

· 论 著 ·

骨形态发生蛋白在乳腺癌增殖、转移中作用的初步筛选

郭 丹¹, 黄佳祎², 印国兵^{1△}, 孙治君¹

(重庆医科大学: 1. 第二附属医院普外科 400010; 2. 第一附属医院内分泌科 400016)

摘要:目的 筛选获得可能与乳腺癌骨转移密切相关的骨形态发生蛋白(BMPs), 为后期进一步研究乳腺癌骨转移的机制奠定基础。方法 收集 10 种不同的人乳腺癌细胞株, RT-PCR 检测 14 种 BMPs 的表达。选择表达频率和水平较高的 BMPs, 以腺病毒为介导感染高转移性的人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231。用细胞生长曲线、划痕修复实验及 Transwell 细胞侵袭实验等检测其增殖、运动和侵袭能力的改变。结果 在 10 种不同的人乳腺癌细胞株中, BMPs 普遍表达, 其中 BMP2、4、7、11 表达频率和水平较高。以腺病毒 BMP2、4、7、11 感染高转移性的人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231, 生长曲线结果显示 BMP2 组和 BMP4 组生长曲线向左上移位, 而 BMP7 组和 BMP11 组向右下移位; 划痕修复实验提示 BMP2 组和 BMP4 组划痕愈合提前, 而 BMP7 组和 BMP11 组延迟; 与空病毒组(105 ± 7.0)相比, BMP2 组(125 ± 10.0)和 BMP4 组(130 ± 12.5)穿膜细胞数增加, 而 BMP7 组(82 ± 5.0)和 BMP11 组(71 ± 9.5)的穿膜细胞数显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 BMPs 与乳腺癌的发生和转移密切相关, 尤其是 BMP2、4、7、11 值得进一步关注。

关键词:骨形态发生蛋白; 乳腺癌; 骨转移

中图分类号: R737.9; R73-37

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)07-0807-03

Screen of BMPs in metastasis and proliferation of human breast cancer

GUO Dan¹, HUANG Jia-Yi², YIN Guo-bing^{1△}, et al.

(1. Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing 400010, China;

2. Department of Endocrinology, The 1st Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To screen and identify the role of Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) in metastasis and proliferation of human breast cancer. **Methods** The expressions of BMPs in 10 kinds of human breast cancer cell lines were evaluated by RT-PCR. Then the BMPs expressing at high level or high frequency were chosen to be overexpressed in human breast cancer cell line MDA-MB-231 by adenovirus infection, growth curve, wound-healing experiment and Matrigel invasion assays were performed to study the changes of proliferation, movement and invasion. **Results** BMPs expressed extensively in 10 kinds of human breast cancer cell lines, especially in BMP2, BMP4, BMP7 and BMP11. After infected with Ad-BMP2 or Ad-BMP4, the proliferation of MDA-MB-231 was induced, while reduced in BMP7 and BMP11 group. Wound healing assays showed that the migrated cells increased in BMP2 and BMP4 group and decreased in BMP7 and BMP11 group. Compared with GFP group(105 ± 7.0), the invasive ability of MDA-MB-231 cells was enhanced in BMP2 and BMP4 group(125 ± 10.0 vs 130 ± 12.5) and inhibited in BMP7 and BMP11 group(82 ± 5.0 vs 71 ± 9.5). **Conclusion** BMPs have closed relationship with the tumorigenesis of human breast cancer, especially BMP2, BMP 4, BMP7, BMP 11.

Key words: bone morphogenetic proteins; breast cancer; osseous metastasis

乳腺癌是威胁妇女健康最常见的恶性肿瘤之一。全球每年新发病例 100 万, 中国至少占 15 万。随着治疗水平的不断提高, 乳腺癌的预后已获得很大改善, 但仍约有 65%~75% 的患者会发生骨转移, 严重影响患者的生活质量。目前对骨转移的治疗主要采用双膦酸盐类抑制破骨细胞的形成和功能, 预防和治疗骨相关事件。尽管如此, 乳腺癌骨转移的疗效并不十分理想, 机制也不完全清楚。而双膦酸盐类可能引起下颌骨坏死也逐渐引起重视^[1]。

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是转化生长因子 β 超家族的成员之一, 最初因其能诱导骨和软骨的形成而得名, 对骨骼的胚胎发育和再生修复起重要作用。随着研究的深入, 发现 BMPs 参与调节多种细胞的增殖、分化和凋亡的生物学过程, 在胚胎发育、出生后各组织器官内环境稳定及多种肿瘤的发生中都有重要作用, 尤其与肿瘤的骨转移密切相关。而乳腺癌因其常伴发骨转移, 提示 BMPs 在其发生中可能具有重要作用。作者初步筛选了 14 种 BMPs 对乳腺癌增

