

c-Met、VEGF 在 AFP 阳性胃癌中的表达及意义

方 瑜¹, 王 琳¹, 李桂梅², 张 瑜¹, 杨宁蓉¹, 秦叔逵¹

摘要 目的 探讨肝细胞生长因子受体 c(c-Met)、血管内皮生长因子(VEGF) 在甲胎蛋白(AFP) 阳性胃癌中的表达, 并探讨 c-Met、VEGF 与 AFP 阳性胃癌临床病理特征的关系。方法 收集临床上 AFP 阳性胃癌组织标本共 21 例作为试验组, 同时收集与该 21 例 AFP 阳性胃癌临床分期基本一致的普通胃癌组织标本作为对照组, 通过免疫组织化学法检测其 c-Met、VEGF 的表达, 分析比较两组肿瘤 c-Met、VEGF 表达的差别。结果 试验组与对照组 c-Met 蛋白的阳性表达率分别为 85.7% (18/21)、71.4% (15/21); VEGF 蛋白的阳性表达率分别为 76.2% (16/21)、47.6% (10/21)。与对照组相比, 试验组在 VEGF、c-Met 蛋白的表达上明显高于后者 ($P < 0.05$)。Spearman 等级相关性分析显示 c-Met 与 VEGF 在试验组中表达呈正相关 ($r_s = 0.621, P < 0.05$)。根据 Lauren 分型, 发现在 AFP 阳性胃癌中肠型胃癌较其他类型易表达 c-Met。未发现试验组中 c-Met、VEGF 表达与患者年龄、性别、肿瘤位置、分化程度、淋巴结转移、肝转移、生存时间、AFP 水平等临床病理特征有相关性。结论 试验组中 c-Met 及 VEGF 表达显著高于对照组, 可能共同参与了 AFP 阳性胃癌的发生、发展过程, 并可能具有协同促肿瘤血管生成作用。

关键词 胃癌; 甲胎蛋白; 血管内皮生长因子; c-Met

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)03-0357-04

甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP) 一度被认为是肝癌及恶性生殖细胞肿瘤的特异性肿瘤标志物。Bourreille et al^[1] 在 1970 年首次报道了 1 例 AFP 阳性胃癌(alpha-fetoprotein-producing gastric carcinoma, AFPGC)。自此, 人们逐渐认识到胃肠癌、胰腺癌、胆囊癌、肺癌、乳腺癌等均可不同程度产生 AFP, 其中以胃癌产生 AFP 率最高, 国外文献^[2] 报道约占胃癌的 1.3% ~ 15.0%。AFPGC 整体预后较普通胃

癌差, 易发生淋巴结及肝脏转移。目前, 对 AFPGC 的发生及发展机制尚不甚了解。而肝细胞生长因子受体 c(c-Met) 与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 是肿瘤发生、发展过程中的主要分子标志物之一, 且临床上已有针对该标志物的靶向药物。故该研究利用免疫组化法检测 21 例 AFPGC 和普通胃癌中 c-Met、VEGF 蛋白表达的情况, 旨在探讨两者之间的相关性及其在 AFPGC 临床病理特征和判断预后中的意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集南京解放军八一医院肿瘤内科 2012 年 6 月 ~ 2014 年 6 月手术切除标本或胃镜活检组织蜡块存档, 其中 AFPGC(即经病理组织学证实的胃癌, 伴有血清 AFP 升高 ($\geq 10 \mu\text{g/L}$) 并排除肝炎、肝硬化、肝细胞癌及生殖细胞恶性肿瘤等其他可能产生 AFP 的疾病) 21 例作为试验组。根据 AJCC 第 7 版 TNM 分期, 其中 III 期 2 例, IV 期 19 例, 男 18 例, 女 3 例, 年龄 21 ~ 83 (58.5 ± 17.3) 岁。AFPGC 组织学亚型^[3] 组成: 肝样型 2 例、胎儿胃肠型或普通型 19 例。另外, 选取临床分期基本一致的普通胃癌(血清 AFP $< 10 \mu\text{g/L}$) 组织蜡块 21 例作为对照组, 其中男 14 例, 女 7 例, 年龄 29 ~ 78 (53.8 ± 11.0) 岁。两组间年龄及性别构成差异无统计学意义。本实验获所有患者或家属知情同意。即用型兔抗人 Met 单克隆抗体、鼠抗人 VEGF 单克隆抗体、免疫组化试剂盒等均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化检测 按试剂盒说明书操作。采用免疫组织化学法。选择研究石蜡标本 $3 \sim 4 \mu\text{m}$ 切片, 60°C 过夜。二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水。柠檬酸(pH 6.0) 微波抗原修复, DAB 显色, 苏木精复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 封片。设立阳性对照和阴性对照: 以已知阳性切片重复染色为阳性对照; 以 PBS 代替一抗为阴性对照。

