

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01174

肝脏微血管密度在索拉非尼联合冷冻消融治疗进展期肝癌疗效评价中的意义

陆荫英,王春平,曲建慧,周 霖,常秀娟,白文林,陈 艳,安林静,曾 珍,杨永平*

解放军 302 医院肝脏肿瘤诊疗与研究中心,北京 100039

[摘要] **目的** 探讨索拉非尼联合局部冷冻消融治疗进展期肝细胞癌(HCC)的疗效,评价肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD)与 HCC 患者治疗预后的关系。**方法** 102 例进展期肝癌患者随机分为索拉非尼联合冷冻消融治疗组(S&C 组, 50 例)和冷冻消融治疗组(C 组, 52 例),分别给予索拉非尼联合冷冻消融治疗及单独冷冻消融治疗,治疗终点为肿瘤进展或出现不能耐受的毒性;治疗前留取肝癌组织标本,并通过计数 CD34 免疫组化数值来评估肝癌组织微血管密度(MVD),每 4~6 周按照 RECIST 标准进行疗效评价,随访生存期及肿瘤进展情况,分析肝癌组织 MVD 值与预后的关系。**结果** S&C 组 2 例完全缓解(CR),9 例部分缓解(PR),22 例疾病稳定(SD),疾病控制率(disease control rate, DCR)66%;C 组 4 例 PR,19 例 SD,DCR 44.2%($P=0.027$);S&C 组患者中位生存期(OS)和中位肿瘤进展时间(TTP)分别为 12.5 和 9.6 个月,而 C 组患者仅为 8.6 和 5.3 个月($P=0.019$)。CR&PR 组的肝组织平均微血管密度($111/0.74 \text{ mm}^2$)明显低于疾病进展组($339/0.74 \text{ mm}^2$, $P=0.0001$)。具有较低肝组织微血管密度的患者在接受索拉非尼联合氩氦刀冷冻消融联合治疗后其中位总生存期和中位肿瘤进展时间明显长于单纯氩氦刀冷冻消融组;具有较高肝组织微血管密度的患者其中位总生存期和中位肿瘤进展时间在两组治疗方式中无区别。**结论** 索拉非尼联合局部冷冻消融治疗能显著延长进展期 HCC 患者的生存期及肿瘤进展时间,使进展期 HCC 患者临床获益;进展期肝癌患者肝组织中较高的微血管密度预示较差的治疗应答。

[关键词] 冷冻消融;索拉非尼;肝肿瘤;肝细胞癌;生存期;肿瘤进展时间;微血管密度

[中图分类号] R 735.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)11-1174-05

Liver microvessel density in evaluating therapeutic effect of sorafenib combined with argon-helium cryoablation in treatment of advanced hepatocellular carcinoma

LU Yin-ying, WANG Chun-ping, QU Jian-hui, ZHOU Lin, CHANG Xiu-juan, BAI Wen-lin, CHEN Yan, AN Lin-jing, ZENG Zhen, YANG Yong-ping*

Clinical Research Center of Hepatocarcinoma, No. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

[Abstract] **Objective** To investigate the therapeutic effect of argon-helium cryoablation combined with sorafenib on hepatitis B-related advanced hepatocellular carcinoma (HCC) and to evaluate the role of microvessel density (MVD) in prognostic evaluation. **Methods** A total of 102 patients with advanced HCC were randomly divided into two groups, with 50 receiving sorafenib plus cryoablation (group S&C) and 52 receiving only cryoablation (group C). The endpoint of the treatment was tumor progression or intolerable adverse reaction. Tumor tissues were obtained before treatment. MVD was evaluated by immunohistochemical analysis using CD34 antibody. The therapeutic effects were evaluated according to RECIST criterion every 4-6 weeks. The adverse events were observed in both groups; the therapeutic effect, overall survival time(OS), and time to progression(TTP) were compared between two groups. **Results** In group S&C, complete response (CR) was achieved in 2 patients(4%), partial response(PR) in 9 (18%), and stable disease(SD) in 22(44%), with the disease control rate(DCR) being 66%; in group C, no CR, PR in 4(7.6%), and SD in 19(36.5%), with the DCR being 44.2% ($P<0.05$). The overall survival (OS) and the time to progression (TTP) were significantly longer in group S&C than in group C (12.5 months vs 8.6 months, 9.6 months vs 5.3 months; $P<0.01$). The mean MVD in group CR&PR ($111/0.74 \text{ mm}^2$) was significantly lower than that in group PD($339/0.74 \text{ mm}^2$, $P<0.01$). Patients with lower MVD receiving sorafenib plus cryoablation had longer OS and TTP than those only receiving cryoablation. The OS and TTP in patients with higher MVD had no significant difference between

