

## 研究论文

# BMP9通过调控AMPK信号通路抑制乳腺癌细胞 脂质代谢及脂质利用

夏菁 苟理尧 刘梦瑶 万群 唐敏 孙恃雷 张彦\*

(重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

**摘要** 为研究骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)对乳腺癌脂质代谢的影响, 该研究采用定量PCR、Western blot及中性脂肪酸试剂盒法检测过表达及干扰BMP9后乳腺癌细胞中脂质代谢关键因子表达、脂肪酸含量变化及AMPK通路活化情况。结果显示, 过表达BMP9后, 乳腺癌细胞中脂质代谢关键因子表达除激素敏感脂肪酶(HSL)外, 均有显著减低( $P < 0.05$ ); 细胞内中性脂肪酸含量减低, AMPK信号通路明显活化; 干扰BMP9表达后, 脂质代谢关键因子表达升高, 细胞内中性脂肪酸含量同样呈升高趋势。该研究证明, BMP9可抑制乳腺癌细胞脂质代谢关键因子的表达, 这一作用与AMPK信号通路的活化有关。

**关键词** 乳腺癌; 脂质代谢; AMPK

## Bone Morphogenetic Protein (BMP9) Attenuate the Lipid Metabolism and Lipid Utilization in Breast Cancer Cells through AMPK Signal Pathway

Xia Jing, Gou Liyao, Liu Mengyao, Wan Qun, Tang Min, Sun Shilei, Zhang Yan\*

(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, School of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** To investigate the effect of bone morphogenetic protein 9 (BMP9) on lipid metabolism in breast cancer, our group set up an Ad-Easy system to overexpress BMP9 in breast cancer cells. After the overexpressed of BMP9, key factors on lipid *de novo* synthesis, degradation and transfer of lipid in breast cancer cells were detected by q-PCR whilst lipid content variation was measured by NEFA measure kit. Moreover, the activity of AMPK signal pathway was detected by Western blot. The efficiency of AMPK on BMP9 was proved by supplying inhibitor of AMPK in the culture. These key factors on breast cancer cells were detected by q-PCR. Concentration of free fatty acid (FFA) in the medium was measured by NEFA measurement kit, which was detected after cell culture and treatment. The result showed that the expression levels of key factors in lipid metabolism on breast cancer cells were reduced by BMP9 ( $P < 0.05$ ), but hormone sensitive lipase (HSL) increased. Content of lipid in breast cancer cells decreased in both MDA-MB-231 and MCF-7 cells. Our study showed BMP9 might attenuate the expression of key factors on lipid metabolism and utilization of breast cancer cells through AMPK signal pathway.

**Keywords** breast cancer; lipid metabolism; AMPK

收稿日期: 2017-10-25 接受日期: 2018-04-18

国家自然科学基金(批准号: 81172017)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68485240, E-mail: zy2753@hotmail.com

Received: October 25, 2017 Accepted: April 18, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81172017)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68485240, E-mail: zy2753@hotmail.com

网络出版时间: 2018-06-27 14:44:07

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180627.1444.008.html>

乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤,随着发病率逐年上升,已经成为威胁女性健康的主要因素之一。近年来的研究表明,脂质从头合成、分解代谢及转移过程在乳腺癌中均有异常升高,并通过调控脂质摄入与分解、生物膜形成、相关信号通路活化等机制,在乳腺癌生长、增殖、凋亡抑制等过程中起到了不可替代的促进作用<sup>[1-3]</sup>。因此,针对乳腺癌脂质代谢相关治疗的手段的研究具有较高的临床价值。

骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)又称转录生长因子-2(GDF-2),近年来发现,其能够通过多种途径调控乳腺癌增殖、迁移及侵袭能力,从而抑制乳腺癌的发生、发展<sup>[4-7]</sup>,并且能够抑制瘦素(leptin)对乳腺癌的促进作用<sup>[8]</sup>,而leptin具有促进脂质分解、抑制脂质合成等调控脂质代谢的生物学功能<sup>[9]</sup>;同时,BMP9也能抑制脂肪微环境中乳腺癌细胞的脂质累积<sup>[8]</sup>,说明BMP9可能具有潜在的抑制乳腺癌脂质代谢的能力。为验证这一假说,本研究采用过表达BMP9的重组腺病毒Ad-BMP9<sup>[5]</sup>感染乳腺癌MDA-MB-231及MCF-7细胞,并进一步观察过表达BMP9后MDA-MB-231细胞及MCF-7细胞脂质代谢能力的改变,初步探讨其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与试剂

人乳腺癌细胞株MDA-MB-231、MCF-7由本实验室保存。DMEM高糖培养基购自美国HyClone公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司;兔总/磷酸化腺苷一磷酸活化蛋白激酶(total/phosphorylation adenosine monophosphate-activated protein kinase, t/p-AMPK)单克隆抗体、鼠 $\beta$ -actin单

