

肝细胞生长因子受体蛋白表达及基因突变 与胃癌临床病理特征的关系

宗桂娟^a, 尹海兵^a, 李春笋^a, 陈旭东^a, 陶玉^a, 杨磊^b, 赵斌^a, 何松^a

作者单位: 南通市肿瘤医院, ^a病理科, ^b肿瘤内科, 江苏 南通 226361

通信作者: 何松, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为消化道肿瘤、淋巴造血系统肿瘤, E-mail: ntzlyyhesong515@ntu.edu.cn

基金项目: 南通市科技项目(HS2015003)

摘要: **目的** 探讨肝细胞生长因子受体(c-Met)蛋白表达及基因突变与胃癌临床病理特征的关系及对胃癌发生发展的影响。**方法** 选取2016年1月至2017年12月南通市肿瘤医院胃癌病人246例。对手术切除的胃癌标本采用免疫组织化学法及荧光定量PCR法检测c-Met蛋白表达水平和基因突变状态。**结果** c-Met蛋白表达阳性率为83.3%, c-Met蛋白表达与病人性别、年龄、肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移、临床分期无明显关系($P > 0.05$); 与脉管侵犯有关($P < 0.05$); c-Met基因突变率与蛋白表达检出率差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** c-Met蛋白表达与脉管侵袭有关; 不同性别、年龄、组织分化之间的c-Met基因突变率差异不大, 且c-Met基因突变率与蛋白表达不一致。

关键词: 胃肿瘤/病因学; 原癌基因蛋白质 c-met; 肿瘤浸润; 基因突变

The relationship between c-Met protein expression and gene mutations and clinicopathological characteristics of gastric carcinoma

ZONG Guijuan^a, YIN Haibing^a, LI Chunsun^a, CHEN Xudong^a, TAO Yu^a, YANG Lei^b, ZHAO Bin^a, HE Song^a

Author Affiliation: ^aDepartment of Pathology, ^bDepartment of Oncology, Nantong Tumor Hospital,
Nantong, Jiangsu 226361, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between c-Met protein expression and gene mutations and clinicopathological features of gastric carcinoma, and their influence on the occurrence and development of gastric carcinoma. **Methods** A total of 246 patients with gastric cancer in Nantong Cancer Hospital from January 2016 to December 2017 were selected. The expression of c-Met protein and gene mutation status were detected by immunohistochemistry and real-time PCR on the surgically resected gastric cancer specimens. **Results** The expression of c-Met protein was not associated with gender, age, tumor size, degree of differentiation, clinical stage, and lymph node metastasis ($P > 0.05$); it was associated with vascular invasion ($P < 0.05$); c-Met gene mutation rate and protein expression test There was a statistically significant difference in the rate of outflow ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of c-Met protein is related to vascular invasion. There is no significant difference in the mutation rate between c-Met gene in different genders, ages and tissue differentiation, and the mutation rate of c-Met gene is inconsistent with protein expression.

Key words: Stomach neoplasms/etiology; Proto-oncogene proteins c-met; Neoplasm invasiveness; gene mutation

胃癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤之一, 其发病率和病死率逐年上升, 严重危害人类健康^[1]。目前, 手术治疗是早中期胃癌首选的治疗方法, 而晚期胃癌的治疗则采用以化疗联合靶向治疗为主的综合治疗。过去几十年, 随着肿瘤生物学的快速发展以及肿瘤分子标志物的不断涌现, 使众多靶向药物应运而生, 如表皮生长因子(EGFR)、肝细胞生长因子受体(c-Met)以及胰岛素样生长因子受体等^[2]。c-Met蛋白是酪氨酸激酶受体超家族成员之一, 由Met原癌基因编码, 是具有磷酸化活性的跨膜受体。它广泛存在于各种细胞中, 并对组织生长发育有着重要的

