

• 实验研究 •

Noggin 基因过表达重组腺病毒载体的构建及其
对骨肿瘤细胞 MG63 迁移侵袭能力的影响张韬¹ 翁艳² 陈冬冬² 周燕芸² 肖莉莉² 张怡元^{2△}

[摘要] 目的:研究 Noggin 基因对骨肿瘤细胞 MG63 中 Noggin,BMP-2,血管内皮生长因子(VEGF)及结缔组织生长因子(CTGF)的表达及细胞迁移侵袭的影响,探讨 Noggin 基因在骨肿瘤的发生和发展过程中的作用机制。方法:通过构建 Noggin 基因过表达重组腺病毒载体,并将其转染到骨肿瘤细胞 MG63 中,采用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测空白对照组、过表达重组腺病毒组中 Noggin,BMP-2,VEGF 和 CTGF 的 mRNA 水平和蛋白水平,Transwell 细胞迁移和侵袭能力实验考察两组细胞的迁移和侵袭能力。结果:成功构建 Noggin 基因过表达重组腺病毒载体,将其转染到骨肿瘤细胞 MG63 后,Noggin 的 mRNA 及蛋白表达水平显著升高,BMP-2,VEGF 及 CTGF 的 mRNA 及蛋白表达水平显著降低,转染 Noggin 基因过表达重组腺病毒的骨肿瘤细胞 MG63 迁移和侵袭的能力明显下降。结论:过表达 Noggin 基因能成功抑制骨肿瘤细胞 MG63 的侵袭和转移,有望成为骨肿瘤基因治疗的新方法。

[关键词] Noggin 基因;过表达重组腺病毒;骨肿瘤细胞 MG63;迁移;侵袭

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)07-0011-05

Construction of Recombinant Adenovirus Vectors Overexpressing
Noggin Gene and Its Effect on the Migration and
Invasion Ability of Bone Tumor Cells MG63ZHANG Tao¹ WENG Yan² CHEN Dongdong² ZHOU Yanyun² XIAO Lili² ZHANG Yiyuan^{2△}

¹ Orthopaedic Institute, Fuzhou Second Hospital, Affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350007, China;

² The First Department of Orthopedics, Fuzhou Second Hospital, Affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350007, China.

Abstract Objective: To investigate the effect of Noggin gene on the expression of Noggin, BMP-2, vascular endothelial growth factor (VEGF) and connective tissue growth factor (CTGF) and the cell migration and invasion in bone tumor cells MG63, and to explore the mechanism of Noggin gene in the development and progression of bone tumors. **Methods:** The Noggin gene overexpressing recombinant adenovirus vectors were constructed and transfected into bone tumor cells MG63. The mRNA and protein levels of Noggin, BMP-2, VEGF, and CTGF in the blank control group and the overexpressing recombinant adenovirus group were detected by RT-PCR and Western blot respectively, and the migration and invasion ability of cells in the two groups were validated by Transwell cell migration and invasion ability experiment. **Results:** After the Noggin overexpressing recombinant adenovirus vectors were successfully constructed and transfected into bone tumor cells MG63, the mRNA and protein expression of Noggin were increased significantly, the mRNA and protein expression of BMP-2, VEGF and CTGF were inhibited significantly, and the migration and invasion ability of bone tumor cells MG63 infected with Noggin gene overexpressing recombinant adenovirus was decreased significantly. **Conclusion:**

Overexpression of Noggin gene can inhibit the invasion and metastasis of bone tumor cells MG63 successfully, which is expected to be a new method for gene therapy of bone tumors.

