

文章编号: 1005-6947(2013)12-1580-05

· 基础研究 ·

# 肝癌组织 c-met 表达与肝癌术后预后的关系

蔡云峰, 苏树英, 甄作均

(中山大学附属佛山医院 肝胆外科, 广东 佛山 528000)

## 摘要

**目的:** 探讨肝癌组织 c-met 表达水平与肝癌患者术后复发、生存时间的关系。

**方法:** 用 Western blot 法分别检测 64 例肝癌半肝切除患者 (手术组) 术前肝穿刺标本与术后切取标本, 以及 30 例行经肝动脉栓塞化疗 (TAE) 肝癌患者 (TAE 组) 肝穿刺标本 c-met 蛋白水平。比较手术组中 1 年以内复发患者与 1 年以上复发患者 c-met 水平; 根据所有患者肝穿刺标本获得的 c-met 平均值, 将手术组与 TAE 组患者分别分为 c-met 低值 ( $\leq$ 均值) 与高值 ( $>$ 均值) 亚组, 比较手术组中 2 个亚组 1 年复发率、复发时间和病理癌栓发生率; 比较手术组与 TAE 组中 4 个亚组间术后生存情况。

**结果:** 手术组中, 术前肝穿刺标本与术后切取标本的 c-met 检测值一致; 1 年以内复发患者 c-met 表达值高于 1 年以上复发患者; 高值亚组比低值亚组 1 年复发率高、复发时间短、癌栓发生率高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。手术组中 c-met 低值亚组术后生存优于其 c-met 高值亚组、TAE 组中 c-met 高值与低值亚组 (均  $P < 0.05$ ), 而后 3 者间差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。

**结论:** c-met 表达水平与肿瘤的术后复发、生存时间关系密切, 表达水平低的可获得良好的手术效果, 提示 c-met 检测可作为肝癌术后预后指标, 术前肝穿刺是可行的取样手段。

## 关键词

肝肿瘤; 肝切除术; 原癌基因蛋白质 c-met; 预后

中图分类号: R735.7 文献标志码: A



DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.12.011  
<http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3724.shtml>

## Relationship between c-met expression level and postoperative prognosis of hepatocellular carcinoma

CAI Yunfeng, SU Shuying, ZHEN Zuojun

(Department of Hepatobiliary Surgery, the First People's Hospital of Foshan, Foshan, Guangdong 528000, China)

Corresponding author: CAI Yunfeng, Email: yfcai70@aliyun.com

## ABSTRACT

**Objective:** To investigate the relations of the c-met expression level in hepatocellular carcinoma (HCC) tissue with the postoperative recurrence and survival of HCC patients.

**Methods:** The expression levels of c-met protein in the tissue samples from preoperative liver needle biopsy and surgical excision specimens of 64 HCC patients undergoing hemihepatectomy (surgical treatment group), as well as in the samples from preoperative liver needle biopsy of 30 HCC patients who received transcatheter arterial chemoembolization (TAE) (TAE group) were detected by Western blot analysis. The c-met expressions

收稿日期: 2013-04-09; 修订日期: 2013-11-11。

作者简介: 蔡云峰, 中山大学附属佛山医院主任医师, 主要从事肝胆外科方面的研究。

通信作者: 蔡云峰, Email: yfcai70@aliyun.com

between the patients relapsing within and beyond one year in surgical treatment group were compared. Based on the mean c-met expression value obtained from the results in preoperative liver needle biopsy of all patients, the patients in both surgical treatment group and TAE group were stratified into low c-met ( $\leq$  mean value) and high c-met ( $>$  mean value) subgroups, and then, the one-year recurrence rate, time to recurrence and incidence of cancer embolus between the subgroups of surgical treatment group were compared, and the post-treatment survival among the 4 subgroups in surgical treatment group and TAE group were also compared.

**Results:** In surgical treatment group, the measured values of c-met expression between the specimens obtained by preoperative needle biopsy and surgical resections were consistent, and the c-met expression level in patients who relapsed within one year was higher than those who relapsed beyond one year, and further, the recurrence rate and incidence of cancer embolus was higher, and time to recurrence was shorter in high c-met subgroup than those in low c-met subgroup, and all differences had statistical significance (all  $P < 0.05$ ). The postoperative survival in low c-met subgroup of surgical treatment group was better than that in its higher c-met subgroup and low or high c-met subgroup in TAE group (all  $P < 0.05$ ), but no statistical difference was seen among the latter three subgroups (all  $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** The c-met expression level is closely related to postoperative recurrence and survival of HCC patients, and those with low c-met expression may have a better outcome. Thus, it suggests that c-met detection can be used as postoperative prognostic indicator for HCC, and preoperative needle biopsy is a feasible approach for obtaining the specimen.

