

BMP9 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 骨转移的影响及可能机制*

孙笑笑¹ 王 科² 冯红蕾¹ 刘月红¹ 万绍恒¹ 罗进勇¹ 张 彦^{1**}

(1 重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室 重庆 400016 2 重庆医科大学附属永川医院 重庆 402160)

摘要 探讨 BMP9 对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞骨转移能力的影响及其可能的机制。扩增高滴度的 BMP9 表达腺病毒,感染 MDA-MB-231 细胞,制备表达 BMP9 的重组 MDA-MB-231/BMP9 细胞,以此作为实验组;同时以含 GFP 的空载腺病毒感染该细胞为 MDA-MB-231/GFP,联合 MDA-MB-231 共同作为对照组;RT-PCR 及 Western blot 检测重组 MDA-MB-231/BMP9 细胞中 BMP9 以及磷酸化 Smad1 (PSmad1) 的表达;定量 PCR 及 Western blot 检测三组细胞中 CTGF mRNA 和蛋白水平的表达情况,最后结合 X 片运用免疫组织化学染色的方法检测三组标本中 CTGF 的表达。结果发现重组 MDA-MB-231/BMP9 细胞中存在 BMP9 的表达;与对照组细胞相比,MDA-MB-231/BMP9 细胞中存在 PSmad1 的活化增强及 CTGF 的表达下调;X 片发现实验组裸鼠胫骨溶骨性缺损减少;瘤体组织免疫组化发现实验组 CTGF 表达下调。所以 BMP9 可以在体内抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的骨转移并且这种抑制作用有可能是通过下调 CTGF 来实现的。

关键词 BMP9 骨转移 CTGF 乳腺癌

中图分类号 R737.9

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,发病率占全身各种恶性肿瘤的 7%~10%,乳腺癌最容易发生骨转移,由于一旦发生骨转移,常常会引发一系列病理性骨折,故致死率高,预后差,严重影响患者生活质量^[1],所以如何有效抑制乳腺癌骨转移是当前面临的一大医学难题。

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 有 20 余种亚型,除了 BMP1 外,其余的都属于转化生长因子 β (Transforming growth factor beta, TGF- β) 超家族的成员,它们最先被发现具有诱导骨与软骨形成的作用,近年来发现 BMPs 也参与了肿瘤发生发展过程^[2-3]。BMP9 作为 BMPs 中的一员,发现较晚,研究较少,近期有文献报导 BMP9 可以通过激活 BMP/SMAD 通路上调分化抑制因子 ID1 促进卵巢癌细胞增殖^[4];通过激活 BMP/SMAD 通路抑制前列腺癌 PC-3 细胞的

生长、侵袭及迁移^[5]。乳腺癌和前列腺癌都很容易发生骨转移,但是关于 BMP9 在乳腺癌细胞中的相关作用及其机制目前尚无报导。前期研究发现 BMP9 在转移能力不同的乳腺癌细胞系中表达明显不同,在整合 SV40 人乳腺上皮细胞 HBL-100 和低转移能力的乳腺癌 MCF7 细胞中有表达,但在高转移能力和最易发生骨转移的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中表达缺失,同时体外实验也证实 BMP9 可以抑制人乳腺癌 (MDA-MB-231) 体外侵袭和迁移^[6],故本研究采用乳腺癌高转移细胞株 MDA-MB-231 为工具细胞,4 周龄雌性裸鼠为研究对象从体外和体内探讨 BMP9 对乳腺癌骨转移的抑制及其可能的机制,为寻找新的乳腺癌骨转移治疗靶点或治疗药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和腺病毒 高转移性人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 购自中国科学院上海生命科学研究院细

收稿日期:2011-12-12 修回日期:2012-01-17

* 国家自然科学基金资助项目 (81172017, 30800658)

** 通讯作者, 电子信箱: zy2753@ hotmail. com

胞资源中心;BMP9 腺病毒和 GFP 腺病毒由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室何通川教授惠赠。

