论著

文章编号:1000-5404(2008)12-1140-04

c-Met、MMP-2、MMP-9在肝细胞癌中的表达及临床意义

谢 斌,唐 春,吴 刚,陈 平 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所肝胆外科,重庆 400042)

摘 要:目的 研究c-Met、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达,探讨三者的表达与肝癌侵袭转移间的关系,并初步明确在肝细胞癌预后判断中的作用。**方法** 采用免疫组化对47例肝细胞癌手术切除标本中c-Met、MMP-2、MMP-9的表达进行检测,评估c-Met的表达与HCC临床病理因素的关系及与MMP-2、MMP-9表达的关系。**结果** c-Met、MMP-2、MMP-9在肝细胞癌组织中的阳性表达率分别为38.3%、72.3%、89.4%,与正常肝组织比较差异有统计学意义(分别为12%、16%、12%,$P<0.05$);c-Met阳性表达率与肝细胞癌的转移、淋巴浸润、包膜形成以及肿瘤分化有关($P<0.05$),而与性别、年龄、肿瘤的大小、分期无关;MMP-2的阳性表达率仅与肝细胞癌的包膜形成有关($P=0.028$);MMP-9的阳性表达率与HCC的各项临床病理因素无关;c-Met阳性表达与MMP-2的异常表达有关($P<0.001$)。**结论** 在HCC的转移中,HGF/c-Met与HCC的转移有关,并且与MMP系统之间存在联系,可能影响MMP-2、MMP-9的表达,对于HCC的转移防治及预后具有一定的临床意义。

关键词: 肝细胞癌; c-Met; MMP-2; MMP-9; 转移
中图法分类号: R394.2;R730.23;R735.7 **文献标识码:** A

Expressions and clinical significances of c-Met, MMP-2, MMP-9 in metastasis of human hepatocellular carcinoma: report of 47 cases

XIE Bin, TANG Chun, WU Gang, CHEN Ping (Department of Hepatobiliary Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of c-Met, MMP-2, MMP-9 in the invasion, metastasis and prognosis of hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods** We used immunohistochemistry to evaluate the expressions of c-Met, MMP-2, and MMP-9, and statistically analyzed the relationship between these expressions and clinicopathological prognostic parameters in 47 patients with HCC. Another 25 samples taken 3 cm away from the margin of tumor mass served as control. **Results** The results showed that the positive rates of the expression of c-Met, MMP-2, MMP-9 in HCC tissue samples were 38.3%, 72.3% and 89.4% respectively, but in normal liver tissue were 12%, 16% and 12% respectively. The expression of c-Met was significantly higher in HCC than in normal liver tissue, while the expressions of MMP-2 and MMP-9 were significantly higher in HCC than in normal liver tissue. c-Met expression was correlated with lymph node status, capsule, metastasis (intra- or extra-hepatic metastasis) and histological grade, but not with gender, age, tumor size, and stage of the disease, similarly MMP-2, MMP-9 expressions were correlated with capsule, but not with gender, age, tumor size, lymph node status, neoplasm stage and histological grade. A statistical significant correlation was found between c-Met and abnormal MMP-2 expression ($P<0.01$). **Conclusion** These results suggest that c-Met may be involved in the up-regulation of MMP-2, *via* interaction of HGF/c-Met signal pathway and MMPs, which may plays an important role in the invasion, metastasis and prognosis of HCC.

Key words: hepatocellular carcinoma; c-Met; matrix metalloproteinase-2; matrix metalloproteinase-9; metastasis

作者简介: 谢 斌,男,四川省彭州市人,博士,主治医师,主要从事肝癌转移机制方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68757963, E-mail:xiebin313@yahoo.com.cn
通信作者: 陈 平,电话:(023)68757966
收稿日期: 2007-12-21;**修回日期:** 2008-01-15

c-Met 跨膜蛋白是肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)的单一受体,HGF 激活 c-Met,导致 ras/致分裂素激活蛋白激酶、磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B 等信号转导途径的级联激活,细胞发生一系列生物学效应,如分散、细胞运动、侵袭、细胞迁移以及最终转移等。HGF/c-Met 信号传导通路广泛存在于各种细胞中,对多种组织器官的生长发育具有重要的生理调节作用。但当细胞过度表达 HGF 或 c-Met 时,常常导致肿瘤细胞的侵袭、转移。

