

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00136

肝细胞癌甲胎蛋白表达与肝祖细胞激活状态及患者预后的关系

钱光阳^{1,2}, 徐敏晖², 李建军³, 蔡雄², 张长松², 吴孟超², 吴东^{2*}, 卫立辛^{2*}

- 1. 苏州大学研究生院, 苏州 215006
- 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院肿瘤免疫实验室, 上海 200438
- 3. 中国人民解放军总政治部机关门诊部, 北京 100120

[摘要] **目的** 探讨原发性肝细胞癌组织中甲胎蛋白(AFP)表达与肝祖细胞激活状态及患者预后的关系。**方法** 回顾性分析 92 例接受根治性切除术的原发性肝癌患者资料。其中男性 76 例, 女性 16 例; 年龄 25~72 岁, 中位年龄 51 岁。对手术病理标本进行 AFP 和细胞角蛋白 19(CK19)染色观察并定量。采用单因素 Kaplan-Meier 生存分析, 观察 AFP 的表达对术后生存时间的影响。Cochran-Armitage 线性趋势检验分析祖细胞激活状态(CK19 阳性染色)评分与 AFP 表达的相关性。**结果** 肝癌组织 AFP 高表达组总生存期短于肝癌组织 AFP 低表达组 ($P=0.021$)。祖细胞激活状态评分与血清 AFP 浓度 ($P=0.046$)、肝癌组织 AFP 表达 ($P<0.001$) 正相关。**结论** 肝细胞癌甲胎蛋白高表达对肝癌预后不利, 可能与肝脏祖细胞的激活状态有关。

[关键词] 肝肿瘤; 肝细胞癌; 甲胎蛋白类; 祖细胞; 预后

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)02-0136-04

Association of alpha fetoprotein in hepatocellular carcinoma with activation of hepatic progenitor cells and patient prognosis

QIAN Guang-yang^{1,2}, XU Min-hui², LI Jian-jun³, CAI Xiong², ZHANG Chang-song², WU Meng-chao², WU Dong^{2*}, WEI Li-xin^{2*}

- 1. School of Graduation, Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China
- 2. Tumor Immunology and Gene Therapy Center, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
- 3. Officer's Clinic of General Political Department of PLA, Beijing 100120, China

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship of alpha fetoprotein (AFP) with activation of hepatic progenitor cells in hepatocellular carcinoma (HCC) and the prognosis of HCC patients. **Methods** The clinical data of 92 HCC patients who received curative hepatectomy were retrospectively analyzed. The patients included 76 males and 16 females, with a median age of 51 (ranging 25-72) years. Expression of AFP and CK19 protein was immunohistochemically stained and quantified. Kaplan-Meier survival analysis was used to observe the influence of AFP expression on postoperative survival of patients. Cochran-armitage trend test was used to analyse the association of AFP expression with activation of progenitor cells (CK19 staining). **Results** Patients with high AFP expression had a significantly shorter survival than those with low AFP expression ($P=0.021$). The activation score of hepatic progenitor cells was positively correlated with serum AFP concentration ($P=0.046$) and AFP expression in tumor tissues ($P<0.001$). **Conclusion** AFP expression in HCC tissue predicts a poor prognosis. AFP is closely associated with activation of hepatic progenitor cells.

[Key words] liver neoplasms; hepatocellular carcinoma; alpha fetoproteins; progenitor cells; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(2):136-139]

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见的恶性肿瘤之一, 病死率在恶性肿瘤中居第 2 位^[1]。近年来研究认为, 肿瘤干细胞有可能是

肝癌生长、转移和复发的根源^[2]。甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)是胚胎肝祖细胞的经典标志物, 鉴于在个体和肿瘤发生过程中其与胚胎基因的密切相

[收稿日期] 2011-11-08 **[接受日期]** 2011-12-09

[基金项目] 国家自然科学基金(30870974, 30801347, 30901722, 31171321, 81000970, 81101622). Supported by National Natural Science Foundation of China (30870974, 30801347, 30901722, 31171321, 81000970, 81101622).

