

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)06-0536-04

骨涎蛋白单克隆抗体对亲骨转移乳腺癌细胞与骨基质黏附的抑制

龚应静, 王捷*, 宋惠雪, 夏冰(广州军区 广州总医院 医学实验科, 广州 510010)

[摘要] 目的: 探讨骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)单克隆抗体对亲骨转移乳腺癌细胞(MDA-MB-231-BO)与骨基质黏附的抑制作用。方法: 免疫组化方法检测 MDA-MB-231-BO、肺癌细胞 SPC-1、大肠癌细胞 LOVO、乳腺癌细胞 BSP 的表达;体外骨基质黏附实验检测肿瘤细胞与骨基质的黏附,以及 BSP 单克隆抗体对 MDA-MB-231-BO 细胞与骨基质黏附的抑制;以 ELISA 法检测肿瘤细胞中生长因子 TGF- β 1 分泌的变化。结果: 免疫组化结果表明,MDA-MB-231-F10 细胞表达 BSP,SPCA-1 和 LOVO 细胞不表达 BSP;MDA-MB-231-BO 细胞黏附骨基质数明显大于 SPCA-1 细胞和 LOVO 细胞($P < 0.01$);BSP 抗体对 MDA-MB-231-BO 细胞和骨基质黏附具有特异抑制作用,随着抗体质量浓度升高(25、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$),其抑制率分别为 22.1%、35.0%、39.2%、41.9%,抑制率与抗体浓度呈正相关;同时 BSP 抗体能特异性抑制 MDA-MB-231-BO 细胞与骨基质黏附所介导 TGF- β 1 的释放。结论: BSP 单克隆抗体对 MDA-MB-231-BO 细胞和骨基质黏附具有特异抑制作用,提示 BSP 抗体可抑制乳腺癌特异性骨转移。

[关键词] 骨涎蛋白;单克隆抗体;乳腺癌;骨转移;TGF- β 1

[中图分类号] R737.9; R730.54 **[文献标志码]** A

Inhibitory effects of bone sialoprotein monoclonal antibody on bone-seeking breast cancer cells adhering to bone matrix

GONG Ying-jing, WANG Jie*, SONG Hui-xue, XIA Bing(Department of Medical Research, Guangzhou General Hospital, PLA Guangzhou Military Area Command, Guangzhou 510010, China)

[Abstract] Objective: To determine the inhibitory effects of anti-bone sialoprotein(BSP) antibody on human breast cancer cells adhering to bone matrix *in vitro*. **Methods:** Expression of BSP in 3 different cancer cell lines(bone seeking breast cancer cell MDA-MB-231-BO, lung adenocarcinoma cell SPCA-1 and colon carcinoma cell LOVO)was detected immunohistochemically. Cells adhering test was carried out to investigate the adhering of the 3 different cancer cell lines to mouse bone matrix *in vitro* and the inhibitory effect of anti-BSP antibody on MDA-MB-231-BO cells adhering to mouse bone matrix; Enzyme-linked immunosorbent assay was carried out for quantitative detection of TGF- β . **Results:** BSP immunostaining was positive in MDA-MB-231-BO cells and negative in SPCA-1 and Lovo cells. The number of MDA-MB-231-F10 cells adhering to mouse bone matrix was significantly more than SPCA-1 or Lovo cells($P < 0.01$). Anti-BSP antibody specifically inhibited MDA-MB-231-BO cells adhering to bone matrix, and the inhibitory rate of anti-BSP antibody was in a concentration-dependent manner. Anti-BSP antibody also inhibited TGF- β 1 secretion after MDA-MB-231-cells adhering to bone matrix. **Conclusion:** Anti-BSP antibody can specifically inhibit breast cancer cells adhering to mouse bone matrix, which suggests that anti-BSP antibody may inhibit the metastasis of breast cancer to bone.

