论著

文章编号:1000-5404(2011)12-1240-03

Noggin蛋白对MCF-7细胞增殖、侵袭能力的影响

郭 丹,龚建平,孙治君,印国兵 (400016 重庆,重庆医科大学附属第二医院乳腺外科)

【摘要】 **目的** 观察Noggin蛋白对乳腺癌细胞MCF-7增殖、侵袭能力的影响。**方法** 以Noggin重组腺病毒感染乳腺癌细胞株MCF-7,MTT法检测Noggin对MCF-7细胞增殖能力的影响,划痕修复实验及Transwell细胞侵袭实验检测其运动和侵袭能力的改变,Real-time PCR和Western blot检测CXCR4和MMP1基因的表达改变。**结果** 过表达Noggin蛋白的MCF-7细胞增殖能力增强($P<0.05$);划痕修复实验提示过表达Noggin蛋白的MCF-7细胞划痕愈合延迟;Transwell细胞侵袭实验提示与空病毒组相比,Noggin组穿膜细胞数显著降低(55 ± 4 *vs* 25 ± 3, $P<0.05$)。RT-PCR和Western blot结果:过表达Noggin后,MCF-7细胞中CXCR4和MMP1基因表达下调。**结论** Noggin蛋白可抑制乳腺癌细胞MCF-7的运动和迁移,可能与下调CXCR4和MMP1基因的表达相关。

【关键词】 Noggin;肿瘤细胞,培养的;细胞系,肿瘤;细胞增殖;肿瘤侵润
【中图法分类号】 R341;R73-362;R737.9 【文献标志码】 A

Effect of noggin protein on proliferation and invasion of breast cancer MCF-7 cells

Guo Dan, Gong Jianping, Sun Zhijun, Yin Guobing (Department of Breast Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To observe the effect of noggin protein on proliferation and invasion of breast cancer MCF-7 cells. **Methods** MCF-7 cells were infected with recombinant noggin adenovirus. Effect of noggin protein on proliferation of MCF-7 breast cancer cells was detected by MTT assay. Changes in movement and invasion of MCF-7 breast cancer cells were examined by cell scratching test and trans-well cell invasion experiment. Expression of MMP-1 and CXCR4 was assayed by real-time PCR and Western blotting. **Results** The proliferation of MCF-7 cells in over-expressed noggin protein was increased ($P<0.05$). Scratching test showed that the healing of scratched MCF-7 breast cancer cells was delayed in over-expressed noggin protein. Trans-well cell invasion experiment showed that the number of MCF-7 breast cancer cells that penetrated the cell membrane was significantly less in noggin group than in GFP group (25 ± 3 *vs* 55 ± 4, $P<0.05$). Real-time PCR and Western blotting showed that the expression of CXCR4 and MMP1 was down-regulated in MCF-7 breast cancer cells when the noggin protein was over-expressed. **Conclusion** Noggin protein can inhibit the movement and migration of MCF-7 breast cancer cells by down-regulating the expression of CXCR4 and MMP1.

【**Key words**】 Noggin; tumor cells, cultured; cell line, tumor; cell proliferation; tumor invasiveness

Supported by the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2010-2-157). Corresponding author: Yin Guobing, E-mail: e1973814@126.com

近年来,骨形态发生蛋白BMPs在乳腺癌骨转移中的作用已得到重视,但机制仍不清楚[1]。Noggin蛋白是BMPs重要的细胞外拮抗剂,可有效地将BMPs上的受体结合位点遮蔽,从而抑制BMPs与其受体结合,尤其是阻断BMP2、4和7与受体的结合。BMPs/Noggin在多种原发性和转移性骨肿瘤的发生和发展中都具有重要作用。在我们的前期研究[2]中发现,MCF-7细胞广泛表达BMPs,尤其是BMP7的表达较高。说明在MCF-7细胞中,BMPs可能同样参与了其增殖转移的调节,尤其是BMP7可能与骨转移的关系较为密切。本研究中我们拟探讨Noggin蛋白在乳腺癌细胞MCF-7中是否可以阻断BMPs的作用,对其生物学行为产生影响。以期为乳腺癌骨转移的临床治疗提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

腺病毒Noggin(美国芝加哥大学分子肿瘤实验室馈赠);人乳腺癌细胞株MCF-7由本实验室保存;其他如RT及PCR相关试剂、DNA Marker、Trizol(TaKaRa公司);细胞培养相关试剂(HyClone公司);Transwell小室(Millipore公司);人工基质胶(ECM,Sigma公司);细胞裂解液,BCA蛋白浓度测定(碧云天公司),抗体(RD公司)为市售。

