doi:10.11659/jjssx.03E019164

·基础研究·

缺氧诱导骨肉瘤 U2OS 细胞分泌 IL-11 的机制研究

杨腾蛟[1],李虎进[1],王 盼[1],冯 勇[2] (1.重庆大学附属肿瘤医院,肿瘤转移与个体化诊治转化研究重庆市重点实验室,重庆 400030;2.重庆市急救医疗中心骨科,重庆 400014)

[摘 要] **目的** 探讨缺氧诱导骨肉瘤 U2OS 细胞分泌 IL-11 的分子机制。**方法** 体外缺氧(1% O_2)环境下培养人骨肉瘤 U2OS 细胞系,同时加入 HIF-1α 抑制剂孵育,或预先加入不同信号通路抑制剂处理,Western blot 检测 HIF-1α 的蛋白水平,定量 PCR 检测 IL-11 的 mRNA 水平,ELISA 检测 IL-11 的蛋白水平。**结果** 与正常氧环境培养的 U2OS 细胞相比,缺氧显著诱导 U2OS 细胞上调 HIF-1α 的表达,同时促进 IL-11 的 mRNA 水平和蛋白水平增加,并具有时间依赖性;加入 HIF-1α 抑制剂后可显著抑制缺氧诱导的 HIF-1α 表达以及 IL-11 的 mRNA 和蛋白水平;加入 JNK 信号抑制剂亦显著抑制缺氧诱导的 IL-11 表达和分泌,上述差异均具有统计学意义($P<0.05$)。但 HIF-1α 的表达无显著变化,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 缺氧可通过 HIF-1α-JNK 信号诱导骨肉瘤 U2OS 细胞分泌 IL-11,从而促进骨肉瘤的发生发展。

[关键词] 缺氧;IL-11;HIF-1α;JNK;骨肉瘤

[中图分类号] R738.1 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-03-26

Study on the mechanism of hypoxia-induced IL-11 secretion in osteosarcoma cell line U2OS

YANG Teng-jiao[1], LI Hu-jin[1], WANG Pan[1], FENG-Yong[2] (1. Cancer Hospital Affiliated to Chongqing University, Chongqing Key Laboratory for Cancer Metastasis and Individualized Treatment Resrarch, Chongqing 400030, China; 2. Department of Orthopaedics, Chongqing Emergency Medical Center, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To study the mechanism of hypoxia-induced IL-11 secretion in osteosarcoma cell line U2OS. **Methods** U2OS cells were cultured (1% O_2) in vitro under hypoxia condition with the hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) inhibitor or different signal pathway inhibitors pre-incubated in advance. The protein level of HIF-1α was detected by Western blot, and the mRNA level of IL-11 was detected by RT-PCR, and the protein level of IL-11 was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Under hypoxia condition, the expression of HIF-1α was significantly increased, and the mRNA and protein levels of IL-11 were also significantly increased ($P<0.05$), which is in a time dependent manner. In addition, the hypoxia-induced HIF-1α expression and the mRNA and protein levels of IL-11 were significantly inhibited when cells were incubated with the HIF-1α inhibitor ($P<0.05$). When cells were pre-treated with JNK signal inhibitor, the expression and secretion of IL-11 were significantly inhibited ($P<0.05$) while the expression of HIF-1α was not altered ($P>0.05$). **Conclusion** Hypoxia could induce the secretion of IL-11 by U2OS cells via HIF-1α-JNK signal pathway, which may be involved in the development of osteosarcoma.

