DOI:10.16016/j.1000-5404.201511019

成骨前体细胞对乳腺癌细胞表达骨拟态特性及增殖的影响

马 敏,胡 旭,陈武桂,邱 浩,臧乐源,胡建新,周 跃,初同伟 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科)

[**摘要**] **目的** 通过共培养体系探讨成骨前体细胞 MC3T3-E1 对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞表达骨拟态特性及增殖的影响。**方法** 实验组将 MC3T3-E1 及 MDA-MB-231 细胞采用 transwell 小室共培养,上室接种 MC3T3-E1 成骨细胞,下室接种相同数量的 MDA-MB-231 细胞。对照组上、下室均采用相同数量及密度的 MDA-MB-231 细胞。实时荧光定量 PCR、Western blot 法检测实验组及对照组骨钙蛋白(osteocalcin,OCN)、骨桥蛋白(osteopontin,OPN)、骨保护素(osteoprotegerin,OPG)的基因及蛋白的表达差异,采用 CCK-8 法检测各组增殖的差异,结晶紫染色法检测细胞集落形成差异。**结果** 与对照组相比,实验组 OCN、OPN、OPG 的基因及蛋白表达均有明显的上调($P<0.05$),MDA-MB-231 细胞的增殖能力明显增高($P<0.01$);实验组 MDA-MB-231 细胞集落形成数量及大小均优于对照组。**结论** 短期共培养后 MC3T3-E1 成骨细胞可促进乳腺癌 MDA-MB-231 细胞表达骨拟态特性,并可促进其增殖及细胞集落形成。

[**关键词**] 成骨前体细胞;乳腺癌;骨拟态;MDA-MB-231
[**中图法分类号**] R322.71; R730.23; R737.9 [**文献标志码**] A

Effects of osteomimicry and proliferation of osteolytic breast cancer induced by osteoblastic progenitor cells *in vitro*

Ma Min, Hu Xu, Chen Wugui, Qiu Hao, Zang Leyuan, Hu Jianxin, Zhou Yue, Chu Tongwei (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of co-culturing with osteoblast cell line MC3T3-E1 on the osteomimicry and proliferation in the osteolytic breast cancer cell line MDA-MB-231. **Methods** MDA-MB-231 cells were co-cultured with osteoblastic progenitor cells MC3T3-E1 in Transwell chamber in which MC3T3-E1 osteoblasts were inoculated in the upper chamber, while the same number of MDA-MB-231 cells in the lower chamber. In the control group, the same number and density of MDA-MB-231 cells were cultured in the upper and lower chambers, respectively. Real-time quantitative PCR and Western blotting were used to observe the expression of osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN), and osteoprotegerin (OPG) at mRNA and protein levels. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was employed to detect the proliferation in the 2 groups. Crystal violet staining was adopted to observe the difference of cell colony between the 2 groups. **Results** Compared with the control group, the expression levels of OPG, OPN and OCN were all increased at mRNA and protein levels in the experimental group ($P<0.05$). The proliferation of MDA-MB-231 was better in experimental group than the control group ($P<0.01$). Cell colony of MDA-MB-231 cells was better in the experimental group than the control group. **Conclusion** Short-term co-culturing with MC3T3-E1 cells promotes breast cancer MDA-MB-231 cells to form osteomimicry, and enhances the cell proliferation and colony formation at the same time.

[**Key words**] osteoblastic progenitor cells; breast cancer cells; osteomimicry; MDA-MB-231 cells

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271979). Corresponding author: Chu Tongwei, E-mail:chtw@sina.com

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81271979)
[**通信作者**] 初同伟,E-mail:chtw@sina.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160126.1536.028.html(2016-01-26)

