

骨形态发生蛋白 4 与乳腺癌骨转移的相关性研究

李科

(四川中医药高等专科学校第一附属医院/绵阳富临医院普外科,四川 绵阳 621000)

摘要:目的 探讨乳腺癌组织及癌旁正常乳腺组织中骨形态发生蛋白 4 的表达情况,分析 BMP-4 表达水平与乳腺癌骨转移的相关性。方法 收集自 2003 年 1 月~2016 年 12 月绵阳富临医院乳腺外科乳腺癌患者术后病理标本,其中 228 例乳腺癌组织石蜡标本,40 例癌旁 2 cm 正常组织石蜡标本作为对照。应用免疫组织化学检测 BMP-4 蛋白在癌组织和癌旁正常组织中的表达情况。结果 BMP-4 在有骨转移乳腺癌组织、无骨转移乳腺癌组织及癌旁正常组织阳性表达率分别为 11.90%(5/42),39.78%(74/186),45.00%(18/40)。发生骨转移乳腺癌组织中 BMP-4 阳性表达率较无骨转移的乳腺癌组织、癌旁正常组织明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 BMP-4 表达水平降低与乳腺癌骨转移相关,BMP-4 阳性表达的患者较 BMP-4 阴性表达的患者骨转移发生几率低。

关键词: BMP-4;乳腺肿瘤;骨转移;免疫组织化学

中图分类号:R737.9

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2018.13.005

文章编号:1006-1959(2018)13-0017-04

Relationship between Bone Morphogenetic Protein 4 and Bone Metastasis in Breast Cancer

LI Ke

(The First Affiliated Hospital of Sichuan College of Traditional Chinese Medicine/General Surgery,Mianyang Fulin Hospital,Mianyang 621000,Sichuan,China)

Abstract:Objective To investigate the expression of bone morphogenetic protein-4 in breast cancer tissues and adjacent normal breast tissues,and to analyze the correlation between BMP-4 expression level and bone metastasis of breast cancer.Methods The postoperative pathological specimens of breast cancer patients from Mianyang Fulin Hospital in Mianyang from January 2003 to December 2016 were collected.Among them,228 specimens of breast cancer tissue and 40 paraffin specimens of 2 cm adjacent normal tissues were used as controls.Immunohistochemistry was used to detect the expression of BMP-4 protein in cancer tissues and adjacent normal tissues.Results The positive expression rates of BMP-4 in breast cancer tissues, bone metastasis-free breast cancer tissues and adjacent normal tissues were 11.90%(5/42),39.78% (74/186),and 45.00%(18/40),respectively.The positive expression rate of BMP-4 in breast cancer tissues with bone metastasis was significantly lower than that in breast cancer tissues without adjacent bone metastasis,and the difference was statistically significant($P<0.05$).Conclusion Decreased expression of BMP-4 is associated with bone metastasis in breast cancer,and patients with positive BMP-4 expression have a lower incidence of bone metastases than patients with negative BMP-4 expression.

Key words: BMP-4;Breast tumor;Bone metastasis;immunohistochemistry.

骨是乳腺癌常见转移部位,晚期乳腺癌患者 70%以上发生骨转移,出现骨痛、高钙血症、脊髓压迫、病理性骨折等并发症,严重影响患者的生活质量,并且乳腺癌细胞以骨髓作为庇护所,逃避人体自身免疫攻击和药物化疗,导致复发和其他脏器的转移。了解骨转移发生的高危因素,揭示发生骨转移机制,从而采取个体化的治疗措施,将可能减缓病情发展。骨形态发生蛋白 4 是转化生长因子- β 超家族的一部分,最初是从脱钙骨基质中提取出的具有诱导骨活性的作用多功能糖蛋白,后来发现其对多种细胞的增殖、分化、凋亡及胚胎干细胞更新具有调控作用,目前有少量文献研究 BMP-4 与乳腺癌的关系,主要是动物模型实验,发现高表达 BMP-4 的乳

