镧和钆对 DU145 细胞诱导的前成骨细胞和破骨细胞分化的影响

张征来, 王芃, 黄健*, 张天蓝, 王夔

北京大学医学部药学院化学生物学系, 北京 100191

* 联系人, E-mail: jhuang@bjmu.edu.cn

2011-03-16 收稿, 2011-11-05 接受

国家自然科学基金(20637010, 21101008)和高等学校博士学科点专项科研基金(200800011058)资助

摘要 为探索稀土化合物在防治前列腺癌骨转移方面的潜在药理作用, 研究了镧(La)和钆(Gd)对前列腺癌细胞 DU145 诱导的成、破骨细胞分化的影响. 实验结果表明, DU145 细胞的条件培养基能够促进小鼠前成骨细胞 MC3T3-e1 的增殖、ALP 活性和钙沉积, 而且经 La 处理后作用进一步加强. 然而 Gd 处理后的 DU145 细胞条件培养基对 MC3T3-e1 的 ALP 活性和钙沉积影响并不显著. RT-PCR 实验表明, La 可能通过上调 DU145 细胞分泌的细胞因子 BMP6 表达, 抑制 Noggin 的表达进而促进成骨细胞的增殖和分化; 而且成骨细胞的增殖、分化与 JNK 信号转导通路有关. 此外, 还观察到 La 能够抑制 DU145 细胞诱导的破骨细胞生成, 并且通过下调前列腺癌细胞 RANKL 的表达而起到抑制作用. 然而 Gd 对 DU145 细胞诱导的破骨细胞生成的影响并不显著.

关键词

镧
钆
前列腺癌细胞
成骨细胞
破骨细胞

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是男性常见的恶性肿瘤之一, 近年来, 在国内、外的发病率呈明显上升趋势. 前列腺癌的一个重要生物学特征是在疾病的早期即发生骨转移, 而骨转移是前列腺癌患者死亡的主要原因之一^[1]. 前列腺癌的骨转移是一个复杂的细胞间相互作用的过程, 尽管临床表现以成骨性转移为主, 但在转移发生的早期阶段, 肿瘤细胞引发的骨组织破坏是重要的起始步骤^[2,3]. 从细胞水平来看, 转移的前列腺癌细胞首先促进破骨细胞成熟和活化, 产生溶骨现象, 为以后的成骨提供了必要的空间、营养物质和钙离子, 并且骨组织中贮存的生长因子的释放促进了前列腺癌细胞骨转移的过程; 之后随着前列腺癌细胞进一步对成骨细胞的激活, 使得成骨细胞的增殖、分化和钙化能力增强, 病理性成骨逐渐明显, 最后形成前列腺癌特有的成骨性转移^[4,5]. 由此可见, 前列腺癌骨转移的形成是前列腺癌细胞和骨微环境之间发生功能性相互作用的结果. 因此,

人为打断前列腺癌细胞与成、破骨细胞间的相互作用是一种很有前途的治疗前列腺癌骨转移的方法.

稀土在癌症治疗方面存在着潜在的药理作用^[6,7]. 我们的前期研究也表明, 镧(La)和钆(Gd)能够不同程度地抑制前列腺癌细胞 DU145 和 PC3 的活性^[8,9]. 上述作用是否能进一步影响前列腺骨转移及其造成的骨质破坏目前尚未见报道.

本文研究了 La 和 Gd 对前列腺癌细胞 DU145 诱导的成、破骨细胞分化的影响. 结果表明, La 能够促进 DU145 细胞条件培养基诱导的成骨细胞增殖和分化, 抑制 DU145 细胞诱导的破骨细胞分化. 而在相同的条件下, Gd 的作用并不显著.

1 实验

(i) 材料和试剂. DMEM 培养基, RPMI 1640, 胰蛋白酶购自 Gibco 公司; 胎牛血清(FBS)购自 Hyclone; Taq DNA 聚合、RNA 酶抑制剂和 M-MLV 逆转录酶

英文引用格式: Zhang Z L, Wang P, Huang J, et al. The influence of La and Gd on prostate cancer DU145 cell-induced osteoblast and osteoclast differentiation (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2012, 57: 418–423, doi: 10.1360/972011-462

