

HIF-1 α 、OPN 及 c-Met 在胆管癌中的表达及其临床意义

李志锋, 石荣亚, 赵景曼, 霍 曼, 孙蒙蒙, 赵小利

(保定市第一医院, 河北 保定 071000)

摘 要: [目的] 探讨缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、骨桥蛋白 (OPN) 及 c-Met 在胆管癌组织中的表达及其临床意义。[方法] 采用免疫组化 SP 法检测 HIF-1 α 、OPN 及 c-Met 在 56 例胆管癌、30 例癌旁正常胆管组织中的表达情况, 并分析其与临床病理特征关系及三者的相关性。[结果] HIF-1 α 、OPN 及 c-Met 在胆管癌组织中的表达均明显高于癌旁正常胆管组织, 并且在胆管癌组织中表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位、分化程度无相关性 ($P>0.05$), 而与肿瘤分期、有无淋巴结转移有关 ($P<0.05$)。HIF-1 α 、OPN 及 c-Met 在胆管癌组织样本中表达均呈正相关 ($P<0.05$)。[结论] HIF-1 α 、OPN 及 c-Met 在胆管癌组织中高表达, 与肿瘤侵袭转移关系密切。

关键词: 胆管肿瘤; 淋巴结转移; 缺氧诱导因子-1 α ; 骨桥蛋白; c-Met

中图分类号: R735.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)08-0643-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.08.B007

Expressions of HIF-1 α , OPN and c-Met in Cholangiocarcinoma and Their Significance

LI Zhi-feng, SHI Rong-ya, ZHAO Jing-man, et al.

(The First Hospital of Baoding, Baoding 071000, China)

Abstract: [Objective] To explore the expressions of HIF-1 α , OPN and c-Met in cholangiocarcinoma and their significance. [Methods] The expression of HIF-1 α , OPN and c-Met in cholangiocarcinoma tissue samples of 56 cases and bile duct tissue samples adjacent to carcinoma of 30 cases were detected by immunohistochemical SP methods. The relationship with clinical pathological features and their correlation were analyzed. [Results] The expression of HIF-1 α , OPN and c-Met in cholangiocarcinoma were significantly higher than those in bile duct tissue adjacent to carcinoma. The strong positive expression in cholangiocarcinoma wasn't related with age, sex, tumor size, tumor location and differentiation degree, while was related with tumor stage and lymph node metastasis ($P<0.05$). There were positive correlations between HIF-1 α , OPN and c-Met expression in cholangiocarcinoma ($P<0.05$). [Conclusion] The expressions of HIF-1 α , OPN and c-Met are higher in cholangiocarcinoma, and are closely associated with tumor invasion and metastasis.

Subject words: cholangiocarcinoma; lymph node metastasis; hypoxia induced factor-1 α ; osteopontin; c-Met

胆管癌是指发生在左、右肝管至胆总管下端的恶性肿瘤, 约占胆管上皮细胞源性肿瘤的 90%^[1]。胆管癌的起病隐匿, 治疗效果差, 是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一。近年来胆管癌的发病率明显升高, 其发病机制尚未明确, 分子生物学标志物的研究为胆管癌的早期诊断与治疗提供了契机。研究发现, HIF-1 α 、OPN 及 c-Met 与多种肿瘤的发生、发展关系密切, 本研究通过检测 HIF-1 α 、OPN 及 c-Met 在胆

管癌组织中的表达水平, 探讨其与胆管癌的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集我院 2010 年 3 月至 2015 年 11 月经病理学证实的胆管癌标本 56 例, 其中男性 31 例, 女性 25 例, 年龄 39~76 岁, 平均年龄为 61.8 岁。病理类型: 高分化腺癌 24 例, 中分化腺癌 19 例, 低分化腺癌 13 例。其中有淋巴结转移 30 例, 无淋巴结转移

通讯作者: 李志锋, 副主任医师, 硕士; 保定市第一医院普外科, 河北省保定市百花东路 966 号 (071000); E-mail: lizhifeng1304@163.com
收稿日期: 2016-01-18; **修回日期:** 2016-02-24

26 例。依据 2010 版国际抗癌联盟(UICC)分期法进行分期,其中Ⅰ期 11 例,Ⅱ期 21 例,Ⅲ期 18 例,Ⅳ期 6 例。同时选取距胆管癌组织 2cm 以外经病理学证实非癌正常胆管组织 30 例作为对照。所有选取标本术前均未行放、化疗等相关抗癌治疗。

