

重组人骨形态发生蛋白-2 和-6 对人骨肉瘤细胞株 MG63 和 U2OS 的作用

何焕玲, 李星星, 吴丽美, 陈英华, 卫 佳, 苗静琨, 周 兰

重庆医科大学生物医学检验系; 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016

摘要 为研究重组人骨形态发生蛋白 rhBMP-2 和 rhBMP-6 对人骨肉瘤细胞株 MG63 和 U2OS 的作用, 分别用含 rhBMP-2 和 rhBMP-6 及重组绿色荧光蛋白的条件培养液干预人骨肉瘤细胞 MG63 和 U2OS, 利用台盼蓝拒染法、TUNEL 法、吖啶橙/溴乙啶 (AO/EB) 荧光双染法、Transwell 小室和碱性磷酸酶活性测定法分别检测细胞增殖、凋亡、迁移以及成骨分化能力的变化。结果显示与未实施任何干预的空白对照组和用 rGFP 干预实验对照组相比, rhBMP-2 和 rhBMP-6 的干预致两种骨肉瘤细胞株: 细胞存活率均随时间逐渐降低; 凋亡率呈时间依赖性增加; 穿膜数明显减低; 碱性磷酸酶 (ALP) 活性逐渐增加。以上差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。表明 rhBMP-2 和 rhBMP-6 可抑制人骨肉瘤细胞株 MG63 和 U2OS 的增殖和迁移、诱导其凋亡和向成骨细胞分化。

关键词 骨形态发生蛋白; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞迁移; 碱性磷酸酶活性

中图分类号 R738.1

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)17-0047-05

Effects of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 and -6 on Human Osteosarcoma Cell Lines MG63 and U2OS

HE Huanling, LI Xingxing, WU Limei,
CHEN Yinghua, WEI Jia, MIAO Jingkun, ZHOU Lan

Department of Medical Laboratory, Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics Founded by Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract To investigate the effects of recombinant human BMP (rhBMP)-2 and -6 on osteosarcoma in treating human osteosarcoma cell lines MG63 and U2OS with rhBMP-2 and rhBMP-6, the osteosarcoma cells in experimental groups were treated with rhBMPs-CMs, those in control groups with rGFP-CM, and those in blank groups with neither. Cell proliferation, apoptosis transmigration and differentiation were detected at different times by Trypan blue exclusion test, transwell-room, terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)/acridine orange-ethidium bromide (AO/EB) double fluorescent dye staining and the alkaline phosphatase (ALP) activity, respectively. The main

results are as follows. (1) There are no significant differences of all indexes tested between the control groups and the blank (all with $P > 0.05$). (2) Compared with the control groups and the blank groups, the cell survival rates see a significant decrease when being treated with rhBMP-2 and rhBMP-6 ($P < 0.01$). (3) The apoptosis indexes are increased ($P < 0.01$) and the results from TUNEL and AO/EB method are consistent. (4) The cell numbers of transmembrane are significantly decreased in both MG63 and U2OS ($P < 0.01$). (5) The ALP activity is increased after being treated with rhBMP-2 and rhBMP-6 for 3 days in MG63 and for 5 days in U2OS ($P < 0.01$). It is suggested that rhBMP-2 and -6 could inhibit the proliferation and transmigration of MG63 and U2OS, induce their apoptosis and differentiation.

Keywords bone morphogenetic protein; cell proliferation; cell apoptosis; cell transmigration; alkaline phosphatase activity

人骨形态发生蛋白 (human bone morphogenetic proteins, hBMPs) 属于转化生长因子 β 超家族, 是目前所知的唯一可诱导异位骨形成的蛋白家族, 其促成骨分化的分子机制尚待阐明。近年有不少关于 hBMPs 抑制胃癌、胶质瘤、多发性骨髓瘤等的生长和促进其凋亡的报道, 而关于 hBMPs 对骨肉瘤作用的报道较少, 且不尽相同^[1]。因此, 本实验拟分别制备含 rhBMP-2 和 rhBMP-6 的条件培养液 (rhBMP-2 conditioned mediums, rhBMP2-CM 和 rhBMP-6 conditioned mediums, rhBMP6-CM) 干

收稿日期: 2009-07-30

基金项目: 重庆市自然科学基金项目 (CSCT2005BB5320)

作者简介: 何焕玲, 医师, 研究方向为肿瘤学, 电子信箱: estherlee0913@gmail.com; 周兰 (通信作者), 教授, 研究方向为分子肿瘤学, 电子信箱: zhoulun0111@gmail.com