1.1.2 裸鼠 4 周龄雌性 BALB/c 裸鼠(体重约 20 g)购自重庆医科大学实验动物中心[动物使用许可证号:SYXK(YU)2007-0001],裸鼠饲养在无特定病原体屏障环境中。

1.1.3 主要试剂 L-15 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司;Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;M-MLV 反转录试剂盒购自美国 Promega 公司;引物由宝生物工程(大连)有限公司合成;Western blot 及蛋白质提取相关试剂购自上海碧云天生物技术有限公司;Smad1 抗体(CATALOG: # 9743)和 PSmad1 抗体(CATALOG: #9553)购自 Cell Signaling 公司;CTGF 抗体(CATALOG: ab-6992)购自美国 ABcam 公司;BMP9 抗体(CATALOG: sc-27821)和 β -actin 抗体(CATALOG: sc-47778)购自 Santa Cruz 公司;化学发光试剂盒(CATALOG: 34080)购自 Pterce 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MDA-MB-231 细胞用含 10% 胎牛血清的 L-15 培养液于 37℃、无 CO₂ 温育箱中培养。

1.2.2 腺病毒的感染 取对数生长期细胞适量接种于 25cm² 培养瓶中培养,待细胞汇合度达 80% 时加入适量 BMP9 或者 GFP 腺病毒,设空白对照组(MDA-MB-231 组),AdGFP 感染组(MDA-MB-231/GFP 组),AdBMP9 感染组(MDA-MB-231/BMP9 组)3 个组,8~12 h 后细胞换液,放入无 CO₂ 温育箱中继续培养,加病毒 24h 后观察荧光表达情况。

1.2.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) Trizol 法提取总 RNA,取 2 μ g 总 RNA 用逆转录试剂盒合成 cDNA,以 1 μ l cDNA 为模板进行 PCR 反应。BMP9 上游引物 5'-CTGCCCTTCTTTGTGTCTT-3',下游引物 5'-CCTTACACTCGTAGGCTTCATA-3',产物长度 322bp;内参 β -actin 上游引物 5'-CACCACACCTTCTACAATGAGC-3',下游引物 5'-GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT-3',产物长度 695bp。PCR 条件:预变性 94℃ 5min,变性 94℃ 30s,退火 52℃ 30s,延伸 72℃ 30s,30 个循环,最后延伸 72℃ 10min。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(Real Time-PCR) Trizol 法提取细胞总 RNA,取 2 μ g 总 RNA 逆转录合成 cDNA,以 1 μ l cDNA 为模板进行 Real Time-PCR 反应。CTGF 上游引物为 5'-GCGGCTTACCGACTGGA-3',下游引物为 5'-AGGCGGCTCTGCTTCTC-3';ID1 上游引物为 5'-

CGGTCTCATTTCTTCTCG-3',下游引物为 5'-TCGGTCTTGTCTCCCTC-3';CXCR4 上游引物为 5'-ACGCCACCAACAGTCAGA-3',下游引物为 5'-ACAACCACCCACAAGTCA-3';内参 GAPDH 上游引物 5'-CAGCGACACCCACTCCTC-3',下游引物为 5'-TGAGGTCCACCACCCTGT-3'。所有样本的结果以 GAPDH 的表达做相对定量分析,数据分析采用比较 CT 法(2^{- $\Delta\Delta$ CT}法),取 3 次重复的平均值。

1.2.5 细胞总蛋白的提取及 Western blot 取对数生长期 MDA-MB-231 细胞接种于 100mm 培养皿中,在 37℃ 无 CO₂ 条件下培养,待细胞达到 80% 融合度,加入适量腺病毒(感染效率约为 30%),8~12 小时后换液,换成无血清 L15 培养基,培养 24 小时后,将三组细胞的培养基弃去,用预冷的 PBS 洗两次,加入细胞裂解液 RIPA(含蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和 1mmol/L PMSF)200 μ l/100mm 培养皿,冰上裂解 30min,12 000 r/min,4℃ 离心 15min,小心吸取上清液至 1.5ml EP 管中,检测蛋白浓度。取 10 μ g 提取的蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿转法转膜,5% 牛血清白蛋白 37℃ 封闭 1h,滴加一抗(1:1 000)4℃ 孵育过夜,0.1% TBST 洗膜 10min \times 3 次,滴加二抗(1:5 000)室温孵育 1h,0.1% TBST 洗膜 10min \times 3 次,最后加入化学发光显色液成像。

