

- 8 Hubbard VM, Eng JM, Ramirez - Montagut T, *et al.* Absence of inducible costimulator on alloreactive T cells reduces graft versus host disease and induces Th2 deviation [J]. *Blood*, 2005, 106 (9) : 3285 - 3292
- 9 Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, *et al.* High donor FOXP3 - positive regulatory T - cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA - matched allogeneic SCT [J]. *Blood*, 2006, 108 (4) : 1291 - 1297
- 10 Liang Y, Liu C, Dieu JY, *et al.* Beta2 integrins separate graft - versus - host disease and graft - versus - leukemia effects [J]. *Blood*, 2008, 111 (2) : 954 - 962
- 11 Matte CC, Cormier J, Anderson BE, *et al.* Graft - versus - leukemia in a retrovirally induced murine CML model: mechanisms of T - cell killing [J]. *Blood*, 2004, 103 (11) : 4353 - 4361
- 12 Prinz L, Koenecke C. Therapeutic potential of induced and natural FoxP3 (+) regulatory T cells for the treatment of graft - versus - host disease [J]. *Arch Immunli Ter Exp (warsz)*, 2012, 60 (3) : 183 - 190
- 13 Kim J, Park K, Kim HJ, *et al.* Breaking of CD8 + T cell tolerance through in vivo ligation of CD40 results in inhibition of chronic graft - versus - host disease and complete donor cell engraftment. [J]. *Immunol*, 2008, 181 (10) : 7380 - 7389
- 14 Ilan Y, Margalit M, Ohana M, *et al.* Alleviation of chronic GVHD in mice by oral immunoregulation toward recipient pretransplant splenocytes does not jeopardize the graft versus leukemia effect [J]. *Hum Immunol*, 2005, 66 (3) : 231 - 240 (收稿日期: 2012 - 12 - 25) (修回日期: 2013 - 01 - 05)

c - Met 在子宫内膜腺癌中的作用

庄晓苹 林琼琼 金纬纬 董 迎

摘 要 目的 研究 c - Met 在子宫内膜腺癌中的表达及其与临床病理参数的关系。方法 采用免疫组化和实时荧光定量 PCR 方法分别检测 60 例子宫内膜腺癌组织和 20 例正常子宫内膜组织中 c - Met 蛋白和 c - Met mRNA 的表达。结果 c - Met 蛋白的表达与子宫内膜腺癌的组织学分级以及肌层浸润深度有关 ($P < 0.05$), 与年龄、绝经、临床分期、淋巴结转移无关 ($P > 0.05$)。c - Met mRNA 在癌组织中的表达量明显高于其在正常子宫内膜组织中的表达量, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 并且与子宫内膜腺癌组织的分化程度有关 ($P = 0.017$)。结论 c - Met 的高表达在子宫内膜腺癌的发生发展中起重要作用。

关键词 c - Met 子宫内膜腺癌 免疫组化 实时荧光定量 PCR

Role of c - Met in Adenocarcinoma of Endometrium. Zhuang Xiaoping, Lin Qiongqiog, Jin Weiwei, Dong Ying. Department of Pathology, Wenzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To study the expression of c - Met in endometrial adenocarcinoma (EC) and its relationship with clinical pathological parameters. **Methods** The expression of c - Met protein and c - Met mRNA were detected in 60 endometrial adenocarcinoma tissues and 20 normal endometrium tissues by immunohistochemistry and real - time quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction (QRT - PCR) respectively. **Results** In endometrial adenocarcinoma, the expression of c - Met protein was correlated with histological grade and invasion of deep muscular layer ($P < 0.05$), but not with age, pausimonia, clinical stage and lymph node metastasis ($P > 0.05$). The positive expression of c - Met mRNA in endometrial adenocarcinoma was higher than that in normal endometrium tissues, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Moreover, it was correlated with differentiation of endometrial adenocarcinoma ($P = 0.017$). **Conclusion** The high expression of c - Met plays an important role in the occurrence and development of endometrial adenocarcinoma.

