

BMP9 对骨肉瘤细胞侵袭迁移能力的影响及机制

宋光泽¹, 赵慧霞²

(中国人民解放军总医院第一附属医院骨肿瘤科¹、肿瘤科², 北京 100048)

【摘要】 目的 探讨骨形态发生蛋白 9 (BMP9) 对骨肉瘤细胞侵袭、迁移能力的影响及机制。方法 以骨肉瘤细胞 F5M2 为研究对象, 通过慢病毒感染过表达细胞中 BMP9 (AdBMP9 组), 以空慢病毒载体为 AdGFP 组, 以不处理的细胞为对照组, 通过 RT-PCR 和 Western blot 检测感染后细胞中 BMP9 表达水平, 细胞划痕实验检测细胞迁移能力, Transwell 小室检测细胞侵袭能力, Western blot 检测细胞中基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)、 β -连环蛋白(β -catenin)表达。结果 对照组、AdGFP 组、AdBMP9 组细胞中 BMP9 mRNA 水平依次为(0.38±0.06)、(0.36±0.05)、(0.92±0.04), BMP9 蛋白表达水平依次为(0.20±0.02)、(0.21±0.06)、(1.22±0.17), 迁移率依次为(99.87±4.36)%、(100.03±8.64)%、(66.58±4.25)%, 侵袭细胞数依次为(115.04±4.98)、(114.95±4.85)、(77.68±8.34), MMP-9 水平依次为(0.88±0.06)、(0.87±0.08)、(0.35±0.07), MMP-2 水平依次为(0.98±0.09)、(0.99±0.06)、(0.32±0.01), β -catenin 水平依次为(1.56±0.09)、(1.58±0.05)、(0.22±0.04)。AdGFP 组细胞中 BMP9 mRNA 和蛋白表达水平、迁移率、侵袭细胞数、MMP-2 水平、MMP-9 水平、 β -catenin 水平与对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。AdBMP9 组细胞中 BMP9 mRNA 和蛋白表达水平与对照组比较均明显升高, 差异均有统计学意义($P<0.05$), 而迁移率、侵袭细胞数、MMP-2 水平、MMP-9 水平、 β -catenin 水平与对照组比较均明显降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 过表达 BMP9 能够降低骨肉瘤细胞迁移侵袭能力, 其作用机制可能与 MMP-2、MMP-9、 β -catenin 有关。

【关键词】 骨肉瘤; 侵袭; 迁移; β -连环蛋白

【中图分类号】 R738 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2018)03-0305-04

Effects of BMP9 on invasion and migration of osteosarcoma cells and its mechanism. SONG Guang-ze¹, ZHAO Hui-xia². Department of Bone Oncology¹, Department of Oncology², the First Affiliated Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, CHINA

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of BMP9 on the invasion and migration of osteosarcoma cells and its mechanism. **Methods** Osteosarcoma cell F5M2 was used as the research object, and BMP9 was overexpressed in infected cells by lentivirus (AdBMP9 group). Slow empty virus vector, were taken as the AdGFP group, and untreated cells were used as the control group. BMP9 expression in infected cells was detected by RT-PCR and Western blot; cell scratch assay was used to detect the ability of cell migration; cell invasion was detected by Transwell chamber; MMP-2, MMP-9 and β -catenin expression in cells were detected by Western blot. **Results** The expression levels of BMP9 mRNA in the control group, AdGFP group and AdBMP9 group were as follows: (0.38±0.06), (0.36±0.05), (0.92±0.04); the expression levels of BMP9 protein were (0.20±0.02), (0.21±0.06) and (1.22±0.17), respectively; the migration rates were as follows: (99.87±4.36)%, (100.03±8.64)% and (66.58±4.25)%; the number of invasive cells were as follows: (115.04±4.98), (114.95±4.85), (77.68±8.34); the expression levels of MMP-9 protein in the control group, AdGFP group and AdBMP9 group were as follows: (0.88±0.06), (0.87±0.08), (0.35±0.07); the expression levels of MMP-2 protein were (0.98±0.09), (0.99±0.06), and (0.32±0.01), respectively; the protein levels of β -catenin were (1.56±0.09), (1.58±0.05), and (0.22±0.04), respectively. There was no significant difference between AdGFP group and the control group in the expression of BMP9 mRNA and protein, the rate of migration, invasion cell number, MMP-2 protein expression level, MMP-9 protein expression level, β -catenin level ($P>0.05$). The levels of BMP9 mRNA and protein in the AdBMP9 group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$), while the rate of migration, invasion cell number, MMP-2 level, MMP-9 level, β -catenin levels were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Overexpression of BMP9 can decrease the migration and invasion of osteosarcoma cells, and the mechanism may be related to MMP-2, MMP-9, β -catenin.

