

· 论著 ·

MACC1与c-Met基因在胰腺癌组织中的表达及预后意义*

买二辉* 徐 涛 张树交 王 晓 李 冉 丁飞虎 雷 霆 李四桥

洛阳市中心医院肝胆胰脾及疝外科一病区 (河南 洛阳 471000)

【摘要】目的 探究MACC1与c-Met基因在胰腺癌组织中的表达及预后意义。**方法** 应用免疫组化法检测各标本中MACC1和c-Met蛋白的表达情况, 统计学分析MACC1和c-Met表达水平与临床病理特征的关系; 分别检测MACC1和c-Met在各细胞系中的表达情况, 并选取高表达MACC1与c-Met的两组细胞株, 通过RNA干扰技术抑制MACC1表达, 48H后采用RT-PCR技术检测MACC1与c-Met; 分别采用流式细胞仪、划痕实验及Transwell实验检测干扰后两组细胞的细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭能力的变化; 采用免疫印迹法检测干扰后两组细胞的MACC1与c-Met蛋白变化, 并进一步研究相关信号通路的变化。**结果** MACC1和c-Met蛋白在胰腺癌组织中的高表达率明显增加($P<0.05$), 且随着肿瘤分期的增高及淋巴结的转移, 其表达量均有所增加($P<0.05$)。在RNA干扰后, MACC1和c-Met蛋白表达水平较对照组均明显降低($P<0.05$); 且细胞增殖、细胞迁移和侵袭能力均明显降低, 细胞凋亡率明显增多。此外, 下调MACC1表达抑制了Notch1、Hey1、Hes1等Notch信号通路相关蛋白的表达, 同时, p53、MDM2等p53信号通路相关蛋白表达也明显改变。**结论** 在胰腺癌中, MACC1和c-Met高表达与肿瘤分期及淋巴结转移密切相关。下调MACC1可以抑制凋亡蛋白的表达、胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 促进癌细胞凋亡, 还可抑制Ras/ERK、Notch以及p53信号通路。MACC1和c-Met与胰腺癌的发生发展密切相关, 可作为判断胰腺癌患者预后的重要指标。

【关键词】 MACC1; c-Met; 胰腺癌

【中图分类号】 R576

【文献标识码】 A

【基金项目】 河南省医学科技攻关计划项目(202102103)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2023.10.029

Expression and Prognostic Significance of MACC1 and c-Met Genes in Pancreatic Cancer*

MAI Er-hui*, XU Tao, ZHANG Shu-jiao, WANG Xiao, LI Ran, DING Fei-hu, LEI Ting, LI Si-qiao.

Liver, liver, pancreas, spleen, and Hernia Surgery, Luoyang Central Hospital, Luoyang 471000, Henan Province, China

Abstract: Objective To explore the expression and prognostic significance of MACC1 and c-Met genes in pancreatic cancer. **Methods** Immunohistochemical method was used to detect the expression of MACC1 and c-Met protein in each specimen, and the relationship between the expression level of MACC1 and c-Met and clinicopathological features was statistically analyzed. The expression of MACC1 and c-Met in each cell line was detected respectively, and two groups of cell lines with high expression of MACC1 and c-Met were selected, and the expression of MACC1 was inhibited by RNA interference technology. After 48H, the expression of MACC1 and c-met was detected by RT-PCR technology. Flow cytometry, scratch test and Transwell test were used to detect the changes of cell proliferation, apoptosis, migration and invasion ability of the two groups after interference. The changes of MACC1 and c-Met protein in the two groups were detected by western blot, and the changes of related signal pathways were further studied. **Results** The high expression rate of MACC1 and c-Met protein in pancreatic cancer tissues increased significantly ($P<0.05$), and their expression levels increased with the increase of tumor stage and lymph node metastasis ($P<0.05$). After RNA interference, the expression levels of MACC1 and c-Met protein were significantly lower than those of the control group ($P<0.05$). Moreover, cell proliferation, cell migration and invasion ability were significantly reduced, and cell apoptosis rate was significantly increased. In addition, down-regulation of MACC1 expression inhibited the expression of Notch1, Hey1, Hes1 and other Notch signaling pathway related proteins, and at the same time, the expression of p53 signaling pathway related proteins such as p53 and MDM2 also changed significantly. **Conclusion** In pancreatic cancer, the high expression of MACC1 and c-Met is closely related to tumor stage and lymph node metastasis. Down-regulation of MACC1 can inhibit the expression of apoptotic protein, the proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells, promote the apoptosis of cancer cells, and also inhibit Ras/ERK, Notch and p53 signaling pathways. MACC1 and c-Met are closely related to the occurrence and development of pancreatic cancer, and can be used as important indicators to judge the prognosis of patients with pancreatic cancer.

