

文章编号:1005-6947(2004)03-0205-04

· 临床研究 ·

# 原发性肝癌组织 VEGF 与外周血 AFP mRNA 检测的临床意义

常实, 汤恢焕, 龚学军, 周军

(中南大学湘雅医院 普外科, 湖南 长沙 410008)

**摘要:**目的 探讨肝癌组织中血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达与外周血液中甲胎蛋白(AFP) mRNA 表达在原发性肝细胞癌转移中的意义。方法 用巢式逆转录 PCR 法检测 20 例肝癌患者术前外周血液中的 AFP mRNA, 对其手术切除标本采用免疫组化方法检测 VEGF 蛋白表达, 结合临床病理资料进行配对分析。结果 (1) 20 例原发性肝细胞癌中 10 例 VEGF 为阳性表达, 其表达情况与临床病理参数无明显相关; (2) 20 例肝癌中 13 例 AFP  $\geq 200 \mu\text{g/L}$ , 15 例外周血液中 AFP mRNA 阳性; (3) VEGF 阳性的 10 例病例中有 9 例在外周血中可检测到 AFP mRNA。结论 (1) 肝癌组织 VEGF 和外周血中 AFP mRNA 检测都可作为判断原发性肝癌有无血行转移倾向的指标, 前者较为简单, 而后者较为客观准确。(2) 对肝癌高危人群的普查和肝癌术后随访, 应用外周血中 AFP mRNA 的检测方法较血清 AFP 水平更加敏感。

**关键词:** 肝肿瘤/病理学; VEGF; AFP mRNA

**中图分类号:** R735.7 **文献标识码:** A

## Clinical significance of VEGF protein expression in hepatoma tissue and the AFP mRNA expression in peripheral vein blood in hepatocellular carcinoma

CHANG Shi, TANG Hui-huan, GONG Xue-jun, ZHOU Jun

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

**Abstract:** **Objective** To study the significance of expression of VEGF in the hepatocellular carcinoma tissue (HCT) and the expression of AFPmRNA in the peripheral vein blood in hepatocellular carcinoma patients (HCC) with metastasis. **Methods** AFPmRNA was detected in peripheral blood before operation and the expression of VEGF in HCC tissue was analyzed by immunohistochemistry after operation in 20 patients. The relations between the expression of VEGF protein and AFPmRNA with clinicopathological parameters were analyzed statistically. **Results** (1) Among the 20 patients with HCC, 10 were positive expression of VEGF protein, which had no relation with the clinicopathological parameters. (2) Of the 20 patients, positive expression of AFPmRNA were detected in the peripheral blood in 15 patients, and AFP  $\geq 200 \mu\text{g/L}$  were found in 13 patients. (3) AFPmRNA in the peripheral blood vein was detected in 9 of 10 patients with VEGF positive expression. **Conclusions** (1) Either VEGF protein expressed in HCC tissue or AFPmRNA detected in the peripheral blood could be as a guide line to judge the tendency of the metastasis of HCC, however former is simpler and the later is more sensitive. (2) The detection of AFPmRNA in the peripheral blood is more sensitive than the detection of serum AFP lever for surveillance of the high risk patients and postoperative follow up of the patients with HCC.

**Key words:** LIVER NEOPLASMS/pathol; VEGF; AFP mRNA

**CLC number:** R735.7 **Document code:** A

收稿日期:2003-09-01; 修订日期:2003-11-18。

**作者简介:**常实(1973-),男,河南安阳人,中南大学湘雅医院主治医师,博士,主要从事普外科疾病的临床与基础方面的研究。

目前虽然对原发性肝细胞癌治疗的手术技术及相关辅助治疗取得了较大进步,但其预后仍不理想。导致治疗失败的主要原因是转移和术后复发。如果能够利用有效的检测手段对肝癌的转移倾向做出早期准确的判断,将有助于制定有针对性的个体化治疗方案,减少肝癌术后转移及复发的可能。本研究旨在探讨原发性肝细胞癌中血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达与肝癌微转移指标——外周血液中甲胎蛋白(AFP)mRNA的相互关系,以了解两者在肝癌转移中的意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

研究对象为中南大学湘雅医院1999年4月~2000年5月普外科住院的部分肝癌患者20例。均经手术切除及病理组织学切片确诊。其中男16例,女4例。年龄19~70(平均46)岁。

