



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.05.021
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.05.021
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(5):747-751.

· 简要论著 ·

HGF 在浸润性乳腺癌中的表达及其对化疗敏感性和预后的影响

吕海通^{1,2}, 廖宁²

(1. 南方医科大学 研究生学院, 广东 广州 515515; 2. 广东省人民医院肿瘤中心 乳腺科 / 广东省医学科学院, 广东 广州 515080)

摘要

目的: 探讨肝细胞生长因子 (HGF) 在乳腺癌组织中的表达水平变化及与患者远期预后、化疗敏感性的关系。

方法: 选取 121 例经病理学证实为浸润性乳腺癌的患者, 采用免疫组化染色方法观察术前未接受放疗治疗的 55 例乳腺癌患者癌组织中 HGF 的表达水平, 分析术前接受新辅助化疗的 66 例浸润性乳腺癌患者中不同 HGF 表达情况与患者预后的关系; 检测下调 HGF 后乳腺癌 MCF-7 细胞与表阿霉素共培养的细胞增殖情况。

结果: 121 例浸润性乳腺癌患者有 77 例 (63.64%) 患者乳腺癌组织中 HGF 表达阳性; HGF 表达阳性、阴性患者的肿瘤分化程度、TNM 分期、淋巴结转移率有关 (均 $P < 0.05$)。HGF 阳性表达患者新辅助化疗缓解率明显低于阴性组的 (50.00% vs. 86.67%, $P < 0.05$), 5 年存活率明显低于阴性患者的 (63.98%, vs. 86.67%, $P < 0.05$); MCF-7 细胞 HGF 表达下调后对表阿霉素的敏感性明显增高 ($P < 0.05$)。

结论: HGF 在乳腺癌组织中的表达与肿瘤分化程度、TNM 分期、淋巴结转移相关, 阳性表达会影响患者的化疗效果, 下调 HGF 表达可增强乳腺癌细胞对化疗的敏感性。

关键词

乳腺肿瘤; 肝细胞生长因子; 放疗; 辅助; 预后

中图分类号: R737.9

乳腺导管癌以及小叶上皮来源的肿瘤较为多见, 体内雌激素水平的波动、绝经期体内孕激素的相对缺乏等, 均促进了现阶段我国乳腺癌发病的增加^[1]。钼靶射线、超声检查以及穿刺活检可以提高乳腺癌的早期诊断水平, 但仍然存在 25% 左右的乳腺癌患者临床确诊时已处于中晚期而需要联合进行化疗。多柔比星、吉西他滨、紫杉醇以及铂类化疗药物对于乳腺癌细胞的异常增殖的杀伤作用, 可以缩小病灶、抑制术后复发、提高术后生存时间^[2]。但部分学者在临床工作中发现, 30%~33% 左右的乳腺癌患者对于常规化疗药物的敏感性不足 35%^[3-4], 化疗后疾病总体缓解率以及

部分缓解率均不理想, 提示了单纯术后化疗的临床局限性。肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 参与到了多种恶性肿瘤如卵巢癌、甲状腺癌的发生发展过程^[5-6]。但对于 HGF 在乳腺癌组织中的蛋白水平的表达研究较少, 本次研究重在探讨 HGF 在乳腺癌中的表达以及其对于辅助化疗方案敏感性的指导意义。

1 材料与方法

1.1 临床标本

选取 121 例经病理学证实为浸润性乳腺癌的患者, 其中术前未接受放疗治疗的 55 例, 术前接受新辅助化疗治疗的 66 例浸润性乳腺癌患者。年龄 34~55 岁, 平均年龄 (44.1 ± 8.7) 岁; 浸润性导管癌 98 例, 浸润性小叶癌 14 例, 乳头状癌 4 例, 管状癌 3 例, 黏液癌 2 例; TNM 分期: I 期 20 例, II 期

