

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.06.001

II 型谷氨酰胺转氨酶对缺氧骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的影响*

马薇, 张书勤[△], 魏柏, 丰小敏

(华中科技大学同济医学院附属梨园医院肿瘤科, 湖北 武汉 430077)

摘要:目的 探讨缺氧条件下骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡与 II 型谷氨酰胺转氨酶(TG2)表达的关系,以及 TG2 抗凋亡机制与细胞色素 C 和 Caspase-3 表达的关系。方法 建立骨肉瘤细胞体外缺氧培养模型,设立单纯缺氧组和 TG2 siRNA 缺氧组,缺氧培养时间为 12 h,观察 TG2 活性、蛋白及 mRNA 水平,胞核、胞浆中细胞色素 C 和 Caspase-3 蛋白水平及细胞凋亡率。结果 单纯缺氧组胞核中 TG2 活性、蛋白及 mRNA 水平均显著高于 TG2 siRNA 缺氧组($P < 0.05$),而胞浆中比较,无显著差异($P > 0.05$);单纯缺氧组胞核中细胞色素 C 和 Caspase-3 蛋白水平显著高于 TG2 siRNA 缺氧组,胞浆中含量显著低于 TG2 siRNA 缺氧组($P < 0.05$);单纯缺氧组的细胞凋亡率显著低于 TG2 siRNA 缺氧组($P < 0.05$)。结论 缺氧条件下 TG2 高表达有抑制 MG-63 骨肉瘤细胞凋亡作用,其机制可能与抑制胞核中细胞色素 C 和 Caspase-3 向胞浆中转移有关。

关键词: II 型谷氨酰胺转氨酶;缺氧;骨肉瘤;细胞凋亡;细胞色素 C;Caspase-3 蛋白;MG-63 细胞

中图分类号:R965.2

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)06-0001-03

Effect of Transglutaminase 2 on Apoptosis of MG-63 Cells in Osteosarcoma Under Oxygen-Deficient Environment

Ma Wei, Zhang Shuqin, Wei Bo, Feng Xiaomin

(Department of Oncology, Liyuan Hospital of Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, China 430077)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the apoptosis of osteosarcoma MG-63 cells and the expression of transglutaminase 2(TG2) under oxygen-deficient environment, and the relationship between the anti-apoptosis mechanism of TG2 and the expression of cytochrome C and Caspase-3. **Methods** The hypoxia models of osteosarcoma cells *in vitro* were established, and then they were divided into single hypoxia group and TG2 siRNA hypoxia group, the hypoxia time was 12 h. The levels of TG2 activity, protein and mRNA, levels of cytochrome C and Caspase-3 protein in nucleus and cytoplasm, and the apoptosis rate of cells were observed. **Results** The levels of TG2 activity, protein and mRNA expression in nucleus in single hypoxia group were higher than those in the TG2 siRNA hypoxia group($P < 0.05$), while in cytoplasm had no statistical difference($P > 0.05$). The levels of cytochrome C and Caspase-3 in nucleus in single hypoxia group were higher than those in TG2 siRNA hypoxia group($P < 0.05$), while those in cytoplasm in single hypoxia group were lower than those in TG2 siRNA hypoxia group($P < 0.05$). The apoptosis rate of cells in single hypoxia group was significantly lower than that in TG2 siRNA hypoxia group($P < 0.05$). **Conclusion** Under oxygen-deficient environment, the high expression of TG2 can inhibit the apoptosis of MG-63 cells in osteosarcoma, the mechanism may be related to the inhibition of cytochrome C and Caspase-3 transferring nucleus to cytoplasm.

Key words: transglutaminase 2; oxygen-deficient; osteosarcoma; cell apoptosis; cytochrome C; Caspase-3; MG-63 cells

细胞 II 型谷氨酰胺转氨酶(transglutaminase 2, TG2)在缺氧刺激下可异常表达升高,并在肿瘤细胞的增殖、分化、转移和凋亡过程中发挥重要作用^[1],有促凋亡和抗凋亡的双重作用。王建新^[2]采用 HEK293 细胞体外实验发现, TG2 抗凋亡机制可能与减少 Bax 产生,抑制 Caspase-3 和 Caspase-9 表达,降低细胞核内细胞色素 C 转导入胞浆水平,以及钙超载诱导线粒体膜的去极化过程等密切相关^[2]。但其在骨肉瘤细胞中能否同样发挥抗凋亡作用,以及具体的作用机制研究还较少。本研究中通过构建骨肉瘤细胞体外缺氧培养模型,探讨缺氧条件下骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡与 TG2 表达的关系,以及 TG2 抗凋亡机制与细胞色素 C 和 Caspase-3

