

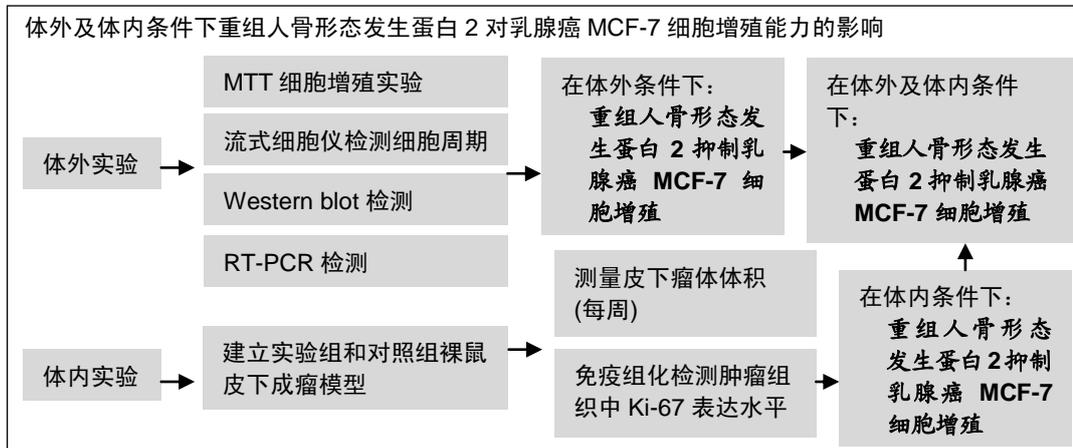
重组人骨形态发生蛋白2对乳腺癌MCF-7细胞增殖的影响

刘书中¹, 劳立峰² (¹中国医学科学院, 北京协和医学院, 北京协和医院骨科, 北京市 100730; ²上海交通大学医学院附属仁济医院骨科, 上海市 200127)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0578

ORCID: 0000-0002-2621-2226(劳立峰)

文章快速阅读:



刘书中, 男, 1989年生, 吉林省长春市人, 满族, 2015年上海交通大学毕业, 博士, 医师, 主要从事骨与关节疾病诊断与治疗研究。

通讯作者: 劳立峰, 博士, 主治医师, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市 200127

文献标识码: B

稿件接受: 2018-07-08



文题释义:

重组人骨形态发生蛋白2: 是诱导成骨的关键物质之一, 属转化生长因子 β 超家族中的一员, 它参与调节多种细胞的增殖、分化、迁移、侵袭及凋亡等一系列的生物学过程。

Akt: 是 PI3K/Akt 信号通路中的关键分子, 又称 PKB, 即蛋白激酶 B, 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 可使多种蛋白及自身磷酸化, 在调节细胞存活及多种生物学功能中起着极其重要的作用。Akt 活性异常可导致正常细胞向恶性细胞转化, 其磷酸化功能能够使多种底物被活化, 促进肿瘤细胞的生长、增殖、侵袭及转移, 抑制肿瘤细胞的凋亡。

细胞增殖: 是生物体的重要生命特征, 细胞以分裂的方式进行增殖。细胞增殖过程中通过细胞分裂, 可以将复制的遗传物质平均地分配到 2 个子细胞中去。由此可见, 细胞增殖是生物体生长、发育、繁殖和遗传的基础。

摘要

背景: 有研究发现重组人骨形态发生蛋白 2 的临床应用可增加恶性肿瘤的患病风险, 但关于重组人骨形态发生蛋白 2 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖作用的影响及机制尚未被阐明。

目的: 探讨在体外及体内条件下重组人骨形态发生蛋白 2 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖能力的影响及其作用机制。

方法: ①体外实验: 无血清条件下, 不同浓度的重组人骨形态发生蛋白 2 处理 MCF-7 细胞, 通过 MTT 检测重组人骨形态发生蛋白 2 对细胞增殖能力的影响。利用流式细胞分析技术检测细胞周期, 通过 Real-time PCR 检测不同浓度的重组人骨形态发生蛋白 2 对 p21、cyclin E 表达的影响, 应用 Western blot 技术检测不同浓度的重组人骨形态发生蛋白 2 处理对 p21、cyclin E 蛋白水平及对 PI3K/Akt 磷酸化水平的影响; ②体内实验: 将 14 只雌性裸鼠随机等分为实验组和对照组, 实验组成瘤方案为 MCF-7 细胞+重组人骨形态发生蛋白 2, 对照组成瘤方案为等量 MCF-7 细胞, 分别于 6 周龄裸鼠皮下注射。

结果与结论: ①体外实验: 无血清条件下, 不同浓度的重组人骨形态发生蛋白 2 处理细胞, 发现重组人骨形态发生蛋白 2 可显著抑制乳腺癌细胞系 MCF-7 的增殖能力。无血清条件下, 不同浓度的重组人骨形态发生蛋白 2 处理细胞 24 h, 发现重组人骨形态发生蛋白 2 可增加 G₁ 期细胞所占比率。重组人骨形态发生蛋白 2 可显著促进 p21 的表达, 显著抑制 cyclin E 的表达, 并显著抑制 PI3K/Akt 信号通路的磷酸化过程; ②体内实验: 实验组裸鼠皮下瘤体体积均较对照组低, 免疫组化检测显示重组人骨形态发生蛋白 2 处理可显著降低瘤体组织中 ki-67 的表达水平; ③研究证实体外及体内条件下重组人骨形态发生蛋白 2 通过影响 PI3K/Akt 信号通路对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖能力发挥显著抑制作用, 从基础水平进一步论证了重组人骨形态发生蛋白 2 的临床应用不能显著增加乳腺癌的患病风险, 为脊柱融合及骨不连等骨科疾病的治疗中应用重组人骨形态发生蛋白 2 提供了一定的理论基础。

