

## 骨形态发生蛋白2、6在肝癌中的表达及意义

吴建兵, 傅华群, 黄龙璋, 刘安文, 张吉翔

### ■背景资料

骨形态发生蛋白(BMPs)是一组能广泛参与调节多种细胞增殖、分化和凋亡的生物学过程的功能蛋白,能诱导前体细胞的迁移和分化。近期研究认为BMPs的表达不但涉及到胚胎、器官的形成,更包括肿瘤疾病的形成和发展,尤其在肿瘤的侵袭、转移特性中,BMPs扮演了十分重要的角色,可以显著增加细胞的迁移和侵袭性。

吴建兵, 黄龙璋, 刘安文, 南昌大学第二附属医院肿瘤科 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006  
傅华群, 南昌大学第二附属医院肝胆外科 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006  
张吉翔, 南昌大学第二附属医院消化内科 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006  
作者贡献分布: 吴建兵与黄龙璋对此文所作贡献均等, 此课题由吴建兵, 傅华群, 张吉翔及黄龙璋设计; 研究过程由吴建兵, 黄龙璋及刘安文操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由吴建兵提供; 数据分析由黄龙璋完成; 此论文写作由吴建兵与黄龙璋完成。  
通讯作者: 吴建兵, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院肿瘤科, 江西省分子医学重点实验室。  
wujb555@hotmail.com  
电话: 0791-6292596 传真: 0791-6292596  
收稿日期: 2009-02-02 修回日期: 2009-02-12  
接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-18

### Expression of bone morphogenetic protein 2 and 6 and clinical significance in liver carcinoma

Jian-Bing Wu, Hua-Qun Fu, Long-Zhang Huang, An-Wen Liu, Ji-Xiang Zhang

Jian-Bing Wu, Long-Zhang Huang, An-Wen Liu, Department of Oncology, the Second Hospital Affiliated to Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China  
Hua-Qun Fu, Department of Gastroenterology, the Second Hospital Affiliated to Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China  
Ji-Xiang Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital Affiliated to Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China  
Correspondence to: Jian-Bing Wu, Department of Oncology, the Second Hospital Affiliated to Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, 1 Middle Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. wujb555@hotmail.com  
Received: 2009-02-02 Revised: 2009-02-12  
Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the expression of bone morphogenetic protein 2 and 6 (BMP-2, 6) mRNA in human liver cancer, and to explore its relationship with biologic action in liver cancer.

**METHODS:** The expressions of BMP-2 and BMP-6 in 30 carcinoma liver tissue samples and 30 normal

liver tissue samples were detected and analyzed by reverse transcriptase PCR and Western blot.

**RESULTS:** The relative level of BMP-2 and BMP-6 mRNA was significantly lower in the normal liver tissue samples than in the liver carcinoma tissue samples ( $0.3245 \pm 0.1127$  vs  $0.8298 \pm 0.1187$ ,  $0.2947 \pm 0.1853$  vs  $0.7145 \pm 0.1373$ , both  $P < 0.05$ ). The relative level of BMP-2 and BMP-6 mRNA in III, IV stages of liver cancer was significantly higher than that in I, II stages ( $0.92431 \pm 0.1234$  vs  $0.69355 \pm 0.1925$ ,  $0.8354 \pm 0.1423$  vs  $0.6043 \pm 0.1234$ , both  $P < 0.05$ ). The expression level of BMP-2 and BMP-6 protein were significantly higher in the metastatic liver cancer compared with that without metastasis ( $0.9854 \pm 0.2888$  vs  $0.6244 \pm 0.3087$ ,  $0.9076 \pm 0.1276$  vs  $0.5678 \pm 0.2493$ , both  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Up-regulated expressions of BMP-2 and BMP-6 play an important role in liver cancer. It may have the active role in invasion and metastasis of liver cancer.

