

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.01.006

文章编号: 1005-8982 (2019) 01-0035-05

肝癌中骨形态发生蛋白 7 表达 及其与生存相关性分析 *

李锴, 宋燕州, 李伟

(江苏省连云港市第一人民医院 普通外科, 江苏 连云港 222000)

摘要: **目的** 研究肝癌组织中骨形态发生蛋白 7 (BMP-7) 表达及其与患者预后关系。**方法** 免疫组织化学及实时逆转录聚合酶链反应 (real-time RT-PCR) 方法分析肝癌组织、癌旁组织及非癌肝脏组织中 BMP-7 表达, 选取 2010 年 1 月—2013 年 12 月江苏省连云港市第一人民医院 85 例肝癌患者的癌组织及 20 例癌旁组织标本, 以肝血管瘤及肝脏外伤患者 14 例为良性对照。研究 BMP-7 与肝癌患者临床病理特征之间关系及其不同表达患者术后生存情况。**结果** BMP-7 在肝癌组织、癌旁组织及非癌肝脏组织中表达的阳性率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), BMP-7 的表达与患者肿瘤大小、肿瘤组织分化程度相关, 其阳性表达的肝癌患者预后较阴性表达者差。**结论** BMP-7 与肝癌的发生、发展相关, 可以作为预测患者预后情况的重要指标。

关键词: 肝肿瘤; 骨形态发生蛋白 7; 存活率分析

中图分类号: 735.7

文献标识码: A

Expression of BMP-7 in hepatocellular carcinoma and its relationship with clinical prognosis*

Kai Li, Yan-zhou Song, Wei Li

(Department of General Surgery, the First People's Hospital of Lianyungang,
Lianyungang, Jiangsu 222000, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of BMP-7 in hepatocellular carcinoma (HCC) and its relationship with clinical prognosis. **Methods** A total of 85 patients with HCC admitted into our hospital from January 2010 to December 2013 were enrolled in this study. Twenty cases of pure -carcinoma tissues and 14 cases of hepatic hemangioma or hepatic injury tissues were also collected. Expression of BMP-7 in HCC tissues ($n = 85$), adjacent tissues ($n = 20$), and non-cancerous liver tissues ($n = 14$) was analyzed by immunohistochemistry and RT-PCR. Relationship between BMP-7 and clinicopathological features was investigated. **Results** The positive expression rate of BMP-7 in hepatocellular carcinoma, adjacent tissues and non-cancerous liver tissue was significantly different. The expression of BMP-7 was closely correlated to the tumor size and differentiation degree of tumor tissue. Patients with positive expression of BMP-7 experienced poor outcome. **Conclusion** BMP-7 may play an important role in the carcinogenesis and progression of HCC, which may be an important prognostic indicator.

Keywords: liver neoplasms; bone morphogenetic protein 7; survival analysis

世界范围内的肝细胞肝癌发生率逐年增加, 已经成为肿瘤死亡的第 3 位^[1]。大多数肝癌患者的预后非

常差, 每年新诊断患者数接近每年死亡的数量^[2]。这一可怕局面源于缺乏早期诊断、大多数可发展为肝癌的

收稿日期: 2018-05-05

* 基金项目: 江苏省连云港市科学技术局社会发展计划项目 (No: SH1408)

[通信作者] 李伟, E-mail: power8446@163.com

肝硬化恶化以及肝癌化疗的高耐药性^[3]。转化生长因子 (transforming growth factor, TGF) 在肝纤维化及肝硬化中起到重要作用, 作为超家族成员中最大的一族, 骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 具有抗纤维化作用, 在细胞的增殖、分化及凋亡中扮演着重要的角色。既往已经在体外经过分子、细胞水平验证 BMP-7 在肝癌相关细胞中发挥促生成作用^[4-5], 但 BMP-7 在肝癌组织中的表达及其与患者预后的关系尚未见诸报导, 本研究旨在揭示 BMP-7 在不同肝脏组织中的表达, 并探究其与肝癌患者预后的关系, 为进一步研究肝癌发生、发展的分子生物学机制打下基础。

