

•肿瘤介入 Tumor intervention•

肝右叶前、后段原发性肝癌 TACE 后 VEGF 及 CD34 的表达水平

沈海洋, 刘瑞宝, 刘 岩, 杨 奕, 孙厚宾, 王惠文, 李 凯

【摘要】 目的 探讨肝右叶后段原发性肝癌病灶较前段易发生侧支循环的可能机制。**方法** 取经导管肝动脉化疗栓塞术(TACE)后手术切除的肝细胞癌组织标本 57 份和未经任何治疗直接手术切除的肝细胞癌组织标本 40 份(单纯手术组),按影像学检查符合筛选标准 31 例分两组。A 组:13 例,病灶位于肝右叶前段(V、Ⅷ段);B 组:18 例,病灶位于肝右后段(VI、Ⅶ段)。采用免疫组化联酶卵白素染色(SP)法,检测残癌组织血管内皮生长因子(VEGF)表达水平和微血管密度[MVD(CD34 标记)]。**结果** TACE 组 VEGF 蛋白阳性表达率显著高于单纯手术组,分别为 86.0%和 65.0%,差异有统计学意义($P = 0.015$);TACE 组 MVD 值较单纯手术组显著增高,分别为 79.37 ± 15.36 和 43.23 ± 14.98 ,差异有统计学意义($P = 0.000$)。TACE 组 VEGF 蛋白阳性表达与 MVD 值变化呈正相关($r_s = 0.493, P < 0.01$)。B 组病灶周围 MVD 略高于 A 组,分别为 80.44 ± 13.74 和 78.08 ± 15.33 ,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** TACE 诱导的新生血管生成理论可能并非肝右叶前后段病灶侧支循环建立差异的机制。

【关键词】 肝细胞癌;经导管动脉化疗栓塞;肝段;血管内皮生长因子;微血管密度;
中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2012)-06-0469-04

The expression levels of vascular endothelial growth factor and CD34 in residual cancerous tissues of primary hepatocellular carcinoma located at anterior and posterior segments of right lobe liver after TACE SHEN Hai-yang, LIU Rui-bao, LIU Yan, YANG Yi, SUN Hou-bin, WANG Hui-wen, LI Kai. Department of Interventional Radiology, Tumor Hospital Affiliated to Harbin Medical University, Haerbin 150081, China

Corresponding author: LIU Rui-bao, E-mail: ruibaoliu@hotmail.com

【Abstract】 Objective To discuss the possible mechanism of why the posterior segments of right hepatic lobe were more prone to form collateral circulation than the anterior segments in primary hepatocellular carcinoma (HCC) after transcatheter arterial chemoembolization (TACE). **Methods** Fifty-seven HCC cases who received second-stage surgery after TACE were taken as TACE group, while forty HCC cases who received only surgery were taken as pure surgery group. The surgical specimens were collected in all cases. In TACE group, 31 cases were up to the screening criteria. According to CT or MRI imaging, these 31 cases were divided into two groups. Group A ($n = 13$): the lesions were located at anterior segments (V, VIII) of the right lobe. Group B ($n = 18$): the lesions were located at posterior segments (VI, VII) of the right lobe. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (MVD, labeled with CD34) were determined by using immunohistochemical methods. **Results** The positive expression of VEGF is significantly higher in TACE group (86.0%) than that in pure surgery group (65.0%) ($P = 0.015$). MVD in TACE group was (79.37 ± 15.36), which was significantly higher than that in pure surgery group (43.23 ± 14.98) ($P = 0.000$). In TACE group, the positive expression level of VEGF had a parallel relationship with MVD ($r_s = 0.493, P < 0.01$). In Group B, MVD surrounding the lesion was (80.44 ± 13.74), which was slightly higher than that in group A (78.08 ± 15.33), but the difference was of no statistical significance ($P >$

0.05). **Conclusion** The theory that TACE can induce angiogenesis may not be the mechanism which causes the difference in the formation of collateral circulation

