短篇论著

文章编号:1000-5404(2012)18-1910-03

BMP-4基因影响乳腺癌细胞增殖、凋亡和迁移能力涉及NF-κB途径

朱宁生[1],张 婧[2],曾晓华[1],江歌丽[1],刘晓渝[1] (400030 重庆,重庆市肿瘤研究所乳腺中心;510280 广州,南方医科大学第二临床医学院2008级[2])

[摘要] **目的** 探讨骨形态发生蛋白-4(bone morphogenetic protein 4,BMP-4)基因对人乳腺癌MCF-7细胞增殖、凋亡和迁移能力的影响途径。**方法** 通过向乳腺癌MCF-7细胞株转染PET-BMP-4质粒过表达BMP-4;采用RT-PCR、MTT法、Boyden小室培养、Hoechst染色、Western blot方法,检测质粒转染、NF-κB抑制剂吡咯二硫代氨基甲酸盐(pyrrodlidine dthiocarbamate,PDTC)预处理和对照组细胞增殖、凋亡、迁移能力及NF-κB、Bax、Bcl-2水平。**结果** 与空质粒转染组和空白对照组细胞相比,过表达BMP-4基因可导致MCF-7细胞增殖能力升高,凋亡细胞比例降低,细胞迁移能力增强,NF-κB和Bcl-2表达水平升高,Bax表达水平降低($P<0.05$);PDTC预处理后NF-κB和Bcl-2表达水平降低,Bax表达水平升高,显著降低过表达BMP-4对MCF-7细胞的生物学效应($P<0.05$)。**结论** 过表达BMP-4基因可增强乳腺癌MCF-7细胞的增殖和迁移能力并抑制其凋亡,可能与上调NF-κB有关。

[关键词] BMP-4;乳腺癌;增殖;凋亡;迁移;NF-κB
[中图法分类号] R394.2;R730.23;R737.9 [文献标志码] A

乳腺癌是女性患病和死亡人数最高的恶性肿瘤,远处转移是乳腺癌致死的主要原因。骨骼是乳腺癌细胞容易转移的部位,超过肝、肺等部位转移,但是乳腺癌嗜骨转移的机理迄今为止尚待进一步阐明。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是一类可诱导骨形成的生长因子的总称,可通过调节多种细胞生物学行为参与骨骼的正常发育和修复[1]。研究[2]发现BMP-4是在乳腺癌组织中表达最为广泛的BMP家族成员之一,提示其可能参与乳腺癌的发生和发展,但具体作用和可能的机制尚不清楚。NF-κB是一种分布广泛的转录活化因子,是否参与BMP-4对乳腺癌细胞生物学行为的影响尚无文献报道,本研究以乳腺癌MCF-7细胞为模型,观察了过表达BMP-4对乳腺癌细胞生物学行为的影响,并对其可能的机制进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 试剂

人乳腺癌细胞系MCF-7(美国ATCC);Hoechst、PDTC(美国Sigma-Aldrich公司);DMEM培养基、胰蛋白酶(美国Gibco公司);MTT(美国Solarbio公司);β-actin、NF-κB、Bax、Bcl-2多克隆抗体(美国Cell Sigaling Technology公司);Boyden小室(美国Millipore公司);PET-BMP-4表达质粒由本实验室冻存;BMP-4和β-actin引物(大连宝生物技术公司);Lipofectamine2000(美国Invitrogen公司);其他试剂均为市售分析纯(广州化学试剂厂)。

1.2 实验分组

将MCF-7乳癌细胞培养转染后分为:对照组,不进行任何处理;空质粒转染组;质粒转染组,即转染BMP-4质粒;PDTC预处理组,细胞培养后采用NF-κB特异性抑制剂吡咯二硫代氨基甲酸盐进行处理;PDTC预处理组+质粒转染组,在PDTC预处理组后转染BMP-4质粒。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养和细胞转染 采用0.25%的胰蛋白酶(37 ℃预热)消化MCF-7细胞,倒置显微镜观察细胞间隙,待其变大后,加入培养基中止反应,将细胞转于培养皿中,以5×10^5/ml的密度将MCF-7细胞接种到培养皿中(加入10%胎牛血清DMEM培养基),在37 ℃、5% CO_2下培养。待细胞长满后进行传代,3 d换1次液,1周传1~2代。转染前用胰蛋白酶(0.25%)消化细胞并铺板,待细胞生长在85%~90%后在未处理和采用10 mol/L PDTC预处理的MCF细胞分别进行PET-BMP-4质粒转染。转染步骤按Lipofectamine 2000说明书进行。24 h后胰蛋白酶消化并按照1∶10的比例稀释细胞,48 h后加入G418(400 mg/L)进行筛选,经2周左右的筛选可获得阳性单克隆,继续用含G418的培养基扩大培养,8周后可获得稳定表达转染的MCF-7细胞。