1 资料与方法

1.1 试剂与仪器

兔抗人多克隆 BMP-7 抗体 (美国 Proteintech 公司), DAB 显色试剂盒、磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS)、即用型免疫组织化学 EliVision plus 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司), SYBR PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 生物工程公司)。UV 分光光度计 (上海精密仪器仪表有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验资料 于连云港市第一人民医院生物标本库中取得 2010 年 1 月—2013 年 12 月间手术切除的肝癌组织 85 例及 20 例癌旁组织标本 (距肿瘤边缘 1 cm), 以肝血管瘤及肝脏外伤患者 14 例手术标本作为良性对照。上述组织术后均经病理检测证实其诊断。

1.2.2 免疫组织化学检测 按说明书基本操作流程操作, BMP-7 一抗加入 PBS 稀释浓度为 1 : 200, BMP-7 二抗用 PBS 稀释为 1 : 6。

1.2.3 肝脏组织总 RNA 的提取、RNA 逆转录、实时逆转录聚合酶链反应 依据说明书逐步提取肝脏组织总 RNA, 通过 UV 分光光度计检测在 260 和 280 nm 波长处的吸光度后置入 -80℃ 冰箱冷冻保存。根据逆转录试剂盒说明书, 将 1 μg RNA 逆转录为 cDNA (20 μl 逆转录反应体系)。实时逆转录聚合酶链反应 (real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, real-time RT-PCR), 以 β-actin 作为内参, 25 μl 反应体系 (包括逆转录产物 1 μl, 2×PCR 反应 mix 12.5 μl, 正向引物 1 μl, 反向引物 1 μl, dH₂O 9.5 μl), 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火及延伸 30 s, 共持续 35 个循环。

1.3 肝癌组织、癌旁组织及非癌肝脏组织 BMP-7 免疫组织化学检测

对应生物标本库中所取患者信息, 选取相应肝癌组织石蜡标本、癌旁组织石蜡标本及非癌肝脏组织石蜡标本, 上述组织术后均经病理检测证实其诊断。对肝癌组织、癌旁组织及非癌肝脏组织 BMP-7 进行免疫组织化学检测, 石蜡切片脱蜡、水化、微波抗原修复, 3% 过氧化氢除去内源性过氧化物酶, BMP-7 免疫组织化学检测按试剂盒说明书进行, DAB 染色, 苏木素复染, 梯度乙醇—二甲苯脱水, 封片。显微镜下观察, 胞核内出现棕黄色颗粒者为免疫组织化学染色 BMP-7 阳性细胞。

1.4 结果判定标准

按细胞胞核内出现棕黄色颗粒为阳性信号, 每张切片光学显微镜下查看 5 个随机的视野 (400 倍), 再用随机的方法选择 200 个细胞, 计算 BMP-7 表现阳性的百分比, 取均值; BMP-7 阳性细胞 ≥ 10% 判定为组织 BMP-7 阳性。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件, 计数资料采用例表示, 采用 χ^2 检验, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-*q* 检验, 应用 Kaplan-Meier 生存法统计绘制 BMP-7 阳性表达与阴性表达患者生存曲线, Logrank 检验比较 BMP-7 表达对肝癌患者远期生存率的影响, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMP-7 在肝癌组织、癌旁组织、非癌肝脏组织中的表达

肝癌组织中 BMP-7 阳性率为 77.6%, 癌旁组织中 BMP-7 阳性率为 55.0%, 非癌肝脏组织 BMP-7 阳性率为 35.7%, BMP-7 在 3 种组织中表达的阳性率比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=12.035$, $P=0.002$) (见表 1)。肝癌组织中 BMP-7 表达高于癌旁组织及非癌肝脏组织, 且阳性率从非癌肝脏组织、癌旁组织到肝癌组织呈现递减现象。