购自 Promega; oligo(dT)₁₅ 和 cDNA 引物由上海生物工程股份有限公司合成; ERK 抗体、p-ERK 抗体、P38 抗体、p-P38 抗体、JNK 抗体、p-JNK 抗体、HRP 羊抗兔 IgG 抗体及 ECL 增强的化学发光试剂盒均购自 Cell Signaling; 其余试剂均为国产分析纯; 所有塑料器皿(培养瓶、培养板、培养皿)均购自 Corning-Costar; 稀土氯化物按以下方法进行配制: 稀土氧化物(纯度 >99.9%, 上海跃龙化工厂)105~110℃干燥 2 h 后精确称量; 用 1:1 HCl 溶解后蒸干至结晶, NaOH 调 pH 至 7.0, 用双蒸水定容。使用前, 用无血清 RPMI1640 培养基稀释至所需浓度。

(ii) 细胞培养. 雄激素非依赖性前列腺癌细胞 DU145 购自协和医学院。培养液为含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液(含 100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素), 于 37℃, 5% CO₂, 培养箱内孵育培养。

小鼠成骨细胞 MC3T3-e1 购自协和医学院。培养基为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液(含 100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素), 于 37℃, 5% CO₂, 培养箱内孵育培养。

(iii) 细胞条件培养液的制备. DU145 细胞按照 10⁴ cells/cm² 密度种于 25 cm² 细胞培养皿中, 细胞达到 80% 融合时更换为新鲜的含 5% FBS 的 DMEM 培养液, 同时分别加入 LaCl₃ 或者 GdCl₃ 使其终浓度为 10⁻⁵ mol/L, 并设空白对照组, 放入 CO₂ 培养箱内培养 24 h 后弃去培养基。用 PBS 洗细胞 3 次, 并更换为新的含 1% FBS 的 DMEM 培养液继续培养 24 h, 收集培养上层清液, 1200 r/min 离心 10 min 以去除细胞碎屑成分, 0.22 μm 的一次性滤器过滤除菌, -80℃保存作为条件培养基(conditioned medium, CM)备用。

相同体积, 无细胞的 1% FBS 的 DMEM 培养液以相同方法处理作为条件培养基的对照组(control conditioned medium, CT CM)。

(iv) 加药处理. MTT 和 Western 实验: 对照组为 50% CT CM(即: CT CM 培养液与 MC3T3-e1 常规培养液 DMEM-10% FBS 按照体积比为 1:1 比例配制); 实验组为 50% CM(即: CM 培养液与 MC3T3-e1 常规培养液 DMEM-10% FBS 按体积比 1:1 比例配制)。

碱性磷酸酶活性和钙沉积测定实验: 对照组为 50% CT CM(即: CT CM 培养液与 MC3T3-e1 分化培养液 DMEM-20% FBS+10 mmol/L β-甘油磷酸钠+50 μg/mL 维生素 C 按照体积比为 1:1 比例配制); 实验组为 50% CM(即: CM 培养液与 MC3T3-e1 分化培养液 DMEM-20% FBS+10 mmol/L β-甘油磷酸钠+50

μg/mL 维生素 C 按照体积比为 1:1 比例配制)。

(v) 细胞增殖测定. 以 5×10³ 细胞/孔密度将 MC3T3-e1 细胞接种于 96 孔培养板, 贴壁生长 48 h 后, 按加药处理加入不同培养基继续培养至 72 h。测量前 4 h 加入 MTT 使其终浓度约为 5 mg/mL, 37℃孵育 4 h 后, 弃尽孔内上层清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 置于微型混合振荡仪上平缓摇动 10 min 以溶解生成的甲臜颗粒, 在多波长全自动酶标仪上 (TECAN SUNRISE, Switzerland) 于 570 nm 处测量各孔吸光度值。

(vi) 碱性磷酸酶活性测定. MC3T3-e1 细胞以每孔 2×10⁴ 个/mL 接种于 24 孔培养板中, 细胞贴壁生长 48 h 后, 按加药处理加入不同培养基继续培养 72 h 后, 收集细胞。用 PBS 洗 3 次, 再用 1% Triton X-100/0.9% NaCl 4℃ 裂解细胞 1 h。离心取 200 μL 上层清液, 加入到 37℃的 1 mL 反应混合液(碱性缓冲液和反应底物各 0.5 mL)中, 在 37℃反应 30 min。加入 12 μL 1 mol/L NaOH 终止反应, 然后测定 405 nm 的吸光度。以对硝基苯酚为标准物作标准曲线算得碱性磷酸酶(ALP)活性。用考马斯亮蓝法测细胞裂解液中蛋白质的含量, ALP 活性按蛋白质质量归一化。一个酶单位定义为 30 min 内生成 1 nmol 对硝基苯酚的酶活性。

