

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.12.009

MACC1 和 C-Met 在口腔白斑和口腔鳞状细胞癌中的表达及意义*

王 彬 张兴伟 颜炳坤 赵鹏飞 陈 东 焦晓辉[△]

(哈尔滨医科大学口腔医学院口腔颌面外科二病房 黑龙江 哈尔滨 150000)

摘要 目的:探讨分析 MACC1 和 C-Met 在正常口腔黏膜、口腔白斑及口腔鳞状细胞癌中的表达及其临床意义。**方法:**采用免疫组化 SP 法检测 20 例口腔黏膜、20 例上皮异常增生白斑、50 例口腔鳞癌组织中的 MACC1、C-Met 蛋白的表达情况,采用 X² 和 spearman 等级相关分析对结果进行判定。**结果:**MACC1、C-Met 蛋白在异常增生型白斑和口腔鳞癌中的阳性表达率分别为 50%、76%、35%、66%,均明显高于正常口腔黏膜(17.6%、5.0%),差异均有统计学意义(P<0.05)。MACC1 和 C-Met 蛋白表达与口腔鳞癌的分期、淋巴结转移及分化程度密切相关(P<0.05)。Spearman 等级相关分析显示口腔白斑及口腔鳞癌中 MACC1 和 C-Met 的表达呈现正相关(P<0.05)。**结论:**MACC1 和 C-Met 在上皮不典型增生性白斑和口腔鳞癌中高表达,二者在口腔黏膜白斑的癌变和口腔鳞癌的发生发展中可能起重要作用。

关键词:口腔白斑;口腔鳞癌;结肠癌转移因子 1;肝细胞生长因子受体

中图分类号:R739.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)12-2236-05

Expression and Significance of MACC-1 and C-Met in the Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma*

WANG Bin, ZHANG Xing-wei, YAN Bing-kun, ZHAO Peng-fei, CHEN Dong, JIAO Xiao-hui[△]

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Stomatology, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150000, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the expressions of MACC1 and C-Met in normal oral mucosa, oral leukoplakia (OLK) and oral squamous cell carcinoma (OSCC) and their clinical significances. **Methods:** Immunohistochemistry of SP method was used to detect the expressions of MACC1 and C-Met protein in 20 cases of normal oral mucosa, 20 cases of atypical epithelial proliferative leukoplakia, 50 cases of oral squamous cell carcinoma. **Results:** The positive expression rates of MACC1 and C-Met in atypical epithelial proliferative leukoplakia and oral squamous cell carcinoma (50%, 76% and 35%, 66% respectively) were significantly higher than those of the normal oral mucosa (17.6%, 5.0% respectively) (P<0.05). The expression of MACC1 and C-Met protein were associated with the malignant degree, lymph node metastasis and differentiation degree of oral squamous cell carcinoma (P<0.05). The results of Spearman analysis showed that MACC1 protein expression in oral squamous cell carcinoma and OLK tissue had positive correlation with C-Met protein expression (P<0.05). **Conclusion:** MACC1 and C-Met were highly expressed in epithelial dysplasia leukoplakia and oral squamous cell carcinoma, and they might play important roles in the carcinogenesis of oral leukoplakia and the occurrence and development of oral squamous cell carcinoma.

Key words: Oral leukoplakia; Oral squamous cell carcinoma; Metastasis-associated in colon cancer 1; C-met

Chinese Library Classification (CLC): R739.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)12-2236-05

前言

口腔白斑好发于中老年男性,上皮组织增生是其主要病理特点,是口腔黏膜最常见的癌前病变,约有 3%~5%的白斑会发展为口腔鳞癌^[1]。口腔鳞癌是头面及颈部较常见的恶性肿瘤,占口腔颌面部恶性肿瘤的比例高达 90%,由于口腔鳞癌常有淋巴结转移和浸润,患者五年生存率较低,预后差,其发病率目前处于上升趋势。