生理调节作用^[3]。c-Met与胃肠肿瘤(包括胃癌、结直肠癌、肝外胆管癌等)密切相关, 在胃癌中表现为过度表达, 但胃癌组织中c-Met蛋白表达及基因突变的临床意义鲜有报道^[4]。本实验选用c-Met单克隆抗体特异性地检测胃癌组织中c-Met蛋白表达水平, 将其与病人临床病理参数进行相关性分析, 分析c-Met基因突变与蛋白表达水平是否存在相关性。旨在探讨胃癌发展过程中c-Met的蛋白表达及基因突变的临床意义, 为临床个性化的诊治提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2016年1月至2017年12月南

通市肿瘤医院住院的胃癌病人246例。其中男181例,女65例。中位年龄66岁,年龄范围为40~88岁。纳入标准:无合并其他恶性肿瘤或者胃癌复发后再次手术者,临床病理资料完整,术前未行放化疗及其他抗肿瘤治疗,手术病理诊断明确为胃癌。病人或近亲属对研究方案签署知情同意书。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 主要试剂与仪器 免疫组化所用抗体即用型试剂盒和一抗均购自Life technologies公司;人组织基因组核酸提取试剂盒(货号为DE02003)及核酸提取仪均来自上海科亦生物科技有限公司;DAKO Omnis全自动免疫组化染色仪;ABI9600PCR仪。

1.3 免疫组化 免疫组化染色采用EnVision(二步法)完成。c-Met一抗工作浓度为1:500,抗原修复方式为热修复(Tris EDTA pH9.0)97℃,30 min。具体操作步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.4 免疫组化结果判读 组织样本来自胃癌病人手术切除的标本。c-Met的表达以细胞质(部分为细胞膜)呈棕黄色或棕褐色为阳性染色。每份标本置高倍镜下选取5个不同视野,每个视野计数200个肿瘤细胞,由两位病理医师进行盲法判读,计算阳性肿瘤细胞所占的百分数。结果分为4级:未见明显阳性细胞为“-”;阳性细胞数<25%为“+”;25%~50%为“2+”;>50%为“3+”;阳性标准定为2+或3+[5]。

1.5 荧光定量PCR 基因组DNA的提取按照试剂盒说明书进行;本实验所用引物为,正向5'-CAG GAT TGA TTG CTG GTG T-3'和反向5'-AAC AAT GTC ACA ACC CAC TG-3';20 μL PCR反应体系包括10 μL的2×Expfu Mix、15 pmol的上游引物、15 pmol的下游引物和3 μL的样品,加入PCR水体系补足至20 μL;PCR程序如下:95℃预变性5 min,接着进行35个扩增循环:95℃10 s,58℃35 s,72℃15 s,随后72℃5 min延伸。

1.6 统计学方法 应用SPSS 2.0软件进行数据处理及统计学分析,计数资料以例数或百分率表示,结果比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 c-Met蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系 根据病人的性别、年龄、肿瘤大小、分化程度、临床分期、有无淋巴结转移、有无脉管侵犯等病理参数,将246例病人标本进行分组。统计学分析结果显示c-Met蛋白表达阳性率为83.3%,且与病人性别、年龄、肿瘤大小、分化程度、临床分期、有无淋巴结转

移无明显关系($P>0.05$);与脉管侵犯密切相关($P<0.05$)。各组c-Met蛋白表达情况见表1。

表1 c-Met蛋白表达与胃癌临床特征的相关性/例

临床病理特征	例数 246	C-met表达		χ^2 值	P值
		阴性	阳性		
性别				0.106	0.746
女	65	10	55		
男	181	31	150		
年龄				0.132	0.717
<60岁	47	7	40		
≥60岁	199	34	165		
肿瘤直径				0.030	0.862
<5 cm	147	24	123		
≥5 cm	99	17	82		
组织学分级				1.272	0.260
中高分化	72	9	63		
低分化	174	32	142		
脉管侵犯				5.055	0.025
无	103	22	81		
有	143	19	124		
淋巴结转移				2.212	0.137
无	65	7	58		
有	181	34	147		
临床分期				1.051	0.305
I~II	83	11	72		
III~IV	163	30	133		
基因状态				6.127	0.013
野生型	177	23	154		
突变型	69	18	51		

