

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00805

## 非小细胞肺癌患者血清骨形成蛋白2的表达及临床意义

### Expression of bone morphogenesis protein 2 in serum of patients with non-small cell lung cancer and the relevant clinical significance

张景熙<sup>1</sup>, 韩一平<sup>1</sup>, 赵立军<sup>1</sup>, 李强<sup>1\*</sup>, 满晓华<sup>2</sup>, 孙沁莹<sup>1</sup>, 张伟<sup>1</sup>

1. 第二军医大学长海医院呼吸内科, 上海 200433
2. 第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 检测非小细胞肺癌(NSCLC)患者血清骨形成蛋白(BMP)2表达水平的变化,探讨其与病情进展的关系。**方法** 采用ELISA方法检测78例NSCLC患者和22例对照组血清BMP-2含量。**结果** 腺癌组血清BMP-2水平 $[(7.54 \pm 8.14) \text{ ng/ml}]$ 较鳞癌组 $[(3.38 \pm 1.83) \text{ ng/ml}]$ ,  $P < 0.05$ 及对对照组 $[(2.57 \pm 1.03) \text{ ng/ml}]$ ,  $P < 0.01$ 升高;远处转移NSCLC患者血清BMP-2水平 $[(7.54 \pm 8.14) \text{ ng/ml}]$ 高于未转移患者 $[(3.90 \pm 2.61) \text{ ng/ml}]$ ,  $P < 0.01$ ;不同转移部位组间BMP-2水平无统计学差异,化疗前后远处转移患者血清BMP-2水平无统计学变化。**结论** 远处转移的NSCLC患者血清BMP-2水平明显升高,在腺癌中升高明显,提示BMP-2与NSCLC的侵袭转移密切相关。BMP-2水平可能具有预判NSCLC远处转移的潜能。

**[关键词]** 肺肿瘤; 非小细胞肺癌; 骨形成蛋白2; 肿瘤转移

**[中图分类号]** R 734.2 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)07-0805-03

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是呼吸系统常见的恶性肿瘤,转移率高、预后差。90%的肺癌患者死亡与侵袭转移有关<sup>[1]</sup>,早期发现患者是否存在远处转移并进行有效治疗对患者预后非常重要。骨形成蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)为转化生长因子(transforming growth factor, TGF) $\beta$ 家族的一个亚群,BMP-2作为其中一员在胚胎正常发育中发挥重要作用。近年来研究发现BMP-2参与了骨肿瘤、舌癌、卵巢癌、胰腺癌、上皮牙生肿瘤<sup>[2]</sup>、肺癌<sup>[3]</sup>等多种恶性肿瘤的形成和发展。98% NSCLC患者标本中BMP-2蛋白表达强度高于正常肺组织的17倍,mRNA水平高于正常肺组织25.6倍<sup>[4]</sup>。BMP-2不仅在肿瘤组织特异性高表达,其还具有从肿瘤细胞分泌的功能。Park等<sup>[5]</sup>发现胃癌患者中血清BMP-2水平在存在远处转移患者中明显升高,与胃癌转移明显相关,提示其可能参与了胃癌细胞的侵袭转移。本研究拟通过检测NSCLC患者血清中BMP-2表达水平的变化,探讨其与病情进展等的关系,为临床预后估计、监测病情及治疗策略提供依据。

#### 1 资料和方法

**1.1 一般资料** 所选取对象均为第二军医大学长海医院呼吸内科及胸心外科获得明确病理诊断的NSCLC患者,共78例,男49例,女29例,年龄35~72岁,平均 $(53.8 \pm 10.5)$ 岁。病理类型:单纯细支气管肺泡癌(bronchiolar alveolar carcinoma, BAC)3例,鳞癌28例,腺癌47例。临床分期采用美国NCCN指南中的TNM分期, I A期4例, I B~ III B

