

· 论 著 ·

沙利度胺抑制成骨细胞中骨唾液酸蛋白的基因表达和转录

王志涛¹, 小方赖昌²

(1. 天津市口腔医院牙周病科 300041; 2. 日本大学松户齿学部, 日本千叶 271-8587)

摘要:目的 研究沙利度胺作用成骨细胞(ROS17/2.8)后对骨唾液酸蛋白(BSP)基因表达和转录活性的影响。方法 将 ROS17/2.8 细胞随机分为两组:空白对照组、沙利度胺组(10 μg/mL 沙利度胺),各组持续作用 12 h 后,采用实时荧光定量 PCR 检测 BSP 信使 RNA(mRNA)的表达,用瞬时转染法检测各组的荧光素酶活性,分析 BSP 基因启动子的转录活性。结果 沙利度胺组的 BSP mRNA 表达量与空白对照组的表达量取比值,沙利度胺使比值明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);沙利度胺组 BSP 启动子(pLUC3,4)的荧光素酶活性值即转录活性值与空白对照组的转录活性值取比值,沙利度胺使比值明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 沙利度胺抑制了 ROS17/2.8 细胞中 BSP 基因启动子的基因表达和转录。

关键词:成骨细胞;沙利度胺;骨唾液酸蛋白;基因表达和转录

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.20.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)20-2318-02

Inhibition of thalidomide on gene expression and transcription of bone sialoprotein in osteoblast

Wang Zhitao¹, Ogata Yorimasa²

(1. Department of Periodontology, Tianjin Stomatology Hospital, Tianjin 300041, China; 2. Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba 271-8587, Japan)

Abstract: Objective The purpose of present study is to investigate the influence of thalidomide on gene expression and transcription of bone sialoprotein (BSP) in ROS17/2.8 cells. **Methods** ROS17/2.8 cells were randomly divided into control group and thalidomide group (10 μg/mL thalidomide). Real-time PCR was conducted to detect the BSP mRNA levels. Transient transfection assay was used to measure the BSP transcription activities. **Results** The BSP mRNA level was significantly decreased by thalidomide ($P < 0.05$). Thalidomide significantly depressed the transcription activity of BSP promoter pLUC3,4 ($P < 0.05$). **Conclusion** 10 μg/mL thalidomide suppressed BSP gene expression and transcription in ROS17/2.8 cells.

Key words: osteoblast; thalidomide; bone sialoprotein; gene expression and transcription

骨唾液酸蛋白(bone sialoprotein, BSP)是一种高度糖基化、硫酸化和磷酸化的细胞外基质蛋白,除了分布于骨、牙齿等矿化组织中,BSP在乳腺癌、前列腺癌、肺癌中也有表达^[1-3]。研究表明,BSP在肿瘤骨转移中发挥重要作用,在恶性肿瘤尤其是乳腺癌骨转移的标志物中显示出很高的灵敏度和特异性,检测BSP的表达量有助于判断患者的病情和预后^[4]。BSP能够通过分子中的RGD序列结构(精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸)与整合素 $\alpha v \beta 3$ 的结合来刺激肿瘤血管新生和骨的早期形成^[5]。关于BSP的基因启动子,Shimizu-sasaki等^[6]通过大量研究在BSP启动子序列中发现了与多个与转录因子相关的应答元件,这些应答元件集中分布在BSP启动子-116+60(pLUC3)和-425+60(pLUC4)的区域内^[7]。沙利度胺(thalidomide,商品名:反应停),曾作为止吐药物广泛用于妊娠妇女,而后因其严重的致畸作用而被长期禁用^[8-9]。近年来,沙利度胺因其抗肿瘤潜能再次成为研究和应用的热点。研究表明,沙利度胺能够抑制肿瘤血管生长因子的生成^[10],抑制肿瘤坏死因子 α (TNF- α)合成进而减少白细胞介素-6(IL-6)产生来抑制肿瘤生长^[11],对肿瘤治疗和防止肿瘤远处转移有重要意义。临床研究表明,沙利度胺对多发性骨髓瘤,骨髓增生异常综合征等有良好的治疗效果^[12-13]。上述研究结果表明,BSP与沙利度胺在恶性肿瘤的发生、转移和治疗中发挥重要作用,但有关两者相互作用的研究报道尚不多见,为此,本研究探讨了沙利度胺对成骨细胞中BSP基因转录的影响,为研究沙利度胺的抗肿瘤机制提供新的试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 沙利度胺购自Sigma公司;基本必须培养基(α -MEM),胎牛血清(FCS),脂质转染体,青霉素、链霉素和胰蛋白酶酶购自Invitrogen公司;pLUCbasic和pSV- β -半乳糖苷酶对照载体购自Promega公司;实时荧光定量PCR仪与PCR试剂盒购自Takara公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 本试验采用相对高表达BSP的大鼠成骨细胞系(ROS17/2.8)。用含有10% FCS的 α -MEM在60 mm的培养皿中培养ROS17/2.8细胞至完全融合,更换无血清 α -MEM继续培养细胞12 h后,空白组再次更换无血清 α -MEM,沙利度胺组加入含有10 μg/mL沙利度胺的无血清 α -MEM,各组分别作用12 h后,冲洗,收集细胞,离心,-80℃保存。