骨拟态是指肿瘤细胞转移至骨后,在骨组织中能够模拟成骨细胞并获得成骨细胞特异性表型的能力。骨转移是乳腺癌的常见并发症之一,而乳腺肿瘤较容易转移到骨组织的原因目前尚不清楚。研究发现转移至骨的乳腺癌细胞会高表达成骨细胞的部分特异性表型并且分泌骨保护素(osteoprotegerin,OPG)[1]、骨桥蛋白(osteopontin,OPN)[2]、骨钙蛋白(osteocalcin,OCN)[3]等成骨细胞所表达的骨基质蛋白,以此获得类似成骨细胞功能的特性。研究表明,肿瘤细胞骨拟态的特性能使转移至骨的肿瘤细胞逃避免疫系统的识别,给肿瘤细胞更多机会在骨组织中生存、增殖,从而让获得骨拟态表型的肿瘤细胞更容易在骨组织中定居[4]。但是肿瘤细胞骨拟态的原因一直存在争议,主要在于肿瘤细胞究竟是在肿瘤原发灶获得了骨拟态的特性所以才更容易转移至骨?还是肿瘤细胞转移至骨后在骨微环境的刺激下才获得了骨拟态的特性使之更容易在骨组织中定居?骨是前列腺癌及乳腺癌最偏好转移的部位,目前已有研究将成骨细胞与前列腺癌细胞共培养,发现成骨细胞能够促使前列腺癌细胞的骨拟态,所以我们推测肿瘤细胞的骨拟态是由骨微环境中的成骨细胞所诱导的,因此通过建立成骨细胞与乳腺癌细胞共培养体系探讨肿瘤细胞骨拟态的发生部位十分必要。其次,目前肿瘤细胞为什么能在骨组织中稳定的增殖,有研究指出,将成骨细胞 MC3T3-E1 与乳腺癌 MDA-MB-231 细胞等量共同注入小鼠股骨内,其成瘤速度及大小均优于单纯股骨内注射等量的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞[5],因此我们推测成骨细胞可能对乳腺癌细胞的增殖也有一定影响。本实验通过将 MC3T3-E1 成骨细胞与乳腺癌 MDA-MB-231 细胞进行 transwell 共培养,观察 MC3T3-E1 成骨细胞是否也是促使溶骨型乳腺癌 MDA-MB-231 细胞骨拟态的诱因,以及成骨细胞对乳腺癌细胞增殖及集落形成的影响,旨在探讨成骨细胞在溶骨型乳腺癌细胞骨拟态过程中的作用以及对肿瘤细胞增殖的影响,为全面研究骨拟态的生物学效应及探讨肿瘤细胞的增殖奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株来源

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、小鼠 MC3T3-E1 成骨前体细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 主要试剂及仪器

0.25% 胰酶、DMEM、α-MEM 购自美国 HyClone 公司,胎牛血清购自美国 Gibic 公司,0.4 μm transwell 共培养小室购自美国 Millipore 公司,RNAiso Plus、PrimeScript® 反转录试剂盒以及荧光染料 SYBR® Premix *Ex Taq*™试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。CCK-8(cell counting kit-8)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究所,OCN、OPN、OPG 及 GAPDH 抗体购自 Abcam 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 成骨细胞 MC3T3-E1 株采用含有 10% 胎牛血清以及 1% 双抗(100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)的 α-MEM 培养基培养,人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 细胞采用含有 10% 胎牛血清以及 1% 双抗(100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)DMEM 高糖培养基培养。两种细胞均置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱培养,每 2 天换液 1 次,等到细胞生长至对数生长期时用 0.25% 胰酶消化,备用。

1.3.2 细胞共培养 采用 0.4 μm Transwell 小室置于 6 孔板上构建共培养体系,并分为实验组和对照组。取 1.3.1 步骤中对数生长期的 MC3T3-E1 及 MDA-MB-231 细胞,实验组上层接种 1.5×10^5 MC3T3-E1 并用配好的 α-MEM 培养基培养,下层接种 1.5×10^5 MDA-MB-231 细胞并用配好的 DMEM 高糖培养基培养,对照组上、下室均接种相同数量的 MDA-MB-231 细胞并用 DMEM 高糖培养基培养。将接种好的细胞置于恒温箱中培养,每 2 天更换培养基 1 次,共培养 5 d 后进行后续实验,将实验组及对照组下层的乳腺癌细胞取出并分别标记为 231-OB 及 231。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测 2 组 OPN、OPG、OCN mRNA 表达 将 2 组 MDA-MB-231 细胞提取 RNA,采用 RNAiso Plus 将 2 组总的 RNA 提出后在微量核酸仪 DM-2000 测定其浓度和纯度,选取符合条件的样本[$D(260)/D(280)$为 1.8~2.0],采用 PrimeScript® 反转录试剂盒以及荧光染料 SYBR® Premix *Ex Taq*™试剂盒进行反转录及扩增,OPG、OPN、OCN mRNA 引物由宝生物(大连)工程有限公司合成,选用 GAPDH 作为内参,所选目的基因及内参基因序列见表 1。检测时每个样本设置 3 个复孔。实验重复 3 遍,最终数据以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示目的基因 mRNA 水平并绘制柱状图。

