

· 基础研究 ·

HGF、c-met 蛋白在家兔颊黏膜癌变过程中的表达*

徐志彬¹, 赵鹏², 高扬¹, 王士杰¹, 吴明利^{1△}

(1. 河北医科大学第四医院内镜科, 河北石家庄 050011; 2. 河北联合大学附属医院普外科, 河北唐山 063000)

摘要:目的 探讨肝细胞生长因子(HGF)、c-met 蛋白在家兔口腔颊黏膜鳞状上皮细胞癌变过程中的表达。方法 将含有致癌剂二甲苯并蒽(DMBA)的溶液及药膜涂抹或贴附于家兔口腔颊黏膜后,应用 DMBA 16 周后,作病理组织学检查和免疫组织化学检查。结果 口腔颊黏膜中、重度不典型增生发生率达 64.6%,不典型增生程度越重,HGF 及 c-met 蛋白表达率越高,染色越明显。结论 应用致癌剂 DMBA 可初步构建家兔口腔颊黏膜鳞状上皮癌前病变模型,在癌变过程中间质成纤维细胞分泌的细胞因子可能起到重要的促进作用。

关键词:口腔黏膜;9,10-二甲苯-1,2-苯并蒽;肝细胞生长因子;癌前病变;c-met

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.14.014

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)14-1601-03

Expression of HGF and c-met protein in rabbit buccal mucosa precancerous lesion*

Xu Zhibin¹, Zhao Peng², Gao Yang¹, Wang Shijie¹, Wu Mingli^{1△}

(1. Department of Endoscopy, Fourth Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China; 2. Department of General Surgery, Affiliated Hospital, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To study the expression of hepatocyte growth factor(HGF) and c-met protein in squamous epithelial cells of oral buccal mucosa during the canceration process. Methods Solution and drug membrane containing carcinogenic agent dimethyl-benzanthracene(DMBA) were attached with rabbit oral cavity cheek mucosa. 16 weeks later, the pathological and immunohistochemical examinations were performed. Results Severe atypical hyperplasia rate of oral buccal mucosa reached 64.6%. The more severe the atypical hyperplasia was, the higher the HGF and c-met protein expression rate and the stronger the staining. Conclusion The application of carcinogenic agent DMBA could preliminarily form the squamous epithelial pre-cancerous lesion model of oral buccal mucosa. Cytokines secreted by stromal fibroblasts may play an important role in the progress of cancerogenesis.

Key words: buccal mucosa; 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene; hepatocyte growth factor; precancerous lesion; c-met

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是一种多功能的生长因子,由肝细胞及间质细胞产生,与上皮细胞表面受体 c-met 蛋白结合后,促进上皮细胞发生分散,增强细胞的运动性,促进细胞的增殖、分化。近年研究表明,HGF、c-met 蛋白除参与调解细胞正常黏附、分化和迁移外,也参与细胞的恶性转化,促进多种肿瘤细胞的增殖、转移,包括胃癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、胰腺癌以及中枢神经系统肿瘤等。既往有研究报道 HGF、c-met 通路在病理类型为鳞状细胞癌的人鼻咽癌^[1]、食管癌^[2]癌组织及转移淋巴结中高表达,与病变分期明显相关,HGF、c-met 蛋白可能在癌细胞增殖和侵袭转移过程中起调节作用,HGF、c-met 蛋白过度表达者,癌组织血管生成能力显著增强,癌细胞增殖活跃,更易发生转移。学者们较多的关注于癌变过程中上皮细胞的癌基因及抑癌基因的表达,而对于鳞状上皮细胞癌变起始阶段,尤其是上皮下间质细胞对于上皮细胞的癌变是否起到了助长作用的研究较少。本研究采用免疫组织化学染色方法,观察 HGF、c-met 蛋白通路在家兔口腔颊黏膜鳞状上皮癌前病变的表达情况,以探讨间质细胞分泌的细胞因子 HGF 对鳞状上皮细胞癌变的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 大耳白家兔 60 只,购自河南华兴实验动物养殖场,体质量 1.5~2 kg,8~12 周龄,雌雄各半。二甲苯并蒽(9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene, DMBA)为瑞士 Fluka 公司生产,DMBA 药膜及 DMBA 丙酮溶液均由河北医科大学附属第四医院制剂室配制。HGF 羊多克隆抗体购自北京中衫金