1.2.6 裸鼠乳腺癌骨转移模型的构建及 X 线成像 收集处于对数生长期的 MDA-MB-231/BMP9、MDA-MB-231/GFP 细胞和空白对照组 MDA-MB-231 细胞,胰蛋白酶消化后,PBS 洗涤两次,用 30 μ l 无菌 PBS 重悬细胞,总共包含细胞量为 1 \times 10⁶ 个,行胫骨贴骨注射法构建乳腺癌骨转移动物模型,分别在 2,4,6,8 周到重庆医科大学附属第一医院放射科行 X 线检查,观察裸鼠胫骨骨肿瘤生长情况。裸鼠用 1.5% 戊巴比妥钠完全麻醉后,将动物摆成俯卧位,四肢伸展,X 线摄影。拍摄参数如下:电压 50kV,电流 45mA,时间 90ms。

1.2.7 免疫组织化学染色 待细胞接种 8 周最后一次 X 成像后,颈椎脱臼法处死裸鼠,取出胫骨组织,生理盐水清洗组织块,4% 多聚甲醛固定 24h,5% 硝酸脱钙 4h,石蜡包埋,切片,经二甲苯脱蜡,梯度酒精水化后行抗原修复,滴加 3% H₂O₂ 去除内源性的过氧化氢酶,PBS 洗涤除去 H₂O₂,滴加一抗 4℃ 孵育过夜后滴加二抗 37℃ 孵育 10~20min,加显色剂显色后苏木精复染,最后经梯度酒精脱水后置二甲苯透明,封片。每张切片在显微镜高倍镜下随机摄取 10~20 个视野,照相并

采集相应图像。然后用 Image-Pro Plus 软件分析统计图像中被染成黄色区域的累积光密度。

1.2.8 统计学分析 所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计软件为 SPSS 16.0,采用 Student's *t* 检验进行统计学分析。

2 结 果

2.1 MDA-MB-231/BMP9 细胞中存在 BMP9 的表达

RT-PCR 检测显示 MDA-MB-231 组和 MDA-MB-231/GFP 组没有内源性 BMP9 表达,MDA-MB-231/BMP9 组可检测到 BMP9 表达(图 1a),Western blot 结果进一步证实 BMP9 蛋白在重组 MDA-MB-231/BMP9 细胞中有表达(图 1b)。