[作者简介] 钱光阳, 硕士生. E-mail: qianguangyang@gmail.com

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81875242, E-mail: wuyuz@yahoo.com.cn; Tel: 021-81870855, E-mail: weilixin@yahoo.com

关性,新近研究提示 AFP 与肝脏肿瘤的干性特征有关^[3-4]。肝细胞的再生是一个多级过程,正常成体肝细胞可以通过自我复制来恢复邻近坏死或凋亡的肝实质。而在长期处于病毒感染、氧化应激或酒精损伤的微环境中,成熟肝细胞的增殖能力受损时,肝脏的祖细胞被激活、增殖并逐渐分化为肝细胞、胆管细胞,参与肝实质的修复^[5-6]。肝脏中祖细胞激活反应位于汇管区边缘,由串状扩张的小胆管细胞组成,它可以被胆系标志物 CK19 染色^[7]。这种反应性小胆管细胞反映了祖细胞的激活状态^[8-9]。肝祖细胞的激活是反映肝再生的重要指标。慢性病毒性肝炎、肝硬化导致的肝细胞不断坏死、再生可能是肝癌发生的病理学基础^[10]。肝肿瘤 AFP 的表达是否与癌旁组织肝祖细胞的激活程度存在联系尚不清楚。本研究探讨了原发性肝细胞癌组织中 AFP 表达与肝脏祖细胞激活状态的相关性,并进一步对预后的影响进行了初步分析。

1 材料和方法

1.1 病例资料及纳入标准 选择 2001 年 2 月至 2003 年 7 月第二军医大学东方肝胆外科医院收治的实施根治性肝切除术的原发性肝癌患者 92 例,其中男性 76 例,女性 16 例,年龄 25~72 岁,中位年龄 51 岁。纳入标准:(1)术前未接受任何放、化疗等抗癌治疗;(2)术前排除远处转移和其他并发症;(3)全部病例病理学检查均确诊为肝细胞癌。本研究得到第二军医大学伦理委员会的批准。

1.2 病例随访 对进入研究的所有病例进行随访。随访方式包括电话随访、门诊随访和信件随访等。总生存期是指从手术之日至死亡或最终随访时间截止所经历的时间;无瘤生存期生存时间是指从手术之日至第 1 次发现复发转移所经历的时间;末次随访时间截至 2009 年 12 月。

1.3 免疫组化染色 外科手术切除的标本来源于东方肝胆外科医院病理科。标本经 10% 中性甲醛固定,常规石蜡包埋,连续切片(厚 4 μm),分别行 H-E 和免疫组织化学染色(ABC 法),染色前采用高压法进行抗原修复。本研究中用到的抗体分别为 anti-CK19(Dako; 1 : 200 稀释), anti-AFP(abcam; 1 : 200 稀释)。AFP 的免疫组化染色定量:电子显微镜 Leica DM RXA2 (Leica Microsystems, Germany) 随机扫描 10 个不重复视野($\times 200$),图像处理软件 Image-Pro Plus 计算每个视野免疫组化阳性染色区

域的平均积分光密度(mean intergrated optical density, MIOD)。祖细胞激活反应性小胆管细胞评分:根据 Park 等^[11]的方法,计算癌旁肝组织汇管区实质上皮-间质交界区域 CK19 阳性染色的串状小胆管所占的百分数,半定量如下,0 分:无;1 分: $\leq 10\%$; 2 分: $10\% \sim 25\%$; 3 分: $26\% \sim 50\%$; 4 分: $\geq 50\%$ 。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 和 SAS 9.2 软件进行统计学处理。以 Kaplan-Meier(log-rank 检验)法计算生存率,Cochran-Armitage 线性趋势检验反应性小胆管细胞评分与 AFP 的相关性。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 AFP 表达水平与祖细胞激活反应 免疫组织化学分析发现:AFP 阳性表达物呈棕黄色颗粒,定位于胞质,少数细胞出现胞核染色。肝癌组织中 AFP 染色差异性比较大,不同标本和同一标本肿瘤细胞的染色强度不尽相同(图 1A、1B)。祖细胞激活反应为棕色串状的反应性小胆管(图 1C),位于癌旁肝组织汇管区边缘,并且延伸到汇管区周围的肝实质细胞中;肝脏祖细胞为单个、非串状的 CK19 阳性小细胞。部分标本癌旁肝组织中反应性小胆管比较少,祖细胞激活水平较低(图 1D)。