克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔IgG和山羊抗鼠IgG(二抗)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;中性脂肪酸(neutral fatty acid, NEFA)检测试剂盒购自南京建成生物技术有限公司。

本实验中脂质代谢核心酶及关键调控因子引物如表1所示。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养及分组** 乳腺癌MDA-MB-231、MCF-7细胞用含有10% FBS的DMEM高糖完全培养基,于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的温育箱中培养。两种细胞均为贴壁生长的细胞。待细胞融合度达70%~80%后,分为空白组、腺病毒对照组及处理组。空白组不加腺病毒,对照组加入绿色荧光蛋白腺病毒Ad-GFP,实验组加入重组腺病毒Ad-BMP9,感染6~8 h后,更换无血清、无抗生素的DMEM高糖培养基培养24 h。

**1.2.2 荧光定量PCR(q-PCR)检测脂质代谢关键酶及调控因子的表达** 取感染腺病毒后的两种乳腺癌细胞,分别提取各组细胞总RNA,以0.15  $\mu$ g的总RNA逆转录成cDNA。实时荧光定量PCR每组均设3个平行孔。所用引物见表1。

**1.2.3 中性脂肪酸(NEFA)试剂盒检测乳腺癌脂质分解能力** 收集空白组、对照组、处理组经24 h处理后的MDA-MB-231及MCF-7细胞,弃去培养基,加PBS混匀成细胞悬液, HK-300E超声仪破碎细胞,制备细胞匀浆,按照试剂盒说明检测细胞匀浆中性脂肪酸含量,以反映乳腺癌脂质分解能力的改变。

**1.2.4 中性脂肪酸(NEFA)检测试剂盒检测高脂环境下乳腺癌细胞脂质摄取能力** 在各分组体系中加入棕榈酸(PA, 100  $\mu$ mol/L)模拟高脂培养环境,培养

表1 脂质代谢核心酶及关键调控因子引物

Table 1 Primer of key enzymes and regulate factors in lipid metabolism

名称 Name	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')	产物长度(bp) Length of products (bp)
FASN	ACA GCG GGG AAT GGG TAC T	GAC TGG TAC AAC GAG CGG AT	188
AP2	ACT GGG CCA GGA ATT TGA CG	CTC GTG GAA GTG ACG CCT T	183
LIPG	GAT GGA CGA TGA GCG GTA TCT	CGC ATC CGT GTA AAG CTG G	131
CD36	AAG CCA GGT ATT GCA GTT CTT T	GCA TTT GCT GAT GTC TAG CAC A	220
CPT1	ATC AAT CGG ACT CTG GAA ACG G	TCA GGG AGT AGC GCA TGG T	121
HSL	GAC CCC TGC ACA ACA TGA TG	TGA GCA GCA CCC TTT GGA TG	134
PPAR $\gamma$	GGG ATC AGC TCC GTG GAT CT	TGC ACT TTG GTA CTC TTG AAG TT	141
SREBP1	CGG AAC CAT CTT GGC AAC AGT	CGC TTC TCA ATG GCG TTG T	141

24 h后,充分混匀,分别收集混匀后培养基,按照试剂盒说明书检测培养基中中性脂肪酸含量,以反映乳腺癌细胞对脂肪酸的利用程度。

**1.2.5 蛋白印迹法(Western blot)检测脂质代谢关键因子表达及AMPK信号通路表达、活化情况** 收集空白组、对照组及处理组处理24 h后的MCF-7细胞,提取细胞总蛋白,使用Nanodrop 1000检测蛋白浓度,上样,10% SDS-PAGE分离蛋白,恒流(200 mA)转移分离后的蛋白至PVDF膜上;5%小牛血清(BSA)37 °C封闭2 h后,4 °C下分别加入一抗过夜孵育(PPAR $\gamma$ /SREBP1/AMPK/p-AMPK 1:200稀释, $\beta$ -actin 1:1 000稀释);TBST洗去游离抗体,分别加入HRP标记的山羊抗兔IgG(1:5 000稀释)或HRP标记的山羊抗小鼠IgG(1:5 000稀释),37 °C孵育1 h;TBST洗去未结合抗体,HRP化学发光液显色。显色结果以Quantity One 4.6.2软件分析灰度值,蛋白质相对表达水平=目的蛋白质灰度值/内参蛋白质灰度值。

### 1.3 统计学方法

每组实验均各自地独立重复3次,采用 Graph-Pad Prism 5软件进行统计学分析。组间样本数据采用t检验单因素方差分析方法进行分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BMP9成功在乳腺癌细胞中过表达

