

HGF、c-Met、p-Met 在 NSCLC 中的表达及与 EGFR 表达的相关性

徐慧媛,周韶璋,宋向群,董芷辛

(广西医科大学附属肿瘤医院,广西南宁 530021)

摘要: [目的] 通过检测非小细胞肺癌患者中 HGF、c-Met 和 p-Met 的表达情况,分析其与临床病理特征关系,并与 EGFR 表达的相关性。[方法] 收集经手术切除非小细胞肺癌患者的标本 100 例,采用免疫组化方法检测 HGF、c-Met、p-Met 蛋白的表达水平,并收集这些患者既往检测 EGFR 的表达情况。[结果] HGF 阳性表达率为 64%,c-Met 阳性表达率为 47%,p-Met 阳性表达率为 3%。HGF、c-Met 的表达与吸烟状态、年龄、性别、临床分期、分化程度、病理类型均无统计学差异;p-Met 阳性表达患者均为 EGFR 突变的 HGF 强表达的腺癌患者。HGF、c-Met 的表达水平与 EGFR 表达水平无相关性。[结论] HGF、c-Met 的阳性表达与吸烟状态、年龄、性别、临床分期、分化程度、病理类型以及 EGFR 的表达水平均无关。p-Met 的阳性表达患者均为 HGF 强表达的腺癌 EGFR 突变型。

关键词: HGF; c-Met; 癌,非小细胞肺; EGFR

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)11-0917-06
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.11.B010

Expression of HGF, c-Met and p-Met in Non-small Cell Lung Cancer and Their Relation to EGFR Expression

XU Hui-yuan, ZHOU Shao-zhang, SONG Xiang-qun, et al.

(Affiliated Tumor Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of HGF, c-Met, p-Met in non-small cell cancer (NSCLC) and their relation to the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR). [Methods] The expressions of the HGF, c-Met and p-Met were detected by immunohistochemistry in 100 tissue specimens of NSCLC. The results of EGFR expression was taken from pathological reports. [Results] The positive expression rates of HGF, c-Met and p-Met were 64%, 47% and 3%, respectively. No correlation was found in the expression of HGF and c-Met with smoking status, age, gender, clinical stage, degree of pathological differentiation or histological type ($P > 0.05$). Positive p-Met was only observed in adenocarcinoma patients with EGFR mutation and strongly expressed HGF. The expression of c-Met and HGF was not correlated with EGFR expression. [Conclusion] This study has not showed the correlation of HGF and c-Met expression with clinicopathological features of NSCLC patients, but shown an association of p-Met expression with EGFR-mutated lung adenocarcinoma.

Subject words: HGF; c-Met; non-small cell lung cancer; EGFR

肺癌在我国已经成为发病率及死亡率排第 1 的恶性肿瘤^[1]。目前通过检测患者的肿瘤异质性提供个体化方案已经成为肺癌治疗的新趋势。酪氨酸激酶抑制剂(TKI)已被批准用于治疗 EGFR 突变或 ALK

重排的晚期非小细胞肺癌(NSCLC)。在 NSCLC 中发现的其他基因改变包括 c-Met、KRAS、NRAS、BRAF、HER2、ROS1 等。以这些基因作为新的治疗靶点是目前治疗研究的热点。其中, c-Met 与其配体 HGF (hepatocyte growth factor) 的异常激活可通过使多种底物蛋白的磷酸化, 促使细胞增殖、运动、迁移、侵袭, 与肿瘤发生、发展密切相关, 并参与肿瘤新生血管的生成^[2]。近来还发现在使用 TKI 治疗的 EGFR

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81260357, 81060188)

通讯作者: 宋向群, 主任医师, 硕士生导师, 学士; 广西医科大学附属肿瘤医院化疗二区, 广西南宁市河堤路 71 号(530021);
E-mail: xiangquns@163.com