桥生物技术有限公司,c-met 蛋白兔抗兔多克隆抗体购自武汉博士德公司,4℃冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及方法 将实验动物随机分为 3 组,对照组(n=12),涂药组(n=24),贴膜组(n=24)。实验均在家兔右侧颊黏膜实施,涂药和贴膜前均进行处理,由助手固定家兔并暴露右侧颊黏膜,4%利多卡因表面浸润麻醉后,用细胞刷磨涂药处黏膜,达到近出血程度以利于药物的吸收。涂药组用自制涂药器涂抹 0.5%DMBA 丙酮溶液,每次 0.1 mL,隔天 1 次,3 次/周。贴膜组贴 0.5 cm² DMBA 药膜,隔天 1 次,3 次/周,实验 16 周。贴膜后用自制口腔固定器固定家兔口腔 10 min,防止药膜移位。对照组不给任何处理。观察、记录家兔双侧颊黏膜的色泽、粗糙度及黏膜完整性,第 16 周取活体组织做组织病理检查及免疫组织化学检查。

1.2.2 判定标准 病理诊断按 1987 年 12 月全国实验肿瘤专题座谈会标准^[3]:根据细胞的异型程度及所累及上皮层的深度将不典型增生分成 3 个级别,轻度不典型增生(mild dysplasia, mD)为受累范围不超过上皮 1/3 层,中度不典型增生(moderate dysplasia, MD)为不超过上皮 2/3 层,重度不典型增生(severe dysplasia, SD)为超过 2/3 层受累,甚至全层,但未突破基底膜。免疫组织化学标准:HGF 表达阳性细胞,细胞质染色成棕黄色颗粒,c-met 蛋白的阳性表达以细胞质为主,根据表达阳性细胞占全部病变细胞的百分比分级^[4],(-)为阳性细胞小于或等于 10%或无;(+)为阳性细胞占 >10%~50%;(++)

为阳性细胞占 $>50\% \sim 75\%$; (+++) 为阳性细胞大于 75%。(一) 者为阴性表达组, (+)~(+++) 者为阳性表达组。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行处理, 采用 χ^2 检验, fisher 精确检验、斯皮尔曼相关, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理学结果 涂药组: 颊黏膜充血糜烂, 附着白苔, 8 周后黏膜粗糙, 失去光泽和弹性, 病理学为单纯性增生, 16 周时全组均出现不同程度不典型增生, 中、重度不典型增生发生率为 58.3% (14/24)。贴膜组: 8 周后黏膜混浊、无光泽。16 周时出现黏膜白斑, 中、重度不典型增生发生率为 70.8% (17/24)。涂药组和贴膜组共发生中、重度不典型增生 31 例 (64.6%)。16 周时, 涂药及贴膜组不典型增生发生率与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 见表 1。

表 1 16 周时 3 组家兔颊黏膜病理结果比较 [$n(\%)$]

组别	<i>n</i>	正常组织	mD	MD	SD
对照组	12	11(91.7)	1(8.3)	0(0.0)	0(0.0)
涂药组	24	1(4.2)	9(37.5)*	9(37.5)*	5(20.8)*
贴膜组	24	0(0.0)	7(29.2)*	10(41.7)*	7(29.2)*