收稿日期: 2016-02-16; 修订日期: 2016-04-18。

作者简介: 吕海通, 南方医科大学研究生学院硕士研究生, 主要从事乳腺癌的综合诊疗方面的研究。

通信作者: 廖宁, Email: drliaoning@hotmail.com

30例, III期71例; 雌激素受体阳性56例, 孕激素受体阳性63例。纳入标准: (1) 所有浸润性乳腺癌患者的诊断均经过术前穿刺活检或术后组织病理学检查证实; (2) 患者术后接受随访观察、各项临床资料、一般资料完整。排除标准: (1) 未获取随访资料、一般资料的患者; (2) 未经病理学证实的患者。

1.2 细胞实验材料

人乳腺癌细胞株MCF-7购自上海生物细胞研究所, PRIM1640培养基购自南京碧云天生物科技有限公司, 噻唑兰(MTT)购自罗氏检测公司, 二甲基亚砜(DMSO)购自南京泰康生物科技有限公司, HGF抗体以及HRP标记二抗购自abcum公司, YEAM多功能酶标仪购自美国GE公司, 细胞培养箱购自美国thermo公司, 倒置显微镜购自日本olympics公司。

1.3 免疫组化法

组织采用石蜡包埋, 切片机切取组织, 厚度5 mm, 用多聚赖氨酸处理。在脱蜡之前, 将切片置于60 ℃恒温箱中烘烤60 min。将切片用二甲苯浸泡10 min, 更换二甲苯后再浸泡10 min。水化后进行抗原修复, 3% H₂O₂一甲醇溶液处理切片15 min, 加入一抗HGF鼠单抗100 mL, 37 ℃, 湿盒孵育1 h。加入增强剂50 L, 室温湿盒孵育20 min。加入HRP标记二抗50 mL, 室温37 ℃, 孵育30 min。每张片子加2滴新鲜配制的DAB溶液, 显微镜下观察。

1.4 细胞转染与 MTT 检测

乳腺癌细胞MCF-7生长至融合度为90%时, 用胰蛋白酶EDTA消化液消化细胞, 加入适当培养基, 吹匀后细胞计数, 使细胞最终密度为 1×10^5 /mL, 96孔板每孔加入100 μL吹匀后的细胞, 置于37 ℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中培养。当细胞密度为30%~50%时采用lipofectamin 2000进行转染siRNA-HGF、siRNA-GFP(阴性对照)。稀释1 μg siRNA-HGF、siRNA-GFP于适当的培养基(含血清和抗生物), 终体积为100 μL, 振荡混匀。加入6 μL liporectamin稀释siRNA, 并使复合体形成。上下吹打5遍或振荡10 s。小心吸出生长培养基, 加入30 μL含有转染试剂以及质粒的培养基, 孵育细胞48~72 h。

MTT实验: 4 h后加入表阿霉素, 使之浓度梯度分别为0、2.5、5、10、15、20 ng/mL, 并设置

6复孔, 在37 ℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中在共培养, 24 h后每孔加入10 μL新型细胞增殖及毒性检测溶液CCK-8(南京凯基生物科技发展有限公司), 置于37 ℃培养箱中孵育2 h, 酶标仪在450 nm波长处检测每孔的吸光度OD值。

1.5 评价标准

近期疗效评价标准: 参照RECIST实体瘤疗效评价标准分为: 完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、疾病稳定(SD)、疾病进展(PD); 缓解率=(CR+PR)/本组样本量×100%, 总有效率=(CR+PR+SD)/本组样本量×100%。免疫组化结果判定: HGF蛋白阳性着色表达于细胞浆, 呈黄色、棕黄色、褐色表达, (1) 随机选取10个低倍镜视野, 阳性细胞着色比例≤5%为0分, >5%为1分; (2) 未见棕黄色着色颗粒为0分, 具有明显的黄色、棕黄色颗粒为1分。综合评分≤1分判断为阴性, 2分为阳性。乳腺癌细胞存活率=加药组的OD值/对照组的OD值×100%。

1.6 统计学处理

数据分析在SAS 9.3软件包中处理, 正态分布的计量指标采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 t 假设检验; 计数资料假设检验采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 浸润性乳腺癌患者的 HGF 表达情况

