



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.013
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3849.shtml

· 基础研究 ·

c-Met 在有、无肝转移结直肠癌组织中的表达差异

姚建锋¹, 孙学军², 闫立昆¹, 贺赛², 李小军¹, 仝聪¹, 王小强¹

(1. 陕西省人民医院 普通外科, 陕西 西安 710068; 2. 西安交通大学附属第一医院 普通外科, 陕西 西安 710061)

摘要

目的: 探讨肝细胞生长因子受体 (c-Met) 在有、无肝转移结直肠癌组织中的表达及其临床意义。

方法: 用 real-time PCR 法和 Western-blot 法分别对 48 例肝转移结直肠癌组织和 48 例无肝转移结直肠癌组织 c-Met 基因和蛋白表达进行检测, 并分析 c-Met 的表达与各临床病理因素间的关系。

结果: 肝转移结直肠癌组织中 c-Met 表达在 mRNA 和蛋白水平均明显高于无肝转移结直肠癌组织, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); c-Met 的 mRNA 水平和蛋白水平均与临床分期、淋巴结转移密切相关 (均 $P < 0.05$), 而与性别、年龄、组织分化程度及肿瘤部位无关 (均 $P > 0.05$)。

结论: c-Met 的高表达与结直肠癌肝转移有关, 检测 c-Met 的表达对预测结直肠癌肝转移可能具有重要价值。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(4):468-472]

关键词

结直肠肿瘤; 原癌基因蛋白质 c-met; 肿瘤转移

中图分类号: R735.3

C-Met expression in primary colorectal cancer tissues with and without liver metastasis

YAO Jianfeng¹, SUN Xuejun², YAN Likun¹, HE Sai², LI Xiaojun¹, TONG Cong¹, WANG Xiaoqiang¹

(1. Department of General Surgery, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; 2. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Corresponding author: SUN Xuejun, Email: sunxy@mail.xjtu.edu.cn

ABSTRACT

Objective: To investigate c-Met expression in colorectal carcinoma tissue either with or without liver metastasis and its clinical significance.

Methods: The c-Met mRNA and protein expressions in 48 specimens of primary colorectal cancer tissues with liver metastasis and 48 specimens of primary colorectal cancer tissues without liver metastasis were determined by real-time PCR method and Western blot analysis, respectively. The relations of c-Met expression with some clinicopathologic profiles were analyzed.

Results: Both c-Met mRNA and protein expressions in primary colorectal cancer tissues with liver metastasis were higher than those in primary colorectal cancer tissues without liver metastasis, and the differences had statistical significance (both $P < 0.05$). Both the c-Met mRNA and protein expression levels were significantly

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81172362; 81101874); 陕西省自然科学基金资助项目 (2013JM4003)。

收稿日期: 2014-02-08; 修订日期: 2014-03-22。

作者简介: 姚建锋, 陕西省人民医院主治医师, 主要从事消化道肿瘤方面的研究。

通信作者: 孙学军, Email: sunxy@mail.xjtu.edu.cn

related to clinical stage and lymph node metastasis (both $P < 0.05$), but irrelevant to sex, age, degree of differentiation and tumor location (all $P > 0.05$).

Conclusion: High c-Met expression is associated with colorectal cancer liver metastasis, and c-Met detection may have an important value for predicting colorectal cancer liver metastasis.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(4):468-472]

KEYWORDS Colorectal Neoplasms; Proto-Oncogene Proteins c-met; Neoplasm Metastasis

CLC number: R735.3

结直肠癌是常见的恶性肿瘤之一,近年来我国发病率有上升趋势^[1]。有研究^[2]表明,约有10%~25%的结直肠癌患者在临床确诊时已存在肝转移,有30%~50%结直肠癌患者在根治性切除后出现复发性肝转移,50%以上的死亡患者存在肝转移。肝转移成为结直肠癌患者死亡的主要原因。c-Met蛋白属于受体酪氨酸蛋白激酶家族成员,是肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)的上皮特异性受体,可调控一种“侵袭性生长”的遗传程序^[3],参与许多生理发育过程以及肿瘤的侵袭和转移。有研究表明^[4],c-Met在相当一部分人类肿瘤中高表达,并与恶性肿瘤的发生、发展及转移密切相关。近期有研究^[5]表明,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。然而在结直肠癌患者中c-Met是否借其异常表达来增加肝转移能力,仍需进一步研究。本研究采用real-time PCR法和Western blot法分别检测有肝转移结直肠癌组和无肝转移结直肠癌组组织中c-Met基因和蛋白表达,分析c-Met与各临床病理因素间的关系,探讨其与结直肠癌肝转移关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源

