

c-Met、HIF-1 α 在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义

张彦惠^{1,2}, 鲍建昌², 邱法鹏³, 孟广明², 郭朝斌², 邱杰²

(1.潍坊医学院, 山东 潍坊 261053; 2.青岛市市立医院东院区, 山东 青岛 266000;

3.青州东圣水医院, 山东 青州 262500)

摘要: [目的] 探讨甲状腺乳头状癌中 c-Met、HIF-1 α 的表达及其临床意义。[方法] 采用免疫组化方法研究 c-Met、HIF-1 α 在甲状腺乳头状癌肿瘤组织中的表达及与临床病理特征的关系。[结果] c-Met、HIF-1 α 在甲状腺乳头状癌中的阳性表达率分别为 97.22%、86.11%, 明显高于甲状腺腺瘤及癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 二者的高表达呈正相关, 但与肿瘤大小、临床分期及淋巴结转移无关。[结论] c-Met、HIF-1 α 在甲状腺乳头状癌肿瘤组织中表达上调, 二者表达呈正相关。

关键词: 甲状腺肿瘤; 乳头状癌; c-Met; HIF-1 α ; 免疫组织化学

中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)01-0055-05

Expressions of c-Met and HIF-1 α in Thyroid Papillary Carcinoma and Their Clinical Significance

ZHANG Yan-hui^{1,2}, BAO Jian-chang², QIU Fa-peng³, et al.

(1. Weifang Medical College, Weifang 261053, China; 2. Qingdao Municipal Hospital (Group), Qingdao 266000, China; 3. Dongshengshui Hospital of Qingzhou, Qingzhou 262500, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of c-Met and HIF-1 α in thyroid papillary carcinoma and their clinical significance. [Methods] The expressions of c-Met and HIF-1 α in tissue samples from 36 cases with thyroid papillary carcinoma were detected by immunohistochemical staining, and their relationship with clinicopathologic characteristics were analyzed. [Results] The positive expression rates of c-Met and HIF-1 α in thyroid papillary carcinoma tissues were 97.22% and 86.11% respectively, which were significant higher than those in cancer adjacent tissues or adenoma tissues ($P < 0.05$). Expressions of c-Met and HIF-1 α showed a positive correlation, but no correlation of their expressions with tumor size, clinical stages or lymph node metastasis. [Conclusion] The expressions of c-Met and HIF-1 α upregulate in thyroid papillary carcinoma tissues, with positive correlation.

Subject words: thyroid neoplasms; papillary carcinoma; c-Met; HIF-1 α ; immunohistochemistry

甲状腺癌是头颈部最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率呈逐年上升趋势, 许多患者术前并无明显临床症状, 常于查体时发现病灶^[1], 其中术后病理证实多为甲状腺乳头状癌^[2]。甲状腺乳头状癌的病因不详, 其发生发展可能是多种机制联合作用的结果。近年来, 随着分子生物学的发展, 有关甲状腺乳头状癌相关基因及肿瘤标志物的研究也更加深入。甲状腺乳头状癌特异性肿瘤标志物的确立, 以及可靠、可行的检测手段的建立, 对提高确诊率, 改善甲

状腺乳头状癌的治疗具有重要意义。关于 c-Met、HIF-1 α 在甲状腺乳头状癌的发生发展中的作用及相互关系还鲜有报道。本文采用免疫组化方法, 研究 c-Met、HIF-1 α 在甲状腺乳头状癌肿瘤组织中的表达。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集青岛市市立医院 2009 年 4 月至 2012 年 6 月经手术切除的甲状腺组织存档蜡块 48 例, 每例

通讯作者: 邱杰, 副主任医师, 硕士生导师, 博士; 山东省青岛市市立医院耳鼻喉科, 山东省青岛市市南区东海路 59 号 (266000); E-mail: wfqpeter2000@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2012-12-06

