

骨形态发生蛋白 7 在前列腺癌中的表达 *

邝世航¹ 冯建华¹ 徐斯君² 李小华¹ 邹贤辉¹ 万磊¹

(1 深圳市龙岗中心医院泌尿外科 广东 深圳 518116 2 龙岗中心医院银珠岭社康中心 广东 深圳 518116)

摘要 目的 探讨骨形态发生蛋白(BMP-7)在前列腺癌组织中的表达及其与临床分期之间的关系。方法 应用免疫印迹法检测 30 例前列腺癌患者及 30 例前列腺良性增生患者前列腺组织中 BMP-7 的表达情况。结果 前列腺癌组织中 BMP-7 的表达显著高于前列腺良性增生组织,且 BMP-7 的表达随前列腺癌的临床分期、Gleason 分级增高而增加。结论 BMP-7 在前列腺癌中的表达明显增高,其表达量与临床分期相关,前列腺癌组织中 BMP-7 的表达增高提示预后不佳。

关键词 前列腺癌;骨转移;骨形态发生蛋白;转化生长因子 β

中图分类号 R737.25 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)24-4679-03

The Expression of Bone Morphogenetic Protein 7 in Human Prostate Cancer*

KUANG Shi-hang¹, FENG Jian-hua¹, XU Si-jun², LI Xiao-hua¹, ZOU Xian-hui¹, WAN Lei¹

(1 Department of urology, Longgang Central Hospital, Shenzhen, 518116, China;

2 Yinzhuiling community health service center, Longgang Central Hospital, Shenzhen, 518116, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the relationship between the clinical stages and the expression of BMP-7 in prostate cancer (PCa) tissue. **Methods:** Western blot was used to detect the expression of BMP-7 in 30 PCa tissues and 30 benign prostatic hyperplasia (BPH) tissues. **Results:** Expression of BMP-7 was significantly higher in the PCa group than in the BPH group. The expression of BMP-7 was increasing in PCa group, especially with increasing clinic stage and Gleason score. **Conclusion:** BMP-7 expression in prostate carcinoma was significantly higher, it related with clinical staging of prostate cancer, the increased expression of BMP-7 prompts a poor prognosis.

Key words: Prostate cancer; Bone metastasis; Bone morphogenetic proteins; Transforming growth factor- β

Chinese Library Classification: R737.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)24-4679-03

前言

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是发达国家男性最常见的恶性肿瘤,占男性癌症死因的第二位^[1-3]。近年来随着人口老龄化及生活方式的西化,我国前列腺癌的发病从 2.41/10 万男性人口,逐渐增加(上海 3.7/10 万男性人口,北京 4.0/10 万男性人口)^[4]。前列腺癌进展过程中最易侵犯骨,前列腺癌死亡的病人尸检时,有 90% 的病人发现有骨转移。骨转移严重影响前列腺癌病人的生活质量,主要表现包括:骨痛、行动障碍、病理性骨折及高钙血症等^[5]。

骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMPs)是转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)亚家族成员,现已发现 40 个以上 BMP 家族成员^[6]。BMP 与其受体结合后可以介导新骨形成,随着研究的深入,研究者发现 BMP 家族除了调控成骨功能外还可以调控细胞的生长和分化^[7]。BMP-7 为 BMP 家族成员之一,在胚胎发育早期,主要在泌尿生殖系统中表达^[8],而成年后在前列腺上皮高表达。研究发现 BMP-7 的表达受雄激素调且与前列腺的形态发生有关^[9]。BMP-7 与 PCa 的相关性业已见文献报道^[10],而 BMP-7 的表达与 PCa 的临床分期、病理分级之间的关系尚不明确,本研究将

对这一方面进行探讨。

1 资料和方法

1.1 资料收集

2004 年 1 月~2011 年 6 月龙岗中心医院术后经 HE 染色符合病理诊断的前列腺癌组织石蜡包埋切片共 30 例,前列腺良性增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)组织 30 例,被电切烫伤坏死的较小标本已被排除。由病理科同一个有经验的医师对前列腺癌组织切片进行病理分级(Gleason 评分, $G \leq 6$ 分 37 例, $G = 7$, 18 例, $G \geq 8$, 32 例)。结合临床 TNM 分期(AJCC, 2002 年)进行分组:Ⅰ期(T1aN0M0)+Ⅱ期(T1bN0M0, T1cN0M0, T2N0M0) 8 例;Ⅲ期(T3N0M0) 9 例;Ⅳ期(T4N0M0, TxN1M0, TxN0M1) 14 例。根据全身核素骨扫描(ECT)或 SPECT-PET/CT 检查分为:前列腺癌无骨转移 23 例,前列腺癌伴骨转移 7 例。PCa 病例的 Gleason 分级评分为: ≤ 5 分者 13 例, $6 \sim 8$ 分者 10 例, ≥ 9 分者 7 例。

