

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.23.025

BMP9 对裸鼠非小细胞肺癌骨转移的影响

王 静, 刘 芳, 杨晓琼[△]

(重庆市红十字会医院/江北区人民医院检验科 400020)

摘 要:目的 探讨 BMP9 对非小细胞肺癌在裸鼠体内胫骨转移的影响。方法 用过表达重组腺病毒 BMP9(AdBMP9)感染非小细胞肺癌 A549 细胞,分别用实时聚合酶链式反应(qRT-PCR)和蛋白免疫印迹(Western blot)法验证 BMP9 的基因和蛋白水平变化;将对照或过表达 BMP9 的 A549 细胞悬液注射到裸鼠胫骨外贴骨处构建胫骨转移模型,定期观察裸鼠后肢胫骨肿瘤生长情况,6 周后麻醉照 X 线片,然后处死裸鼠,取出胫骨组织,固定、脱钙、包埋后行苏木精-伊红染色(HE 染色)和碱性磷酸酶染色(AKP 染色)。结果 Ad-BMP9 成功感染了 A549 细胞;细胞于裸鼠胫骨外注射 6 周后,对照组胫骨发生了明显的肿瘤细胞侵袭和溶骨现象,A549/BMP9 组溶骨区域和损害程度较对照组明显减少,且 AKP 的染色强度高。结论 过表达 BMP9 抑制了非小细胞肺癌在裸鼠体内胫骨转移的能力,减少了溶骨损害。

关键词:骨形态发生蛋白 9; 非小细胞肺癌; 骨转移**中图分类号:**R446.8**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2018)23-3566-04

Effect of BMP9 on bone metastasis of non-small cell lung cancer in nude mice

WANG Jing, LIU Fang, YANG Xiaoqiong[△]

(Department of Clinical Laboratory, Chongqing Municipal Red Cross Hospital / Jiangbei District People's Hospital, Chongqing 400020, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of BMP9 on non-small cell lung cancer tibial transfer of nude mice in vivo. **Methods** A549 cells were transfected with recombinant adenovirus BMP9, the expression of BMP9 was verified by qRT-PCR and Western blot. A model of tibial metastasis was constructed by injecting A549 cell suspension into the tibia of nude mice. The growth of tibial tumors in the hind limbs of nude mice was observed regularly. After six weeks, the nude mice were killed and the tibial tissue was taken out after anesthesia with X-ray. After immobilization, decalcification and embedding, HE staining and AKP staining were performed. **Results** A549 cells were infected with AdBMP9 successfully. Six weeks after the cells were injected into the tibia of nude mice, the obvious tumor cell invasion and bone dissolution occurred in the tibia of the control group. And the bone dissolving area and damage degree of A549/BMP9 group were significantly lower; the staining intensity of AKP was higher than those of the control group. **Conclusion** Overexpression of BMP9 inhibits the metastasis ability of non-small cell lung cancer in the tibia of nude mice, and reduces the osteolytic damage.

Key words: bone morphogenetic protein 9; non-small cell lung cancer; bone metastases

肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,其中 85% 左右为非小细胞肺癌,其病死率在肿瘤中位居首位;尽管手术及放化疗对治疗肺癌有很大帮助,但由于大多数肺癌患者初次发现时已属中晚期,发生了远处转移。而远处转移最常见的是骨转移,特别是溶骨性转移,因此导致患者错过了最佳治疗时机,故其五年生存率仍然很低^[1-3]。此外,近年来由于靶向药物带来耐药问题也逐渐增多,因此,寻找新的分子标志物对肺癌的诊断和治疗有着至关重要的作用^[4]。

骨形态发生蛋白(BMPs)属于转化生长因子- β (TGF- β)超家族中的一员,通过调节细胞的分化、增殖、凋亡等生物学活性参与组织器官的形成和发展,

特别是骨或软骨形成的关键因子^[5]。近年来,不少研究报道 BMPs 对肿瘤生长和转移的影响尤为重要。已有研究显示 BMPs 家族中 BMP2、BMP7 等在肺癌的生长转移中也有重要的作用^[6-7],而 BMP9 作为 BMPs 中促成骨作用最强、发现较晚的一员,在乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌等肿瘤中多有报道^[8-9],而对肺癌生长和转移的影响还未见报道。本课题组前期检测出 BMP9 在正常支气管上皮细胞的中表达高于非小细胞肺癌细胞;肺癌细胞过表达 BMP9 后,其增殖、迁移、侵袭能力降低,凋亡能力增加;A549 细胞与骨髓基质细胞 HS-5 共培养后,A549 细胞的增殖、迁移、侵袭能力增强,而 BMP9 抑制了这一作用,其机制可

