

肝癌内皮细胞包裹肿瘤细胞团与 VEGF 表达的意义

钟崇 陈智远 吕园园 吴健 李惠东 郭荣平

【摘要】 目的 研究血管内皮细胞生长因子(VEGF)的表达与肝癌形成内皮细胞包裹的肿瘤细胞团(ECTC)的关系及其与肝癌复发预后的关系。方法 选取根治性切除肝癌组织石蜡标本90例,采用免疫组化方法检测标本ECTC形成情况及VEGF表达情况,分析两者相关性及其与预后关系;多因素分析影响肝癌预后的独立危险因素。结果 90例肝癌组织中42例(46.7%)存在ECTC结构,61例(67.8%)VEGF表达阳性。VEGF与形成ECTC具有明显相关性($r_s=0.305, P=0.003$),两者均与肿瘤复发相关($r_s=0.269, r_s=0.174$)。按有/无ECTC及VEGF表达情况,将患者分为A组(ECTC-/VEGF-)、B组(ECTC+/VEGF-; ECTC-/VEGF+)、C组(ECTC+/VEGF+)。A组1、3、5年无瘤生存率分别是92.0%、72.0%和32.0%,B组分别为88.9%、51.9%和14.8%,C组分别为78.9%、15.8%和2.6%,差异有统计学意义($\chi^2=24.101, P<0.01$)。A组的1、3、5年生存率分别是96.0%、80.0%和64.0%,B组分别为96.3%、77.8%和37.0%,C组分别为92.1%、36.8%和18.4%,差异有统计学意义($\chi^2=18.358, P<0.01$)。多因素分析显示TNM分期、ECTC及VEGF是影响生存的独立危险因素。结论 VEGF与形成ECTC具有明显相关性,两者是影响肝癌长期生存的独立危险因素。

【关键词】 癌,肝细胞; 血管内皮生长因子类; 内皮细胞包裹肿瘤细胞团; 免疫组织化学; 复发

Clinical value of endothelium-coated tumor clusters and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma ZHONG Chong*, CHEN Zhi-yuan, LV Yuan-yuan, WU Jian, LI Hui-dong, GUO Rong-ping. *The Third Department of Surgery, the First Affiliated Hospital to Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

Corresponding author: GUO Rong-ping, Email:sumszhong@gmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the clinical value of endothelium-coated tumor clusters (ECTC) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Ninety consecutive HCC specimens were evaluated by immunohistochemical staining for VEGF and cluster of differentiation 34 (CD34). Correlations between VEGF, ECTC and the recurrence of HCC were analyzed. Risk factors to long-term survival were analyzed by a Cox model. **Results** The presence of ECTCs in HCC was 46.7%, and positive staining of VEGF was 67.8%, respectively. The presence of ECTCs in HCC positively correlated to VEGF ($r_s=0.305, P=0.003$) and both positively correlated to HCC recurrence ($r_s=0.269, r_s=0.174$). The HCC patients were divided into three groups, according to presence of ECTC and VEGF: Group A, ECTC(-)/VEGF(-); Group B, ECTC(-)/VEGF(+), or ECTC(+)/VEGF(-); Group C, ECTC(+)/VEGF(+). The 1-, 3-, and 5-year tumor-free survival rates of Group A, Group B and Group C were 92.0%, 72.0% and 32.0%; 88.9%, 51.9% and 14.8%; and 78.9%, 15.8% and 2.6%, respectively. The difference was significant ($\chi^2=24.101, P<0.01$). The 1-, 3-, and 5-year overall survival rates of Group A, Group B and Group C were 96.0%, 80.0% and 64.0%; 96.3%, 77.8% and 37.0%; and 92.1%, 36.8% and 18.4%, respectively ($\chi^2=18.358, P<0.01$). Multivariate analysis revealed that TNM classification, presence of ECTC and VEGF were independent risk factors to long-term survival. **Conclusion** VEGF positively correlated to the presence of ECTCs in HCC. Both could be regarded as valuable indicators for predicting

