DOI:10.16016/j.1000-5404.201409140

论著

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

李宏维[1],叶凯山[1],王栓科[1,2] (730000 兰州,兰州大学第二医院骨科[1];730000 兰州,甘肃省骨关节疾病重点实验室[2])

[摘要] **目的** 研究外源性骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic protein 9,BMP9)过表达对骨肉瘤细胞的影响与 Wnt/β-catenin 信号通路的关系。**方法** 用携带人 BMP9 基因的重组腺病毒 AdBMP9 转染人骨肉瘤细胞 MG63,上调 MG63 中 BMP9 的表达水平;MTT 法检测细胞增殖能力的变化,Hochest 染色法检测细胞凋亡的变化,Transwell 实验检测细胞迁移能力的变化;实时定量 PCR 和 Western blot 分别检测 Wnt/β-catenin 信号通路中相关分子 β-catenin、c-myc、cyclinD1 和 E-cadherin 在 mRNA 和蛋白水平表达的变化。统计分析实验结果。**结果** 获得了过表达 BMP9 的 MG63 细胞;BMP9 能促进 MG63 细胞的增殖、迁移和凋亡;MG63 细胞中 BMP9 的过表达增强了 Wnt/β-catenin 信号通路中相关分子 β-catenin、c-myc、cyclinD1 的表达,减弱了 E-cadherin 的表达。**结论** BMP9 对于骨肉瘤细胞 MG63 具有正性调节作用,该调控作用可能与 Wnt/β-catenin 信号通路相关。

[关键词] BMP9;骨肉瘤;MG63;Wnt/β-catenin 信号通路
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R738.1 [文献标志码] A

Effect of exogenous BMP9 on osteosarcoma MG63 cells and its relationship with Wnt/β-catenin signaling pathway

Li Hongwei[1], Ye Kaishan[1], Wang Shuanke[1,2] ([1]Department of Orthopaedics, the Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000; [2]Key Laboratory of Bone and Joint Diseases, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of exogenous bone morphogenetic protein 9 (BMP9) on osteosarcoma cell line MG63 and its relationship with Wnt/β-catenin signaling pathway. **Methods** Recombinant adenovirus AdBMP9 carrying BMP9 gene was used to up-regulate the expression of BMP9 protein in MG63 cells. Then, MTT assay, Hoechst staining, and Transwell assay were used to detect the cell proliferation, apoptosis, and migration, respectively. The mRNA levels of genes involved in Wnt/β-catenin signaling pathway, including β-catenin, c-myc, cyclinD1 and E-cadherin, were examined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), while the protein levels were determined by Western blotting. **Results** BMP9 protein was over-expressed in the MG63 cells after transfection of recombinant adenovirus. BMP9 could promote the proliferation, apoptosis and migration in the MG63 cells. The over-expression of BMP9 protein up-regulated the expressions of β-catenin, c-myc and cyclinD1, and down-regulated the expression of E-cadherin. **Conclusion** BMP9 can positively regulate the MG63 cells through Wnt/β-catenin signaling pathway.

[**Key words**] BMP9; osteosarcoma; MG63 cells; Wnt/β-catenin signaling pathway

Supported by the Natural Science Research Foundation Plan of Gansu Provincial Department of Science and Technology (1208RJZA272); Corresponding author: Wang Shuanke, E-mail: youhua_huang@163.com

[基金项目] 甘肃省科技厅自然科学研究基金(1208RJZA272)
[通信作者] 王栓科, E-mail:youhua_huang@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141210.1636.008.html(2014-12-10)

骨肉瘤是一种发病率较高的肿瘤,约占骨科恶性肿瘤总数的一半[1],恶性程度高,多发于青少年。其发生的主要机制是成骨细胞增殖过度[2]。尽管治疗模式不断发展,但因肿瘤细胞易侵袭和迁移,仍有20%~40%的患者最终死于骨肉瘤[3]。研究表明Wnt信号通路与骨肉瘤的形成、转移和凋亡过程关系密切[4]。β-catenin是Wnt信号通路中的一种转录激活因子,在多种人体恶性肿瘤如骨肉瘤、乳腺癌和淋巴瘤中均有异常表达,且与肿瘤转移密切相关。β-catenin在细胞中以两种形式存在:一种为结合型,与上皮钙粘附素(E-cadherin)结合于细胞质膜的内表面,在细胞内形成E-cadherin/catenin复合体,介导同种细胞间的粘附;另一种为游离型,参与Wnt信号传导途径,通过核膜进入到细胞核内,与DNA亲和蛋白LEF/TC结合,激活靶基因,其靶基因C-myc、cyclinD1、MMP-7、CD44、Claudin-1等在肿瘤发生、发展过程中扮演了重要的角色[5]。因此,Wnt/β-catenin信号通路的激活是引起肿瘤发生、发展的机制之一[6]。研究表明,β-catenin可以调节间充质干细胞向成骨细胞和软骨细胞的分化,在维持骨和软骨的动态平衡中发挥重要作用[7-9]。因此,Wnt/β-catenin信号通路的激活会促进成骨细胞的过度增殖,同时抑制破骨细胞的作用从而导致骨肉瘤的发生。

