

二噁英对成骨肉瘤细胞增殖和胰岛素样生长因子2表达的影响

赵玉岩*, 郭磊, 都健, 马冬杰, 田蕾

(中国医科大学附属第一医院内分泌科, 辽宁沈阳 110001)

摘要:目的 探讨环境类致癌因子二噁英(TCDD)对成骨肉瘤细胞增殖及胰岛素样生长因子2(IGF-2)mRNA和蛋白表达的影响。方法 TCDD作用于人成骨肉瘤细胞SaOS-2细胞株24~48 h。MTT法检测细胞增殖率;对硝基酚磷酸盐法测定细胞内碱性磷酸酶(ALP)活性;RT-PCR半定量分析细胞IGF-2 mRNA的表达;Western蛋白质印迹法测定细胞IGF-2和丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)信号通路中p38 MAPK蛋白表达及其磷酸化水平。结果与对照组比较,TCDD 1, 10和100 nmol·L⁻¹作用48 h,使SaOS-2细胞内ALP活性分别增加38%,95%和142%。TCDD 1,10及100 nmol·L⁻¹作用24 h后,SaOS-2细胞存活率分别增加21%,47%和56%,细胞内IGF-2 mRNA和IGF-2蛋白表达均增加。TCDD对SaOS-2细胞内p38 MAPK蛋白表达无明显影响,但明显降低其磷酸化水平。结论 TCDD具有促进SaOS-2细胞增殖的作用。TCDD可能通过促进SaOS-2细胞内IGF-2的表达,并抑制MAPK信号通路中转录因子p38 MAPK活性而促进细胞增殖。

关键词:二噁英;细胞增殖;骨肉瘤;胰岛素样生长因子2;信号传导通路

中图分类号: R994.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2008)04-0296-05

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2008.04.009

二噁英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin,

收稿日期: 2007-11-05 接受日期: 2008-01-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30500414);辽宁省教育厅高等学校科学研究项目(05L508);辽宁省教育厅高等学校科学研究项目(20061010)

作者简介: 赵玉岩(1970-),女,教授,医学博士,研究方向:脂类代谢的分子机制。

*联系作者 E-mail: G572@sina.com Tel: 13032450929

TCDD)是卤代芳族烃类环境致癌因子,具有生物蓄积和生物学致癌等生物效应,在环境因素诱变易感基因致肿瘤发生的机制研究中逐渐成为热点。目前研究显示,胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGF)家族中重要成员之一IGF-2与IGF受体结合后发挥其重要的生物学活性,可促进机体蛋白质和DNA的合成以及糖的代谢,与细胞的生长分化和胚胎的发育密切相关^[1]。近年来研究发现,多种肿瘤中IGF-2与IGF受体的表达异常,提示IGF-2在诱导和保持肿瘤细胞的表型及浸润、转移及抗细胞凋亡等方面可能发挥作用^[2]。本研究探讨成骨肉瘤细胞中TCDD对IGF-2基因表达的调控及骨肉瘤细胞增殖的影响,阐明环境致癌因素对IGF家族和肿瘤细胞代谢的调控作用,为IGF-2途径干预IGF依赖型肿瘤的基因治疗研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

SaOS-2细胞株(人成骨肉瘤细胞)引自北京协和医科大学细胞生物学研究所。TCDD购自日本Okumetric公司,M-MLV逆转录试剂盒和PCR试剂为美国Promega公司产品,Trizol RNA抽提试剂、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和DMEM培养基为美国Gibco公司产品,IGF-2和β-肌动蛋白(β-actin)引物由上海生工生物工程有限公司合成,噻唑蓝(MTT)为美国Sigma公司产品,兔抗鼠IGF-2多克隆抗体、兔抗鼠p38丝裂原激活蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)和磷酸化p38 MAPK(P-p38 MAPK)多克隆抗体购自北京中山生物技术公司,GAPDH为上海生物通公司产品。其他试剂为国产分析纯。

1.2 细胞处理与分组

SaOS-2细胞常规培养于10% DMEM(含有10% FBS、100 kU·L⁻¹青霉素和100 mg·L⁻¹链霉

素),在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中贴壁生长。培养 24 h 达对数生长期进行实验。实验分为对照组, TCDD 1, 10 及 100 nmol·L⁻¹ 组。TCDD 作用浓度参考文献[3]选定。

