

人大肠癌组织肝细胞生长因子及其受体 c-met 的表达

李宏武, 单吉贤

李宏武, 单吉贤, 中国医科大学第一临床学院肿瘤科 辽宁省沈阳市 110001
项目负责人: 单吉贤, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学第一临床学院肿瘤科. lhw-005@163.com
电话: 024-23256666-6227
收稿日期: 2004-03-25 接受日期: 2004-05-11

摘要

目的: 评价人大肠癌组织肝细胞生长因子(HGF)及其受体c-met的mRNA表达水平.

方法: 应用RT-PCR法检测人大肠癌组织中肝细胞生长因子及其受体c-met mRNA表达水平, 以正常大肠组织为对照.

结果: 大肠癌组织中肝细胞生长因子及其受体c-met mRNA过度表达(其中HGF mRNA表达 1.063 ± 0.179 , c-met mRNA表达 1.128 ± 0.173 , 对照组表达 0.576 ± 0.052), c-met表达与大肠癌分化程度($P < 0.05$)、有无淋巴结转移($P < 0.05$)有关.

结论: 肝细胞生长因子及其受体c-met mRNA表达与大肠癌有关, 高表达c-met组分化程度差, 淋巴结转移多, 更具浸润、转移潜能.

李宏武, 单吉贤. 人大肠癌组织肝细胞生长因子及其受体 c-met 的表达. 世界华人消化杂志 2004; 12(9): 2199-2201

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2199.asp>

0 引言

大肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是人类最常见的恶性肿瘤之一, 也是我省常见多发病, 占西方国家癌症死亡病因的第二位. 而且, 大肠癌肝脏转移率约为15-20%, 手术是治疗大肠癌最有效的手段, 根治切除率可达60%, 但仍有许多病例复发、转移, 严重危害广大患者的生命健康. C-met是原癌基因, 他的蛋白产物是肝细胞生长因子/离散因子(Hepatocyte growth factor/scatter factor, HGF/SF)的受体, 具有酪氨酸激酶活性, HGF/SF与其受体特异结合, 引起一系列跨膜信号通路的激活, 刺激上皮细胞的增生、迁移和形态发生. C-met基因异常在恶性肿瘤中多表现为过度表达, 在胃癌^[1], 胰腺癌^[2], 甲状腺癌^[3], 肝外胆道癌^[4], 肝细胞癌^[5]中已有报告. 研究表明HGF/SF及其受体c-met在恶性肿瘤的发生、浸润、转移中发挥作用. 本实验我们采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术研究肝细胞生长因子及其受体在大肠癌组织中的表达规律, 以探讨HGF/SF-c-met与大肠癌细胞增生、浸润、转移的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-07/2003-10手术切除并经病理证实为进

展期大肠癌40例, 男24例, 女16例; 年龄30-76(平均53)岁, 其中高分化21例(52.5%), 中分化7例(17.5%), 低分化12例(30%); Dukes A期4例(10%), B期22例(55%), C和D期14例(35%); 病变在升结肠6例(15%), 横结肠5例(12.5%), 降结肠2例(5%), 乙状结肠9例(22.5%), 直肠18例(45%). 每例标本手术切除后立即取约200 mg, 同时取配对肠黏膜组织(距离肿瘤边缘3 cm以上), 正常大肠组织作为对照, 所有标本置于-80℃深低温冰箱中保存备用. RT-PCR试剂盒 Ver1.1 购于Takara公司; HGF, c-met, β -actin引物由北京奥科公司合成, 扩增片段大小分别为: 539 bp, 655 bp, 690 bp, 用 β -actin基因作为内对照扩增; Trizol试剂购于华美生物工程公司; 自动电泳凝胶成像分析仪为Olympus公司产品; PCR扩增仪PTC-100TM是美国PE公司产品; 低温超速离心机为德国Hermle Z383k产品.