1.2 主要试剂和仪器

Odyssey 双色红外成像系统(美国 LICOR 公司),重组人 BMP-7 单克隆抗体(一抗)Anti-BMP7 antibody(购自美国 abcam 公司),IRDye 800CW Goat anti-mouse IgG (H+L)二抗(购

* 基金项目 深圳市卫生局课题资助项目(YS2010129)

作者简介 邝世航,电话:13823662142, E-mail: kuangshihang@21cn.com

(收稿日期 2012-01-05 接受日期 2012-01-30)

自美国 licor 公司)。RIPA 缓冲液 (购自美国 Thermo fisher scientific 公司 ,89900) ,Halt 蛋白酶抑制剂混合物 (购自 Thermo fisher scientific ,78430)。

1.3 BMP-7 检测

取手术切除标本 30mg 左右 , 等量加入 400μ l RIPA 缓冲液以及 4μ l Halt 蛋白酶抑制剂混合物 ,用匀浆机进行匀浆 ,冰水浴中超声粉碎细胞 ,4℃ 静置 30min 后 13 000 r / min 离心 30min ,上清即为细胞总蛋白 ;用 BCA 法以牛血清蛋白作标准品进行蛋白定量检测 ,取含有 40μ g 总蛋白的组织裂解产物进行 10% SDS-PAGE 电泳 ,电转移到硝基纤维膜(NC 膜)上 ,5% 脱脂牛奶封闭液封闭 2h ,经 TBS-T 洗涤 3 次 ,每次 5 min ,加入一抗 Anti-BMP7 鼠抗人单克隆抗体(1 :1 000 稀释) ,4℃ 孵育过夜 ,TBS-T 彻底冲洗 3 次 ,每次 5min ,加入二抗 IRDye 800CW Goat anti-mouse IgG (1 :10000 稀释) ,孵育 1h ,用 Odyssey 成像系统观察结果。

1.4 结果判定

Western blot 实验结果通过 Odyssey 成像系统分析仪采集 ,测定特异性条带的荧光值(Intensity) ,将正常前列腺组织和 PCa 组织中表达进行对比 ,统计分析两者的差异。

1.5 统计学分析

使用 SPSS 13.0 统计软件包进行数据处理 ,比较前列腺组织和 PCa 组织在不同临床分期和病理分级间 BMP-7 蛋白表达的情况 ,所得数据以均数± 标准误来表示 ,采用计量资料 t 检验。

2 结果

2.1 BMP-7 蛋白表达与 PCa 病理分级和临床分期的关系

BMP-7 在 Gleason 评分 6~8 分(Intensity 值为 25.71± 3.4) 和≥ 9 分者 (Intensity 值为 31.63± 2.9) ,与正常前列腺组织 14.22± 2.1)相比 ,差异均有显著性(P 均 <0.01) ,并且与 Gleason 评分≤ 5 分者(13.94± 1.8)相比差异亦有显著性(分别为 P<0.05 ,P<0.01)。T1-T2 期和 T3-T4 期的 BMP-7 在 PCa 中的表达 (Intensity 值分别为 18.76± 1.8 ,32.62 ± 3.2) ,与正常前列腺组织相比 ,差异均有显著性(分别 P<0.05 ,P<0.01) ,而且 T3-T4 期与 T1-T2 期相比 ,差异亦有显著性(P<0.05)。BMP-7 在有骨转移 PCa 中的表达明显高于无骨转移 PCa 中的表达 ,两者间的差异具有显著性。

Pca 组荧光值为 14.22± 2.1 ,显著大于 BPH 组(P<0.01) ; Gleason 分级≥ 9 组的荧光值为 31.63± 2.9 显著 (P<0.01) 大于≤ 5 组 ,6~8 组的荧光值为 25.71± 3.4 显著(P<0.05)大于≤ 5 组(表 1)。

表 1 BMP-7 在正常前列腺和 PCa 组织中的表达
Table 1 BMP-7 expression in normal prostate and PCa tissues