结肠癌转移相关因子 1 (metastasis-associated in colon cancer 1, MACC1) 是 Stein 等^[2]于 2009 年在对结肠癌的研究中发现的一种因子,在促使肿瘤细胞发生转移侵袭和增殖过程中与肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)/肝细胞生长因子受体 (C-Met) 信号传导通路有着密切的关系。但 MACC1、C-Met 在口腔鳞癌及口腔白斑的发生发展过程中的作用尚未见报道。本研究采用免疫组织化学 SP 法对 20 例正常口腔黏膜组织,20 例上皮异常增生性白斑、50 例口腔鳞癌组织中

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(D200835)

作者简介:王彬(1990-),男,硕士研究生,住院医师,主要研究方向:口腔颌面外科的临床治疗工作,E-mail: 1041319349@qq.com

[△] 通讯作者:焦晓辉,男,教授,主任医师,博士研究生导师,口腔颌面外科主任,电话:0451-85553926,E-mail: jiaoxiaohuidocor@163.com

(收稿日期:2016-11-02 接受日期:2016-11-30)

MACC1 和 C-Met 蛋白进行检测,探究 MACC1 和 C-Met 在口腔鳞癌和口腔白斑中的表达情况及两者的相关性,以期对口腔鳞癌的早期诊断和临床治疗提供新的参考和思路。

1 材料与方法

1.1 标本选择

选取 2009 年至 2011 年于哈尔滨医科大学附属第一医院病理科保存的 50 例口腔鳞癌组织及 20 例异常增生性白斑石蜡标本为研究对象,另取正常口腔黏膜组织 20 例作对照组。所有病例资料完整,其中肿瘤标本均为初发肿瘤原发病损,未经放化疗。

1.2 主要试剂

兔抗人多克隆 MACC1 抗体 (bs-4293R),兔抗人多克隆 C-Met 抗体 (bs-0668R),DAB 显色试剂盒以及 SP 免疫组化试剂盒均购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 实验方法

免疫组化染色采用免疫组化 SP 法,具体操作步骤按 SP 试剂盒说明书进行。石蜡标本 4 μm 连续切片,HE 染色观察组织病理学变化。应用免疫组化 SP 法检测 MACC1 和 C-Met 蛋白的表达情况,PBS 代替一抗作为阴性对照,实验步骤按照烤片-脱蜡至水-抗原修复-3% H_2O_2 封闭阻断内源性过氧化物酶-PBS 浸洗-加一抗-标记二抗孵育-DAB 显色-流水冲洗-苏木素复染-脱水透明封片的方法操作。

1.4 判定标准

MACC1 染色以细胞浆或者细胞核呈棕黄色,C-Met 染色以细胞膜或胞质呈棕黄色者为阳性细胞。随机选择 5 个视野

($\times 200$)观察,细胞数 $>500/\text{视野}$ 。1)按染色强度:无染色记为 0 分,浅黄色记为 1 分,棕黄色记为 2 分,棕褐色记为 3 分;2)按阳性细胞所占的比例计分: $<5\%$ 为 0 分,5%-25%记为 1 分,26%-50%记为 2 分, $>50\%$ 记为 3 分;两者相加, ≥ 3 分者为阳性, <3 分者为阴性。上述结果由两位病理学专家双盲独立阅片获得。

1.5 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计软件,各组间率的比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 法。统计学检验标准为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 不同组织中 C-Met 和 MACC1 的表达情况

C-Met 在口腔正常黏膜、异常增生性白斑、口腔鳞癌组织中阳性表达率分别为 5.0%(1/20)、35.0%(7/20)、66.0%(33/50),呈逐渐增高趋势,异常增生性白斑 C-Met 的表达显著高于口腔正常黏膜($P=0.0177$),口腔鳞癌 C-Met 的表达显著高于异常增生性白斑($P=0.0179$)及口腔正常黏膜($P<0.01$)。MACC1 在口腔正常黏膜、异常增生性白斑、口腔鳞癌组织中阳性表达率分别为 17.6%(3/20)、50.0%(10/20)、76.0%(38/50),呈逐渐增高趋势,异常增生性白斑 MACC1 的表达显著高于口腔正常黏膜($P=0.0181$),口腔鳞癌 MACC1 的表达显著高于异常增生性白斑($P=0.0343$)及口腔正常黏膜($P<0.01$)。