【Key words】 Osteosarcoma; Invasion; Migration; β -catenin

骨肉瘤常发生于青少年和儿童, 是一种常见的恶性肿瘤, 其具有极强的侵袭能力, 转移速度快, 其发病率在全部恶性肿瘤中约占 20%, 严重危害着人类的生命健康。据统计骨肉瘤在数月之内就能够发生肺转移, 通过截肢手术后其 5 年内的存活率仍然低于 20%^[1]。研究骨肉瘤的发病机制是目前研究的热点。

骨形态发生蛋白 9 (bone morphogenetic protein 9, BMP9) 是骨形态发生蛋白的成员之一, 是一种存在于骨基质中的诱导因子, 在骨形成、血细胞生长、神经元分化、血管生成等过程中发挥调控功能^[2]。近年来的研究显示, 骨肉瘤参与肿瘤的转移, 在骨肉瘤组织中表达下调, 能够抑制肿瘤细胞裸鼠成瘤能力^[3]。本

研究旨在通过细胞划痕实验、Transwell小室侵袭实验等实验手段,探讨BMP9对骨肉瘤细胞迁移和侵袭能力的影响,以期为研究骨肉瘤的发病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 骨肉瘤细胞F5M2购自于中国科学院细胞库;RPMI1640培养基为美国Sigma公司产品;胎牛血清为美国Gibco公司产品;胰蛋白酶为美国Thermo公司产品;二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白浓度检测试剂盒为北京索莱宝公司产品;BMP9腺病毒和GFP腺病毒为北京医学实验室保存;BMP9、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;RT-PCR试剂盒为GeneCopoeia公司产品;基质金属蛋白酶-2(matrix metalloprotease 2, MMP-2)单克隆抗体、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloprotease 9, MMP-9)单克隆抗体、 β -连环蛋白(β -catenin)单克隆抗体、GAPDH单克隆抗体为武汉艾美捷公司产品。

1.2 细胞培养 骨肉瘤细胞F5M2从液氮中取出后,加入含有10%胎牛血清的RPMI1640细胞培养液,混合后,1 000 r/min离心10 min,弃去上清液,加入细胞培养液,接种到细胞培养瓶中,在37℃、5% CO₂培养箱中培养。细胞生长3 d后进行细胞传代,细胞消化用含有0.25%的胰蛋白酶。以1:3的比例接种到细胞培养瓶中继续培养。

1.3 腺病毒感染及分组 腺病毒感染参照文献^[4]:取骨肉瘤细胞F5M2,培养至对数生长期后,以每孔中加入10⁵个细胞接种到6孔细胞培养板中,用BMP9腺病毒和GFP腺病毒感染细胞,依次记为AdBMP9组、AdGFP组,同时以不做处理的细胞为对照组,12 h后更换细胞培养液,细胞出现绿色荧光后,用1 000 μ g/mL的G418进行筛选,继续培养24 h后,RT-PCR和Western blot检测细胞中BMP9表达。

1.4 RT-PCR检测BMP9表达 取AdBMP9组、AdGFP组和对照组细胞,培养24 h后,提取细胞中RNA,紫外分光光度计检测RNA样品的浓度及纯度。按照RT-PCR试剂盒操作说明书检测BMP9的表达水平,以GAPDH为内参,以2^{- $\Delta\Delta$ C_t}方法计算目的基因的表达。BMP9上游引物5'-CTGCCCTTCTTT-GTTGTCTT-3',下游引物5'-CCTTACACTCGTAG-GCTTCATA-3'。GAPDH上游引物5'-CAGCGA-CACCCACTCCTC-3',下游引物5'-TGAGGATCCAC-CACCCTGT-3'。反应条件:95℃预变性5 min;94℃,30 s;60℃,30 s;72℃,30 s,共45个循环,72℃延伸5 min。

