

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20230410003

彭颖蓓, 陈昞升, 刘奕耘, 等. TCDD对胶质母细胞瘤中环氧化酶2基因表达的影响和生物学作用[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(4): 241-252

Peng Y B, Chen Y S, Liu Y Y, et al. Effect of TCDD on expression of cyclooxygenase-2 gene and its biological role in glioblastoma [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(4): 241-252 (in Chinese)

# TCDD对胶质母细胞瘤中环氧化酶2基因表达的影响和生物学作用

彭颖蓓<sup>1,2</sup>, 陈昞升<sup>1,\*</sup>, 刘奕耘<sup>3</sup>, 李云平<sup>4</sup>, 徐丽<sup>1</sup>, 谢群慧<sup>1</sup>, 赵斌<sup>1,2,4</sup>

1. 中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085

2. 中国科学院大学资源与环境学院, 北京 100049

3. 重庆医科大学公共卫生学院, 重庆 400030

4. 国科大杭州高等研究院环境学院, 杭州 310024

收稿日期: 2023-04-10 录用日期: 2023-05-22

**摘要:** 胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是最常见的恶性脑肿瘤,其复发率和死亡率居高不下。环氧化酶2(cyclooxygenase 2, COX2)在正常生理条件下几乎不表达,但持续高表达的COX2常见于各种恶性肿瘤和癌前状态,并参与诸多肿瘤发生发展过程,如血管生成、免疫抑制、迁移侵袭以及化疗抵抗等。二噁英类污染物作为一级致癌物,但目前有关二噁英对GBM发展的研究十分有限。本研究旨在探究二噁英暴露影响GBM发展的分子机制。以COX2为标志物,明确二噁英类污染物中毒性最强的2,3,7,8-二苯并-p-二噁英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD)对胶质母细胞瘤U87细胞中COX2基因表达的影响以及芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)在之中的作用,并借助转录组测序进一步探究TCDD暴露后U87细胞中COX2参与的生物过程。实验结果显示,TCDD以AhR依赖的方式上调U87细胞中COX2基因表达并具有时间-剂量依赖效应。转录组分析结果表明,TCDD暴露显著改变了U87细胞中细胞黏附、胞外刺激检测以及膜转运等相关通路的基因表达,COX2可能通过影响脂质形成和维持炎症反应参与U87的改变。进一步的互作分析发现COX2基因与IL1B和CYP2E1相关。本研究补充了TCDD在U87细胞中上调COX2表达的可能机制和影响,并为今后对二噁英促癌作用的研究提供参考。

**关键词:** 二噁英;胶质母细胞瘤 U87 细胞;环氧化酶2(COX2);转录组分析;芳香烃受体

文章编号: 1673-5897(2023)4-241-12 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Effect of TCDD on Expression of Cyclooxygenase-2 Gene and Its Biological Role in Glioblastoma

Peng Yingbei<sup>1,2</sup>, Chen Yangsheng<sup>1,\*</sup>, Liu Yiyun<sup>3</sup>, Li Yunping<sup>4</sup>, Xu Li<sup>1</sup>, Xie Qunhui<sup>1</sup>, Zhao Bin<sup>1,2,4</sup>

1. State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

2. College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3. College of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400030, China

4. School of Environment, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, China

Received 10 April 2023 accepted 22 May 2023

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(22206202);国家自然科学基金重点项目(21836004);国家重点研发计划项目(2018YFA0901100)

第一作者: 彭颖蓓(1998—),女,硕士研究生,研究方向为环境毒理学, E-mail: ybpeng\_st@rcees.ac.cn

\* 通信作者( Corresponding author), E-mail: yschen@rcees.ac.cn

**Abstract:** Glioblastoma (GBM) is the most common malignant brain tumor which has high recurrence and mortality rate. Cyclooxygenase 2 (COX2) is not expressed under normal physiological conditions, but the continuously high expression of COX2 is common in various malignant tumors and precancerous states. COX2 is involved in many tumors' physiological activities, such as angiogenesis, immunosuppression, migration invasion, and chemotherapy resistance. As primary carcinogen, the research about dioxin on glioblastoma occurrence and development is very limited. This study is aimed to investigate the effect and mechanism of dioxin on the expression of *COX2* gene and its subsequent effects on glioblastoma. We investigated the effect of dioxin on *COX2* gene expression in glioblastoma U87 cells and the role of aryl hydrocarbon receptor (AhR). Through *in vitro* cell experiments, the most toxic dioxin, 2,3,7,8-dibenzo-p-dioxin (TCDD), was used as a representative pollutant to explore whether dioxin can change the expression of *COX2* gene through the classical AhR pathway in U87 cell. Finally, transcriptome sequencing was used to further explore the biological role of *COX2* in U87 cells after TCDD treatment. The experimental results showed that TCDD could upregulate the expression of *COX2* gene in U87 cells in an AhR-dependent manner and had significant time-dependent and dose-dependent effects. The results of transcriptome analysis showed that TCDD exposure significantly altered cell adhesion, extracellular stimulation detection, and membrane transport pathways in U87 cells, and *COX2* perhaps participate in the change of U87 by affecting lipid formation and maintaining inflammatory response. Through further interaction analysis, we found that *COX2* gene was associated with *IL1B* and *CYP2E1*. This study supplements the possible mechanism and influence of TCDD upregulating *COX2* expression in U87 cells, and provides more details for future researches on the cancer promoting effect of dioxins.

**Keywords:** dioxin (TCDD); glioblastoma (U87 cell); cyclooxygenase 2 (COX2); transcriptome analysis; aryl hydrocarbon receptor (AhR)

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是恶性程度最高的脑肿瘤<sup>[1]</sup>,占成人恶性原发脑肿瘤的70%,是最常见的恶性脑肿瘤<sup>[2]</sup>。GBM起源于脑或脊髓中的神经元或星形胶质细胞,患者癌症进程进展迅速,中位总生存期仅为16~21个月<sup>[3]</sup>,其标准治疗手段一般包括手术切除和放化疗,然而由于GBM的弥漫性,无法通过手术切除全部的病灶,导致以现有手段无法治愈,GBM的复发率和死亡率居高不下。环氧合酶2(cyclooxygenase 2, COX2)能催化花生四烯酸(arachidonic acid, AA)转化为前列腺素(prostaglandin, PG),其编码基因为 *PTGS2*。COX2在正常生理条件下几乎不表达,但在组织器官受损后被显著上调,参与炎症反应并通过诱导上皮间充质转化增强细胞存活以促进组织再生<sup>[4]</sup>。持续高表达的COX2常见于各种恶性肿瘤和癌前状态,如GBM<sup>[5]</sup>、乳腺癌<sup>[6]</sup>和宫颈癌症<sup>[7]</sup>等,并参与诸多肿瘤生理活动,如血管生成、免疫抑制、迁移侵袭以及化疗抵抗等<sup>[8-10]</sup>。

芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)通路是介导二噁英化合物毒性作用的经典路径<sup>[11]</sup>,在生殖、心血管和免疫等发育和功能作用中扮演着至关重要的角色<sup>[12]</sup>。二噁英以配体的形式与AhR结