#### KEY WORDS

Liver Neoplasms; Hepatectomy; Proto-Oncogene Proteins c-met; Prognosis

**CLC number:** R735.7      **Document code:** A

**DOI:** 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.12.011

原发性肝癌术后预后判断一直是难题, 至今尚缺乏有效的指标<sup>[1-2]</sup>。总体而言, 手术是肝癌治疗最有效的方法, 但是具体到个体, 手术的效果、复发时间的早晚在术前很难确定<sup>[3-5]</sup>。如何筛选手术效果好的患者是外科医生需要考虑的问题。肝切除后肝处于再生状态<sup>[6-7]</sup>, 笔者之前的研究提示肝癌术后肝再生过程中血浆 HGF 水平升高, 而肝癌的复发与 HGF 的受体 c-met 的表达有相应的关系<sup>[8]</sup>, 本研究采用前瞻性的方法, 探讨 c-met 表达水平与肝癌术后预后的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

对我院 2008 年 1 月—2010 年 12 月因原发性肝癌行半肝切除的 64 例患者 (手术组) 进行前瞻性研究, 其中男 50 例, 女 14 例; 年龄 26~65 岁, 平均  $(45.2 \pm 10.2)$  岁; HBsAg 阳性 55 例 (85.9%), 甲胎蛋白 (AFP) 阳性 51 例 (79.7%); 病理学检查均证实为肝细胞癌 (HCC)。并选取同期诊断为原发性肝癌、肝内单结节、行经肝动脉栓塞化疗 (TAE) 的患者 30 例 (TAE 组) 作为对照, 其中男 26 例, 女 4 例; 年龄 24~60 岁,

平均  $(39.3 \pm 8.7)$  岁; 均为 HBsAg 阳性, AFP 阳性者 25 例 (83.3%); 肿瘤均  $> 5$  cm。

### 1.2 研究方法

**1.2.1 标本取样** 所有手术患者均于术前于切除侧行活检针穿刺抽取肝癌组织标本, 手术后切取肿瘤标本, Western blot 法检测 c-met 蛋白的表达。TAE 组则于首次治疗前行活检针穿刺肝癌标本送检。

**1.2.2 Western blot 检测 c-met 表达** 取标本组织电动匀浆, 超声粉碎仪粉碎,  $4^{\circ}\text{C}$  12 000 r/min 离心 20 min; Bradford 法测定蛋白浓度。根据蛋白浓度将样本稀释成相同的浓度, 煮沸 3~5 min 待用。已煮沸的样品用微量加样器等体积加入 SDS-PAGE 凝胶的上样孔, 使每孔的蛋白上样量为 25  $\mu\text{g}$ 。垂直电泳。待溴酚蓝到达分离胶底部, 停止电泳。取出凝胶进行电转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。封闭膜, 加入一抗 (鼠抗人 c-met 单克隆抗体, 稀释度 1:500) 孵育; 再加入 HRP 标记的抗鼠二抗 (1:2 000), 室温孵育。将膜上的液体烘干, 加入 10 mL 发光液 LumiGLO 反应。曝光 X 片。然后洗涤 PVDF 膜, 剥脱抗体; 再从膜的封闭步骤开始, 重复以上操作。加入的一抗为小鼠抗人  $\alpha$ -tubulin 单克隆抗体, 稀释度 1:1 000, 曝光获得 X 线片。Western 印迹杂交 X 线

片用图像扫描。采用 KONTRON IBAS 2.5 全自动图像分析系统对 c-met 与内参  $\alpha$ -tubulin 条带进行光度分析，将 c-met/ $\alpha$ -tubulin 值作为 c-met 表达的相对含量。

1.2.3 病理结果分析 记录病理报告脉管癌栓的发生率。

### 1.3 随访

手术组患者术后每月回院复查，检查肝功能、AFP、肝胆 B 超及胸片，记录肿瘤复发时间及生存时间。TAE 组每月回院复查，行 3 次以上治疗，记录生存时间。

### 1.4 指标比较

比较肝穿刺与术后切取标本 c-met 测定值的差异，对两组测定值进行直线相关分析及配对  $t$  检验。根据随访结果，将手术患者分为 1 年复发及 1 年以上复发组，分别比较其 c-met 值。根据所有肝穿刺标本检测到的 c-met 值，计算平均值，将手术组分为 c-met 低值 ( $\leq$ 均值) 与高值 ( $>$ 均值) 亚组，比较两亚组 1 年复发率、复发时间、癌栓发生率。对于 TAE 组，同样分为低值和高值亚组，两两比较手术组、TAE 组各高、低 c-met 亚组间的生存情况。