1.2 方法

1.2.1 MTT法测定细胞生长曲线 接种人乳腺癌细胞株

【基金项目】 重庆市卫生局课题(2010-2-157)
【通信作者】 印国兵,E-mail:e1973814@126.com

MCF-7 于 T-25 细胞培养瓶，分别感染腺病毒 Ad-RFP 和 Ad-Noggin。感染后第 2 天检测荧光表达率一致，消化吹打细胞至单细胞悬液并以 1×10^4/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板，每组 10 个复孔，连续计数 5 d。计数方法：每日取出 1 个 96 孔板，每孔加入 20 μl MTT（5 mg/ml），4 h 后去上清，加入二甲亚砜 150 μl。摇床震荡 10 min，在酶标仪（Thermo，USA）以波长 570 nm测定光密度值[*D*(570)]，取均值后以时间为横坐标，光密度值为纵坐标绘制细胞生长曲线。实验重复 3 次。

1.2.2　划痕修复实验　　接种人乳腺癌细胞株 MCF-7 于 6 孔细胞培养板，分别感染腺病毒 Ad-RFP 和 Ad-Noggin，感染后第 2 天观察感染效率一致。待细胞融合度达 100% 后，轻轻划痕，于 12、24、36 h 观察划痕的损伤修复情况。实验重复 3 次。

1.2.3　Transwell 细胞侵袭实验　　Transwell 小室中加入 32 μl 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 MCF-7 分别感染腺病毒 Ad-RFP 和 Ad-Noggin，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 μl 加入上室中，在下室中加入 600 μl 含 20% FBS 的 DMEM 培养液。每组设 3 个平行样本，置 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱内培养 30 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。显微镜下观察穿膜细胞，并随机取高倍镜下 5 个视野计数取均值。实验重复 3 次。

1.2.4　Real-time PCR 检测 MMP1 和 CXCL4 基因表达的改变　　接种人乳腺癌细胞株 MCF-7 于 T-25 细胞培养瓶，分别感染腺病毒 Ad-RFP 和 Ad-Noggin。感染后第 2 天检测荧光表达率一致，Trizol 法提取总 RNA，逆转录获得 cDNA。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。引物序列如下：GAPDH 上游 5′-GGCTGCCCAGAACATCAT-3′，下游 5′-CGGACACATTGGGGGTAG-3′；MMP1 上游 5′-TGTCTCACAGCTTCCCAGCGACTC-3′，下游 5′-CAGGGTTTCAGCATCTGGTTTCC-3′；CXCR4 上游 5′-CGACCTCCTCTTTGTCATCACGC-3′，下游 5′-CAGACGCCAACATAGACCACCTT-3′。

1.2.5　Western blot 检测相关基因蛋白水平表达的改变　　同上处理细胞后第 3 天收集细胞，常规提取总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度，变性后分装保存。取 20 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，转膜后 5% BSA 封闭，1∶500 稀释一抗 4 ℃孵育过夜，TBST 洗膜后二抗 37 ℃孵育 1 h，再次洗膜后加入 ECL 发光试剂，显影，CCD 采集图像，保存。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析，实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间差异采用成组设计 *t* 检验。

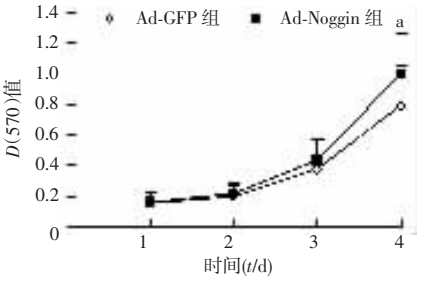
2　结果

2.1　细胞增殖能力

结果显示与对照（Ad-GFP）组相比，随着培养时间的延长，Ad-Noggin 组 *D*(570) 值逐步上升，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。说明过表达 Noggin 基因可促进 MCF-7 细胞的增殖（图 1）。