关键词:

重组人骨形态发生蛋白 2; PI3K/Akt; 乳腺癌; MCF-7 细胞系; 细胞增殖; 细胞周期蛋白; 体内实验; 体外研究; 临床应用

主题词:

骨形态发生蛋白质类; 肿瘤; 细胞增殖; 组织工程

中图分类号: R459.9

基金资助:

上海市科委医学引导类科技支撑项目(17411964200), 项目负责人: 劳立峰; 上海市浦江人才计划(15PJJD026), 项目负责人: 劳立峰; 上海交通大学医工交叉研究基金面上项目(YG2014MS51), 项目负责人: 劳立峰; 上海仁济医院临床科研创新培育基金(PYXJS16-006), 项目负责人: 劳立峰

Liu Shuzhong, MD,
Physician, Chinese Academy
of Medical Sciences &
Peking Union Medical
College, Department of
Orthopedics, Peking Union
Medical College Hospital,
Beijing 100730, China

Corresponding author:
Lao Lifeng, MD, Attending
physician, Department of
Orthopedics, Renji Hospital,
Shanghai Jiao Tong
University School of
Medicine, Shanghai 200127,
China

Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the proliferation of breast cancer MCF-7 cells

Liu Shuzhong¹, Lao Lifeng² (¹Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Department of Orthopedics, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China; ²Department of Orthopedics, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China)

Abstract

BACKGROUND: Clinical application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) has been found to increase the risk for malignant tumors, but the effect of rhBMP-2 on the proliferation of breast cancer MCF-7 cells and the underlying mechanism remain unclear.

OBJECTIVE: To explore the effects of rhBMP-2 on the proliferation of breast cancer MCF-7 cells and the underlying mechanism *in vivo* and *in vitro*.

METHODS: *In vitro* study: cell proliferation of MCF-7 under different concentrations of rhBMP-2 was determined by MTT assay and flow cytometry in serum-free condition. The cell cycle was detected by flow cytometry. The expression levels of p21 and cyclin E were detected by real-time PCR. The protein levels of p21, cyclin E and phosphorylation of PI3K/Akt were tested by western blot and real-time PCR. *In vivo* study: fourteen 6-week-old female nude mice were divided into two groups: experimental group (subcutaneous injection of rhBMP-2 plus MCF-7 cells), control group (subcutaneous injection of the same volume of MCF-7 cells).

RESULTS AND CONCLUSION: *In vitro* study: rhBMP-2 markedly inhibited the proliferation of MCF-7 cells in serum-free condition. After 24-hour treatment, rhBMP-2 could increase the G₁ cell ratio. rhBMP-2 could significantly increase the expression of p21 as well as significantly inhibit the expression of cyclin E and phosphorylation in the PI3K/Akt signaling pathway. *In vivo* study: the volume of subcutaneous tumor in the experimental group was smaller than that in the control group. Immunohistochemistry revealed that rhBMP-2 could significantly decrease the expression level of ki-67 in tumor tissues. Our study suggests that rhBMP-2 has significantly suppressive effect on the proliferation of breast cancer MCF-7 cells *via* PI3K/Akt pathway *in vitro* and *in vivo*. Therefore, we can provide the basic science data to avoid risks of breast cancer and to support the utilization of rhBMP-2 in the management of spinal fusion, treatment of bone union and other orthopedic disorders.

Subject headings: Bone Morphogenetic Proteins; Neoplasms; Cell Proliferation; Tissue Engineering

Funding: the Medicine-Guided Science and Technology Project of Shanghai Science and Technology Commission, No. 17411964200 (to LLF); the Talent Program of Shanghai Pujiang, No. 15PJD026 (to LLF); the Medical-Engineering Joint Foundation of Shanghai Jiao Tong University, No. YG2014MS51 (to LLF); the Clinical Research and Innovation Foundation of Renji Hospital of Shanghai, No. PYXJS16-006 (to LLF)

0 引言 Introduction

骨形态发生蛋白是转化生长因子 β 超家族中的成员,由Urist等^[1-2]于1965年首次报道,迄今发现的骨形态发生蛋白已超过30种,其中骨形态发生蛋白2的临床应用最为广泛。近年来,骨形态发生蛋白2在调节细胞增殖、分化、迁移、凋亡等领域的生物学功能得到进一步证实,但多项研究显示骨形态发生蛋白2信号通路尚可参与多种肿瘤的发生与进展^[3-5]。磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 信号通路是参与调控细胞增殖、分化、迁移及凋亡等多种重要生物学行为的重要信号通路^[6]。AKT是PI3K/AKT信号转导通路中的关键分子,其磷酸化功能能够使多种底物被活化,进而发挥相应的细胞调控作用^[6]。