1.2 试剂

兔抗人 OPN 单克隆抗体和兔抗人 c-Met 单克隆抗体购于上海研晶生物技术公司,鼠抗人 HIF-1 α 单克隆抗体、免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购于福州迈新生物技术有限公司。

1.3 方法

所有样本均经 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,4 μ m 厚连续切片,石蜡切片经脱蜡、水化,然后按免疫组化 SP 法试剂说明操作:切片浸于枸橼酸盐缓冲液经中火档微波处理行抗原修复,室温孵育 15min 以消除内源性过氧化物酶的作用,PBS 漂洗,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入二抗,DAB 显色剂显色 10~15min,苏木素复染。蒸馏水充分冲洗,复染,脱水,晾干,树胶封片。显微镜下观察切片,已知阳性切片作阳性对照,PBS 替代一抗作阴性对照。

1.4 结果判断标准

HIF-1 α 的阳性表达主要定位于细胞核,OPN 和 c-Met 的阳性表达主要定位于细胞质,以可见清晰黄色、棕黄色或棕褐色的颗粒判定为阳性,每张切片随机在高倍镜下选择不同的 5 个视野,每个视野计数 200 个肿瘤细胞,根据阳性细胞数量及着色强度用半定量评分法对结果进行判定。着色强度:不显色或显色不清为 0,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕

褐色为 3 分;阳性细胞百分率:阳性细胞百分数 $\leq$ 5% 为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分;两者分值相加:0~1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(+),4~5 分为中等阳性(++),6~7 分为强阳性(+++)。由两位高年资病理医师采用双盲法判读。

1.5 统计学处理

应用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理,计数资料的比较采用 χ^2 检验,当某一个理论数 $1 < T \leq 5$ 时,须对 χ^2 进行连续性校正,相关性分析采用 Spearman 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

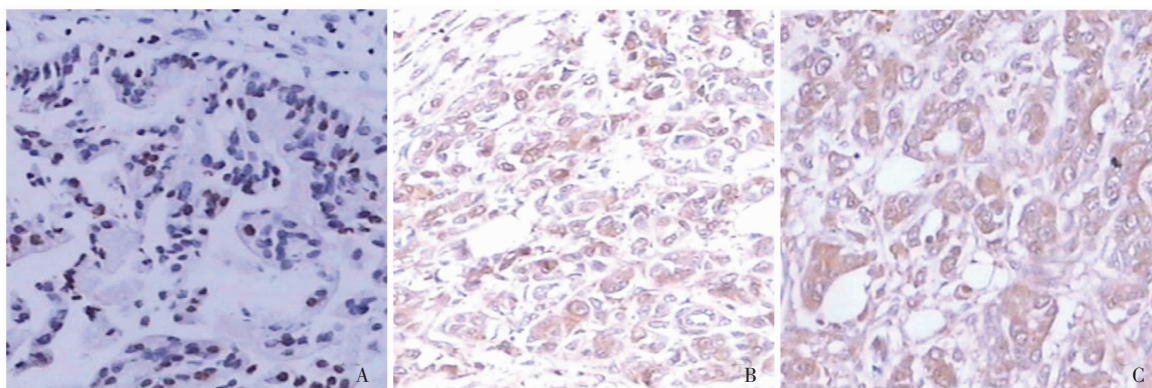
2 结果

2.1 HIF-1 α 、OPN 及 c-Met 在胆管癌组织、正常胆管组织中的表达

HIF-1 α 在胆管癌组织、正常胆管组织中阳性表达率分别为 69.6%(39/56)、13.3%(4/30);OPN 在胆管癌组织、正常胆管组织中阳性表达率分别为 66.1%(37/56)、16.7%(5/30);c-Met 在胆管癌组织、正常胆管组织中阳性表达率分别为 76.8%(43/56)、26.7%(8/30)。HIF-1 α 、OPN 及 c-Met 在胆管癌组织中的表达均高于在癌旁正常胆管组织中的表达,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)(Table 1, Figure 1)。

2.2 HIF-1 α 、OPN 及 c-Met 在胆管癌表达与临床病理特征的关系

在胆管癌组织中,HIF-1 α 、OPN 及 c-Met 的表达与患者性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位、分化程度无



Note: A: HIF-1 α positive expression; B: OPN positive expression; C: c-Met positive expression.