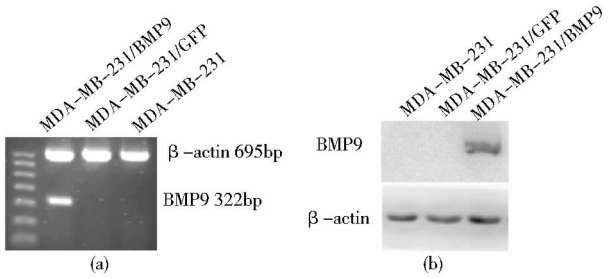


图 1 各组细胞中 BMP9 的表达情况
Fig.1 The expression pattern of BMP9 in different groups

2.2 重组 MDA-MB-231/BMP9 细胞中经典的 Smad 信号通路被激活

Western blot 结果显示,BMP9 对三组细胞总 Smad1

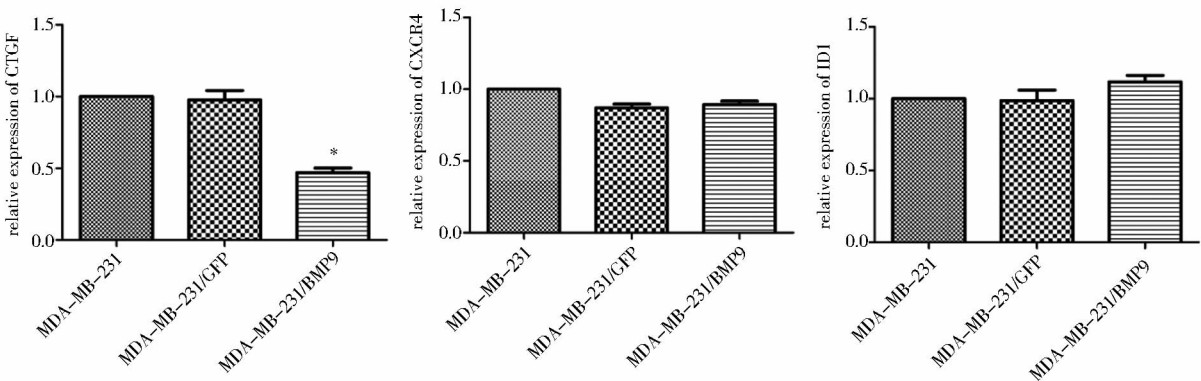


图 3 肿瘤骨转移相关基因 CTGF,CXCR4,ID1 在三组细胞中的表达情况
Fig.3 The expression pattern of bone metastasis-associated gene CTGF,CXCR4,ID1 in three groups

2.4 BMP9 诱导 CTGF 蛋白表达下调

Western blot 检测显示肿瘤骨转移相关基因 CTGF 在重组 MDA-MB-231/BMP9 细胞中表达明显下调,进

一步证实了 Real Time-PCR 检测的结果(图 4)。

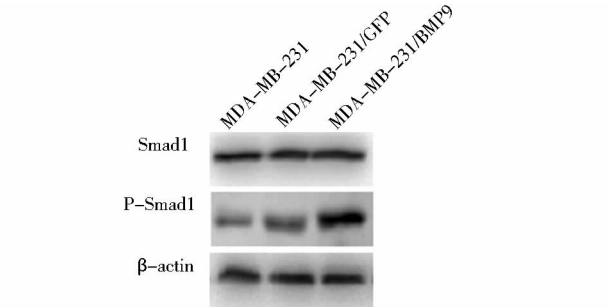


图 2 各组细胞中 Smad 信号通路的激活情况
Fig.2 The activity of BMP/Smad signal pathway in different groups

2.3 BMP9 诱导 CTGFmRNA 下调

分化抑制因子 1(inhibitor of differentiation-1, ID1), C-X-C 家族趋化因子受体 4(C-X-C chemokine receptor type 4,CXCR4)和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)均是与肿瘤骨转移相关的基因,Real Time-PCR 法检测 BMP9 处理后这些基因 mRNA 表达量的变化,结果发现过表达 BMP9 后,CTGF 的表达与对照组相比 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 为 0.47,即 CTGF 的表达与对照组相比降低了 53% ($P < 0.05$);CXCR4 的表达与对照组相比 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 为 0.85,差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$);ID1 的表达与对照组相比 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 为 1.12,差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)(图 3),提示 BMP9 可以导致 CTGF 表达下调。

一步证实了 Real Time-PCR 检测的结果(图 4)。

2.5 BMP9 减少乳腺癌溶骨性缺损

裸鼠胫骨贴骨注射乳腺癌 MDA-MB-231 细胞复制

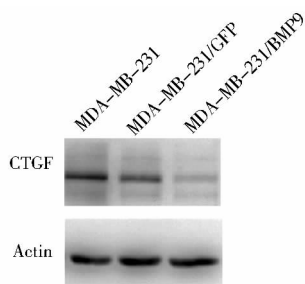


图4 CTGF在重组MDA-MB-231/BMP9细胞中表达下调

Fig. 4 Down-regulation of CTGF protein in recombinant MDA-MB-231/BMP9

骨转移动物模型,2周后开始X线成像。在第2周各组均未见明显溶骨缺损发生;第4周对照组有明显溶骨缺损发生,而MDA-MB-231/BMP9组尚未发生溶骨,成瘤6周后,对照组瘤体和溶骨区域明显大于MDA-MB-231/BMP9组(图5),成瘤8周后处死所有裸鼠,进行组织石蜡包埋和切片。