美国食品及药品管理局已批准将重组人骨形态发生蛋白2应用于临床,目前重组人骨形态发生蛋白2多用于脊柱融合及骨不连等骨科疾患的治疗中,但近年来,国内外多项研究表明重组人骨形态发生蛋白2的临床应用可增加多种恶性肿瘤的患病风险^[4-5, 7-8]。

实验选用乳腺癌MCF-7细胞系作为实验对象,探讨重组人骨形态发生蛋白2对MCF-7细胞增殖能力的作用及其可能机制,为重组人骨形态发生蛋白2应用于骨科疾病临床治疗并预防肿瘤发生发展提供一定的基础实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞分子生物学体外实验及裸鼠模型体内实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年12月至2016年12月在上海交通大学医学院附属仁济医院完成。

1.3 材料 14只6周龄雌性BALB/c nu/nu裸鼠购自上海第二军医大学实验动物中心,生产许可证号SCXK(沪)

2012-0003,使用许可证号SYXK(沪)2012-0003。每笼4只,按SPF(specific-pathogen free)级别饲养。研究经上海交通大学医学院附属仁济医院伦理委员会审核。重组人骨形态发生蛋白2购自UCLA骨科实验室(加州,美国),人乳腺癌细胞系MCF-7购自上海市肿瘤研究所(上海,中国),胎牛血清、RPMI1640培养基、胰蛋白酶以及细胞培养相关试剂均购自Gibco公司,RT-PCR相关试剂、DNA Marker、TRIZOL购自TakaRa公司,Western blot试剂购自Sigma公司,抗体均购自R&D公司,Matrigel购自BD Biosciences公司,3550型酶标仪购自美国Bio Rad公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 将人乳腺癌MCF-7细胞培养于体积分数10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素的RPMI1640培养基中,所有细胞在体积分数5%CO₂的37 °C培养箱中常规培养,培养液每2 d或3 d更换1次。

1.4.2 MTT细胞增殖实验 取上述培养的MCF-7细胞用0.25%胰蛋白酶消化,新鲜的培养液吹打下制成细胞悬液,用血球计数板计数,并调整细胞浓度到 $1 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$,按 2×10^5 /孔MCF-7细胞接种在96孔板中过夜,在无血清条件下,第2天加入重组人骨形态发生蛋白2处理,重组人骨形态发生蛋白2浓度分别为0(未加入重组人骨形态发生蛋白2),2,4,6,10 nmol/L。分别培养24 h后,于倒置显微镜(Olympus公司)下观察。MTT试剂及二甲亚砜(100 μL /孔)按照用法要求加入,所得产物吸光度应用酶标仪在570 nm下测量。

1.4.3 流式细胞仪检测细胞周期 将细胞浓度为 $1 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ 的MCF-7细胞悬液接种于6孔培养皿中,每孔1 mL。然后在无血清培养基中培养24 h。MCF-7细胞于无血清条件下培养24 h后,各孔分别加入0 nmol/L(未加入重组人骨形态发生蛋白2),2,4,6,10 nmol/L重组人骨形态发生蛋白2。完成上述操作后,用PBS洗涤细胞并在37 °C条件下使用胰

蛋白酶处理。将细胞在体积分数70%乙醇中固定30 min, 3 200 r/min离心5 min, 用含体积分数1%胎牛血清的PBS洗涤3次, 重悬细胞。使用50 mg/L propidium iodide和5 mg/L RNaseA进行核染色, 应用流式细胞仪检测分析。

1.4.4 Western blot检测 将人乳腺癌MCF-7细胞悬液以 $3 \times 10^5 L^{-1}$ 的细胞浓度接种于6孔培养皿中, 每孔1 mL。然后在无血清培养基中培养24 h。选取对数生长期的MCF-7细胞于无血清条件下分别加入0(未加入重组人骨形态发生蛋白2), 2, 4, 6, 10 nmol/L重组人骨形态发生蛋白2。处理后用PBS洗涤细胞, 然后经M-PER溶解、10%SDS-PAGE分离蛋白质并转移至PVDF膜。经上述处理后以p21、Cyclin E、PI3Kp85 α 、p-AKT, AKT及 β -Actin为一抗, 使用辣根过氧化物酶标记的IgG作为二抗, 孵育后显色。

1.4.5 RT-PCR检测 检测人乳腺癌MCF-7细胞的增殖基因及mRNA表达水平, 将MCF-7细胞接种于6孔培养皿中, 加入上述不同浓度(0, 2, 4, 6, 10 nmol/L)的重组人骨形态发生蛋白2处理, 并培养24 h。总RNA由TRizol分离提取, 随后进行DNA酶处理。RT-PCR检测使用7300 RT-PCR仪(Invitrogen公司)完成, 所有检测过程均在仪器使用说明书指导下完成。

1.4.6 体内实验 将14只6周龄雌性裸鼠平均随机分为实验组($n=7$)和对照组($n=7$)。实验组成瘤方案为200 μ L MCF-7细胞+重组人骨形态发生蛋白2(20 μ L)+Matrigel(20 μ L)+PBS, 对照组成瘤方案为等量的200 μ L MCF-7细胞+Matrigel(20 μ L)+PBS, 分别于裸鼠背部皮下注射, 每周测量实验组及对照组裸鼠成瘤大小并测算体积(体积(mm^3) = (瘤体长径 \times 瘤体短径 2) \times 0.5)。