2.2 不同年龄、性别、组织学分级胃癌c-Met基因突变情况 基因检测突变率为28%,通过分析发现c-Met基因突变频率在不同性别($P=0.473$)、年龄($P=0.251$)及组织学分级($P=0.709$)胃癌病人中无明显差异。各组c-Met基因突变频率见表2。

2.3 c-Met基因检测与蛋白表达的相关性 基因检测c-Met突变69例,其中35例免疫组化检测结果为2+,3例免疫组化检测结果为3+,即免疫组化结果与基因检测结果相同者38例。根据 χ^2 检验结果,c-Met基因检测与蛋白表达的检出率差异有统计学意义($\chi^2=5.369$, $P=0.021$),两者关联性低,见表3。

3 讨论

近年来分子靶向治疗是胃癌治疗研究的热点,HGF/c-Met信号通路抑制剂作为治疗胃癌潜在突破口,主要包括以下三种类型(1)抗HGF单克隆抗体,如rilotumumab、ficlatuzumab和TAK-701[6];(2)抗c-Met单克隆抗体,如Onartuzumab/MetMab[7];(3)小分子酪氨酸酶抑制剂,主要阻止c-Met激酶的激活,

表2 胃癌病人中不同年龄、性别、组织学分级群体中 c-Met 基因的突变频率/例(%)

c-Met 突变	年龄		性别		组织学分级	
	≥60岁(n=199)	<60岁(n=47)	男(n=181)	女(n=65)	中高分化(n=72)	低分化(n=174)
C.2942-18T>A	44(22.11)	7(14.89)	41(22.65)	10(15.38)	15(20.83)	36(20.69)
C.2942-35G>A	12(6.03)	2(4.25)	8(4.41)	6(9.23)	3(4.17)	11(6.32)
C.2942-36C>T	1(0.50)	0(0.00)	1(0.55)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.57)
C.2942-18T>A&C.2942-20T>A	2(1.01)	0(0.00)	2(1.10)	0(0.00)	1(1.39)	1(0.57)
C.2942-35G>A&C.2942-18T>A	0(0.00)	1(0.50)	1(0.55)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.57)
合计	29.65	21.27	29.28	24.61	26.39	28.74

表3 c-Met 基因突变及 c-Met 蛋白表达分布/例(%)

c-Met 蛋白表达	c-Met基因状态	
	野生	突变
阴性(0、1+)	52(29.38)	31(44.93)
阳性(2+、3+)	125(70.62)	38(55.07)

如 PHA-6657520^[8]。因此检测胃癌组织中 c-Met 蛋白表达水平及基因突变情况,筛选潜在的受益病人,选择合适的靶向治疗方案,对指导临床个体化治疗尤为重要。c-Met 作为原癌基因编码的蛋白质,被称为肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)特异性的细胞膜受体,两种蛋白结合组成信号通路可以参与调控多种细胞的增殖、分化及运动改变^[9]。在持续异常刺激后,使得 HGF/c-Met 过度激活引发下游 Ras/MAPK、PI3K/Akt 等信号通路激活,促进细胞分裂、诱导上皮细胞迁移和侵袭、促进细胞外基质降解等最终诱导细胞癌变^[10]。因此研究 c-Met 在胃癌发生发展中的作用及对胃癌靶向治疗具有重要的临床意义。

研究表明在结肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤组织中 c-Met 过表达与病人不良预后呈正相关^[11-12]。2016 年谷光福等采用免疫组化分析 129 例胃癌病人临床资料发现 c-Met 阳性表达率为 82.9%,且 c-Met 蛋白过表达与肿瘤淋巴结转移、TNM 分期、OS、DFS 显著相关^[13]。本研究结果显示 246 例胃癌组织中 c-Met 阳性表达率为 83.3%,c-Met 蛋白表达与病人性别、年龄、肿瘤大小、分化程度、有无淋巴结转移无明显关系($P>0.05$);但 c-Met 蛋白过表达与脉管侵犯密切相关($P<0.05$),表明 c-Met 过表达可以促进胃癌的侵袭。c-Met 基因突变率为 28%,而 c-Met 基因突变与性别、年龄及组织学分化均无明显关系。