2.6 BMP9导致CTGF在乳腺癌骨转移动物模型中表达下调

免疫组织化学法检测乳腺癌骨转移标本中CTGF的表达,用Image-Pro Plus图像分析软件对组化切片上黄色区域的累计光密度值(IOD值)进行分析,结果显示CTGF在MDA-MB-231/BMP9组的表达量明显低于MDA-MB-231/GFP组($P < 0.05$),而MDA-MB-231/GFP组与MDA-MB-231组在CTGF表达量上的差异无统计学意义($P > 0.05$)(图6)。

3 讨论

BMPs是一组可诱导间充质干细胞成骨分化的细胞因子,它以同源或异源二聚体的形式从细胞分泌,以自分泌或旁分泌的形式作用于自身及周围细胞,发挥生物学作用^[7]。研究发现从早期的胚胎发育、器官形成到出生后内环境稳态的维持、损伤修复等过程中均有BMPs的参与,BMPs可通过调节下游靶基因的转录影响细胞的生长、分化、凋亡和转移等多种生物学行为。近年来发现BMPs在很多肿瘤中有异常表达,因此探讨它与肿瘤发生发展的关系成了当前研究的热点。在乳腺癌中,BMP2可导致乳腺癌细胞周期阻滞,抑制细胞的凋亡、促进细胞的迁移和侵袭^[8-12];BMP4可通过干扰乳腺上皮细胞导管的形成来抑制乳腺上皮细胞的侵袭,也可以通过抑制MMP9的表达来抑制乳腺癌

细胞的侵袭和转移^[13-14];BMP7与乳腺癌骨转移相关,可作为独立的早期骨转移预后因子,而在原位复发的乳腺癌中表达缺失^[15]。

BMP9又称生长分化因子2,最初由胎鼠的cDNA中克隆出来^[16],具有多种生物学作用,其具体参与了血管形成,骨的形成与再生,诱导和维持胚胎神经元的类胆碱分化、调节葡萄糖和脂肪酸代谢^[17],调节体内铁的动态平衡,维持肝细胞内皮网状系统等等^[18]。近年来研究发现BMP9可以抑制内皮细胞迁移和侵袭^[19];可以通过前列腺凋亡反应蛋白4促进前列腺癌PC-3细胞的凋亡^[5],但是在乳腺癌高转移细胞株MDA-MB-231中却表达缺失,用表达BMP9的腺病毒感染细胞后发现BMP9可以抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞的增殖,迁移和侵袭能力^[6],所以实验构建了重组MDA-MB-231/BMP9细胞,从体内来进一步探讨BMP9对乳腺癌细胞骨转移的影响。

BMPs主要是通过经典的BMPs-BMPR-Smad信号通路传递信号,调节下游靶基因的转录而发挥其生物学功能,研究通过Western blot发现BMP9可以增强PSmad1的活化水平,说明BMP9可通过经典的信号通路来抑制乳腺癌骨转移。CTGF为近年来发现的新的致纤维化因子,也是BMP9的下游靶基因,是一种富含半胱氨酸的多肽,属即刻早期基因CCN(CTGF、Cyr61、nov)家族成员之一^[20]。目前有文献报道CTGF的表达水平与肿瘤的预后及术后复发密切相关,然而,在不同的肿瘤组织中CTGF的分布及生物学作用不同,它可以通过正向或负向调节肿瘤的发展,如在肝癌、弥漫浸润型胃癌、脑胶质瘤、食管腺癌中CTGF阳性或者高表达者肿瘤细胞生长,浸润,转移性强,患者生存期短,预后差,不易治疗,而在胰腺癌、食管鳞状细胞癌、结直肠癌、喉鳞状细胞癌、甲状腺癌、肺癌中可作为肿瘤抑制因子发挥负性调节作用,乳腺组织中富含结缔组织,而CTGF在乳腺癌中又是高表达^[21],其表达量与病程、肿瘤大小、淋巴结状况、年龄有重要关联,故研究CTGF在乳腺癌细胞和组织中的变化有重大意义。研究发现加入BMP9腺病毒后CTGF表达在mRNA和蛋白质水平均明显下调,暗示BMP9很有可能就是通过下调CTGF来发挥抑制肿瘤侵袭和迁移的。