1.5 Western blot检测BMP9表达 取AdBMP9组、AdGFP组和对照组细胞,培养24 h后,加细胞裂解液,在冰上裂解20 min后,4℃,12 000 r/min离心15 min,将蛋白上清吸取至EP管中。利用二喹啉甲酸(BCA)

蛋白定量试剂盒对蛋白样品定量检测。将提取的蛋白样品与5×Loading buffer按照4:1的比例混合,放置在100℃水浴中煮沸5 min。吸取50 μ L的变性蛋白样品加入到聚丙烯酰胺凝胶上样孔中,100 V电压2 h,观察溴酚蓝进入浓缩胶底部边缘时终止电泳。取出蛋白凝胶,在4℃将蛋白转印至硝酸纤维素膜上。5%脱脂奶粉在室温环境封闭60 min,与一抗(1 000倍稀释,4℃过夜)、二抗(1 000倍,室温60 min)反应,转移到暗室,滴加显色液,曝光,以GAPDH为内参,分析蛋白表达水平。

1.6 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 取AdBMP9组、AdGFP组和对照组细胞,培养48 h后,调整细胞浓度为2×10⁶个/mL,以每孔1 mL细胞悬浮液接种到6孔细胞培养板中,在倒置显微镜下观察细胞密度超过60%时,用移液枪枪头垂直的长满细胞的细胞瓶壁上划出一条细痕,并用磷酸盐缓冲液(PBS)将划出来的细胞洗掉。培养24 h后,倒置显微镜下观察细胞划痕的宽度。计算细胞迁移率。迁移率=100%×对照组平均宽度/感染组平均宽度。

1.7 Transwell小室检测细胞侵袭能力 取AdBMP9组、AdGFP组和对照组细胞,调整细胞密度为每毫升含有5×10⁵个细胞。在实验开始前将基质胶加入到24孔Transwell小室,在37℃环境中湿化3 h,待基质胶凝固后,加入不含胎牛血清的细胞培养液继续孵育40 min。取200 μ L的细胞悬浮液加入Transwell小室的上室,在小室的下室加入500 μ L的含有胎牛血清的细胞培养液。放在37℃环境中培养24 h后,将Transwell小室取出,擦掉没有穿膜的细胞,用PBS洗涤,多聚甲醛固定,结晶紫染色,在显微镜下随机选取5个视野观察侵袭细胞数目。

1.8 Western blot检测MMP-2、MMP-9、 β -catenin表达水平 取AdBMP9组、AdGFP组和对照组细胞培养24 h后,Western blot检测细胞中MMP-2、MMP-9、 β -catenin表达水平,步骤参照1.5。

1.9 统计学方法 应用SPSS22.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较用独立样本 t 检验,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD- t 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞感染后BMP9的表达 对照组、AdGFP组、AdBMP9组细胞中BMP9 mRNA水平依次为(0.38±0.06)、(0.36±0.05)、(0.92±0.04),BMP9蛋白表达水平依次为(0.20±0.02)、(0.21±0.06)、(1.22±0.17)。AdGFP组细胞中BMP9 mRNA和蛋白表达水平与对照组比较差异均无统计学意义($t_{\text{mRNA}}=0.444$, $P_{\text{mRNA}}=0.680$; $t_{\text{蛋白}}=0.274$, $P_{\text{蛋白}}=0.798$),而AdBMP9组细胞中BMP9 mRNA和蛋白表达水平与对照组比较明显升

高,差异均有统计学意义($t_{mRNA}=12.970, P_{mRNA}=0.000; t_{蛋白}=10.321, P_{蛋白}=0.001$),见图 1。