殖、迁移的影响, 拟找出与乳腺癌发生密切相关的 BMP 亚型, 为下一步深入研究其作用机制, 提供新的药物靶点打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料 10 种人乳腺癌细胞株及相关腺病毒为美国芝加哥大学分子肿瘤实验室馈赠, RT 及 PCR 相关试剂、DNA Marker、TRIzol 为 Takara 产品, 细胞培养相关试剂为 HyClone 产品, Transwell 小室为 Millipore 公司产品, 人工基质胶(ECM)为 Sigma 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 RT-PCR 检测 14 种 BMPs 在不同人乳腺癌细胞株中的表达 分别接种 10 种不同的人乳腺癌细胞株于 T-25 细胞培养瓶, 待细胞融合度达 70%~80% 时收集细胞, Trizol 法提取总 RNA, RT-PCR 试剂盒逆转录获得 cDNA。半定量 PCR 检测相关目的基因的表达, 并以 GAPDH 作为内参进行结果校正(表 1)。

[△] 通讯作者。

表 1 引物序列

目的基因	上游引物	下游引物
GAPDH	GGCTGCCCAGAACATCAT	CGGACACATTGGGGGTAG
BMP2	GGGCATCCTCTCCACAAA	GTCATTCCACCCACGTC
BMP3	GCTCTACTGGGTCTTGCTG	ATGAGGCCCTTCTCTGTT
BMP4	CTGGTCCACCACAATGTGAC	CGATCGGCTAATCCTGACAT
BMP5	GGAGCTGCTGGGTCTAGTG	AATGGTCTGGGTCTGTGAGG
BMP6	TGCAGGAAGCATGAGCTG	GTGCGTTGAGTGGAAGG
BMP7	GGCAGGACTGGATCATCG	AAGTGGACCAGCGTCTGC
BMP8	TTATCTGCGCCTCCATTTTC	TATGTGCCAACTCTGCTTCG
BMP9	CTGCGGGTCTGACTTTAG	CCTTGGGTGCAATGATCC
BMP10	AAGAGGACCCGCTCTACAT	CTGGGAATTCTTGAGGTGGA
BMP11	TTCATGGAGCTTCGAGTCTT	GTTGGCCTTGTAAGCGTTAG
BMP12	TTCATGATGTCGCTTACCG	ACACGTCGAACAGGAAGCTC
BMP13	GCAGTGAGGAAGGAGACAGG	GCCTACTCATGGCAATGTT
BMP14	CCAGGACGATAAGACCGTGT	AGCCCATGTCCTTGAAGTTG
BMP15	GTGAAGCCCTTGACCAGTGT	CACATGGCAGGAGAGATTGA

PCR 反应采用 20 μ L 体系:上下游引物(10 μ mol/L)各 0.2 μ L,模板 2 μ L,dNTP mix(10 mmol/L)0.4 μ L,Taq 酶 2 μ L,10 \times PCR buffer 2 μ L,MgCl₂ 25 mmol/L 1.2 μ L,灭菌双蒸水 13.8 μ L。循环条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C、30 s,55 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、40 s,共 28 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.2.2 划痕修复实验 接种人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 于 6 孔细胞培养板,选择表达频率和水平较高的 BMP2、4、7、11 分别以腺病毒为介导感染细胞株,观察感染效率一致。常规胰酶消化,重新种植细胞于预放“+”形划痕架的 6 孔细胞培养板,分别于接种后 4、16、24 h 观察划痕的愈合情况。

1.2.3 生长曲线 接种人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 于 T-25 细胞培养瓶,分别感染腺病毒 Ad-GFP、Ad-BMP2、Ad-BMP4、Ad-BMP7、Ad-BMP11,检测荧光表达率一致。消化吹打细胞至单细胞悬液并以 20%~30% 的密度接种于 24 孔细胞培养板,分 5 组,每组 3 个复孔,连续计数 5 d。

1.2.4 Transwell 细胞侵袭实验 Transwell 小室中加入 32 μ L ECM 胶(用 6 倍体积的无血清 DMEM 稀释),过夜凝固。人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 分别感染腺病毒 Ad-GFP、Ad-BMP2、Ad-BMP4、Ad-BMP7、Ad-BMP11,荧光表达率一致。常规消化细胞后计数,调整密度为 2.5×10^5 /mL,取 400 μ L 加入上室中;在下室中加入 600 μ L 含 20%FBS 的 DMEM 培养液。每组设 3 个平行样本,置 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 细胞培养箱内培养 24 h。小心取出上室,吸尽上室内液体,用湿棉签擦去膜上面未穿过膜的细胞,风干后以无水乙醇固定 20 min,苏木精染色。显微镜下观察、计数穿膜细胞数。