### 1.2 免疫组织化学染色

1.2.1 标本 切除肝癌标本常规行石蜡包埋,取5 $\mu$ m厚连续切片行病理学检查和VEGF免疫组化检测。

1.2.2 试剂 兔抗人VEGF单克隆抗体及免疫组织化学SABC试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2.3 方法和结果判断 按SABC试剂盒说明操作。阳性对照由试剂公司提供,阴性对照以PBS取代一抗。VEGF的表达阳性为肿瘤细胞胞浆或胞膜染成棕黄色。评价采用半定量计分法:高倍镜下计数1000个肿瘤细胞,将阳性肿瘤细胞的百分率和染色强度分别计分,具体如下:(1)阳性细胞的百分率<5%0分,5%~25%1分,26%~50%2分,51%~75%3分,>75%4分。(2)阳性细胞的染色强度为无染色0分,淡棕黄色1分,中等棕黄色2分,深棕黄色或胞浆中出现深棕色斑块3分。(1)+(2)为总积分。0分为阴性,1~3分为弱阳性(+),4~7分为强阳性(++)[1]。

### 1.3 巢式逆转录聚合酶链反应(nested reverse-transcription polymerase chain reaction, nested RT-PCR)

于手术开始前抽取外周静脉血7ml分装。2ml

离心测血清AFP浓度,另5ml肝素抗凝,行巢式RT-PCR,具体步聚为:(1)有核细胞制备,采用红细胞溶解法;(2)抽取细胞总RNA,应用TRIZOL试剂(Life technologies Inc, Gaithersburg, USA)提取,提取后取2 $\mu$ l测OD260/280值,以了解RNA有无降解;(3)cDNA合成,采用Promega公司生产的逆转录试剂盒,具体操作按说明进行;(4)巢式PCR,引物设计参照文献[2],由Takaka公司合成,PCR循环条件如下,30 $\mu$ l反应体系,94 $^{\circ}$ C变性30s,(54 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸40s,进行30个循环;5)产物在1.8%琼脂糖凝胶上行电泳后观察结果,按设计要求逆转录及巢式PCR产物分别为174bp和101bp。

### 1.4 统计学分析

应用SPSS软件包,组间计数采用 $\chi^2$ 检验的四格表确切概率法校正(Fisher's exact test), $P < 0.05$ 认为有显著差异。

## 2 结果

### 2.1 原发性肝细胞癌标本VEGF表达及其与肿瘤临床病理学的关系

本组20例肝癌中,10例VEGF为阳性表达。其中弱阳性6例,强阳4例。VEGF的表达强弱与是否合并肝硬化、肿瘤的大小及有无门静脉癌栓无关(表1)。

表1 VEGF表达与临床病理学的关系

临床参数	VEGF的表达			$\chi^2$ 值	P值
	阴性	弱阳性	强阳性		
肝硬化					
无	2	3	0	6.000	0.199
有	8	3	4		
肿瘤直径					
$\leq 3$ cm	4	0	0	6.000	0.050
>3cm	6	6	4		
门静脉癌栓					
无	7	4	4	9.000	0.060
有	3	2	0		

### 2.2 外周血液中AFP mRNA结果及其与肿瘤临床病理学的关系

本组20例患者中有15例术前外周静脉血中AFP mRNA为阳性(图1),阳性率为75%。此检验结果亦与肿瘤临床各参数无关(表2)。

174 bp : cDNA 产物 ; 101 bp : 巢式 RT-PCR 产物

图 1 AFP mRNA 阳性

表 2 外周血 AFP mRNA 与临床病理学的关系

临床病理指标	外周血 AFP mRNA		$\chi^2$ 值	P 值
	阴性	阳性		
肝硬化				
无	1	4	0.089	1.000
有	4	11		
肿瘤直径				
$\leq 3$ cm	0	4	1.667	0.530
$> 3$ cm	5	11		
门静脉癌栓				
无	2	10	1.111	0.347
有	3	5		

### 2.3 外周血 AFP mRNA 与血清 AFP 水平及 VEGF 表达的关系

为了解 AFP mRNA 与 AFP 在高危人群普查中的意义,本研究将 AFP  $\geq 200 \mu\text{g/L}$  认为阳性。本组 AFP 阳性率为 13/20,小肝癌(直径  $\leq 3$  cm)的 4 例中 3 例为阳性。外周血 AFP mRNA 阳性率(15/20)较血清 AFP 阳性率高( $P < 0.05$ );而 VEGF 的表达与外周血 AFP mRNA 表达之间无统计学差异( $P > 0.05$ )。在 VEGF 阳性的 10 例中,有 9 例可在外周静脉血中发现 AFP mRNA(表 3)。