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是转录生长因子β(TGFβ)超家族的一员。研究表明BMP2-8在骨肉瘤临床标本中有不同程度的异常表达[10]。但是,BMP9在骨肉瘤发生、发展过程中的作用尚不清楚。本研究拟通过携带BMP9的重组腺病毒转染骨肉瘤细胞MG63,上调BMP9的表达,分析BMP9过表达对肉瘤细胞增殖、迁移和凋亡的影响,以及对Wnt/β-catenin信号通路相关分子的影响,以期对骨肉瘤的诊断和治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 DMEM培养液(美国HyClone公司),胎牛血清(美国HyClone公司),0.25%胰蛋白酶(美国HyClone公司),MTT(美国Sigma公司),细胞凋亡与坏死检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),Transwell小室(美国Corning公司),TRIzol(美国Invitrogen公司),反转录试剂盒(美国Thermo公司),SYBR Premix Ex *Taq* Ⅱ(大连宝生物工程有限公司),RIPA裂解液(美国Sigma公司),BMP9兔多抗、c-myc小鼠多抗(美国Santa Cruz公司),β-catenin兔多抗(江苏碧云天生物技术研究所),cyclinD1兔多抗、E-cadherin兔多抗、山羊抗小鼠和山羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.1.2 腺病毒和细胞株 腺病毒载体AdBMP9和AdGFP(绿色荧光蛋白)均由上海吉满生物科技有限公司构建;人骨肉瘤细胞株MG63购自中国科学院上海细胞库,细胞培养在DMEM培养液中,加入10%胎牛血清,于37 ℃和5% CO_2体积分数的温浴箱中培养,每3天换1次液,待细胞长满培养皿底,用0.25%胰蛋白酶消化,平均分配后完成传代。

1.2 方法

1.2.1 腺病毒干预细胞有效性鉴定 实验分3组:BLK(空白对照)组、AdGFP+MG63(转染空病毒)组、AdBMP9+MG63(转染BMP9)组。将骨肉瘤细胞以1×10^5/孔接种于6孔板,待细胞融合度达到40%时,加入AdGFP或AdBMP9重组腺病毒进行感染。转染培养48 h后,在荧光显微镜下观察报告基因GFP的表达,随后收获细胞提取RNA和蛋白进行目的基因BMP9的表达分析。

1.2.2 MTT法检测细胞增殖 吸弃培养液,加入0.25%胰蛋白酶消化细胞,轻轻吹打后制成单细胞悬液,接种于96孔板中,放置于37 ℃,5% CO_2的孵箱中继续培养,在24、48、72 h 3个时间点分别取出1个96孔板,加入180 μL完全培养基和20 μL事先准备好的MTT溶液,继续培养4 h。1 000 r/min离心后吸弃上清,加入200 μL DMSO,振荡10 min,酶标仪测定490 nm处各孔光密值[D(490)]。每组实验重复3次,计算各组光密值的平均值。

1.2.3 Hoechst染色检测细胞凋亡 吸弃培养液后消化,轻轻吹打制成单细胞悬液,在96孔板中每孔接种1.0×10^4个细胞,加入200 μL培养液,在37 ℃,5% CO_2的孵箱中继续培养,实验分组同1.2.1。分别于24、48、72 h 3个时间点各取出1个96孔板,吸弃培养基,PBS洗涤后加入等量的Hoechst染液,4 ℃条件下孵育30 min,洗涤后荧光显微镜下观察计数。每组实验重复3次,计算平均值。