MMPs 是一类能分解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)与基底膜的蛋白水解酶。目前许多研究证明,肿瘤的浸润和转移与 MMPs 的过度表达有关[1]。MMP-2、MMP-9 能降解明胶,层黏连蛋白、巢蛋白,MMP-2 还能降解Ⅰ型胶原,激活 MMP-9、MMP-13,MMPs 共同作用可降解所有的 ECM。关于 c-Met、MMP-2、MMP-9 三者在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织中的表达及其在肝癌转移中的基础研究不少,但是 c-Met 与 MMP 系统之间在临床肝癌转移研究中是否有相互作用却少有涉及。本研究采用免疫组化(ABC 法)对 47 例肝细胞癌手术切除标本中 c-Met、MMP-2、MMP-9 的表达进行了检测,研究 c-Met、MMP-2、MMP-9 的表达与 HCC 临床病理因素的关系,明确这种关系在 HCC 的转移、复发及预后判断中的作用及临床意义,并对 c-Met 与 MMP 系统在 HCC 转移中的联系进行初步分析。

1　材料与方法

1.1　研究对象

收集本院 2001－2003 年手术切除经病理证实为肝细胞癌的标本 47 例,男性 39 例,女性 8 例,年龄 30～76 岁。有肝外转移和/或肝内转移者占 29.8%(14/47),有淋巴结转移者占 10.6%(5/47)。肿瘤分期根据国际抗癌联盟 TNM 确定。肿瘤体积按直径分为 3 种:<30 mm、30～50 mm、>50 mm。所有病例术前未接受任何放射治疗或化学治疗。对照组 25 例为手术过程中取自肿瘤边缘 3 cm 以外的、经苏木精-伊红染色病理切片证实无癌变的组织。

1.2　试剂

c-Met、MMP-2、MMP-9 单克隆/多克隆抗体为北京中山公司产品,ABC 试剂盒、DAB 试剂盒由北京中山公司提供。

1.3　方法

标本经 10%甲醛固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续切片 6 张,切片厚度为 4 μm,分别行苏木精-伊红染色和 ABC 免疫组化染色。主要步骤:石蜡切片常规脱蜡,0.3%(体积分数)H_2O_2 10 min 阻断内源性过氧化酶活性。微波炉抗原热修复处理 700 W/20 min。山羊血清封闭非特异性抗原,滴加一抗(1∶200)4 ℃过夜,然后滴加生物素化羊抗鼠/兔 IgG,37 ℃ 孵育 30 min;最后滴加 ABC 复合物,37 ℃ 孵育 30 min。上述各步骤均以 PBS 溶液漂洗 3 次,每次 5 min。DAB 溶液显色后,苏木精复染细胞核,脱水树胶封片。

1.4　结果判断

光镜下以细胞质(或膜)呈棕黄色为阳性作为判定标准,每例组织切片随机观察 10 个高倍(HPFs×400)视野,细胞质(或膜)呈棕黄色且细胞数<10%设定为“0”,10%～30%设定为“1”,31%～50%设定为“2”,>50%设定为“3”,“1～3”均设定为阳性表达。以对照组的切片为参照,将 c-Met、MMP-2、MMP-9 染色程度“1”设定为正常表达,染色程度“2～3”设定为异常表达。

1.5　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件行 Fisher 确切概率法、校正 χ^2 检验和 χ^2 检验。

2　结果

2.1　c-Met 在肝细胞癌组织的阳性表达增高

c-Met 表达主要表现为胞质呈棕黄色染色(图 1)。47 例肝细胞癌组织中有 18 例(38.3%)c-Met 表达阳性,其中表达呈“1”者为 5/18(27.8%),表达呈“2”者为 4/18(22.2%),表达呈“3”者为 9/18(50%)。25 例正常肝组织中有 3 例(12%)表达阳性。前者阳性率显著增高($P=0.028$);而且 c-Met 异常表达率增高与肝细胞癌患者的淋巴浸润、转移、包膜形成、肿瘤分化有关(分别为 $P=0.006$, $P=0.002$, $P=0.002$, $P=0.007$,表 1),而与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤分期无关(分别为 $P=0.717$, $P=0.630$, $P=0.592$, $P=0.270$)。