移植瘤动物模型是研究体内肿瘤细胞生物学行为的重要工具之一,通过裸鼠胫骨贴骨注射乳腺癌细胞复制了乳腺癌骨转移动物模型,X光片发现MDA-MB-231/BMP9组溶骨区域明显小于MDA-MB-231/GFP

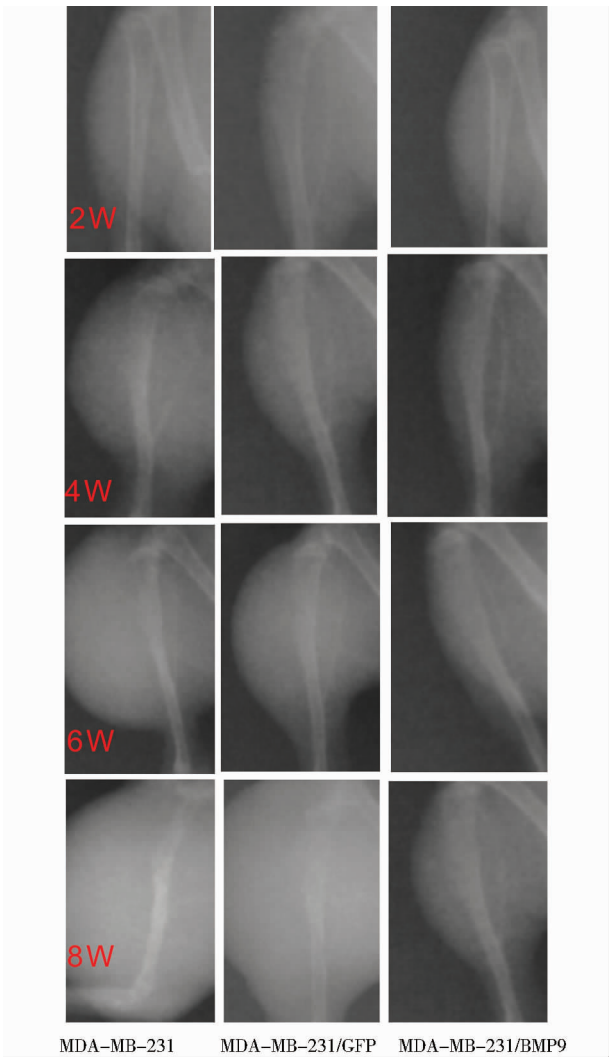


图5 X线成像分析 BMP9 对 MDA-MB-231 细胞 2,4,6,8 周溶骨性转移的影响

Fig.5 The lytic lesions were analysis with X Radiographic at 2, 4, 6 and 8 weeks by over expression of BMP9

组,说明 BMP9 能有效抑制 MDA-MB-231 细胞的骨转移。免疫组化结果显示 MDA-MB-231/BMP9 组的 CTGF 表达较 MDA-MB-231/GFP 有明显降低,进一步证实了体外实验得出的 BMP9 能够使 CTGF 表达降低的结论,体内实验结果提示 BMP9 可以作为乳腺癌的负性调控因子,过表达 BMP9 能够显著抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的骨转移,BMP9 有可能成为乳腺癌骨转移靶向治疗的分子靶点。

