

Noggin抑制乳腺癌溶骨性骨转移的作用研究

张莹^{1*} 张志慧²¹唐山市协和医院检验科, 唐山 063000; ²唐山市妇幼保健院产前诊断遗传病诊断中心, 唐山 063000)

摘要 该文主要研究头蛋白(Noggin)抑制乳腺癌溶骨性骨转移的可能作用机制。通过体外慢病毒感染的方法, 将Noggin慢病毒感染乳腺癌MDA-MB-231细胞, Western blot检测Noggin表达情况, 利用CCK8和流式细胞术检测细胞增殖和周期改变, Western blot检测BMPs/SMAD信号通路变化和PI3K/Akt/mTOR关键分子Akt和mTOR总的蛋白和磷酸化蛋白的改变, 裸鼠胫骨贴骨注射乳腺癌细胞复制骨转移动物模型, 通过X片检测Noggin对乳腺癌溶骨性骨缺损的影响, 免疫组化检测乳腺癌骨转移组织中Akt总的蛋白、磷酸化蛋白以及细胞核增殖抗原PCNA的改变。Noggin组的Noggin蛋白表达明显升高, Noggin慢病毒感染MDA-MB-231细胞第3天, CCK8检测其吸光度值为(0.452±0.059), 显著低于RFP组(0.683±0.064), 并且将细胞周期阻滞在G₁期; Western blot显示Akt和mTOR总的蛋白未发生改变、磷酸化蛋白表达明显降低; 乳腺癌溶骨性骨转移动物模型中Noggin组的溶骨性缺损明显低于RFP组, 免疫组化结果显示PI3K/Akt/mTOR中关键分子Akt磷酸化蛋白、PCNA表达明显降低。Noggin可能通过抑制PI3K/Akt/mTOR通路的激活来抑制乳腺癌的溶骨性骨转移。

关键词 乳腺癌; 头蛋白; 细胞增殖; 溶骨性骨转移

Inhibitory Effect of Noggin on Osteolytic Bone Metastasis of Breast Cancer

ZHANG Ying^{1*}, ZHANG Zhihui²¹Clinical Laboratory of Tangshan City Union Hospital, Tangshan 063000, China;²Prenatal Diagnosis and Genetic Diagnosis Center of Tangshan City Maternal and Child Health Care Hospital, Tangshan 063000, China)

Abstract The aim of this article was to investigate the inhibitory effect of Noggin on osteolytic bone metastasis of human breast cancer MDA-MB-231 cells as well as the possible mechanism. Noggin lentivirus was used to infect the breast cancer MDA-MB-231 cells *in vitro*. Western blot was used to detect the expression of Noggin in breast cancer cells. CCK8 and flow cytometry were used to detect the changes of cell proliferation and cell cycle. Western blot was used to detect the changes of BMPs/SMAD cell signal pathway, total protein and phosphorylated protein of Akt and mTOR, which were the key molecule protein of PI3K/Akt/mTOR cell signal pathway. Breast cancer cells were injected into the tibia of nude mice to build bone metastasis animal models. The effect of Noggin on osteolytic bone metastasis of breast cancer was examined by X-ray. Immunohistochemistry was used to detect the changes of PCNA, total and phosphorylated Akt protein in bone metastasis tissues of breast cancer. The expression of Noggin protein was significantly increased in Noggin group. The CCK8 showed that the absorbance of Noggin lentivirus group was (0.452±0.059) significantly lower than the RFP group (0.683±0.064) after the third day of Noggin lentivirus infected cells. Western blot showed that the total protein of Akt and mTOR was unchanged

收稿日期: 2019-03-27 接受日期: 2019-08-26

*通讯作者。Tel: 15031523636, E-mail: 52514493@qq.com

Received: March 27, 2019 Accepted: August 26, 2019

*Corresponding author. Tel: +86-15031523636, E-mail: 52514493@qq.com

网络出版时间: 2020-01-06 17:07:09

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20200106.1706.010.html>

but the phosphorylated protein expression was significantly decreased. The osteolytic bone defect of Noggin group was significantly lower than RFP group. Immunohistochemistry showed that PI3K/Akt/mTOR was involved in osteolytic bone metastasis. The expression of phosphorylated Akt and PCNA were decreased significantly. Noggin may inhibit the osteolytic bone metastasis of breast cancer by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway *in vivo* and *in vitro*.