Figure 1 Expressions of HIF-1 α , OPN and c-Met in cholangiocarcinoma(SP $\times 200$)

Table 1 HIF-1 α , OPN and c-Met in cholangiocarcinoma tissues and normal bile duct tissues [n(%)]

Groups	N	HIF-1 α		OPN		c-Met	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Carcinoma tissues	56	39(69.6)	17(30.4)	37(66.1)	19(33.9)	43(76.8)	13(23.2)
Normal bile duct tissues	30	4(13.3)	26(86.7)	5(16.7)	25(83.3)	8(26.7)	22(73.3)
χ^2		22.575		17.157		20.332	
<i>P</i>		<0.001		<0.001		<0.001	

相关性($P>0.05$),而与肿瘤分期、淋巴结转移相关($P<0.05$);HIF-1 α 、OPN 及 c-Met 的表达阳性率在胆管癌中淋巴结转移阳性组高于淋巴结转移阴性组,Ⅲ~Ⅳ期高于 I ~ II 期(Table 2)。

2.3 HIF-1 α 、OPN 及 c-Met 在胆管癌组织中表达的相关性

Spearman 相关分析结果表明,HIF-1 α 和 OPN、c-Met 在胆管癌组织样本中表达均呈显著正相关 (OPN: $r=0.347$, $P=0.009$;c-Met: $r=0.373$, $P=0.005$),OPN 和 c-Met 在胆管癌组织样本中表达也呈显著正相关($r=0.321$, $P=0.016$)(Table 3)。

Table 3 The correlation between HIF-1 α and OPN,c-Met in cholangiocarcinoma

HIF-1 α	OPN			c-Met		
	Positive	Negative	<i>P</i>	Positive	Negative	<i>P</i>
Positive	30	9	0.009	34	5	0.005
Negative	7	10		9	8	

Table 2 HIF-1 α , OPN and c-Met relationship with clinicopathological features of cholangiocarcinoma

Features	N	HIF-1 α			OPN			c-Met		
		Positive	Negative	<i>P</i>	Positive	Negative	<i>P</i>	Positive	Negative	<i>P</i>
Gender										
Male	31	22	9	0.810	21	10	0.769	24	7	0.890
Female	25	17	8		16	9		19	6	
Age(years)										
≥ 60	29	19	10	0.487	17	12	0.222	21	8	0.627
<60	27	20	7		20	7		22	5	
Tumor size(cm)										
≥ 3 cm	26	20	6	0.270	19	7	0.303	22	4	0.330
<3cm	30	19	11		18	12		21	9	
Tumor location										
Hilar	25	18	7	0.730	17	8	0.784	20	5	0.847
Distal	31	21	10		20	11		23	8	
Differentiation degree										
High differentiated	24	16	8	0.883	14	10	0.339	17	7	0.587
Moderately differentiated	19	14	5		15	4		16	3	
Bad differentiated	13	9	4		8	5		10	3	
Lymph node metastasis										
No	26	14	12	0.036	13	13	0.019	16	10	0.028
Yes	30	25	5		24	6		27	3	
Stage										
I ~ II	32	18	14	0.026	17	15	0.038	21	11	0.047
III ~ IV	24	21	3		20	4		22	2	

3 讨论

肿瘤的重要生物学特征之一即为肿瘤细胞快速生长增殖,随着瘤体的增大,使肿瘤细胞处于缺氧微环境下。缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 是在缺氧状

态下存在于人类机体的核转录因子,由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚单位构成,其中 α 亚基为氧调蛋白,是目前发现的唯一在乏氧状态下仍能发挥活性的转录因子。HIF 是调节肿瘤细胞适应低氧的关键因子。研究发现,在常氧环境下,HIF-1 α 蛋白生成后被迅速降解掉,其半衰期仅为 5min;乏氧状态下,HIF-1 α

蛋白稳定存在并发挥活性,可激活多种缺氧反应基因的产物,对肿瘤细胞的增殖、侵袭、凋亡、细胞周期进行调控^[2]。本研究中,HIF-1 α 在胆管癌组织细胞中过表达,表达强度与肿瘤分期、淋巴结转移相关($P<0.05$)。目前已证实,HIF-1 α 在甲状腺癌、胃癌、结直肠癌、卵巢癌、鼻咽癌等多种癌组织中呈现过表达,且其表达情况与肿瘤临床患者病理特征具有一定相关性^[3-5]。因此认为,HIF-1 α 参与肿瘤细胞增殖、转移及能量代谢等过程。