收稿日期: 2016-03-23; **修回日期:** 2016-06-07

突变的 NSCLC 患者中,出现耐药与 HGF/c-Met 通路异常有关^[3]。HGF/c-Met 通路异常包括 HGF、c-Met 过度表达,c-Met 突变及 c-Met 倍数扩增,抑制 HGF/c-Met 通路激活成为治疗 NSCLC 的新靶点。c-Met 基因扩增被证实与 EGFR-TKI 耐药相关,而 HGF、c-Met 过度表达可诱导 c-Met 基因的扩增,所以有学者认为 HGF、c-Met 过度表达可能也是 EGFR-TKI 耐药的机制之一^[4],还有学者提出以 c-Met 的过度表达作为 c-Met 扩增的生物标志^[5]。一些 HGF/c-Met 抑制剂证实在 HGF、c-Met 过度表达的患者中取得很好的疗效^[6]。本实验通过使用免疫组化方式检测 NSCLC 中 HGF、c-Met 及 p-Met(phosphorylated Met) 蛋白的表达水平,探索阳性表达患者的临床病理学特征,为该人群提供使用 HGF/c-Met 抑制剂的依据,并探索其表达与 EGFR 表达的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2013 年 10 月至 2015 年 2 月在广西医科大学附属肿瘤医院手术切除的经病理确诊为 NSCLC 的石蜡包埋非冰冻标本 100 例。其中鳞癌 20 例,腺癌 72 例,腺鳞癌 7 例,大细胞癌 1 例;临床分期: I 期 46 例, II 期 18 例, III 期 25 例, IV 期 11 例。同时收集既往行 EGFR 免疫组化检测的结果。

1.2 试剂

Rabbit Anti-Met(c-Met) antibody(bs-0668R)、Rabbit Anti-HGF antibody (bs-1025R)、Rabbit Anti-phospho-Met(Tyr1234)、二抗生物素标记、酶标三抗均购自博奥森公司。DAB 显色剂购自北京山桥公司。

1.3 免疫组化方法和结果判定标准

按免疫组化流程分别对 HGF、c-Met 和 p-Met 进行检测。HGF、c-Met 结果选择 Fromowitz

阳性细胞半定量分级法^[7]:阳性细胞数占整个肿瘤细胞的百分比:<6%为 0 分;6%~25%为 1 分;26%~50%为 2 分;51%~75%为 3 分;>75%为 4 分;阳性细胞染色强度:阴性为 0 分;淡黄色为 1 分;棕黄色为 2 分;棕褐色为 3 分。两者分数相加,0~1 为(-),2~3 分为(+),4~5 分为(++),6~7 分为(+++)。其中“-”定义为阴性,“+”为弱阳性,“++”和“+++”为强阳性。p-Met 结果评判标准:高倍镜下观察阳性细胞数占整个肿瘤细胞的百分比>5%即设定为阳性^[8]。

