

引用本文: 刘海旺, 张宏旭, 刘燃, 等. 肝细胞生长因子/酪氨酸蛋白激酶MET信号通路与乳腺癌侵袭转移的相关性分析[J]. 安徽医药, 2021, 25(3): 516-519. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.03.021.

◇临床医学◇



肝细胞生长因子/酪氨酸蛋白激酶MET信号通路与乳腺癌侵袭转移的相关性分析

刘海旺^a, 张宏旭^b, 刘燃^c, 郝美玲^a, 王军^a, 李春辉^a

作者单位: 承德医学院附属医院, ^a病理科, ^b乳腺外科, ^c麻醉科, 河北 承德 067000

通信作者: 李春辉, 男, 主任医师, 研究方向为乳腺癌基础与临床, Email: chli612@126.com

基金项目: 承德市科学技术研究与发展项目(201701A080)

摘要: **目的** 探讨分析肝细胞生长因子(HGF)/酪氨酸蛋白激酶MET(c-met)信号通路与乳腺癌侵袭转移的相关性。**方法** 选择2018年3月至2019年3月承德医学院附属医院临床术后经病理证实的乳腺癌标本75例、乳腺纤维腺瘤标本60例以及癌旁正常乳腺组织标本50例。采用SP免疫组化法以及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测各组织标本HGF、c-met、 β 连环素(β -catenin)蛋白表达和mRNA表达情况。**结果** HGF[82.67%(62/75)比48.33%(29/60)比14.00%(7/50)]、c-met[86.67%(65/75)比55.00%(33/60)比20.00%(10/50)]、 β -catenin[78.67%(59/75)比41.67%(25/60)比6.00%(3/50)]在乳腺癌组织、乳腺纤维腺瘤组织以及癌旁正常乳腺组织中的表达均差异有统计学意义($P<0.05$)。在乳腺癌、乳腺纤维腺瘤以及癌旁正常乳腺组织中HGF、c-met mRNA相对表达量差异有统计学意义($P<0.05$), 其中乳腺癌相对表达量最高、乳腺纤维腺瘤相对表达量次之; 而乳腺癌、乳腺纤维腺瘤以及癌旁正常乳腺组织中 β -catenin mRNA相对表达量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。HGF表达阳性率与病人TNM分期、淋巴结转移、肿瘤大小、ER表达、HER-2表达有关($P<0.05$)。c-met蛋白表达阳性率与病人肿瘤TNM分期、淋巴结转移密切相关($P<0.05$)。 β -catenin蛋白表达异常率与病人TNM分期、淋巴结转移、肿瘤大小密切相关($P<0.05$)。**结论** 乳腺癌组织中HGF、c-met蛋白高表达而 β -catenin蛋白异常表达, 且HGF/c-met信号通路及 β -catenin蛋白与乳腺癌侵袭转移密切相关。

关键词: 乳腺肿瘤; 肝细胞生长因子; 受体蛋白质酪氨酸激酶类; β 连环素; HGF/c-met信号通路; 侵袭; 转移; 相关性

Analysis of correlation between HGF/c-met signaling pathway and invasion and metastasis of breast cancer

LIU Haiwang^a, ZHANG Hongxu^b, LIU Ran^c, HAO Meiling^a, WANG Jun^a, LI Chunhui^a

Author Affiliation: ^aDepartment of Pathology, ^bBreast Surgery, ^cAnesthesiology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China