Keywords breast cancer; Noggin; cell proliferation; osteolytic bone metastasis

三阴性乳腺癌是一种恶性程度较高的肿瘤,因其雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(PR)和原癌基因Her-2蛋白均为阴性的乳腺癌,导致这类乳腺癌具有特殊的生物学行为和临床病理特征,预后较其他类型差^[1]。因其对常规的放疗不敏感,也无可选择的小分子靶向药物治疗,导致本病预后较差,死亡风险较高。该类肿瘤恶性程度高,往往容易发生远处转移。其中骨转移对患者影响最大,一旦发生骨转移,患者往往会出现骨痛、骨缺损以及骨折等骨相关事件;并且一旦发生骨转移,患者生活质量将严重下降,而且容易在短期内死亡^[2]。在肿瘤生存期整体有提高的情况下,面对这部分三阴性乳腺癌患者,临床往往无有效治疗手段。因此找到三阴性乳腺癌恶性程度高、容易侵袭转移的机制,开展有针对性生物治疗将是未来研究重点。头蛋白(Noggin)作为骨形态发生蛋白一重要的拮抗剂,研究发现,其可能具有抑制前列腺癌、骨肉瘤、乳腺癌等肿瘤增殖、侵袭和迁移的作用,但机制未完全明了,这限制了其进一步的应用^[3-5]。对Noggin抑制乳腺癌的作用进行深入研究,发现其存在一重要调控机制, NoggIn能通过抑制三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞的PI3K/Akt/mTOR信号通路来抑制乳腺癌的溶骨性骨转移。本研究对深入研究三阴性乳腺癌的生物治疗具有重要意义,为实现三阴性乳腺癌的有效治疗奠定了一定的基础。

1 材料和方法

1.1 慢病毒载体和细胞

MDA-MB-231细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;Noggin慢病毒、RFP慢病毒由本实验室构建并保存。

1.2 主要试剂

DMEM高糖培养液购自美国Life公司;Aux-Genex胎牛血清购自澳洲AusGeneX公司;RNAiso plus、逆转录试剂、荧光定量PCR试剂购自大连宝生

生物技术公司;PCR引物由南京金斯瑞物生物技术有限公司合成;CCK8检测试剂购自东仁化学科技(上海)有限公司;蛋白质提取裂解液和Western blot检测试剂购自碧云天生物技术有限公司;ECL化学发光试剂盒购自北京英格恩生物技术有限公司;实验材料还包括:小鼠抗PCNA单克隆抗体(ab29,美国Abcam公司)、小鼠抗 β -Actin单克隆抗体(#3700,美国CST公司)、兔抗Noggin多克隆抗体(ab16054,美国Abcam公司)、兔多抗SMAD1/5/9(ab66737,美国Abcam公司)、兔单抗磷酸化SMAD1/5/9(#13820,美国CST公司)、小鼠抗Akt单克隆抗体(#2920,美国CST公司)、兔抗磷酸化Akt单克隆抗体(#4060,美国CST公司)、兔抗mTOR单克隆抗体(#2983,美国CST公司)、兔抗磷酸化mTOR单克隆抗体(ab109268,美国Abcam公司)。

1.3 细胞培养与实验分组

取对数生长期的MDA-MB-231细胞,经过胰酶消化后,按 6×10^5 个/mL接种在6 cm的细胞培养皿中,待细胞生长至60%~70%密度时,加入提前制备好的慢病毒。实验分2组:(1)RFP组,MDA-MB-231细胞中加入80 μ L滴度为 5×10^7 TU/mL的RFP慢病毒;(2)Noggin组,MDA-MB-231细胞中加入40 μ L滴度为 1×10^8 TU/mL的Noggin过表达慢病毒,病毒感染24 h后,更换新鲜含10%胎牛血清的完全培养液继续培养,并通过荧光显微镜观察各组细胞中荧光表达,随后继续培养,后续实验备用。

1.4 CCK8和流式检测细胞增殖改变

将前期感染的各组细胞的密度调整为 1×10^4 个/mL,96孔板的每孔加入100 μ L细胞悬液,每组共设5个平行孔。细胞贴壁24 h后,用CCK8试剂连续5天监测各孔细胞的吸光度值,并根据吸光度值绘制增殖曲线图,流式细胞术检测感染慢病毒第3天,各组细胞周期改变。

1.5 Western blot检测乳腺癌细胞中Noggin以及BMPs/SMAD、PI3K/Akt相关蛋白改变

用预冷磷酸缓冲盐溶液(PBS)将前期用RFP和

Noggin慢病毒感染的乳腺癌MDA-MB-231细胞洗2次,加入1 mL PBS,用细胞刮收集于细胞于1.5 mL EP管中,1 000 ×g离心5 min后,倒掉上清液,加入150 μL RIPA在冰上裂解细胞,30 min。4 °C、12 000 r/min离心15 min,转移上清液至1.5 mL EP管中,BCA法检测蛋白浓度,再加入30 μL蛋白上样缓冲液,100 °C煮沸10 min,置于冰上用于后续实验。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶5%,分离胶10%),上样量15 μL,湿转PVDF膜,5%牛血清清蛋白37 °C封闭1 h,加入一抗4 °C孵育过夜再用TBST洗膜3次,每次15 min,加入二抗于室温孵育1 h, TBST洗膜3次,每次15 min,最后加入ECL显色液在化学发光仪上成像。