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2012.06.007

作者单位: 150081 哈尔滨 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院介入科

通信作者: 刘瑞宝 E-mail: ruibaoliu@hotmail.com

between the anterior and the posterior segments of right hepatic lobe in patients with primary hepatocellular carcinoma after TACE. (J Intervent Radiol, 2012, 21: 469-472)

【Key words】 hepatocellular carcinoma; transcatheter arterial chemoembolization; liver segments; vascular endothelial growth factor; microvessel density; immunohistochemistry

经导管肝动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是中晚期肝癌非手术治疗的首选治疗方法,现已广泛应用于临床。文献表明 TACE 治疗可诱导肝外侧支动脉的发生,进而影响 TACE 疗效^[1];分析各肝段侧支供血发生情况,表明肝右叶后段侧支供血发生率明显高于前段。本研究旨在采用免疫组化方法,研究肝右叶前、后段原发性肝癌动脉化疗栓塞术后血管内皮生长因子(VEGF)及 CD34[作为微血管密度(MVD)标记]的表达水平,探讨肝右叶后段较前段病灶经 TACE 后易侧支循环建立的可能机制。

1 材料与方法

1.1 一般材料

收集我院 2000 年 1 月-2009 年 10 月行 TACE

后手术切除的肝细胞癌组织标本 57 份,同期直接手术切除(单纯手术组)的肝细胞癌组织标本 40 份。由 2 名副主任医师按照介入治疗前增强 CT 或(和)MR 影像资料分别判断病灶准确位置及大小,病灶位置意见不一致则请第 3 名副主任医师协助判断,其中 TACE 组符合肝右叶前段(V、Ⅷ)13 例,符合肝右叶后段(Ⅵ、Ⅶ)18 例,并以此分成 A、B 两组。患者手术前接受 1~4 次的 TACE 治疗,其中 1 次 33 例、2 次 14 例、3 次及以上 10 例,平均 1.6 次。末次 TACE 到手术切除间隔时间为 13~222 d,平均 50.9 d。单纯手术组患者术前未接受任何其他治疗。两组患者在年龄、性别、有无肝硬化病史、病灶直径、病灶数目、AFP 值及肝功 Child-Pugh 分级方面差异无统计学意义(表 1);A、B 两组在以上临床参数及接受 TACE 治疗次数方面差异无统计学意义(表 2)。

表 1 两组一般临床资料比较

组别	平均年龄 (岁)	性别 (男/女)	肝硬化 (有/无)(例)	病灶大小 ^a (mm)	单发/多发 (例)	AFP(ng/ml) (≤400/>400)	Child-Pugh (A/B)
TACE 组(<i>n</i> = 57)	46 ± 9	45/12	38/19	75.2 ± 16.3	22/35	31/26	30/27
单纯手术组(<i>n</i> = 40)	45 ± 9	31/9	24/16	71.4 ± 21.0	22/18	25/15	23/17
<i>P</i> 值	0.611	0.865	0.501	0.316	0.110	0.426	0.635

注: ^a 为肝内病灶直径的平均值,如系多发肿瘤,为所有可测量肿瘤直径之和

表 2 TACE 中 AB 两组一般临床资料比较

组别	平均年龄 (岁)	性别 (男/女)	肝硬化 (有/无)	病灶大小 ^a (mm)	单发/多发 (例)	AFP(ng/ml) (≤400/>400)	Child-Pugh (A/B)	TACE 治疗次数
A 组(<i>n</i> = 13)	48 ± 9	8/5	9/4	72.3 ± 15.1	6/7	7/6	10/3	1.5 ± 0.8
B 组(<i>n</i> = 18)	43 ± 9	16/2	13/5	76.3 ± 12.5	7/11	8/10	10/8	1.5 ± 0.7
<i>P</i> 值	0.130	0.099 ^b	1.000 ^b	0.430	0.686	0.605	0.220	0.887