**Key Words:** Carcinoma; Hepatocellula; Bone morphogenetic proteins; Reverse transcriptase PCR; Western blot

Wu JB, Fu HQ, Huang LZ, Liu AW, Zhang JX. Expression of bone morphogenetic protein 2 and 6 and clinical significance in liver carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 834-837

### 摘要

**目的:** 研究骨形态发生蛋白2、6(BMP-2、6)在肝癌组织中的表达,并探讨其与肝癌生物学行为的关系。

**方法:** 应用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和Western blot检测30例正常肝脏组织和30例肝癌组织的BMP-2、6的表达水平。

**结果:** 正常肝脏组织BMP-2、6 mRNA相对表达量显著低于肝癌组织( $0.3245 \pm 0.1127$  vs  $0.8298 \pm 0.1187$ ,  $0.2947 \pm 0.1853$  vs  $0.7145 \pm 0.1373$ , 均 $P < 0.05$ )。Ⅲ、Ⅳ期肝癌组织BMP-2、6 mRNA相对表达量显著高于Ⅰ、

### ■同行评议者

党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

II期( $0.92431 \pm 0.1234$  vs  $0.69355 \pm 0.1925$ ,  $0.8354 \pm 0.1423$  vs  $0.6043 \pm 0.1234$ , 均 $P < 0.05$ ). Western blot检测有远处转移的肝癌组织BMP-2、6表达高于无远处转移的肝癌组织( $0.9854 \pm 0.2888$  vs  $0.6244 \pm 0.3087$ ,  $0.9076 \pm 0.1276$  vs  $0.5678 \pm 0.2493$ , 均 $P < 0.01$ ).

**结论:** BMP-2、6在肝癌中表达上调, 可能在肝癌的发生发展中起着重要的作用, 其表达上调可能促进肝癌的浸润和转移.

**关键词:** 癌; 肝细胞; 骨形态发生蛋白; 逆转录-聚合酶链反应; 蛋白质印迹

吴建兵, 傅华群, 黄龙璋, 刘安文, 张吉翔. 骨形态发生蛋白2、6在肝癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 834-837 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/834.asp>

## 0 引言

肝癌具有的高度侵袭和转移能力是影响肝癌治疗和预后的关键因素. 骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是一组能广泛参与调节多种细胞增殖、分化和凋亡的生物学过程的功能蛋白, 能诱导前体细胞的迁移和分化. 近期研究认为BMPs的表达不但涉及到胚胎、器官的形成, 更包括肿瘤疾病的形成和发展, 尤其在肿瘤的侵袭、转移特性中, BMPs扮演了十分重要的角色, 可以显著增加细胞的迁移和侵袭性. 因此, 本研究旨在探讨与肿瘤发生密切相关的BMP-2、6在人肝癌组织中的表达及其与临床分期、病理的关系, 为进一步深入研究BMPs在人肝癌发生、发展及生物学特性中所起的作用提供理论和实验依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2007-09/2008-09收集的新鲜肝癌组织标本30例, 其中手术切除的新鲜肝癌标本24例, 穿刺活检标本6例(有远处转移, 不适合手术切除的肝癌). 另取正常新鲜肝脏组织标本30例作为对照. 30例肝癌患者年龄38-73(平均61)岁. 依照国际抗癌联盟组织(UICC)颁发的恶性肿瘤TNM分期标准<sup>[1]</sup>, 根据术前影像学检查CT、MRI和全身骨扫描结果、手术中肿瘤形态和浸润情况、肝门淋巴结是否转移以及门静脉主干有无癌栓形成等病理情况进行TNM分期, 其中I期4例、II期8例、III期12例、IV期6例; 肝门淋巴结转移2例; 门静脉主干及分支癌栓4例; 远处转移6例, 其中肺转移2例、骨转移4例. 按原发性肝癌病理大

体分型和组织病理分型方法, 其中巨块型23例, 结节型7例; 肝细胞癌21例、胆管细胞癌9例. 治疗前AFP阳性者23例, 阴性者7例. 胰蛋白酶(北京Solarbio公司), TRIzol试剂(北京天更公司), Lipofectamine 2000(Invitrogen公司), 逆转录试剂盒(Fermentas公司), BMP-2、6鼠抗人mAb、Actin兔抗人多克隆抗体(Santa Cruz公司), 辣根酶标记山羊抗鼠IgG、辣根酶标记山羊抗兔IgG(北京中杉金桥生物公司), 免疫印迹配胶、电泳、电转装置(Bio-Rad公司).