1.3.2 细胞BMP-4基因mRNA水平检测 采用RT-PCR检测,具体方法见Alaaeddine等[3]的报道,采用ΔΔ Ct法分析BMP-4的扩增效果,并与β-actin做标准化处理,结果均以$2^{-\Delta\Delta Ct}$来表示。BMP-4引物:上游5′-ACCTCAACTCAACCAACC-3′,下游5′-GTGTGGTATGTGTAGGTGG-3′。β-actin引物:上游5′-TCTTCCAGCCTTCCTTCCTG-3′,下游5′-TAGAGCCACCAATCCACACA-3′。

1.3.3 MTT检测细胞增殖 取不同处理的对数生长期MCF-7

[通信作者] 朱宁生,E-mail:1090409913@qq.com

细胞培养,并制成 1×10^5 ml^{-1} 的细胞悬液,以 200 μl /孔接种到 96 孔培养板中,设 5 个复孔。24 h 后向每孔加入 20 μl MTT (5 mg/ml),继续孵育 4 h 后,加入 DMSO 200 μl/孔,振荡混匀后在全自动酶标仪于波长 490 nm 处测定吸光度值[D(490)]。上述实验重复 3 次。

1.3.4 Hoechst 染色检测细胞凋亡 取对数期细胞制成爬片,加入 0.5 ml Hoechst 33342 染色液,5 min 后 PBS 洗 2 次,将切片置于载玻片上,加入抗淬灭封片液,盖上一洁净的盖玻片,尽量避免气泡。荧光显微镜可检测到呈蓝色的细胞核,在 40× 物镜下,观察每张片子的 Hoechst + 细胞数并计算出平均值。实验重复 3 次。

1.3.5 MCF 细胞迁移实验 采用改良的 Boyden 微孔膜双槽法进行细胞迁移实验,下槽加入 20% 胎牛血清作为趋化刺激物,用 8 μm 孔径的聚碳微孔膜(预先采用 0.01% Gelatin 煮沸处理)隔开上下槽,于上槽加入 0.4 ml 的 2.5×10^5 细胞/ml 细胞悬液(血清浓度为 10%)。将小室置于 37 ℃ 5% CO_2 培养箱,4 h 后将聚碳微孔膜进行 95% 酒精固定(10 min)和 0.5% 甲苯胺蓝染色(40 min),用棉签轻刮去聚碳微孔膜朝上槽的细胞,仅保留下槽细胞,压片后光学显微镜观察,每张膜随机取 5 个高倍视野(×200)并计算细胞数。实验重复 3 次。

1.3.6 相关蛋白水平检测 采用 Western blot 法检测蛋白水平。具体步骤见 Zhu 等[4]的方法,将待用的蛋白样品与上样缓冲液充分混合后煮沸,以每孔 20 μg 的量进行 10% SDS-PAGE 电泳,半干转法转膜,根据要求分别加入 NF-κB、Bax、Bcl-2 的一抗孵育过夜,二抗孵育后行 ECL,采用 Gel-Pro analyzer 分析各条带的光密度,最终结果以 NF-κB、Bax、Bcl-2 和 β-actin 的光密度比值表示。

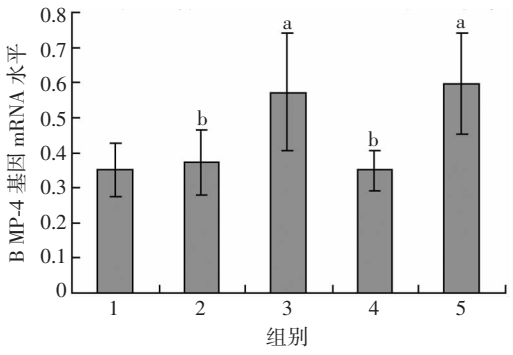
1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件包,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法。

2 结果

2.1 不同处理对 BMP-4 基因 mRNA 水平的影响

空质粒转染和 PDTC 预处理与对照组比较无差异,不影响 BMP-4 mRNA 表达水平;质粒转染组和 PDTC 预处理 + 质粒转染组的表达水平高于对照组,见图 1。



1:对照组; 2:空质粒转染组;3:质粒转染组;4:PDTC 预处理组;5:PDTC预处理 + 质粒转染组;a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与质粒转染组比较