肝转移结直肠癌组、无肝转移结直肠癌组各48例取自陕西省人民医院普外科2007年1月—2012年6月手术切除患者的新鲜标本,-80℃冷冻保存,其中男54例,女42例;年龄52~80岁(中位数66岁)。所有患者术后经病理确诊,术前均未经化疗、放疗等辅助治疗。结直肠癌TNM分期按照NCCN指南2013版进行。

1.2 主要试剂

TRIzol购自美国Invitrogen公司,兔抗人c-Met单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology, Inc(CST)公司,多克隆羊抗兔二抗购自Santa Cruz公司,哺乳动物细胞蛋白裂解液(RIPA)及BCA蛋白定量试剂盒均购自北京中杉生物技术有限公司,c-Met引物由上海吉凯生物工程有限公司合成,SYBR实时定量PCR试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 患者分组

无肝转移组($n=48$):术前影像学诊断或术中探查无肝转移,术后病理为II、III期,术后1年内未发现有肝脏转移;肝转移组($n=48$):术前影像学或术中已发现有肝脏转移。

1.4 方法

1.4.1 real-time PCR检测c-Met mRNA表达
先行标本组织总RNA抽取(根据Invitrogen公司的TRIzol操作说明书进行),反转录成cDNA(根据Promega公司M-MLV操作说明书进行),然后用RT-PCR试剂盒检测c-Met mRNA表达水平,其中c-Met基因上游引物:5'-AGT CAT AGG AAG AGG GCA TT-3',下游引物:5'-CTT CAC TTC GCA GGC AGA-3';GAPDH基因上游引物:5'-TGA CTT CAA CAG CGA CAC CCA-3',下游引物:5'-CAC CCT GTT GCT GTA GCC AAA-3',反应体系为20 μL,SYBR premix ex taq 10.0 μL,上游引物(2.5 μM)0.5 μL,下游引物(2.5 μM)0.5 μL,cDNA 1.0 μL,RNase-Free H₂O 8.0 μL。两步法进行real-Time PCR:95℃预变性30 s,PCR反应95℃变性5 s,60℃退火30 s,55℃延伸30 s,共45个循环。内参基因为GAPDH,反应体系和条件相同,计算c-Met mRNA的相对表达量。

1.4.2 Western blot检测c-Met的蛋白表达 RIPA

(加蛋白酶及磷酸酶抑制剂)裂解液裂解 10 mg 液氮冻存组织, BCA 法测蛋白浓度, $5 \times$ Buffer 加样缓冲液混合, 变性蛋白 (100°C , 5 min), 每条 8% SDS-PAGE 凝胶泳道上样 $25 \mu\text{g}$ 蛋白, 电泳 80 V 2 h, 转 PVDF 膜 300 mA 2.5 h, 含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h, 兔抗人 Met 抗体 (1:1 000) 4°C 孵育过夜, GAPDH 一抗 (1:2 000), 4°C 过夜, 兔二抗 (1:2 000), 室温 1 h, ECL 显影, 利用化学发光法 (ECL) 检测曝光并进行扫描后分析。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计分析软件对数据进行分析。计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间指标比较采用独立样本 t 检验, 多组间指标比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组结直肠癌组织中 c-Met 的 mRNA 表达

用 real-time PCR 法检测肝转移组结直肠癌组织与无肝转移结直肠癌组织中 c-Met 的 mRNA 表达。结果发现无肝转移结直肠癌组组织中 c-Met 基因 Ct 值为 22.736 ± 0.111 , 内参基因 (GAPDH) Ct 值为 16.204 ± 0.070 , ΔCt 值 ($\Delta\text{Ct} = \text{目的基因 Ct 值} - \text{内参基因 Ct 值}$) 为 6.532 ± 0.930 ; 肝转移结直肠癌组组织中 c-Met 基因 Ct 值为 32.327 ± 0.093 , 内参基因 (GAPDH) Ct 值为 16.178 ± 0.108 , ΔCt 值为 16.150 ± 1.017 ; 提示肝转移结直肠癌组组织中 c-Met 基因表达在 mRNA 水平明显高于无肝转移结直肠癌组, 其组间差异具有统计学意义 ($t = 4.763$, $P = 0.009$) (图 1)。

