基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0186-03

hBMP9 在人骨肉瘤细胞株 MG63、U2OS 和 143B 中的内源性表达

吴丽美[1],何焕玲[1],李星星,卫 佳[1],陈英华[1],马 闻[1],周 兰[2]

(1. 重庆医科大学生物医学工程系、重庆市生物医学工程学重点实验室、重庆市超声医学工程重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地;2. 重庆医科大学医学检验系, 重庆 400016)

【摘 要】目的:研究人骨形态发生蛋白(Human bone morphogenetic protein,hBMP)9 在人骨肉瘤细胞株 MG63、U2OS 和 143B 中的内源性表达,为下一步研究 hBMP9 对骨肉瘤的体内外作用奠定实验基础。方法:利用免疫细胞化学法和 Western blot 法检测 hBMP9 在人骨肉瘤细胞株 MG63、U2OS 和 143B 中的内源性表达。结果:在 MG63、U2OS 和 143B 中,hBMP9 均呈不同程度的阳性表达,并且两种检测方法所得结果一致。结论:hBMP9 在人骨肉瘤细胞株 MG63、U2OS 和 143B 中均有内源性表达。

【关键词】骨形态发生蛋白;骨肉瘤细胞;免疫细胞化学;Western blot

【中国图书分类法分类号】R738.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-04-22

Expression of hBMP9 in human osteosarcoma cell lines

WU Li-mei, et al

(*Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of human bone morphogenetic protein 9 (hBMP9) in osteosarcoma cell lines. *Methods*: Immunocytochemistry and Western blot were applied to detect the endogenous expression of hBMP9 in the human osteosarcoma cell line MG63, U2OS and 143B. *Results*: hBMP9 were positive in three cell lines and the results of two methods were consistent. *Conclusion*: There are endogenous expressions

作者介绍:吴丽美(1983-),女,硕士,研究方向:分子肿瘤学。现工作单位:广州市花都区妇幼保健院检验科。

通讯作者:周 兰,女,教授,E-mail: zhoulan0111@gmail.com。

基金项目:超声医疗国家工程研究中心[编号:发改高技(2005)2181 号]。

AT1R 加重缺血性脑损伤。AT1R 能激活 MMP-2 和 MMP-9 的活性,激发脑缺血后脑水肿,加重脑损伤[5];AT1R 激活可产生脑血管收缩作用加重脑缺血[6];中枢性 AT2R 激活可产生脑血管舒张作用,恢复脑供血供养[6];中枢性 AT2R 激动后在缺血性脑损伤中能通过改善脑供血量及减少超氧化物的产生发挥脑保护作用[7]。ATⅡRA 分别通过减少血管紧张素Ⅱ生成和阻断血管紧张素Ⅱ与 AT1R 结合产生的生物学效应减轻缺血再灌注损伤。ATⅡRA 通过下调中枢性 AT1R 和上调中枢性 AT2R 表达,对脑缺血后脑损伤产生良性作用[8]。缬沙坦是非肽类血管紧张素Ⅱ受体(AT1 亚型)拮抗剂,对 AT1 受体有高度选择性,能抑制血管收缩,减少醛固酮和肾上腺素分泌,降低血压。

本组实验选用缬沙坦作为治疗药物,通过治疗组与高血压组比较,降压效果明显,说明肾性高血压大鼠对该药具有良好的反应性,同时有研究表明肾性高血压大鼠体内肾素血管紧张素系统活性增高,与高血压病人形成高血压的病理生理过程有相似之处,适合用于与高血压有关的研究。

本组实验表明,HIR 与 IR 比较,MMP-2 和 MMP-9 表达明显增多,说明 MMP-2 和 MMP-9 表达增多不但参与了缺血性脑损伤过程,而且加重肾性高血压大鼠缺血再灌注后的炎症反应,是缺血性脑损伤不可忽略的机制之一,高血压能够促进这种炎症反应。而缬沙坦能降低血压,明显抑制 MMP-2 和 MMP-9 的活性,对肾性高血压大鼠脑缺血再灌注产生脑保护。

参 考 文 献

[1] 黄如训, 苏镇培.肾性高血压大鼠脑血管病变的初步观察[J],中国神经精神疾病杂志,1990,16(6):136-140.