(vii) 钙沉积测定. MC3T3-e1 细胞以每孔 2×10⁵ 个/mL 接种于 24 孔培养板中, 细胞贴壁后按加药处理加入不同条件培养基。每两天换一次液, 于第 21 天后, 用 PBS 洗 3 次, 再用 0.6 mol/L HCl 脱钙 24 h。收集 HCl 处理后的溶液, 离心取上层清液, 按照试剂盒提供程序测定钙含量。剩下的细胞用 PBS 洗 3 次, 0.1 mol/L NaOH/0.1% SDS 裂解细胞, 用考马斯亮蓝法测细胞裂解液中蛋白质的含量。钙沉积量按蛋白质质量归一化。

(viii) 蛋白免疫印记法. MC3T3-e1 细胞接种于 6 孔培养板上, 以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养。待细胞生长面积达 90% 后, 更换为无血清的 DMEM 培养液使细胞饥饿 24 h。按加药处理方法加入不同条件培养基, 孵育 12 h 后提取蛋白。蛋白免疫印迹法测量 ERK, p-ERK, P38, p-P38, JNK 和 p-JNK 的含量。用 UVI 凝胶成像系统摄像, 并用 Image2Pro Plus 510 软件分析条带灰度值。

(ix) La 和 Gd 对 DU145 细胞调控骨代谢相关蛋白表达的影响. DU145 细胞中加入 10⁻⁵ mol/L LaCl₃ 或 GdCl₃ 培养 48 h, 参照 Gibco 公司提供的 TRIZol

法提取细胞总 RNA. 骨形成蛋白(BMP6)、Noggin、核转录因子受体激活剂(RANKL)、骨保护素(OPG) 的 mRNA 水平通过半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定. 取 5 μg 样品 RNA, 利用随机引物 oligo(dT)₁₅ 和 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA. 取 5 μL 逆转录所得 cDNA, 利用 PCR 进行扩增. BMP6, Noggin, RANKL, OPG 及 GAPDH 的特异性引物序列分别是:

BMP6 Forward, CCGTGTAGTATGGGCCTCAGA,
Reverse, TCACAACCCACAGATTGCTAGTG;
Noggin Forward, CCTGGTGGACCTCATCGAA,
Reverse, CAGCGTCTCGTTCAGATCCTT;
OPG Forward, GCTTACCGGGAAGAAAG,
Reverse, AGGATCTGGTCACTGGGT;
RANKL Forward, CCTTTTGCTCATCTCACTATT,
Reverse, AATGTTGGCATAACAGGTAATA;
GAPDH Forward, GGCCTCCAAGGAGTAAGACC,
Reverse, AGGGGTCTACATGGCAACTG.

以不含 cDNA 模板的反应体系为空白对照组, 以 GAPDH 为内参照物测定每个样品的 mRNA. PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min; 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色后, 采用计算机控制 Alphamager 2200 凝胶成像仪 (Alpha innotech corporation) 进行图像扫描和分析, 得到各种骨代谢标志蛋白相对于 GAPDH 的 mRNA 表达量的相对值.

(X) La 和 Gd 对前列腺癌细胞促破骨细胞分化作用的影响. 取 4 周龄雄性小鼠 5 只 (北京大学医学部实验动物中心提供) 体重 20 ~ 25 g. 拉颈脱位处死, 75% 乙醇泡 5 min. 无菌条件下, 分离股骨, 剪断两侧骨骺端, 用 DMEM (100 U/mL 青霉素, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 10% FBS) 轻轻冲洗骨髓腔, 收集骨髓细胞并接种于培养瓶中加入 FBS 含量为 10% 的 DMEM 的培养基及 15 ng/mL 的 M-CSF 培养 12 h (5% CO₂, 95% 空气, 37 $^{\circ}\text{C}$). 收集未贴壁细胞, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上层清液. 用 DMEM 培养液重悬细胞, 计数并调整细胞浓度至 10⁵ 个/mL 备用.

