

## · 实验研究 ·

# 抑制肿瘤细胞骨保护素表达对乳腺癌细胞致骨转移能力的影响

张帆 杨新华 唐振宁 梁燕 唐鹏 齐晓伟 陈庆秋 姜军

**【摘要】** 目的 观察抑制肿瘤细胞骨保护素(osteoprotegerin, OPG)表达对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株致骨转移的影响。方法 32 只 4~6 周龄雌性裸鼠被随机分为 A、B、C、D 4 组,每组 8 只,A、C 组的每只裸鼠按分组分别以  $5 \times 10^5$  个 MDA-MB-231 细胞注射入左心室(A 组)或左胫骨骨髓腔(C 组)。B、D 组的每只裸鼠按分组分别以  $5 \times 10^5$  个 MDA-MB-231i 细胞(OPG 表达抑制)注射入左心室(B 组)或左胫骨骨髓腔(D 组),42 d 后行病理检查,比较 A、B 组骨转移发生率和骨转移灶数量,以及 C、D 组的骨肿瘤体积。定量资料的比较采用 *t* 检验或秩和检验,定性资料比较采用 Fisher 确切概率检验。结果 A 组有 6 只发生骨转移,全组共检出不连续性骨转移灶 23 处;B 组有 3 只发生骨转移,全组共检出不连续性骨转移灶 8 处。A 组的骨转移发生率和转移灶数量虽高于 B 组,但两者差异并无统计学意义( $P > 0.05$ )。C 组肿瘤平均体积为  $(66.29 \pm 41.01) \text{ mm}^3$ , D 组肿瘤平均体积为  $(23.70 \pm 16.14) \text{ mm}^3$ , C 组骨肿瘤体积大于 D 组,两组间差异有统计学意义( $P = 0.02$ )。结论 乳腺癌细胞致骨转移能力与其 OPG 表达水平密切相关,抑制 OPG 表达可以降低乳腺癌细胞致骨转移的能力。

**【关键词】** 乳腺肿瘤;骨转移;骨保护素;MDA-MB-231 细胞株

**【中图分类号】** R737.9 **【文献标识码】** A

**Impact of inhibiting osteoprotegerin expression of tumor cell on breast cancer metastasis to bone** ZHANG Fan, YANG Xin-hua, TANG Zhen-ning, LIANG Yan, TANG Peng, QI Xiao-wei, CHEN Qing-qiu, JIANG Jun. Breast Disease Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the impact of inhibiting osteoprotegerin (OPG) expression in tumor cells on breast cancer cell line MDA-MB-231 induced bone metastasis. **Methods** Thirty-two female nude mice aged 4–6 weeks were divided randomly into four groups ( $n=8$  in each group). MDA-MB-231 cells ( $5 \times 10^5$ ) were injected into the body via the left heart ventricles (group A) and via the left tibia marrow cavities (group C), respectively. MDA-MB-231i cells ( $5 \times 10^5$ ) (OPG expression inhibition) were injected into the body via the left heart ventricles (group B) and via the left tibia marrow cavities (group D), respectively. Forty-two days after the injection, all the nude mice were subjected to pathological examination to

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30700814);第三军医大学 2006 年度中青年科研基金资助项目

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院乳腺疾病中心

通信作者:姜军, E-mail: jcbd@medmail.com.cn

determine bone metastasis. Student's *t*-test was used for the comparison of quantitative data, and Fisher's exact test was used for the comparison of qualitative data. **Results** There were 23 bone metastasis lesions detected and six mice with bone metastasis in group A, and 8 bone metastasis lesions detected and three mice with bone metastasis in group B, but with no statistically significant difference between the two groups ( $P > 0.05$ ). The bone tumor volume of group C and group D was  $(66.29 \pm 41.01) \text{ mm}^3$  and  $(23.70 \pm 16.14) \text{ mm}^3$ , respectively. The bone tumor volume of group C was larger than that of group D. There was a statistically significant difference in the bone tumor volume between group C and group D ( $P = 0.02$ ). **Conclusions** Breast cancer metastasis to bone is closely correlated with the osteoprotegerin expression level in tumor cells. To inhibit the osteoprotegerin expression can decrease the capability of breast cancer-induced bone metastasis.