预人骨肉瘤细胞株 MG63 和 U2OS,并以含重组绿色荧光蛋白 (recombinant green fluorescent protein,rGFP) 的条件培养液 (rGFP-CM) 作为实验对照,研究重组 hBMPs (recombinant human bone morphogenetic proteins,rhBMPs) 对骨肉瘤的生物学作用。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞株及细胞培养 HEK 293 细胞,以及人骨肉瘤细胞 MG63 和 U2OS 购自中国典型培养物保藏中心;HCT116 细胞为本实验室保存;HEK293 细胞、MG63 和 U2OS 贴壁生长于 RPMI 1640 培养液中(内含 10%(V/V)新生牛血清、青、链霉素各 100 U/mL),于 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度箱中培养,隔日换液,处于对数生长期时传代继续培养。

1.2 主要材料和试剂

表达 rhBMP 的重组腺病毒 AdBMP-2 和 AdBMP-6、以及表达 rGFP 的 AdGFP 由美国芝加哥大学分子肿瘤研究室惠赠^[2];RPMI 1640 购自美国 Hyclone 公司;24 孔细胞培养板和 Transwell 小室(直径 6.5 mm,孔径 8.0 μm)为美国 Corning Costar 公司产品;细胞凋亡原位检测试剂盒-POD 为德国 Roche 公司产品;氯化铯为美国 Amresco 公司产品;新生牛血清为兰州民海生物工程有限公司产品;台盼蓝、溴乙啶、吖啶橙、胰蛋白酶和碱性磷酸酶试剂盒均为美国 Sigma 公司产品;ECL 试剂盒、羊抗人 hBMP-2、hBMP-6 多克隆抗体、兔抗人 β-catenin 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品;兔抗羊和羊抗兔抗体为北京中杉生物技术有限公司产品;PVDF 膜(孔径 0.45 μm)为美国 Invitrogen 公司产品。

1.3 病毒扩增

参见参考文献[2]。

1.4 条件培养液(rhBMPs-CMs 和 rGFP-CM)的制备和鉴定 参见参考文献[3]。

1.5 实验分组和干预

MG63 和 U2OS 细胞接种在 24 孔板上,当细胞融合度达 70%~80%时,按实验分组进行相应干预,并于 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度箱中继续培养和观察;实验分组:①空白对照组:不施加任何干预因素的骨肉瘤细胞;②实验对照组:rGFP-CM 干预的两株骨肉瘤细胞;③实验组:rhBMP2-CM 和 rhBMP6-CM 干预的两株骨肉瘤细胞。每组设 3 个复孔,实验在相同条件下重复 3 次。

1.6 细胞增殖能力检测

各组在相应干预后 24、48 和 72 h,0.04%台盼蓝染色计数活细胞和死细胞,按以下公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{活细胞总数}}{\text{活细胞总数} + \text{死细胞总数}} \times 100\%$$

1.7 细胞凋亡率检测

1.7.1 TUNEL 法

0.25%胰酶消化干预后 24、48 和 72 h 的 MG63 和 U2OS

细胞,制成细胞涂片,4%多聚甲醛固定 1 h,按 Roche 公司 TUNEL-POD 试剂盒说明书进行操作。

1.7.2 AO/EB 荧光双染法

0.25%胰酶消化干预后 24、48 和 72 h 的 MG63 和 U2OS 细胞进行操作,具体方法参见参考文献[3]。

1.8 细胞迁移能力检测

用 0.25%胰蛋白酶消化细胞,制成单细胞悬液,在每个 Transwell 小室的上腔中加入 1.0×10⁴ 个细胞,下腔中加入 500 μL 含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液。培养 24 h 后,各上腔分别加入相应干预因素;干预后 24、48 和 72 h 在 400 倍镜下随机选择 5 个视野,计数每个视野穿过膜的细胞数。计算平均值,以穿过膜的细胞相对数目表示肿瘤细胞的迁移能力。

1.9 细胞 ALP 活性检测

分别于干预后 1、3、5、7 和 9 d 后弃去培养液,0.01 mol/L PBS 漂洗细胞 3 次,用细胞裂解液裂解细胞,900 r/min 离心 5 min,各取 100 μL 细胞裂解液与 1 mL 碱性磷酸酶反应底物混匀,反应 3 min 后在酶标仪 405 nm 波长下读取 ALP 活性的 OD 值,取平均值。