本实验均使用Ad-Easy<sup>[10]</sup>法构建过表达及干扰重组腺病毒。半定量PCR显示,BMP9已在乳腺癌细胞中成功干扰表达及过表达(图1)。荧光定量PCR(q-PCR)结果显示,过表达BMP9能显著降低乳腺癌细胞中脂质从头合成关键酶——脂肪细胞蛋白2(adipocyte protein 2, AP2)、脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FASN)(图2)以及脂质转运关键因子——细胞

分化抗原36[cluster of differentiation 36, CD36;又名脂肪酸易位酶(fatty acid translocase), FAT]和内皮细胞脂肪酶(endothelial lipase, LIPG)(图3)的表达。在有基础BMP9表达量的MCF-7细胞中,干扰BMP9表达后,AP2及LIPG的表达有所上升(图2和图3),说明BMP9能影响脂质合成及转运关键酶的表达。

### 2.2 BMP9可抑制乳腺癌细胞脂肪酸氧化关键酶,并抑制脂质分解

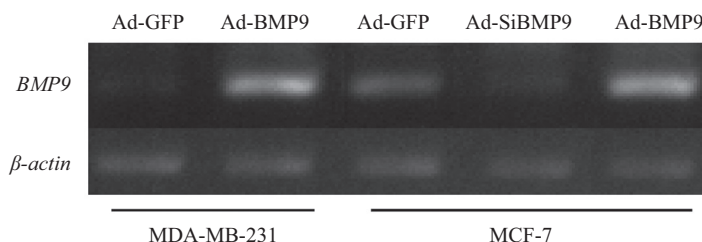
类似地,过表达BMP9后,乳腺癌细胞中脂肪酸氧化关键酶——肉碱脂酰转移酶I(carnitine palmitoyl-transferase I, CPT1)的表达也有明显减低,而激素敏感脂肪酶(hormone-sensitive lipase, HSL)的表达反而有所上升;干扰MCF-7细胞中BMP9表达后,CPT1的表达有所上升,HSL则无明显变化(图4)。

另一方面,乳腺癌细胞可摄取周围环境中的脂质,并将其分解为游离脂肪酸。中性游离脂肪酸(NEFA)检测试剂盒检测结果显示,过表达BMP9后可显著降低MDA-MB-231细胞中游离脂肪酸的含量( $P < 0.01$ ),对MCF-7细胞也产生了类似的作用( $P = 0.072 4$ )(图5)。

综合图4及图5的结果,可推证:BMP9可降低乳腺癌细胞脂质氧化关键酶的表达,并抑制乳腺癌细胞中游离脂肪酸的产生。

### 2.3 BMP9可抑制乳腺癌细胞中脂质代谢调控关键因子PPAR $\gamma$ 、SREBP1的表达

过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR $\gamma$ )属于II型核受体,是调控细胞脂质存储及代谢的主要受体之一<sup>[11]</sup>。固醇调控元件结合蛋白1(sterol regulatory element-binding protein 1, SREBP1)可调控固醇类脂质的合成与转运,同时也能激活PPAR $\gamma$ ,协同发挥作用<sup>[12]</sup>。q-PCR结果显示,过表达BMP9后,乳腺癌



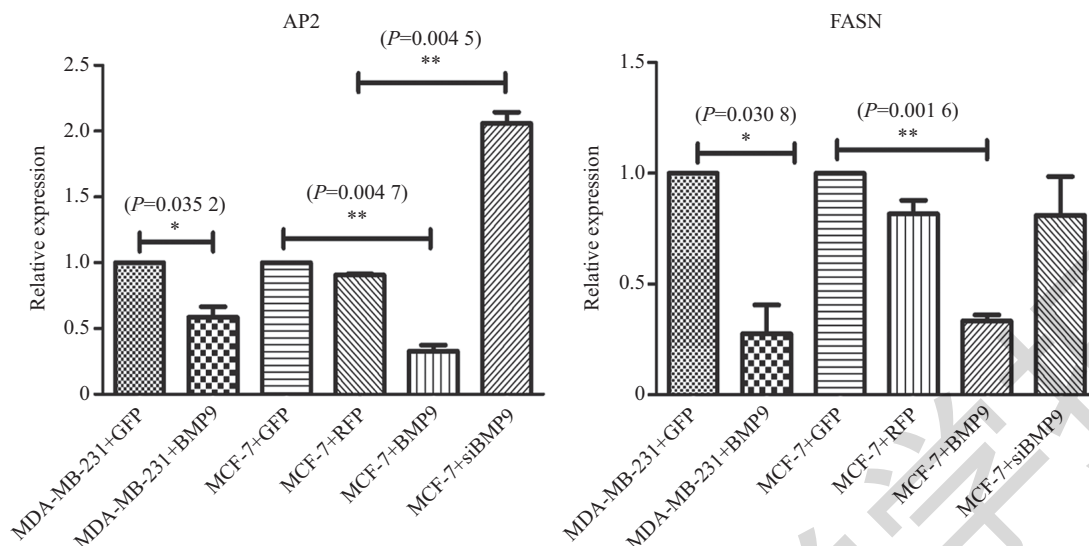
使用半定量PCR检测MDA-MB-231及MCF-7细胞中BMP9表达情况,BMP9成功干扰表达及过表达。

The expression level of BMP9 was detected by semi-quantitative PCR. BMP9 overexpressed successfully.