1.2.2 结果判定标准 c-Met 蛋白免疫组化染色阳性表达主要位于细胞膜和胞质内, 呈棕黄色或棕褐

2014-10-23 接收

基金项目: 中国胃肠肿瘤临床研究协作组(CGOG) 胃癌研究基金(编号: 20130101002)

作者单位: 安徽医科大学解放军八一临床学院¹ 全军肿瘤中心肿瘤内科、² 病理科, 南京 210002

作者简介: 方 瑜, 男, 硕士研究生;

王 琳, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wanglin81yy@163.com

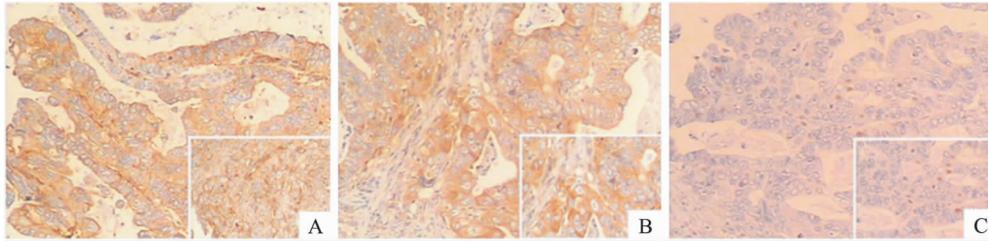


图1 c-Met、VEGF 及 AFP 在 AFPGC 中的表达

A: c-Met 强阳性(++) 表达 ×100(×200); B: VEGF 强阳性(++) 表达 ×100(×200); C: AFP 阳性表达 ×100(×200)

色颗粒; VEGF 蛋白免疫组化染色阳性表达主要位于细胞质, 呈棕黄色或棕褐色颗粒。按阳性着色程度评分: 0 分为无着色; 1 分为浅黄色; 2 分为棕黄色; 3 分为棕褐色。按阳性细胞的比例评分: 每张切片随机观察 4 个高倍视野(×400), 计数阳性细胞与总细胞的比值, 阳性细胞数 < 5% 为 0 分, 5% ~ 25% 为 1 分, 26% ~ 50% 为 2 分, > 50% 为 3 分。综合两种评分, 取分值较少的作为最终判定结果: 0 分为阴性(-), 1 分为弱阳性(+), 2 分为阳性(++), 3 分为强阳性(+++). 结果由 2 名病理科医师进行盲法判读, 对判读不一致的病例取平均值或协商决定。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行分析, 采用非参数检验(Mann-Whitney U Test)比较两组胃癌 c-Met 及 VEGF 表达差异; 采用 Spearman 等级相关分析 c-Met 与 VEGF 间的相关性; 采用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法对 c-Met、VEGF 表达与临床病理因素的关系以及两组胃癌性别、年龄的组间差异进行检验; 对于不同 Lauren 分型与 c-Met、VEGF 表达的差异采用 Kruskal-Wallis 检验和两两比较的秩和检验(*t* 检验)法。

