

文章编号:1005-6947(2008)07-0692-05

· 临床研究 ·

# 肝癌术后肝再生状态与肝癌复发关系的初步研究

蔡云峰, 甄作均, 陈焕伟, 苏树英

(中山大学附属佛山市第一人民医院 肝胆外科, 广东 佛山 528000)

**摘要:**目的 探讨肝癌肝切除术后再生激素的变化,以评估肝再生激素与肝癌复发之间的关系。方法 收集2年内确诊为原发性肝癌行手术治疗的患者129例的临床资料,将小肝癌及大肝癌术后复发患者分别分为术后1,6个月,1年复发组,并以肝癌TAE治疗患者40例作为对照组。分别于术前1d与术后1,3,7,10,14d清晨抽取静脉血检测血清肝细胞生长因子(HGF),观察其在手术前后HGF的变化。手术中切取癌及癌旁组织为标本分别采用半定量RT-PCR及Western Blot法检测HGF受体c-met的mRNA及蛋白表达,比较复发时间早晚与表达量的差别。将所得结果与病理检查发现的脉管癌栓发生率对照。结果 肝切除后,患者血清HGF水平升高,术后约10d达高峰期,14d开始降低。大肝癌组的HGF升高水平明显高于小肝癌组( $P < 0.05$ )。大、小两肝癌组的c-met mRNA及蛋白的水平变化均显示肿瘤复发时间越早,c-met水平越高,脉管癌栓发生率越高。结论 肝癌患者肝部分切除术后血清HGF水平明显增高及肿瘤本身c-met蛋白过度表达可能与术后早期复发有关。

[中国普通外科杂志,2008,17(7):692-696]

**关键词:** 肝肿瘤; 肝切除术; 肝再生; 肿瘤复发; 肝细胞生长因子

中图分类号:R 735.7

文献标识码:A

## A preliminary study of the relationship between postoperative liver regeneration and HCC recurrence

CAI Yunfeng, ZHEN Zuojun, CHEN Huanwei, SU Shuying

(Department of Hepatobiliary Surgery, the First People's Hospital of Foshan, Foshan, Guangdong 528000, China)

**Abstract: Objective** To explore the variations of regeneration hormones after hepatectomy for liver cancer, and evaluate the relationship between the liver regeneration hormones and cancer recurrence. **Methods** The clinical data of 129 patients with primary hepatic carcinoma in our hospital from Dec 2004 to Dec 2005 were collected. The patients were divided into three groups according to their recurrent times, which were one-month recurrence group, 6 months recurrence group and one-year recurrence group. And at the same time, 40 cases of liver cancer that received TAE treatment were as contrast group. Serum HGF value was detected before operation and 1, 3, 7, 10 and 14 days after operation. c-met, which is the receptor of HGF, was also detected as c-met mRNA and protein expression in cancer tissue and near-carcinoma liver tissue by semi-quantitative RT-PCR and Western Blot. The differences between the level of expression and the time of recurrence were compared, and the results were also compared with pathological indexes. **Results**

Serum HGF value elevated after hepatectomy, the crest time appeared at about 10 days after the operation, and decreased after 14 days. The elevated values of HGF in large HCC tumors were markedly higher than those in small HCC tumors. The change of c-met mRNA and protein levels, revealed that the earlier the

收稿日期:2007-12-04; 修订日期:2008-03-20。

作者简介:蔡云峰,男,中山大学附属佛山医院(佛山市第一人民医院)副主任医师,主要从事肝胆方面研究。

通讯作者:蔡云峰 E-mail:yfcai70@yahoo.com.cn

recurrence in both large and small HCC, the higher the c-met levels, and the higher the rate of vascular cancer emboli. **Conclusions** There is marked elevation of HGF level after hepatectomy in patients with liver carcinoma, and the over expression of c-met of the tumor may be related to its early postoperative recurrence.

[ Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17 ( 7 ) : 692 - 696 ]

**Key words:** Liver Neoplasms; Hepatectomy; Liver Regeneration; Neoplasm Recurrence; HGF

**CLC number:** R 735.7

**Document code:** A

肝癌术后5年生存率极少超过40%,复发多在术后1~2年,至今尚缺乏判断肝癌术后预后理想的指标。肝切除后肝脏即进入增殖状态,引起一系列肝再生因子水平的变化<sup>[1]</sup>,使肝的再生有序地进行,但也有可能改变已发生肝内微转移的肿瘤细胞所处的微环境,导致肿瘤复发。其中,HGF是肝细胞最强烈的增殖刺激因子和促有丝分裂原,与肿瘤细胞的生长、浸润及转移关系密切<sup>[2-3]</sup>。检测肝癌术后肝细胞生长因子(HGF)激素水平的变化及肝癌组织的HGF受体表达将有可能揭示肿瘤复发与肝再生激素的关系,为预防和减少肝癌术后复发提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床一般资料