[Key words] bone sialoprotein; monoclonal antibody; breast cancer; bone metastasis; TGF- β 1

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(6): 536-539]

骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)是细胞外基质中的一种酸性糖蛋白,主要分布在矿质化的组织中,由成骨细胞、破骨细胞以及软骨细胞表达和分泌。乳腺癌经常侵袭骨组织的原因可能是处于旺盛生长状态的肿瘤细胞作为“种子”,当遇到合适的器官、组织的基质环境,即“土壤”时,就会发生肿瘤的

[基金项目] 广东省自然科学基金重点项目资助(NO. 06104396). Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 06104396)

[作者简介] 龚应静(1981-),女,湖北省武汉市人,华南理工大学生物科学与工程学院在读硕士生,主要从事生物制药方面的研究

* Corresponding author. E-mail: jiew@tom.com

转移^[1]。已有研究^[2]报道乳腺癌细胞中增加 BSP 的表达促进乳腺癌细胞骨转移的发生。BSP 阳性癌细胞脱离血循环进入骨髓腔,黏附定位于骨矿质化基质的表面,BSP 的 RGD 序列与 $\alpha V\beta 3$ 结合^[3],导致乳腺癌细胞和骨小梁的黏附,活化破骨细胞产生溶骨性骨吸收,促进乳腺癌细胞的骨转移进程^[4]。骨基质组织中富含转化生长因子 β (TGF- β),是影响骨转移进程的重要细胞因子之一。在破骨细胞进行骨吸收时储存在骨中的 TGF- β 从骨中释放,刺激乳腺癌细胞产生破骨细胞的强力趋化因子——甲状旁腺激素相关蛋白 (PTHrP),进一步活化破骨细胞,促进骨吸收^[5-7],形成乳腺癌与破骨细胞相互作用的恶性循环,促进溶骨性骨转移^[5]。本研究利用免疫组化、骨基质黏附实验、ELISA 等方法检测 BSP 单克隆抗体对乳腺癌细胞与骨基质黏附的影响,分析骨基质所释放 TGF- $\beta 1$ 的变化,为以 BSP 为药物靶点的乳腺癌骨转移的防治提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与试剂

昆明种小鼠 [实验动物合格证号 (KM) 0020860] (30 ± 2)g, SPF 级,广东中医药大学实验动物中心提供。亲骨转移乳腺癌细胞 (MDA-MB-231-BO)^[8]由美国德州大学圣安东尼健康科学中心 Yoneda 教授惠赠。肺癌细胞 (SPC-A1) 和大肠癌细胞 (LOVO)、BSP 小鼠单克隆抗体 (IgG1 型)由广州军区广州总医院医学实验科制备或提供^[9]。正常小鼠 IgG (mIgG)购自北京奥森生物技术有限公司。I 型胶原酶 (228 U/mg)购自 Invitrogen 公司。UltraSensitive™ S-P 超敏免疫组化用试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。小鼠 TGF- $\beta 1$ 的 ELISA 检测试剂盒购自 Bender MedSystems 公司。

1.2 免疫组化法检测肿瘤细胞 BSP 蛋白的表达

制备 MDA-MB-231-BO、SPCA-1 和 LOVO 细胞爬片,采用常规免疫组化 SP 法检测 BSP 的表达。待细胞在载玻片上的融合度达到 75% ~ 90%,用 0.01 mol/L 的 PBS 冲洗玻片 3 次,10% 甲醛固定 30 min。0.01 mol/L 的 PBS 洗涤,3% 的 H₂O₂ 甲醇溶液室温下孵育 10 min,0.01 mol/L 的 PBS 洗涤,在蜡笔所画的范围内滴一滴试剂 B (正常非免疫动物血清),室温孵育 10 min,加经 1:200 稀释的 50 μ l 一抗 (鼠抗 hBSP),室温放置 60 ~ 90 min,对照组仅加抗体稀释液,0.01 mol/L 的 PBS 洗涤,滴加生物素标记的第二抗体 (羊抗鼠 IgG),室温孵育 10 min,0.01 mol/L 的 PBS 洗涤,滴加 1 滴试剂 D (链霉菌抗

生素 - 过氧化物酶溶液),室温孵育 10 min,0.01 mol/L 的 PBS 洗涤,DAB 显色,自来水冲洗,苏木精复染,自来水冲洗,乙醇梯度脱水,TO 透明剂处理 2 × 10 min,树胶封片。显微镜下观察,细胞胞质中出现棕黄色颗粒为 BSP 表达阳性。

1.3 黏附实验检测肿瘤细胞与骨基质黏附情况

在 24 孔组织培养板中,将胶原酶处理的 1 cm² 小鼠颅骨^[10-11]骨片固定于 1% 琼脂表面,加入 1 × 10⁵/ml MDA-MB-231-BO、SPCA-1 和 LOVO 细胞各 1 ml (每一组设 3 个复孔),以未加细胞孔为空白对照组。5% CO₂、37 °C,孵育 24 h,收集黏附到骨片上的细胞,经过甲苯胺蓝染色,测定 D₄₈₈。以 D₄₈₈ 值变化间接计算与骨片黏附的细胞相对数量。