总之,BMP9 可通过激活 Smad 信号通路来抑制乳腺癌细胞的骨转移,且这种抑制作用可能是通过下调 CTGF 的表达来实现的,具体机制还有待深一步研究。

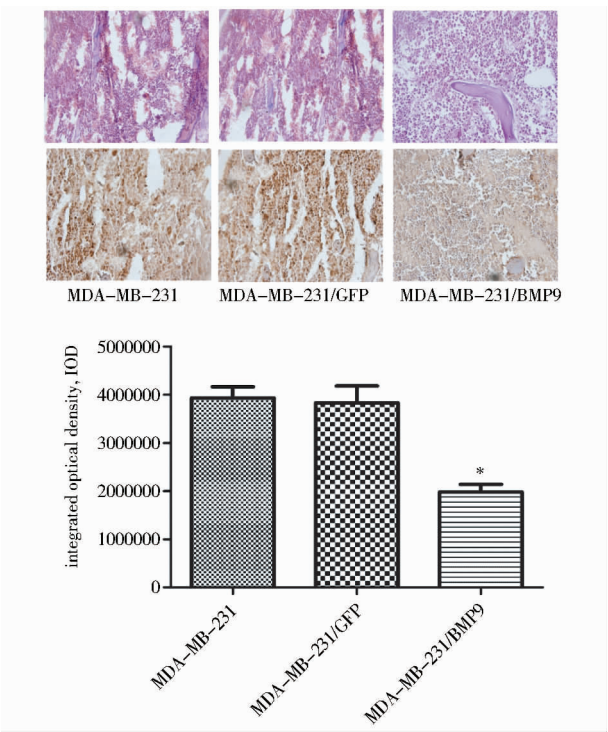


图6 BMP9 导致 CTGF 在乳腺癌骨转移动物模型中表达下调

Fig.6 The down-regulation of CTGF by over expression of BMP9 in animal models of breast cancer bone metastasis in vivo

参考文献

[1] Boér K. Current trends in pharmacotherapy of breast cancer. Orv Hetil, 2002,143(14) :725-730.

[2] Reddi A H. Bone and cartilage differentiation. Curr Opin Genet Dev, 1994, 4(5) :737-744.

[3] Senta H, Park H, Bergeron E, et al. Cell responses to bone morphogenetic proteins and peptides derived from them; biomedical applications and limitations. Cytokine Growth Factor Rev,2009, 20(3) :213-222.

[4] Herrera B, van Dinther M, Ten Dijke P, et al. Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. Cancer Res,2009,69(24) :9254-9262.

[5] Ye L, Kynaston H, Jiang W G. Bone morphogenetic protein-9 (BMP-9) induces apoptosis in prostate cancer cells, the role of prostate apoptosis response-4 (PAR-4). Mol Cancer Res, 2008, 6(10) : 1594-1606.

[6] 王科,冯红蕾,孙笑笑,等. 骨形态发生蛋白 9 抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 体外侵袭和迁移. 基础医学与临床,2011,31(4) :360-365.

- Wang K, Feng H L, Sun X X, et al. Bone morphogenetic protein-9 inhibits the migration and invasiveness of human breast cancer cells MDA-MB-231 in vitro. *Basic & Clinical Medicine*, 2011,31(4):360-365.
- [7] Alarmo E L, Rauta J, Kauraniemi P, et al. Bone morphogenetic protein 7 is widely overexpressed in primary breast cancer. *Genes Chromosomes and Cancer*,2006,45(4):411-419.
- [8] Constam D B, Robertson E J. Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol*,1999,144(1):139-149.
- [9] Zhu W, Kim J, Cheng C, et al. Noggin regulation of bone morphogenetic protein (BMP) 2/7 heterodimer activity in vitro. *Bone*,2006, 39(1):61-71.
- [10] Moustakas A, Souchelnyskiy S, Heldin C H. Smad regulation in TGF- β signaling transduction. *J Cell Sci*,2001,114(24):4359-4369.
- [11] Cheng H, Jiang W, Phillips F M, et al. Osteogenetic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *Bone Surg Am*,2003,85(8):1544-1552.
- [12] Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, et al. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone*, 1998,22(6):605-612.
- [13] Derynck R, Akhurst R J, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*,2001,29(2):117-129.
- [14] Piscione T D, Phan T, Rosenblum N D. BMP7 controls collecting tubule cell proliferation and apoptosis via Smad1-dependent and O-independent pathways. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001,280(1):19-33.
- [15] Hogan B L. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*,1996,10(13):1580-1594.
- [16] Lopez-Coviella I, Follettie M T, Mellott T J, et al. Bone morphogenetic protein 9 induces the transcriptome of basal forebrain cholinergic neurons. *Proc Natl Acad Sci*, 2005,102(19):6984-6984.
- [17] David L, Mallet C, Keramidas M, et al. Bone Morphogenetic Protein-9 is a Circulating Vascular Quiescence Factor. *Circ Res*, 2008,2(8):914-922.
- [18] Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, et al. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci*,2007,20(6):964-972.
- [19] David L, Mallet C, Mazerbourg S, et al. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*, 2007,109(5):1953-1961.
- [20] Shimo S T, Nakanishi T, Nishida T, et al. Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells in vitro, and angiogenesis in vivo. *J Biochem*,1999,126(1):137-145.
- [21] Pandey D P, Lappano R, Albanito L, et al. Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO J*, 2009,28(5):523-532.