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种钙结合磷酸化糖蛋白,因最早从骨基质中提取而得名,在人体肾脏、胎盘、平滑肌、骨基质等不同组织细胞中均有发现。OPN基因定位于染色体4q13,包括6个内含子和7个外显子,OPN蛋白含有特有RGD(精氨酸—甘氨酸—天冬氨酸)序列,该序列与整合素受体结合可发挥细胞粘附功能。此外,OPN分子含有多个结合位点,包括钙结合位点、转谷氨酰胺酶作用位点、基质金属蛋白酶(MMPs)位点和两个肝素结合区^[6]。OPN有两种受体,一种是钙依赖性的整合素受体,另一种为CD44受体,OPN通过与其受体结合,增强细胞趋化、粘附功能,实现细胞的侵袭、转移^[7]。本研究中,OPN在胆管癌呈高表达,表达强度与肿瘤分期、淋巴结转移相关($P<0.05$);在胆管癌Ⅲ~Ⅳ期高于Ⅰ~Ⅱ期,淋巴结转移阳性组高于阴性组。近年来多项研究表明^[8,9],OPN在肺癌、胃癌、结直肠癌、卵巢癌、乳腺癌等肿瘤中高表达,与肿瘤的发生、侵袭转移关系密切,与本研究结果基本一致。

c-Met蛋白是肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)高亲和性的细胞膜受体,广泛表达于人体正常组织。c-Met蛋白是原癌基因*c-Met*编码的蛋白质产物,由一条50kD的 α 亚基和145kD的 β 亚基组成,其中 α 链为胞外部分, β 链分为胞外区、跨膜区和胞内区, α 链和 β 链胞外区作为配体共同与HGF结合;位于胞浆内的 β 链C端具有酪氨酸激酶活性^[10]。HGF是一种多功能生长因子,与受体c-Met结合,HGF/c-met可激活受体胞内的酪氨酸蛋白激酶(protein tyrosine kinases, PTK),使酪氨酸残基磷酸化,启动一系列跨膜信号转导通路,刺激多种类型细胞的增殖、分化、运动及形态发生,对多种组织器官的生长发育进行生理调节^[11]。HGF/c-met在异常因素的持续刺激下过度表达,使系统过度激活,刺激细

胞的增殖分化、粘附迁移等过程,促使肿瘤细胞发生浸润、侵袭转移。大量研究表明,c-Met蛋白的表达水平反映了c-Met信号途径的功能,在多种肿瘤的发生、发展和转移过程中存在c-Met蛋白的高表达^[12,13]。本研究中,c-Met蛋白在胆管癌组织细胞呈高表达,表达强度与肿瘤分期、淋巴结转移相关($P<0.05$),证实c-Met对胆管癌细胞的增殖、分化、侵袭具有促进作用。

恶性肿瘤的发生、浸润、侵袭转移是多个因素参与、多个基因调控、多个步骤发展的复杂过程。临床及实验研究发现^[14],低氧可以促进肿瘤细胞HIF-1 α 蛋白表达,HIF-1 α 基因转录水平的提高可调节OPN、c-Met基因的表达,OPN、c-Met蛋白表达水平随HIF-1 α 升高而升高。HGF/c-met可激活PI3K、STAT、PLC- γ 、ras等信号通路,促使OPN表达水平升高,促进肿瘤细胞浸润、侵袭及转移,而OPN抗体可以抑制HGF/c-Met的功能^[15,16]。本研究结果显示,经Pearson相关性分析胆管癌组织HIF-1 α 、OPN及c-Met在表达之间呈明显的正相关。因此认为,HIF-1 α 、OPN及c-Met在胆管癌发生和发展等生物学过程中发挥了协同促进作用。

HIF-1 α 、OPN及c-Met在胆管癌组织高表达,与肿瘤分期、淋巴结转移相关,在胆管癌的发生、浸润及转移过程中可能发挥了重要作用。联合检测对于胆管癌诊断、鉴别诊断及预后判断具有重要意义,同时,为胆管癌的靶向治疗提供了新的研究方向。

参考文献:

- [1] Gai DW, Song MR, Liu T, et al. The diagnosis and treatment status of cholangiocarcinoma [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15(2): 368-372. [盖大伟, 宋明芮, 刘涛, 等. 胆管癌的诊疗现状[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(2): 368-372.]
- [2] Dong ZZ, Yao M, Wang L, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α : molecular-targeted therapy for hepatocellular carcinoma [J]. Mini Rev Med Chem, 2013, 13(9): 1295-1304.
- [3] Yin ZP, Sun X. Expression and clinical significance of HIF-1 α and GLUT-1 in human nasopharyngeal carcinoma [J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2015, 22(4): 495-499. [尹中普, 孙晓. HIF-1 α 和GLUT-1在鼻咽癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2015, 22(4): 495-499.]