收集我院2004年12月—2006年12月确诊为原发性肝癌行手术治疗126例患者的临床资料,其中男110例,女16例;年龄(45.6±9.8)岁(25~68岁)。HBsAg阳性114例(88.4%),甲胎蛋白(AFP)阳性105例(81.4%)。病理学检查均证实为肝细胞癌(HCC)。肿瘤小于5cm的小肝癌38例(小肝癌组,SHCC),88例为大于5cm的肝癌(大肝癌组,LHCC)。SHCC组肝切除范围为1~2个肝段,LHCC切除范围均为半肝切除。术后随访1~2年,将小肝癌及大肝癌分别再分为术后1,6个月,1年复发组(表1)。并收集同期诊断为原发性肝癌、肝内单结节、行经肝动脉栓塞化疗(TACE)的患者40例作为对照组,男36例,女4例,年龄(19±8.7)岁(23~62岁),均为HBsAg阳性,AFP阳性者31例,肿瘤均大于5cm,行TAE治疗后1个月患者复查无肝内转移灶。

表1 肝癌术后1年内复发病例数

组别	总例数	复发时间			合计(%)
		1月复发	6月复发	1年复发	
小肝癌	38	0	10	13	23(60.5%)
大肝癌	88	16	22	42	80(90.9%)

### 1.2 实验方法

1.2.1 标本收集与处理 所有手术及TAE治疗的患者分别于术前1d与术后1,3,7,10,14d清晨抽取静脉血(4mL),室温下凝血30min,血清分离后,将血清吸入另一微量离心管内,2000r/min离心20min,置于-80℃保存以备测定HGF浓度。另取对手术切除的癌组织及癌旁组织1.0cm×1.0cm×1.0cm各1块,置液氮速冻后放-80℃保存备用。

1.2.2 血清HGF测定 采用双抗夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)法。用美国DiacloneHGFELISA检测试剂盒,按说明书操作方法建立HGF浓度标准曲线,检测各血清样品的浓度。

1.2.3 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测c-met mRNA的水平表达 采用Trizol试剂(Promega)从肝癌及癌旁组织中提取总RNA。以2μg总RNA为模板,0.5μg随机引物(Takara),逆转录酶M-MLV(Promega)进行逆转录合成cDNA第一链;反应条件为70℃5min,37℃1h,95℃5min。cDNA再进行PCR反应,反应缓冲液含引物、LA Taq酶(Takara)。引物为c-met(5'-CGATGCAAGAGTACACA-3'和5'-CGGTCAGAAATTTGGGAA-3',扩增片段450bp),内参照为β-actin(5'-GAACAACGGCTCCGGCATGTG-3'和5'-TGAGGATGCTCTCTTGCTC-3',扩增片段166bp)。PCR反应条件:c-met反应条件为94℃30s变性,50℃30s退火,72℃1min延伸;共35个循环。β-actin反应条件为:94℃40s变性,55℃45s退火,72℃40s延伸;共30个循环。

同一标本的c-met,β-actinPCR产物和加样缓冲液,按5:5:2的体积比混合,充分混匀后取10μL加入1.5%琼脂糖凝胶的上样孔中,电压80V,0.5×TBE电泳缓冲液电泳。电泳结束后以0.5μg/mL溴化乙锭(EB)染色10min。凝胶成像仪进行拍照记录,并用机内UVI-Map软件进行图像分析。用光密度指数(OPTDI)表示各条带mRNA表达的量,光密度指数等于平均光密度(OPTDM)与条带面积(AREA)之乘积。比较分析各泳道c-met与β-actin的光密度之比(R)作为c-met mRNA的相对含量。实验时,每一样本的强度之比为3次独立电泳的平均值。