1.6 乳腺癌骨转移动物模型构建与溶骨区域检测

4周龄裸鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司;课题组通过裸鼠贴骨注射预先处理各组乳腺癌细胞复制乳腺癌骨转移动物模型(细胞浓度调整为 5×10^6 个/mL,100 μL贴骨注射到裸鼠胫骨),接种后第2、6周用X片成像技术检测各组裸鼠骨转移溶骨区域变化(电压50 kV,电流45 mA,时间90 ms)。6周后,用麻醉法处死裸鼠,取出瘤体组织4%多聚甲醛固定,送病理科包埋切片,备用。本文中所有实验均经过唐山市协和医院伦理委员会批准。

1.7 统计学方法

应用SPSS 22.0统计软件对数据进行,计量资料实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两独立样本组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot检测Noggin慢病毒感染MDA-MB-231细胞后,Noggin蛋白的表达情况

Noggin和RFP慢病毒感染MDA-MB-231细胞,

其中Noggin和RFP慢病毒对MDA-MB-231细胞的MOI值为15,课题组通过荧光显微镜确定其感染效率为70%。Western blot检测不同组乳腺癌细胞中Noggin蛋白表达,可见感染Noggin慢病毒感染MDA-MB-231细胞后,其表达明显升高(图1)。

2.2 CCK8检测过表达Noggin基因对MDA-MB-231细胞增殖影响

感染慢病毒的MDA-MB-231细胞,用CCK8试剂连续5天监测各孔细胞的吸光度值,并根据吸光度值绘制增殖曲线图,结果(图2)显示,Noggin组和RFP组细胞在第3天开始吸光度值有差异,RFP组为(0.683±0.064),Noggin组为(0.452±0.059)($P < 0.05$),第5天差异更为显著,RFP组为(1.271±0.113),Noggin组(0.753±0.662)($P < 0.001$)。

2.3 流式细胞术检测过表达Noggin基因对MDA-MB-231细胞周期影响

慢病毒感染各组细胞的第3天,收获细胞于离心管中,并用PBS清洗细胞3次,离心收集细胞沉淀,用1 mL预冷的70%的乙醇固定细胞,然后PI/RNase,上流式细胞仪检测细胞周期改变。流式结果(图3)显示,RFP组 G_1 期细胞为(35.49±4.37)%,Noggin组 G_1 期细胞为(71.35±8.12)%,Noggin基因对阻滞MDA-MB-231细胞在 G_1 期。

2.4 过表达Noggin基因对BMPs/SMAD信号通路的影响

文献报道,Noggin作为BMPs/SMAD信号通路的抑制因子,但Noggin是否会对MDA-MB-231细胞中BMPs/SMAD信号通路的影响呢?为此,课题组通过Western blot技术检测Noggin对MDA-MB-231细胞体内BMPs/SMAD信号通路的影响,结果显示:Noggin能抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路的激活。具

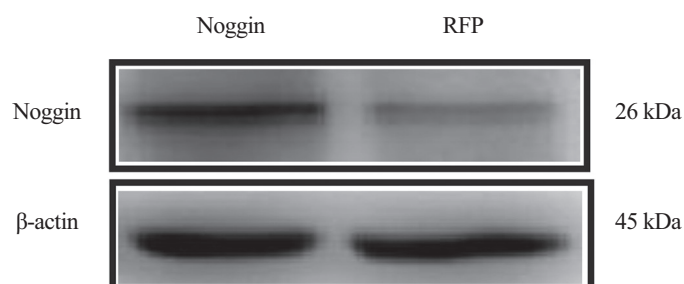
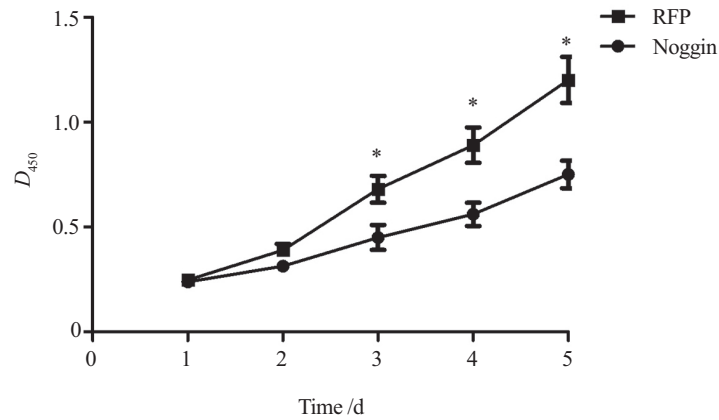


图1 Noggin慢病毒感染MDA-MB-231细胞后,Western blot检测Noggin蛋白表达

Fig.1 Western blot was used to detect the expression of Noggin protein in MDA-MB-231 cells after lentivirus infection



* $P < 0.05$, 与RFP组比较。

* $P < 0.05$ vs RFP group.