1.4 黏附实验检测 BSP 抗体对 MDA-MB-231-BO 细胞和骨基质黏附的抑制

骨片固定孔中同时分别加入不同质量浓度 BSP 抗体 0.5 ml 和 2 × 10⁵ 个/ml 细胞 0.5 ml,使抗体终质量浓度为 25 ~ 200 μ g/ml (每一浓度设 3 个复孔)。不加抗体为对照组,加正常小鼠 IgG (mIgG) 孔为无关抗体组。抑制率 (%) = (1 - 处理组 D₄₈₈/对照组 D₄₈₈) × 100%

1.5 TGF- $\beta 1$ 试剂盒定量检测骨基质 TGF- $\beta 1$ 的分泌水平

肿瘤细胞和 BSP 抗体或 mIgG 共同加到经胶原酶消化的骨片上 (实验步骤见 1.4),培养 24 h 后,收集上清液。用小鼠 TGF- $\beta 1$ 检测试剂盒以双夹夹心 ELISA 法定量检测上清中 TGF- $\beta 1$ 的水平:

(1) 从已放至室温的密封袋中取出所需以骨板条,其他骨板条密封放回 4 °C。(2) 建立标准曲线: 设标准孔 8 孔,第 8 孔空白对照为 100 μ l Assay Buffer。(3) 加样: 样品各加 100 μ l / 孔,用封板胶纸封住反应孔,37 °C,孵育 60 min。(4) 用试剂盒所带的洗涤液按每孔 250 μ l,洗板 4 次。(5) 加生物素化抗体工作液 100 μ l / 孔,37 °C,孵箱孵育 60 min。(6) 同步骤 4,洗板 4 次。(7) 加底物 100 μ l / 孔,避光孵育 30 min。(8) 加入终止液 100 μ l / 孔,混合后即刻测量 D₄₅₀ 值。

1.6 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS10.0 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 BSP 在各组肿瘤细胞中的表达

通过免疫组化法检测 BSP 蛋白的表达,结果如图 1 所示: 亲骨转移乳腺癌细胞 MDA-MB-231-BO

胞质内有棕色颗粒,表明 MDA-MB-231-BO 细胞表达 BSP。而肺腺癌细胞 SPC-A1 和大肠癌细胞 LO-

VO 胞质中均内无棕色颗粒,提示 SPCA-1 和 LOVO 细胞 BSP 表达呈阴性。

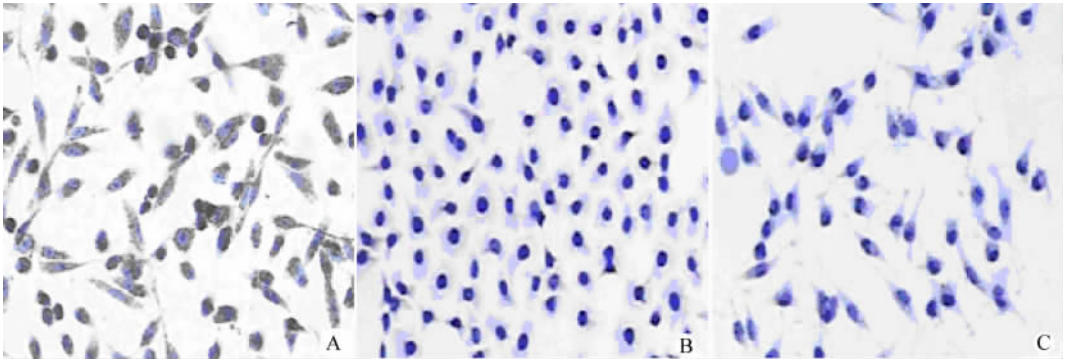


图 1 免疫组化检测肿瘤细胞中 BSP 的表达(×200)

Fig. 1 Expression of BSP in cancer cell lines by immunohistochemical staining (×200)

A: MDA-MB-231-BO cells; B: SPCA-1 cells; C: LOVO cells

2.2 肿瘤细胞与骨基质的黏附

将乳腺癌细胞加到经胶原酶消化的骨片上,经过一段时间的孵育,消化吸附到骨条上的细胞,经过甲苯胺蓝染色,测定 D_{488} 。通过 D_{488} 值的比较来确定吸附到骨条上细胞的相对数量,以不加乳腺癌细胞的骨片为空白对照。MDA-MB-231-BO、SPCA-1、LOVO 组的 D 值分别为 0.26 ± 0.015 , 0.02 ± 0.008 , 0 ± 0.004 。MDA-MB-231-BO 与骨片的黏附细胞数明显大于 SPCA-1 组和 LOVO 组($P < 0.01$)。

