

文章编号:1005-6947(2006)01-0052-05

· 临床研究 ·

肝癌射频消融治疗前后外周血微转移变化的研究

李坚, 王洪林, 陈翔, 涂刚, 王济明

(重庆医科大学附属第一医院 肝胆外科, 重庆 400010)

摘要:目的 探讨射频消融(RFA)治疗是否促进原发性肝癌(PhC)患者的血源性转移。方法 应用RT-PCR检测32例PhC患者RFA治疗前后外周静脉血AFP mRNA的表达。结果 32例PhC患者RFA治疗前外周血AFP mRNA表达阳性18例(56.3%),阴性14例(43.7%);治疗后阳性12例(37.5%),阴性20例(62.5%)。RFA治疗前后PhC患者外周血AFP mRNA阳性率无显著性差异($P > 0.05$)。结论 RFA治疗肝癌不会促进肿瘤的血源性转移。

关键词:肝肿瘤/外科学; 射频消融; 肿瘤转移

中图分类号:R735.7; R73-37 文献标识码:A

A study of variation in micrometastasis in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma before and after treatment by radio-frequency ablation

LI Jian, WANG Hong-lin, CHENG Xiang, TU Gang, WANG Ji-ming

(Department of General Surgery, the first Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

Abstract: **Objective** To assess whether clustered radiofrequency ablation (RFA) would lead to hematogenous dissemination of malignant cells in patients with primary hepatocellular carcinoma (PhC). **Methods** In 33 patients with PhC, the expression of AFP mRNA in peripheral blood before and after RFA treatment was detected by RT-PCR. **Results** Before RFA treatment, peripheral blood AFP mRNA was positive in 18 PhC patients (56.3%), and in the remaining 14 patients was negative (43.7%). However, positive expression of peripheral blood AFP mRNA was detected in 12 patients (37.5%) after RFA treatment. No significant difference of AFP mRNA expression was found before and after RFA treatment ($P > 0.05$). **Conclusions** RFA treatment of PhC patients does not lead to hematogenous tumor dissemination.

Key words: Liver Neoplasms/surg; RFA; Neoplasms Metastasis

CLC number: R735.7; R73-37 **Document code:** A

微转移一般指非血液系统恶性肿瘤在发生发展过程中播散并存活于血循环、骨髓、淋巴系统等组织器官的微小肿瘤细胞灶,常无任何临床表现,常规检查方法如CT,磁共振成像(MRI)或普通病理检查等都难以发现。通过前瞻性研究,观察手术、

化疗、局部治疗等手段对肝癌微转移及转移复发的影响是目前研究的热点之一。随着临床应用RFA治疗肝癌的日益普遍,其是否促进肿瘤的血源性转移已引起人们的重视。笔者试图通过观察PhC患者RFA治疗前后外周血微转移的变化情况,探讨RFA对PhC的血源性转移是否有影响。

AFP mRNA作为肝癌微转移检测标记物,对预测肝癌转移复发有一定的意义^[1]。目前,逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)是肝癌微转移研究中最常用的检测技术。

收稿日期:2005-03-25; 修订日期:2005-11-28。

作者简介:李坚,男,四川巴中人,重庆医科大学附属第一医院主治医师,主要从事肝癌多发转移的防治方面的研究。

通讯作者:李坚 电话:023-89011180(0), 13368152925(手机); E-mail:lijian158@tom.com。

1 资料与方法

1.1 病例分组及临床资料

1.1.1 RFA 治疗组 32 例,均为本院肝胆外科收治的确诊为 PHC 的患者。平均年龄(50.2 ± 10.4)岁;男 24 例,女 8 例。其中 AFP 阳性(AFP $> 20 \mu\text{g/L}$)15 例,阴性 17 例。肿瘤直径 $\leq 5 \text{ cm}$ 者 13 例, $> 5 \text{ cm}$ 者 19 例。均于 RFA 治疗前后接受外周血 AFP mRNA 的检测。