合后,能够显著上调以 *CYP1A1* 和 *CYP1B1* 为代表的P450酶家族,并影响诸多基因的转录表达进而导致机体各种生理功能紊乱。AhR参与COX2表达调控已在多种肿瘤中被证实,但AhR与COX2之间的关系仍存在争议。在GBM中,COX2能通过催化生成前列腺素E2(PGE2)促进肿瘤中AhR内源性激动剂表达上调,进而促进肿瘤免疫逃逸<sup>[13]</sup>。而在食管鳞状细胞癌中,AhR激动剂3,3'-二吡啶甲烷(3,3'-diindolylmethane, DIM)能够降低COX2/PGE2表达,最终逆转癌细胞上皮间充质转化,减缓癌症进程<sup>[14]</sup>;在乳腺癌中,AhR激活降低了细胞凋亡标志蛋白(B-cell lymphoma 2, BCL2)、COX2和干细胞标志蛋白SRY盒转录因子4(SRY-box transcription factor 4, SOX4)的表达水平,并选择性地增加了肿瘤抑制基因 *P53* 的表达,促进癌细胞凋亡,在体内外实验中均能抑制乳腺癌细胞增殖<sup>[15]</sup>。

大量研究流行病学数据和体内外实验证明二噁英参与多种肿瘤的发生发展<sup>[16-19]</sup>。越战退伍军人总癌症发病率相较一般人群显著增加,在500多名女性越战退伍军人中生殖相关肿瘤发病率最高,所有退伍军人中枢神经系统癌变风险极高<sup>[20]</sup>。二噁英能

够扰乱生物体内分泌系统的正常工作,进而引起神经系统发育异常、机体代谢紊乱,促进癌症的发生发展<sup>[21]</sup>。二噁英类污染物具有神经毒性。研究表明,父母职业接触农药或住宅接触农药与儿童脑肿瘤发生之间存在关联<sup>[22]</sup>;2,3,7,8-二苯并-p-二噁英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD)暴露会导致机体神经系统发育异常,且 TCDD 可以通过 AhR 破坏神经内分泌系统的功能结构,影响脊椎动物神经系统中神经元以及胶质细胞的增殖、分化和存活<sup>[23]</sup>。二噁英经典毒性作用靶点 AhR 在 GBM 中过表达,并随胶质瘤恶性程度升高表达增加<sup>[24]</sup>。在 GBM 中,内源性的犬尿氨酸(kynurenine, Kyn)能通过激活 AhR 进而促进肿瘤增殖、维持肿瘤干细胞的干性以及促进免疫抑制微环境形成,色氨酸-2,3-双加氧酶(tryptophan-2,3-dioxygenase, TDO)和 AhR 调节基因的表达与 GBM 的恶性进展和低生存率有关<sup>[25]</sup>。二噁英能以 AhR 依赖的方式诱导 COX2 在多种组织中表达,如成纤维细胞<sup>[26]</sup>、子宫内膜细胞<sup>[27]</sup>、造血干细胞<sup>[28]</sup>以及人肺癌细胞<sup>[29]</sup>,但关于二噁英化合物与 GBM 发生发展之间的关系有待进一步探究。

本研究旨在探究二噁英能否通过引起胶质母细胞瘤 U87 细胞中 COX2 的改变进而促进肿瘤发展。通过体外细胞实验,以毒性最强的二噁英 2,3,7,8-TCDD 为代表性污染物,明确二噁英污染物能否通过经典的 AhR 通路在 U87 细胞中引起下游 COX2 基因表达量的变化;通过转录组测序进一步分析 COX2 在 TCDD 暴露后 U87 细胞中经历的生理活动转变。本研究有助于扩展对二噁英在 GBM 发展过程影响机制上的认识,明晰 AhR 在这一过程中的作用和挖掘未知的下游功能基因,并为今后二噁英促癌作用的相关研究提供一些参考,也为以 AhR 为靶点开发的新型抗肿瘤药物提供数据支持。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 材料

人胶质母细胞瘤细胞系 U87 购自中国医学科学院细胞资源中心。DMEM 培养基、0.25% 胰酶、青霉素/链霉素、胎牛血清均购自 Gibco 公司;二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO;纯度 99.9%)购自 Sigma 公司,2,3,7,8-二苯并-p-二噁英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD;纯度 99.9%)购自 Wellington 公司。荧光定量 PCR 仪(4485694, Life, USA),PCR 仪(T100TM, BIO-RAD, USA)。

### 1.2 细胞培养和传代

使用 DMEM 空白培养基混合 10% 胎牛血清、100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素和 100 μg·mL<sup>-1</sup>的链霉素配制为全培养基培养 U87 细胞。2 种细胞均培养在 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 37 °C 恒温培养箱中。当细胞生长至 80% ~ 90% 时,使用 0.25% 的胰酶消化,按 1:3 传代。

### 1.3 AhR 干扰 RNA 转染

干扰 RNA 转染实验按照 RNAiMAX Transfection Reagent(Invitrogen)说明书进行。首先接种 5 × 10<sup>5</sup> 个细胞于 6 孔板中,培养 24 h 后,待细胞覆盖 6 孔板底面 80% 时进行转染。配制转染试剂时,先使用无血清 Opti-MEM 培养基分别稀释试剂 Lipofectamine RNAiMAX 和 AhR siRNA,之后两液体按 1:1 的比例涡旋混合至均匀。混合后的溶剂室温放置 5 min 后,6 孔板的每孔加入 250 μL 干扰试剂,使得孔中干扰 RNA 含量为 50 pmol,培养箱中孵育 24 h 后进行后续实验。正式实验前需对干扰 RNA 的干扰效率进行检测,通过检测目标基因的表达水平计算干扰效率。本实验中的 siRNA 序列如表 1 所示。

表 1 AhR siRNA 序列

基因 Gene	干扰 RNA 序列 siRNA sequence
阴性对照(NC)	5'-UUCUCCGAACGUGUCACCU-3'
Negative control (NC)	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'
AhR	5'-AGGGAAAGAUGGAUCAAUATT-3'
	5'-UAUUGAUCCAUCUUUCCCU-3'

### 1.4 总 RNA 提取与 cDNA 合成

RNA 提取采用纯化柱法, GeneJETRNA (Thermo) 纯化试剂盒被用于提取细胞内总 RNA。RevertiAid First Strand cDNA Synthesis(Thermo)试剂盒被用于进行逆转录实验。使用 NanoDrop 2000/2000c 分光光度计检测提取的 RNA 质量和浓度。之后使用无菌水将所有样品配制成总 RNA 量为 2 000 ng 的 RNA 溶液,用于后续 cDNA 合成。首先混匀 11 μL 稀释后的 RNA 溶液、0.5 μL Oligo(dT)18 和 0.5 μL Random Primer, 配制总体积为 12 μL 的 Mix1, 待其在 PCR 仪 65 °C 加热 5 min 后取出,再向每样品中加入 4 μL Reaction Buffer (5 ×)、2 μL dNTP Mix、1 μL RI 和 1 μL RT, 涡旋混匀后再次放入 PCR 仪中,按如下程序进行反转录:25 °C 孵育 5

min, 42 °C 加热 1 h, 70 °C 加热 5 min, 4 °C 冷却。-30 °C 冰箱储存 cDNA 样品。

### 1.5 实时荧光定量 PCR 检测目标基因表达量

反转 RNA 合成 cDNA 后, 荧光定量 PCR 实验用于检测 *AhR*、*CYP1A1*、*CYP1B1* 和 *PTGS2* 的表达量。qPCR 仪中热循环条件为: 95 °C 加热 2 min, 95 °C 解旋 15 s, 60 °C 下 20 s 退火, 72 °C 延伸 20 s, 变性循环共 40 次。最终表达量通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值法进行计算分析。实验中, *GAPDH* 表达恒定, 被选定为内参基因, 每个样品设置 3 个平行复孔。以上基因的引物序列均基于 GenBank 网站中的 Primer-BLAST 功能设计而得, 正式实验前所有引物均已进行过引物验证, 效率在 0.9 ~ 1.1 之间。所有引物由生工生物科技公司(北京)合成, 具体序列见表 2。