图 1 各组 BMP-4 基因 mRNA 表达水平

2.2 不同处理对细胞增殖的影响

质粒转染组 D(490)值高于对照组和空质粒转染组($P<0.05$),而给予 PDTC 预处理后,质粒转染后吸光值降低,且与对照组没差异;且 PDTC 预处理组的 D(490)值低于对照组($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组 MCF-7 乳腺癌细胞株增殖、凋亡、迁移结果 ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	D(490)	Hoechst + 细胞数	细胞迁移数
对照组	1.34 ± 0.23	60.00 ± 12.12	113.13 ± 18.98
空质粒转染组	1.37 ± 0.27[b]	61.88 ± 11.88[b]	108.25 ± 17.39[b]
质粒转染组	1.65 ± 0.32[a]	46.50 ± 8.83[a]	147.25 ± 30.21[a]
PDTC 处理组	1.20 ± 0.27[ab]	77.38 ± 10.40[ab]	71.13 ± 14.11[ab]
PDTC 处理 + 质粒转染组	1.30 ± 0.29[b]	59.50 ± 7.66[b]	113.00 ± 19.61[b]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与质粒转染组比较

2.3 不同处理对细胞凋亡的影响

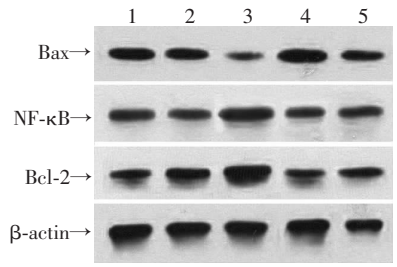
与空质粒转染组和对照组相比,MCF-7 过表达 BMP-4 基因可降低 Hoechst$^+$ 细胞数($P<0.05$);采用 PDTC 预处理,可消除 BMP-4 过表达导致 Hoechst$^+$ 细胞数降低的作用;且 PDTC 预处理组的 Hoechst + 细胞数多于对照组,见表 1。

2.4 不同处理对细胞迁移的影响

与空质粒转染组和对照组相比,MCF-7 过表达 BMP-4 基因可增加迁移细胞数($P<0.05$);采用 PDTC 预处理,可消除 BMP-4 过表达导致迁移细胞数升高的作用;且 PDTC 预处理组的迁移细胞数低于对照组,见表 1。

2.5 不同处理对相关蛋白水平的影响

与空质粒转染组和对照组相比,MCF-7 过表达 BMP-4 基因可降低 Bax 水平,增加 NF-κB 和 Bcl-2 的表达($P<0.05$);采用 PDTC 预处理,可消除 BMP-4 过表达导致的 Bax 水平降低和 NF-κB、Bcl-2 升高的效应;且 PDTC 预处理组的 Bax 水平高于对照组,NF-κB、Bcl-2 水平低于对照组($P<0.05$),见图 2、表 2。



1:对照组; 2:空质粒转染组;3:质粒转染组;4:PDTC 预处理组;5:PDTC预处理 + 质粒转染组

图 2 Western blot 检测各组 Bax、NF-κB、Bcl-2 蛋白的表达

表 2 各组 Bax、NF-κB、Bcl-2 蛋白相对表达量 ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	Bax	NF-κB	Bcl-2
对照组	0.40 ± 0.08	0.46 ± 0.12	0.23 ± 0.05
空质粒转染组	0.38 ± 0.09[b]	0.50 ± 0.07[b]	0.26 ± 0.08[b]
质粒转染组	0.27 ± 0.09[a]	0.63 ± 0.16[a]	0.40 ± 0.10[a]
PDTC 处理组	0.66 ± 0.07[ab]	0.34 ± 0.05[ab]	0.17 ± 0.06[ab]
PDTC 处理 + 质粒转染组	0.39 ± 0.11[b]	0.50 ± 0.07[b]	0.25 ± 0.06[b]

a: $P<0.05$,与对照组比较; b:$P<0.05$,与质粒转染组比较

3 讨论

乳腺癌是常见的恶性肿瘤之一,发生转移的乳腺癌患者中有65% ~75%发生骨转移[5]。BMPs是一大类细胞因子,不仅可诱导骨和软骨的形成,而且可调节多种细胞学行为,包括细胞的增殖、分化、凋亡以及黏附和侵袭等[6]。BMP-4是BMPs中的一员,研究[7-8]表明可能参与肿瘤的发生、发展,如在颌面部恶性神经鞘瘤中发现BMP-4 mRNA的表达,肿瘤浸润深、分化程度高及有淋巴结转移的肺癌患者的BMP-4阳性率要高于浸润浅、分化程度低及无淋巴结转移者。已有研究[2]显示BMP-4在乳腺癌组织中广泛表达,新近研究[9]显示BMP-4可促进乳腺癌细胞的侵袭及迁移能力,同时发现BMP-4在MCF-7细胞中表达相对较低。因此,本实验选择MCF-7细胞作为BMP-4过表达实验细胞模型,进一步研究BMP-4在乳腺癌的发生、发展中的作用及其可能的机制。