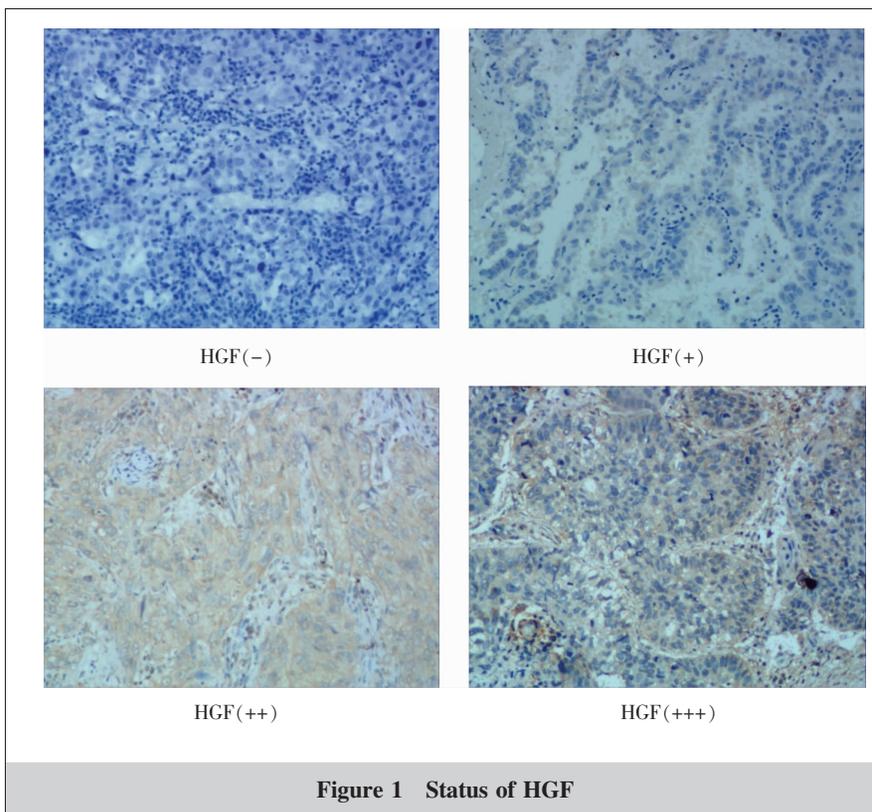
1.4 统计学处理

使用 SPSS16.0 软件分析,HGF、c-Met 及 EGFR 表达与临床病理参数之间关系分析采用卡方检验及 Fisher's exact test, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。HGF、c-Met 及 EGFR 之间关系使用 Spearman 相关检验,检验标准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HGF、c-Met、EGFR 在 NSCLC 中的表达情况

HGF 在 NSCLC 中主要表达在肿瘤细胞胞质中,阳性为黄色沉淀,在间质可见弱表达(Figure 1)。



c-Met 在组织中同样表达于肿瘤细胞胞质中,间质未见表达 (Figure 2)。HGF、c-Met 阳性表达率分别为 64%、47%。HGF、c-Met 表达与吸烟状态、年龄、性别、临床分期、分化程度、病理类型均无统计学差异 (Table 1)。100 例患者中有 94 例患者明确病理分化程度,有 57 例既往检测 EGFR 的表达情况,阳性总表达率 96.5%,与吸烟状态、年龄、分化程度、分期、病理类型均无统计学差异 (Table 1)。

