

骨形态发生蛋白-7 在胃癌组织中的表达及意义*

郑齐懿¹, 严留佳², 王庆飞¹, 陈军浩¹, 沈 瀚¹

(1. 南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 南京 210008; 2. 江苏省肿瘤医院检验科, 南京 210000)

摘要:目的 分析骨形态发生蛋白-7 (BMP-7)在胃癌中的表达,初步探讨 BMP-7 对胃癌诊断的意义。方法 以 27 例胃癌及相应的癌旁组织为研究对象,采用实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 方法,分别检测组织中 BMP-7 mRNA 及其蛋白的表达情况。结果 27 例配对的胃癌及其癌旁组织中,63.0% (17/27) 的癌组织 BMP-7 mRNA 的表达高于癌旁组织,差异有统计学意义 ($t=2.94, P<0.01$, 配对 t 检验); Western blotting 结果显示,77.8% (7/9) 的癌组织 BMP-7 蛋白水平的表达高于癌旁组织,差异有统计学意义 ($t=2.57, P<0.05$, 配对 t 检验)。结论 胃癌组织中 BMP-7 的表达高于癌旁组织,可能与胃癌的发生、发展相关,对临床胃癌的辅助诊断可能具有潜在价值。

关键词:胃癌;骨形态发生蛋白-7

中图分类号:R735.2;R730.43 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)06-018-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.06.005

Expression and Clinical Significance of Bone Morphogenetic Protein-7 in Gastric Cancer

ZHENG Qi-si¹, YAN Liu-jia², WANG Qing-fei¹, CHEN Jun-hao¹, SHEN Han¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Nanjing Drum Tower Hospital of Medical School, Nanjing University, Nanjing 210008, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210000, China)

Abstract: **Objective** To preliminarily investigate the expression of BMP-7 in gastric cancer and its significance for gastric cancer diagnosis. **Methods** The expression level of BMP-7 mRNA in 27 pair-matched gastric neoplastic and adjacent non-neoplastic tissues was determined by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction, and western blotting was performed to analyze BMP-7 protein level in randomly selected 9 pair-matched tissues. **Results** The relative expression level of BMP-7 mRNA in 63.0% (17/27) gastric cancer tissues was significantly higher than that in adjacent non-neoplastic tissues ($t=2.57, P<0.05$, paired t -test). The level of BMP-7 protein in 77.8% (7/9) gastric cancer tissues was higher than that in adjacent non-neoplastic tissues ($t=2.57, P<0.05$, paired t -test). **Conclusion** Compared to the non-neoplastic tissues, expression of BMP-7 was increased in gastric cancer, indicating BMP-7 might be associated with the occurrence and development of gastric cancer, and may have potential value for the diagnosis of gastric cancer.

Keywords: gastric cancer; bone morphogenetic protein-7

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMPs) 是转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β) 超家族的成员^[1]在骨骼的胚胎发育和再生、修复具有重要作用。除了调节骨骼的发育和形成,近期的研究发现 BMPs 的功能还与肿瘤细胞的增殖、凋亡有关,研究显示 BMP-7 信号通路参与肿瘤的进展^[2,3],但其在胃癌的发生、发展过程中的具体作用尚不清楚。本研究初步探讨 BMP-7 在胃癌中的表达,为进一步探讨 BMP-7 在胃癌发生、发展及转移中所起的作用和潜在临床价值提供基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2013 年 10 月~2014 年 12

月间南京鼓楼医院和江苏省肿瘤医院普外科 27 例胃癌患者的肿瘤及相应癌旁组织标本,患者术前均未进行化疗、放疗。新鲜标本置液氮中速冻约 0.5~1 h 后转 -80℃ 保存备用。以上标本均经病理组织学证实,研究方案获南京鼓楼医院和江苏省肿瘤医院伦理学委员会批准。

1.2 试剂与仪器 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购自 Takara 公司,荧光定量 PCR 试剂盒为 ToYoBo 公司产品。蛋白裂解液和 BCA 蛋白定量试剂盒均购自 Thermo 公司,BMP-7 和 GAPDH 单克隆抗体均购自 Santa Cruz 公司,羊抗鼠 IgG-HRP 超敏 ECL 化学发光试剂盒购自 GE Healthcare 公司。Mx3000P 实时荧光定量

* 基金项目:南京市医学科技发展重点项目(ZKX08030)、专项课题(YKK13066)。

作者简介:郑齐懿(1988-),男,学士,技师,主要从事临床免疫学检验工作,Tel:025-83106666 转 60659。

通讯作者:陈军浩(1966-),男,主任技师,E-mail:nj_cjh@aliyun.com。

沈 瀚(1965-),男,主任技师,E-mail:shenhan10366@sina.com。

PCR仪购自Stratagene公司,化学发光成像分析系统购自Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 组织总RNA提取和逆转录反应:取50~100 mg胃癌或癌旁组织,放入装有1 ml Trizol的离心管内,用匀浆器在冰上匀浆,室温(15~30℃)放置5 min。加入0.2 ml 氯仿,剧烈振荡30 s,室温放置3 min,12 000 r/min,4℃离心15 min。取上清至1.5 ml离心管中,加入等体积异丙醇,混合均匀,室温放置15 min,12 000 r/min,4℃离心10 min,移去上清。加入0.1 ml/dl DEPC处理的75 g/dl 乙醇500 μ l 洗涤RNA沉淀,7 500 r/min,4℃离心5 min,弃上清。在超净台中将残余乙醇充分挥发至沉淀呈半透明状,加入30 μ l 去RNase的双蒸水使RNA溶解。分光光度计测浓度及 $A_{260\text{ nm}}$ / $A_{280\text{ nm}}$ 值,-80℃冰箱储存。按逆转录试剂盒操作合成cDNA,-20℃保存备用。