表 1 实时定量-PCR 引物序列

基因	引物序列(5′→3′)	退火温度
GAPDH	上游:TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC 下游: AAGATGGTGATGGGCTTCCCG	60 ℃
OCN	上游:TGACGAGTTGGCTGACCACATC 下游:AGGAAAGAAGGGTGCCTGGAGA	60 ℃
OPG	上游:GCACGCACTAAAGCACTCAAAGAC 下游:TGTGAAGCTGTGAAGGAACCTGATG	60 ℃
OPN	上游:ACAGCCGTGGGAAGGACAGTTA 下游:ACATCGGAATGCTCATTGCTCTCA	60 ℃

OPG:骨保护素;OPN:骨桥蛋白;OCN:骨钙蛋白

1.3.4 Western blot 检测 收集 1.3.2 步骤中 2 组细胞,使用 RIPA 裂解液提取 2 组蛋白并分别标记为 231-OB 及 231。BCA 试剂盒测定蛋白浓度后,取出蛋白并加入等体积的上样缓冲液后煮沸 5 min。将变性后的蛋白溶液 50 μg/孔等量上样,行 SDS-PAGE(10% 分离胶和 4% 浓缩胶)电泳,然后用电转膜仪将蛋白转移至 PVDF 膜上,放入 5% 脱脂奶粉中封闭,加入一抗体(鼠抗 OPN,1∶1 000;鼠抗 OCN,1∶1000;兔抗 OPG,1∶1 000;鼠抗 GAPDH,1∶3 000)4 ℃过夜,TBST 缓冲液清洗 3 次,加二抗(山羊抗小鼠 IgG,山羊抗兔 IgG),37 ℃ 孵育 2 h,行免疫印迹检测后 ECL 发光试剂盒发光并胶片曝光,常规显影、定影后行灰度值分析。

1.3.5 细胞集落实验检测 2 组细胞集落形成能力

共培养 5 d 后将 2 组细胞的培养板取出并弃去上层小室,吸去下层小室培养 MDA-MB-231 细胞的培养液,并用 PBS 溶液洗涤下层细胞贴壁 2 次,每孔加 1 mL 10% 甲醇溶液固定细胞 30 s。吸去甲醇溶液,每孔加 1 mL 结晶紫染液,室温中放置 20 min。轻轻吸去染色液,用蒸馏水洗涤各孔 3 次,将培养板倒置于吸水纸上将水分吸干,自然干燥,100 倍视野下选取 5 个视野观察肿瘤细胞集落形成数量及大小。

1.3.6 CCK-8 法检测 2 组细胞的增殖差异 实验组采用 Transwell 共培养体系将 MDA-MB-231 细胞接种于 24 孔板下室,加入含有 1.0×10^4/mL MDA-MB-231 的 DMEM 培养基 1 mL,上室接种含有 1.0×10^4/mL MC3T3-E1 的 α-MEM 培养基1 mL。对照组上、下室均接种含有 1.0×10^4/mL 乳腺癌细胞的 DMEM 培养基 1 mL。分别继续培养 24、48、72 h 后,取出 2 组上层小室并加入 CCK-8 反应试剂 100 μL/孔,置于 37 ℃细胞培养箱中反应 2 h 后取出,2 组各取 100 μL 反应液加入 96 孔板中,每组设 6 个复孔。酶联免疫检测仪检测 450 nm 波长处各孔的光密度值[D(450)],以时间为横坐标,D(450)值为纵坐标绘制细胞增殖曲线,实验重复 3 次。

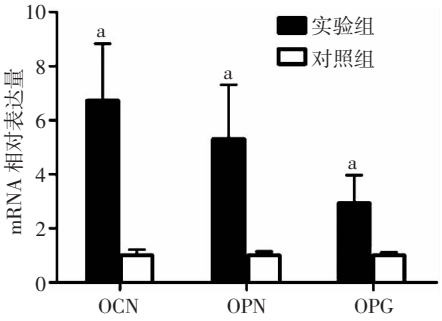
1.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,行 t 检验分析。检验标准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 共培养 5 d 后 2 组 OCN、OPN、OPG 的基因表达差异