注: ^a 为肝内病灶直径的平均值,如系多发肿瘤,为所有可测量肿瘤直径之和。^bFisher 精确概率检测法

1.2 方法

1.2.1 检测方法

1.2.1.1 主要试剂: VEGF 单克隆抗体(型号 ZM-0509)及 CD34 单克隆抗体(型号 ZM-0046)工作液以及抗兔、抗鼠二抗(PV-6001、PV-6002),均购自北京中杉金桥生物公司。

1.2.1.2 切片准备: 每个肝癌组织蜡块标本 4 μm 厚连续切片 3 张。

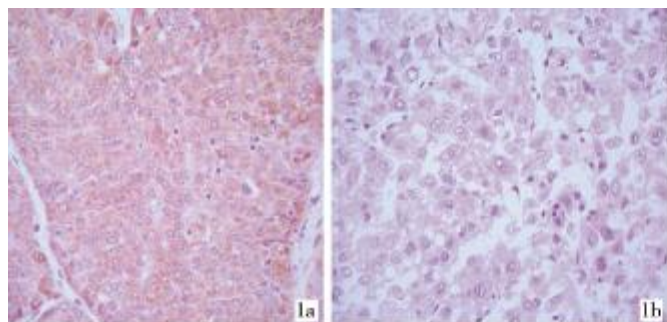
1.2.1.3 免疫组化染色: 采用过氧化物酶标记的联酶卵白素染色法(SP 法),常规脱蜡水化,组织抗原微波修复,10%山羊血清封闭,滴加一抗,室温下孵育 60 min,冲洗,滴加二抗,室温下孵育 10 min,冲

洗,滴加链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液,室温下孵育 10 min,冲洗,DAB 染色,苏木精复染,封固,每组用已知阳性切片作阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.2 结果分析 光镜下 VEGF 以胞质或胞核有棕黄色颗粒为阳性染色(图 1)。高倍镜(× 200)下分别选取阳性染色最明显的 5 个视野,每视野统计 200 个细胞,共 1 000 个细胞,计算每张切片阳性细胞百分率,分 4 级: ≤ 10%为 0,11%~25%为+, 26%~50%为++, > 50%为+++; 本研究设定切片阳性细胞百分率 < 25%为阴性。CD34 蛋白阳性表达为棕黄色细胞或细胞簇且与邻近的血管、肿瘤组织

清楚分界,可见管腔(图2)。管腔直径 ≤ 8 个红细胞者均计为1条血管, > 8 个红细胞或管壁可见平滑肌者不计入内。先低倍镜($\times 100$ 倍)下确定3个血管染色最密集的热点区,然后200倍镜下计数微血管,取3个视野的均值作为MVD。

1.3 统计学方法



1a TACE 术手术切除后残癌组织 1b 单纯手术切除癌组织

图1 两组 VEGF 蛋白表达(SP 法 $\times 400$)

2 结果

2.1 两组 VEGF 和 MVD 测值

TACE 组 VEGF 蛋白阳性率明显高于单纯手术组,分别为 86.0%,65.0%和差异有统计学意义($P < 0.05$)。TACE 组 MVD 值较单纯手术组显著增高,分别为 79.37 ± 15.36 和 43.23 ± 14.98 ,差异有统计学意义($P < 0.01$,表3)。

表3 两组 VEGF 蛋白阳性表达率及 MVD 值的差异

分组	例数	VEGF 阳性(%)	MVD 值
TACE 后手术组	57	49(86.0%)	79.37 ± 15.36
单纯手术组	40	26(65.0%)	43.23 ± 14.98
P 值		$0.015(\chi^2 = 5.89)$	$0.000(t = 11.52)$

