

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.07.018

非小细胞肺癌人群中 c-MET 基因的扩增检测

陈志红¹, 陈华军², 郭爱林¹, 安社娟¹, 苏 健¹, 谢 至¹, 吴一龙²

Detection of c-MET Gene Amplification in Non-small Cell Lung Cancer

CHEN Zhi-hong¹, CHEN Hua-jun², GUO Ai-lin¹, AN She-juan¹, SU Jian¹, XIE Zhi¹, WU Yi-long²

1. Medical Research Center, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medicial Sciences, Guangzhou 510080, China; 2. Guangdong General Hospital, Guangdong Lung Cancer Institute, Guangdong Academy of Medicial Sciences

Corresponding Author: WU Yi-long, E-mail: syylwu@live.cn

Abstract: Objective c-MET gene amplification was regarded as one of the main resistance mechanisms in non-small-cell lung cancer (NSCLC) treated with tyrosine kinase inhibitors (TKIs, gefitinib and erlotinib). The study was to evaluate the difference of c-MET gene amplification between TKI-naïve NSCLC cohort and patients resistant to EGFR TKIs. **Methods** The baseline group included 55 TKI-naïve NSCLC patients and their tumor specimens were obtained via the lung resection. The resistant group included 23 TKIs resistant patients after first-line TKIs monotherapy. Five tumor samples were collected from the primary cancer via the resection, and nine samples were from metastatic sites via the resection, and the rest were obtained by core needle biopsy of the primary tumors. All the tumor tissues were stored at -80℃ for use. Genomic DNA was extracted from tumor tissues after selection by laser microdissection. Copy numbers of c-MET gene were assessed by quantitative real-time PCR. **Results** c-MET gene amplification was not related to clinicopathologic characteristics both in the baseline group and the resistant group. The prevalence of c-MET amplification in baseline group was 5.5% (3/55), which was lower than the rate in TKIs resistant group ($P=0.045$, Fisher's exact test). In seven pairs of the tumor samples before and after TKIs treatment, c-MET gene was not amplified in pre-treatment samples, whereas the c-MET gene amplification was found in two cases after TKIs treatment. **Conclusion** Clinicopathologic characteristics may not predict c-MET amplification. In the TKI-naïve NSCLC patients, c-MET amplification is accidental. But the gene is amplified in part of NSCLC patients when treated with EGFR TKIs.

Key words: NSCLC; c-MET; Gene amplification; Resistance

摘 要: 目的 c-MET 基因扩增是非小细胞肺癌对 EGFR TKIs(吉非替尼或厄罗替尼)产生耐药的主要机制之一。本研究探讨没有接受 TKIs 治疗与 TKIs 治疗后耐药的 NSCLC 中 c-MET 基因的扩增是否存在差异。**方法** 获得 55 例术后非小细胞肺癌(NSCLC)的肿瘤组织(基线组)以及 23 例对 TKIs 耐药的肿瘤组织(耐药组)后,通过激光显微切割筛选癌细胞后提取基因组 DNA,实时荧光定量 PCR TaqMan 探针法检测所有标本的 c-MET 基因的拷贝数。**结果** 1.基线组和耐药组的临床病理特征均与 c-MET 基因的扩增无关。2.基线组中 c-MET 基因扩增阳性率为 5.5% (3/55);耐药组的 c-MET 基因扩增阳性率为 21.7% (5/23)。两组之间有统计学差异(Fisher 精确概率法, $P=0.045$)。3.在 7 例获得 TKI 治疗前后肿瘤组织的 NSCLC 中,TKI 治疗前没有出现 c-MET 的基因扩增,TKI 治疗后有 2 例患者出现了 c-MET 的基因扩增(2/7)。TKI 治疗前后的 c-MET 基因扩增差异无统计学意义。**结论** NSCLC 的临床病理特征不能预测 c-MET 基因扩增;在没有接受 EGFR

