

HGF 蛋白与 C-Met 蛋白在胆管癌中的表达及临床意义

王 金¹, 赵一洁², 崔广宾², 尚培中^{1△}

(1. 中国人民解放军第二五一医院普通外科, 河北张家口 075000; 2. 河北北方学院, 石家庄 075061)

[摘要] **目的** 探讨肝细胞生长因子(HGF)与其受体(C-Met)蛋白在血清及组织中的表达及临床意义。**方法** 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测 42 例初治胆管癌患者及 20 例健康对照者血清 HGF 及 C-Met 水平;应用免疫组织化学技术观察 42 例胆管癌组织及正常组织 HGF 及 C-Met 的表达。**结果** 术前 1 d 胆管癌患者血清中 HGF 蛋白与 C-Met 蛋白水平均高于健康对照者(1.53±0.48)ng/mL vs. (0.48±0.55)ng/mL;(16.28±5.17)ng/mL vs. (4.31±2.84)ng/mL, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。术后第 3 天胆管癌患者血清中 HGF 蛋白与 C-Met 蛋白水平较术前变化不明显,而术后第 7、10 天 HGF 蛋白与 C-Met 蛋白水平较术前则明显降低。另外, HGF 蛋白与 C-Met 蛋白在胆管癌组织的阳性表达率分别为 76.2%、81.0%, 在正常组织的表达分别为 15.0%、20.0%。**结论** HGF 蛋白与 C-Met 蛋白在胆管癌患者血清和组织中异常表达,可能与胆管癌的发生、发展有密切关系。

[关键词] 胆管肿瘤;肝细胞生长因子;C-Met 蛋白;临床病理特征**[中图分类号]** R735.8**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)17-2362-03

Expression and clinical significance of HGF and C-Met in cholangiocarcinoma

Wang Jin¹, Zhao Yijie², Cui Guangbin², Shang Peizhong^{1△}

(1. Department of General Surgery, the 251th Hospital of People's Liberation Army, Zhangjiakou, Hebei 075000, China;

2. Northern College of Hebei, Zhangjiakou, Hebei 075061, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and clinical significance of HGF and C-Met in cholangiocarcinoma. **Methods** The levels of HGF and C-Met were measured by ELISA, the expression of HGF and C-Met in cholangiocarcinoma and health control was detected by immunohistochemistry. **Results** The preoperative levels of HGF and C-Met in cholangiocarcinoma were higher than the health control ($P<0.05$). Compared with the preoperative state, the levels of HGF and C-Met in cholangiocarcinoma on the 3rd day after operation did not change significantly. However, the levels of HGF and C-Met on the postoperative 7th and 10th day decreased obviously. In addition, the expression of HGF and C-Met in cholangiocarcinoma was 76.2%, 81.0%, respectively, which is higher than that in normal tissue ($P<0.01$). **Conclusion** There is an abnormal expression of HGF and C-Met in cholangiocarcinoma, which may be related to the incidence and development of cholangiocarcinoma.

[Key words] cholangiocarcinoma; hepatocyte growth factor; C-Met; clinical and pathological features

胆管癌(cholangiocarcinoma)是指起源于胆管上皮细胞的恶性肿瘤,恶性程度高、预后差,根治性手术切除后患者的 5 年生存率也仅为 20%~40%^[1]。胆管癌细胞强大的局部侵犯和远处转移能力是胆管癌预后极差的两大主要危险因素。目前,胆管癌治疗效果欠佳,预后较差,逐步提升为临床研究重点之一^[2]。随着生命科学及分子生物学的发展,与肿瘤转移有关的分子机制逐渐被人们发现。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)及其受体(C-Met)蛋白在人类肿瘤的发展及转移中有重要作用,但目前对于 HGF 和 C-Met 蛋白的研究还主要集中在胃癌、肝癌、肺癌等领域,在胆管癌中还鲜有报道^[3-4]。本研究检测了健康者和胆管癌患者血清中 HGF 和 C-Met 蛋白的水平,并且对正常组织和胆管癌组织中 HGF 和 C-Met 蛋白的表达情况进行了分析,探讨 HGF 和 C-Met 蛋白在胆管癌中的表达和临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 12 月至 2015 年 3 月本院普外科收治的胆管癌患者 42 例(胆管癌组),男 25 例,女 17 例,年龄 36~78 岁,平均(59.6±13.0)岁。全部患者均接受准根治性切除手术。肿瘤大小 0.4~3.8 cm。中低分化 19 例、高分化 23 例。根据 2010 年美国国家癌症综合网(NCAA)第 7 版

