



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.009
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.009
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(7):985-990.

· 专题研究 ·

出血坏死表型肝细胞癌肿瘤微血管特征研究

陶一明, 王志明

(中南大学湘雅医院 普外科肝脏外科, 湖南 长沙 410008)

摘要

目的: 探讨出血坏死表型肝细胞癌(HN-HCC)瘤内微血管(MV)特征。

方法: 收集104例HCC样本, 其中HN-HCC 72例, 非HN-HCC(NHN-HCC) 32例。将每例HCC样本均划分为癌组织中央区、肿瘤中心到肿瘤边缘中间区、肿瘤边缘区3个区域, 分别比较两种类型HCC样本对应区域间MV形态特征以及血管生成相关基因BTB/POZ结构域蛋白7(BTBD7)、缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、促血管生成素2(Ang-2)的mRNA表达的差异。

结果: HCC瘤内MV形态分为肿瘤细胞簇包绕型血管(VETC)、毛细管状血管(CV)和两者混合型(VETC+CV)。两者相应区域间比较, HN-HCC各区域VETC阳性率均高于NHN-HCC(65% vs. 29%、76% vs. 9%、70% vs. 16%), CV阳性率均低于NHN-HCC组(23% vs. 55%、3% vs. 72%、11% vs. 59%), 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 但VETC+CV阳性率均无差异(均 $P > 0.05$); HN-HCC各区域BTBD7, HIF-1 α , Ang-2 mRNA的表达水平均高于NHN-HCC(均 $P < 0.05$)。

结论: HN-HCC瘤内MV形态构筑紊乱且血管生成相关基因异常表达, 可能是导致肿瘤局部缺血缺氧及侵袭转移重要原因。

关键词

癌, 肝细胞; 出血; 坏死; 微血管
中图分类号: R735.7

Features of intratumoral microvessels in hepatocellular carcinoma with hemorrhagic/necrotic phenotype

TAO Yiming, WANG Zhiming

(Department of Liver Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract

Objective: To analyze the features of intratumoral microvessels (MV) in hepatocellular carcinoma with hemorrhagic/necrotic phenotype (HN-HCC).

Methods: A total of 104 specimens of HCC were collected, which included 72 cases of HN-HCC and 32 cases of non-HN-HCC (NHN-HCC). Each HCC specimen was divided into 3 regions designated as the central region of the tumor, intermediate region between the core and margin of the tumor and marginal region of the tumor. The differences in morphological profiles of the intratumoral MV and mRNA expressions of angiogenesis-associated genes that included the BTB/POZ domain-containing protein 7 (BTBD7), hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and angiopoietin 2 (Ang-2) between the parallel regions of the two types of HCC were compared.

基金项目: 国家自然科学基金面上基金资助项目(81372630); 湖南省自然科学基金资助项目(12JJ3118)。

收稿日期: 2016-05-04; **修订日期:** 2016-06-16。

作者简介: 陶一明, 中南大学湘雅医院助理研究员, 主要从事肝癌外科临床与基础方面的研究。

通信作者: 王志明, Email: wzmxyesu@hotmail.com

Results: The patterns of the intratumoral MV were classified as vessels that encapsulated tumor clusters (VETC), capillary vessels (CV) and combined VETC and CV (VETC+CV). Comparison between the parallel regions of the two types of HCC showed that in each parallel region of HN-HCC compared with NHN-HCC, the VETC positive rate was increased (65% vs. 29%, 76% vs. 9%, 70% vs. 16%), while the CV positive rate was decreased (23% vs. 55%, 3% vs. 72%, 11% vs. 59%) and all differences had statistical significance (all $P < 0.05$), but the VETC+CV positive rate had no difference (all $P > 0.05$); the mRNA expressions of BTBD7, HIF-1 α , and Ang-2 were all significantly up-regulated (all $P < 0.05$).

Conclusion: There is disorder of intratumoral MV architecture with aberrant expressions of angiogenesis-associated genes in HN-HCC, which may induce local hypoxia and ischemia as well as tumor invasion and metastasis.