121例浸润性乳腺癌患者有77例患者乳腺癌组织中HGF表达阳性, 阳性表达率为63.64%; HGF表达与阳患者的肿瘤分化程度、TNM分期、淋巴结转移率有关(均 $P < 0.05$); 与患者的年龄、肿瘤最大径、雌激素受体阳性、孕激素受体阳性、是否进行新辅助化疗无关(均 $P > 0.05$)(表1)。

2.2 浸润性乳腺癌 HGF 表达与患者化疗近期疗效的关系

66例术前进行辅助化疗的浸润性乳腺癌患者中有36例HGF表达阳性, 30例表达阴性; HGF阳性表达患者的化疗缓解率50.00%, 明显低于阴性组的86.67%($P < 0.05$)(表2)。

2.3 浸润性乳腺癌 HGF 表达与患者化疗远期疗效的关系

HGF阴性表达患者的5年存活率86.67%, 明显高于阳性患者的63.98%($P < 0.05$)(表3)。

表1 浸润性乳腺癌患者的HGF表达与患者临床病理特征的关系 [n (%)]

因素	HGF表达		χ^2	P
	阳性 (%)	阴性 (%)		
年龄 (岁)				
≥ 45	40 (51.95)	20 (45.45)	0.472	0.492
< 45	37 (48.05)	24 (54.55)		
肿瘤最大径 (cm)				
≥ 5	28 (36.36)	14 (31.82)	0.255	0.613
< 5	49 (63.64)	30 (68.18)		
分化程度				
高 + 中	23 (29.87)	28 (63.64)	13.093	<0.001
低	54 (70.13)	16 (36.36)		
TNM分期				
I+II期	19 (24.68)	31 (70.45)	24.201	<0.001
III期	58 (75.32)	13 (29.55)		
淋巴结转移				
是	39 (50.65)	13 (29.55)	5.089	0.024
否	38 (49.35)	31 (70.45)		
雌激素受体阳性				
是	38 (49.35)	18 (40.91)	0.803	0.370
否	39 (50.65)	26 (59.09)		
孕激素受体阳性				
是	42 (54.55)	21 (47.73)	0.52	0.477
否	35 (45.45)	23 (52.27)		
术前辅助化疗				
是	38 (49.35)	28 (63.64)	2.305	0.129
否	39 (50.65)	16 (36.36)		

表2 浸润性乳腺癌HGF表达与患者化疗近期疗效的关系

HGF表达	n	CR	PR	SD	PD	缓解率 (%)	总有效率 (%)
阳性	36	1	17	15	3	18 (50.00)	33 (91.67)
阴性	30	3	23	3	1	26 (86.67)	29 (96.66)
χ^2	—	—	—	—	—	9.9	0.719
P	—	—	—	—	—	0.002	0.397

表3 浸润性乳腺癌HGF表达与患者化疗远期疗效的关系 (%)

HGF表达	n	3年	5年
阳性	36	86.11	63.89
阴性	30	93.33	86.67
χ^2	—	0.900	4.440
P	—	0.343	0.035

2.4 不同HGF表达的乳腺癌MCF-7细胞对化疗的敏感性分析

HGF下调表达的si-HGF组在0.5、1、2、4、8 ng/mL的表阿霉素中乳腺癌MCF-7细胞存活率均明显的低于空白对照、阴性对照组，差异具统计学意义 (均P<0.05) (表4)。

表4 不同HGF表达的乳腺癌MCF-7细胞与表阿霉素共培养的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	表阿霉素 (ng/mL)				
	0.5	1	2	4	8
空白对照组	94.2 ± 3.9	91.5 ± 4.3	83.0 ± 7.4	64.1 ± 8.0	39.5 ± 6.8
阴性对照组	93.8 ± 4.0	92.3 ± 4.7	85.1 ± 7.8	62.9 ± 8.3	41.0 ± 6.4
si-HGF组	70.3 ± 5.2 ¹⁾	58.0 ± 6.1 ¹⁾	42.1 ± 5.5 ¹⁾	33.9 ± 4.7 ¹⁾	31.4 ± 5.0 ¹⁾