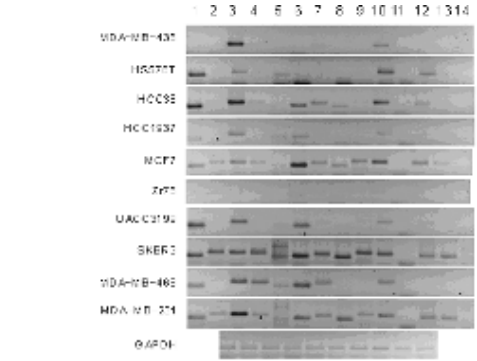
1.3 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,计量数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异采用成组设计 *t* 检验。

2 结 果

2.1 BMPs 在不同人乳腺癌细胞株中的表达 经半定量 RT-PCR 检测相关目的基因的表达,并以 GAPDH 作为内参进行结果校正(图 1)。结果可见,在所有的乳腺癌细胞株中 BMPs 普遍表达,其中 BMP2、4、7、11 表达频率和水平较高。

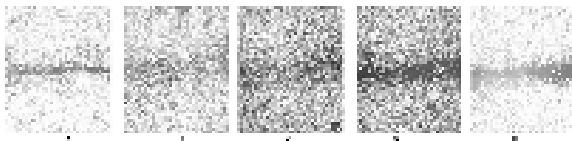
2.2 划痕修复实验 选择表达频率和水平较高的 BMP2、4、7、11,分别以腺病毒为介导感染人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231,于 4、16、24 h 观察划痕的愈合情况(图 2)。结果可见,与空病毒组相比,Ad-BMP2 组和 Ad-BMP4 组划痕愈合提前,而

Ad-BMP7 组和 Ad-BMP11 组愈合延迟(实验重复 3 次)。说明 BMP2 和 BMP4 有促进细胞迁移的趋势,而 BMP7 和 BMP11 有抑制的趋势。



1~14 : BMP2~15。

图 1 RT-PCR 检测 BMPs 在不同人乳腺癌细胞株中的表达



A:GFP 组;B:BMP2 组;C:BMP4 组;D:BMP7 组;E:BMP11 组。

图 2 24 h 后划痕修复情况(LM \times 100)

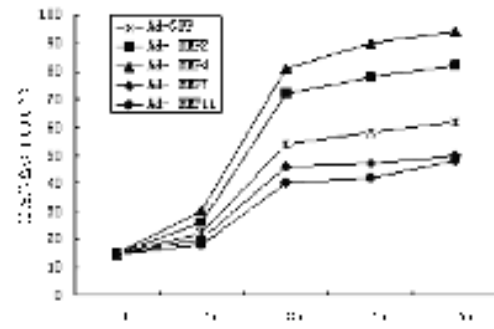
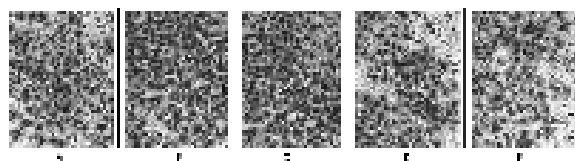


图 3 生长曲线检测 BMPs 对 MDA-MB-231 细胞株增殖的影响



A: GFP 组; B: BMP2 组; C: BMP4 组; D: BMP7 组; E: BMP11 组。

图 4 Transwell 细胞侵袭实验 (LM×200)

2.3 生长曲线 见图 3, 经腺病毒 BMP2 或 BMP4 感染后, 细胞对数生长期前移, 平台期水平升高; 而 BMP7 或 BMP11 感染后, 细胞生长曲线向右下移动, 细胞增殖被抑制 ($P < 0.05$)。

2.4 Transwell 细胞侵袭实验 与空病毒组 (105 ± 7.0) 相比, BMP2 组 (125 ± 10.0) 和 BMP4 组 (130 ± 12.5) 穿膜细胞数增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 BMP7 组 (82 ± 5.0) 和 BMP11 组 (71 ± 9.5) 穿膜细胞数显著降低, 差异也有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4。

3 讨 论

乳腺癌骨转移是晚期乳腺癌常见的并发症, 严重影响了患者的生存期和生活质量。早期的研究发现 BMPs 信号途径在乳腺癌中表达活跃, 提示可能与乳腺癌的骨转移密切相关, 但机制并不十分清楚^[2]。不同的 BMPs 亚型具有不同的作用。有研究提示, 在前列腺肿瘤中, BMP2 和 BMP6 可促进肿瘤细胞的迁移和骨转移^[3-4], 而 BMP9 可抑制癌细胞的增殖、迁移和浸润^[5]。对乳腺癌的研究发现, 不同的 BMPs 在乳腺癌中的表达水平和功能差异也很大, 其中 BMP4 和 BMP7 尤其值得重视^[6]。杨光等^[7]研究发现 BMP2 在乳腺癌微钙化形成中发挥了重要调控作用。另外, BMP2 可通过激活 ID1 和 P38 通路促进肿瘤的血管生成^[8], 对 MCF7 乳腺癌细胞株有促进转移和浸润的作用^[9]。BMP6 和 BMP7 可通过抑制 P38 信号途径和类固醇硫酸酯的表达来抑制由雌激素介导的乳腺癌细胞的增殖^[10], 同时, BMP6 还可通过减少 deltaEF1 的表达抑制 MDA-MB-231 细胞的转移性^[11]。