Key words Carcinoma, Hepatocellular; Hemorrhage; Necrosis; Microvessels

CLC number: R735.7

一些实验和临床研究数据证实, 肝细胞癌 (HCC) 的发生发展和血管生成 (angiogenesis) 有关, 而且瘤内微血管 (MV) 密度和形态构筑异常是肿瘤血管生成的直接反映, 是HCC预后不良的独立危险因素, 也是肿瘤发生缺血缺氧、出血坏死的重要原因^[1-2]。新近研究^[3]表明, HCC瘤内MV形态可以分为3类: 肿瘤细胞簇包绕型血管 (vessels that encapsulated tumor clusters, VETC)、毛细管状血管 (capillary vessels, CV) 及两者混合型 (VETC+CV), 其中VETC已被证实是一种新的肝癌血管生成模式, 成为HCC细胞侵袭转移潜在的通道。笔者^[4]的研究已经证实, HCC有或者无出血坏死病理表型是肿瘤微环境和肿瘤异质性的一种重要病理学标志物, 出血坏死表型肝细胞癌 (HN-HCC) 预后不良。但HN-HCC现今尚有很多问题并未阐明, HN-HCC的MV病理特征目前尚不十分清楚。本文收集2009—2010年间104例HCC标本及临床病理资料。通过HCC多区域标本取样策略, 采用免疫组化和荧光定量PCR方法检测了HCC的MV和血管生成相关基因mRNA表达情况, 探讨HN-HCC瘤内MV病理结构特征对侵袭转移潜能的影响, 旨从肿瘤血管生成角度诠释HN-HCC侵袭转移作用机制提供新理论和实验基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

HCC组织样本共104例, 为2009—2010年间于中南大学湘雅医院肝脏外科行手术切除的HCC

患者, 均已被告知并签署书面知情同意书。本课程研究内容已报中南大学湘雅医院医学伦理委员会审批备案, 同意实施。HCC确诊根据2010年版世界卫生组织 (WHO) 病理诊断标准^[5]。HN-HCC病理定义及特征参照文献^[4]报道: 未接受过诊断性穿刺活检和治疗 (介入、射频消融、放疗和抗血管分子靶向药物), 大体标本剖面散在灶性出血及坏死, 易伴发隐匿的卫星结节或血管侵犯。纳入本研究104例HCC分为: HN-HCC组72例, 非HN-HCC (NHN-HCC) 组32例, 所有HCC患者临床资料见表1。

1.2 免疫组化

采取HCC多区域方法收集标本, 所有标本常规石蜡包埋制成4 μm 厚连续切片。采用免疫组织化学SP法检测CD34蛋白表达标记MV (抗体购自英国Abcam公司, 工作浓度1:500) 在HCC中的表达, 以PBS代替一抗作为阴性对照。操作步骤按照免疫组织化学SP试剂盒的说明书 (福州迈新生物技术公司)。免疫染色评分标准参照以前的文献^[2]报道。

1.3 SYBR 荧光染料法定量 PCR

PCR 引物碱基对序列采用美国哈佛大学引物数据库PrimerBank database (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) 在线设计, 扩增产物约100~250 bp大小, 经Blast程序比对确定引物的特异性后, 由大连TaKaRa生物技术公司合成。取TRIzol[®] Reagent (美国Thermo公司) 提取新鲜癌组织总RNA, 测定浓度后合成cDNA用于PCR扩增, 用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 以来计量表示该样本中目的基因的表达水平。反应体系和扩增条件参照文献^[6]。目的基因序列见表2。

表 1 104 例 HCC 临床病理特征 [n (%)]
Table 1 Characteristics of the 104HCC patients [n (%)]