Keywords: MACC1; c-Met; Pancreatic Cancer

胰腺癌(Pancreatic Cancer, PC)属于一种常见的消化道恶性肿瘤疾病, 在癌症死亡率中位居第四^[1]。其确诊后1年之内死亡率高达95%^[2]。近年来, 胰腺癌的发病率及死亡率逐年增加, 且其手术后死亡率较高^[3]。PC转移率高是其治疗效果差的重要原因^[4]。在PC诊断时, 约有50%左右的患者已发生转移, 平均生存期低于1年^[5]。结肠癌转移相关基因1(Metastasis-associated with colon cancer protein 1, MACC1)可预测早期癌症阶段的转移风险, 其表达水平与肿瘤进展呈正相关^[6]。肝细胞生长因子受体(hepatocyte growth factor receptor, c-Met)癌蛋白通过其信号传导途径驱动多种肿瘤中的癌症进展^[7]。本研究将探究MACC1与c-Met基因在胰腺癌组织中的表达及预后意义, 以期临床上胰腺癌的治疗及预后判断提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2019年1月至2023年1月我院收治的胰腺癌患者80例, 所有病人均接受手术治疗, 术中取胰腺癌组织及癌旁组织。其中, 男37例, 女43例, 年龄35~65岁, 平均年龄(57.245.49)岁; 肿瘤直径1~7cm, 平均直径(4.210.59)cm。肿瘤分期: I~II期32例, III期39例, IV期9例; 淋巴结转移54例。

纳入标准: 符合胰腺癌诊断标准^[8]; 能进行手术治疗; 临床资料完整。排除标准: 存在沟通、凝血功能障碍者; 伴有精神疾病者; 有生物免疫制剂治疗史; 有化疗治疗史^[9]。选择同期于本院接受治疗的胰岛细胞瘤等良性病变患者80例, 取其胰腺组织, 作为对照组。本研究在伦理委员会批准下进行。

1.2 方法

1.2.1 组织学实验 对胰腺癌组织、癌旁组织及健康对照组胰腺组织标本进行固定、石蜡包埋、切片。采用免疫组化SP法。随机

【第一作者】买二辉, 男, 副主任医师, 主要研究方向: 肝胆胰肿瘤。E-mail: 15139982322@163.com

【通讯作者】买二辉

选择10个高倍镜视野观察阳性细胞。每个视野计数100个肿瘤细胞,采用半定量积分法进行结果判定。并且将其与患者的临床病理特征进行统计学分析。

1.2.2 MACC1与c-Met的表达水平 体外培养正常的胰腺导管上皮细胞株(HPDE6-C7)及胰腺癌细胞株Panc-1、BxPC-3、AsPC-1、MIA Paca-2,分别检测各株细胞中MACC1与c-Met的表达水平。

1.2.3 RT-PCR技术 选取高表达MACC1与c-Met的细胞株(假设A株、B株),通过RNA干扰技术分别抑制两组细胞MACC1表达,48h后采用RT-PCR技术检测MACC1与c-Met,并设立相应的对照组。

1.2.4 细胞增殖及凋亡情况 采用流式细胞仪检测干扰后A、B组细胞的细胞增殖及凋亡的变化。

1.2.5 迁移及侵袭能力 采用划痕实验及Transwell实验分析抑制表达A、B组细胞的迁移及侵袭能力变化。

1.2.6 MACC1及c-Met可能的信号通路研究 免疫印迹法检测干扰后A、B组细胞的MACC1与c-Met蛋白变化水平;进一步研究相关信号通路的变化。

1.3 统计分析 采用SPSS 18.0统计软件对数据进行分析,计量资料均以($\bar{x} \pm s$)表示,组间、组内比较分别采用独立样本t和配对样本t检验。分类计数资料均以%表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$,表明差异有显著性。