2.2 两组结直肠癌组织中 c-Met 的蛋白表达

用 Western blot 法检测肝转移组结直肠癌组织与无肝转移结直肠癌组织中 c-Met 的蛋白表达。c-Met 蛋白在肝转移结直肠癌组织中的表达强于其在非肝转移结直肠癌组织中的表达 (图 2)。在 48 例非肝转移结直肠癌组织中 c-Met 蛋白表达水平明显低于其在肝转移结直肠癌组织中的表达 [(0.052 ± 0.044) vs. (0.234 ± 0.093) ; $t = 3.469$, $P = 0.026$] (图 3)。

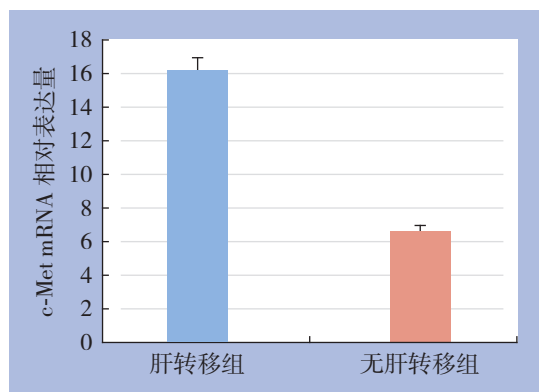


图 1 有、无肝转移结直肠癌组织中 c-Met 的 mRNA 表达
Figure 1 c-Met mRNA expressions in primary colorectal cancer tissues with and without liver metastasis

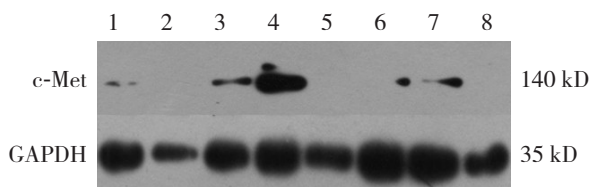


图 2 c-Met 蛋白电泳图 1-4: 肝转移组; 5-8: 无肝转移组

Figure 2 Electrophoretogram of c-Met protein 1-4: Liver metastasis group; 5-8: Non-liver metastasis group

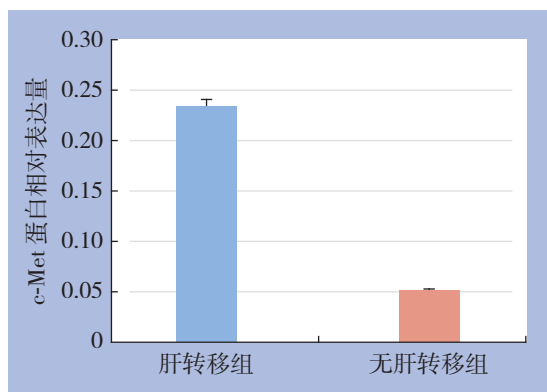


图 3 有、无肝转移结直肠癌组织中 c-Met 蛋白表达
Figure 3 c-Met protein expressions in primary colorectal cancer tissues with and without liver metastasis

2.3 结直肠癌中 c-Met 的基因和蛋白表达与临床病理因素的关系

结直肠癌组织中 c-Met 的基因和蛋白表达与临床分期、淋巴结转移有关 (均 $P < 0.05$), 而与患者的性别、年龄、组织分化程度及肿瘤部位无关 (均 $P > 0.05$) (表 1)。

表1 c-Met mRNA和蛋白表达与结直肠癌患者临床病理因素的关系

Table1 The relations of c-Met mRNA and protein expression with the clinicopathologic features of colorectal cancer patients

临床病理因素	n	c-Met mRNA ΔCt	t/F	P	c-Met 蛋白 c-Met/GAPDH	t/F	P
性别							
男	54	5.309 ± 0.544	1.316	0.258	0.312 ± 0.272 0.070 ± 0.042	0.802	0.481
女	42	6.651 ± 0.593					
年龄(岁)							
> 60	58	7.526 ± 0.882	1.803	0.169	0.323 ± 0.271 0.071 ± 0.041	0.849	0.458
≤ 60	38	5.446 ± 0.591					
组织分化程度							
低	29	6.818 ± 0.482	3.773	0.100	0.313 ± 0.272 0.071 ± 0.039 0.325 ± 0.270	0.881	0.470
中	36	8.226 ± 0.618					
高	31	6.280 ± 0.780					
TNM分期							
II	18	5.450 ± 0.557	19.732	0.002	0.165 ± 0.090 0.093 ± 0.006 0.322 ± 0.013	5.333	0.047
III	22	12.437 ± 1.648					
IV	56	17.558 ± 0.862					
淋巴结转移							
有	47	6.216 ± 0.738	3.076	0.037	0.283 ± 0.014 0.073 ± 0.006	8.307	0.010
无	49	15.113 ± 0.145					
肿瘤部位							
直肠	52	5.709 ± 0.544	2.070	0.107	0.252 ± 0.251 0.032 ± 0.013	1.165	0.309
结肠	44	7.051 ± 0.593					