Key words c - Met; Endometrioid adenocarcinoma; Immunohistochemistry; Real - time quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction (QRT - PCR)

c - Met 是一种由 c - Met 原癌基因编码的蛋白产物, 作为肝细胞生长因子受体 (HGF), c - Met 具有酪氨酸激酶活性, 对多种细胞的信息转导、细胞增殖

分化和运动等有调控作用, 并在多种恶性肿瘤中过表达, 与肿瘤的发生、发展、侵袭和血管形成密切相关^[1]。但国内关于 c - Met 在子宫内膜腺癌中表达的研究不多, 本研究通过免疫组织化学和实时荧光定量 PCR 法检测子宫内膜腺癌组织和正常子宫内膜组织中 c - Met 蛋白和 c - Met mRNA 的表达, 进而探讨 c - Met 的表达与子宫内膜腺癌临床病理特

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2010KYA175)

作者单位: 325000 温州市中西医结合医院病理科

通讯作者: 庄晓苹, 电子信箱: tingyuxuan56@126.com

征的关系,为临床早期诊断、治疗、判断预后提供新的思路。

材料与方法

1. 对象:搜集 2005 年 1 月~2006 年 12 月间存档的石蜡组织 60 例子宫内膜腺癌组织、20 例正常子宫内膜组织,用于石蜡组织提取 RNA。同时收集 2010 年 3 月~2011 年 10 月间在因“子宫内膜腺癌”行手术的 15 例子宫内膜腺癌组织新鲜标本、因“子宫肌瘤”行子宫全切术 10 例正常子宫内膜组织。手术切除的新鲜组织以冻存管分装后立即置入液氮罐中,后转入-80℃冰箱保存。新鲜标本用于与石蜡组织提取 RNA 的对照。所有石蜡病例均有完整的临床病理资料。60 例子宫内膜腺癌组织石蜡组织病例按 2000 年国际妇产科联盟手术病理分期标准(FIGO)进行手术分期和病理分级:病理分级为 G₁ 级 15 例,G₂ 级 30 例,G₃ 级 15 例;临床分期为 I 期 28 例,II 期 14 例,III 期 18 例。无肌层浸润或肌层浸润深度≤1/2 者 36 例,肌层浸润深度>1/2 者 24 例;无淋巴结转移者 47 例,有转移者 13 例。

2. 检测试剂:c-Met 兔多克隆抗体、免疫组化试剂盒、pv-600t 通用型二步法检测试剂盒均购自北京中杉金桥生物有限公司;Total 试剂购自 Invitrogen 公司;石蜡组织 RNA 分离和扩增试剂盒购自 Ambion 公司;引物设计与合成由上海生工生物工程有限公司合成。ABI7500 型荧光定量 PCR 仪。

3. 检测方法:(1)免疫组化:石蜡标本均以厚度 4μm 连续切片后,然后进行免疫组化染色:脱蜡,依次浸泡于不同浓度乙醇中,蒸馏水洗涤 2 次;3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶 20min,蒸馏水冲洗 2 次,PBS 液浸泡 5min×3 次;高压锅抗原修复:用 0.01mmol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH6.0)作为抗原修复液,高压锅加帽出气后 2min,快速冷却;PBS 浸泡 5min×3 次;滴加适当稀释的一抗 c-Met(即用型),4℃ 孵育过夜,PBS 浸泡 5min×3 次;滴加二抗,37℃ 孵育 30min,PBS 浸泡 5min×3 次;应用 DAB 显色;自来水充分冲洗,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。PBS 代替一抗作为阴性对照,用已知 c-Met 蛋白阳性表达的乳腺癌切片作阳性对照。(2)石蜡组织 RNA 的提取:①石蜡组织样本脱蜡:将二甲苯加入切片中,室温孵育 10min,颠倒混匀,使石蜡充分溶解。无水乙醇洗涤 2 遍,去掉残余的二甲苯,干燥片状沉淀物;②石蜡组织样本 RNA 提取及纯化:按照 RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE 试剂盒说明操作提取总 RNA;③RNA 溶解:纯化后的 RNA 用 60U/L elution 溶解,分装 20μl 用于检测 RNA 质量和反转录,其余-80℃ 保存备用。(3)实时荧光定量 PCR 检测石蜡组织中 c-Met 表达量:引物:c-Met(212bp):上游 5'-CAGGCAGTGCAGCATGTAGT-3';下游 5'-GATGATTCCCTCGGTCAGAA-3';GAPDH(314bp):上游 5'-GGTCCGAGTCAACGGATTTC-3';下游 5'-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'。反应在 25μl 的体系中进行,其中 2×QuantiTect SYBR Green PCR12.5μl、10μmol/L 的上下游引物各 1μl、样本 cDNA 2μl(300ng)、RNA 酶灭活水