1.2.4 Transwell实验检测细胞的迁移能力 吸弃培养液,加入0.25%胰蛋白酶消化细胞,轻轻吹打后制成单细胞悬液,以每孔5.0×10^4的细胞量接种于48孔板,实验分组同1.2.1。用不完全培养液(不含胎牛血清)培养细胞24 h后,再次消化细胞并计数,在每个Transwell小室的上腔中接种1.0×10^5个细胞,下腔中加入完全培养液。培养48 h后将小室用95%酒精固定,进行HE染色。在倒置显微镜下计数转移至微孔膜下层的细胞,每组实验重复3次,计算平均值进行统计分析。

1.2.5 实时定量PCR 细胞转染腺病毒24、48、

72 h后,收获细胞,随后按TRIzol试剂说明书收集细胞总RNA,氯仿抽提RNA,按Thermo反转录试剂盒说明书合成cDNA,实时定量PCR反应体系共20 μL(SYBR Premix Ex *Taq* Ⅱ 10 μL,无菌去离子水7 μL,上下游引物各1 μL,cDNA模板1 μL),反应条件(94 ℃预变性10 min;94 ℃变性20 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,35个循环;72 ℃后延伸10 min)。引物序列:BMP9上游引物5′-TTCCTTCAGAGCAAACAGCA-3′,下游引物5′-GTTGTGCTCAAATCCCCATT-3′,片段大小1 597 bp;β-catenin上游引物5′-AAGTTCTTGGCTATTACGACA-3′,下游引物5′-ACAGCACCTTCAGCACT-CT-3′,片段大小1 151 bp;c-myc上游引物5′-ATGACCTCGACTACGACTC-3′,下游引物5′-TTCACCATGTCTCCTCCCAGC-3′,片段大小281 bp;cyclinD1上游引物5′-ATGGAACACCAGCTCCTGTG-3′,下游引物5′-TGTCGGTGTAGATGCACAG-3′,片段大小369 bp;E-cadherin上游引物5′-ATCAAAGGTATCACGGCAAAGG-3′,下游引物5′-CGGAGAGCTCGTCCACGTAT-3′,片段大小211 bp;内参β-actin上游引物5′-CAG CGACACCCACTCCTC-3′,下游引物5′-TGAGGTCCACCACCCTGT-3′,片段大小268 bp。熔解曲线的条件为65~95 ℃,目的基因和β-actin基因表达量根据$2^{-\Delta\Delta Ct}$法获得。

1.2.6 Western blot检测 细胞转染腺病毒培养48 h后,吸弃培养液,加入RIPA裂解液收集细胞总蛋白,并测定蛋白浓度。每个样本取50 μg蛋白,经SDS-PAGE分离蛋白(80 V跑浓缩胶至样品被压成1条线后,增加电压至120~200 V跑完),电转仪转膜60 min;采用2.5%的脱脂奶粉封闭1 h,分别加入1∶500稀释后的BMP9和c-myc,1∶200稀释后的β-catenin,cyclinD1和E-cadherin,4 ℃孵育过夜;洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的1∶1 000稀释的二抗孵育2 h,采用ECL方法显影。

1.3 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件,数值用$\bar{x} \pm s$表示,多组间均数比较采用单因素方差分析。