3 讨论

c-Met 是原癌基因, 表达于上皮细胞表面, 其编码的蛋白产物是 HGF 的受体, 具有酪氨酸激酶活性。大量研究^[6-10]表明, 在人的许多肿瘤组织中有 c-Met 基因和蛋白过表达, 如卵巢癌、胃癌、肺癌、胰腺癌、乳腺癌等。且多项研究已证实在肿瘤组织中 c-Met 的过表达与肿瘤的浸润、转移和预后密切相关。Bu 等^[11]研究表明: c-Met 在卵巢癌上皮癌中呈明显高表达, 并且认为 c-Met 高表达与卵巢癌的预后相关; Amemiya 等^[12]研究表明: c-Met 在胃癌组织中明显高表达, 且与肿瘤的分化明显相关, 并预示 c-Met 可作为判断胃癌患者预后的因子。da Silveira 等^[13]亦发现甲状腺癌组织中 c-Met 明显存在过表达。Tsuta 等^[14]发现 c-Met 在非小细胞肺癌组织中存在过表达, 并可作为判断非小细胞肺癌患者预后的独立因子。Holgren 等^[15]通过上调 c-Met 基因能使 c-Met 高表达的肿瘤细胞显著增加增殖能力及侵袭性。Horikawa 等^[16]从 39 例鼻咽癌标本中发现 c-Met 原癌基因的表达与肿瘤细

胞的转移能力密切相关。Fazekas 等^[17]采用人结肠癌细胞株及 SCID 鼠动物实验研究表明, c-Met 在人结肠癌中的表达可作为肝转移潜能的标志物, c-Met 与肿瘤转移信号的关系密切。

本研究中, 无肝转移组与肝转移组结直肠癌组织中 c-Met 表达比较, 肝转移组表达阳性率均高于无肝转移组, 统计学检验差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。一方面提示 c-Met 蛋白的高表达可能是由于 c-Met 基因转录水平改变和 c-Met 基因的扩增所致, c-Met 基因过度表达在结直肠癌生长、发展过程中起重要作用。另一方面表明肝转移组结直肠癌组织中 c-Met 过度表达, 可能通过增加肿瘤组织对 HGF 的敏感性, 使肿瘤细胞肝转移潜能增加。

Ma 等^[18]分析胃癌 c-Met 的表达发现有淋巴结转移者的 c-Met 表达与无淋巴结转移的 c-Met 表达差异明显, 说明 c-Met 蛋白的表达与肿瘤淋巴结转移关系密切。Takeuchi 等^[19]发现不同大小的结肠癌组织中以及有无转移的癌组织 c-Met 表达情况不同, 提示 c-Met 对肿瘤的浸润深度以及预测肿瘤有、无转移均是一个重要的分子标志物。Matsui 等^[20]通过细胞及动物实验研究表明, 一方面, c-Met 过表达与结直肠癌肝转移及淋巴结转移密切相关, 另一方面, 即使结直肠癌肝切除术后血清中 HGF 升高, 然而肝转移灶中 c-Met 表达却降低, 并与肝转移灶细胞的生长能力降低密切相关因此, c-Met 已被认为是促进肿瘤发生, 发展, 浸润, 转移的关键分子。

本研究中发现 c-Met 的表达与 TNM 分期和淋巴结转移情况相关, 而与肿瘤细胞分化程度, 患者性别、年龄无关 ($P > 0.05$)。一方面提示 c-Met 过度表达发生在结直肠癌的不同分期, 肝转移期结直肠癌患者可能因为分期偏晚 c-Met 的更高表达而具备更高的肝转移潜能; 另一方面, 本研究中 c-Met 的表达在结肠癌组与直肠癌组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 c-Met 的过度表达与肿瘤部位无关, 有待于后续实验进一步扩大样本量进行分层分析。本次研究结果与目前国内该方面报道基本一致。

综上所述, 本研究表明了 c-Met 在结直肠癌肝转移组中的高表达, 以及与结直肠癌患者分期、淋巴结转移相关。提示 c-Met 与结直肠癌的浸润、肝转移密切相关, 因此检测 c-Met 的表达情况有可能为预测结直肠癌肝转移及判断预后提供重要依据。

