

乳腺癌中 SyK、HGF 表达的相关性及预后的关系

庄晓苹 林琼琼 季剑乐 朱 晔

摘 要 **目的** 探讨乳腺癌中脾酪氨酸激酶基因(spleen tyrosine kinase, SyK)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)表达的相关性及其与乳腺癌患者预后的关系。**方法** 采用实时 PCR 方法分别检测 120 例乳腺癌组织、100 例正常乳腺组织、100 例纤维腺瘤组织之间的 SyK 和 HGF 基因表达,分析乳腺癌组织中二者的表达水平与临床病理学特征的关系,并对其表达的相关性以及乳腺癌患者预后的关系进行了统计分析。**结果** SyK、HGF mRNA 的表达在乳腺癌组织和正常乳腺组织及纤维腺瘤组织之间比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);而二者表达在其他两组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。SyK、HGF mRNA 表达与乳腺癌的临床分期、脉管侵犯相关($P < 0.05$),但与年龄、肿块直径无关($P > 0.05$)。120 例乳腺癌患者的随访结果为术后 5 年内死亡人数为 8 例,占 6.67% (8/120),生存中位数时间为 47 个月,采用 Kaplan - Meier 法对 120 例乳腺癌患者分为两组,即比较组与预后组,结果显示对两组生存曲线整体比较的 Log Rank 检验结果为 $P = 0.009$, Breslow 检验结果为 $P = 0.018$ 。按照 Log Rank 检验的结果,可以认为两组表达对患者的生存率有差异,预后组与生存状态呈负相关($r = -0.202, P < 0.05$)。**结论** SyK、HGF 参与乳腺癌侵袭和转移中的作用, SyK 缺失或 HGF 过表达提示患者预后不良,可作为乳腺癌预后判断的指标。

关键词 乳腺癌 脾酪氨酸激酶 肝细胞生长因子 反转录 - 聚合酶链反应

中图分类号 R75 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.05.030

Correlation between SyK and HGF in Breast Cancer and Their Prognosis Significance. Zhuang Xiaoping, Lin Qiongqiong, Ji Jianle, et al. Department of Pathology, Wenzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To investigate the correlation between SyK and HGF in breast cancer and their prognosis significance. **Methods** The expressions of SyK and HGF gene were detected by RT - PCR method in 120 samples of breast cancer, 100 samples of normal breast tissue and 100 samples of fibroadenoma. We analyzed its relationship with clinicopathological parameters of breast cancer. The correlation between SyK and HGF and their prognosis significance were investigated. **Results** There were statistically significant differences between the expression levels of SyK and HGF of breast cancer, normal breast tissue and fibroadenoma ($P < 0.01$). There were no statistically significant differences between the expression levels of SyK and HGF of normal breast tissue and fibroadenoma ($P > 0.05$). These data showed that the expression of SyK and HGF is remarkably related to the clinical stage and vascular invasion ($P < 0.05$), but not to the age and tumor size. Follow - up results for 120 cases of breast cancer patients were 8 death cases within five years, accounted for 6.67% (8/120). And the median survival time was 47 months. With the method of Kaplan Meier, we divided these 120 breast cancer patients into two groups: comparison group and prognosis group. The results showed a comparison of two groups of overall survival curves of the Log Rank test results for $P = 0.009$. And Breslow test results for $P = 0.018$. According to the results of the Log Rank test, the prognosis group was negatively correlated with the survival status ($r = -0.202, P < 0.05$). **Conclusion** SyK and HGF were involved in breast cancer invasion and metastasis. The deficiency of SyK and the high expression of HGF in breast cancer may be served as an indicator of the prognosis of breast cancer.

Key words Breast cancer; SyK; HGF; RT - PCR

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,在国内发生率明显上升,且发病年龄有低龄化的趋势,其具体发病原因及机制尚未完全阐明^[1]。脾酪氨酸激酶基因(spleen tyrosine kinase, SyK)目前引起了

国内外研究者的广泛重视,认为 SyK 基因是一种新发现的候选抑癌基因,可以预测乳腺癌预后情况的指标之一。有研究表明肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)异常表达提示肿瘤的预后不良及低生存率^[2]。本研究通过实时 PCR 检测 SyK、HGF mRNA 在乳腺癌中表达情况,进而探讨 SyK、HGF 在乳腺癌侵袭和转移中的作用以及预后的相关性。

基金项目:浙江省温州市科技局计划项目(Y20140225)