Abstract: **Objective** To investigate the correlation between HGF/c-met signaling pathway and invasion and metastasis of breast cancer. **Methods** From March 2018 to March 2019, 75 breast cancer specimens, 60 breast fibroadenoma specimens and 50 normal breast tissue specimens were selected from the Affiliated Hospital of Chengde Medical College. The expression of HGF, c-met and β -catenin protein and the expression of HGF, c-met and β -catenin mRNA were detected by SP immunohistochemistry and RT-PCR. **Results** There were significant differences in the expression of HGF[82.67%(62/75) vs. 48.33%(29/60) vs. 14.00%(7/50)], c-met[86.67%(65/75) vs. 55.00%(33/60) vs. 20.00%(10/50)] and β -catenin[78.67%(59/75) vs. 41.67%(25/60) vs. 6.00%(3/50)] in breast cancer, breast fibroadenoma and adjacent normal breast tissues ($P<0.05$). The relative expression of HGF and c-Met mRNA in breast cancer, breast fibroadenoma and adjacent normal breast tissues were significantly different ($P<0.05$), and the relative expression of HGF and c-Met mRNA in breast cancer was the highest, followed by that in breast fibroadenoma. There was no significant difference in the relative expression of β -catenin protein between breast cancer, breast fibroadenoma and adjacent normal breast tissues ($P>0.05$). The positive rate of HGF expression was related to TNM stage, lymph node metastasis, tumor size, ER expression and HER-2 expression ($P<0.05$). The positive rate of c-met protein expression was closely related to TNM stage and lymph node metastasis ($P<0.05$). The abnormal expression rate of β -catenin protein was closely related to TNM stage, lymph node metastasis and tumor size ($P<0.05$). **Conclusions** The expression of HGF and c-Met protein in breast cancer tissues is up-regulated while that of β -catenin protein is abnormal. HGF/c-met signaling pathway and β -catenin protein are closely related to the invasion and metastasis of breast cancer.

Key words: Breast neoplasms; Hepatocyte growth factor; Receptor protein-tyrosine kinases; Beta catenin; HGF/c-met signaling pathway; Invasion; Metastasis; Correlation

乳腺癌是女性常见的一种恶性肿瘤,约有24%~60%的乳腺癌病人因为肿瘤转移而死亡^[1-2]。肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)也被称为扩散因子,是具有促有丝分裂的一种独特的生长因子^[3]。HGF由间充质细胞所分泌,其受体酪氨酸蛋白激酶MET(c-met)蛋白作为一种跨膜蛋白,存在于多种上皮细胞膜上^[4]。当HGF与c-met蛋白发生特异性结合,导致c-met蛋白酪氨酸激酶活性的激活,从而使该通路上多种底物蛋白发生磷酸化,从而调控细胞的增殖和分化^[5]。本研究探讨分析HGF/c-met信号通路与乳腺癌侵袭转移的相关性,为了阐明乳腺癌发生发展提供依据,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2018年3月至2019年3月承德医学院附属医院临床术后经病理证实的乳腺癌标本75例、乳腺纤维腺瘤标本60例以及癌旁正常乳腺组织标本50例。乳腺癌病理类型均为浸润性导管癌,正常乳腺组织取自乳腺癌根治术后标本距离肿瘤(或肿瘤结节)边缘大于5 cm的区域。75例乳腺癌病人均为女性,年龄(51.93±7.32)岁,范围为33~76岁,其中左乳腺39例、右乳腺36例,肿瘤直径≥2 cm病人33例、<2 cm病人42例;TNM分期Ⅰ期21例、Ⅱ期25例、Ⅲ期19例、Ⅳ期10例;其中伴有淋巴结转移病人35例、无淋巴结转移病人40例。

1.2 方法

1.2.1 SP免疫组化法 石蜡包埋连续切片4 μm, 3%过氧化氢孵育10 min封闭灭活内源性过氧化物酶;磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗5 min后将切片放入0.01 mL/L枸橼酸缓冲液中微波抗原修复10 min;加入山羊血清封闭60 min(37℃),滴加适当浓度的一抗,37℃孵育60 min后4℃过夜, PBS洗5 min×3;滴加羊抗兔/鼠IgG二抗,室温孵育15 min, PBS洗5 min×3;3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)显色,苏木素复染核,封片、观察。使用PBS代替一抗作为阴性对照。