Keywords: Noggin gene; overexpressing recombinant adenovirus; bone tumor cells MG63; migration; invasion

基金项目:福建省卫计委创新课题(2014-cxb-23)

福州市科技计划项目(2015-S-141-10)

福州市临床重点专科建设项目(骨科)

福建省自然科学基金面上项目(2016J01594)

¹ 厦门大学附属福州第二医院骨科研究所(福州,350007)

² 厦门大学附属福州第二医院骨一区

[△]通信作者 E-mail:zhangyiyuan_fj@126.com

Noggin 基因是 Smith 从非洲爪蟾的胚胎中分离得到的^[1],作为一种重要的胚胎蛋白,最早发现其在胚胎发育过程中具有重要的神经诱导作用,主要诱导外胚层的背侧发育^[2]。近年来的研究表明 Noggin 基因对多个系统的发育和重塑的调控有着重要作用。Noggin 与骨形态发生蛋白(Bone Morphogenetic Protein,BMP)高度结合,阻止其与相应受体的结合,直接拮抗 BMP-2,BMP-4,BMP-7,从而抑制 BMP 作用的信号转导通路^[3],因此 Noggin 基因在多种原发性和转移性骨肿瘤的发生和发展过程中具有重要作用。本研究通过构建 Noggin 基因过表达重组腺病毒载体,并将其转染到骨肿瘤细胞 MG63 中,观察其对骨肿瘤细胞 MG63 中 Noggin,BMP-2,血管内皮生长因子(VEGF)及结缔组织生长因子(CTGF)抗体表达及迁移侵袭能力的影响,为深入研究骨肿瘤转移的分子机制提供进一步的实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

pCAE 质粒、pAdEasy-1 腺病毒基因组质粒、穿梭质粒载体 pGV314,BamH I / Age I 内切酶(上海吉凯基因化学技术有限公司);实验其他所用限制性内切酶、ECL-plus 试剂盒(美国 NEB 公司);DNA 标准参照物(Fermentas 公司);DNA 凝胶回收试剂盒、DNA 纯化试剂盒、质粒 DNA 提取试剂、RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司);引物合成、质粒测序(生工生物工程(上海)股份有限公司);DMEM 培养基、Opti-MEM I 低血清培养基、谷氨酰胺(美国 Gibco 公司),RIPA 细胞裂解液、MTT、胎牛血清、一抗、二抗、EGTA、Triton 100(美国 Sigma 公司);人成骨肉瘤细胞 MG63(中国科学院上海细胞所细胞库);Lipofectamine 2000 Trizol Reagent、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);BMP-2 抗体、VEGF 抗体、CTGF 抗体(美国 Abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 Noggin 基因质粒的构建

根据 NCBI 数据库

查询参考核苷酸序列 Noggin 基因,采用 Primer 5.0 设计 PCR 引物,经化学合成得到含 BamH I / Age I 酶切位点的小鼠 Noggin 基因,将其连接于质粒载体 pCAE 中,用 BamH I / Age I 双酶切此质粒后将酶切混合物置于 37 ℃ 水浴 2 h。

1.2.2 重组穿梭质粒 pGV314-Noggin 的构建 用 BamH I / Age I 酶双酶切穿梭质粒 pGV314,将酶切后的线性化酶切产物通过琼脂糖凝胶电泳回收后,与双酶切后的目的基因产物片段进行交换。交换产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,在含有氨苄西林抗性的 LB 琼脂平板上挑选转化子,质粒 DNA 提取试剂盒快速提取质粒后,酶切进行测序鉴定。

1.2.3 过表达重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-Noggin 的构建 取 pGV314-Noggin 用 Pme I 线性化,0.8% 琼脂糖凝胶电泳回收目的片段备用。将腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 转入高效 BJ5183 感受态菌中,青霉素抗性平板挑取含 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态菌,并通过电穿孔法将 pGV314-Noggin 转移质粒转入其中,在含有卡那霉素抗性的 LB 琼脂平板上挑选转化子。提取质粒后行琼脂糖凝胶电泳,鉴定正确后用 Pac I 酶切线性化重组腺病毒包装质粒,用 Lipofectamine 2000 脂质体转染 HEK-293 细胞,收集病毒液。

1.2.4 过表达重组腺病毒 pAdEasy-1-Noggin 对骨肿瘤细胞 MG63 转染 MG63 细胞培养 24 h 后分为空白对照组、pAdEasy-1-Noggin 组,用重组腺病毒 pAdEasy-1-Noggin 转染 MG63 细胞,转染复数(MOI)为 50。重组腺病毒转染 48 h 后,分别消化收集细胞。