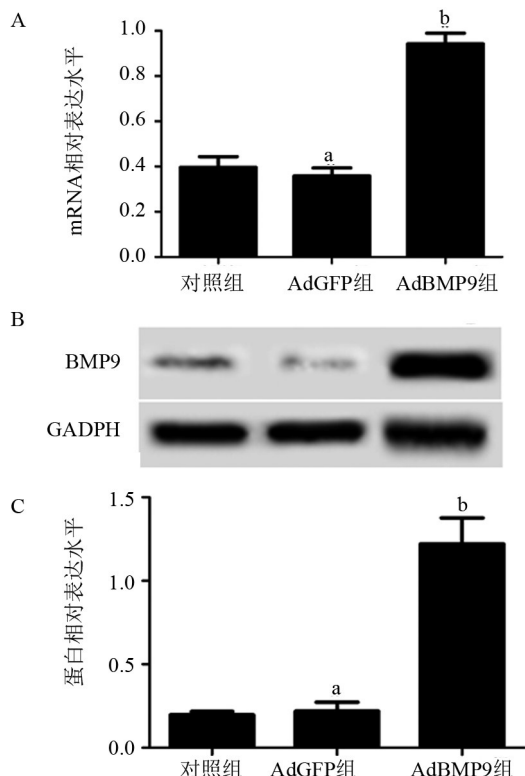


图 1 转染后细胞中 BMP9 表达水平

注:A,转染后各组细胞中 BMP9 mRNA 表达水平;B,Western blot 检测转染后各组细胞中 BMP9 蛋白表达;C:转染后各组细胞中 BMP9 蛋白表达水平;与对照组比较, $^aP>0.05$;与对照组比较, $^bP<0.05$ 。

2.2 BMP9 对细胞迁移能力的影响 对照组、AdGFP 组、AdBMP9 组迁移率依次为(99.87±4.36)%、(100.03±8.64)%、(66.58±4.25)%。AdGFP 组细胞迁移率与对照组比较没有明显变化,差异无统计学意义($t_{迁移率}=0.029, P_{迁移率}=0.979$),而 AdBMP9 组细胞迁移率与对照组比较明显下降,差异有统计学意义($t_{迁移率}=9.470, P_{迁移率}=0.001$)。细胞迁移率越大细胞迁移能力越强。BMP9 能够抑制骨肉瘤细胞迁移能力,见图 2。

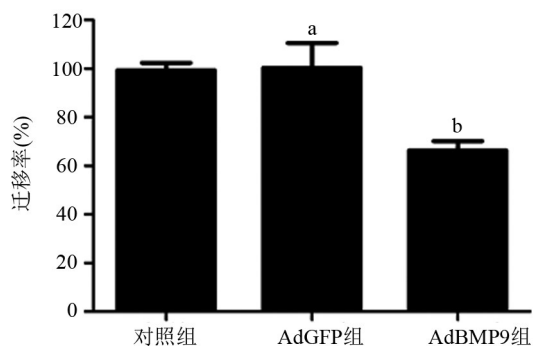


图 2 转染后各组细胞迁移率

注:与对照组比较, $^aP>0.05$;与对照组比较, $^bP<0.05$ 。

2.3 BMP9 对细胞侵袭能力的影响 对照组、AdGFP 组、AdBMP9 组侵袭细胞数依次为(115.04±4.98)、(114.95±4.85)、(77.68±8.34)。AdGFP 组侵袭细

胞数与对照组比较没有明显变化,差异无统计学意义($t_{侵袭细胞数}=0.022, P_{侵袭细胞数}=0.983$),而 AdBMP9 组侵袭细胞数与对照组比较明显下降,差异均有统计学意义($t_{侵袭细胞数}=6.662, P_{侵袭细胞数}=0.003$),见图 3。

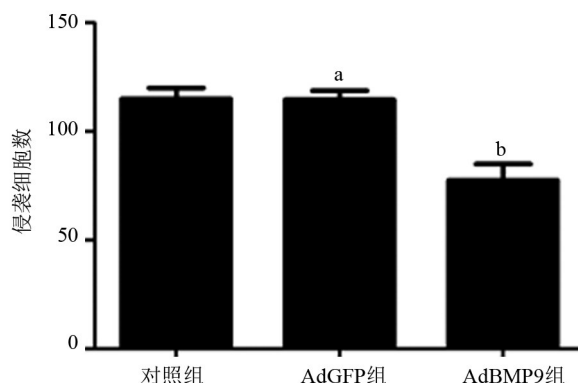


图 3 转染后各组侵袭细胞数

注:与对照组比较, $^aP>0.05$;与对照组比较, $^bP<0.05$ 。

2.4 BMP9 对细胞中 MMP-2、MMP-9、 β -catenin 表达的影响 AdGFP 组细胞中 MMP-2、MMP-9、 β -catenin 表达与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),AdBMP9 组细胞中 MMP-2、MMP-9、 β -catenin 表达与对照组比较明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1 与图 4。