8.5μl。热循环如下:94℃、5min;94℃、30s,57℃、30s,72℃、60s,40 个循环;72℃、10min。

4. 结果判定:(1)免疫组化 c-Met 蛋白表达部位:细胞质或胞膜。阴性:细胞质或胞膜不着色;弱阳性:细胞质或胞膜淡棕色颗粒;阳性:细胞质或胞膜棕黄色颗粒;强阳性:细胞质或胞膜深棕黄色颗粒棕。切片在光镜下测量采用高倍镜选取子宫内膜腺癌组织、正常子宫内膜组织,进行数码拍照(统一焦距及光强),在所需区域随机拍摄 5 个高倍视野,用 Image pro plus 6.0 图像分析软件分析,准确分割阳性区域后,测量累积光密度总和(IOD sum),以及阳性区域面积总和(area sum),二者之商(IOD sum/area sum),即为单位面积平均光密度(OD)值,最后再以同一切片 5 个视野的平均光密度的均数作为该切片所代表样本 c-Met 蛋白表达强度。(2)实时荧光定量 PCR 检测石蜡包埋组织中 c-Met mRNA 表达量:选择适宜的基线,各荧光曲线与基线的交叉点即为 Ct 值,同一基线下 Ct 值越小,其荧光信号也就最先到达某阈值而被检测到,表明其基因拷贝数越多。应用 2^{-ΔΔCt} 法分析目的基因和内参基因的 Ct 值,以 GAPDH 作为内参基因,正常子宫内膜组织作为对照组,C-Met 相对表达量公式计算: folds = 2^{-ΔΔCt} 其中 ΔΔCt = (Ct 目的基因 - Ct 内参照基因)_{研究组} - (Ct 目的基因 - Ct 内参照基因)_{对照组},通过计算子宫内膜组织中 c-Met mRNA 相对于正常子宫内膜组织的表达性差异^[2]。

5. 统计学方法:采用 SPSS 15.0 软件分析数据,计量资料统计描述用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. c-Met 蛋白在子宫内膜腺癌组织和正常子宫内膜组织中的表达:c-Met 蛋白在子宫内膜腺癌组织、正常子宫内膜组织细胞胞质或胞膜中呈不同程度阳性表达。子宫内膜腺癌组织强阳性或阳性表达,正常子宫内膜组织阴性或弱阳性表达。在子宫内膜腺癌组织和正常子宫内膜组织之间,c-Met 蛋白表达差异有统计学意义(P=0.013)(表 1)。

表 1 c-Met 蛋白在子宫内膜癌和正常子宫内膜组织中表达情况

组别	n	OD 值	P
子宫内膜腺癌组	60	0.835 ± 0.298	0.013
正常子宫内膜组	20	0.263 ± 0.168	

2. 实时荧光定量 PCR 检测石蜡包埋组织中 c-Met mRNA 表达量的可靠性:石蜡组织子宫内膜腺癌组织与配对新鲜组织提取的所有 RNA 的 A260/A280 为 1.75~1.95,两组样本间的差异无统计学意义(P>0.05)。石蜡组织子宫内膜腺癌组织中 ΔCT_{C-Met} = 5.36 ± 1.15,相应新鲜组织中 ΔCT_{C-Met} =

