

## 靶向 $\beta_2$ -肾上腺素受体抗骨肉瘤的实验研究

廖鸿益<sup>1</sup>, 谢显彪<sup>1</sup>, 温丽丽<sup>2</sup>, 汪校帅<sup>1</sup>, 刘伟海<sup>1</sup>, 利洪艺<sup>1</sup>, 尹军强<sup>1</sup>, 黄 纲<sup>1</sup>  
(1.中山大学附属第一医院骨肿瘤科,广东广州 510080;2.华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心,广东 广州 510060)

**摘要:**【目的】探索靶向  $\beta_2$ -肾上腺素受体诱导骨肉瘤细胞凋亡的作用及相关分子机制。【方法】利用 MTT 法检测靶向  $\beta_2$ -肾上腺素受体对骨肉瘤细胞的生长抑制作用,流式细胞仪检测细胞周期阻滞及凋亡,Western blot 法检测  $\beta_2$ -肾上腺素受体抑制剂 ICI118,551 处理后相关信号通路的变化。【结果】 $\beta_2$ -肾上腺素受体抑制剂对骨肉瘤细胞的生长抑制作用,流式细胞仪检测结果证明 ICI118,551 可显著诱导骨肉瘤细胞周期阻滞及凋亡,以 p-ERK 蛋白水平表达变化最为显著。【结论】靶向  $\beta_2$ -肾上腺素受体能显著诱导骨肉瘤细胞凋亡,其中 ERK 通路在靶向  $\beta_2$ -肾上腺素受体诱导的骨肉瘤细胞凋亡中具有重要作用。

**关键词:**  $\beta_2$ -肾上腺素受体;骨肉瘤;凋亡

中图分类号:R73 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2016)02-0217-05

### Anti-osteosarcoma Effect by Targeting $\beta_2$ -Adrenoceptor

LIAO Hong-yi<sup>1</sup>, XIE Xian-biao<sup>1</sup>, WEN Li-li<sup>2</sup>, WANG Xiao-shuai<sup>1</sup>, LIU Wei-hai<sup>1</sup>, LI Hong-yi<sup>1</sup>,  
YIN Jun-qiang<sup>1</sup>, HUANG Gang<sup>1</sup>

(1.Department of Orthopaedic Oncology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. State Key Laboratory of Oncology in Southern China // Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China)

Corresponding to: HUANG Gang, E-mail: ganghuang@163.net

**Abstract:** 【Objective】 To study the anti-tumor effect by targeting  $\beta_2$ -adrenoceptor in osteosarcoma and the underlying molecular mechanism. 【Methods】 MTT assay was used to detect the anti-proliferation effect in osteosarcoma following the cells were treated with a  $\beta_2$ -adrenoceptor antagonist ICI118,551. Then, flow cytometry was employed to detect the cell cycle arrest and apoptosis. Finally, the concerning signal pathway was tested by Western blot. 【Result】 Targeting  $\beta_2$ -adrenoceptor could inhibit osteosarcoma cell proliferation. Significant G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis were detected through flow cytometry following ICI118,551 incubation. Furthermore, the protein level of p-ERK was found down-regulated remarkably. 【Conclusion】 Together, targeting  $\beta_2$ -adrenoceptor possesses potent anti-tumor effect in osteosarcoma cells. The ERK signaling pathway probably play a critical role in this process.

**Key words:**  $\beta_2$ -adrenoceptor; osteosarcoma; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(2): 217-221]

骨肉瘤是青少年最常见的骨骼系统原发恶性肿瘤,新辅助化疗的应用使患者 5 年生存率已提高到 65%~70%,然而仍有部分患者对目前化疗方案不敏感<sup>[1]</sup>。传统的化疗方案及手术切除并没有进一步提高骨肉瘤患者的五年生存率,因此亟须探索新的治疗靶点来开发对骨肉瘤敏感的药物。 $\beta_2$ -肾上腺素受体是 G 蛋白偶联受体家族的一

员<sup>[2]</sup>,在乳腺癌、口腔癌、前列腺癌以及黑色素瘤等中高表达,且  $\beta_2$ -肾上腺素受体的表达与这些肿瘤不良的临床病理特征,转移、复发以及减少生存率有关<sup>[3]</sup>。刺激  $\beta_2$ -肾上腺素受体能促进肺癌、胰腺癌及前列腺癌的生长<sup>[4-6]</sup>。然而靶向  $\beta_2$ -肾上腺素受体在骨肉瘤中的作用及其分子机制目前研究尚少。因此,本研究通过观察抑制  $\beta_2$ -肾上腺素受