### 1.6 转录组测序分析

TCDD 处理 U87 细胞 48 h 后, 根据说明书使用 GeneJET RNA(Thermo) 纯化试剂盒提取总 mRNA, 在验证完整性和纯度后, 将总 mRNA 随机断裂成约 200 bp 的片段, 并将 RNA 转录成双链 DNA。通过 Illumina NovaSeq 6000 探测产生的 DNA 产物序列。为了确定 2 个不同样本之间的差异表达基因(different expressed genes, DEGs), 根据每百万次读取的转录本方法计算每个转录本的表达水平,  $FC > 1.5$ 、 $P < 0.05$  的基因被定义为 DEGs。使用 DAVID 平台(<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)对筛选出的 DEGs 进行 KEGG 和 GO 富集分析, 分析结果中  $P < 0.05$  的通路被认为具有显著性。使用 Origin 2021 (Northampton, MA, USA) 进行绘图。使用 STRING 11.5 在线平台(<https://cn.string-db.org/>)进行蛋白相互作用分析。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

基因 Gene	引物序列 Primer sequences
<i>GAPDH</i>	(F) 5' -ATGACCCCTTCATTGACC-3'
	(R) 5' -GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
<i>AhR</i>	(F) 5' -CTGAAGTCAACCTCACCAGAAAAAT-3'
	(R) 5' -AAAAACAGTGACTTGTACAGCATAATGA-3'
<i>COX2</i> ( <i>PTGS2</i> )	(F) 5' -GCTAGACAGCGTAAACTGCG-3'
	(R) 5' -CATCATCAGACCAGGCACCA-3'
<i>CYP1B1</i>	(F) 5' -GGCCGGTACGTTCTCCAAATC-3'
	(R) 5' -AACGTCATGAGTGCCGTGTGT-3'
<i>CYP1A1</i>	(F) 5' -GGGTTGACCCATAGCTTCTG-3'
	(R) 5' -TCCTGGAGACCTCCGACAC-3'

### 1.7 数据统计与分析

实验结果的数据统计与分析通过 GraphPad prism(v.7, La Jolla, CA, USA) 软件进行, 数值结果以平均值±标准误( $n=3$ )显示, 每次独立实验设置 3 次平行。最后采用单因素或双因素方差分析(ANOVA)和 Bonferroni 检验进行统计检验。 $P < 0.05$  被认为具有统计学意义, \* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 为  $P < 0.01$ , \*\*\* 为  $P < 0.001$ 。

## 2 结果 (Results)

### 2.1 TCDD 诱导 U87 细胞中 *COX2* 表达上调

首先, 探究了 TCDD 在 U87 细胞中对 *COX2* 基因表达的影响及时间剂量效应关系。在 U87 中,  $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TCDD 处理 24 h 后 *COX2* 基因表达量发生了明显变化, 其表达水平升高约 6 倍, 在处理 48 h 后, *COX2* 的表达量增加至 40 多倍(图 1(a)), 说明 TCDD 诱导 *COX2* 基因表达上调的作用具有时间依赖性;  $10^{-13} \sim 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TCDD 处理 U87 细胞 48 h 后, *COX2* 基因表达量随着 TCDD 浓度升高而升高, 具有明显的剂量依赖效应, 在  $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TCDD 处理后, U87 中 *COX2* 的表达量上调 2 倍左右, 具有统计学意义(图 1(b))。

### 2.2 AhR 信号通路介导了 TCDD 对 *COX2* 基因表达的上调作用

分析了  $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TCDD 处理 U87 细胞后, 12、24、48 h 处 U87 细胞中 *AhR* 基因和 AhR 通路下游 *CYP1A1*、*CYP1B1* 基因的表达情况。在 U87 中, *AhR* 的表达量在 TCDD 处理后不同时间点处略有降低但未发生显著性变化(图 2(a)), 而 *CYP1A1* 与 *CYP1B1* 的表达量在 3 个时间点下均急剧升高, 在 TCDD 处理 24 h 后, *CYP1B1* 增至 10 倍左右, *CYP1A1* 表达变化幅度更大, 激增约 50 倍, 且 2 个基因的表达量均随 TCDD 处理时间延长持续升高(图 2(b)和 2(c))。在系列浓度 TCDD 处理下, U87 细胞中 *CYP1A1* 与 *CYP1B1* 的表达均显著上调, 且 *CYP1A1* 上调倍数同样高于 *CYP1B1*。当  $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TCDD 处理 U87 细胞后, *CYP1A1* 上调 3 倍左右, 相对 *CYP1B1* 对 TCDD 刺激的响应更显著(图 2(d))。

为进一步探究 AhR 通路在 TCDD 对 *COX2* 基因表达调控中的作用, 使用 AhR siRNA 处理 U87 细胞, 观察 *AhR* 基因表达沉默后, TCDD 对 *AhR*、*CYP1A1*、*CYP1B1* 和 *COX2*(*PTGS2*) 基因的表达影响。并检测了  $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TCDD

处理后 *AhR* 和 *CYP1A1* 的表达量。结果显示,使用 *AhR* siRNA 沉默 *AhR* 基因表达后, *AhR* 基因表达下调约 50%(图 3(a))。同时,与 NC 组相比, *AhR* 通路被显著抑制,TCDD 对 *CYP1A1* 的表达上调作用在 *AhR* 沉默后被大幅抑制,尤其是在  $10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TCDD 暴露条件下由 60 倍降低至 20 倍(图 3(b))。 *AhR* 沉默后, *COX2* 的表达与对照组没有明显变化,

但是,TCDD 对 *COX2* 的表达上调作用受到显著抑制(图 3(c))。在 NC 组内 TCDD 处理显著上调了 *COX2* 的表达,但在 *AhR* siRNA 处理组中,虽然 TCDD 处理后, *COX2* 表达仅略有增加,并没有显著差异。同时,与 NC 组相比, *AhR* siRNA 处理组中  $10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TCDD 使得 *COX2* 基因的表达分别降低 2 倍和 4 倍,均被显著下调。

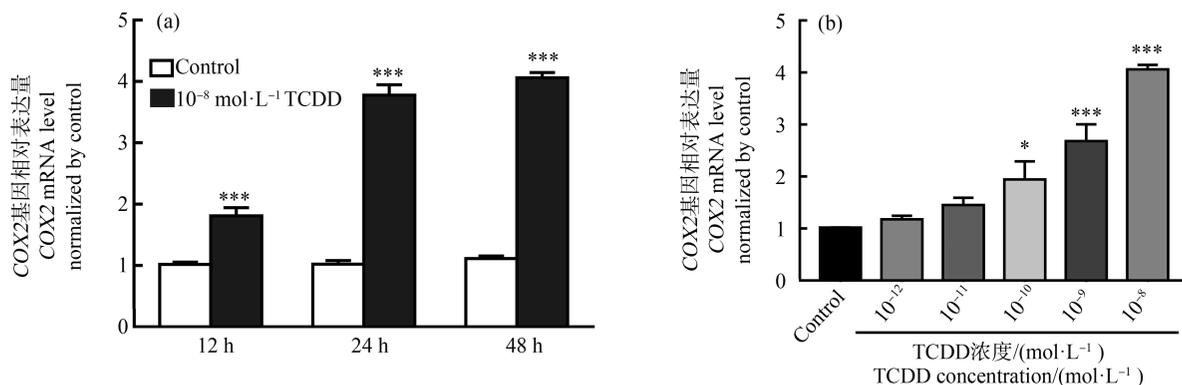


图 1 TCDD 诱导 U87 细胞中 *COX2* 表达的时间和剂量效应

注:(a)  $10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TCDD 处理 U87 细胞 12,24,48 h 后 *COX2* (*PTGS2*)表达量变化的时间效应;(b)  $10^{-13} \sim 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TCDD 处理 U87 细胞 48 h 后 *COX2* (*PTGS2*)表达量变化的剂量效应;与对照组相比,\*  $P<0.05$ ,\*\*\*  $P<0.001$ 。

Fig. 1 The dose effect and time effect of TCDD inducing *COX2* expression in U87 cells

Note: (a) Time effect of *COX2* (*PTGS2*) expression in U87 cells treated with  $10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TCDD for 12, 24 and 48 h; (b) Dose effect of *COX2* (*PTGS2*) expression after  $10^{-13} \sim 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TCDD treatment of U87 cells for 48 h; compared with the control, \* indicates  $P<0.05$ , and \*\*\* indicates  $P<0.001$ .