[收稿日期] 2010-06-28 **[接受日期]** 2010-09-21

[基金项目] 国家科技重大专项课题(2008ZX10002-018),军队医学杰出人才基金(04J020). Supported by National Key Scientific and Technological Research Program(2008ZX10002-018) and the Fund for Distinguished Medical Scholars of the PLA(04J020).

[作者简介] 陆荫英,博士,副主任医师. E-mail: luyinying1973@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:010-63879193, E-mail: yongpingyang@hotmail.com

different groups. **Conclusion** Sorafenib plus cryoablation is a safe and effective therapy for patients with advanced HCC; it can improve the OS and TTP of patients. Patients with higher MVD have a lower response to therapy and poor prognosis.

[**Key words**] cryoablation; sorafenib; liver neoplasms; hepatocellular carcinoma; overall survival time; time to progression; microvessel density

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(11):1174-1178]

氩氦刀局部冷冻消融(argon-helium cryoablation)治疗原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)对肝脏损伤轻、可以同时治疗多个肿瘤及大肿瘤,成为不能切除的中晚期肝癌患者局部治疗的重要方法^[1-2],而多靶点抗肿瘤分子靶向药物甲苯磺酸索拉非尼(sorafenib)则为进展期肝癌的局部治疗后的系统治疗提供了有效的手段^[3-4]。据此,我中心采用局部冷冻消融联合索拉非尼治疗进展期 HCC 患者,旨在减小瘤体、减轻肿瘤负荷的基础上提高进展期肝癌对索拉非尼的治疗应答,本研究将评估上述联合治疗方案对进展期肝癌患者治疗的效果。

研究表明 HCC 这种富血供的实体瘤中 MVD 较高,且高 MVD 值的患者比低 MVD 值的患者更易复发和转移,MVD 与小于 5 cm 的肝癌患者手术切除术后复发率正相关^[5-6]。为明确 HCC 组织内的 MVD 是否可作为进展期 HCC 患者治疗疗效和预后评估因素,我们对所有患者留取肝脏肿瘤标本并行 MVD-CD34 免疫组化染色,计数微血管密度并分析其与疗效、生存期等的关系。

1 资料和方法

1.1 病例资料 2007 年 7 月至 2009 年 12 月在我中心住院的 102 例 HCC 患者,诊断符合《原发性肝癌规范化诊治专家共识》^[7],按照巴塞罗那临床肝癌分期系统(Barcelona Clinic Liver Cancer Staging Classification, BCLC)分期属于进展期肝癌^[8];入组前未接受过肝癌的系统治疗,采用计算机随机法分为索拉非尼联合冷冻消融治疗组(S&C 组, 50 例)和冷冻消融治疗组(C 组, 52 例)。纳入标准包括: Child-Pugh A/B 级(≤ 8 分), ECOG PS (Eastern Cooperative Oncology Group performance status score)评分 ≤ 2 分,总胆红素(TBIL) ≤ 3 mg/L,丙氨酸转氨酶(ALT)/天冬氨酸转氨酶(AST) \leq 正常值上限 5 倍,凝血酶原活动度 $\geq 40\%$,血肌酐(Cr) \leq 正常 1.5 倍,血常规中性粒细胞绝对值 $\geq 1.5 \times 10^9$ /L,血红蛋白(Hb) ≥ 90 g/L,心肺脑功能正常,预计生存时间至少 12 周。根据实体瘤疗效评价标准(response evaluation criteria in solid tumors, RECIST)至少有 1 个能够被测量的靶病灶(所有患者均知情同意并报我院伦