能与 MAPK/ERK 和 NF-κB 信号通路的激活有关^[10-11]。但前期裸鼠皮下成瘤实验中未发现肿瘤转移到肝脏、肺或骨等其他器官,因此对肺癌骨转移方面的动物实验还需进一步的研究。本研究采用裸鼠胫骨外贴骨处注射肺癌细胞构建胫骨转移模型,探讨 BMP9 对肺癌骨转移的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人肺腺癌细胞 A549 购自美国菌种保藏中心(ATCC)。表达绿色荧光蛋白的空载腺病毒 AdGFP 和 AdBMP9 由美国芝加哥大学何通川教授惠赠。采用重庆医科大学动物实验中心提供 16 只 4~6 周龄雄性非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)裸鼠构建肺癌裸鼠胫骨转移模型。

1.2 试剂和仪器 DMEM 高糖培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;聚合酶链式反应(PCR)引物由上海百力格公司合成;蛋白裂解液购自上海碧云天公司;兔抗 BMP9 抗体购自美国 Abcam 公司;鼠抗 β-actin 抗体、山羊抗鼠(或抗兔)IgG 购自北京中杉金桥公司;碱性磷酸酶(AKP)染液购自南京建成科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养和病毒感染 A549 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃,5% CO₂ 条件下培养,当细胞密度达 90% 左右时,用胰酶消化并传代。病毒感染时,待细胞生长密度达 70%,每孔加入 6 μL 聚凝胺和重组腺病毒;24 h 后,荧光显微镜下观察绿色荧光表达情况,以感染 30% 细胞的病毒量为合适的滴度。

1.3.2 qRT-PCR 检测细胞中 BMP9 基因 收集腺病毒感染或未感染的 A549 细胞,Trizol 法提取总 RNA,逆转录后的 cDNA 进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 10 L,引物序列及产物长度见表 1,PCR 反应条件:95℃,30 s;95℃、10s,55℃、20 s,72℃、20 s,40 个循环;72℃,10 min。

表 1 qRT-PCR 引物序列		
基因	引物序列(5'→3')	长度(bp)
BMP9	F:CTG CCC TTC TTT GTT GTC TT	322
	R:CCT TAC ACT CGT AGG CTT CAT A	
GAPDH	F:CAG CGA CAC CCA CTC CTC	120
	R:TGA GGT CCA CCA CCC TGT	

1.3.3 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测细胞中 BMP9 蛋白 收集腺病毒感染或未感染的 A549 细胞,提取总蛋白,与蛋白 Buffer 混匀后,沸水中煮 10 min,至蛋白变性。取 50 μg 蛋白样品,4℃进行聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳、湿转、封闭,一抗孵育过夜(抗体稀释比例:BMP9,1:500;β-actin,1:1 000)、洗

膜、二抗 37℃育 1 h、洗膜、显影,用 Quantity One 软件对条带进行分析。

1.3.4 构建肺癌裸鼠胫骨转移模型 收集腺病毒感染或未感染的 A549 细胞,150 μL 磷酸盐缓冲液(PBS)中重悬,冰上放置备用。实验分为 4 组:PBS 对照组,A549 组(6×10⁶),A549/GFP 组(6×10⁶),A549/BMP9 组(6×10⁶)。将 16 只裸鼠随机分为 4 组,每组 4 只。将准备好的细胞悬液注射到裸鼠胫骨外贴骨处。定期观察裸鼠后肢胫骨肿瘤生长情况,6 周后麻醉裸鼠,到重庆医科大学附属第一医院放射科对裸鼠胫骨行 X 线检查;之后处死裸鼠,取出胫骨组织,用 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,10% 乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙、包埋。

1.3.5 苏木精-伊红染色(HE 染色) 石蜡组织切成 5 μm 厚度,烤片过夜,经脱蜡及水化(依次为二甲苯 I→二甲苯 II→二甲苯 III→无水乙醇 I→无水乙醇 II→95%乙醇→90%乙醇→80%乙醇→70%乙醇→蒸馏水),HE 染色,盐酸酒精分化,脱水及透明(依次为 70%乙醇→80%乙醇→90%乙醇→95%乙醇→无水乙醇 I→无水乙醇 II→二甲苯 I→二甲苯 II),封片,照相。