Keywords: hypoxia; IL-11; HIF-1α; JNK; osteosarcoma

骨肉瘤是人类最常见的恶性骨肿瘤之一,严重危害我国儿童和青少年的健康。目前认为促炎微环境是导致骨肉瘤发生发展的重要因素[1]。IL-6、IL-11 及 TNF-α 等多个炎症因子均参与骨肉瘤的疾病进程[2-4]。有研究发现,促炎因子 IL-11 及其受体 IL-11Rα 在骨肉瘤细胞中高表达,且 IL-11 结合受体后,可激活下游 STAT3 信号,促进骨肉瘤细胞的增殖、侵袭和转移,表明 IL-11/IL-11Rα 轴可作为骨肉瘤临床治疗的新靶标[5]。然而骨肉瘤微环境使肿瘤细胞表达和分泌 IL-11 的调控机制尚不明确,因此,深入探讨 IL-11 产生的上游信号,可为临床靶向治疗提供新的理论依据。目前,肿瘤微环境缺氧已被人们所公认,而缺氧诱导 HIF-1α 的增加则是肿瘤组织缺氧最为重要的特征。有文献报道,缺氧能够增加肿瘤细胞的迁移和侵袭能力,若利用抗体阻断 IL-11 的分泌,缺氧调控肿瘤细胞迁移与侵袭的能力则显著下降,提示 IL-11 的促瘤效果很可能与肿瘤微环境缺氧密切相关[6]。然而,缺氧是否能够诱导骨肉瘤细胞表达和分泌 IL-11 及其相关的分子机制并不清楚。因此,本研究拟在体外缺氧环境下培养骨肉瘤细胞系 U2OS,探讨缺氧诱导 U2OS 细胞表达和分泌 IL-11 水平的变化规律,进一步阐明其相关的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

IL-11 ELISA 检测试剂盒购自美国 PeproTech 公司,

[基金项目] 重庆市科卫联合医学科研青年项目(2018QNXM019)

HIF-1α 抑制剂 LW6 购自美国 MedChem Express 公司,抗 HIF-1α 抗体及抗 GAPDH 抗体购自美国 Abcam 公司,HRP 标记的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司,mRNA 提取试剂盒购自美国 invitrogen 公司,逆转录试剂盒和 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 购自日本 Toyobo 公司,RIPA 裂解液购自北京碧云天公司,PBS 购自北京中杉金桥生物技术有限公司,BCA 蛋白试剂盒购自武汉博士德公司,DMEM 培养基、胎牛血清以及胰酶均购自美国 Hyclone 公司,NF-κB 抑制剂(BAY 11-7082)、MEK1/2 抑制剂(U0126)和 JNK 抑制剂(SP600125)购自上海碧云天生物技术有限公司,细胞株人骨肉瘤细胞系 U2OS 细胞购自中国科学院。

1.2 细胞培养

U2OS 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中进行培养。

1.3 细胞刺激和分组

U2OS 细胞以 1×10^6 个/孔铺于 6 孔板中,然后置于缺氧(1% O_2)的孵箱中进行培养,根据实验需要或同时加入10 μmol/L的 HIF-1α 抑制剂 LW6 孵育,或预先加入 NF-κB 抑制剂(BAY 11-7082)、MEK1/2 抑制剂(U0126)和 JNK 抑制剂(SP600125)孵育 1 h 后再缺氧刺激 24 h,收集细胞及其培养上清,用于 RT-PCR、Western blot 及 ELISA 检测。细胞处理分组如下:未缺氧组,缺氧组,缺氧 + LW6 组,缺氧 + DMSO 组,缺氧 + NF-κB 抑制剂组,缺氧 + MEK1/2 抑制剂组以及缺氧 + JNK 抑制剂组。

1.4 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

U2OS 细胞经 RNA 提取试剂盒抽提 mRNA 并逆转录成 cDNA,然后分别利用 IL-11 的引物对(上游引物:5′-CGAGCGGACCTACTGTCCTA-3′,下游引物:5′-GCCCAGTC AAGTGTCAGGTG-3′)和 GAPDH 的引物对(上游引物:5′-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3′,下游引物:5′-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3′)进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:94 ℃预变性 30 s,然后以 94 ℃变性 5 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s 的模式反应 35 个循环,使用 Bio-Rad CFX96 定量 PCR 仪进行分析,以 GAPDH 作为参考基因,分析 IL-11 的 mRNA 水平。

1.5 Western blot 检测

U2OS 细胞经 RIPA 裂解液裂解后,利用 BCA 蛋白试剂盒进行定量,然后 SDS-PAGE 电泳并转至 PVDF 膜,经封闭液封闭 1 h 后加入抗 HIF-1α 抗体及抗 GAPDH 抗体 4 ℃孵育过夜,随后 HRP 标记的二抗 37 ℃孵育 1 h,经洗涤后利用化学发光显色系统进行检测分析。