1.1.2 晚期肝癌组 20 例,为本院肝胆外科和肿瘤科收治的晚期肝癌患者。平均年龄(48.5 ± 6.3)岁;男 15 例,女 5 例。其中 AFP 阳性 13 例,阴性 7 例。均未接受 RFA 或手术治疗。均于化疗前接受外周血 AFP mRNA 的检测。

1.1.3 肝病对照组 29 例,为本院肝胆外科和消化内科收治的肝病者。平均年龄(40.9 ± 5.5)岁;男 22 例,女 7 例。其中 17 例肝硬化,5 例转移性肝癌,5 例肝血管瘤,2 例肝脓肿。17 例肝硬化中 AFP 阳性 1 例。均于治疗前接受外周血 AFP mRNA 的检测。

1.1.4 正常对照组 20 例健康人,来自重庆中心血站。平均年龄(34.7 ± 2.2)岁;男 10 例,女 10 例。均接受了外周血 AFP mRNA 的检测。

1.2 外周血 AFP mRNA 的检测

1.2.1 标本采集 采集 5 mL 抗凝(含 EDTA)的外周静脉血。RFA 治疗组分别于治疗前后 1 周采集,然后每隔 1 周采集,共 4 周。其余 3 组只采集 1 次。采集后用冰盒盛装并立即提取总 RNA。

1.2.2 总 RNA 的提取 采用直接溶解全血的方法提取总 RNA(RNafast 200 总 RNA 极速抽提试剂盒,由上海飞捷生物有限公司提供,并按说明方法提取)。总 RNA 通过 1% 甲醛变性凝胶电泳和紫外分光光度计测定样品 OD 值鉴定细胞总 RNA 质量。琼脂糖电泳显示 28S,18S 和 5S 3 条电泳带,说明总 RNA 无降解。

1.2.3 cDNA 第一链的合成 反应体积为 $20 \mu\text{L}$ 。 $4 \mu\text{L}$ $5 \times \text{buffer}$, $1 \mu\text{L}$ (200 U) MMLV-RT, $1 \mu\text{L}$ ($18 \sim 20 \text{ U}$) RNasin, $2 \mu\text{L}$ (10 mmol/L) dNTPs, $1 \mu\text{L}$ 随机引物, $10 \mu\text{L}$ RNA 模板,三重蒸馏水补充至 $20 \mu\text{L}$ 。

37°C 恒温水浴 60 min, 95°C 灭活逆转录酶 10 min,冰浴 5 min。

1.2.4 巢式 RT-PCR 扩增 AFP 基因 (1) AFP 引物序列:外套正链为 $5' \text{ GCCCAGTTTGT-TCAAGAAGCC}' 3$,负链为 $5' \text{ TTTTGTTCATAGCGAG-CAGCCC}' 3$,产物长度 409 bp;内套正链为 $5' \text{ CAGTCTTCAGGGTGTTTAGAA}' 3$,负链为 $5' \text{ GGGATGC-CTTCTTGCTATCTC}' 3$,产物长度 270 bp。 β -肌动蛋白(β -Actin)的引物序列:正链为 $5' \text{ CGTGCCTGACATTAAGGAGA}' 3$,负链为 $5' \text{ GGATGTCCACGTCA-CACTTC}' 3$,产物长度 245 bp。所有引物均由上海生物细胞工程有限公司合成。(2)一级 PCR 反应体系: $10 \mu\text{L}$ cDNA 模板, $5 \mu\text{L}$ $10 \times \text{PCR buffer}$, $0.3 \mu\text{L}$ Taq 酶, $1.5 \mu\text{L}$ 10 mmol/L dNTP, $4 \mu\text{L}$ 25 mmol/L MgCl_2 ,各 $1 \mu\text{L}$ 的一对 AFP 外套引物(20 pmol/L),灭菌双蒸水 $27.2 \mu\text{L}$ 。二级 PCR 反应体系: $5 \mu\text{L}$ 一级 PCR 产物, $5 \mu\text{L}$ $10 \times \text{PCR buffer}$, $0.3 \mu\text{L}$ Taq 酶, $5 \mu\text{L}$ 10 mmol/L dNTP, $4 \mu\text{L}$ 25 mmol/L MgCl_2 ,各 $1 \mu\text{L}$ 的一对 AFP 内套引物(20 pmol/L),灭菌双蒸水 $28.7 \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序均为: 94°C 变性 2 min 后,以 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 40 s, 72°C 延伸 60 s 为一个循环,共 35 个循环,最后 72°C 延伸 10 min。每次设一管不加样品 cDNA 为阴性对照。内参引物的扩增方法相同。AFP mRNA 和 β -Actin PCR 循环条件及引物设计参照 GENBANK 和文献^[2]。