[2] 卢昌均.肾性高血压大鼠血浆内皮素,一氧化氮含量变化及老年降压冲剂对其影响[J],中国现代医学杂志,2001,11(9):8-9.

[3] Nagasawa H, Kogura K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 1989, 20: 1037-43.

[4] Nikodemova M, Duncan ID, Watters JJ. Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and IkappaBalpha degradation in a stimulus-specific manner in microglia[J]. J Neurochem, 2006, 96: 314-323.

[5] Mikami C. Effect of nicardipine and magnesiumon cerebral infarction-brain surface perfusion technique[J]. Cerebrovasc Dis, 2001, 11 (1): 44-50.

[6] Ravati A, Junker V, Kouklei M, et al. Enalapril and moexipril protect from free radical-induced neuronal damage in vitro and reduce ischemic brain injury in mice and rats[J].Pharmacol, 1999, 373(1): 21-33.

[7] Lou M. Sustained blockade of brain AT1 receptors before and after focal cerebral ischemia alleviates neurologic deficits and reduces neuronal injury, apoptosis, and inflammatory responses in the rat[J]. Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(5): 536-47.

[8] Hanon O. Prevention of dementia and cerebroprotection with antihypertensive drugs[J]. Curr Hypertens Rep, 2004, 6(3): 201-207.

(责任编辑:关蕴良)

of hBMP9 in MG63, U2OS, and 143B cells.

【Key words】Bone morphogenetic proteins; Osteosarcoma; Immunocytochemistry; Western blot

骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMPs)是TGF-β 超家族成员,以其功能上的多效性为特点,该家族在调节发育和成人组织的稳态以及和人类多种疾病都有很深的关联[1],有关该家族和人类肿瘤的关系也成为近来研究的热点。课题组前期发现 4 个 BMP 家族成员体外具有抑制骨肉瘤细胞株生物学活性的作用[2-4],而 BMP9,也叫生长分化因子 7(Growth differentiation factor 7, GDF7),是成骨活性最强的成员之一[5],其对骨肉瘤细胞株是否也具有较强的生物学作用有待于进一步研究。本研究用免疫细胞化学和 western blot 法检测 hBMP9 在人骨肉瘤细胞株 MG63、U2OS 及 143B 中的内源性表达,为后续研究 hBMP9 对骨肉瘤的生物学作用及进一步阐明 BMPs 家族对骨肉瘤的体内外作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料

AdBMP9,美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室何通川教授赠送;人骨肉瘤细胞株 MG63、U2OS 和 143B 购自中国典型培养物保藏中心;DMEM, MEM, RPMI 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清购自 MDgenics;胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司;正常兔血清购自北京中杉金桥生物技术研究所;羊抗人 BMP-9 多克隆体和 ECL 试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记兔抗羊抗体(Santa Cruz),兔抗羊免疫组化试剂盒和 DAB 购自北京中杉金桥公司;PVDF 膜购自 Millipore(孔径 0.22 μm),GelDoc 凝胶成像仪,电泳仪购自 Bio-Rad。

1.2 细胞培养

所用 DMEM, MEM, RPMI 1640 内均含 10%新生牛血清,青、链霉素各 100 U/ml,MG63 用 MEM 培养,U2OS 用 DMEM 培养,143B 用 RPMI1640 培养,3 种细胞均为贴壁生长型,于 37℃、5% CO_2 的饱和湿度箱中培养[6]。

1.3 免疫细胞化学法

制备细胞爬片,PBS 洗涤,70%酒精固定 30 min,经 0.1% H_2O_2/PBS 处理后,滴加正常兔血清,37℃孵育 30 min,滴加羊抗人 BMP-9 多克隆抗体(1:400),4℃孵育过夜,滴加二抗(1:500)37℃孵育 10 ~ 15 min;以上各步骤间均以 PBS 充分洗涤;DAB 试剂盒显色,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。以 PBS 代替一抗作阴性对照,胞浆中有棕黄色颗粒为阳性。

1.4 Western blot 法

提取细胞总蛋白,取 80 μg 细胞总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,按湿转法将电泳产物转移到 PVDF 膜,5%脱脂奶粉 4 ℃封闭 2 h,滴加一抗(1:1 000)4 ℃过夜,TTBS 洗膜 10 min × 4 次, 滴加二抗 (1:1 000)37℃ 孵育 2 h,TTBS 洗膜 10 min × 4 次,TBS 洗膜 10 min, 按 ECL 试剂盒说明进行显色,GelDoc 凝胶成像仪采集图像,以 PBS 代替一抗为阴性对照[7]。