5.25 ± 1.03 (图 1A), GAPDH RNA 在两种处理组织中的表达亦具有相关性 (图 1B)。

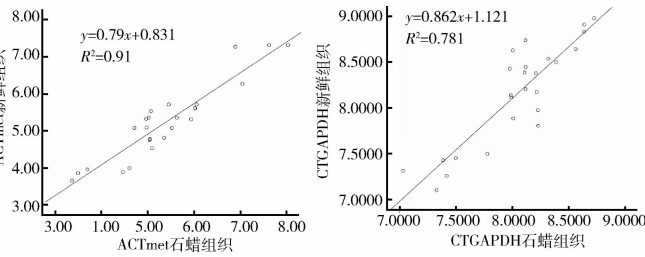


图 1 石蜡组织子宫内膜腺癌组织与配对新鲜组织提取的总 RNA 中 c - Met 表达量的比较

A. 石蜡组织子宫内膜腺癌组织与配对新鲜组织 c - Met 的 ΔCt 值的比较; B. 石蜡组织子宫内膜腺癌组织与配对新鲜组织 GAPDH 的 ΔCt 值的比较

3. c - Met mRNA 在子宫内膜腺癌和正常子宫内膜组织中的表达: 子宫内膜腺癌组织和正常子宫内膜组织中 C - Met mRNA 相对表达量分别为 3.94 ± 1.88 、 0.672 ± 0.098 , C - Met 相对表达量符合正态分布 ($P > 0.05$), 子宫内膜腺癌组织明显高于正常子宫内膜组织, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

4. c - Met 表达与子宫内膜腺癌组织临床病理特征的关系: c - Met 在中分化和低分化子宫内膜腺癌中的表达明显高于其在高分化子宫内膜腺癌中的表达 (图 2A、B), 差异有统计学意义 ($P = 0.003$), c - Met 蛋白的表达还与肌层浸润深度有关 ($P = 0.018$) (图 2C、D), 但与年龄、绝经、临床分期、淋巴结转移无关 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 c - Met 蛋白和 c - Met mRNA 表达与子宫内膜腺癌组织临床病理特征的关系

临床特征	n	c - Met 蛋白表达			c - Met mRNA 表达		
		$\bar{x} \pm s$	t	P	$\bar{x} \pm s$	t	P
年龄 (岁)							
< 50	38	0.676 ± 0.284	0.486	0.345	3.457 ± 0.736	1.542	0.417
≥ 50	22	0.716 ± 0.133			3.787 ± 0.624		
绝经							
有	15	0.781 ± 0.131	0.062	0.915	3.639 ± 0.924	1.003	0.321
无	45	0.806 ± 0.173			3.411 ± 0.689		
临床分期							
I ~ II	42	0.878 ± 0.324	1.492	0.144	3.698 ± 0.892	1.361	0.180
III	18	0.751 ± 0.212			3.397 ± 0.664		
肌层浸润深度							
< 1/2	36	0.602 ± 0.285	2.467	0.018	3.546 ± 0.841	0.697	0.489
≥ 1/2	24	0.815 ± 0.240			3.397 ± 0.665		
病理分级							
G ₁	15	0.567 ± 0.270	3.143	0.003	3.323 ± 0.629	2.484	0.017
G ₂ 、G ₃	45	0.845 ± 0.256			3.852 ± 0.841		
淋巴结转移							
有	13	0.781 ± 0.244	1.198	0.238	3.615 ± 0.788	1.059	0.295
无	47	0.676 ± 0.288			3.397 ± 0.665		