2.2 口腔鳞癌组织 C-Met 与 MACC1 与临床病理学特征的关系

如表 2 示,C-Met 与 MACC1 在口腔鳞癌中的表达与组织分化程度、淋巴结是否转移和临床分期均相关(均 $P<0.05$),与年龄、性别、吸烟史及肿瘤大小无相关性(均 $P>0.05$)。

表 1 C-Met 和 MACC1 在口腔正常黏膜组织、口腔白斑和口腔鳞癌组织中的表达

Table 1 The expressions of C-Met and MACC1 protein in normal oral mucosa, OLK and OSCC

Groups	n	C-Metpositive rate			MACC1 Positive rate		
		+	-	(%)	+	-	(%)
Normal oral mucosa	20	1	19	5.0	3	17	17.6
OLK	20	7	13	35.0*	10	10	50.0*
OSCC	50	33	17	66.0*	38	12	76.0*

Note: * $P<0.05$ compared with the normal oral mucosa.

2.3 口腔鳞癌组织中 C-Met 和 MACC1 表达的相关性分析

经 Spearman 相关性分析,口腔鳞癌组织中 C-Met 和 MACC1 的表达呈正相关($r=0.2886$, $P<0.01$,表 3)。

3 讨论

口腔白斑病理组织学上分为上皮单纯性增生和上皮异常增生,上皮异常增生性白斑恶变倾向较大,赵今^[3]等报道上皮异常增生白斑患者癌变率为 21.67%,因此本实验选取上皮异常增生性白斑病例。口腔黏膜从正常组织发展到口腔白斑、口腔鳞癌是多个因素的共同作用,病理过程是多个阶段和步骤的,与细胞的异常增殖凋亡密切相关。

MACC1 是一种新近发现的基因,定位于人染色体

7P21.1,其编码的 MACC1 蛋白包含四个结构域:ZU5,SH3 以及两个 C 末端死亡结构域 (death domains,DDs),DD 结构域可能与细胞增殖凋亡及信号的传导密切相关^[4]。既往研究显示其与结肠癌的侵袭、转移和患者的生存率密切相关,能够独立判断结肠癌患者的预后^[5]。MACC1 在肺癌、肝癌、胃癌等非腺体组织中过度表达,并与肿瘤浸润和转移密切相关^[6-8]。C-Met 是肝细胞生长因子(HGF)的受体,多见其表达在上皮细胞中,又由于肝细胞生长因子受体(C-Met)可以编码酪氨酸激酶,以致其能够调节肿瘤细胞的侵袭性。研究表明 C-Met 在舌鳞癌中呈过表达,与其临床分期和是否有淋巴结转移相关^[9]。

MACC1 基因结合与 MET 基因启动子近端约 60bp 的启动子片段上,能够控制 MET 启动子的活性和 C-Met 蛋白的表

表 2 C-Met 和 MACC1 的表达和口腔鳞癌临床病理特征的关系

Table 2 The correlation of C-Met and MACC1 expressions with the clinicopathological characteristics of OSCC

Projects	n	C-Met				MACC1			
		+	—	x ²	P	+	—	x ²	P
Gender									
Female	18	12	6	0.0056	0.9405	15	3	0.8292	0.3625
Male	32	21	11			23	9		
Age									
<60	29	18	11	0.4755	0.4905	22	7	0.0007	0.9786
≥ 60	21	15	6			16	5		
Smoking									
Yes	25	16	9	0.0891	0.7653	20	5	0.4386	0.5078
No	25	17	8			18	7		
Differentiation									
Well	27	14	13	5.2362	0.0221	17	10	5.4693	0.0194
Poor/Moderate	23	19	4			21	2		
Tumor size									
≤ 4 cm	30	19	11	1.6841	0.1942	24	6	0.6582	0.4173
>4 cm	20	14	6			24	6		
Clinical Stage									
I - II	30	16	14	5.3624	0.0206	19	11	7.7379	0.0054
III-IV	20	17	3			19	1		
Lymphatic Metastasis									
Yes	20	18	2	8.5561	0.0034	19	1	6.5972	0.0102
No	30	15	15			19	11		