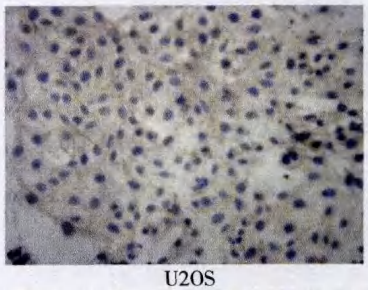
2 结 果

免疫细胞化学法检测结果见图 1。阴性对照中没有棕黄色颗粒。hBMP9 在 MG63、U2OS 和 143B 细胞中均呈阳性反应,棕黄色阳性颗粒位于胞浆中;经 Image Pro Plus 6.0 (IPP) 图像分析软件分析这些免疫细胞化学染色结果发现,MG63、U2OS 和 143B 细胞中的积分光密度(IOD)值分别为 0.29、0.28 和 0.31,提示 hBMP-9 在 3 种骨肉瘤细胞的表达水平以 143B 略高,MG63 次之,U2OS 最低。

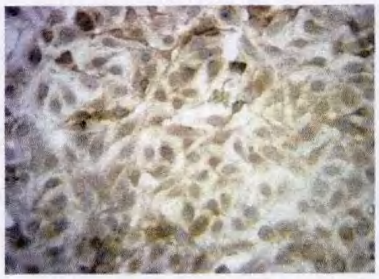
Western blot 法检测发现,hBMP9 在骨肉瘤细胞 MG63、U2OS 和 143B 中均有表达;经 Quantity-one 4.31 软件分析,



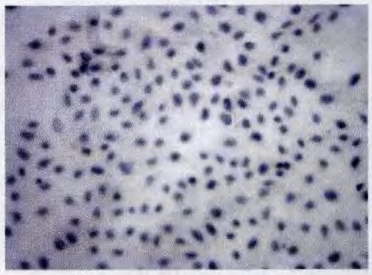
MG63



U2OS



143B



阴性对照(以 U2OS 为例)

图 1 3 种骨肉瘤细胞株中 hBMP9 的内源性表达(SABC 法,DAB 染色,×400)



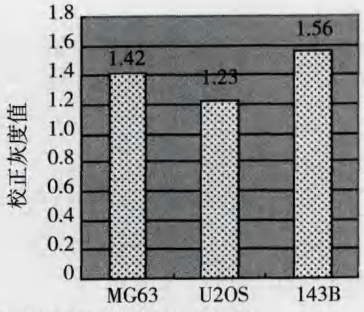


图 2 骨肉瘤细胞中 BMP-9 的内源性表达（Western blot）

表 1 IPP 分析骨肉瘤细胞中 hBMP9 表达的免疫细胞化学染色结果

	面积值	光密度值	积分光密度值（光密度/面积）
MG63	1 631 496	474 392	0.29
U2OS	2 187 155	618 756	0.28
143B	1 197 492	372 475	0.31

hBMP9 在 MG63、U2OS 和 143B 细胞中杂交带的校正灰度值分别为 1.42、1.23 和 1.56（图 2），该结果提示的 hBMP9 在这 3 株人骨肉瘤细胞的表达及表达水平与免疫细胞化学法一致。

3 讨 论

BMPs 是一个功能繁多的分子家族，除与成骨、发育、调节机体稳态等有关外，其与肿瘤的发生发展的关系也较密切，已有该家族不同成员与骨肉瘤、结肠癌、胃癌、乳腺癌、前列腺癌等的关系的报道。例如，本课题组的前期研究发现 BMPs 家族中的 4 个成员，即 BMP-2、-3、-6 和 -12 在体外对人骨肉瘤细胞株 MG63、U2OS 和大鼠骨肉瘤细胞株 UMR106 均有不同程度的抑制增殖和迁移，促进凋亡和促成骨分化的作用[3-5]。但是 BMPs 对骨肉瘤的这种抑制性作用是否具有普遍性、是否其在体内也对骨肉瘤具有这样的抑制性作用及其作用机制等，都有待于进一步研究。