1.10 数据分析

所获实验数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 条件培养液的制备及其中 rhBMPs 的鉴定

AdBMPs 和 AdGFP 分别感染人结肠癌细胞 HCT116 后,按方法 1.4 收获条件培养液,并检测证实其中含相应重组蛋白。结果(图 1)表明,所制备的 rhBMP2-CM 和 rhBMP6-CM 中存在相应的 hBMP,表明条件培养液制备成功。

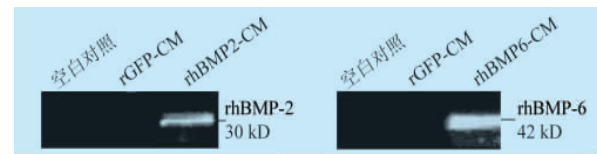


图 1 条件培养液中 rhBMP-2 和 rhBMP-6 的表达
鉴定 (Western blot)

Fig. 1 Expressions of rhBMP-2 and rhBMP-6 in a conditioned medium by Western blot

2.2 rhBMP2-CM 和 rhBMP6-CM 对 MG63 和 U2OS 细胞增殖能力的作用

如图 2 所示,在 24、48 和 72 h 3 个实验观察点,每株细胞的空白对照组和实验对照组的细胞存活率随时间无明显变化,并且两对照组之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$);实验组细胞的存活率则渐降低,到 72 h 时尤为明显。以 MG63 为例,到 72 h 时 rhBMP2-CM 处理组存活率仅为对照组的 11.78%,这些差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

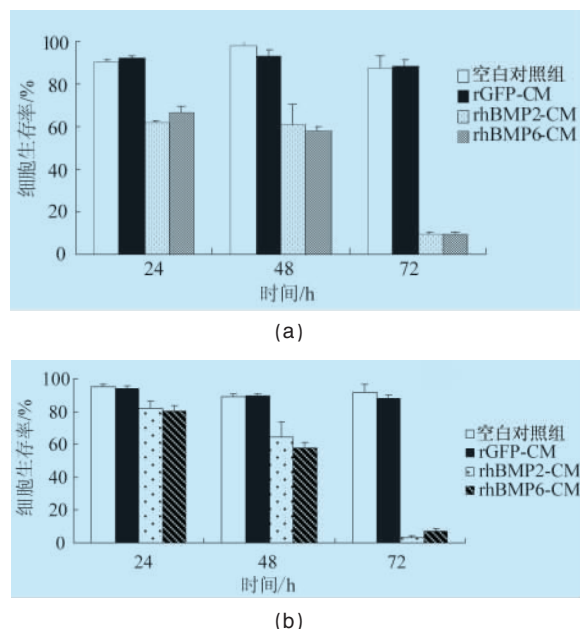


图2 rhBMPs-CMs对MG63(a)和U2OS(b)细胞存活率的影响

Fig. 2 Cell survival rates of MG63 (a) and U2OS (b) treated with rhBMPs-CMs

2.3 rhBMP2-CM和rhBMP6-CM对MG63和U2OS细胞凋亡的影响

2.3.1 TUNEL法

图3给出使用TUNEL方法情况, rhBMPs-CMs对MG63和U2OS的细胞凋亡率的影响。可以看出, 在3个时间点, 每株细胞的两个对照组的凋亡率均无明显变化 ($P>0.05$); 实验

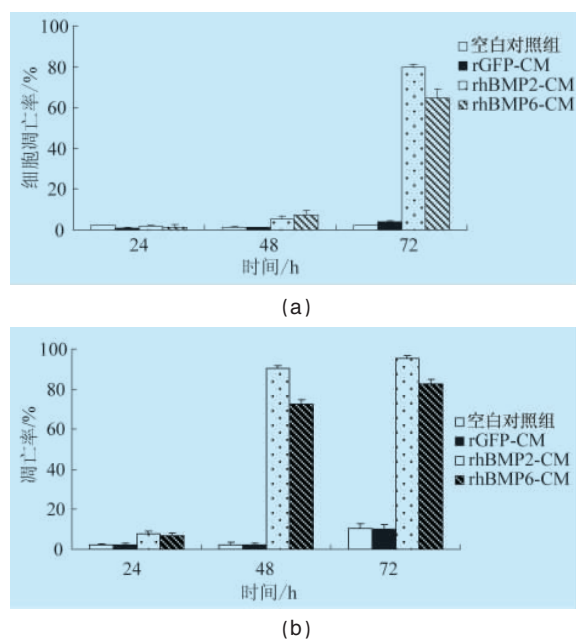


图3 rhBMPs-CMs对MG63(a)和U2OS(b)细胞凋亡率的影响(TUNEL法)