理委员会备案)。

1.2 治疗方案 局部冷冻消融采用美国 Endocare 公司生产的氩氦超导手术系统(Endocare Cryocare-System),在 B 超引导下对肿瘤进行经皮穿刺冷冻消融治疗^[9-10],直径 5 cm 以下的肿瘤患者接受 1 次冷冻消融治疗,直径 5 cm 以上的肿瘤患者接受 2~3 次局部冷冻消融治疗,每次手术间隔 5~7 d,每次消融冷冻治疗同时留取肝穿肿瘤组织标本。S&C 组患者在最后一次冷冻消融治疗后 3~7 d 加用索拉非尼(多吉美,德国拜耳) 400 mg 口服,每日 2 次。两组患者均未接受其他任何局部治疗及全身放化疗(包括 TACE)、免疫治疗等,根据乙肝 HBV DNA 水平给予核苷类似物抗病毒及常规保肝药辅助治疗。

1.3 疗效评价与随访 按实体瘤 RECIST(1.0 版)标准在治疗 4~6 周进行疗效评价,分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、疾病稳定(SD)和疾病进展(progressive disease, PD),持续 4 周以上为有效病例,以 CR+PR 计算临床有效率(clinical effective ratio, CER),以 CR+PR+SD 计算疾病控制率(DCR);以肝功能、肾功能、血常规、凝血酶原活动度、甲胎蛋白(AFP)、胸部 X 线/CT 及腹部增强 CT/MRI 等评价疗效,确定肿瘤进展时间(TTP),统计生存期(OS)。按照美国 NCICTC 标准评价毒副反应,当疾病进展后,如果患者同意且临床症状轻微,索拉非尼可以继续服用。随访终止时间为 2010 年 5 月 31 日。

1.4 CD34 免疫组化染色 所有 HCC 患者的肝脏组织标本均行 H-E 染色作普通病理诊断,石蜡包埋样本被切成 5 μ m 薄片采用 SP 法行免疫组化染色,一抗为小鼠抗人 CD34 单克隆抗体, PBS 代替一抗作阴性对照, AEC 显色。微血管密度的判定参考 Weidner 等^[11]报道 MVD 计量方法,分别由 2 名病理科医生采用双盲原则判定后取其平均值;在低倍视野下($\times 40$)选取 5 个新生血管最集中的区域,然后采用计算机影像分析系统(MetaMorph Imaging System Version 3.0; Universal Imaging Corp, West Chester, PA)在高倍镜下($\times 200$)计数微血管数目,每一个被染成红色,可与周围血管、肿瘤细胞

及其他结缔组织分开的内皮细胞或内皮细胞簇,无论有无管腔形成和红细胞出现,均被视为一个微血管计数,用每 0.74 mm² 面积的微血管绝对数表示。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) 软件,率的比较进行 χ^2 检验,定量资料采用 *t* 检验,通过 Kaplan-Meier 法(log-rank 检验)来判断总生存期(OS)、肿瘤进展时间(TTP)和预后因素的关系。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 临床特点 本组病例男性 95 例(93.13%),女性 7 例(6.87%),平均 53 岁(35~72 岁)。82 例 Child-Pugh A 级(80.39%),20 例 Child-Pugh B 级(19.69%)。ECOG PS 评分 0 分 32 例(31.37%),1 分 58 例(56.86%),2 分 12 例(1.76%)。所有患者病理结果均为肝细胞癌,肿瘤分化程度高 19 例(18.6%),中 58 例(56.9%),低 25 例(24.5%)。治疗前两组患者性别、年龄、肿瘤大小、HBV DNA 定量、HBeAg 阳性率、AFP、Child-Pugh 分级、ECOG PS 评分、肿瘤分化等方面差异均无统计学意义(表 1)。

表 1 102 例进展期肝细胞癌患者一般临床特点

Tab 1 Demographic and baseline characteristics of 102 patients with AHCC

Items	Sorafenib&Cryo (n=50)	Cryo (n=52)	P
Age (year)	51.6±10.2	52.3±7.9	0.061 2
Sex			
Male	47	47	0.465 6
Female	3	5	
ECOG performance status			
0	15	17	0.783 4
1	28	30	
2	7	5	
Diameter of tumor d/cm	8.25±3.43	8.32±2.72	0.150 2
Alpha-fetoprotein			
>400 ng/ml	24	24	0.851 9
≤400 ng/ml	26	28	
HBV DNA positive	29	27	0.537 5
HBeAg positive	9	13	0.390 2
Child-Pugh class			
A	39	43	0.550 7
B	11	9	
Tumor differentiation			
Well	9	10	0.786 0
Moderately	28	30	
Poorly	13	12	