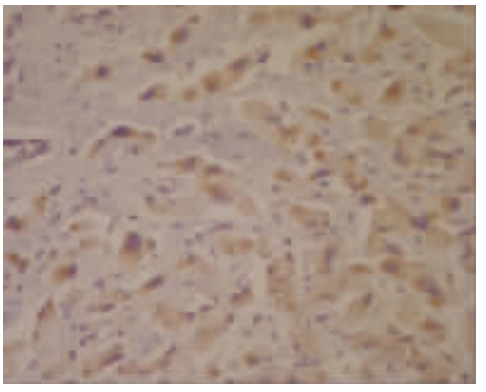


图 1　c-Met 在 HCC 中的表达　(ABC×400)

表 1　c-Met 表达与 HCC 临床病理因素关系

临床病理因素	n	c-Met	
		阴性	阳性
淋巴浸润			
有	5	0	5[a]
无	42	29	13
转移			
有	14	4	10[b]
无	33	25	8
包膜			
有	24	20	4[c]
无	23	9	14
肿瘤分化			
高分化	15	11	4[d]
中分化	24	17	7
低分化	8	1	7

a: $P<0.05$,与无淋巴浸润者比较; b: $P<0.05$,与无转移者比较; c: $P<0.05$,与无包膜者比较; d: $P<0.05$,与中分化、低分化者比较

2.2 MMP-2 在肝细胞癌组织的阳性表达增高

MMP-2 表达主要表现为胞膜呈棕黄色染色(图 2)。MMP-2 在 47 例肝细胞癌组织中有 34 例(72.3%)呈阳性表达(其中"2~3"级异常表达为 28 例),25 例正常肝组织中有 4 例(16%)呈阳性表达,前者显著增高($P<0.001$);而且 MMP-2 异常表达率增高与肝细胞癌患者的包膜形成有关($P=0.028$,表 2),而与性别、年龄、转移、肿瘤大小、淋巴浸润、肿瘤分期无关(分别为 $P=0.748$, $P=0.929$, $P=0.072$, $P=0.276$, $P=0.571$, $P=0.900$)。

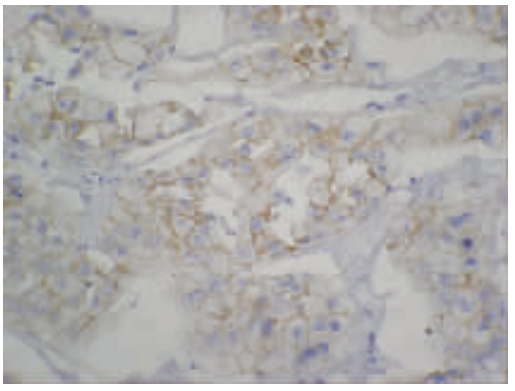


图 2 MMP-2 在 HCC 中的表达 (ABC×400)

表 2 MMP-2、MMP-9 表达与 HCC 临床病理因素关系

临床病理因素	n	MMP-2		MMP-9	
		阴性	阳性	阴性	阳性
转移					
有	14	1	13	1	13
无	33	12	21	4	29
包膜					
有	24	10	14[a]	5	19
无	23	3	20	0	23

a: $P<0.05$,与无包膜比较

2.3 MMP-9 在肝细胞癌组织的阳性表达增高

MMP-9 表达主要表现为胞膜呈棕黄色染色(图 3)。MMP-9 表达在 47 例肝细胞癌组织中有 42 例(89.4%)呈阳性表达(其中"2~3"级异常表达为 34 例)。25 例正常肝组织中有 3 例(12%)呈阳性表达,前者显著增高($P<0.001$);但是 MMP-9 异常表达率增高与肝细胞癌患者的性别、年龄、肿瘤大小、转移、包膜形成、淋巴浸润、肿瘤分期无关(分别为 $P=0.801$, $P=0.529$, $P=0.448$, $P=1.000$, $P=0.050$, $P=0.630$, $P=0.709$)(表 2)。

2.4 c-Met 与 MMP-2、MMP-9 表达的关系

c-Met 阳性表达与 MMP-2、MMP-9 异常表达的关系见表 3(分别为 $P<0.001$, $P=0.315$)。在 18 例 c-Met 阳性表达的标本中,MMP-2 全部呈异常表达(高表达),15 例 MMP-9 呈异常表达(染色程度"1"设定为正常表达,染色程度"2~3"设定为异常表达)。