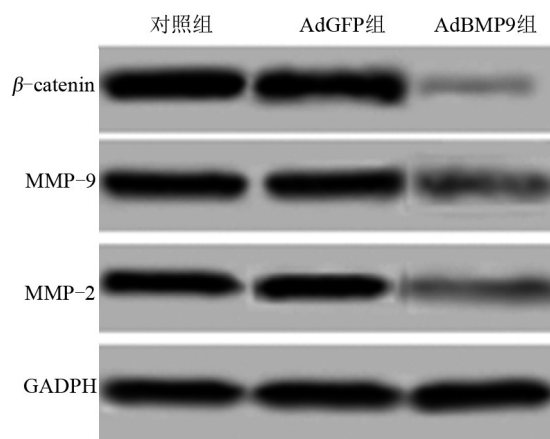


图 4 Western blot 检测转染后各组细胞中 MMP-2、MMP-9、 β -catenin 蛋白表达

表 1 转染后各组细胞中 MMP-2、MMP-9、 β -catenin 相对表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	MMP-2	MMP-9	β -catenin
对照组	0.98±0.09	0.88±0.06	1.56±0.09
AdGFP 组	0.99±0.06	0.87±0.08	1.58±0.05
AdBMP9 组	0.32±0.01	0.35±0.07	0.22±0.04

注:与对照组比较, $t_{MMP-2}=0.160, P_{MMP-2}=0.881, t_{MMP-9}=0.173, P_{MMP-9}=0.871, t_{\beta\text{-catenin}}=0.337, P_{\beta\text{-catenin}}=0.753$;与对照组比较, $t_{MMP-2}=12.624, P_{MMP-2}=0.000, t_{MMP-9}=9.957, P_{MMP-9}=0.001, t_{\beta\text{-catenin}}=23.566, P_{\beta\text{-catenin}}=0.000$ 。

3 讨论

骨形态发生蛋白具有多种调节功能,能够诱导骨和软骨的形成,目前已经发现 20 多种骨形态发生蛋白,这些骨形态发生蛋白参与骨骼发育、胚胎形成、血管生成等过程,并且参与肥胖、动脉粥样硬化、糖尿病

等疾病的发生。BMP9参与肿瘤的发生。Ren等^[5]的研究表明,在23例乳腺癌患者中有21例患者的乳腺癌组织存在BMP9 mRNA的表达缺失,而在其对应的癌旁组织中均检测到BMP9 mRNA的表达。Wan等^[6]在转移能力较高的乳腺癌细胞MDA-MB-231中没有检测到BMP9的表达,而在转移能力较低的MCF-7中检测到BMP9的微量表达,通过腺病毒感染后,乳腺癌细胞的侵袭能力降低。Ye等^[7]通过免疫组化检测前列腺癌组织和正常的前列腺上皮组织中BMP9的表达水平,结果发现BMP9在前列腺癌组织中表达降低,而过表达BMP9后细胞迁移和侵袭能力均明显降低。王静^[8]研究表明,BMP9能抑制肺癌A549细胞的增殖、迁移和侵袭,对A549细胞凋亡具有促进作用。这些研究结果均表明,BMP9参与肿瘤的发生和发展过程。本研究通过腺病毒感染骨肉瘤细胞,结果发现,BMP9能够抑制骨肉瘤细胞的迁移和侵袭能力。

肿瘤细胞的转移和发生与细胞内信号转导有关。基质金属蛋白酶家族由于需要依赖钙、锌等金属离子的辅助而得名,含有26个家族成员,能够降解细胞外基质,根据其降解的底物不同可以分为明胶酶、基质溶解素、胶原酶等6类,参与肿瘤迁移和侵袭过程^[9-12]。MMP-2和MMP-9是IV型胶原酶,是基质金属蛋白酶家族成员中作用最为广泛的两个蛋白家族成员,在肿瘤组织中表达上调^[13-14]。有研究表明,干扰MMP-2和MMP-9表达后,肺癌、口腔癌等肿瘤细胞的转移能力受到抑制^[15-16]。 β -catenin是一种位于细胞膜的蛋白,在细胞间黏附和细胞内基因表达等过程中具有重要作用,能够调控细胞的生长、迁移和侵袭能力^[17]。Zhang等^[18]发现骨形态发生蛋白2能够通过抑制 β -catenin的表达下调肿瘤细胞的迁移能力。本研究结果表明,BMP9能够抑制骨肉瘤细胞中MMP-2、MMP-9和 β -catenin的表达,这与之前的研究结果相符。