2.2 HGF、c-Met 与 EGFR 之间的相关性分析

HGF 与 c-Met 经检验成正相关关系 (Table 2)。而 HGF、c-Met 与 EGFR 之间的表达均无相关关系 (Table 3)。

2.3 p-Met 检测结果

p-Met 阳性表达率为 3% (Figure 3),均为 HGF 强表达、

EGFR 突变的腺癌患者。其中 2 例患者 c-Met 为强表达,1 例为阴性 (Table 4)。

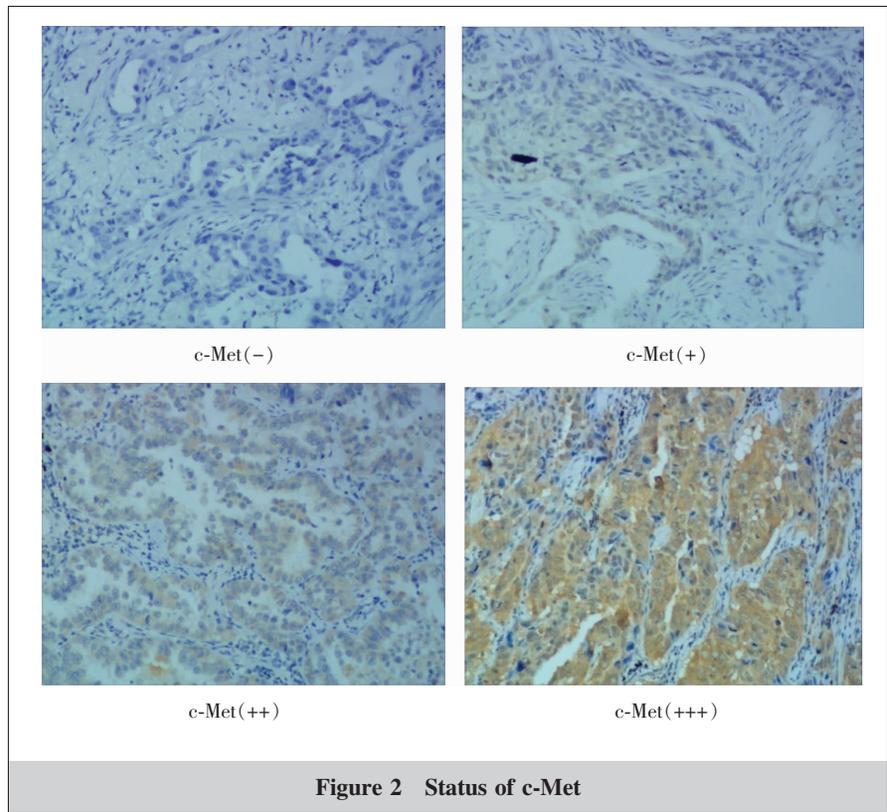


Table 1 Expression of HGF, c-Met and EGFR in NSCLC and their relationship with clinical pathological features

Clinical pathological features	HGF			c-Met			EGFR		
	Positive	Negative	P	Positive	Negative	P	Positive	Negative	P
Smoking status									
Smoking	31	16	0.701	22	25	0.971	27	1	1.000
Non-smoking	33	20		25	28		28	1	
Age(years)									
≥60	27	14	0.558	22	19	0.266	19	0	0.515
<60	37	22		25	34		36	2	
Sex									
Male	42	21	0.468	31	32	0.843	35	1	1.000
Female	22	15		16	21		20	1	
Clinical stage									
I	30	16	0.067	22	24	0.859	23	1	0.432
II	16	2		9	8		9	1	
III	13	12		12	14		17	0	
IV	5	6		4	7		6	0	
Degree of differentiation									
Low differentiation	19	15	0.339	14	20	0.126	18	0	0.538
High differentiation	40	20		30	30		32	2	
Histological types									
Adenocarcinoma	48	24	0.259	32	40	0.403	45	2	1.000
Squamous carcinoma	11	9		11	9		4	0	

Table 2 Correlation between expression of HGF and c-Met

HGF	c-Met			r	P
	-	+	+++~++++		
-	27	4	5	0.35	0.001
+	17	10	6		
+++~++++	9	11	11		

Table 3 Correlation between HGF, c-Met expression and EGFR expression

EGFR	HGF			r	P	c-Met			r	P
	-	+	+++~++++			-	+	+++~++++		
-	0	1	1	-0.57	0.671	0	1	1	0.549	0.092
+	4	7	4			8	3	4		
+++~++++	16	9	15			15	6	7		

Table 4 Clinical pathological features of p-Met positive patients

Differentiation degree	Stage	Histological types	HGF	c-Met	EGFR	EGFR mutation
High differentiation	IV	Adenocarcinoma	++	++	+++	+
Mid-differentiation	III A	Adenocarcinoma	+++	+++	No test	+
High differentiation	II B	Adenocarcinoma	++	-	+	+

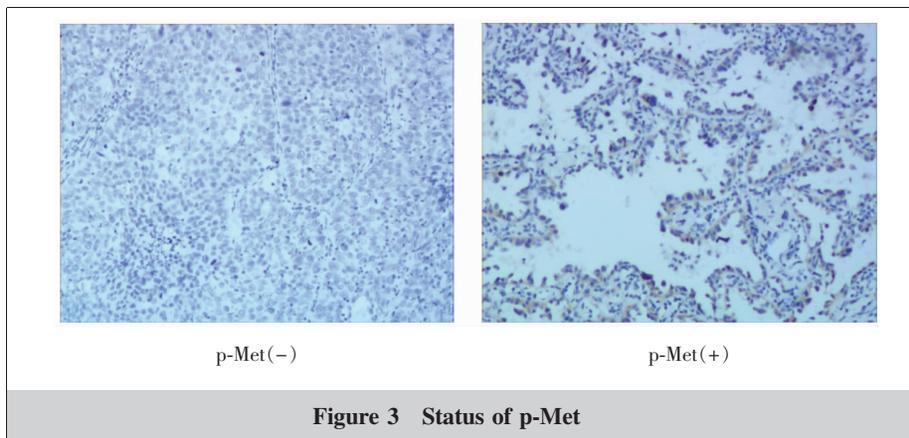


Figure 3 Status of p-Met

3 讨论

HGF 主要产生于间质细胞,正常情况下以旁分泌的形式与受体 c-Met 结合,与器官发育相关。当组织受损和修复时,HGF、c-Met 可出现短暂性高表达,但很快在机体调控下恢复至正常水平。目前,HGF 和 c-Met 的过度表达在很多实体瘤如胃癌、肝癌、结肠癌、胰腺癌、肺癌、甲状腺癌和脑胶质瘤等中被证实。这提示肿瘤的发生及演进可能与人体失去对 HGF、c-Met 表达的控制相关。