图1 BMP9在MDA-MB-231及MCF-7细胞中成功过表达

Fig.1 BMP9 overexpressed in MDA-MB-231 and MCF-7



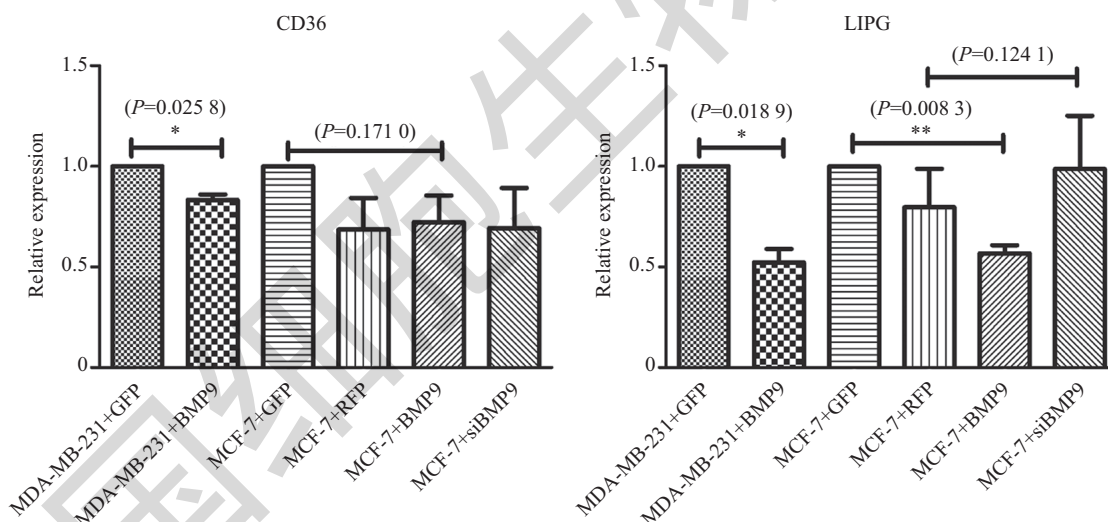


在MDA-MB-231及MCF-7细胞中过表达BMP9后, 脂质从头合成关键酶AP2及FASN的表达均出现明显下调; 干扰MCF-7细胞中BMP9表达后, 两种酶的表达均上调。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

Expression levels of AP2 and FASN in MDA-MB-231 and MCF-7 were reduced since BMP9 overexpressed. Expression levels of these enzymes increased since expression of BMP9 was interfered in MCF-7 cells. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

图2 BMP9调控AP2及FASN的表达

Fig.2 BMP9 regulated the expressions of FASN and AP2



在MDA-MB-231及MCF-7细胞中过表达BMP9后, 脂质转移关键酶CD36及LIPG的表达均出现明显下调; 干扰MCF-7细胞中BMP9表达后, 两种酶的表达均呈现上调趋势。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

Expression levels of CD36 and LIPG in MDA-MB-231 and MCF-7 were reduced since BMP9 overexpressed. Expression levels of these enzymes increased since expression of BMP9 was interfered in MCF-7 cells. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

图3 过表达及干扰BMP9后CD36及LIPG的表达改变

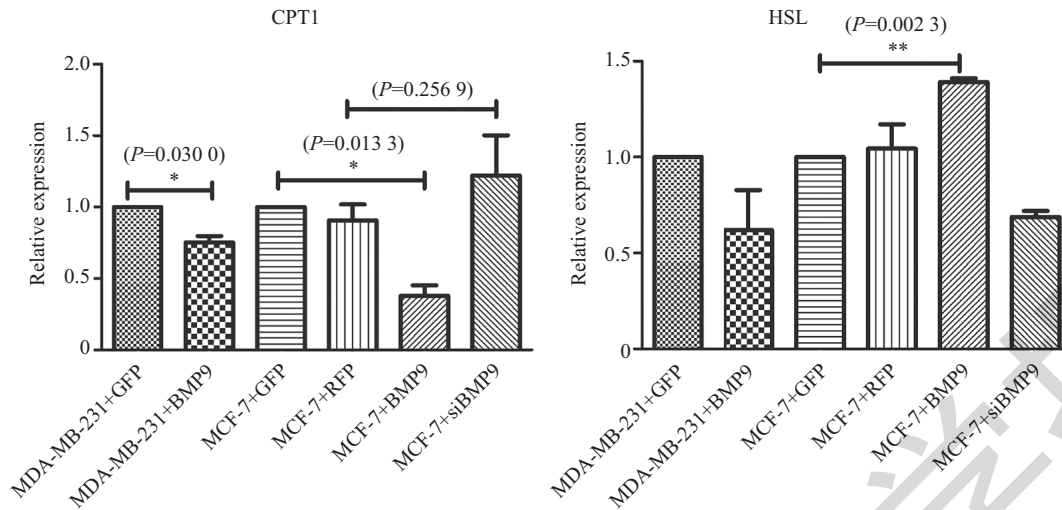
Fig.3 BMP9 regulated the expressions of CD36 and LIPG in breast cancer cells