表 3 口腔鳞癌中 C-Met 和 MACC1 表达的相关性分析

Table 3 Analysis of the association between expressions of C-Met and MACC1 in OSCC

c-Met	MACC1		Total	χ^2	r	p
	+	-				
+	28	5	33	14.6179	0.28866(p=0.0421)	0.0001
-	10	7	17			
Total	38	12	50			

达^[10],调节 HGF/c-met 信号转导通路^[11]。正常情况下,HGF/c-met 通路能够调节胚胎发育,并且参与受伤组织的修复,但 HGF/c-met 通路被异常激活时能够加速肿瘤细胞的浸润和转移^[12]。因此,在大多数的恶性肿瘤中 HGF/c-met 通路的表达都处于异常状态,并且其异常的程度与肿瘤的转移浸润及预后相关甚密。在 HGF/c-met 通路中 MACC1 作为调节因子起关键作用,其中 C-Met 作为 MACC1 转录的靶点,C-Met 和 MACC1 相结合后可以以变异或者扩增的方式来启动 HGF/c-met 传导通路,而这个过程可以完全不需要 HGF 的参与。但是 C-Met 和 MACC1 相结合的实现需要一个特异性的 Sp1 结合位点,是 MACC1 基因能够诱导 MET 基因以及激活 HGF/c-met 信号传

导通路的关键^[5,13]。Stein 等^[14]研究认为在 MACC1 与 HGF/c-met 信号传导通路间有一个正反馈环路:HGF 能够促使 MACC1 从细胞浆转移到细胞核内,在细胞核内 MACC1 就可以与 c-Met 启动子区的关键结合位点 Sp1 结合,C-Met 启动子被激活,相应的 c-Met 的转录就会上升,这时大量的 C-Met 就会结合更多的肝细胞生长因子,使得下游的信号通路得以激活,从而致使肿瘤细胞的活性增强,肿瘤组织生长加速,间质细胞中的肝细胞生长因子的表达也处于高表达状态,进而加速 MACC1 源源不断地从细胞浆转移到细胞核内,再激活 HGF/c-met 信号传导通路。因此,细胞内下游信号通路不断被激活。MACC1 能够通过 C-Met 启动子区的关键结合位点 Sp1 结合促进 C-Met 的

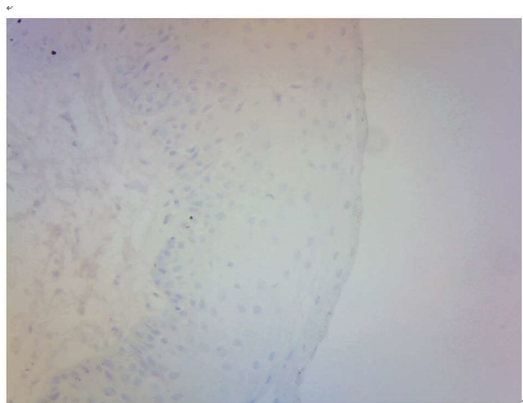
图1 C-Met 在正常口腔黏膜中的表达($\times 200$)

Fig.1 Expression of C-Met in normal oral mucosa

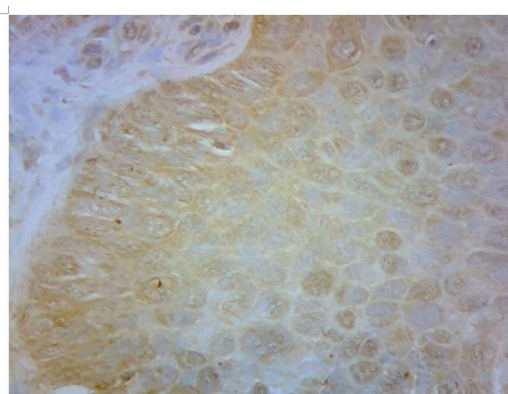
图2 C-Met 在白斑组织中的表达($\times 400$)