腺癌细胞较低表达的不容易出现骨转移,有更好的预后,提示 BMP-4 可能作为癌转移抑制蛋白,在乳腺癌转移过程中发挥负性调节作用。目前未发现文献报道直接检测患者乳腺癌病理组织中的 BMP-4 的表达水平及其与乳腺癌骨转移的关系。本项研究目的是为了找到更多预测乳腺癌骨转移的影响因子,应用免疫组化(SP)法检测乳腺癌组织中 BMP-4 的表达水平,以癌旁 2 cm 正常组织作为对照,分析 BMP-4 表达水平与临床病理因素及骨转移的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 四川省绵阳富临医院乳腺外科 2003 年 1 月~2008 年 12 月确诊为乳腺癌的患者 228 例。本次研究经过医院伦理委员会批准。骨转移诊断符合下列条件:①有明确的乳腺癌病史;②临床症状明显:如骨痛、恶液质、血清碱性磷酸酶升高;③骨扫描

作者简介:李科(1979.4-),男,四川南江人,硕士,主治医师,研究方向:乳腺及甲状腺疾病

(骨 ECT) 示多发异常放射性浓聚伴或不伴稀疏或缺损区;单发异常放射性浓聚区,复查病灶数增多病变范围扩大者;④X 线或 MRI 诊断为骨转移。纳入标准:①病理组织 HE 染色或免疫组化确诊为乳腺癌;②石蜡标本大小满足实验要求并保存完整;③随访资料完整;④行乳腺癌改良根治术;⑤术后接受规范化治疗(包括放、化疗及内分泌治疗)。排除标准:①临床病理资料不完整;②失访;③术前行新辅助化疗或术后未完成规范化治疗。根据疾病分为两组,无骨转移组患者 186 例,男性 2 例,女性 184 例,年龄 28~79 岁,平均年龄(50.25±1.61)岁,病程 12~60 个月,平均病程(40.12±3.63)个月。骨转移组患者 42 例,均为女性,年龄 35~72 岁,平均年龄(53.25±1.45)岁。病程 12~60 个月,平均病程((35.96±3.41)个月。

1.2 方法

1.2.1 主要仪器 DF-620Y 数控切条机、烘片机(HI1220)、倒置相差荧光显微镜(包埋机(德国 EG1160)、普通光学显微镜(北京恒奥德科技有限公司 SC-JBX-D)、DSP 彩色摄像系统(TCR1060)、

1.2.2 主要实验试剂 二氨基联苯胺(DAB)显示试剂盒由天津博美科生物技术有限公司提供。BMP-4 鼠抗人单克隆抗体由上海瑞齐生物科技有限公司提供。

1.2.3 实验步骤 取骨转移乳腺癌组和无骨转移乳腺癌组癌旁 2 cm 正常组织各 20 例,大小 2.0 cm×2.0 cm×0.3 cm,常规石蜡包埋、切片。

1.3 结果判断 镜下观察,BMP-4 阳性染色主要定位于细胞质,偶尔可见细胞膜,呈棕黄色颗粒。在双盲的情况下由两位经验丰富的病理科医师对每张照片全面观察,每张切片选 10 个高倍视野(×400),每个视野记数 100 个肿瘤细胞。按阳性细胞占计数同类细胞的百分比,采用颜色和阳性细胞数积分综合计量判定。①按染色强度记分为:无色为 0 分、淡黄色为 1 分、棕色为 2 分、深棕色为 3 分。②百分率:阳性细胞率≤5%为 0 分,阳性细胞率 10%~25%为 1 分,阳性细胞率 25%~50%为 3 分,阳性细胞率>50%记为 3 分;将①×②结果分级:0 分为阴性(-),1~2 分视为弱阳性(+),3~4 分视为阳性(+ +),≥5 分视为强阳性(+ + +)^[2]。

1.4 统计学分析 采用中文版 SPSS 19.0 统计分析软件进行数据分析,计数资料组间比较分别采用 χ^2 检验、Fisher's 精确检验;等级资料组间比较采用秩和检验;运用 Spearman 进行相关分析;以 $P<0.05$

