

两种细胞因子受体在胰腺癌中的表达及临床应用价值

卢庆乐,田玫玲,芦珂,张莹(山东大学附属省立医院检验科,山东济南 250022)

【摘要】 目的 探讨胰腺癌组织中表皮生长因子受体(EGFR)和肝细胞生长因子受体(Met)基因和蛋白的表达情况,及其与胰腺癌临床病理特征和预后的关系。**方法** 采用免疫组化法检测 78 例胰腺癌组织和 23 例正常胰腺组织中 EGFR 和 Met 蛋白的表达情况,采用实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 EGFR 和 Met-DNA 的相对拷贝数。**结果** 78 例胰腺癌组织中,EGFR 和 Met 蛋白的阳性表达率明显高于正常胰腺组织,差异均有统计学意义($P<0.05$)。肿瘤直径大于 4 cm 患者、胰腺癌组织高中分化患者、出现远处转移患者、淋巴转移患者、肠系膜上血管侵犯患者、TNM 分期为Ⅲ和Ⅳ期患者中 EGFR 和 Met 蛋白的表达均明显高于肿瘤直径小于或等于 4 cm 患者,胰腺癌组织低分化患者,未出现远处转移患者、未有淋巴转移患者、未出现肠系膜上血管侵犯患者、TNM 分期为Ⅰ和Ⅱ期患者,差异具有统计学意义($P<0.05$)。胰腺癌患者中,EGFR 和 Met-DNA 相对拷贝数均明显高于正常胰腺组织中 EGFR 和 Met-DNA 相对拷贝数,差异具有统计学意义($P<0.05$)。高表达 EGFR 和 Met 胰腺癌患者的平均生存时间均显著低于 Met 及 EGFR 低表达患者,差异具有统计学意义($P<0.05$)。Met 和 EGFR 均高表达的患者平均生存时间较 Met 或 EGFR 单一高表达者的短,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** EGFR 和 Met 的表达与胰腺癌的临床病理相关指标密切相关,对二者的分析研究有助于对胰腺癌患者的预后作出预测,并对化疗药物新靶点筛选提供理论依据。

【关键词】 胰腺癌; 表皮生长因子受体; 肝细胞生长因子受体; 实时定量聚合酶链反应; 免疫组织化学
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.17.005 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)17-2217-03

Expression and clinical significance of hepatocyte growth factor receptor and epidermal growth factor receptor in pancreatic cancer LU Qing-le, TIAN Mei-ling, LU Ke, ZHANG Ying (Inspection Branch, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan, Shandong 250022, China)

【Abstract】 Objective To study the clinical significance of hepatocyte growth factor receptor (Met) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in pancreatic cancer. **Methods** Expression levels of EGFR and Met protein were detected by immunohistochemical staining in 78 cases of pancreatic cancer tissues and 23 cases of normal pancreatic tissues, and gene copy numbers of EGFR and Met were detected by fluorescent real time-polymerase chain reaction. **Results** Positive rates of EGFR and Met expression in pancreatic cancer tissues were higher than those in normal tissues ($P<0.05$). Expression levels of EGFR and Met were significantly influenced by TNM stages, tumor size, superior mesenteric vessels invasion and transfer of tumor lesions ($P<0.05$). Relative gene copy numbers of EGFR and Met in pancreatic cancer tissues were significantly higher than those in normal pancreatic tissues ($P<0.05$). The median survival time of pancreatic cancer patients with high expression of EGFR or Met were significantly lower than patients with low expression of Met or EGFR ($P<0.05$). The median survival time of patients with high expression of Met and EGFR were significantly lower than patients with high expression of Met or EGFR ($P<0.05$). **Conclusion** EGFR and Met might interact in a synergistic manner with the oncogenesis and development of pancreatic cancer, could be helpful for the prognostic evaluation of pancreatic cancer and also could be new therapeutic targets in pancreatic cancer.

【Key words】 pancreatic cancer; epidermal growth factor receptor; hepatocyte growth factor receptor; real time-polymerase chain reaction; Immunohistochemistry

胰腺癌作为消化系统常见的高侵袭性恶性肿瘤之一,其病死率较高,一般的检测手段不能及时对其进行确诊,故胰腺癌患者就诊时往往已发展到晚期,加之患者身体体质较弱,基本都不能进行手术治疗,且放化疗疗效不理想^[1-2]。为此对于胰腺癌病因机制的探讨以及寻求更有效的靶点药物治疗显得极为重要。近年来大量研究表明,表皮生长因子受体(EGFR)和肝细胞生长因子受体(Met)在肿瘤的发生发展中起到重要的作用^[3]。另据一些研究表明胰腺癌患者的 EGFR 和 Met 均呈现高表达状态^[4],但二者在胰腺癌中的具体关系及与胰腺癌预后的相关性研究较少,本研究旨在分析 EGFR 及 Met 在胰腺癌中的表达情况并进一步分析其相关性,为临床工作提供胰腺