1.2.5 PCR 扩增产物分析 (1)电泳:用 1.5% 琼脂糖电泳,EB(0.1% 溴化乙啶)染色, 100 V ,30 min,溴酚蓝跑 2~3 cm 即可,紫外灯下观察结果,照相。(2)PCR 产物观察和特异性分析:出现 270 bp 条带者为阳性产物。以 PstI 限制性内切酶行该产物酶切,产生 170 bp 和 100 bp 两条 DNA 条带,证实 PCR 产物为 AFP 基因。

1.2.6 PCR 对照 选 HepG2 肝癌细胞株为阳性对照(细胞株由重庆医科大学超研所赠送),DEPC(焦碳酸二乙酯)水为空白性对照。

1.3 统计学分析

以 SAS 软件包进行资料统计。主要采用 χ^2 检验和 Fisher, s 确切概率法。 $P < 0.05$ 判定为有统

计学意义。

2 结果

2.1 外周血 RT-PCR 产物

外周血巢式 RT-PCR 终产物凝胶电泳,有清晰

1:100~1 000 bp DNA Ladder (Marker),最下面是1 000 bp,从下向上以100 bp 递减;2:阳性产物经 PstI 酶切;3:空白对照;4:阳性对照的 HepG2 肝癌细胞的最终 PCR 的产物;5~7:PHC 患者阳性表达;8:PHC 患者阴性表达

图1 AFP mRNA Nested RT-PCR 及酶切结果

2.2 外周血 AFP mRNA 的表达

RFA 组 32 例中外周血 AFP mRNA 阳性表达 18 例(56.3%)。20 例晚期肝癌患者中阳性率为 100%。对照组 29 例中仅 1 例肝硬化患者为阳性(3.4%)。健康人中均无 AFP mRNA 的表达。

2.3 RFA 治疗前后 AFP mRNA 表达的变化

32 例 PHC 患者接受 RFA 治疗前,AFP mRNA 阳性 18 例,阳性率为 56.3%;治疗后有 7 例转为阴性(转阴率为 38.9%),其中肿瘤直径 ≤5 cm 的 4 例阳性病例在治疗后全转为阴性(转阴率为 100%),肿瘤直径 >5 cm 的 14 例阳性病例中有 3 例转阴(转阴率为 21.4%);治疗后转阴的病例肿瘤都能被集束电极所覆盖;仍为阳性的病例肿瘤,均不能被集束电极所覆盖。RFA 治疗前,肿瘤直径 ≤5 cm 的 9 例 AFP mRNA 阴性病例,治疗后仍为阴性;肿瘤直径 >5 cm 的 5 例 AFP mRNA 阴性病例,治疗后第 4 周有 1 例转为阳性(肿瘤不能被集束电极所覆盖)。RFA 治疗前后肝癌患者外周血 AFP mRNA 阳性率无显著性差异($P > 0.05$)。

