

MACC1和c-met在非小细胞肺癌中的表达及其预后价值

胡兴胜 付曦 文世民 邹心怡 刘雨松

【摘要】背景与目的 已有的研究表明结肠癌转移相关基因1 (metastasis-associated in colon cancer 1, MACC1) 是一个与肿瘤浸润转移相关的新基因, 该基因能够调节肝细胞生长因子受体 (hepatocyte growth factor receptor, c-met) 的表达。本研究旨在探讨MACC1和c-met在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 组织中的表达及其与浸润转移和预后的关系。方法 采用免疫组化检测103例NSCLC组织及40例癌旁正常组织中MACC1和c-met蛋白的表达。结果 MACC1和c-met在NSCLC组中的阳性表达率均明显高于正常肺组织 ($P<0.001$)。MACC1和c-met阳性率均与肺癌的分化程度、T分期、淋巴结转移和TNM分期相关 ($P<0.05$), 而与性别、年龄、吸烟及组织学类型等无关 ($P>0.05$)。MACC1和c-met的表达呈正相关 ($r=0.403, P<0.001$)。Kaplan-Meier生存曲线显示MACC1和c-met阳性组5年生存率均明显低于阴性组 ($P<0.05$)。Cox多因素分析显示MACC1是NSCLC的独立预后因素 ($P=0.026$)。结论 MACC1和c-met的表达与肺癌的分化、浸润和转移密切相关, 两者均对生存期有一定的影响, MACC1是NSCLC的独立预后危险因素。

【关键词】 肺肿瘤; MACC1; c-met; 浸润; 转移; 预后

【中图分类号】 R734.2

Prognostic Value of MACC1 and c-met Expressions in Non-small Cell Lung Cancer

Xingsheng HU¹, Xi FU¹, Shimin WEN¹, Xinyi ZOU², Yusong LIU³

¹Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637900, China;

²Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Care Service Centre of Shifang, Shifang 618400, China;

³Department of Clinical Laboratory, The People's Hospital of Shifang, Shifang 618400, China

Corresponding author: Xi FU, E-mail: 2434771363@qq.com; Shimin WEN, E-mail: wensmin@yahoo.cn

【Abstract】 Background and objective It has been proven that metastasis-associated in colon cancer 1 (MACC1) is a new gene that is related to the invasion and metastasis of tumors. MACC1 also regulates c-met expression. The aim of this study is to explore the expressions of MACC1 and hepatocyte growth factor receptor (c-met), and its relationship with invasion, metastasis, and prognosis of non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** MACC1 and c-met expressions were detected in 103 cases of NSCLC and 40 cases of neighboring normal lung cancer tissue using immunohistochemistry. **Results** MACC1 and c-met expressions were significantly higher in lung cancer tissues than that in neighboring normal tissue ($P<0.001$). MACC1 and c-met expressions were associated with poor differentiation, advanced T stages, lymph node metastasis, and advanced TNM stages ($P<0.05$) of NSCLC, but not with sex, age, smoking, and histological classification ($P>0.05$). In addition, a positive correlation between MACC1 and c-met expressions was observed ($r=0.403, P<0.001$). The result from the Kaplan-Meier survival analysis showed that the five-year survival rate in patients with positive MACC1 and c-met expressions was remarkably lower than that in patients with negative expressions ($P<0.05$). The result from the Cox regression analysis showed that MACC1 expression was an independent prognostic factor for NSCLC ($P=0.026$). **Conclusion** MACC1 and c-met have an important function in the differentiation, invasion, and metastasis of NSCLC. MACC1 and c-met have poor prognosis in patients with NSCLC. Moreover, MACC1 expression is an independent prognostic factor for NSCLC.