综上所述, 尽管近年来对 BMPs 在乳腺癌骨转移中的作用有一定的研究, 但机制仍不十分清楚。为进一步全面了解各种 BMPs 在乳腺癌骨转移中的作用, 作者广泛筛选了 BMPs 在多种乳腺癌细胞株中的表达, 以期找到与乳腺癌骨转移密切相关的 BMPs 亚型, 为进一步研究乳腺癌骨转移的机制打下基础。

在该实验中, 作者广泛检测了 10 种人乳腺癌细胞株中 BMPs 的内源性表达。结果发现在 10 种人乳腺癌细胞株中 BMPs 普遍表达, 其中 BMP2、4、7、11 表达频率和水平较高。这也与 Alarmo 等^[6]的研究相一致。在此基础上, 作者构建了腺病毒 Ad-BMP2、Ad-BMP4、Ad-BMP7、Ad-BMP11 分别感染高转移性的人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231, 生长曲线、划痕实验和 Transwell 细胞侵袭实验提示 BMP2 和 BMP4 有促进乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的趋势, 而 BMP7 和 BMP11 有抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的趋势。该结果说明 BMPs 在乳腺癌的发生和转移中具有重要的作用, 尤其是 BMP2、BMP4、BMP7、BMP11 值得进一步的关注。

在下一步实验中, 将集中研究 BMP2、BMP4、BMP7、BMP11 对乳腺癌细胞增殖、分化和恶性转移等的影响。并进一步研究其作用机制, 如对破骨细胞的形成和功能影响, 对肿

瘤相关基因、黏附因子等表达的影响。该研究有助于阐述 BMPs 与乳腺癌骨转移发生的关系, 为乳腺癌骨转移的治疗和预防提供新的靶点。

参考文献:

- [1] Walter C, Al-Nawas B, du Bois A, et al. Incidence of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in breast cancer patients[J]. *Cancer*, 2009, 115(8): 1631.
- [2] Katsuno Y, Hanyu A, Kanda H, et al. Bone morphogenetic protein signaling enhances invasion and bone metastasis of breast cancer cells through Smad pathway[J]. *Oncogene*, 2008, 27(49): 6322.
- [3] Dai J, Keller J, Zhang J, et al. Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(18): 8274.
- [4] Graham TR, Odero-Marrah VA, Chung LW, et al. Abdel-Mageed, PI3K/Akt-dependent transcriptional regulation and activation of BMP-2-Smad signaling by NF-kappa B in metastatic prostate cancer cells[J]. *Prostate*, 2009, 69(2): 168.
- [5] Ye L, Kynaston H, Jiang WG. Bone morphogenetic protein-9 induces apoptosis in prostate cancer cells, the role of prostate apoptosis response-4 [J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(10): 1594.
- [6] Alarmo EL, Kuukasjärvi T, Karhu R, et al. A comprehensive expression survey of bone morphogenetic proteins in breast cancer highlights the importance of BMP4 and BMP7[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, 103(2): 239.
- [7] 杨光, 张祥宏, 张静, 等. BMP-2 在乳腺癌组织中的表达及其与 OPN、ON 表达和微钙化的关系[J]. *临床放射学杂志*, 2007, 26(4): 347.
- [8] Raida M, Clement JH, Leek RD, et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and induction of tumor angiogenesis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005, 131(11): 741.
- [9] Clement JH, Raida M, Sängler J, et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces in vitro invasion and in vivo hormone independent growth of breast carcinoma cells[J]. *Int J Oncol*, 2005, 27(2): 401.
- [10] Takahashi M, Otsuka F, Miyoshi T, et al. Bone morphogenetic protein 6 (BMP6) and BMP7 inhibit estrogen-induced proliferation of breast cancer cells by suppressing p38 mitogen-activated protein kinase activation[J]. *J Endocrinol*, 2008, 199(3): 445.
- [11] Yang S, Du J, Wang Z, et al. BMP-6 promotes E-cadherin expression through repressing deltaEF1 in breast cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2007, 7: 211.

(收稿日期: 2009-09-23 修回日期: 2009-12-23)