1.6 ELISA 检测

根据 IL-11 的 ELISA 检测试剂盒操作指南,检测 U2OS 细胞培养上清中 IL-11 的分泌水平。

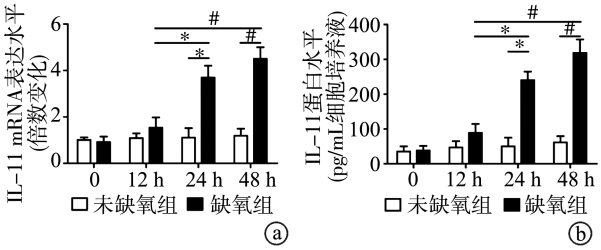
1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理和分析,数据以均值 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2 组之间的比较采用独立样本 t 检验,多组之间的比较采用单因素方差分析并进行 Tukey 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧诱导 U2OS 细胞表达和分泌 IL-11

U2OS 细胞于体外经缺氧刺激培养,检测 IL-11 的 mRNA 及蛋白水平。结果显示:在正常氧环境下,U2OS 细胞自身低表达和分泌 IL-11,但经缺氧刺激培养后,其表达和分泌 IL-11 的水平显著增加,并且随着缺氧时间的延长,IL-11 的 mRNA 及蛋白水平也逐渐增加(图 1),提示缺氧可诱导 U2OS 细胞表达和分泌 IL-11 上调,并具有时间依赖性,差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



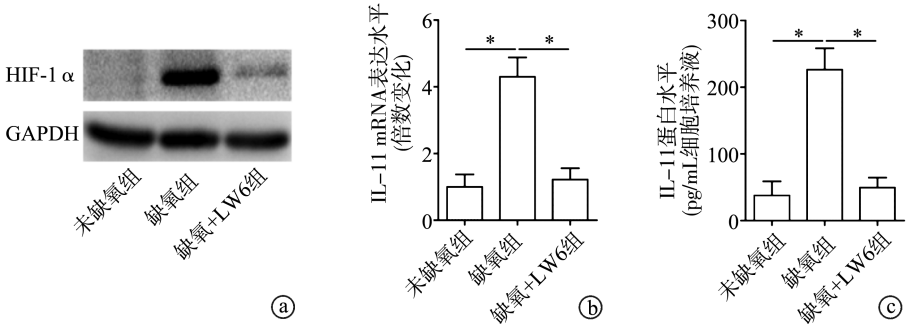
a:缺氧诱导 U2OS 细胞表达 IL-11mRNA 水平;b:缺氧诱导 U2OS 细胞分泌 IL-11 蛋白水平 *:$P<0.05$,#:$P<0.01$

图 1 缺氧在不同时间点诱导 U2OS 细胞表达和分泌 IL-11 水平的比较

2.2 缺氧通过 HIF-1α-JNK 信号诱导 IL-11 的表达和分泌

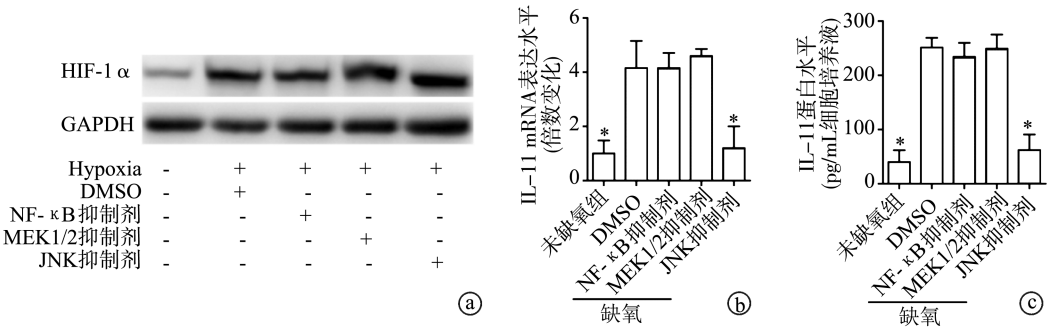
在常氧条件下,U2OS 细胞低表达缺氧诱导因子 HIF-α,且 IL-11 的 mRNA 和蛋白水平较低;在缺氧 24 h时,缺氧诱导因子 HIF-1α 的蛋白水平显著增加,同时 IL-11 的 mRNA 和蛋白水平显著上升;若加入 HIF-1α 抑制剂 LW6 阻断细胞内的缺氧信号,HIF-1α 的蛋白水平则显著下降,同时 IL-11 的表达和分泌水平则显著下降,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 2。进一步利用 NF-κB 信号通路抑制剂 BAY11-7082、MEK1/2 信号通路抑制剂 U0126 和 JNK 信号通路抑制剂 SP600125 预处理细胞后进行缺氧刺激,结果发现,在细胞均缺氧 24 h 的条件下,JNK 抑制剂组中 IL-11 的 mRNA 和蛋白表达水平显著低于 DMSO 组,