TKIs 治疗的 NSCLC 中,c-MET 基因扩增仅为少见事件。但经过吉非替尼或厄罗替尼治疗后出现耐药情况 NSCLC 中,部分患者的 c-MET 基因出现扩增。
关键词: NSCLC;c-MET;基因扩增;耐药
中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A
文章编号: 1000-8578(2010)07-0802-04

收稿日期: 2009-03-10; **修回日期:** 2009-09-24
作者单位: 1. 510080 广州,广东省人民医院医学研究中心,广东省医学科学院,2. 肿瘤中心,广东省医学科学院,广东省肺癌研究所
通信作者: 吴一龙, E-mail: syylwu@live.cn
作者简介: 陈志红(1969-),女,硕士,副主任技师,主要从事肿瘤分子生物学方面的研究

0 引言

人类 c-MET 基因位于第 7 号染色体 7q31 区,其编码的 c-MET 受体是肝细胞生长因子(Hepato-cyte growth factor,HGF)的特异性受体,属于酪氨酸激酶型受体,在肝、肾和肺等几种上皮来源的肿瘤均有表达^[1]。HGF 与 c-MET 受体结合后激活受体发生自身磷酸化,引起多种底物蛋白磷酸化和细胞内一系列信号转导,激活 PI3K/Akt 及 Mek/erk 等信号通路,促进肿瘤细胞的生长、侵袭和转移^[2-4]。c-MET 基因是非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer,NSCLC)的预后因素之一;c-MET 基因高表达则预后不佳^[5-6]。c-MET 基因在 NSCLC 中的扩增研究是新近的热点。

为探讨 NSCLC 人群中 c-MET 基因的扩增情况,我们拟用实时定量 PCR(Quantitative real-time PCR)方法对使用 TKIs 治疗前及治疗后产生耐药的 NSCLC 的肿瘤组织进行检测,为探讨 TKI 耐药机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

组织标本均来自广东省肺癌研究所组织库,包括 2005 年 1 月—2007 年 12 月 55 例术后肺癌原发灶与相应的正常肺组织,以及使用吉非替尼或厄罗替尼治疗后产生耐药的患者肿瘤组织 23 例。耐药组的肿瘤组织标本来源:5 例来自原发灶切除术,9 例来自转移灶切除术,9 例来源于经皮肺穿刺术。获得组织后立即置入液氮速冻,然后于-80℃组织库保存备用。所有患者均知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 激光显微切割 参考文献的方法^[7-8],组织标本用 OCT(sakura tissue-tek OCT compound)包埋,5μm 连续冷冻切片,贴于激光显微切割专用薄膜载片上,快速苏木精染色,打开切割系统(Laser microdissection, Leica AS LMD System, UK),在病理科医生的协助下确定病灶位置,每个组织标本获取癌细胞或正常细胞 200~400 个,细胞汇集到 0.2ml 离心管内。

1.2.2 基因组 DNA 的抽提 采用微量 DNA 提取试剂盒(Qiagen, Catalog No. 56304, France),按说明书进行。

1.2.3 Real time PCR Taqman 探针法检测 c-MET 基因拷贝数

(1)引物和探针:根据 GeneBank 的序列,采用 Primer Express 2.0 软件对目标基因 c-MET (NC-

000007)和内参基因 Line-1 进行引物及 TaqMan 探针设计。c-MET 基因上游引物序列:5'-CCCCA-CAATCATACTGCTGACA-3',下游引物序列:5'-GTTGATGAACCGGTCCTTTACAG -3',探针序列:5'-FAM- CACAGATAGAAGAGCCCAGC-CAGTGTCTT-TAMARA -3';内参基因 Line-1 上游引物序列:5'- TGCTTTGAATGCGTCC -3',下游引物序列:5'- AAAGCCGCTCAACTACAT -3',探针序列:5'-FAM- AGATTCTGGTATGTTGT-GTCTTTGTTCTCGTTG -TAMARA -3'。

(2)标准品的制备:取 A549 细胞株提取 DNA,按 pGEM-T Easy(Promega)的说明书方法构建质粒标准品,测序验证标准品连接序列的正确性。通过 D_{260} nm 值,计算标准品的拷贝数,按照所需浓度稀释成工作液。

