基因及其蛋白在肿瘤中的表达 DOI:10.11699/cyxb20130816

HGF/c-Met 在鼻内翻性乳头状瘤中的表达及与其恶变的关系

段晓辉[1],于艳芳[1],裴志萍[2],张艳丽[1],王延臣[1],乔国勇[1],康 震[1]
(1. 河北工程大学附属医院耳鼻咽喉科，邯郸 056002;2. 邯郸市第二医院普外科，邯郸 056001)

【摘 要】目的:检测肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)/c-Met 系统在鼻内翻性乳头状瘤中的表达及探索与其恶变的关系。方法:选择我院 2005-2010 年间确诊为鼻内翻性乳头状瘤(实验组 1)患者 30 例及鼻腔恶性乳头状瘤(实验组 2)患者 12 例作为实验组,选取鼻息肉(对照组 1)患者 28 例、慢性肥厚性鼻炎(对照组 2)患者 18 例作为对照组,对实验组织采用免疫组织化学方法 SP 法检测 HGF/c-Met 的表达,并统计其染色得分。Real-time PCR 检测手术切除组织 HGF 与 c-Met 基因表达。结果:实验组统计得分明显高于对照组,且实验组内鼻腔恶性乳头状瘤的统计得分均值要高于内翻性乳头状瘤($P<\alpha'$)。Real-time PCR 也得到和免疫组织化学染色一致的结果。结论:HGF/c-Met 的高表达可能和内翻性乳头状瘤的恶变有关。检测 HGF/c-Met 的表达可对内翻性乳头状瘤是否有恶变风险和判断预后提供依据。

【关键词】肝细胞生长因子/c-Met;内翻性乳头状瘤;恶变
【中国图书分类法分类号】R739.62 【文献标志码】A 【收稿日期】2012-06-15

Expressions of HGF/c-Met in nasal inverted papilloma and their relationship with malignant transformation

DUAN Xiaohui[1], YU Yanfang[1], PEI Zhiping[2], ZHANG Yanli[1], WANG Yanchen[1], QIAO Guoyong[1], KANG Zhen[1]
(1. Department of Otorhinolaryngology, the Affiliated Hospital, Hebei Engineering University;
2. Department of General Surgery, the Second Hospital of Handan City)

【Abstract】***Objective***: To detect the expressions of hepatocyte growth factor(HGF)/c-Met system in nasal inverted papilloma and to explore the relationship between HGF/c-Met expressions and malignant transformation. ***Methods***: Totally 30 cases of defined nasal inverted papilloma and 12 cases of nasal malignant papilloma were chosen as experimental group while 28 cases of nasal polyps and 18 cases of chronic hypertrophic rhinitis were defined as control group. All samples were selected in our hospital from 2005 to 2010. Surgical treatment was applied to dissect the disease tissues, immunohistochemical SP was used to detect the expressions of HGF/c-Met and staining scores of the samples were calculated. HGF and c-Met mRNA level of removed tissues were detected by real-time PCR. ***Results***: Statical score of experimental group was significantly higher than that of control group. In experimental group, score of malignant palilloma was higher than that of inverte papilloma. Real-time PCR results were similar to those of immunohistochemistry. ***Conclusions***: High expressions of HGF/c-Met may relate with malignant transformation of inverted papilloma. Detecting HGF/c-Met expression may provide references for judging the malignant risk and prognosis of inverted papilloma.

【Key words】hepatocyte growth factor/c-Met; inverted papilloma; malignant transformation

鼻内翻性乳头状瘤是耳鼻喉科常见的良性上皮细胞肿瘤,多发于中年男性,约占到鼻内肿瘤的 0.4%~4.7%[1]。临床常采取手术切除的方式来治疗,但其容易复发且生长方式具有破坏性,容易恶变为恶性乳头状瘤。临床诊断上容易与鼻息肉、慢性肥厚性鼻炎混淆。因此判断其是否具有恶变倾向显得尤为重要。本文通过检测与恶性肿瘤发展过程相关的肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)/c-Met 系统来探索其与内翻性乳头状瘤恶变的相关性。

1 资料与方法

1.1 实验对象

入选对象为我院 2005-2010 年间的就诊病例。选取鼻内翻性乳头状瘤(实验组 1)30 例及鼻腔恶性乳头状瘤(实验组 2)12 例作为实验组;鼻息肉(对照组 1)28 例及慢性肥厚性鼻炎(对照组 2)18 例为对照组。一般资料比较见表 1。