Cryo: Cryoablation

2.2 临床疗效 中位随访时间 9.2 个月(3.8~31.5 个月)。随访结束,S&C 组有 32 例死亡(64%),

18 例存活(36%);中位 OS 12.5 个月(3.8~31.5 个月)、中位 TTP 9.6 个月(3.5~13.5 个月);C 组 46 例死亡(88%),6 例存活(12%);中位 OS 8.6 个月(3.2~14.4 个月)、中位 TTP 5.3 个月(2.5~6.9 个月);两组中位 OS 和中位 TTP 相比差异有统计学意义($P=0.001$,图 1)。S&C 组 2 例 CR(4%),9 例 PR(18%),22 例 SD(44%),临床有效率 22%,疾病控制率 66%;C 组 4 例 PR(7.6%),19 例 SD(36.5%),临床有效率 7.6%,疾病控制率 44.2%,两组临床有效率和疾病控制率相比差异有统计学意义($P=0.027$)。

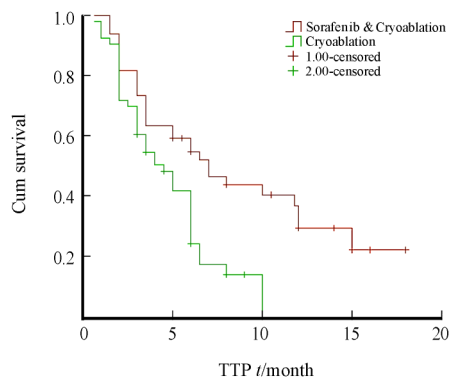
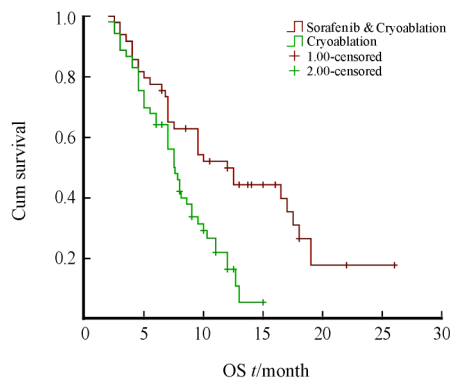


图 1 两组患者生存期(OS)和肿瘤进展时间(TTP)的 Kaplan-Meier 生存曲线分析

Fig 1 Overall survival time(OS) and time to progression(TTP) Kaplan-Meier survival curves of patients in two groups (log-rank $P=0.001$ for OS and TTP)

2.3 MVD-CD34 评价疗效 MVD-CD34 在肝癌组织中的免疫组化结果如图 2 所示。所有患者中获得 CR+PR 患者的平均 MVD-CD34 计数为(111±49)/0.74 mm²,获得 SD 患者的平均 MVD-CD34 计数为(206±74)/0.74 mm²,肿瘤进展(PD)患者的平均 MVD-CD34 计数为(339±92)/0.74 mm²,临床有效病例组(CR+PR)的平均 MVD-CD34 较 PD 组明显降低($P=0.000 1$)。102 例患者的中位 MVD-CD34 计数为 219.5/0.74 mm²,利用 MVD-CD34 中位

数将患者分成高 MVD 组和低 MVD 组, 分析其总生存时间和疾病进展时间结果显示, 49 例低于中位 MVD 值的患者中, 接受联合治疗与单独行冷冻消融治疗的患者生存时间和疾病进展时间差异有统计学意义 [$P=0.018$ (TTP); $P=0.023$ (OS), 图 3]。53 例 MVD 值比中位 MVD 值高的患者, 接受不同治疗后其生存时间和疾病进展时间差异无统计学意义 [$P=0.312$ (TTP); $P=0.062$ (OS)]。

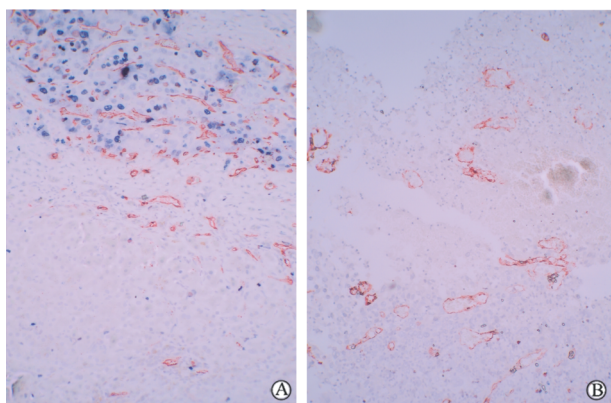


图 2 肝癌组织中 MVD-CD34 的表达

Fig 2 Staining of microvessels by anti-CD34

immunostaining (pink staining) in tumor tissue (SP staining)