Group	n	BMP-7
BPH	5	14.22± 2.1
Pca	52	30.22± 2.8 **
Gleason grade		
≤ 5	25	13.94± 1.8
6~8	21	25.71± 3.4 **△
≥ 9	6	31.63± 2.9△△
stage		
T1-T2	30	18.76± 1.8 *
T3-T4	22	32.62 ± 3.2 **

注 :与正常前列腺组织相比 ,* P<0.05 ,** P<0.01 ;与 Gleason 评分≤ 5 相比 ,△ P<0.05 ,△△ P<0.01。

Note: Via normal prostate ,* P<0.05 ,** P<0.01 ,via Gleason≤ 5 ,△ P<0.05 ,△△ P<0.01.

2.2 BMP-7 的蛋白表达与 PCa 骨转移的关系

转移组的荧光值为 33.23± 3.4 显著大于 BPH 组 14.22±

2.1(P<0.01) ,BPH 组和非转移组之间无明显差异(P>0.05)(表 2)。

表 2 BMP-7 在 PCa 组织中的表达与骨转移的关系
Table 2 BMP-7 expression in PCa tissues and the relationship with bone metastasis

Group	n	BMP-7
BPH	5	14.22± 2.1
Non-metastasis	38	19.23± 2.9
Metastasis	14	33.23± 3.4 **

注 :与非转移 PCa 相比 ,** P<0.01。

Note: Via non metastatic PCa ,** P<0.01.

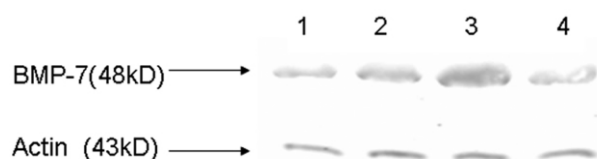


图1 BMP-7在不同 Gleason 评分 PCa 中的表达 Western 印迹电泳图
泳道 :1. Gleason 评分 ≤ 5 前列腺组织 2. Gleason 评分 6~8 分前列腺组织 3. Gleason 评分 ≥ 9 分前列腺组织 4. 正常前列腺组织

Fig. 1 BMP-7 expression in different Gleason score PCa



图2 BMP-7在不同临床分期 PCa 前列腺组织的表达免疫印迹图
泳道 :1 正常前列腺组织 2 T1-T2 期 PCa 前列腺组织 3 T3-T4 期 PCa 前列腺组织

Fig. 2 BMP-7 expression in Different clinical stages of PCa



图3 BMP-7在有、无骨转移 PCa 前列腺组织的表达免疫印迹图
泳道 :1 无骨转移 PCa 前列腺组织 2 有骨转移 PCa 前列腺组织

Fig. 3 BMP-7 expression in PCa with or without bone metastasis

3 讨论

BMP 蛋白家族除了成骨功能之外, 还有调节细胞增殖和分化的功能^[7]。与家族其他成员不同, BMP-7 一直没有在正常骨组织中检测到相应表达^[11]。BMP-7 与前列腺形态发生有关, 在前列腺上皮高表达, 其表达水平受雄激素调控^[12]。Masuda 等^[13]比较了正常骨组织和前列腺癌骨转移灶组织后发现, BMP-7 在正常骨组织中无表达, 而 PCa 转移灶中表达显著增高, BMP-7 和 PCa 的骨转移密切相关。骨转移灶中高表达的 BMP-7 来源于前列腺。还有研究者报道, BMP-7 可以增强癌细胞的转移能力^[14]。

BMP-7 在 PCa 骨转移的调控中可能发挥重要作用, 这一效应与上皮间充质转变(Epithelial to mesenchymal transition, EMT)有关。EMT 是一个胚胎发育中组织塑型的过程^[15]。在此期间, 细胞丧失其上皮特性(包括极性和特定细胞间接触), 获得转移能力, 允许其离开原集落转移到邻近或远处组织。研究认为 EMT 与肿瘤的侵袭和转移能力密切相关^[16], 在肿瘤转移的过程中 EMT 被认为是一个肿瘤转移的必要的早期事件。而 TGF- β 信号通路是调控 EMT 的重要因素^[16], BMP-7 作为 TGF- β 亚家族的成员在发育中也对 EMT 起到调控作用。