1.3.6 AKP 染色 石蜡组织切片、二甲苯脱蜡,水化(依次为 95%乙醇→75%乙醇→30%乙醇→蒸馏水),将玻片放入基质液染缸中,37℃孵育 15 min,不要水洗,移至显色液 A 染色 5 min,显色液 B 染色 30 s,再放入复染剂中染色 30 s,水洗 30 s,甩干,镜检。染色呈现灰黑色颗粒或块状则为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组以上数据比较采用单因素方差分析,并用 Bonferroni 校正的 *t* 检验进行组间两两比较。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A549 细胞中 BMP9 的基因和蛋白水平表达 分别将 AdGFP 和 AdBMP9 感染 A549 细胞,24 h 后感染效率为 80% 以上。提取各组细胞做 BMP9 基因和蛋白水平检测,qRT-PCR 及 Western blot 结果显示,A549 细胞感染 AdBMP9 后,BMP9 的基因和蛋白表达水平较阴性对照组明显上调(*P* < 0.001),由此证实 BMP9 在 A549 细胞中成功过表达。见图 1、2。

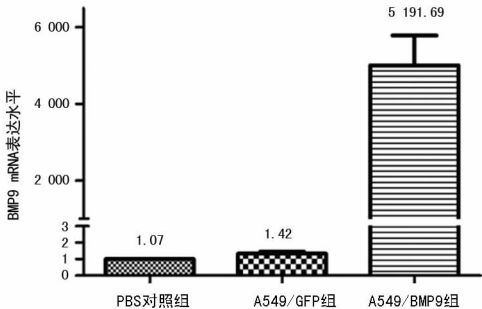


图 1 qRT-PCR 检测细胞中 BMP9 基因表达情况

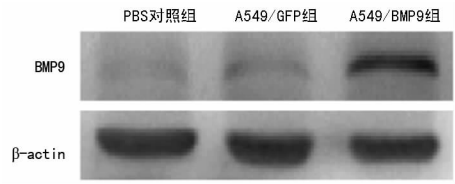
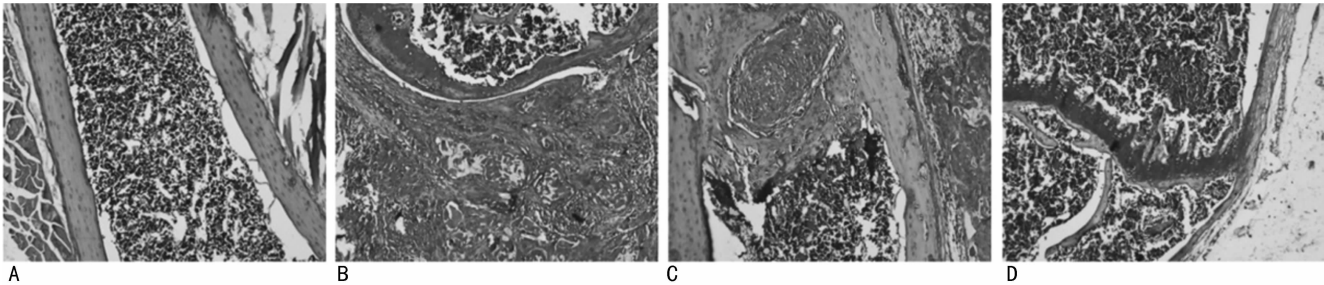


图 2 Western blot 检测细胞中 BMP9 蛋白表达情况

2.2 BMP9 抑制肺癌细胞 A549 的胫骨转移情况
胫骨外贴骨处注射肺癌细胞 3 周左右,裸鼠胫骨周围瘤体的大小有明显差异;6 周后麻醉裸鼠行 X 线成像,PBS 对照组骨组织完整,无肌肉肿胀等情况发生,A549 组和 A549/GFP 组肺癌细胞浸润到裸鼠骨组织及周围软组织,裸鼠后肢明显增粗,其直径为阴性对照组的 3~4 倍,发生了明显的肿瘤侵袭和骨质破坏,A549/BMP9 组骨及周围软组织损坏区域和损害程度



注:A 为 PBS 对照组;B 为 A549 组;C 为 A549/GFP 组;D 为 A549/BMP9 组
图 3 BMP9 抑制了肺癌细胞对胫骨的溶骨损害(HE,×100)