2.4 外周血 AFP mRNA 与血清甲胎蛋白(AFP)的关系

AFP 阳性和阴性的两组肝癌患者,其 AFP mRNA 的阳性率差异无显著性($\chi^2 = 0.015$, $P > 0.05$),

的阳性条带 270 bp,与阳性对照条带完全一致,并且以 PstI 限制性内切酶行该产物酶切,产生 170 bp 和 100 bp 2 条 DNA 条带,则提示条带产物来自 AFP mRNA;阴性标本则无该条带出现(图 1)。内对照的目的在于鉴定 cDNA 样品的质量(图 2)。

1:100~1 000 bp DNA Ladder (Marker),最下面是1 000 bp,从下向上以100 bp 递减;2,3,9:为空白;4~8:内参扩增产物

图2 内对照 β-肌动蛋白基因表达 RT-PCR 检测结果

即 AFP 与 AFP mRNA 表达无关(表 1)。

表1 肝癌患者外周血 AFP mRNA 与 AFP 的关系

AFP	肝癌 例数	AFP mRNA (+)	AFP mRNA (-)	阳性率 (%)
阳性(>20 μg/L)	28	21	7	75.0
阴性(<20 μg/L)	24	17	7	70.8
合计	52	38	14	73.1

2.5 外周血 AFP mRNA 与肿瘤大小的关系

经 RFA 治疗的 PHC 患者中,治疗前肿瘤较大(直径 >5 cm)者其 AFP mRNA 阳性率明显高于肿瘤较小者,差异有显著性($\chi^2 = 5.776$, $P < 0.05$),提示外周血 AFP mRNA 的阳性率与肿瘤直径有关(表 2)。

表2 肝癌患者外周血 AFP mRNA 与肿瘤直径的关系

肿瘤直径	例数	AFP mRNA (+)	AFP mRNA (-)	阳性率 (%)
≤5 cm	13	4	9	30.8
>5 cm	19	14	5	73.7
合计	32	18	14	56.3

3 讨论

检测外周血、骨髓、淋巴结中的肿瘤微转移

灶,主要应用 RT-PCR 法扩增组织或肿瘤特异性的 mRNA。AFP 的编码基因位于 4q11 ~ 12,长度约 17 kbp,含 15 个外显子。AFP 主要在胎儿肝脏和卵黄囊合成,出生后其表达迅速减少,几乎未被发现。肝癌细胞中 AFP 基因重新强烈表达。因此,组织特异性 AFP mRNA 的存在为肝癌微转移的检测提供了可能。肝癌主要通过血液途径转移,外周血播散肿瘤细胞中的 mRNA 能完整存在,因为外周血含有大量的核酸酶,能迅速降解血中游离的 mRNA。因此一旦外周血检测到 AFP mRNA,即提示血中有肝癌细胞。近年来的报道已较多地集中于外周血 AFP mRNA 的检测,但其对估计有无血行播散和预测肝癌转移复发的意义仍有争议。赵挺等^[3]认为巢式 RT-PCR 检测 PHC 患者外周血中 AFP mRNA 是一种早期发现 PHC 血道播散的可靠而又敏感的方法。Kedda^[4]等认为外周血中检测出 AFP mRNA 不等于存在癌细胞,因为在慢性肝病患者中,分泌 AFP 的非肿瘤细胞也可以入血,导致 AFP mRNA 出现假阳性。由于目前还没有肝癌特异性的标记物,故需要其他标记物的联合检测以提高特异性。本资料 32 例 PHC 患者外周血 AFP mRNA 阳性率为 56.3%,20 例晚期肝癌组的 AFP mRNA 表达阳性率为 100%。对照组 17 例肝硬化病例中仅有 1 例 AFP mRNA 表达阳性,阳性率为 5.9%,明显低于 PHC 组(56%, $P < 0.05$),其他转移性肝癌和肝血管瘤患者和健康人均均为阴性。结果表明,外周血 AFP mRNA 的表达对估计 PHC 患者有无肝癌细胞血行播散有重要价值。对于 AFP mRNA 预测肝癌转移复发的意义,Mutsuko 等^[1]认为术后微转移的检出能提前 1 ~ 12 个月预警肿瘤的复发。张捷等^[5]发现肝细胞癌(HCC)患者外周血 AFP mRNA 阳性率同患者出现血行微转移灶及预后有一定的相关性。但 Kienle 等^[6]发现骨髓中 AFP mRNA 可以反映患者的预后,而外周血的 AFP mRNA 与预后无关。由于目前对肝癌患者骨髓中的微转移检测报道还很少,对于这两个不同部位的检测意义还有待进一步研究。