TNM 分期标准进行分类:I+II 期 22 例,III+IV 期 20 例。另选取同期健康对照者胆管正常组织 20 例(健康对照组),术后存档蜡块经 EliVision™ plus 免疫组织化学染色后光镜观察。

1.2 实验试剂 人 HGF 及 C-Met 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购自美国 Genzyme 公司;兔抗人 HGF 和 C-Met 单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;EliVision™ plus 二步法试剂盒购自福州迈新生物制品有限公司。

1.3 方法

1.3.1 研究方法 所有患者均于入院后术前 1 d,术后第 3、7、10 天采集静脉血 3 mL,室温下静置 10 min 后,4℃下 2 500 r/min 离心 10 min 收集血清保存于一 80℃冰箱。使用人 HGF ELISA 试剂盒检测各样本 HGF 水平,检测步骤严格按照说明书进行。根据微波(microwave, MW)热效应原理,采用 MW 抗原修复 EliVision™ plus 二步免疫组织化学染色方法,每例连续切片进行 HGF 和 C-Met 标记,每种免疫组化标记的切片染色 2 张,其中 1 张 DAB 显色后苏木素复染用于观察和照相,另一张不复染,用于图像分析。每次用已知 HGF 和 C-Met 阳性标本切片作为阳性对照。以磷酸盐缓冲液(PBS)溶液代替一抗做空白对照,以排除假阳性结果。

1.3.2 结果判定 HGF 蛋白阳性着色主要位于肿瘤细胞和

间质细胞胞质及细胞膜，C-Met 蛋白阳性着色主要位于肿瘤细胞质及细胞膜。结果的判定遵循双盲法，由 2 名病理医师独立观察。染色判定结果标准：随机观察并计数 10 个高倍镜(×400)视野下的阳性细胞，根据细胞染色强度及阳性细胞数占同类细胞总数的百分率综合判定。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析；计数资料以率表示，采用 χ^2 检验进行分析；计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用独立样本 *t* 检验；以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 胆管癌术前、术后及健康对照组血清中 HGF 及 C-Met 水平比较 胆管癌组患者术前 1 d 血清中 HGF 及 C-Met 蛋白的表达明显高于健康对照组，差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后第 3 天胆管癌组患者血清中 HGF 蛋白与 C-Met 蛋白水平较术前变化不明显，而术后第 7、10 天 HGF 蛋白与 C-Met 蛋白的水平较术前则明显降低，甚至达到正常水平。

表 1 胆管癌及健康对照组术前、术后血清中 HGF 及 C-Met 水平($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

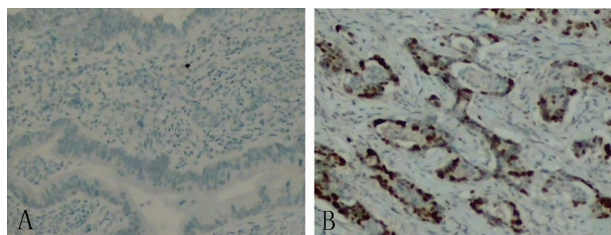
组别	n	HGF	C-Met
健康对照组	20	0.48 ± 0.55	4.31 ± 2.84
胆管癌组			
术前 1 d	42	1.53 ± 0.48*	16.28 ± 5.17*
术后 3 d	42	1.37 ± 0.39*	14.28 ± 4.96*
术后 7 d	42	0.64 ± 9.67#	7.63 ± 3.32#
术后 10 d	42	0.57 ± 0.32#	4.47 ± 3.01#

*: $P < 0.05$; 与健康对照组比较; #: $P < 0.05$, 与胆管癌组术前 1 d 比较。

2.2 HGF 及 C-Met 蛋白在胆管癌组织及正常胆管组织中的表达 HGF 及 C-Met 蛋白在大部分细胞质内出现棕色阳性表达(图 1、2)，胆管癌组的阳性表达率明显低于健康对照组，差异有统计学意义($P < 0.05$)，见表 2。

表 2 HGF 及 C-Met 的在胆管癌组织及正常组织中的表达的比较[n(%)]

组别	n	HGF	C-Met
胆管癌组	42	32(76.2)	34(81.0)
健康对照组	20	3(15.0)	4(4.0)
<i>P</i>		<0.05	<0.05