8周后处死裸鼠, 取肿瘤组织行免疫组化检测裸鼠荷瘤组织中ki-67表达情况。

1.5 主要观察指标 ①体外实验中不同浓度的重组人骨形态发生蛋白2对乳腺癌MCF-7细胞增殖的影响及相关mRNA、蛋白的表达情况; ②体内实验中实验组、对照组裸鼠皮下成瘤体积及荷瘤组织中Ki-67表达情况。

1.6 统计学分析 数据处理和统计分析采用SPSS 20.0 (IBM公司, 美国)完成, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。Mann-Whitney U 检验比较裸鼠皮下成瘤体积及瘤体质量, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 体外实验结果

2.1.1 不同浓度及作用时间重组人骨形态发生蛋白2对MCF-7细胞增殖的影响 无血清条件下, 不同浓度的重组人骨形态发生蛋白2处理细胞24 h, 通过MTT检测重组人骨形态发生蛋白2对细胞增殖能力的影响, 发现重组人骨形态发生蛋白2可抑制MCF-7的增殖(4 nmol/L及以上浓度处理MCF-7的增殖能力与对照组的差异有显著性意义, 见图1。无血清条件下, 6 nmol/L的重组人骨形态发生蛋白2处理细胞不同时间, 通过MTT检测重组人骨形态发生蛋白2对细胞增殖能力的影响, 发现24 h后, 重组人骨形态发生蛋白2显著抑制MCF-7的增殖能力, 见图2。

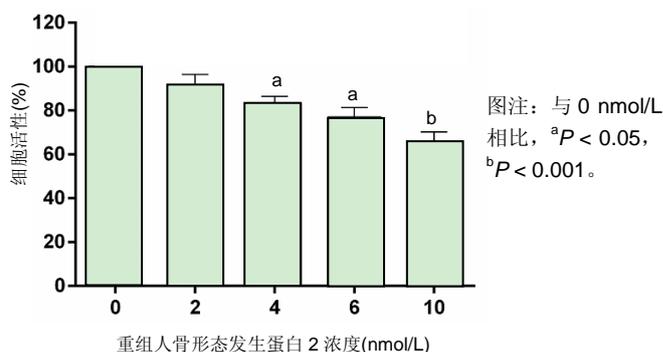


图1 不同浓度重组人骨形态发生蛋白2对MCF-7细胞增殖的影响
Figure 1 Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at different concentrations on the proliferation of MCF-7 cells

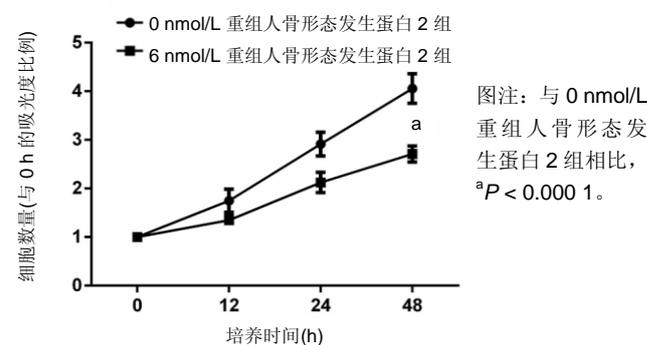


图2 不同时间重组人骨形态发生蛋白2对MCF-7细胞增殖的影响
Figure 2 Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at different time points on the proliferation of MCF-7 cells

2.1.2 重组人骨形态发生蛋白2对MCF-7细胞周期的影响 无血清条件下, 不同浓度的重组人骨形态发生蛋白2处理细胞24 h, 通过流式细胞仪检测细胞周期, 发现重组人骨形态发生蛋白2可影响MCF-7细胞周期, 增加G₁期细胞所占比率, 相比0 nmol/L, 在10 nmol/L剂量下G₁期细胞所占比率由50%增加到70%, S期细胞所占比率缩小10%, 见图3。不同浓度的重组人骨形态发生蛋白2处理细胞24 h, 通过Real-time PCR检测其对p21和cyclin E表达的影响, 发现重组人骨形态发生蛋白2可显著促进p21 mRNA的表达, 显著抑制cyclin E mRNA的表达, 见图4。不同浓度的重组人骨形态发生蛋白2处理细胞24 h, 通过Western blot检测其对p21和cyclin E蛋白表达水平的影响, 发现重组人骨形态发生蛋白2可显著促进p21的表达, 显著抑制cyclin E的表达, 见图5。

2.1.3 不同浓度的重组人骨形态发生蛋白2对MCF-7细胞系PI3K/Akt磷酸化水平的影响 不同浓度的重组人骨形态发生蛋白2处理细胞24 h, 通过Western blot检测其对PI3K/Akt磷酸化水平的影响, 发现重组人骨形态发生蛋白2可显著抑制PI3K/Akt的磷酸化过程, 见图6。