期为28例,经CT、MRI、PET-CT或MRI证实的存在骨骼或脑转移的IV期患者46例,单纯脑转移者16例,单纯骨转移者20例,骨、脑同时转移者10例。I B~IV期患者均接受了NCCN推荐的标准一线化疗,药物选择为以顺铂或卡铂联合吉西他滨或紫杉醇的化疗方案。所有患者均在手术前或第一次化疗前抽血,有远处转移者第一次化疗前及第一次化疗后21 d抽血。同时选取年龄、性别相匹配的22例健康体检者为对照组。所选取研究对象均签署知情同意书。

**1.2 血清BMP-2水平的测定** NSCLC患者及对照组对象留取空腹外周静脉血4.0 ml,立即低温下 $1\ 000 \times g$ 离心10 min,小心吸取血清,冻存于 $-80^\circ\text{C}$ (避免反复冻融)低温冰箱中待测。实验前室温下解冻。采用双抗夹心ELISA法检测,试剂盒购自美国R&D Systems公司。检测步骤严格按照试剂盒说明书进行。每份标本均检测2次。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS 13.0统计软件包进行资料录入、整理及统计分析处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组分析进行单因素ANOVA方差分析,方差不齐两组分析采用Wilcoxon-Mann-Whitney  $U$ 检验,多组分析采用Kruskal-Wallis法进行多组差别秩和检验,组间两两比较采用Nemenyi法检验。方差齐性两两比较采用LSD- $t$ 检验,检验水平( $\alpha$ )为0.05。

#### 2 结果

**2.1 不同病理类型NSCLC患者血清BMP-2水平** 结果(表1)显示:对照组、鳞癌组、腺癌组及BAC组患者中腺癌组

**[收稿日期]** 2010-03-04 **[接受日期]** 2010-06-21

**[作者简介]** 张景熙,博士,讲师、主治医师。E-mail: jingxizhang2000@yahoo.com.cn

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873231, E-mail: liqressh@yahoo.com.cn

血清 BMP-2 水平最高,与鳞癌 ( $P < 0.05$ ) 及对照组 ( $P < 0.01$ ) 间差异有统计学意义,而亚组分析显示 IV 期鳞癌及腺癌患者 BMP-2 水平较对照组升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),但分别较 I A~III B 期鳞癌组及腺癌组 BMP-2 水平未见升高 ( $P = 0.19, P = 0.11$ )。BAC 组与对照组 BMP-2 水平比较未见统计学差异。

表 1 不同病理类型及分期 NSCLC 患者血清 BMP-2 水平

病理类型	分期	n	BMP-2 $\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$
对照		22	2.57 ± 1.03
细支气管肺泡癌	I A	3	2.43 ± 0.54
鳞癌		28	3.38 ± 1.83
	I A~III B	16	2.94 ± 1.31
	IV	12	3.96 ± 2.29**
腺癌		47	7.54 ± 8.14**△
	I A~III B	13	5.11 ± 4.77
	IV	34	8.46 ± 8.99**

\*\*  $P < 0.01$  与对照组比较;△  $P < 0.05$  与鳞癌组比较

2.2 未远处转移及远处转移 NSCLC 患者 BMP-2 水平 结果表明:对照组和未转移组 NSCLC 患者血清 BMP-2 水分别为 (2.57 ± 1.03)、(3.90 ± 2.61), 低于远处转移组 (7.29 ± 8.04) ng/ml ( $P < 0.05$ )。未转移组与对照组相比无明显统计学差异。

2.3 不同远处转移部位的 IV 期 NSCLC 患者 BMP-2 水平 结果表明:骨转移组、脑转移组及骨脑转移组 BMP-2 水平分别为 (7.80 ± 3.36)、(6.08 ± 2.13)、(8.22 ± 3.11) ng/ml, 较对照组 [(2.57 ± 1.03) ng/ml] BMP-2 升高 ( $P < 0.05$ ), 其中存在骨转移的 2 组与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。不同转移组间 BMP-2 水平间无统计学差异。