2.2 术前 TACE 治疗次数对残癌组织 VEGF 蛋白阳性表达水平及 MVD 值的影响

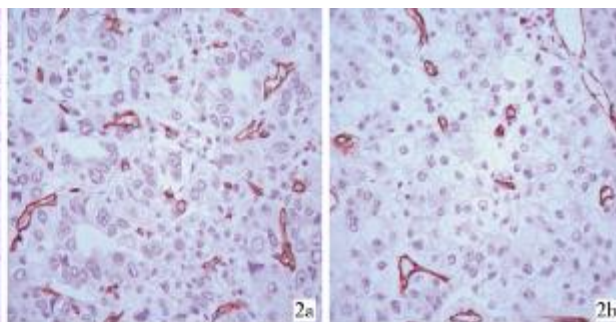
根据术前接受 TACE 频次不同(1、2 和 3 次及以上)分 3 组,3 组间 VEGF 表达水平及 MVD 值比较差异不明显($P > 0.05$,表4)。TACE 组残癌组织 VEGF 蛋白阳性表达与 MVD 值呈正相关($r_s = 0.493$, $P < 0.01$)。

表4 术前 TACE 治疗次数对残癌组织 VEGF 蛋白阳性表达水平及 MVD 值的影响

治疗次数	例数	VEGF 阳性(%)	MVD 值
1 次	33	29(87.9%)	77.97 ± 15.81
2 次	14	11(78.6%)	82.14 ± 14.75
3 次及以上	10	9(90.0%)	80.10 ± 15.67
Z 值		0.854	0.368(F)
P 值		0.652 ^a	0.694 ^b (P)

注:^a 多个独立样本秩和检验;^b 单因素方差分析

使用 SPSS 13.0 软件包,计数资料采用 χ^2 检验(也有使用 Fisher 精确概率检测法),计量资料采用两独立样本 t 检验,VEGF、MVD 的相关性分析采用 Spearman 等级相关检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



2a TACE 术手术切除后残癌组织 2b 单纯手术切除癌组织

图2 两组 MVD 表达(SP 法 $\times 400$)

2.3 TACE 对肝细胞癌右叶前、后段病灶 MVD 的影响

A、B 两组病灶经 TACE 后残癌组织 MVD 分别为 78.08 ± 15.33 和 80.44 ± 13.74 ,差异无统计学意义($t = 0.451$, $P = 0.655$)。

3 讨论

3.1 TACE 术后 VEGF、MVD 的变化

对于 TACE 是否具有促进血管生成作用,已有多篇文献给予肯定^[2-3];TACE 术后肿瘤组织的 MVD 值显著高于未行 TACE 者。缺氧可能是诱导肿瘤新生血管生成的中心环节^[4,5]。TACE 阻断了肝癌病灶的供血动脉,势必加重残癌组织的缺氧程度,残癌组织在低氧状态下,通过多种机制上调促血管生成因子的表达^[6]。研究发现,VEGF 在诸多促肿瘤血管生成因素中,起着最基础、最关键的作用^[7]。我们通过对 TACE 后二期切除残癌组织行免疫组化染色检测结果显示,TACE 组 VEGF 蛋白阳性表达水平及 MVD 值均高于单纯手术组($P < 0.05$),且 VEGF 水平与 MVD 值呈正相关($r = 0.493$, $P < 0.01$);说明 TACE 术后组织缺血缺氧能诱导 VEGF 表达上调,进而刺激新生血管生成,证实了 TACE 具有促进血管生成作用及 VEGF 对血管生成的调节作用。另外,我们根据术前接受 TACE 次数不同(1、2 和 3 次及以上)分 3 组,3 组间 VEGF 表达水平及 MVD 值比较无统计学差异($P > 0.05$),表明 TACE 治疗虽有促进肿瘤微血管生成作用,但新血管生成并不受