前列腺癌 DU145 细胞以 10³/孔 (设有空白组) 接种于已装有玻片的 24 孔板, 培养 24 h 备用. 将破骨细胞前体细胞悬液种入按上述方法准备好的 24 孔板, 每孔加入 10⁻⁵ mol/L 的 LaCl₃ 或 GdCl₃, 并设空白对照组, 培养基为含 FBS (10%), M-CSF (50 ng/mL) 和 RANKL (100 ng/mL) 的 DMEM 培养液, 在 5% CO₂, 95% 空气, 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿热条件下培养, 并每隔 3 天换液,

于第 9 天进行细胞观察、染色及计数.

(xi) 数据统计. 实验数据经 SPSS11.5 统计软件处理, 实验结果均采用方差分析处理, 以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm\text{SD}$)表示. 显示结果为至少 3 次重复实验中的一次. $P<0.05$ 认为差异有统计学意义.

2 实验结果

(i) La 和 Gd 作用 DU145 细胞后的条件培养基对前成骨细胞增殖的影响. 如图 1 所示, DU145 细胞的条件培养基对成骨细胞 MC3T3-e1 的增殖有促进作用, 经 La 和 Gd 作用后 DU145 细胞条件培养基的促增殖作用进一步增强.

(ii) La 和 Gd 作用 DU145 细胞后的条件培养基对成骨细胞 ALP 活性的影响. 如图 2 所示, 和没有细胞的条件培养基(CT CM)相比较, DU145 细胞的条件培养基对成骨细胞 MC3T3-e1 的 ALP 活性没有显著影响, 但 La 或 Gd 作用 DU145 细胞后的条件培养基对 MC3T3-e1 细胞的 ALP 活性显著增强. 并且和 DU145 细胞的条件培养基相比较, La 作用后的 DU145 细胞条件培养基对 MC3T3-e1 细胞的 ALP 活性的增加更为显著.

(iii) La 和 Gd 作用 DU145 细胞后的条件培养基对成骨细胞钙沉积的影响. 如图 3 所示, DU145 细胞的条件培养基对成骨细胞 MC3T3-e1 的钙沉积有促

图1 La 和 Gd 作用后的 DU145 细胞条件培养基对 MC3T3-e1 细胞增殖的影响

* $P<0.05$ vs. CT CM; # $P<0.05$ 经稀土作用后的 DU145 CM 组 vs. DU145 CM 组

图2 La 和 Gd 作用 DU145 细胞后的条件培养基对 MC3T3-e1 细胞 ALP 活性的影响

* $P < 0.05$ vs. CT CM; # $P < 0.05$ 经稀土作用后的 DU145 CM 组 vs. DU145 CM 组

进作用, 经 La 处理后, DU145 细胞的条件培养基促进钙沉积作用进一步增强. 而经 Gd 处理后, 和 DU145 细胞的条件培养基相比无明显变化.

(iv) La 和 Gd 对 DU145 细胞调控骨代谢相关标志蛋白表达的影响. 如图 4 所示, 经 La 处理后, DU145 细胞的 Noggin 和 RANKL 表达明显减弱, 而 BMP6 和 OPG 的表达显著提高. 经 Gd 处理后, DU145 细胞的 Noggin 和 RANKL 的表达无明显变化, 但是 BMP6 和 OPG 的表达显著提高.

(v) La 和 Gd 作用 DU145 细胞后的条件培养基对成骨细胞信号通路的影响. 如图 5 所示, DU145 细胞条件培养基对成骨细胞 ERK, P38 和 JNK 的磷酸化水平没有显著影响; La 和 Gd 处理后的条件培养基

图3 La 和 Gd 作用 DU145 细胞后的条件培养基对 MC3T3-e1 细胞钙沉积的影响

* $P < 0.05$ vs. CT CM; # $P < 0.05$ 经稀土作用后的 DU145 CM 组 vs. DU145 CM 组

增强了成骨细胞 JNK 的磷酸化水平.

(vi) La 和 Gd 对 DU145 细胞共培养条件下破骨细胞分化的影响. 如图 6 所示, 与前列腺癌细胞 DU145 共培养能够促进破骨细胞前体细胞向破骨细胞的分化. La 能够抑制 DU145 细胞促进破骨细胞前体细胞的分化作用, 而 Gd 对破骨细胞前体细胞分化的影响并没有显著差异.