Fig. 3 Apoptosis indexes of MG63 (a) and U2OS (b) treated with rhBMPs-CMs by TUNEL

组的凋亡率则呈时间依赖性增加, 其中MG63组从48h开始有变化, 到72h时凋亡率明显高于对照组; U2OS组则从24h时即出现差异, 这些差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。提示rhBMP-2和rhBMP-6有诱导MG63和U2OS细胞凋亡的作用。

2.3.2 AO/EB荧光双染法

如图4所示, 与空白对照组相似, 实验对照组施加干预因素48h后荧光显微镜下可见少数凋亡细胞; 而实验组则可见较多的凋亡细胞; 该法所检测到的凋亡率变化与TUNEL法结果是一致的, 即实验组的凋亡率则呈时间依赖性增加, MG63组从48h开始出现差异, 而U2OS组从干预后24h即开始表现出和对照组的差异, 这些差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。

从图2和图3可以看出, 虽然U2OS组在48h检测点时生存率和凋亡率没有明显的反比关系, 但是从统计学上看, 与对照组均有统计学意义。TUNEL法与AO/EB法检测的绝对比值虽然不同, 但是趋势一致: 两种凋亡率的检测的结果都是逐渐增加, 且与对照组的差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。

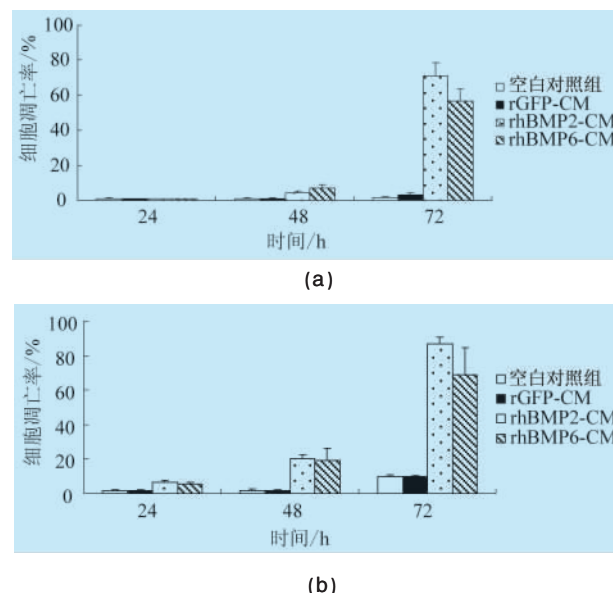


图4 rhBMPs-CMs对MG63(a)和U2OS(b)细胞凋亡率的影响(AO/EB荧光双染法)

Fig. 4 Apoptosis indexes of MG63 (a) and U2OS (b) treated with rhBMPs-CMs by AO/EB

2.4 rhBMP2-CM和rhBMP6-CM对MG63和U2OS细胞迁移能力的影响

rhBMP2-CM作用后不同时间点显微镜下细胞计数发现, 2株细胞的实验组的穿膜细胞数明显低于其相应的空白对照组和实验对照组, 所有差异均有统计学意义 ($P<0.01$), 其中MG63组呈现时间依赖性; 而对照组之间的差异则无统计学意义 (参见图5)。rhBMP6-CM作用于这两株细胞后, 穿膜实验结果与rhBMP2-CM组相似。

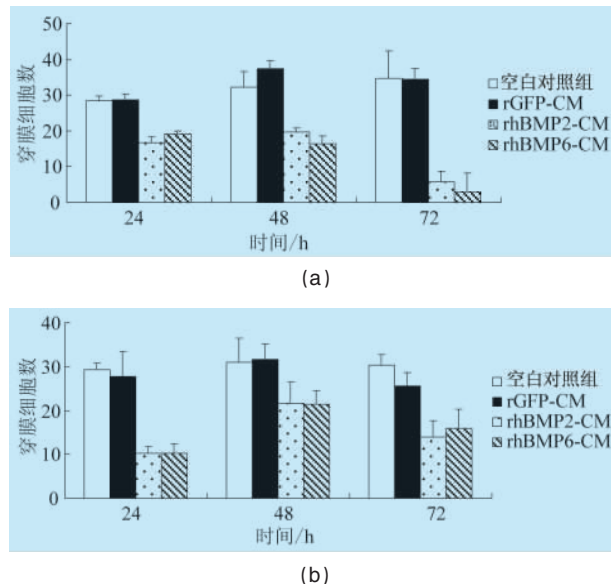


图5 rhBMPs-CMs 对 MG63(a)和 U2OS(b) 细胞迁移能力的影响

Fig. 5 Cell numbers of transmembrane of MG63 (a) and U2OS (b) treated with rhBMPs-CMs