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.23.010

基金项目: 广东省科技计划项目(2012B061700032); 广东省医学科研基金(A2012216)

作者单位: 510405 广州中医药大学第一附属医院三外科(钟崇、吕园园、吴健、李惠东); 中山大学肿瘤防治中心肝胆外科(陈智远、郭荣平)

通讯作者: 郭荣平, Email:sumszhong@gmail.com

recurrence (or metastasis) risk of HCC patients. The current results suggested that ECTCs and VEGF was predictor of a poor prognosis in patients with HCC.

【Key words】 Carcinoma, hepatocellular; Vascular endothelial growth factors; Endothelium-coated tumor clusters; Immunohistochemistry; Recurrence

肝癌是我国乃至世界上最常见和预后最差的恶性肿瘤之一^[1]。肝癌患者易于发生血行转移,尤其是早期肝内播散,是导致其疾病进展迅速,手术切除率低和术后复发率高的的重要因素。肿瘤血行转移是一个多因素、多阶段的复杂的过程,包括血管生成、肿瘤细胞粘附、侵袭/渗入血管、存活、侵袭/渗血管壁并形成新的转移灶等多个步骤^[2]。最近研究表明,肝癌组织存在一种独特的内皮细胞包裹的肿瘤细胞团结构(endothelium-coated tumor clusters, ECTC),与患者的术后生存及无瘤生存密切相关,可能是肝癌血行转移的新途径^[3]。关于 ECTC 形成的潜在调控机制目前尚不清楚。在小鼠黑色素瘤模型中,过表达血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A) 基因能选择性的促进 ECTC 的形成以及肿瘤的血行转移^[4]。而关于调控人肝癌组织中 ECTC 结构形成机制目前尚未见报道。本研究拟通过研究肝癌组织中 ECTC 结构与血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达关系,探讨两者在肝癌预后中的作用。

资料与方法

一、标本来源

取自中山大学肿瘤防治中心 2000 年 1 月至 2003 年 1 月肿瘤资源库接受根治性切除的肝癌患者。患者术前未行其他治疗。患者术前肝储备功能评估采用 Child-pugh 评分及吲哚靛青绿 15 min 留滞率 (Indocyanine green retention rate at 15 minutes, ICGR15)。临床分期采用 UICC TNM 分期标准(2002)。病理诊断为肝细胞癌,肿瘤组织学分级采用 Edmondson-Steiner 分级标准。

二、免疫组化方法

免疫组化一抗分别用 DAKO 公司鼠抗人单克隆抗体 (CD34, QBE10) 及迈新公司鼠抗人单克隆抗体 (VEGF, JH121)。MaxVision™ 二步法检测 (Kit-5001) 及 DAB 染色。实验步骤及阳性判断标准参照我们已发表的文章介绍的方法进行^[5-6]。

三、随访方法

患者术后 1 个月第一次复查,以后门诊定期 (2~3 个月) 随访。怀疑复发时,行 CT 增强扫描和 (或) 肝动脉造影检查。随访至 2013 年 6 月,随访时间 7~

132 个月 (中位时间 41 个月)。

四、统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件包。计量资料采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, *t* 检验; 计数资料采用率表示, χ^2 检验; Log-rank 法比较两组无瘤生存率及生存率。Cox 多因素回归模型分析预后危险因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 患者临床病理资料情况: 入组患者男 78 例, 女 12 例; 平均年龄 (49.1±12.5) 岁。乙型肝炎病毒表面抗原阳性 77 例。60 例患者术前 AFP>25 ng/ml。术前患者肝储备功能 ICGR15 为 (7.4±3.8) %; 肿瘤平均直径 (6.6±3.4) cm; 74 例为单发肿瘤; 12 例伴有肉眼癌栓。TNM 分期: I 期 67 例, II~III 期 23 例。术后病理为肝细胞癌, Edmondson-Steiner 分级: I~II 级 65 例, III~IV 级 25 例。