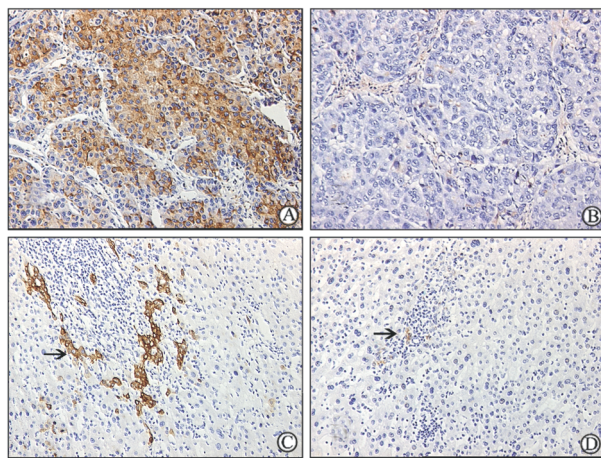


图 1 HCC 组织中 AFP 表达和癌旁肝祖细胞激活状态的免疫组化染色情况

Fig 1 Staining of AFP expression in tumor tissue and activation of hepatic progenitor cells in adjacent noncancerous tissues

A,B: Staining of tumor expression of AFP; C,D: Staining of activation of hepatic progenitor cells in noncancerous tissues (arrows). Original magnification: $\times 200$ (A, B); $\times 100$ (C, D)

2.2 肝癌组织 AFP 表达与预后 为了解肝癌组织

AFP 表达情况对患者生存的影响,我们计算了 HCC 组织的 AFP 平均积分光密度(MIOD),并在接下来的分析中,把 MIOD 的中位数作为癌组织 AFP 高表达和低表达的临界值。血清 AFP 浓度以 20 ng/ml 作为 AFP 表达阳性的临界值。

全组患者 5 年总生存率为 31.5%,中位生存期 25.4 个月;全组患者 5 年无病生存率为 19.6%,中

位生存期 15.8 个月。Kaplan-Meier 生存分析结果显示(图 2A);肝癌组织 AFP 高表达组 5 年总生存率(23.9%)和中位生存期(19.4 个月)均低于肝癌组织 AFP 低表达组(分别为 39.1%和 33.5 个月, $P < 0.05$);肝癌组织 AFP 高表达组 5 年无病生存率和中位生存期略低于肝癌组织 AFP 低表达组,但差异无统计学意义($P = 0.127$,图 2B)。

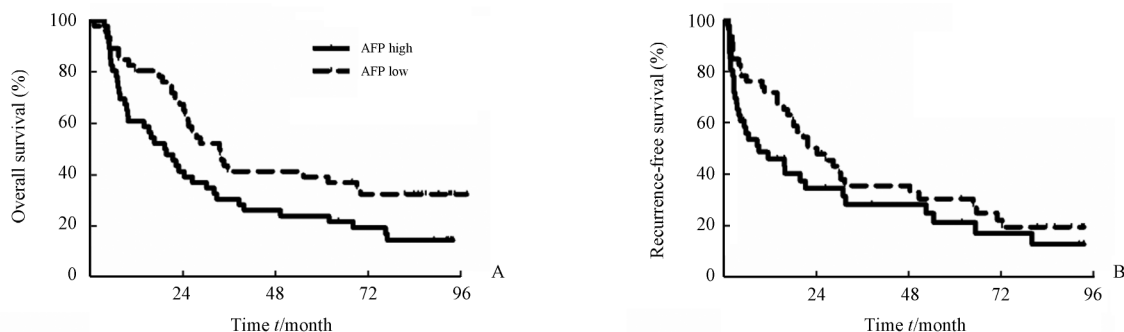


图 2 肝癌组织中 AFP 表达的预后分析

Fig 2 Survival analysis of HCC patients according to AFP expression in tumor tissue