临床病理参数	n	HN-HCC (n=72)	NHN-HCC (n=32)	P	临床病理参数	n	HN-HCC (n=72)	NHN-HCC (n=32)	P
年龄 (岁)					肿瘤包膜				
≤ 60	57	40 (55.6)	17 (53.1)	0.818	有	35	18 (24.3)	17 (53.1)	0.004
> 60	47	32 (44.4)	15 (46.9)		无	69	56 (75.7)	15 (46.9)	
性别					卫星结节				
男	82	55 (76.4)	27 (84.4)	0.357	无	45	25 (34.7)	20 (62.5)	0.008
女	22	17 (23.6)	5 (15.6)		有	59	47 (65.3)	12 (37.5)	
HBsAg					肿瘤分化				
阴性	18	10 (13.8)	8 (25.0)	0.167	I/II	55	33 (45.8)	22 (68.8)	0.031
阳性	86	62 (86.2)	24 (75.0)		III/IV	49	39 (54.2)	10 (31.2)	
肝硬化					静脉侵犯				
无	10	6 (8.3)	4 (12.5)	0.506	无	37	17 (23.6)	20 (62.5)	<0.001
有	94	66 (91.7)	28 (87.5)		有	67	55 (76.4)	12 (37.5)	
AFP (μg/L)					淋巴结转移				
≤ 20	42	29 (40.3)	13 (40.6)	0.973	无	98	68 (94.4)	30 (93.8)	0.889
> 20	62	43 (59.7)	19 (59.4)		有	6	4 (5.6)	2 (6.3)	
肿瘤直径 (cm)					BCLC 分期				
≤ 5	33	15 (20.8)	18 (56.3)	<0.001	A	56	35 (48.6)	21 (65.6)	0.108
> 5	71	57 (79.2)	14 (43.8)		B/C	48	37 (51.4)	11 (34.4)	
肿瘤数目					TNM 分期				
单个	54	43 (59.7)	11 (34.4)	0.017	I	51	31 (43.1)	20 (62.5)	0.067
多个	50	29 (40.3)	21 (65.6)		II/III	53	41 (56.9)	12 (37.5)	

表 2 定量 PCR 扩增基因序列

Table 2 Oligonucleotide sequences of specific primers for quantitative real-time PCR

基因	上游引物序列	下游引物序列
BTBD7	5'-AGTCAAATGCCTGCTTACGG-3'	5'-TGTCTGGCACATTGGACATT-3'
HIF-1 α	5'-CCAGTTAGGTTCCCTTCGATCAGT-3'	5'-TTTGAGGACTTGCGCTTTCA-3'
Ang-2	5'-CTGGGCGTTTTGTTGGTC-3'	5'-GGTTTGGCATCATAGTGTCTGG-3'
GAPDH	5'-TGTCTGGCACATTGGACATT-3'	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'

1.4 统计学处理

所有计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示方式表示。各组间比较采用重复测量方差分析, 用GraphPad Prism6.02软件分析制图。

2 结 果

2.1 HN-HCC 临床病理特征相关性分析

病理大体标本层面研究已发现, HN-HCC和NHN-HCC两者比较具有较明显的差异^[4]。继而分析了HN-HCC与肝癌临床病理特征的相关性, 结果发现HN-HCC与肿瘤大小、包膜、静脉浸润、肿瘤数目、肿瘤分化程度和肝癌临床分期有关 (均 $P < 0.05$), 而与性别、AFP、HBsAg和肝硬化程度无关 (均 $P > 0.05$) (表1)。

2.2 MV 形态特征分析

NH-HCC瘤内细胞分化程度、细胞凋亡及微环境的缺氧程度存在区域性差异^[4]。通过CD34单克隆抗体标记免疫组化染色癌组织3个区域MV (图1), 结果显示, 较CV管状结构, VETC呈现“蜘蛛网络状”包被肝癌细胞巢, 无成熟的血管“管腔状”结构。

比较CV和VETC在HCC肿瘤中心区 (R1)、肿瘤中心到肿瘤边缘中间区 (R2) 和肿瘤边缘区 (R3) 3个区域中的分布情况。HN-HCC组3个区域VETC阳性率 (65%、76%、70%) 均高于NHN-HCC组 (29%、9%、16%), CV阳性率 (23%、3%、11%) 均低于NHN-HCC组 (55%、72%、59%); 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 两组3个区域VETC+CV阳性率差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表3)。