HGF、c-met判断标准:HGF、c-met以正常黏膜上皮细胞或肿瘤细胞质或胞核出现棕黄色颗粒为阳性,阳性表达判断标准:①选取染色均匀的组织区域,在400倍视野下计数着色细胞占视野总细胞的百分数,共随机计数5个视野,取其平均值,按照百分数记分,0分:0%;1分:>0%~25%;2分:>25%~50%;3分:>50%。②按照细胞着色强弱程度评分:0分:不着色;1分:着色弱;2分:中等着色;3分:着色强。按照①、②值之和判断结果,0分:阴性(-);1~2分:弱阳性(+);3~4分:中等阳性(++);5~6分:强阳性(+++)。

β连环素(β-catenin)判断标准:β-catenin在细胞膜、细胞质、细胞核3个部位表达强度进行判断,正常β-catenin表达主要定位于细胞膜,当>70%细胞膜阳性表达为正常表达,反之为细胞膜表达缺失;当>10%细胞质或细胞核阳性表达为异位表达。将细胞膜表达缺失以及异位表达均作为异常表达。

1.2.2 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测方法 取100 mg组织(液氮中保存)放入匀浆器中,在冰浴条件下将组织剪碎后立即加入预冷的Trizol提取液1 mL,充分匀浆,根据试剂使用说明提取组织RNA,使用紫外分光光度计定量RNA含量。参照文献设计引物^[6],PCR扩增反应条件为:94℃预变性2 min, 94℃45 s、55℃30 s、72℃30 s,共进行35个循环, 72℃8 min。将PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳,然后使用凝胶图像分析系统进行吸光度扫描,用目的基因吸光度与甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)吸光度比值表示目的基因的相对表达量。

1.3 统计学方法 采用统计学软件SPSS 22.0,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,三组比较采用单因素方差分析,多组间的两两比较采用SNK法,计数资料采用“率”表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三种组织中各蛋白免疫组化表达情况 HGF、c-met、β-catenin在乳腺癌组织、乳腺纤维腺瘤组织以及癌旁正常乳腺组织中的表达均差异有统计学意义($P<0.05$),见表1。

表1 不同乳腺组织样本中各蛋白免疫组化表达情况比较

组别	例数	HGF		c-met		β-catenin	
		阳性/例	阳性率/%	阳性/例	阳性率/%	异常/例	异常率/%
乳腺癌	75	62	82.67	65	86.67	59	78.67
乳腺纤维腺瘤	60	29	48.33 ^①	33	55.00 ^①	25	41.67 ^①
癌旁正常乳腺组织	50	7	14.00 ^{①②}	10	20.00 ^{①②}	3	6.00 ^{①②}
χ^2 值		57.549		55.291		64.614	
P值		<0.001		<0.001		<0.001	

注:HGF为肝细胞生长因子,c-met为酪氨酸蛋白激酶MET,β-catenin为β连环素。

①与乳腺癌比较, $P<0.05$;②与乳腺纤维腺瘤比较, $P<0.05$ 。

2.2 三种组织中HGF、c-met、β-catenin mRNA相对表达情况 在乳腺癌、乳腺纤维腺瘤及癌旁正常乳腺组织中HGF、c-met mRNA相对表达量差异有统计学意义($P<0.05$),其中乳腺癌最高、乳腺纤维腺瘤次之;而乳腺癌、乳腺纤维腺瘤以及癌旁正常乳腺组织中β-catenin mRNA相对表达量比较差异无统

计学意义($P>0.05$)。见表2、图1。

表2 三种乳腺组织中HGF、c-met、 β -catenin mRNA
相对表达情况/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	HGF	c-met	β -catenin
乳腺癌	75	0.894±0.182	1.261±0.284	0.810±0.291
乳腺纤维腺瘤	60	0.521±0.094 ^①	0.877±0.206 ^①	0.794±0.316
癌旁正常乳腺组织	50	0.305±0.065 ^{①②}	0.512±0.117 ^{①②}	0.821±0.335
F值		319.778	170.383	0.106
P值		<0.001	<0.001	0.900