### 1.2 方法

**1.2.1 RT-PCR检测BMP-2、6 mRNA的表达:** 使用TRIzol试剂按说明分别提取人肝癌组织总RNA. 逆转录反应按试剂盒操作说明进行. 引物由广州锐博生物工程有限公司合成. BMP-2引物上游5'-AACCTGCAACAGCCAACT-3'; 下游5'-GGAGCCACAATCCAGTCAT-3', PCR产物长度418 bp, BMP-6引物上游5'-TCAGCGACACCA CAAAGAGT-3'; 下游5'-CTGGGTAGAGCGATTACGACT-3', PCR产物长度478 bp. 内参GAPDH引物上游5'-GAAGGTCTGGAGTCAACGG-3', 下游5'-GCTCAGTGTAGCCCAGGAT-3', PCR产物长度为825 bp. PCR扩增条件: 94℃预变性2 min, 然后94℃变性45 s, 52℃退火45 s, 72℃延伸30 s, 共30个循环, 最后72℃延伸10 min. PCR产物在10 g/L琼脂糖凝胶电泳后观察结果.

**1.2.2 Western blot印迹检测:** 取各组标本等量加入500 μL裂解液中(10 mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 150 mmol/L NaCl, 25 g/L SDS, 25 g/L TritonX-100, 1 mol/L EDTA, 抑酞酶2 mg/L), 冰上孵育裂解细胞20 min, 离心2 min后取上清液-20℃保存备用. 采用Bradford法测定蛋白质浓度, 以50 μg/孔上样, 在非还原的条件下经120 g/L的SDS-PAGE凝胶进行电泳分离后, 转移至硝酸纤维素膜上, 在含50 g/L脱脂奶粉的PBS中4℃封闭过夜, 加入1:200稀释的鼠抗人BMP-2抗体, 室温下反应2 h, 经0.05% Tween-PBS洗涤3次后, 再与1:2000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG作用2 h, 0.05% Tween-PBS洗涤3次, 每次10 min. 最后, ECL显影, 压片, 观察结果. 测定目的条带的灰度值, 以β-actin为内参照, 目的蛋白量 = 目的蛋白条带吸光度/β-actin条带光密度, 实验重复3次.

**统计学处理** 用SPSS13.0软件进行统计学分析, 各组实验数据以mean±SD表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用t检验,

### ■ 研发前沿

由于BMPs在大多数肿瘤中均有高表达而成为目前肿瘤研究领域的新热点.

## ■ 相关报道

Langenfeld *et al* 研究发现BMP-2在人类非小细胞肺癌中异常高表达,在肺良性肿瘤及正常肺组织中无表达,BMP-2在前列腺癌、大肠癌、黑色素瘤及骨髓瘤及头颈部肿瘤中均过表达。

表 1 BMP-2、6 基因在肝癌及正常肝组织中的半定量分析 (mean  $\pm$  SD,  $n = 30$ )

分组	BMP-2	BMP-6
正常肝脏组织	0.3245 $\pm$ 0.1127	0.2947 $\pm$ 0.1853
肝癌组织	0.8298 $\pm$ 0.1187 <sup>a</sup>	0.7145 $\pm$ 0.1373 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常肝脏组织。

$P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 半定量RT-PCR检测结果 BMP-2、6基因在正常肝脏组织中的表达水平明显低于肝癌组织,差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表1, 图1)。

半定量RT-PCR显示, BMP-2 mRNA表达与病例的年龄、病理大体和组织学分型及甲胎蛋白无关( $P > 0.05$ ),但在不同的病理分期因素中,III、IV期表达指数为 $0.92431 \pm 0.1234$ ,显著高于I、II期( $0.69355 \pm 0.1925$ ),两者差异有显著统计学意义( $P < 0.05$ )。BMP-6 mRNA表达亦有相似的结果(表2)。

2.2 Western blot检测结果 Western blot检测显示肝癌组织BMP-2、6蛋白表达量明显高于正常肝组织,区域转移(肝门淋巴结、门静脉主干)肝癌及远处转移(肺、骨)肝癌组织BMP-2、6蛋白表达量与无转移肝癌相比有显著差异( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , 表3, 图2)。