为差异具有统计学意义。

2 结果

BMP-4 在乳腺癌组织和癌旁正常组织阳性表达率分别为 34.64%(79/228)、45.00%(18/40),两者比较,差异无统计学意义($\chi^2=1.579, P=0.209>0.05$)。将乳腺癌组织分为两组:发生骨转移组(42 例)和未发生骨转移组(186 例),与癌旁正常组织对照。BMP-4 阳性表达率在骨转移组、无骨转移组、癌旁正常组分别为 11.90%(5/42)、39.78%(74/186)、45.00%(18/40),骨转移组与无骨转移组比较,差异有统计学意义($\chi^2=10.16, P=0.001<0.05$);骨转移组与癌旁正常组比较,差异有统计学意义($\chi^2=11.11, P=0.001<0.05$);无骨转移组与癌旁正常组比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.33, P=0.561>0.05$),见表 1。

表 1 三组 BMP-4 的阳性表达情况比较 [n, %]

组别	n	BMP-4				χ^2	P
		-	+	++	+++		
骨转移组	42	37	5	0	0	11.90	10.16 0.001*
无骨转移组	186	112	47	23	4	39.78	11.11 0.001**
癌旁正常组	40	22	7	7	4	45.00	0.33 0.561***

注:*骨转移组与无骨转移组比较($\chi^2=10.160, P=0.001$);**骨转移组与癌旁正常组比较($\chi^2=11.110, P=0.001$);***无骨转移组与癌旁正常组比较($\chi^2=0.330, P=0.561$)

对全部乳腺癌样本中 BMP-4 的表达情况与骨转移的发生情况进行相关分析发现:BMP-4 表达阳性的乳腺癌患者中只有 5 (5/79) 例出现骨转移(6.31%),而 BMP-4 阴性表达的乳腺癌患者中有 37 例(37/149)发生骨转移(24.83%)。Spearman 相关分析结果显示:BMP-4 阳性表达与乳腺癌骨转移呈负相关, ($r=-2.27, P=0.001, P<0.05$), 差异具有统计学意义。见表 2。

表 2 BMP-4 与乳腺癌骨转移 spearman 相关分析(n)

组别		骨转移		合计	r	P
		阳性	阴性			
BMP-4	阳性	5	74	79	-2.27	0.001
	阴性	37	112	149		
	合计	42	186	228		

3 讨论

乳腺癌是目前全球最常见的女性恶性肿瘤,远处转移是乳腺癌患者死亡的主要原因,骨是乳腺癌常见的转移部位之一。因此,弄清乳腺癌骨转移的临床病理过程,鉴别具有高转移风险的患者,以采取个体化的治疗措施成为乳腺癌临床治疗亟需解决的问题。有资料显示,骨形态发生蛋白 4 在乳腺癌的转移中发挥重要调节作用。

骨形态发生蛋白 4 是转化生长因子- β (transforming growth factor - β , TGF - β) 超家族的成员。BMP-4 基因定位于染色体 14q22-q23, 基因全长为 1.9KD, 共编码 408 个氨基酸, 有 2 个编码外显子和 3 个 5' 端的非编码外显子, 这 3 个启动子具有不同启动功能。BMP-4 基因在人体不同的发育阶段、不同的组织采用不同的启动子, 因而有不同的表达水平。BMP 是分泌型多功能糖蛋白, 通过旁分泌或自分泌发挥作用, 而其结构和功能高度保守, 其羧基端有高度保守的结构域, 内含 7 个半胱氨酸, 其位置固定。BMP-4 合成时首先是一个前体蛋白, 约有 100~125 个氨基酸, 包括一个前结构域, 一个氨基端信号肽及一个羧基端成熟肽。经研究证实, BMP-4 不但具有促进人体胚胎发育及调节细胞增值、分化、凋亡的能力, 而且在多种肿瘤的增殖、侵袭及转移中发挥作用^[1]。BMP-4 在的表达具与组织特异性, 文献报道, BMP-4 在促肾上腺皮质激素瘤中的表达明显降低, 对促肾上腺皮质激素腺瘤起抑制作用^[2]; BMP-4 在前列腺癌中过度表达, 促进前列腺癌骨转移^[3]。在乳腺癌组织中的表达情况文献报道较少。我们目前的实验研究便是为了探查 BMP-4 在乳腺癌组织中的表达情况及与骨转移的关系, 为建立乳腺癌骨转移新的预测模型和乳腺癌抗骨转移药物的研发提供新思路。