肝癌组织、癌旁组织及非癌肝脏组织 BMP-7 的表达见图 1。肝癌组织阳性表达细胞数为 (173.6 ± 20.4) 个, 癌旁组织 (65.4 ± 36.9), 非癌肝脏组织 (29.4 ± 7.8) 个, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=365.016$, $P=0.000$), 各组 BMP-7 表达的水平有差

表 1 BMP-7 在肝癌组织、癌旁组织及非癌肝脏组织中的表达情况 例 (%)

组别	n	BMP-7 阳性	BMP-7 阴性
肝癌组织	85	66 (77.6)	19 (22.4)
癌旁组织	20	11 (55.0)	9 (45.0)
非癌肝脏组织	14	5 (35.7)	9 (64.3)

异 ; 与肝癌组织比较, 癌旁组织及非癌肝脏组织中可见 BMP-7 阳性表达细胞数较少, 进一步两两比较显示, 与癌旁组织比较, 肝癌组织中 BMP-7 阳性表

达细胞数增多 ($q=26.714, P=0.042$); 与非癌肝脏组织比较, 肝癌组织中 BMP-7 阳性表达细胞数增多 ($q=30.677, P=0.021$)。BMP-7 在肝癌组织、癌旁组织、非癌肝脏组织中的表达分别为 (2.213 ± 0.210)、(1.126 ± 0.182) 及 (0.786 ± 0.319), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=392.607, P=0.000$), 各组 BMP-7 的表达水平有差异 ; 进一步两两比较显示, 肝癌组织中 BMP-7 相对表达量较癌旁组织增高 ($q=3.361, P=0.019$); 肝癌组织中 BMP-7 相对表达量较非癌肝脏组织增高 ($q=2.805, P=0.032$) (见图 2)。

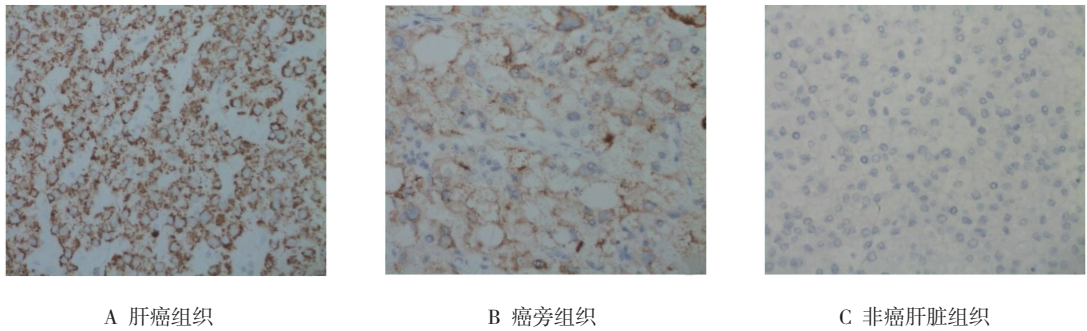


图 1 BMP-7 在不同组织中的表达 (免疫组织化学法 $\times 400$)

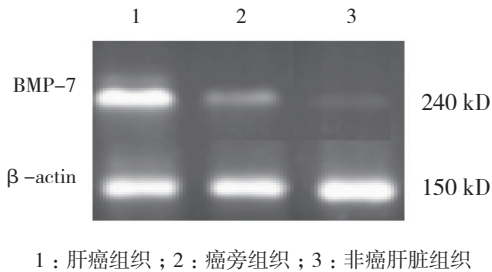
2.2 BMP-7 与肝癌患者临床病理特征的关系

与 BMP-7 阴性组织比较, BMP-7 阳性组织的肿

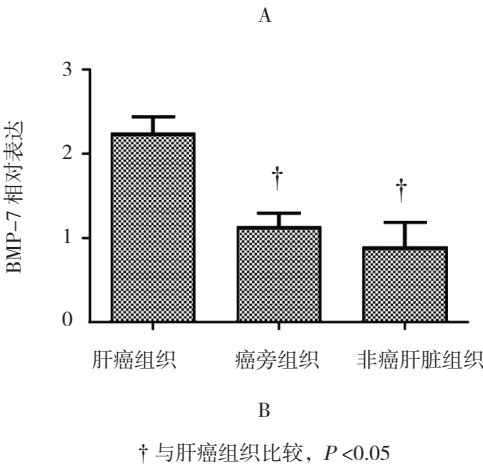
瘤直径、分化程度及 2 年生存率的比例降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 组织分型上, 低、未分化组织 BMP-7 阳性表达较中、高分化组织高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。性别、年龄及术后肿瘤是否复发的 BMP-7 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