2. 肝癌组织 ECTC 的分布及 VEGF 的表达情况: 肝癌组织中均可见 CD34 染色的微血管 (图 1A)。本组资料中, 46.7% (42/90) 肝癌组织中可见 ECTC 结构 (图 1B)。肝癌组织 VEGF 阳性表达主要于肿瘤细胞胞浆内, 癌旁组织可见少量表达 (图 1C)。本组患者 VEGF 的阳性表达率为 67.8% (61/90)。

3. ECTC 形成与 VEGF 及肿瘤复发的相关性: 分析肝癌组织中 VEGF 的表达情况与 ECTC 的相关性, 两组相关系数 $r_s = 0.305$ ($P = 0.003$)。有 ECTC 结构肝癌组织中 VEGF 的阳性表达率 90.5% (38/42), 无 ECTC 结构肝癌组织中 VEGF 的阳性率 47.9% (23/48), 两组差异有显著性 ($\chi^2 = 18.6$, $P < 0.01$)。另外, ECTC 与肿瘤复发 ($r_s = 0.174$, $P = 0.012$) 及 VEGF 与肿瘤复发 ($r_s = 0.269$, $P = 0.010$) 均具有相关性。

4. 患者无瘤生存率: 随访期间有 87 例复发 (87/90, 96.7%), 中位无瘤生存时间 30.6 (3~132) 个月, 1、3、5 年无瘤生存率分别为 86.7%、42.2% 和 14.4%。

按有/无 ECTC 结构及 VEGF 的表达情况, 可以将患者分为 A 组: 无 ECTC 且 VEGF 阴性表达者, 共 25 例; B 组: 有 ECTC 而 VEGF 阴性表达, 或无 ECTC、VEGF 阳性表达者, 共 27 例; C 组: 有 ECTC 及 VEGF 阳性表达组, 共 38 例。

A 组的 1、3、5 年无瘤生存率分别是 92.0%、72.0%

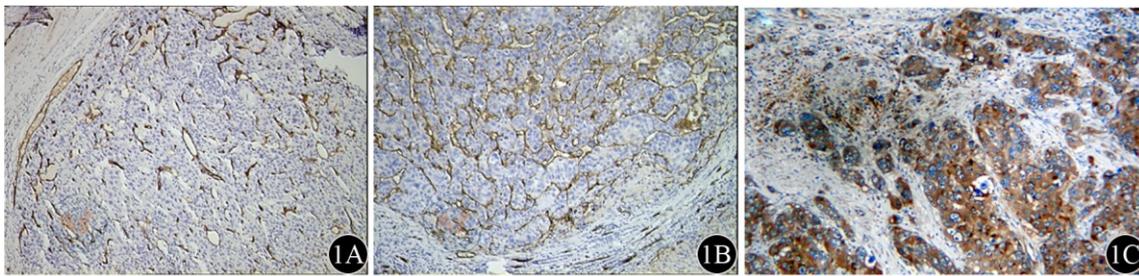


图1 1A: HCC肿瘤组织中CD34染色的微血管 (MaxVision™×100) ; 1B: HCC肿瘤组织内见CD34染色显示ECTC结构 (MaxVision™×100) ; 1C: HCC肿瘤组织中VEGF的表达情况 (MaxVision™×100)

