DOI:10.16016/j.1000-5404.201409109

论著

c-met 和 EGFR 蛋白表达与声门型喉磷癌术后复发的关系

蒋 梅[1],肖 何[1],张志敏[2],陈 川[1],毛必静[1],张 辉[1],李 建[1],肖华亮[3],王 阁[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:肿瘤中心[1],病理科[3];430070 武汉,广州军区武汉总医院肿瘤科[2])

[摘要] **目的** 探讨表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)和肝细胞生长因子受体(mesenchymal-epithelial transition factor,c-Met)在声门型喉鳞癌中的表达及与术后复发之间的关系。**方法** 共纳入66例声门型喉磷癌患者,复发组和未复发组各33例。免疫组化法检测c-Met及EGFR在原发灶组织的表达情况,用H评分法对免疫组化结果进行评估。定义H评分值高于中位值为高表达,相反为低表达。**结果** 在总群体中,c-Met和EGFR的H评分中位值分别为150(0~270)和225(0~270)。单变量Logistic回归分析表明,c-Met或EGFR高表达患者的复发风险显著高于低表达患者($OR=7.111$, $P<0.001$; $OR=5.290$, $P=0.002$)。逐步回归分析表明c-Met或EGFR的高表达均可作为声门型喉癌术后复发的独立危险因素($OR=5.909$, $P=0.002$; $OR=4.231$, $P=0.013$)。ROC曲线分析显示联合检测c-Met和EGFR的表达情况对评估术后复发风险具有良好的预测效能($AUC=0.795$, 95% CI: 0.685~0.905)。**结论** c-Met和EGFR的表达均与声门型喉磷癌术后复发密切相关,可作为术后复发的有效预测指标。

[关键词] 声门型喉鳞癌;肝细胞生长因子受体;表皮生长因子受体;术后复发
[中图法分类号] R181.23;R730.23;R739.65 [文献标志码] A

Relationship between c-met and EGFR expression and postoperative recurrence in glottic laryngeal squamous cell carcinoma

Jiang Mei[1], Xiao He[1], Zhang Zhimin[2], Chen Chuan[1], Mao Bijing[1], Zhang Hui[1], Li Jian[1], Xiao Hualiang[3], Wang Ge[1] ([1]Cancer Center, [3]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, [2]Department of Oncology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan, Hubei, Province, 430070, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the relationship between mesenchymal-epithelial transition factor (c-Met) and epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and postoperative recurrence in glottic laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC). **Methods** Immunohistochemistry accompanied with H scores was utilized to evaluate the expression of c-Met and EGFR in primary focus tissues of 66 patients with glottic LSCC, who were equally divided into a recurrence group and a non-recurrence group. If H scores were greater than the median values, the c-met and EGFR expression was defined as high expression, and conversely, low expression was defined. **Results** The median values of H-scores of c-Met and EGFR were 150 (0 – 270) and 225 (0 – 270), respectively. The univariate logistic regression analysis showed that the recurrence risk was significantly increased in the patients with high expression of c-Met or EGFR compared with the patients with low expression ($OR = 7.111$, $P < 0.001$; $OR = 5.290$, $P = 0.002$). Stepwise regression analysis suggested that high expression of c-Met or EGFR was independent prognostic factor for recurrence after LSCC operation ($OR=5.909$, $P=0.002$; $OR=4.231$, $P=0.013$). ROC curve analysis showed that combined detection of c-Met and EGFR expression had moderate predictive value for postoperative recurrence (AUC = 0.795, 95% CI: 0.685 – 0.905). **Conclusion** The expression levels of c-Met and EGFR are closely

[通信作者] 王 阁,电话:(023)6875717,E-mail:wangge70@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1532.103.html (2014-12-03)

correlated with postoperative recurrence of glottic LSCC, and can be used as indicators for recurrence of glottic LSCC.

[**Key words**] glottic laryngeal squamous cell carcinoma; mesenchymal-epithelial transition factor; epidermal growth factor receptor; postoperative recurrence