A: Survival curves plotted according to AFP expression levels in HCC patients. Patients with high AFP expression had shorter overall survival than those with low AFP expression ($P = 0.021$). B: AFP expression was not associated with recurrence-free survival ($P = 0.127$)

2.3 祖细胞激活状态与 AFP 表达的相关性 Cochrane-Armitage 趋势分析显示(表 1):反应性小胆管细胞评分与肝癌组织 AFP 表达高低呈线性趋势($Z = -3.5584, P < 0.001$),与血清 AFP 阳性率呈线性趋势($Z = -1.9949, P = 0.046$)。Spearman 等级相关分析显示:反应性小胆管细胞评分与肝癌组

织 AFP 表达正相关($r = 0.383, P < 0.001$);在血清 AFP ≥ 20 ng/ml 的患者中,反应性小胆管细胞评分与肝癌组织 AFP 表达正相关($r = 0.310, P = 0.009$);在血清 AFP < 20 ng/ml 的患者中,反应性小胆管细胞评分与肝癌组织 AFP 表达正相关($r = 0.491, P = 0.02$)。

表 1 祖细胞激活状态与血清 AFP 及肝癌组织 AFP 表达的关系

Tab 1 Correlation of activation of hepatic progenitor cells with serum AFP levels and AFP expression in tumor tissue

Reactive ductules score	Serum AFP $\rho_{25}/(\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$			AFP expression of tumor tissue		
	< 20	≥ 20	Total	Low	High	Total
1	8(42.1)	11(57.9)	19	13(68.4)	6(31.5)	19
2	9(27.3)	24(72.7)	33	20(60.6)	13(39.4)	33
3	2(6.9)	27(93.1)	29	13(44.8)	16(55.2)	29
4	3(27.2)	8(72.8)	11	0(36.4)	11(63.6)	11
Total	22	70	92	46	46	92

Statistical significance was determined using the Cochran-Armitage trend test, $Z = -1.9949, P = 0.046$ for hepatic progenitor cells and serum AFP levels; $Z = -3.5584, P = 0.0004$ for hepatic progenitor cells and AFP expression in tumor tissue

3 讨论

在肝脏胚胎发育和肝癌发生中,AFP 是重要的研究指标。正常情况下 AFP 由卵黄囊及胚胎肝脏产生,出生后维持低水平表达。而在急慢性肝炎及肝硬化患者,肝细胞损伤后再生情况下 AFP 表达可

再度升高;AFP 明显增高见于肝细胞性肝癌和畸胎瘤,血清 AFP 浓度已作为临床诊断肝癌的重要指标之一^[12]。新近研究提示血清 AFP 浓度与肝癌的预后相关,具体机制尚不清楚。本研究从组织学水平直观地观察了 AFP 在肿瘤中的表达情况,并分析了肝癌组织 AFP 表达与患者预后的关系,结果发现