【Key words】 Lung neoplasms; MACC1; c-met; Invasion; Metastasis; Prognosis

作者单位: 637900 南充, 川北医学院第二临床学院肿瘤科 (胡兴胜, 付曦, 文世民); 618400 什邡, 什邡市妇幼保健院检验科 (邹心怡); 618400 什邡, 什邡市人民医院检验科 (刘雨松) (通讯作者: 付曦, E-mail: 2434771363@qq.com; 文世民, E-mail: wensmin@yahoo.cn)

目前, 肺癌死亡率已位居男、女性恶性肿瘤的第一位^[1], 全球每年至少有160万的新发病例和130万的死亡病例。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 约占肺癌总数的80%。浸润和转移是恶性肿瘤最重要的生物学特征之一, 亦是导致患者死亡的主要原因。肺癌

易发生浸润和转移,其5年生存率低。目前有关肺癌浸润转移的机制尚不完全清楚,因此探索与肺癌浸润转移尤其是与预后相关的生物学指标,显得尤为重要。研究^[2]表明,结肠癌转移相关基因1 (metastasis-associated in colon cancer 1, MACC1) 是2009年新发现的,能够预测肿瘤浸润转移及预后的新基因,其机制可能与调节肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF, 又称离散因子) 及其受体c-met表达有关。为此,我们采用免疫组化联合检测了MACC1和c-met在NSCLC组织中的表达情况,并分析了它们与肺癌临床病理特征及预后的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 选取2003年1月-2006年1月在川北医学院第二临床学院胸心外科手术标本103例和同期40例距离癌肿边缘5 cm以上的正常组织。所有患者术前均未化疗或放疗,有完整的临床资料和明确的术后病理诊断。其中男性77例,女性26例;<60岁51例,≥60岁52例;不吸烟42例,吸烟61例;鳞癌56例,腺癌47例;高分化15例,中分化68例,低分化20例;T1期+T2期78例,T3期+T4期25例;N0期70例,N1,2,3期33例;I期56例,II期12例,III期35例。

随访: 所有患者每3个月均进行电话、门诊或住院部随访,随访开始于2003年4月,2011年1月结束,最短随访时间为4个月,最长随访时间为5年。期间有9例失访。

1.2 免疫组化检测MACC1和c-met蛋白的表达 手术标本经10%甲醛固定后,常规石蜡包埋、切片,厚度4 μm。采用免疫组化SP法(兔抗人MACC1多克隆抗体购自美国Sigma公司,兔抗人c-met多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,免疫组化二抗SP试剂盒购自北京中杉生物公司)。用PBS液代替一抗作为阴性对照,按照试剂说明书进行操作。结果判断:所有切片均采用双盲法由两位病理科医师独立阅片。MACC1和c-met阳性表达均定位于细胞浆和细胞膜,呈浅黄色、黄色或棕黄色。随机选择10个高倍镜视野(400倍),每个视野连续计数100个细胞,共计数1,000个细胞。最后表达以染色强度和阳性细胞率的得分之和进行判断:无染色记0分,弱染色记1分,中等染色记2分,强染色记3分;阳性细胞率<5%记0分,5%-25%记1分,26%-50%记2分,>50%记3分。上述两项评分相加,<3分为阴性,≥3分为阳性。

1.3 统计学处理 采用SPSS 17.0统计学软件包分析。率的比较采用 χ^2 检验或Fisher精确检验,单因素生存分析采用Kaplan-Meier生存曲线和Log-rank检验,多因素生存分析采用Cox多因素分析模型,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MACC1和c-met蛋白检测结果 MACC1和c-met在癌组中的阳性率分别为67.9% (70/103) 和68.9% (71/103),均明显高于其在正常组织中的表达5.0% (2/40) ($\chi^2=45.684, P<0.001$) 和7.5% (3/40) ($\chi^2=43.545, P<0.001$) (图1)。

2.2 MACC1蛋白表达与肺癌临床病理特征的联系 统计学结果显示,MACC1和c-met的阳性率均随肿瘤分化程度的降低、T分期的增加、淋巴结转移和TNM分期的增加而增加 ($P<0.05$),而与性别、年龄、吸烟及组织学类型等无关 ($P>0.05$) (表1)。