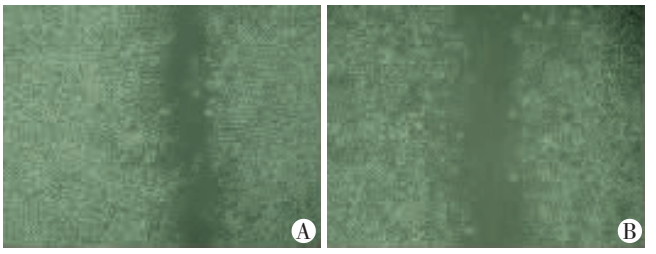
2.2　划痕修复实验

与对照组相比，Ad-Noggin 组划痕愈合延迟。在划痕后36 h 观察，对照组的愈合已达到 60%～70%，而 Ad-Noggin 组愈合为 30%～40%。见图 2。



a：$P<0.05$，与 Ad-GFP 组比较

图 1　MTT 法检测 Noggin 基因对 MCF-7 细胞增殖能力的影响

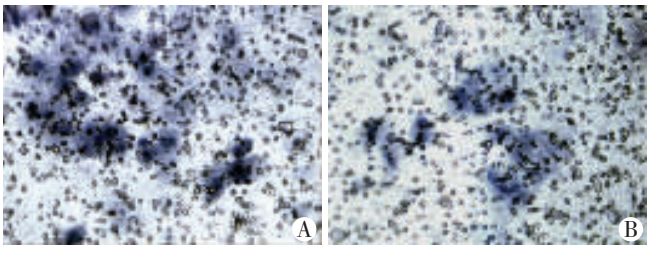


A：Ad-GFP 组；B：Ad-Noggin 组

图 2　划痕修复实验检测 Noggin 基因对 MCF-7 细胞迁移能力的影响（×100）

2.3　Transwell 细胞侵袭实验

与对照组相比（55 ± 4），Ad-Noggin 组穿膜细胞数降低（25 ± 3），差异具有统计学意义（$P<0.05$，图 3）。

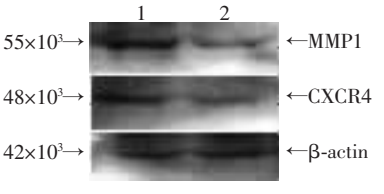


A：Ad-GFP 组；B：Ad-Noggin 组

图 3　Transwell 细胞侵袭实验检测过表达 Noggin 基因对 MCF-7 细胞侵袭能力的影响（×200）

2.4　Real-time PCR 及 Western blot 检测相关基因蛋白水平表达的改变

结果显示与对照组（MMP1、CXCR4 表达均数均为 1）相比，Ad-Noggin 组 MMP1 基因表达为（0.472 ± 0.101），下降约 53%，CXCR4 的表达均数为（0.293 ± 0.037），下降约 71%，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。Western blot 检测得出相同结论[MMP-1：（1.897 ± 0.336）*vs*（0.474 ± 0.080）；CXCR4：（1.632 ± 0.303）*vs*（0.540 ± 0.108）；$P<0.05$]。见图 4。



1：Ad-GFP 组 2：Ad-Noggin 组

图 4　Western blot 检测过表达 Noggin 基因对 MMP1 和 CXCR4 表达的影响

3 讨论

本实验以腺病毒 Noggin 感染 MCF-7 细胞，发现过表达 Noggin 蛋白的 MCF-7 细胞增殖加快，但划痕愈合的时间减慢，Transwell 检测穿膜细胞数降低。说明外源性的 Noggin 蛋白可降低乳腺癌细胞株 MCF-7 的侵袭和转移。为了进一步研究 Noggin 蛋白降低 MCF-7 侵袭和转移的机制，我们检测了一些肿瘤转移相关基因的改变，如 MMP1 和 CXCR4。MMP 是溶解细胞外基质（ECM）的一组酶类，存在于乳腺癌细胞表面的 MMP 能降解其下面的基底膜，从而穿透基质并发生转移。研究[3]发现 MMP1 在溶骨性骨转移初始阶段是必需的，阻断人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中 MMP1 的表达，其体外溶胶原活性下降，在动物体内的成瘤体积也减小。CXCR4 属 G 蛋白偶联受体超家族，是一类重要的趋化因子受体，是乳腺癌骨转移的关键因子之一。成骨细胞分泌的趋化因子 SDF-1（CXCL12）和乳腺癌细胞表面趋化因子受体 CXCR4 的结合在乳腺癌的特异性骨转移过程中起着非常重要的作用。抑制 CXCR4 的表达可抑制乳腺癌的骨转移和肺转移[4]，近期研究[5]发现在激素受体阳性的乳腺癌患者中，高 CXCR4 的表达还可作为预后不良的指标之一。在本实验中我们发现导入外源基因 Noggin 后，乳腺癌细胞 MCF-7 中 MMP1 和 CXCR4 表达均降低，结合其生物学特性的改变，说明 Noggin 蛋白可以一定程度减轻乳腺癌细胞的侵袭和转移，其机制可能是通过降低 MMP1 和 CXCR4 表达。该研究为临床乳腺癌骨转移的治疗提供了新的实验室依据。