收稿日期:2015-10-15

基金项目:广东省自然科学基金(S2013010015384)

作者简介:廖鸿益,硕士研究生, E-mail: liaohyi@126.com; 黄纲,通信作者:博士,副教授,硕士生导师,研究方向:骨与软组织肿瘤学, E-mail: ganghuang@163.net

体诱导骨肉瘤细胞凋亡的作用并探索其作用分子机制,为寻找抗骨肉瘤新的治疗靶点提供理论依据及实验基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株及细胞培养

骨肉瘤细胞株 U2OS,由意大利 Rizzoli 骨科研究所 Dr.M SERRA 惠赠<sup>[7]</sup>,143B 和 MG63 购买于 ATCC 细胞库(美国)。这些骨肉瘤细胞在含有体积分数 100 ml/L 的胎牛血清、10 kU/L 青霉素及 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养液中培养。

### 1.2 MTT 法检测 $\beta_2$ -肾上腺素受体抑制剂对骨肉瘤细胞株增殖抑制的影响

取对数生长期的细胞  $30 \times 10^3$  个/mL 接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,加入 50  $\mu$ L 不同浓度  $\beta_2$ -肾上腺素受体抑制剂 ICI118,551。培养 24、48、72 h 后,加入 50  $\mu$ L 的 5 mg/mL MTT,再孵育 4 h。弃去培养液,加入 200  $\mu$ L DMSO,待结晶完全溶解后,在 Bio-Rad550 酶联免疫检测仪上 490 nm 波长测定每孔的吸光度值。

### 1.3 流式细胞仪检测细胞周期

取约  $2 \times 10^6$  个骨肉瘤细胞接种于直径为 6 cm 的培养皿,用 75  $\mu$ mol/L 的 ICI118,551 处理 24 h,收集细胞,4  $^{\circ}$ C 的体积分数为 75%的乙醇固定,PI(propidium iodide)染色之后采用流式细胞仪分析。

### 1.4 AnnexinV/PI 染色流式细胞术检测细胞凋亡率

用 75  $\mu$ mol/L 的 ICI118,551 处理骨肉瘤细胞 48 h,收集细胞,每管约  $1 \times 10^6$  个细胞。加入 100

$\mu$ L 反应缓冲液每管标本中重旋,加入 5  $\mu$ L Annexin-V 和 5  $\mu$ L PI 进行染色,摇匀,室温下孵育 15 min,加入 400  $\mu$ L 反应缓冲液,摇匀后上机检测。

### 1.5 细胞胞浆总蛋白制备

接种对数生长期的骨肉瘤细胞与直径为 6 cm 的皿中,用不同浓度的 ICI118,551 (0,25,50,75  $\mu$ mol/L)处理骨肉瘤细胞 48 h 后,收集细胞于预冷的 EP 管中,向 EP 管中加入 0.2 mL 的裂解缓冲液后反复吹打直至细胞完全裂解;冰上静置 20 min,4 $^{\circ}$ C 15 000 r/min 离心 15 min(离心半径  $r = 5$  cm),取上清并测定蛋白浓度。

### 1.6 Western blotting

将提取的细胞胞浆总蛋白变性后上样,进行 SDS 电泳,电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,质量分数为 5%的脱脂奶粉室温封闭 1 h。1:1 000 的一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,最后将发光液加入到 PVDF 膜上,X 线片暗室曝光,信号条带用 Image J1.41 进行灰度分析。