1.2.2 实时荧光定量PCR 采用苯酚-氯仿法从ROS17/2.8细胞中提取总RNA,测定样本吸光度(A)值,以 A_{260}/A_{280} 的比值鉴定总RNA的纯度。用Ex Script RT试剂盒,以1 μg总RNA作为模板合成cDNA。使用大鼠BSP和GAPDH两种引物,见表1。

表 1		实时荧光定量 PCR 引物序列
引物		序列
BSP	正义链	5'-AGACCACAGCTGACGCTGGA-3'
	反义链	5'-CCGTTGACGACCTGCTCATT-3'
GAPDH	正义链	5'-GACAACCTTGGCATCGTGGA-3'
	反义链	5'-ATGCAGGGATGATGTCTCTGG-3'

实时荧光定量 PCR 反应:使用 Takara 公司的 TP800 thermal cycler dice 系统进行实时荧光定量 PCR 反应。将 2 SYBRPremix EX Taq 酶混合液 12.5 μ L,0.2 μ mol/L 的正、反义引物各 0.1 μ L,25 ng 的 cDNA 模板 2.5 μ L,混合配制成 25 μ L 的反应混合液。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s,热启动后,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 15 s,40 个循环。然通过扩增曲线观察 PCR 产物的特异性,以 GAPDH 作为组内对照。以沙利度胺组与空白对照组数值的比值作为 BSP mRNA 的表达量。3 次独立试验结果取平均值。

1.2.3 瞬时转染分析 将 ROS17/2.8 细胞植入直径 35 mm 的细胞培养皿中,在含有 10% FCS 的 α -MEM 中培养 24 h,待细胞达到 50%~70%融合时,无血清 α -MEM 中加入脂质体进行瞬时转染。每个培养皿的转染混合物中包含 0.5 μ g 结合有 BSP 启动子片段的虫荧光酶质粒 pLUC3(-116~+60)和 pLUC4(-425~+60)或者不含 BSP 启动子片段的空白载体 pLUCbasic(pLUCB),以及包含 2 μ g 作为组内对照的 β -半乳糖苷酶颗粒(pSV- β -galactosidase, β -gal)。转染混合物作用细胞 12 h 后,更换含有 10%FCS 的 α -MEM 继续培养 36 h,待细胞达到完全融合后,随即分组处理。空白对照组:只加入无血清 α -MEM;沙利度胺组:加入浓度为 10 μ g/mL 沙利度胺的无血清 α -MEM。分别作用细胞 12 h 后,收集细胞,依照程序(Picagene;ToyoInki,东京,日本)并使用测光仪(Acuu FLEX Lumi400;Aloka,日本)检测各组的虫荧光素酶活性。将各组数值与空白载体 pLUCB 数值的比值作为各组结果。3 次独立试验结果取平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS14.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 用表示,差异的显著性用组间 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