本实验采用免疫组化法检测 c-Met 蛋白的阳性率为 83.3%,且 c-Met 蛋白过表达仅与脉管侵犯密切相关,其中阳性率与国外相关研究的结果存在不一致^[2,14-15],主要原因除免疫组化检测所用的抗体及方法有关外,还可能与免疫组化阳性判读标准不一有关。此外,本研究结果显示胃癌组织中 c-Met 基因

突变率较低,而 c-Met 蛋白阳性率远高于基因突变率,主要是由于基因表达是从 DNA 转录翻译至蛋白质过程,其中蛋白质的形成过程既可以受转录调控也可以受外界调控因素的影响。因此 c-Met 的免疫组化结果不能替代基因检测结果,对于考虑选用抗 c-Met 单克隆抗体治疗的病人,可以检测 c-Met 基因状态。本组 69 例 c-Met 基因突变的胃癌组织中,38 例 c-Met 蛋白过表达,提示免疫组化法检测 c-Met 对筛查 c-Met 基因突变的胃癌病人并没有甄别作用。

总之,c-Met 基因突变与 c-Met 蛋白过表达具有不一致性。由于 c-Met 可能参与了胃癌的侵袭,因此检测 c-Met 蛋白表达情况可以有助判断病人的发展及预后情况。而检测 c-Met 基因状态对临床指导选用抗 c-Met 单克隆抗体治疗的胃癌病人尤为重要。

参考文献

[1] CHEN WQ, ZHENG RS, BAADE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[2] LIU YJ, SHEN D, YIN X, et al. HER2, MET and FGFR2 oncogenic driver alterations define distinct molecular segments for targeted therapies in gastric carcinoma[J]. Br J Cancer, 2014, 110(5): 1169-1178.

[3] BIRCHMEIER C, BIRCHMEIER W, GHERARDI E, et al. Met, metastasis, motility and more[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(12): 915-925.

[4] SIERRA JR, TSAO MS. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer[J]. Ther Adv Med Oncol, 2011, 3(1 Suppl): S21-35.

[5] FROMOWITA FB, VIOLA MV, CHAO S, et al. ras p21 expression in the progression of breast cancer[J]. Hum Pathol, 1987, 18(12): 1268-1275.

[6] TENG L, LU J. cMET as a potential therapeutic target in gastric cancer (Review)[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(6): 1247-1254.

[7] SATTler M, MA PC, SALGIA R. Therapeutic targeting of the receptor tyrosine kinase Met[J]. Cancer Treat Res, 2004, 119: 121-138.

[8] CECCHI F, RABE DC, BOTTARO DP. Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(6): 553-572.

[9] HUH CG, FACTOR VM, SANCHEZ A, et al. Hepatocyte growth

- factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair[J].Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(13): 4477-4482.
- [10] BRINKMANN V, FOROUTAN H, SACHS M, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells[J].J Cell Biol, 1995, 131(6 Pt 1): 1573-1586.
- [11] ZENG ZS, WEISER MR, KUNTZ E, et al. c-Met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases[J].Cancer Lett, 2008, 265(2): 258-269.
- [12] LENGUEL E, PRECHTEL D, RESAU JH, et al. c-Met overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu[J].Int J Cancer, 2005, 113(4): 678-682.
- [13] 谷光福, 朱正秋. MACC1、HGF、c-Met蛋白在胃癌组织中的表达及意义[J].胃肠病学和肝病学杂志, 2016, 25(11): 1229-1232.
- [14] KUROKAWA Y, MATSUURA N, KAWABATA R, et al. Prognostic impact of major receptor tyrosine kinase expression in gastric cancer[J].Ann Surg Oncol, 2014, 21 Suppl 4: S584-590.
- [15] PENG Z, LI Z, GAO J, LU M, et al. Tumor MET Expression and Gene Amplification in Chinese Patients with Locally Advanced or Metastatic Gastric or Gastroesophageal Junction Cancer [J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(11): 2634-2641.
- (收稿日期: 2019-04-09, 修回日期: 2019-06-15)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.11.015