**1.2.4 免疫印迹 (Western blot) 法检测 c-met 蛋白的表达** 分别取 0.5 g 肝癌及癌旁组织电动匀浆, 超声粉碎仪粉碎, 4 ℃ 12 000 r/min 离心 20 min; Bradford 法测定蛋白浓度。根据蛋白浓度将样本稀释成相同的浓度, 煮沸 3 ~ 5 min 待用。已煮沸的样品用微量加样器等体积加入 SDS-PAGE 凝胶的上样孔, 使每孔的蛋白上样量为 25 μg。垂直电泳。待溴酚蓝到达分离胶底部, 停止电泳。取出凝胶进行电转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。封闭膜, 加入一抗 (鼠抗人 c-met 单克隆抗体, 稀释度 1:500) 孵育; 再加入 HRP 标记的抗鼠二抗 (稀释度 1:2 000), 室温孵育。将膜上的液体烘干, 加入 10 mL 发光液 LumiGLO 反应。曝光 X 片。然后洗涤 PVDF 膜, 剥脱抗体; 再从膜的封闭步骤开始, 重复以上操作。加入的一抗为小鼠抗人 α-tubulin 单克隆抗体, 稀释度 1:1 000, 曝光获得 X 线片。Western 印迹杂交 X 线片用图像扫描。采用 KONTRON IBAS 2.5 全自动图像分析系统对 c-met 与内参 α-tubulin 条带进行光密度分析, 将 c-met/α-tubulin 值作为 c-met 表达的相对含量。

**1.2.5 各组 c-met 水平与病理资料比较** 各组病例所获得的 c-met 水平分别与病理报告结果对照, 比较脉管癌栓的发生率。

### 1.3 统计学处理

实验数据计量资料用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 所有数据用统计学软件 SPSS11.0 进行分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肝切除后 HGF 水平的变化

肝切除后, 各组患者血清 HGF 水平升高, 术后

约 10 d 出现高峰期, 14 d 开始降低。LHCC 组升高的水平明显高于 SHCC 组 ( $P < 0.05$ ), 而 TAE 患者 (对照组) 术后略为增高, 两肝癌组各时段的 HGF 水平均显著高于 TAE 对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。肝切除范围越大, HGF 水平越高。

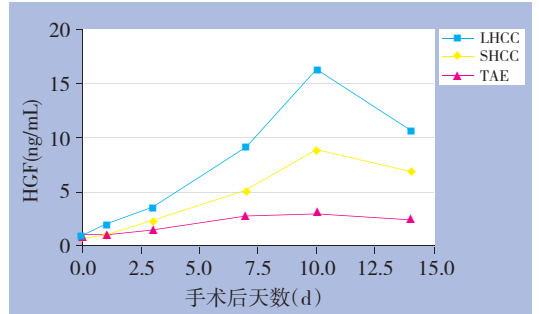


图 1 肝癌术后 HGF 水平的变化

### 2.2 不同复发时段 c-met mRNA 的表达

RT-PCR 结果显示, 术后不同复发时段肝癌组织均存在 c-met mRNA 的转录, 而癌旁组织中 c-met mRNA 转录量少, 半定量 c-met/β-actin 值为  $0.06 \pm 0.05$ , 与肝癌组织相比, 差异均有显著意义 ( $P < 0.01$ )。SHCC 组中, 6 个月复发患者半定量 c-met/β-actin 值为  $0.66 \pm 0.16$ , 1 年复发半定量 c-met/β-actin 值为  $0.29 \pm 0.05$ ; 6 个月复发组与 1 年复发组差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。LHCC 组中, 1, 6 个月及 1 年复发组半定量 c-met/β-actin 值分别为  $0.89 \pm 0.11$ ,  $0.62 \pm 0.10$  和  $0.39 \pm 0.09$ , 各组间差异均有显著意义 ( $P < 0.05$ ) (图 2-3)。

