

· 专题报道 ·

肝癌患者肝移植术前外周血 AFP mRNA 的表达与肿瘤复发及患者生存的关系

蔡金贞¹, 郑虹¹, 朱志军¹, 邓永林¹, 潘澄¹, 张雅敏¹, 张建军¹, 蒋文涛¹, 王亮¹, 沈中阳^{1*}, 傅志仁², 丁国善², 张友磊²
(1. 天津市第一中心医院器官移植中心, 天津 300071; 2. 第二军医大学长征医院全军器官移植研究所, 上海 200003)

[摘要] 目的:探讨原发性肝细胞肝癌患者在肝移植术前外周血 AFP mRNA 的表达及其与术后肿瘤复发、患者预后的关系。方法:以 2003 年 2 月~2004 年 2 月收入天津市第一中心医院的 31 例肝细胞肝癌行原位肝移植患者为研究对象,采用实时定量 RT-PCR 检测患者术前外周血 AFP mRNA 表达水平,均采用尸体供肝经典原位肝移植。以 SPSS 12.0 软件分析 AFP mRNA 的表达与患者术后肿瘤复发及生存的相关性。结果:31 例患者中有 10 例 AFP mRNA 表达阳性,表达量为 57~10 400 copy/μg,中位数为 360 copy/μg。患者 Child-pugh 分级,肿瘤的大小、个数,病理 Edmond 分级与术前 AFP mRNA 的表达水平无关。肿瘤 TNM 分期为 ~ 期的患者 AFP mRNA 的阳性表达率显著高于 ~ 期患者 ($P=0.001$); 脉管浸润的患者 AFP mRNA 的表达水平显著高于无脉管浸润者 ($P=0.029$)。肝移植术前 AFP mRNA 阴性组的无瘤生存及总体生存显著高于 AFP mRNA 阳性组。结论:术前 AFP mRNA 表达的水平是肿瘤复发的危险因素,是术前可能存在肝外微转移的指标,可作为预后的判断因子。

[关键词] 癌,肝细胞;肝移植;甲胎蛋白;肿瘤复发,局部

[中图分类号] R 657.3 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)10-1052-04

Relationship between pre-transplantation α -fetoprotein messenger RNA expression in peripheral blood with tumor recurrence and survival rate in HCC patients

CAI Jin-zhen¹, ZHENG Hong¹, ZHU Zhi-jun¹, DENG Yong-lin¹, PAN Cheng¹, ZHANG Ya-min¹, ZHANG Jian-jun¹, JIANG Wen-tao¹, WANG Liang¹, SHEN Zhong-yang^{1*}, FU Zhi-ren², DING Guo-shan², ZHANG You-lei² (1. Center of Organ Transplantation, First Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300071, China; 2. Organ Transplantation Institute of PLA, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

[ABSTRACT] **Objective:** To assess the relationship between pre-transplantation α -fetoprotein messenger (AFP) RNA expression in peripheral blood with tumor recurrence and survival rate in HCC patients. **Methods:** Thirty-one HCC patients receiving *in situ* liver transplantation from Feb. 2003 to Feb. 2004 were included in this study. Real-time quantitative RT-PCR was used to determine the expression level of AFP RNA in peripheral blood of all patients. All the cases were followed up for tumor recurrence and survival rate. The SPSS 12.0 software was used to analyze the relationship between AFP mRNA expression with tumor recurrence and survival rate. **Results:** Ten of the 31 patients were positive of AFP mRNA, with the quantity being 57 to 10 400 copies/ μ g RNA (median value: 360 copies/ μ g RNA). Patients' Child-pugh grade, tumor size, tumor number, and tumor Edmond grade were not related to pre-transplantation AFP mRNA expression. Patients of pTNM ~ stages had a significantly higher AFP mRNA expression than those of pTNM ~ stages ($P=0.001$); patients with vascular invasion had a significantly higher expression than those without ($P=0.029$). Patients who were negative of AFP mRNA before transplantation had a significantly higher survival rate than those positive of AFP mRNA. **Conclusion:** The results suggest that the pre-transplantation levels of AFP mRNA in peripheral blood may be a risk factor for recurrence and/or metastasis after transplantation in HCC patients; it may also be an indicator for extra-hepatic micrometastasis before transplantation and can be used for predicting prognosis.

[KEY WORDS] carcinoma, hepatocellular; liver transplantation; alpha-fetoprotein; neoplasm recurrence, local

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(10):1052-1055]

肝癌行肝移植术后,肿瘤的复发和转移率仍较高。肝癌早期即可侵袭血管进入血循环,复发性或伴有肝外远处器官转移的肝癌周围静脉血液中是否存在播散的肝癌细胞或微小转移灶(micrometastasis),多年来一直倍受人们瞩目^[1,2]。及早检出血循环中的肝癌细胞,对指导治疗、判断预后有着重要意义。目前国外 AFP mRNA 在肝移植术后肿瘤复发

的意义上存在争议^[3-5],国内肝癌肝移植术患者 AFP mRNA 的表达与术后复发的研究尚未见报道。

[基金项目] 天津市卫生局重点课题(03KY01)。Supported by the Key Program of Health Bureau of Tianjin Municipality(03KY01)。