(3)荧光定量检测:①将质粒标准品倍比稀释成 6 个浓度:c-MET: $10^7 \sim 10^2$,内参基因 Line-1: $10^9 \sim 10^4$,制作标准曲线。通过标准曲线,计算待测样品的拷贝数。待测样品重复检测三次。②Real time PCR 反应体系:TaqMan Universal MasterMix (2x) 12.5 μl,10μM sense primer 0.8μl,10μM antisense primer 0.8 μl,5μM TaqMan Probe 0.8μl,模板 DNA1 μl,无菌水 6.6 μl。③反应条件:去除 UNG 酶 2mins 50℃;聚合酶的活化 10 min 95℃;PCR 扩增(40 个循环);15s 95℃,60s 60℃。反应在 ABI PRISM 7000 Sequence Detector 中进行。④每次反应分别设置阳性对照(HCC827 GR 细胞系 DNA),阴性对照(HCC827 细胞系 DNA)和 NTC(无模板对照)。

(4)结果判读:取三次独立实验(c-MET/Line-1)比值的均值作为分析数据,按照 Beau-Faller 等的统计方法^[9],55 例术后正常肺组织的 $\bar{x} \pm s$ 作为判定的临界值。在临界值以上的肿瘤标本判定为 c-MET 基因扩增阳性;等于或小于临界值则判定为阴性。

1.3 统计学方法

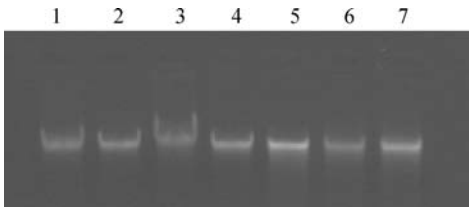
SPSS 11.0 统计软件分析数据,采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法或配对资料 t 检验进行分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 微切割 DNA 的提取

通过测定 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值和琼脂糖电泳的方法确定 DNA 的质量,电泳图显示 DNA 必须完整,没有降解,见图 1; OD_{260}/OD_{280} 的比值必须在 1.8~1.9 之间。不合格的 DNA 弃掉重提,合格的

DNA 才进行下游的检测。



Lane 1~7:the laser microdssection DNA of the sample 8~14

图 1 微切割 DNA 琼脂糖(1.0%)电泳图
Figure 1 The agarose gel electrophoresis(1.0%)pattern of the laser microdissection DNA

2.2 c-MET 基因扩增与临床病理特征的关系

统计结果显示,无论是基线组(55 例非 TKIs 治疗的 NSCLC 肿瘤组织)还是耐药组(23 例使用 TKIs 治疗后出现耐药的 NSCLC 肿瘤组织),c-MET 基因扩增与性别、年龄、抽烟情况、组织分型、分化程度和 TNM 分期等的临床病理特征均无显著关系($P>0.05$),见表 1、2。

表 1 基线组 c-MET 扩增与临床病理特征
Table 1 Correlation between c-MET gene amplification and clinicopathologic features in Base Line Group

Characteristic	n	c-MET (+)	c-MET (-)	Positive rate(%)	P*
Age (years)					
≤60	23	2	21	8.7	
>60	32	1	31	3.1	0.565
Gender					
Male	33	2	31	6.1	
Female	22	1	21	4.5	1
Smoking status					
Smoker	31	2	29	6.5	
Non-smoker	24	1	23	4.2	1
Histology					
Adenocarcinoma	39	2	37	5.1	
Non-adenocarcinoma	16	1	15	6.3	1
TNM staging					
I + II	46	2	44	6.5	
III A + III B	9	1	8	11.1	0.421

Note: * P: c-Met (+) compared with c-Met (-) with in subgroup(Fisher exact test)