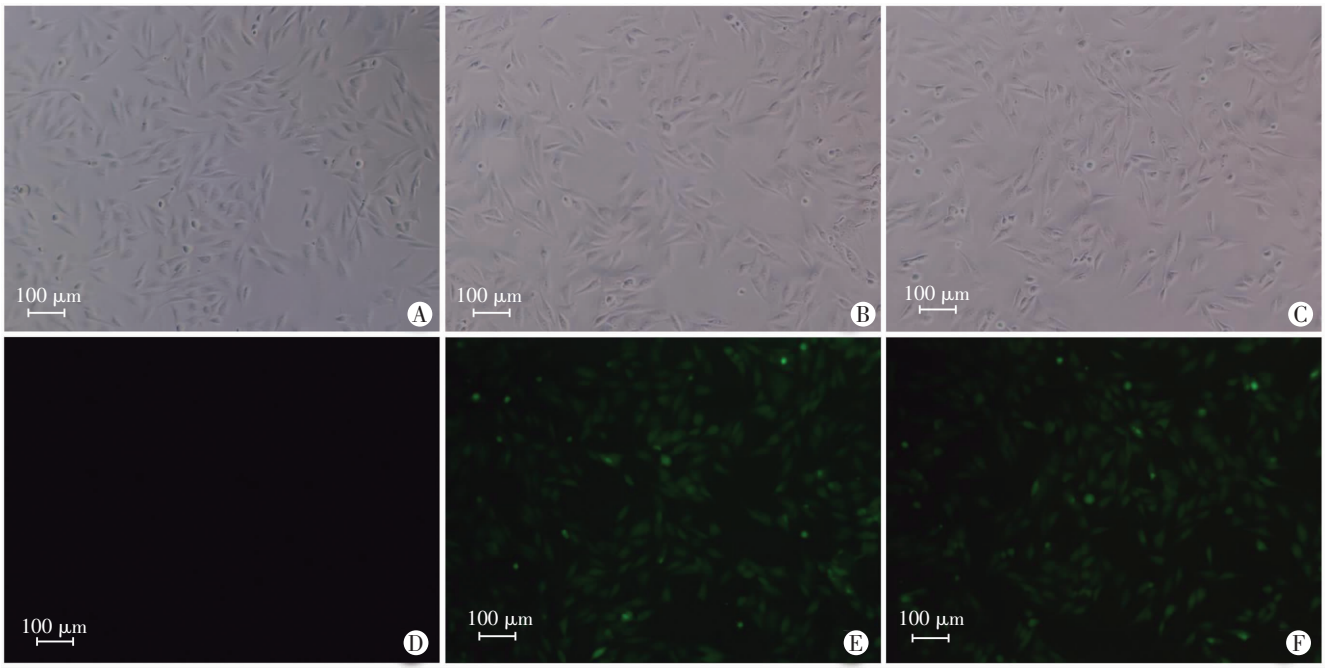
2 结果

2.1 重组腺病毒转染进入MG63细胞

BLK组无明显GFP表达,AdGFP组和AdBMP9组均有明显的报告基因GFP表达,说明MG63细胞中转入了重组腺病毒(图1)。

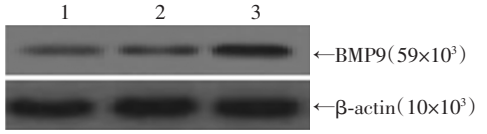
2.2 AdBMP9重组腺病毒转染有效提高细胞中BMP9的表达

实时定量PCR结果显示,转染AdBMP9(7.56±0.69)后,MG63中BMP9的表达是AdGFP组(1.17±0.29)的6.5倍,是BLK组(1.05±0.25)的7.2倍($P<0.05$)。Western blot检测显示,转染AdBMP9后,MG63中BMP9的表达灰度值为(1.58±0.08),表达水平分别较AdGFP组增加65%($P<0.05$,图2)。提示重组腺病毒AdBMP9能够携带相应基因进入MG63细胞,并提高BMP9的表达水平。



A、D:BLK组;B、E:AdGFP组;C、F:AdBMP9组

图1 荧光显微镜观察腺病毒转染后报告基因GFP的表达



1:BLK 组;2:AdGFP 组;3:AdBMP9 组

图2 Western blot 检测细胞转染腺病毒后 BMP9 的表达变化

2.3 BMP9 的过表达能够提高骨肉瘤细胞 MG63 的增殖能力

MTT 实验结果显示:AdGFP 组与 BLK 组相比无显著性差异($P>0.05$);而 AdBMP9 组与 AdGFP 组相比,D(490)值在 48 h 和 72 h 时均显著增高,分别较 AdGFP 组增加 33%($P<0.05$)和 34%($P<0.05$)。说明 BMP9 能够促进 MG63 细胞增殖。

2.4 BMP9 的过表达能够促进骨肉瘤细胞 MG63 的凋亡

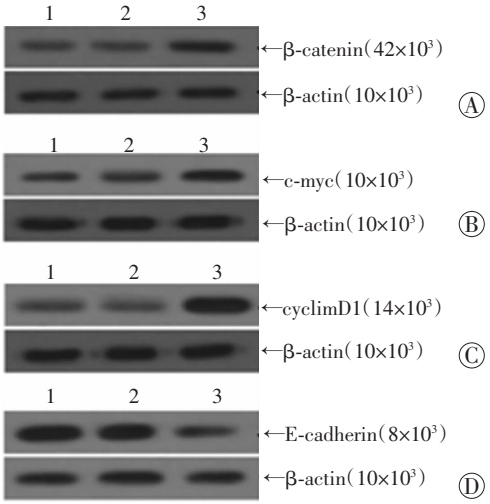
Hoechst 染色显示,AdBMP9 组细胞凋亡率在 24、48、72 h 时分别较 AdGFP 组增加 68%、65%($P<0.05$)和 63%($P<0.05$)。说明过表达 BMP9 会促进 MG63 的凋亡。