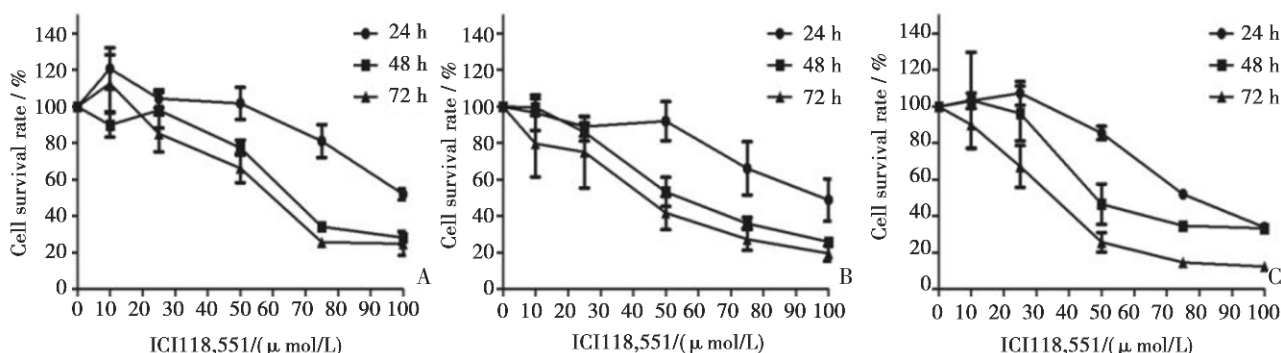
### 1.7 统计学处理

所有数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。两独立样本均数比较采用  $t$  检验,多组间均数差异性比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用 SNK 法,两样本率的比较采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 靶向 $\beta_2$ -肾上腺素受体对骨肉瘤的抑制作用

$\beta_2$ -肾上腺素受体抑制剂 ICI118,551 能显著抑制骨肉瘤细胞株 U2OS、MG63、143B 四种骨肉



A: U2OS; B: MG63; C: 143B

图 1 ICI118,551 靶向  $\beta_2$ -肾上腺素受体对骨肉瘤细胞的增殖抑制作用

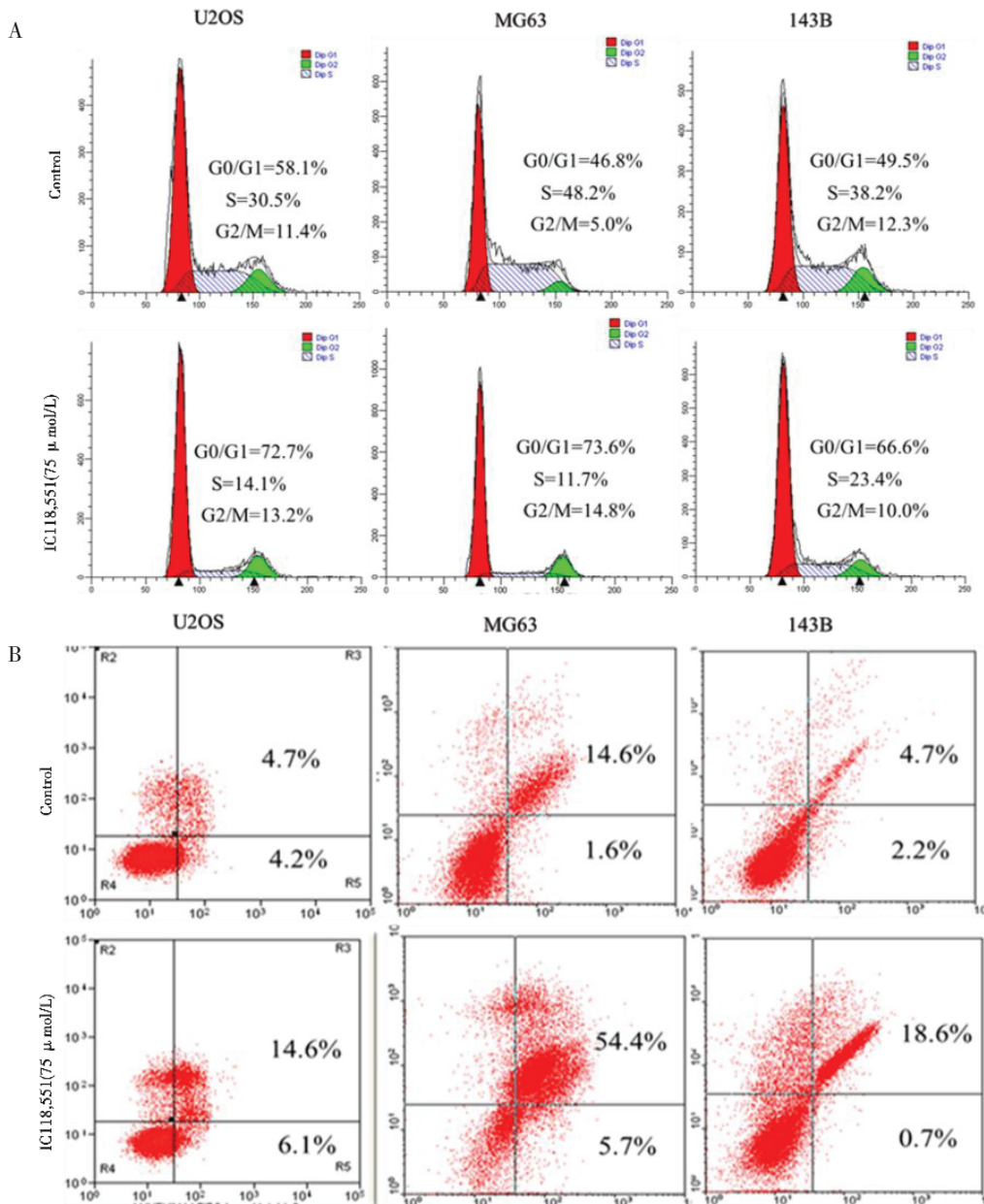
Fig.1 Anti-proliferation effect of ICI118,551 targeting  $\beta_2$ -adrenoceptor in osteosarcoma cells