1.3 MTT 法检测 SaOS-2 细胞增殖

培养 SaOS-2 细胞达对数生长期, 细胞以 1×10^8 L⁻¹ 的密度植入 96 孔板, 每孔 100 μL, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养 24 h 后, 换无血清 DMEM 再培养 24 h。实验组分别换含有 1, 10 及 100 nmol·L⁻¹ TCDD 的 DMEM 培养 24 h, 对照组仍用无血清 DMEM 培养。培养结束前 4 h 每孔加入 MTT (5 g·L⁻¹) 20 μL, 继续培养 4 h 后, 吸弃孔内培养液, 加入 DMSO 150 μL, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 490 nm 波长测定吸光度 (A) 值。计算细胞存活百分率 ($A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$)。实验重复 5 次。

1.4 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性检测

培养 SaOS-2 细胞达对数生长期, 细胞以 3×10^7 L⁻¹ 的密度接种到 6 孔板中, 每孔 3 mL。用含 10% FBS 的 DMEM 培养 14 d (每 3 d 换液), 更换无血清培养基培养 24 h。之后, 对照组仍使用无血清 DMEM 培养, 实验组换为含有 1, 10 及 100 nmol·L⁻¹ TCDD 的无血清 DMEM。培养 48 h 后, 吸弃孔中的培养液, 用 PBS 洗 2 遍, 每孔加入细胞裂解液 1 mL, 37℃ 作用 20 min; 收集裂解液, 用对硝基酚磷酸盐法测定 ALP 活性, Bradford 法测定裂解液中总蛋白浓度, ALP 活性以 U·g⁻¹ 蛋白表示。

1.5 细胞总 RNA 提取及 RT-PCR

SaOS-2 细胞与 TCDD 共培养 24 h, 按试剂盒说明书提取总 RNA。将总 RNA 的 mRNA 逆转录成 cDNA, 引物为 Oligo dT。IGF-2 引物序列上游为 5'-TCTCATCTCTTTGGCCTTCG-3', 下游为 5'-TTCAGT-GATGGTTGCTGGAC-3', 扩增片段 508 bp; β-肌动蛋白上游引物: 5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3', 下游引物 5'-AGTACTTGCCTCAGGAGGA-3', 扩增片段 299 bp。PCR 反应条件同文献[4]。PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 1 h, 电压为 80 V, 将凝胶置 GDS8000 凝胶自动成像仪中, 采用 Gels work-ID 软件分别对目的基因及内对照 β-肌动蛋白的扩增产物进行半定量分析。

1.6 细胞总蛋白质提取及 Western 蛋白印迹杂交

SaOS-2 细胞与 TCDD 共培养 24 h, 用细胞裂解液裂解, 超声波处理, 12 000 ×g, 离心 2 min, 取上清, 测

定总蛋白浓度。已溶解于加样缓冲液的总蛋白质经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 100 V 电泳转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 用 1:300 稀释的抗 IGF-2 抗体、1:400 稀释的抗 p38 MAPK 和 P-p38 MAPK 抗体进行 Western 蛋白印迹杂交, 40℃ 孵育过夜。1:300 稀释的二抗 (ALP 偶联的羊抗小鼠 IgG, 美国 Santa Cruz 公司) 孵育 2 h, 采用 DAB 显色试剂盒显影并检测。以 GAPDH 作为内对照。

1.7 统计学分析

实验数据表示为 $\bar{x} \pm s$, 用 SPSS12.0 统计软件进行方差分析和 *t* 检验。

2 结果

2.1 二噁英对 SaOS-2 细胞增殖和 ALP 活性的影响

表 1 结果显示, 1, 10 及 100 nmol·L⁻¹ TCDD 作用 SaOS-2 细胞 24 h, 细胞存活率较对照组分别增加 21%, 47% 和 56%; 作用 48 h, 细胞内 ALP 活性较对照组分别增加 38%, 95% 和 142%。

Tab 1. Effects of TCDD on cell proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activity of SaOS-2 cells

TCDD/nmol·L ⁻¹	Cell proliferation (A _{490 nm})	ALP activity /kU·g ⁻¹ protein
0	0.053 ± 0.018	0.81 ± 0.12
1	0.064 ± 0.021	1.12 ± 0.28
10	0.078 ± 0.015*	1.58 ± 0.14*
100	0.083 ± 0.028*	1.96 ± 0.17*

TCDD: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. SaOS-2 cells were incubated with TCDD for 24 h (cell proliferation, determined by MTT method) or 48 h (ALP activity). $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, compared with control group (0 nmol·L⁻¹).