注:HGF为肝细胞生长因子,c-met为酪氨酸蛋白激酶MET, β -catenin为 β 连环素。

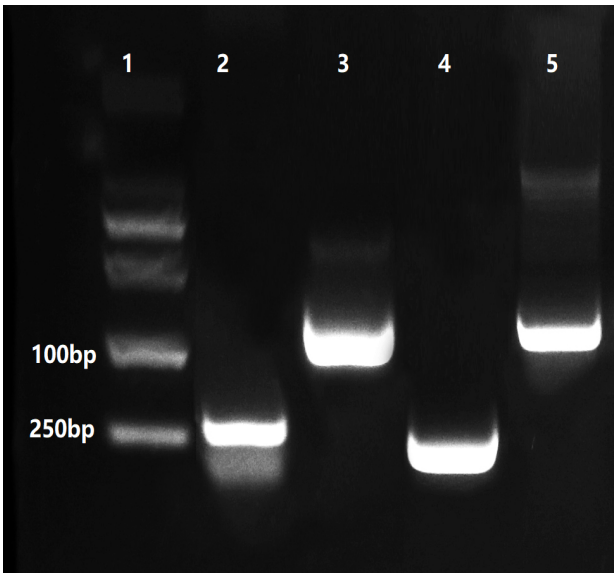
①与乳腺癌比较, $P<0.05$ 。②与乳腺纤维腺瘤比较, $P<0.05$ 。

2.3 HGF表达与乳腺癌病人病理相关性分析

HGF表达阳性率与病人TNM分期、淋巴结转移、肿瘤大小、ER表达、HER-2表达有关($P<0.05$) ; c-met蛋白表达阳性率与病人TNM分期、淋巴结转移密切相关($P<0.05$) ; β -catenin蛋白表达异常率与病人TNM分期、淋巴结转移、肿瘤大小密切相关($P<0.05$)。见表3。

3 讨论

目前乳腺癌治疗靶点的研究仍处于起步阶



注:1—DNA分子标记物(Maker);2—肝细胞生长因子(HGF);3—酪氨酸蛋白激酶MET(c-met);4— β 连环素(β -catenin);5—GAPDH。

图1 PCR显示HGF、c-met及 β -catenin在75例乳腺癌组织中的表达

段^[7-8]。HGF可以促进肿瘤细胞的增殖与转移,同时还可促进肿瘤组织周围血管以及淋巴管的形成,从而为肿瘤转移提供通道,对肿瘤的转移可能具有促进作用,并可能与乳腺癌恶变程度有关^[9-10]。HGF

表3 HGF、c-met、 β -catenin表达与乳腺癌病人75例临床病理相关性分析/例(%)

临床病理特征	例数	HGF			c-met			β -catenin		
		阳性	χ^2 值	P值	阳性	χ^2 值	P值	阳性	χ^2 值	P值
年龄			0.460	0.498		1.002	0.317		0.021	0.886
≥50岁	41	35(85.37)			37(90.24)			32(78.05)		
<50岁	34	27(79.41)			28(82.35)			27(79.41)		
TNM分期			6.362	0.012		7.274	0.007		5.872	0.015
I~II期	46	34(73.91)			36(78.26)			32(69.57)		
III~IV期	29	28(96.55)			29(100.00)			27(93.10)		
淋巴结转移			6.183	0.013		6.233	0.013		9.540	0.002
是	35	33(94.29)			34(97.14)			33(94.29)		
否	40	29(72.50)			31(77.50)			26(65.00)		
肿瘤大小			8.413	0.004		0.169	0.681		8.190	0.004
≥2 cm	33	32(96.97)			28(84.85)			31(93.94)		
<2 cm	42	30(71.43)			37(88.10)			28(66.67)		
ER			8.295	0.004		0.145	0.703		0.741	0.389
阳性	49	45(91.84)			43(87.76)			40(81.63)		
阴性	26	17(65.38)			22(84.62)			19(73.08)		
PR			0.300	0.584		0.132	0.716		0.021	0.886
阳性	34	29(85.29)			30(88.24)			27(79.41)		
阴性	41	33(80.49)			35(85.37)			32(78.05)		
HER-2			7.400	0.007		0.339	0.560		0.005	0.942
阳性	24	24(100.00)			20(83.33)			19(79.17)		
阴性	51	38(74.51)			45(88.24)			40(78.43)		
Ki-67			0.724	0.395		0.008	0.927		0.123	0.726
<14%	31	27(87.10)			27(87.10)			25(80.65)		
≥14%	44	35(79.55)			38(86.36)			34(77.27)		