表达的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞株、试剂和主要仪器

骨肉瘤细胞株 MG-63(中国科学研究院);鼠抗人 TG2, 细胞色素 C, Caspase-3 单克隆抗体(美国 San Cruze 公司), AP 碱磷酶标记抗小鼠 IgG 和过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 的二抗(北京中杉生物技术公司);FAC Sort 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

细胞置含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液(美国 Sigma 公司)培养,在 5% CO₂、37℃ 及饱和湿度的培

*基金项目:湖北省自然科学基金计划项目[2016CFB646]。

第一作者:马薇,女,硕士研究生,主治医师,研究方向为肿瘤的姑息治疗,(电话)027-86773979。

[△]通信作者:张书勤,男,硕士研究生,副主任医师,研究方向为肿瘤的分子靶向治疗,(电子信箱)517372330@qq.com。

养箱中培养 24 h, 然后用 0.25% 胰酶消化、传代。取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 缺氧模型构建

细胞置 CO₂ 缺氧培养箱(5% CO₂、95% N₂)中, 37 ℃ 下培养 24 h。

1.2.3 分组与细胞转染

取对数生长期细胞, 重悬细胞浓度为 5×10^5 /孔接种至 2 mL 接孔板(美国 Bio-Rad 公司)中, 待细胞长至 90% 以上时分为单纯缺氧组和 TG2 siRNA 缺氧组, 共培养 12 h。siRNA 转染: 纯化 siRNA 分子由江苏碧云天科技有限公司完成。TG2 转染组的 siRNA 序列为 (F)5'-GCGGGATCCGCCAGATCATT-3', (R)5'-TACGCCCTUGGTGGCCUTGTU-3'。对照组 siRNA 序列为 (F)5'-UATCGAGUACACTCAUGATCU-3', (R)5'-UTGATGUCUUTAGTCCCTATU-3'。按照 Dharmafect 3 试剂盒步骤进行转染, 进行下一步实验。

1.2.4 观察指标和检测方法

微量滴定板法测定 TG 活性^[1]: 缺氧条件细胞培养 12 h 后, 采用 5-生物素酰氨基戊胺(BP, 美国 R&D 公司)标记。4 ℃、20 000 g 超速离心 10 min, 使用细胞提取物包被 96 孔的微量滴定板(美国 Bio-Rad 公司)于 4 ℃, 含 5% 牛血清蛋白的磷酸盐缓冲液(PBS)中封闭 1 h。然后采用辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(北京中杉生物技术公司)于 37 ℃ 孵育 45 min, PBS 洗涤 5 min × 3 次。微量滴定板中加入邻苯二胺盐酸盐于室温下显色 10 min, 1 mol/L 硫酸终止反应。显色后采用微孔板分光光度计(美国 GE 公司)于 490 nm 波长处测量吸光度(A)值。实验进行 3 次, 取平均值。

RT-PCR 法测定 TG mRNA 相对表达水平^[2]: 常规 Tizol 法(美国 Santa Cruz 公司)提取总 RNA, 紫外分光光度法测定其浓度和纯度, 逆转录试剂盒(北京中杉生

物技术公司)合成 cDNA, PCR 扩增 TG2 序列为 (F)5'-GGGGTGAGAGAGGAAAGACC-3', (R)5'-TGCAGTC-TAGGGAGCTGGAT-3', 167 bp; 内参 β -actin 序列为 (F)5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3', (R)5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3', 245 bp。反应参数为 94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s, 54 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 35 个循环, 72 ℃ 10 min 终止反应。取扩增产物 10 μ L 用 1.2% 琼脂糖电泳鉴定产物, 分析条带灰度值, 结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示。

Western Blot 法^[3]测定三酰甘油(TG)、细胞色素 C 和 Caspase-3 蛋白水平: 常规方法抽提细胞核和细胞浆总蛋白, 考马斯亮兰蛋白定量测定浓度和纯度。取适量样本蛋白置十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 然后电转移至硝酸纤维素膜上封闭, 漂洗。分别加入鼠抗人 TG2、Bax 及 cytC 单克隆抗体一抗(北京中杉金桥生物有限公司, 1:1 000 稀释), 4 ℃ 孵育过夜, 再加入兔抗鼠多克隆抗体二抗(北京中杉金桥生物有限公司, 1:500), 37 ℃ 避光孵育 1 h, 丽春红显色, 显微镜下观察、拍照。

Sub-G1 法检测凋亡细胞^[4]: 胰酶消化, 取 2×10^5 个细胞, 70% 乙醇固定, 4 ℃ 孵育过夜。PBS 漂洗, 溴化丙啶染色, 1 h 内于 FAC Sort 流式细胞仪上检测。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件分析。正态分布数据以 $\bar{X} \pm s$ 表示, 行 t 检验; 定性数据以百分率表示, 行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