图2 CCK8检测过表达Noggin对MDA-MB-231细胞增殖的改变

Fig.2 CCK8 was used to detect the changes in the proliferation of MDA-MB-231 cells by overexpression of *Noggin*

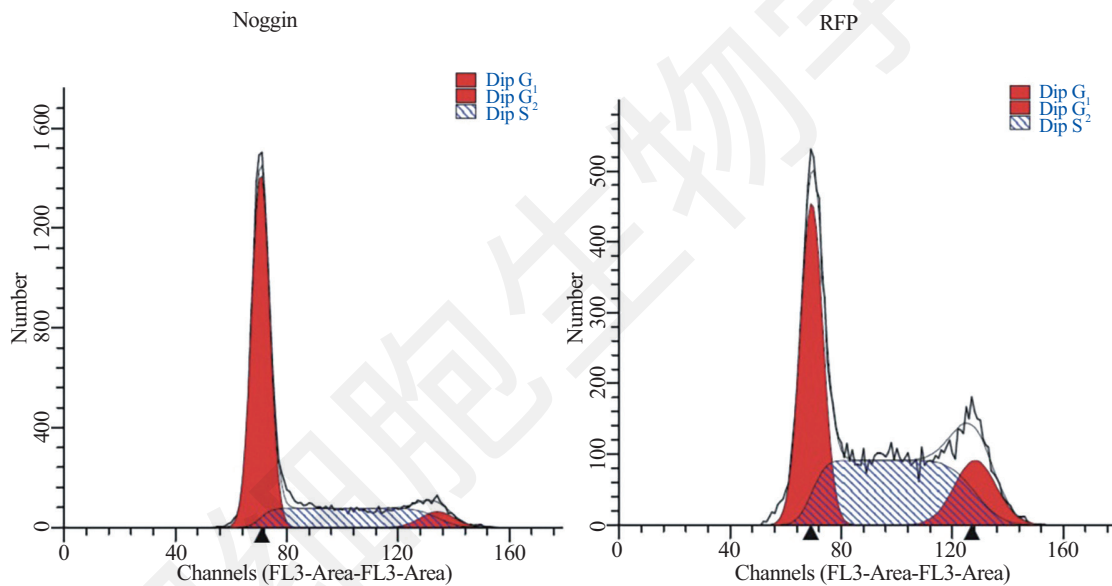


图3 流式细胞术检测过表达Noggin对MDA-MB-231细胞周期的改变

Fig.3 The cell cycle of MDA-MB-231 cells was affected by overexpression of *Noggin*

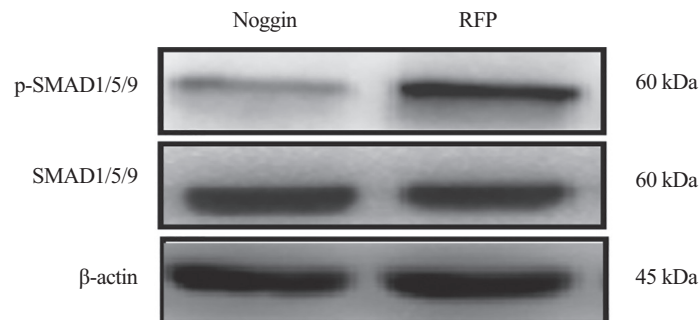


图4 Western blot技术检测Noggin对BMPs/SMAD信号通路影响

Fig.4 The expressions pattern of BMPs/SMAD related proteins in *Noggin* and RFP lentivirus infection MDA-MB-231 cells