*: $P<0.01$, 与对照组比较。

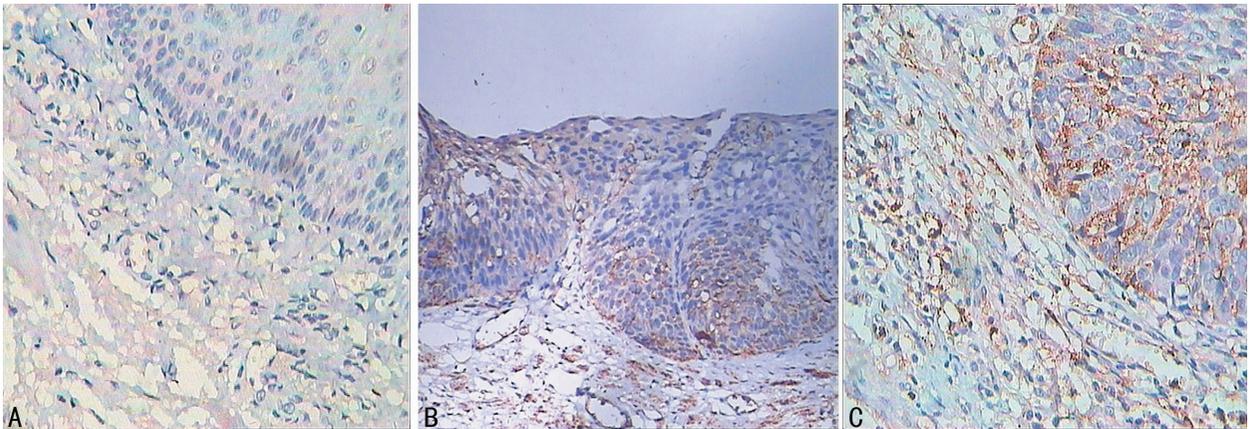
2.2 免疫组织化学检测结果 HGF 蛋白主要定位于细胞膜和细胞质上, c-met 蛋白主要分布于细胞质中, 在部分包膜中也有表达, 二者呈棕黄或棕色颗粒状。正常组织中 HGF、

c-met 蛋白不表达或表达强度极弱; 轻度不典型增生组织中, HGF 表达阳性率为 17.6% (3/17), c-met 蛋白表达阳性率为 23.5% (4/17); 中度不典型增生组织中 HGF、c-met 蛋白阳性表达, 间质内也可见阳性染色, HGF 蛋白表达阳性率为 26.3% (5/19), c-met 蛋白表达阳性率为 31.6% (6/19); 重度不典型增生组织中 HGF、c-met 蛋白阳性表达, 间质内也可见阳性染色, HGF 蛋白表达阳性率为 41.7% (5/12), c-met 蛋白表达阳性率为 66.7% (8/12) (图 1、2)。随着病变的加重, 两种蛋白的阳性表达率逐渐升高, HGF 蛋白在间质中也可见表达, 染色强度也加深。与正常组织比较, 重度不典型增生组织中 c-met 蛋白表达差异有统计学意义 ($P<0.05$), 而轻、中度不典型增生组织中 HGF、c-met 两种蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。HGF、c-met 两种蛋白在鳞状上皮癌变过程中表达逐渐升高, 且呈正相关, 见表 2。

表 2 HGF 及 c-met 蛋白在不同颊黏膜组织中的表达

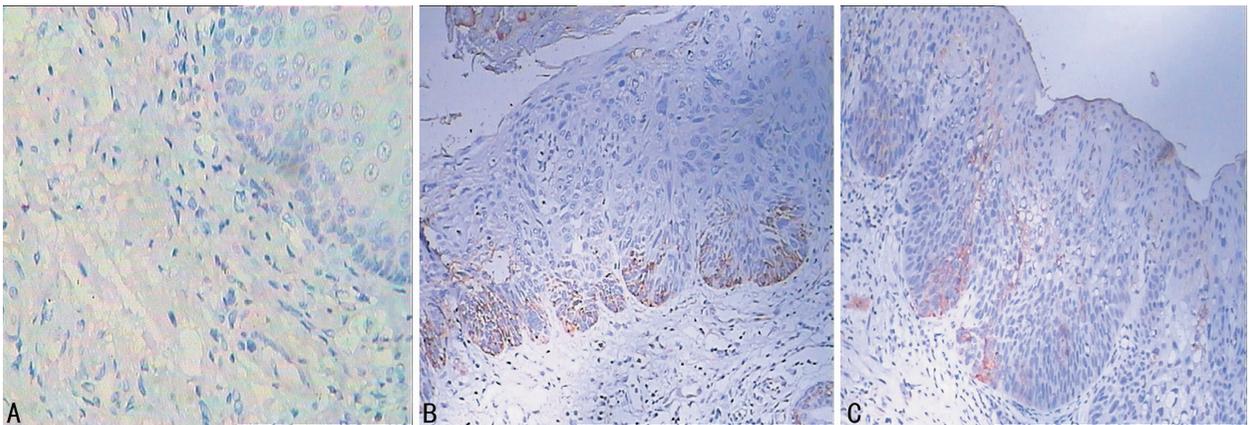
分级	<i>n</i>	HGF 蛋白		<i>P</i>	c-met 蛋白		<i>P</i>	<i>r</i>
		阳性	阴性		阳性	阴性		
正常组织	12	1	11	—	1	11	—	—
mD	17	3	14	0.620	4	13	0.370	0.683
MD	19	5	14	0.360	6	13	0.200	0.729
SD	12	5	7	0.150	8	4	0.009	0.237