2 结果

2.1 MACC1、c-Met在各组织中的表达情况 结果显示,在胰腺癌组织中MACC1和c-Met蛋白的高表达率分别为83.75%、80.00%,明显高于胰腺组织和癌旁组织,差异比较均具有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.2 MACC1和c-Met蛋白表达与胰腺癌临床病理特征的关系 结果显示,随着肿瘤分期的增高及淋巴结的转移,MACC1和c-Met蛋白的表达有所增加($P < 0.05$);MACC1和c-Met蛋白的表达与病人的年龄、性别、肿瘤直径等无统计学意义相关性

($P > 0.05$),见表2。

2.3 各细胞株中MACC1与c-Met基因水平的表达情况 结果显示,MACC1在BxPC-3中表达最多,c-Met在AsPC-1中表达最多,见表3。因此,选择BxPC-3和AsPC-1细胞株继续进行实验。

2.4 RNA干扰后MACC1、c-Met的表达情况 结果显示,MACC1和c-Met蛋白表达水平在空白对照组和阴性对照组之间差异不显著($P > 0.05$);而RNA干扰后的BxPC-3和AsPC-1细胞株中MACC1和c-Met蛋白表达水平较对照组均明显降低($P < 0.05$),见表4。

2.5 细胞增殖及凋亡情况 结果显示,相较于对照组,BxPC-3和AsPC-1细胞株中对MACC1进行抑制后,细胞增殖明显变慢,而细胞凋亡率明显增多,见表5。

2.6 细胞迁移及侵袭能力 结果显示,相较于对照组,BxPC-3和AsPC-1细胞株中对MACC1进行抑制后,细胞迁移和侵袭能力均明显降低,见表6。

2.7 下调MACC1表达对各信号通路的影响 结果显示,干扰后的胰腺癌细胞,MACC1与c-Met、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9表达水平均显著下降;下调MACC1表达抑制了Notch1、Hey1、Hes1、Ras、p-ERK1/2等通路相关蛋白的表达,同时,p53、MDM2等p53信号通路相关蛋白表达也明显改变。

表1 MACC1、c-Met在各组织中的表达情况[n(%)]

组织	MACC1高表达	c-Met高表达
胰腺组织(n=80)	5(6.25)	4(5.00)
癌旁组织(n=80)	37(46.25)	36(45.00)
胰腺癌组织(n=80)	67(83.75)	64(80.00)
χ^2	96.948	91.765
P	0.000	0.000

表2 MACC1和c-Met蛋白表达与胰腺癌临床病理特征的关系[n(%)]

因素		例数	MACC1		χ^2	P	c-Met		χ^2	P
			低表达(n=13)	高表达(n=67)			低表达(n=16)	高表达(n=64)		
年龄	<60岁	59	11	48	0.395	0.530	12	47	0.036	0.849
	≥60岁	21	2	19		4	17			
性别	女	43	5	38	1.460	0.227	6	37	2.125	0.145
	男	37	8	29		10	27			
肿瘤直径(cm)	<5	47	10	37	2.115	0.146	10	37	0.116	0.733
	≥5	33	3	30		6	27			
肿瘤分期	I ~ II	32	10	22	8.818	0.003	11	21	6.888	0.009
	III~IV	48	3	45		5	43			
淋巴结转移	无	26	11	15	16.486	0.000	12	14	16.467	0.000
	有	54	2	52		4	50			

表3 各细胞株中MACC1与c-Met基因水平的表达情况

细胞株	MACC1	c-Met
HPDE6-C7	0.100.04	0.150.04
Panc-1	0.010.01	0.310.12
BxPC-3	0.120.05	2.250.31
AsPC-1	0.020.01	5.860.39
MIA Paca-2	0.010.01	0.020.01

表4 RNA干扰后MACC1、c-Met的表达情况

组别	MACC1	c-Met
空白对照组	0.760.07	0.620.06
阴性对照组	0.780.09	0.620.07
BxPC-3细胞株	0.180.04*	0.180.03*
AsPC-1细胞株	0.170.05*	0.160.04*