作者单位:325000 温州市中西医结合医院

通讯作者:庄晓苹,电子信箱:tingyuxuan56@126.com

材料与方法

1. 标本来源:收集于 2012 ~ 2015 年笔者医院病理科石蜡标本,正常乳腺组织 100 例,纤维腺瘤 100 例,乳腺癌组织 120 例。收集的病例均有完整的临床病理资料和随访资料(表 1)。根据 2012 年第 4 版的 WHO 乳腺肿瘤分类^[3],按照分析乳腺小管和腺体的

分化程度、肿瘤细胞核的多形性、病理核分裂象计数等进行肿瘤分级:组织学分级Ⅰ、Ⅱ级者 72 例,Ⅲ级者 48 例;临床分期Ⅰ、Ⅱ期者 75 例,Ⅲ期者 45 例;有脉管侵犯者 34 例、无侵犯者 86 例;腋窝淋巴有结转移者 43 例、无转移者 77 例。患者术前均未接受任何治疗方案,包括放射治疗、化学治疗或激素治疗。

表 1 乳腺癌组织中 SyK、HGF mRNA 表达和临床病理学参数之间的关系

临床特征		SyK mRNA 表达				HGF mRNA 表达		
		<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>t</i>	<i>P</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄(岁)	<40	58	22.98 ± 1.237	0.079	0.937	32.33 ± 2.708	1.507	0.135
	≥40	62	22.96 ± 1.407			32.93 ± 1.584		
肿块直径(cm)	<3	45	22.86 ± 1.277	0.040	0.969	32.18 ± 3.009	0.869	0.388
	≥3	75	22.85 ± 1.287			32.60 ± 1.505		
临床分期	Ⅰ~Ⅱ	75	22.89 ± 2.532	2.131	0.035	30.22 ± 3.912	2.313	0.022
	Ⅲ	45	21.86 ± 2.626			31.86 ± 3.441		
组织学分级	Ⅰ~Ⅱ	72	23.21 ± 2.011	2.309	0.024	32.11 ± 2.985	1.481	0.143
	Ⅲ	48	22.07 ± 2.992			31.02 ± 4.484		
脉管侵犯	有	34	23.63 ± 1.572	4.235	0.000	32.73 ± 1.902	3.073	0.003
	无	86	21.93 ± 2.769			31.17 ± 3.581		
淋巴结转移	有	43	23.38 ± 1.541	1.747	0.085	31.86 ± 2.842	2.331	0.022
	无	77	22.89 ± 1.292			30.51 ± 3.414		

2. 检测试剂:Total 试剂购自于美国 Invitrogen 公司;石蜡标本 RNA 分离和扩增试剂盒购自美国 Ambion 公司;引物设计和合成均由上海生物工程有限公司制作。

3. 研究方法:(1)石蜡标本 RNA 提取法:将切下的蜡膜放在二甲苯中,室温孵育 10min,石蜡混匀颠倒,使组织得到充分溶解。用 100% 无水乙醇洗涤 2 次,去除残留的二甲苯,然后干燥呈片状沉淀物^[4]。(2)RNA 提取及纯化:按照 RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE 试剂盒的说明书步骤提取总 RNA。(3)RNA 溶解:纯化后的 RNA 用 60U/L e-lution 溶解,分装。用 20μl 来检测 RNA 质量与反转录,剩余的标本保存 -80℃ 冰箱备用。(4)实时 PCR 方法:用 TRIzol 法提取标本总 RNA,反转录反应按照试剂盒说明书进行操作。PCR 反应以 25μl 为体系,取 cDNA 2μl,加入试剂 10 × buffer 2.5μl、dNTP 0.5μl、MgCl₂ 1μl 及 TaqDNA 聚合酶 0.3μl。SyK 上游引物:5'-CATGGAAAAATCTCTCGGGAAGA-3',下游引物:5'-GTCGATCGGATAGTGCAGCA-3';HGF 上游引物:5'-GCTATCGGGGTAAAGACCTACA-3',下游引物:5'-CGTAGCGTACCTCTGGATTGC-3';内参 β-actin 上游引物:5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3';下游引物:5'-AGCACTGTGTTG-

GCGTACAG-3'。上下游引物各加 0.75μl、纯净水 16.4μl。反应条件:94℃ 预变性 10min、94℃ 变性 30s、54℃ 退火 30s、72℃ 延伸 1min 45s,35 个循环;72℃ 终末延伸 10min。用 DEPC 水代替 cDNA 做阴性对照,用扩增 GAPDH 作为内参照。

