论著

文章编号:1000-5404(2007)18-1768-04

腺病毒介导BMP-2和BMP-6对人骨肉瘤细胞株MG63和U2OS的作用研究

左国伟,何焕玲,李星星,赖天霞,王 嫣,王 胜,周 兰 (重庆医科大学生物医学工程系,重庆 400016)

提 要:目的 研究骨形态发生蛋白(BMP)-2和BMP-6对人骨肉瘤细胞株MG63和U2OS的作用。**方法** 分别用重组腺病毒AdBMP-2、AdBMP-6和AdGFP感染骨肉瘤细胞MG63和U2OS,利用台盼蓝拒染法、TUNEL法、吖啶橙/溴乙啶(AO/EB)荧光双染法、Transwell小室和碱性磷酸酶(ALP)活性测定法分别检测细胞增殖、凋亡、迁移以及成骨分化能力的变化。**结果** 与感染AdGFP的相应骨肉瘤细胞株(对照组)相比,分别感染AdBMP-2和AdBMP-6的两种骨肉瘤细胞株的细胞存活率随时间延长逐渐降低,凋亡率逐渐增加,细胞穿膜数逐渐减少,ALP活性逐渐增加。**结论** BMP-2和BMP-6可以抑制人骨肉瘤细胞株MG63和U2OS的增殖和迁移,并诱导它们凋亡和向成骨细胞分化。

关键词: 骨形态发生蛋白;细胞增殖;细胞凋亡;细胞迁移;碱性磷酸酶活性

中图法分类号: R73-362;R730.23;R738.1 **文献标识码:** A

Effects of recombinant BMP-2 and BMP-6 adenoviruses on human osteosarcoma cell line MG63 and U2OS

ZUO Guo-wei, HE Huan-ling, LI Xing-xing, LAI Tian-xia, WANG Yan, WANG Sheng, ZHOU Lan (Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of BMP-2 and BMP-6 on osteosarcoma cell line MG63 and U2OS. **Methods** The two osteosarcoma cell lines were infected with AdBMP-2, AdBMP-6 (as experimental groups), and AdGFP (as control), respectively. Abilities of their proliferation, transmigration, apoptosis and differentiation were detected by trypan blue exclusion test, transwell-room, acridine orange-ethidium bromide fluorescent staining, *in situ* cell death detection and the test of alkaline phosphatase activity respectively. **Results** In the experimental groups, the cell survival rates were significant decreased ($P<0.01$); the apoptosis indexes were significantly increased in a time-dependent manner ($P<0.01$); the cell numbers of transmembrane were decreased ($P<0.01$); and the activity of alkaline phosphatase was increased gradually ($P<0.01$). **Conclusion** The human BMP-2 and BMP-6 could inhibit the proliferation and migration, promote apoptosis, and reverse the malignancy of osteosarcoma cell line MG63 and U2OS.

Key words: bone morphogenetic protein; proliferation; apoptosis; transmigration; phosphatase activity

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)属于转化生长因子-β(TGF-β)超家族,迄今,已克隆了16种BMPs的cDNA和多种BMPs亚型的cDNA,成功地分离了40多种BMPs蛋白。除诱导异位骨形成外,BMPs还在胚胎发生与发育、组织和细胞分化及增殖等许多方面起着重要的调节作用。近年来,研究人员发现某些型别的BMPs(如BMP-2)对一些肿瘤的发生和转移有抑制作用[1],包括结肠癌、前列腺癌、骨髓瘤等,然而也有相反的意见,认为BMPs可以促进肿瘤的发生与转移[2]。关于BMPs对骨肉瘤的作用研究较少,且结论也有分歧。为此,本研究选取了BMPs中具有代表性的BMP-2和BMP-6,从存活率、凋亡、迁移和分化4个方面相对系统地研究了其对骨肉瘤细胞株MG63和U2OS的作用。

基金项目:重庆市自然科学基金(CSCT2005BB5320)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSCT2005BB5320)