差异具有统计学意义($P<0.05$);而加入其他抑制剂组则与 DMSO 组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。此外,所有信号通路抑制剂预处理并未影响缺氧诱导的 HIF-1α 表达,由此提示 JNK 是 HIF-1α 的下游信号,缺氧可通过激活 HIF-1α-JNK 通路诱导 U2OS 细胞分泌 IL-11(图 3)。



a:LW6 抑制缺氧诱导 U2OS 细胞表达 HIF-1α 蛋白水平;b:LW6 降低缺氧诱导 U2OS 细胞表达 IL-11 的 mRNA 水平;c:LW6 降低缺氧诱导 U2OS 细胞分泌 IL-11 的蛋白水平 *:$P<0.05$

图 2 HIF-1α 抑制剂 LW6 对缺氧诱导 U2OS 细胞表达和分泌 IL-11 的影响



a:信号通路抑制剂对 HIF-1α 表达水平无影响;b: JNK 抑制剂组中 IL-11 的 mRNA 表达水平显著低于 DMSO 组;c:JNK 抑制剂组中 IL-11蛋白表达水平显著低于 DMSO 组 *:与 DMSO 组比较,$P<0.05$

图 3 不同信号通路抑制剂对缺氧诱导 U2OS 细胞表达和分泌 IL-11 的影响

3 讨论

骨肉瘤作为骨恶性肿瘤中最常见的一种,在全球范围内引起高度的关注和重视[7]。尽管目前手术切除、放疗和化疗已被广泛应用于骨肉瘤患者的治疗,但效果仍不理想[8]。已有的研究表明,环境、基因、免疫等都是骨肉瘤的致病因素,其中免疫因素,特别是促炎细胞因子调控的炎症免疫应答在骨肉瘤的发生发展中起着重要作用[9-11]。因此,深入阐明骨肉瘤微环境炎症形成的免疫学机制可为疾病的防治提供理论依据。

在骨肉瘤中,促炎细胞因子 IL-11 是疾病进展的关键因素之一。有文献报道骨肉瘤患者肿瘤细胞不仅高表达 IL-11,而且还显著上调 IL-11 受体 IL-11Rα 的表达水平,并证实其与患者的疾病进展和预后不良密切相关[12]。肿瘤细胞来源的 IL-11 通过与其受体 IL-11Rα 结合,以自分泌的形式直接作用于肿瘤细胞本身,诱导其分泌血管内皮生长因子 VEGF 或转化成间质细胞,从而促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移;此外,IL-11 还能够以旁分泌的形式作用于肿瘤浸润的巨噬细胞,诱导巨噬细胞分化成为具有免疫抑制功能的肿瘤相关巨噬细胞,进而抑制免疫细胞的抗肿瘤功能,间接促进肿瘤的进展[13-15]。然而,骨肉瘤微环境如何诱导 IL-11 的产生,进而影响疾病的进程尚不清楚。本研究利用骨肉瘤细胞系 U2OS 作为研究对象,在体外检测到正常氧环境培养下其自身表达和分泌 IL-11 的水平比较低,但是缺氧条件下 U2OS 细胞表达和分泌 IL-11 的水平显著上调,而且随着缺氧时间的延长,其诱导 IL-11 表达和分泌的能力也逐渐增强,由此表明缺氧可通过作用于骨肉瘤细胞直接诱导 IL-11 的表达和分泌。基于肿瘤微环境缺氧已被人们所公认,且骨肉瘤中缺氧诱导因子 HIF-1α 的表达与患者的生存时间密切相关,提示骨肉瘤缺氧微环境很可能调控肿瘤细胞产生 IL-11,从而促进骨肉瘤的进程[16-17]。