注:HGF为肝细胞生长因子,c-met为酪氨酸蛋白激酶MET, β -catenin为 β 连环素,ER为雌激素受体,PR为孕激素受体,HER-2为人类表皮生长因子受体2(HER采用免疫组化检验,+++作为阳性),Ki-67为细胞增殖核抗原。

由间充质细胞所分泌,其受体 c-met 蛋白作为一种跨膜蛋白,在多种上皮细胞膜上均有表达^[11]。当 HGF 与 c-met 蛋白发生特异性结合之后,可激活 c-met 受体蛋白的酪氨酸激酶活性,调控肿瘤细胞的增殖与分化^[12]。 β -catenin 是一种重要的胞内蛋白,是具有癌基因潜能的转录激活蛋白,同时也是配体蛋白(Wnt)/连环蛋白(Catenin)信号通路中的一种信号转导分子,是细胞间重要的黏附分子之一,在肿瘤发生、发展、侵袭以及迁移过程中具有着重要作用^[13-14]。研究显示,HGF/c-met 介导的信号通路可促使 Wnt/Catenin 信号通路传导分子 β -catenin 酪氨酸残基发生磷酸化,使 β -catenin 不能与上皮钙黏素胞内部分结合形成复合体,从而降低细胞间黏附作用,而影响肿瘤组织的侵袭和迁移^[15-16]。

本研究结果显示,在乳腺癌组织中,HGF、c-met 蛋白表达阳性率显著高于乳腺纤维腺瘤以及癌旁正常乳腺组织,而 β -catenin 蛋白表达异常率(包括细胞膜表达缺失以及异位表达)显著高于乳腺纤维腺瘤以及癌旁正常乳腺组织。与学者相关研究^[17-18]结果相似,提示在乳腺癌中,HGF/c-met 信号通路处于高表达状态,且 β -catenin 异常表达明显升高。此外,RT-PCR 结果显示,HGF、c-met mRNA 相对表达量在乳腺癌组织中最高,乳腺纤维腺瘤次之,进一步证实了 HGF、c-met 在乳腺癌组织中的高表达;而 β -catenin mRNA 在三种不同组织中的相对表达含量无明显差异,可能考虑 β -catenin 在正常组织中均有表达,而在乳腺癌组织中出现表现为表达异常,通过 RT-PCR 法仅代表 mRNA 表达相对含量,而无法定位具体表达部位^[19]。

此外,本研究结果显示,HGF 表达阳性率与病人 TNM 分期、淋巴结转移、肿瘤大小、ER 表达、HER-2 表达有关($P < 0.05$);c-met 蛋白表达阳性率与病人 TNM 分期、淋巴结转移密切相关($P < 0.05$); β -catenin 蛋白表达异常率与病人 TNM 分期、淋巴结转移、肿瘤大小密切相关($P < 0.05$)。HGF、c-met、 β -catenin 蛋白与乳腺癌疾病进展、肿瘤侵袭转移具有着密切的联系^[20-21],其中 HGF 蛋白表达与 ER 表达、HER-2 表达有关,提示 HGF/c-met 信号通路、 β -catenin 蛋白可能为乳腺癌侵袭转移的调控机制之一,还需进一步深入研究分析。

综上所述,乳腺癌组织中 HGF、c-met 蛋白高表达而 β -catenin 蛋白异常表达,且 HGF/c-met 信号通路及 β -catenin 蛋白与乳腺癌侵袭转移密切相关。