瘤细胞株的生长 (图 1)。ICI118,551 对 U2OS 的 72 h  $IC_{50}$  值为 58.72  $\mu\text{mol/L}$ , 95% 置信区间为 (52.81, 65.29)  $\mu\text{mol/L}$ , 对 MG63 的 72 h  $IC_{50}$  值为 40.92  $\mu\text{mol/L}$ , 95% 置信区间为 (34.13, 49.06)  $\mu\text{mol/L}$ , 对 143B 的 72 h  $IC_{50}$  值为 33.02  $\mu\text{mol/L}$ , 95% 置信区间为 (29.94, 36.43)  $\mu\text{mol/L}$ 。因此, 靶向  $\beta_2$ -肾上腺素受体能很好地抑制骨肉瘤生长。

2.2  $\beta_2$ -肾上腺素受体抑制剂诱导骨肉瘤细胞周期阻滞与凋亡

我们采用流式检测进一步确认靶向  $\beta_2$ -肾上

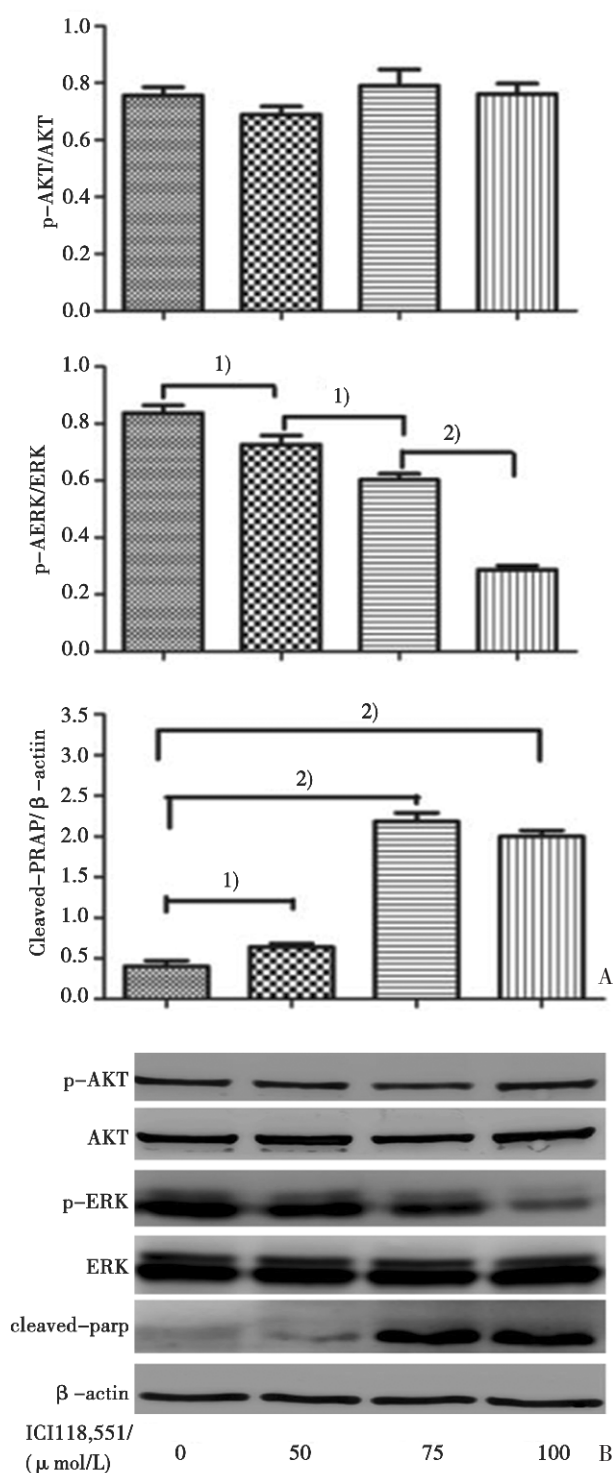
腺素受体对骨肉瘤细胞是否有生长抑制作用。人骨肉瘤细胞株 U2OS、MG63、143B 经 ICI118,551 处理株 48 h 后, 流式细胞仪检测结果表明 ICI118,551 能够增加肉瘤细胞株 U2OS、MG63、143B 的 G0/G1 期的百分比, 而 S 期的百分比则相应降低 (图 2A), 与对照组对比具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。这证明了肾上腺素受体抑制剂能使细胞周期阻滞在 G0/G1 期。同时, AnnexinV/PI 染色流式检测可见 ICI118,551 处理后与对照组对比细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ ; 图 2B)。因此, 靶向  $\beta_2$ -肾