### 1.5 统计学处理

实验数据计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，所有数据用统计学软件 SPSS 19.0 进行分析，其中肝穿刺与术后标本 c-met 测定值的差异采用直线相关分析及配对  $t$  检验，计数资料采用  $\chi^2$  检验，不符合正态分布的计量资料采用秩和检验，复发时间曲线、生存曲线由 Kaplan-Meier 法得出，复发率、生存率的比较采用 log-rank 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 肝穿刺与术后切除标本 c-met 检查结果比较

每例手术患者均可获得来自穿刺标本检测和来自手术切除标本检测的 c-met/ $\alpha$ -tubulin 值，将肝穿刺检测结果 ( $y$ ) 与手术切除后标本检测结果 ( $x$ ) 进行直线相关分析及配对  $t$  检验，可得直线回归方程  $y = 1.015x - 0.430$ ，相关系数 ( $r$ ) = 0.999，配对  $t$  检验  $P > 0.05$ ，两组间无统计学意义。

### 2.2 手术组 1 年内复发者与 1 年以上复发者 c-met 值比较

1 年内复发患者共 30 例，c-met/ $\alpha$ -tubulin

值为  $0.75 \pm 0.23$ ，1 年以上复发共 34 例，c-met/ $\alpha$ -tubulin 为  $0.32 \pm 0.28$ ，两组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

表 1 不同时间复发两组 c-met 值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

复发时间	n	c-met/ $\alpha$ -tubulin	P
1 年内	30	$0.75 \pm 0.23$	<0.05
1 年以上	34	$0.32 \pm 0.28$	

### 2.3 手术组 c-met 低值与高值患者复发及癌栓发生率比较

测定 c-met/ $\alpha$ -tubulin 均值为 0.48，c-met 高值患者 28 例，1 年以内复发 20 例 (71.4%)，1 年以上复发 8 例 (28.6%)；c-met 低值患者 36 例，1 年以内复发 10 例 (27.8%)，1 年以上复发 26 例 (72.2%)，两组差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 12.051$ ,  $P < 0.05$ ) (表 2)。高值患者中位复发时间为 6.0 个月 (95% CI=4.7-7.3)，低值患者为 17.0 个月 (95% CI=13.5-20.5)，两者差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。其复发曲线见图 1。病理报告脉管癌栓发生率高值患者 20 例 (71.4%)，低值患者 14 例 (38.9%)，两者差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 6.185$ ,  $P < 0.05$ )。

表 2 c-met 高值组与低值组复发率比较 [n (%)]

复发时间	c-met 高值 (n=28)	c-met 低值 (n=36)	$\chi^2$	P
1 年内	20 (71.4)	10 (27.8)	12.051	<0.05
1 年以上	8 (28.6)	26 (72.2)		

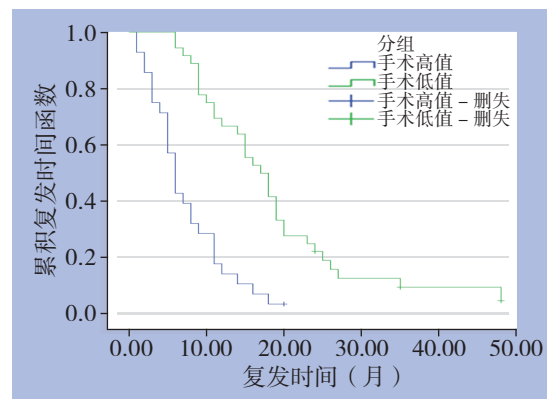


图 1 手术组中 c-met 高值与低值亚组复发时间曲线  
Figure 1 Recurrence curves of the high and low c-met subgroups in surgical treatment group

## 2.4 手术组与 TAE 组生存情况比较

手术组 c-met 高值患者中位生存时间为 15 个月 (95% CI=10.9-19.1), 低值患者为 30 个月 (95% CI=24.4-35.6); TEA 组 c-met 高值患者中位生存时间为 16 个月 (95% CI=11.6-20.4), 低值患者为 17 个月 (95% CI=8.9-25.1)。手术组 c-met 低值患者与其他各组相比差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 其余各组间相比差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 生存曲线见图 2。