2.2 体内实验结果 实验组及对照组所有裸鼠均建模成功, 在成瘤后第3-8周实验组裸鼠皮下瘤体体积均较对照组低($P < 0.001$), 见图7。通过免疫组化检测经重组人骨形态发生蛋白2处理与否小鼠荷瘤组织中ki-67的表达差异, 发现重组人骨形态发生蛋白2处理可显著降低裸鼠皮下荷瘤组织中ki-67的表达水平, 见图8。

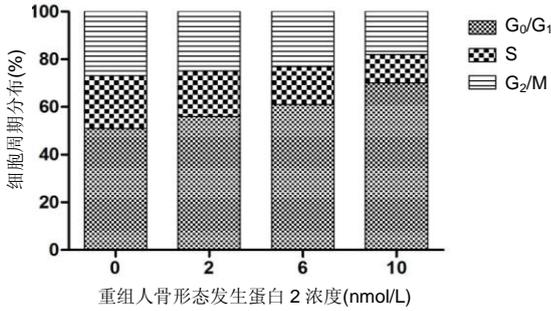


图3 不同浓度重组人骨形态发生蛋白2对MCF-7细胞周期的影响
Figure 3 Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at different concentrations on the cell cycle of MCF-7 cells

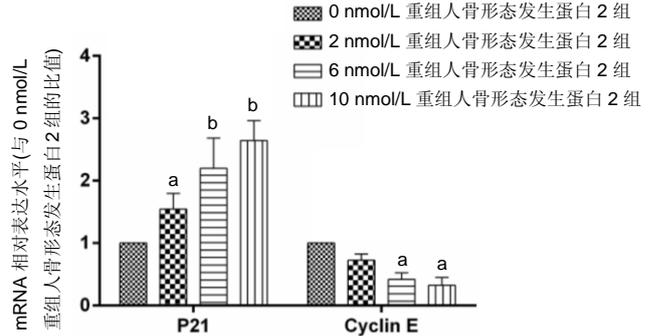


图4 不同浓度重组人骨形态发生蛋白2对MCF-7细胞周期蛋白p21和cyclin E mRNA的影响
Figure 4 Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at different concentrations on mRNA levels of p21 and cyclin E in MCF-7 cells
图注: 与0 nmol/L 重组人骨形态发生蛋白2组相比, ^aP<0.05, ^bP<0.0001。

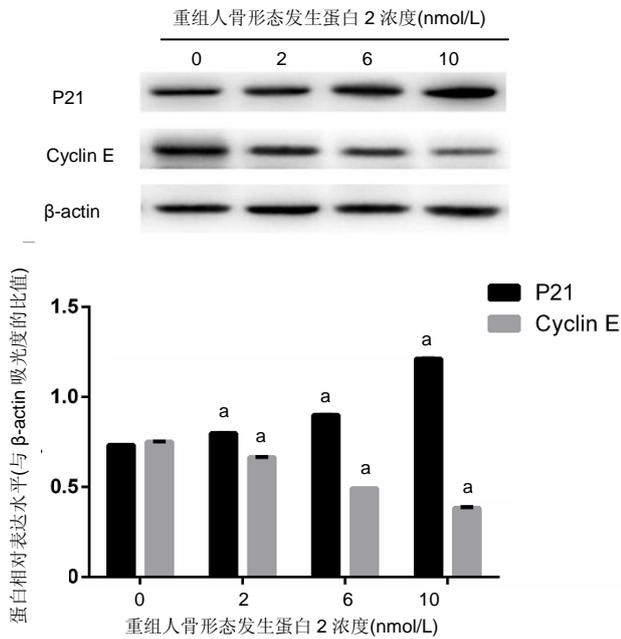


图5 不同浓度重组人骨形态发生蛋白2对MCF-7细胞周期蛋白p21和cyclin E的影响
Figure 5 Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at different concentrations on cell cycle proteins of p21 and cyclin E in MCF-7 cells
图注: 与0 nmol/L 重组人骨形态发生蛋白2组相比, ^aP<0.0001。

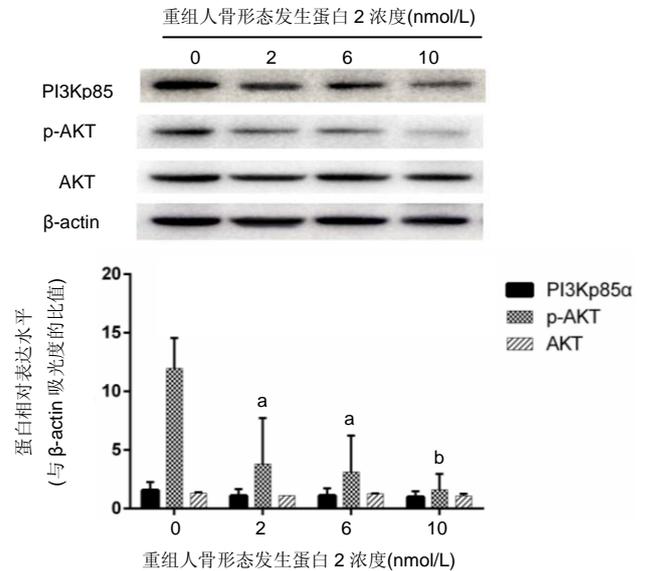


图6 不同浓度重组人骨形态发生蛋白2对MCF-7细胞系PI3K/Akt磷酸化水平的影响
Figure 6 Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at different concentrations on phosphorylation of PI3K/Akt pathway in MCF-7 cells
图注: 与0 nmol/L 重组人骨形态发生蛋白2组相比, ^aP<0.01, ^bP<0.001。