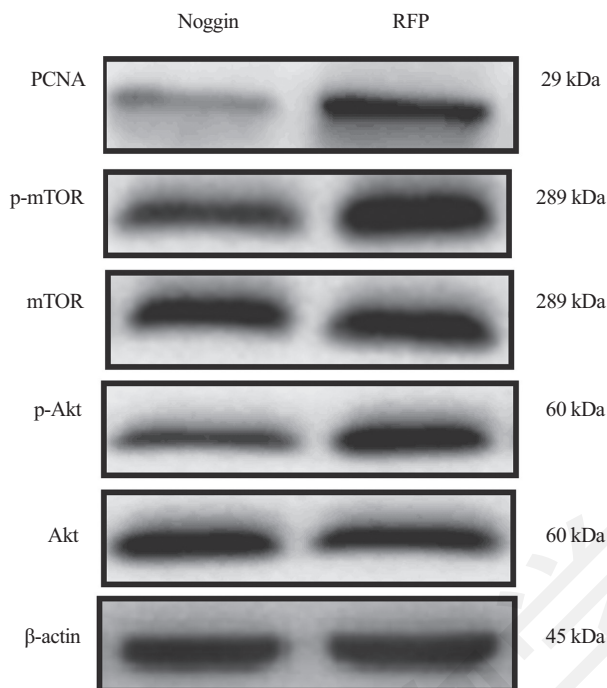


图5 Western blot技术检测Noggin对MDA-MB-231细胞体内PI3K/Akt/mTOR信号通路关键分子Akt和mTOR总蛋白和磷酸化蛋白以及PCNA的改变

Fig.5 The expressions pattern of PI3K/Akt/mTOR related proteins, total protein and phosphorylated proteinin of Akt, mTOR and PCNA in Noggin lentivirus infection MDA-MB-231 cells

体表现为: Noggin组SMAD1/5/9总的蛋白未发生改变, 但SMAD1/5/9磷酸化蛋白表达较RFP组明显降低(图4)。

2.5 过表达Noggin基因对PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白的影响

体外实验证实Noggin能够抑制MDA-MB-231细胞增殖, 而且与经典SMAD依赖信号通路BMPs/SMAD信号通路有关, 有文献报道MDA-MB-231细胞内存在PI3K/Akt/mTOR信号通路的异常激活, 但Noggin是否会影响PI3K/Akt/mTOR信号通路呢? 为此, 课题组通过Western blot技术检测Noggin对MDA-MB-231细胞体内PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响, 结果显示: Noggin能抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路的激活。具体表现为: Noggin组Akt和mTOR总的蛋白未发生改变, 但Akt和mTOR磷酸化蛋白表达较RFP组明显降低, PCNA蛋白表达也降低(图5)。

2.6 过表达Noggin基因对乳腺癌骨转移的影响

MDA-MB-231细胞作为一株高恶性的三阴性乳腺癌, 极易发生乳腺癌的骨转移。课题通过裸鼠胫骨贴骨注射乳腺癌细胞, 建构乳腺癌骨转移动物模型的骨微环境系统, 结果显示: 构建骨转移动物模

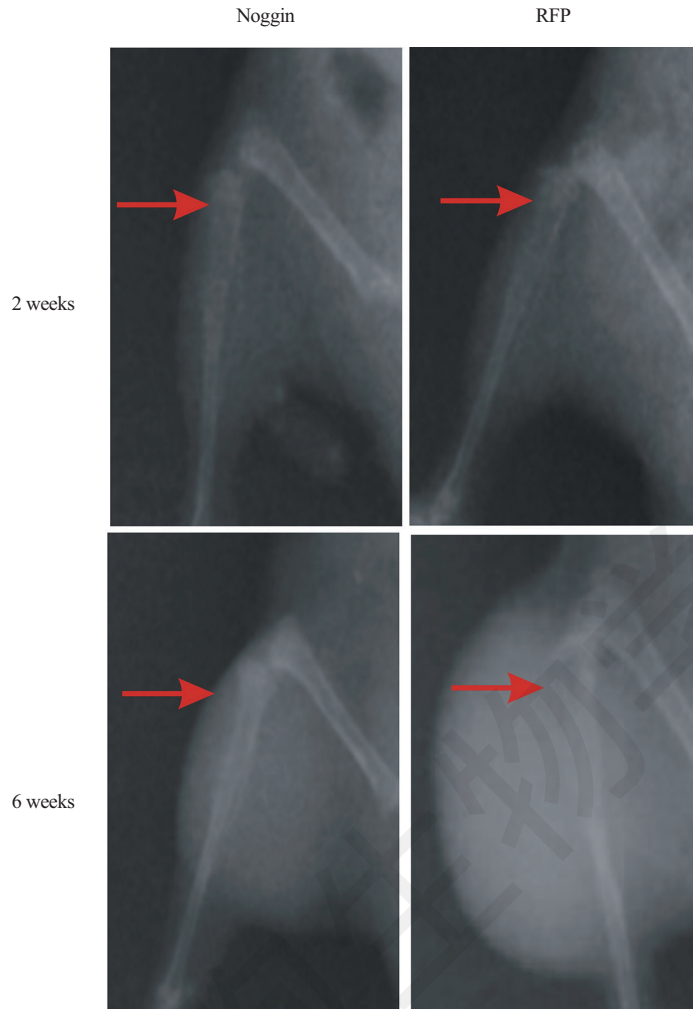
型第6周, X片显示Noggin能显著抑制MDA-MB-231细胞造成的溶骨性骨缺损, RFP组骨缺损明显增多(图6)。