癌的诊断、治疗以及预后评估的检测指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2003 年 1 月至 2012 年 12 月 10 年本院进行手术切除并经术后病理证实的胰腺癌患者 78 例临床资料作为研究对象。其中男 52 例,女 26 例,平均年龄(51.5±12.5)岁,所有患者均符合参考文献[5]中的诊断标准,且术前未进行放化疗等治疗。其中胰头癌 68 例,胰体尾部癌 10 例。根据 TNM 分期,Ⅰ和Ⅱ期 34 例,Ⅲ和Ⅳ期 44 例,并选取 23 例正常胰腺组织作为对照组。本研究方案经本院伦理委员会审查批准通过。

1.2 主要试剂 一抗为兔抗人 EGFR 和 Met 单克隆抗体购

于 Santa Cruz 公司,免疫组化其他染色试剂购于北京中杉金桥公司。组织 DNA 提取试剂盒购于 Omega 公司, RT-PCR 试剂盒和蛋白酶 K 购于 Roche 公司。

1.3 免疫组化染色和结果分析 所有标本经一般病理切片处理后,严格按试剂盒说明书进行操作,DAB 显色,苏木素复染。染色结果依据参考文献[6]由两名病理科医生在双盲的条件下单独进行判定,依据参考文献[6]综合阳性细胞百分数和染色强度进行评分。以上两项的积分和进行分级:0 分为(—),2~3 分为(±),4~5 分为(+),6~7 分为(++),其中(+)和(++)判定为阳性。

1.4 基因组 DNA 提取和 RT-PCR 严格按照 DNA 提取试剂盒提供的步骤进行石蜡块组织 DNA 的提取。Met 和 EGFR 引物和内参基因 Line-1 引物由上海吉玛公司设计合成。PCR 反应体系(20 μL),主要有 2×1 SYBR,10 μL,样本 DNA 模板 0.4 μL,上下游引物各 0.3 μL,Taq-DNA 聚合酶 0.12 μL,双蒸水 8.88 μL。在 Roche 480 RT-PCR 仪上进行检测,每种引物和模板各做 3 个重复孔反应。RT-PCR 反应条件为 95 ℃ 30 s, 95 ℃ 10 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s,40 个循环。对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析其特异性。经扩增效率一致性验证后,取 3 个平行孔 Ct 值的平均数,分别计算出同一个样本中 Met 和 EGFR 的 Ct 值与 Line-1 Ct 值的差值(Δct),然后依据参考文献[7]中的公式计算每个样本中 Met 和 EGFR-DNA 的相对拷贝数:DNA=2^{-Δct}×100。

1.5 统计学方法 研究所得数据采用 SPSS17.0 统计软件进行处理。免疫组化检测结果采用四格表 χ² 检验或 Fisher 精确概率法,相关性分析采用 Spearman 相关分析。RT-PCR 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并进行方差齐性检验,两个样本均数间比较采用独立样本 t 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 EGFR 和 Met 蛋白在胰腺癌组织中的表达情况 EGFR 在胰腺癌组织中主要表达于癌细胞胞浆内和(或)细胞膜上。Met 蛋白主要定位于胰腺癌肿瘤细胞的胞浆和胞膜,并可表达

于肿瘤癌巢。78 例胰腺癌组织中 43 例 EGFR 阳性表达(55.128%),41 例 Met 阳性表达(52.564%);对照组 23 例正常胰腺组织中有 2 例 EGFR 阳性表达(8.696%),4 例 Met 阳性表达(17.391%)。胰腺癌组织中 EGFR 和 Met 的表达均明显高于正常胰腺组织中的表达,差异具有统计学意义(P<0.05,见表 1 和表 2)。

表 1 EGFR 在胰腺癌组织和正常胰腺组织中的表达分析

组别	n	EGFR				阳性率 (%)	χ ²	P
		—	±	+	++			
胰腺癌组织	78	15	20	15	28	55.128	5.502	0.000
正常胰腺组织	23	0	21	1	1	8.696		

表 2 Met 在胰腺癌组织和正常胰腺组织中的表达分析

组别	n	Met				阳性率 (%)	χ ²	P
		—	±	+	++			
胰腺癌组织	78	16	21	14	27	52.564	8.895	0.002
正常胰腺组织	23	0	19	3	1	17.391		