2.4 IV 期 NSCLC 患者化疗前后 BMP-2 水平变化 存在远处转移的 46 例 NSCLC 患者在化疗前后血清中 BMP-2 水平分别为 (7.29 ± 8.04) ng/ml 和 (6.58 ± 5.97) ng/ml, 差异无统计学意义 (图 1)。

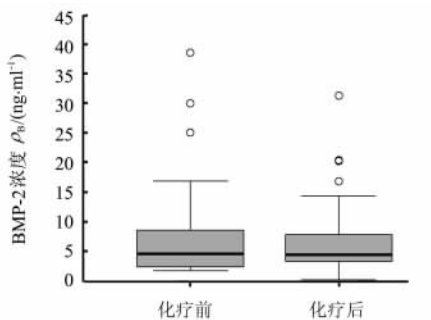


图 1 远处转移 NSCLC 患者 化疗前后血清 BMP-2 水平

$n = 46, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

BMP-2 属于 TGF- $\beta$  超家族,是调节各种不同细胞分化的多功能蛋白分子,也是调节各种组织器官和肿瘤形成、分

化、进展的重要调节因子。已有研究证明,BMP-2 可促进前列腺癌<sup>[6]</sup>、乳腺癌<sup>[7]</sup>、软骨肉瘤<sup>[8]</sup>、胃癌<sup>[9]</sup>等多种肿瘤细胞的增殖,肿瘤细胞还具有分泌 BMP-2 的能力,通过自分泌或旁分泌途径促进肿瘤细胞不断生长及增殖。NSCLC 患者组织标本中 BMP-2 蛋白<sup>[3]</sup>及 mRNA 水平<sup>[4]</sup>均异常升高,但其在肿瘤组织中的原位表达水平与患者病理类型及分期无明显相关。本研究中通过血清检测发现,腺癌患者血清中 BMP-2 水平较对照组及鳞癌组升高,并且对于 IV 期患者而言,无论鳞癌及腺癌患者 BMP-2 水平均较对照组升高,提示外周血 BMP-2 的表达与分期存在一定的相关性。由于细支气管肺泡癌组患者例数较少,其 BMP-2 水平值得进一步检测。从整体而言,有远处转移的 NSCLC 患者 BMP-2 水平较未转移组升高,而未转移组与对照组间无显著差异,这在其他肿瘤也有类似结果,BMP-2 水平高低可能成为判断远处转移的一个预测指标。Le Page 等<sup>[10]</sup>则发现 BMP-2 的表达与上皮样卵巢癌预后正相关,Park 等<sup>[5]</sup>发现胃癌患者有远处转移者血清 BMP-2 水平明显高于早期胃癌患者。这说明随着病情的发展,肿瘤患者血清中 BMP-2 负荷在不断增加,提示 BMP-2 可能参与了肿瘤细胞的侵袭与转移,而不是随着病情进展肿瘤细胞分泌 BMP-2 的能力逐渐加强也值得进一步研究。

NSCLC 的预后差与远处转移发生率高密切相关,骨骼、头颅是最常见的两个转移脏器。近年来,上皮间质样转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 被认为是促进 NSCLC 细胞侵袭转移的一个重要分子机制<sup>[11-13]</sup>。BMP-2 具有促进体外多种肿瘤细胞发生 EMT、导致细胞侵袭性增加的作用。Graham 等<sup>[14]</sup>体外实验证实 BMP-2 可刺激溶骨性前列腺癌细胞系增殖、迁移和侵袭能力增强。Gordon 等<sup>[15]</sup>发现 BMP-2 可以通过激活 Smad-1 上调基质金属蛋白酶 (MMP)-2 表达,诱导胰腺癌细胞株 Pac-1 出现细胞表型改变,细胞向“间质样细胞”转化,迁徙能力增加。Fong 等<sup>[16]</sup>发现 BMP-2 可促进软骨肉瘤的迁移、增加人软骨肉瘤细胞 (JJ012) 表面 1-整合素蛋白和 mRNA 表达,抑制 PI<sub>3</sub>K 或 Akt 后可抑制上述改变。Feeley 等<sup>[17]</sup>用 BMP-2 抑制剂头蛋白 Noggin 转染 A549 细胞后,SCID 动物皮下肿瘤生长明显缩小,骨转移率较对照组下降。