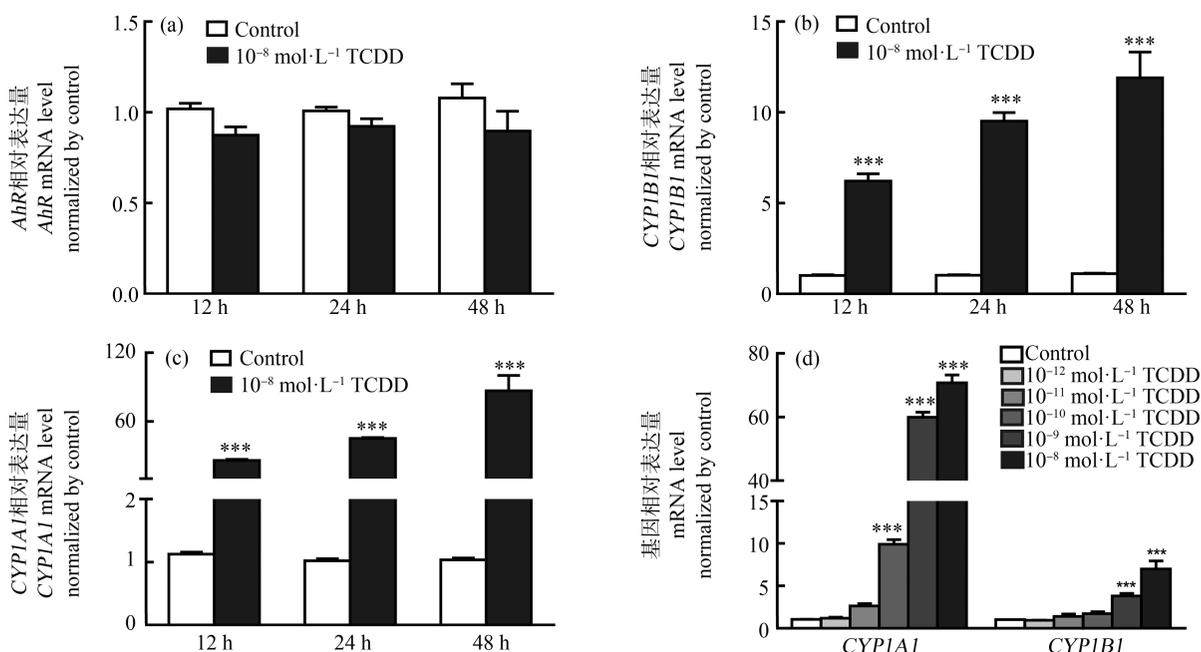


图 2 TCDD 处理对 U87 细胞中 *AhR* 信号通路的激活情况

注:(a),(b),(c)  $10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TCDD 处理 U87 细胞 12,24,48 h 后 *AhR* (a),*CYP1B1* (b)和 *CYP1A1* (c)的变化情况;(d) 在 U87 细胞中,  $10^{-12} \sim 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TCDD 处理 48 h 后 *AhR* 下游标志基因 *CYP1A1* 和 *CYP1B1* 的表达变化情况;与对照组相比,\*\*\*  $P<0.001$ 。

Fig. 2 The activation of AhR pathway in U87 cells

Note: (a), (b), (c) The expression change of *AhR* (a), *CYP1B1* (b) and *CYP1A1* (c) in U87 cells after  $10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TCDD treatment for 12, 24, 48 h; (d) The expression of *CYP1A1* and *CYP1B1* in U87 cells after  $10^{-12} \sim 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TCDD treatment for 48 h; compared with the control, \*\*\* indicates  $P<0.001$ .

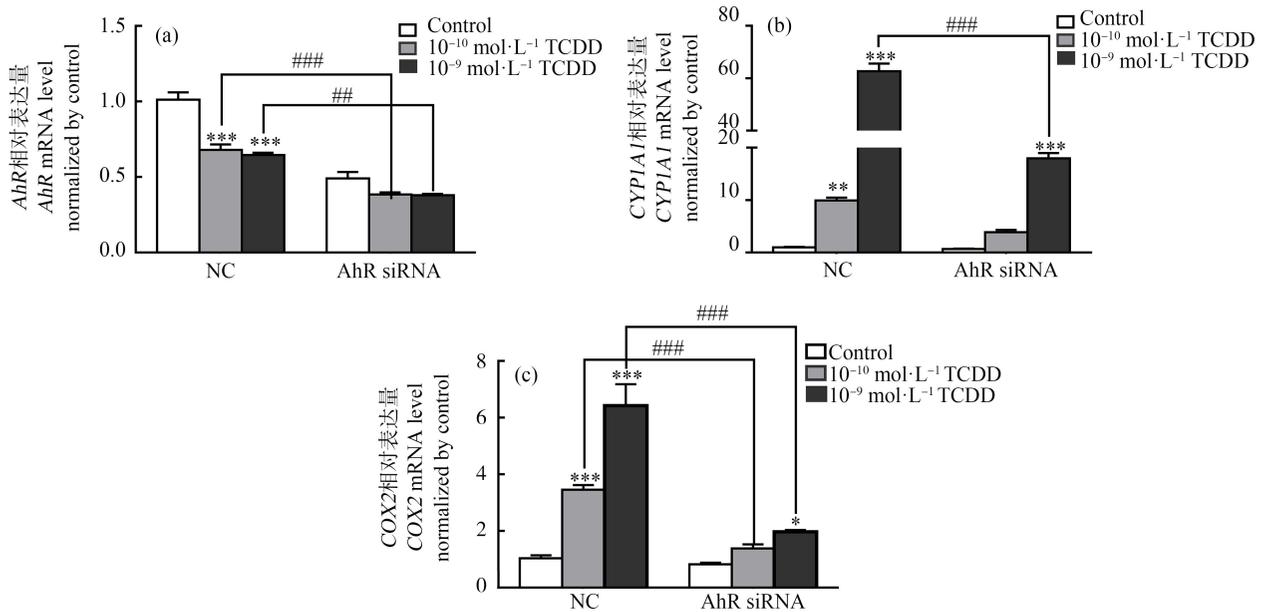


图 3 AhR siRNA 处理 U87 细胞后 *AhR*、*CYP1A1* 和 *COX2* (*PTGS2*) 的变化情况

注:(a),(b) AhR siRNA 干扰后 U87 细胞以及  $10^{-10}$  mol·L<sup>-1</sup> 和  $10^{-9}$  mol·L<sup>-1</sup> TCDD 处理后, *AhR* (a) 和 *CYP1A1* (b) 的表达情况;  
(c)  $10^{-9}$  mol·L<sup>-1</sup> 和  $10^{-10}$  mol·L<sup>-1</sup> TCDD 处理 U87 细胞后 *COX2* (*PTGS2*) 表达量的变化; \* 表示与对照组相比具有显著性 (\*  $P<0.05$ 、\*\*  $P<0.01$ 、\*\*\*  $P<0.001$ ), # 表示与 NC 组相比变化显著 (##  $P<0.01$ 、###  $P<0.001$ 、####  $P<0.0001$ )。

Fig. 3 Changes of *AhR*, *CYP1A1*, *COX2* (*PTGS2*) after treatment of U87 cells with AhR siRNA

Note: (a), (b) The expression of *AhR* (a) and *CYP1A1* (b) in U87 cells after  $10^{-10}$  mol·L<sup>-1</sup> and  $10^{-9}$  mol·L<sup>-1</sup> TCDD treatment;  
(c) Changes in the expression of *COX2* (*PTGS2*) in U87 cells treated with  $10^{-9}$  mol·L<sup>-1</sup> and  $10^{-10}$  mol·L<sup>-1</sup> TCDD; \* indicates significant changes compared to the control group (\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ ), while # indicates significant changes compared to the NC group (##  $P<0.01$ , ###  $P<0.001$ , ####  $P<0.0001$ ).