3 讨 论

肺癌成为全球发病率和病死率最高的恶性肿瘤,其主要原因是容易发生转移,特别是溶骨性转移,严重影响患者的预后,成为治疗肺癌最大的阻碍,因此寻找新的分子标志物对于早期诊断和治疗肺癌,延缓骨转移的破坏作用至关重要。

BMPs 在胚胎期肺和支气管的发育过程中有非常重要的作用^[12-13],目前对 BMPs 在肺癌中的研究也逐渐增多,不同亚型的 BMP 在不同类型的肺癌组织中表达和作用不同^[14-16];如 BMP2 肺癌中过表达,促进肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力;BMP3b 在非小细胞肺癌中低表达;BMP4 可负向调控肺癌细胞的生长,促进肺腺癌细胞 A549 的衰老;BMP5 的 mRNA 和蛋白水平在肺腺癌细胞中的表达较肺鳞癌细胞中高;BMP7 可促进肺癌细胞的迁移和侵袭,但对其增殖和凋亡并没有影响^[17-19]。由此可见,BMPs 在肺癌中的作用尤为重要,值得深入探究。成骨作用强的 BMP9 在其他肿瘤中有重要的作用,而在肺癌中报道较少。

基于前期实验检测出 BMP9 在体外抑制了肺癌细胞 A549 增殖、迁移和侵袭能力,其机制可能与 MAPK/ERK 和 NF-κB 信号通路的激活有关。本研究采用裸鼠胫骨外贴骨注射肺癌细胞构建胫骨转移模型,结果显示,注射 A549 细胞 6 周后,PBS 对照组、

较对照组明显减少。

2.3 BMP9 抑制肺癌对胫骨溶骨损害情况 肺癌发生骨转移最常见的类型是溶骨性转移,对骨造成了严重的损害。处死已照 X 线片的裸鼠,取出胫骨组织脱钙,做 HE 染色和 AKP 染色。HE 染色显示,A549 组和 A549/GFP 组胫骨髓腔中有明显的肿瘤细胞浸润,周围骨质已不完整,并且有的裸鼠胫骨骨髓已完全被肿瘤组织占据,而 A549/BMP9 组中髓腔破坏较轻。AKP 是成骨发生中一个重要的标志,本研究显示,A549 组和 A549/GFP 组骨质溶解破坏严重,髓腔被大量肿瘤细胞浸润,染色偏红色,其 AKP 阳性率为 40%,而 A549/BMP9 组大多为完整骨组织,AKP 染色呈灰黑色,阳性率为 75%,明显高于对照组。见图 3。

A549/GFP 组裸鼠胫骨周围瘤体明显大于 A549/BMP9 组;肺癌细胞浸润到裸鼠骨组织,发生了明显的侵袭和骨质破坏溶解,AKP 染色面积和强度减少,而 A549/BMP9 组骨损坏区域和溶骨程度明显减少。此研究进一步证实了 BMP9 对肺癌细胞增殖、转移的抑制作用。

综上所述,BMP9 可在体内外抑制非小细胞肺癌的增殖和转移能力,但其在临床肺癌患者不同分型的肺癌组织及癌旁组织是否有差异,还需收集大量的临床标本验证,为肺癌的临床诊断和治疗提供更多理论基础。

参考文献

[1] SIEGEL R, MA J, ZOU Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29.
[2] REMON J, LIANES P, MARTÍNEZ S, et al. Adjuvant treatment in resected non-small cell lung cancer: current and future issues[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2013, 88(2): 375-386.
[3] TUBIANA-HULIN M. Incidence, prevalence and distribution of bone metastases[J]. Bone, 1991, 12(Suppl 1): S9-S10.
[4] SONG J, TEPLOVA M, ISHIBE-MURAKAMI S, et al. Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation[J]. Science, 2012, 335