本研究发现,不同转移部位患者血清 BMP-2 水平虽未见明显差异,但骨转移患者 BMP-2 平均水平较脑转移者偏高。我们推测血清中分泌型 BMP-2 在 NSCLC 侵袭转移中发挥着一定的作用。其机制可能为:(1)在骨组织形成过程中 BMP 是唯一能够单独诱导间充质细胞向骨组织方向分化的生长因子,因此成为骨组织形成过程中最关键的调节因子。Wozney 等<sup>[18]</sup>实验表明,低浓度 BMP 能够诱导间充质细胞向骨组织形成区移行;中等浓度 BMP 可以促进间充质细胞向成软骨及成骨细胞方向分化;而高浓度 BMP 则能促进间充质细胞的增生。原发病灶肿瘤细胞可异常高表达或分泌 BMP-2,促进肿瘤细胞由上皮样向间质样转化后,进一步推动这些间质样细胞向骨组织移行,随着肿瘤细胞的不断生长,BMP-2 浓度升高进而又促进这些转移至骨组织的肿瘤细胞发生增殖。(2)BMP-2 升高后,通过自分泌或旁分泌途径促进肿瘤细胞 BMP 受体表达升高,骨骼及细胞外基质等

自身表达 BMP-2 的器官可吸引肿瘤细胞黏附而增殖。本研究发现在脑转移患者中 BMP-2 也出现升高,可能与 BMP-2 能够刺激血管生成有关。Deckers 等<sup>[19]</sup>发现 BMP-2 可通过磷酸化 Smad-1、5、8, ERK-1、2 和增加 Id-1 的表达来活化内皮细胞功能并刺激新生血管生成。

CEA、CA199、EGFR、VEGF<sup>[20]</sup>等多种肿瘤标志物已被作为判断化疗效果的重要血清标本。本研究检测了化疗对远处转移患者血清 BMP-2 的影响,结果发现,远处转移患者 BMP-2 水平明显升高,推测 BMP-2 可能参与了 NSCLC 的侵袭转移,而化疗前后 BMP-2 水平未见显著改变,血清 BMP-2 水平没有因化疗而改变预示着 BMP-2 对肿瘤细胞的作用持续存在,这也可以为目前中晚期 NSCLC 化疗总体有效率偏低提供一个可能的解释。由于本组患者化疗次数较少或未将患者疗效进行进一步亚组分层分析,化疗对 BMP-2 长期的影响及其机制尚值得进一步深入探讨。对 BMP-2 的干预是否能够发挥治疗作用也成为值得研究的课题。

综上所述,远处转移的 NSCLC 患者血清 BMP-2 水平明显升高,在腺癌中升高明显,提示 BMP-2 可能参与 NSCLC 的侵袭转移,通过体外实验进一步研究 BMP-2 对 NSCLC 肿瘤细胞 EMT 的作用及其机制对于阐明非小细胞肺癌的进展机制,寻找有效的干预途径具有重要意义。

#### [参考文献]

[1] Herbst R S, Heymach J V, Lippman S M. Lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359; 1367-1380.

[2] Ruhin-Poncet B, Ghouli-Mazgar S, Hotton D, Capron F, Jaafoura M H, Goubin G, et al. Msx and dlx homeogene expression in epithelial odontogenic tumors [J]. *J Histochem Cytochem*, 2009, 57; 69-78.

[3] Langenfeld E M, Bojnowski J, Perone J, Langenfeld J. Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas [J]. *Ann Thorac Surg*, 2005, 80; 1028-1032.

[4] Bieniasz M, Oszejka K, Eusebio M, Kordiak J, Bartkowiak J, Szemraj J. The positive correlation between gene expression of the two angiogenic factors: VEGF and BMP-2 in lung cancer patients[J]. *Lung Cancer*, 2009, 66; 319-326.