2.3 MACC1和c-met相关性分析 经Spearman秩相关分析发现,在103例肺癌组织中MACC1和c-met的表达呈正相关, ($r=0.403, P<0.001$)。

2.4 生存分析 Kaplan-Meier生存曲线显示,MACC1阳性组的5年生存率为19.5%,明显低于阴性组的59.9% ($\chi^2=15.093, P<0.001$)。c-met阳性组5年生存率为25.4%,明显低于阴性组的48.3% ($\chi^2=8.230, P=0.004$) (图2)。

2.5 Cox多因素回归分析 Kaplan-Meier单因素分析发现,分化程度、T分期、淋巴结转移、TNM分期均与患者的生存期相关,故均纳入Cox多因素分析模型。Cox多因素分析结果显示,只有MACC1 ($P=0.026$) 和TNM分期 ($P=0.004$) 是肺癌患者的独立预后危险因素,其相对危险度 (relative risk, RR) 分别为2.178 (95%CI: 1.097-4.327) 和2.230 (95%CI: 1.288-3.860),而c-met表达不是患者的独立危险因素 ($P>0.05$) (表2)。

3 讨论

MACC1基因定位于人染色体7p21.1。该基因是2009年由Stein等^[2]发现并命名的一个新基因,研究表明它与结肠癌的浸润、转移及预后密切相关。Stein检测到MACC1在结肠癌组织中表达异常增高,在有远处转移病例中其表达明显高于无转移者,MACC1高表达者5年

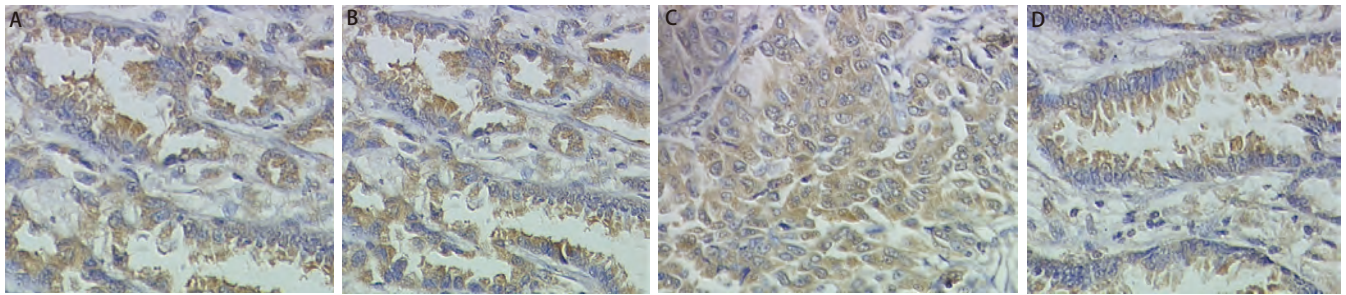


图1 免疫组化检测MACC1在肺鳞癌(A)和腺癌(B)以及c-met在肺鳞癌(C)和腺癌(D)组织中的阳性表达(×400)

Fig 1 The positive expression of MACC1 in lung squamous carcinoma (A) and adenocarcinoma (B), c-met in lung squamous carcinoma (C) and adenocarcinoma (D) tissue by immunohistochemistry (×400).