1.3 实验指标测定

1.3.1 RT-PCR 检测 MG63 细胞中 Noggin,BMP-2,VEGF 及 CTGF 的 mRNA 水平 用 RNA 抽提试剂盒分别提取两组 MG63 细胞中的总 RNA,分别进行反转录和上述目的片段的扩增,每组均设 3 个重复孔。RT-PCR 反应条件参照试剂盒说明书,以 β -actin 作为内参照,见表 1。

表 1 相应基因的 RT-PCR 引物

基因		序列
Noggin	正义链	5'-TTGCCACCGGTGTCACCATCAGAT-3'
	反义链	5'-CATGGATGCTTATTACTCCCTACG-3'
BMP-2	正义链	5'-ACTTATCGATCTATCTGGACTGATT-3'
	反义链	5'-GTTCCATTACCTACCGTGACCCGG-3'
VEGF	正义链	5'-GAAACGCCGAAGAGACCTCGA-3'
	反义链	5'-TGATAACGGCAGTAAAGGCCT-3'
CTGF	正义链	5'-CGGAACGTTTCAGGTAGCCTT-3'
	反义链	5'-GCCATTAGATTGTGCCCTACG-3'
β -actin	正义链	5'-TGACCCAATGCACGGCAAAG-3'
	反义链	5'-CAGGCCAATGGATAGGCAGG-3'

1.3.2 Western blot 检测 MG63 细胞中 Noggin, BMP-2, VEGF 及 CTGF 的蛋白表达水平 两组细胞用 RIPA 裂解液裂解, 取等量蛋白样品进行 PAGE, 分离获得的蛋白转至 PVDF 膜上, 加入一抗后 4 ℃ 孵育过夜。洗膜后加二抗, 室温孵育 2 h, TBST 液漂洗 3 次, 每次 10 min, ECL-plus 试剂盒显色, 以 β -actin 作为内参照。

1.3.3 Transwell 细胞迁移和侵袭能力实验 两组细胞胰酶消化, 离心弃培养液, PBS 漂洗 3 遍, BSA 无血清培养基重悬细胞制备单细胞悬液, 细胞密度调整至 $5 \times 10^5 / \text{mL}$, 于 Transwell 小室下室中加入 200 μL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 (Transwell 细胞侵袭实验时, 取稀释的 Matrigel 25 μL 加入 Transwell 板上室, 覆盖整个聚碳酸酯膜), 取细胞悬液 100 μL 加入 Transwell 小室。将 24 孔板置于细胞培养箱中, 37 ℃ 5% CO_2 培养 24 h。取出 Transwell 小室, 用湿棉签轻轻擦去 Matrigel 凝胶和聚碳酸酯膜上表面的细胞。小心取出上室, 用线拴住并做好标记, 用冰预冷的甲醇固定 30 min, 苏木素染色 1 min。梯度乙醇脱水 (80%, 95%, 100%), 二甲苯透明。小心将聚碳酸酯膜自上室基底切取下来, 置载玻片上中性树脂封片, 显微镜下随机选取 5 个高倍视野观察迁移细胞并计数。以 MG63 空白对照组为对照, 计算各组细胞相对穿膜细胞数。

1.4 统计学方法

研究数据采用 SPSS20.0 统计处理软件进行数据处理, 计量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 带有 Noggin 基因的 pCAE 质粒的鉴定

用 BamH I / Age I 酶切连接目的基因的 pCAE 质粒 (见图 1), 结果表明酶切后片段长度约 687 bp, 与目的基因片段长度相近。

2.2 重组穿梭质粒 pGV314-Noggin 基因质粒的鉴定

Noggin 基因质粒用 BamH I / Age I 酶双酶切后亚克隆至经同样双酶切的穿梭载体 pGV314 中, 形成重组穿梭质粒 pGV314-Noggin, 采用 In-fusion 克隆技术获得重组穿梭质粒 pGV314-Noggin, 随机挑选 6 个单菌克隆, 菌斑 PCR 技术鉴定得到的 6 个阳性克隆 (见图 2)。提取阳性克隆扩增后送测序, 测序结果显示成功构建 pGV314-Noggin。