治疗次数而增加。

3.2 TACE 与侧支循环建立的关系

肝癌右叶后段病灶经 TACE 治疗后较前段病灶易发生侧支供血,影响 TACE 疗效。王伟昱等^[8]研究发现 TACE 治疗次数的增加可以促使肝外潜在的侧支血管开放并成为其供血动脉,并且认为肝右叶后段因其临近右后腹壁、右肾及肾上腺等器官较前段更容易从相邻周边组织及脏器获得血供,增大随后介入操作难度。张军华等^[9]在探讨肝癌肝外供血的形成规律时亦发现位于肝后部尤其右叶后段肝癌一旦波及膈面或肿瘤组织突破肝脏裸区就可能通过直接黏附或直接侵犯从膈下动脉或肾上腺动脉获得血供。Chung 等^[1]亦认为多次重复 TACE 治疗可诱导肝外侧支动脉的发生,进而影响 TACE 疗效。该作者分析各肝段侧支供血发生情况,肝右叶后段侧支供血发生率明显高于前段 (20.8%比 13.3%)。我们对 58 例行 TACE 术的肝癌患者(病灶位于肝右叶前段 23 例;病灶位于肝右后段 35 例)进行了近期疗效随访,发现肝右叶后段病灶组近期疗效好于前段病灶组,且差异有统计学意义,分析原因可能与侧支循环建立相关^[10]。本课题设计初衷认为肝癌 TACE 后肝右叶前、后段病灶周围 MVD 差异可能是前后段病灶侧支循环形成差异的原因,也可能是影响肝右叶前、后段病灶 TACE 疗效差异的原因。本研究 TACE 组 57 例患者中病灶位于肝右叶前段 13 例,位于后段 18 例;分析它们的 MVD,结果发现:经 TACE 后,肝右叶后段病灶 MVD 值略高于前段,分别为 80.44 ± 13.74 和 78.08 ± 15.33 ,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。推测残癌组织微血管生成理论可能并非肝右叶前后段病灶经 TACE 治疗后侧支循环形成差异的发生机制。肝右叶前后段病灶经 TACE 治疗后侧支循环形成差异可能是邻近周围脏器血管,便于优先获得肝外血管供应,具体理论依据待于进一步研究。

本研究的不足在于病例数少,所得结果可能不能全面准确地反映肝内不同位置病灶周围的血管

情况,有待于多中心大样本数据证实。本研究虽未得到预期结果,但希望对将来研究肝内不同位置病灶 TACE 后侧支循环建立理论依据提供一种有益的思路。

[参 考 文 献]

- [1] Chung JW, Kim HC, Yoon JH, et al. Transcatheter arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma: prevalence and causative factors of extrahepatic collateral arteries in 479 patients [J]. Korean J Radiol, 2006, 7: 257 - 266.
- [2] 邵国良, 王建华, 周康荣, 等. 肝癌化疗栓塞术后残癌组织微血管密度及血管内皮细胞生长因子表达的研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2002, 10: 11 - 14.
- [3] 郭 栋, 肖恩华. 不同化疗栓塞方式对肝细胞癌血管生成的影响[J]. 中华放射学杂志, 2007, 41: 1369 - 1373.
- [4] 赵荣瑞. 缺氧诱导因子-1(HIF-1)的基础研究与临床意义[J]. 山西医科大学学报, 2006, 37: 225 - 230.
- [5] Shim JH, Park JW, Kim JH, et al. Association between increment of serum VEGF level and prognosis after transcatheter arterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma patients [J]. Cancer Sci, 2008, 99: 2037 - 2044.
- [6] Semenza GL. Regulation of vascularization by hypoxia-inducible factor 1[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1177: 2 - 8.
- [7] Tsuzuki Y, Fukumura D, Oosthuysen B, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1 α \rightarrow hypoxia response element \rightarrow VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors[J]. Cancer Res, 2000, 60: 6248 - 6252.
- [8] 王伟昱, 吕维富, 侯昌龙, 等. 原发性肝癌肝外血供的血管造影分析及介入治疗 [J]. 介入放射学杂志, 2007, 16: 538 - 540.
- [9] 张军华, 马 威, 董景辉, 等. 探讨肝癌肝外供血的形成规律及介入治疗[J]. 中国介入影像与治疗学, 2007, 4: 27 - 30.
- [10] 沈海洋, 杨 光, 刘瑞宝, 等. 肝右叶前、后段原发性肝癌动脉化疗栓塞术后近期疗效比较 [J]. 介入放射学杂志, 2010, 19: 382 - 385.

(收稿日期:2011-12-20)

(本文编辑:俞瑞纲)