2.7 过表达Noggin基因对乳腺癌骨转移动物模型中PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白的影响

体外实验证实, Noggin能抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路的激活, PI3K/Akt作为乳腺癌一重要的信号通路, 被认为是癌症的主调节器对细胞的病理过程是至关重要, 靶向PI3K途径可作为治疗策略成为肿瘤研究的热点。课题组通过免疫组化检测乳腺癌骨转移动物模型中Noggin是否对PI3K/Akt信号通路有调节作用, 免疫组化结果显示, Noggin组Akt磷酸化蛋白、PCNA表达均降低(图7)。

3 讨论

三阴性乳腺癌的治疗一直是临床难题, 由于其无可用的靶向药物、放疗不敏感、临床化疗容易产生耐药等特点, 导致其死亡率高。三阴性乳腺癌是最容易发生远处转移的乳腺癌, 其转移主要有远处淋巴结、肺转移和骨转移。其中骨转移是最常见一种类型, 骨转移将引发一系列的骨病理改变, 导致患者



红色箭头: 骨缺损。

Red arrows: bone defect.

图6 X线检测过表达*Noggin*对乳腺癌溶骨性骨转移的影响

Fig.6 The osteolytic metastasis of breast cancer of MDA-MB-231 was detected by overexpression of *Noggin*

生活质量差、死亡率高。搞清楚三阴性高骨转移的原因和机制,并采取有效的干预措施可大大提高患者生活质量。国内外学者一直致力于研究乳腺癌骨转移的分子机制。文献报道,骨形态发生蛋白BMPs在促进乳腺癌的骨转移中起重要作用,BMP7和BMP9作为乳腺癌的负性调控因子,能够有效抑制乳腺癌的生长、侵袭和骨转移,但BMP7和BMP9在MDA-MB-231细胞中表达明显降低或缺失,导致其乳腺发生转移,而导致其对MDA-MB-231细胞的抑制减弱或消失,而一些促进MDA-MB-231细胞生长的骨形态发生蛋白如BMP6、BMP4更多发挥促进MDA-MB-231细胞生长、侵袭和骨转移的作用^[6-7],国内张彦课题组^[8]采用显性负性突变DNALK2能在一定程度上抑制MDA-MB-231细胞的生长,这个在一定程度上解释在MDA-

MB-23细胞内存在促进其生长、侵袭和迁移的BMPs。

*Noggin*又叫头蛋白,是一个分子量为26 kDa的小分子蛋白,最初是在非洲爪蟾胚胎中被发现,其参与脊索的形成,并且能特异地与骨形态发生蛋白结合,并抑制骨形态发生蛋白的信号转导^[9]。国内法云智课题组^[10]发现,*Noggin*基因对BMP信号通路可能存在反馈性抑制机制,而对Wnt信号通路存在反馈性激活机制。MDA-MB-231作为高恶性的乳腺癌细胞,体内存在着一些促进其转移的骨形态发生蛋白,当外源性*Noggin*与MDA-MB-231细胞内的骨形态发生蛋白相结合时,MDA-MB-231细胞会发生哪些改变呢?为此,课题组将*Noggin*慢病毒感染MDA-MB-231细胞,通过流式细胞术和CCK8检测*Noggin*对MDA-MB-231细胞增殖的影响,结果显示