Fig.2 Expression of C-Met in OLK

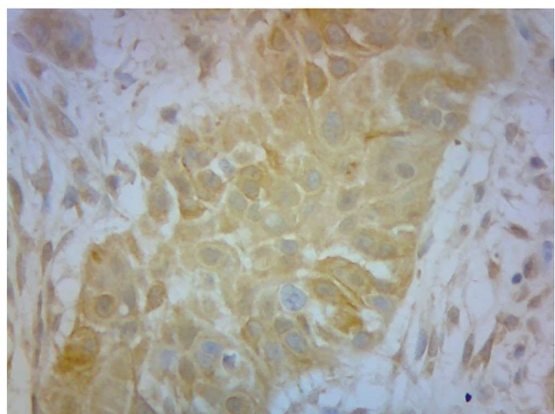
图3 C-Met 在口腔鳞癌组织中的表达($\times 400$)

Fig.3 Expression of C-Met in OSCC

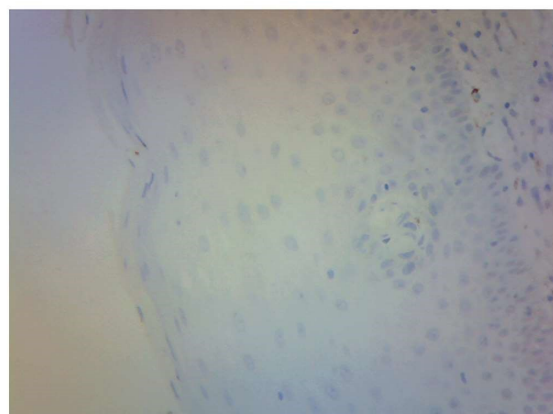
图4 MACC1 在正常口腔黏膜中的表达($\times 200$)

Fig.4 Expression of MACC1 in normal oral mucosa

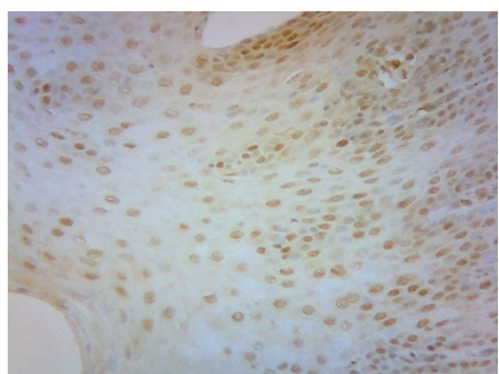
图5 MACC1 在白斑组织中的表达($\times 200$)

Fig.5 Expression of MACC1 in OLK

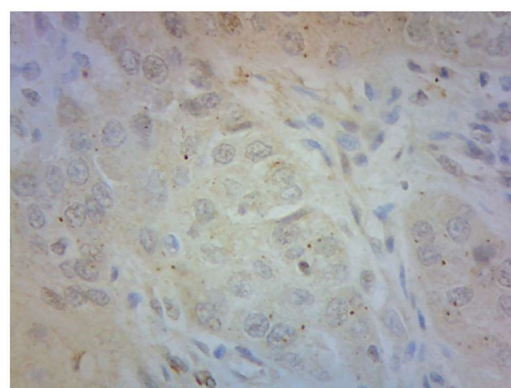
图6 MACC1 在口腔鳞癌组织中的表达($\times 400$)