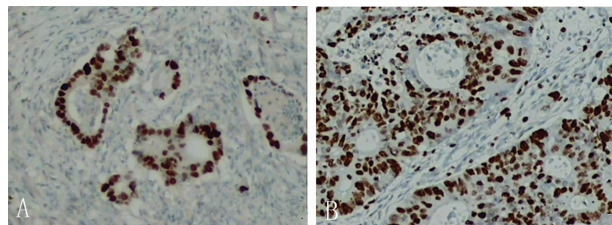


A: HGF 在正常胆管组织中的表达; B: HGF 在胆管癌组织中的表达。

图 1 HGF 蛋白的表达情况 (Envision, ×100)

2.3 HGF 及 C-Met 蛋白在胆管癌组织表达与临床病理特征的关系 HGF 蛋白的表达与淋巴结转移、分化程度及 TNM 分期有关，差异有统计学意义($P < 0.05$)；与性别、年龄、肿瘤大小等其他因素无关，差异无统计学意义($P > 0.05$)。C-Met

蛋白的表达与 TNM 分期、淋巴结转移有关，差异有统计学意义($P < 0.05$)；而与性别、年龄、肿瘤大小及分化程度等其他因素无关，差异无统计学意义($P > 0.05$)，见表 3。



A: C-Met 在正常胆管组织中的表达; B: C-Met 在胆管癌组织中的表达。

图 2 C-Met 蛋白的表达情况 (Envision, ×100)

表 3 HGF 和 C-Met 蛋白的表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	n	HGF		C-Met			
		阳性	χ^2	<i>P</i>	阳性	χ^2	<i>P</i>
年龄(岁)							
≤60	19	15	0.000	0.986	13	0.505	0.477
>60	23	17			19		
性别							
男	25	19	0.012	0.913	16	0.000	1.000
女	17	14			13		
肿瘤大小(cm)							
≤2	20	13	0.048	0.827	15	0.736	0.391
>2	22	15			18		
分化程度							
中低分化	19	17	6.773	0.009	12	0.192	0.661
高分化	23	12			16		
淋巴结转移							
是	27	23	5.250	0.022	24	11.448	0.00
否	15	7			5		
TNM 分期							
I + II	22	12	6.453	0.011	12	4.546	0.033
III + IV	20	18			17		

3 讨 论

胆管癌已成为临床较为常见的恶性肿瘤，早期发病无明显临床症状，国内流行病学资料证实胆管癌的发生率和病死率逐渐增加，导致这种现象的主要原因是缺乏有效的诊断和治疗手段。胆管癌并无特异性的肿瘤标志物，仅 CA19-9、CA125、癌胚抗原(CEA)有一定价值，但是这些肿瘤标志物没有较高的特异度与灵敏度^[5]。随着肿瘤分子生物学研究的逐渐深入，学者们发现表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、HGF、IL-6 等能促进胆管细胞 DNA 合成^[6-8]。HGF 是一种多功能细胞因子，尽管其结构、基因序列等已明确，但其在胆管癌中发挥作用的具体机制尚不完全清楚。基础研究表明，HGF 具有促有丝分裂活性，可以促进胆管癌的转移，但临床上关于 HGF 对胆管癌的影响的报道却很少见^[9]。C-Met 是从 NIH3T3 细胞中克隆出来的一种原癌基因，属于酪氨酸激酶家族的成员，也是 HGF 惟一的受体。目前已经证实 C-Met 参与

了多种恶性肿瘤的发生,并且有文献报道 C-Met 也参与胆管癌的发生过程^[10-12]。因此,本研究期望通过检测血清中 HGF 蛋白与 C-Met 蛋白的水平及在胆管癌组织中的表达,探讨其具有的临床意义。

本研究发现,胆管癌患者血清中 HGF 的水平较健康人明显升高,这与国外学者 Balaban 等^[13]的研究较为相似。据此,笔者检测了 HGF 在胆管癌组织中的表达,发现 HGF 蛋白的表达与淋巴结转移、分化程度及 TNM 分期相关,与性别、年龄、肿瘤大小等其他因素无关;C-Met 蛋白的表达与 TNM 分期、淋巴结转移相关,而与性别、年龄、肿瘤大小及分化程度无关。

有研究表明,HGF/C-Met 不仅可以调节肿瘤细胞间的黏附作用、促进细胞外基质的降解,还可以促进肿瘤血管生成。有文献表明,HGF/C-Met 可能影响胆管癌的预后^[14]。

为了研究 HGF/C-Met 与胆管癌预后的关系,笔者检测了胆管癌患者术后第 3、7、10 天血清中 HGF 及 C-Met 的水平,我们发现,术后第 3 天血清中 HGF 及 C-Met 的水平较术前并未明显下降,但在第 7、10 天胆管癌患者血清中 HGF 及 C-Met 的水平明显下降,甚至达到正常水平。因此,笔者认为血清中 HGF 及 C-Met 的水平对预测胆管癌的复发及转移具有一定的参考价值。