—: 此项无数据。



A: 正常组织; B: 中度不典型增生组织; C: 重度不典型增生组织。

图 1 HGF 蛋白在不同颊黏膜组织中的表达 (免疫组化 $\times 200$)



A: 正常组织; B: 轻度不典型增生组织; C: 中度不典型增生组织。

图 2 c-met 蛋白在不同颊黏膜组织中的表达 (免疫组化 $\times 200$)

3 讨 论

DMBA 是多环芳烃类致癌物,可与组织 DNA 形成加合物,导致基因突变,引发细胞增殖和凋亡紊乱。既往实验表明,DMBA 可诱发多种动物组织器官发生癌变^[5-7]。本实验结果表明,随着实验的进展,涂药时间的延长,家兔颊黏膜不典型增生程度加重,不典型增生发生率逐步增高;DMBA 涂药、贴膜两种给药方法在导致癌前病变的效果上无明显差异,贴膜法略好于涂药法。DMBA 诱癌过程中,实验预处理即刷拭拟给药处黏膜,在诱癌过程中可能起一定作用,(1)黏膜刷拭可破坏黏膜屏障,致癌物容易进入细胞内;(2)黏膜刷拭可导致组织机械损伤,刺激细胞增生,而增生的细胞,特别是细胞周期 S 期前的细胞因其 DNA 处于复制前准备阶段,易受到致癌物的攻击,且 DNA 的改变常可经细胞分裂传给子代细胞而被固定,细胞表型发生改变,使诱癌成功。解京丰等^[8]用 0.5%DMBA 丙酮抹地鼠颊囊口中央,每周 3 次,共涂抹 6 周。随机活检,证实 50%的动物致癌剂涂抹部位镜下表现为上皮轻度异常增生,停止涂抹后,病变继续发展,约 3 个月后,100%的病变发生癌变,本组未能诱导出癌,可能与动物种类及作用部位差异较大有关。

以往肿瘤的研究多集中于上皮细胞的恶变及浸润转移,而对于间质细胞的研究较少,尤其是其在癌变的起始阶段的作用。HGF 主要由间质细胞表达,是一种具有多种功能的细胞因子,与特异性 c-met 受体结合后能激活多种细胞内信号通路,包括丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)和 Stat3 等通路,促进多种组织细胞增生分裂、促细胞运动和促血管生成等。HGF 受体 c-met 广泛存在于多种正常组织细胞和体内、外恶性肿瘤细胞内,多位学者利用组织原位杂交、southern 印迹、northern 印迹技术测定了 c-met mRNA 及其表达的定位、定量,发现肿瘤组织细胞内的表达量,明显高于正常组织细胞^[9-10],尤其在肿瘤侵袭的边缘,其表达更为明显。Ntoulia 等^[11]研究发现在上皮细胞中,HGF 显著增加它本身及其特异受体 c-met 的表达,体外实验表明,c-met 的配体-间质细胞产生的 HGF 可激活 c-met 蛋白的激酶活性,而且极微量的 HGF 可激活 c-met 蛋白酪氨酸激酶。由此可见,HGF 与 c-met 结合可形成 HGF-c-met 自分泌环信号通路。本实验发现,正常家兔颊黏膜组织基本不表达 HGF 及 c-met,而随着病变的进展,鳞状上皮由轻度不典型增生发展到中度不典型增生,直至重度不典型增生过程中,HGF 及 c-met 蛋白表达阳性率均逐渐升高,二者呈正相关,同时 HGF 在间质中的表达随病变进展,阳性率逐渐增高,染色强度加深,而 c-met 在上皮中的表达亦可见类似情形,本结果与庄小强等^[12]对胃组织的研究一致,浅表性胃炎中 c-met 基因表达率较低,随着从肠上皮化生-不典型增生-癌变的演变,阳性表达率逐步升高。本研究发现在癌前病变组织中 HGF 与 c-met 蛋白表达呈正相关,提示在癌前病变组织中,间质细胞分泌的细胞因子 HGF 与上皮