[5] Park Y, Kang M H, Seo H Y, Park J M, Choi C W, Kim Y H, et al. Bone morphogenetic protein-2 levels are elevated in the patients with gastric cancer and correlate with disease progression [J]. *Med Oncol*, 2009 Nov 19. [Epub ahead of print]

[6] Graham T R, Agrawal K C, Abdel-Mageed A B. Independent and cooperative roles of tumor necrosis factor-alpha, nuclear factor-kappaB, and bone morphogenetic protein-2 in regulation of metastasis and osteomimicry of prostate cancer cells and differentiation and mineralization of MC3T3-E1 osteoblast-like cells[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101; 103-111.

[7] Montesano R. Bone morphogenetic protein-4 abrogates lumen formation by mammary epithelial cells and promotes invasive growth[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353; 817-822.

[8] Weiss K R, Cooper G M, Jadowiec J A, McGough R L 3rd, Huard J. VEGF and BMP expression in mouse osteosarcoma cells[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2006, 450; 111-117.

[9] Kang M H, Kim J S, Seo J E, Oh S C, Yoo Y A. BMP2 accelerates the motility and invasiveness of gastric cancer cells *via* activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI<sub>3</sub>K)/Akt pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316; 24-37.

[10] Le Page C, Puiffe M L, Meunier L, Zietarska M, de Ladurantaye M, Tonin P N, et al. BMP-2 signaling in ovarian cancer and its association with poor prognosis[J]. *J Ovarian Res*, 2009, 2; 4.

[11] Kuner R, Muley T, Meister M, Ruschhaupt M, Buness A, Xu E C, et al. Global gene expression analysis reveals specific patterns of cell junctions in non-small cell lung cancer subtypes [J]. *Lung Cancer*, 2009, 63; 32-38.

[12] Chou T Y, Chen W C, Lee A C, Hung S M, Shih N Y, Chen M Y. Clusterin silencing in human lung adenocarcinoma cells induces a mesenchymal-to-epithelial transition through modulating the ERK/Slug pathway[J]. *Cell Signal*, 2009, 21; 704-711.

[13] Dasgupta P, Rizwani W, Pillai S, Kinkade R, Kovacs M, Rastogi S, et al. Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124; 36-45.

[14] Graham T R, dero-Marah V A, Chung L W, Agrawal K C, Davis R, Abdel-Mageed A B. PI<sub>3</sub>K/Akt-dependent transcriptional regulation and activation of BMP-2-Smad signaling by NF-kappaB in metastatic prostate cancer cells[J]. *Prostate*, 2009, 69; 168-180.

[15] Gordon K J, Kirkbride K C, How T, Blobe G C. Bone morphogenetic proteins induce pancreatic cancer cell invasiveness through a Smad1-dependent mechanism that involves matrix metalloproteinase-2[J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30; 238-248.

[16] Fong Y C, Li T M, Wu C M, Hsu S F, Kao S T, Chen R J, et al. BMP-2 increases migration of human chondrosarcoma cells *via* PI<sub>3</sub>K/Akt pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2008, 217; 846-855.

[17] Feeley B T, Liu N Q, Conduah A H, Krenek L, Roth K, Dougall W C, et al. Mixed metastatic lung cancer lesions in bone are inhibited by noggin overexpression and Rank:Fc administration [J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21; 1571-1580.

[18] Wozney J M, Rosen V, Celeste A J, Mitsock L M, Whitters M J, Kriz R W, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities[J]. *Science*, 1988, 242; 1528-1534.

[19] Deckers M M, van Bezooijen R L, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos S E, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A [J]. *Endocrinology*, 2002, 143; 1545-1553.

[20] 顾爱琴, 韩宝惠, 张雪艳, 包国良, 忻宇, 宋懿懿, 等. 非小细胞肺癌患者血清 VEGF 和 bFGF 检测的临床意义[J]. *上海交通大学学报:医学版*, 2008, 28; 1087-1090.