细胞中PPAR $\gamma$ 与SREBP1的表达均出现了不同程度的减低(图6); 而干扰BMP9表达后, PPAR $\gamma$ 的表达有所恢复; Western blot结果也显示, BMP9对PPAR $\gamma$ 及SREBP1在蛋白转录水平同样有抑制作用(图7)。综合上述结果, 我们推测, BMP9能够抑制乳腺癌细胞中脂质合成、分解、转运关键酶的表达, 同时减弱

乳腺癌细胞分解脂质的能力; 而这种抑制效果可能与PPAR $\gamma$ 及SREBP1的抑制有关。

#### 2.4 BMP9对乳腺癌脂质代谢的抑制作用可能通过活化AMPK信号通路实现

腺苷一磷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)经172-Thr

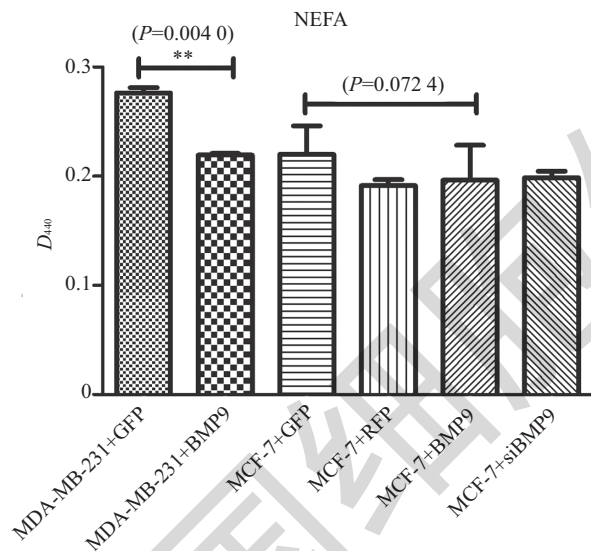


在MDA-MB-231及MCF-7细胞中过表达BMP9后, 脂质分解代谢关键因子CPT1的表达出现明显下调; 干扰MCF-7细胞中BMP9表达后, CPT1表达上调。HSL的表达则无明显趋势。 $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ 。

Expression level of CPT1 in MDA-MB-231 and MCF-7 was reduced since BMP9 overexpressed. Expression level of CPT1 increased since expression of BMP9 was interfered in MCF-7 cells. HSL did not show an obvious trend.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ .

图4 过表达及干扰BMP9后CPT1及HSL的表达改变

Fig.4 BMP9 regulated the expressions of CPT1 and HSL



在MDA-MB-231及MCF-7细胞中过表达BMP9后, 乳腺癌细胞中游离脂肪酸含量呈下降趋势,  $**P<0.01$ 。

NEFA in MDA-MB-231 and MCF-7 tend to a decrease trend since BMP9 overexpressed.  $**P<0.01$ .

图5 过表达及干扰BMP9后乳腺癌中游离脂肪酸含量的改变

Fig.5 BMP9 regulated the FFA in breast cancer cells

位磷酸化活化后, 能够通过活化下游一系列相关因子调控胞内AMP/ATP比值, 是细胞内能量代谢调控的主要信号通路<sup>[13]</sup>。文献报道称, AMPK信号通路的活化可抑制乳腺癌细胞周期<sup>[14]</sup>, 同时抑制mTOR信号通路的活化<sup>[15]</sup>, 进而抑制乳腺癌增殖。那么, BMP9对乳腺癌脂代谢的抑制效应是否通过活化AMPK信号通路实现呢? 过表达BMP9后, 乳腺癌细