**【Key words】** Breast neoplasms; Bone metastasis; Osteoprotegerin; MDA-MB-231 cell line

骨保护素(osteoprotegerin, OPG)是近年发现的肿瘤坏死因子受体超家族成员<sup>[1]</sup>,是调控破骨细胞活化维持骨稳定的关键因素。在乳腺癌骨转移过程中,骨组织的成骨细胞 OPG 表达下降对其发生、发展起重要作用,是转移灶发生溶骨性骨破坏的关键因素。现已证实部分乳腺癌细胞株表达 OPG<sup>[2]</sup>,但肿瘤细胞自身 OPG 表达对乳腺癌骨转移的影响目前还不清楚。本研究在前期利用 RNA 干扰(RNAi)抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株 OPG 表达的基础上,通过对 OPG 低表达和对照 MDA-MB-231 细胞致骨转移情况的比较研究,探讨肿瘤细胞自身 OPG 表达在乳腺癌骨转移发生、发展中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株购自上海细胞生物研究所。研究者前期稳定转染 OPG 干扰质粒 pGenesil-1. 1-1. 2-1. 3-shRNA1-shRNA2-shRNA3 的 MDA-MB-231 单克隆细胞(MDA-MB-231i), RNAi 对 OPG mRNA 和蛋白的表达抑制率分别为 91%和 73%(另文发表)。

### 1.2 动物

BALB/C-nu/nu 雌性裸鼠 32 只,4~6 周龄,体质量在 14~20 g 之间,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。动物于本校大坪医院实验动物中心无特殊病原体条件下饲养,保持恒温(25~27 °C)、恒湿(40%~50%),每日添加鸡蛋和维生素以增强裸鼠营养。将实验裸鼠随机分为 A、B、C、D 4 组,每组 8 只,A 组为 MDA-MB-231 左心室注射组,B 组为 MDA-MB-231i 左心室

注射组, C组为 MDA-MB-231 左胫骨骨髓腔注射组, D组为 MDA-MB-231i 左胫骨骨髓腔注射组。

### 1.3 主要试剂

DMEM-F12 培养基、0.25% 胰蛋白酶和胎牛血清均为 hyclone 公司产品, G418 为 Gibico 公司产品, 1×PBS 缓冲液和 0.5% 戊巴比妥钠溶液消毒备用, 0.4% 台盼蓝溶液备用。

### 1.4 细胞培养

MDA-MB-231 细胞株用 DMEM-F12 完全培养液(含 10% 胎牛血清) 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 每 2~3 d 更换培养液。待培养瓶中细胞 80%~90% 融合时传代。以 0.25% 胰蛋白酶消化对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 室温下以 1000 r/min(离心机半径 6 cm) 离心 5 min, 用 1×PBS 液漂洗 2 遍后以 1×PBS 液反复吹打重悬 MDA-MB-231 细胞, 调整细胞数至合适数值, 暂置于 4℃ 冰盒中待用。用 0.4% 台盼蓝溶液染色, 镜下观察, 计算活细胞率, 如活细胞率大于 90%, 则继续行下一步实验。对于 MDA-MB-231i 细胞, 除在培养基中加入 500 μg/ml 的 G418 维持筛选压力外, 其余实验方法与 MDA-MB-231 细胞株培养相同。

### 1.5 裸鼠左心室注射肿瘤细胞

以 60 mg/kg 的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉裸鼠, 75% 酒精消毒皮肤, 裸鼠取仰卧位, 头端朝向实验者, 再次反复吹打细胞悬液(细胞数为  $5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ), 以 29G 针头和 1 ml 注射器吸取 0.1 ml 细胞悬液, 于裸鼠左侧第 2 肋间胸骨旁 2~3 mm 处进针, 进针方向斜向内下, 与裸鼠纵轴及横轴均成 45° 角, 进针约 5~6 mm, 轻轻回抽, 如有鲜红色血液进入注射器, 提示左心室穿刺成功, 保持空针稳定, 在 30~60 s 内缓慢且均匀地向左心室注入细胞悬液。

### 1.6 裸鼠左胫骨骨髓腔注射肿瘤细胞

麻醉和消毒方法同前, 裸鼠取仰卧位, 以 29G 针头和 1 ml 注射器吸取 10 μl 细胞悬液(细胞数为  $5 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ ), 将裸鼠左膝关节弯曲成约 135°, 以肉眼可见的白色股四头肌肌腱在胫骨止点内上各约 0.5 mm 处为进针点, 进针后稍用力穿破胫骨骨皮质后针头沿胫骨骨髓腔向远端进入约 5 mm, 将细胞悬液注入胫骨骨髓腔。

### 1.7 病理检查

于肿瘤细胞注射后第 42 天处死裸鼠, 解剖 A 组和 B 组裸鼠颅骨、颈椎、胸椎、腰椎、肋骨、四肢长骨、肩胛骨和骨盆骨, 肉眼观察骨转移肿瘤形成情况, 如骨转移可疑, 则以 10% 甲醛固定 24 h 后, 用 10% 盐酸脱钙, 酒精脱水, 常规

石蜡包埋,制作  $4\ \mu\text{m}$  切片,行苏木精-伊红染色,显微镜下观察并判断是否形成骨转移。解剖 C 组和 D 组裸鼠左后肢长骨,测量骨肿瘤最长径(a)和最短径(b),按公式:体积= $a \times b^2 / 2$  计算骨肿瘤体积<sup>[3]</sup>。