LHCC 及 SHCC 两组在相同复发时段的比值没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

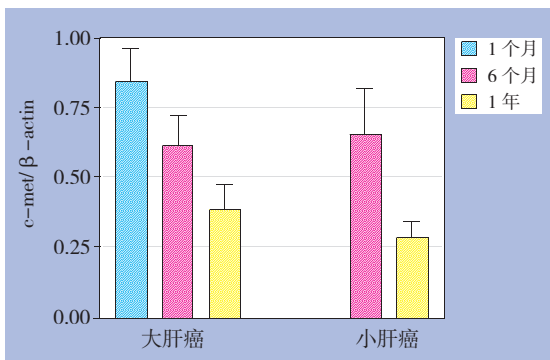


图 2 不同复发时段肝癌 c-met mRNA 转录水平比较

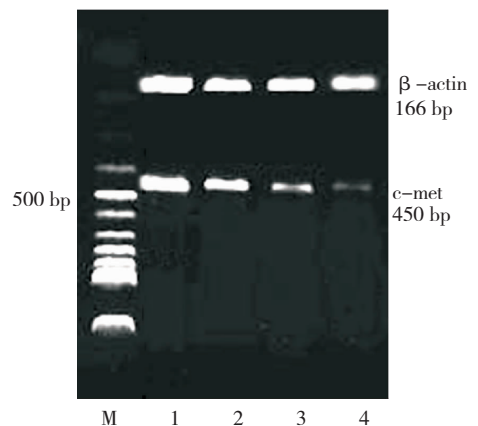


图 3 RT-PCR 检测各组 c-met mRNA 转录 M:marker; 1:1 个月复发; 2:6 个月复发; 3:1 年复发; 4:癌旁组织

### 2.3 不同复发时段 c-met 的蛋白表达

Western Blot 结果显示,肝癌组织均有不同程度的 c-met 蛋白表达,但癌旁组织表达量较少。SHCC 组中, c-met/ $\alpha$ -tubulin 值在 6 个月复发组与 1 年复发组分别为  $0.23 \pm 0.05$  和  $0.11 \pm 0.05$ , 差异有显著意义 ( $P < 0.05$ )。LHCC 组 1,6 个月复发组及 1 年复发组 c-met/ $\alpha$ -tubulin 值分别为  $0.60 \pm 0.15$ ,  $0.26 \pm 0.09$  和  $0.19 \pm 0.05$ , 其中 1 个月复发组与其他两组比较差异有显著性 ( $P < 0.01$ ), 而 6 个月组与 1 年复发组差别不显

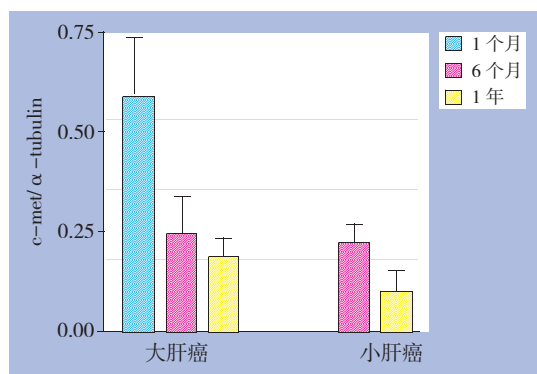


图4 不同复发时段 c-met 蛋白表达水平比较

表2 不同复发时段癌栓发生率

组别	癌栓发生率(例,%)		
	1个月复发	6个月复发	1年复发
SHCC	-	8/10(80.0%)	7/13(53.8%)
LHCC	16/16(100%)	14/22(63.6%)	18/42(42.9%)
P 值	-	>0.05	>0.05

### 3 讨论

总体而言,手术是治疗肝癌的最有效方法,然而术后的复发和转移仍严重影响治疗效果。临床上常可观察到,术前临床表现、特殊检查结果相似的肝癌患者,手术后的结果却差别很大;有术后早期复发者,也有长期生存而不复发者。另外还可观察到,不适宜手术治疗的大肝癌患者,行 TAE 或其他消融治疗,在原发肿瘤存在的情况下,肝内长时间内往往不容易出现多发的转移增殖病灶,其原因可能在于微转移的肿瘤细胞并未获得增生的优势。手术后的肝脏处于增殖

著 ( $P > 0.05$ ), 6 个月组表达量大于 1 年复发组 (图 4-5)。

LHCC 及 SHCC 两组在相同复发时段的比值没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 肝癌组织中 c-met 蛋白表达量与临床病理表现的关系

SHCC 与 LHCC 不同复发时段病理检查发现的癌栓发生率均表现为复发时间越早,脉管癌栓发生率越高;相同复发时间,SHCC 组比 LHCC 组癌栓发生率高,差异无统计学意义(表 2)。

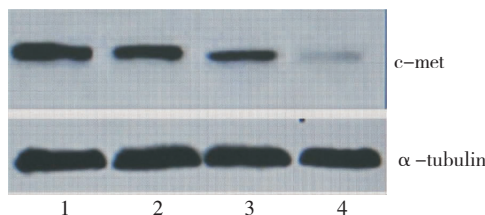


图5 Western blot 检测各组 c-met 蛋白表达 1:1 个月复发; 2:6 个月复发; 3:1 年复发; 4:癌旁组织

状态,肝再生所引起的激素水平变化一方面引起肝细胞的增生,另一方面可能引起肿瘤细胞的增殖,从而获得在术前所没有的增殖优势,导致肿瘤复发<sup>[4]</sup>。

