

· 论 著 ·

# 骨形成蛋白家族成员 BMP2、BMP4 及 BMP7 对膀胱尿路上皮癌术后复发的预测

黄凤鸣, 陈炜, 曾翔, 林圩, 梁勇

自贡市第四人民医院泌尿外科, 四川 自贡 643000

**摘要:** **目的** 探讨骨形成蛋白(BMP)家族成员 BMP2、BMP4 和 BMP7 对膀胱尿路上皮癌术后复发及 TNM 分期的预测价值。**方法** 共收集膀胱尿路上皮癌标本及正常膀胱移行上皮标本各 30 例,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)方法检测 BMP2、BMP4 及 BMP7 mRNA 表达水平。所有患者术后均随访 1 年,分析 BMPs 表达与复发情况及 TNM 分期相关性。**结果** BMP4 mRNA 在膀胱尿路上皮癌组织中表达水平显著低于正常膀胱移行上皮组织,差异有统计学意义( $t = 32.47, P < 0.01$ ), BMP2 及 BMP7 mRNA 在膀胱浸润性尿路上皮癌中呈现低表达(BMP2:  $t = 18.59, P < 0.01$ ; BMP7:  $t = 52.67, P < 0.01$ )。相关性分析显示 BMP7 mRNA 与病理 TNM 分期的 pTa 分期存在明显负相关关系( $r = -0.42, P = 0.005$ ), BMP2、BMP7 mRNA 低表达患者的复发率低于高表达患者( $P = 0.01, P = 0.03$ )。**结论** 低表达 BMP2、BMP7 与膀胱尿路上皮癌复发时间缩短成正相关,而与其 TNM 分期未见明显相关性。

**关键词:** 骨形成蛋白; 骨形成蛋白 2; 骨形成蛋白 7; 膀胱尿路上皮癌; 复发

**中图分类号:** R 737.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)05-0605-04

## Predictive value of bone morphogenetic protein family members BMP2, BMP4 and BMP7 for postoperative recurrence of bladder urothelial carcinoma

HUANG Feng-Ming, CHEN Wei, ZENG Xiang, LIN Wei, LIANG Yong

Department of Urology Surgery, Zigong Fourth People's Hospital,

Zigong, Sichuan 643000, China

Corresponding author: LIANG Yong, E-mail: urologyly@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the predictive value of BMP2, BMP4 and BMP7, the members of the bone morphogenetic protein family (BMPs), for postoperative recurrence and TNM staging in patients with bladder urothelial carcinoma. **Methods** Thirty bladder urothelial carcinoma specimens and 30 normal bladder transitional epithelium specimens were collected. Real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect BMP2, BMP4 and BMP7 mRNAs relative expression levels. All patients were followed up for 1 years after operation. The correlations of BMPs expressions with TNM staging and recurrence were analyzed. **Results** BMP4 mRNA expression level in bladder urothelial carcinoma tissues was significantly lower than that in normal bladder transitional epithelium tissues ( $t = 32.47, P < 0.01$ ). BMP2 mRNA ( $t = 18.59, P < 0.01$ ) and BMP7 mRNA ( $t = 52.67, P < 0.01$ ) expression levels were down-regulated in invasive bladder urothelial carcinoma. The correlation analysis showed that BMP7 mRNA was negatively correlated with the pTa staging of pathological TNM staging ( $r = -0.42, P = 0.005$ ). The low-expressions of BMP2 mRNA ( $P = 0.01$ ) and BMP7 mRNA ( $P = 0.03$ ) were significantly correlated with postoperative recurrence of bladder urothelial carcinoma. **Conclusion** The low-expressions of BMP2 mRNA and BMP7 mRNA are positively correlated with shortening of postoperative recurrence time and not significantly correlated with TNM staging.