乳腺癌是常见的“亲骨性”肿瘤之一。文献报告大约有 70% 的乳腺癌可发生骨转移，且通常是溶骨性损伤。当骨转移发生后，局部可出现持续性疼痛、脊髓压迫、高血钙症和病理性骨折，严重影响患者的生活质量，增加死亡率。骨形态发生蛋白 BMPs 是转化生长因子 β 超家族的成员之一，因其在骨发育中的重要性提示与肿瘤的骨转移密切相关。研究[6]发现 BMP10 与乳腺癌的预后不良有关，BMP2 和 BMP4 可促进乳腺癌细胞株的转移和侵润[7-8]。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[9]，但机制并不清楚。Noggin 蛋白可通过与 BMPs 特异性结合阻止 BMPs 与细胞表面的受体结合，抑制 BMPs 功能的发挥。通过 RNA 干扰阻断 Noggin 基因的表达，可促进 BMPs 的成骨作用，从而有利于骨损伤的恢复[10]。同样，Noggin 对 BMPs 的这种抑制作用，也可以作为治疗表达 BMP 肿瘤的一种有效手段。在前列腺癌骨转移的研究中发现，Noggin 在体外实验中能够抑制成骨性和破骨性前列腺转移癌细胞的生长、增殖、侵袭和转移能力，并且应用过度表达 Noggin 的逆转录病毒载体还可以在体内明显抑制成骨性和破骨性前列腺转移癌病灶的大小[11-13]。本研究也得到了同样的结果：高表达 Noggin 蛋白可抑制乳腺癌细胞的侵袭和转移。下一步我们将继续观察 Noggin 蛋白在乳腺癌细胞转移到骨后，和骨微环境相互作用中的影响，并进一步于动物体内证实。

参考文献：

[1] 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): 6322-6333.

[2] 郭丹，黄佳祎，印国兵，等. 骨形态发生蛋白在乳腺癌增殖、转移中作用的初步筛选[J]. 重庆医学，2010，39(7)：807-809.

[3] Wyatt C A, Geoghegan J C, Brinckerhoff C E. Short hairpin RNA-mediated inhibition of matrix metalloproteinase-1 in MDA-231 cells: effects on matrix destruction and tumor growth[J]. Cancer Res, 2005, 65(23): 11101-11108.

[4] Richert M M, Vaidya K S, Mills C N, *et al*. Inhibition of CXCR4 by CTCE-9908 inhibits breast cancer metastasis to lung and bone[J]. Oncol Rep, 2009, 21(3): 761-767.

[5] Chu Q D, Holm N T, Madumere P, *et al*. Chemokine receptor CXCR4 overexpression predicts recurrence for hormone receptor-positive, node-negative breast cancer patients[J]. Surgery, 2011, 149(2): 193-199.

[6] Ye, L, Bokobza S, Li J, *et al*. Bone morphogenetic protein-10 (BMP-10) inhibits aggressiveness of breast cancer cells and correlates with poor prognosis in breast cancer[J]. Cancer Sci, 2010, 101(10): 2137-2144.

[7] Clement J H, Raida M, Sanger 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): 401-407.

[8] Ketolainen J M, Alarmo E L, Tuominen V J, *et al*. Parallel inhibition of cell growth and induction of cell migration and invasion in breast cancer cells by bone morphogenetic protein 4[J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 124(2): 377-386.

[9] 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): 445-455.

[10] Takayama K, Suzuki A, Manaka T, *et al*. RNA interference for noggin enhances the biological activity of bone morphogenetic proteins *in vivo* and *in vitro*[J]. J Bone Miner Metab, 2009, 27(4): 402-411.

[11] Feeley B T, Liu N Q, Conduah A H, *et al*. Mixed metastatic lung cancer lesions in bone are inhibited by noggin overexpression and Rank: Fc administration[J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(10): 1571-1580.

[12] Feeley B T, Krenek L, Liu N, *et al*. Overexpression of noggin inhibits BMP-mediated growth of osteolytic prostate cancer lesions[J]. Bone, 2006, 38(2): 154-166.

[13] Feeley B T, Gamradt S C, Hsu W K, *et al*. Influence of BMPs on the formation of osteoblastic lesions in metastatic prostate cancer[J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(12): 2189-2199.

（收稿：2010-11-04 修回：2010-12-19）

（编辑 邓强庭）