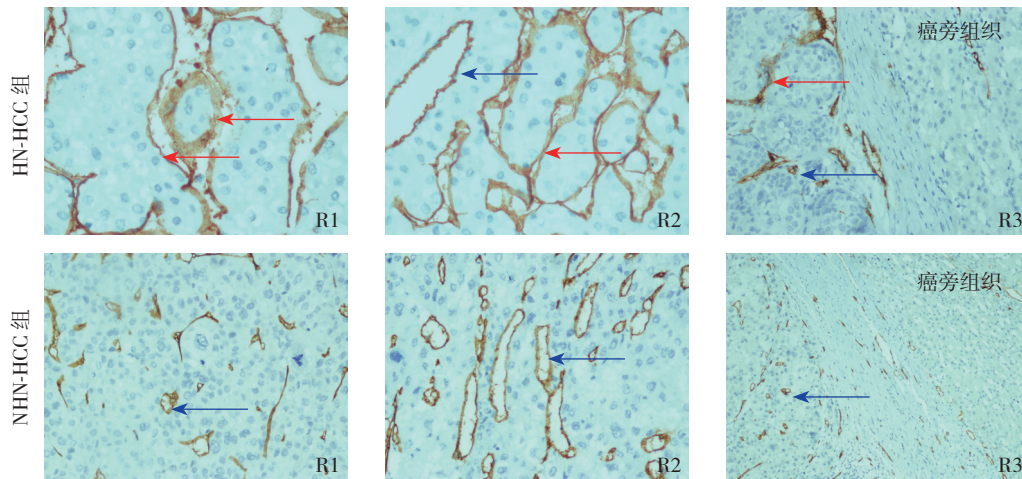


图 1 NH-HCC 和 NHN-HCC 3 个区域 CD34 免疫组化染色 (×200) (红色箭头示 VETC, 蓝色箭头示 CV)

Figure 1 Immunohistochemical staining for CD34 expression in the 3 different regions of NH-HCC and NHN-HCC tissue (×200) (red arrow showing VETC, and blue arrow showing CV)

表 3 104 例 HCC 患者 MV 特征 [n (%)]

Table 3 MV features of the 104 HCC cases [n (%)]

MV 分类	HN-HCC (n=72)			NHN-HCC (n=32)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
VETC	47 (65)	55 (76)	51 (70)	9 (29)	3 (9)	5 (16)
CV	17 (23)	2 (3)	11 (15)	17 (55)	23 (72)	19 (59)
VETC+CV	8 (12)	15 (21)	10 (15)	6 (16)	6 (18)	8 (25)

2.3 HN-HCC 血管生成相关基因表达分析

BTBD7、HIF-1 α 、Ang-2 mRNA 在 HN-HCC 组织中的表达水平高于 NHN-HCC 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。BTBD7, HIF-1 α , Ang-2 mRNA 表达水平在 HN-HCC 组织中 R3 区

上调最为明显, 高于 R1 区和 R2 区 (图 2); 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。如图 2 所示, BTBD7、HIF-1 α 、Ang-2 mRNA 表达水平在 NHN-HCC 组织 R1、R2、R3 3 个区域中无统计学差异 (均 $P > 0.05$)。