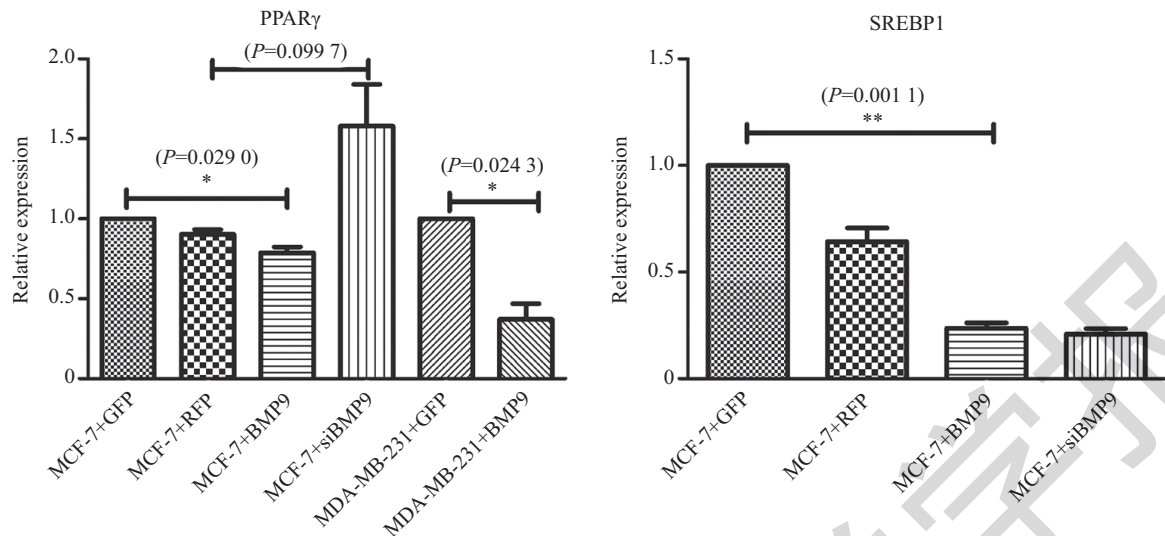
胞MCF-7中磷酸化AMPK(p-AMPK)的含量显著上升; 加入针对AMPK蛋白Thr-172位点的AMPK抑制剂WZ4003后, 过表达BMP9所产生的AMPK活化效应消失(图8)。

综合以上结果, BMP9可抑制乳腺癌的脂质代谢与利用能力, 而这种抑制作用可能与AMPK信号通路的活化有关。

### 3 讨论

肿瘤代谢异常改变与肿瘤的恶性行为密切相关, 包括肿瘤的快速增殖、迁移及免疫逃逸等; 而肿瘤自身快速发生、发展, 又为肿瘤提供了条件, 形成恶性循环, 从而导致临床预后不良。

与正常组织相比, 乳腺癌细胞中多种代谢途径都发生了不同方式与程度上的异常改变, 即“代谢重塑(metabolism reprogramming)”。如在供能方面, 有氧糖酵解效应(Warburg effect)取代了细胞线粒体有氧呼吸, 成为肿瘤能量获取的快速及主要来源, 同时使得肿瘤细胞乳酸产量明显增加<sup>[16]</sup>, 为后续肿瘤恶性行为提供原料及能量来源。同样, 肿瘤脂类异常代谢也是整个肿瘤代谢重塑的重要组成部分: 脂质作为生物膜主要成分及生命活动中重要的活性因子, 为肿瘤的快速发生、发展提供原料与支持, 因此在肿瘤的发生、发展中起到不可或缺的作用。在肿瘤组织中, 脂质代谢相对正常组织明显升高, 主要表

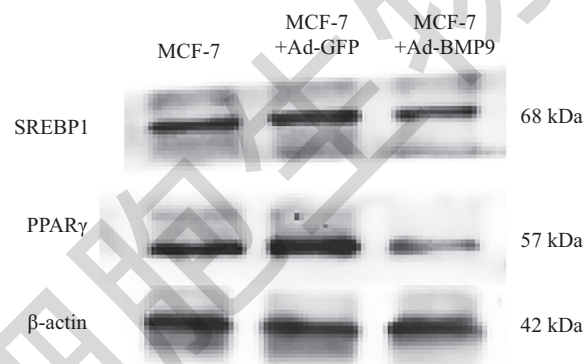


在MDA-MB-231及MCF-7细胞中过表达BMP9后, 脂质代谢调控关键因子PPAR $\gamma$ 及SREBP1的表达均出现明显下调; 干扰MCF-7细胞中BMP9表达后, PPAR $\gamma$ 的表达上调。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

Expression level of PPAR $\gamma$  and SREBP1 in MDA-MB-231 and MCF-7 was reduced since BMP9 overexpressed. Expression level of PPAR $\gamma$  increased since expression of BMP9 was interfered in MCF-7 cells. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