表 3 VEGF、血清 AFP 及外周血 AFP mRNA 的关系

项目	外周血 AFP mRNA		$\chi^2$ 值	P 值
	阴性	阳性		
VEGF 基因				
阴性	4	6	6.000	0.199
弱阳性	1	5		
强阳性	0	4		
血清 AFP				
$\geq 200 \mu\text{g/L}$	1	12	5.934	0.031
$< 200 \mu\text{g/L}$	4	3		

## 3 讨论

手术切除仍是目前治疗肝癌的主要方法,但进展期肿瘤(TNM III-IV 期)在手术切除甚至行原位

肝移植术后复发率都较高<sup>[3]</sup>。肝癌切除术后复发的可能原因目前认为有:(1)肝癌为多中心性;(2)切缘有残余的癌细胞;(3)肿瘤侵犯门静脉或发生镜下转移等。而肝移植术后出现肝癌复发则可能与外周血液中存在游离的癌细胞有关。进一步探讨肝癌的分子转移机制将有助于评估肝癌切除术后预后<sup>[4]</sup>。

近年来随着 PCR 技术的成熟与完善,可以通过对外周血液中 AFP mRNA 的检测而证实其中有无肝癌细胞。目前此种方法愈来愈受到重视,认为它是肝癌发生微转移(即用常规临床病理学方法不能检出的非血液系统恶性肿瘤的转移)的重要检测指标。采用巢式逆转录 PCR 技术,文献报道<sup>[5]</sup>可以从 2 ml 外周静脉血中检测到 10 个左右的肝癌细胞,特异度和灵敏度都较高。本组病例术前外周血 AFP mRNA 的阳性率为 75%,显著高于 AFP 阳性率(65%)( $P < 0.05$ )。而且肿瘤直径  $\leq 3$  cm 的 4 例患者术前外周血液中的 AFP mRNA 均为阳性,而血清 AFP 水平 1 例阴性,1 例  $\geq 200 \mu\text{g/L}$ ,2 例  $\geq 500 \mu\text{g/L}$ 。此结果提示 AFP mRNA 不仅可以反应 AFP 的表达情况,而且对小肝癌的早期诊断及术后随访较血清 AFP 水平似乎更敏感、更有意义。

VEGF 是促血管新生最重要的生长因子。目前认为其诱导肿瘤血管新生的作用机制有:(1)VEGF 可以促进内皮细胞迁移和增殖<sup>[6]</sup>;(2)是新生血管内皮细胞的抗凋亡因子<sup>[7]</sup>;(3)VEGF 可以增加血管通透性,促进血浆蛋白外渗形成纤维素支架,从而为内皮细胞的迁移和血管的生长提供支持<sup>[8]</sup>;(4)VEGF 还可以激活蛋白水解酶系统,包括尿激酶及基质金属蛋白酶,促进细胞外基质降解,从而促进血管新生<sup>[9]</sup>。本研究发现其表达情况与有无门静脉癌栓无关,而后者被认为是判断肝癌有无肝内转移的重要临床指标。因此我们推测 VEGF 主要反映肝癌肝外血行转移的特性。这一点也通过与 AFP mRNA 的配对分析得以证实:VEGF 阳性的病例中有 90% 可以在外周血中发现癌细胞。

本研究结果提示,肝癌组织 VEGF 和外周血 AFP mRNA 检测都可作为评估肝癌转移的指标。前者较为简单易行,而后者则更为客观和灵敏。理论上,如果术前外周血 AFP mRNA 阳性,可于术前行全身化疗,以减少术后转移的机会。同样,肝癌组织的 VEGF 表达情况亦也可达到类似效果。两者对指导

原发性肝癌的个体化辅助治疗方案都有重要的参考价值。

#### 参考文献:

- [1] 周军, 汤恢焕. 胆管癌微血管计数和 VEGF 及 MMP2 的表达及其意义[J]. 中国普通外科杂志, 2003, 12(2): 122-124.
- [2] Komada T, Fukuda Y, Sando T, *et al.* Sensitive detection of circulating hepatocellular carcinoma cells in peripheral venous blood [J]. *Cancer*, 1995, 75(9): 2214-2219.
- [3] Frilling A, Malago M, Broelsch CE. Current status of liver transplantation for treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Dig Dis*, 2001, 19(4): 333-337.
- [4] Kar S, Carr BI. Detection of liver cells in peripheral blood of patients with advanced stage hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 1995,

21(2): 403-407.