2.5 rhBMP2-CM 和 rhBMP6-CM 对 MG63 和 U2OS 细胞的 ALP 活性的影响

如图 6 所示,在干预后 1、3、5、7 和 9 d 共 5 个时间点上每株细胞的 2 个对照组之间 ALP 活性差异无统计学意义 ($P>0.05$);U2OS 细胞和 MG63 细胞的实验组 ALP 活性分别在干预后 3 和 5 d 开始明显增加,且差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。

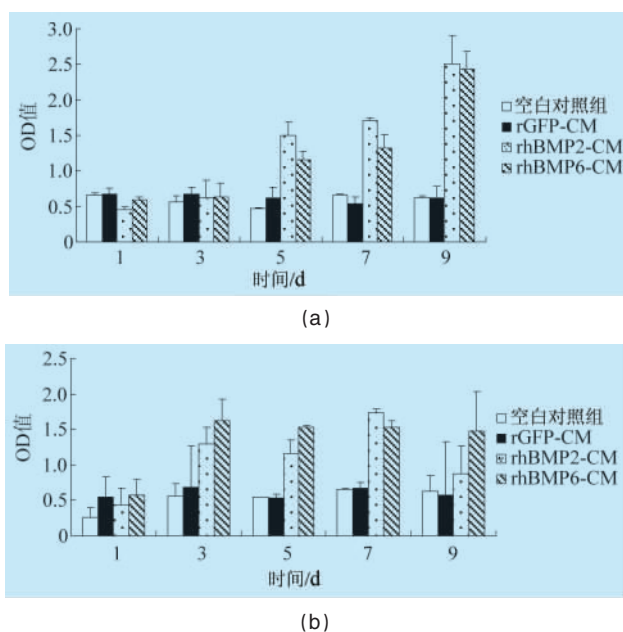


图6 hBMPs-CMs 对 MG63(a)和 U2OS(b) 细胞 ALP 活性的影响

Fig. 6 Activity of ALP of MG63 (a) and U2OS (b) treated with rhBMPs-CMs

3 讨论

hBMPs 是一类具有高效诱骨活性的蛋白质,能够诱导未分化的间充质干细胞向骨细胞和软骨细胞方向分化,在骨折和骨缺损的治疗中具有广泛的用途。hBMP-2 是 hBMP 家族中发现最早、研究最多的一员,对于它对肿瘤的作用报道也不尽相同。有发现 BMP-2 在体内可以促进骨肉瘤的生长^[4],并在骨肉瘤的转移中起着重要作用^[5];但更多研究者认为,hBMP-2 对肿瘤的生长无促进作用或者对肿瘤生长有抑制和转移作用^[6-7]。同时亦有 rhBMP-2 诱导肿瘤细胞向成骨方向分化的报道,如日本学者发现 rhBMP-2 可以促进鼠骨肉瘤细胞的成骨分化等^[9]。本实验的前期工作也发现它能够诱导人骨肉瘤细胞株 TE-85 向成骨方向分化^[10];在此基础上,本实验选用含 rhBMP-2 的条件培养液,通过体外作用于具有不同生物学特性的 2 株人骨肉瘤细胞 MG63 和 U2OS,较全面地探讨了它对骨肉瘤细胞的作用。结果表明,rhBMP-2 对人骨肉瘤细胞株 MG63 和 U2OS 具有抑制增殖和迁移、诱导凋亡的作用,同时它能使 MG63 和 U2OS 细胞的 ALP 活性明显增加。ALP 是成骨细胞的早期标志酶,是公认的成骨分化开始的标志物。因此,本实验也进一步证实了 hBMP-2 能够诱导骨肉瘤细胞向成骨方向分化。

hBMP-6 与 hBMP-2 一样,具有明确成骨活性,能够促进骨组织再生。有认为 BMP-6 的表达可以作为前列腺癌的疾病判断指标^[11],也有研究发现,hBMP-6 可以诱导骨髓瘤细胞的凋亡^[12];本实验前期研究发现 rhBMP-6 与 rhBMP-2 一样,对人骨肉瘤细胞 TE-85 具有诱导成骨的活性^[5]。本实验同样选用含 rhBMP-6 的条件培养液体外方式干预两株人骨肉瘤细胞,结果显示,rhBMP-6 对人骨肉瘤细胞的作用与 rhBMP-2 一致,能够抑制其增殖和迁移、诱导其凋亡,并明显增加 ALP 活性。