2 结果

2.1 试验组与对照组中 c-Met 和 VEGF 蛋白的表达 c-Met 蛋白在癌组织中阳性染色主要定位于细胞膜和胞质内, 为棕黄色或棕褐色颗粒(图 1A); VEGF 蛋白在癌组织中阳性染色主要定位于细胞质, 呈棕黄色或棕褐色颗粒(图 1B)。c-Met 蛋白在试验组与对照组中阳性表达率为 85.7% (18/21)、71.4% (15/21), 差异有统计学意义($P < 0.05$); VEGF 蛋白在试验组与对照组中阳性表达率为 76.2% (16/21)、47.6% (10/21), 差异有统计学意义($P < 0.05$) ,见表 1。

2.2 c-Met 和 VEGF 蛋白在 AFPGC 组织中表达的相关性 c-Met、VEGF 在 AFPGC 中的表达呈正相

关系($r_s = 0.621, P < 0.05$) ,见表 2。

表1 AFPGC 与普通胃癌组织中 c-Met、VEGF 蛋白的表达情况($n = 21$)

组别	c-Met				阳性率 (%)	P 值	VEGF				阳性率 (%)	P 值
	-	+	++	+++			-	+	++	+++		
试验	3	5	3	10	85.7	0.022	5	5	7	4	76.2	0.013
对照	6	8	5	2	71.4		11	7	2	1	47.6	

表2 AFPGC 组织中 c-Met 和 VEGF 表达的相关性(n)

VEGF	c-Met				合计
	-	+	++	+++	
-	2	2	0	1	5
+	0	3	1	1	5
++	1	0	2	4	7
+++	0	0	0	4	4
合计	3	5	3	10	21

2.3 c-Met 和 VEGF 蛋白表达与临床病理因素的关系 经 χ^2 和 Fisher 确切概率法检验, AFPGC 组织中 c-Met、VEGF 表达与患者年龄、性别、肿瘤位置、分化程度、淋巴结转移、肝转移、Lauren 分型、总生存时间、AFP 水平等无统计学意义。见表 3。随后将 c-Met、VEGF 表达情况与 Lauren 分型的关系进一步分析, 采用 Kruskal-Wallis 检验和两两比较的秩和检验(*t* 检验)法比较不同 Lauren 分型与 c-Met、VEGF 表达是否有差异。c-Met 表达与 Lauren 分型有关($P < 0.05$)。在肠型 AFPGC 中表达显著高于弥漫型($t = 3.97, P < 0.05$)及混合型($t = 2.82, P < 0.05$)。而 VEGF 表达与 Lauren 分型无明显相关性。见表 4。

3 讨论

AFP GC 不同于普通胃癌, 其恶性度高、进展快、易转移、预后差, 被认为是一种特殊类型的胃癌。目前 AFP GC 的治疗更多的是借鉴普通胃癌, 但疗效逊于普通胃癌。随着分子生物学的发展, 分子靶向药

表3 VEGF、c-Met 的表达与临床病理因素的关系

临床特征	n	c-Met			VEGF		
		阳性	阴性	P 值	阳性	阴性	P 值
性别							
男	18	15	3	>0.05	14	4	>0.05
女	3	3	0		2	1	
年龄(岁)							
≤60	8	7	1	>0.05	6	2	>0.05
>60	13	11	2		10	3	
位置							
胃底	11	10	1		9	2	
胃体	2	1	1	>0.05	0	2	>0.05
胃窦	8	7	1		7	1	
分化程度							
低分化	14	13	1		11	3	
中分化	7	5	2	>0.05	5	2	>0.05
高分化	0	0	0		0	0	
淋巴结转移							
无	4	4	0	>0.05	4	0	>0.05
有	17	14	3		12	5	
肝转移							
无	8	8	0	>0.05	7	1	>0.05
有	13	10	3		9	4	
分期							
I - II	0	0	0	>0.05	0	0	>0.05
III - IV	21	18	3		16	5	
Lauren 分型							
肠型	9	9	0		8	1	
弥漫型	10	7	3	>0.05	8	2	>0.05
混合型	2	2	0		0	2	
生存时间(周)							
>20	12	11	1	>0.05	10	2	>0.05
≤20	9	7	2		6	3	
AFP(μg/L)							
>100	17	14	3	>0.05	13	4	>0.05
≤100	4	4	0		4	0	