4. 结果判定:用实时 PCR 检测石蜡标本中 SyK、HGF mRNA 相对表达量,应用 2^{-ΔΔCt} 法分析目的基因和内参基因的 Ct 值,以 GAPDH 为内参基因,以正常乳腺组织为对照组,SyK、HGF 相对表达量公式计算: folds = 2^{-ΔΔCt}, 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},通过计算乳腺癌组织中 SyK、HGF mRNA 相对于正常乳腺组织、纤维腺瘤表达之间的差异性^[4,5]。

5. 随访结果:随访截止时间为 2017 年 5 月 31 日,共随访患者 120 例,随访时间 1 ~ 60 个月,生存中位数为 47 个月。120 例患者中无病生存 88 例,出现局部复发或远处转移共 24 例,死于乳腺癌复发转移 5 例,死于其他原因 3 例。

6. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析,计量资料由均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用独立样本 *t* 检验方法,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。生存期按月计算,生存曲线采用 Kaplan-Meier 方法绘图,用 Log-Rank 检验比较

SyK、HGF 患者生存时间的差异。

结 果

1. SyK、HGF mRNA 不同乳腺组织相对表达量: SyK mRNA 正常乳腺组和纤维腺瘤组相对表达量为 ($t=0.978, P=0.333$); 正常乳腺组和乳腺癌组相对表达量为 ($t=40.810, P<0.01$); 纤维腺瘤组和乳腺癌组相对表达量为 ($t=34.240, P<0.01$)。HGF mRNA 正常乳腺组和纤维腺瘤组相对表达量为 ($t=2.248, P=0.029$); 正常乳腺组和乳腺癌组相对表达量为 ($t=3.760, P=0.000$); 纤维腺瘤组和乳腺癌组相对表达量为 ($t=3.371, P=0.001$)。相对表达量符合正态分布 ($P>0.05$), SyK、HGF mRNA 乳腺癌相对表达量明显高于正常乳腺组和纤维腺瘤组, 两者比较差异有统计学意义 ($P<0.01$, 图 1)。

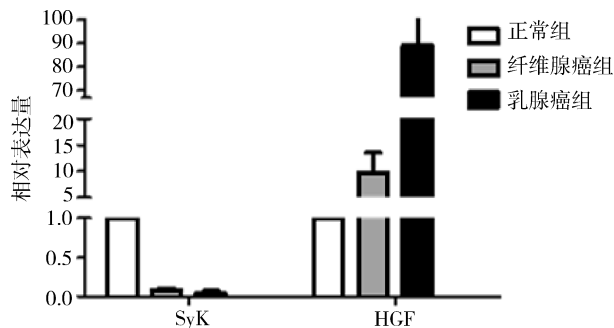


图 1 SyK、HGF mRNA 在不同乳腺组织的相对表达量

2. SyK、HGF mRNA 表达和乳腺癌组织临床病理学参数之间的关系: SyK、HGF mRNA 表达与乳腺癌的临床分期、有脉管侵犯相关 ($P<0.05$), 但与年龄、肿块直径无关 ($P>0.05$)。其中 SyK 与组织学分级相关 ($P<0.05$), HGF 与淋巴结转移相关 ($P<0.05$, 表 1)。

3. 乳腺癌中 SyK、HGF 的表达与患者生存的关系: 120 例乳腺癌患者的随访结果为术后 5 年内死亡人数为 8 例, 占 6.67% (8/120), 生存中位数时间为 47 个月, 根据乳腺癌 SyK、HGF 的表达状况将患者分为两组: (1) 比较组: SyK + / HGF + (18 例)、SyK + / HGF - (10 例)、SyK - / HGF - (15 例)。(2) 预后组: SyK - / HGF + (77 例); 因比较组的 3 组数据较小, 合并成一组为比较组。采用 Kaplan - Meier 法对 120 例乳腺癌患者的随访结果进行统计学分析处理, 结果显示对两组生存曲线整体比较的 Log Rank 检验结果为 $P=0.009$, Breslow 检验结果为 $P=0.018$ 。Log Rank 检验的结果显示, 两组表达对患者的生存率有差异, 预后组与生存状态负相关 ($r=-0.202, P<0.05$),