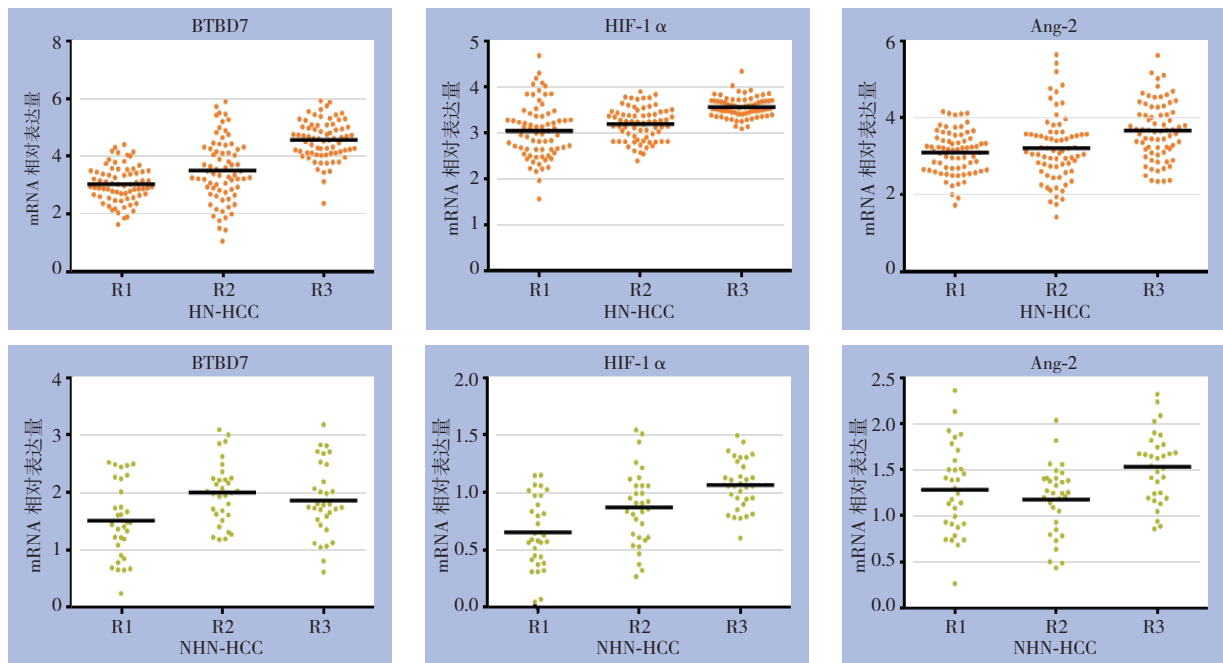


图 2 荧光定量 PCR 分析 BTBD7、HIF-1 α 、Ang-2 mRNA 在 HCC 中的表达 (SYBR 荧光染料法)

Figure 2 qRT-PCR analysis of BTBD7, HIF-1 α and Ang-2 mRNA levels in HCC tumors (SYBR staining)

3 讨论

肿瘤病理组织学及其生物学特性是影响HCC患者预后的主要因素,包括是否伴有肝硬化、肿瘤大小、包膜是否完整、卫星灶、肿瘤病理类型、分化程度、肿瘤结节数目以及淋巴结转移等^[7]。其中卫星灶、微血管侵犯(MVI)和门静脉癌栓形成是肝癌术后早期复发的独立危险因素,这已被众多的学者所接受^[8-9]。在前期工作中笔者发现,一些术前未接受过诊断性穿刺活检和治疗的HCC,术后标本的剖面散在混杂的出血坏死灶,频发卫星结节或血管侵犯,预后不良,称之为HN-HCC。同时与其相对应的,临床上尚存在NHN-HCC,预后较HN-HCC要好^[4]。笔者分析了出血坏死表型与HCC临床病理特征的相关性,结果发现出血坏死病理表型与肿瘤大小、包膜、静脉浸润、肿瘤数目、肿瘤分化程度和HCC临床分期有关。研究结果提示,出血坏死的病理表型的确反映了HCC肿瘤进展及肿瘤细胞生物学行为特征。

MV形态特征和密度直接影响与HCC肝切除术后复发和生存^[10]。VETC已被证实是一种新的肝癌血管生成模式,是潜在的侵袭转移通道^[11]。本研究通过CD34单克隆抗体标记HCC癌组织的MV,结果发现HN-HCC中的MV形态以VETC并形成蛛网状网络特征为主,VETC在HN-HCC的肿瘤中心区、肿瘤中心到肿瘤边缘中间区、肿瘤边缘区和邻近非癌肝组织的数量均高于NHN-HCC。上述研究提示,一方面,不成熟的MV导致局部HCC供氧不足出现出血坏死;另一方面,VETC其不成熟的血管结构特征也为HN-HCC细胞的侵袭转移提供了便捷的门户。由此足以说明HN-HCC瘤内微血管的形态特征是其不良预后的重要原因之一。

新近研究发现,HCC肿瘤微环境与血管生成及侵袭转移密切相关^[7],如免疫抑制作用机理^[12],缺氧微环境激活HIF-1 α ^[13]和Ang-2^[14]信号促进VETC形成。笔者前期研究^[6]证实:BTBD7表达具有调控肿瘤血管塑形的潜在重要功能,并与肝癌MV正相关。为了初步探讨上述HN-HCC瘤内微血管密度和形态异常可能涉及的分子事件。本研究检测并发现BTBD7, HIF-1 α , Ang-2基因在HN-HCC组织中mRNA表达水平显著高于NHN-HCC组。提示HN-HCC肿瘤微环境可能活化的血管生

成信号通路,促进MV异常构筑。另有研究^[15]表明,HCC细胞恶性程度越高,其细胞外基质硬度(matrix stiffness)牵引力越高,引起细胞表面牵张力变化,导致基质力学的改变调节MV构筑和发生上皮-间质转化(EMT)表型促进肿瘤细胞侵袭转移^[16]。HN-HCC的微血管结构特征是否涉及基质-力学作用机理还有待进一步研究予以证实。

综上所述,本研究初步发现了HN-HCC的MV形态特征以VETC居多并与HCC侵袭转移表型密切相关。但本研究为临床样本研究,其研究结果仍需从体外细胞实验和体内动物模型两个层面,深入探讨HN-HCC病理特征及瘤内异质性。旨在进一步鉴定调控HN-HCC侵袭转移的关键分子并阐明其作用机制。