3 讨论

前列腺癌转移主要为成骨型, 因此前列腺癌细胞与成骨细胞间的相互作用是前列腺癌骨转移过程中的重要组成部分^[10]. 有研究表明, 前列腺癌细胞的条件培养基可以促进成骨细胞增殖、分化和钙化能力, 提示前列腺癌细胞分泌了一些与成骨细胞分化

图4 La 和 Gd 对 DU145 细胞蛋白表达的影响

* $P < 0.05$ 稀土处理组 vs. 对照组

图5 La和Gd作用DU145细胞后的条件培养基对MC3T3-e1细胞信号通路的影响

图6 La和Gd对DU145细胞共培养条件下破骨细胞样分化的影响

* $P < 0.05$ vs. 对照组; # $P < 0.05$ vs. 不加稀土共培养组

相关细胞因子^[11]。我们的实验结果也证实了 DU145 细胞的条件培养基能够促进小鼠前成骨细胞 MC3T3-e1 的增殖、ALP 活性和钙沉积, 而且发现经 La 作用 DU145 细胞后的条件培养基对 MC3T3-e1 细胞的作用进一步加强, 然而 Gd 作用 DU145 后的细胞条件培养基只是促进了 MC3T3-e1 细胞的增殖, 对 ALP 活性和钙沉积影响并不显著。

在前列腺癌骨转移过程中, 癌细胞通过过度分泌调控骨代谢的细胞因子直接作用于成骨细胞。有研究发现, BMP6 mRNA 及其蛋白在几乎所有发生骨转移的前列腺癌原发部位和骨转移部位均有高表达, 而在无转移的前列腺癌和良性前列腺增生性病变中表达很低甚至几乎不表达, 提示 BMP6 表达与前列腺癌的发生及骨转移有密切关系^[12]。BMPs 可诱导间

质细胞向成骨细胞系分化, 并可促进成骨细胞的功能。Noggin 是 BMPs 的细胞外拮抗剂, 通过与 BMPs 特异性结合阻止 BMPs 与细胞表面的受体结合, 从而抑制 BMPs 功能的发挥。我们通过 RT-PCR 实验检测了 DU145 细胞的 BMP6 和 Noggin 基因表达, 发现 La 显著提高 BMP6 在前列腺癌细胞中的表达, 而且降低了 Noggin 的表达。La 可能通过促进 DU145 细胞 BMP6, 降低其拮抗剂 Noggin 表达, 从而增强成骨细胞增殖和分化的功能。

ERK, P38 和 JNK 通路参与了成骨细胞分化、增殖的信号转导, 3 种 MAPK 通路作用比较独立。JNK 通路和成骨细胞分化晚期相关, 而在 BMP2 诱导成骨细胞分化的研究中发现, JNK 通路的激活对于该过程是必需的^[13]。由于 BMPs 是一组具有类似结构的高度保守的功能蛋白, BMP6 也有可能通过相同的通路起作用。我们的实验结果表明, La 作用后的条件培养基仅激活 JNK 磷酸化水平, 而对 ERK 和 P38 磷酸化没有影响。提示 La 作用 DU145 细胞后, 通过增加细胞因子 BMP6 的表达, 进而激活 JNK 通路, 从而促进成骨细胞分化。

破骨细胞的成熟和活化在前列腺癌骨转移导致的骨质损伤发展中是非常重要的, 因此抑制前列腺癌骨转移的策略包括控制肿瘤细胞对破骨细胞的作用^[4]。我们用前列腺癌细胞与来自骨髓造血干细胞的破骨细胞前体细胞共培养体系, 检测了稀土对前列腺癌细胞诱导破骨细胞生成的影响。结果显示, La 抑制 DU145 细胞诱导的破骨细胞生成, 而 Gd 对 DU145 细胞的诱导作用无明显影响。

RANK 表达于破骨细胞前体细胞表面, RANKL 是其配体, 二者结合可激活 RANK, 导致破骨细胞的分化与活化。这条途径受到 OPG 的调节, 它可以阻断 RANK 与 RANKL 的结合以及破骨细胞的分化与活化^[14]。正常前列腺和原位前列腺癌细胞都可表达 RANKL, 又可表达 OPG, 前列腺癌细胞可以通过调节 RANKL 和 OPG 分子的表达, 来参与骨基质的更新^[15]。我们的实验结果表明, La 显著提高 OPG 在前列腺癌 DU145 细胞中的表达, 降低了 RANKL 的表达, 而 Gd 对 RANKL 在前列腺癌 DU145 细胞中的表达并无影响。说明 La 在前列腺癌骨转移过程中, 可以通过抑制前列腺癌细胞 RANKL 的表达从而抑制破骨细胞的生成。

本文研究表明, La 可能通过上调 DU145 细胞分泌的细胞因子 BMP6 表达, 抑制 Noggin 的表达进而

促进成骨细胞的增殖和分化; 而且成骨细胞的增殖、分化与 JNK 信号转导通路有关. 此外我们还观察到 La 通过上调前列腺癌细胞分泌的细胞因子 OPG, 下

调 RANKL 表达, 而起到抑制 DU145 细胞诱导的破骨细胞生成.