参考国内外研究,NSCLC 中 HGF 表达率大约范围是 31.5%~72.6%,c-Met 为 22.2%~74.6%,p-Met 为 5.6%~21.5%^[8-13]。结果波动范围较大,原因可能与每个研究收集标本的方式和类型有关。这些研究

的对象包括晚期 NSCLC 患者、包含所有分期的手术患者、EGFR 突变 NSCLC。而标本来源的人种、地域以及样本大小的不同,均是可能造成结果产生差异的原因。目前对于免疫组化结果的评判标准尚不统一。与大多数研究一样,本实验采用结合染色强度和范围的评判标准,而部分实验^[13-15]仅单以染色范围作为标准。实验中使用正常肺标本作为阴性对照,其中只有一个弱表达 HGF。Dziedziszko 等^[12]的研究证实 HGF 可在正常间质中表达。

多数研究结果^[8,11]表明 HGF、c-Met 的表达与性别、年龄、吸烟状态、临床分期无统计学关系,Tsao 等^[16]检测得出 c-Met 在腺癌中表达明显高于鳞癌。Tachibana 等^[9]结果表明 c-Met 更倾向于出现在浸润性生长的腺癌患者中。而实验中 c-Met 阳性表达在鳞癌中的表达高于腺癌,HGF 在早期患者中表达比晚期高,虽然不具有统计学差异,但与参考研究结果不同,其原因主要因为收集样本量小,而病理类型中腺癌数量远多于鳞癌;其次,以手术患者作为研究对象,大部分为 I、II 期患者,存在严重选择偏倚。

p-Met 作为 c-Met 磷酸化的产物,其阳性患者并未完全出现 c-Met 的阳性。目前 p-Met 和 c-Met 之间的联系尚未明确,但 Watermann 研究表明两者之间并无绝对关系^[17]。p-Met 可能只是该通路发挥生物学效应的底物之一;或者 p-Met 发挥生物学效应时间短,结构可能发生改变,依靠免疫组化方式无法准确检测。p-Met 阳性患者均为 HGF 强阳性的腺癌患者。Tsuta 等^[13]的研究支持 p-Met 在腺癌患者中的表达,该研究中 p-Met 表达只在腺癌及肉瘤样癌的患者中出现,鳞癌患者无 p-Met 表达。Takamitsu 等^[11]的研究同样证实 p-Met 倾向出现在高表达 HGF 的

患者中,它认为高水平的 HGF 可能是诱导 p-Met 产生及发挥效应的原因之一。高水平表达 HGF 可以通过诱导 c-Met 倍数扩增致使 EGFR-TKI 耐药^[18],作为该通路的关键启动因子之一,抑制其发挥效应或可达到治疗的目的。目前联合抗 HGF 治疗 NSCLC 的临床实验也证实其作为靶点的有效性^[19,20]。此外,p-Met 阳性患者同时出现 EGFR 突变。虽然目前对 EGFR 突变和 p-Met 表达之间关系未能确定,由于 EGFR 在调节细胞分裂及死亡中发挥重要作用,突变的 EGFR 可激活恒定的信号通路,导致瘤发生及凋亡抑制,而磷酸化的 c-Met 可以恢复被 EGFR-TKI 抑制的 PI3K/Akt 信号通路,使 EGFR 突变的患者对 TKI 产生耐药^[21]。p-Met 作为 HGF/c-Met 通路激活的产物之一,其阳性表达的 EGFR 突变患者可能对 EGFR-TKI 存在原发性耐药,治疗效果可能欠佳。通过检测 HGF、c-Met、p-Met 表达可以初步了解患者有无 HGF/c-Met 通路异常,是否有对 EGFR-TKI 原发耐药的可能,为患者联合抗 HGF/c-Met 和 EGFR-TKI 治疗提供信息。Gou 等^[15]实验证实 c-Met 的过度表达可以作为 EGFR-TKI 联合 c-Met 抑制剂治疗 EGFR-TKI 耐药患者的标志。现阶段研发的 HGF/c-Met 通路抑制剂联合 EGFR-TKI 治疗 NSCLC 患者的疗效已经得到初步验证^[22,23]。一项实验发现在 NSCLC 中,c-Met 抑制剂 SU11274 甚至可以逆转 HGF 诱导的厄洛替尼耐药^[24]。在 Sano 等^[25]的一项研究中表明,Onartuzumab 的有效治疗可以通过抑制 c-Met 的泛素化而降低 c-Met 及 p-Met 的蛋白水平,联合 Onartuzumab 与厄洛替尼治疗可能使高水平表达 HGF 的 EGFR 突变患者获益。