细胞 c-met 蛋白的高表达密切相关,促进了细胞的增殖及异型改变,HGF、c-met 蛋白通路在肿瘤的早期阶段即对上皮细胞的恶变起到了促进作用,而开发阻断 HGF 配体、c-met 受体的药物为预防及治疗口腔癌、食管癌等鳞状上皮细胞癌变提供了一新的思路。

参考文献:

- [1] 刘崇梅,于惠芝,林明晖,等. HGF/c-Met 系统在鼻咽癌中的表达及其与增殖细胞核抗原的关系[J]. 现代肿瘤医学,2009,17(11):2087-2090.
- [2] 秦艳茹,李永欣,王立东,等. 食管癌和淋巴结转移组织中 c-myc,hTERT 和 c-MET 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报:医学版,2006,41(1):34-36.
- [3] 高进. 肿瘤学基础与研究方法[M]. 北京:人民卫生出版社,1999.
- [4] 尹芳,乔泰东,时永全,等. 紧密连接分子 Occludin mRNA 在胃癌中的表达和分布[J]. 中华肿瘤杂志,2002,24(6):41-44.
- [5] 沈忠飞,方马荣,张梅光,等. 二甲基苯并蒽诱发卵巢恶性肿瘤的动物实验[J]. 中华妇产科杂志,2006,41(8):572-573.
- [6] 李宁,陈晓欣,韩驰,等. DMBA 诱发的地鼠口腔癌发病机制研究[J]. 癌变. 畸变. 突变,2003,15(1):21-24,65.
- [7] 崔文明,张馨,刘立军,等. DMBA 诱发的地鼠口腔癌模型中生物标志物研究[J]. 北京口腔医学,2002,10(3):116-118.
- [8] 解京丰,章魁华. 实验性口腔黏膜癌前病变的裸鼠移植[J]. 中华口腔医学杂志,1989,24(3):149-151.
- [9] Tokunou M,Niki T,Eguchi K,et al. c-MET expression in myofibroblasts;role in autocrine activation and prognostic significance in lung adenocarcinoma[J]. Am J Pathol,2001,158(4):1451-1463.
- [10] 董彤,辛晓燕,马向东. 肝细胞生长因子及其受体 c-met 在卵巢癌细胞中的表达[J]. 肿瘤与临床,2006,18(8):541-543.
- [11] Ntoulia M,Stathopoulou A,Ignatiadis M,et al. Detection of mammaglobin A-mRNA-positive circulating tumor cells in peripheral blood of patients with operable breast Cancer with nested RT-PCR[J]. Clin Biochem,2006,39(9):879-887.
- [12] 庄小强,郑杰,林三仁,等. 胃癌及癌前黏膜病变与 c-met 原癌基因表达的关系及预后研究[J]. 中华普通外科杂志,2002,17(2):107-108.

(收稿日期:2012-09-08 修回日期:2013-01-22)

(上接第 1600 页)

- [7] Han LN,Liu J,Wang S,et al. The changes of neuronal activity of the zone incerta in a rodent model of Parkinson's disease[J]. Acad J Xi'an Jiaotong Univ:English edition,2008,20(2):71-75.
- [8] 郭晓妹,方海立,李军,等. 颈交感神经阻滞对烧伤早期小鼠肝脏干扰素诱导蛋白 IFIT1 表达的影响[J]. 第三军医

大学学报,2007,29(17):1647-1649.

- [9] 陆建华,粟永萍,陶军,等. 颈交感神经阻滞调节放烧复合伤小鼠巨噬细胞 GR 的表达及细胞因子分泌的影响[J]. 第三军医大学学报,2007,29(4):284-286.

(收稿日期:2012-09-18 修回日期:2013-01-26)