作者介绍:段晓辉,Email:yb8564@163.com,
研究方向:鼻内镜外科及头颈部肿瘤的基础与临床。

表 1　两组患者基本资料

Tab.1　Basic information of patients in two groups

分组		例数（n）	性别 男	性别 女	平均年龄（岁）	病程（年）
对照组	对照组 1	28	20	8	34.0 ± 12.5	3.5 ± 0.5
	对照组 2	18	14	4	36.0 ± 10.5	4.0 ± 0.8
实验组	实验组 1	30	24	6	37.0 ± 10.5	4.5 ± 0.5
	实验组 2	12	9	3	43.0 ± 12.5	4.5 ± 1.5

1:4 组之间的两两比较，均有 P>0.05；2：性别比较：卡方检验；其它资料：成组 t 检验。3：采用假设检验方法做均衡比较，故不考虑因多次比较而调整显著性水平，以更利于统计结果的可靠稳健

以上两组（4 个小组）所有入选对象均通过手术切除病变组织。其基线资料，如年龄构成、病程资料，经统计学检验差异无统计学意义（P>0.05），各组由于疾病本身关系男性例数均多于女性例数，但各组患者基线资料相近，具有可比性。

1.2　主要仪器及试剂

石蜡切片机为 SYD-S1020，阅片显微镜为 OLYMPUS 光学显微镜，羊抗人 HGF 多克隆抗体、鼠抗人 c-Met 多克隆抗体购自北京中山生物技术有限公司，含兔抗羊二抗、兔抗鼠二抗的 SP 试剂盒购自福州迈新公司，引物由 invitrogen 公司合成。

1.3　方法及结果判定

内翻性乳头瘤、鼻息肉、慢性肥厚性鼻炎组患者均行鼻内窥镜下病变组织切除术；鼻腔恶性乳头瘤组根据 CT 确定的病变部位 4 例接受内窥镜下病变组织切除术，5 例采用单纯鼻内径术，3 例采用鼻侧切开径路，手术力求将肿瘤发生部位及侵犯部位彻底切除。切除组织经福尔马林固定后采用 SP 法免疫组织化学染色，所有标本实验条件均一致，用 PBS 代替一抗做阴性对照，已知阳性标本做阳性对照。染色结果为 HGF 与 c-Met 均定位细胞质，颜色及形态为介于淡黄色至棕褐色之间的颗粒，所有染色后图片均由固定的 2 位病理医师双盲法阅片。基本不着色为 1 级，黄色为 2 级，棕褐色为 3 级；阳性细胞百分比分级：准确计数 200 个细胞，统计细胞染色程度和着色细胞个数，计分规则：无色 0 分，浅色 1 分，深色 2 分，并计算每个样本总分数。

基因表达检测（引物序列见表 2）：准确称取手术切除组织 0.1 g 于 EP 管，提取 RNA，紫外分光光度计定量 RNA 含量，所有组织 RNA 均 $A_{260\,nm}/A_{280\,nm}$>1.8，取等量 RNA 根据逆转录试剂盒说明逆转录得到 cDNA，根据 Toyobo SYBR-green super-MIX 要求做 PCR，real-time PCR 结果根据仪器测得的 ct 值，以GAPDH 为基准，根据 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 计算所测基因与 GAPDH 的相对表达量。

1.4　统计学处理

试验结果资料为染色程度平均值，即各组所有样本得分之和除以组内样本数，为无量纲计量数据，以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）形式描述。各大组各小组均为独立组，组间比较采用成组 t 检验，使用 SPSS 11.5 进行统计分析。各大小组间的比较均为 2 个指标比较，比较次数 k=2，取检验水准 α=0.05，调整检验水准为 α'=α/k=0.025。

表 2　Real-time PCR 引物序列

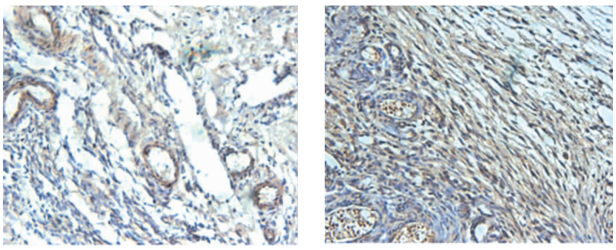
Tab.2　Primers sequence of real-time PCR

基因名称	正义链	反义链
HGF	5' -GGGCACTGTCAAT ACCAT- 3'	5' -CAGTAGCCAACTC GGATG- 3'
c-Met	5' -ATTGATTGCTGGTG TTGT -3'	5' -TTCTGTAGTTGGGC TTAC -3'
GAPDH	5' -GTGGAGATTGTTG CCATCAACG-3'	5' -CAGTGGATGCAGGG ATGATGTTCTG- 3'