**Key words:** Bone morphogenetic protein family; bone morphogenetic protein 2; bone morphogenetic protein 7; Bladder urothelial cancer; Recurrence

随着医疗技术的进步,膀胱癌的 5 年生存率逐渐提高,约为 81.7%,且膀胱癌相关总死亡率逐渐下降,但该疾病高复发的特点仍是治疗上的难点,故对其复发实现早期发现、早期诊断及早期治疗尤为重要。其中寻求新的预后因素以提高治疗效果,为疾病复发的高风险或低风险的个体提供替代治疗方式为目前研究热点。骨形成蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是从骨基质中分离出来的多向生长因子,其最初用于诱导骨及软骨组织的形成<sup>[1]</sup>。随着研究的深入,发现 BMPs 还可参与包括多种恶性肿瘤在内的胚胎发育期间细胞分化的多个关键步骤的调控<sup>[2-4]</sup>。有研究显示 BMP2 和 BMP4 参与膀胱癌的发生发展有关<sup>[5]</sup>,且 BMP2 表达水平与膀胱癌骨转移有关<sup>[6]</sup>。本文研究 BMP2、BMP4 和 BMP7 基因在人正常膀胱尿路上皮和上皮癌中不同阶段的表达,进而探讨其与膀胱肿瘤术后复发间的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选择于自贡市第四人民医院住院行经尿道膀胱肿瘤切除(transurethral resection of bladder tumor, TURBt)的患者,以病理活检确诊为膀胱尿路上皮癌(BUC)的患者 30 例为 BUC 组,根据不同浸润程度分为非浸润性膀胱尿路上皮癌(niBUC)及浸润性膀胱尿路上皮癌(iBUC)。病例纳入标准:(1)确诊为 BUC;(2)无明显骨质疾病;(3)3 个月之内未服用影响骨质代谢的药物。排除标准:(1)合并其他肿瘤疾病;(2)具有明确骨质疾病或服用影响骨质代谢的药物;(3)膀胱肿瘤为转移性肿瘤。并选择同期就诊的 30 例膀胱镜活检证实为正常膀胱尿路上皮的患者为对照组。患者均签署知情同意书。

**1.2 研究方法** 留取各组行膀胱镜或 TURBt 的标本,切除后立即浸入 RNAlater<sup>®</sup> 稳定剂中,按操作说明书采用实时定量 PCR(qRT-PCR)检测方法测定组织中 BMP2、BMP4 及 BMP7 mRNA 含量。

**1.3 统计学方法** 采用 DataAssist<sup>™</sup> 软件进行统计处理,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,两独立样本组间比较采用 *t* 检验,对照组及 niBUC、iBUC 之间数据比较采用方差分析, TNM 分期与 BMPs 之间相关性采用 Spearman 秩相关检验,计数资料采用  $\chi^2$  检验,生存资料采用 Kaplan-Meier 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 一般资料** 共 60 例患者纳入本次研究,年龄( $52.2 \pm 21.5$ )岁, BMI 为  $18.5 \sim 26.9 \text{ kg/m}^2$ 。两组

年龄及 BMI 比较差异无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ )。见表 1。

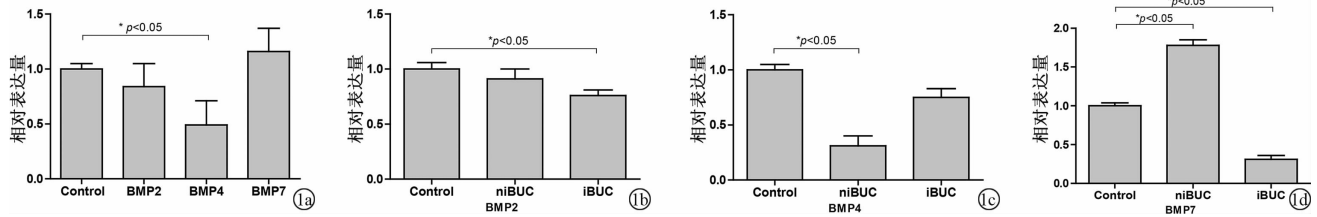
表 1 两组患者一般资料比较 ( $n = 30, \bar{x} \pm s$ )

指标	BUC 组	对照组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	54.7 ± 20.9	51.8 ± 19.7	0.64	0.52
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	23.6 ± 4.4	24.0 ± 2.7	1.92	0.06
TNM 分期				
pTa	12	-	-	-
pT1	10	-	-	-
pT2	2	-	-	-
pT3	2	-	-	-
pT4	4	-	-	-