- [4] Yan Z, Bai LL, Zhao WJ, et al. Expression of HIF-1 α and E-cadherin in breast cancer and the significance[J]. Hebei Medical Journal, 2015, 21(6): 914-917. [闫哲, 白立立, 赵伟静, 等. HIF-1 α 、E-cadherin 在乳腺中的表达及意义[J]. 河北医药, 2015, 21(6): 914-917.]
- [5] Zhao J, Gao C. Expression and clinical significance of HIF-1 α and VEGF protein in tissues of colorectal carcinoma[J]. Journal of Radioimmunology, 2013, 26(5): 605-607. [赵晶, 高超. HIF-1 α 和 VEGF 蛋白在结直肠癌组织中的表达及其临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2013, 26(5): 605-607.]
- [6] Lv Y, Li SY, An P, et al. Research progress of osteopontin and its correlation with colorectal cancer and liver metastasis[J]. Chinese Journal of Operative Procedures of General Surgery(Electronic Edition), 2014, 8(2): 178-180. [吕远, 李世拥, 安萍, 等. 骨桥蛋白与结直肠癌及肝转移关系研究进展[J]. 中华普外科手术学杂志(电子版), 2014, 8(2): 178-180.]
- [7] Renee JP, Karla JH, Kylie HV. Osteopontin increases hepatocellular carcinoma cell growth in a CD44 dependant manner[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(26): 3389-3399.
- [8] Wang CJ, Yang GG, Ding J, et al. Expression and clinical significance of Gli1 and OPN in colorectal cancer[J]. Journal of Medical Research, 2014, 43(6): 135-137. [汪长健, 杨关根, 丁菁, 等. Gli1 和 OPN 在结直肠癌组织中的表达及其临床意义[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(6): 135-137.]
- [9] Hsu HP, Shan YS, Lai MD, et al. Osteopontin-positive infiltrating tumor-associated macrophages in bulky ampullary cancer predict survival[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(2): 144-154.
- [10] Jia Y, Chen XG. Research progress of the relationship between HGF/c-Met signaling pathway and cancer? [J]. Shandong Medical Journal, 2015, 55(41): 101-104. [贾颖, 陈兴国. HGF/c-Met 信号途径与肿瘤关系的研究进展[J]. 山东医药, 2015, 55(41): 101-104.]
- [11] Sun YL. Role of HGF/c-Met signaling pathway in liver metastasis of colorectal cancer [J]. China Medical Herald, 2015, 12(24): 61-64. [孙燕来. HGF/c-Met 信号转导通路在结肠癌肝转移中的作用 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(24): 61-64.]
- [12] Katherine C, Anand K, Shujie ZH, et al. Roles of c-Met and RON kinases in tumor progression and their potential as therapeutic targets[J]. Oncotarget, 2015, 6(6): 3507-3518.
- [13] Liu T, Liu DB, Wei ZY. Correlation between the expression of c-met and HER-2 in breast cancer tissues and clinical pathological factors [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2014, 21(16): 1248-1251. [刘涛, 刘东滨, 韦志永. 乳腺癌组织 c-met 和 HER-2 表达与临床病理因素相关性分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(16): 1248-1251.]
- [14] Su HL, Su HH, Zhang PX, et al. Expression of HIF-1 α and c-MET in gastric carcinoma and their correlation with angiogenesis and prognosis [J]. The Practical Journal of Cancer, 2015, 30(12): 1771-1774. [苏会玲, 苏红慧, 张培新, 等. HIF-1 α 和 c-MET 在胃癌中的表达及其与血管生成和预后的相关性 [J]. 实用癌症杂志, 2015, 30(12): 1771-1774.]
- [15] Zhang Y, Zhao JJ, Zhang QF. The expression and clinical significance of OPN and C-met in laryngeal carcinoma[J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2014, 28(4): 256-258. [张悦, 赵俊军, 张庆丰. 骨桥蛋白及 C-met 在喉癌中的表达意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014, 28(4): 256-258.]
- [16] Ma GF, Cai HX, Ding FY, et al. Abnormal expressions and significances of OPN and c-Met in gastric cancer [J]. Chongqing Medicine, 2014, 41(36): 3823-3824. [马桂芳, 蔡红星, 丁风云, 等. 胃癌组织中 OPN、c-Met 蛋白的异常表达及其意义[J]. 重庆医学, 2014, 41(36): 3823-3824.]