2.3 BMP-7 在肝癌的表达与患者预后生存之间的关系

与 BMP-7 阴性表达患者比较, BMP-7 阳性表达患者的总生存率降低 ($\chi^2=8.132, P=0.004$)。见图 3。



1 : 肝癌组织 ; 2 : 癌旁组织 ; 3 : 非癌肝脏组织



† 与肝癌组织比较, $P<0.05$

图 2 BMP-7 在肝癌组织、癌旁组织、非癌肝脏组织中的表达

表 2 BMP-7 表达与肝癌临床病理特征之间的关系

临床病理特征	阴性例数	阳性例数	阳性率 / %	χ^2 值	P 值
性别					
男	11	40	78.4	0.050	0.832
女	8	26	76.5		
年龄					
<50 岁	9	33	78.6	0.040	0.840
≥ 50 岁	10	33	76.7		
肿瘤直径					
>5 cm	7	49	89.1	9.180	0.006
≤ 5 cm	12	17	53.1		

续表 2

临床病理特征	阴性例数	阳性例数	阳性率 / %	χ^2 值	P 值
分化程度					
高分化	13	9	40.9	26.271	0.000
中分化	6	26	81.3 [†]		
低、未分化	0	31	100.0 [‡]		
复发					
是	6	28	82.4	0.720	0.438
否	13	38	74.5		
术后生存					
<24 个月	5	43	89.6	9.050	0.006
≥ 24 个月	14	23	62.2		

注：1) 与高分化比较, $P < 0.05$

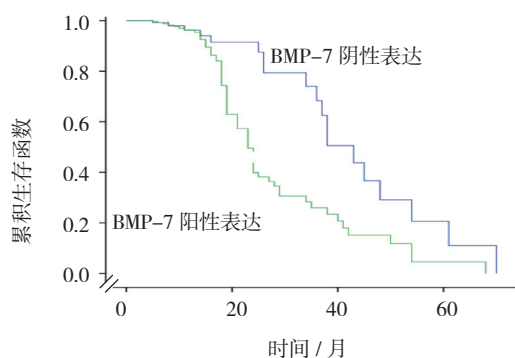


图 3 BMP-7 阳性及阴性表达肝癌患者术后生存曲线图

3 讨论

作为 TGF 家族之一, BMP-7 从人类血小板中第一次分离出来, 同时发现它可以减少创伤的愈合时间^[6], 继而在乳腺癌、胃癌、肾癌、结直肠癌等许多肿瘤组织中均发现高表达的 BMP-7^[7-8]。许多相关研究指出, TGF- β 作为转化生长因子超家族可以通过相关信号通路, 在调控细胞生长、影响细胞发育、控制细胞分化等过程中发挥作用, BMP-7 可以使前炎症细胞因子水平下降; 也可以促进基质金属蛋白酶的生成, 以上等研究进一步表明 BMP-7 可以使细胞的纤维化过程发生逆转。

通过下调前炎症因子及诱导基质金属蛋白酶等进而逆转组织细胞的纤维化^[9]。BMP-7 通过拮抗 TGF- β / Smads 信号通路在肝脏组织细胞的慢性纤维化过程中发挥重要的调节作用^[10-11]。TGF- β 可减弱上皮细胞的分裂增殖, 以上也可以发生在免疫细胞中, 抑制增殖