图6 过表达及干扰BMP9后乳腺癌PPAR $\gamma$ 及SREBP1含量的改变

Fig.6 BMP9 regulated the expression of PPAR $\gamma$  and SREBP1

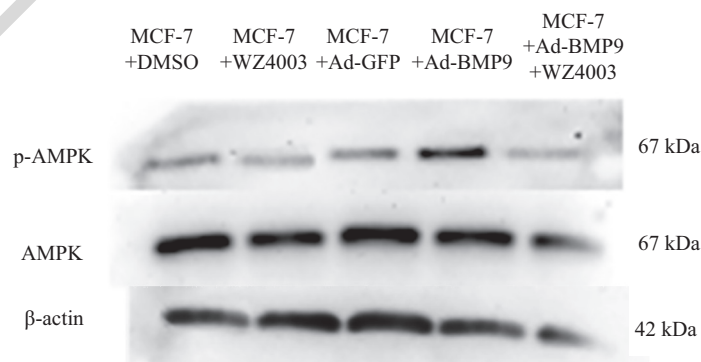


在MCF-7细胞中过表达BMP9后, 脂质代谢调控关键因子PPAR $\gamma$ 及SREBP1的蛋白表达均受到抑制。

Protein expression of PPAR $\gamma$  and SREBP1 in MCF-7 was reduced since BMP9 overexpressed.

图7 过表达BMP9后乳腺癌PPAR $\gamma$ 及SREBP1蛋白表达量的改变

Fig.7 BMP9 regulated the protein expression of PPAR $\gamma$  and SREBP1



过表达BMP9后, 乳腺癌细胞MCF-7中AMPK信号通路明显活化。

AMPK signal pathway was significantly activated when BMP9 overexpressed.

图8 过表达BMP9及使用WZ4003后乳腺癌细胞中AMPK活化情况的改变

Fig.8 BMP9 activated the AMPK signal pathway in breast cancer



现为脂质从头合成、摄取外源性脂肪酸及脂质氧化分解能力的增强<sup>[17]</sup>;在这一过程中,代谢关键酶如FASN、CPT1、AP2等的高表达与活化起到了关键性作用<sup>[1]</sup>。因此,在针对乳腺癌脂质代谢的研究中,我们着眼于关键酶及调控因子的表达改变。

骨形态发生蛋白9(BMP9)又称转录生长因子-2(GDF-2),属于转录生长因子超家族。前期研究发现,BMP9能够有效抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力,并且这种调控作用与乳腺癌细胞中PI3K/AKT及ERK1/2信号通路的抑制有关<sup>[5-6]</sup>。文献报道称,BMP9可调控肝脏组织糖、铁代谢,并具有潜在的促进棕色脂肪形成、抑制肥胖发生的作用<sup>[18-20]</sup>;同时,BMP9还可抑制脂肪微环境中脂肪细胞向乳腺癌细胞的脂质转移作用,并抑制脂肪因子leptin的分泌<sup>[8]</sup>,而BMP9与乳腺癌脂质代谢之间的关系尚未见报道。

本研究采用腺病毒Ad-Easy系统,在乳腺癌细胞MDA-MB-231及MCF-7中过表达BMP9,探讨其对乳腺癌脂质代谢的调控作用及其初步机制。采用半定量PCR技术确认,BMP9在两种乳腺癌细胞中均成功过表达。检测过表达及干扰BMP9后,乳腺癌脂质从头合成、转移、分解关键酶的表达改变,我们发现,脂质从头合成关键酶FASN、AP2,脂质转移关键酶CD36、LIPG及脂质氧化分解关键酶CPT1有明显减低,说明BMP9能够从合成、转移、氧化功能三方面抑制乳腺癌的脂质代谢。脂质分解关键酶HSL则在MDA-MB-231及MCF-7两种细胞中呈现出相反的趋势,可能是由于两种细胞恶性程度及对BMP9敏感度差异所导致。

AMPK信号通路是调控细胞能量代谢的主要通路<sup>[13]</sup>,也是脂质代谢的核心通路之一。本研究证实,过表达BMP9后,乳腺癌细胞中脂质代谢关键酶表达明显减低,同时伴有AMPK信号通路的活化;抑制AMPK信号通路的活化后,BMP9对乳腺癌细胞脂质代谢的调控作用被抑制。这说明,AMPK信号通路在BMP9对乳腺癌脂质代谢抑制作用的过程可能起到了一个较为关键的作用。另一方面,BMP9下游信号通路主要包括BMP9刺激活化的Smad4/5/8介导的经典Smad通路与Tak1介导的非经典Smad通路。文献证实,Tak1的活化可介导AMPK信号通路的活化<sup>[21-22]</sup>,即形成BMP9-Tak1-AMPK信号通路轴;而AMPK信号通路的活化已证实可通过多种途径抑制乳腺癌<sup>[23-24]</sup>,