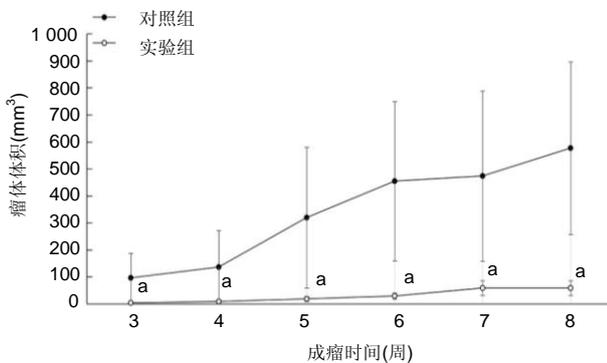


图7 重组人骨形态发生蛋白2对乳腺癌MCF-7细胞诱导裸鼠成瘤的影响
Figure 7 Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the subcutaneous tumor volume of MCF-7-induced nude mice
图注: 实验组成瘤方案为MCF-7细胞+重组人骨形态发生蛋白2, 对照组成瘤方案为等量MCF-7细胞。与对照组相比, ^aP<0.05。

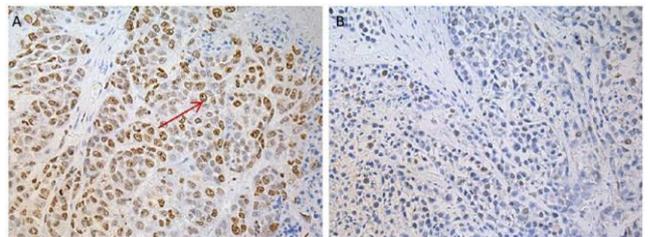


图8 重组人骨形态发生蛋白2对乳腺癌MCF-7细胞诱导成瘤裸鼠荷瘤组织中ki-67的表达的影响(免疫组化染色, ×40)
Figure 8 Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the expression of ki-67 in MCF-7-induced nude mice (immunohistochemistry, ×40)
图注: 图中A为对照组, 成瘤方案为MCF-7细胞; B为实验组, 成瘤方案为MCF-7细胞+重组人骨形态发生蛋白2。箭头指示ki-67阳性表达。

3 讨论 Discussion

自2002年美国FDA批准将重组人骨形态发生蛋白2用于脊柱融合手术及骨不愈合的临床治疗后, 其显著促进骨质形成的作用得到国际上的广泛认可^[9]。迄今为止, 尚缺乏关于重组人骨形态发生蛋白2与乳腺癌的发生与发展相关性的研究, Ghosh-Choudhury等^[10]以乳腺癌MDA-MB-231细胞系为研究对象, 运用体外实验证实了骨形态发生蛋白2可以通过调控Rb蛋白的CDK磷酸化过程抑制MDA-MB-231细胞增殖过程。与之相反, Katsuno等^[11]报道骨形态发生蛋白2增加了MDA-231-D细胞(MDA-MB-231细胞的亚克隆)肿瘤细胞的活性。Ye等^[12]进一步阐明了骨形态发生蛋白2抑制MDA-MB-231细胞增殖的具体机制, 即通过改变多种细胞周期蛋白表达水平进而调节Smad、Wnt通路而实现其抑制细胞增殖的作用。

迄今, 重组人骨形态发生蛋白2凭借其强大的诱导骨生成的特性已广泛用于骨折后骨不连和脊柱融合手术当中。然而, 多项体外和体内实验证明肿瘤细胞骨形态发生蛋白2受体的存在, 并且发现重组人骨形态发生蛋白2具有促进某些肿瘤细胞生长、增殖、侵袭和转移的潜能^[4-5, 7-8]。近年来, 国内外多项研究提出重组人骨形态发生蛋白2的临床应用可能增加多种恶性肿瘤的患病风险, 并可引起诸如逆行射精、脊髓神经根炎、异位骨化、局部组织肿胀等严重不良反应^[13-16]。以上因素就使骨形态发生蛋白2在脊柱融合及骨不愈合治疗中的应用面临极大地限制和挑战。正因如此, 国际上需要更多的基础与临床研究来充分评估重组人骨形态发生蛋白2的临床应用风险。Skovrlj等^[17]回顾性分析了重组人骨形态发生蛋白2与肿瘤关联性的相关文献, 提出重组人骨形态发生蛋白2的临床应用并未显著增加患者恶性肿瘤的患病风险, 但需要更多深入的体内与体外研究予以进一步证实。