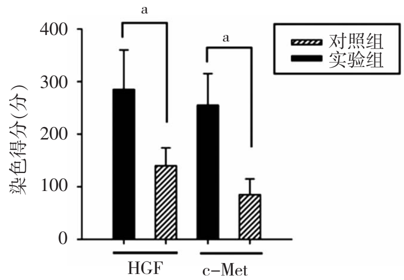
2　结　果

2.1　大组间的 HGF 及 c-Met 的阳性表达

HGF 在鼻腔恶性肿瘤中的阳性表达如图 1A。c-Met 在鼻腔恶性肿瘤中的阳性表达如图 1B。实验组（鼻内翻性乳头状瘤及恶性乳头状瘤）的 HGF、c-Met 染色程度平均值（285 ± 75）、（255 ± 60）分，明显高于对照组（鼻息肉组与慢性肥厚性鼻炎组）（140 ± 34）、（85 ± 30）分，2 大组相比，差异有统计学意义。见表 3 及图 1C。



A. HGF 在鼻腔恶性乳头瘤中的阳性表达　　B. c-Met 在鼻腔恶性肿瘤中的阳性表达



a，差异有统计学意义

C. 对照组与实验组 HGF、c-Met 染色平均得分比较

图 1　HGF 与 c-Met 在鼻腔恶性乳头瘤中的阳性表达及二者在不同组的染色得分

Fig.1　Positive expressions of HGF and c-Met in malignant papilloma and their staining scores

2.2　各大组内（小组间）的 HGF、c-Met 染色程度及二者基因在组织内的表达比较

各大组内的比较结果为：鼻内翻性乳头状瘤的 HGF、c-Met 染色程度平均值（255 ± 34）、（220 ± 20）分，明显低于鼻腔恶性乳头状瘤的染色程度平均值（360 ± 37）、（342 ± 39）分，

2小组相比，差异有统计学意义。而鼻息肉的 HGF、c-Met 染色程度平均值（128 ± 17）、（94 ± 22）分，和慢性肥厚性鼻炎组（156 ± 16）、（79 ± 15）分的染色程度得分相比，差异也有统计学意义，见表 4 及图 2A。比较 HGF、c-Met 在不同组组织中的表达也得到和染色结果比较接近的结果，见图2B。

表 3 大组间 HGF 及 c-Met 的阳性表达

Tab.3 Positive expressions of HGF and c-Met between groups

组别	例数（n）	HGF染色程度（$\bar{x} \pm s$）	c-Met染色程度（$\bar{x} \pm s$）
实验组（乳头状瘤）	42	285 ± 75	255 ± 60
对照组（息肉鼻炎）	46	140 ± 34	85 ± 30
t 值		11.5	16.6
P 值		0.000[a]	0.000[a]

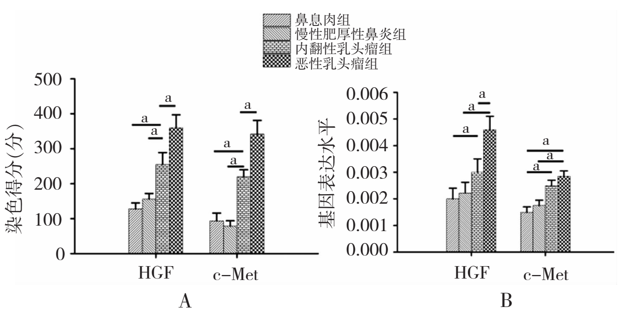
注：统计方法采用两独立组 t 检验之校正 t 检验 3 法（Stterthwaite），a，$P<\alpha$'，差异有统计学意义

表 4 各大组内 HGF 及 c-Met 的阳性表达

Tab.4 Positive expressions of HGF and c-Met within groups

组别	例数（n）	HGF染色程度（$\bar{x} \pm s$）	c-Met染色程度（$\bar{x} \pm s$）
实验组 1（鼻内翻性乳头状瘤）	30	255 ± 34	220 ± 20
实验组 2（鼻腔恶性乳头状瘤）	12	360 ± 37	342 ± 39
对照组 1（鼻息肉）	28	128 ± 17	94 ± 22
对照组 2（肥厚性鼻炎）	18	156 ± 16	79 ± 15
实验两小组比较：t 值、P 值		8.8、0.000[a]	10.3、0.000[a]
对照两小组比较：t 值、P 值		5.57、0.000[a]	2.53、0.015[a]