缺氧环境下可有效激活细胞中的 HIF-1α 信号,进而诱导靶基因的转录和翻译[18]。本研究进一步探讨了 U2OS 细胞中 HIF-1α 的蛋白水平,结果发现缺氧在上调 IL-11 表达和分泌的同时,U2OS 细胞中 HIF-1α 的蛋白水平也显著增加;利用 HIF-1α 抑制剂 LW6 抑制 HIF-1α 的聚集与转录活性后,伴随着 HIF-1α 蛋白水平的下降,IL-11 的表达和分泌水平也显著下降。由

此提示缺氧处理 U2OS 细胞后,可经活化 HIF-1α 信号参与诱导 IL-11 的产生。有文献报道,氯化钴作为组织微环境缺氧的模拟物,在体外能够诱导肿瘤细胞分泌 IL-11,其内在的调控机制即为 HIF-1α 信号通路所介导,证实缺氧通过 HIF-1α 信号诱导肿瘤细胞分泌 IL-11,进而参与骨肉瘤等多种肿瘤的发生发展[19]。

HIF-1α 作为核转录因子,可直接或间接调控下游基因的转录和翻译,并参与指导下游的蛋白质行使其功能[20]。然而,文献报道 IL-11 的启动子序列虽然含有缺氧应答元件,但是删除该应答元件后,IL-11 的表达和分泌水平仍然不受影响,提示 HIF-1α 并非直接调控 IL-11 的应答,而是很可能通过作用于其他信号间接实现对 IL-11 的调控[21-22]。因此,本研究进一步利用不同信号通路抑制剂进行预处理,发现在缺氧环境下,JNK 信号通路抑制剂处理的 U2OS 细胞表达和分泌 IL-11 的能力显著下降,而 NF-κB 和 MEK1/2 信号通路抑制剂处理的 U2OS 细胞表达和分泌 IL-11 的水平则无明显变化,表明 JNK 信号参与缺氧诱导的 IL-11 转录和翻译。为了进一步明确 HIF-1α 与 JNK 的上下游关系,本研究同时探讨信号通路抑制剂处理的 U2OS 细胞表达 HIF-1α 的情况,结果发现 JNK 信号并未影响 HIF-1α 的表达,由此证实 JNK 是 HIF-1α 的下游信号,表明缺氧微环境通过 HIF-1α-JNK 信号诱导骨肉瘤细胞表达和分泌 IL-11,进而介导疾病的进展。

综上所述,在骨肉瘤缺氧微环境中,缺氧能够诱导 HIF-1α 聚集,激活下游 JNK 信号通路并促进 IL-11 的分泌,从而导致骨肉瘤的发生发展。进一步通过体内研究阐明缺氧调控 IL-11 分泌的致病机制,将为骨肉瘤患者的临床靶向治疗提供实验依据。

[参考文献]

[1] Liu B, Huang Y, Sun Y, et al. Prognostic value of inflammation-based scores in patients with osteosarcoma[J]. Sci Rep, 2016, 6: 39862. doi: 10.1038/srep39862.

[2] Cortini M, Massa A, Avnet S, et al. Tumor-activated mesenchymal stromal cells promote osteosarcoma stemness and migratory potential via IL-6 secretion[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166500. doi: 10.1371/journal.pone.0166500.

[3] Yang J, Zhang W. New molecular insights into osteosarcoma targeted therapy[J]. Curr Opin Oncol, 2013, 25(4): 398-406. doi: 10.1097/CCO.0b013e3283622c1b.