2.3 基线组与继发耐药组的 c-MET 基因扩增

本研究用同样的方法分别检测了两组 NSCLC 肿瘤组织中 c-MET 的基因扩增:基线组(代表非继发耐药组的 c-MET 基因扩增的原始状况)和继发耐药组。来自肺腺癌亲代细胞株 HCC827 及吉非替尼诱导的耐药克隆 HCC827 GR 的基因组 DNA 分别用作阴性对照及阳性对照^[10]。结果显示:基线组

中 c-MET 基因扩增阳性率为 5.5% (3/55);耐药组的 c-MET 基因扩增阳性率为 21.7% (5/23)。两组之间有统计学差异(Fisher 精确概率法, $P=0.045$)。

表 2 耐药组 c-MET 扩增与临床病理特征
Table 2 Correlation between c-MET gene amplification and clinicopathologic features in TKI-Resistant Group

Characteristic	n	c-MET (+)	c-MET (-)	Positive rate (%)	P*
Age(years)					
≤60	18	4	14	22.2	
>60	5	1	4	20.0	1
Gender					
Male	14	4	10	28.6	
Female	9	1	8	11.1	0.611
Smoking status					
Smoker	4	2	2	50.0	
Non-smoker	19	3	16	15.8	0.194
Histology					
Adenocarcinoma	21	4	17	19.0	
Squamous cell carcinoma	2	1	1	50.0	0.395
First line therapy					
Chemotherapy	17	2	15	11.8	
EGFR-TKI	6	3	3	50.0	0.089
Site of biopsy of TKI					
Primary lesion	9	2	7	22.2	
Metastatic lesion	14	3	11	21.4	1

Note: * P: c-Met (+) compared with c-Met (-) with in subgroup(Fisher exact test)

2.4 继发耐药组中 7 对成对组织的 c-MET 基因扩增

本研究分别检测了 7 例 NSCLC 患者在进行 TKI 治疗前的肿瘤组织和经 TKI 治疗后出现耐药的肿瘤组织的 c-MET 基因扩增。结果显示:TKI 治疗前没有出现 c-MET 的基因扩增,TKI 治疗后有 2 例患者出现了 c-MET 的基因扩增,阳性率为 28.6% (2/7)。TKI 治疗前后的 c-MET 基因扩增差异没有统计学意义(配对资料 t 检验: $P=0.383$)

3 讨论

目前对使用 TKI 治疗的 NSCLC 观察发现,产生继发性耐药的患者仅有部分是因为出现 T790M 突变,部分患者耐药的分子机制尚不清楚。国外 Engelman 等^[10]发现,对吉非替尼(Gefitinib,Iressa)敏感的细胞株 HCC827(EGFR 19 外显子缺失突变的肺腺癌)在长时间吉非替尼诱导后,产生的耐药株 HCC827GR 中 c-MET 基因扩增 5~10 倍。研究证明 c-MET 基因扩增后激活 MET/ERBB3/PI3K 信号通路,导致肺癌对吉非替尼耐药。通过 RNA

干扰抑制 c-MET 的信号通路后,可恢复耐药细胞株对吉非替尼的敏感性。Beau-Faller 等^[9]研究耐药后的肿瘤标本中发现 22%(4/18)有 c-MET 基因扩增,但在吉非替尼或厄罗替尼(Erlotinib,Tarceva)治疗前的 NSCLC 中未能检测到 c-MET 基因扩增。

c-MET 与肺癌的关系非常密切。研究^[11-13]表明,40.9%~60%的 NSCLC 组织中表达 c-MET 蛋白;52%~75.5%的肺癌组织中 c-MET mRNA 的表达增高。c-MET 介导的信号通路与 EGFR 的信号通路存在交叉,对肺癌发生发展过程有重要意义^[14]。新近的研究更显示,c-MET 基因扩增是 NSCLC 对 TKIs 产生继发耐药的重要机制之一。

