

· 临床研究 ·

肝细胞生长因子及其受体与神经纤毛蛋白 1 在骨肉瘤中的表达及意义

吴同申¹, 孟彦², 彭圣智³

(1. 济宁医学院附属医院骨科, 山东济宁 272029; 2. 山东大学第二医院骨科, 济南 250033;

3. 济宁医学院病理学教研室, 山东济宁 272067)

摘要:目的 检测骨肉瘤组织中肝细胞生长因子(HGF)、肝细胞生长因子受体(C-met)和神经纤毛蛋白 1(NRP1)的表达特征,探讨三者的关系及临床意义。方法 选择 70 例骨肉瘤术后留取的蜡块及临床资料作为观察组,选择 50 例成熟的骨组织脱钙后的蜡块及临床资料作为对照组,应免疫组织化学技术检测 2 组中 HGF、C-met 和 NRP1 蛋白的表达,探讨 HGF、C-met 和 NRP1 在肿瘤患者不同临床病理特征的表达差别及其相关性。结果 观察组中 HGF、C-met 和 NRP1 蛋白表达的阳性率明显高于对照组,观察组中 HGF、C-met 和 NRP1 蛋白表达的阳性率与肿瘤的转移、脉管浸润、临床分期及 Ki67 的表达密切相关。观察组中 HGF、C-met 和 NRP1 之间的表达具有正相关性。结论 骨肉瘤组织中 HGF、C-met 和 NRP1 高表达,三者对病变的进展具有重要作用,术后联合检测 HGF、C-met 和 NRP1 的表达可能对判断预后有一定价值。

关键词:骨肉瘤;肝细胞生长因子;原癌基因蛋白质 c-met;神经纤毛蛋白 1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.27.011

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)27-3234-02

Expressions and significance of HGF, C-met and NRP1 protein in osteosarcoma

Wu Tongshen¹, Meng Yan², Peng Shengzhi³

(1. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining, Shandong 272029, China;

2. Department of Orthopedics, Second Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250033, China;

3. Department of Pathology, Jining Medical College, Jining, Shandong 272067, China)

Abstract: Objective To detect the expressions of HGF, C-met and NRP1 protein in osteosarcoma and to investigate their correlation and the clinical significance. **Methods** The postoperative preserved paraffin block and the clinical data in 70 cases of osteosarcoma were taken as the observation group and 50 cases of the paraffin block of mature bone tissue after decalcification and the clinical data were taken as the control group. The expressions of HGF, C-met and NRP1 protein were detected by the immunohistochemistry(IHC) method for investigating their expressions in the tumor patients with different clinicopathological characteristics and analyzing their relationship. **Results** The positive rates of HGF, C-met and NRP1 expressions in the observation group were higher than those in the control group. The positive rates of HGF, C-met and NRP1 expressions in the observation group were correlated with metastasis, vascular invasion, clinical stage and Ki67 expression. The positive relationship was found between the expressions of HGF and C-met with NRP1 of neoplasm. **Conclusion** The high expressions of HGF, C-met and NRP1 in osteosarcoma play the important role in the progress of tumor lesion. The postoperative combined detection of HGF, C-met and NRP1 protein could have certain value to predict the prognosis.

Key words: osteosarcoma; hepatocyte growth factor; proto-oncogene proteins c-met; neuropilin-1

骨肉瘤临床中常见,患者进展较快,且病变进展与基因和蛋白有密切关系。肝细胞生长因子(HGF)又称为离散因子,可以对肝细胞进行强烈而有效的刺激,引起肝细胞的再生。HGF在作用过程中可以与肝细胞生长因子受体(C-met)结合而发挥生物学作用。而 C-met 由原癌基因 C-met 编码表达,C-met 是 II 型氨基酸激酶受体,正常组织和细胞中表达极少,在恶性肿瘤中表达明显升高^[1]。HGF 与 C-met 结合后可以促进多种肿瘤的增殖、迁移和血管的生成,对肿瘤的侵袭和转移有重要促进作用。神经纤毛蛋白 1(NRP1)是 SEMA3F 的受体,其不仅具有促进神经导向因子的生长,而且在肿瘤中的作用受到学者的关注^[2]。本实验应用免疫组织化学技术检测骨肉瘤组织中 HGF、C-met 和 NRP1 的表达情况,并进行临床对照观察,探讨其临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集济宁医学院附属医院及山东大学第二医院、山东大学齐鲁医院 2008 年 1 月至 2010 年 11 月骨肉瘤手