1.2 方法 RT-PCR法检测大肠癌组织中HGF mRNA, c-met mRNA的表达. 总RNA提取参照Chomczynski *et al*^[6]的异硫氰酸胍-酚-抽提一步法, 标本加入异硫氰酸胍裂解液后, 依次用酚、氯仿抽提, 异丙醇沉淀RNA, 乙醇洗涤沉淀, 紫外分光光度计检测RNA纯度及浓度. 引物序列如下: HGF/SF: sense, 5' -CAGCGTTGGGAT TCTCAGTAT-3' antisense, 5' -CCTATGTTTGTTCG TGTTGGA-3' c-met: sense, 5' -ACAGTGCATGTCA ACATCGCT-3' antisense: 5' -GCTCGGTAGTCTACAG ATT-3' β -actin: sense, 5' -GATTGCCTCAGGACATTT CTG-3' antisense: 5' -GATTGCTCAGGACATTTCTG-3' 逆转录反应: 65℃ 1 min, 30-60℃ 20 min, 65℃ 30 min, 98℃ 5 min, 5℃ 5 min. PCR扩增参照试剂盒说明书操作, 循环条件: 94℃ 3 min, 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 2 min, 72℃ 7 min, 循环45个周期. 使用含有溴化已啶的20 g/L琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物, PCR电泳带存入1Dkodak凝胶成像分析系统, 以 β -actin为参照标化HGF, c-met的mRNA含量, 计算灰度值, 灰度值 = 检测值/ β -actin值 \times 100%.

统计学处理 所得数据以均数 \pm 标准差表示, 采用SPSS12.0统计软件处理, 样本均数比较采用Dunnett *t* 检验; 两样本率的比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 判定差异有显著性.

2 结果

2.1 大肠癌组织HGF/SF mRNA, c-met mRNA表达 RT-PCR扩增后HGF产物为539 bp, c-met为655 bp, β -actin为690 bp(图1, 2). 以正常组织为对照, 其相

对含量 95% 的可信区间为 0.530-0.604, 当所测 mRNA 值 β -actin 值 >0.61 为阳性表达. 40 例大肠癌中, HGF/SF 阳性表达 21 例(52.5%), c-met 阳性表达 32 例(80.0%); 配对癌旁组织中 HGF/SF 阳性表达 20 例(50.0%), c-met 阳性表达 8 例(20%) 对照组均为阴性表达. 与对照组(0.576±0.052) 比较, 大肠癌组织中 HGFmRNA(1.063±0.179), c-metmRNA(1.128 ± 0.173) 表达有统计意义($P < 0.05$).

2.2 大肠癌 HGF/SF、c-metmRNA 表达与临床病理的关系 HGF 表达与大肠癌发生部位、生长方式、浸润深度、分化程度和 Dukes 分期等无关. 以大肠癌中 c-metmRNA 阳性表达的平均值为界将 32 例大肠癌分为 2 组: 高 c-met 大肠癌组(18 例)和低 c-met 大肠癌组(14 例),

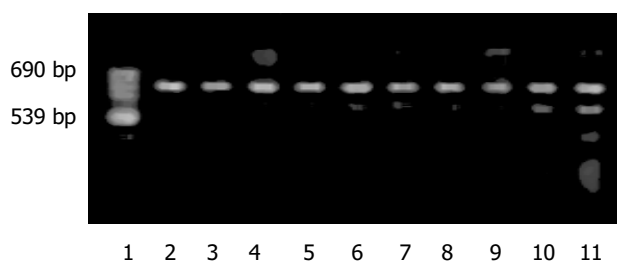


图 1 大肠癌组织中 HGFmRNA 表达. 1:Marker; 2: 正常组织; 3-4: 癌旁组织; 5-11: 大肠癌组织

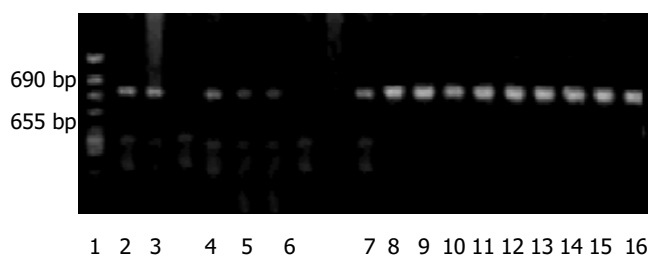


图 2 大肠癌组织中 c-metmRNA 表达. 1: Marker; 2: 正常组织; 3: 癌旁组织; 4-16: 大肠癌组织

表 1 大肠癌 c-met mRNA 表达与病理特征的关系

特征	高 c-metCRC n(%) (n=18)	低 c-metCRC n(%) (n=14)
直肠	7(38.9)	6(42.9)
结肠	11(61.1)	8(57.1)
团块生长	7(38.9)	11(78.6)
混合生长	11(61.1)	3(21.4)
浸润 ss	13(72.2)	8(57.1)
浸润 mp, se	5(27.8)	6(42.9)
Dukes A, B 期	5(27.8)	3(21.4)
Dukes C, D 期	13(72.2)	11(78.6)
高分化	5(27.8)	10(71.4)
中低分化	13(72.2)	4(28.6) ^a
有淋巴结转移	14(77.8)	5(35.7)
无淋巴结转移	4(22.2)	9(64.3) ^a

^a $P < 0.05$.