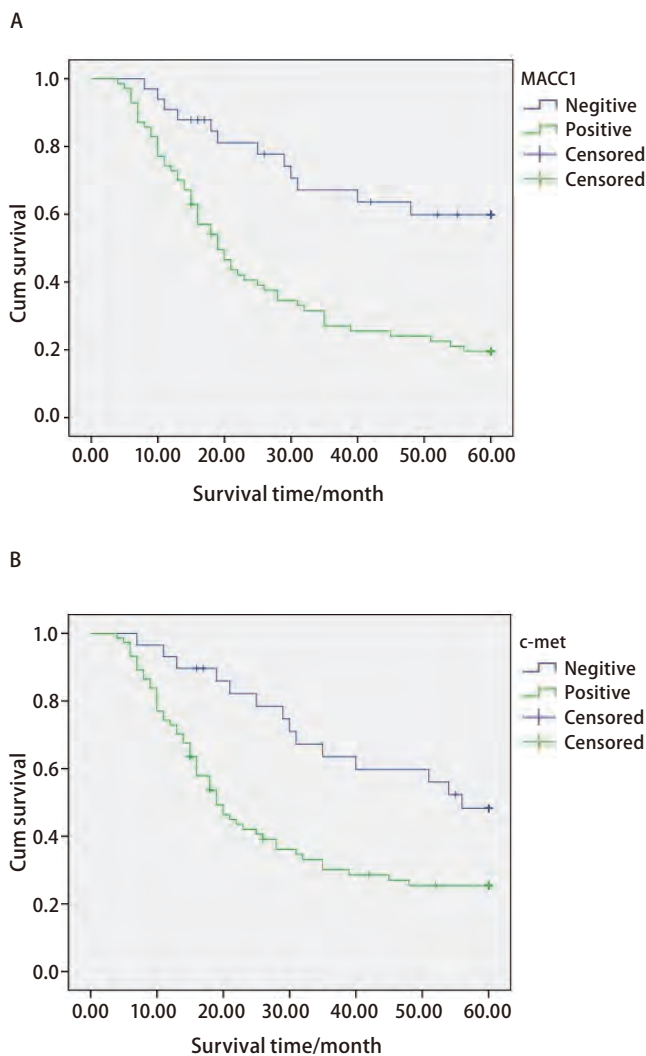


图2 Kaplan-Meier累计生存时间曲线分析。A: MACC1表达阳性和阴性NSCLC患者; B: c-met表达阳性和阴性NSCLC患者。

Fig 2 Kaplan-Meier cumulative survival time curves analysis. A: MACC1 positive and negative expression group of NSCLC patients; B: c-met positive and negative expression group of NSCLC patients; NSCLC: non-small cell lung cancer.

生存率为15%明显低于低表达者的80%，且是结肠癌转移的独立预后指标。后来研究表明，MACC1在胃癌^[3]、肝癌^[4-5]、卵巢癌^[6]、肺腺癌^[7]、前列腺癌^[8]等腺癌组织及膀胱移行细胞癌^[9]、脑胶质瘤^[10]、小细胞肺癌细胞系^[11]等非腺癌组织中过表达，并且与浸润转移密切相关。MACC1高表达的肝癌组患者总生存率和无病生存率均明显低于低表达组^[5]。在肺癌的研究中，Chundong等^[7]采用免疫组化方法对197例手术后肺腺癌患者研究结果显示，MACC1的阳性率为65.5%，在复发组中的阳性率为82.5% (33/40)，明显高于非复发组的61.1% (96/157)，阳性组无病生存期较阴性组降低。杨淑慧等^[11]观察到MACC1在小细胞肺癌细胞系中高表达，用MACC1 siRNA抑制其表达后，能明显抑制癌细胞的增殖迁移能力。

HGF是一种多功能细胞活性因子，具有很强的促有丝分裂作用，可诱导上皮细胞和成纤维细胞发生离散和运动。c-met是由原癌基因编码的HGF受体，主要在各种上皮细胞中表达。c-met编码了酪氨酸激酶，可调节肿瘤细胞侵袭性生长。HGF须与c-met受体结合方能发挥作用，两者结合导致两个酪氨酸残端在羧基端的磷酸化，引起一系列信号转导蛋白的酶促反应，从而调节相应的生物学行为，如细胞的运动等。正常的HGF/c-met通路在调节胚胎发育及组织损伤修复，而异常激活促进肿瘤的转移。HGF/c-met在多种恶性肿瘤组织中异常表达，并且与肿瘤的进展密切相关^[12,13]。

MACC1是HGF/c-met信号通路的一个关键调节因子。c-met已被证明是MACC1的转录子靶点^[2]，它能够通过扩增和(或)变异而不依赖与HGF的结合来激活。MACC1调节c-met的机制，可能是与c-met启动子区的SP1位点结合，从而激活c-met，促进其转录。HGF与c-met

表 1 MACC1和c-met的表达与NSCLC的临床病理特征联系

Tab 1 Correlation of MACC1 and c-met expression with clinicopathologic characteristics of NSCLC