参考文献

- [1] HUANG KH, SUNG IC, FANG WL, et al. Correlation between HGF/c-Met and Notch1 signaling pathways in human gastric cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(1):294-302.
- [2] 敬健雄,冯春红,张春燕,等.胆管癌组织中白细胞介素-6/Stat3 通路对 c-Met 的调控作用[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(9):2095-2097.
- [3] CASCONI T, XU L, LIN HY, et al. The HGF/c-MET pathway is a driver and biomarker of VEGFR-inhibitor resistance and vascular remodeling in non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(18):5489-5501.
- [4] 黄玉琴.卵巢癌组织中肝细胞生长因子及其受体 c-Met 的表达与临床意义[J]. *中国慢性病预防与控制*, 2017, 25(7):551-553.
- [5] 汤华.c-Met mRNA、HGF mRNA 的表达与宫颈癌患者盆腔淋巴结转移的相关性研究[J]. *中国妇幼保健*, 2017, 32(19):4830-4832.
- [6] YANG XP, LIU SL, XU JF, et al. Pancreatic stellate cells increase pancreatic cancer cells invasion through the hepatocyte growth factor /c-Met/survivin regulated by P53/P21 [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 357(1):79-87.
- [7] 徐建平,赵洁婷,叶伟,等.HGF、c-MET 及 VEGF 在非小细胞肺癌中的表达和意义[J]. *实用癌症杂志*, 2017, 32(4):528-530.
- [8] YIN B, LIU Z, WANG Y, et al. RON and c-Met facilitate metastasis through the ERK signaling pathway in prostate cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(6):3209-3218.
- [9] 赵杨,刘莎莎,徐树雷,等.食管癌中肝细胞生长因子及其受体的表达与淋巴管生成和淋巴结转移的关系[J]. *河北医学*, 2018, 24(1):26-30.
- [10] HAN SY, ZHAO W, HAN HB, et al. *Marsdenia tenacissima* extract overcomes Axl- and Met-mediated erlotinib and gefitinib cross-resistance in non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(34):56893-56905.
- [11] 赵玥,吴瑾.转移性肾癌的内科治疗及相关研究进展[J]. *癌症进展*, 2018, 16(7):807-811.
- [12] LEUNG E, XUE A, WANG Y, et al. Blood vessel endothelium-directed tumor cell streaming in breast tumors requires the HGF/C-Met signaling pathway[J]. *Oncogene*, 2017, 36(19):2680-2692.
- [13] 毛东,于江文,陆航.结肠高分化腺癌中肝细胞生长因子和间质表皮转化因子表达与增殖指数的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(4):918-919.
- [14] 乔银标,杨波.HGF/c-MET 信号通路抑制剂在抗胰腺癌中的研究进展[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2017, 44(4):304-306.
- [15] SUN Z, LIU Q, YE D, et al. Role of c-Met in the progression of human oral squamous cell carcinoma and its potential as a therapeutic target[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(1):209-216.
- [16] 邓佑兴,史惠蓉,李霞,等.沉默 MACC1 基因对人卵巢癌耐药细胞增殖、凋亡和侵袭的影响[J]. *山东医药*, 2017, 57(26):21-24.
- [17] 李仁琴,陈晓品. HGF/c-MET 抑制剂在晚期非小细胞肺癌中的治疗进展[J]. *临床肺科杂志*, 2017, 22(4):718-722.
- [18] YASUI H, OHNISHI Y, NAKAJIMA M, et al. Migration of oral squamous cell carcinoma cells are induced by HGF/c-Met signaling via lamellipodia and filopodia formation [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(6):3674-3680.
- [19] GAO F, DENG G, LIU W, et al. Resveratrol suppresses human hepatocellular carcinoma via targeting HGF-c-Met signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2):1203-1211.
- [20] 郭斌生,徐寒梅,欧瑜.靶向 HGF/c-Met 信号通路的抗体类抗肿瘤药物研究进展[J]. *药物生物技术*, 2017, 24(6):534-540.
- [21] WANG Z, HE C, LIU L, et al. PHA665752 inhibits the HGF-stimulated migration and invasion of cells by blocking PI3K/AKT pathway in uveal melanoma[J]. *Neoplasma*, 2017, 64(3):377-388.

(收稿日期:2019-10-08,修回日期:2020-01-03)