实验组将与 MC3T3-E1 共培养 5 d 的 MDA-MB-231 细胞与对照组未和 MC3T3-E1 细胞共培养的 MDA-MB-231 细胞进行 PCR 检测,实验组成骨相关基因 OCN、OPN、OPG 的表达水平显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 1)。

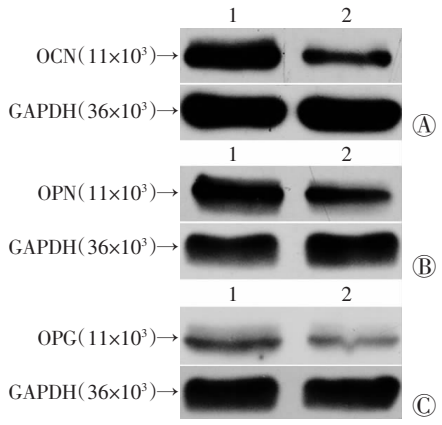


a:$P<0.05$,与对照组比较

图 1 实时荧光定量 PCR 法检测 2 组成骨相关基因的表达差异 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.2 共培养 5 d 2 组 MDA-MB-231 细胞 OPG、OPN、OCN 蛋白表达差异

共培养 5 d 后实验组 OCN(0.89 ± 0.07)、OPN(1.19 ± 0.08)、OPG(0.30 ± 0.05)的表达显著高于对照组[OCN(0.42 ± 0.04)、OPN(0.51 ± 0.05)、OPG(0.16 ± 0.03)],差异具有统计学意义($P<0.05$,图 2)。



1:实验组;2:对照组 A:OCN;B:OPN;C:OPG

图 2 Western blot 法检测 2 组 OCN、OPN、OPG 的蛋白表达差异

2.3 MC3T3-E1 对 MDA-MB-231 细胞集落形成的影响

实验组在集落形成数量及大小上均优于对照组,证实成骨前体细胞 MC3T3-E1 与乳腺癌 MDA-MB-231 共培养后有明显刺激乳腺癌细胞集落形成及增殖的作用(图 3)。

2.4 MC3T3-E1 有促进 MDA-MB-231 细胞增殖的作用

CCK-8 法检测显示,实验组与对照组 MDA-MB-231 细胞 24 h 增殖差异无统计学意义($P>0.05$),48、

72 h MC3T3-E1 具有明显促进 MDA-MB-231 细胞增殖的作用($P<0.01$,图 4)。

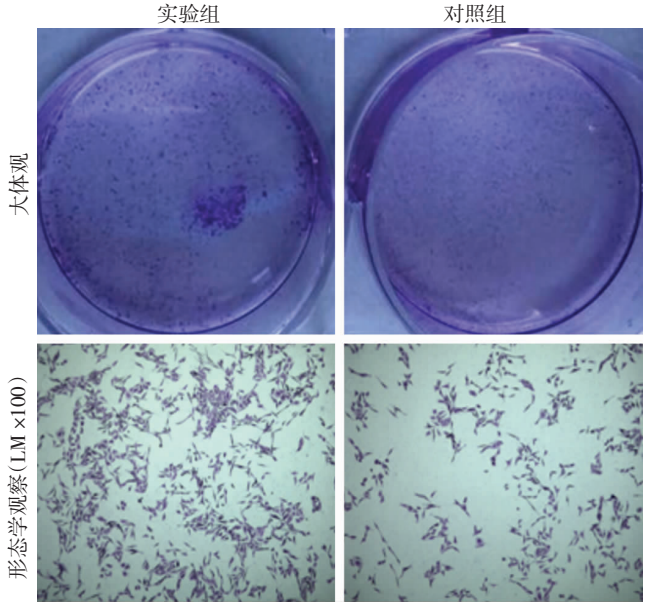
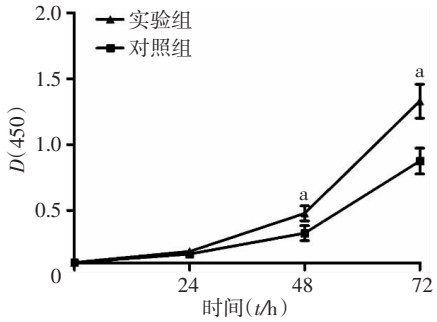