结果发现, 高 c-met 大肠癌组与大肠癌分化程度、淋巴结有无转移相关(表 1).

3 讨论

肝细胞生长因子(HGF/SF), 亦称离散因子, 是调节细胞、组织生命活动的多效作用分子, 能增强正常细胞和癌细胞的移动性^[7], 也是潜在的肝细胞^[8]、胰腺细胞^[9]、内皮细胞^[10]的生长刺激因子, 也发挥血管形成因子的作用. HGF/SF 是多效作用的生长因子, 可以诱导多种上皮细胞, 是上皮细胞形态发生的间叶细胞效应因子^[11]. 体外实验表明, HGF/SF 可以诱导增生、扩散、浸润和形态发生, 体内分析中, HGF/SF 负责成人胚胎发生并参与多种活性调节, 这些活性与他在肿瘤形成和转移中的作用有关^[12]. 1991 年 Battaro *et al*^[13] 首次报道了 HGF/SF 和 c-met 的关系, 原癌基因 c-met 的蛋白产物是 HGF 的酪氨酸受体, HGF 与他的受体结合, 使受体酪氨酸激酶磷酸化, 引起细胞有丝分裂、形态发生等生物学效应. 体外实验中, HGF 能够诱导表达 c-met 的靶细胞多种作用, 包括细胞增生、侵袭、转移等^[14]. HGF 受体是 c-met 原癌基因编码的酪氨酸激酶受体, 已发现 c-met 在胃癌、甲状腺癌、乳腺癌等^[13,15] 实体瘤中有过度表达. 本结果表明, HGF 在大肠癌中表达率为 52.5%, 与正常组比较有差异, 但我们发现 HGFmRNA 表达与大肠癌相关病理因素无关, 这提示 HGF 可能通过旁分泌途径影响大肠癌的发生、发展. 我们的资料显示, 癌组织中 c-metmRNA 表达多, 癌旁组织中表达较低, 正常组中无表达. 如果以大肠癌组中平均表达值为界, 将 c-met 癌基因表达值分为高表达和低表达组表明, 高表达组分化低, 淋巴结转移多, 说明浸润转移机会更大. 提示高表达 c-met 的大肠癌病例, HGF 促进癌细胞的运动, 并可能诱导转移的发生.

总之, c-met 在大肠癌中有过度表达, HGF/SF-c-met 系统在大肠癌浸润、转移中可能起重要作用. 对他们的不断深入研究有助于阐明大肠癌发生、发展的分子机制, 对大肠癌的防治亦有重要意义. 例如, 阻断 HGF/SF 诱导的信号通路可以抑制癌细胞的增生、迁移, 从而达到控制癌转移的目的, 该方面的相关研究将对人类攻克癌症有非常重要的意义.

4 参考文献

- Amemiya H, Kono K, Itakura J, Tang RF, Takahashi A, An FQ, Kamei S, Iizuka H, Fujii H, Matsumoto Y. c-Met expression in gastric cancer with liver metastasis. *Oncology* 2002;63: 286-296
- La Rosa S, Uccella S, Capella C, Erba S, Sessa F. Localization of hepatocyte growth factor and its receptor met in endocrine cells, and related tumors of the Gut and Pancreas: An immunohistochemical study. *Endocr Pathol* 2000;11:315-329
- de Luca A, Arena N, Sena LM, Medico E. Met overexpression confers HGF-dependent invasive phenotype to human thyroid carcinoma cells *in vitro*. *J Cell Physiol* 1999;180:365-371
- Hida Y, Morita T, Fujita M, Miyasaka Y, Horita S, Fujioka Y, Nagashima K, Katoh H. Clinical significance of hepatocyte growth factor and c-met expression in extraphepatic biliary