2.3 BSP 抗体对 MDA-MB-231-BO 细胞与骨基质黏附的抑制

实验结果表明,无关抗体对照的 mIgG 对乳腺癌细胞与骨片的黏附无影响,BSP 抗体处理使 MDA-MB-231-BO 细胞与骨片的黏附受到明显抑制,而且随着 BSP 抗体质量浓度的升高(25、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$),其抑制率分别逐步上升为 22.1%、35.0%、39.2%、41.9%,抑制率与抗体质量浓度呈正相关。

2.4 BSP 抗体对骨基质释放 TGF- β 1 的抑制

MDA-MB-231-BO 细胞和骨片共同培养 24 h 后,其上清液中含 TGF- β 1 (3.258 ± 0.11) ng/ml。由于 SPCA-1 和 LOVO 细胞与骨基质黏附力低,因此骨基质基本无 TGF- β 1 的分泌[分别为(0.10 ± 0.012)和(0.09 ± 0.005)]。且单纯 BSP 抗体或 mIgG 不能刺激骨基质释放 TGF- β 1。

以 50、100、200 $\mu\text{g/ml}$ BSP 抗体加入肿瘤细胞和骨基质培养体系培养 24 h,结果显示低剂量 BSP 对骨基质 TGF- β 1 释放的抑制很弱,高剂量 200 $\mu\text{g/ml}$ BSP 抗体可显著抑制 MDA-MB-231-BO 细胞

与骨基质黏附介导 TGF- β 1 的释放($P < 0.01$);而在各种浓度 mIgG 作用下,骨基质上清液中 TGF- β 1 水平无显著变化($P > 0.05$,表 1)。提示 BSP 单抗特异性抑制 MDA-MB-231-BO 细胞与骨基质黏附介导的 TGF- β 1 的释放。

表 1 BSP 抗体对 MDA-MB-231-BO 刺激骨基质释放 TGF- β 1 的抑制率(%)

Tab. 1 Inhibitory rate of BSP-MAb on TGF- β 1 release after matrix adhering to MDA-MB-231-BO

Group	Effective dose ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)		
	50	100	200
BSP-MAb	4.1	6.2	36.1**
mIgG	4.5	5.6	4.7

** $P < 0.01$ vs mIgG group

3 讨论

研究发现 75% 乳腺癌骨转移为破骨细胞所致的溶骨性骨转移,提示表达 $\alpha\text{V}\beta$ 3 的破骨细胞在溶骨性骨转移中发挥重要作用。因此,乳腺癌细胞和骨基质的黏附有可能是引起特异性骨转移的前提。BSP 阳性癌细胞脱离血循环进入骨髓腔,黏附定位于骨矿质化基质的表面过程中,BSP 的 RGD 序列与 $\alpha\text{V}\beta$ 3 结合,导致乳腺癌细胞和骨小梁的黏附,活化破骨细胞产生溶骨性骨吸收,促进乳腺癌细胞的骨转移进程。提示 BSP 通过 $\alpha\text{V}\beta$ 3 可直接调控乳腺癌细胞的迁移和侵袭,促进亲骨性转移的发生^[4]。

为分析单克隆 BSP 抗体对细胞与骨片黏附的影响,本研究将亲骨转移乳腺癌细胞和 BSP 抗体置于经胶原酶消化的骨片表面,测定其吸附能力。骨基质主要由 I 型胶原和非胶原蛋白组成。小鼠骨片经 I 型胶原酶消化后,将骨组织细胞充分暴露,有利于与亲骨转移乳腺癌细胞的相互作用,发生黏附。

根据 D_{488} 值变化,所测 3 种肿瘤细胞株与骨片黏附的能力依次为:MDA-MB-231-F10 > SPCA-1 > LOVO。尽管肺癌骨转移的发生率达 22% ~ 64%^[12-13],但肺腺癌细胞株 SPCA-1 不表达 BSP,有可能影响其与骨基质的黏附。而大肠癌罕见骨转移。此外 LOVO 细胞株 BSP 表达呈阴性。当然除 BSP 外,涉及肿瘤细胞与骨基质黏附的因素甚多,例如骨组织的细胞外基质中已经发现存在吸引乳腺癌细胞的趋化因子可以诱导细胞的黏附和迁移^[14]。