2.3 过表达重组腺病毒质粒载体 pAdEasy-1-Noggin 的鉴定

分别以穿梭载体 pGV314-Noggin 和重组腺病毒质粒载体 pAdEasy-1-Noggin 为模板, 用 Noggin 基因

扩增引物进行 PCR 反应, 扩增出 687 bp 的条带, 表明重组腺病毒质粒载体构建成功, 见图 3。

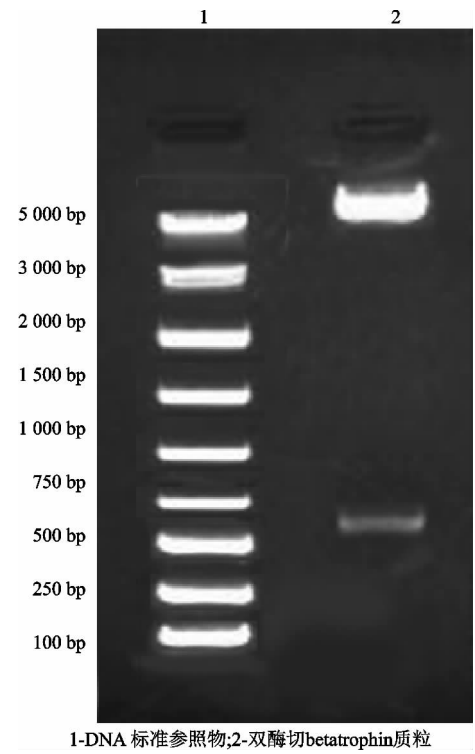


图 1 BamH I / Age I 酶切 pCAE 质粒电泳图

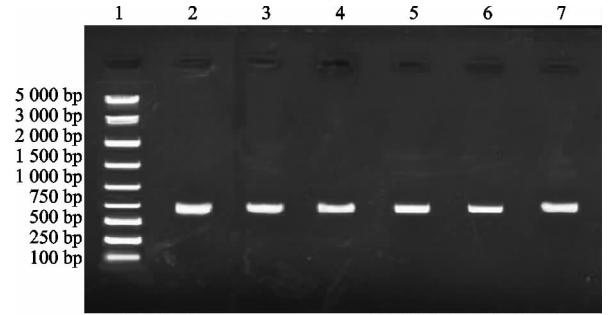


图 2 菌斑 PCR 鉴定 pGV314-Noggin 重组穿梭质粒 6 个阳性克隆

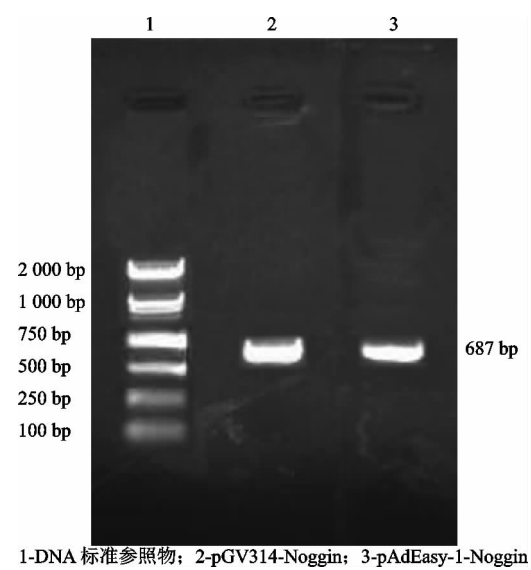


图 3 穿梭质粒 pGV314-Noggin 和重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-Noggin 的 PCR 分析

2.4 过表达重组腺病毒 pAdEasy-1-Noggin 转染骨肿瘤细胞 MG63 后 Noggin, BMP-2, VEGF 及 CTGF 的 mRNA 水平

