

· 论 著 ·

# 糖皮质激素受体 $\beta$ 的稳定过度表达对激素调节人骨肉瘤细胞增殖分化作用的影响

周 筠<sup>1</sup>, 朱晓燕<sup>2</sup>, 陈玉霞<sup>3</sup>, 卢 建<sup>3</sup>, 刘宇健<sup>3\*</sup>

(1. 同济大学附属同济医院内分泌科, 上海 200065; 2. 第二军医大学基础医学部生理学教研室, 上海 200433; 3. 第二军医大学基础医学部病理生理学教研室)

**[摘要]** **目的:** 研究糖皮质激素受体  $\beta$ (GR $\beta$ ) 的稳定过度表达对激素调节人骨肉瘤细胞增殖分化作用的影响, 探讨糖皮质激素受体  $\beta$  的生物学意义。**方法:** 将 GR $\beta$  在人骨肉瘤细胞中稳定过度表达, 用不同浓度 ( $10^{-10} \sim 10^{-6}$  mol/L) 的地塞米松处理稳定过度表达 GR $\beta$  的细胞, 用活细胞计数法和 MTT 法检测细胞的增殖, 用标准酚比色法检测碱性磷酸酶 (AKP) 的活性。**结果与结论:** 在稳定过度表达 GR $\beta$  的人骨肉瘤细胞中, 糖皮质激素抑制细胞增殖和诱导细胞分化的作用均减弱; GR $\beta$  可能是 GR $\alpha$  的内源性抑制因子。

**[关键词]** 受体, 糖皮质激素; 骨肉瘤; 增殖; 分化**[中图分类号]** R 335.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0186-03

## Overexpression of glucocorticoid receptor beta affects regulatory effect of glucocorticoids on proliferation and differentiation of human osteosarcoma cells

ZHOU Yun<sup>1</sup>, ZHU Xiao-yan<sup>2</sup>, CHEN Yu-xia<sup>3</sup>, LU Jian<sup>3</sup>, LIU Yu-jian<sup>3\*</sup> (1. Department of Endocrinology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China; 2. Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the effect of glucocorticoid receptor beta overexpression on the regulatory effect of glucocorticoid on proliferation and differentiation of human osteosarcoma cell and to investigate the biological significance of glucocorticoid receptor beta. **Methods:** Glucocorticoid receptor beta was stably transfected into human osteosarcoma cells and the stable transfectants were treated with different concentrations of dexamethasone ( $10^{-10} \sim 10^{-6}$  mol/L). Then cell proliferation was determined by MTT method and viable cell counting; alkaline phosphatase was detected by standard hydroxybenzene colorimetry. **Results and Conclusion:** In stable transfectants overexpressing glucocorticoid receptor beta, glucocorticoid-induced cell proliferation repression and cell differentiation are inhibited, indicating that glucocorticoid receptor beta may be an endogenous inhibitor of glucocorticoid receptor alpha.

**[KEY WORDS]** receptors, glucocorticoid; osteosarcoma; proliferation; differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 186-188]

糖皮质激素对细胞的增殖分化具有重要的调节作用, 这种调节作用主要由糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 介导。GR 是一种激素依赖性转录调节因子, 由于对前体 RNA 的剪切不同, GR 有 GR $\alpha$  和 GR $\beta$  两种同型 (isoform)<sup>[1,2]</sup>。以往的研究<sup>[3]</sup> 证明, 糖皮质激素抑制人骨肉瘤细胞 (HOS-8603) 的增殖并诱导其分化, 同时证明该效应主要是由 GR $\alpha$  介导的。本课题组前期的工作表明, 在稳定过度表达 GR $\beta$  的 HOS-8603 细胞中, 糖皮质激素对 GR $\alpha$  内源性靶基因 p21 的诱导明显受到抑制<sup>[4]</sup>。由于 p21 与细胞增殖分化的关系非常密切, 因此, 很自然地推测 GR $\beta$  对糖皮质激素调节 HOS-8603 细胞增殖分化的过程可能同样会产生影响。

为证实这个想法, 本课题组研究了糖皮质激素对稳定过度表达 GR $\beta$  的 HOS-8603 细胞增殖分化的调节, 以进一步探讨 GR $\beta$  的生物学意义。