### 1.8 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料的比较采用 *t* 检验或秩和检验,转移发生率的比较采用 Fisher 精确概率检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 裸鼠死亡情况

全部裸鼠均按分组完成肿瘤细胞注射。注射当日至实验结束,全组裸鼠无死亡,注射致死率为 0。

### 2.2 病理检查结果

A 组共有 6 只裸鼠出现骨转移,全组共检出不连续性骨转移灶 23 处,平均为  $(2.88 \pm 2.53)$  处;B 组共有 3 只裸鼠出现骨转移,全组共检出不连续性骨转移灶 8 处,平均为  $(1.00 \pm 1.77)$  处。A 组骨转移发生率和骨转移灶数量虽高于 B 组,但两者差异并无统计学意义( $P = 0.32, P = 0.11$ )。

C 组和 D 组均于左后肢形成肉眼可见肿瘤,肿瘤位于为胫骨中上段,两组肿瘤体积差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 1)。

表 1 C 组与 D 组的骨转移瘤体积比较

组别	例数	肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
C 组	8	$66.29 \pm 41.01$	2.733	0.02
D 组	8	$23.70 \pm 16.14$		

### 2.3 骨转移病理特征

大体解剖发现骨转移肿瘤呈灰白色隆起于骨质表面,呈结节状或团块状(图 1),C 组和部分 D 组肿瘤包裹所在骨干(图 2)。显微镜下观察可见肿瘤细胞排列紊乱,形态不规则,细胞分化差,细胞核大、染色深,骨正常组织形态消失,骨小梁被破坏,肿瘤组织充填骨髓腔并向骨皮质浸润,部分肿瘤组织破坏骨皮质向周围软组织浸润(图 3)。



a:右肋骨转移;b:左肱骨转移;c:颅骨转移

图 1 不同部位的骨转移大体形态

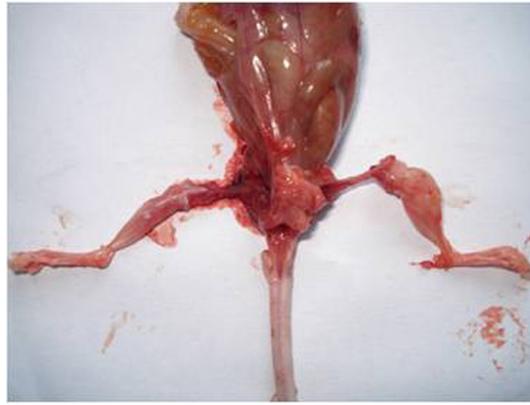


图2 左肱骨肿瘤

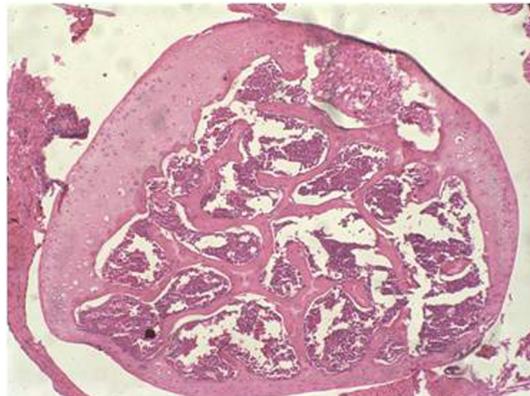


图3 骨转移显微镜下形态(HE染色 ×100)

### 3 讨论

70%以上的进展期乳腺癌患者会发生骨转移,一旦发生骨转移,疾病即进入不可治愈阶段,中位生存期只有2年,5年生存率只有10%。骨转移引起的疼痛、贫血、高血钙、骨折、截瘫和恶病质更是严重影响患者生活质量。从19世纪开始就有学者试图解释乳腺癌特异性嗜骨转移机制,并提出著名的种子与土壤学说等理论<sup>[4]</sup>,但迄今为止乳腺癌骨转移机制仍未完全阐明,这也严重限制了骨转移预防和治疗的发展。因此,进一步阐明乳腺癌骨转移机制具有重要意义。

OPG是近年发现的一种肿瘤坏死因子受体超家族成员<sup>[1]</sup>,其与NF- $\kappa$ B配体受体活化因子(receptor activator of NF-kappa B ligand,RANKL)及NF- $\kappa$ B受体活化因子(receptor activator of NF-kappa B,RANK)组成的细胞信号通路是调控骨组织维持正常结构和功能的关键因素<sup>[5]</sup>。一方面成骨细胞表达的RANKL与破骨细胞表面的RANK结合,刺激破骨细胞成熟活化,促进骨吸收;另一方面,成骨细胞产生OPG,以旁分泌方式与成骨细胞表达的RANKL竞争性结合,阻止RANKL与破骨细胞RANK的结合,阻止破骨细胞成熟活化,抑制骨吸收。骨组织通过该信号通路,调节成骨、破骨活动平衡,维持正常骨稳态。而在乳腺癌骨转移过程中,转移的肿瘤细胞作用于成骨细胞,使得成骨细胞RANKL表达升高,OPG表达下降,刺激破骨细胞成熟活化,导致骨质