该两组 5 年生存情况生存曲线, 详见图 2。

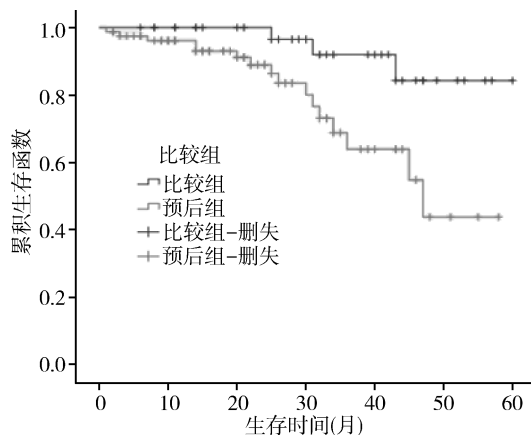


图 2 SyK、HGF 不同表达与乳腺癌患者生存时间的关系

讨 论

研究证明, 乳腺癌的发生、浸润、侵袭及转移是多因素参与、多基因调控、多步骤发展的复杂过程, 且与许多生物学指标密切相关^[6]。SyK 是一种备选抑癌基因, 其表达的缺失引起免疫细胞发育成熟障碍, 使机体的免疫监视能力逐渐下降, 致使机体对基因突变、细胞的异常增生失去免疫力, 从而引发肿瘤^[7]。临床及实验研究发现 SyK 表达下调或缺失与多种恶性肿瘤的浸润、侵袭及转移密切相关, 如结肠癌、肺癌、鼻咽癌、视网膜母细胞瘤等恶性肿瘤中均表明 SyK 表达下调或缺失, 恶性程度越高的肿瘤 SyK 表达缺失的现象越明显^[8~11]。本研究 SyK mRNA 在乳腺癌中表达明显低于正常乳腺组和纤维腺瘤组, 两者比较差异有统计学意义 ($P<0.01$), 说明 SyK 表达下调或缺失与乳腺恶性肿瘤发生有着密切关联。正常乳腺组织、纤维腺瘤中 SyK 高表达, 可能提示 SyK 对体内肿瘤细胞的发生、发展有一定的抑制作用, 从而维持良性的组织学特性。在临床病理参数中, SyK mRNA 表达缺失与乳腺癌的临床分期、组织学分级、脉管侵犯相关 ($P<0.05$), 这与 Ghotra 等^[12]研究结果相符。乳腺癌临床分期越晚、组织学分级越差、有脉管侵犯者等 SyK 表达缺失越严重, 这说明 SyK 表达缺失的现象与乳腺癌具有更高的侵袭性、转移以及预后不良因素密切相关。

HGF 是属于受体酪氨酸蛋白激酶家族成员之一, 具有多种生物学效应的一种血源性生长因子, 能促进淋巴管的生成和血管内皮细胞的增殖。正常组织存在低表达, 在恶性肿瘤组织呈高表达^[13]。研究显示, HGF 过表达与配体 c - Met 相结合作用, 可通

过旁分泌或自分泌途径激活多种信号通路,引起直接或间接反应,从而刺激肿瘤发生、浸润及转移^[14]。研究证实,HGF 在黑色素瘤、肝癌、卵巢癌、恶性间皮瘤等恶性肿瘤中均呈高表达^[15-18]。本研究 HGF mRNA 在乳腺癌中明显高于正常乳腺组和纤维腺瘤组,两者比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),各项临床参数中 HGF mRNA 表达与乳腺癌的临床分期、淋巴结转移、有脉管侵犯者相关($P < 0.05$),与 Hao 等^[19]研究结果相一致。这结果提示 HGF 高表达促进肿瘤细胞的增殖、癌变,同时又促进血管内皮细胞增生,导致恶性肿瘤细胞的侵袭和转移。HGF 与淋巴结转移相关,提示 HGF 可能有促进淋巴管的增生,增加肿瘤与淋巴管之间的接触面积,便于肿瘤细胞进入淋巴管的机会,从而导致淋巴结转移。淋巴结转移是乳腺癌的主要转移方式,也是乳腺癌死亡或复发的重要因素,进一步说明 HGF 过表达是乳腺癌的早期发现、早期诊断以及判断预后不良的指标之一。