图 3 结晶紫染色法观察实验组及对照组的乳腺癌细胞集落形成能力



a:$P<0.01$,与对照组比较

图 4 CCK-8 法检测实验组与对照组 MDA-MB-231 细胞的增殖能力差异 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

3 讨论

乳腺癌及前列腺癌细胞转移至骨后在骨组织中均会发生骨拟态的改变,其原因尚不清楚,但目前可以肯定的是肿瘤细胞这种骨拟态特性使肿瘤细胞更容易在骨微环境中生存[4,6]。成骨细胞可引起前列腺癌细胞的骨拟态[7],骨又是前列腺癌以及乳腺癌最偏好转移的部位,且有研究表明将成骨细胞与具有肿瘤干细胞相似特性的乳腺癌侧群细胞共培养后能够高表达 Wnt-1 及 Runx2 等成骨分化相关转录因子,乳腺癌细胞一旦高表达这些转录因子其骨转移能力增强[8-9]。所以我们推测成骨细胞也可以诱导乳腺癌细胞高表达成骨相关的基因及蛋白(如 OCN、OPN、OPG),并以此表现出骨拟态的特性使其在骨组织中稳定生存。其次,乳腺癌细胞转移至骨组织后能在骨微环境中快速增殖,这与肿瘤细胞转移至骨后激活破骨细胞并破坏骨组织释放一些肿瘤生长因子相关,如转化生长因子(transforming growth factor-β,TGF-β)、胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor 1,IGF-1)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors,FGFs)及血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor,PDGF)等[10-11],而这些生长因子反过来能够刺激肿瘤细胞的生长,从而形成著名的"恶性循环"理论。然而动物实验表明,将 MC3T3-E1 成骨细胞与乳腺癌 MDA-MB-231 细胞共同注入小鼠股骨内,其肿瘤形成速度、大小均有明显的促进作用[5],这提示了我们肿瘤细胞在骨微环境中的增殖除了经典的"恶性循环"理论外,成骨细胞也可能直接促进肿瘤细胞的增殖。

本实验通过将 MC3T3-E1 与 MDA-MB-231 细胞共培养,检测实验组及对照组乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 OCN、OPN 及 OPG 的表达差异,以此探讨乳腺癌细胞骨拟态的可能发生部位。实验结果表明共培养后乳腺癌细胞 OCN、OPN 及 OPG 的表达均有明显上调,证明了成骨细胞可促使乳腺癌细胞表达骨拟态的特性。近些年的研究表明 OPG 在乳腺癌细胞中的表达与肿瘤细胞的克隆及归巢相关,并且能够保护肿瘤细胞不被 TRAIL 介导的凋亡所伤害[12]。OPN 在肿瘤细胞中过表达有助于肿瘤细胞的增殖及侵袭,并且 OPN 的表达增高在肿瘤细胞的转移过程中也扮演着重要角色[13-14],所以肿瘤细胞一旦在骨组织中高表达 OPG 及 OPN 后转移能力增强,更多的肿瘤细胞转移至骨后又会在成骨细胞的诱导下发生骨拟态以此恶性循环,这也可能是肿瘤细胞在骨微环境中增殖较快的原因之一,但进一步的研究仍需动物实验的支持。其次,本实验证明了在成骨细胞的诱导下乳腺癌细胞的增殖能力及集落形成能力增强,其作用机制可能为 PDGF 是肿瘤细胞的重要生长因子,MDA-MB-231 乳腺癌细胞本身能够自分泌 PDGF。有研究报道成骨细胞条件培养基可促使 MDA-MB-231 细胞高表达 PDGF 受体[15],这可能是成骨细胞促进乳腺癌细胞增殖的原因之一,值得进一步研究。

综上所述,在与成骨细胞共培养的条件下,乳腺癌细胞的增殖能力增强说明了成骨细胞可直接促进肿瘤细胞增殖。这也提醒我们,以往将肿瘤细胞在骨微环境中增殖的注意力过多地集中在破骨细胞上,然而成

骨细胞同样能够促进肿瘤细胞增殖。其次本实验通过共培养模型,从细胞层面探讨 MC3T3-E1 成骨前体细胞对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞表达骨拟态特征的正向调控现象,证实乳腺癌细胞的骨拟态也是由成骨细胞引起的,进一步支持肿瘤细胞骨拟态特性可能是在骨微环境中形成的理论,为深入探讨肿瘤细胞骨拟态的生物学效应奠定基础。目前骨拟态相关研究仍然处于初步阶段。有研究表明前列腺癌骨拟态的发生机制可能和 Notch 及 ERK 信号通路有关[16],那么在骨微环境中,成骨细胞是否也能激活乳腺癌细胞的 Notch 及 ERK 通路并由此表现出骨拟态的特性,值得进一步研究。