作者简介:左国伟(1979-),男,河北省元氏县人,硕士,助教,主要从事分子肿瘤学方面的研究。电话:(023)68485023, E-mail: zuoguowei@gmail.com

通讯作者:周 兰,电话:(023)68485023,E-mail: zhoulan0111@gmail.com

收稿日期:2006-10-05;修回日期:2007-01-10

1　材料与方法

1.1　细胞和试剂

重组腺病毒 AdBMP-2、AdBMP-6 和 AdGFP 由美国芝加哥大学分子肿瘤研究室何通川教授惠赠；RPMI1640 购自美国 Hyclone 公司；HEK 293 细胞以及人骨肉瘤细胞 MG63 和 U2OS 购自中国典型培养物保藏中心；Transwell 小室（直径 6.5 mm，孔径 8.0 μm）购自美国 Corning Costar 公司；TUNEL 试剂盒购自德国 Roche 公司；羊抗人 BMP-2、BMP-6 多克隆抗体及 ECL 试剂盒为 Santa Cruz 公司产品；兔抗羊抗体为北京中杉生物技术有限公司产品。

1.2　细胞培养和腺病毒的扩增纯化

参考文献[3]方法进行。

1.3　实验分组及病毒感染方法

实验分为 4 组，即空白对照组，AdGFP 感染组和 AdBMP2 感染组和 AdBMP6 感染组。MG63 和 U2OS 细胞接种于 24 孔板，当细胞融和达 70% ~80% 时进行实验干预，即分别加入相同滴度的病毒，于37 ℃、5% CO_2 的饱和湿度箱中继续培养和观察。

1.4　Western blot 法确认病毒感染后 BMP-2 和 BMP-6 的表达

参考文献[3]方法进行。

1.5　细胞增殖能力检测

根据实验分组培养细胞，分别于感染后 24、48、72 h 以台盼蓝染色计数活细胞和死细胞，按以下公式计算细胞存活率：

细胞存活率（%）= 活细胞总数/（活细胞总数 + 死细胞总数）×100%

1.6　细胞凋亡率检测

1.6.1　TUNEL 法　　0.25% 胰酶消化病毒感染后不同时间点的 MG63 和 U2OS 细胞，制成细胞涂片，4% 多聚甲醛固定 1 h，按 Roche 公司 TUNEL-POD 试剂盒说明书进行。

1.6.2　AO/EB 荧光双染法　　用 0.25% 胰酶消化病毒感染后不同时间点的 MG63 和 U2OS 细胞，各取细胞悬液 100 μl，加 AO/EB 混合荧光染料 4 ml 混匀，滴于载玻片上，荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。400 倍镜下计数，按下式计算凋亡率，取平均值：

凋亡率 =（早期凋亡细胞 + 晚期凋亡细胞）/（正常细胞 + 坏死细胞 + 早期凋亡细胞 + 晚期凋亡细胞）×100%

1.7　细胞迁移能力检测

用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞，制成单细胞悬液，在每个 Transwell 小室的上腔中加入 1.0×10^4 细胞，下腔中加入 500 μl 含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液。培养 24 h 后，各上腔分别加入 AdGFP、AdBMP-2 和 AdBMP-6 于感染后不同时间点随机选择 5 个 400 倍显微视野，计数视野中细胞数目。

1.8　细胞碱性磷酸酶（ALP）活性检测

分别于感染后 1、3、5、7、9 d 后弃去培养液，0.01 mol/L PBS 漂洗细胞 3 次，用细胞裂解液裂解细胞，各取 100 μl 细胞裂解液与 1 ml ALP 反应底物混匀，反应 3 min 后在酶标仪 405 nm 波长下读数 ALP 活性值，取平均值进行统计学处理。