综上所述,本研究结果表明 HGF 及 C-Met 在胆管癌患者血清和组织中呈高度活化,其活化对维持胆管癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力起重要作用。本研究认为深入认识 HGF 及 C-Met 在胆管癌进展中的作用可以为开发胆管癌的分子靶向治疗提供实验依据。

参考文献

- [1] 毛志远,郭晓川,张婷婷,等.影响胆管癌预后的因素研究[J]. 华西医学,2014(11):2046-2049.
- [2] Luo XW, Yuan L, Wang Y, et al. Survival outcomes and prognostic factors of surgical therapy for all potentially resectable intrahepatic cholangiocarcinoma: a large Single-Center cohort study[J]. *Gastrointest Surg*, 2014, 18(3): 562-572.
- [3] Graziano F, Catalano V, Lorenzini P, et al. Clinical impact of the HGF/Met pathway activation in patients with advanced gastric cancer treated with palliative chemotherapy [J]. *Pharmacogenomics J*, 2014, 14(5): 418-423.
- [4] Sano Y, Hashimoto E, Nakatani N, et al. Combining onartuzumab with erlotinib Inhibits growth of non-small cell

lung cancer with activating EGFR mutations and HGF overexpression[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2014, 14(2):533-541.

- [5] 盖大伟,宋明芮,刘涛,等.胆管癌的诊疗现状[J]. 现代生物医学进展,2015,15(2):368-372,397.
- [6] Leelawat K, Leelawat S, Tepaksorn P, et al. Involvement of c-Met/hepatocyte growth factor pathway in cholangiocarcinoma cell invasion and its therapeutic inhibition with small interfering RNA specific for C-Met[J]. *J Surg Res*, 2006, 136(1): 78-84.
- [7] Braconi C, Valeri N, Gasparini P, et al. Transcribed ultra-conserved regions are aberrantly expressed and can be modulated by interleukin 6 in cholangiocarcinoma [J]. *Lancet*, 2013, Supple 1: 26.
- [8] 黄志强.肝胆管外科的发展方向[J]. 外科理论与实践, 2011, 16(4): 329-331.
- [9] Patel T. New insights into the molecular pathogenesis of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *J Gastroenterol*, 2014, 49(2): 165-172.
- [10] Seiwert TY, Beck TN, Salgia R. The role of HGF/c-MET in head and neck squamous cell carcinoma[M]//molecular determinants of head and neck cancer. Springer New York, 2014: 91-111.
- [11] Sims JD, Taguian JM, Hanson C, et al. A novel tumor-targeting construct aimed at c-Met[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(19 Suppl): 4490.
- [12] Tijeras-Raballand A, Serrate C, Riveiro ME, et al. Met inhibition using SU11274 impairs cellular activities in hepatocellular and Cholangiocarcinomas with high levels of Met and low levels of EGFR expressions[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(8 Suppl): 2178-2178.
- [13] Balaban YH, Us D, Hascelik G, et al. Hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma are associated with high serum levels of hepatocyte growth factor [J]. *Indian J Gastroenterol*, 2006, 25(4): 223.
- [14] Miyamoto M, Ojima H, Iwasaki M, et al. Prognostic significance of overexpression of C-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(1): 131-138.

(收稿日期:2015-11-22 修回日期:2016-01-10)

(上接第 2361 页)

- Chemother Pharmacol, 2009, 64(3): 463-472.
- [6] Timmerman LA, Holton T, Yuneva M, et al. Glutamine sensitivity analysis identifies the xCT antiporter as a common triple-negative breast tumor therapeutic target [J]. *Cancer Cell*, 2013, 24(4): 450-465.
- [7] 孙彦辉,陈新忠,白芹.术中癫痫诱发试验联合皮层热灼治疗胶质瘤所致癫痫的临床研究[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2007, 34(3): 208-211.
- [8] 郭韬,康进生,杜亚丽,等.低级别胶质瘤继发癫痫的手术

治疗[J]. 中华神经外科杂志, 2011, 27(5): 454-457.

- [9] 邱炳辉,公方和,方陆雄,等.胶质瘤术后癫痫发生影响因素分析[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(12): 2233-2234, 2238.
- [10] Berntsson SG, Malmer B, Bondy ML, et al. Tumor-associated epilepsy and glioma: are there common genetic pathways? [J]. *Acta Oncol*, 2009, 48(7): 955-963.

(收稿日期:2015-11-08 修回日期:2016-02-26)