参考文献

- [1] 中国抗癌协会大肠癌专业委员会. 中国结直肠癌性别、年龄和部位变化趋势—19 家医院 31246 例初步分析 [C]. 欧亚结直肠外科会议论文汇编, 2009:20-25.
- [2] Konopke R, Roth J, Volk A, et al. Colorectal liver metastases: an update on palliative treatment options[J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2012, 21(1):83-91.
- [3] Stella GM, Benvenuti S, Gramaglia D, et al. MET mutations in cancers of unknown primary origin (CUPs)[J]. *Hum Mutat*, 2011, 32(1):44-50.
- [4] Yap TA, Sandhu SK, Alam SM, et al. HGF/c-MET targeted therapeutics: novel strategies for cancer medicine[J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12(14):2045-2058.
- [5] 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.
- [6] Amemiya H, Peña A, Chiurillo M, et al. Increased expression of the c-Met receptor mRNA in gastric cancer[J]. *Invest Clin*, 2013, 54(3):284-298.
- [7] Gardian K, Janczewska S, Durluk M. Microenvironment elements involved in the development of pancreatic cancer tumor[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2012, doi: 10.1155/2012/585674.
- [8] Yamamoto S, Tsuda H, Miyai K, et al. Gene amplification and protein overexpression of MET are common events in ovarian clear-cell adenocarcinoma: their roles in tumor progression and prognostication of the patient[J]. *Mod Pathol*, 2011, 24(8):1146-1155.
- [9] Raghav KP, Wang W, Liu S, et al. cMET and phospho-cMET protein levels in breast cancers and survival outcomes[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(8):2269-2277.
- [10] Tretiakova M, Salama AK, Karrison T, et al. MET and phosphorylated MET as potential biomarkers in lung cancer[J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2011, 30(4):341-354.
- [11] Bu R, Uddin S, Bavi P, et al. HGF/c-Met pathway has a prominent role in mediating antiapoptotic signals through AKT in epithelial ovarian carcinoma[J]. *Lab Invest*, 2011, 91(1):124-137.
- [12] Amemiya H, Menolascino F, Peña A. Role of the expression of c-Met receptor in the progression of gastric cancer[J]. *Invest Clin*, 2010, 51(3):369-380.
- [13] da Silveira Mitteldorf CA, de Sousa-Canavez JM, Leite KR, et al. FN1, GALE, MET, and QPCT overexpression in papillary thyroid carcinoma: molecular analysis using frozen tissue and routine fine-needle aspiration biopsy samples[J]. *Diagn Cytopathol*, 2011, 39(8):556-561.
- [14] Tsuta K, Kozu Y, Mimae T, et al. c-MET/phospho-MET protein expression and MET gene copy number in non-small cell lung carcinomas[J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(2):331-339.
- [15] Holgren C, Dougherty U, Edwin F, et al. Sprouty-2 controls c-Met expression and metastatic potential of colon cancer cells: sprouty/c-Met upregulation in human colonic adenocarcinomas[J]. *Oncogene*, 2010, 29(38):5241-5253.
- [16] Horikawa T, Sheen TS, Takeshita H, et al. Induction of c-Met proto-oncogene by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 and the correlation with cervical lymph node metastasis of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(1):27-33.
- [17] Fazekas K, Csuka O, Köves I, et al. Experimental and clinicopathologic studies on the function of the HGF receptor in human colon cancer metastasis[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2000, 18(8):639-649.
- [18] Ma J, Ma J, Meng Q, et al. Prognostic value and clinical pathology of MACC-1 and c-MET expression in gastric carcinoma[J]. *Pathol Oncol Res*, 2013, 19(4):821-832.
- [19] Takeuchi H, Bilchik A, Saha S, et al. c-Met expression level in primary colon cancer: a predictor of tumor invasion and lymph node metastases[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(4):1480-1488.
- [20] Matsui S, Osada S, Tomita H, et al. Clinical significance of aggressive hepatectomy for colorectal liver metastasis, evaluated from the HGF/c-Met pathway[J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(2):289-297.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 姚建锋, 孙学军, 闫立昆, 等. c-Met 在有、无肝转移结肠癌组织中的表达差异 [J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(4):468-472. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.013
 Cite this article as: YAO JF, SUN XJ, YAN LK, et al. C-Met expression in primary colorectal cancer tissues with and without liver metastasis[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(4):468-472. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.013