本研究发现过表达BMP-4可导致NF-κB蛋白水平上升,BMP-4转染组细胞迁移水平较空质粒转染和对照组明显提高,BMP-4转染组经过PDTC处理后细胞迁移水平显著低于处理前,调控NF-κB蛋白量可改变BMP-4转染乳腺癌细胞的迁移水平,提示NF-κB的蛋白水平与过表达BMP-4基因乳腺癌细胞的迁移水平有关,有研究显示NF-κB通过上调肿瘤细胞起重要迁移作用的表皮生长因子、基质金属蛋白酶等细胞因子,来促进其转移[10-11]。过表达BMP-4基因乳腺癌细胞的增殖能力也较空质粒转染和对照组明显增强,PDTC处理后较处理前细胞增殖能力显著下降。过表达BMP-4基因乳腺癌细胞Hoechst$^+$细胞数量较空质粒转染和对照组显著减少,PDTC处理后Hoechst$^+$细胞数量较处理前显著增多,这与过表达BMP-4基因可导致Bax下降、Bcl-2上升,抑制细胞凋亡,而PDTC预处理后Bax上升、Bcl-2下降,调控细胞凋亡的现象有关;过表达BMP-4基因PDTC预处理后Bax和Bcl-2水平与对照组没有差异,提示BMP-4可能是先通过激活NF-κB来调节Bax和Bcl-2水平,抑制细胞凋亡。

本研究显示过表达BMP-4可增强MCF-7乳腺癌细胞的增殖和迁移能力并抑制其凋亡,采用PDTC阻断NF-κB信号通路,能显著影响过表达BMP-4对MCF-7乳腺癌细胞的生物学效应,提示BMP-4基因影响乳腺癌细胞增殖、凋亡和迁移能力涉及NF-κB途径。

参考文献:

[1] Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, *et al*. Bone morphogenetic proteins: a critical review [J]. Cell Signal, 2011, 23(4): 609 - 620.

[2] Alarmo E L, Kuukasjarvi T, Karhu R, *et al*. A comprehensive expression survey of bone morphogenetic proteins in breast cancer highlights the importance of BMP4 and BMP7 [J]. Breast Cancer Res Treat, 2007, 103(2): 239 - 246.

[3] Alaaeddine N, De-Montigny C, Sadouk M. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction quantification of tumor necrosis factor alpha messenger in human leukocytes [J]. Clin Lab, 2011, 57(9/10): 799 - 802.

[4] Zhu Y, Li T, Song J, *et al*. The TIR/BB-loop mimetic AS-1 prevents cardiac hypertrophy by inhibiting IL-1R-mediated MyD88-dependent signaling [J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106(5): 787 - 799.

[5] 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.

[6] Zara J N, Siu R K, Zhang X, *et al*. High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo [J]. Tissue Eng Part A, 2011, 17(9/10): 1389 - 1399.

[7] Xin H, Li Y, Chen X, *et al*. Bone marrow stromal cells induce BMP2/4 production in oxygen-glucose-deprived astrocytes, which promotes an astrocytic phenotype in adult subventricular progenitor cells [J]. J Neurosci Res, 2006, 83(8): 1485 - 1493.

[8] Jeffery T K, Upton P D, Trembath R C, *et al*. BMP4 inhibits proliferation and promotes myocyte differentiation of lung fibroblasts via Smad1 and JNK pathways [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(2): L370 - L378.

[9] Guo D, Huang J, Gong J. Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) is required for migration and invasion of breast cancer[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 363(1/2): 179 - 190.

[10] Yamanaka Y, Karuppaiah K, Abu-Amer Y. Polyubiquitination events mediate polymethylmethacrylate (PMMA) particle activation of NF-kappaB pathway [J]. J Biol Chem, 2011, 286(27): 23735 - 23741.

[11] 吴昆鹏, 戴永武, 杨巧珠, 等. NF-κB信号通路与骨质疏松[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(19): 3852 - 3855.

(**收稿**:2012-05-27;**修回**:2012-07-23)

(编辑 汪勤俭)