具体结果见图 4 和表 2,与空白对照组相比,过表达重组腺病毒 Noggin mRNA 水平显著升高($P<0.05$),BMP-2,VEGF 及 CTGF 的 mRNA 水平显著降低($P<0.05$)。

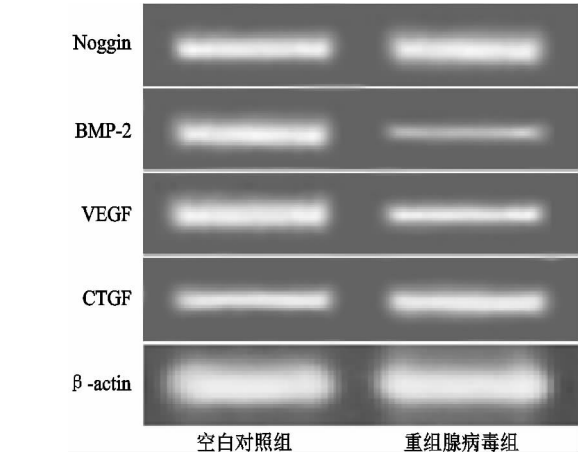


图 4 两组细胞中 Noggin,BMP-2,VEGF 及 CTGF 的 mRNA 水平

表 2 两组细胞中 Noggin,BMP-2,VEGF 及 CTGF 的 mRNA 水平($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

指标	空白对照组	重组腺病毒组	<i>t</i>	<i>P</i>
Noggin	1.16±0.15	2.43±0.22	22.264	0.031 5
BMP-2	1.74±0.18	0.36±0.19	19.845	0.025 4
VEGF	2.01±0.26	0.64±0.17	59.463	0.013 7
CTGF	0.86±0.17	1.42±0.23	24.443	0.047 6

2.5 过表达重组腺病毒 pAdEasy-1-Noggin 转染骨肿瘤细胞 MG63 后 Noggin, BMP-2, VEGF 及 CTGF 的蛋白表达水平

具体结果见图 5 和表 3,与空白对照组相比,过表达重组腺病毒组 Noggin 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),BMP-2,VEGF 及 CTGF 的蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。

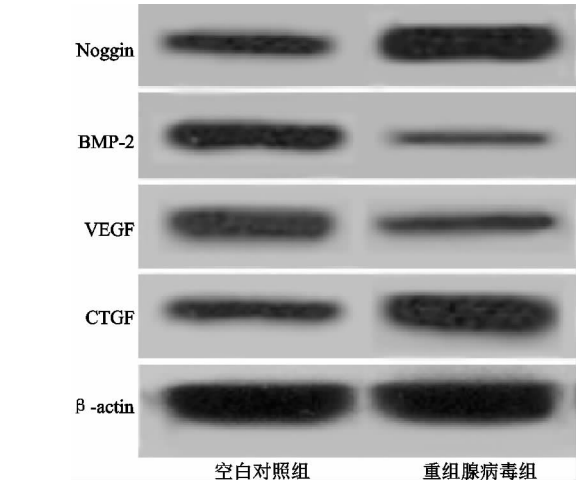


图 5 两组细胞中 Noggin,BMP-2,VEGF 及 CTGF 的蛋白表达水平

表 3 两组细胞中 Noggin,BMP-2,VEGF 及 CTGF 的蛋白表达水平($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

指标	空白对照组	重组腺病毒组	<i>t</i>	<i>P</i>
Noggin	1.15±0.27	2.36±0.36	20.593	0.038 8
BMP-2	1.59±0.38	0.34±0.17	17.462	0.027 6
VEGF	1.47±0.41	0.52±0.14	48.014	0.016 2
CTGF	0.69±0.17	1.87±0.29	25.171	0.041 4