从而以另一个角度证实了BMP9-AMPK轴的存在及其对乳腺癌的抑制作用。

综上所述,BMP9可通过抑制乳腺癌脂质代谢关键酶的表达及乳腺癌脂质利用能力来抑制乳腺癌脂质代谢,而这种抑制作用可能通过活化AMPK信号通路来实现。这提示,BMP9除了能够直接抑制乳腺癌Wnt、PI3K/AKT及ERK1/2等相关恶性通路之外,还可激活其能量代谢调控通路,从能量代谢角度进一步抑制乳腺癌,因而具有更强的乳腺癌临床治疗的应用潜力。

### 参考文献 (References)

- 1 Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV Jr. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab* 2013; 18(2): 153-61.
- 2 Nomura DK, Cravatt BF. Lipid metabolism in cancer. *Febs J* 2013; 1831(10): 1497-8.
- 3 Huang C, Freter C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2015; 16(1): 924-49.
- 4 Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395(6704): 763-70.
- 5 Ren W, Liu Y, Wan S, Fei C, Wang W, Chen Y, *et al.* BMP9 inhibits proliferation and metastasis of HER2-positive SK-BR-3 breast cancer cells through ERK1/2 and PI3K/AKT pathways. *PLoS One* 2014; 9(5): e96816.
- 6 Ren W, Sun X, Wang K, Feng H, Liu Y, Fei C, *et al.* BMP9 inhibits the bone metastasis of breast cancer cells by downregulating CCN2 (connective tissue growth factor, CTGF) expression. *Mol Biol Rep* 2014; 41(3): 1373-83.
- 7 Wan S, Liu Y, Weng Y, Wang W, Ren W, Fei C, *et al.* BMP9 regulates cross-talk between breast cancer cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Onco (Dordr)* 2014; 37(5): 363-75.
- 8 Wang T, Zhang Z, Wang K, Wang J, Jiang Y, Xia J, *et al.* Inhibitory effects of BMP9 on breast cancer cells by regulating their interaction with pre-adipocytes/adipocytes. *Oncotarget* 2017; 8(22): 35890.
- 9 Rosenbaum M, Leibel RL. Role of leptin in energy homeostasis in humans. *J Endocrinol* 2014; 223(1): T83.
- 10 Luo J, Deng Z L, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J, *et al.* A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc* 2007; 2(5): 1236-47.
- 11 Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, *et al.* PPAR is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999; 4(4): 585-95.
- 12 Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 activates PPAR $\gamma$  through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(8): 4333-7.
- 13 Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *Febs Lett* 2003; 546(1): 113-20.
- 14 Zhuang Y, Miskimins WK. Cell cycle arrest in Metformin treated breast cancer cells involves activation of AMPK, downregulation

- of cyclin D1, and requires p27 Kip1 or p21 Cip1. *J Mol Sci* 2008; 3(1): 18.
- 15 Nemeč MJ, Kim H, Marciante AB, Barnes RC, Hendrick ED, Bisson WH, *et al.* Polyphenolics from mango (*Mangifera indica* L.) suppress breast cancer ductal carcinoma in situ proliferation through activation of AMPK pathway and suppression of mTOR in athymic nude mice. *J Nutr Biochem* 2017; 41: 12-9.
- 16 Beckers A, Organe S, Timmermans L, Scheys K, Peeters A, Brusselmans K, *et al.* Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67(17): 8180-7.
- 17 Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(10): 763-77.
- 18 Kuo MM, Kim S, Tseng CY, Jeon YH, Choe S, Lee DK. BMP-9 as a potent brown adipogenic inducer with anti-obesity capacity. *Biomaterials* 2014; 35(10): 3172-9.
- 19 Mleczko-Sanecka K, Casanovas G, Ragab A, Breitkopf K, Müller A, Boutros M, *et al.* SMAD7 controls iron metabolism as a potent inhibitor of hepcidin expression. *Blood* 2010; 115(13): 2657-65.
- 20 Grgurevic L, Christensen GL, Schulz TJ, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins in inflammation, glucose homeostasis and adipose tissue energy metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 27: 105-18.
- 21 Jeon SM. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med* 2016; 48(7): e245.
- 22 Lv G, Zhu H, Zhou F, Lin Z, Lin G, Li C. AMP-activated protein kinase activation protects gastric epithelial cells from *Helicobacter pylori*-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 453(1): 13-8.
- 23 Lee KH, Hsu EC, Guh JH, Yang HC, Wang D, Kulp SK, *et al.* Targeting energy metabolic and oncogenic signaling pathways in triple-negative breast cancer by a novel adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activator. *J Biol Chem* 2011; 286(45): 39247-58.
- 24 Henry WS, Laszewski T, Tsang T, Beca F, Beck AH, McAllister SS, *et al.* Aspirin suppresses growth in PI3K-mutant breast cancer by activating AMPK and inhibiting mTORC1 signaling. *Cancer Res* 2017; 77(3): 790-801.