1.9　统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析。

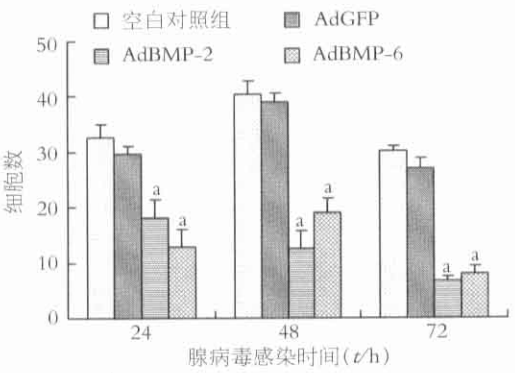
2　结果

2.1　腺病毒介导的 BMP-2 和 BMP-6 在 MG63 和 U2OS 细胞中的表达

感染腺病毒 AdBMP-2 和 AdBMP-6 后，MG63 和 U2OS 细胞中均有绿色荧光蛋白表达，表达荧光蛋白细胞的比例在 90% 以上，示病毒感染成功。两种细胞本身表达一定量的 BMP-2、BMP-6；AdBMP-2 和 AdBMP-6 感染后，其 BMP-2、BMP-6 的表达水平明显高于对照组，提示病毒携带的 BMP-2、BMP-6 在被感染的细胞中成功表达。

2.2　BMP-2、BMP-6 对 MG63 和 U2OS 细胞增殖能力的作用

实验组两种细胞的存活率在 72 h 时显著降低，仅为 AdGFP 组的 10.1% ~10.7%，具有显著性差异（$P < 0.01$）（图 1），提示 BMP-2、BMP-6 均能够抑制 MG63 和 U2OS 细胞的增殖能力。

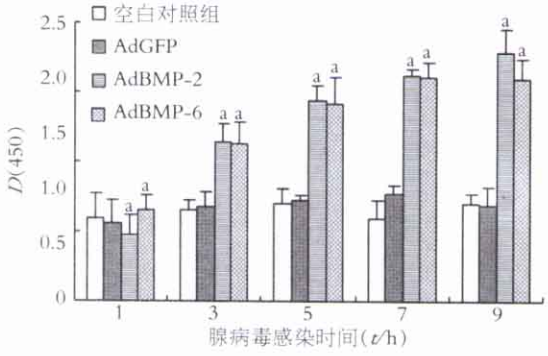


a：$P < 0.01$，与空白对照组和 AdGFP 对照组比较

图 1　BMP-2、BMP-6 对 U2OS 细胞存活率影响

2.3　BMP-2 和-6 对 MG63 和 U2OS 细胞凋亡的影响

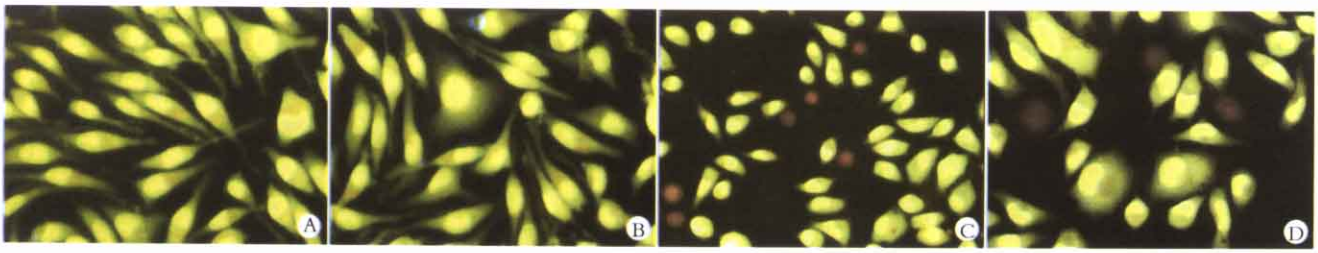
2.3.1　TUNEL 法　　在 3 个观察点，每株细胞的两个对照组的凋亡率均无明显变化（$P > 0.01$）；实验组的凋亡率则呈时间依赖性增加，如 AdBMP-2-MG63 组是 AdGFP-MG63 组的 2.7 ~ 21.5 倍（图 2），AdBMP-2-U2OS 组是 AdGFP-U2OS 组的 2.4 ~ 19.8 倍，均有显著性差异（$P < 0.01$）。AdBMP-6 对诱导两株细胞的凋亡作用与 AdBMP-2 相似。提示 BMP-2 和 BMP-6 有诱导 MG63 和 U2OS 细胞凋亡的作用。