Variable	n	MACC1+ (%)	χ^2	P	c-met+ (%)	χ^2	P
Sex			0.666	0.414		0.666	0.414
Male	77	56 (72.7%)			56 (72.7%)		
Female	26	21 (80.8%)			21 (80.8%)		
Age (year)			0.320	0.571		0.025	0.875
<60	51	36 (70.6%)			37 (72.5%)		
≥60	52	34 (65.4%)			37 (71.2%)		
Smoking			1.195	0.274		0.006	0.938
No	42	26 (61.9%)			30 (71.4%)		
Yes	61	44 (72.1%)			44 (72.1%)		
Pathological type			0.064	0.800		0.604	0.437
Squamous carcinoma	56	30 (53.6%)			42 (75.0%)		
Adenocarcinoma	47	24 (51.1%)			32 (68.1%)		
Differentiation			5.536	0.019		4.044	0.044
Well and moderate	83	52 (62.7%)			56 (67.5%)		
Poor	20	18 (90.0%)			18 (90.0%)		
T stage			3.900	0.048		4.260	0.039
T1-T2	78	49 (62.8%)			52 (66.7%)		
T3-T4	25	21 (84.0%)			22 (88.0%)		
Lymphatic metastasis			4.282	0.039		4.059	0.044
N0	70	43 (61.4%)			46 (65.7%)		
N1-N2	33	27 (81.8%)			28 (84.8%)		
TNM stages			7.674	0.006		5.042	0.025
I+II	68	40 (58.8%)			44 (64.7%)		
III	35	30 (85.7%)			30 (85.7%)		

表 2 Cox方程中的变量

Tab 2 Cox variables in the Equation

Variables	B	SE	Wald	df	Sig.	RR	RR (95%CI)	
							Lower limit	Upper limit
MACC1	0.779	0.350	4.943	1	0.026	2.178	1.097	4.327
c-met	0.236	0.338	0.487	1	0.485	1.266	0.653	2.455
TNM stages	0.802	0.280	8.209	1	0.004	2.230	1.288	3.860
Lymphatic metastasis	0.663	0.474	1.956	1	0.162	1.940	0.767	4.909
T stages	0.170	0.192	0.785	1	0.376	1.185	0.814	1.727
Differentiation	0.275	0.230	1.421	1	0.233	1.316	0.838	2.067

RR: relative risk.

结合后，能启动下游3条信号途径：①磷脂酰肌醇3-激酶（PI3K）；②信号转导及转录激活因子（STAT）；③有丝分裂原活化激酶（MAPK）。这3条通路是细胞核内主要转录机构，从而促使肿瘤细胞增殖、运动、浸润、转移及血管生成等。另外，MACC1还可通过促进细胞外

基质的降解、调节细胞骨架的结构^[8]等方面，促进肿瘤的浸润和转移。

本研究结果显示，MACC1和c-met蛋白均在NSCLC组织中呈过表达。虽然文献多数报道MACC1在腺癌中高表达，但本研究首次报道了其在鳞癌组织中的高表达，

与腺癌组织中的表达无统计学差异, 这可能与MACC1 (与c-met相关) 在肿瘤的发展过程中普遍起作用相关, 这已在膀胱癌^[9]、脑胶质瘤^[10]、小细胞肺癌细胞系^[11]非腺癌中得到证实。本研究表明, MACC1和c-met蛋白的异常表达均与肺癌的分化程度、T分期、淋巴结转移和TNM分期密切相关, 与文献报道基本一致。T分期是肿瘤体积的大小和侵袭能力的综合反应, 提示MACC1参与了肿瘤的分化、增殖、侵袭和转移等。本研究中MACC1和c-met的表达呈正相关 ($r=0.403, P<0.001$), 与Zhang^[6]在卵巢癌中的报道 ($r=0.429, P=0.002$) 基本一致, 但高于Qiu^[5]在肝癌中对两者mRNA检测的报道 ($r=0.235, P=0.009$), 导致这种差异可能与肿瘤的类型、蛋白/mRNA检测的差异及样本量有关。本研究生存分析显示, MACC1和c-met的高表达均预示肺癌的不良预后, 其中MACC1是肺癌独立预后危险因素, 这与Stein^[2]在结肠癌、Qiu^[5]在肝癌及Chundong^[7]在肺腺癌中的报道基本一致, 提示MACC1可能是肿瘤的一个重要独立预后分子指标。