实验的目的是探讨体外及体内条件下重组人骨形态发生蛋白2对MCF-7细胞增殖的作用及其可能机制, 并检验重组人骨形态发生蛋白2是否可以对远离原发部位的乳腺癌肿瘤细胞的增殖产生生物学影响。作者选用乳腺癌MCF-7细胞系作为研究对象, 探讨重组人骨形态发生蛋白2对MCF-7细胞增殖能力的作用及其可能机制, 在体外实验证实了重组人骨形态发生蛋白2可显著抑制乳腺癌细胞系MCF-7的增殖能力, 流式细胞分析表明不同浓度的重组人骨形态发生蛋白2处理细胞可增加G₁期细胞的比率, 且呈浓度依赖性。Western blot、RT-PCR检测结果显示重组人骨形态发生蛋白2可显著促进p21的表达, 显著抑制cyclin E的表达, 并显著抑制PI3K/Akt的磷酸化过程, 实验结果表明重组人骨形态发生蛋白2可激活PI3K/Akt信号通路, 进而抑制MCF-7细胞增殖能力, 其抑制效应呈现浓度依赖性。动物实验进一步证实实验组裸鼠皮下瘤体体积、重量均较对照组低, 实验组股骨破坏较对照组轻微, 免疫组化检测显示重组人骨形态发生蛋白2处理后可显著降低瘤体组织中ki-67的表达水平。

实验首次通过实验证实在体内及体外条件下重组人骨形态发生蛋白2对乳腺癌MCF-7细胞系增殖能力具有显著的

抑制作用, 骨基质中内源性重组人骨形态发生蛋白2表达水平为1.0-2.0 ng/g, 此水平低于实验中重组人骨形态发生蛋白2的浓度, 由此表明骨微环境中较低浓度的骨形态发生蛋白2可能不足以抑制乳腺癌细胞生长, 并且在机体微环境中骨形态发生蛋白2水平增高并未显著增加MCF-7细胞的增殖、分化、迁移等活性^[12]。有学者报道骨形态发生蛋白2只有在高浓度条件下才可发挥对间充质干细胞、乳腺癌、前列腺癌、肺癌等恶性肿瘤细胞的抑制作用, 因而在体内实验中成瘤部位重组人骨形态发生蛋白2维持在一定浓度范围以上至关重要^[12, 18-20]。特别是在体内实验中, 外源性重组人骨形态发生蛋白2在种植部位的剂量取决于载体类型、种植浓度及种植时间。例如, 在种植7 d后, 在含有骨形态发生蛋白结合肽载体情况下可有53%的骨形态发生蛋白2保留在种植部位, 而在无骨形态发生蛋白结合肽载体情况下只有28%的骨形态发生蛋白2存在。较高的骨形态发生蛋白2浓度可能在抑制乳腺癌细胞增殖方面效果更佳, 此外, 国际上有学者报道MCF-7细胞系在动物实验中成瘤效果不佳^[21-22]。为解决上述问题, 作者在体内实验在实验组及对照组注射所用肿瘤细胞悬液中均加入20 μL Matrigel, 实验结果表明皮下及股骨内成瘤率均达到100%, 并可有效增加皮下及股骨内成瘤局部重组人骨形态发生蛋白2的浓度。

多种治疗策略如手术治疗、化疗、放疗、内分泌治疗及靶向治疗等, 已被广泛应用于乳腺癌患者的临床治疗中。但是, 据最新统计乳腺癌依然是威胁女性健康的头号杀手^[23], 且易发生骨转移^[24-25], 目前乳腺癌与乳腺癌骨转移的临床治疗效果仍有待进一步提高。在之前的研究中, 作者发现骨形态发生蛋白2可以在体内及体外条件下促进前列腺癌细胞增殖与转移, 作者进一步证明了分泌性磷蛋白24 ku(spp24), 可以阻断骨形态发生蛋白2对前列腺癌的作用^[7-8]。实验结果研究显示, 骨形态发生蛋白信号系统的失调可能与多种恶性肿瘤的发生、发展密切相关^[7-8], 而spp24有望成为肝癌、前列腺癌、胰腺癌及其骨转移癌的新型治疗剂, 但是目前尚缺乏重组人骨形态发生蛋白2与乳腺癌的相关性研究^[17]。骨转移癌是乳腺癌的常见并发症, 此次实验表明重组人骨形态发生蛋白2可以在体内用作抗肿瘤治疗剂治疗转移性乳腺癌模型。综上所述, 可以为重组人骨形态发生蛋白2应用于乳腺癌及乳腺癌脊柱转移癌患者的治疗提供一定的基础科学依据。

文章尚存在诸多不足: ①研究中没有设置spp24对重组人骨形态发生蛋白2及乳腺癌MCF-7细胞系的影响, 其相关性及其机制尚需进一步探索; ②在体内实验中建立的是裸鼠皮下肿瘤模型, 皮下成瘤模型的病理生理条件与原位模型可能不完全相同, 乳腺及骨骼原位肿瘤模型可能对于实验结果的阐明具有更大的优势, 且体内实验中各组裸鼠数量较少, 在一定程度上影响了实验结果的准确性; ③在实验中可尝试进行间断重组人骨形态发生蛋白2注射, 更有利于重组人骨形态发生蛋白2局部有效浓度的维持; ④最后实验只是针对重组人骨形态发生蛋白2对乳腺癌MCF-7增殖能力的影响, 而对细胞其它生物学行为的作用需进一步深入探讨; ⑤乳腺癌MCF-7细胞呈雌激素依赖性, 不同雌激素水平对MCF-7细胞