2.5 BMP9 的过表达能够提高骨肉瘤细胞 MG63 的迁移能力

Transwell 实验发现,48 h 后,AdGFP 组(41.60±3.65)与 BLK 组穿膜细胞数(44.00±3.18)比较,差异无统计学意义($P>0.05$),AdBMP9 组穿膜细胞数(75.60±2.20)较 AdGFP 组增加 45%($P<0.05$)。表明 BMP9 能够提高 MG63 细胞的迁移能力。

2.6 BMP9 过表达能提高 β-catenin、c-myc 和 cyclinD1 的表达

细胞转染 AdBMP9 24、48、72 h 后提取细胞总 RNA,应用实时定量 PCR 方法从 mRNA 水平分别检测 β-catenin 以及 Wnt/β-catenin 通路下游基因 c-myc、cyclinD1的表达。β-catenin、c-myc 和 cyclinD1 基因在转染后 24 h 时即明显表达,转染后 48 h 时表达增强,且呈现时间依赖性增强,至 72 h 分别是 AdGFP 组的 5.6、5.9 倍和 3.2 倍($P<0.05$)。图 3 显示,Western blot 从蛋白水平检测转染 AdBMP9 后 MG63 中 β-catenin、c-myc 和 cyclinD1 表达灰度值分别是(2.98±0.21)、(3.12±0.22)和(5.34±0.54)(48 h),表达水平较 AdGFP 组增加 77%($P<0.05$)、59% 和 86%($P<0.05$)。BMP9 的过表达提高了 Wnt/β-catenin 信号通路中相关分子 β-catenin、c-myc 和 cyclinD1 的表达水平,表明 Wnt/β-catenin 信号通路被活化。



1:BLK 组;2:AdGFP 组;3:AdBMP9 组

A:BMP9;B:c-myc;C:cyclinD1;D:E-cadherin

图3 Western blot 检测 BMP9 转染 48 h 后 Wnt/β-catenin 相关基因在蛋白水平的表达变化

2.7 BMP9 过表达能降低 E-cadherin 的表达

细胞转染 AdBMP9 24、48、72 h 后检测 E-cadherin 的表达(图 3),E-cadherin 表达呈现时间依赖性减弱,在 24、48、72 h 的表达分别是 AdGFP 组的 7/10、1/2($P<0.05$)和 1/5($P<0.05$)。蛋白水平的检测显示表达水平较 AdGFP 组下降 89%($P<0.05$)。表明,BMP9 过表达降低了细胞间粘附分子 E-cadherin 的表达,造成骨肉瘤细胞更易于迁移。

3 讨论

本实验通过重组腺病毒技术研究 BMP9 过表达对骨肉瘤细胞 MG63 的作用发现:一方面,BMP9 的过表达的确促进了骨肉瘤细胞 MG63 的增殖,显著增加了细胞的数量;另一方面,BMP9 的过表达也促进了 MG63 的凋亡,具有减少细胞数量的趋势。这看似矛盾。本研究证明,BMP9 的过表达提高了 β-catenin 的表达,促进了 Wnt/β-catenin 信号通路的下游分子的表达,MG63 细胞很可能通过这个途径提高了增殖能力;另外,MG63 细胞有可能通过其他途径同时促进了凋亡。研究证明,β-catenin 的过表达有可能会促进骨肉瘤细胞的凋亡[11],具体的机制需要进一步研究。实际上,上述一正(促进增殖)一负(促进凋亡)两种作用在细胞内既相互协调,又相互制约,体现了生物体内动态平衡的机制。这也可能是 BMP9 分子自身的一种平衡调节机制,在骨肉瘤细胞水平呈现的总效应是促进

性的。

Wnt/β-catenin 信号通路是肿瘤发生、发展过程中的主要途径之一。β-catenin 是 Wnt/β-catenin 信号通路的中心分子,其表达的上调会导致该肿瘤发生途径的异常活化。文献[12]报道,β-catenin 表达的增加也会促进骨肉瘤的发生,推测是由于 Wnt/β-catenin 信号通路的激活导致下游靶基因的表达,促进骨肉瘤细胞的增殖和迁移[13]。本研究发现 BMP9 的高表达促进了 Wnt/β-catenin 信号通路的激活,提高了该信号通路核心分子 β-catenin 的表达,进而促进癌基因 c-myc 和 cyclinD1 的表达升高。同时,BMP 过表达降低细胞间粘附分子 E-cadherin 的表达,从而减弱细胞之间作用力,表明 BMP9 高表达可能造成骨肉瘤细胞易于脱离原发灶而促进骨肉瘤的转移。