### 1 材料和方法

1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 JM109 由第二军医大学医学遗传教研室提供; 真核表达载体 pcDNA3 由第二军医大学武圣明教授惠赠; pRShGR $\alpha$  和

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (39870304)。Supported by National Natural Science Foundation of China (39870304)。

**[作者简介]** 周 筠, 硕士, 讲师、主治医师。

E-mail: zhouyunsy@126.com

\* Corresponding author. E-mail: liuyujian@yahoo.com.cn

pRShGR $\beta$ 由剑桥大学 Dr. Evans Rm 惠赠。

1.2 主要试剂 地塞米松为 Sigma 公司产品; G418 为 CNI 产品; Lipofectamine 转染试剂盒为 Gibco-BRL 公司产品。其他有关材料及试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.3 细胞系与细胞培养 HOS-8603 人骨肉瘤细胞系(由第二军医大学病理解剖学教研室建株),置含 5%(V/V)小牛血清及抗生素的 DMEM(Gibco BRL 公司)培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 饱和湿润空气中培养。

1.4 GR $\beta$ 在 HOS-8603 细胞中的稳定过度表达 用 *Xho* I 和 *Kpn* I 分别双酶切 pRShGR $\beta$  和 pcDNA3,得到编码 GR $\beta$  的全长 cDNA 片段和线性化 pcDNA3 质粒。用 T $_4$  DNA 连接酶进行定向连接,得到 GR $\beta$  的真核表达载体 pcDNA3-GR $\beta$ 。将 pcDNA3-GR $\beta$  转入 HOS-8603 细胞(具体操作见 Lipofectamine 转染试剂盒说明),经 G418 压力筛选,得到 GR $\beta$  的稳定转化子,用极限稀释法进一步筛选单克隆细胞株<sup>[5]</sup>。

1.5 细胞增殖的检测

1.5.1 活细胞计数法 取对数生长期的 HOS-GR $\beta$  (稳定过度表达 GR $\beta$  的 HOS-8603 细胞)、HOS-pcDNA3(用 pcDNA3 空载体转染的 HOS-8603 细胞)和未转染的 HOS-8603 细胞接种于 24 孔板( $2 \times 10^4$ /孔),24 h 后更换培养液,并加入不同浓度的地塞米松至终浓度分别为  $10^{-10} \sim 10^{-6}$  mol/L,对照组细胞加等体积无水乙醇,继续培养 96 h 后收集细胞并计数。

1.5.2 MTT 法 取对数生长期的 HOS-GR $\beta$ 、HOS-pcDNA3 和未转染的 HOS-8603 细胞接种于 24 孔板( $2 \times 10^4$ /孔),24 h 后更换培养液,并加入不同浓度的地塞米松至终浓度分别为  $10^{-10} \sim 10^{-6}$  mol/L,对照组细胞加等体积无水乙醇,培养 96 h 后每孔加 MTT 溶液至终浓度 0.5 mg/ml,继续孵育 4 h,终止培养,吸弃培养液,每孔加入 0.5 ml DMSO,振荡 10 min,混匀后用酶联检测仪检测 500 nm 波长的光密度值( $D_{500}$ )。

1.6 碱性磷酸酶(AKP)的测定 取对数生长期的 HOS-GR $\beta$ 、HOS-pcDNA3 和未转染的 HOS-8603 细胞接种于 24 孔板( $2 \times 10^4$ /孔),24 h 后更换培养液,并加入不同浓度的地塞米松至终浓度分别为  $10^{-10} \sim 10^{-6}$  mol/L,对照组细胞加等体积无水乙醇,培养 72 h 后用标准酚比色法检测 AKP 活性,AKP 活性表示为 nmol  $\cdot$  min $^{-1}$   $\cdot$  mg $^{-1}$  蛋白。

1.7 统计学处理 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间数据处理使用 Microsoft Excel 软件进行方差分析,