注: *表示与对照组比较,差异显著。

表5 细胞增殖情况[A]

时间(h)	BxPC-3		AsPC-1	
	对照组	转染组	对照组	转染组
0	0.130.04	0.130.04	0.120.03	0.120.03
24	0.260.05	0.250.04	0.220.05	0.210.04
48	0.310.06	0.280.05	0.250.06	0.230.05
72	0.720.12	0.530.09*	0.620.14	0.430.11*
96	0.960.18	0.730.13*	0.780.19	0.510.17*
120	1.250.22	0.820.19*	0.980.21	0.690.18*

注：*表示与对照组比较，差异显著。

表6 细胞迁移情况

组别	迁移细胞数
对照组	374.55±18.48
空转染组	331.48±17.72*
转染组	20.34±8.26*

注：*表示与对照组比较，差异显著。

3 讨论

胰腺癌是致死率较高的恶性肿瘤之一，目前尚无有效的早期诊断手段，且胰腺癌患者的预后极差^[10]。MACC1在多种实体瘤中均呈现高表达状态^[11]。已有研究指出，MACC1在细胞培养物以及结肠癌患者中诱导肿瘤的增殖、侵袭和转移^[12]。近来有研究通过RNA-seq和微阵列数据集合分析发现c-Met是胰腺癌的重要枢纽基因^[13]。

在本研究中，MACC1和c-Met蛋白在胰腺癌组织中的高表达率明显高于胰腺组织和癌旁组织($P<0.05$)。且随着肿瘤分期的增高及淋巴结的转移，MACC1和c-Met蛋白的表达有所增加($P<0.05$)；而MACC1和c-Met蛋白的表达与病人的年龄、性别、肿瘤直径等无统计学意义相关性($P>0.05$)，表明MACC1和c-Met蛋白的表达量随着胰腺癌的进一步恶化逐渐增加。与Zhang X^[14]、Qin T^[15]等人的研究结果一致。这是因为MACC1是一种重要的致癌基因，通过调控HGF-MET信号通路，促进肿瘤癌的发生发展以及转移。MACC1含有多个基序，参与肿瘤细胞的多种生物学过程。其在多种肿瘤中具有致癌作用，主要表现为细胞增殖、上皮间质转化、淋巴结转移等。且c-Met属于受体酪氨酸激酶家族，在上皮细胞中高表达。肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)是c-Met的唯一配体，HGF与c-Met结合后，可导致c-Met磷酸化，从而激活MAPK、STAT3和PI3K/AKT等多种信号通路，这些信号通路调控肿瘤细胞的增殖、侵袭及迁移。

本研究结果还显示，MACC1和c-Met蛋白表达水平在空白对照组和阴性对照组之间差异不显著($P>0.05$)；而RNA干扰后的BxPC-3和AsPC-1细胞株中MACC1和c-Met蛋白表达水平较对照组均明显降低($P<0.05$)。且相较于对照组，BxPC-3和AsPC-1细胞株中对MACC1进行抑制后，细胞增殖明显变慢，细胞凋亡率明显增多；同时，细胞迁移和侵袭能力均明显降低。肿瘤最显著的特点就是无限增殖和容易发生转移，无限增殖不但会引起压迫症状，还会引起明显的恶病质。大部分的癌症患者在晚期都会出现远处转移，这就会造成体内多发肿瘤，从而明显缩短患者的生存期^[16]。而对MACC1进行抑制后，MACC1和c-Met蛋白表达水平

明显降低，且可明显抑制细胞增殖、迁移和侵袭，促进细胞凋亡，因此，MACC1和c-Met对胰腺癌的发生发展具有重要作用。最后，本研究还发现下调MACC1表达抑制了Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9等凋亡蛋白以及Notch1、Hey1、Hes1、Ras、p-ERK1/2等信号通路蛋白的表达，同时，p53、MDM2等p53信号通路相关蛋白表达也明显改变。张德宇^[17]的研究中也指出MACC1的表达情况与P53和Notch信号通路活性有关。Xu Z^[18]等人认为即使是在胰腺癌的晚期阶段，使用相关抑制剂靶向HGF/c-MET通路，也能显著抑制肿瘤转移和生长，进一步表明MACC1和c-Met对胰腺癌发生发展及预后的重要性。