综上所述, 我们的研究揭示了MACC1和c-met均在肺癌组织中过表达, 其表达与肺癌的分化、浸润转移相关, 它们对生存期均有一定的影响, 而MACC1可能是肺癌的一项新的独立预后指标。因此, 通过检测MACC1和c-met的表达可以更好的判断肺癌的恶性程度和预后, 设想通过抑制MACC1的表达, 抑制肿瘤浸润转移等, 改善肺癌的不良预后, 为肿瘤的靶向治疗提供新的靶点, 为肿瘤发病机制的研究提供新的思路。

参 考 文 献

- Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- Stein U, Walther W, Arlt F, *et al.* MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis. *Nature Med*, 2009, 15(1): 59-67.
- Shirahata A, Sakata M, Kitamura Y, *et al.* MACC 1 as a marker for peritoneal-disseminated gastric carcinoma. *Anticancer Res*, 2010, 30(9): 3441-3444.
- Shirahata A, Fan W, Sakuraba K, *et al.* MACC1 as a marker for vascular invasive hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*, 2011, 31(3): 777-780.
- Qiu J, Huang P, Liu Q, *et al.* Identification of MACC1 as a novel prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *J Transl Med*, 2011, 9: 166.
- Zhang R, Shi H, Chen Z, *et al.* Effects of metastasis-associated in colon cancer 1 inhibition by small hairpin RNA on ovarian carcinoma OVCAR-3 cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30: 83.
- Chundong G, Uramoto H, Onitsuka T, *et al.* Molecular diagnosis of MACC1 status in lung adenocarcinoma by immunohistochemical analysis. *Anticancer Res*, 2011, 31(4): 1141-1145.
- Lv X. The effect of MACC1 on invasion and metastasis in prostate cancer cell lines (1E8/2B4). Wu Han. Huazhong University of Science and Technology. 2011. [吕焯. MACC1对前列腺癌体外侵袭转移能力的影响[M]. 武汉. 华中科技大学. 2011.]
- Wu J, Zhang X, Zhu YL. The expression of MACC1 in bladder carcinoma and clinic significance. *Jiangsu Yi Yao*, 2011, 37(1): 101-102. [吴健, 张昶, 朱亚宁. MACC1在膀胱癌中的表达及临床意义. *江苏医药*, 2011, 37(1): 101-102.]
- Shang C, Hong Y, Xue YX. The expression of MACC1 gene in brain glioma and the influence to apoptosis in U87 cell. *Jie Pou Xue Jin Zhan*, 2011, 17(1): 1-3. [尚超, 洪杨, 薛一雪. MACC1基因在脑胶质瘤中的表达及其对U87细胞凋亡和增殖的影响. *解剖科学进展*, 2011, 17(1): 1-3.]
- Yang SH, Long YM, Wang YX, *et al.* Influence of MACC1 gene expression on the proliferation and migration of SBC-5 lung cancer cells. *Xian Dai Zhong Liu Yi Xue*, 2011, 19(4): 633-636. [杨淑慧, 龙摇敏, 王摇希, 等. MACC1基因siRNA对肺癌SBC-5细胞增殖和迁移的影响. *现代肿瘤医学*, 2011, 19(4): 633-636.]
- Eder JP, Vande Woude GF, Boerner SA, *et al.* Novel therapeutic inhibitors of the c-met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(7): 2207-2214.
- Graveel CR, DeGroot JD, Su Y, *et al.* Met induces diverse mammary carcinomas in mice and is associated with human basal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12909-12914.

(收稿: 2012-04-06 修回: 2012-06-02)

(本文编辑 丁燕)