a:$P<0.01$,与空白对照组和 AdGFP 对照组比较

图2 BMP-2、BMP-6 对 MG63 凋亡的影响

2.3.2 AO/EB 荧光双染法 如图3所示,AdGFP 感染后荧光显微镜下可见少数凋亡细胞(与空白对照相似);AdBMP-2 感染 48 h 后可见较多的凋亡细胞。正常细胞细胞核染色质结构正常、细胞膜完整和着均匀绿色;凋亡细胞分为两种,细胞核呈黄绿色荧光者为早期凋亡细胞,其核浓聚成新月形或颗粒状,并位于一侧;细胞核呈橘红色,浓聚与偏侧者为晚期凋亡细胞。该法所检测到的凋亡率变化与 TUNEL 法结果是一致的,即实验组的凋亡率则呈时间依赖性增加,其中 AdBMP-2-MG63 细胞是 AdGFP-MG63 组的 2.5 ~ 22.9 倍,AdBMP-2-U2OS 组是 AdGFP-U2OS 组的 1.2 ~ 16.5 倍,均有显著性差异($P<0.01$)。用 AdBMP-6 感染这两株细胞,所得结果与 AdBMP-2 类似,进一步证实了 BMP-2 和 BMP-6 能够诱导 MG63 和 U2OS 细胞凋亡。

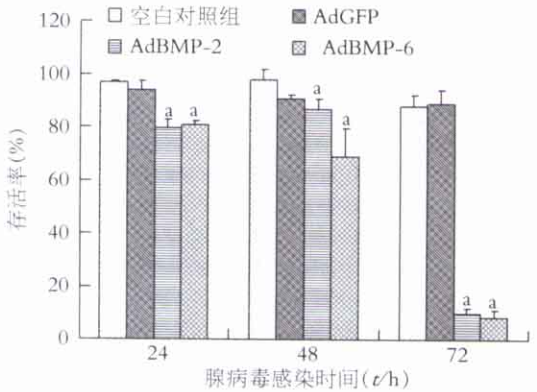


A: 空白对照组; B: AdGFP; C: AdBMP-2; D: AdBMP-6

图3 AO/EB 荧光双染法检测 BMP-2 和 BMP-6 对 MG63 和 U2OS 细胞凋亡的作用 (×400)

2.4 BMP-2 和 BMP-6 对 MG63 和 U2OS 细胞迁移能力的影响

显微镜下细胞计数结果显示,两株细胞的实验组的穿膜细胞数明显低于空白对照组和 AdGFP 组,并且随着实验时间延长,实验组穿膜的细胞数则逐渐减少(图4)。例如,AdBMP-2-MG63 组较 AdGFP-MG63 组降低 49.0% ~ 94.6%,AdBMP-2-U2OS 组较 AdGFP-U2OS 组降低 38.4% ~ 82.8%,均具有显著性差异($P<0.01$)。用 AdBMP-6 感染这两株细胞后,穿膜实验结果与 AdBMP-2 组相似。实验提示 BMP-2 和 BMP-6 可以降低 MG63 和 U2OS 细胞的迁移能力。