A: High expression of MVD-CD34 (lower: liver tissue; upper: tumor tissue); B: Low expression of MVD-CD34. Original magnification: $\times 200$

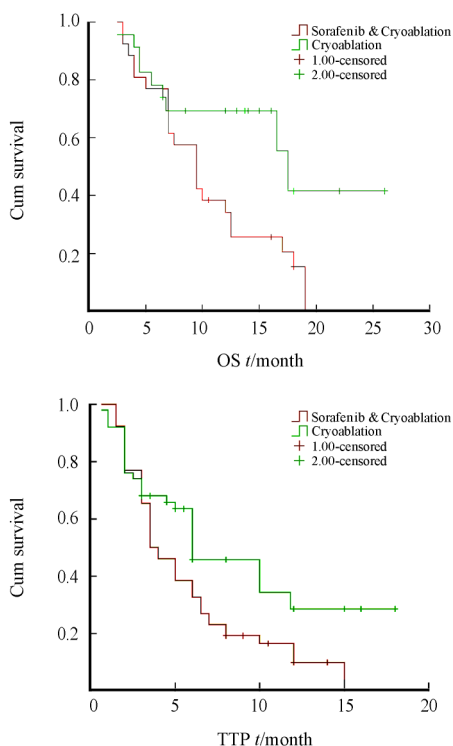


图 3 两组低 MVD 值患者生存期 (OS) 和肿瘤进展时间 (TTP) 的 Kaplan-Meier 生存曲线分析

Fig 3 OS and TTP Kaplan-Meier survival curves for patients with lower MVD in two groups

3 讨论

在我国, 大部分原发性肝癌患者一经确诊即已到进展期, 治疗难度大、预后差。进展期肝癌既往以局部治疗为主, 甲苯磺酸索拉非尼为局部治疗后的系统治疗提供了有效手段^[3-4]。我中心采用氩氦刀局部冷冻消融与索拉非尼相结合, 在最大程度对肝脏原发肿瘤进行局部消融的基础上, 加用索拉非尼从全身水平控制残余肝内病灶及门脉癌栓、肝外病灶等, 在对 102 例进展期肝癌患者进行治疗后的临床结果中显示中位 OS 为 12.5 个月, 中位 TTP 达 9.6 个月, 明显长于单纯局部冷冻消融治疗的 8.6 个月和 5.3 个月, 上述结果同样明显优于目前国内外报道的索拉非尼单独治疗进展期 HCC 的研究结果^[12-13]。在疗效方面, 联合治疗组 2 例 CR, 9 例 PR, 临床有效率 (CR+PR) 达 22%, 凸显了局部消融联合索拉非尼靶向治疗的优越性。

但同为进展期的肝癌患者经过治疗后预后相差很大 (3.8~31.5 个月), 如果在术前能筛选出肝癌组织中特异性的客观检测指标, 术前对患者进行评估, 对于选择合适的治疗对象尤为重要。原发性肝癌是一种血管富集的肿瘤, 血管的新生在肿瘤的发生、发展过程中起着举足轻重的作用, 20 世纪 90 年代 Weidner 等^[11]发现肿瘤血管 MVD 与肿瘤侵袭性、淋巴结转移、患者预后密切相关, 证实 MVD 可以反映肿瘤诱导血管的能力, MVD 越高, 肿瘤侵袭越强、转移越早、预后越差。而 CD34 在 HCC 血管形成中有促进作用, 在新生血管内皮细胞中的表达大于非新生血管, 与肿瘤血管形成早期内皮细胞的迁移有关, CD34 标记的微血管密度 (MVD) 计数还与肝癌大小、分期有相关性^[14]。Poon 等^[6]报道小于 5 cm 的肝癌手术切除术后, 高 MVD-CD34 值的患者 3 年生存率明显低于低 MVD-CD34 值的患者, 且与术后复发率正相关, 提示肝癌组织内的微血管密度 MVD 可以作为原发性肝癌的预后预测因素。而甲苯磺酸索拉非尼在动物实验中已证实能抑制 SD 大鼠 PLC/PRF/5 细胞系接种后所致的肝细胞癌组织中 CD34 的表达, 抑制肿瘤血管的新生从而起到抗肿瘤的作用^[15]。因此, 我们对所有患者在术前进行肝穿病理活检, 对每位患者的肝癌组织行 CD34 标记的免疫组化染色微血管计数, 并分析 MVD 与疗效之间的关系。结果表明, 获得临床有效结果的中位 MVD-CD34 值比病情进展的患者明显降