Osteosarcoma cells U2OS, MG63, 143B were treated with ICI118,551 (75  $\mu\text{mol/L}$ ) for 48 h. A: cell cycle; B: apoptosis assay.

图 2 ICI118,551 诱导骨肉瘤细胞周期阻滞及凋亡

Fig.2 ICI118,551 induced cell cycle arrest and apoptosis in osteosarcoma cells



A: Statistical analysis of relative protein level.  $n = 4$ , 1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.01$ ; B: The levels of p-AKT, AKT, p-ERK, ERK,  $\beta$ -actin, cleaved-PARP were analyzed by Western blot.

图 3 靶向  $\beta_2$ -肾上腺素受体诱导的骨肉瘤细胞凋亡中相关信号通路的变化

Fig.3 The pathway underlying in the apoptosis induced by targeting  $\beta_2$ -adrenoceptor in osteosarcoma cells

上腺素受体能诱导骨肉瘤细胞周期阻滞与凋亡。

### 2.3 ERK 通路在介导靶向 $\beta_2$ -肾上腺素受体诱导骨肉瘤凋亡中起重要作用

研究表明刺激  $\beta_2$ -肾上腺素受体可通过 c-Src/Ras/Raf/MAPK 通路和 PI3K/Akt 通路促进胰腺癌和肺癌细胞的生长<sup>[4-5]</sup>。不同剂量  $\beta_2$ -肾上腺素受体抑制剂 ICI118,551 处理 U2OS 48 h 后, western blot 检测发现 p-AKT 蛋白水平随 ICI118,551 剂量升高而变化不明显, 相反的 p-ERK 蛋白水平随 ICI118,551 剂量升高而逐渐下调, 同时凋亡标志物 cleave-PARP 也逐渐升高(图 3)。这些结果表明在骨肉瘤中, PI3K/Akt 通路并不是介导靶向  $\beta_2$ -肾上腺素受体促进骨肉瘤细胞凋亡的分子机制, 而可能是通过 ERK1/2 通路。因此, ERK 通路在介导靶向  $\beta_2$ -肾上腺素受体诱导骨肉瘤凋亡中起重要作用。

## 3 讨论

$\beta_2$ -肾上腺素受体是 G 蛋白偶联受体家族的一员, 可调节肿瘤的增殖且参与肿瘤的发生发展<sup>[8]</sup>。研究发现  $\beta_2$ -肾上腺素受体阻断剂可减缓乳腺癌的发展, 降低乳腺癌患者的死亡率<sup>[9]</sup>。在胰腺癌中  $\beta_2$ -肾上腺素受体阻断剂还可促进肿瘤细胞的周期阻滞与凋亡<sup>[10]</sup>。另外, 普萘洛尔在成神经细胞瘤中起抗肿瘤作用<sup>[11]</sup>。因此,  $\beta_2$ -肾上腺素受体极有可能作为药物治疗肿瘤的新靶点。

本研究中我们发现, 靶向  $\beta_2$ -肾上腺素受体对 U2OS、143B、MG63 四株人骨肉瘤细胞系均具有显著的生长抑制作用。此外, 流式细胞仪检测证实 ICI118,551 能够增加肉瘤细胞株 U2OS、MG63、143B 的 G0/G1 期的百分比, 降低 S 期的百分比, 同时, AnnexinV/PI 染色流式检测出 ICI118,551 处理后细胞凋亡率升高。这表明靶向  $\beta_2$ -肾上腺素受体可以诱导骨肉瘤细胞周期阻滞和凋亡。