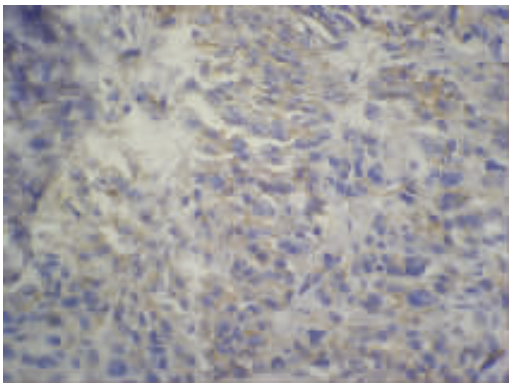


图 3 MMP-9 在 HCC 中的表达 (ABC×400)

表 3 c-Met 与 MMP-2、MMP-9 的表达关系

指标	n	c-Met	
		阴性	阳性
MMP-2			
异常表达	28	10	18[a]
正常表达	19	19	0
MMP-9			
异常表达	34	19	15
正常表达	13	10	3

a: $P<0.05$,与 MMP-2 正常表达比较

3 讨论

目前研究认为可能有 3 种系统与肝细胞癌的侵袭转移有关,除 HGF/Met 外,尚有 u-PA/plasmin 系统和 MMP 系统。三者既可以单独作用,又可相互影响而促进肿瘤的侵袭转移[2]。近年研究证明 HGF、c-Met 在肝癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌等组织中强阳性表达,并与肿瘤的侵袭和转移相关[3,4]。c-Met 蛋白是 HGF 的特异膜受体,c-Met 与 HGF 特异结合后能显著增加肿瘤细胞的运动及侵袭基底膜的能力[5],异常的 HGF/c-Met 系统可能赋予肝癌细胞一种生长优势,在肿瘤的浸润和转移中扮演重要角色[6]。MT1-MMP 是膜型基质金属蛋白酶家族成员,该蛋白酶不仅能激活明胶酶 A(MMP-2),促进其对基底膜成分如Ⅳ型胶原和层黏蛋白的降解,而且自身也能发挥降解细胞外基质的作用。但在 HCC 中,c-Met 的过度表达与 MMP-2、MMP-9 表达是否有关系却少有提及。

本研究表明,HCC 中 c-Met 的阳性表达与正常组织相比有显著差异,MMP-2、MMP-9 和正常组织相比表达均有增高,这些结果提示:c-Met 的过度表达和 MMP-2、MMP-9 表达的增高可能在与 HCC 的转移中有联系。本实验结果显示,c-Met 表达在性别、年龄、肿瘤体积及分期方面无差异,而在淋巴结浸润、转移、包膜的形成、分化方面则显示差异有显著性;MMP-2 的异常表达(高表达)仅在包膜的形成方面显示有差异

($P = 0.028$),而且结果显示 MMP-9 的异常表达在 HCC 包膜的形成方面也有差异的趋向($P = 0.050$),提示包膜的形成预示 HCC 可能有良好的预后,这也与临床实践中 HCC 的预后结果相符,但二者在 HCC 的转移上均未显示出有差异,这和其他报道的实验结果不同,高峰研究认为,MMP-9 与胃癌的淋巴转移、浸润深度有关[7]。另外,有报道 MMP-2、MMP-9 与肝癌组织的病理分级是有关联的[8]。还有研究结果显示,c-Met、MT1-MMP 的表达水平与肝癌包膜浸润、肿瘤远处转移均呈正相关关系[9]。出现这样相互矛盾的结果,可能与肿瘤的种类不同,也有可能是抗体或方法使用的差异所致。

关于 c-Met 与 MMPs 之间的关系,王化丽等[10]研究认为 HGF 通过激活 c-Met,并激活 NFκB 进入细胞核内,通过 NFκB 通路激活 MMP-9,促进细胞侵袭。MMP-9 基因的启动子有可能含 NFκB 结合的位点,活化的 NFκB 入核后启动 MMP-9 基因的表达,进而调节 MMP-9 的转录和翻译,但是应用 PDTC 作用后 MMP-9 mRNA、蛋白和细胞穿膜数量仍高于无 HGF 作用组,推测可能存在除 NFκB 以外的传导途径调节 MMP-9 的变化。Ozaki 等[11]研究了 HGF/c-Met 在人肝细胞癌中对 MMP mRNA 表达的调节以及转录因子 Ets-1 的影响。表明 HGF 经 Ets-1 可以诱导某些 MMPS(MMP-1、MMP-3、MMP-7)和 c-Met 在肝细胞癌中过度表达,与肝细胞癌的发展、侵袭转移有关。既往的研究表明 c-Met 基因的扩增和高表达可使 c-Met 激酶激活,c-Met 激活后又可通过 ras 途径上调尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)的表达促进 MMP-9 的活化[12]。在本研究中,我们仅发现 c-Met 的过度表达与 MMP-2 的表达有关,与 MMP-9 的表达无关。本研究提示 c-Met 与 MMP-2 表达的相关关系可能也涉及上述信号途径。