增殖能力的影响有待实验加以论证^[12]。

作者通过上述实验证实体内及体外条件下重组人骨形态发生蛋白2对乳腺癌MCF-7细胞增殖能力具有显著的抑制作用，并与PI3K/Akt信号通路密切相关。从基础水平进一步论证了重组人骨形态发生蛋白2的临床应用不能显著增加乳腺癌的患病风险，为在脊柱融合及骨不连等骨科疾病的治疗中应用重组人骨形态发生蛋白2提供了一定的理论基础。

作者贡献: 刘书中、劳立峰进行实验设计，实验实施为刘书中、劳立峰，实验评估为劳立峰，资料收集为刘书中、劳立峰，刘书中成文，劳立峰审校。

经费支持: 该文章接受了“上海市科委医学引导类科技支撑项目(17411964200)”、“上海市浦江人才计划(15PJD026)”“上海交通大学医工交叉研究基金面上项目(YG2014MS51)”“上海仁济医院临床科研创新培育基金(PYXJS16-006)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经上海交通大学医学院附属仁济医院动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在戊巴比妥钠麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁，可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(3698):893-899.
- [2] Salazar VS, Gamer LW, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(4):203-221.
- [3] Kang MH, Kang HN, Kim JL, et al. Inhibition of PI3 kinase/Akt pathway is required for BMP2-induced EMT and invasion. *Oncol Rep*. 2009;22(3):525-534.
- [4] Lao L, Shen J, Tian H, et al. Secreted phosphoprotein 24kD (Spp24) inhibits growth of hepatocellular carcinoma in vivo. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017;51:51-55.
- [5] Li CS, Tian H, Zou M, et al. Secreted phosphoprotein 24kD (Spp24) inhibits growth of human pancreatic cancer cells caused by BMP-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;466(2):167-172.
- [6] Yu JS, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development*. 2016;143(17):3050-3060.
- [7] Faundez A, Tournier C, Garcia M, et al. Bone morphogenetic protein use in spine surgery-complications and outcomes: a systematic review. *Int Orthop*. 2016;40(6):1309-1319.
- [8] James AW, LaChaud G, Shen J, et al. A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng Part B Rev*. 2016;22(4):284-297.
- [9] Bodalia PN, Balaji V, Kaila R, et al. Effectiveness and safety of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for adults with lumbar spine pseudarthrosis following spinal fusion surgery: A systematic review. *Bone Joint Res*. 2016;5(4):145-152.
- [10] Ghosh-Choudhury N, Woodruff K, Qi W, et al. Bone morphogenetic protein-2 blocks MDA MB 231 human breast cancer cell proliferation by inhibiting cyclin-dependent kinase-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;272(3):705-711.
- [11] Katsuno Y, Hanyu A, Kanda H, et al. Bone morphogenetic protein signaling enhances invasion and bone metastasis of breast cancer cells through Smad pathway. *Oncogene*. 2008;27(49):6322-6333.
- [12] Ye S, Park BH, Song KJ, et al. In vivo inhibition of bone morphogenetic protein-2 on breast cancer cell growth. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013;38(3):E143-150.
- [13] Vavken J, Mameghani A, Vavken P, et al. Complications and cancer rates in spine fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Eur Spine J*. 2016;25(12):3979-3989.
- [14] Tannoury CA, An HS2. Complications with the use of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in spine surgery. *Spine J*. 2014;14(3):552-559.
- [15] Young A, Mirarchi A. Soft Tissue Swelling Associated with the Use of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Long Bone Non-unions. *J Orthop Case Rep*. 2015;5(3):18-21.
- [16] Malham GM, Giles GG, Milne RL, et al. Bone Morphogenetic Proteins in Spinal Surgery: What Is the Fusion Rate and Do They Cause Cancer? *Spine (Phila Pa 1976)*. 2015;40(22):1737-1742.
- [17] Skovrlj B, Koehler SM, Anderson PA, et al. Association Between BMP-2 and Carcinogenicity. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2015;40(23):1862-1871.
- [18] Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;(346):26-37.
- [19] Wang Y, He T, Liu J, et al. Synergistic effects of overexpression of BMP-2 and TGF- β 3 on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep*. 2016;14(6):5514-5520.
- [20] Zheng Y, Wang X, Wang H, et al. Bone morphogenetic protein 2 inhibits hepatocellular carcinoma growth and migration through downregulation of the PI3K/AKT pathway. *Tumour Biol*. 2014;35(6):5189-5198.
- [21] Zhao X, Wang Q, Yang S, et al. Quercetin inhibits angiogenesis by targeting calcineurin in the xenograft model of human breast cancer. *Eur J Pharmacol*. 2016;781:60-68.
- [22] Noël A, De Pauw-Gillet MC, Purnell G, et al. Enhancement of tumorigenicity of human breast adenocarcinoma cells in nude mice by matrigel and fibroblasts. *Br J Cancer*. 1993;68(5):909-915.
- [23] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(2):115-132.
- [24] Fontanella C, Fanotto V, Rihawi K, et al. Skeletal metastases from breast cancer: pathogenesis of bone tropism and treatment strategy. *Clin Exp Metastasis*. 2015;32(8):819-833.
- [25] Sciubba DM, Goodwin CR, Yurter A, et al. A Systematic Review of Clinical Outcomes and Prognostic Factors for Patients Undergoing Surgery for Spinal Metastases Secondary to Breast Cancer. *Global Spine J*. 2016;6(5):482-496.