结果见表 1 和表 2。单纯缺氧组细胞凋亡率显著低于 TG2 siRNA 缺氧组[(21.3 ± 4.4)% vs (42.6 ± 8.7)%, $t = 5.758$, $P = 0.031 < 0.05$]。

表 1 两组 TG2 活性、蛋白及 mRNA 水平比较($\bar{X} \pm s$)

组别	胞核			胞浆		
	TG2 活性	蛋白水平	mRNA 水平	TG2 活性	蛋白水平	mRNA 水平
单纯缺氧组	26.4 ± 2.3	31.5 ± 3.4	26.9 ± 2.1	11.6 ± 1.8	12.9 ± 2.7	14.7 ± 1.9
TG2 siRNA 缺氧组	12.5 ± 2.2	13.6 ± 2.9	10.3 ± 2.3	12.4 ± 1.7	12.6 ± 2.2	14.5 ± 1.6
t 值	4.518	4.627	5.103	0.529	0.267	0.362
P 值	0.036	0.034	0.026	0.127	0.535	0.415

表 2 两组细胞色素 C 和 Caspase-3 蛋白水平比较($\bar{X} \pm s$)

组别	胞核		胞浆	
	细胞色素 C	Caspase-3	细胞色素 C	Caspase-3
单纯缺氧组	31.6 ± 2.5	26.7 ± 1.8	5.6 ± 0.4	4.9 ± 0.6
TG2 siRNA 缺氧组	13.5 ± 2.3	12.6 ± 1.5	17.9 ± 2.1	16.6 ± 1.5
t 值	5.174	4.926	6.517	6.238
P 值	0.023	0.035	0.014	0.016

3 讨论

TG2 在胞浆、胞核、线粒体、细胞膜表面及细胞外基质中均有大量表达。TG2 在 Ca²⁺ 依赖的催化蛋白交联活性, 三磷酸鸟苷(GTP)依赖的 G 蛋白功能, 蛋白二硫键异构酶活性和蛋白激酶功能表达方面均发挥重要作用^[3]。此外, TG2 在多种恶性肿瘤细胞的生物学行为中扮演重要角色。但目前针对 TG2 在细胞凋亡中的作用

仍无统一看法。部分研究认为, TG2 主要表现促凋亡功能。缺氧条件下细胞表达一系列高水平活性氧簇(ROS), 进而促使大量 Ca^{2+} 进入细胞内, 胞浆内钙超载, 诱导 TG2 酶学活性增强, 进而启动细胞凋亡程序的发生^[4]。也有研究指出, TG2 高表达并不与凋亡程度一致。肺癌、结直肠癌、肝癌等数个恶性增殖肿瘤细胞系在体外诱导 TG2 过表达后, 细胞凋亡率并未明显增加^[5]。Jang 等^[6]的研究证实, TG2 发挥促凋亡作用可能与其水平有关, 当 TG2 明显消耗降低后可导致细胞周期停止而进入凋亡。蔺会云等^[7]研究指出, TG2 表达升高可能促进肾癌细胞增殖, 抑制凋亡。细胞核内聚集的 TG2 (R580A) 可以抵消胞浆内 TG2 的促凋亡作用。因此, 假设 TG2 在不同条件下可发挥促凋亡和抗凋亡双重作用, 其倾向哪一方及作用强弱可能与细胞类型、作用条件及 TG2 在细胞内的定位和构型等不同有关^[8]。本研究结果显示, 缺氧条件下, 胞核中 TG2 显著增多, 而胞浆中变化不明显。TG2 活性增强, mRNA 和蛋白表达水平明显增加, 随缺氧时间延长逐渐增高。单纯缺氧组胞核中 TG2 活性、蛋白及 mRNA 水平均显著高于 TG2 siRNA 缺氧组, 差异有统计学意义, 而胞浆中两组比较, 差异无统计学意义。提示缺氧条件下胞核中 TG2 的表达可能参与抗凋亡过程, 而胞核中 TG2 更多地参与促凋亡过程。