本研究结果显示,c-MET 基因扩增与性别、吸烟史、组织分型等临床特点无关,与 Beau-Faller 等^[9]的研究结果一致。本研究的基线组即没有接受 TKIs 治疗的 NSCLC 中,c-MET 基因扩增仅是一少见事件(5.5%);但耐药组即 TKIs 治疗一段时间并产生继发耐药的 NSCLC 中,约有五分之一(21.7%)的病例会出现 c-MET 的基因扩增,这一结果与 Engelman 或 Bean 等的报道亦相同^[10,15]。因此可提示 c-MET 基因扩增可能是维持肿瘤细胞继续生长的因素之一;在 NSCLC 中,c-MET 基因主要在 EGFR 通路被阻断后才出现扩增,从而起到信号代偿作用。

比较 TKI 治疗前后的 c-MET 基因扩增结果显示,在治疗前没有 c-MET 基因扩增的 7 例 NSCLC 中,经 TKI 治疗一段时间后出现耐药,有 2 例患者出现了 c-MET 基因扩增。这与 Beau-Faller 等^[9]的研究结果也一致。但 TKI 治疗前后的 c-MET 基因扩增差异没有统计学意义,这可能是由于本研究所收到的配对的病例数太少,尚不能形成主要趋势。

综上所述,NSCLC 临床病理特征与 c-MET 基因扩增无关。在没有接受 EGFR TKIs 治疗的 NSCLC 中,c-MET 基因扩增比较少见。但经过吉非替尼或厄罗替尼治疗后,部分患者的 c-MET 基因出现扩增,代偿生长信号及维持肿瘤细胞存活。

(致谢:感谢 Pasi A. Janne 教授(Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA)提供的细胞株 DNA 样品及宝贵意见。)

参考文献:

[1] Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, et al. Role of the hepato-

cyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002,13(1):41-59.

[2] RosarioM, BirchmeierW. How to make tubes; signaling by the Met receptor tyrosine kinase [J]. *Trends Cell Biol*, 2003,13:328-35.

[3] Recio JA, Merlino G. Hepatocyte growth factor/scatter factor activates proliferation in melanoma cells through p38 MAPK/ATF and cyclinD1 [J]. *Oncogene*, 2002,21(7):1000-1008.

[4] Paumelle R, Tulasne D, Kherrouche Z, et al. Hepatocyte growth Factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway [J]. *Oncogene*, 2002,21(15):2309-2319.

[5] Ichimura E, Maeshima A, Nakajima T, et al. Expression of c-met/HGF receptor in human non-small cell lung carcinomas in vitro and in vivo and its prognostic significance [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1996,87(10):1063-1069.

[6] Siegfried JM, Weissfeld LA, Singh-Kaw P, et al. Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 1997,57(3):433-439.

[7] 田应选,南岩东,杨拴盈.应用激光捕获显微切割技术制备肺癌蛋白质组学研究样品[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2007,28(5):598-601.

[8] Dietmaier W, Hartmann A, Wallinger S, et al. Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification [J]. *Am J Pathol*, 1999,154:83-95.

[9] Beau-Faller M, Ruppert AM, Voegeli AC et al. MET gene copy number in non-small cell lung cancer: molecular analysis in a targeted tyrosine kinase inhibitor naïve cohort [J]. *J Thorac Oncol*, 2008,3(4):331-339.

[10] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T,et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling [J]. *Science*, 2007,316(5827):1039-1043.

[11] Takanami I, Tanana F, Hashizume T, et al. Hepatocyte growth factor and c-Met/hepatocyte growth factor receptor in pulmonary adenocarcinomas: an evaluation of their expression as prognostic markers [J]. *Oncol*, 1996,53(5):392-397.

[12] Cheng TL, Chang MY, Huang SY, et al. Overexpression of circulating c-met messenger RNA is significantly correlated with nodal stage and early recurrence in non-small cell lung cancer [J]. *Chest*, 2005,128(3):1453-1460.

[13] 高霞,刁路明,李恒,等.非小细胞肺癌中肝细胞生长因子受体蛋白表达及其与肿瘤细胞增殖、血管生成的关系[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2005,26(3):273-280.

[14] Guo A, Villén J, Kornhauser J, et al. Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2008,105(2):692-697.

[15] Bean J, Brennan C, Shih JY, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2007,104(52):20932-20937.

[编辑校对:杨 卉]