注：采用两独立样本 t 检验；a，$P<\alpha$'，差异有统计学意义



a，$P < 0.05$

图 2 不同恶性程度鼻腔疾病的 HGF、c-Met 染色程度平均值及其基因表达比较

Fig.2 Comparison on average scores of HGF and c-Met staining degree and their gene expressions among nasal diseases with different malignant degrees

3 讨 论

鼻内翻乳头瘤是来自鼻腔及鼻窦黏膜的上皮组织良性肿瘤，主要向间质内呈现管状、手指状或分枝状生长，其生长方式具有破坏性且发展很快，容易恶变，转变为恶性乳头状瘤的概率为 2%~10%[2]。目前临床多采取鼻内镜下的手术切除[3]，但术后容易复发。因此，研究其发病机制与其恶变相关因素对探索可能的治疗手段与指导临床治疗具有重要的意义。鼻息肉、慢性肥厚性鼻炎的生长表现与鼻内翻性乳头瘤有明显不同，其生长无破坏性，发展缓慢且不易恶变。

HGF 是一种具有刺激多种细胞增殖的细胞因子，它的特异性受体是 c-Met。二者可以形成 HGF/c-Met 信号通路，该通路激活后能够刺激多种细胞活动发生改变[4]，并且与肿瘤的发生过程有密切关系[5]。

HGF 主要由间质细胞产生，在生理情况下只有上皮细胞表面才表达 c-Met，它们共同构成上皮-间质相互作用的通路，这种配体与受体的严格表达调控能够使 HGF 引发的细胞增殖调控受到严格的调控。但是很多研究发现，在恶性肿瘤中，存在二者阳性的细胞发生变化，这不仅发生在其表达量上，而且生理情况下不表达 HGF/c-Met 的细胞在发生恶变后也高表达二者，这种异常表达可以形成恶性的自分泌环，使得 HGF 不断通过自身细胞表面的c-Met 受体向胞内传导信号，导致其信号通路持续激活，从而促进细胞恶变与肿瘤的生长和转移。目前已有大量研究证实 HGF 与 c-Met 在多种恶性肿瘤中有异常表达。李宏武和单吉贤[6]从基因表达水平研究大肠癌的 HGF、c-Met 的表达规律，其结果表明，HGF 在大肠癌中阳性率高达 52.5%，明显高于正常组织的表达率；张敏等[7]发现在人口腔鳞癌中的表达要明显高于在正常口腔黏膜组织中的表达，Park 等[8]发现 HGF/c-Met 系统在胃癌细胞系 SUN-484 的增殖与转移也发挥重要的作用，张瑞涛等[9]发现 HGF/c-Met 可能在卵巢上皮细胞性癌的恶性进展也有作用；王河清等[10]在宫颈癌患者中的研究中也发现，HGF 可能和宫颈癌的发展、转移、预后有密切关系；高霞等[11]在非小细胞肺癌中也观察到检测 HGF 水平的变化对判断患者疗效、肿瘤负荷、复发转移等有参考价值。

本研究的目的是检测 HGF/c-Met 在鼻内增生性组织中的表达情况，并探讨鼻内翻乳头瘤向鼻恶性乳头状瘤转变过程中 HGF/c-Met 的表达变化。结果显示，鼻内反翻乳头瘤和鼻恶性乳头状瘤恶变组 HGF/c-Met 表达均值明显高于另外两种良性鼻内增生组织（鼻息肉、慢性肥厚性鼻炎）中表达量，这

说明恶变或具有高恶变潜能的鼻上皮细胞表现为明显的 HGF/c-Met 上调。HGF/c-Met 在局部组织的上调可能形成了其不受调控的自分泌环导致细胞的恶变。比较内翻性乳头瘤与恶性乳头状瘤的HGF/c-Met 表达结果显示，后者的 HGF/c-Met 表达要明显的高于前者，说明恶性细胞的表达量要高于具有恶变潜能的细胞。这一结果也提示，HGF/c-Met 在内翻性乳头状瘤中的表达增高就应该引起临床重视，防止其发生向恶性乳头状瘤的转变。同时研究表明，良性鼻内增生组织内的 HGF/c-Met 表达差异无统计学意义。