## 3 讨论

BMPs是一组能诱导异位软骨和骨形成的具有类似结构的功能蛋白,人们发现其广泛分布于人体多种组织和细胞,参与调节多种细胞的增殖、分化和凋亡的生物学过程,对他的研究一直是干细胞、细胞分化、细胞凋亡、肿瘤发病机制等研究课题的重要内容。由于BMPs在大多数肿瘤中均有高表达而成为目前肿瘤研究领域的新热点。BMPs在多种肿瘤中均有表达异常,以过表达为主,其中尤以BMP-2、3、4、5、6、7的表达更为常见且重要,BMP-2在98%的非小细胞肺癌中过表达<sup>[2]</sup>,Langenfeld *et al*<sup>[3]</sup>研究发现BMP-2在人类非小细胞肺癌中异常高表达,在肺良性肿瘤及正常肺组织中无表达,BMP-2在前列腺癌、大肠癌、黑色素瘤及骨髓瘤及头颈部肿瘤中均过表达<sup>[4-7]</sup>;BMP-6在骨肉瘤、结肠癌、前列腺癌、乳腺癌细胞中高表达<sup>[8-10]</sup>,但BMP-2、6在肝癌的表达及其与肝癌的发生发展

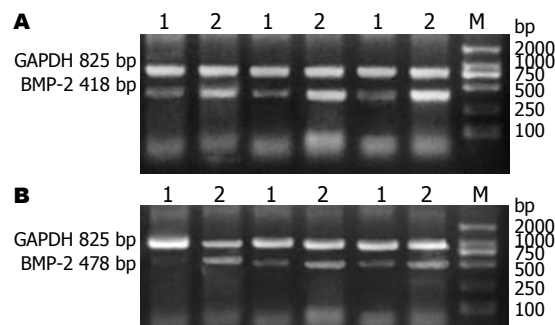


图 1 肝癌及正常组织中的BMP-2及BMP-6基因的表达。A: BMP-2; B: BMP-6; 1: 正常肝组织; 2: 肝癌组织; M: DNA marker。

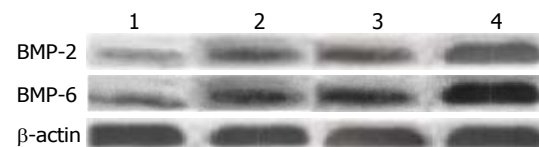


图 2 BMP-2、6蛋白表达与肝癌病理学因素间的关系。1-4: 对应正常肝组织、无转移、区域转移、远处转移肝癌BMP-2、6蛋白表达结果; 最下条带为相应标本的 $\beta$ -actin内参照。

和病理的关系未见报道。

细胞迁移是器官形成和肿瘤发生的生物学基础。在肿瘤的侵袭、转移中, BMPs扮演了十分重要的角色, 众多的研究一致显示BMPs可以显著增加细胞的迁移和侵袭性。Busch *et al*<sup>[11]</sup>发现BMP-2可以增加黑素瘤B16-F1细胞的侵袭性。Darby *et al*<sup>[12]</sup>报道BMP-6对前列腺癌PC3M和DU145细胞的增殖无明显增强作用, 但显著增加了细胞的迁移和侵袭性, 同时也观察到BMP-6可以诱导金属蛋白酶MMP-1和MMP-9 mRNA以及MAPK(促分裂原活化蛋白激酶)磷酸化水平的升高。Feeley *et al*<sup>[13]</sup>报道BMP-2的天然拮抗剂noggin可以抑制BMP-2介导的前列腺癌侵袭生长。

本组资料结果显示, 肝癌BMP-2、6 mRNA相对表达显著高于正常肝脏组织, 提示在肝癌的发生发展中有一定的促进肿瘤生成的作用, 肝癌中BMP-2、6 mRNA的表达与年龄、肿瘤的病理分型无关, 而与肿瘤的分期明显相关。蛋白印迹检测显示随着肝癌转移程度的增加, BMP-2、6蛋白表达明显上调, 提示BMP-2、6作为肿瘤转移促进基因在肝癌的浸润和转移中起着重要的作用, 这与BMP-2、6在其他肿瘤浸润和转移中的表现一致。肝癌的发生发展是一个多基因、多因子作用的过程, BMP-2、6可能参与肝癌的发生和发展, 与区域转移和远处转移可能更有密切关系, 继续深入研究将可能对肝

表 2 BMP-2、6 mRNA表达与肝癌病理学因素间的关系 (mean ± SD)