◇临床医学◇

多层螺旋CT与磁共振成像诊断胰腺神经内分泌肿瘤及其对病理分级的临床价值

王海彬, 段成洲, 崔振华

作者单位: 安阳市肿瘤医院影像科, 河南 安阳 455000

通信作者: 段成洲, 男, 主任医师, 研究方向为肿瘤的影像诊断, CT引导下的穿刺活检及肿瘤的微创治疗, E-mail: ayduancz@126.com

摘要: **目的** 探讨多层螺旋CT(MSCT)与磁共振成像(MRI)诊断胰腺神经内分泌肿瘤(pNENs)及其对病理分级的临床价值。**方法** 回顾性分析2015年6月至2018年6月安阳市肿瘤医院收治的64例pNENs病人临床资料, 所有病人均行MSCT、MRI检查。以病理检查作为金标准, 评估不同影像学检查诊断pNENs的准确性及评估不同病理分级的价值。**结果** ①MSCT与MRI诊断pNENs的总体检出率(87.50%比89.06%)、敏感性(83.82%比85.29%)对比, 均差异无统计学意义($P > 0.05$); ②不同级别pNENs的直径、病灶边缘、病灶形状、主胰管扩张和远处转移比例对比, 均差异有统计学意义($P < 0.05$); 不同级别pNENs部位和囊变坏死比例对比, 差异无统计学意义($P > 0.05$); MSCT影像表现中, 不同级别pNENs动脉期和门脉期CT绝对强化值对比, 差异有统计学意义($P < 0.05$); MRI影像表现中, 不同级别pNENs动脉期和门脉期高信号比例对比, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** MSCT与MRI均能有效诊断pNENs, 评估其病理分级。

关键词: 胰腺肿瘤; 体层摄影术, 螺旋计算机; 磁共振成像; 诊断; 病理分级

Clinical value of MSCT and MRI in the diagnosis of pancreatic neuroendocrine neoplasms and pathological grades

WANG Haibin, DUAN Chengzhou, CUI Zhenhua

Author Affiliation: Department of Imaging, Anyang Tumor Hospital, Anyang, Henan 455000, China

Abstract: Objective To explore the clinical value of multi-slice spiral CT (MSCT) and magnetic resonance imaging (MRI) in the diagnosis of pancreatic neuroendocrine neoplasms (pNENs) and pathological grades. **Methods** The clinical data of 64 patients with pNENs admitted to Anyang Tumor Hospital between June 2015 and June 2018 were retrospectively analyzed. All patients underwent MSCT and MRI examination. Pathological examination was used as the gold standard to evaluate the accuracy of different imaging examinations in the diagnosis of pNENs and to evaluate the value of different pathological grades. **Results** There were no statistically significant differences in the overall detection rate (87.50% vs. 89.06%) and sensitivity (83.82% vs. 85.29%) of MSCT and MRI ($P > 0.05$). There was no significant difference in the proportions of diameter, lesion margin, lesion shape, main pancreatic duct dilatation and distant metastasis of pNENs at different grades ($P < 0.05$). There were no significant differences in the proportions of sites and cystic necrosis of pNENs at different grades ($P > 0.05$). In MSCT imaging, there were statistically significant differences in the CT absolute enhancement value of pNENs arterial phase and portal phase ($P < 0.05$). In MRI imaging, there was a statistically significant difference in the proportion of high signal in pNENs arterial phase and portal phase ($P < 0.05$). **Con-**