值得提出的是，HGF/c-Met 在很多的肿瘤组织内均表达上调，检测 HGF/c-Met 的表达量对于判断其他组织细胞是否具有恶变倾向尚不清楚，且检测 HGF/c-Met 缺乏一定的特异性，做为诊断的指标还需与其他特异性高的实验一同进行。鼻内翻性乳头瘤与恶性乳头状瘤的 HGF/c-Met 表达上调的一致性表明其在评价肿瘤的发展趋势上具有一定意义，但是这种上调的一致性与内翻性乳头瘤发生恶变的关系到底有多大还不清楚，恶性乳头状瘤的HGF/c-Met 显著高于鼻内翻性乳头状瘤则更加说明在恶变的过程中 HGF/c-Met 的表达是逐渐上升的，可能 HGF/c-Met 的这种上升所造成的细胞增殖调控受到破坏是引起鼻内翻性乳头状瘤细胞彻底恶变的原因之一。检测 HGF/c-Met 在鼻增生组织中的表达可能为临床的诊断提供一定的依据，并为日后开发治疗这种顽固复发性疾病的治疗手段提供指导。

参 考 文 献

[1] 钟　静.鼻内镜下鼻腔鼻窦内翻性乳头状瘤切除术 38 例疗效分析[J].医学信息，2011，24(5)：1118.

Zhong J. Nasal endoscopic sinus inerted papilloma resection of 38 cases of curative effect analysis[J].Medical Information，2011，24(5)：1118.

[2] 李树玲.头颈部肿瘤诊断.治疗及预后[M].天津：天津科学技术出版社，1983：151-152.

Li S L.Head and neck cancer diagnosis.treatment and prognosis[M].Tianjin：Tianjin Science and Technology Press，1983：151-152.

[3] 母晓松，李　兵，熊俊伟，等.经鼻内镜鼻腔鼻窦内翻性乳头瘤切除术[J].重庆医科大学学报，2011，36(7)：891-892.

Mu X S，Li B，Xiong J W，et al.Endoscopic surgery for sinonasal inverted papilloma [J].Journal of Chongqing Medical University，2011，36(7)：891-892.

[4] 蒲一平，吴家廉，骆文龙，等.HGF 应用于鼓膜修补术的临床研究[J].重庆医科大学学报，2003，28(3)：334-335.

Pu Y P，Wu J L，Luo W L，et al.The clinical study of HGF in miringoplasty[J].Journal of Chongqing Medical University，2003，28(3)：334-335.

[5] Cecchi F，Rabe D C，Bottaro D P.Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy[J].Expert Opin Ther Targets，2012，16(6)：553-572.

[6] 李宏武，单吉贤.人大肠癌组织肝细胞生长因子及其受体 c-met 的表达[J].世界华人消化杂志，2004，12(9)：2199-2201.

Li H B，Shan J X.Human hepatocyte growth factor of colorectal cancer tissue and expression of its receptor c-met[J].World Chinese Journal of Digestology，2004，12(9)：2199-2201.

[7] 张　敏，雷志敏，闫国胜，等.HGF/c-Met，VEGF 和 uPA 在口腔鳞癌组织中的表达及意义[J].临床口腔医学杂志，2010，26：8-10.

Zhang M，Lei Z M，Yan G S，et al.Expression and significance of HGF/c-Met，VEGF and uPA in oral squamous carcinoma tissue[J].Journal of Clinical Stomatology，2010，26：8-10.

[8] Park M，Park H，Kim W H，et al.Presence of autocrine hepatocyte growth factor-Met signaling and its role in proliferation and migration of SNU-484 gastric cancer cell line[J].Exp Mol Med，2005，37(3)：213-219.

[9] 张瑞涛，史惠蓉，黄好亮，等.MACC1、HGF、和 C-Met 蛋白在卵巢上皮性癌中的表达及其意义[J].南方医科大学学报，2011，31(9)：1551-1555.

Zhang R T，Shi H R，Huang H L，et al.Expression of MACC1，HGF，and C-met protein in epithelial ovarian cancer and their significance[J].J South Med Univ，2011，31(9)：1551-1555.

[10] 王河清，钟培根，林还珠，等.宫颈癌患者血清 HGF 水平的变化及临床意义[J].齐齐哈尔医学院学报，2011，32(13)：2061-2062.

Wang H Q，Zhong P L，Lin H Z，et al.Investigation of the serum HGF level changes of patients with cervical cancer and its clinical significance[J].Journal of Qiqihar University of Medicine，2011，32(13)：2061-2062.

[11] 高　霞，刁路明，陈洪雷，等.肝细胞生长因子及其受体在非小细胞肺癌中的表达及意义[J].实用肿瘤杂志，2005，20(1)：17-20.

Gao X，Diao L M，Chen H L，et al.Expression of hepatocyte growth factor and its receptor in non-small cell lung carcinoma and its significance[J].Journal of Practical Oncology，2005，20(1)：17-20.

（责任编辑：冉明会）