2.2 二噁英对 SaOS-2 细胞 IGF-2 mRNA 及蛋白表达的影响

与对照组比较, 1, 10 及 100 nmol·L⁻¹ TCDD 使 SaOS-2 细胞内 IGF-2 mRNA 表达水平明显增高 (图 1A, 表 2), 表明 TCDD 对 IGF-2 转录有促进作用, 在此浓度范围内无明显浓度依赖效应。Western 蛋白印迹结果显示 (图 1B, 表 2), 1, 10 及 100 nmol·L⁻¹ TCDD 显著促进 SaOS-2 细胞中 IGF-2 蛋白的表达, 并呈浓度依赖性。100 nmol·L⁻¹ 的 TCDD 使 IGF-2 蛋白表达上调达 324%。

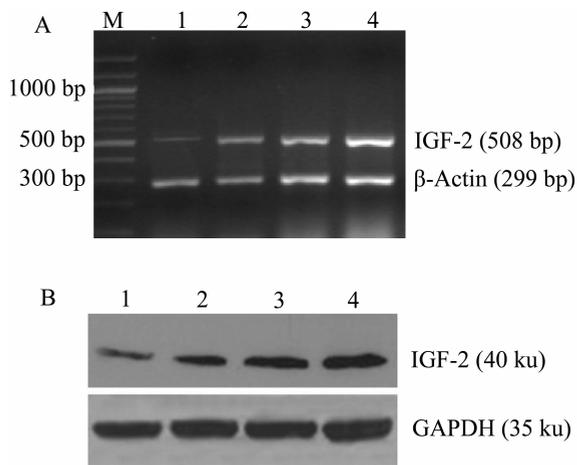


Fig 1. Effects of TCDD on IGF-2 mRNA and protein expressions in SaOS-2 cells. A: mRNA expression detected by RT-PCR. B: protein expression detected by Western blot. IGF-2: insulin-like growth factor 2. M: marker; lane 1: normal control group; lanes 2, 3 and 4: TCDD 1, 10 and 100 nmol·L⁻¹ for 24 h, respectively.

Tab 2. Effect of TCDD on IGF-2 expression in SaOS-2 cells

TCDD /nmol·L ⁻¹	mRNA (A _{IGF-2} :A _{β-Actin})	Protein (A _{IGF-2} :A _{GAPDH})
0	0.26 ± 0.06	0.21 ± 0.05
1	0.85 ± 0.18 *	0.30 ± 0.08
10	0.82 ± 0.16 *	0.68 ± 0.16 *
100	0.92 ± 0.18 *	0.89 ± 0.12 *

See Fig 1 for the treatments. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, compared with control group(0 nmol·L⁻¹).

2.3 二噁英对 SaOS-2 细胞中 p38 MAPK 信号通路的抑制作用

如图 2 和表 3 结果所示,1,10 及 100 nmol·L⁻¹ TCDD 处理 24 h 对 SaOS-2 细胞 p38 MAPK 蛋白总量无明显影响 ($P > 0.05$),但使 P-p38 MAPK 水平明显降低,100 nmol·L⁻¹ TCDD 使 P-p38 MAPK 水平降低了 60%。

3 讨论

环境类污染物是由于人类活动而释放到环境中的一类化学物质,TCDD 作为环境类污染物的代表具有广泛性分布、生物蓄积、生物学致畸和致癌等生

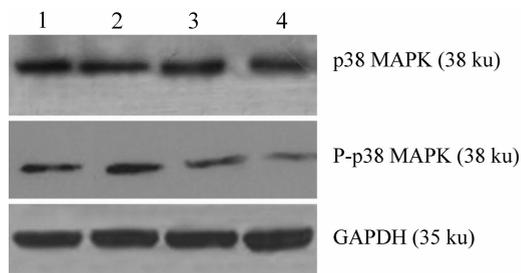


Fig 2. Effects of TCDD on p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and phospho-p38 MAPK (P-p38 MAPK) levels in SaOS-2 cells by Western blot. Lane 1: normal control group; lanes 2, 3 and 4: TCDD 1, 10 and 100 nmol·L⁻¹ for 24 h, respectively.

Tab 3. Effects of TCDD on expressions of p38 MAPK and P-p38 MAPK in SaOS-2 cells

TCDD/nmol·L ⁻¹	A _{Target protein} :A _{GAPDH}	
	p38 MAPK	P-p38 MAPK
0	0.54 ± 0.12	0.21 ± 0.05
1	0.62 ± 0.14	0.32 ± 0.08
10	0.58 ± 0.15	0.12 ± 0.03 *
100	0.62 ± 0.20	0.08 ± 0.01 *

See Fig 2 for the treatments. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, compared with control group(0 nmol·L⁻¹).