本研究以病理确诊的手术切除标本为研究对象, 分析

BMP-7 蛋白表达与 PCa 病理分级、临床分期的关系, 结果显示: 与前列腺良性增生组织比, PCa 表达 BMP-7 显著增高($P < 0.01$); 与 Gleason 分级 ≤ 5 者相比, 分级 6~8 者与大于等于 9 者的 BMP-7 表达均显著增高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 在临床分期比较中, BMP-7 表达随临床分期的升高而增高。在前列腺良性增生组、PCa 非转移和 PCa 转移组的研究中发现, PCa 转移组的 BMP-7 表达显著高于 PCa 非转移组($P < 0.01$), 而前列腺良性增生组和 PCa 非转移组两者之间无显著性差异($P > 0.05$)。以上结果提示, BMP-7 与前列腺癌的恶性度明显相关, BMP-7 表达随着 PCa 分期、分级的恶化而增高。BMP-7 是提示 PCa 预后不良的一个重要指标。对 BMP-7 的深入研究, 可能为 PCa 的治疗提供新的思路。

参考文献(References)

- [1] Landis SH, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics, 1999. CA [J], A Cancer Journal for Clinicians, 1999, 49(1): 8-31
- [2] 杨翌, 王毅, 秦国庆, 等. 前列腺癌内分泌治疗现状[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(2): 371-374
Yang Yi, Wang Yi, Qin Guo-qing, et al. The status of endocrine therapy on prostate cancer [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(2): 371-374
- [3] 张煜. β_2 微球蛋白在内分泌治疗前列腺癌根治术后患者体内表达与预后关系研究[J]. 肿瘤药学, 2011, 1(5): 444-446
Zhang Yu. Analysis of relationship between the expression of β_2 -Microglobulin in hormonal therapy treated patients with prostate cancer after the radical prostatectomy and prognosis [J]. Anti-tumor Pharmacy, 2011, 1(5): 444-446
- [4] 孙颖浩. 我国前列腺癌的研究现状[J]. 中华泌尿外科杂志, 2004, (2): 77-80
Sun Ying-hao. The current research status of prostate cancer in our country [J]. Chinese Journal of Urology, 2004, (2): 77-80
- [5] Dai J, Keller J, Zhang J, et al. Bone Morphogenetic Protein-6 Promotes Osteoblastic Prostate Cancer Bone Metastases through a Dual Mechanism [J]. Cancer Research, 2005, 65(18): 8274-8285
- [6] Corradini E, Babitt JL, Lin HY. The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors [J]. Cytokine Growth Factor Reviews, 2009, 20(5): 389-398
- [7] Bailey JM, Singh PK, Hollingsworth MA. Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenetic proteins [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2007, 102(4): 829-839
- [8] Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, et al. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning [J]. Genes & Development, 1995, 9(22): 2808-2820
- [9] Thomas R, Anderson WA, Raman V, et al. Androgen-dependent gene expression of bone morphogenetic protein 7 in mouse prostate [J]. Prostate, 1998, 37(4): 236-245
- [10] Morrissey C, Brown LG, Pitts TE, et al. Bone morphogenetic protein 7 is expressed in prostate cancer metastases and its effects on prostate tumor cells depend on cell phenotype and the tumor microenvironment [J]. Neoplasia, 2010, 12(2): 192-205
- [11] Masuda H, Fukabori Y, Nakano K, et al. Expression of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) in human prostate [J]. The Prostate, 2004, 59(1): 101-106

(下转第 4653 页)