综上所述,BMP9可能通过抑制骨肉瘤细胞中MMP-2、MMP-9和 β -catenin的表达降低骨肉瘤细胞侵袭、迁移能力。本研究结果为探讨骨肉瘤的发病机制奠定了基础,为骨肉瘤基因靶向治疗提供了新思路。但本研究只在体外进行了细胞实验,后续会进一步研究BMP9在体内对骨肉瘤的作用及机制。

参考文献

- [1] Zhu H, Liao Q, Yin K, et al. Circulating miR-17-5p as a potential biomarker for diagnosis and prognosis in osteosarcoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017, 10(3): 3409-3416.
- [2] Wang J, Liao J, Zhang F, et al. NEL-like molecule-1 (Nell1) is regulated by bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and potentiates BMP9-induced osteogenic differentiation at the expense of adipogenesis in mesenchymal stem cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(2): 484-500.
- [3] Li B, Yang Y, Jiang S, et al. [Corrigendum] Adenovirus-mediated overexpression of BMP-9 inhibits human osteosarcoma cell growth and migration through downregulation of the PI3K/AKT pathway [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(5): 2189.
- [4] Prasad V, Suomalainen M, Pennauer M, et al. Chemical induction of unfolded protein response enhances cancer cell killing through lytic virus infection [J]. *J Virol*, 2014, 88(22): 13086-13098.
- [5] Ren W, Sun X, Wang K, et al. BMP9 inhibits the bone metastasis of breast cancer cells by downregulating CCN2 (connective tissue growth factor, CTGF) expression [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(3): 1373-1383.
- [6] Wan S, Liu Y, Weng Y, et al. BMP9 regulates cross-talk between breast cancer cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2014, 37(5): 363-375.
- [7] 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): 1594-1606.
- [8] 王静. BMP9对骨微环境中非小细胞肺癌A549细胞的影响及机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2016.
- [9] Gonzalez-Villasana V, Fuentes-Mattei E, Ivan C, et al. Rac1/Pak1/p38/MMP-2 axis regulates angiogenesis in ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(9): 2127-2137.
- [10] Fiorentini C, Bodei S, Bedussi F, et al. GPNMB/OA protein increases the invasiveness of human metastatic prostate cancer cell lines DU145 and PC3 through MMP-2 and MMP-9 activity [J]. *Exp Cell Res*, 2014, 323(1): 100-111.
- [11] Groblewska M, Mroczko B, Gryko M, et al. Serum levels and tissue expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2) in colorectal cancer patients [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(4): 3793-3802.
- [12] Wang R, Ke ZF, Wang F, et al. GOLPH3 overexpression is closely correlated with poor prognosis in human non-small cell lung cancer and mediates its metastasis through upregulating MMP-2 and MMP-9 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(3): 969-982.
- [13] 霍小蕾, 裴振, 王金胜, 等. PRL-3, MMP-2和CD105在食管鳞癌中的表达及其与临床病理特征的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(1): 113-115.
- [14] Darlix A, Lamy PJ, Lopez-Crapez E, et al. Serum NSE, MMP-9 and HER2 extracellular domain are associated with brain metastases in metastatic breast cancer patients: predictive biomarkers for brain metastases? [J]. *Int J Cancer*, 2016, 139(10): 2299-2311.
- [15] Jung O, Lee J, Lee YJ, et al. Timosaponin AIII inhibits migration and invasion of A549 human non-small-cell lung cancer cells via attenuations of MMP-2 and MMP-9 by inhibitions of ERK1/2, Src/FAK and β -catenin signaling pathways [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(16): 3963-3967.
- [16] Hsu LS, Huang RH, Lai HW, et al. KLF6 inhibited oral cancer migration and invasion via downregulation of mesenchymal markers and inhibition of MMP-9 activities [J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(6): 530-535.
- [17] Arend RC, Londono-Joshi AI, Samant RS, et al. Inhibition of Wnt/ β -catenin pathway by niclosamide: A therapeutic target for ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 134(1): 112-120.
- [18] Zhang R, Oyajobi BO, Harris SE, et al. Wnt/ β -catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts [J]. *Bone*, 2013, 52(1): 145-156.

(收稿日期:2017-06-05)