Corresponding author: Wang Ge, Tel: 86-23-68757171, E-mail: wangge70@hotmail.com

喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)占全身恶性肿瘤5.7%~7.6%,是常见的头颈肿瘤之一,每年全世界约有2.4%的新发病例[1]。90%的喉癌属于鳞状细胞癌,其中约67%的喉癌为声门型。近几十年,喉癌的5年生存率未得到改善,且有下降趋势[2]。术后复发是治疗失败的主要原因之一,因此寻找一个有效的预测指标准确评估喉癌患者术后的复发风险至关重要。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)和肝细胞生长因子受体(mesenchymal-epithelial transition factor,c-Met)是原癌基因的表达产物,二者的过表达均可在头颈肿瘤中被发现[3]。EGFR的过表达可通过激活下游信号通路导致细胞增殖,凋亡抑制和诱导分化等[4]。EGFR过表达与头颈肿瘤患者的不良预后及无疾病生存时间密切相关[3]。c-Met是肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)的受体,当c-Met被HGF激活后可促进细胞迁移、侵袭和血管生成[5-6]。前期研究发现,c-Met与EGFR可在头颈肿瘤细胞株中呈共表达状态[4],且c-Met的激活与EGFR抑制剂的耐药密切相关[7]。既往研究已经证实c-Met和EGFR的过表达均与头颈肿瘤复发密切相关[3,8-9],但二者与声门型喉鳞癌术后复发的关系暂不明确。因此,本研究采用免疫组化方法分析c-Met和EGFR蛋白在声门型喉鳞癌中的表达情况及与喉癌术后复发的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性分析我院2006年12月至2013年12月经病理诊断证实为声门型鳞状细胞癌患者共66例。若经随访2年以上未出现局部区域复发或远处转移者入组未复发组,在术后2年内经病理证实发生局部区域复发或远处转移者被入组复发组,每组各33例。患者均为男性,中位年龄为60(39~79)岁。临床分期依据AJCC/TNM分期系统(2002年),其中Ⅰ期9例,Ⅱ期30例,Ⅲ期17例,Ⅳ期10例。病理分化等级依据WHO肿瘤组织学分型标准,高分化22例,中分化41例,低分化3例(表1)。排除标准:术前进行放疗或化疗;术前被诊断为远处转移;手术切缘阳性;未进行正规治疗。

1.2 免疫组化方法及评分原则

66例声门型喉鳞癌组织的石蜡标本被连续切片,厚3 μm,用人类c-Met多克隆抗体和EGFR单克隆抗体(均购自中杉金桥生物技术有限公司)进行免疫组化检测。免疫组化(immunohistochemistry,IHC)方法采用即用型快捷免疫组化Max Vision™检测试剂盒(购自福州迈新生物技术开发有限公司)。实验步骤按说明书进行。用已知阳性切片做阳性对照,以PBS代替一抗做阴性对照。所有病理切片由2名经验丰富的病理科医师在没有临床病理资料的情况下进行评分。若结果存在差异则被再次评估,直到达成共识。免疫组化着色强度被分为4级:0(无着色);1(淡黄色);2(黄色);3(棕黄色),然后在5个高倍视野下评估被特异性着色的细胞百分比(0%~100%)。c-Met的阳性表达被定义为超过30%的细胞被着色为黄色或棕黄色[10],EGFR的阳性表达被定义为超过10%的细胞被特异性着色[11]。H评分值为着色强度与细胞阳性率乘积(范围0~300)[11]。

1.3 统计学分析

应用SPSS 16.0软件统计分析。组间免疫组化H评分采用Kruskal-Wallis检验。单因素及逐步Logistic回归分析临床病理因素、c-Met蛋白表达和EGFR蛋白表达与声门型喉鳞癌术后复发的相关性。ROC曲线分析联合检测EGFR和c-Met蛋白表达对复发的预测效能。均为双侧检验。

2 结果

2.1 c-met和EGFR在声门型喉鳞癌组织中的表达

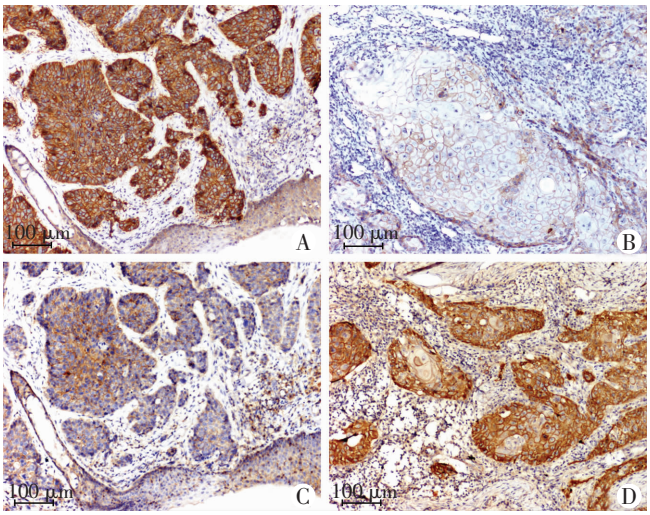
结果显示,c-Met及EGFR的阳性表达部位主要是细胞膜,部分有细胞质着色(图1),二者的IHC阳性表达率分别为68.2%和90.9%。c-Met在复发组的H评分中位值显著高于未复发组(中位值:240 *vs* 210, $\chi^2=12.79$, $P=0.001$)。同样,复发组中EGFR的中位值也显著高于未复发组(中位值:180 *vs* 120, $\chi^2=10.436$, $P<0.001$)。