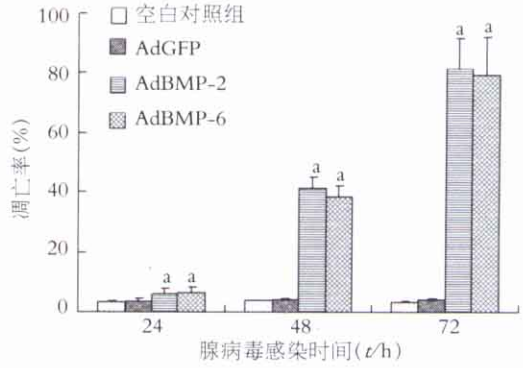


a:$P<0.01$,与空白对照组和 AdGFP 对照组比较

图4 BMP-2、BMP-6 对 U2OS 细胞迁移能力的影响

2.5 BMP-2 和 BMP-6 对 MG63 和 U2OS 细胞的 ALP 活性的影响

在感染后 1、3、5、7、9 d 共 5 个时间点上每株细胞的两个对照组之间 ALP 活性差异无显著性($P>0.05$);而实验组 ALP 则呈时间依赖性增加,在感染后 5、7、9 d,AdBMP-2-MG63 组较 AdGFP-MG63 组增加 99% ~ 157%(图5),AdBMP-6-U2OS 组较 AdGFP-U2OS 组增加 95% ~ 130%,均有显著性差异($P<0.01$)。提示 BMP-2 和 BMP-6 可以增加 MG63 和 U2OS 细胞的 ALP 酶活性。



a:$P<0.01$,与空白对照组和 AdGFP 对照组比较

图5 BMP-2、BMP-6 对 MG63 细胞 ALP 活性的影响

3 讨论

BMPs 是一类具有高效诱骨活性的蛋白质,能够诱导未分化的间充质干细胞向骨细胞[4]和软骨细胞方向分化,在骨折和骨缺损的治疗中具有广泛的用途;几个重组的 BMPs,如 BMP-2、BMP-7 和 BMP-9,已经显示在活体内具有明显的诱导骨形成的作用[5],其中

BMP-2 和 BMP-7 已经在临床试用于开放性胫骨骨干骨折和牙槽嵴缺损[6,7]。除诱导骨形成的作用外，BMPs 还具有抑制肿瘤细胞生长和促进凋亡作用。

BMP-2 是 BMP 家族中发现最早、研究最多的一员。已有研究表明，BMP-2 对一些肿瘤的生长无促进作用或者对肿瘤生长和转移有抑制作用，包括结肠癌、前列腺癌、骨髓瘤、卵巢癌、非小细胞肺癌和胶质瘤等；Waite 等发现 BMP-2 可以通过减少肿瘤抑制因子 PTEN 蛋白的降解来快速增加乳腺癌细胞株 MCF-7 中 PTEN 蛋白的水平，从而抑制其增殖；同时，BMP-2 在正常结肠上皮的表达和其促进成熟结肠上皮细胞凋亡作用以及在家族性多发性腺瘤患者的微腺瘤上的表达缺失，也提示 BMP-2 是肿瘤抑制因子[1]。但是，也有报道 BMPs 的拮抗剂 Noggin 和反义 BMP-2 等可以明显抑制 BMP-2 的活性，使肺癌瘤细胞株 A549 和 H7249 的生长明显减缓[2]；体内实验也显示 BMP-2 可以通过激活血管的生成而促进肿瘤的发生[8]。BMP-6 与 BMP-2 的生物学功能极其相似，同样具有促进骨组织再生的功能，也有报道显示 BMP-6 可以抑制骨髓瘤细胞的生长[9]；尚少见 BMP-6 促进肿瘤或肿瘤细胞株增殖的报道。

关于 BMPs 对骨肉瘤作用的报道较少，且也不尽一致；Huang 等[10]报道 BMP-2 可以促进大鼠骨肉瘤细胞株 UMR106 的成骨分化；Orui 等[11]发现 BMP-2 对人骨肉瘤细胞株 NOS-1、HuO9 和 HuO-3N1 没有促进增殖的作用，还可以引起 NOS-1 细胞的成骨分化；但岳文等[12,13]报道用反义 BMP-2 逆转录病毒载体和抗 BMP-2 的抗体可以使骨肉瘤细胞（OS-9901 和 OS-732）的增殖活性降低，认为 BMP-2 具有促进骨肉瘤细胞体外增殖的作用。目前尚少见 BMP-6 对骨肉瘤作用的报道。我们在前期的研究中还发现，BMPs 有促进骨肉瘤细胞 TE-85 向成骨分化的作用[3]，与 Orui 等[11]的发现一致。