综上所述,我们认为在 HCC 的转移中,c-Met 可能是通过 HGF/c-Met 影响 MMP-2 的改变来促进癌细胞的扩散进而出现转移,其中涉及的信号通路可能包括 NFκB、ras 途径等多种信号通路。目前以 HGF/c-Met、MMP-2、MMP-9 为靶点针对肝细胞癌复发转移治疗的研究较少,但大量证据已表明 HGF/c-Met、MMP-2、MMP-9 在肝细胞癌转移复发中的作用是不容忽视的,以 HGF/ c-Met 为靶点设计的小分子抑制剂和抗体已经用于临床肿瘤包括肝癌的转移复发治疗[13];MMPs 抑制剂对肿瘤转移有治疗潜能,一种新的 MMPs 抑制剂 BPHA 能有效抑制 MMP-2、MMP-9、MMP-14 ,可能会成为有效的抗肿瘤转移的新药[14]。尽管本研究中 MMP-9 的表达未显示出与 HCC 的转移有关,且与 c-Met 的表达无相关,但它在 HCC 的包膜形成上也显示出相关的趋势($P = 0.050$),有待作进一步的分析。因此,联合这 3 种指标的检测,对于 HCC 的转移、复发防治及预后判断具有一定的临床意义。

参考文献:

[1] McCawley L J, Matrisian L M. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression[J]. Mol Med Today, 2000, 6(4): 149 – 156.

[2] Schoedel K E, Tyner V Z, Kim T H, *et al*. HGF, Met, and matrix-related proteases in hepatocellular carcinoma, fibrolamellar variant, cirrhotic and normal liver[J]. Mod Pathol, 2003, 16(1): 14 – 21.

[3] 谢　斌, 李晓武, 董家鸿. c-met、E-钙黏蛋白、β-连环蛋白在肝细胞癌中的表达及意义[J]. 消化外科, 2006, 5(1): 62 – 66.

[4] 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.

[5] Huh C G, Factor V M, Sanchez A, *et al*. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101 (13): 4477 – 4482.

[6] Christensen J G, Burrows J, Salgia R. c- Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention [J]. Cancer Lett, 2005, 225(1): 1 – 26.

[7] 高　峰, 周文学, 佟柏峰, 等. C-Met 、MMP-9 、TIMP-1 在胃癌中的表达及与胃癌侵袭转移的关系[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2004, 38(3): 259 – 262.

[8] 吕增发, 王　林. MMP-2 和 MMP-9 在肝细胞癌中的表达及其临床意义[J]. 现代实用医学, 2004, 16(12): 704 – 706.

[9] 何　萍, 张雁瑞, 车丽洪, 等. 大小肝癌中相关因子的表达差异及其意义[J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33(2): 77 – 79.

[10] 王化丽, 张淑兰, 鲁艳明, 等. 肝细胞生长因子对卵巢癌细胞侵袭的促进作用及信号转导途径[J]. 癌症, 2006, 25(5): 570 – 575.

[11] Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, *et al*. Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor *via* a transcription factor Ets-1[J]. Hepatol Res, 2003, 27(4): 289 – 301.

[12] Abounader R, Ranganathan S, Lal B, *et al*. Reversion of human glioblastoma malignancy by U1 small nuclear RNA/ribozyme targeting of scatter factor/HGF and c-met expression[J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91(18): 1548 – 1556.

[13] Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, *et al*. Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13(1): 41 – 59.

[14] Maki H, Maekawa R, Yoshida H, *et al*. Antiangiogenic and antitumor effect of BPHA, an orally-active matrix metalloproteinase inhibitor, in *in vivo* murine and human tumor model[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 1999, 26 (11): 1599 – 1606.

(编辑　吴培红)