骨肉瘤细胞凋亡途径主要有 2 条, 即死亡受体配体途径和线粒体途径。其中线粒体途径是细胞内主要的凋亡机制, 具体过程为细胞受胞内外各种凋亡刺激因子作用, 诱导线粒体释放细胞色素 C, 胞浆中细胞色素 C 与凋亡蛋白酶活化因子-1 (Apaf-1) 结合形成多聚体; 进而趋化 Caspase-9 前体形成凋亡小体, Caspase-9 激活后可进一步促进下游 Caspase-3 活化, 加速凋亡进程^[9]。Caspases-3 是 Caspases 家族介导细胞凋亡的关键分子, 是各种凋亡途径的终末效应分子。胞浆中无活性状态的 Caspases-3 以酶原形式存在, 凋亡启动的早期阶段即可被迅速、大量激活, 活化状态的 Caspase-3 结构组成有 2 个大亚基和 2 个小亚基, 作用底物分布在胞浆和胞核中, 通过多种效应分子介导的信号转导途径, 最终诱导细胞凋亡^[10]。胡岳等^[11]研究证实, TG2 在促凋亡过程中, 同样可以与细胞核、细胞质及线粒体内的一些蛋白形成非共价复合物, 然后与 Caspase-3 形成不溶性复合物, 进而抑制其活性, 抑制凋亡进程的进一步扩大。其遏制凋亡发生及级联扩增是不依赖 TG2 转化酶功能, 而可能与 TG2 的细胞定位与分子结构构象不同有关^[12]。本研究结果提示, 单纯缺氧组 Caspase-3 活性水平无明显增加, 而 siRNA 转染缺氧组通过直接抑制 TG2 表达水平, 导致 Caspase-3 活性及其蛋白相对表达水平显著升高, 细胞凋亡率也随之上升。由此说

明, 细胞缺氧状态可诱导 TG2 的异常高表达, 介导 Caspase-3 活性下降而发挥抗细胞凋亡表达^[13]。

本研究中发现, 单纯缺氧组胞核中细胞色素 C 和 Caspase-3 蛋白水平显著高于 TG2 siRNA 缺氧组, 胞浆中含量及细胞凋亡率显著低于 TG2 siRNA 缺氧组, 提示缺氧条件下 TG2 可抑制骨肉瘤细胞色素 C 和 Caspase-3 由线粒体向胞浆内释放, 起到抗凋亡作用^[14]。

综上所述, 缺氧条件下 TG2 高表达有抑制 MG-63 骨肉瘤细胞凋亡的作用, 可能与抑制胞核中细胞色素 C 和 Caspase-3 向胞浆中转移有关, 可能成为治疗骨肉瘤的新干预靶点。下一步研究可在动物模型中进行验证。

参考文献:

- [1] 蔡文涛, 夏虹, 沈宁江, 等. II型谷氨酰胺转氨酶对骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的抑制作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2014, 40(4): 782-789.
- [2] 王建新. TG2 对缺氧条件下骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的影响[J]. 广东医学, 2015, 36(13): 1996-2000.
- [3] Hsieh YF, Liu GY, Lee YJ, et al. Transglutaminase 2 contributes to apoptosis induction in Jurkat T cells by modulating Ca^{2+} homeostasis via cross-linking RAP1GDS1[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e81516.
- [4] Lee HJ, Lee CH. Transglutaminase 2 is involved in expression of osteoprotegerin in MG-63 osteosarcoma cells[J]. Biomol Ther (Seoul), 2013, 21(3): 204-209.
- [5] Cho SY, Lee JH, Bae HD, et al. Transglutaminase 2 inhibits apoptosis induced by calcium-overload through down-regulation of Bax[J]. Exp Mol Med, 2010, 42(9): 639-650.
- [6] Jang GY, Jeon JH, Cho SY, et al. Transglutaminase 2 suppresses apoptosis by modulating caspase 3 and NF- κ B activity in hypoxic tumor cells[J]. Oncogene, 2010, 29(3): 356-367.
- [7] 蔺会云, 陆应麟. 组织型谷氨酰胺转氨酶在肿瘤生物学中的作用[J]. 军事医学科学院院刊, 2006, 30(4): 382-385.
- [8] Nurminskaya MV, Belkin AM. Cellular functions of tissue transglutaminase[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2012, 294(1): 1-97.
- [9] 王玉峰, 王岩峰, 胡春吉, 等. NF- κ B 抑制剂 PDI 对骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡及 Livin 和 Caspase-9 表达的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2011, 19(7): 589-591.
- [10] 邓超, 曲国蕃. XIAP 和 Caspase-3 在骨肉瘤中的表达及其意义[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2010, 44(2): 156-159.
- [11] 胡岳, 王涌, 邱江峰. 组织型转谷氨酰胺酶在肿瘤发生、发展、侵袭和转移中的作用及其作用机制的研究进展[J]. 肿瘤, 2013, 33(9): 831-836.
- [12] Mehta K, Kumar A, Kim HI. Transglutaminase 2: a multi-tasking protein in the complex circuitry of inflammation and cancer[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(12): 1921-1929.
- [13] Kumar S, Mehta K. Tissue transglutaminase, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? [J]. Amino Acids, 2013, 44(1): 81-88.
- [14] 李梅, 张余. 细胞凋亡与骨肉瘤[J]. 中国骨科临床与基础研究杂志, 2011, 3(4): 299-303.

(收稿日期: 2017-08-16)