本实验选用重组腺病毒 AdBMP-2 和 AdBMP-6 体外感染细胞的方式来进一步探讨 BMP-2 和 BMP-6 对人骨肉瘤的作用，结果表明 BMP-2 和 BMP-6 对人骨肉瘤细胞株 MG63 和 U2OS 都具有抑制增殖和迁移、诱导凋亡的作用。ALP 是成骨细胞的早期标志酶，在成骨过程中水解磷酸酯，为羟基磷灰石的沉积提供必要的磷酸，有利于成骨，是成骨分化开始的标志物。我们发现 BMP-2 和 BMP-6 能够使 MG63 和 U2OS 细胞的 ALP 活性明显增加，进一步证实了我们前期的结果以及 Orui 等[11]的发现，即 BMP-2 和 BMP-6 可能具有促进骨肉瘤细胞分化为成骨细胞的作用。

BMP-2 和 BMP-6 可能抑制骨肉瘤细胞的生长和转移、诱导其凋亡，并促使其向成骨方向分化，这提示外源性 BMP-2 和 BMP-6 的应用可能成为骨肉瘤综合治疗的有力手段之一，既促进骨缺损的修复，又有助于降低骨肉瘤的复发率和转移率；这将为 BMP-2 和 BMP-6 的临床应用开辟新领域。但是，目前仅仅是体外的研究结果，尚需更多的工作进一步证实。

参考文献：

[1] Hardwick J C, Van-Den-Brink G R, Bleuming S A, *et al*. Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon[J]. Gastroenterology, 2004, 126(1): 111 - 121.

[2] Langenfeld E M, Calvano S E, Abou-Nukta F, *et al*. The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells[J]. Carcinogenesis, 2003, 24(9): 1445 - 1554.

[3] Cheng H, Jiang W, Phillips F M, *et al*. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs) [J]. J Bone Joint Surg Am, 2003, 85-A(8): 1544 - 1552.

[4] 段小军，杨　柳，王铁翔，等. 骨形态发生蛋白对人骨髓基质细胞的体外成骨分化影响[J]. 第三军医大学学报，2002，24(5)：534 - 536.

[5] Le A X, Miclau T, Hu D, *et al*. Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures[J]. J Orthop Res, 2001, 19(1): 78 - 84.

[6] Valentin-Opran A, Wozney J, Csimma C, *et al*. Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2[J]. Clin Orthop Relat Res, 2002, (395): 110 - 120.

[7] Partridge K, Yang X, Clarke N M, *et al*. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: *in vitro* and *in vivo* bone formation on biodegradable polymer scaffolds[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 292(1): 144 - 152.

[8] Langenfeld E M, Langenfeld J. Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors [J]. Mol Cancer Res, 2004, 2(3): 141 - 149.

[9] Ro T B, Holt R U, Brenne A T, *et al*. Bone morphogenetic protein-5, -6 and -7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells [J]. Oncogene, 2004, 23(17): 3024 - 3032.

[10] Huang W, Rudkin G H, Carlsen B, *et al*. Overexpression of BMP-2 modulates morphology, growth, and gene expression in osteoblastic cells[J]. Exp Cell Res, 2002, 274(2): 226 - 234.

[11] Orui H, Imaizumi S, Ogino T, *et al*. Effects of bone morphogenetic protein-2 on human tumor cell growth and differentiation: a preliminary report[J]. J Orthop Sci, 2000, 5(6): 600 - 604.

[12] 岳　文，杨连甲，晏　伟，等. 反义人骨形态发生蛋白 2 基因逆转录病毒表达载体的构建及其对骨肉瘤细胞生物学行为的影响[J]. 中华骨科杂志，2000，20(9)：525 - 528.

[13] 岳　文，杨连甲，马　明，等. 体内和体外实验观察骨形成蛋白在骨肉瘤中的作用[J]. 口腔颌面外科杂志，2000，10(3)：222 - 224.

（编辑　张大春）