[4] Mori T, Sato Y, Miyamoto K, et al. TNFα promotes osteosarcoma progression by maintaining tumor cells in an undifferentiated state[J]. Oncogene, 2014, 33(33): 4236-4241. doi: 10.1038/onc.2013.545.

[5] Lewis VO, Devarajan E, Cardó-Vila M, et al. BMTP-11 is active in preclinical models of human osteosarcoma and a candidate targeted drug for clinical translation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(30): 8065-8070. doi: 10.1073/pnas.1704173114.

[6] Lim JH. Inhibition of the Interleukin-11-STAT3 axis attenuates hypoxia-induced migration and invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2014, 18(5): 391-396. doi: 10.4196/kjpp.2014.18.5.391.

[7] Simpson S, Dunning MD, de Brot S, et al. Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics[J]. Acta Vet Scand, 2017, 59(1): 71. doi: 10.1186/s13028-017-0341-9.

[8] Harrison DJ, Geller DS, Gill JD, et al. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2018, 18(1): 39-50. doi: 10.1080/14737140.2018.1413939.

[9] Simpson E, Brown HL. Understanding osteosarcomas[J]. JAAPA, 2018, 31(8): 15-19. doi: 10.1097/01.JAA.0000541477.24116.8d.

[10] Wang X, Liu Z. Systematic meta-analysis of genetic variants associated with osteosarcoma susceptibility[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(38): e12525. doi: 10.1097/MD.0000000000012525.

[11] Miwa S, Shirai T, Yamamoto N, et al. Current and emerging targets in immunotherapy for osteosarcoma[J]. J Oncol, 2019, 2019: 1-8. doi: 10.1155/2019/7035045.

[12] Lewis VO. IL-11Rα: a novel target for the treatment of osteosarcoma[J]. AdvExp Med Biol, 2014, 804: 285-289. doi: 10.1007/978-3-319-04843-7_15.

[13] Permyakov EA, Uversky VN, Permyakov SE. Interleukin-11: a multifunctional cytokine with intrinsically disordered regions[J]. Cell BiochemBiophys, 2016, 74(3): 285-296. doi: 10.1007/s12013-016-0752-7.

[14] Putoczki TL, Ernst M. IL-11 signaling as a therapeutic target for cancer[J]. Immunotherapy, 2015, 7(4): 441-453. doi: 10.2217/imt.15.17.

[15] Xu DH, Zhu Z, Wakefield MR, et al. The role of IL-11 in immunity and cancer[J]. Cancer Lett, 2016, 373(2): 156-163. doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.004.

[16] Balamurugan K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer[J]. Int J Cancer, 2016, 138(5): 1058-1066. doi: 10.1002/ijc.29519.

[17] Ouyang Y, Li H, Bu J, et al. Hypoxia-inducible factor-1 expression predicts osteosarcoma patients' survival: a meta-analysis[J]. Int J Biol Markers, 2016, 31(3): e229-234. doi: 10.5301/jbm.5000216.

[18] Yellowley CE, Genetos DC. Hypoxia signaling in the skeleton: implications for bone health[J]. CurrOsteoporos Rep, 2019, 17(1): 26-35. doi: 10.1007/s11914-019-00500-6.

[19] Zhong Z, Hu Z, Jiang Y, et al. Interleukin-11 promotes epithelial-mesenchymal transition in anaplastic thyroid carcinoma cells through PI3K/Akt/GSK3β signaling pathway activation[J]. Oncotarget, 2016, 7(37): 59652-59663. doi: 10.18632/oncotarget.10831.

[20] Xia Y, Jiang L, Zhong T. The role of HIF-1α in chemo-radioresistant-tumors[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 3003-3011. doi: 10.2147/OTT.S158206.

[21] Onnis B, Fer N, Rapisarda A, et al. Autocrine production of IL-11 mediates tumorigenicity in hypoxic cancer cells[J]. J Clin Invest, 2013, 123(4): 1615-1629. doi: 10.1172/JCI59623.

[22] Masoud GN, Li W. HIF-1α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy[J]. Acta Pharm Sin B, 2015, 5(5): 378-389. doi: 10.1016/j.apsb.2015.05.007.

(编辑:陈庆利)