临床资料完整。甲状腺乳头状癌 36 例,其中男性 11 例,女性 25 例,年龄 9~71 岁,中位年龄 41.8 岁,病理分期为 I 期 28 例,II 期 2 例,III 期 3 例,IV 期 3 例(按照 AJCC 肿瘤分期 2010 年第 7 版标准)。所有患者术前均未接受放疗、化疗及免疫制剂等抗癌治疗。取癌旁正常组织 12 例为对照组。甲状腺腺瘤 12 例,其中男性 2 例,女性 10 例,年龄 22~75 岁,中位年龄 51.6 岁。所有病例的诊断依据患者的临床资料和术后病理确认。全部标本经 4% 中性甲醛固定,常规脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色镜下观察。

1.2 免疫组化染色

免疫组化检测采用 SP 法。石蜡包埋组织连续切片,厚约 3 μ m,脱蜡至水,置于 pH6.0 的柠檬酸修复液中,微波加热抗原修复 8min,冷却后,4% H₂O₂ (室温,10min)阻断内源性过氧化物酶,PBS 缓冲液漂洗,滴加一抗 c-Met 抗体(中杉金桥公司,ZA-0412,工作液)、HIF-1 α 抗体(中杉金桥公司,ZA-0552,克隆号 EP118,工作液),37 $^{\circ}$ C 湿盒温浴 1h,PBS 洗后滴加二抗(快捷型酶标羊抗鼠/兔 IgG 聚合物),室温孵育 15min,PBS 缓冲液冲洗切片,DAB 显色后,流水冲洗终止反应,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,树胶封片,显微镜下观察。PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照,用预实验中已知的阳性切片作为阳性对照。

1.3 结果判断

免疫组化染色结果由两位病理科医生采用盲法阅片对切片进行半定量评估。c-Met 阳性着色部分为细胞质,呈棕褐色,HIF-1 α 阳性着色部分为细胞核或细胞核及部分细胞质,呈现棕色或淡棕色颗粒。按染色阳性细胞数量评分:0 分(全片未见着色或少于 5% 细胞散在着色),1 分(5%~25% 细胞着色),2 分(25%~50% 细胞染色阳性),3 分(50%~75% 细胞染色阳性),4 分(>75% 细胞染色阳性)。按染色强度评分:0 分(阴性),1 分(弱阳性),2 分(中等阳性),3 分(强阳性)。染色阳性细胞数量评分与染色强度评分之积为最终染色评分标准:0 分为阴性(-),1 分为弱阳性(+),2~4 分为中等阳性(++),5~12 分为强阳性(+++)。两位病理科医生对所有标本评分结果是一致的。

1.4 统计学处理

数据统计使用 SPSS17.0 统计软件。样本率的比较采用 χ^2 检验,计量资料先行方差齐性检验,两样本

均数比较采用 t 检验,参数间相关性采用 Spearman 等级相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 c-Met、HIF-1 α 在各类甲状腺组织中的表达

c-Met 表达主要位于细胞质,部分细胞膜也有表达(Figure 1),HIF-1 α 表达主要位于细胞核,部分细胞质和(或)细胞核有表达(Figure 2)。癌组织、腺瘤和癌旁正常组织中 c-Met 的阳性率分别为 97.22%、58.33%、25.00%,HIF-1 α 的阳性率分别为 86.11%、50.00%、25.00%。癌组织中两者的阳性率均高于腺瘤和癌旁组织,差异有统计学意义($\chi^2=7.779, P<0.05$)(Table 1)。

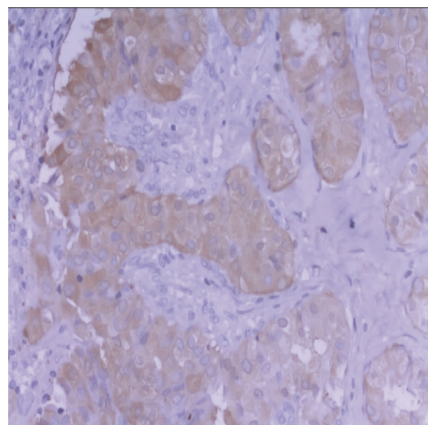


Figure 1 Positive expression of c-Met in thyroid papillary cancer (SP×200)