**2.2 各组 BMP2、BMP4 及 BMP7 mRNA 表达情况** 设各对照组 qRT-PCR 检测结果 BMPs mRNAs 表达水平为 1,进行 mRNAs 相对表达量的比较。与对照组相比, BUC 组 BMP4 mRNA 相对表达水平( $0.49 \pm 0.07$ )降低( $t = 32.47, P < 0.01$ ), BMP2 mRNA 相对表达水平( $0.78 \pm 0.06$ )降低, BMP7 mRNA 相对表达水平( $1.29 \pm 0.05$ )升高,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。根据肿瘤浸润程度分为 iBUC 及 niBUC,结果显示,与对照组相比, iBUC 组 BMP2 mRNA 表达水平( $0.76 \pm 0.05$ )下降( $t = 18.59, P < 0.01$ ), niBUC 组 BMP2 表达水平( $0.91 \pm 0.06$ )无差异( $P > 0.05$ ); niBUC 组 BMP4 表达水平( $0.31 \pm 0.09$ )下降( $t = 36.71, P < 0.01$ ), iBUC 组 BMP4 表达水平( $0.76 \pm 0.05$ )无差异( $P > 0.05$ ); iBUC 组 BMP7 表达水平( $0.32 \pm 0.05$ )下降( $t = 52.67, P < 0.01$ ), 而 niBUC 组 BMP7 mRNA 表达水平( $1.78 \pm 0.07$ )升高( $t = 49.66, P < 0.01$ )。见图 1。

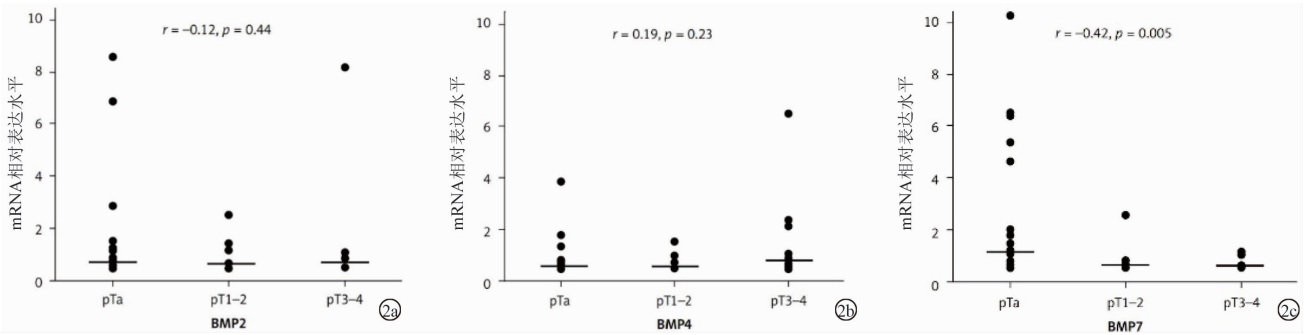
**2.3 BUC 不同 TNM 分期 BMP2、BMP4、BMP7 mRNA 表达情况** 按照不同 TNM 病理分期,将 BUC 组患者分为 pTa 组、pT1-2 组及 pT3-4 组。结果显示不同分期与 BMP2 及 BMP4 mRNA 表达水平均无显著性关联(BMP2:  $r = -0.12, P = 0.44$ ; BMP4:  $r = 0.19, P = 0.23$ ), 而 BMP7 mRNA 在 pTa 期患者中明显呈现高表达,且两者存在负相关关系(BMP7:  $r = -0.42, P = 0.005$ )。见图 2。

**2.4 BMP2、BMP4、BMP7 mRNA 表达与 BUC 复发相关性分析** 对 30 例 BUC 患者中 26 例成功进行为期一年的 TURBt 术后随访,共 11 例出现术后复发,中位复发时间为 261 d。对手术切除标本中 BMP2、BMP4 及 BMP7 mRNA 表达进行检测后,根据其表达水平高低分为高表达组及低表达组。结果显示, BMP4 mRNA 高表达与低表达患者的复发率无统计学差异( $P = 0.40$ ), 而 BMP2、BMP7 mRNA 低表达患者的复发率低于高表达患者( $P = 0.01, P = 0.03$ )。见图 3。