* 在此将 AFPGC 肝样型归为低分化、弥漫型(Lauren 分型)。

表4 c-Met、VEGF 表达与 Lauren 分型的关系(n)

Lauren 分型	n	c-Met				P 值	VEGF				P 值
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
肠型	9	0	0	1	8		1	1	5	2	
弥漫型	10	3	3	2	2	0.004	2	4	2	2	0.082
混合型	2	0	2	0	0		2	0	0	0	

物应用于临床, 研究者们逐渐将精力集中在研究不同肿瘤细胞分子标志物表达的差异上, 期望在分子水平探讨肿瘤之间的差异。对于 AFPGC 与普通胃癌之间也是如此。

c-Met 蛋白是一种具有酪氨酸激酶活性的跨膜蛋白, 是由原癌基因 c-Met 编码表达的一种膜受体, 被认为是肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF) 的唯一受体。c-Met 与 HGF 结合并呈现高水

平的二聚化和自体磷酸化, 从而激活下游信号通路, 促进细胞的生长、扩散和运动、侵袭、抑制细胞凋亡和血管生成等。此外, c-Met 还可以不依赖 HGF 而被激活, Met 蛋白的高表达可能是由于 c-Met 基因的扩增、转录增强或转录后机制造成。研究^[4]显示许多肿瘤细胞中 c-Met 过度表达。在肺癌治疗中发现 Met 基因扩增与分子靶向药物的耐药性相关^[5]。孙燕来等^[6]发现 HGF 及 c-Met 可能与肠癌肝转移有关。可见 c-Met 的临床价值潜力巨大。本实验显示 c-Met 在 AFPGC 中表达显著高于普通胃癌, 与国外研究^[7]结果基本一致。可能由于样本量较少, 仅显示 c-Met 表达与 Lauren 分型有关, 而未表明其与患者年龄、性别、肿瘤位置、分化程度、淋巴结转移、肝转移、生存时间、AFP 水平等因素相关。Lauren 分型中肠型 AFPGC 易表达 c-Met。早前研究^[8]就表明 c-Met 基因在肠型胃癌中的变化是以扩增和过表达为主, 肠化及不典型增生胃黏膜 c-Met 基因过表达呈高水平, 与胃黏膜癌变过程的发生和发展是密切相关的。c-Met 是否与不同 Lauren 分型预后不同有关, 值得进一步研究。

VEGF 是目前已知作用最强、专属性最高的促血管内皮细胞增殖和促血管生成因子。AFPGC 细胞易表达 VEGF, 弥海宁等^[9]发现 VEGF 阳性表达率在 AFPGC 组织中为 90.5% (19/21), AFP 阴性胃癌组织中为 67.2% (162/241), 差异有统计学意义。Kamei et al^[10]研究表明 AFPGC 易发生淋巴结转移可能与 AFPGC 组织中 VEGF, 尤其是 VEGF-C 表达明显升高有关, 并与 AFP 水平呈正相关。本研究亦显示 VEGF 在 AFPGC 中表达高于普通胃癌, 但未能证明 VEGF 与 AFPGC 临床病理特征之间的关系。

在 AFPGC 组织中, c-Met 表达与 VEGF 表达呈正相关关系。相关文献^[11]也表明 HGF 与其受体 c-Met 结合可促进 VEGF 的表达, 而 VEGF 为主要的促血管生成因子, 故 c-Met 和 VEGF 可能在促进新生血管形成方面具有协同作用。

参考文献

- [1] Bourreille J, Metayer P, Sauger F, et al. Existence of alpha-feto-protein during gastric-origin secondary cancer of the liver [J]. Presse Med, 1970, 78(28): 1277-8.
- [2] Hirajima S, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Liver metastasis is the only independent prognostic factor in AFP-producing gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(36): 6055-61.