两两比较用  $q$  检验。

## 2 结果

2.1 GR $\beta$  的稳定过度表达对激素调节 HOS-8603 细胞增殖的影响 将 HOS-GR $\beta$ 、HOS-pcDNA3 和未转染的 HOS-8603 细胞接种于 24 孔板( $2 \times 10^4$ /孔),用不同浓度的地塞米松( $10^{-10} \sim 10^{-6}$  mol/L)分别处理 3 种细胞 96 h 后,用 MTT 法检测细胞的增殖。结果表明,激素明显抑制 HOS-8603 和 HOS-pcDNA3 细胞的增殖, $10^{-6}$  mol/L 地塞米松对 HOS-8603 和 HOS-pcDNA3 细胞的增殖抑制率分别为 49.6%和 49.1%。而在稳定过度表达 GR $\beta$  的 HOS-GR $\beta$  细胞中,地塞米松对细胞增殖的抑制作用明显减弱, $10^{-6}$  mol/L 地塞米松对 HOS-GR $\beta$  细胞的抑制率仅为 29.4%,与激素对 HOS-8603 和 HOS-pcDNA3 细胞的增殖抑制率相差显著( $P < 0.01$ ,图 1)。用活细胞计数法也得到了类似的结果。

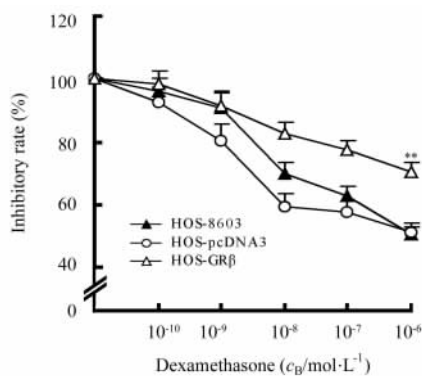


图 1 GR $\beta$  的稳定过度表达对激素调节 HOS-8603 细胞增殖的影响

Fig 1 Effects of dexamethasone on proliferation of HOS-8603, HOS-pcDNA3 and HOS-GR $\beta$  cells

HOS-8603, HOS-pcDNA3 and HOS-GR $\beta$  cells were treated and processed as described in the materials and methods. Results were expressed as the means  $\pm$  standard deviations from 3 independent experiments performed in triplicate. \*\*  $P < 0.01$  vs HOS-8603 or HOS-pcDNA3

2.2 GR $\beta$  的稳定过度表达对激素诱导 HOS-8603 细胞 AKP 活性的影响 将 HOS-GR $\beta$ 、HOS-pcDNA3 和未转染的 HOS-8603 细胞接种于 24 孔板( $2 \times 10^4$ /孔),用不同浓度的地塞米松( $10^{-10} \sim 10^{-6}$  mol/L)分别处理 3 种细胞 72 h 后,用标准酚比色法检测细胞的 AKP 活性。结果表明:地塞米松明显诱导 HOS-8603 和 HOS-pcDNA3 细胞 AKP 活性,并具有剂量依赖性特点, $10^{-6}$  mol/L 地塞米松对 HOS-8603 和 HOS-pcDNA3 细胞 AKP 活性的诱导

倍数分别为 2.89 和 2.78。而在稳定过度表达 GRβ 的 HOS-GRβ 细胞中,10<sup>-6</sup> mol/L 地塞米松对 AKP 的诱导倍数为 1.53,与激素对 HOS-8603 和 HOS-pcDNA3 细胞 AKP 活性的诱导相差显著 (P<0.01,图 2)。

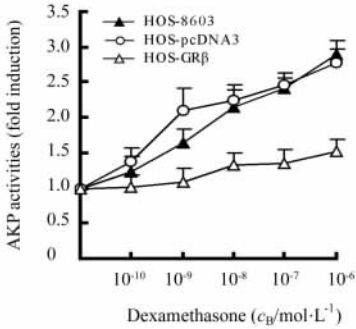


图 2 GRβ 的稳定过度表达对激素诱导 HOS-8603 细胞 AKP 活性的影响

Fig 2 Effects of GRβ overexpression on AKP activities in HOS-8603, HOS-pcDNA3 and HOS-GRβ cells induced by dexamethasone

HOS-8603, HOS-pcDNA3 and HOS-GRβ cells were treated and processed as described in the materials and methods. Data were expressed as the means ± standard deviations of 3 independent experiments. \*\* P<0.01 vs HOS-8603 or HOS-pcDNA3

### 3 讨论

1985 年, Hollenberg 等<sup>[2]</sup>在克隆人 GR 的 cDNA 时,发现 GR 有 α 和 β 两种同型。其中, GRα 就是通常所指的 GR,而 GRβ 则是因对 GR 前体 mRNA 剪切不同所产生的。由于 GRβ 缺乏完整的激素结合区,无激素结合活性,因此一直未引起人们的重视。目前,有关 GRβ 的表达调控和生物学意义尚不完全清楚。