- (669):709-712.
- [5] WANG R N, GREEN J, WANG Z, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) signaling in development and human diseases[J]. *Genes Dis*, 2014, 1(1): 87-105.
 - [6] DENG T, LIN D, ZHANG M, et al. Differential expression of bone morphogenetic protein 5 in human lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2015, 47(7): 557-563.
 - [7] LIU Y, CHEN J, YANG Y, et al. Molecular impact of bone morphogenetic protein 7, on lung cancer cells and its clinical significance[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(6): 1016-1024.
 - [8] YE L, KYNASTON H, JIANG W G. 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.
 - [9] 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*, 2014, 37(5): 363-375.
 - [10] 王静, 邓芳, 李亚, 等. 过表达 BMP9 对人肺鳞状细胞癌细胞 NCI-H520 迁移和侵袭的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(11): 1921-1927.
 - [11] WANG J, WENG Y, ZHANG M, et al. BMP9 inhibits the growth and migration of lung adenocarcinoma A549 cells in a bone marrow stromal cell-derived microenvironment through the MAPK/ERK and NF- κ B pathways[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(1): 410-418.
 - [12] LANGENFELD E M, BOJNOWSKI J, PERONE J, et al. Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas[J]. *Ann Thorac Surg*, 2005, 80(3): 1028-1032.
 - [13] WEAVER M, YINGLING J M, DUNN N R, et al. Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development[J]. *Development*, 1999, 126(18): 4005-4015.
 - [14] ROSENDAHL A, PARDALI E, SPELETAS M, et al. Activation of bone morphogenetic protein/Smad signaling in bronchial epithelial cells during airway inflammation[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27(2): 160-169.
 - [15] 崔丹. 外源性骨形态发生蛋白 9 转入肺鳞癌细胞对其活性的影响及作用机制[J]. *中国老年学*, 2017, 37(15): 3691-3693.
 - [16] 李宏维, 叶凯山, 王栓科. 外源性 BMP9 对骨肉瘤细胞 MG63 的影响与 Wnt/ β -catenin 信号通路的关系[J]. *第三军医大学学报*, 2015, 37(7): 655-659.
 - [17] 王维, 陈莹莹, 刘月红, 等. BMP9 对体外模拟骨微环境中乳腺癌细胞迁移和凋亡的影响及其机制探讨[J]. *肿瘤*, 2013, 33(8): 663-669.
 - [18] 王金兰, 覃音玲, 郭丽艳. 肺鳞癌组织 miR-146a 表达变化及其对细胞迁移和侵袭的影响[J]. *山东医药*, 2017, 57(36): 68-71.
 - [19] 王建华, 唐治贵, 袁永强, 等. BMP9 对人肺腺癌 A549 细胞侵袭、迁移的影响及机制的研究[J]. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(2): 177-183.
- (收稿日期: 2018-04-28 修回日期: 2018-07-12)
-
- (上接第 3565 页)
- H L, et al. Reimbursement policies in the Asia-Pacific for chronic hepatitis B[J]. *Hepatol Int*, 2015, 9(1): 43-51.
 - [6] 洪永孟, 郭亚兵. 失代偿期乙型肝炎肝硬化患者预后相关因素研究[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2012, 17(3): 159-161.
 - [7] 叶素素, 张新雷, 徐伟, 等. 替比夫定、阿德福韦酯联用与恩替卡韦单药治疗失代偿期乙型肝炎肝硬化疗效对比观察[J]. *山东医药*, 2015, 58(2): 65-67.
 - [8] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. *中华临床感染病杂志*, 2011, 4(1): 1-13.
 - [9] LIAW Y F, KAO J H, PIRATVISUTH T, et al. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2012 update[J]. *Hepa Inter*, 2012, 6(3): 531-561.
 - [10] HARRIS A M, LINK-GELLES R, KIM K, et al. Community-based services to improve testing and linkage to care among non-u. s. -born persons with chronic hepatitis b virus infection——three u. s. programs, october 2014-Sep-tember 2017[J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2018, 67(19): 541-546.
 - [11] 苏通, 李春霞, 王君, 等. 血液透析患者 HBV 感染影响因素的多水平模型分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2015, 36(5): 59-61.
 - [12] 周培, 陈辉, 王鲁文, 等. 恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎肝硬化失代偿期患者的近期疗效及安全性[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2014, 24(1): 27-30.
 - [13] LIAW Y F, RAPTOPOPOULOU-GIGI M, CHEINQUER H, et al. Efficacy and safety of entecavir versus adefovir in chronic hepatitis B patients with hepatic decompensation: a randomized, open-label study[J]. *Hepatology*, 2011, 54(1): 91-100.
 - [14] GAI X D, WU W F. Effect of entecavir in the treatment of patients with hepatitis B virus-related compensated and decompensated cirrhosis[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(4): 3908-3914.
- (收稿日期: 2018-05-16 修回日期: 2018-08-21)