Effects and Possible Mechanism of BMP9 on the Bone Metastasis of Human Breast Cancer Cells MDA-MB-231

SUN Xiao-xiao¹ WANG Ke² FENG Hong-lei¹ LIU Yue-hong¹ WAN Shao-heng¹
LUO Jin-yong¹ ZHANG Yan¹

(1 The Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics in the Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

(2 The Laboratory Department, Affiliated Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

Abstract The purpose is to investigate the effects and possible mechanisms on BMP9 inhibiting the bone metastasis of human breast cancer MDA-MB-231 cells. High titer adenovirus vector expressing BMP9 was used to infect MDA-MB-231 cells. Experimental group is MDA-MB-231/BMP9 cells, control groups are both MDA-MB-231/GFP cells and MDA-MB-231 cells. RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of BMP9 and PSmad1 in recombinant MDA-MB-231/BMP9 cells; Q-PCR and Western blot were used to detect the expression of CTGF in three groups cells; At last, X Light and Immunohistochemistry were used separately to

detect the osteolytic lesions and the expression of CTGF in three groups cells. BMP9 was expressed in recombinant MDA-MB-231/BMP9 cells; the recombinant MDA-MB-231/BMP9 cells exhibited higher level of phosphorylated Smad1 and lower level of CTGF than the MDA-MB-231/GFP cells and MDA-MB-231 cells, but total Smad1 protein was similar in the three groups. In comparison with the control groups, the osteolytic lesions observed were significantly reduced in MDA-MB-231/BMP9 group; The removed tumor samples were detected by immunohistochemistry, MDA-MB-231/BMP9 samples analysed showed less CTGF staining than the control samples. Taken together, BMP9 can inhibit the bone metastasis of breast cancer cells MDA-MB-231 in vivo and the downregulation of CTGF is the possible mechanism.

Key words BMP9 Bone metastasis CTGF Breast cancer

广 告 索 引

Abcam (香港)有限公司(封面),通用电气医疗系统贸易发展(上海)有限公司(封二),英潍捷基(上海)贸易有限公司(彩1),宝生物工程(大连)有限公司(彩2),梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司(彩3),上海森松制药设备工程有限公司(彩4),上海日泰医药设备工程有限公司(彩5),镇江东方生物工程设备公司(彩6-7),上海开放生物科技有限公司(彩8),上海伯豪生物技术有限公司(彩9),北京天一辉远生物科技有限公司(彩10),伯乐生命医学产品(上海)有限公司(彩11),安倍医疗器械贸易有限公司(目次旁页),沃特世科技(上海)有限公司(中插1),上海国强生化装备工程有限公司(中插2-3),上海近岸科技有限公司(中插4),安捷伦科技有限公司(后1),第十二届世界制药原料中国展(后2),安琪酵母股份有限公司(封三),纽英伦生物技术(北京)有限公司(封底)