- [3] Kinjo T, Taniguchi H, Kushima R, et al. Histologic and immunohistochemical analyses of α -fetoprotein producing cancer of the stomach [J]. *Am J Surg Pathol*, 2012, 36(1): 56–65.
- [4] Sierra J R, Tsao M S. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2011, 3(S1): S21–S35.
- [5] Engelman J A, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling [J]. *Science*, 2007, 316(5827): 1039–43.
- [6] 孙燕来, 李增军, 徐忠法. 肝细胞生长因子及其受体 c-Met 表达与结直肠癌同时性肝转移的相关性研究 [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2014, 17(6): 598–601.
- [7] Amemiya H, Kono K, Mori Y, et al. High frequency of c-Met expression in gastric cancers producing alpha-fetoprotein [J]. *Oncology*, 2000, 59(2): 145–51.
- [8] Wu C W, Li A F, Chi C W, et al. Hepatocyte growth factor and Met/HGF receptors in patients with gastric adenocarcinoma [J]. *Oncol Rep*, 1998, 5(4): 817–22.
- [9] 弥海宁, 赵晓宁, 杨言苹. AFP 在胃癌中的表达意义及其与 VEGF 的关系 [J]. *现代肿瘤医学*, 2011, 19(1): 106–8.
- [10] Kamei S, Kono K, Amemiya H, et al. Evaluation of VEGF and VEGF-C expression in gastric cancer cells producing alpha-fetoprotein [J]. *J Gastroenterol*, 2003, 38(6): 540–7.
- [11] Lin Y M, Huang Y L, Fong Y C, et al. Hepatocyte growth factor increases vascular endothelial growth factor-A production in human synovial fibroblasts through c-Met receptor pathway [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50924.

The expression and significance of c-Met, VEGF in the AFP-positive gastric cancer

Fang Yu¹, Wang Lin¹, Li Guimei², et al

(¹Dept of Medical Oncology, ²Dept of Pathology, Anhui Medical University Affiliated 81 Hospital of PLA, Nanjing 210002)

Abstract Objective To investigate the expression of c-Met and vascular endothelial growth factor(VEGF) in the alpha fetoprotein(AFP) -positive gastric cancer, and to explore the relationship between expression of c-Met and VEGF with clinicopathological features of AFP-positive gastric cancer. **Methods** A total of 21 cases AFP-positive gastric cancer tissues were selected as a test group, while collected 21 cases ordinary gastric, which had consistency with AFP-positive gastric cancer in stage as a control group. The expressions of c-Met and VEGF were detected by immunohistochemistry, then the differences of c-Met, VEGF expression in two kinds of tumor were analyzed and compared. **Results** The positive expression rates of c-Met protein in AFP-positive gastric cancer and ordinary gastric carcinoma were 85.7% (18/21) and 71.4% (15/21), respectively. The positive expression rates of VEGF protein were 76.2% (16/21) and 47.6% (10/21), respectively. Compared with ordinary gastric cancer, AFP-positive gastric cancer was significantly higher than the former in the expression of VEGF and c-Met protein ($P < 0.05$). Spearman rank correlation analysis showed that c-Met and VEGF expressions were positively correlated ($r_s = 0.621, P < 0.05$) in the AFP-positive gastric carcinoma. AFP-positive gastric cancer, which was intestinal type by the Lauren classification, was more likely to express c-Met. The expressions of c-Met and VEGF were not significantly associated with the clinicopathological features in AFP-positive gastric cancer, such as age, sex, tumor location, degree of differentiation, lymph node metastasis, liver metastasis, survival time and AFP levels. **Conclusion** The expressions of c-Met and VEGF in AFP-positive gastric cancer tissues are significantly higher than ordinary gastric cancer tissues. They may be involved in the occurrence and development of AFP-positive gastric cancer and have synergistic effect on pro-angiogenesis.

Key words gastric cancer; alpha-fetoprotein; VEGF; c-Met