2.2 c-Met和EGFR表达与声门型喉鳞癌术后复发的关系

66例患者的c-Met和EGFR的H评分中位值分

别为 150（0～270）和 225（0～270）。c-Met 或 EGFR 的 H 评分值若高于中位值被定义为高表达，相反为低表达。单变量 Logistic 回归分析表明，c-Met 高表达或 EGFR 高表达患者的复发风险均显著增加（*OR* = 7.111，*P* < 0.001；*OR* = 5.290，*P* = 0.002）。临床病理因素（如：年龄、T 分期、N 分期、临床分期、分化程度、吸烟及饮酒等）与复发无显著相关性（表 1）。以全部基线病理特征、c-Met 蛋白表达及 EGFR 蛋白表达作为候选变量，逐步回归建立的初步主效应模型表明，c-Met高表达和 EGFR 高表达均是声门型喉磷癌术后复发的独立危险因素（*OR* = 5.909，*P* = 0.002；*OR* = 4.231，*P* = 0.013，表 2）。

另外，将 EGFR 和 c-Met 同时低于中位值定义为低风险组，两个指标均高于中位值为高风险组。高风险组的复发风险是低风险组的 25.0 倍（*OR* = 25.000，95% *CI*：4.93～126.7）。用初步主效应模型计算得到的复发预测概率值绘制 ROC 曲线，曲线下面积为 0.795，提示联合检测 EGFR 和 c-Met 的表达情况对评估声门型喉磷癌术后复发具有中等预测效能（图 2）。



A：EGFR 高表达；B：EGFR 低表达；C：c-Met 低表达；D：c-Met 高表达

图 1　IHC 染色观察 c-Met 和 EGFR 在声门型喉磷癌组织中的表达

表 1　单因素 Logistic 回归分析声门型喉鳞癌术后复发的影响因素［例（%）］

临床特征	未复发组（*n* = 33）	复发组（*n* = 33）	*OR*（95% *CI*）	*P*
年龄（岁）				
≤60	19（54.3）	16（45.7）	1	
>60	14（45.2）	17（54.8）	1.034（0.976～1.094）	0.255
吸烟史				
是	29（52.7）	26（47.3）	1	
否	4（36.4）	7（63.6）	1.952（0.512～7.437）	0.327
饮酒史				
是	23（50.0）	23（50.0）	1	
否	10（50.0）	10（50.0）	1.000（0.350～2.857）	1.000
T 分期				
T1～T2	21（47.7）	23（52.3）	1	
T3～T4	12（54.5）	10（45.5）	0.761（0.273～2.124）	0.602
N 分期				
N0	32（52.5）	29（47.5）	1	
N1～N2	1（20.0）	4（80.0）	4.414（0.466～41.801）	0.196
临床分期				
Ⅰ～Ⅱ	19（48.7）	20（51.3）	1	
Ⅲ～Ⅳ	14（51.9）	13（48.1）	0.882（0.330～2.355）	0.802
分化程度				
低分化	2（66.7）	1（33.3）	1	
中分化	22（53.7）	19（46.3）	1.727（0.145～20.578）	0.665
高分化	9（40.9）	13（59.1）	2.889（0.226～36.868）	0.414
EGFR				
低表达（<225）	23（69.7）	10（30.3）	1	
高表达（≥225）	10（30.3）	23（69.7）	5.290（1.851～15.116）	0.002
c-Met				
低表达（<150）	24（72.7）	9（27.3）	1	
高表达（≥150）	9（27.3）	24（72.7）	7.111（2.407～21.011）	<0.001

表2 逐步 Logistic 回归分析 c-Met 和 EGFR 蛋白表达与声门型喉鳞癌术后复发的关系

变量	回归系数 β	标准误	Wald 统计量	*P*	*OR*	95% *CI*
EGFR 高表达与低表达	1.442	0.582	6.132	0.013	4.231	1.351～13.250
c-Met 高表达与低表达	1.776	0.582	9.302	0.002	5.909	1.887～18.506