2.2 EGFR 和 Met 蛋白的表达与胰腺癌患者临床病理特征的关系 胰腺癌患者中,肿瘤直径大于 4 cm 患者,胰腺癌组织高中度分化患者、出现远处转移患者、淋巴转移患者、肠系膜上血管侵犯患者、TNM 分期为Ⅲ和Ⅳ期患者中 EGFR 和 Met 蛋白的表达均明显高于肿瘤直径小于或等于 4 cm 患者,胰腺癌组织低分化患者、未出现远处转移患者、未有淋巴转移患者、未出现肠系膜上血管侵犯患者、TNM 分期为Ⅰ和Ⅱ期患者,差异具有统计学意义(P<0.05,见表 3);EGFR 和 Met 蛋白的表达与胰腺癌患者的性别、年龄差异均无统计学意义(P>0.05,见表 3)。

表 3 胰腺癌患者 EGFR 和 Met 蛋白表达与临床病理特点分析

临床病例指标	n	EGFR 阳性表达例数	χ ² 值	P 值	MET 阳性表达例数	χ ²	P
年龄(<60 岁/≥60 岁)	38/40	21/22	0.001	0.981	20/21	0.000 1	0.991
性别(男/女)	56/22	32/11	0.325	0.568	30/11	0.621	0.432
年龄(≤4 cm/>4 cm)	36/42	17/26	1.689	0.193	16/25	1.768	0.183
分化等级(高或中分化/低分化)	53/25	48/11	19.991	0.000	46/12	13.407	0.000
淋巴结转移(有/无)	49/29	37/6	22.132	0.000	34/7	14.960	0.000
肠系膜上血管侵犯(有/无)	28/50	27/16	30.119	0.000	26/15	28.441	0.000
远处转移(有/无)	61/17	41/2	19.000	0.000	38/3	10.629	0.001
TNM 分期(Ⅰ和Ⅱ/Ⅲ和Ⅳ)	34/44	16/27	5.498	0.019	19/22	4.963	0.026

表 4 EGFR 和 Met 在胰腺癌和正常胰腺组织 DNA 的相对拷贝数分析($\bar{x} \pm s$)

项目	正常胰腺 (n=24)	胰腺癌 (n=78)	t	P
EGFR-DNA 相对拷贝数	0.12±0.10	0.21±0.14	3.444	0.001
Met-DNA 相对拷贝数	0.13±0.09	0.22±0.16	3.464	0.000

2.3 EGFR 和 Met-DNA 的相对拷贝数 胰腺癌组织中 EGFR 和 Met-DNA 相对拷贝数均显著高于正常胰腺组织中 EGFR 和 Met-DNA 相对拷贝数。差异具有统计学意义(P<0.05,见表 4)。

2.4 相关分析 EGFR 和 Met 蛋白表达水平经 Spearman 相关分析显示,两者呈显著正相关性(r=0.713,P=0.014)。对 EGFR 和 Met-DNA 相对拷贝数进行 Pearson 相关分析的结果显示,两者表达呈正相关性(r=0.624,P=0.021)。对 EGFR

蛋白表达和 EGFR DNA 相对拷贝数进行 Spearman 相关分析的结果显示,两者表达呈正相关性($r=0.817, P=0.012$)。对 Met 蛋白表达和 Met-DNA 相对拷贝数进行 Spearman 相关分析的结果显示,两者之间没有相关性($r=0.282, P=0.293$)。

2.5 EGFR 及 Met 表达水平与胰腺癌生存预后的关系 高表达 EGFR 和 Met 胰腺癌患者的平均生存时间均显著低于 Met 及 EGFR 低表达患者,差异具有统计学意义($P<0.05$,见表 5)。36 例 Met 和 EGFR 均高表达的胰腺癌患者的平均生存时间为(205 ± 28)d 较 Met 或 EGFR 单一高表达者的短,差异具有统计学意义。

表 5 EGFR 及 Met 表达与胰腺癌患者生存分析($\bar{x}\pm s$)				
组别	患者数	中位生存时间(d)	<i>t</i>	<i>P</i>
高表达 EGFR	45	243±41	24.195	0.000
低表达 EGFR	32	553±71		
高表达 Met	46	231±37	27.892	0.000
低表达 Met	31	561±67		

3 讨 论

胰腺癌的发病率逐年升高,其病死率也非常高,由于多种原因所致患者不能及时地进行相关的手术治疗,故多数胰腺癌患者需采用放化疗治疗,但放化疗治疗的效果不甚明显,为此患者的整体生存质量较差^[8]。随着生物医学的不断发展,对于胰腺癌的发生发展、侵袭和转移等相关分子标记物进行研究,为胰腺癌的诊断和治疗提供了一定的帮助。