BMP9，也叫生长分化因子 7（Growth differentiation factor 7，GDF7），是成骨活性最强的 BMPs 家族成员之一，在目前的研究中关注较多的是：1）其与神经系统的关系：有报道认为，BMP9 能活化经典 BMP 信号途径[8]，从而诱导基底前脑胆碱能神经元（Basal forebrain cholinergic neurons，BFCN）的转录[9]；2）其与循环系统的关系：David 等[10]认为其为循环的血管休眠因子，具有抗血管生成的作用；Scharpfenecker 等[11]则认为其能通过 ALK-1 抑制 bFGF 诱导的内皮细胞增殖和 VEGF 诱导的血管生成；3）BMP9 与肿瘤的关系：Ye 等[12]报道 BMP9 在 PC-3 前列腺癌细胞中通过上调前列腺凋亡反应因子-4 诱导细胞凋亡。其与骨肿瘤的关系报道少，且结果不一致。需进一步探讨。

MG63、U2OS 和 143B 均为人骨肉瘤细胞系，已知 MG63 和 143B 均能在裸鼠皮下成瘤，但从成瘤时间及大小和荷瘤鼠生存时间看，143B 的恶性程度更高（本课题组实验结果，尚未发表）。目前为止，未见 U2OS 成瘤模型的报道。为此，本研究选择生物学特性各异的这 3 株骨肉瘤细胞为研究对象，通过免疫细胞化学法和 Western blot 定性和半定量检测 hBMP9 在 3 株人骨肉瘤细胞中的内源性表达，发现其在 U2OS、MG63 和 143B 中均有表达，且表达量有依次递增趋势，这是否提示 hBMP9 在骨肉瘤细胞中的表达水平与其恶性生物学特性有一定关系？有待于进一步研究证实。

该研究结果为我们进一步探讨 BMPs 在骨肉瘤发生发展中的作用及机制奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Herrera B, Inman G J.A rapid and sensitive bioassay for the simult aneous measurement of multiple bone morphogenetic proteins. Identifi cation and quantification of BMP4, BMP6 and BMP9 in bovine and human serum [J]. BMC Cell Biol, 2009, 10(20): 1-11.

[2] 左国伟，何焕玲，李星星，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2007，29(18)：1783-1786.

[3] 吴丽美，何焕玲，李星星，等.人骨形态发生蛋白 3 对骨肉瘤细胞系 MG63 和 U2OS 的作用[J].基础医学与临床，2009，29(7)：731-736.

[4] 李星星，何焕玲，吴丽美，等. 人骨形态发生蛋白 12 对人骨肉瘤细胞的生物学作用[J].生命科学研究，2008，12(4)：365-372.

[5] Luu H H, Song W X, Luo X, et al.Distinct roles of bone morphoge netic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. J Orthop Res, 2007, 25(5): 665-677.

[6] 姚草原，江 涛，韩晓黎，等.靶向 survivin 的 siRNA 联合顺铂抑制肺腺癌 A549 细胞增殖的实验研究[J].重庆医科大学学报，2009，34(2)：178-181.

[7] 卫 佳，王 胜，苗静琨，等. 人 S100A2-GST 融合蛋白原核表达和纯化[J]. 重庆医科大学学报，2008，33(12)：1427-1430.

[8] Lopez-Coviella I, Mellott T M, Kovacheva V P, et al.Developmental pattern of expression of BMP receptors and Smads and activation of Smad1 and Smad5 by BMP9 in mouse basal forebrain[J]. Brain Res, 2006, 1088(1): 49-56.

[9] Lopez-Coviella I, Follettie M T, Mellott T J, et al. Bone morphogenetic protein 9 induces the transcriptome of basal forebrain cholinergic neurons [J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102(19): 6984-6989.

[10] David L, Mallet C, Keramidas M, et al.Bone morphogenetic protein -9 is a circulating vascular quiescence factor[J]. Circ Res, 2008, 102(8): 914-922.

[11] Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, et al. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis[J]. J Cell Sci., 2007, 120(6): 964-972.

[12] Ye L, Kynaston H, Jiang W G., et al. Bone morphogenetic protein-9 induces apoptosis in prostate cancer cells, the role of prostate apoptosis response-4[J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(10): 1594-1606.

（责任编辑：冉明会）