1.3.2 实时荧光定量PCR:以 β -actin为内参,进行荧光定量PCR反应。BMP-7上、下游引物序列分别为:5'-CGAAGTAGAGGACGGAGATG-3'和5'-GTATGTCAGCTTCCGAGACC-3',扩增产物224 bp;内参 β -actin的上、下游引物序列分别为:5'-CACGAACTACCTTCAACTCC-3'和5'-CATACTCCTGCTTGCTGATC-3',扩增产物265 bp。以上引物委托Invitrogen公司合成。PCR反应体系为20 μ l,每个样本重复测定3次,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算BMP-7 mRNA的相对表达量。

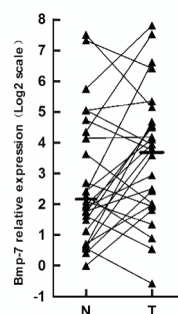
1.3.3 Western Blotting 组织蛋白的提取:将胃癌或癌旁组织剪碎,称重,切小块放入管中。加入含蛋白酶抑制剂的裂解液(250 mg组织中加入1 ml 抽提试剂);用匀浆器每次30 s 低速匀浆,每次匀浆间隔冰浴1 min,至组织完全裂解(冰上进行);12 000 r/min 4℃,10 min 离心取上清,采用BCA法测定蛋白浓度。取20 μ g 总蛋白,加入loading buffer煮沸3~5 min,置冰上冷却,短暂离心后按照顺序上样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。随后经转膜、免疫检测,应用化学发光成像分析系统进行成像扫描,使用Quantity One软件进行条带灰度分析,结果用BMP-7和内参GAPDH的比值表示BMP-7蛋白的相对含量。

1.4 统计学分析 采用Graphpad 5.0软件进行绘图和统计分析,胃癌及相应癌旁组织中BMP-7的表达差异比较采用配对均数 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织中BMP-7 mRNA的表达 经 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算BMP-7 mRNA的相对表达水平。

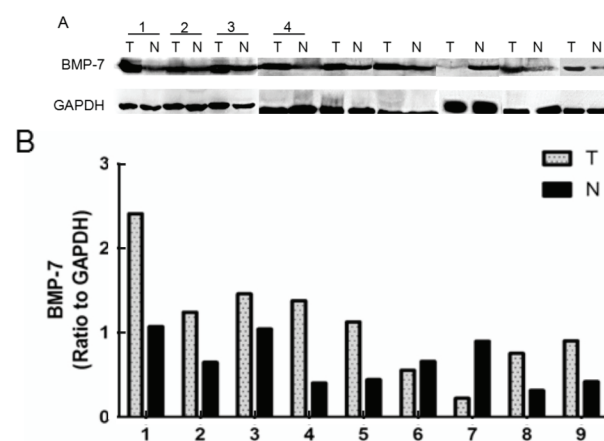
结果显示,在27例标本中,17例(63%)胃癌组织BMP-7 mRNA的相对含量高于癌旁组织,见图1,表达指数的配对 t 检验发现差异有统计学意义($t=2.94, P<0.01$)。27例胃癌组织中BMP-7 mRNA的总体平均相对表达量为 3.58 ± 1.99 高于癌旁组织的 2.22 ± 2.05 ,但两组间均数比较差异无统计学意义($t=1.97, P=0.054$)。



(T. 胃癌组织;N. 对应的癌旁组织)

图1 胃癌及癌旁组织中BMP-7 mRNA的表达水平

2.2 胃癌组织中BMP-7蛋白表达水平 随机选取9例胃癌及癌旁组织标本,运用Western blotting方法检测BMP-7蛋白水平的表达,见图2A;图2B的灰度分析结果显示:77.8%(7/9)的标本中,癌组织BMP-7蛋白水平的表达高于癌旁组织,差异有统计学意义($t=2.57, P<0.05$,配对 t 检验)。



A. Western blotting 结果;B. 灰度扫描分析结果;T. 胃癌组织;N. 癌旁组织。

图2 胃癌及癌旁组织中BMP-7蛋白水平的表达

3 讨论 骨形态发生蛋白-7(BMP-7)是转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族中的重要成员,具有高效骨诱导活性,可诱导间充质细胞向成骨、成软骨细胞分化,进而产生新生骨;促进碱性磷酸酶的表达、修复和重建骨、软骨缺损。BMP-7还可通过诱导各种血管活性因子或刺激内皮细胞的迁移和血管形成。除此之外,近年来,在多种肿瘤细胞中陆续发现BMP-7及其受体的异常表达^[2],并参与肿瘤的转移。(下转24页)