参考文献

- [1] Muto J, Shirabe K, Sugimachi K, et al. Review of angiogenesis in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatol Res*, 2015, 45(1):1-9.
- [2] Poon RT, Ng IO, Lau C, et al. Tumor microvessel density as a predictor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study[J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(7):1775-1785.
- [3] Fang JH, Zhou HC, Zhang C, et al. A novel vascular pattern promotes metastasis of hepatocellular carcinoma in an epithelial-mesenchymal transition-independent manner[J]. *Hepatology*, 2015, 62(2):452-465.
- [4] 陶一明, 王志明. 出血坏死表型肝细胞癌病理特征及预后的前瞻性初步研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(1):6-11.
Tao YM, Wang ZM. Pathologic features and prognosis of hepatocellular carcinoma with hemorrhagic/necrotic phenotype: a prospective preliminary study[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(1):6-11.
- [5] Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, et al. WHO classification of tumours of the digestive system[M]. Lyon: IARC Press, 2010:205-227.
- [6] Tao YM, Huang JL, Zeng S, et al. BTB/POZ domain-containing protein 7: epithelial-mesenchymal transition promoter and prognostic biomarker of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2013, 57(6):2326-2337.
- [7] Hernandez-Gea V, Toffanin S, Friedman SL, et al. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(3):512-527.
- [8] Roayaie S, Blume IN, Thung SN, et al. A system of classifying microvascular invasion to predict outcome after resection in

- patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2009, 137(3):850-855.
- [9] 王志明, 胡宽, 陶一明. 伴门静脉癌栓的原发性肝癌外科治疗: 附 335 例报告[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(7): 928-932.
- Wang ZM, Hu K, Tao YM, Surgical treatment strategy for primary liver cancer with portal vein tumor thrombus: a report of 335 cases[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2015, 24(7):928-932.
- [10] Chen ZY, Wei W, Guo ZX, et al. Morphologic classification of microvessels in hepatocellular carcinoma is associated with the prognosis after resection[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(5):866-874.
- [11] Hanley KL, Feng GS. A new VETC in hepatocellular carcinoma metastasis[J]. *Hepatology*, 2015, 62(2):343-345.
- [12] Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(2):73-86.
- [13] Li J, Xu Y, Long XD, et al. Cbx4 governs HIF-1 α to potentiate angiogenesis of hepatocellular carcinoma by its SUMO E3 ligase activity[J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(1): 118-131.
- [14] Mittal K, Ebos J, Rini B. Angiogenesis and the tumor microenvironment: vascular endothelial growth factor and beyond[J]. *Semin Oncol*, 2014, 41(2):235-251.
- [15] Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(12):802-812.
- [16] Wei SC, Fattet L, Tsai JH, et al. Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(5):678-688.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 陶一明, 王志明. 出血坏死表型肝细胞癌肿瘤微血管特征研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(7):985-990. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.009

Cite this article as: Tao YM, Wang ZM. Features of intratumoral microvessels in hepatocellular carcinoma with hemorrhagic/necrotic phenotype[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(7):985-990. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.009

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计: 应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计 (分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究); 实验设计 (应交代具体的设计类型, 如自身配对设计、成组设计、交叉设计、正交设计等); 临床试验设计 (应交代属于第几期临床试验, 采用了何种盲法措施等)。主要做法应围绕 4 个基本原则 (随机、对照、重复、均衡) 概要说明, 尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述: 用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料, 用 $M(QR)$ 表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于 20, 要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择: 对于定量资料, 应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备条件以分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析, 应结合专业知识和散布图, 选用合适的回归类型, 不应盲目套用简单直线回归分析, 对具有重复实验数据的回归分析资料, 不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料, 要在一元分析的基础上, 尽可能运用多元统计分析方法, 以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达: 当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时, 应说明对比组之间的差异有统计学意义, 而不应说对比组之间具有显著性 (或非常显著性) 的差别; 应写明所用统计分析方法的具体名称 (如: 成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等), 统计量的具体值 (如 $t=3.45$, $\chi^2=4.68$, $F=6.79$ 等) 应可能给出具体的 P 值 (如 $P=0.0238$); 当涉及到总体参数 (如总体均数、总体率等) 时, 在给出显著性检验结果的同时, 再给出 95% 置信区间。

中国普通外科杂志编辑部