肝切除术后引起一系列激素变化,其中 HGF 是近年来关注的热点之一。HGF 具有明显的促细胞分裂、细胞动力以及血管形成等多种功能<sup>[5]</sup>。肝细胞再生或生长需要 HGF,它主要通过旁分泌途径获得大量 HGF,并与 c-met 受体结合而产生生物学效应<sup>[6-8]</sup>。研究发现,肝癌等多种肿瘤组织或细胞内 c-met mRNA 及其蛋白存在过量表达,并与患者的预后直接相关<sup>[8]</sup>。本研究发现,HGF 在术后即开始升高,至术后约 10 d 出现高峰期,术后 2 周逐渐降低。这与临床上观察到患者在 10 d 之后肝功能逐渐恢复是相应的;而且大小肝癌水平变化有差别,大肝癌组 HGF 水平明显高于小肝癌组,提示与肝切除量有关系。HGF 水平的升高引起肝再生修复,肝功能恢复,而另一方面是否会引起肿瘤的复发是值得注意的问

题。本文发现,术后复发时间越早的患者,其 c-met 的 mRNA 转录及蛋白的表达水平越高。据此推测,肝癌切除术后血清 HGF 水平升高,使肝内微转移病灶获得增殖的机会,导致术后早期的复发。Nihon 大学医学院选取 99 例慢性丙肝、肝硬化和 HCC 患者作血清 HGF 检测,结果显示,HGF 水平可反映慢性丙肝与肝硬化的肝脏肿瘤的发生状态。HGF 血清浓度超过 0.6 ng/mL 的患者均发生 HCC,而且肝细胞癌术后 HGF 水平高者的预后相对较差<sup>[9-10]</sup>。提示肝癌患者围手术期控制活动性肝炎减少肝损害对肝癌的预后有益,这是由于减轻了肝再生因子的刺激。

总之,从本研究可见,肝癌患者肝部分切除术后血清 HGF 水平明显增高及肿瘤本身 c-met 蛋白过度表达可能与术后早期复发有关。进一步研究肝再生激素变化、肿瘤受体的表达以及激素受体结合后细胞信号的传导,可为肝癌患者术前的决策、治疗方法的选择、术后处理提供参考。

#### 参考文献:

- [1] 吕璟. 肝再生相关细胞因子的探究[J]. 解剖科学进展, 2005, 11(2):174-179.
- [2] 董薇. 肝细胞生长因子及其临床应用研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2001, 29(3):87-91.
- [3] Guirouilh J, Castroviejo M, Balabaud C, *et al.* Hepatocarcinoma cells stimulate hepatocyte growth factor secretion in human liver myofibroblasts[J]. *Int J Oncol*, 2000, 17(4):777-781.
- [4] Christophi C, Harun N, Fifis T. Liver regeneration and tumor stimulation-a review of tytokine and angiogenic factors[J]. *J Gastrointest Surg*, 2008, 12(5):966-980.
- [5] 李宏武,张趣,梁健. 大肠癌细胞增殖中 HGF/SF 作用研究[J]. 中国普通外科杂志, 2006(2):111-115.
- [6] Yn Y, Merlino G. Constitutive c - met signaling through aronautocrine mechanism promotes metastasis in a transgenic-transplantation model[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(10):2951-2956.
- [7] 辛华,郑雅娟,韩振国,等. 肝细胞生长因子对癌细胞向血管内游走的影响[J]. 吉林大学学报, 2004, 30(4):589-591.
- [8] Monvoisin A, Bisson C, Si Tayeb K, *et al.* Involvement of matrix metalloproteinase type-3 in hepatocyte growth factor-induced invasion of human hepatocellular carcinomacells[J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(2):157-162.
- [9] Yamagamin H, Moriyama M, Matsumura H, *et al.* Serum concentration of human growth factor is a useful indicator for prediction the occurrence of hepa-tocellular carcinomas in C-viral chronic liver diseases[J]. *Cancer*, 2002, 95(4):824-834.
- [10] 朱洪,郭永章,李立,等. 促肝细胞生长素对慢性肝损伤鼠肝部分切除术后肝细胞的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2002(1):29-32.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 本刊决定采用汉语拼音姓名的新写法

编辑学报 2007 年第 5 期刊登了我国台湾省留美学者许仲平教授提出的中国人汉语拼音姓名写法的建议:姓在前,名在后,姓的字母全大写,名只首字母大写,双名间不加连接号,名字不缩写。

例如:“杨为民”写作“YANG Weimin”,不写作“Yang Weimin”或“YANG Wei-min”或“YANG W M”或“YANG W”。这是一个有助于解决西方人对中国人姓名误解的好建议。

这一建议符合中国人的姓名习惯,与现行有效的国家标准的规范也基本一致,差别只在于建议的姓字母全大写,而国家标准仅规定姓的首字母大写,而这样做确实便于西方人清楚区别中国人的姓和名。目前本刊实行的是姓字母全大写,双名间加连接号。经慎重研究,决定从 2008 年起采用姓的字母全大写、双名间不加连接号的建议。

中国普通外科杂志编辑部