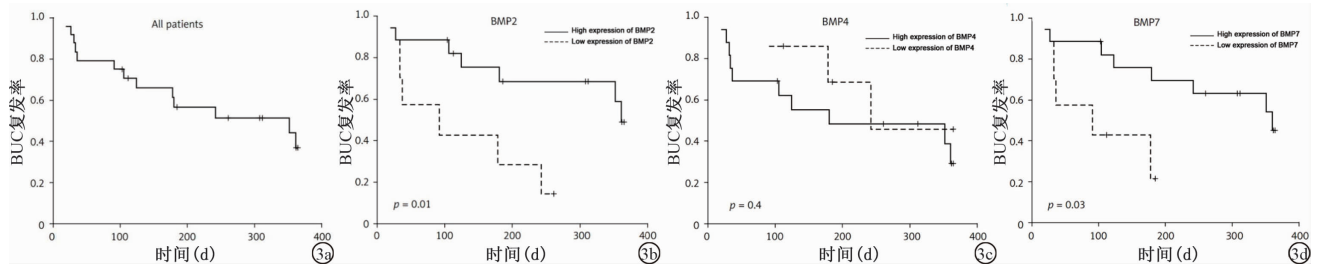
注:1a:BUC 组 BMP2、BMP4、BMP7 与对照组比较;1b:对照组、niBUC 组、iBUC 组 BMP2 比较;1c:对照组、niBUC 组、iBUC 组 BMP4 比较;1d:对照组、niBUC 组、iBUC 组 BMP7 比较。

图 1 各组 BMP2、BMP4 及 BMP7 mRNA 表达情况



注:2a:BMP2;2b:BMP4;2c:BMP7。

图 2 不同 TNM 病理分期 T 分期中 BMP2、BMP4、BMP7 mRNA 相对表达水平



注:实线:高表达 BMPs;虚线:低表达 BMPs。

图 3 BMP2、BMP4、BMP7 mRNA 表达与肿瘤复发率相关性分析

### 3 讨论

膀胱肿瘤存在预后相对良好及高复发率的特点,故对其进行复发检测具有重要意义。BMP2、BMP4 及 BMP7 在多种肿瘤中已表现出明显的差异性表达,且在一些疾病中可潜在地用于判定其预后<sup>[3,7-10]</sup>。但截至目前,除 Komai<sup>[11]</sup> 及 Yang 等<sup>[6]</sup> 对 BMP2 在膀胱肿瘤中进行了一些研究外,未见上述因子在膀胱尿路上皮癌中的差异性表达及预后研究。本研究对膀胱肿瘤中 BMP2、BMP4 及 BMP7 的表达进行了检测,并对其与膀胱尿路上皮癌的复发情况进行了相关分析。初步结果表明,BMP2 及 BMP7 在正常尿路上皮组织中及尿路上皮癌组织中的表达相似,而 BMP4 的表达在尿路上皮癌中存在明显下调,然而,以上结果并未对肿瘤的分级及分期进行亚组分析。故为进一步探讨 BMP2、BMP4 及 BMP7 与疾病进展及浸润程度的关系,我们将肿瘤组织按照是否存在浸润性分为浸润及非浸润尿路上皮癌组织,并对肿瘤的 TNM 分

期进行亚组分析,结果显示 BMP2 在疾病进展的所有阶段几乎存在稳定的表达,提示该蛋白可能没有直接参与 BUC 的疾病进展。另一方面,在本研究中 BMP4 及 BMP7 随着尿路上皮癌的不同阶段而呈现不同的表达程度。与正常对照组相比,BMP4 在 BUC 中的表达明显降低,特别是在其病例分期的早期及非浸润性肿瘤,但差异无统计学意义,其研究结果与 Zaravinos 等<sup>[5]</sup> 报道一致。

本研究还发现 BUC 中 BMP7 的表达与肿瘤临床分级及病理分期存在相关性。在非浸润性肿瘤患者 BMP7 的水平显著升高,而浸润性肿瘤 BMP7 表达则明显下降;同样的,在不同 TNM 病理分期中 BMP7 的表达也有显著差异,在病理分期 Ta 期患者 BMP7 水平相对于病理分期 T<sub>3-4</sub> 期患者显著升高,相关分析证实两者存在负相关关系,故推测 BMP7 可能潜在的用于肿瘤的恶性程度及进展的监测。对 30 例患者中 26 例进行了 1 年的随访,结果显示其中 11 例 (42.31%) 患者出现术后复发。根据 BMPs 表达高低

分为低表达及高表达组,对其进行生存分析结果显示,BMP2 或 BMP7 表达低的肿瘤患者尿路上皮癌术后复发时间较短,这表明 BMP2 和 BMP7 可作为 BUC 术后随访过程中具有复发预测价值的潜在生物标志物。