3.1 BMP-4 在乳腺组织中的表达 研究显示, 正常乳腺组织中 BMP-4 由乳腺的间充质细胞分泌, 对乳腺的发育和维持正常生理功能发挥调节作用, 特别是维持乳腺胚胎干细胞的自我更新功能, 25% 正常乳腺组织中有 BMP-4 强表达, 平均阳性表达率在 30%~50%^[4]。本实验结果显示, 乳腺癌组织中 BMP-4 表达阳性率为 34.64% (79/228) 低于癌旁正常组织 45.00% (18/40), 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。Alar-mo 等^[5]认为 BMP-4 在乳腺正常组织和癌组织中可能作用不同。文献报道体外乳腺癌细胞系 BMP-4 表达存在很大差异, 郭丹等^[6]发现 MCF-7 和 MBA-MD-231 细胞系高表达 BMP-4, 并认为 BMP-4 具有抑制癌细胞增殖同时促进侵袭转移的双重作用; Cao 等^[7]在对 4T1.1 和 4T1.2 乳腺癌细胞系研究中发现 BMP-4 表达水平降低, BMP4 能够促使癌细胞失巢凋亡, 减少炎症细胞因子如粒细胞集落刺激因子等的表达和分泌, 增加髓系来源抑制性细胞 (Myeloid derived suppressor cells, MDSCs) 衰减, BMP-4 可能作为肿瘤转移基因, 具有抑制肿瘤转移的能力。Ro-

driguez 等^[8]研究表明 BMP-4 的表达具有时间依赖性, 在细胞的不同周期呈时相表达。综合分析, BMP-4 作为一种细胞因子的在乳腺组织中的表达, 受到全身和局部多种因素的调节来发挥生理功能, 乳腺癌是一种高度异质性的疾病, 癌微环境的不同, BMP-4 的表达水平也不样。本研究显示乳腺癌组织中 BMP-4 的平均阳性表达率与癌旁正常组织表达相比没有统计学意义, 但进一步分层分析, 发生骨转移乳腺癌组织中 BMP-4 阳性表达率较之未发生骨转移乳腺癌组织及癌旁正常组织明显降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。提示 BMP-4 可能不主要参与原发乳腺癌的形成过程, 而是在乳腺癌恶性病变形成以后的转移过程中发挥重要作用, 即乳腺癌组织中 BMP-4 表达水平低的癌细胞具有高转移的生物学特性。

3.2 BMP-4 与乳腺癌骨转移 本实验相关性分析发现 BMP-4 阳性表达与骨转移两者呈明显负相关。骨转移的第一步是癌细胞降解周围基质侵入到脉管系统, MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) 是乳腺癌的一种基质金属蛋白酶, 癌细胞通过分泌 MMP-9 水解肿瘤细胞周围基质, 达到浸润和转移的目的, 研究发现 BMP-4 能够抑制 MMP-9 的分泌, 从而抑制肿瘤转移^[9]。同时 BMP4 可通过激活 P38MAPK 通路诱导癌细胞走向过早性衰老^[10]。另外, BMP-4 可以抑制血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth-factor-D, VEGF-D) 驱动转移淋巴结引起的血管重塑, 从肿瘤细胞和肿瘤基质细胞水平抑制原发肿瘤的生长, 抑制乳腺癌细胞失巢凋亡, 降低乳腺癌转移能力^[11]。乳腺癌骨转移, 主要表现为溶骨性或混合性转移, BMP-4 具有较强的诱导骨基质细胞定向分化为骨转移的能力。BMP-4 在乳腺癌中的表达降低或表达缺失, 可能导致了乳腺癌骨转移中成骨与溶骨的平衡紊乱^[12]。可通过对乳腺癌组织中 BMP-4 表达的检测, 判断乳腺癌骨转移风险的高低。并且 BMP-4 作为一种小分子糖蛋白, 重组 BMP-4 是否可以作为一种药物, 用于抑制乳腺癌骨转移, 这需要进一步研究确定。