- [5] 刘宇慧, 周柔丽, 芮静安. 用 nested RT-PCR 法检测肝癌患者外周血癌细胞[J]. 北京医科大学学报, 1997, 28(3): 270-272.
- [6] Ferrare N, Davis ST. Biology properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins [J]. *Endocr Rev*, 1997, 18(1): 4-25.
- [7] Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, *et al.* Selective ablation of immature blood vessels in establish human tumors follows vascular endothelial growth factor withdraw [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(2): 159-165.
- [8] Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and significance of microvascular permeability in angiogenesis [J]. *Curr Top Microbiol*, 1999, 237(2): 97-132.
- [9] Jones A, Fujiyama C. Angiogenesis in urological malignancy: prognostic indicator and therapeutic target [J]. *BJU International*, 1999, 83(5): 535-555.

文章编号: 1005-6947(2004)03-0208-01

## · 病例报告 ·

# Mirizzi 综合征伴发自发性肝破裂 1 例

樊巍巍, 汪东文, 陈新娜

(武警湖南总队医院 外一科, 湖南 长沙 410006)

**关键词:** Mirizzi 综合征; 破裂, 自发性; 病例报告

**中图分类号:** R657.4

**文献标识码:** D

患者 男, 76 岁。因突发上腹部疼痛 32h 入院。体查: 体温 36.7℃, 脉搏 98 次/min, 呼吸 20 次/min, 血压 120/80 mmHg, 急性痛苦面容, 全身皮肤黏膜黄染, 心肺检查无异常。腹略膨隆, 全腹压痛、反跳痛及肌卫, 以剑突下为重。墨菲氏征阳性, 肝区轻叩痛, 移动浊音阴性, 肠鸣音减弱, 1 次/min。白细胞  $21.4 \times 10^9/L$ , 中性 0.90。尿常规: 尿胆原(-), 胆红素(-)。血、尿淀粉酶正常。腹部透视: 膈下未见游离气体, 未见气液平面。B 超: 肝、脾、肾未见异常, 胆囊约 8.5 cm × 3.1 cm 大小, 壁毛糙, 厚 0.4 cm, 内可见多个强光团。胆总管 0.6 cm, 内未见结石声影。左肝外叶上段后方可见 6.9 cm × 6.1 cm 大小液性暗区, 体位变化后体积变小。腹部 CT 示腹腔内积

液, 胆囊结石并胆囊炎。腹腔穿刺抽出深黄色匀质胆汁样液体, 无杂质。诊断: (1) 急性弥漫性腹膜炎; (2) 梗阻性黄疸; (3) 胆囊结石并急性胆囊炎。急诊剖腹探查。术中见: 腹腔内有黄绿色胆汁样液体约 500 ml。肝表面光滑, 无明显结节, 肝左外叶脏面见两处约 0.8 cm × 0.2 cm 大小浅表糜烂灶, 有胆汁外渗。胆囊约 1.1 cm × 10 cm × 21 cm, 张力大, 囊壁充血水肿, 囊内可扪及大量结石, 胆囊三角、胆囊壶腹部、十二指肠及周围组织致密粘连, 胆囊体部呈“L”型折叠, 扪及胆囊管有质硬结石嵌顿, 胆囊管行径与胆总管行径平行且压迫胆总管, 肝总管扩张, 约 1.2 cm 左右, 证实为 Mirizzi 综合征, 常规行胆囊切除、胆总管探查 T 管引流、左肝外叶脏面糜烂灶修补术。左、右肝管及胆总管通畅。于左肝外叶脏面放置腹腔引流管。引流管与 T 管分别引出腹腔。术后检查标本, 见胆囊管内有 3 枚约 0.2 cm ×

0.2 cm × 0.2 cm 大小质硬结石嵌顿。术后腹腔引流管前 5d 每日引出约 70~120 ml 黄绿色胆汁样液体, 术后第 6 天始每日引出约 2~5 ml 黄绿色胆汁样液体, 术后第 9 天经 T 型管造影显示肝左外叶无造影剂漏出, 拔除腹腔引流管, 术后 30d 拔除 T 型管痊愈。

**讨论** Mirizzi 综合征常引起胆道梗阻、急性化脓性胆管炎、败血症、肾功能衰竭等, 但并发自发性肝破裂者临床极罕见。胆汁性腹膜炎病情凶险紧急, 病死率高达 28.6%, 因此, 此类患者需急诊手术治疗。手术以胆道减压、肝修补最为理想。国内亦有其它胆道疾患致自发性肝破裂的报道(王斌, 等. 中国普通外科杂志, 2002, 11(3): 154.)。因此在胆道疾病剖腹探查遇有胆漏时, 需仔细探查肝面, 警惕自发性肝破裂存在的可能性, 以防漏诊。

**收稿日期:** 2003-12-18。

**作者简介:** 樊巍巍(1977-), 女, 河南邓州人, 武警湖南总队医院医师, 主要从事普外科方面的研究。