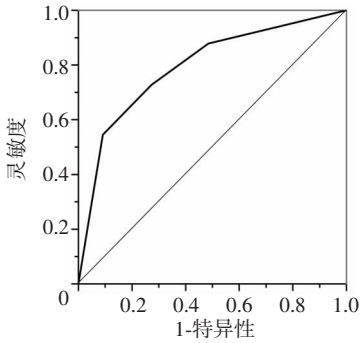


图2 联合检测 c-Met 和 EGFR 表达对术后复发预测作用的 ROC 曲线分析

3 讨论

头颈肿瘤具有解剖学多样化及分子生物学机制各不同的特点,这些异质性均可降低预测因子的特异性[12]。喉癌与其他头颈肿瘤的主要区别为男女比例较高及5年生存率在近30年未得到改善[2]。喉癌的5年生存率为73%左右,其中近1/5的患者会在术后2年内发生复发,且复发患者的5年生存率将低于50%[13]。本研究显示,c-Met 和 EGFR 蛋白表达高低对声门型喉鳞癌术后复发具有预测价值。

EGFR 是一个相对分子质量为 170×10^3 的跨膜蛋白,位于染色体7p12。EGFR 与配体结合形成二聚体使细胞内酪氨酸激酶领域被激活,导致细胞增殖、凋亡抑制和血管生成等作用[4]。超过90%的头颈鳞癌会出现 EGFR 的过表达[3]。目前,EGFR 的靶向药物(如:西妥昔单抗)已被美国 FDA 批准用于头颈肿瘤治疗[14]。随机临床试验证实西妥昔单抗联合放疗可改善头颈肿瘤的局部控制率,降低患者的死亡率[15]。Wei 等[16]的研究显示,EGFR 在喉鳞癌中的过表达率为87.5%。已有大量研究报道,EGFR 的表达水平可作为喉癌局部复发、无疾病生存期及总生存期的独立预测因子[17-18]。本研究结果再次证实 EGFR 高表达的声门型喉鳞癌患者术后复发风险显著增加。

HGF 是一个由间充质细胞旁分泌作用于上皮细胞、相对分子质量为 100×10^3 的肝素结合型多肽。c-Met 作为 HGF 受体,主要表达于上皮细胞,包括内分泌细胞、肝细胞、纤维细胞、角质细胞和黑色素细胞等,具有促进细胞迁移、侵袭和血管生成等作用[19]。在大多数实体肿瘤中均可发现 c-Met 的阳性表达[20]。前期研究发现,c-Met 可作为肺癌、肾癌、肝癌、胃癌、乳腺癌及头颈鳞癌等肿瘤的预后指标[21]。Kim 等[10]的研究发现 c-Met 表达与口腔癌的淋巴结转移、病理分级和疾病复发密切相关,且 c-Met 为阳性表达的患者有更高的复发风险。但在声门型喉鳞癌中,关于 c-Met 蛋白表达与术后复发关系的研究鲜见报道。本研究显示,c-Met 表达高低对声门型喉鳞癌术后复发同样具有预测价值,且预测作用优于 EGFR。

体外试验发现,c-Met 与 EGFR 可共表达于头颈肿瘤细胞株中[4]。c-Met 和 EGFR 的激活可相互协同,且 c-Met 可在 HGF 缺失的情况下被 EGFR 激活[22]。当 c-Met 和 EGFR 被活化后均可使 PI3K/AKT 和 RAS/MAPK 等下游信号通路被激活,导致肿瘤的进展[4]。国内外的既往研究认为,c-Met 和 EGFR 是喉癌发生、发展中的重要因子[17,10,23-24],但二者联合检测对声门型喉鳞癌术后复发的预测作用的相关研究鲜见报道。本研究显示,联合检测 c-Met 和 EGFR 在声门型喉磷癌组织中的表达情况对评估术后复发具有良好的的预测价值,且优于单一指标的作用。

综上所述,本研究证实 c-Met 和 EGFR 的表达高低对声门型喉鳞癌患者的术后复发均具有预测作用,且 c-Met 的预测价值优于 EGFR。因此,检测 c-Met 和 EGFR 在声门型喉磷癌组织中的表达情况,可有效评估术后复发风险,并为患者尽早选择恰当的个体化治疗方案提供依据。

参考文献:

[1] Lin H W, Bhattacharyya N. Staging and survival analysis for nonsquamous cell carcinomas of the larynx[J]. Laryngoscope, 2008, 118(6): 1003-1013.

[2] Hoffman H T, Porter K, Karnell L H, *et al*. Laryngeal cancer in the United States: changes in demographics, patterns of care, and survival[J]. Laryngoscope, 2006, 116(9 Pt 2 Suppl 111): 1-13.