Wnt/β-catenin 对于骨肉瘤的发生起了重要的作用,目前对于该通路的研究方向主要集中于该通路的调节位点,主要是各个蛋白激酶之间的相互作用对信号传导的影响,如降解复合体(GSK-3、APC、Axin、CK)的各个酶功能,协调作用及其对整体的调控,下游转录因子的调控,与其他信号通路的交联作用等。蛋白磷酸酶 1 就是一种新发现的可以参与 Wnt/β-catenin 信号通路的调节位点[14],通过它可以将更多的信号通路作用或者蛋白分子引入信号的传导过程,继而可以寻求出更多新的相互交联作用。从这些相互交联作用了解上述多种信号通路的作用过程,具体的调节位点及功能对于我们了解骨肉瘤的机制有着极为重要的作用。正是基于这样的思路,本研究想探讨 BMP9 对于骨肉瘤细胞 MG63 的作用是否与 Wnt/β-catenin 信号通路有直接关系。实验证明,BMP9 对于骨肉瘤细胞的促进作用很可能是通过活化 Wnt/β-catenin 信号通路而实现的。当然骨肉瘤的发病过程中肯定不止 Wnt/β-catenin 一个信号通路或者某一个蛋白分子在发生作用,但是本研究有助于我们发现更多的参与其中的相关蛋白基因,选取调节作用位点,改变目前骨肉瘤治疗过程中对化疗药物耐药的病例对药物的敏感性,同时为选取新的治疗位点探索新的思路。

参考文献:

[1] Luetke A, Meyers P A, Lewis I, *et al*. Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review[J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(4): 523-532.

[2] He J P, Hao Y, Wang X L, *et al*. Review of the molecular pathogenesis of osteosarcoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(15): 5967-5976.

[3] Kobys V L, Konovalenko V F, Repina N V, *et al*. Treatment of large osteosarcoma in children: new approach [J]. Exp Oncol, 2013, 35(2): 105-108.

[4] Liu Y, Liu Y Z, Zhang R X, *et al*. Oridonin inhibits the proliferation of human osteosarcoma cells by suppressing Wnt/beta-catenin signaling[J]. Int J Oncol, 2014, 45(2): 795-803.

[5] Voutilainen K A, Anttila M A, Sillanpaa S M, *et al*. Prognostic significance of E-cadherin-catenin complex in epithelial ovarian cancer[J]. J Clin Pathol, 2006, 59(5): 460-467.

[6] Jamieson C, Sharma M, Henderson B R. Targeting the beta-catenin nuclear transport pathway in cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2014, 27: 20-29.

[7] Burgers T A, Williams B O. Regulation of Wnt/beta-catenin signaling within and from osteocytes[J]. Bone, 2013, 54(2): 244-249.

[8] Li X, Peng J, Wu M, *et al*. BMP2 promotes chondrocyte proliferation *via* the Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2011, 4(4): 621-626.

[9] Sassi N, Laadhar L, Allouche M, *et al*. Wnt signaling is involved in human articular chondrocyte de-differentiation *in vitro*[J]. Biotech Histochem, 2014, 89(1): 29-40.

[10] Gobbi G, Sangiorgi L, Lenzi L, *et al*. Seven BMPs and all their receptors are simultaneously expressed in osteosarcoma cells [J]. Int J Oncol, 2002, 20(2): 143-147.

[11] 卫佳, 李星星, 陈英华, 等. β-catenin 降低外源性 hS100A6 对骨肉瘤细胞的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(16): 1703-1707.

[12] Tian J, He H, Lei G. Wnt/beta-catenin pathway in bone cancers[J]. Tumour Biol, 2014, 35(10): 9439-9445.

[13] Zhang Y, Li X M, Zhang F K, *et al*. Activation of canonical Wnt signaling pathway promotes proliferation and self-renewal of rat hepatic oval cell line WB-F344 *in vitro*[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(43): 6673-6680.

[14] Luo W, Peterson A, Garcia B A, *et al*. Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex [J]. EMBO J, 2007, 26(6): 1511-1521.

(**收稿**:2014-09-20;**修回**:2014-10-27)

(编辑 龙 亮)