的过程可以促进上皮间质转化的发生, 进而促进肝脏细胞的可塑性变化、诱导产生肝癌细胞^[12]。BMP-7 可以阻抑 TGF- β , BMP-7 在细胞中表达水平的异常可能抑制肝癌细胞的分裂增殖, 同时减弱肝癌细胞的相关功能。

本研究结果表明, BMP-7 与肝癌的发生、发展关系密切, 其在肝癌组织中的表达远高于癌旁组织、非癌肝脏组织, 阳性表达 BMP-7 的肝癌患者其表达水平与肿瘤大小、分化程度密切相关, 且其预后较阴性表达者差, 需进一步深入的机制研究。抑制 BMP-7 的表达或可改善肝癌患者的术后生存状况, 检测 BMP-7 的表达或可成为肝癌患者预后的预测指标之一。

参 考 文 献:

- [1] GRANDHI M S, KIM A K, RONNEKLEIV-KELLY S M, et al. Hepatocellular carcinoma: from diagnosis to treatment[J]. Surgical Oncology, 2016, 25(2): 74-85.
- [2] I YAMATO, T TAKAYAMA, Y MIDORIKAWA, et al. Postoperative outcomes of patients with hepatocellular carcinoma negative for all virus-related markers[J]. Surgery Today, 2013, 43(8): 865-870.
- [3] YANG M, FANG Z, YAN Z, et al. Transarterial chemoembolisation (TACE) combined with endovascular implantation of an iodine-125 seed strand for the treatment of hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis versus TACE alone: a two-arm, randomised clinical trial[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2014, 140(2): 211-219.
- [4] ZHEIRY M M, EL-HASAN S A, AHWANY E, et al. Serum markers of epithelial mesenchymal transition as predictors of HCV-induced liver fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. Electron Physician, 2015, 7(8): 1626-1637.
- [5] ULRIKE M, ANJA-KATRIN B. BMP activated Smad signaling strongly promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells[J]. Exp Mol Pathol, 2012, 92(1): 74-81.
- [6] HAN D, YBANEZ M D, JOHNSON H S, et al. Dynamic adaptation of liver mitochondria to chronic alcohol feeding in mice: biogenesis, remodeling, and functional alterations[J]. J Biol Chem, 2012, 287(50): 42165-42179.
- [7] REN C M, LI Y, CHEN Q Z, et al. Oridonin inhibits the proliferation of human colon cancer cells by upregulating BMP-7 to activate p38 MAPK[J]. Oncol Rep, 2016, 35(5): 2691-2698.
- [8] 朱振红, 巨卫平, 李伟. BMP-7 在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 徐州医学院学报, 2014, 34(12): 843-846.
- [9] MF AKDOGAN, A AZAK, B HUDDAM, et al. Influence of bone morphogenic protein 7 (BMP-7) on the progression of chronic kidney disease[J]. Journal of Nephrology & Urology Research, 2014, 2: 1-8.
- [10] ZHONG L, WANG X, WANG S, et al. The anti-fibrotic effect of bonemorphogenic protein-7 (BMP-7) on liver fibrosis[J]. Int J

Med Sci, 2013, 10(4): 441-450.

[11] SHU D Y, WOJCIECHOWSKI M C, LOVICU F J, et al. Bone morphogenetic protein-7 suppresses TGF-β2-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: Implications for cataract prevention[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(2): 781-796.

[12] 郑涛, 杨甲梅. 转化生长因子 β 信号通路在肝癌患者中的作用机制 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2016, 22(6): 425-428.