[3] Chau N G, Perez-Ordonez B, Zhang K, *et al*. The association between EGFR variant III, HPV, p16, c-MET, EGFR gene copy number and response to EGFR inhibitors in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the

head and neck[J]. Head Neck Oncol, 2011, 3: 11.

[4] Xu H, Stabile L P, Gubish C T, *et al*. Dual blockade of EGFR and c-Met abrogates redundant signaling and proliferation in head and neck carcinoma cells[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(13): 4425-4438.

[5] Zhao D, Wang S H, Feng Y, *et al*. Intratumoral c-Met expression is associated with vascular endothelial growth factor C expression, lymphangiogenesis, and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: implications for use as a prognostic marker[J]. Hum Pathol, 2011, 42(10): 1514-1523.

[6] Seiwert T Y, Jagadeeswaran R, Faoro L, *et al*. The MET receptor tyrosine kinase is a potential novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2009, 69(7): 3021-3031.

[7] Stabile L P, He G, Lui V W, *et al*. c-Src activation mediates erlotinib resistance in head and neck cancer by stimulating c-Met[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(2): 380-392.

[8] Young R J, Rischin D, Fisher R, *et al*. Relationship between epidermal growth factor receptor status, p16(INK4A), and outcome in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011, 20(6): 1230-1237.

[9] Baschnagel A M, Williams L, Hanna A, *et al*. c-Met expression is a marker of poor prognosis in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma treated with chemoradiation[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2014, 88(3): 701-707.

[10] Kim C H, Koh Y W, Han J H, *et al*. c-Met expression as an indicator of survival outcome n patients with oral tongue carcinoma[J]. Head Neck, 2010, 32(12): 1655-1664.

[11] Mazieres J, Brugger W, Cappuzzo F, *et al*. Evaluation of EGFR protein expression by immunohistochemistry using H-score and the magnification rule: re-analysis of the SATURN study[J]. Lung Cancer, 2013, 82(2): 231-237.

[12] Keren S, Shoude Z, Lu Z, *et al*. Role of EGFR as a prognostic factor for survival in head and neck cancer: a meta-analysis[J]. Tumour Biol, 2014, 35(3): 2285-2295.

[13] Ritoe S C, Verbeek A L, Krabbe P F, *et al*. Screening for local and regional cancer recurrence in patients curatively treated for laryngeal cancer: definition of a high-risk group and estimation of the lead time[J]. Head Neck, 2007, 29(5): 431-438.

[14] Dorsey K, Agulnik M. Promising new molecular targeted therapies in head and neck cancer[J]. Drugs, 2013, 73(4): 315-325.

[15] Bonner J A, Harari P M, Giralt J, *et al*. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck[J]. N Engl J Med, 2006, 354(6): 567-578.

[16] Wei Q, Sheng L, Shui Y, *et al*. EGFR, HER2, and HER3 expression in laryngeal primary tumors and corresponding metastases[J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15(4): 1193-1201.

[17] Farhadieh R D, Salardini A, Rees C G, *et al*. Protein expression of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma index tumors correlates with diagnosis of second primary tumors of the upper aero-digestive tract[J]. Ann Surg Oncol, 2009, 16(10): 2888-2894.

[18] Almadori G, Bussu F, Gessi M, *et al*. Prognostic significance and clinical relevance of the expression of the HER family of type I receptor tyrosine kinases in human laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(6): 1144-1152.

[19] Jiang W G, Martin T A, Parr C, *et al*. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2005, 53(1): 35-69.

[20] Eder J P, Vande-Woude G F, Boerner S A, *et al*. Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(7): 2207-2214.

[21] Maroun C R, Rowlands T. The Met receptor tyrosine kinase: a key player in oncogenesis and drug resistance[J]. Pharmacol Ther, 2014, 142(3): 316-338.

[22] Puri N, Salgia R. Synergism of EGFR and c-Met pathways, cross-talk and inhibition, in non-small cell lung cancer[J]. J Carcinog, 2008, 7: 9.

[23] 张世文, 何晓光, 李晓江, 等. 表皮生长因子受体在喉癌组织不同部位中的表达及与分化的关系[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2012, 26(3): 123-124, 128.

[24] 孙旭, 娄卫华. 氧诱导因子-1α和肝细胞生长因子受体在喉鳞癌中的表达及其与微血管密度的关系[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(16): 2675-2677.

(**收稿**:2014-09-16;**修回**:2014-10-10)

(编辑 汪勤俭)