡的信号转导通路,它们分别为 MKP-1、NF- κ B、PI₃K 和 Wnt 等通路,而肿瘤细胞的抗凋亡作用方式是非常复杂,有单一通路或多条通路共同参与起到抗凋亡作用。研究报道提示 GC 诱导前列腺癌、乳腺癌等肿瘤细胞凋亡中出现抵抗,通过各方面检测发现在这些肿瘤细胞中高表达 GR。Gassler 等^[20]对肺癌细胞进行地塞米松和顺铂体外共培养发现地塞米松诱导肺癌细胞对顺铂的抵抗概率极高。研究表明各种肿瘤中 GR 表达不同,会引起细胞抗凋亡能力及对化疗药物抵抗性也不同,这可能跟 GR 调节其他肿瘤相关基因表达有关。与此同时,某些肿瘤中 GR 基因本身也受到多种基因和蛋白调节的影响,Cabra 等发现鼠 NIH3T3 细胞转染前后,GR 表达不同,高表达 c2jun 基因的 NIH3T3 细胞显示更低的 GR mRNA 水平。

本实验检测了3种不同功能的人成骨肉瘤细胞株 GR 表达情况。根据 real-time PCR 和 Western blot 法检测结果,笔者发现 GR 在3种人成骨肉瘤细胞株表达存在明显差异,其中 HOS 中表达最高,U2-OS 中表达极低或无表达,这可能由于 GR 受到1种或多种相关基因调控,使 GR 基因在3种骨肉瘤细胞株表达不同,进一步导致3种细胞株细胞抗凋亡信号转导通路不同,引起细胞抗凋亡能力不同,而且研究报道骨肉瘤患者化疗易出现耐药,不同类型骨肉瘤对化疗药物敏感度也不同。因此笔者推测骨肉瘤中 GR 基因表达受到相关基因调节,而 GR 表达高低进一步引起骨肉瘤对化疗药物敏感度不同。笔者下一步是检测 GR 在骨肉瘤细胞凋亡中作用和临床不同骨肉瘤标本及耐药患者中 GR 表达情况,将对骨肉瘤患者治疗提供指导意义。

(下转第3页)

和预后有关。Niinaka 等^[12]研究发现骨肉瘤细胞株 MG63 中 Vimentin 被敲除后,骨肉瘤细胞的黏附力及侵袭力发生改变。Xia 等^[13]和 Zhang 等^[14]通过沉默骨肉瘤细胞株中 β -catenin 基因后,MG63 细胞凋亡