注: 1) 与空白对照组、阴性对照组比较, P<0.05

3 讨论

乳腺癌早期可无明显临床症状, 乳腺局部微小肿块在触诊以及临床体格检查中可以触及, 但部分病变容易与小叶纤维囊性病变相混, 超声以及钼靶射线检查虽然可以明显提高早期诊断灵敏度以及特异度30%以上, 但仍然存在15%左右的漏诊率^[7]。对于早期即发生远处淋巴结转移以及肝脏、脑部等重要内脏器官转移的患者, 保留乳腺的根治性手术, 以及传统根治性乳腺癌切除术联合淋巴结清扫难以彻底切除病变。新型辅助化疗主要通过围手术期运用多柔比星、吉西他滨、紫杉醇以及卡铂等细胞毒性药物, 进而抑制细胞增殖、DNA扩增^[8-9], 改善预后。但问天娇等^[10-12]通

过分析了175 mg/d以及顺铂55 mg/d联合化疗6个周期后, 17%的乳腺浸润型导管癌的疾病总体缓解率仅为30%, 患者的总生存时间不足39个月, 提示了传统单纯化疗的临床应用的局限性。近年来对于恶性肿瘤基因突变以及癌基因水平的探讨发现, 促癌基因通过对于新生血管、淋巴结的侵袭以及细胞周期的调控作用, 进而促进癌细胞的转移和复发。肝细胞生长因子为跨膜G蛋白偶联受体家族成员, 通过对于细胞内第二信使的信息传递以及miRNA的调控, 进而促进肿瘤的侵袭和转移^[13-15]。迄今为止已发现在卵巢浆液性囊腺癌、甲状腺乳头状癌等恶性肿瘤组织中显著表达, 但在乳腺癌发生发展中的作用研究较少, 本次研究在探讨其在乳腺癌中表达差异的同时, 进一步揭示了新型辅助

化疗中HGF的波动与临床预后的关系。

本次研究中乳腺癌患者中HGF的阳性表达率为63.64%，明显高于Ahmed等^[16-17]报道的16%左右的平均乳腺小叶或者胆管上皮的阳性表达率，提示了HGF蛋白水平表达的增强。对于相关临床特征的分析发现，HGF与乳腺癌患者的雌激素或者孕激素受体的阳性率并无明显关联，雌激素受体ER以及孕激素受体PR激活介导的下游HER/cyc/bcl-2信号通路的活化并不影响到HGF在乳腺癌中的促癌作用的发挥。乳腺癌分化程度越差、临床分期越晚、淋巴结转移率越高，患者的HGF阳性表达率越强，特别是发生淋巴结转移的患者，HGF的阳性率可达50%。新型辅助化疗可以缩小围手术期患者乳腺癌病灶的大小，改善远期临床预后并提高患者的生存质量，HGF阳性表达患者的化疗缓解率50.00%显著的低于阴性组的86.67%。HGF表达的增强可以通过促进磷酸二酯酶以及二磷酸腺苷的活性，进而促进细胞核周边的钙离子等第二信使的表达，促进VEGF对于新生血管的促生成作用，并协助逃逸免疫监察。对于远期疗效分析可见，HGF阳性的患者其3年生存率以及5年生存率可分别达93.33%、86.11%，明显高于HGF阴性的患者。Ho-Yen等^[18-20]通过前瞻性分析了33例小样本量的乳腺小叶原位癌进行单纯吉西他滨35 mg/d联合卡铂65 mg/d的新型辅助化疗后，HGF阳性表达率为45%的乳腺癌患者明显高于阳性表达率为13%的患者，提示了HGF对于评估新型辅助化疗方案疗效的临床价值。另外，本次研究进行了细胞水平的试验，发现HGF转染乳腺癌si-MCF-7后，虽然基因的敲除，在表阿霉素的细胞毒性作用下HGF可以起到化疗的保护性作用，抑制表阿霉素对于乳腺癌细胞MCF-7中DNA复制以及染色体形成，进而促进细胞凋亡。而在表阿霉素为4 μg/L以及8 μg/L的作用下，HGF对于乳腺癌MCF-7细胞的保护性作用呈现了一定的平台期表现，提示HGF对于细胞增殖可能具有一定的浓度依赖性，但本次研究并未进一步探讨，提示了一定的不足。