Fig.6 Expression of MACC1 in OSCC

转录,C-Met 和 HGF 结合激活信号途径,其中细胞核是关键的转录场所,信号通路异常激活使得肿瘤细胞活性增强,加速侵袭转移和血管的生成^[15]。

本研究结果显示 MACC1 和 C-Met 蛋白在口腔鳞癌组织中都是呈现过表达状态,与既往的研究结果相一致^[16],并且 MACC1 和 C-Met 蛋白的异常表达与口腔鳞癌的组织分化、是否淋巴结转移以及临床分期相关。组织分化程度和临床分期可以反映口腔鳞癌侵袭的能力和破坏性,因而 MACC1 和 C-Met 两种蛋白可能参与了口腔鳞癌的发展、浸润和转移。此外,MACC1 和 C-Met 在口腔鳞癌中的表达呈正相关,与其在肺癌

及卵巢癌中的研究结果具有一致性^[16,17]。在脑胶质瘤和肾癌细胞中有研究显示 siRNA-MACC1 能够抑制细胞中 MACC1 蛋白的表达后,随之 C-Met 的表达也大幅度降低,肿瘤细胞的活性降低,进而推测 MACC1 的高表达异常激活 HGF/c-met 信号传导通路使得 C-Met 蛋白量增加,协同使得肿瘤细胞的活性大幅度增加,致使肿瘤的复发转移及不良预后^[18-20]。

综上所述,MACC1 和 C-Met 的异常表达与口腔鳞癌的发生发展及转移预后密切相关,并为口腔鳞癌的分子靶向治疗提供了参考依据,而关于 MACC1 与 HGF/c-met 信号通路在口腔鳞癌中具体调控机制尚待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] 韩帮锋, 吴平凡, 潘剑, 等. 鼠双微粒体 2 蛋白, P53 在口腔白斑和鳞癌中的表达及其相关性的研究 [J]. 华西口腔医学杂志, 2011, 29(1): 79-82
- Han Bang-feng, Wu Ping-fan, Pan Jian, et al. Expression and its relationship of murine double minute 2 and P53 protein in oral leukoplakia and squamous cell carcinoma [J]. West China Journal of Stomatology, 2011, 29(1): 79-82
- [2] Stein U, Dahlmann M, Walther W. MACC1-more than metastasis? Facts and predictions minute 2 and P53 protein in oral leukoplakia and squamous cell carcinoma [J]. West China about a novel gene[J]. Journal of molecular medicine, 2010, 88(1): 11-18
- [3] 赵今, 郭斌, 马三成, 等. p53 和 Ki-67 在老年人口腔癌前病变的表达及临床意义[J]. 四川大学学报(医学版), 2005, 36(5): 689-691
- Zhao Jin, Guo Bin, Ma San-cheng, et al. Expression of p53 and Ki-67 Genes in Epithelial Dysplasia from Old Oral Mucosa and Clinical Significance [J]. Journal of Sichuan University (Medical Science Edition), 2005, 36(5): 689-691
- [4] Kokoszyńska K, Kryński J, Rychlewski L, et al. Unexpected domain composition of MACC1 links MET signaling and apoptosis [J]. Acta Biochim Pol, 2009, 56(2): 317-323
- [5] Stein U, Walther W, Arlt F, et al. MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis[J]. Nature medicine, 2009, 15(1): 59-67
- [6] 江俊伟, 葛林虎. MACC1、c-met 蛋白与非小细胞肺癌的分化、浸润、转移及生存期的关系分析 [J]. 实用医学杂志, 2014, 25(12): 1936-1938
- Jiang Jun-wei, Ge Lin-hu. Relationship between MACC1, c-Met protein and non small cell lung cancer, the relationship between the differentiation, invasion, metastasis and survival [J]. The Journal of Practical Medicine, 2014, 25(12): 1936-1938
- [7] Shirahata A, Sakata M, Kitamura Y, et al. MACC 1 as a marker for peritoneal-disseminated gastric carcinoma [J]. Anticancer research, 2010, 30(9): 3441-3444
- [8] Qiu J, Huang P, Liu Q, et al. Identification of MACC1 as a novel prognostic marker in hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Translational Medicine, 2011, 9: 166
- [9] 陈仲伟, 徐冬贵, 朱李军, 等. HGF/C-Met 在舌部鳞状细胞癌的表达及其临床意义[J]. 口腔医学研究, 2013, 29(1): 76-81
- Chen Zhong-wei, Xu Dong-gui, Zhu Li-jun, et al. Expression of Hepatocyte Growth Factor and c-Met in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue [J]. Journal of Oral Science Research, 2013, 29(1): 76-81
- [10] Cecchi F, Rabe DC, Bottaro DP. Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(6): 553-572