2.6 过表达重组腺病毒 pAdEasy-1-Noggin 转染骨肿瘤细胞 MG63 后迁移和侵袭能力比较

具体结果见图 6 和图 7,Transwell 细胞迁移和侵袭实验表明,过表达重组腺病毒组相比空白对照组,骨肿瘤细胞 MG63 迁移和侵袭的能力明显下降。

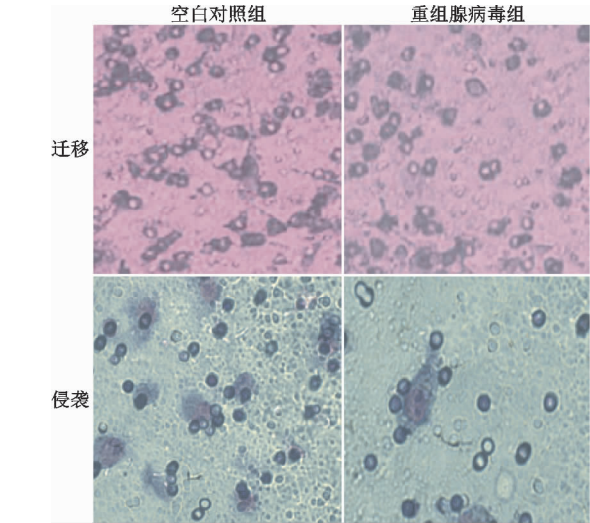


图 6 两组细胞的迁移和侵袭能力对比显微镜图($\times 200$)

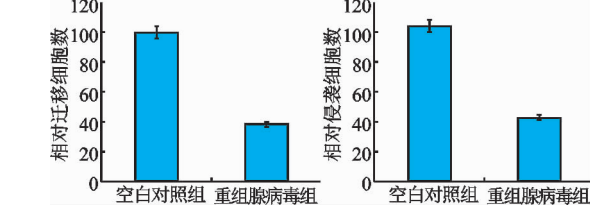


图 7 两组细胞的迁移和侵袭能力对比柱状图

3 讨论

肿瘤的发生是细胞遗传物质及其表达产物发生异常的结果,骨肿瘤也不例外。Noggin 是骨骼系统发育所必需的重要调控基因,研究发现正常的关节、韧带、软骨形成需要适当的 Noggin 及 BMPs/CDMP 表达^[4,5]。Noggin 在体外实验中可抑制由 BMPs 介导的肿瘤细胞的增生、侵袭和转移能力,在体内实验可有效抑制肿瘤生长和骨骼破坏。BMPs 在多种肿瘤的发生和发展中都起到重要的调节作用,尤其是骨骼系统的首发性和转移性肿瘤。岳文等^[6]通过构建反义人 BMP-2 基因的逆转录病毒表达载体,并将其转染至 BMP 高表达的骨肉瘤细胞中,结果表明反义 BMP-2 表达载体可造成肿瘤细胞中 BMP 表达下降,进一步证实了 BMP 对肿瘤细胞增殖的促进作用,同时证明

了用反义表达载体封闭或降低肿瘤细胞中的 BMP 表达的技术可行性。

结缔组织生长因子(CTGF)是一种新的可刺激成纤维细胞增殖和分泌胶原的生长因子,还具有促细胞增殖、迁移及分化等作用^[7]。血管内皮生长因子(VEGF)是血管形成的重要调节因子,对肿瘤新生血管形成及生长和转移起重要作用。研究发现 VEGF 高表达于 OS 患者^[8],能够影响肿瘤细胞的生长和转移。此外,抑制 VEGF 信号通路可减少肿瘤血管的形成^[9]。有研究发现大鼠骨肉瘤细胞的转移能力随 VEGF 和 BMP 表达的增加而增加;高转移性骨肉瘤细胞系 K7M2 中的 VEGF 和 BMP 表达水平较高,低转移性 K12 细胞系表达水平相对较低^[10]。