(王荣兵 编辑)

《中国现代医学杂志》投稿须知

《中国现代医学杂志》创刊于 1991 年, 中国标准连续出版物号 ISSN 1005-8982/CN 43-1225/R, 半月刊, 系中国科技论文统计源期刊、北大中文核心期刊(2008、2011 和 2014 版)、中国核心学术期刊(RCCSE)(A-)及湖南省十佳期刊, 被中国知网、万方数据、维普资讯、超星“域出版”、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等国内外多个数据库收录, 公开发行。本刊是中华人民共和国教育部主管的综合性医学学术期刊, 以服务于广大医药卫生科技人员, 促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨。由中南大学、中南大学湘雅医院主办, 湖南省湘雅医学期刊社有限公司出版。

本刊刊登的论文内容涉及基础医学、临床医学、预防医学及医学相关学科的新理论、新技术、新成果以及医学信息、动态等。文稿须具有科学性、创新性、实用性。文字要求准确、通顺、精练。本刊设基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。学术报告类论文字数控制在 3 000 字以内; 病例报告类论文字数控制在 800 字以内。稿件格式为题名、作者姓名、作者单位、邮编、摘要(具体要求见投稿细则)、关键词、正文、参考文献。

本刊对国家级的科研成果或阶段性成果及部级以上课题项目的进展报道实行速审快发。一般稿件 2 个月内有评审结果, 录用后等待发表。请作者自行登录本刊网站(www.zgxdyx.com)查询稿件处理结果, 恕不另行通知。稿件发表后, 赠当期杂志 2 本。

投 稿 细 则

1. 文稿力求文字精练、准确、通顺; 文题简明、醒目, 能反映出文章的主题; 勿用不规范字。请作者仔细校对全文, 并认真复核数据。摘要应与正文内药物剂量、病例数、百分比等数据一致。如有错误, 将降低审稿人和编辑对该文真实性的信任度, 导致退稿。	6. 所有栏目论文需附关键词 3 ~ 5 个, 其中临床报道、学术报告和病例报告只需中文关键词, 其余栏目论文需中英文关键词齐全。
2. 文题中不使用英文缩略语。摘要中一般也不使用英文缩略语, 如因为该词出现多次而需要使用时, 应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文缩略语(此处不需写出英文全称)。正文中首次使用英文缩略语时, 也应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文全称及英文缩略语。此规则对已公知、公用的缩略语除外。	7. 照片、图片(黑白原始照片必须清晰, 大小 5 cm × 7 cm), 须在文章内标明其位置, 并附标题, 显微镜下照片应标明放大倍数。
3. 单位介绍信原件, 注明稿件非一稿多投。采用网上投稿方式时, 请将该介绍信照片插入提交的论文 Word 文稿第一页。	8. 所有栏目论文参考文献须引用 10 条以上, 以近 5 年文献为主。引用期刊的格式为: 作者. 文题. 刊名, 年, 卷(期): 起止页码.; 引用书籍的格式为: 著者. 书名. 版次. 出版地: 出版社, 年份: 起止页码.。每条参考文献应列出作者姓名, 如超过 3 名, 则在 3 名作者后写等。中文格式: 解勤之, 陈方平, 蹇在伏, 等. 红细胞收缩: 血小板无力症的可能代偿机制 [J]. 中国医学工程, 1998, 8(11): 3-5. 英文格式: SZEMAN B, NAGY G. Changes in cognitive function in patient with diabetes mellitus[J]. Orv Hetil, 2012, 153(9): 323-329.
4. 所有栏目投稿的中英文论文题目、作者姓名及作者单位需齐全(每位作者只标注一个主要单位, 其余的可以作者简介方式在首页左下角注明, 标注通信作者的必须留下通信作者本人的电话或电子邮箱, 以便核实)。	9. 综述第一作者须有副高以上职称证明(参考文献 35 条以上)。
5. 对不同栏目论文中英文摘要的要求: 基础研究·论著、临床研究·论著、新进展研究·论著需中英文摘要齐全, 并按目的、方法、结果、结论四要素书写, 200 ~ 500 个字。综述需中英文摘要齐全, 不需按四要素书写。临床报道和学术报告只需中文摘要, 病例报告无需中英文摘要。	10. 凡国家、省部级自然科学基金、博士基金、863 计划及国家重点实验室项目的论文, 请注明基金名称及编号并附相关项目批准文件或任务书复印件, 可优先发表。项目主要负责人为通信作者。采用网上投稿方式时, 请将相关证明材料的照片插入提交的论文 Word 文稿最后一页。