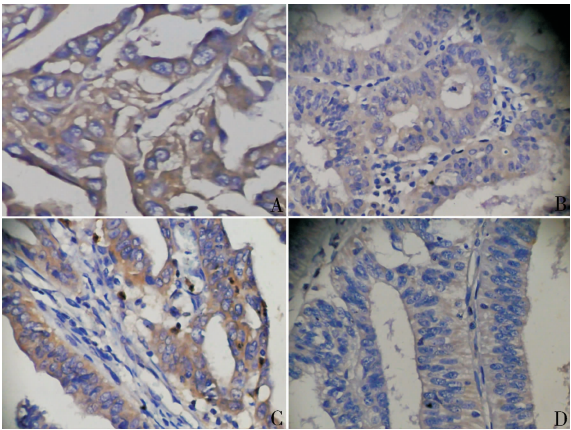


图 2 子宫内膜腺癌 c - Met 蛋白表达 (Envision, × 200)

A. 中、低分化腺癌 c - Met 蛋白强阳性表达; B. 高分化腺癌 c - Met 蛋白阳性表达; C 癌肌层浸润深度 ≥ 1/2 c - Met 蛋白强阳性表达; D 癌肌层浸润深度 < 1/2 c - Met 蛋白阳性表达

讨 论

c - Met 原癌基因编码蛋白为肝细胞生长因子的特异性细胞膜受体, c - Met 基因位于染色体 7q21 ~ 31。c - Met 受体由 50kDa 的 α 亚基在细胞外通过二硫键与 145kDa 的 β 跨膜亚基联结形成异二聚体, 具有自身磷酸化活性的跨膜受体。肝细胞生长因子具有刺激或抑制细胞增殖、并诱导细胞的能动性, 但肝细胞生长因子与其受体 c - Met 蛋白相结合后激活受体发生自身磷酸化, 导致 HGF/c - Met 信号转导途径的异常激活, 从而参与调节细胞增殖、分化、抗凋亡^[3]。肿瘤细胞中 c - Met 的过度表达, 导致其对受体肝细胞生长因子的敏感性增强, 而肝细胞生长因子能破坏肿瘤细胞之间的连接, 使细胞间黏附性减弱, 促进刺激肿瘤细胞的迁移和转移。相关研究表明, c - Met

过表达与恶性肿瘤的侵袭及转移密切相关^[4-6]。

以往 c-Met 在肿瘤方面的研究多采用免疫组化或 RT-PCR 方法,而实时荧光定量 PCR 法具有操作简便、速度快,灵敏度高、重复性好、定量准确的特点,使得结果判断更客观、更真实^[7]。目前国内尚没有该方法检测 c-Met 在子宫内膜腺癌中的表达的报道。传统 PCR 研究多从新鲜组织中提取 mRNA 用于检测分析,这是因为石蜡组织样本中的 RNA 受到固定、甲醛浓度、标本保存时间和条件等多因素影响,严重降解。本研究利用石蜡组织 RNA 分离和扩增试剂盒从石蜡组织提取 RNA 并扩增,比较从新鲜子宫内膜腺癌组织中提取 RNA 并扩增,研究结果表明两者存在强相关性 $R^2 = 0.918 (P < 0.01)$ 。所以实时荧光定量 PCR 检测石蜡组织中 c-Met mRNA 表达量的方法是可行的。利用石蜡组织 RNA 分离和扩增试剂盒,扩展了石蜡提取 RNA 在分子生物学中的应用范围,可以开展石蜡组织的存档组织用于 mRNAs 相关的回顾性研究。