综上所述，在胰腺癌中，MACC1和c-Met的异常高表达可能与肿瘤分期及淋巴结转移密切相关。下调MACC1可以抑制凋亡蛋白的表达、胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭，促进胰腺癌细胞的凋亡，还可抑制Ras/ERK、Notch以及p53信号通路。MACC1和c-Met与胰腺癌的发生发展密切相关，可作为判断胰腺癌患者预后的重要指标，也是潜在的癌症治疗靶点。

参考文献

- [1]徐红伟,王大军,游焜,等.腹腔镜下Kimura法与Warshaw法治疗对胰腺癌患者围术期指标及术后并发症的影响[J].罕少疾病杂志,2020,27(6):32-35.
- [2]豆艳.姑息护理对晚期胰腺癌患者癌因性疲乏及负性情绪的影响[J].罕少疾病杂志,2019,26(1):77-79.
- [3]李林,毛朝明,司马玉洁,等.血清CEA、CA242和PET/CT显像联合检测对胰腺癌的诊断价值[J].中国CT和MRI杂志,2023,21(1):115-116,185.
- [4]De Dosso S,Siebenhüner AR,Winder T,et al.Treatment landscape of metastatic pancreatic cancer[J].Cancer Treat Rev.2021,96:102180.
- [5]Mizrahi JD,Surana R,Valle JW,et al.Pancreatic cancer[J].Lancet.2020,395(10242):2008-2020.
- [6]Zhang X,Luo Y,Cen Y,et al.MACC1 promotes pancreatic cancer metastasis by interacting with the EMT regulator SNAI1[J].Cell Death Dis.2022,13(11):923.
- [7]Park KC,Richardson DR. The c-MET oncoprotein:Function,mechanisms of degradation and its targeting by novel anti-cancer agents[J]Biochim Biophys Acta Gen Subj.2020,1864(10):129650.
- [8]中国抗癌协会胰腺癌专业委员会.中国胰腺癌综合诊治指南(2020版)[J].中华外科杂志,2021,59(2):81-100.
- [9]刘利民.术前外周血循环肿瘤细胞和糖类抗原199水平对可切除胰腺癌患者预后的评估价值[J].包头医学,2021,45(1):1-4.
- [10]Ghafoori-Fard S,Fathi M,Zhai T,et al.LncRNAs: Novel Biomarkers for Pancreatic Cancer[J].Biomolecules.2021,11(11):1665.
- [11]Shi XY,Zhang XL,Shi QY,et al.IFN- γ affects pancreatic cancer properties by MACC1-AS1/MACC1 axis via AKT/mTOR signaling pathway[J].Clin Transl Oncol.2022,24(6):1073-1085.
- [12]赵为民,金博,于震,等.上皮间质转化MACC1对结肠癌细胞HT-29增殖迁移和侵袭影响[J].中华肿瘤防治杂志,2021,28(14):1072-1079.
- [13]Nisar M,Paracha RZ,Arshad I,et al.Integrated Analysis of Microarray and RNA-Seq Data for the Identification of Hub Genes and Networks Involved in the Pancreatic Cancer[J].Front Genet.2021,12:663787.
- [14]Zhang X,Luo Y,Cen Y,et al.MACC1 promotes pancreatic cancer metastasis by interacting with the EMT regulator SNAI1[J].Cell Death Dis.2022,13(11):923.
- [15]Qin T,Xiao Y,Qian W,et al.HGF/c-Met pathway facilitates the perineural invasion of pancreatic cancer by activating the mTOR/NGF axis[J].Cell Death Dis.2022,13(4):387.
- [16]徐业成,傅德良.胰腺癌淋巴结转移研究进展[J].肝胆外科杂志,2022,30(1):76-80.
- [17]张德宇.MACC1促进胰腺癌发生发展中涉及的相关表型及激活通路的研究[D].河南:郑州大学,2020.
- [18]Xu Z,Pang TCY,Liu AC,et al.Targeting the HGF/c-MET pathway in advanced pancreatic cancer: a key element of treatment that limits primary tumour growth and eliminates metastasis[J].Br J Cancer,2020,122(10):1486-1495.

(收稿日期: 2023-07-25)
(校对编辑: 姚丽娜)