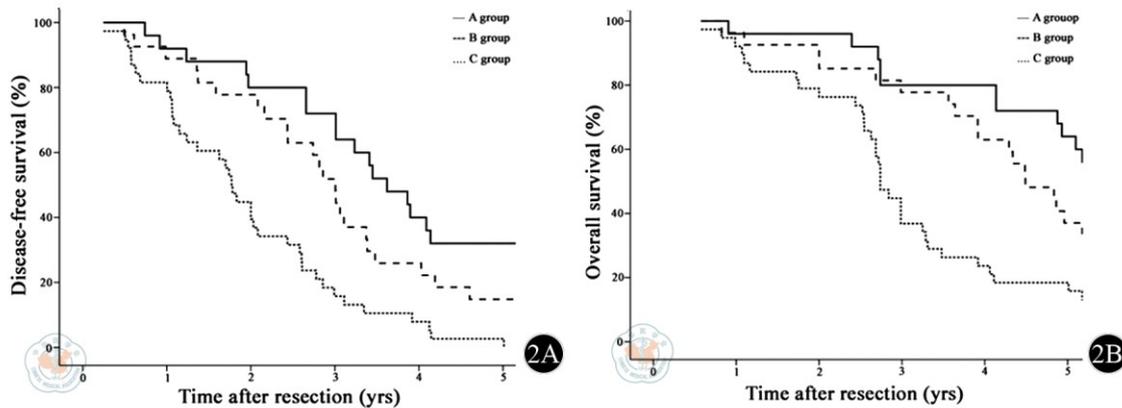


图2 2A: 不同组别肝癌患者的无瘤生存曲线 ($\chi^2=24.101, P<0.01$)。A组: 无ECTC且VEGF阴性表达者; B组: 有ECTC而VEGF阴性表达, 或无ECTC、VEGF阳性表达者; C组: 有ECTC及VEGF阳性表达者。2B: 不同组别肝癌患者的生存曲线 ($\chi^2=18.358, P<0.01$)

和 32.0%, B 组分别为 88.9%、51.9%和 14.8%, C 组分别为 78.9%、15.8%和 2.6%, 差异有统计学意义 ($\chi^2=24.101, P<0.01$, 图 2A)。同时, C 组与 A、B 组相比, 1、2、3 年无瘤生存率明显降低 ($P<0.01$)。

5. 患者生存率: 随访期间有 85 例死亡 (85/90, 94.4%), 中位生存时间 40.6 (7~132) 个月, 1、3、5 年无瘤生存率分别为 95.6%、61.1%和 36.7%。

A 组的 1、3、5 年生存率分别是 96.0%、80.0%和 64.0%, B 组分别为 96.3%、77.8%和 37.0%, C 组分别为 92.1%、36.8%和 18.4%, 差异有统计学意义 ($\chi^2=18.358, P<0.01$, 图 2B)。同时, C 组与 A、B 组相比, 1、3、5 年生存率明显降低 ($P<0.01$)。

6. 影响患者长期生存多因素分析: 将影响患者长期生存的临床病理因素、是否 ECTC、VEGF 表达水平一起纳入 Cox 风险回归模型进行多因素分析, 结果显示 TNM 分期、ECTC 以及 VEGF 阳性表达是影响肝细胞癌患者长期生存的独立危险因素 (表 1)。

表 1 影响患者长期生存的多因素分析

危险因素	危险比	危险比的 95%可信区间	Wald 值	P 值
TNM 分期	0.083	0.018~0.380	10.260	0.001
ECTC	0.490	0.285~0.842	6.670	0.010
VEGF 阳性表达	0.553	0.320~0.957	4.477	0.034

讨 论

肝癌发病率位居全球癌症发病率第六位, 而死亡率则为第三位^[5]。目前肝癌的最有效治疗方法之一手术治疗^[7]。但术后高复发率、预后差仍是肝癌治疗一大难题。研究表明影响肝癌疗效的因素除了手术切缘、术后是否恰当运用辅助性治疗等^[5,8], 最重要的一点是肿瘤本身因素。肝癌易于发生血行转移, 尤其是早期肝内播散, 是导致其疾病进展迅速, 手术切除率低和术后复发率高的因素。肿瘤血行转移是一个多因素、多阶段的复杂的过程, 包括血管生成、肿瘤细胞粘附、侵袭/渗入血管、存活、侵袭/渗出血管壁并形成新的转移灶等多个步骤^[2]。最近研究表明, 肝癌组织存在一种独特的 ECTC, 与患者的术后生存及无瘤生存密切相关^[3]。关于 ECTC 形成的潜在调控机制目前尚不清楚。在小鼠黑色素瘤模型中, 过表达 VEGF-A 基因能选择性的促进 ECTC 的形成以及肿瘤的血行转移^[4]。本研究中, 90 例肝癌组织中, 46.7%可见 ECTC 结构与 Ding 等^[3]报道的一致。67.8%的肿瘤组织中 VEGF 表达阳性, 且与 ECTC 的形成具有明显相关性 ($r_s=0.305, P=0.003$), 提示肝癌组织中也存在 VEGF 促进 ECTC 形成的可能。