综上所述，HGF在乳腺癌组织中的表达，同时HGF的阳性表达与与肿瘤分化程度、TNM分期、淋巴结转移相关。HGF阳性表达会影响患者的化疗效果，通过细胞水平的试验敲除HGF表达

后可以增强乳腺癌细胞对化疗的敏感性。

参考文献

- [1] 张新毅. 乳腺钼靶X射线摄片联合血清CA15-3、CEA和OPN在乳腺癌诊断中的价值[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(23):6640-6641.
Zhang XY. Value of molybdenum target x-ray combined with serum CA15-3, CEA and OPN in diagnosis of breast cancer[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2014, 34(23):6640-6641.
- [2] 周金妹, 江泽飞. 液体肿瘤生物指标检测对乳腺癌患者的临床价值[J]. 中国癌症杂志, 2014, 24(8):636-640.
Zhou JM, Jiang ZF. The clinical value of liquid tumor biomarker detection for breast cancer[J]. China Oncology, 2014, 24(8):636-640.
- [3] 罗海涛, 邹静荷, 古伟光, 等. 卡培他滨维持治疗对联合化疗有效的复发转移三阴乳腺癌的临床观察[J]. 重庆医学, 2015, 44(24):3357-3359.
Luo HT, Zou JH, Gu WG, et al. Clinical observation of capecitabine continuous maintenance in treatment recurrence of triple-negative breast cancer with reaction to combined chemoradiotherapy[J]. Chongqing Medicine, 2015, 44(24):3357-3359.
- [4] 梅雅琪, 杨娅娟, 苏丹, 等. 乳腺癌术后化疗患者的疾病感知及相关因素[J]. 中国心理卫生杂志, 2015, 29(8):567-569.
Mei YQ, Yang YJ, Su D, et al. Disease perception and associated factors in breast cancer patients undergoing postoperative chemotherapy[J]. Chinese Mental Health Journal, 2015, 29(8):567-569.
- [5] Diéras V, Campone M, Yardley DA, et al. Randomized, phase II, placebo-controlled trial of onartuzumab and/or bevacizumab in combination with weekly paclitaxel in patients with metastatic triple-negative breast cancer[J]. Ann Oncol, 2015, 26(9):1904-1910.
- [6] Tsai PC, Fu YS, Chang LS, et al. Cardiotoxin III Inhibits Hepatocyte Growth Factor-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Suppresses Invasion of MDA-MB-231 Cells[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2016, 30(1):12-21.
- [7] 师丙帅, 王文胜, 赵爱国, 等. 奈达铂联合吉西他滨治疗转移性三阴性乳腺癌近期疗效观察[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(13):2154-2156.
Shi BS, Wang WS, Zhao AG, et al. Short-term efficacy of nedaplatin plus gemcitabine in treatment of metastatic triple negative breast cancer[J]. The Journal of Practical Medicine, 2014, 30(13):2154-2156.
- [8] 余明杰, 徐元宏, 王萍. RNA干扰A20基因的表达对人乳腺癌细胞MCF-7增殖、凋亡和迁移的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(9):1215-1219.
Yu MJ, Xu YH, Wang P. The effect of knockdown A20 expression