## 2.3 TCDD 暴露后 U87 细胞的基因表达谱发生变化

### 2.3.1 TCDD 暴露改变 U87 细胞中的细胞黏附和膜转运活动

为进一步探究 *COX2* 表达升高的生物学意义, 选择了 TCDD 处理 U87 细胞后 *COX2* 基因表达升高具有显著性的最小浓度  $10^{-10}$  mol·L<sup>-1</sup> TCDD 作为暴露浓度, 在暴露 U87 细胞 48 h 后进行了转录组分析。共筛选出 824 个 DEGs (fold change > 1.5,  $P < 0.05$ ), 其中包括上调基因 187 个, 下调基因 637 个, 转录组中所有基因的火山图如图 4(a) 所示。之后对筛选出的 DEGs 进行了 KEGG 和 GO 分析, 结果如图 4 所示。KEGG 通路富集分析显示, TCDD 处理后, 细胞通讯、细胞黏附和免疫相关通路更为活跃, 尤其是细胞间相互作用相关通路, 此外 NF- $\kappa$ B 通路也被激活(图 4(b)); GO 生物功能分析注释表现出与 KEGG 相似的结果, 最显著的几条富集通路显示细胞黏附、胞外刺激检测以及膜转运等功能活跃(图 4(c))。

### 2.3.2 *COX2* 主要参与脂质形成和炎症响应

转录组分析结果与上文的细胞学实验结果一致, *COX2* 的表达量在 TCDD 处理后相比对照组上

调 2.3 倍。GO 富集分析中 *COX2* 相关的且具有显著性的通路共有 19 条(图 5)。其中, 多肽酶活负向调节通路的显著性最高, 炎症反应调节相关通路涉及最多的基因, 总体而言 *COX2* 主要参与脂质形成和炎症响应相关通路。

### 2.3.3 *COX2* 的潜在调控分子机制

为进一步了解 *COX2* 影响 U87 细胞生理活动的作用机制, 利用 DEGs 进行蛋白相互作用分析, 并通过聚类筛选出 40 个与 *COX2* 相关的 DEGs, 其相互作用关系如图 6 所示, 线条颜色深浅代表了两分子间联系的密切程度。其中 *IL1B* 处于网络中心, 且 *IL1B*、*CYP2E1*、*PTGER3*、*KNG1* 和 *CXCL12* 与 *COX2* 相关, 尤其是 *IL1B* 和 *CYP2E1*。*IL1B* 由免疫细胞、成纤维细胞或肿瘤细胞等多种细胞产生分泌, 在正常情况下通过结合 *IL1R* 促进炎症发生参与先天免疫活动, 在肿瘤微环境中其表达增加可促进癌细胞增殖、新血管生成或肿瘤浸润免疫细胞<sup>[30]</sup>, TCDD 处理后表达量增长约 2.2 倍; *CYP2E1* 属于 P450 酶超家族, 在肝脏中高表达, 主要负责体内酒精、药物和环境毒素的代谢<sup>[31]</sup>, TCDD 处理后增长约 2.9 倍。

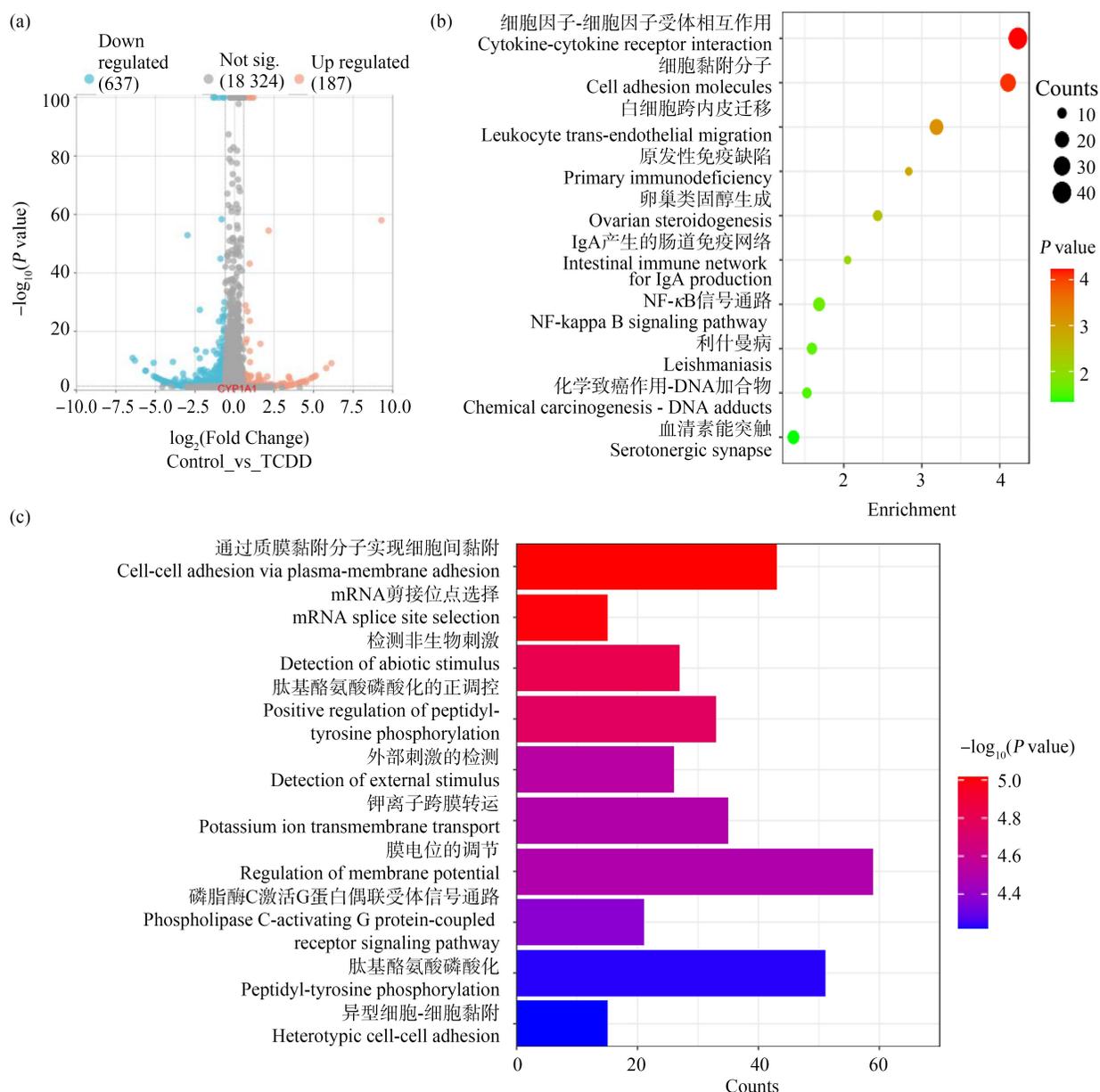


图 4 转录组差异表达基因的火山图、KEGG 和 GO 分析

注:(a) 转录组中差异表达基因火山图;  $10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TCDD 处理后 U87 细胞中总体差异表达基因的 KEGG 富集通路(b)和 GO 分析(c)。

Fig. 4 KEGG and GO enrichment analysis of differentially expressed genes

Note: (a) Volcano map of differentially expressed genes in transcriptome; KEGG (b) and GO (c) enrichment analysis of total differentially expressed genes in U87 cells after treating with  $10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TCDD.