参考文献

- 1 Coleman R E. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 6243s–6249s
- 2 Casimiro S, Guise T A, Chirgwin J. The critical role of the bone microenvironment in cancer metastases. *Mol Cell Endocrin*, 2009, 310: 71–81
- 3 Guise T A, Mohammad K S, Clines G, et al. Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 6213s–6216s
- 4 Ibrahim T, Flamini E, Mercatali L, et al. Pathogenesis of osteoblastic bone metastases from prostate cancer. *Cancer*, 2010, 116: 1406–1418
- 5 Roato I, D'Amelio P, Gorassini E, et al. Osteoclasts are active in bone forming metastases of prostate cancer patients. *PLoS ONE*, 2008, 3: e3627
- 6 Fricker S P. The therapeutic application of lanthanides. *Chem Soc Rev*, 2006, 35: 524–533
- 7 Shailendra K. Lanthanum and its rapidly emerging role as an anti-carcinogenic agent. *J Cell Biochem*, 2009, 106: 193
- 8 王芃, 黄健, 张天蓝, 等. 氯化镧抑制人转移型雄性激素非依赖性前列腺癌细胞 DU145 的生长和迁移. *科学通报*, 2010, 55: 2289–2295
- 9 Wang P, Zou X M, Huang J, et al. Gadolinium inhibits prostate cancer PC3 cell migration and suppresses osteoclast differentiation *in vitro*. *Cell Biol Int*, 2011, 35: 1159–1167
- 10 Boyle W J, Simonet W S, Lacey D L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 2003, 423: 337–342
- 11 Bentley H, Hamdy F C, Hart K A, et al. Expression of bone morphogenetic proteins in human prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Br J Cancer*, 1992, 66: 1159–1163
- 12 Hamdy F C, Autzen P, Robinson M C, et al. Immunolocalization and messenger RNA expression of bone morphogenetic protein-6 in human benign and malignant prostatic tissue. *Cancer Res*, 1997, 57: 4427–4431
- 13 Liu H, Liu Y, Viggeswarapu M, et al. Activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase 1 increases cellular responsiveness to BMP-2 and decreases binding of inhibitory Smad6 to the type I BMP receptor. *J Bone Miner Res*, 2011, 26: 1122–1132
- 14 Lacey D L, Timms E, Tan H L, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998, 93: 165–176
- 15 Brown J M, Corey E, Lee Z D, et al. Osteoprotegerin and rank ligand expression in prostate cancer. *Urology*, 2001, 57: 611–616

The influence of La and Gd on prostate cancer DU145 cell-induced osteoblast and osteoclast differentiation

ZHANG ZhengLai, WANG Peng, HUANG Jian, ZHANG TianLan & WANG Kui

To assess the potential effect of lanthanides (Ln) on the prevention of prostate cancer (PCa) bone metastasis, in this study we report the influence of Ln on PCa cells induced osteoblasts and osteoclasts differentiation. We cultured osteoblast-like MC3T3-e1 cells with conditioned medium (CM) from lanthanum (La) or gadolinium (Gd) treated DU145 cells. MC3T3-e1 differentiation increased in the presence of DU145 CM treated with La, whereas Gd treatment had no effect on MC3T3-e1 differentiation. Using RT-PCR arrays, we observed an increase in the expression of BMP6 genes in DU145 cells treated with La. Western blot analysis demonstrated that LaCl₃ treatment increased phosphorylation of c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK). In addition, La reduced the expression of osteoclastogenesis-associated genes RANKL while increasing OPG expression in DU145 cells. Furthermore, La inhibited DU145 cells induced osteoclast formation in an *in vitro* coculture model of prostate cancer cells with osteoclast precursors generated from mouse bone marrow cells, while Gd failed to show the similar phenomenon in osteoclast differentiation.

lanthanum, gadolinium, prostate cancer, osteoblast, osteoclast