术后的留取的蜡块及临床资料作为观察组,纳入均符合 WHO 在 2008 版中关于骨肉瘤的诊断标准,并重新切片并由病理医师再次确诊,患者术前均未进行放疗和化疗。本组共选取 70 例,男 40 例,女 30 例,年龄 11~38 岁,平均 18.7 岁。同时选取经病理证实为正常的成熟骨组织并经脱钙后的蜡块及临床资料 50 例作为对照组,男 26 例,女 24 例,年龄 12~36 岁,平均 17.8 岁。2 组在一般临床特征中的比较差异无统计学意义 ($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 HGF、C-met 和 NRP1 蛋白的检测 实验用的兔抗人 HGF、C-met 和 NRP1 蛋白的浓缩液均购自中杉金桥生物技术公司,HGF、C-met 和 NRP1 蛋白的检测均应用免疫组化二步法,均由病理技师进行操作,设阳性对照和阴性对照,严格质量控制。

1.2.2 HGF、C-met 和 NRP1 蛋白的判断方法 HGF、C-met 和 NRP1 蛋白阳性染色定位于细胞质和(或)细胞膜上,以出现

棕黄的颗粒定为阳性细胞,选择阳性细胞集中的区域(热点区)并计数 5 个 400 倍视野的阳性表达细胞数,以平均每高倍镜视野的阳性肿瘤细胞数大于或等于 25% 即判断为阳性,以小于 25% 为阴性。计算阳性率。

1.3 统计学处理 应用 SAS 6.12 统计软件进行分析,应用 χ^2 检验,相关分析及生存分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组中 HGF、C-met 和 NRP1 蛋白表达阳性率的比较
观察组中 HGF、C-met 和 NRP1 蛋白表达的阳性率明显高于

对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 观察组中不同临床特征患者 HGF、C-met 和 NRP1 蛋白表达的比较
观察组中 HGF、C-met 和 NRP1 蛋白表达的阳性率与肿瘤的转移、脉管浸润、临床分期及 Ki67 的表达密切相关,见表 2。

2.3 观察组中 HGF、C-met 和 NRP1 表达的相关性
经线性相关分析显示,观察组中 HGF 和 C-met ($r = 0.47, P = 0.0165$)、HGF 和 NRP1 ($r = 0.43, P = 0.0312$)、C-met 和 NRP1 ($r = 0.48, P = 0.0109$) 的表达具有正相关性。

表 1 2 组中 HGF、C-met 和 NRP1 蛋白表达阳性率的比较[n(%)]

组别	n	HGF		χ^2	P	C-met		χ^2	P	NRP1		χ^2	P	
		阳性	阴性			阳性	阴性			阳性	阴性			
观察组	70	50(71.43)	20(28.57)	22.102	0	47(67.14)	23(32.86)	25.993	6	42(60.00)	28(40.00)	39.387	6	<0.01
对照组	50	14(28.00)	36(72.00)			10(20.00)	40(80.00)			2(4.00)	48(96.00)			

表 2 观察组中不同临床特征患者 HGF、C-met 和 NRP1 蛋白表达的比较[n(%)]