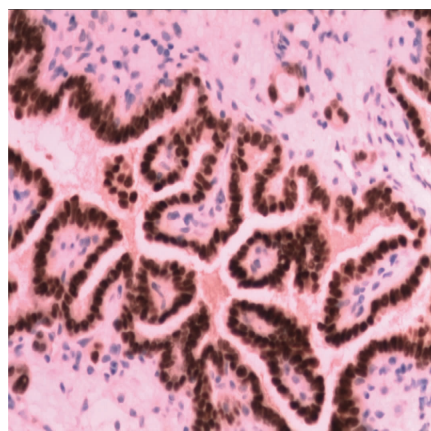


Figure 2 Positive expression of HIF-1 α in thyroid papillary cancer (SP×200)

Table 1 Expressions of c-Met and HIF-1α in thyroid papillary cancer tissue, cancer adjacent tissue and adenoma tissue

Tissues	n	c-Met					HIF-1α				
		-	+	++	+++	P	-	+	++	+++	P
Papillary cancer	36	1	17	11	7	0.9722	5	20	8	3	0.8611
Adenoma	12	5	5	1	1	0.5833	6	4	2	0	0.5000
Cancer adjacent tissue	12	9	2	1	0	0.2500	9	3	0	0	0.2500

2.2 c-Met、HIF-1α 表达的相关性及其与临床病理的关系

经 Spearman 等级相关分析, c-Met 和 HIF-1α 在甲状腺乳头状癌中的表达呈正相关性 ($r=0.421, P<0.05$)。c-Met 和 HIF-1α 的表达与淋巴结转移、临床分期、肿瘤大小无关, 淋巴结有转移者 c-Met 和 HIF-1α 的阳性表达率(100.00%和 88.24%)与无淋巴结转移者(94.74%和 84.21%)差异无统计学意义($P>0.05$)。各指标与年龄、性别亦无关(Table 2)。

3 讨 论

乳头状癌为实体肿瘤, 是甲状腺癌最常见的病理类型, 其临床特点是早期易发生淋巴结转移和局部浸润, 即使是微小癌。多数实体肿瘤具有缺氧的微环境, 并存在自身对缺氧微环境的调节和适应, 表现

为诱导 HIF-1α 的转录, c-Met 在诱导其转录激活中通过 PI3K/AKT 途径发挥了一定作用。

c-Met 致癌基因最初是以其重排形式在人类骨肉瘤细胞系中被发现的^[3]。它是由 *Met* 原癌基因编码的具有酪氨酸激酶活性的跨膜蛋白受体, 这一跨膜蛋白受体由 2 个亚基组成, 分别为相对分子质量为 50×10^3 的细胞外 α 链和相对分子质量为 145×10^3 的跨膜 β 链^[4], 二者以二硫键相连, β 链提供该激酶的多功能结合位点。c-Met 的胞外区含有一个信号素同源区, 胞内区由 3 部分组成, 分别为近膜区、酪氨酸激酶区及 C-末端。胞外区与肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF) 结合, 胞内区发生自身磷酸化, 进而通过一系列信号转导, 导致细胞的胞间解离、移动扩散、迁移、定居新环境等侵袭性生长的生物学反应。HGF 是 c-Met 的配体, 为扩散因子

家族成员, 可激活 c-Met 引起肿瘤细胞的运动和侵袭。c-Met 和 HGF 已被证明在甲状腺乳头状癌中过度表达, 且高表达 *Met* 的肿瘤细胞其转移能力增强, 但恶性度降低, 临床上病人预后较好。c-Met 在甲状腺乳头状癌中高表达, 其阳性率可达 70%~100%, 但在滤泡状癌及未分化癌中不表达, 在甲状腺良性病变中表达率可达 20%~30%, 在正常组织中 c-Met 表达很低甚至测不到^[5-8]。我们的实验结果显示 c-Met 在甲状腺乳头状癌中高表达, 其阳性率达 97.22%, 与上述研究结果一致, 其超高表达对临床诊断甲状腺乳头状癌具有重要价值。