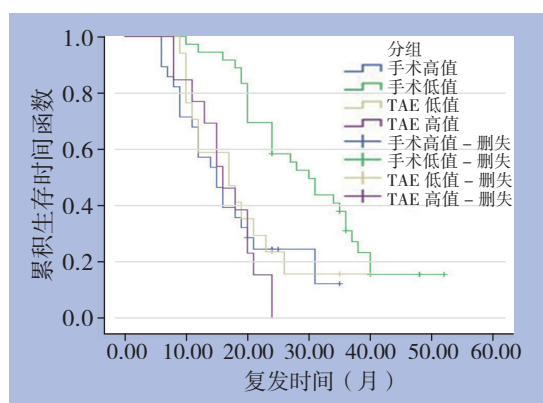


图 2 手术组与 TAE 组中各亚组患者生存曲线

Figure 2 Survival curves of each subgroup in surgical treatment group and TAE group

## 3 讨 论

肝癌术后 5 年生存率极少超过 40%, 术后复发多发生在术后 1~2 年, 平均复发时间 14.9 个月<sup>[9-11]</sup>。肝癌复发的来源, 一般认为有术前癌细胞经门静脉系统播散形成微转移灶、手术切除不彻底、术中操作不当致癌细胞沿门静脉系统播散、多中心发生的原发癌以及新生肿瘤等, 其中属肝内转移者占 50.9%<sup>[12-15]</sup>。笔者既往的研究发现细胞的增殖取决于细胞的特性及所处的环境, 肝切除后肝脏进入的再生状态以及长期慢性肝炎造成的坏死增生状态均为肝癌细胞增殖的有利环境, 而肝癌细胞能否获得增殖的优势取决于其特性, 其表面再生激素的受体是重要的特征<sup>[16-17]</sup>。肝细胞生长因子及其受体 c-met 已被证明与肿瘤细胞的生长、浸润及转移关系密切<sup>[18-23]</sup>。术前检测肝癌细胞的 c-met 表达水平有可能提示其复发的早晚, 从而判断其预后情况。

本研究针对肝癌术后患者进行前瞻性研究, 为尽可能取得术后的相似状态, 选择半肝切除的患者, 以求切除肝量及再生反应相似, 避免影响

术后观察。于术前进行肝穿刺取得肝癌标本, 检测其 c-met 表达水平, 与术后切取标本的检测结果比较, 两者检测指标一致, 提示术前肝穿刺标本检测能反应 c-met 的真实表达水平, 这为术前评估提供了技术手段。

肝癌术后即进入再生状态, 其增殖恢复时间约为 6 个月<sup>[6-7]</sup>, c-met 表达水平与术后复发情况有无关系, 可通过观察 1 年内的复发情况判断。本研究比较了 1 年以下复发及 1 年以上复发患者其 c-met 表达水平, 1 年以下组表达水平高于 1 年以上组, 两组差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。提示术后 1 年的增生活跃期内, 表达水平高的转移灶细胞因肝再生获得了增殖的优势, 而表达水平低的转移灶细胞没有获得增殖优势, 其复发与其他因素相关。

c-met 表达水平高低能否提示术后复发及生存情况, 是本研究需要解决的问题, 结果显示, c-met 表达水平高的患者, 其 1 年复发率高于表达水平低的患者, 中位时间为 6 个月, 而水平高的其中位时间为 17 个月, 两组的复发曲线差异有统计学意义。以 TAE 组为对照作生存分析, TAE 组内部无论表达水平高低, 其累积生存率差异无统计学意义, 而手术组 c-met 表达水平低的手术后生存优于其他 3 组, 而表达水平高的术后生存与 TAE 两组差异无统计学意义, 中位生存时间数值反而低于 TAE 组。由此可见, 选择表达水平低的肝癌患者进行手术才能获得良好的手术效果, 而表达水平高的患者手术治疗并未见比介入治疗有优势, 反而因手术造成的抵抗力降低容易导致肿瘤的复发。

从本研究可见, 要获得良好的手术效果, 有必要对肝癌患者术前进行筛选, 通过肝穿刺检测 c-met 蛋白表达水平来预测患者的术后预后是可行的, 选择表达水平低的患者进行手术治疗, 而表达水平高的患者手术治疗需慎重。随着检测手段的进一步完善以及观察的积累, 这一方法将有可能为临床医生术前的决策、治疗方法的选择、术后的处理提供参考。

## 参考文献

- [1] Abdel-Wahab M, El-Husseiny TS, El Hanafy E, et al. Prognostic factors affecting survival and recurrence after hepatic resection for hepatocellular carcinoma in cirrhotic liver[J]. Langenbecks Arch