RFA 为治疗肝癌提供了新的手段。但 RFA 术后仍有局部复发和肝内外远处转移。Bleicher 等^[7]回顾性分析了 447 例采用 RFA 治疗肝肿瘤病例的局部复发因素,发现肿瘤的大小与局部复发密切相关,此外多个肿瘤和病理类型可能也与局部复发有关。IzumI 等^[8]对 92 例小于 3 cm 的肝癌进行射频或微波凝固治疗,观察到 22 例在肝内远处再发新的肿瘤。Curley 等^[9]报道 RFA 治疗后 19 个月内远处复发率为 45%;而 Buscarini 等^[10]报道 RFA 治疗后 23 个月内远处复发率为 36%。Poon 等^[11]报道 RFA 治疗后 13 个月内并未发现针道种植和远处转移。但 Seki 等^[12]首次报道 1 例患者在 RFA 联合经导管化疗栓塞术(TACE)治疗后短期内迅速发生远处转移,认为这可能是 RFA 和 TACE 分别促进肿瘤转移或者两者联合促进肿瘤的转移。本研究采用巢式 RT-PCR 检测肝癌患者在 RFA 治疗前后外周血 AFP mRNA 表达的变化。发现 RFA 治疗后外周血 AFP mRNA 阳性变化与集束电极覆盖的范围有关。PHC 患者接受 RFA 治疗后转阴率为 38.9%,其中肿瘤直径 ≤ 5 cm 的转阴率为 100%,肿瘤直径 > 5 cm 的转阴率为 21.4%。治疗后转阴的病例肿瘤都能被集束电极所覆盖,而仍为阳性的 11 例肿瘤都不能被集束电极所覆盖。说明肿瘤直径 ≤ 5 cm 者其 RFA 治疗效果优于直径 > 5 cm 者^[13]。肿瘤直径 ≤ 5 cm 的 9 例 AFP mRNA 阴性患者,治疗后仍为阴性;肿瘤直径 > 5 cm 的 5 例 AFP mRNA 阴性患者,治疗后在第 4 周有 1 例转为阳性(肿瘤不能被集束电极覆盖所致肿瘤细胞播散)。研究表明,RFA 治疗肝癌不会促进肿瘤的血源性转移,是一种安全有效的治疗方法。同时也提示 RFA 是肝癌肝移植在供肝等待期间的理想的辅助治疗手段^[14,15],因为 RFA 不会促进肿瘤血源性转移,而且能杀灭肿瘤防止其进展。本实验肿瘤直径 > 5 cm 的阴性者 RFA 治疗后在第 4 周有 1 例转为阳性,14 例阳性者 RFA 治疗后仍有 11 例为阳性,说明对于大肝癌则需要多弹头射频以及射频联合其他治疗才可能完全杀灭肿瘤组织^[16]。

总之,本实验未得到支持 RFA 促进肿瘤血源性转移的证据,RFA 术后肿瘤的复发转移可能与肿瘤的生物行为相关。巢式 RT-PCR 是一种较敏感,但不能定量的检测方法,今后还需要采用更先进的 RT-PCR 方法来定量检测肝癌患者外周血 AFP mRNA 的变化,以及采用多种指标分析微转移,然后才可能更准确地监测复发,指导临床治疗,并评价其疗效。

参考文献:

- [1] Mutsuko M, Naoshi N. Postoperative detection of a-fetoprotein mRNA in blood as a predictor for metastatic recurrence of hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2001, 16(4):445-451.
- [2] 黄东胜,傅佩芬,郑树森,等. 肝癌病人外周血及骨髓 AFP mRNA 的检测及意义 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2002, 8(3):154-158.
- [3] 赵挺,胡福军,凌志强,等. 原发性肝癌患者 PBMC AFP mRNA 表达与其微转移的相关性研究 [J]. *中国误诊学杂志*, 2002, 2(7):976-979.
- [4] Kedda MA, Kew MC, Skelton M, *et al.* Nonspecific messenger RNA of a-fetoprotein in peripheral blood in detecting early spread of hepatocellular carcinoma in black Africans [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 1998, 13(6):885-891.
- [5] 张捷,陈克林,寇丽筠,等. 肝癌患者外周血 AFP mRNA 检测的临床追踪观察 [J]. *实用癌症杂志*, 1998, 13(4):257-259.
- [6] Kienle P, Weitz J, Klaes R, *et al.* Detection of isolated disseminated tumor cells in bone marrow and blood samples of patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Arch Surg*, 2000, 135(2):213-218.
- [7] Bleicher RJ, Allegra DP, Nora DT, *et al.* Radiofrequency ablation in 447 complex unresectable liver tumors; lessons learned [J]. *Ann Surg Oncol*, 2003, 10(1):52-58.
- [8] Izumi N, Asahina Y, Noguchi O, *et al.* Risk factors for distant recurrence of hepatocellular carcinoma in the liver after complete coagulation by microwave or radiofrequency ablation [J]. *Cancer*, 2001, 91(8):949-956.
- [9] Curley SA, Izzo F, Ellis LM, *et al.* Radiofrequency ablation of hepatocellular cancer in 110 patients with cirrhosis [J]. *Ann Surg*, 2000, 232(4):381-391.
- [10] Buscarini L, Buscarini E. Therapy of HCC-radiofrequency ablation [J]. *Hepatogastroenterology*, 2001, 48(1):15-19.
- [11] Poon RT, Ng KK, Lam CM, *et al.* Radiofrequency ablation for subcapsular hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2004, 11(3):281-289.
- [12] Seki T, Tamai T, Ikeda K, *et al.* Rapid progression of hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization and percutaneous radiofrequency ablation in the primary tumour region [J]. *Eur Gastroenterol Hepatol*, 2001, 13(3):291-294.
- [13] 刘连新,朴大勋,武林枫,等. 射频消融技术治疗原发性肝癌 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(3):233-235.
- [14] Fontana RJ, Hamidullah H, Nghiem H, *et al.* Percutaneous radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma: a safe and effective bridge to liver transplantation [J]. *Liver Transpl*, 2002, 8(5):1165-1174.
- [15] Martin AP, Goldstein RM., Katabi N, *et al.* Radiofrequency thermal ablation of liver tumors before liver transplantation-a clinical and histological examination [J]. *Transplantation*, 2004, 78(2):144-148.
- [16] 周乐杜,廖锦堂,王志明,等. 集束电极射频热凝治疗肝癌 [J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(9):519-521.

本刊为“万方数据——数字化期刊群”期刊

为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化,推进科技信息交流的网络化进程,本刊已入网“万方数据——数字化期刊群”,所以,向本刊投稿并录用的稿件文章,将一律由编辑部统一纳入万方数据资料系统(Chinainfo),进入因特网提供信息服务。凡有不同意见者,请另投它刊。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

万方数据——数字化期刊群是国家“九五”重点科技攻关项目(网址:<http://www.chinainfo.gov.cn/periodical>)。本刊全文内容按照统一格式制作编入万方数据资料系统(Chinainfo),读者可上因特网进入万方数据资料系统(Chinainfo)免费(一年后开始酌情收费)查询浏览本刊内容,也欢迎各界朋友通过万方数据资料系统(Chinainfo)向我刊提出宝贵意见、建议,或征订本刊。