HIF-1 是一种核转录因子, 是由 α 亚基和 β 亚基组成的异源二聚体。HIF-1α 仅在缺氧细胞内表达, 是惟一的 O₂ 调节亚单位, 决定 HIF-

Table 2 Relationship of expressions of c-Met and HIF-1α with Clinicopathologic characteristics

Parameters	n	c-Met		HIF-1α	
		Positive cases	P	Positive cases	P
Gender					
Male	11	11	0.9600	11	0.8000
Female	25	24		20	
Age(years)					
≥45	16	15	0.9375	13	0.8125
<45	20	20		18	
Lymph node metastasis					
No	19	18	0.9474	16	0.8421
Yes	17	17		15	
Chinical stage					
I	28	27	0.9643	23	0.8214
II	2	2		2	
III	3	3		3	
IV	3	3		3	
T stage					
T _x	2	2	0.9615	2	0.8077
T ₁	26	25		21	
T ₂	5	5		5	
T ₃	3	3		3	

1 的活性。HIF-1 参与许多重要的肿瘤生物行为,包括刺激血管生成、促进肿瘤细胞转移和抑制肿瘤细胞凋亡。研究证实,去除 *HIF-1 α* 基因或阻断 *HIF-1 α* 转录可使胰腺癌细胞不分泌 VEGF,并可抑制肿瘤血管的形成,证实缺氧所产生的生理性刺激导致肿瘤组织中 *HIF-1 α* 的转录激活,并可能通过多条信号转导通路诱导其靶基因 *VEGF* 表达上调,从而促进肿瘤血管生成和耐受缺氧^[9,10],提示 HIF-1 α 在肿瘤的发生、发展和转移中发挥重要作用,而在正常组织中不表达^[11]。在甲状腺肿瘤中,HIF-1 α 的表达与肿瘤病理类型相关,在未分化癌中显示为弥漫性强阳性,而分化型甲状腺癌中 HIF-1 α 的分布及表达强度变异较大,从强阳性、中等阳性、弱阳性到几乎不表达,通常呈灶性表达,可能与肿瘤长期处于缺氧状态有关。HIF-1 α 在甲状腺肿瘤中的表达显著高于正常组织,尤其在未分化癌及滤泡状癌中表达最高^[10]。正常氧浓度下,HIF-1 α 仅有较弱的胞浆表达;缺氧诱导的 HIF-1 α 的表达主要见于细胞核^[10]。我们的研究表明,HIF-1 α 在甲状腺乳头状癌中的阳性表达率达 86.11%,以细胞核染色为主,考虑肿瘤发生可能与甲状腺乳头状癌细胞缺氧相关。

c-Met、HIF-1 都与肿瘤的发生、发展密切相关,并通过 PI3K/AKT 途径相互关联。磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)是一种与细胞信号转导有关的蛋白激酶,AKT 是一种 Ser/Thr 激酶。PI3K 可被多种细胞因子激活,AKT 与活化的 PI3K 结合而被激活,PI3K/AKT 信号转导通路激活后,依靠激活的 AKT 磷酸化其下游分子而发挥生理功能,参与调节细胞生长、凋亡、代谢及血管新生等。研究表明,甲状腺结节病变与 PI3K/AKT 信号转导通路相关分子的异常表达密切相关,信号转导通路的过度激活在甲状腺肿瘤的发生发展中起了重要作用。众多研究显示^[10-16],c-Met 和 HIF-1 都可促进 PI3K/AKT 途径激活,而 PI3K/AKT 途径的激活又可使 c-Met 和 HIF-1 的表达增高,同时缺氧诱导的 HIF-1 α 的异常激活可促进 c-Met 的表达,组织学上可促进甲状腺乳头状癌的转移。另有研究表明^[14],肿瘤的转移主要与 PI3K 途径有关,而与氧浓度无关,但缺氧促进依赖 HIF-1 的甲状腺癌的转移。