- Surg, 2010, 395(6):625-632.
- [2] Mann CD, Neal CP, Garcea G, et al. Prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma: a systematic review[J]. Eur J Cancer, 2007, 43(6):979-992.
- [3] Singhal A, Jayaraman M, Dhanasekaran DN, et al. Molecular and serum markers in hepatocellular carcinoma: predictive tools for prognosis and recurrence[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2012, 82(2):116-140.
- [4] Truant S, Boleslawski E, Duhamel A, et al. Tumor size of hepatocellular carcinoma in noncirrhotic liver: a controversial predictive factor for outcome after resection[J]. Eur J Surg Oncol, 2012, 38(12):1189-1196.
- [5] Burak KW. Prognosis in the early stages of hepatocellular carcinoma: predicting outcomes and properly selecting patients for curative options[J]. Can J Gastroenterol, 2011, 25(9):482-484.
- [6] Coban Z, Barton MC. Integrative genomics: liver regeneration and hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(7):2179-2184.
- [7] Shi JH, Huitfeldt HS, Suo ZH, et al. Growth of hepatocellular carcinoma in the regenerating liver[J]. Liver Transpl, 2011, 17(7):866-874.
- [8] 蔡云峰, 甄作均, 陈焕伟, 等. 肝癌术后肝再生状态与肝癌复发关系的初步研究[J]. 中国普通外科杂志, 2008, 17(7):692-696.
- [9] 汤钊猷. 肝癌研究进展[J]. 中国肿瘤, 2001, 10(1):37-40.
- [10] Lim KC, Chow PK, Allen JC, et al. Systematic review of outcomes of liver resection for early hepatocellular carcinoma within the Milan criteria[J]. Br J Surg, 2012, 99(12):1622-1629.
- [11] Takayama T. Surgical treatment for hepatocellular carcinoma[J]. Jpn J Clin Oncol, 2011, 41(4):447-454.
- [12] 邱斌玉, 温浩, 张金辉. 肝癌复发转移微环境研究进展[J]. 肝胆外科杂志, 2010, 18(1):62-66.
- [13] 杨浩, 杨连粤. 肝癌术后复发转移相关因素研究进展[J]. 中国实用外科杂志, 2012, 32(10):868-870.
- [14] 刘臻玉, 区金锐. 肝癌患者肝内微小静脉浸润的预后及临床意义[J]. 中华普通外科杂志, 2006, 21(6):415-418.
- [15] Giannelli G, Antonaci S. Novel concepts in hepatocellular carcinoma: from molecular research to clinical practice[J]. J Clin Gastroenterol, 2006, 40(9):842-846.
- [16] Cai YF, Zhen ZJ, Min J, et al. Selection, proliferation and differentiation of bone marrow-derived liver stem cells with a culture system containing cholestatic serum in vitro[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(22):3308-3312.
- [17] Cai YF, Chen JS, Su SY, et al. Passage of bone-marrow-derived liver stem cells in a proliferating culture system[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(13):1630-1635.
- [18] Michalopoulos GK. Liver regeneration[J]. J Cell Physiol, 2007, 213(2):286-300.
- [19] Osada S, Kanematsu M, Imai H, et al. Clinical significance of serum HGF and c-Met expression in tumor tissue for evaluation of properties and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 2008, 55(82-83):544-549.
- [20] Daveau M, Scotte M, François A, et al. Hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, and their receptors as combined markers of prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Carcinog, 2003, 36(3):130-141.
- [21] Ke AW, Shi GM, Zhou J, et al. Role of overexpression of CD151 and/or c-Met in predicting prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2009, 49(2):491-503.
- [22] Mizuguchi T, Nagayama M, Meguro M, et al. Prognostic impact of surgical complications and preoperative serum hepatocyte growth factor in hepatocellular carcinoma patients after initial hepatectomy[J]. J Gastrointest Surg, 2009, 13(2):325-333.
- [23] Ang CS, Sun MY, Huitzil-Melendez DF, et al. c-MET and HGF mRNA expression in hepatocellular carcinoma: correlation with clinicopathological features and survival[J]. Anticancer Res, 2013, 33(8):3241-3245.

( 本文编辑 姜晖 )

本文引用格式: 蔡云峰, 苏树英, 甄作均. 肝癌组织 c-met 表达与肝癌术后预后的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(12):1580-1584. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.12.011

Cite this article as: CAI YF, SU SY, ZHEN ZJ. Relationship between c-met expression level in liver cancer cells and postoperative prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Chin J Gen Surg, 2013, 22(12):1580-1584. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.12.011