$\beta_2$ -肾上腺素受体通过激活 cAMP/PKA 及其下通路介导细胞增殖, 活化的 PKA 可调节核转录因子如 CREB、STAT3 以及 AKT、Src 磷酸化来介导肿瘤细胞的增殖或转移<sup>[12]</sup>。在前列腺癌中, 儿茶酚胺激活  $\beta_2$ -肾上腺素受体通过 cAMP/PKA/P-BAD 通路介导肿瘤细胞增殖<sup>[6]</sup>; 也有研究表明,  $\beta_2$ -肾上腺素受体可通过 Ras/Raf/MEK/ERK 和 PI3K/Akt 通路促进肺癌和胰腺癌的生长与分化<sup>[4-5]</sup>。然而

靶向 $\beta_2$ -肾上腺素受体抗骨肉瘤作用及其分子机制研究尚少。本研究发现,不同剂量 $\beta_2$ -肾上腺素受体抑制剂 ICI118,551 处理 U2OS 48 h 后,p-AKT 蛋白水平变化并不明显,而 p-ERK 蛋白水平随 ICI118,551 剂量升高而逐渐下调,同时凋亡标志物 cleave-PARP 也逐渐升高。ERK 通路可通过磷酸化 NF- $\kappa$ B、CREB、AP-1 调节其入核水平,从而介导肿瘤细胞的增殖或转移<sup>[12]</sup>。因此,这些结果表明 ERK 通路可能在靶向 $\beta_2$ -肾上腺素受体诱导的骨肉瘤细胞凋亡中发挥重要作用。

综上所述,本研究表明靶向 $\beta_2$ -肾上腺素受体可诱导细胞凋亡发挥抗骨肉瘤作用;其诱导凋亡作用可能是通过多条信号通路共同作用的结果,其中 ERK 信号通路可能是靶向 $\beta_2$ -肾上腺素受体诱导骨肉瘤细胞凋亡的重要分子机制之一,具体的分子机制还需进一步探索。

#### 参考文献

- [1] ISAKOFF MS, BIELACK SS, MELTZER P, et al. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(27): 3029-3035.
- [2] WARNE T, SERRANO-VEGA MJ, BAKER JG, et al. Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor[J]. *Nature*, 2008, 454(7203):486-491.
- [3] CHEN D, XING W, HONG J, et al. The beta2-adrenergic receptor is a potential prognostic biomarker for human hepatocellular carcinoma after curative resection[J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(11):3556-3565.
- [4] SCHULLER HM. Mechanisms of smoking-related lung and pancreatic adenocarcinoma development [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(6):455-463.
- [5] WEDDLE DL, TITHOFF P, WILLIAMS M, et al. Beta-adrenergic growth regulation of human cancer cell lines derived from pancreatic ductal carcinomas [J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22(3):473-479.
- [6] HASSAN S, KARPOVA Y, BAIZ D, et al. Behavioral stress accelerates prostate cancer development in mice [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(2):874-886.
- [7] 谢显彪,尹军强,贾强,等. 槲皮素诱导耐甲氨蝶呤骨肉瘤细胞系 U2-OS/MTX300 凋亡[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2011, 32(3):331-335.  
XIE XB, YIN JQ, JIA Q, et al. Quercetin induces apoptosis in methotrexate resistant osteosarcoma cell line U2-OS/MTX300 in vitro[J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2011, 32(3):331-335.
- [8] WU WK, WONG HP, LUO SW, et al. 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-b utanone from cigarette smoke stimulates colon cancer growth via beta-adrenoceptors [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(12):5272-5277.
- [9] BARRON TI, CONNOLLY RM, SHARP L, et al. Beta blockers and breast cancer mortality: a population-based study [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(19):2635-2644.
- [10] ZHANG D, MA Q, WANG Z, et al. Beta2-adrenoceptor blockage induces G1/S phase arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells via Ras/Akt/NFkappaB pathway [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10:146.
- [11] WOLTER JK, WOLTER NE, BLANCH A, et al. Anti-tumor activity of the beta-adrenergic receptor antagonist propranolol in neuroblastoma [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(1):161-172.
- [12] TANG J, LI Z, LU L, et al. Beta-Adrenergic system, a backstage manipulator regulating tumour progression and drug target in cancer therapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23(6 Pt B):533-542.

(编辑 刘清海)