病理学因素	n	BMP-2	P值	BMP-6	P值
年龄					
>60岁	13	0.8222 ± 0.2002	>0.05	0.7221 ± 0.1343	>0.05
<60岁	17	0.8401 ± 0.1193		0.6888 ± 0.2034	
病理分期					
I、II期	12	0.69355 ± 0.1925	<0.05	0.6043 ± 0.1234	<0.05
III、IV期	18	0.92431 ± 0.1234		0.8354 ± 0.1423	
大体病理分型					
巨块型	23	0.8187 ± 0.1593	>0.05	0.7281 ± 0.1009	>0.05
结节型	7	0.8443 ± 0.1003		0.7081 ± 0.1876	
组织病理分型					
肝细胞癌	21	0.8111 ± 0.1387	>0.05	0.7312 ± 0.1299	>0.05
胆管细胞癌	9	0.8333 ± 0.2093		0.7009 ± 0.1987	
AFP					
阴性	7	0.8265 ± 0.1139	>0.05	0.6998 ± 0.1658	>0.05
阳性	23	0.8351 ± 0.1983		0.7265 ± 0.1876	

表 3 BMP-2、6蛋白表达与肝癌病理学因素间的关系 (mean ± SD)

分组		BMP-2	BMP-6
正常肝组织	30	0.3452 ± 0.2123	0.2354 ± 0.1393
无转移肝癌	18	0.6244 ± 0.3087	0.5678 ± 0.2493
区域转移肝癌	6	0.8044 ± 0.2855 <sup>a</sup>	0.7898 ± 0.2556 <sup>a</sup>
远处转移肝癌	6	0.9854 ± 0.2888 <sup>b</sup>	0.9076 ± 0.1276 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 无转移肝癌.

癌的早期诊断和评估浸润和转移风险有一定的临床指导意义.

4 参考文献

1 Sobin LH, Fleming ID. TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 1997; 80: 1803-1804

2 Langenfeld EM, Bojnowski J, Perone J, Langenfeld J. Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas. *Ann Thorac Surg* 2005; 80: 1028-1032

3 Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P, Langenfeld J. The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1445-1454

4 Rothhammer T, Poser I, Soncin F, Bataille F, Moser M, Bosserhoff AK. Bone morphogenetic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. *Cancer Res* 2005; 65: 448-456

5 Beck SE, Jung BH, Fiorino A, Gomez J, Rosario ED, Cabrera BL, Huang SC, Chow JY, Carethers

JM. Bone morphogenetic protein signaling and growth suppression in colon cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G135-G145

6 Yang S, Pham LK, Liao CP, Frenkel B, Reddi AH, Roy-Burman P. A novel bone morphogenetic protein signaling in heterotypic cell interactions in prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 198-205

7 Sotobori T, Ueda T, Myoui A, Yoshioka K, Nakasaki M, Yoshikawa H, Itoh K. Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic migration of murine osteoblastic and osteosarcoma cells by enhancing incorporation of integrin beta1 into lipid rafts. *Exp Cell Res* 2006; 312: 3927-3938

8 Bobinac D, Marić I, Zorčić S, Spanjol J, Dordević G, Mustać E, Fuckar Z. Expression of bone morphogenetic proteins in human metastatic prostate and breast cancer. *Croat Med J* 2005; 46: 389-396

9 Dai J, Keller J, Zhang J, Lu Y, Yao Z, Keller ET. Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism. *Cancer Res* 2005; 65: 8274-8785

10 Lee J, Son MJ, Woolard K, Donin NM, Li A, Cheng CH, Kotliarova S, Kotliarov Y, Walling J, Ahn S, Kim M, Totonchy M, Cusack T, Ene C, Ma H, Su Q, Zenklusen JC, Zhang W, Maric D, Fine HA. Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. *Cancer Cell* 2008; 13: 69-80

11 Busch C, Drews U, Eisele SR, Garbe C, Oppitz M. Noggin blocks invasive growth of murine B16-F1 melanoma cells in the optic cup of the chick embryo. *Int J Cancer* 2008; 122: 526-533

12 Darby S, Cross SS, Brown NJ, Hamdy FC, Robson CN. BMP-6 over-expression in prostate cancer is associated with increased Id-1 protein and a more invasive phenotype. *J Pathol* 2008; 214: 394-404

13 Feeley BT, Krenek L, Liu N, Hsu WK, Gamradt SC, Schwarz EM, Huard J, Lieberman JR. Overexpression of noggin inhibits BMP-mediated growth of osteolytic prostate cancer lesions. *Bone* 2006; 38: 154-166