临床病理特征	n	HGF		χ^2	P	C-met		χ^2	P	NRP1		χ^2	P	
		阳性	阴性			阳性	阴性			阳性	阴性			
无转移	44	27(61.36)	17(38.64)	5.880	2	24(54.55)	20(45.45)	8.521	4	19(43.18)	25(56.82)	13.961	2	0.000
转移	26	23(88.46)	3(11.54)			23(88.46)	3(11.54)			23(88.46)	3(11.54)			
无脉管浸润	48	30(62.50)	18(37.50)	5.965	9	28(58.33)	20(41.67)	5.372	7	22(45.83)	26(54.17)	12.771	5	0.000
有脉管浸润	22	20(90.91)	2(9.09)			19(86.36)	3(13.64)			20(90.91)	2(9.09)			
I、II期	40	24(60.00)	16(40.00)	5.973	3	19(47.50)	21(52.50)	16.323	6	18(45.00)	22(55.00)	8.750	0	0.003
III、IV期	30	26(86.67)	4(13.33)			28(93.33)	2(6.67)			24(80.00)	6(20.00)			
Ki67<25	36	21(58.33)	15(41.67)	6.227	9	17(47.22)	19(52.78)	13.332	1	14(38.89)	22(61.11)	13.763	6	0.000
Ki67≥25	34	29(85.29)	5(14.71)			30(88.24)	4(11.76)			28(82.35)	6(17.65)			

3 讨 论

骨肉瘤在病变进展中增殖明显,且出现明显的浸润和转移。NRP1 是细胞表面相对分子质量为 102×10^3 的 I 型跨膜糖蛋白,其常表达在内皮细胞和一些肿瘤细胞中,是 Semaphorin3A 和血管内皮生长因子(VEGF)的受体,在神经轴突的生长、血管的生成及肿瘤的转移中起重要作用^[3]。也有观点认为 NRP1 表达在所有肿瘤细胞中,即分布在肿瘤血管内皮细胞上,也直接分布在肿瘤细胞中^[4]。如果 NRP1 与 VEGF 结合,可以有效地促进肿瘤血管的生成及肿瘤细胞的增殖。也有人发现 NRP1 可以有效地下调肿瘤细胞间的黏附作用,使肿瘤细胞易于脱离原发灶而出现转移^[5]。HGF 和 C-met 具有明显的协同作用,其高表达时引起 β_2 连环蛋白的酪氨酸残基发生磷酸化,使其不能与 E-钙黏蛋白胞内部分结合形成复合体,破坏了 E-钙黏蛋白和细胞骨架的连接作用,最终引起细胞间的黏附作用减弱^[6-7]。也有观点认为 HGF 是通过增加整合素的功能活性,而不是改变其在细胞膜表面的表达量来促进细胞与胞外基质成分的黏附作用^[8]。多个学者的研究则显示,HGF/C-met 的作用过程中,对肿瘤的淋巴管生成也有重要促进作用^[9-10]。因此 HGF/C-met 的作用可能是多元性的,其影响因素也较多。

研究结果显示,观察组中 HGF、C-met 和 NRP1 高表达,提示 3 种蛋白在肿瘤进展中有明显的促进作用,也显示出 HGF、C-met 和 NRP1 作为癌基因起到的类似作用。相关分析显示 HGF、C-met 和 NRP1 之间均呈正相关性。由于 HGF/C-met 被认为是经典的作用通路,而 NRP1 可以对此通路形成有效的促进作用,因此 NRP1 对 HGF/C-met 的表达有明显的增

强作用。由于 NRP1、HGF/C-met 均可以促进以 VEGF 诱发的血管生成,因此 NRP1 对 HGF/C-met 的作用是否通过 VEGF 为中介分子尚有待更多实验证实。本研究结果显示,观察组中 HGF、C-met 和 NRP1 蛋白表达的阳性率与肿瘤的转移、脉管浸润、临床分期及 Ki67 的表达密切相关,提示 3 种蛋白参与了肿瘤的转移、脉管浸润和细胞的增殖过程。由于以上因素均与骨肉瘤的预后有关,因此联合检测 HGF、C-met 和 NRP1 蛋白的表达可能对判断预后有一定价值。即骨肉瘤中 HGF、C-met 和 NRP1 高表达患者的预后差。Ki67 作为肿瘤细胞恶性增殖的重要指标,而 HGF、C-met 和 NRP1 均与 Ki67 表达的增殖指数有关,因此 3 种蛋白对肿瘤细胞的增殖也有明显的促进作用,此结论也显示出了 HGF、C-met 和 NRP1 高表达时的高增殖的肿瘤细胞,同时显示出了高表达预示着患者的预后不良。