因此, *COX2* 可能通过与 *IL1B* 和 *CYP2E1* 的相互作用影响 U87 细胞的脂质代谢过程并维持肿瘤内部炎症反应进而影响其免疫活动。

### 3 讨论 (Discussion)

为探究二噁英污染物在 GBM 中能否诱导 *COX2* 表达, 本研究以 TCDD 为代表性二噁英化合物、U87 细胞为细胞模型进行体外实验。实验数据

显示, TCDD 诱导 *COX2* 基因表达上调的作用具有显著的时间依赖性和剂量依赖效应; *AhR* 在 U87 细胞中被 TCDD 显著激活, *AhR* 下游基因 *CYP1A1* 相较 *CYP1B1* 响应更强。AhR siRNA 干扰 AhR 表达后 AhR 通路被大幅抑制, 尤其是在高浓度 TCDD 刺激时抑制作用更明显, 同时 *COX2* 基因的表达量在 TCDD 处理后相较 NC 组同样被显著下调。之后为进一步探究 *COX2* 表达上调的生理学意义, 对  $10^{-10}$

$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TCDD 处理 48 h 后的 U87 细胞进行了转录组分析,DEGs 的 KEGG 和 GO 富集分析结果显示,TCDD 处理后,U87 细胞中细胞黏附、胞外刺激检测以及膜转运等功能活跃,此外 *COX2* 的上游 *NF- $\kappa$ B* 通路也被激活。进一步分析 *COX2* 参与的 GO 富集分析中显著的通路,发现 *COX2* 主要参与脂质形成和炎症响应等活动。最后,蛋白相互作用分析发现 *IL1B*、*CYP2E1*、*PTGER3*、*KNG1* 和 *CXCL12* 与 *COX2* 相关,尤其是 *IL1B* 和 *CYP2E1*,说明 *COX2* 可能通过 *IL1B* 和 *CYP2E1* 影响 U87 细胞的炎症响应和脂质代谢过程(图 7)。

前人研究显示  $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TCDD 处理 U87 细胞后,*AhR* 表达水平相比对照组显著降低<sup>[9]</sup>,这与本文图 3(a)中 NC 组 TCDD 处理后 *AhR* 表达水平相对对照组显著降低的现象相符。*AhR* 结合配体后会与 *AhR* 核转位子相结合并转位入核启动下游基因转录,之后 *AhR*-配体复合物被转运到细胞质

通过泛素/蛋白酶体系统被迅速降解,导致胞内 *AhR* 存在水平下降<sup>[2]</sup>。虽然 TCDD 刺激后 *AhR* 的存在水平有所降低,但胞内 *AhR* 处于动态平衡,刺激后 *AhR* 表达总量增高,导致胞内 *AhR* 通路活性很高。

许多研究发现 *AhR* 在 GBM 的发展中起到重要作用,但不同配体激活 *AhR* 导致的下游效应不尽相同。犬尿氨酸能以自分泌的方式激活 GBM 细胞内的 *AhR*,促进细胞增殖、上调整合素表达,进而增强肿瘤侵袭性;*AhR* 能促进胶质瘤细胞分泌炎症因子 *IL6* 并上调 *IDO* 表达;*AhR* 还能驱动 *CD39* 表达,通过 *CD39* 与 *CD73* 的相互作用生成免疫抑制性腺苷,以招募巨噬细胞,影响肿瘤生长<sup>[3]</sup>。GBM 中 *AhR* 的激活还被发现与细胞迁移能力相关:Liu 等<sup>[9]</sup>发现 *AhR* 过表达能增加 U87 细胞的迁移能力,相反,敲低 *AhR* 会抑制肿瘤细胞迁移,但在 *AhR* 激动剂 6-甲酰基[3,2-*b*]咪唑(6-formyl[3,2-*b*]carbazole, FICZ)和 TCDD 激活下,U87 细胞通过 *AhR* 上调肿