- tract cancers. *Oncol Rep* 1999;6:1051-1056
- 5 Ueki T, Fujimoto J, Suzuki T, Yamamoto H, Okamoto E. Expression of Hepatocyte growth factor and Its receptor c-met proto-oncogene in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;25:862-866
 - 6 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:2524-2529
 - 7 Jiang WG, Lloyds D, Puntis MC, Nakamura T, Hallett MB. Regulation of spreading and growth of colon cancer cells by hepatocyte growth factor. *Clin Exp Metastasis* 1993;11:235-242
 - 8 Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Comm* 1984;122:1450-1459
 - 9 Vila MR, Nakamura T, Real F. Hepatocyte growth factor is a potent mitogen for normal human pancreas cells *in vitro*. *Lab Invest* 1995;73:409-418
 - 10 Rosen EM, Meromsky L, Setter E, Vinter DW, Goldberg ID. Purified scatter factor stimulates epithelial and vascular endothelial cell migration. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990;195:34-43
 - 11 Brinkmann V, Foroutan H, Sachs M, Weidner KM, Birchmeier W. Hepatocyte growth factor /scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *J Cell Biol* 1995;131:1573-1586
 - 12 Zhang YW, Vande Woude GF. HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *J Cell Biochem* 2003;88:408-417
 - 13 Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. Identification of the hepatocyte growth factor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 1991;251:802-804
 - 14 Webb CP, Taylor GA, Jeffers M, Fiscella M, Oskarsson M, Resau JH, Vande Woude GF. Evidence for a role of met-HGF/SF during Ras-mediated tumorigenesis/metastasis. *Oncogene* 1998;17:2019-2025
 - 15 Parr C, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. The hepatocyte growth factor regulatory factors in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(1 Pt 1):202-11

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

直肠癌旁移行黏膜中 Survivin 基因表达的意义

苏琪, 吴硕东, 殷红专, 韩霞, 陈春生, 冯勇, 刘恩卿

苏琪, 吴硕东, 殷红专, 韩霞, 陈春生, 冯勇, 刘恩卿, 中国医科大学第二临床学院普外四科 辽宁省沈阳市 110004
辽宁省自然科学基金资助项目: No. 972255
项目负责人: 苏琪, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街 36 号, 中国医科大学第二临床学院普外四科. suqi100@hotmail.com
电话: 024 - 83955072
收稿日期: 2004-05-07 接受日期: 2004-06-17

苏琪, 吴硕东, 殷红专, 韩霞, 陈春生, 冯勇, 刘恩卿. 直肠癌旁移行黏膜中 Survivin 基因表达的意义. 世界华人消化杂志 2004;12(9):2201-2202
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2201.asp>

摘要

目的: 探讨凋亡抑制基因 survivin 在直肠癌旁移行黏膜中的表达情况, 为保肛手术的选择提供理论依据。

方法: 应用黏液组化方法确定各种组织类型直肠癌旁移行黏膜的分布规律, 应用免疫组织化学方法检测凋亡抑制基因 survivin 在直肠癌旁移行黏膜中的表达情况。

结果: 直肠癌旁移行黏膜范围, 在黏液癌(平均 7.83 cm)明显大于乳头状癌及管状腺癌($P < 0.01$), 在 Dukes C 期(平均 5.61 cm)明显大于 Dukes A、B 期($P < 0.05$)。正常黏膜(NM)、移行黏膜(TM)、非典型增生及癌组织中均有 survivin 基因产物表达, 由正常直肠黏膜到癌组织表达率逐渐增加, 四组间差别有显著意义($P < 0.05$)。

结论: 在移行黏膜(TM)、非典型增生及癌组织中就存在 survivin 基因表达上调; 在黏液癌及 Dukes C 期直肠癌旁移行黏膜范围明显增宽, 提示对低位黏液癌及 Dukes C 期直肠癌保肛手术应慎重。

0 引言

Survivin 是凋亡抑制基因(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的新成员。近年来, 对 survivin 的分子生物学, 凋亡抑制机制及其与肿瘤发展关系的研究已取得一定进展。随着保肛手术逐渐增加, 特别是腹腔镜等微创技术在直肠癌中的应用, 根治术后 2 a 内局部复发有逐年增加的趋势, 其中吻合口复发者占 5-15%。所以癌旁移行黏膜(transitional mucosa, TM)的研究更加受到重视^[1-2]。我们率先将凋亡抑制基因 survivin 应用于直肠癌旁 TM 的研究, 并与正常黏膜及癌组织进行对照如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2000/2003 年手术切除的直肠癌标本 73 例, 男 41 例, 女 32 例; 年龄 53.0 ± 12.3 岁。乳头状腺癌 32 例, 管状腺癌 23 例, 黏液腺癌 16 例, 未分化癌 2 例。Survivin 羊抗人多克隆抗体(sc-8806)为 Santa Cruz 公司产品、survivin 一抗工作浓度为 1:50, SP 试剂盒为 Zymed 公司产品, 高铁双胺奥蓝(HID-AB)试剂盒购于上海虹桥医用试剂研究所。

1.2 方法 标本经 40 g/L 的中性甲醛固定后, 沿肠管纵向自癌肿向两端每 0.5 cm 等长取材, 近端平均距癌瘤