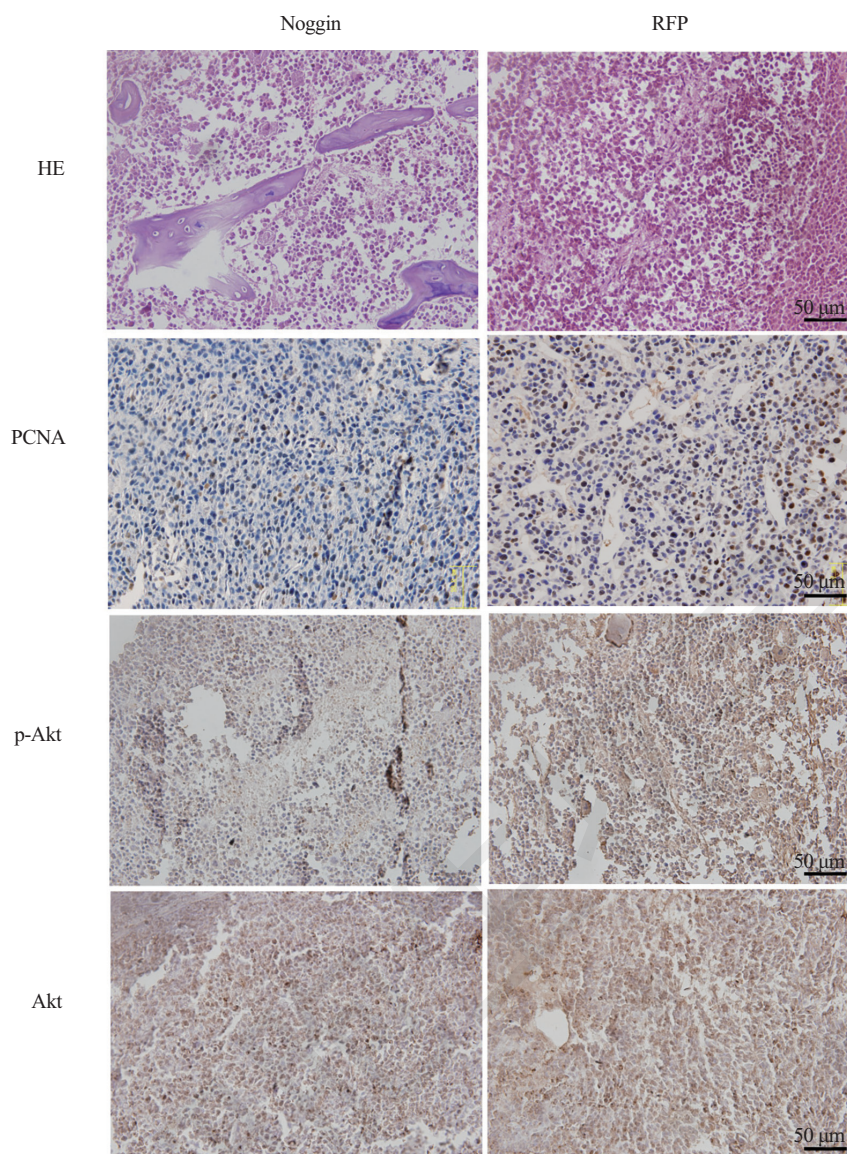


图7 免疫组化检测过表达Noggin对乳腺癌溶骨性骨转移中PI3K/Akt信号通路关键分子Akt蛋白的影响
Fig.7 The expression of Akt protein, a key molecule of PI3K/Akt signaling pathway were detected in osteolytic bone metastasis of breast cancer by immunohistochemistry

Noggin能显著抑制MDA-MB-231细胞增殖。Noggin能显著抑制MDA-MB-231细胞的增殖在一定程度上证实MDA-MB-231细胞存在促进其生长、侵袭和转移的骨形态发生蛋白。为进一步证实Noggin抑制MDA-MB-231细胞增殖的机制,课题组通过Western blot技术检测Noggin可能的作用信号通路的关键分子。结果显示: Noggin对PI3K/Akt/mTOR信号通路有显著调控作用, Noggin是通过抑制PI3K/Akt/mTOR通路的激活来抑制MDA-MB-231细胞的增殖。

MDA-MB-231细胞作为一株高恶性程度的三阴性乳腺癌细胞,其更容易发生溶骨性转移,而且患者一旦骨转移,生存质量将严重下降,短期内将发

生死亡。三阴性乳腺癌对常规放化疗不敏感,且无合适的小分子靶向药,导致其预后差。国内外学者一直关注三阴性乳腺癌的新治疗方法,旨在彻底解决三阴性乳腺癌无有效治疗方案的窘态。张彦课题组^[1]发现, BMP9能显著抑制MDA-MB-231细胞的生长、侵袭、迁移和溶骨性骨转移,而且他们通过乳腺癌细胞和骨髓基质细胞的共培养,进一步证实BMP9作为乳腺癌负性调控因子。普林斯顿肿瘤研究院康毅滨教授与Amgen药物公司^[2]合作开发的一种新型抗体15D11通过抑制Jagged1,进而达到治疗乳腺癌骨转移。

本课题组前期体外实验已经发现, Noggin是通

过下调PI3K/Akt/mTOR通路来抑制MDA-MB-231细胞增殖,那Noggin在乳腺癌的溶骨性骨转移中是否发挥作用呢?为此,课题组进一步通过目前比较成熟的技术——裸鼠胫骨贴壁注射MDA-MB-231细胞来模拟乳腺癌溶骨性骨缺损^[11]。课题成功建立乳腺癌溶骨性动物模型,并且通过X片成像技术证实Noggin能显著抑制溶骨性骨缺损。进一步通过免疫组化实验证实体外Western blot结果,Noggin确实对PI3K/Akt/mTOR信号通路存在调控作用。