物效应。流行病学调查研究表明,TCDD 与软组织肉瘤、恶性淋巴瘤和胃癌等恶性肿瘤有明确相关性,但具体作用机制目前尚存在争议。Beebe 等^[5]给 Swiss 小鼠灌胃 TCDD 发现,低剂量的 TCDD(1.6 μg·kg⁻¹·d⁻¹)可以引起肺细胞肿瘤增加,但对肝细胞的影响不大。MCF-7 乳腺癌细胞中,TCDD 对维 A 酸依赖性基因的表达有浓度依赖性调控效应,并诱导乳腺癌细胞的凋亡^[6]。骨生长代谢过程中,成骨细胞具有合成细胞外重要的基质蛋白、分泌细胞生长因子和调节基质降解吸收等重要生理功能。本研究中,10 及 100 nmol·L⁻¹ TCDD 作用 SaOS-2 细胞 24 h,显著提高 SaOS-2 细胞的增殖能力。同时,SaOS-2 细胞内 ALP 活性增加,表明 TCDD 可能通过促进细胞内 ALP 活性增强 SaOS-2 细胞生物学效应。进而推测,TCDD 可能调控某些重要的易感基因,干预骨细胞的增殖和合成基质蛋白的功能。

IGF 家族成员 IGF-2 与 IGF 受体结合后发挥其重要的生物学活性,与细胞的生长分化、胚胎的发育

密切相关。近年来研究发现,多种肿瘤中 IGF-2 与 IGF 受体的表达异常,提示 IGF-2 在诱导和保持肿瘤细胞的表型及浸润、转移及抗细胞凋亡等方面可能发挥作用^[7]。IGF-2 的表达持续增高是乳腺癌、胰腺癌和结肠癌发生的危险因子^[8]。Furukawa 等^[9]检测促胃液素瘤(神经内分泌肿瘤)中 IGF-2 与 IGF 受体 mRNA 表达水平,发现其不仅在非内分泌肿瘤及少数内分泌肿瘤中表达增高,在神经内分泌肿瘤中表达也明显增高。胶质瘤、成胶质细胞瘤和脑膜瘤等神经系统肿瘤中,IGF-2 与 IGF 受体的表达均升高,且肿瘤细胞的凋亡功能发生变化^[10]。IGF-2 与 IGF 受体还可通过调控 Bcl-2 家族蛋白水平,发挥抗凋亡作用。在依托泊苷诱导神经胶质瘤细胞系发生凋亡时,Bcl-2 的表达减少,但 IGF 受体能阻止这些诱导凋亡因素引起的 Bcl-2 下调作用^[11]。TCDD 进入细胞后,与配体依赖性转录因子结合,并诱发一系列细胞内信号传导,引起靶基因的表达与蛋白质的合成,发挥生殖毒性、免疫毒性和诱导肿瘤发生等生物学效应。在肿瘤细胞的凋亡过程中,TCDD 与配体依赖性转录因子结合形成的复合物是否影响 IGF-2 的生物活性? 已往研究发现,10 nmol·L⁻¹ 的 TCDD 可以使小鼠头盖骨成骨样细胞(MC-3T3-E1 细胞)中 IGF-2 的表达升高^[4]。本研究发现,在 SaOS-2 成骨肉瘤细胞中,低浓度的 TCDD (1~100 nmol·L⁻¹) 促进 IGF-2 mRNA 和蛋白表达,表明其在 IGF-2 基因的转录和翻译水平发挥调控作用。MAPK 是介导细胞反应的重要信号转导系统,可以被放射线、病毒和机械力等多种因素激活,可调控细胞生长代谢、分化、凋亡和炎症反应等重要生理过程。其中重要转录因子 p38 MAPK 表达及磷酸化对肿瘤细胞的增殖与凋亡发挥重要作用^[12]。本研究发现,1~100 nmol·L⁻¹ TCDD 不影响 SaOS-2 细胞内 P-p38 MAPK 蛋白总量,但 P-p38 MAPK 水平明显低于对照组,提示 TCDD 抑制了 MAPK 信号通路中转录因子 p38 MAPK 的生物活性,进而影响 SaOS-2 细胞的增殖功能。

4 参考文献:

- [1] Dupont J, Pierre A, Froment P, Moreau C. The insulin-like growth factor axis in cell cycle progression[J]. *Horm Metab Res*, 2003, **35**(11-12):740-750.
- [2] Fu P, Thompson JA, Leeding KS, Bach LA. Insulin-like growth factors induce apoptosis as well as proliferation in LIM 1215 colon cancer cells[J]. *J Cell Biochem*, 2007, **100**(1):58-68.
- [3] Guo L, Zhao YY, Zhao YY, Sun ZJ, Liu H, Zhang SL. Toxic effects of TCDD on osteogenesis through altering IGFBP-6 gene expression in osteoblasts[J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, **30**(11):2018-2026.
- [4] Guo L, Zhao YY, Dong LY, Ding Q, Sun KL, Ji SJ, et al. Antiestrogenic effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the gene expression of insulin-like growth factors family in osteoblast cells[J]. *Chin J Med Genet* (中华遗传学杂志), 2006, **20**(6):490-494.
- [5] Beebe LE, Anver MR, Riggs CW, Fornwald LW, Anderson LM. Promotion of *N*-nitrosodimethylamine-initiated mouse lung tumors following single or multiple low dose exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin[J]. *Carcinogenesis*, 1995, **16**(6):1345-1349.
- [6] Widerak M, Ghoneim C, Dumontier MF, Quesne M, Corvol MT, Savouret JF. The aryl hydrocarbon receptor activates the retinoic acid receptor alpha through SMRT antagonism[J]. *Biochimie*, 2006, **88**(3-4):387-397.
- [7] Liao Y, Abel U, Grobholz R, Hermani A, Trojan L, Angel P, et al. Up-regulation of insulin-like growth factor axis components in human primary prostate cancer correlates with tumor grade[J]. *Hum Pathol*, 2005, **36**(11):1186-1196.
- [8] Knowlden JM, Hutcheson IR, Barrow D, Gee JM, Nicholson RI. Insulin-like growth factor- I receptor signaling in tamoxifen-resistant breast cancer: a supporting role to the epidermal growth factor receptor[J]. *Endocrinology*, 2005, **146**(11):4609-4618.
- [9] Furukawa M, Raffeld M, Mateo C, Sakamoto A, Moody TW, Ito T, et al. Increased expression of insulin-like growth factor I and/or its receptor in gastrinomas is associated with low curability, increased growth, and development of metastases[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**(9):3233-3242.
- [10] Naidu KA, Tang JL, Naidu KA, Prockop LD, Nicosia SV, Coppola D. Antiproliferative and apoptotic effect of ascorbyl stearate in human glioblastoma multiforme cells: modulation of insulin-like growth factor- I receptor (IGF- I R) expression[J]. *J Neurooncol*, 2001, **54**(1):15-22.
- [11] Yin D, Tamaki N, Parent AD, Zhang JH. Insulin-like growth factor- I decreased etoposide-induced apoptosis in glioma cells by increasing bcl-2 expression and decreasing CPP32 activity[J]. *Neurol Res*, 2005, **27**

(1):27-35.

[12] Zhang H, Vollmer M, De Geyter M, Dürrenberger M, De Geyter C. Apoptosis and differentiation induced by

staurosporine in granulosa tumor cells is coupled with activation of JNK and suppression of p38 MAPK[J]. *Int J Oncol*, 2005, 26(6):1575-1580.

Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on cell proliferation and insulin-like growth factor 2 in osteogenic sarcoma cells

ZHAO Yu-Yan*, GUO Lei, DU Jian, MA Dong-Jie, TIAN Lei

(Department of Endocrinology, the First Clinical Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: AIM To investigate the effects of environmental carcinogenic factor 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on cell proliferation and expression of insulin-like growth factor 2(IGF-2) in osteogenic sarcoma (SaOS-2) cells. **METHODS** SaOS-2 Cells were treated with TCDD for 24-48 h. MTT assay was used to detect cell proliferation. Alkaline phosphatase (ALP) activity in SaOS-2 cells was measured using the nitrophenol phosphate salt method. IGF-2 mRNA level in SaOS-2 cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). IGF-2 protein, p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and phospho-p38 MAPK (P-p38 MAPK) levels were detected by Western blot analysis. **RESULTS** Treated with TCDD 1, 10 and 100 nmol·L⁻¹ for 48 h ALP activity in SaOS-2 cells was increased about 38%, 95% and 142%, respectively, compared with control group. Treated with TCDD 1, 10 and 100 nmol·L⁻¹ for 24 h, cell proliferation increased

about 21%, 47% and 56%, respectively, and the expressions of IGF-2 mRNA and protein in SaOS-2 cells increased. TCDD did not affect the protein expression of p38 MAPK in MAPK signal pathway, but decreased the P-p38 MAPK level in SaOS-2 cells. **CONCLUSION** TCDD may increase proliferation of SaOS-2 cells, which may be related with its enhancement of IGF-2 expression, and inhibition of p38 MAPK activity.

Key words: dioxin; cell proliferation; osteosarcoma; insulin-like growth factor 2; signal transduction pathways

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China (30500414); Scientific Research Project for College of Department of Education of Liaoning Province (05L508); and Scientific Research Project for College of Department of Education of Liaoning Province (20061010)

* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)