实时荧光定量 PCR 扩增曲线平滑,PCR 产物特异性好。与空白对照组比较,10 μ g/mL 沙利度胺降低了 BSP mRNA 的表达量,差异有统计学意义($P < 0.05$)。沙利度胺抑制了 BSP 基因启动子 pLUC3、4 的转录活性。与空白对照组比较,10 μ g/mL 沙利度胺使 BSP 基因启动子片段 pLUC3、4 的荧光素酶活性值与 pLUCB 荧光素酶活性值的比值即相对转录活性降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 10 μ g/mL 沙利度胺对 BSP mRNA 表达及 BSP 基因启动子 pLUC3、4 转录活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	BSP 启动子转录活性		
	BSP mRNA 表达	pLUC3	pLUC4
空白对照组	1	4.220 \pm 0.236	3.709 \pm 0.313
沙利度胺组	0.375 \pm 0.014*	2.052 \pm 0.068*	1.957 \pm 0.049*

*: $P < 0.05$,与空白对照组比较。

3 讨 论

肿瘤细胞的转移和扩散是恶性肿瘤治疗失败的主要原因之一,研究肿瘤细胞转移的机制和信号途径对于改进恶性肿瘤的靶向治疗、研制新的抗肿瘤药物、抑制肿瘤细胞转移扩散具有十分重要的意义。肿瘤血管生成是恶性肿瘤生长和转移的形态学基础和营养来源,在恶性肿瘤转移中起决定性的作用^[14]。血管内皮生长因子(VEGF)被认为是最重要的促血管生长因子,与肿瘤的生长、转移关系密切^[15]。有研究表明,VEGF 通过与其受体结合促进肿瘤血管新生,并促进肿瘤细胞

通过淋巴管向全身扩散^[16]。BSP 属于小整合素结合配体 N 端联结糖蛋白家族(SIBLING),BSP 生物学功能与整合素 α v β 3 关系密切^[17]。研究表明,BSP 通过羧基端的 RGD 序列结构(精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸)与整合素 α v β 3 结合来磷酸化整合素连接激酶(ILK),激活 ILK 信号通路,磷酸化蛋白激酶 B(PKB),进而活化 mTOR/Frap,通过阻击缺氧诱导因子(HIF)促进 VEGF 的表达,从而促进肿瘤血管生成和转移^[18]。BSP 与整合素 α v β 3 的基因表达水平和结合水平被认为是影响 ILK 信号通路的重要因素^[19]。沙利度胺抗肿瘤作用的一个重要机制是其能够抑制整合素的基因表达^[20]。本研究结果显示,沙利度胺可以抑制成骨细胞中 BSP 的基因表达和转录活性,综合相关试验结果,沙利度胺对 BSP 和整合素的基因表达都有抑制作用,提示沙利度胺可能通过抑制 BSP 和整合素两者的基因表达和结合水平来影响 ILK 信号通路,进而抑制 VEGF 的生成,减少肿瘤血管新生和转移,发挥其抗肿瘤作用。

在恶性肿瘤的远处转移中,骨转移是最常见的并发症,因为骨组织具有丰富的血运和适宜肿瘤细胞入侵和增殖的微环境。肿瘤细胞的入侵改变了成骨细胞和破骨细胞的功能平衡,形成了成骨性、溶骨性或混合性的骨质破坏,因此,成骨细胞在恶性肿瘤的骨转移中发挥了重要作用。研究证明,大鼠成骨细胞系中 BSP 的基因表达较高,是 BSP 分子水平研究的有效载体^[17]。基于以上研究,本试验以大鼠成骨细胞系 ROS17/2.8 为载体,研究了沙利度胺对 BSP 基因表达的作用,但在其他细胞系中沙利度胺对 BSP 表达的影响仍需要进一步研究。