虽然 GRβ 缺乏完整的激素结合区,但它同 GRα 一样,含有完整的 DNA 结合区和转录激活区,可以和靶基因上游调控区的糖皮质激素反应元件(glucocorticoid response elements, GREs)结合,并且两者可以形成异二聚体。因此,有理由相信 GRβ 很可能是通过影响 GRα 的功能而发挥作用。我们前期的工作表明,HOS-8603 细胞中 GRβ mRNA 的表达和 GRα mRNA 的表达均受糖皮质激素的向下调节<sup>[6]</sup>;在稳定过度表达 GRβ 的细胞中,激素对 GRβ 外源性靶基因 CAT 和内源性靶基因 p21 的诱导均受到抑制<sup>[4]</sup>;此外,在部分激素抵抗型肾病综合征患者的外周血白细胞中,GRβ mRNA 的表达量增多<sup>[7]</sup>。这些结果均提示 GRβ 可能是 GRα 的内源性抑制因子。

众所周知,p21 是 CDK (cyclin-dependent ki-

nase)抑制因子家族的主要成员之一。p21 抑制 CDK<sub>2</sub>和 CDK<sub>4</sub>的激酶活性,从而在细胞周期的调控中发挥非常重要的作用<sup>[8]</sup>。糖皮质激素诱导 p21 的表达则可能参与了糖皮质激素抑制肿瘤细胞增殖和诱导细胞分化的作用。GRβ 抑制激素对 p21 的诱导,也就很有可能影响激素对 HOS-8603 细胞增殖分化的调节。本研究结果表明,在稳定过度表达 GRβ 的细胞中,糖皮质激素抑制细胞增殖的作用明显减弱,10<sup>-6</sup> mol/L 地塞米松对 HOS-GRβ 细胞的抑制率仅为 29.4%,而 10<sup>-6</sup> mol/L 地塞米松对 HOS-8603 和 HOS-pcDNA3 细胞的增殖抑制率分别为 49.6%和 49.1%;同时激素对 AKP (AKP 是成骨细胞分化的一种特异性标志酶)的诱导也明显受到抑制,10<sup>-6</sup> mol/L 地塞米松对 HOS-8603 和 HOS-pcDNA3 细胞 AKP 活性的诱导倍数分别为 2.89 和 2.78,而对 HOS-GRβ 细胞 AKP 活性的诱导倍数为 1.53。这一结果进一步提示 GRβ 可能是 GRα 的内源性抑制因子,GRβ 可能参与了组织对糖皮质激素反应性的调节。

GRβ 是 GRα 的内源性抑制因子的观点仍有待进一步验证,如果这一观点得到证实,那么,在考虑 GR 介导糖皮质激素生物学效应(尤其是在病理情况下)时,就不应忽视 GRβ 的存在。

### [参考文献]

- [1] Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily[J]. Science, 1988,240: 889-895.
- [2] Hollenberg SM, Weinberger C, Ong EM, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA[J]. Nature, 1985,318:635-641.
- [3] Song LN. Effects of retinoic acid and dexamethasone on proliferation, differentiation, and glucocorticoid receptor expression in cultured human osteosarcoma cells[J]. Oncol Res, 1994, 4: 111-118.
- [4] 刘宇健,宋亮年,陈玉霞,等.糖皮质激素受体 β 对糖皮质激素受体 α 转录激活功能的影响[J].中国病理生理杂志,2002,18: 1187-1191.
- [5] 刘宇健,陈玉霞,宋亮年,等.稳定表达糖皮质激素受体 β 的人骨肉瘤细胞系的建立[J].第二军医大学学报,2002,23:179-182.
- [6] 刘宇健,宋亮年,卢建.糖皮质激素对糖皮质激素受体 α 和 β mRNA 表达的调节作用[J].中国病理生理杂志,2002,18:243-246.
- [7] 刘宇健,宋亮年,李保春.激素抵抗型肾病综合征患者外周血白细胞中糖皮质激素受体 β mRNA 的表达[J].中华内科杂志, 2001,40:725-728.
- [8] Gartel AL, Radhakrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences[J]. Cancer Res, 2005,65:3980-3985.

[收稿日期] 2005-10-25

[修回日期] 2006-01-06

[本文编辑] 孙岩