国外学者研究证实多数恶性肿瘤存在 c-Met 的过表达,而且恶性程度与其表达呈正相关^[8]。国内研究人员采用免疫组化方法检测食管鳞状细胞癌及配对的癌旁组织中 c-Met 的表达,发现其与食管鳞状细胞癌患者的肿瘤浸润深度、淋巴结转移及临床病理分期存在显著相关性^[9]。本研究运用免疫组化法和荧光定量 PCR 检测 60 例子宫内膜腺癌组织和 20 例正常子宫内膜组织中 c-Met 蛋白和 mRNA 的表达,发现两者在癌组织中的表达均明显高于正常子宫内膜组织,而且病理分化程度愈低,两者的表达愈高,这提示 c-Met 在促分化、形态发生中起重要作用。此外,免疫组化的结果也提示,随着肿瘤肌层浸润的深入,c-Met 蛋白表达也相应增加。因此,c-Met 在子宫内膜腺癌组织从基因到蛋白的过表达,证明其参与子宫内膜腺癌的发生、发展过程,其表达强度反映肿瘤的恶性程度和浸润深度,可作为判断子宫内膜腺癌发生、发展及评估预后的指标。有些研究发现 HGF/c-Met 系统可能通过影响细胞黏附因子、细胞外基质的降解酶表达和增强肿瘤细胞侵袭性,诱导新生血管生成等参与肿瘤转移^[10-12]。本研究结果表明,c-Met 与临床分期晚、有淋巴结转移患者的癌组织有关联,可能因为部分子宫内膜腺癌患者未做淋巴结清扫,导致淋巴转移例数较少,研究样本数量有限,无法做出修正统计有关。c-Met 表达与淋巴结转移的关系有待于扩大样本量后进一步研究。

综上所述,c-Met 高表达是子宫内膜腺癌组织的发生发展、侵袭、进展重要参数。c-Met 在子宫内膜腺癌的恶性程度判断、浸润深度的监测中具有重要意义。由于 HGF/c-Met 信号通路与子宫内膜腺癌组织的发生、发展有密切相关,针对该通路的抗肿瘤治疗已成为肿瘤研究的一个热点,c-Met 具有潜在的临床应用价值,以 c-Met 为靶分子的基因治疗可能是今后子宫内膜腺癌治疗的手段之一。

参考文献

- 1 Liu X, Newton RC, Scherle PA, *et al.* Developing c-MET pathway inhibitors for cancer therapy: progress and challenges [J]. Trends Mol Med, 2010, 16(1):37-45
- 2 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4):402-408
- 3 Chen CC, Hou MF, Wang JY, *et al.* Simultaneous detection of multiple mRNA markers CK19, CEA, c-Met, Her2/neu and Hmab with membrane array, an innovative technique with a great potential for breast cancer diagnosis [J]. Cancer Lett, 2006, 240(2):279-288
- 4 Zeng ZS, Weiser MR, Kuntz E, *et al.* c-Met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases [J]. Cancer Lett, 2008, 265(2):258-269
- 5 Miyamoto M, Ojima H, Iwasaki M, *et al.* Prognostic significance of over expression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma [J]. Br J Cancer, 2011, 105(1):131-138
- 6 Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, *et al.* Functional expression and mutations of C-met and its therapeutic inhibition with SUI 1274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Res, 2005, 65(4):1479-1488
- 7 Kahn HJ, Yang LY, Blondal J, *et al.* RT-PCR amplification of CK19 mRNA in the blood of breast cancer patients: correlation with established prognostic parameters [J]. Breast Cancer Res Treat, 2000, 60(2):143-151
- 8 刘增进,综述,夏祥国,等. 肝细胞生长因子及其受体在肿瘤中的研究进展 [J]. 医学信息手术学分册, 2007, 20(11):1015-1018
- 9 刘春涛,朱圣韬,田月等. c-Met 在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其与临床病理的相关性 [J]. 首都医科大学学报, 2012, 33(2):223-226
- 10 Crouch S, Spidel CS, Lindsey JS. HGF and ligation of alphavbeta5 integrin induce a novel, cancer cell-specific gene expression required for cell scattering [J]. Exp Cell Res, 2004, 292(2):274-287
- 11 Park YH, Ryu HS, Choi DS, *et al.* Effects of hepatocyte growth factor on the expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors during the endometrial cancer invasion in a three-dimensional coculture [J]. Int J Gynecol Cancer, 2003, 13(1):53-60
- 12 Sengupta S, Kiziltepe T, Sasisekharan R. A dual-color fluorescence imaging-based system for the dissection of antiangiogenic and chemotherapeutic activity of molecules [J]. FASEB J, 2004, 18(13):1565-1567

(收稿日期:2012-11-30)

(修回日期:2012-12-12)