随着 BSP 抗体浓度的升高,MDA-MB-231-BO 细胞与骨基质黏附的数量逐渐下降。为排除 IgG 型 BSP 单克隆抗体的非特异性抑制乳腺癌细胞与骨片的黏附作用,将 mIgG 作为无关抗体对照。实验结果表明,BSP 抗体对 MDA-MB-231-F10 细胞和骨基质黏附具有特异性抑制作用,抑制率与抗体的质量浓度呈正相关。

骨基质中含量最丰富的 TGF- β 是影响骨转移进程的重要细胞因子,TGF- β 的分泌能促进乳腺癌与破骨细胞相互作用,从而促进溶骨性骨转移。通过检测 TGF- β 的分泌水平可以推测 BSP 抗体对肿瘤骨转移的影响机制。实验结果表明,MDA-MB-231-BO 细胞在与骨基质黏附后,可以促进骨基质释放 TGF- β 1,作为 IgG 型的 BSP 单抗能特异性抑制 MDA-MB-231-BO 细胞与骨基质黏附介导 TGF- β 1 的释放。

综上所述,BSP 单克隆抗体能特异性抑制 MDA-MB-231-BO 细胞与骨基质黏附,导致 TGF- β 1 的释放受抑。而骨基质局部释放 TGF- β 1 分泌水平下调,将有可能抑制乳腺癌与破骨细胞相互作用的恶性循环^[6]。

[参 考 文 献]

[1] Psaila B, Kaplan RN, Port ER. Priming the 'soil' for breast cancer metastasis: the pre-metastatic niche [J]. Breast Dis,

2006-2007, 26: 65-74.

- [2] 杜红延,王捷,郑霖,等. BSP 的高稳定表达对乳腺癌细胞生物学行为的影响[J]. 解放军医学杂志,2006,31(5):428-430.
- [3] Pilch J, Habermann R, Felding-Habermann B. Unique ability of integrin α V β 3 to support tumor cell arrest under dynamic flow conditions [J]. J Biol Chem. 2002, 277(24): 21930-21938.
- [4] Uemura T, Liu YK, Feng Y, *et al.* The role of sialoprotein in recognition of bone surface by osteoblast via integrin [J]. Mat Sci Eng, 1997, C4(4): 303-309.
- [5] Yoneda T. Cellular and molecular basis of preferential metastasis of breast cancer to bone [J]. J Orthop Sci, 2000, 5(1): 75-81.
- [6] Cecchini MG, Wetterwald A, van der Pluijm G, *et al.* Molecular and biological mechanisms of bone metastasis [J]. EAU Update Series, 2005, 3(4): 214-226.
- [7] Siclari VA, Guise TA, Chirgwin JM. Molecular interactions between breast cancer cells and the bone microenvironment drive skeletal metastases[J]. Cancer Metastasis Rev, 2006, 25(4): 621-633.
- [8] Waltregny D, Bellahcene A. Prognostic value of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostate cancer [J]. J Nat Can Inst, 1998, 90(13): 1000-1008.
- [9] 王捷,刘增田,杨太成,等. 抗重组人骨涎蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国生化药物杂志, 2006, 27(6): 323-325.
- [10] Sharp JA, Waltham M, Williams ED, *et al.* Transfection of MDA-MB-231 human breast carcinoma cells with bone sialoprotein (BSP) stimulates migration and invasion *in vitro* and growth of primary and secondary tumors in nude mice[J]. Clin Exp Metastasis, 2004, 21: 19-29.
- [11] Sung V, Cattell DA, Bueno JM, *et al.* Human breast cancer cell metastasis to long bone and soft organs of nude mice: a quantitative assay[J]. Clin Exp Metastasis, 1997, 15: 173-183.
- [12] Wilson MA, Calhoun FW. The distribution of skeletal metastases in breast and pulmonary cancer: concise communication[J]. J Nucl Med, 1981, 22(7): 594-597.
- [13] Tofe AJ, Francis MD, Harvey WJ, *et al.* Correlation of neoplasm with incidence and localization of skeletal metastase: analysis of 1355 diphosphonate bone scans[J]. J Nucl Med, 1975, 16(11): 986-989.
- [14] Mastro AM, Gay CV, Welch DR. The skeleton as a unique environment for breast cancer cells[J]. Clin Expr Metastasis, 2003, 20(3): 275-284.

[收稿日期] 2007 - 08 - 01

[修回日期] 2007 - 10 - 29

[本文编辑] 韩丹