我们的研究表明 c-Met、HIF-1 α 在甲状腺乳头状癌组织中高表达,且二者呈正相关关系,但与肿

瘤大小、临床分期及淋巴结转移无明显相关性,考虑可能与样本量小,多数病例肿瘤分期较早,肿瘤较小,且伴有淋巴结转移的病例数较少有关。Belfiore 等^[17]的研究未发现 c-Met 与肿瘤大小有关,张春旭等^[18]的研究发现 c-Met 的表达与患者年龄、性别、TNM 分期、肿瘤大小及血管侵犯没有明显关系。具体二者在甲状腺乳头状癌中的作用有待选取更合适的临床病例资料行进一步研究。但 c-Met、HIF-1 α 作为肿瘤标志物,对诊断甲状腺乳头状癌仍具有重要意义,而二者对肿瘤发生、发展的作用有待深入研究。

参考文献:

- [1] Song YX, Hua YY, Ma J, et al. Color doppler ultrasound in the diagnosis for 106 Cases with papillary thyroid micro-carcinoma [J]. Journal of Chinese Oncology, 2012, 18(7): 535-538. [宋迎香, 华燕吟, 马杰, 等. 106 例甲状腺微小乳头状癌彩色多普勒超声诊断分析 [J]. 肿瘤学杂志, 2012, 18(7): 535-538.]
- [2] Al-Brahim N, Asa SL. Papillary thyroid carcinoma: an overview [J]. Arch Pathol Lab Med, 2006, 130(7): 1057-1062.
- [3] Cooper CS, Park M, Blair DG, et al. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line [J]. Nature, 1984, 311(5981): 29-33.
- [4] Park M, Dean M, Kaul K, et al. Sequence of MET proto-oncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(18): 6379-6383.
- [5] Gentile A, Trusolino L, Comoglio PM. The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer [J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(1): 85-94.
- [6] Oyama T, Ichimura E, Sano T, et al. C-Met expression of thyroid tissue with special reference to papillary carcinoma [J]. Pathol Int, 1998, 48(10): 763-768.
- [7] Trovato M, Villari D, Bartolone L, et al. Expression of the hepatocyte growth factor and c-Met in normal thyroid, non-neoplastic, and neoplastic nodules [J]. Thyroid, 1998, 8(2): 125-131.
- [8] Di Renzo MF, Olivero M, Serini G, et al. Overexpression of the c-MET/HGF receptor in human thyroid carcinomas derived from the follicular epithelium [J]. J Endocrinol Invest, 1995, 18(2): 134-139.
- [9] Melstrom LG, Salabat MR, Ding XZ, et al. Apigenin down-regulates the hypoxia response genes: HIF-1 α , GLUT-1, and VEGF in human pancreatic cancer cells [J]. J Surg

- Res, 2011, 167(2): 173-181.
- [10] Burrows N, Babur M, Resch J, et al. Hypoxia-inducible factor in thyroid carcinoma[J]. J Thyroid Res, 2011, 2011: 762905.
- [11] Burrows N, Resch J, Cowen RL, et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in thyroid carcinomas[J]. Endocr Relat Cancer, 2010, 17(1):61-72.
- [12] Ruggeri RM, Vitarelli E, Barresi G, et al. HGF/C-MET system pathways in benign and malignant histotypes of thyroid nodules: an immunohistochemical characterization [J]. Histo Histopathol, 2012, 27(1):113-121.
- [13] Hara S, Nakashiro K, Klosek SK, et al. Hypoxia enhances c-Met/HGF receptor expression and signaling by activating HIF-1 α in human salivary gland cancer cells[J]. Oral Oncol, 2006, 42(6):593-598.
- [14] Scarpino S, d'Alena FC, Napoli AD, et al. Increased expression of met protein is associated with up-regulation of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) in tumour cells in papillary carcinoma of the thyroid[J]. J Pathol, 2004, 202(3):352-358.
- [15] Burrows N, Babur M, Resch J, et al. GDC-0941 inhibits metastatic characteristics of thyroid carcinomas by targeting both the phosphoinositide-3 kinase (PI3K) and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) pathways [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(12):1934-1943.
- [16] Pennacchiotti S, Michieli P, Galluzzo M, et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene[J]. Cancer Cell, 2003, 3(4): 347-361.
- [17] Belfiore A, Gangemi P, Costantino A, et al. Negative/low expression of the met/hepatocyte growth factor receptor identifies papillary thyroid carcinomas with high risk of distant metastases [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1997, 82(7):2322-2328.
- [18] Zhang CX, Wang Q, Li YP. c-Met expression in tall cell variant papillary carcinoma of the thyroid [J]. Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery, 2008, 15(5):318-322. [张春旭, 王强, 李延甫. c-Met 蛋白在高细胞变异型甲状腺乳头状癌中的表达[J]. 中国普外基础与临床杂志. 2008, 15(5):318-322.]