- on the proliferation, apoptosis and migration of MCF-7 cells[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2015, 50(9):1215-1219.
- [9] 张倩, 颜海波, 刘锋. ARID1A对乳腺癌生长的抑制及潜在调控机制[J]. *复旦学报:医学版*, 2015, 42(4):427-434.
- Zhang Q, Yan HB, Liu F. ARID1A acts as a tumor-suppressor in breast cancer and its underlying regulatory mechanism[J]. *Fudan University Journal of Medical Sciences*, 2015, 42(4):427-434.
- [10] 李涌涛, 蒋威华, 王晓文, 等. 新疆地区不同肿瘤家族史的乳腺癌患者BRCA1/2基因突变的分析及临床意义[J]. *实用医学杂志*, 2015, 31(14):2287-2290.
- Li YT, Jiang WH, Wang XW, et al. Clinical significance of BRCA1/2 mutation in breast cancer patients with different malignant tumor family history in Xinjiang region[J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2015, 31(14):2287-2290.
- [11] 邸大琳, 陈蕾, 王丽娜, 等. 人细胞间黏附分子1基因慢病毒干扰载体感染MCF-7细胞下调靶基因表达[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(8):1048-1052.
- Di DL, Chen L, Wang LN, et al. Down-regulation of human intercellular adhesion molecule-1 expression in MCF-7 cells infected by lentiviral short hairpin RNA interference vectors[J]. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2015, 31(8):1048-1052.
- [12] 问天娇, 高媛, 陈喃喃, 等. 多药耐药1基因小干扰RNA阳离子脂质体逆转乳腺癌多药耐药的研究[J]. *中国药学杂志*, 2015, 50(9):763-767.
- Wen TJ, Gao Y, Chen NN, et al. Reversal of Multidrug Resistance in Breast Cancer by MDR1 Gene SiRNA Cationic Liposomes[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2015, 50(9):763-767.
- [13] 徐学清, 张贝. 乳腺肿瘤细胞对微环境成纤维细胞基因表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(7):1032-1033.
- Xu XQ, Zhang B. Effect of breast tumor cells on the gene expression profiles of fibroblasts in microenvironment[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2015, 31(7):1032-1033.
- [14] 张鹤美, 贺金奖, 高四海, 等. 外源性TGFBI抑制乳腺癌细胞生长的体内外实验[J]. *肿瘤防治研究*, 2014, 41(7):693-697.
- Zhang HM, He JJ, Gao SH, et al. TGFBI Inhibits Proliferation of Breast Cancer Cell in vitro and in vivo[J]. *Cancer Research on Prevention and Treatment*, 2014, 41(7):693-697.
- [15] 林艳, 匡文斌, 吴碧涛, 等. 肝细胞生长因子通过上调环氧化酶2表达增强乳腺癌细胞的侵袭能力[J]. *肿瘤*, 2015, 35(7):732-740.
- Lin Y, Kuang WB, Wu BT, et al. Hepatocyte growth factor induces the invasion ability of breast cancer cells by up-regulating COX2 expression[J]. *Tumor* 2015, 35(7):732-740.
- [16] 刘仕红. 成年女性乳腺癌发病的危险诱因分析[J]. *现代仪器与医疗*, 2015, 21(3):110-111.
- Liu SH. Analysis of risk factors for breast cancer occurrence in adult women[J]. *Modern Instruments & Medical Treatment*, 2015, 21(3):110-111.
- [17] Ahmed M, Kumar G, Moussa M, et al. Hepatic Radiofrequency Ablation-induced Stimulation of Distant Tumor Growth Is Suppressed by c-Met Inhibition[J]. *Radiology*, 2016, 279(1):103-117.
- [18] Ho-Yen CM, Jones JL, Kermorgant S. The clinical and functional significance of c-Met in breast cancer: a review[J]. *Breast Cancer Res*, 2015, 17:52. doi: 10.1186/s13058-015-0547-6.
- [19] Vallet S, Bashari MH, Fan FJ, et al. Pre-Osteoblasts Stimulate Migration of Breast Cancer Cells via the HGF/MET Pathway[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3):e0150507. doi: 10.1371/journal.pone.0150507.
- [20] Liu S. HGF-MET as a breast cancer biomarker[J]. *Aging (Albany NY)*, 2015, 7(3):150-151.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 吕海通, 廖宁. HGF在浸润性乳腺癌中的表达及其对化疗敏感性和预后的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(5):747-751. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.05.021

Cite this article as: Lu HT, Liao N. Expression of HGF in infiltrative breast cancer and its effect on sensitivity of chemotherapy and prognosis[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(5):747-751. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.05.021