这些研究结果提示对 BMPs 活性进行局部抑制或许可以为抑制骨肿瘤生长、减少恶性肿瘤发生骨转移提供一种新的治疗方向。为深入研究骨肿瘤转移的分子机制,观察 Noggin 基因在骨肿瘤细胞转移中的重要作用,本研究通过成功构建 Noggin 基因过表达重组腺病毒载体,并将其转染到骨肿瘤细胞 MG63 中,实验结果表明:Noggin 基因过表达重组腺病毒转染骨肿瘤细胞 MG63 后,Noggin 的 mRNA 及蛋白表达水平显著升高,BMP-2、VEGF 及 CTGF 的 mRNA 及蛋白表达水平显著降低,说明过表达 Noggin 基因后,BMP-2 表达水平下降,肿瘤细胞增殖能力减弱,VEGF 及 CTGF 表达水平下降,肿瘤细胞生长和转移的能力降低,这从骨肿瘤细胞 MG63 的 Transwell 细胞迁移和侵袭实验得到证明。由此说明 Noggin 基因可能通过影响上述基因的表达来改变骨肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

综上所述,通过过表达 Noggin 基因能成功抑制骨肿瘤细胞的侵袭和迁移,有望成为骨肿瘤基因治疗

的新方法。

参考文献

- [1] Smith WC, Haland RM. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos[J]. *Cell*, 1992, 70(5): 829-840.
- [2] Lim DA, Tramontin AD, Tyevejo JM, et al. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis[J]. *Neuron*, 2000, 28(3): 713-726.
- [3] Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM. The Spemann organizer signal Noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4[J]. *Cell*, 1996, 86(4): 599-606.
- [4] Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, et al. Noggin, cartilage morphogenesis and joint formation in the mammalian skeleton[J]. *Science*, 1998, 281(5368): 1455-1457.
- [5] Li CH, Yang X, He YJ, et al. Bone morphogenetic protein-9 induces osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells in P38 and ERK1/2 MAPK dependent manner[J]. *Int J Med Sci*, 2012, 9(10): 862-871.
- [6] 岳文, 杨连甲, 晏伟, 等. 反义人骨形态发生蛋白-2 基因逆转录病毒表达载体的构建及其对骨肉瘤细胞生物学行为的影响[J]. *中华骨科杂志*, 2000, 20(9): 525-528.
- [7] 张政. 结缔组织生长因子的研究进展[J]. *滨州医学院学报*, 2015, 38(1): 67.
- [8] Yang J, Yang D, Sun Y, et al. Genetic amplification of the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway genes, including VEGF-A in human osteosarcoma[J]. *Cancer*, 2011, 117(21): 4925-4938.
- [9] Andersen S, Donnem T, Al Shibli K, et al. Prognostic impacts of angiopoietins in NSCLC tumor cells and stroma: VEGF-A impact is strongly associated with Ang-2[J]. *PLoS One*, 2011, 6: e19773.
- [10] Weiss KR, Cooper GM, Jadowiec JA, et al. VEGF and BMP expression in mouse osteosarcoma cells[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2006, 450: 111-117.

(收稿日期: 2017-02-04)

(上接第 10 页)

- [14] Ponte AL, Marais E, Galloway N, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(7): 1737-1745.
- [15] Qin L, Yin YT, Zheng FJ, et al. WNT5A promotes stemness characteristics in nasopharyngeal carcinoma cells leading to metastasis and tumorigenesis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(12): 10239-10252.
- [16] De A. Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2011, 43(10): 745-756.
- [17] Cai SX, Liu AR, He HL, et al. Stable genetic alterations of beta-catenin and ROR2 regulate the Wnt pathway, affect the fate of MSCs[J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(6): 791-800.
- [18] 刘征, 吴洪涛, 倪亚光, 等. Wnt5a 与炎症信号在炎症性疾病中的交叉互动[J]. *生理学报*, 2015, 67(4): 437-445.

- [19] Rauner M, Stein N, Winzer M, et al. WNT5A is induced by inflammatory mediators in bone marrow stromal cells and regulates cytokine and chemokine production[J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(3): 575-585.
- [20] Yang L, Chu Y, Wang Y, et al. siRNA-mediated silencing of Wnt5a regulates inflammatory responses in atherosclerosis through the MAPK/NF-kappaB pathways[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(4): 1147-1152.
- [21] Li S, Wang W, Zhang N, et al. IL-1beta mediates MCP-1 induction by Wnt5a in gastric cancer cells[J]. *Bmc Cancer*, 2014, 14: 480.

(收稿日期: 2016-12-11)