本实验通过检测 HGF、c-Met、p-Met 在 NSCLC 中的表达水平,展示 HGF、c-Met、p-Met 表达水平与临床病理特征的关系。结果显示 HGF、c-Met 表达与吸烟状态、年龄、性别、临床分期、分化程度、病理类型以及 EGFR 的表达水平均无关。p-Met 阳性患者为 HGF 强表达的 EGFR 突变腺癌患者。实验不足在于标本选择存在选择偏倚,样本量小。后续研究可进行 HGF、c-Met、p-Met 阳性患者生存分析及追踪阳性患者使用 EGFR-TKI 的疗效情况。

参考文献:

[1] Yang FH,Zhang CD. Research status of lung cancer[J].

China Continuing Medical Education,2015,10(2):30-31. [杨付红,张春娣. 肺癌的研究现状[J]. 中国继续医学教育,2015,10(2):30-31.]

[2] Trovato M,Torre ML,Ragonese M,et al. HGF/c-met system targeting PI3K/AKT and STAT3/phosphorylated-STAT3 pathways in pituitary adenomas :an immunohistochemical characterization in view of targeted therapies[J]. Endocrine,2013,44(3):735-743.

[3] Turke AB,Zejnullahu K,Yi-Long W,et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC[J]. Cancer Cell,2010,17(17):77-88.

[4] Xuan XL,An CS,Zhou CC. The Mechanism of gefitinib resistance induced by hepatocyte growth factor in sensitive non-small cell lung cancer cell in vitro[J]. Chinese Journal of Lung Cancer,2013,16(1):1-6.[玄香兰,安昌善,周彩存.肝细胞生长因子诱导敏感非小细胞肺癌细胞对吉非替尼耐药及机制的研究[J].中国肺癌杂志,2013,16(1):1-6.]

[5] Li AN,Yang JJ,Zhang XC,et al. Crizotinib in advanced non-small-cell lung cancer with de novo c-Met overexpression[J]. J Clin Oncol,2015,33(15):abstr 8090.

[6] David R,Thomas J,Rodryg A. Randomized phase II trial of onartuzumab in combination with erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol,2013,10(31):4105-4114.

[7] Jin J,Xie L. Investigation into the expression and significance of C-met in patients with non-small cell lung cancer [J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine,2015,1:119-122.[金军,谢玲. C-met 在非小细胞肺癌患者中的表达及意义探讨[J]. 临床肺科杂志,2015,1:119-122.]

[8] Nakamura Y,Niki TA,Morikawa T,et al. c-Met activation in lung adenocarcinoma tissues;an immunohistochemical analysis[J]. Cancer Sci,2007,7(98):71006-71013.

[9] Tachibana K,Minami Y,Shiba-Ishii A,et al. Abnormality of the hepatocyte growth factor/MET pathway in pulmonary adenocarcinogenesis[J]. Lung Cancer,2012,75:181-188.

[10] Scagliotti GV,Silvia N,Joachim VP,et al. The emerging role of MET/HGF inhibitors in oncology[J]. Cancer Treat Rev,2013,39:793-801.

[11] Takamitsu O,Hidetaka U,Kenji O,et al. Comprehensive molecular analyses of lung adenocarcinoma with regard to the epidermal growth factor receptor,K-ras,MET,and hepatocyte growth factor status[J]. J Thorac Oncol,2010,5(5):591-596.