总之,骨肉瘤组织中 HGF、C-met 和 NRP1 高表达,三者可能具有协同正向作用,使肿瘤快速生长、浸润及转移。术后联合检测 HGF、C-met 和 NRP1 的表达可能对判断预后有一定价值。

参考文献:

[1] Sun R,Zhang Q,Guo L,et al. HGF stimulates proliferation through the HGF/c-Met pathway in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Oncol Lett,2012,3(5):1124-1128.
[2] 裴向克,蔡明,周鸿敏,等. Neuropilin-1 在小鼠黑色素瘤细胞增殖中的作用[J]. 现代肿瘤医学,(下转第 3238 页)

在传统鼻内镜手术中,不仅疾病本身对解剖结构的破坏,给手术带来困难;而且一些鼻窦解剖畸形,如额隐窝或额窦区的解剖畸形(鼻丘气房、眶上气房、额气房及筛泡上气房),由于毗邻重要解剖器官和解剖复杂多变而易混淆,手术没能彻底清除阻塞额窦引流的气房,是导致内镜鼻窦手术失败常见原因^[10-11]。借助影像导航系统帮助可以正确判定解剖结构,实时精确显示手术器械位置、角度和深度,为术者提供了精确的定位,引导手术器械避开周围重要结构,使手术精确地、有步骤地进行,避免了严重并发症的发生,保证手术治疗效果^[12]。本研究发现,导航组手术在额隐窝或额窦区的解剖畸形体现出优越性,特别是在对鼻丘气房的处理具有较大的临床应用价值,而在 Haller 气房、Onodi 气房及非鼻丘气房中与传统鼻内镜手术相比未体现优越性。可能与以下因素有关:(1)额隐窝或额窦区域解剖结构复杂,鼻丘气房额窦气化程度决定额窦口的狭窄程度,是额窦手术的关键部位,高质量的影像导航有助于术者辨认鼻丘气房与周围结构的关系,顺利打开额隐窝引流通道。(2)Haller 气房、Onodi 气房虽毗邻重要的解剖结构,但属于终末气房,只需部分打开,并不影响相应窦腔的引流,传统的鼻内镜手术也可对其进行有效的处理。(3)本研究中非鼻丘气房导航手术,未显示出优越性,可能与病例数较少有关,有待于扩大样本再行报道。