参考文献:

[1] Weichhaus M, Segaran P, Renaud A, *et al*. Osteoprotegerin expression in triple-negative breast cancer cells promotes metastasis[J]. Cancer Med, 2014, 3(5): 1112 - 1125. DOI: 10.1002/cam4.277

[2] Rose A A, Siegel P M. Breast cancer-derived factors facilitate osteolytic bone metastasis[J]. Bull Cancer, 2006, 93(9): 931 - 943.

[3] Salem A M, Zohny S F, Abd-El-Wahab M M, *et al*. Predictive value of osteocalcin and beta-CrossLaps in metastatic breast cancer[J]. Clin Biochem, 2007, 40(16/17): 1201 - 1208. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2007.07.006

[4] Rucci N, Teti A. Osteomimicry: how tumor cells try to deceive the bone[J]. Front Biosci (Schol Ed), 2010, 2: 907 - 915.

[5] Bodenstine T M, Beck B H, Cao X, *et al*. Pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells promote breast cancer growth in bone in a murine xenograft model[J]. Chin J Cancer, 2011, 30(3): 189 - 196.

[6] Cox R F, Jenkinson A, Pohl K, *et al*. Osteomimicry of mammary adenocarcinoma cells *in vitro*; increased expression of bone matrix proteins and proliferation within a 3d collagen environment[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41679. DOI: 10.1371/journal.pone.0041679

[7] Knerr K, Ackermann K, Neidhart T, *et al*. Bone metastasis: Osteoblasts affect growth and adhesion regulons in prostate tumor cells and provoke osteomimicry[J]. Int J Cancer, 2004, 111(1): 152 - 159. DOI: 10.1002/ijc.20223

[8] 杨晓宁, 周艳, 齐晓伟, 等. 成骨细胞诱导乳腺癌侧群细胞获得骨模拟特性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(11): 1102 - 1106.

[9] Baniwal S K, Khalid O, Gabet Y, *et al*. Runx2 transcriptome of prostate cancer cells: insights into invasiveness and bone metastasis[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 258. DOI: 10.1186/1476-4598-9-258

[10] Chappard D, Bouvard B, Basle M F, *et al*. Bone metastasis: histological changes and pathophysiological mechanisms in osteolytic or osteosclerotic localizations. A review[J]. Morphologie, 2011, 95(309): 65 - 75. DOI: 10.1016/j.morpho.2011.02.004

[11] Zhang Y, Ma B, Fan Q. Mechanisms of breast cancer bone metastasis[J]. Cancer Lett, 2010, 292(1): 1 - 7. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.11.003

[12] Kapoor P, Suva L J, Welch D R, *et al*. Osteoprotegrin and the bone homing and colonization potential of breast cancer cells[J]. J Cell Biochem, 2008, 103(1): 30 - 41. DOI: 10.1002/jcb.21382

[13] Hou X, Wu X, Huang P, *et al*. Osteopontin is a useful predictor of bone metastasis and survival in patients with locally advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. Int J Cancer, 2015, 137(7): 1672 - 1678. DOI: 10.1002/ijc.29540

[14] Kruger T E, Miller A H, Godwin A K, *et al*. Bone sialoprotein and osteopontin in bone metastasis of osteotropic cancers[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2014, 89(2): 330 - 341. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2013.08.013

[15] Brama M, Basciani S, Cherubini S, *et al*. Osteoblast-conditioned medium promotes proliferation and sensitizes breast cancer cells to imatinib treatment[J]. Endocr Relat Cancer, 2007, 14(1): 61 - 72. DOI: 10.1677/erc.1.01307

[16] Zayzafoon M, Abdulkadir S A, McDonald J M. Notch signaling and ERK activation are important for the osteomimetic properties of prostate cancer bone metastatic cell lines[J]. J Biol Chem, 2004, 279(5): 3662 - 3670. DOI: 10.1074/jbc.M308158200

(**收稿**:2015-11-04;**修回**:2015-12-11)

(编辑 龙 亮)