[12] Dzadzadzuszko R,Wynes MW,Singh S,et al. Correlation

- between MET gene copy number by silver in situ hybridization and protein expression by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer [J]. J Thorac oncol,2012,7(2):340-347.
- [13] 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.
- [14] Noro R,Seike M,Zou F,et al. MET FISH-positive status predicts short progression-free survival and overall survival after gefitinib treatment in lung adenocarcinoma with EGFR mutation[J]. BMC Cancer,2015,15(1):1-8.
- [15] Gou LY,Wu YL,Yang JJ,et al. Targeting c-Met overexpression for overcoming acquired resistance to EGFR TKIs in NSCLC[J]. J Clin Oncol,2015,33:abstr 8091.
- [16] Tsao MS,Yang Y,Marcus A,et al. Hepatocyte growth factor is predominantly expressed by the carcinoma cells in non-small cell lung cancer [J]. Hum Pathol,2001,32(1):57-65.
- [17] Watermann I,Schmitt B,Stellmacher J,et al. Improved diagnostics targeting c-MET in non-small cell lung cancer: expression, amplification and activation?[J]. Diagn Pathol, 2015,10(1):1-12.
- [18] Seiji Y,Shinji T,Takayuki N,et al. Ligand-triggered resistance to molecular targeted drugs in lung cancer: roles of hepatocyte growth factor and epidermal growth factor receptor ligands[J]. Cancer Sci,2012,103(7):1189-1194.
- [19] Pérez-Ramírez C,Cañadas-Garre M,Molina MÁ,et al. MET/HGF targeted drugs as potential therapeutic strategies in non-small cell lung cancer[J]. Pharmacol Res,2015, 102:90-106.
- [20] D'Arcangelo M,Cappuzzo F. Focus on the potential role of ficlatuzumab in the treatment of non-small cell lung cancer [J]. Biologics Targets and Therapy,2013,7(1):61-68.
- [21] Wu HY,Fan FT,Liu ZG,et al. Norcantharidin combined with EGFR-TKIs overcomes HGF-induced resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer cells via inhibition of Met/PI3k/Akt pathway [J]. Cancer Chemother and Pharmacol,2015,76(2):307-315.
- [22] Sequist LV,von Pawel J,Garmey EG,et al. Randomized phase II study of erlotinib plus tivantinib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol,2011,29(24):3307-3315.
- [23] Spigel DR,Ervin TJ,Ramlau R,et al. Final efficacy results from OAM4558g,a randomized phase II study evaluating MetMab or placebo in combination with erlotinib in advanced NSCLC[J]. J Clin Oncol,2011,29(Suppl): Abstract7505.
- [24] M Wu,X Xuan,F Wang,et al. c-Met inhibitor reverses HGF-induced resistance to Erlotinib in non-small lung cancer cells with different EGFR gene types [J]. Chin J Cancer Biothe,2015,22(4):427-431.
- [25] Sano Y,Hashimoto E,Nakatani N,et al. Combining onartuzumab with erlotinib inhibits growth of non-small cell lung cancer with activating EGFR mutations and HGF over expression[J]. Molecular Cancer Therapeutics,2015, 14(2):533-541.

关于作者版面费汇款的有关要求

为了便于财务统一管理,防止商务网站虚假征稿骗取版面费,从2016年起作者缴纳版面费须从银行汇款,必须注明稿号、第一作者姓名。不接受邮局汇款,严禁用信件夹寄现金。同时由于营改增的实施,从2016年5月起,版面费发票改为国税发票,如您的版面费发票抬头为贵单位名称,需提供贵单位的税号或组织机构代码证号,请您在百忙中,向贵单位财务部门咨询一下!并在网上投稿作者版面费登记栏中,完善税号登记信息,以便开具发票;如果您的版面费发票抬头是个人,则不需税号。谢谢合作!

相关问题,可以拨打 0571-88122280 进行咨询。

银行汇款:户名:浙江《肿瘤学杂志》社 账号:1202020009900009865

开户行:中国工商银行杭州半山支行