- [11] 苏会玲, 刘凤玲. HGF/c-MET 通路在癌症中的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2013, 28(1): 98-100
- Su Hui-ling, Liu Feng-ling. The research progress of HGF/c-MET pathway in cancer [J]. The Practical Journal of Cancer, 2013, 28(1): 98-100
- [12] 尚超, 张辉, 宋永胜. MACC1 基因与肾癌转移的相关性及其对细胞侵袭能力的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(4): 637-639
- Shang Chao, Zhang Hui, Song Yong-sheng. The relationship between MACC1 gene and renal carcinoma and its influence to invasiveness of Caki-1 cells[J]. Journal Of Modern Oncology, 2011, 19(4): 637-639
- [13] Juneja M, Ilm K, Schlag PM, et al. Promoter identification and transcriptional regulation of the metastasis gene MACC1 in colorectal cancer[J]. Mol Oncol, 2013, 7(5): 929-943
- [14] Stein U, Smith J, Walther W, et al. MACC1 controls Met: what a difference an Sp1 site makes[J]. Cell Cycle, 2009, 8(15): 2467-2469
- [15] Sheng XJ, Li Z, Sun M, et al. MACC1 induces metastasis in ovarian carcinoma by upregulating hepatocyte growth factor receptor c-MET [J]. Oncol Lett, 2014, 8(2): 891
- [16] Hu Wen Sheng, Fu Xi. Expression and prognostic significance of MACC1 and C-met in non-small cell lung cancer[J]. J Lung Cancer in China, 2012, 15(7): 399-403
- [17] 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]. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, 2011, 30: 83
- [18] 吴健, 张昶, 朱亚宁. MACC1 在膀胱癌中的表达及临床意义[J]. 江苏医药, 2011, 37(1): 101-102
- Wu Jian, Zhang Chang, Zhu Ya-ning. The expression and clinical significance of MACC1 in bladder cancer [J]. Jiangsu Medical Journal, 2011, 37(1): 101-102
- [19] Yang T, Kong B, Kuang YQ, et al. Overexpression of MACC1 protein and its clinical implications in patients with glioma [J]. Tumour Biol, 2014, 35(1): 815-819
- [20] 尚超, 张辉, 宋永胜. 肾癌细胞增殖过程 MACC1 和 c-MET 调控机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(14): 1065-1067
- Shang Chao, Zhang hui, Song Yong-sheng. Regulation between MACC1 and c-MET in proliferative process of renal carcinoma[J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2011, 18(14): 1065-1067

(上接第 2231 页)

- [17] Makovey J, Macara M, Chen JS, et al. Serum UA plays a protective role for bone loss in peri- and postmenopausal women: a longitudinal study[J]. BONE, 2013, 52(1): 400-406
- [18] 尹军, 高传芳, 浅议 TGF- β 与原发骨质疏松[J]. 临床医学, 2011, 30(26): 86-87
- Yin Jun, Gao Chuan-fang. Shallow discussion TGF- β and primary osteoporosis[J]. China Foreign Medical, 2011, 30(26): 86-87
- [19] Sila Asna M, Bunyaratvej A, Maeda S, et al. Osteoblast differentiation and formation gene expression in strontium inducing bone marrow mesenchymal stem cell [J]. Kobe J Med Sci, 2007, 53(12): 25-35
- [20] Zhao L, Jiang S, Hantash BM, et al. Transforming Growth Factor β Induces Osteogenic Differentiation of Murine Bone Marrow Stromal Cells[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(2): 725-733
- [21] Jia Yi-jie, Tian Jing. Stem cells treatment for osteoporosis: Possibility and feasibility [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2012, 16(1): 148-152