EGFR 作为人表皮生长因子受体家族的成员之一,可以通过信号转导通路对细胞周期、转移、浸润等起到一定的调控作用。特别当其过度高表达时,细胞可以向恶性表型进行转化。故本研究显示胰腺癌组织中 EGFR 高表达显著高于正常胰腺组织,且胰腺癌患者中 EGFR 高表达患者中位生存期明显短于 EGFR 低表达组患者。Met 是肝细胞生长因子(HGF)的受体,属于酪氨酸激酶受体家族,研究发现其在多种上皮细胞及相关来源的肿瘤中均有相关的表达,同样可以通过相关的多种信号通路,促使肿瘤细胞的生长与转移^[11-12]。故本研究中显示胰腺癌组织中 Met 高表达显著高于正常胰腺组织,且胰腺癌患者中 Met 高表达患者中位生存期明显短于 Met 低表达组患者。由此可知 EGFR 和 Met 与胰腺癌的一些临床病理指标如肿瘤大小、分化、转移及 TNM 分期存在一定的相关性。

近年来研究发现 Met 受体同样可以与其他一些膜受体如表 EGFR 等产生交互作用,主要是在激活 Akt 信号通路中起着一定的相互协调作用^[13]。故本研究胰腺癌患者中 EGFR 和 Met 均高表达患者的中位生存期明显短于 EGFR 和 Met 单一表达或者低表达组患者。此外 EGFR 与 Met 蛋白表达之间、EGFR 与 Met-DNA 相对拷贝数之间的变化呈显著性正相关性,进一步表明两者在胰腺癌的发生和发展中可能存在协同作用。本研究中 DNA 拷贝数结果显示 Met 蛋白的高表达与 Met-DNA 拷贝数之间的无相关性,表明 Met 蛋白的高表达受多种因素的调控,具体机制尚待研究。

总之,在胰腺癌的发生和发展中 EGFR 和 Met 可能存在一定的相互作用。对二者的肿瘤作用机制进一步研究将有助于筛选出更加可靠的胰腺癌早期诊断和预后判断的基因标志物,并为放化疗治疗药物新靶点的选择提供理论依据和支持。

参考文献

[1] 陈伟,黄力,华赟鹏,等.肝细胞生长因子受体和表皮生长因子受体在胰腺癌中的表达及临床意义[J].中华肝胆外科杂志,2012,18(6):447-451.

[2] 朱功兵,赵勤,郭晓枫,等.抗表皮生长因子受体单克隆抗体对人胰腺癌裸鼠模型的化疗增敏作用[J].中华实验外科杂志,2010,27(10):1489-1491.

[3] 秦玉璇,李东风,李良芳,等.胰腺癌中 EGFR、KRAS、BRAF 基因突变状况分析及意义[J].实用医学杂志,2012,28(14):2339-2341.

[4] 赵燕,姚志华,马杰,等.胰腺癌组织中 P21ras、TGF- α 及 EGFR 蛋白的表达[J].郑州大学学报:医学版,2010,45(3):457-460.

[5] 张永胜,徐龙江,李峰,等.胰腺癌组织中 EGFR 和 CD31 的表达及其临床意义[J].临床与实验病理学杂志,2011,27(10):1117-1119.

[6] 林远洪,雷小林,吴永忠,等.靶向 EGFR 基因的 shRNA 对胰腺癌细胞放疗敏感性的增强作用[J].中国老年学杂志,2011,31(5):797-799.

[7] 洪晓泉,林凡,王敏,等. EGFR 及 ADAM9 在胰腺癌干细胞与分化细胞中的表达及意义[J].中华胰腺病杂志,2011,11(2):82-85.

[8] 万世奇,张太平,王天笑,等.重组腺相关病毒载体表达抗表皮生长因子受体抗体对胰腺癌细胞株抑制作用的研究[J].中华消化外科杂志,2011,10(4):286-289.

[9] 宰红艳,易小平,李宜雄,等.同时稳定抑制 X 连锁凋亡抑制蛋白和生存素表达对胰腺癌细胞上皮-间质转化及侵袭性的影响[J].中南大学学报:医学版,2012,37(9):883-888.

[10] 张志华,裴正军,朱光辉,等. CD151、c-MET 及整合素 $\alpha 3, \alpha 6$ 在胰腺导管腺癌中的表达及其与预后的关系[J].中华胰腺病杂志,2011,11(3):190-193.

[11] 胡运莲,姜楠,谭大琦,等.加味左金丸对大鼠胃癌前病变胃黏膜 EGFR、VEGF、C-MET、Bcl-2、P53 表达的影响[J].世界华人消化杂志,2006,14(7):650-654.

[12] 陈凡,林琳,张红杰,等.溃疡性结肠炎结肠黏膜修复中 HGF、c-MET、EGFR 的作用[J].世界华人消化杂志,2006,14(6):594-599.

[13] 范苗静,王林,曾韵洁,等. EGFR 在消化道肿瘤中的表达意义及其与 GST π 和 c-MET 的关系[J].广东医学,2009,30(3):432-434.