APF 升高的确对患者的预后有不利影响,癌组织 AFP 表达与患者总生存负相关。

越来越多的研究表明,肿瘤干细胞在肿瘤的发生发展过程中发挥了重要作用。肿瘤干细胞除具有自我更新和多向分化等正常干细胞的基本特性外,还能够维持肿瘤的增殖和生长,逃避免疫调控,并通过各种信号转导和调节通路参与肿瘤的发生、发展、转移和复发^[2]。目前已经在白血病、神经系统肿瘤、乳腺癌和肝癌中发现了肿瘤干细胞存在的可能性^[13-16]。寻找肿瘤干细胞的特征性指标是近年来的肝癌研究热点。目前已经发现,CD133、CD90、EpCAM、CK7 和 CK19 等可能成为肝癌干细胞筛选的参考标志物^[17-20]。但确切的肝癌干细胞的特异性标志物尚未有定论。有报道认为在肝内胆管细胞癌和胰腺癌中,AFP 在肿瘤细胞中的表达可能与具有肿瘤干细胞的特征有关^[4,21]。既往研究表明,表达干性指标的肝癌预后相对较差^[20]。本研究选取 AFP 作为肝癌的指标,发现随着癌旁祖细胞的激活水平的增强,肝癌组织 AFP 表达阳性率、血清 AFP 阳性率都相应提高,两者存在正相关关系。我们推测,长期慢性损伤的微环境促进了肝脏祖细胞的激活,同样的环境因素也可能促进肝癌组织 AFP 的表达。深入研究有助于进一步了解肝癌 AFP 表达的发生机制及其与肝肿瘤干细胞的关系。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 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作委员会,中华医学会肝病学会肝癌学组. 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.
- [2] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, Weissman I L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature,2001,414:105-111.
- [3] Ishii T, Fukumitsu K, Yasuchika K, Adachi K, Kawase E, Suemori H, et al. Effects of extracellular matrixes and growth factors on the hepatic differentiation of human embryonic stem cells[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2008,295:G313-G321.
- [4] Ishii T, Yasuchika K, Suemori H, Nakatsuji N, Ikai I, Uemoto S. Alpha-fetoprotein producing cells act as cancer progenitor cells in human cholangiocarcinoma[J]. Cancer Lett,2010,294:25-34.
- [5] Roskams T. Progenitor cell involvement in cirrhotic human liver diseases: from controversy to consensus[J]. J Hepatol,2003,39:431-434.
- [6] Roskams T, De Vos R, Van Eyken P, Myazaki H, Van Damme B, Desmet V. Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man[J]. J Hepatol,1998,29:455-463.
- [7] Falkowski O, An H J, Ianus I A, Chiriboga L, Yee H, West A B, et al. Regeneration of hepatocyte 'buds' in cirrhosis from intra-biliary stem cells[J]. J Hepatol,2003,39:357-364.
- [8] Roskams T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma[J]. Oncogene,2006,25:3818-3822.
- [9] Clouston A D, Powell E E, Walsh M J, Richardson M M, Demetris A J, Jonsson J R. Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis[J]. Hepatology,2005,41:809-818.
- [10] Levrero M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C[J]. Oncogene,2006,25:3834-3847.
- [11] Park Y N, Kojiro M, Di Tommaso L, Dhillon A P, Kondo F, Nakano M, et al. Ductular reaction is helpful in defining early stromal invasion, small hepatocellular carcinomas, and dysplastic nodules[J]. Cancer,2007,109:915-923.
- [12] Sell S. Alpha-fetoprotein, stem cells and cancer; how study of the production of alpha-fetoprotein during chemical hepatocarcinogenesis led to reaffirmation of the stem cell theory of cancer[J]. Tumour Biol,2008,29:161-180.
- [13] Bonnet D, Dick J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell[J]. Nat Med,1997,3:730-737.
- [14] Singh S K, Clarke I D, Terasaki M, Bonn V E, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. Cancer Res,2003,63:5821-5828.
- [15] Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, Morrison S J, Clarke M F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003,100:3983-3988.
- [16] Chiba T, Kita K, Zheng Y W, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties[J]. Hepatology,2006,44:240-251.
- [17] Yang Z F, Ho D W, Ng M N, Lau C K, Yu W C, Ngai P, et al. Significance of CD90⁺ cancer stem cells in human liver cancer[J]. Cancer Cell,2008,13:153-166.
- [18] Yin S, Li J, Hu C, Chen X, Yao M, Yan M, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity[J]. Int J Cancer,2007,120:1444-1450.
- [19] Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang H Y, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features[J]. Gastroenterology,2009,136:1012-1024.
- [20] Durnez A, Verslype C, Nevens F, Fevery J, Aerts R, Pirenne J, et al. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin[J]. Histopathology,2006,49:138-151.
- [21] Sasaki N, Ishii T, Kamimura R, Kajiwara M, Machimoto T, Nakatsuji N, et al. Alpha-fetoprotein-producing pancreatic cancer cells possess cancer stem cell characteristics[J]. Cancer Lett,2011,308:152-161.