在乳腺癌传统的预后判定指标有:年龄、肿块直径、组织学分级、临床分期等,临床情况相同的患者中,却有着不同的预后结果,因此不能根据传统的预后指标来判断,并且制定治疗方案,应要结合其他生物学指标,比如 SyK、HGF 等指标进行综合判断。本研究根据乳腺癌中 SyK、HGF 的表达情况将患者分为比较组与预后组(SyK-/HGF+),采用 Kaplan-Meier 法对 120 例乳腺癌患者的随访结果进行统计学分析处理,结果显示对两组生存曲线整体比较的 Log Rank 检验结果为 $P = 0.009$,Breslow 检验结果为 $P = 0.018$ 。按照 Log Rank 检验的结果,SyK 和 HGF 表达与否对患者的生存率有显著影响,预后组与生存状态呈负相关($r = -0.439$, $P < 0.05$),从生存曲线图可知,乳腺癌患者中 SyK 缺失或 HGF 过表达者,其患者生存时间均低于 SyK 高表达或 HGF 低表达者。说明患者 SyK 表达的越低、HGF 表达的越高,提示肿瘤的恶性程度就越高,加速肿瘤向远处转移的概率会更大,患者预后会更差。因此可以说明 SyK 和 HGF 是预后独立因素,可作为乳腺癌预后判断的指标之一。

参考文献

- 1 师金,梁迪,李道娟,等.全球女性乳腺癌流行情况研究[J].中国肿瘤,2017,26(9):683-690
- 2 庄晓苹,董晓峰,林琼琼. RON、HGF 在子宫内膜癌中的表达及临床意义[J]. 现代实用医学,2017,29(7):911-912
- 3 庄晓苹,谭晓,朱晔,等. SyK 和 HGF 在乳腺癌中表达及临床意义[J]. 医学研究杂志,2016,11(45):145-148
- 4 庄晓苹,林琼琼,金经纬,等. C-Met 在子宫内膜腺癌中的作用

- [J]. 医学研究杂志,2013,42(5):90-93
- 5 Zhuang XP, Jin WW, Teng XD, et al. c-Met and RON expression levels in endometrial adenocarcinoma tissue and their relationship with prognosis[J]. Eur J Gynaecol Oncol,2015,36(3):255-259
- 6 周晓芳,张彩霞,方青芳. 用于乳腺癌的分子靶向治疗药物研究进展[J]. 海峡药学,2016,8(3):136-138
- 7 曹跃鹏,庞洪双,袁旦平. 结肠癌组织 Syk 基因表达程度与其临床意义[J]. 现代实用医学,2016,28(3):328-329
- 8 Yang Z, Huo L, Chen H, et al. Hypermethylation and prognostic implication of Syk gene in human colorectal cancer[J]. Med Oncol,2013,30(2):586
- 9 Peng CL, Zhang Y, Sun QF, et al. Inhibitory effects of syk transfection on lung cancer cell invasion[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2013,14(5):3001-3003
- 10 Zhou X, Matskova L, Rathje LS, et al. SyK interaction with ITGB4 suppressed by Epstein-Barr virus LMP2A modulates migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Oncogene,2015,34(34):4491-4499
- 11 Qiu Q, Yang C, Xiong W, et al. SyK is a target of lymphocyte-derived microparticles in the induction of apoptosis of human retinoblastoma cells[J]. Apoptosis,2015,20(12):1613-1622
- 12 Ghotra VP, He S, van der Horst G, et al. SyK is a candidate kinase target for the treatment of advanced prostate cancer[J]. Cancer Res,2015,75(1):230-240
- 13 Chiba S, Tsuchiya N, Horikawa Y, et al. Functional mononucleotide repeat polymorphism in the promoter region of HGF is associated with risk and malignant aggressiveness of bladder cancer[J]. Int J Oncol,2014,44(3):678-684
- 14 Lam BQ, Dai L, Qin Z. The role of HGF/c-MET signaling pathway in lymphoma[J]. J Hematol Oncol,2016,9(1):135
- 15 Makowiecka A, Simiczyjew A, Nowak D, et al. Varying effects of EGF, HGF and TGF- β on formation of invadopodia and invasiveness of melanoma cell lines of different origin[J]. Eur J Histochem,2016,60(4):2728
- 16 Gao F, Deng G, Liu W, et al. Resveratrol suppresses human hepatocellular carcinoma via targeting HGF-c-Met signaling pathway[J]. Oncol Rep,2017,37(2):1203-1211
- 17 Kwon Y, Godwin AK. Regulation of HGF and c-MET interaction in normal ovary and ovarian cancer[J]. Reprod Sci,2017,24(4):494-501
- 18 Hao NB, Tang B, Wang GZ, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) upregulates heparanase expression via the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway for gastric cancer metastasis[J]. Cancer Lett,2015,361(1):57-66
- 19 Koo BS, Kim JM, Seo ST, et al. Upregulation of HGF and c-MET is associated with subclinical central lymph node metastasis in papillary thyroid microcarcinoma[J]. Ann Surg Oncol,2014,21(7):2310-2317

(收稿日期:2018-06-11)

(修回日期:2018-07-11)