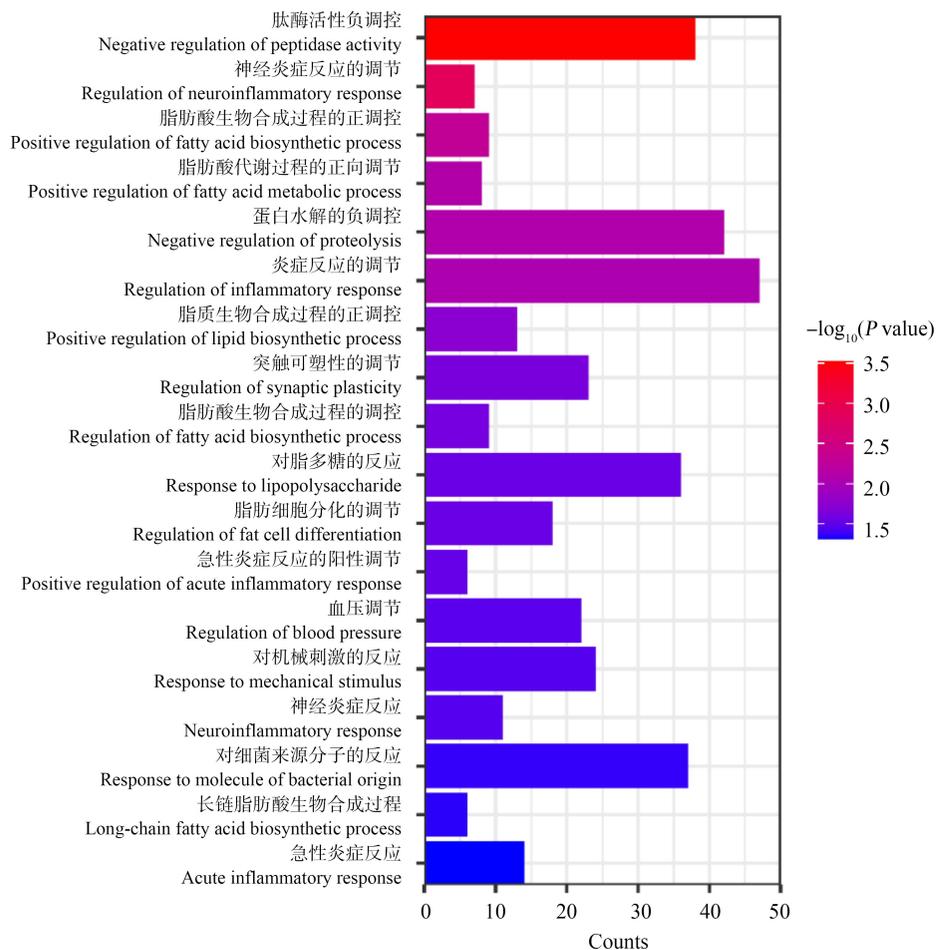


图 5 GO 分析中 *COX2* 参与通路

Fig. 5 Significant pathways involved in GO enrichment analysis

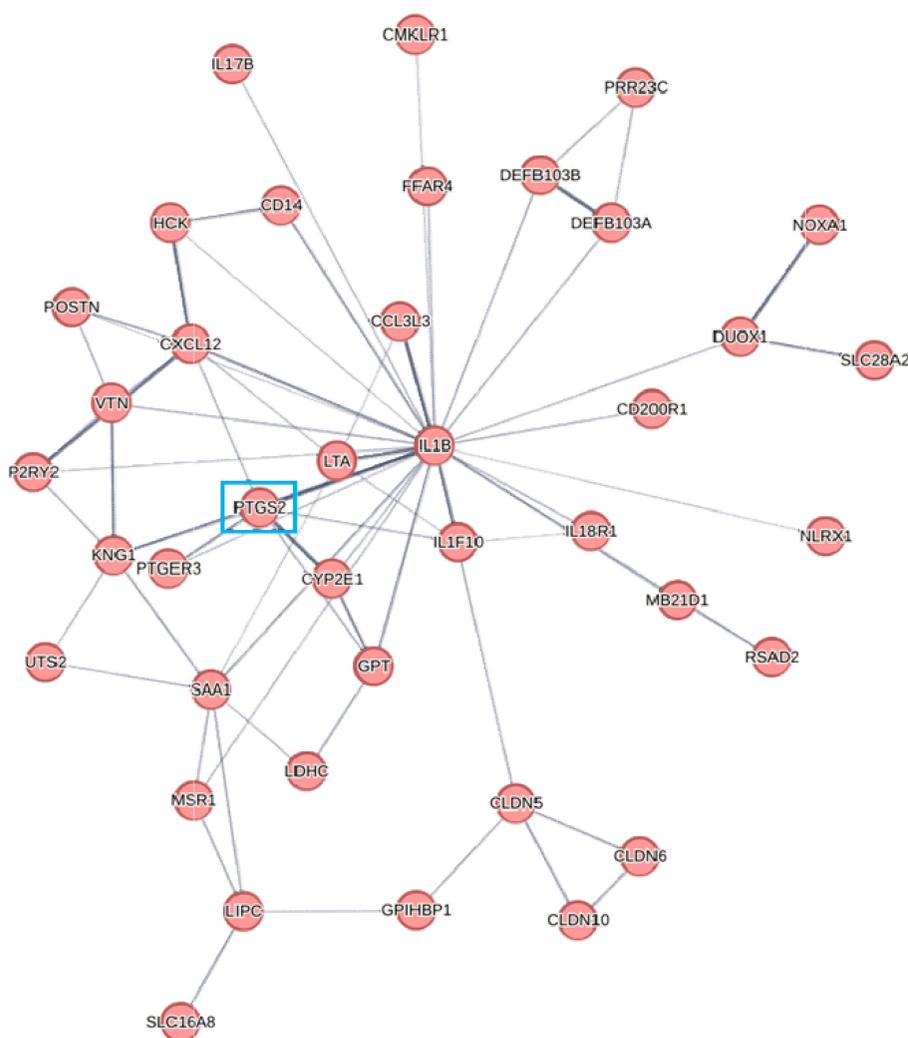


图 6 蛋白相互作用网络

注:COX2 参与的蛋白相互作用网络图。

Fig. 6 Network of protein-protein interaction

Note: Network diagram of protein interaction involving COX2.

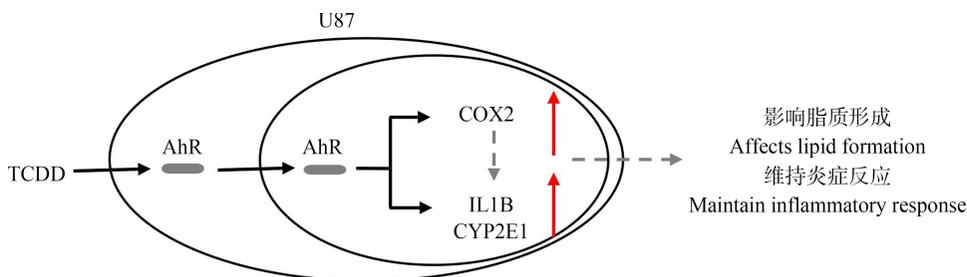


图 7 本研究模式图

Fig. 7 The framework of this study

瘤抑制因子 IL24 的表达,细胞迁移能力被抑制,并在乳腺癌和肺癌细胞中发现了同样的 AhR-IL24 轴的抑制机制。这些研究的结果与我们的结果相似:在 U87 细胞中 AhR 通路能被配体 TCDD 显著激

活,并可能促进肿瘤的发展。

COX2 能将 AA 催化成 PG,是机体脂质生成与转化的重要一环,在慢性和急性炎症中表达上调<sup>[34]</sup>。诸多证据表明,在 GBM 中 COX2 表达升高参与肿

瘤免疫微环境形成,促进细胞增殖和增强肿瘤细胞耐药性。COX2 抑制剂帕瑞考昔联合免疫疗法治疗患脑瘤大鼠能显著提高大鼠的长期治愈率<sup>[5]</sup>; COX2 的催化产物 PGE2 和 IL10 能分别作用在 EP2/4 受体和 IL10 受体上,激活调节 NOS2 和 Arg1 的回路,影响巨噬细胞状态,COX2 抑制剂处理能使巨噬细胞重新转变为表达 NOS2 的抗肿瘤表型<sup>[6]</sup>。8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 COX2 抑制剂塞来昔布能引起 U87 细胞发生 DNA 损伤、抑制 DNA 合成,虽然 U87 细胞在塞来昔布处理后未发生凋亡,但其细胞周期停滞在 G1 期<sup>[7]</sup>。COX2/PGE2/EP4 轴能激活 MAPK 信号通路并诱导 *Id1* 转录,促进肿瘤细胞的抗辐射能力和维持肿瘤干细胞干性<sup>[5]</sup>。以上研究表明过表达的 COX2 促进 GBM 的发展。

IL1B 被证实在多种肿瘤中显著上调并且与病人预后较差有关,如黑色素瘤、结肠癌和乳腺癌,是公认的炎症因子<sup>[8]</sup>。骨髓来源抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)增加是肿瘤免疫抑制微环境的标志之一,研究发现 IL1B 过表达导致胃癌和纤维肉瘤中 MDSC 浸润增加,进而抑制肿瘤免疫<sup>[8]</sup>。CYP2E1 是体内代谢脂溶性小分子外源药物和环境污染物的主要代谢酶,是机体对 80 多种外源性物质致癌产物代谢的第一步<sup>[9]</sup>。结合上文转录组分析结果,COX2 可能是通过 IL1B 和 CYP2E1 影响 U87 细胞黏附和分泌活动,进而影响肿瘤细胞的迁移和免疫活动。

综上所述,本研究以 TCDD 为代表性二噁英化合物,以 U87 细胞为模型探究了二噁英在 GBM 中对 COX2 表达的诱导作用,最后通过转录组测序进一步探究 TCDD 暴露后 U87 细胞的生理变化以及 COX2 的潜在作用机制。实验结果显示,TCDD 以 AhR 依赖的方式诱导 U87 细胞中 COX2 基因表达上调并具有显著的时间和剂量依赖效应。转录组分析结果表明,TCDD 暴露对 U87 细胞中细胞黏附、胞外刺激检测以及膜转运等相关通路影响最显著,且 COX2 的公认上游 NF- $\kappa$ B 通路也被显著激活,COX2 可能通过影响脂质形成和维持炎症反应参与 U87 的改变。互作分析发现 IL1B、CYP2E1、PTGER3、KNG1 和 CXCL12 与 COX2 相关,尤其是 IL1B 和 CYP2E1,说明 COX2 可能通过 IL1B 和 CYP2E1 影响 U87 细胞的炎症响应和脂质代谢过程,进而影响细胞黏附以及各种细胞因子的分泌。本研究探讨了二噁英促进 GBM 发展的可能途径、