4 结论

综上所述研究发现:直接应用 hBMP-2 和 hBMP-6 的重组蛋白能抑制人骨肉瘤细胞的增殖和转移,诱导其凋亡和向成骨方向分化;此结果与本研究组通过腺病毒介导基因转入方式发现的 hBMP-2 和 hBMP-6 对骨肉瘤细胞的作用一致^[3]。这样的结果提示无论是以重组蛋白形式干预细胞还是以基因形式转入细胞,均可实现 hBMP-2 和 hBMP-6 抑制骨肉瘤细胞的生长和转移、诱导其凋亡和向成骨方向分化的作用,为它们的临床应用方式和前景提供了实验室依据。

致谢 感谢美国芝加哥大学医学中心何通川教授提供的 AdBMP-2、AdBMP-6 和 AdGFP 等关键实验材料和指导,以及寇小琴和谭启华给予的技术支持和帮助。

参考文献 (References)

- [1] 陈英华, 李星星, 周兰. BMP2 对骨肉瘤细胞株 MG63 的作用机制[J]. 科技导报, 2009, 27(11): 64-67.
- Chen Yinghua, Li Xingxing, Zhou Lan. *Science & Technology Review*,

- 2009, 27(11): 64-67.
- [2] Luo J, Deng Z L, Luo X, *et al.* A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(5): 1236-1247.
- [3] 左国伟, 何焕玲, 李星星, 等. 腺病毒介导 hBMP-2 和 hBMP-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.
- Zuo Guowei, He Huanling, Li Xingxing, *et al.* *Acta Medicine Militaris Tertiae*, 2007, 29(18): 1783-1786.
- [4] Sotobori T, Ueda T, Myoui A, *et al.* Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic migration of murine osteoblastic and osteosarcoma cells by enhancing incorporation of integrin beta1 into lipid rafts[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(19): 3927-3938.
- [5] Weiss K R, Cooper G M, Jadowiec J A, *et al.* VEGF and BMP expression in mouse osteosarcoma cells[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2006, 450: 111-117.
- [6] Orui H, Imaizumi S, Ogino T, *et al.* Effects of bone morphogenetic protein-2 on human tumor cell growth and differentiation: a preliminary report[J]. *Orthop Sci*, 2000, 5(6): 600-604.
- [7] Li B. Bone morphogenetic protein-Smad pathway as drug targets for osteoporosis and cancer therapy [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2008(3): 208-219.
- [8] Murphy M G, Mailhot J, Borke J, *et al.* The effects of rhBMP-2 on human osteosarcoma cells and human gingival fibroblasts *in vitro* [J]. *J Oral Implantol*, 2001, 27(1): 16-24.
- [9] Sotobori T, Ueda T, Myoui A, *et al.* Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic migration of murine osteoblastic and osteosarcoma cells by enhancing incorporation of integrin $\beta 1$ into lipid rafts [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(19): 3927-3938.
- [10] Cheng H W, Jiang W, Phillips F M, *et al.* Osteogenic activity of the 14 types of human bone morphogenetic proteins (HBMPs)[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2003(8): 1544-1552.
- [11] Yuen H F, Chan Y P, Cheung W L, *et al.* The prognostic significance of BMP-6 signaling in prostate cancer [J]. *Mod Pathol*, 2008, 21 (12): 1436-1443.
- [12] Ro T B, Holt R U, Brenne A T, *et al.* Bone morphogenetic protein-5, -6 and -7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells [J]. *Oncogene*, 2004, 23(17): 3024-3032.

(责任编辑 王芷)

中国声学学会

2009年青年学术会议

时间: 2009年10月

地点: 湖南·长沙

主办: 中国声学学会

会议网址: <http://www.aschina.org/news.asp?id=153>

通信地址: 北京市海淀区北四环西路21号中国声学学会办公室 (100190)

电话: 010-62554285

传真: 010-62561833

电子信箱: asc@mail.ioa.ac.cn