近年来 Sugino 等^[9-10]提出了一种新的肿瘤非侵袭

依赖性血行转移途径,即由主瘤灶脱落的癌细胞经过血管内皮细胞包裹形成 ECTC 进入外周血循环后,更易于在远处器官成功“种植”并形成新的转移灶。这些被包裹的癌细胞团通常在肝和肺等具有丰富毛细血管丛的器官中“被滤过”时,更易于被“卡住”并因此生长成为转移灶。在此血行转移过程中,肿瘤内的血管壁并未受到肿瘤细胞的侵袭和渗入。新近肾透明细胞癌研究也发现,患者外周血中存在这类癌细胞团与肺转移密切相关^[11]。这类机制与肝癌易于发生肝内转移和远处肺转移的临床特征非常吻合。Ding 等^[3]研究也发现肝癌组织存在 ECTC,且与患者的术后生存及无瘤生存密切相关。本研究中,具有 ECTC 结构且 VEGF 表达阳性的肝细胞癌,其无瘤生存率及总生存率明显降低。多因素分析也显示,ECTC 及 VEGF 表达阳性是影响肝癌长期生存的独立危险因素。

参 考 文 献

- [1] Caldwell S, Park SH. The epidemiology of hepatocellular cancer: from the perspectives of public health problem to tumor biology. *J Gastroenterol*, 2009, 44: 96-101.
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144: 646-674.
- [3] Ding T, Xu J, Zhang Y, et al. Endothelium-coated tumor clusters are associated with poor prognosis and micrometastasis of hepatocellular carcinoma after resection. *Cancer*, 2011, 117: 4878-4889.
- [4] Kusters B, Kats G, Roodink I, et al. Micronodular transformation as a novel mechanism of VEGF-A-induced metastasis. *Oncogene*, 2007, 26: 5808-5815.
- [5] Guo RP, Zhong C, Shi M, et al. Clinical value of apoptosis and angiogenesis factors in estimating the prognosis of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006, 132: 547-555.
- [6] Chen ZY, Wei W, Guo ZX, et al. The morphologic classification of microvessels in hepatocellular carcinoma are associated with the prognosis after resection. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26: 866-874.
- [7] Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 2012, 379: 1245-1255.
- [8] Zhong C, Guo RP, Li JQ, et al. A randomized controlled trial of hepatectomy with adjuvant transcatheter arterial chemoembolization versus hepatectomy alone for Stage III A hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135: 1437-1445.
- [9] Sugino T, Kusakabe T, Hoshi N, et al. An invasion-independent pathway of blood-borne metastasis: a new murine mammary tumor model. *Am J Pathol*, 2002, 160: 1973-1980.
- [10] Sugino T, Yamaguchi T, Hoshi N, et al. Sinusoidal tumor angiogenesis is a key component in hepatocellular carcinoma metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25: 835-841.
- [11] Kats-Ugurlu G, Roodink I, de Weijert M, et al. Circulating tumour tissue fragments in patients with pulmonary metastasis of clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol*, 2009, 219: 287-293.

(收稿日期: 2013-09-09)

(本文编辑: 马超)

钟崇, 陈智远, 吕园园, 等. 肝癌内皮细胞包裹肿瘤细胞团与 VEGF 表达的意义 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7 (23): 10426-10429.

中 华 临 床 医 师 杂 志