综上所述, BMP-4 表达水平降低与乳腺癌骨转移存在明显的负相关。通过术后病理组织免疫组化监测 BMP-4, 可以鉴别具有高骨转移风险的乳腺癌患者, 采取个体化的治疗措施, 提高患者的生存质量和生存时间。然而本组实验样本量较小, 研究方法单一, 只是初步分析了 BMP-4 在乳腺癌中的表达情况

与临床病理因素及骨转移的关系,对 BMP-4 在乳腺癌发生发展中究竟发挥哪些具体作用的研究,还需要更大的样本,不同检测的方法,更深入的研究。乳腺癌骨转移是一个多基因参与、多步骤、多途径的复杂过程,任何阻断这一过程的方法都可以延缓骨转移的发生。随着对 BMP-4 信号通路的深入研究,BMP-4 作为小分子糖蛋白,重组 BMP-4 有望成为抗乳腺癌骨转移的药物。

参考文献:

- [1]Bosukonda A,Carlson WD.Harnessing the BMP signaling pathway to control the formation of cancer stem cells by effects on epithelial-to-mesenchymal transition[J].Biochemical Society Transactions,2017,45(1):223.
- [2]季立津,鹿斌,史虹莉.泌乳素瘤发病机制研究进展[J].医学综述,2016,22(1):55-59.
- [3]孙继建,潘世杰.血清 ALP、ICTP、sTf 水平及癌组织 BMP 表达对前列腺癌骨转移的预测价值[J].山东医药,2017,57(48):79-81.
- [4]Liu Y,Zhang RX,Yuan W,et al.Knockdown of Bone Morphogenetic Proteins Type 1a Receptor (BMPRIa)in Breast Cancer Cells Protects Bone from Breast Cancer-Induced Osteolysis by Suppressing RANKL Expression[J].Cellular Physiology & Biochemistry,2018,45(5):1759-1771.
- [5]Zabkiewicz C,Resaul J,Hargest R,et al.Bone morphogenetic proteins,breast cancer,and bone metastases:striking the right balance[J].Endocrine-Related Cancer,2017,24(10):R349-R366.
- [6]Dan G,Huang J,Gong J.Bone morphogenetic protein 4 (BMP4)is required for migration and invasion of breast cancer[J].Molecular&Cellular Biochemistry,2012,363(1-2):179.
- [7]Na YE,Jiping QI,He WU,et al.Research Progress of Bone Morphogenetic Protein 4 [J].Medical Recapitulate,2017,23 (5): 872-876.
- [8]Alejandra RM,Emma-Leena A,Lilli S,et al.Analysis of BMP4 and BMP7 signaling in breast cancer cells unveils time-dependent transcription patterns and highlights a common synexpression group of genes[J].BMC Medical Genomics,2011,4(1):80.
- [9]Cyrdepauw C,Northey JJ,Tabariès S,et al.Chordin-Like 1 Suppresses Bone Morphogenetic Protein 4-Induced Breast Cancer Cell Migration and Invasion[J].Molecular&Cellular Biology,2016,36(10):1509.
- [10]Pal A,Huang W,Li X,et al.CCN6 modulates BMP signaling via the Smad-independent TAK1 p38 pathway,acting to suppress metastasis of breast cancer[J].Cancer Research,2012,72(18): 4818-4828.
- [11]Ampuja M,Alarmo E L,Owens P,et al.The impact of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) on breast cancer metastasis in a mouse xenograft model [J].Cancer Letters,2016,375 (2):238-244.
- [12]Ampuja M,Rantapero T,Rodriguezmartinez A,et al.Integrated RNA-seq and DNase-seq analyses identify phenotype-specific BMP4 signaling in breast cancer [J].Bmc Genomics, 2017,18(1):68.

收稿日期:2018-5-7;修回日期:2018-7-6

编辑/李桦