关于 BMP-7 在肿瘤发生、发展过程中的作用及其分子机制研究日渐深入。有研究报道 BMP-7 是 p53 的靶基因,在 p53 缺失的乳腺癌细胞株中, BMP-7 对维持细胞的存活发挥重要作用^[3]。 BMP-7 在黑色素瘤、食管腺癌、前列腺肿瘤中表达上调,在卵巢癌及卵巢周围的基质细胞中也被检测到。Beck 等^[4]发现在人结肠癌 SW480 细胞中, BMP-2 和 BMP-7 高表达,并通过 Smad4 独立信号通路对细胞增殖起调控作用。Sakai 等^[5]研究发现, BMP-7 及其受体的高表达与乳腺癌细胞的骨转移有关。 BMP-7 能刺激 Smad1/5/8 磷酸化,促进肿瘤细胞的增殖和迁移,可作为早期诊断乳腺癌骨转移的重要指标^[6]。另一方面,正常肾组织通常高表达 BMP-7,有研究报道 BMP-7 表达高的肾癌患者,其预后较表达低者好^[7],这可能与组织类型有关。

胃癌是我国发病率和死亡率均位居前列的恶性肿瘤。大量的临床研究表明,早期胃癌的 5 年生存率可高于 90%。目前,血清中相关肿瘤标志物的检测和联合应用对胃癌的早期诊断,指导治疗及预防判断具有重要意义^[8,9],但与期望的效果仍有较大差距,迫切需要寻找、发现更理想的标记物。本研究结果显示,胃癌组织中 BMP-7 mRNA 和蛋白水平均高于癌旁组织,提示 BMP-7 可能与胃癌的发生、发展有关。同时,癌组织中高表达 BMP-7 蛋白的比例高于 mRNA (77.8% vs 63%),推测 BMP-7 蛋白可能具有更高的检出率。在先前 Aoki 等^[10]的研究中,用免疫组织化学的方法检测了 233 例胃癌组织中 BMP-7 的表达,发现其在 55% (129/233) 的标本中表达阳性,并与肿瘤大小、淋巴浸润、细胞分化程度等有关, BMP-7 的表达水平与术后复发密切相关,可作为独立的预后评估指标。

总之, BMP-7 在胃癌组织中具有较高水平的表达,有可能是潜在的胃癌相关新标志物。在后续的研究中,需要进行大样本、多中心的研究,进一步分析 BMP-7 表达与肿瘤分型、浸润程度、淋巴结转移以及生存情况等的关系,明确 BMP-7 表达在胃癌中的作用及其作为分子标记在诊断、预后评估中

的临床价值。

参考文献:

- [1] Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation; molecular clones and activities [J]. Science, 1988, 242(4885): 1528-1534.
- [2] Boon MR, van der Horst G, van der Pluijm G, et al. Bone morphogenetic protein 7: a broad-spectrum growth factor with multiple target therapeutic potency [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22(4): 221-229.
- [3] Alarmo EL, Parssinen J, Ketolainen JM, et al. BMP7 in uences proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells [J]. Cancer Lett, 2009, 275(1): 35-43.
- [4] Beck SE, Jung BH, Fiorino A, et al. Bone morphogenetic protein signaling and growth suppression in colon cancer [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 291(1): G135-145.
- [5] Sakai H, Furihata M, Matsuda C, et al. Augmented autocrine bone morphogenic protein (BMP) 7 signaling increases the metastatic potential of mouse breast cancer cells [J]. Clin Exp Metastasis, 2012, 29(4): 327-338.
- [6] Motoyama K, Tanaka F, Kosaka Y, et al. Clinical significance of BMP7 in human colorectal cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15(5): 1530-1537.
- [7] Kwak C, Park YH, Kim IY, et al. Expression of bone morphogenetic proteins, the subfamily of the transforming growth factor-beta superfamily, in renal cell carcinoma [J]. J Urol, 2007, 178(3 pt 1): 1062-1067.
- [8] 邢瑞青, 吴永昌, 邹海, 等. 不同血清肿瘤标志物对胃癌诊断价值的临床研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(6): 102-106.
- [9] Xing RQ, Wu YC, Zou H, et al. Diagnostic value of different serum tumor markers in gastric cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(6): 102-106.
- [9] 王妍, 姚伟, 黄钦贤, 等. 胃癌患者的血清乳酸脱氢酶水平及其基因在癌组织的表达与患者预后的相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(5): 54-57.
- [10] Wang Y, Yao W, Huang QX, et al. Association between the level of LDH in gastric cancer patient's serum, the relative expression of LDH in tissues and the patient's prognosis [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(5): 54-57.
- [10] Aoki M, Ishigami S, Uenosono Y, et al. Expression of BMP-7 in human gastric cancer and its clinical significance [J]. Br J Cancer, 2011, 104(4): 714-718.

收稿日期: 2015-03-18

修回日期: 2015-07-17