- [3] 唐科伟,魏强.附睾结节性疾病[J].临床泌尿外科杂志,2005,20(10):645
Tang Ke-wei, Wei Qiang. Epididymal nodule disease [J]. Journal of Clinical Urology, 2005,20(10):645
- [4] Cristiana Kahl, Joshua A Cleland. Visual analogue scale, numeric pain rating scale and the mcgill pain questionnaire:an overview of psychometric properties[J]. Physical Therapy Review, 2005,10:123-128
- [5] 杨为民,曾令启.附睾肿块的诊断和处理[J].中华男科学,2001,7(3):174-175
Yang Wei-min, Zeng Ling-qi. Diagnosis and Management of Epididymal Mass[J]. National Journal of Andrology, 2001,7(3):174-175
- [6] 张宗梁.附睾的免疫学研究[J].科学通报,2005,50(18):1936
Zhang Zong-liang. The immunological study of epididymis [J]. Chinese Science Bulletin, 2005,50(18):1936
- [7] 李飞平.附睾肿块 150 例临床分析[J].中国男科学杂志,1998,12(4):233-234
Li Fei-ping. Clinical analysis of 150 cases of epididymal mass [J]. Chinese Journal of Andrology, 1998,12(4):233-234
- [8] 申广浩,佟世超. 恒磁场对伤口愈合的影响[J].现代生物医学进展,2010,10(14):2635-2640
Shen Guang-hao, Tong Shi-chao. Effects of Constant Magnetic Fields on Wound Healing [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010,10(14):2635-2640
- [9] Massot O, Grimaldi B, Bailly JM, et al. Magnetic field desensitizes 5-HT (1B) receptor in brain: pharmacological and functional studies [J]. Brain Res, 2000,858(1):143-150
- [10] Marko S, Markov. What need to be known about the therapy with static magnetic fields[J]. Environmentalist, 2009,29(2):169-176
- [11] Kuipers NT, Sauder CL, Ray CA. Influence of static magnetic fields on pain perception and sympathetic nerve activity in humans[J]. Journal of Applied Physiology, 2006,102:1410-1415
- [12] 赵不非,赵锐.磁场对大鼠细胞 SOD 活性及心肌 MDA 含量的影响[J].中华理疗杂志,1999,22(6):356
Zhao Bu-fei, Zhao Rui. Magnetic fields on rat SOD cell activity and MDA content in myocardium of shadow[J]. Chinese Journal of physical therapy, 1999,22(6):356
- [13] 杨修益,肖粤.恒定磁场对小鼠一氧化氮和一氧化氮合成酶及氧自由基相关成分的影响[J].中华理疗杂志,1999,22(6):357
Yang Xiu-yi, Xiao Yue. Constant magnetic field on mice of nitric oxide and nitric oxide synthase and oxygen free radicals related components influence[J]. Chinese Journal of physical therapy, 1999,22(6):357
- [14] 付妍,李小林.磁场对小鼠肝组织过氧化物酶活性的影响[J].中华理疗杂志,2000,23(3):170
Fu Yan, Li Xiao-lin. Magnetic field on mice liver peroxidase activity in rats[J]. Chinese Journal of physical therapy, 2000,23(3):170
- [15] 周万松.磁场的治疗作用[J].人民军医,2002,45(11):671-673
Zhou Wan-song. Effect of magnetic field treatment [J]. People's military medical, 2002,45(11):671-673
- [16] Xiao-yun zhang. Influence of alternating magnetic field on neuroendocrine and its analgesic effect[J]. Chinese journal of clinical rehabilitation, 2004,8(5):994-995
- [17] 姬文晋,黄慧民.恒定磁场对大肠杆菌生长繁殖影响[J].现代生物医学进展,2009,9(5):856-859
Ji Wen-jin, Huang Hui-min. Effects of Static Magnetic Fields on the Growth and Propagation of Escherichia coli [J].Progress in Modern Biomedicine, 2009,9(5):856-859
- [18] 杨玉山,董发勤,冯建军.恒定强磁场对大鼠血液流变特性的影响[J].中国生物医学工程学报,2006,25(4):503-506
Yang Yu-shan, Dong Fa-qin, Feng Jian-jun. Effect of constant high magnetic field on hemorheology in rats [J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2006,25(4):503-506
- [19] 李平.恒磁有氧循环经无创治疗周围性面瘫临床研究[J].现代生物医学进展,2008,8(3):501-502
Li Ping. Using Constant Magnetic Field and Aerobic Non-injured Method to Treat Peripheral Facial Paralysis along Meridians [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008,8(3):501-502
- [20] 王学军,罗二平.恒磁场对临床术后伤口愈合的影响[J].第四军医大学学报,2006,27(8):754
Wang Xue-jun, Luo Er-ping. Clinical effect of constant magnetic field on postoperative wound healing [J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 2006,27(8):754

(上接第 4681 页)

- [12] Morrissey C, Brown LG, Pitts TE, et al. Bone morphogenetic protein 7 is expressed in prostate cancer metastases and its effects on prostate tumor cells depend on cell phenotype and the tumor microenvironment[J]. Neoplasia, 2010,12(2):192-205
- [13] Masuda H, Fukabori Y, Nakano K, et al. Increased expression of bone morphogenetic protein-7 in bone metastatic prostate cancer[J]. The Prostate, 2003,54(4):268-274
- [14] 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]. Clinical and Experimental Metastasis, 2012,29(4):327-338
- [15] Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1[J]. Nat Cell Biol, 2008,10(5):593-601
- [16] Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition[J]. Cell Res, 2009,19(2):156-172