《肿瘤学杂志》投稿须知

1. 文稿务必材料可靠, 数据准确, 论点清楚, 论据充足, 结论明确。
2. 文字通顺、准确和简练, 重点突出, 层次清楚。论著需附结构式摘要, 包括目的、方法、结果、结论四部分。中文摘要 200~300 字; 英文摘要务必与中文摘要一一对应翻译。英文摘要前加英文文题、作者姓名汉语拼音、单位英文全称、所在城市名及邮政编码。
3. 图表请附中英文各一份, 包括图表的题目、内容及注释。
4. 所列参考文献限作者亲自阅读的已发表的近 3 年文献为主, 按文内引用先后顺序列于文末, 并在正文内引文处右上角以 [] 号注明序号。具体格式举例如下:
 期刊: [序号] 作者 (3 位以下全部写出, 不同作者姓名中间加逗号, 英文文献作者为姓全称, 加名缩写; 3 位以上时只写前 3 位, 于后加 “, 等.” 或 “, et al.) 文题 [J]. 刊名 (英文为缩写), 年, 卷 (期): 起页-止页。
 书籍: [序号] 作者. 书名 [M]. 版本. 出版地 (即城市名): 出版者, 出版年. 起页-止页。
 学位论文: [序号] 作者. 学位论文名 [D]. 城市: 培养单位, 年。
 电子文献: [序号] 作者. 题名 [电子文献类型]. 可获得的网址, 发表或更新的日期。
 其中, 电子文献类型, 是网上期刊时, 用 [J/OL]; 是网上电子公告时, 用 [EB/OL]; 是网上联机数据库时, 用 [DB/OL]。
5. 特别注意的是, 从 2013 年起, 所有中文文献, 需同时附对应的英文翻译。
5. 有通讯作者的文稿, 请在文章首页左下角注明通讯作者职务、职称、学位、工作单位 (详细到科室)、详细通讯地址 (邮编) 和 E-mail。
6. 请 E-mail 投稿, E-mail: zlxzz04@126.com。请勿投寄给个人。文稿以 Word 排版、附件形式发送, 并在主页上注明单位及详细联系方式。同时请寄纸样打印稿 1 份、单位介绍信、基金证明复印件和稿件处理费 20 元。来稿内容若受国家或省、厅级项目资助请在正文首页脚注中说明, 并附基金资助证明复印件。
7. 为了便于与作者 (通讯作者) 及时联系, 缩短文稿处理的时间, 请作者 (通讯作者) 务必在邮件主页留下手机号码、E-mail 地址! 本刊将主要通过电子邮件与作者 (通讯作者) 联系, 文稿投出后请随时查看所留 E-mail 地址的电子信箱。
7. 编辑部对来稿有文字修改权, 凡涉及内容的修改, 则提请作者考虑, 文责自负。文稿一般不退, 请作者自留底稿。来稿一经录用, 收取一定版面费, 发表后寄赠当期杂志 2 册并酌付稿酬。