低,这也说明 MVD 值能够影响进展期肝癌患者应用索拉菲尼的临床疗效。在低于中位 MVD 值的患者中,接受索拉菲尼系统治疗的患者其中位生存时间及中位肿瘤进展时间较单纯冷冻消融组延长;但是在高于中位 MVD 值的患者中,两组的中位肿瘤进展时间及中位生存时间无明显差异,提示 MVD 可能影响索拉菲尼在进展期肝癌治疗中的疗效,高 MVD 值的进展期肝癌患者加用索拉菲尼后应答不佳。

综上,索拉菲尼联合局部冷冻消融治疗进展期 HCC 是安全、有效的,能显著延长进展期 HCC 患者的生存期及肿瘤进展时间,使进展期 HCC 患者临床获益;但进展期肝癌组织中高 MVD 值可能预示对索拉菲尼的治疗效果欠佳,对于术前病理检查提示具有高 MVD 值的患者由于治疗预后较差,在选择治疗方案时应综合考虑患者的情况,优化医疗资源使用。

[参考文献]

- [1] Hinshaw J L, Lee F T Jr. Cryoablation for liver cancer[J]. *Tech Vasc Interv Radiol*, 2007, 10: 47-57.
- [2] 张敏娜, 陆荫英, 王新真, 安林静, 王春平, 陈 艳, 等. 氩氦冷冻消融治疗原发性肝癌临床研究[J]. *中国肿瘤*, 2009, 18: 329-331.
- [3] Cheng A L, Kang Y K, Chen Z, Tsao C J, Qin S, Kim J S, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10: 25-34.
- [4] Llovet J M, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J F, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359: 378-390.
- [5] Poon R T, Lau C P, Ho J W, Yu W C, Fan S T, Wong J. Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 5339-5345.
- [6] Poon R T, Ng I O, Lau C, Yu W C, Yang Z F, Fan S T, et al. Tumor microvessel density as a predictor recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study[J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20: 1775-1785.
- [7] 中国抗癌协会肝癌专业委员会, 中国抗癌协会临床肿瘤学协会, 中华医学会肝病学会分会肝癌学组. 原发性肝癌规范化诊治专家共识[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2009, 14: 259-269.
- [8] Llovet J M, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma; the BCLC staging classification[J]. *Semin Liver Dis*, 1999, 19: 329-338.
- [9] 王春平, 陆荫英, 王新真, 安林静, 苏淑慧, 周 霖, 等. 经皮氩氦刀冷冻消融治疗原发性肝癌的疗效观察(附 300 例报告)[J]. *解放军医学杂志*, 2008, 33: 1413-1417.
- [10] 周 霖, 杨永平, 冯永毅, 陆荫英, 王春平, 王新真, 等. 氩氦刀冷冻治疗原发性肝癌的初步临床研究[J]. *癌症*, 2009, 28: 58-62.
- [11] Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred E N, Moore D H, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma [J]. *Natl Cancer Inst*, 1992, 82: 1875-1887.
- [12] Shim J H, Park J W, Choi J I, Park B J, Kim C M. Practical efficacy of sorafenib monotherapy for advanced hepatocellular carcinoma patients in a hepatitis B virus-endemic area[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135: 617-625.
- [13] Pinter M, Sieghart W, Graziadei I, Vogel W, Maieron A, Kniglsberg R, et al. Sorafenib in unresectable hepatocellular carcinoma from mild to advanced stage liver cirrhosis[J]. *Oncologist*, 2009, 14: 70-76.
- [14] Hakimé A, Hines-Peralta A, Peddi H, Atkins M B, Sukhatme V P, Signoretti S, et al. Combination of radiofrequency ablation with antiangiogenic therapy for tumor ablation efficacy: study in mice[J]. *Radiology*, 2007, 244: 464-470.
- [15] Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 11851-11858.

[本文编辑] 孙 岩