体外试验证明,10~200 μ g/mL 浓度范围的沙利度胺能够抑制乳腺癌细胞的增殖和血管内皮生长因子的表达,10~200 μ g/mL 被认为是进行沙利度胺体外试验的有效浓度范围,依据这些研究的结果,本试验以 10 μ g/mL 为刺激浓度研究了沙利度胺对 BSP 基因表达和转录的影响,其他浓度的沙利度胺对 BSP 的作用如何,不同浓度沙利度胺的作用有无差别,这些问题都有待于进一步的试验来阐明。

作为重要的抗肿瘤药物,沙利度胺在多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征等恶性肿瘤的治疗中取得良好的效果,并被逐步应用于其他肿瘤的治疗中,但其抗肿瘤的机制尚不清楚,尤其是分子水平的研究仍处于起步阶段。本试验证明了大鼠成骨细胞系中沙利度胺对 BSP 基因表达的抑制作用,为研究沙利度胺的抗肿瘤作用机制提供了新的试验依据。

参考文献:

[1] Waltregny D, Bellahcene A, Castronovo V, et al. Increased expression of bone sialoprotein in bone metastases compared with visceral metastases in human breast and prostate cancers[J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(5): 834-843.

[2] Fisher LW, McBride OW, Termine JD, et al. Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization[J]. J Biol Chem, 1990, 265(4): 2347-2351.

[3] Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein J[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1999, 10(1): 79-88.

[4] Diel IJ, Solomayer EF, Seibel ML, et al. Serum bone sialoprotein in patients with primary breast cancer is a prognostic marker for subsequent bone metastasis [J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(12): 3914-3919.

[5] 桂瑞, 宋永平. 沙利度胺的临床应用新进展[J]. 医学综述, 2012, 18(11): 1739-1742. (下转第 2323 页)

重烧伤内脏并发症的新策略。

参考文献:

- [1] 付小兵, 盛志勇. 进一步重视和加强对严重创伤后内脏缺血性损伤修复的研究[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(6): 327.
- [2] Weisleder N, Takizawa N, Tan T, et al. Recombinant MG53 protein modulates therapeutic cell membrane repair in treatment of muscular dystrophy[J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(139): 139.
- [3] 刘毅, 薛晓东, 贾赤宇, 等. 恒温恒压电烫伤仪建立小鼠烫伤模型的实验研究[J]. 兰州医学院学报, 2001, 27(1): 6.
- [4] Hermes M, Hanaa S, Chinkes D, et al. Gastric and small bowel ileus after severe burn in rats: The effect of cyclooxygenase-2 inhibitors[J]. *Burns*, 2009, 35(8): 1180-1184.
- [5] Erdogan H, Fadillioglu E, Yagmurca M, et al. Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine[J]. *Urol Res*, 2006, 34(1): 41-46.
- [6] 石艳, 任立群, 孙波, 等. KIM-1 在 UUO 大鼠肾脏表达的研究[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(10): 1545.
- [7] Wang X, Xie W, Zhang Y, et al. Cardioprotection of ischemia/reperfusion injury by cholesterol-dependent MG53-mediated membrane repair[J]. *Circ Res*, 2010, 107(1): 76-83.
- [8] Weisleder N, Takeshima H, Ma J. Mitsugumin 53(MG53) facilitates vesicle trafficking in striated muscle to contribute to cell membrane repair[J]. *Commun Integr Biol*, 2009, 2(3): 225-226.
- [9] Cai C, Masumiya H, Weisleder N, et al. MG53 regulates membrane budding and exocytosis in muscle cells[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(5): 3314-3322.
- [10] Zhu H, Lin P, De G, et al. Polymerase transcriptase release factor(PTRF) anchors MG53 protein to cell injury site for initiation of membrane repair[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(15): 12820-12824.
- [11] Hwang M, Ko JK, Weisleder N, et al. Redox-dependent oligomerization through a leucine zipper motif is essential for MG53-mediated cell membrane repair[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 301(1): C106-114.
- [12] Cai C, Weisleder N, Ko JK, et al. Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(23): 15894-15902.
- [13] Waddell LB, Lemckert FA, Zheng XF, et al. Dysferlin, annexin A1, and mitsugumin 53 are upregulated in muscular dystrophy and localize to longitudinal tubules of the T-system with stretch[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2011, 70(4): 302-313.
- (收稿日期: 2013-01-08 修回日期: 2013-03-19)
-
- (上接第 2319 页)
- [6] Shimizu-sasaki E, Yamazaki M, Furuyama S, et al. Identification of a novel response element in the rat bone sialoprotein(BSP) gene promoter that mediates constitutive and fibroblast growth factor 2-induced expression of BSP[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(8): 5459-5466.
- [7] Samato H, Shimizu E, Matsuda-honjo Y, et al. Prostaglandin E2 stimulates bone sialoprotein (BSP) expression through cAMP and FGF2 response elements in the proximal promoter of the rat BSP gene[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(31): 28659-28667.
- [8] Wu JJ, Huang DB, Pang KR, et al. Thalidomide: dermatological indications, mechanisms of action and side-effects[J]. *Br J Dermatol*, 2005, 153(2): 254-273.
- [9] Perri AJ 3rd, Hsu S. A review of thalidomides history and current dermatological applications[J]. *Dermatol Online J*, 2003, 9(3): 5.
- [10] 顾爱琴, 张雪艳, 包国良, 等. 沙利度胺对肺癌患者血清 VEGF、bFGF 和 TNF- α 水平的影响及临床意义[J]. 中国癌症杂志, 2008, 18(5): 376-379.
- [11] Zand MS, Vo T, Pelleqrin T, et al. Apoptosis and complement-mediated lysis of myeloma cells by polyclonal rabbit antithymocyte globulin[J]. *Blood*, 2006, 107(7): 2895-2903.
- [12] 袁宁宁, 张星星, 朱绮文. 沙利度胺联合 VAD 方案治疗多发性骨髓瘤的临床研究[J]. 临床血液学杂志, 2004, 17(4): 209-211.
- [13] 徐泽锋, 秦铁军, 张悦, 等. 环孢素联合沙利度胺治疗骨髓增生异常综合征[J]. 中华血液学杂志, 2010, 31(7): 451-455.
- [14] 聂富祥, 陈根元. 转移性骨肿瘤中 COX-2, VEGF 及微血管的关系[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(9): 846-848.
- [15] 周锐, 王平, 王建祥. COX-2, VEGF 和 β -catenin 表达及其与乳腺癌的相关性研究[J]. 临床外科杂志, 2009, 17(2): 122-124.
- [16] 郭琳, 张丹丹, 王强. VEGF-C 与恶性肿瘤相关性的研究进展[J]. 山东医药, 2009, 49(7): 113-114.
- [17] Ogata Y. Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism[J]. *J Periodont Res*, 2008, 43(2): 127-135.
- [18] Edwards LA, Woo J, Huxham LA, et al. Suppression of VEGF secretion and changes in glioblastoma microenvironment by inhibition of integrin-linked kinase (ILK)[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(1): 59-70.
- [19] 彭远远, 王捷. 骨唾液酸蛋白通过整合素 $\nu\beta 3$ 调控 ILK 信号通路[J]. 生物技术通报, 2012, 27(1): 172-176.
- [20] 刘国珍, 王春波, 李光耀. 沙利度胺抗肿瘤作用机制研究进展及在骨髓增生异常综合征治疗中的应用[J]. 山东医药, 2009, 49(11): 117-118.
- (收稿日期: 2013-01-15 修回日期: 2013-03-21)