吸收破坏,最终形成乳腺癌特异性溶骨转移<sup>[6]</sup>。因此,骨组织中的 OPG 表达下降是乳腺癌骨转移发生、发展的重要因素。

同时,作为肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)的诱饵受体,肿瘤细胞自身表达的 OPG 可与 TRAIL 竞争性结合,抑制 TRAIL 与死亡受体 DR4 和 DR5 结合引起的肿瘤细胞凋亡<sup>[7]</sup>,进而可能促进肿瘤生长和转移。有研究发现,过表达 OPG 的乳腺癌细胞较对照细胞对裸鼠有更强的致瘤能力,并指出其原因是由于乳腺癌细胞过表达 OPG 与裸鼠体内的 TRAIL 竞争性结合,抑制了裸鼠体内的 TRAIL 诱导的肿瘤细胞凋亡,从而使乳腺癌细胞致瘤能力增强<sup>[8]</sup>。

虽然骨组织中 OPG 表达下降是乳腺癌骨转移发生、发展的重要因素且肿瘤细胞自身 OPG 表达可能通过抑制体内 TRAIL 诱导的肿瘤细胞凋亡而促进肿瘤生长和转移,但肿瘤细胞自身 OPG 表达对乳腺癌骨转移的作用目前还不清楚。本研究在前期利用 RNAi 技术抑制 MDA-MB-231 OPG 表达的基础上,分别采用经左心室注射和左胫骨原位注射肿瘤细胞的两种方法,观察抑制 OPG 表达对 MDA-MB-231 细胞致骨转移能力和特点的变化,发现在胫骨原位注射致瘤实验中,抑制肿瘤细胞 OPG 表达使形成的骨肿瘤体积显著下降。在左心室注射致瘤实验中,普通 MDA-MB-231 组骨转移发生率和骨转移灶数量虽明显高于 OPG 低表达 MDA-MB-231 组,但两者差异并无统计学意义,分析原因可能为各组裸鼠样本量较小,未能发现其在骨转移发生率和骨转移灶数量上的统计学差异;如果扩大实验组裸鼠样本数量,可能会获得具有统计学意义的结果。以上发现提示肿瘤细胞自身表达的 OPG 在乳腺癌骨转移过程中的主要作用可能在于:通过其与裸鼠体内的 TRAIL 竞争性结合,抑制了裸鼠体内的 TRAIL 诱导的肿瘤细胞凋亡,从而保护肿瘤细胞,促进骨转移形成。另一方面,肿瘤细胞自身表达的 OPG 可能并不参与或较少参与破骨细胞活化过程,从而不影响或甚少影响骨转移灶的骨质吸收与破坏。因此可以认为:乳腺癌细胞致骨转移能力与其 OPG 表达水平密切相关,抑制 OPG 表达可以降低乳腺癌细胞致骨转移能力。

#### 参考文献

- [1] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*,1997,89:309-319.
- [2] Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ, et al. Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. *Endocrinology*,1999,140:4451-4458.
- [3] 杨滨, 阎华, 王欣彦, 等. 卡培他滨与放射联合对子宫颈癌抗肿瘤的实验研究. *中国医科大学学报*,2009, 38: 751-754.
- [4] Lu X, Kang Y. Organotropism of breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2007,12: 153-162.
- [5] Reid P, Holen I. Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). *Eur J Cell Biol*,2009,88:1-17.
- [6] Kozlow W, Guise TA. Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*,2005,10: 169-180.
- [7] Holen I, Cross SS, Neville Webbe HL, et al. Osteoprotegerin (OPG) expression by breast cancer cells in vitro and breast

tumours in vivo-a role in tumour cell survival? Breast Cancer Res Treat, 2005, 92: 207-215.

- [8] Fisher JL, Thomas Mudge RJ, Elliott J, et al. Osteoprotegerin overexpression by breast cancer cells enhances orthotopic and osseous tumor growth and contrasts with that delivered therapeutically. Cancer Res, 2006, 66: 3620-3628.

(收稿日期:2009-03-16)

(本文编辑:罗承丽)

张帆,杨新华,唐振宁,等.抑制肿瘤细胞骨保护素表达对乳腺癌细胞致骨转移能力的影响[J/CD].中华乳腺病杂志:电子版,2010,4(3):322-328.