Noggin作为BMPs的结合蛋白,更多文献报道其与BMPs的结合是通过抑制BMP/SMAD信号通路来实现的^[12-14]。课题通过体内外实验证实,Noggin对BMP/SMAD以外的信号通路如PI3K/Akt/mTOR信号通路存在调控作用,PI3K/Akt/mTOR作为肿瘤体内一条重要通路,在细胞的生长、存活、增殖、凋亡、血管生成、自吞噬等过程中发挥着极其重要的生物学功能,是一条具有可用于肿瘤靶向治疗的信号通路^[15]。课题研究发现Noggin的作用新机制,在一定程度上解释其抑制乳腺癌溶骨性骨缺损的作用,同时也肯定PI3K/Akt/mTOR对乳腺癌的调控作用,MAPK/ERK作为丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶信号传导通路可促进肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤血管生成、诱导肿瘤组织侵袭,直接参与乳腺癌发生发展,Noggin是否会对MAPK/ERK信号通路起到相互调节作用呢?这将是课题进一步的研究方向,最终找到在三阴性乳腺癌中起关键作用的信号通路,选择适合治疗三阴性乳腺癌的有效方法。

参考文献 (References)

- Kucukzeybek BB, Bayoglu IV, Kucukzeybek Y, Yildiz Y, Oflazoglu U, Atahan MK, *et al.* Prognostic significance of androgen receptor expression in HER2-positive and triple-negative breast cancer. *Pol J Pathol* 2018; 69(2): 157-68.
- Zheng H, Bae Y, Kasimir-Bauer S, Tang R, Chen J, Ren G, *et al.* Therapeutic antibody targeting tumor- and osteoblastic Niche-derived Jagged1 sensitizes bone metastasis to chemotherapy. *Cancer Cell* 2017; 32(6): 731-47.
- 张韬, 翁艳, 陈冬冬, 周燕芸, 肖莉莉, 张怡元. 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. *中国中医骨伤科杂志*(Zhang Tao, Weng Yan, Chen Dongdong, Zhou Yanyun, Xiao Lili, Zhang Yiyuan. Constuction of recombinant adenovirus vectors overexpressing Noggin gene and its effect on the migration and invasion ability of bone tumor cells MG63. *Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopedics*) 2017; 25(7): 11-5.
- AlShaibi HF, Ahmed F, Buckle C, Fowles ACM, Awlia J, Cecchini MG, *et al.* The BMP antagonist Noggin is produced by osteoblasts in response to the presence of prostate cancer cells. *Biotechnol Appl Biochem* 2018; 65(3): 407-18.
- Laurila R, Parkkila S, Isola J, Kallioniemi A, Alarmo EL. The expression patterns of gremlin 1 and noggin in normal adult and tumor tissues. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6(7): 1400-8.
- Mulloy B, Rider CC. The bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Vitam Horm* 2015; 99: 63-90.
- Yan X, Kang D, Pan J, Jiang C, Lin Y, Qi S. Osteoblastic differentiation and cell calcification of adamantinomatous craniopharyngioma induced by bone morphogenetic protein-2. *Cancer Biomark* 2017; 18(2): 191-8.
- Wang K, Sun X, Feng HL, Fei C, Zhang Y. DNALK2 inhibits the proliferation and invasiveness of breast cancer MDA-MB-231 cells through the Smad-dependent pathway. *Oncol Rep* 2017; 37(2): 879-86.
- Kang HW, Gupta S, Bogdanov A Jr. Orthotopic expression of noggin protein in cancer cells inhibits human lung carcinoma growth *in vivo*. *Mol Imaging Biol* 2012; 14(4): 480-8.
- 马雨楠, 游颖, 沈欢欢, 孙兆增, 曾林, 法云智. Noggin基因沉默对BMP和Wnt信号通路表达的影响. *中国实验动物学报*(Ma Yunan, You Ying, Shen Huanhuan, Sun Zhaozeng, Zeng Lin, Fa Yunzhi. Effect of Noggin silencing on the BMP and Wnt signaling pathways. *Acta Laboratorrum Animalis Scientia Sinica*) 2016; 24(5): 475-80.
- 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.
- Yu X, Kawakami H, Tahara N, Olmer M, Hayashi S, Akiyama R, *et al.* Expression of Noggin and Gremlin1 and its implications in fine-tuning BMP activities in mouse cartilage tissues. *J Orthop Res* 2017; 35(8): 1671-82.
- Pham LK, Liang M, Adisetiyo HA, Liao CP, Cohen MB, Tahara SM, *et al.* Contextual effect of repression of bone morphogenetic protein activity in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2013; 20(6): 861-74.
- Yuen HF, McCrudden CM, Grills C, Zhang SD, Huang YH, Chan KK, *et al.* Combinatorial use of bone morphogenetic protein 6, noggin and SOST significantly predicts cancer progression. *Cancer Sci* 2012; 103(6): 1145-54.
- Kim SB, Dent R, Im SA, Espié M, Blau S, Tan AR, *et al.* Ipatasertib plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (LOTUS): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial *Lancet Oncol* 2017; 18(10): 1360-72.