值得注意的是,Choi 等<sup>[12]</sup>报道卵巢癌中 BMP2 低表达预示其预后较差,但 Park<sup>[13]</sup>及 Liu 等<sup>[14]</sup>报道在胃癌及胶质瘤中高表达 BMP2 的患者预后则较差,在肾细胞癌中 BMP7 低表达提示较差的预后,高水平的 BMP7 有利于肿瘤良好的预后<sup>[15]</sup>。以上矛盾的结果表明 BMP2 作为预后监测标志物可能与疾病类型相关。本研究结果是基于 30 例患者的分析基础之上的,其结果可能受到病例数的限制,还需更大样本的分析支持。

综上,BUC 组织中 BMP2 和 BMP7 的低表达与复发时间缩短有关,因此可推荐作为 BUC 的预后因素进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] Bains R, Mitsunaga L, Kardile M, et al. Bone morphogenetic protein (BMP-2) usage and cancer correlation: an analysis of 10,416 spine fusion patients from a multi-center spine registry[J]. *J Clin Neurosci*, 2017, 43: 214 - 219.
- [2] Wang T, Zhang Z, Wang K, et al. Inhibitory effects of BMP9 on breast cancer cells by regulating their interaction with pre-adipocytes/adipocytes[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(22): 35890 - 35901.
- [3] Pulido C, Vendrell I, Ferreira AR, et al. Bone metastasis risk factors in breast cancer[J]. *Ecanermediscience*, 2017, 11: 715.
- [4] Ampuja M, Rantapero T, Rodriguez-Martinez A, et al. Integrated RNA-seq and DNase-seq analyses identify phenotype-specific BMP4 signaling in breast cancer[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18: 68.
- [5] Zaravinos A, Lambrou GI, Boulalas I, et al. Identification of common

differentially expressed genes in urinary bladder cancer[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18135.

- [6] Yang ZJ, Liu FX, Yang YS, et al. Expression of bone-morphogenetic protein 2 and tumor necrosis factor  $\alpha$  correlates with bone metastases in bladder urothelial carcinoma[J]. *Ann Diagn Pathol*, 2013, 17(1): 51 - 53.
- [7] Irshad S, Bansal M, Guarnieri P, et al. Bone morphogenetic protein and Notch signalling crosstalk in poor-prognosis, mesenchymal-subtype colorectal cancer[J]. *J Pathol*, 2017, 242(2): 178 - 192.
- [8] Cui X, Yang Y, Jia D, et al. Downregulation of bone morphogenetic protein receptor 2 promotes the development of neuroblastoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483(1): 609 - 616.
- [9] Zhou K, Shi X, Huo J, et al. Bone morphogenetic protein 4 is overexpressed in and promotes migration and invasion of drug-resistant cancer cells[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 101: 427 - 437.
- [10] Shirai YT, Ehata S, Yashiro M, et al. Bone morphogenetic protein-2 and-4 play tumor suppressive roles in human diffuse-type gastric carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(6): 2920 - 2930.
- [11] Komai Y, Morimoto S, Saito K, et al. Possible involvement of bone morphogenetic protein 2 in heterotopic ossification in metastatic lesion from urothelial carcinoma of bladder[J]. *Int J Urol*, 2006, 13(8): 1126 - 1128.
- [12] Choi YJ, Ingram PN, Yang K, et al. Identifying an ovarian cancer cell hierarchy regulated by bone morphogenetic protein 2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(50): 6882 - 6888.
- [13] Park Y, Kang MH, Seo HY, et al. Bone morphogenetic protein-2 levels are elevated in the patients with gastric cancer and correlate with disease progression[J]. *Med Oncol*, 2010, 27(4): 1192 - 1199.
- [14] Liu C, Tian G, Tu Y, et al. Expression pattern and clinical prognostic relevance of bone morphogenetic protein-2 in human gliomas[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2009, 39(10): 625 - 631.
- [15] Basic-Jukic N, Hudolin T, Radic-Antolic M, et al. Bone morphogenetic protein-7 expression is down-regulated in human clear cell renal carcinoma[J]. *J Nephrol*, 2011, 24(1): 91 - 97.

收稿日期: 2017 - 12 - 18 编辑: 王国品