AhR 对 COX2 表达的调控作用以及 COX2 影响肿瘤活动的可能途径,有助于人们更好地了解二噁英在 GBM 发展过程中的机制,也为今后对二噁英促癌作用和 AhR 与 GBM 发展关系的研究提供了一些见解。

通信作者简介:陈暘升(1989—),男,博士,主要研究方向为环境毒理学。

#### 参考文献(References):

- [1] Rodríguez-Camacho A, Flores-Vázquez J G, Moscardini-Martelli J, et al. Glioblastoma treatment: State-of-the-art and future perspectives [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(13): 7207
- [2] Zhai L J, Lauing K L, Chang A L, et al. The role of IDO in brain tumor immunotherapy [J]. Journal of Neuro-Oncology, 2015, 123(3): 395-403
- [3] Ladomersky E, Scholtens D M, Kocherginsky M, et al. The coincidence between increasing age, immunosuppression, and the incidence of patients with glioblastoma [J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10: 200
- [4] Rios A, Vargas-Robles H, Gúmez-Méndez A M, et al. Cyclooxygenase-2 and kidney failure [J]. Prostaglandins & Other Lipid Mediators, 2012, 98(3-4): 86-90
- [5] Cook P J, Thomas R, Kingsley P J, et al. Cox-2-derived PGE2 induces Id1-dependent radiation resistance and self-renewal in experimental glioblastoma [J]. Neuro-Oncology, 2016, 18(10): 1379-1389
- [6] Lyons T R, O' Brien J, Borges V F, et al. Postpartum mammary gland involution drives progression of ductal carcinoma *in situ* through collagen and COX-2 [J]. Nature Medicine, 2011, 17(9): 1109-1115
- [7] Manchana T, Triratanachat S, Sirisabya N, et al. Prevalence and prognostic significance of COX-2 expression in stage IB cervical cancer [J]. Gynecologic Oncology, 2006, 100(3): 556-560
- [8] Gasparini G, Longo R, Sarmiento R, et al. Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: A new class of anticancer agents? [J]. The Lancet Oncology, 2003, 4(10): 605-615
- [9] Alique M, Calleros L, Luengo A, et al. Changes in extracellular matrix composition regulate cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells [J]. American Journal of Physiology Cell Physiology, 2011, 300(4): C907-C918
- [10] Privorotskiy A, Bhavsar S P, Lang F F, et al. Impact of anesthesia and analgesia techniques on glioblastoma progression. A narrative review [J]. Neuro-Oncology Advances, 2020, 2(1): vdaa123

- [11] Fernandez-Salguero P M, Hilbert D M, Rudikoff S, et al. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1996, 140 (1): 173-179
- [12] Shivanna B, Chu C, Moorthy B. The aryl hydrocarbon receptor (AHR): A novel therapeutic target for pulmonary diseases? [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1516
- [13] Ochs K, Ott M, Rauschenbach K J, et al. Tryptophan-2,3-dioxygenase is regulated by prostaglandin E2 in malignant glioma via a positive signaling loop involving prostaglandin E receptor-4 [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2016, 136(6): 1142-1154
- [14] Zhu P Y, Yu H Y, Zhou K, et al. 3,3'-diindolylmethane modulates aryl hydrocarbon receptor of esophageal squamous cell carcinoma to reverse epithelial-mesenchymal transition through repressing RhoA/ROCK1-mediated COX2/PGE2 pathway [J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2020, 39(1): 113
- [15] Hanieh H, Ibrahim H M, Mohammed M, et al. Activation of aryl hydrocarbon receptor signaling by gallic acid suppresses progression of human breast cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 2022, 96: 153817
- [16] Enan E, El-Sabeawy F, Scott M, et al. Alterations in the growth factor signal transduction pathways and modulators of the cell cycle in endocervical cells from macaques exposed to TCDD [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1998, 151(2): 283-293
- [17] Warner M, Mocarelli P, Samuels S, et al. Dioxin exposure and cancer risk in the Seveso Women's Health Study [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2011, 119(12): 1700-1705
- [18] Bui L C, Tomkiewicz C, Pierre S, et al. Regulation of aquaporin 3 expression by the AhR pathway is critical to cell migration [J]. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 2016, 149(1): 158-166
- [19] Liu Y Y, Chen Y S, Sha R, et al. A new insight into the role of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the migration of glioblastoma by AhR-IL24 axis regulation [J]. *Environment International*, 2021, 154: 106658
- [20] Lee W, Park S, Kang S K, et al. Cancer risk in Vietnam war veterans from the Korean Vietnam war veterans' health study cohort [J]. *Frontiers in Oncology*, 2023, 13: 1048820
- [21] Schug T T, Janesick A, Blumberg B, et al. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 127(3-5): 204-215
- [22] Mesnil M, Defamie N, Naus C, et al. Brain disorders and chemical pollutants: A gap junction link? [J]. *Biomolecules*, 2020, 11(1): 51
- [23] Juricek L, Coumoul X. The aryl hydrocarbon receptor and the nervous system [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(9): 2504
- [24] Gabrieli G, Wheeler M A, Takenaka M C, et al. Role of AHR and HIF-1 $\alpha$  in glioblastoma metabolism [J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2017, 28(6): 428-436
- [25] Opitz C A, Litzenburger U M, Sahm F, et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor [J]. *Nature*, 2011, 478(7368): 197-203
- [26] Wölfle D, Marotzki S, Dartsch D, et al. Induction of cyclooxygenase expression and enhancement of malignant cell transformation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(1): 15-21
- [27] Li Y, Wang K, Zou Q Y, et al. A possible role of aryl hydrocarbon receptor in spontaneous preterm birth [J]. *Medical Hypotheses*, 2015, 84(5): 494-497
- [28] Casado F L, Singh K P, Gasiewicz T A. Aryl hydrocarbon receptor activation in hematopoietic stem/progenitor cells alters cell function and pathway-specific gene modulation reflecting changes in cellular trafficking and migration [J]. *Molecular Pharmacology*, 2011, 80(4): 673-682
- [29] Ho I C, Lee T C. Arsenite pretreatment attenuates benzo[a]pyrene cytotoxicity in a human lung adenocarcinoma cell line by decreasing cyclooxygenase-2 levels [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 2002, 65(3-4): 245-263
- [30] Rebe C, Ghiringhelli F. Interleukin-1beta and cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(7): 1-31
- [31] Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001, 58(5): 737-747
- [32] Pollenz R S. The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2002, 141(1-2): 41-61
- [33] Lim T X, Ahamed M, Reutens D C. The aryl hydrocarbon receptor: A diagnostic and therapeutic target in glioma [J]. *Drug Discovery Today*, 2022, 27(2): 422-435
- [34] Ye Y, Wang X P, Jeschke U, et al. COX-2-PGE2-EPs in gynecological cancers [J]. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2020, 301(6): 1365-1375
- [35] Eberstål S, Badn W, Fritzell S, et al. Inhibition of cy-

- cloxygenase-2 enhances immunotherapy against experimental brain tumors [J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2012, 61(8): 1191-1199
- [36] Basudhar D, Bharadwaj G, Somasundaram V, et al. Understanding the tumour micro-environment communication network from an NOS2/COX2 perspective [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2019, 176(2): 155-176
- [37] Kang K B, Zhu C J, Yong S K, et al. Enhanced sensitivity of celecoxib in human glioblastoma cells: Induction of DNA damage leading to p53-dependent G1 cell cycle arrest and autophagy [J]. *Molecular Cancer*, 2009, 8: 66
- [38] Tu S P, Bhagat G, Cui G L, et al. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice [J]. *Cancer Cell*, 2008, 14(5): 408-419
- [39] Trafalis D T, Panteli E S, Grivas A, et al. CYP2E1 and risk of chemically mediated cancers [J]. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2010, 6(3): 307-319
- ◆