影像导航系统与鼻内窥镜能够很好配合,适用于鼻内窥镜手术。鼻腔、鼻窦及颅底解剖变异以及有鼻科手术史而解剖标志缺失的患者,是进行影像导航手术的指征。而影像导航下行鼻内镜手术,能够有效地降低手术风险和并发症,提升预后,有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Wong WK, Matsuwaki Y, Omura K, et al. Role of intraoperative CT-updates during image-guided endoscopic sinus surgery for sinonasal fibro-osseous lesions[J]. *Auris Nasus Larynx*, 2011, 38(5):628-631.
- [2] 唐强, 阮标, 段炼, 等. 计算机辅助电磁影像导航在鼻内镜手术中的临床应用[J]. *中国医师进修杂志*, 2012, 35(23):233-235.
- [3] Song X, Zhang W, Zhang Y, et al. Expression of semaphorin 3A and neuropilin 1 with clinicopathological features and survival in human tongue cancer[J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2012, 17(6):962-968.
- [4] Bergé M, Allanic D, Bonnin P, et al. Neuropilin-1 is upregulated in hepatocellular carcinoma and contributes to tumour growth and vascular remodeling[J]. *J Hepatol*, 2011, 55(4):866-875.
- [5] 裴向克, 石炳毅. Neuropilin-1 研究进展[J]. *免疫学杂志*, 2007, 23(5):580-583.
- [6] Bozkaya G, Korhan P, Cokakli M, et al. Cooperative interaction of MUC1 with the HGF/c-Met pathway during hepatocarcinogenesis[J]. *Mol Cancer*, 2012, 11(1):64-70.
- [7] 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.
- [8] Horn LC, Hommel N, Roschlau U, et al. Peritumoral stromal remodeling, pattern of invasion and expression of c-met/HGF in advanced squamous cell carcinoma of the cervix uteri, FIGO stages III and IV[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2012, 163(1):76-80.
- [9] 张雪玉, 张咏梅, 杨彩虹, 等. HGF、C-MET 和 VEGF-C 在宫颈癌中的表达[J]. *肿瘤防治研究*, 2011, 38(4):411-413.
- [10] 王婧男, 张楠, 赵建强, 等. 乳腺癌中 HGF 及其受体 C-MET 的表达与淋巴管生成及淋巴道转移的关系[J]. *山东大学学报:医学版*, 2012, 48(3):90-94.
- [33] 中华医学会耳鼻咽喉科学会, 中华耳鼻咽喉科杂志编辑委员会. 慢性鼻窦炎鼻息肉临床分期内窥镜鼻窦手术疗效评定标准(1997年,海口)[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 1998, 33(2):216-218.
- [4] Swiahb JN, Dousary SH. Computer-aided endoscopic sinus surgery: a retrospective comparative study[J]. *Ann Saudi Med*, 2010, 30(2):149-152.
- [5] Farhadi M, Jalessi M, Sharifi G, et al. Use of image guidance in endoscopic endonasal surgeries: a 5-year experience[J]. *B-ENT*, 2011, 7(4):277-282.
- [6] Caversaccio M, Zheng G, Nolte LP, et al. Computer-aided surgery of the paranasal sinuses and the anterior skull base[J]. *HNO*, 2008, 56(4):376-378.
- [7] 文彤, 韩德民, 周兵, 等. 鼻内镜手术中影像导航系统的作用[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2006, 13(8):565-569.
- [8] 肖立智, 郑静, 陈颈海, 等. 影像导航系统在鼻内镜手术中的应用[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2011, 17(4):347-350.
- [9] 蒙文彤, 韩德民, 周兵, 等. 鼻内镜手术影像导航系统的作用[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2006, 13(8):565-569.
- [10] Kennedy DW, Senior BA. Endoscopic sinus surgery. A review[J]. *Otolaryngol Clin North Am*, 1997, 30(3):313-330.
- [11] Nguyen QA, Leopold DA. Current concepts in the surgical management of chronic frontal Sinusitis[J]. *Otolaryngol Clin North Am*, 1997, 30(3):355-370.
- [12] Patel SN, Youssef AS, Vale FL, et al. Re-evaluation of the role of image guidance in minimally invasive pituitary surgery benefits and outcomes[J]. *Comput Aided Surg*, 2011, 16(2):47-53.

(收稿日期:2013-04-17 修回日期:2013-05-16)

(上接第 3235 页)

- [3] Song X, Zhang W, Zhang Y, et al. Expression of semaphorin 3A and neuropilin 1 with clinicopathological features and survival in human tongue cancer[J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2012, 17(6):962-968.
- [4] Bergé M, Allanic D, Bonnin P, et al. Neuropilin-1 is upregulated in hepatocellular carcinoma and contributes to tumour growth and vascular remodeling[J]. *J Hepatol*, 2011, 55(4):866-875.
- [5] 裴向克, 石炳毅. Neuropilin-1 研究进展[J]. *免疫学杂志*, 2007, 23(5):580-583.
- [6] Bozkaya G, Korhan P, Cokakli M, et al. Cooperative interaction of MUC1 with the HGF/c-Met pathway during hepatocarcinogenesis[J]. *Mol Cancer*, 2012, 11(1):64-70.
- [7] 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.
- [8] Horn LC, Hommel N, Roschlau U, et al. Peritumoral stromal remodeling, pattern of invasion and expression of c-met/HGF in advanced squamous cell carcinoma of the cervix uteri, FIGO stages III and IV[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2012, 163(1):76-80.
- [9] 张雪玉, 张咏梅, 杨彩虹, 等. HGF、C-MET 和 VEGF-C 在宫颈癌中的表达[J]. *肿瘤防治研究*, 2011, 38(4):411-413.
- [10] 王婧男, 张楠, 赵建强, 等. 乳腺癌中 HGF 及其受体 C-MET 的表达与淋巴管生成及淋巴道转移的关系[J]. *山东大学学报:医学版*, 2012, 48(3):90-94.

(收稿日期:2013-06-09 修回日期:2013-07-07)