[作者简介] 蔡金贞,博士,主治医师。

E-mail:caijinzen@eyou.com

* Corresponding author. E-mail:Shenz Y@ootc.net

本研究拟通过检测肝细胞肝癌患者术前外周静脉血液 AFP mRNA 表达来探讨其与肿瘤复发性转移以及对患者的无瘤生存及总体生存的影响。

1 对象和方法

1.1 病例选择 选择 2003 年 2 月~2004 年 2 月天津市第一中心医院术前经 B 超、CT 及 AFP 水平诊断为肝癌,术后经病理确诊为肝细胞肝癌行肝移植的患者 31 例,其中男性 29 例,女性 2 例,年龄在 37~62 岁,中位年龄 49 岁。对照组 10 例,为随机选择的同期肝炎肝硬化行肝移植患者,年龄 35~60 岁,中位年龄 53 岁,两组间无显著性差异。病例剔除标准:入院时患者检查已明确诊断肿瘤有远处转移;术后病理诊断排除肝细胞肝癌;治疗过程中因各种原因不能配合以及不愿合作的患者;无法随访的患者。

1.2 临床资料 31 例肝癌患者中,乙型肝炎病毒感染 30 例,丙型肝炎病毒感染 1 例。Child-Pugh 分级 A 级 14 例(45.2%),B 级 7 例(22.6%),C 级 10 例(32.3%)。肿瘤最大径 0.9~14 cm,其中 <5 cm 16 例(51.6%),≥5 cm 15 例(48.4%)。肿瘤结节数 <3 个 26 例,其中单发肿瘤 16 例,3 个 5 例。TNM 分期 I 期 6 例(19.4%),II 期 6 例(19.4%),III 期 15 例(48.4%),IV 期 4 例(12.9%)。病理 Edmondson 分级 I 级 18 例(58.1%),II 级 8 例(25.8%),III 级 5 例(16.1%)。合并脉管侵犯 16 例(51.6%)。3 例合并有单支的门静脉癌栓,其中有 1 例为门静脉主干癌栓,患者术后 4 个月门脉再次形成癌栓。术前肝切除 6 例(19.4%),行 TACE 7 例(22.6%),放疗 1 例(3.2%),未针对肿瘤加以治疗者 17 例(54.8%)。

1.3 AFP mRNA 的检测 患者行肝移植手术当天,于手术前留取肘静脉血 10 ml。采用淋巴细胞分离液分离有核细胞,用 TRIzol 试剂提取总 RNA,逆转录合成 cDNA。采用实时定量 RT-PCR 的方法,通过 GeneAmp PE-5700 软件系统检测样本 AFP mRNA 的表达。RT-PCR 引物由上海浩源生物技术有限公司合成。上游引物:5'-TgA AgA ggg AA g ACA TAA CTg-3';下游引物:5'-AgC AgC CCA AA g AA g AAT-3';探针:5'-ACA CAA AAA gCC CAC TCC AgC-3'。质量控制:GeneAmp PE-5700 型 PCR 仪在核酸扩增过程中实现实时定量,每 8 s 检测 1 次 PCR 产物量,获得核酸扩增的 S 形动力学曲线。本实验以模板起始拷贝数的自然对数为横坐标,以循环阈值为纵坐标,获得直线型标准曲

线,斜率为 -4.092,线性相关系数 $r = 0.992$ 。

1.4 治疗方法 患者均采用尸体供肝经典原位肝移植,术后常规应用 FK506、MMF、甲强龙抗排斥治疗。符合 Milan 标准的患者为 15 例,超出 Milan 标准的患者为 16 例。术后超出 Milan 标准的 16 例患者均进行了化疗,化疗开始的最早时间为 2 周,大多数患者于术后第 4、5 周开始。符合 Milan 标准的患者 7 例行化疗,8 例未行化疗。化疗方案:(1)表柔比星 40 mg,第 1 天静脉滴注;(2)5-氟尿嘧啶 500 mg,顺铂 20 mg,连续静滴 4 d;(3)基因工程 -2b 干扰素(商品名:安福隆)100 万单位连续肌内注射 4 d。肝移植术后 1 年以内,每隔 1 个月化疗 1 次,共 4~6 次。

1.5 随访 患者肿瘤复发转移为无瘤生存的随访终点,患者死亡为随访总体生存终点,详细记录在随访期内的相关并发症、肿瘤复发时间、部位、单发或多发及治疗情况,术后的抗排斥治疗及抗肿瘤治疗情况。

1.6 统计学处理 用 SPSS 12.0 统计软件对数据进行分析及图表处理。总体累计生存率和无瘤(无复发)累计生存率由 Kaplan-Meier 方法获得。生存曲线间的比较通过 log-rank test,组间相关性分析采用 spss 相关分析,均为双尾分析,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用组间 t 检验。

2 结果

2.1 术前外周血的 AFP mRNA 的表达 实验组 31 例患者在肝移植术前共有 10 例(32.3%)患者在外周血检测出 AFP mRNA 的表达(图 1A),表达量为 57~10 400 copy/ μ g,中位数为 360 copy/ μ g,有 21 例(67.7%)的患者术前表达为阴性(图 1B)。对照组的 10 例单纯肝硬化患者,9 例为阴性表达,1 例为 78 copy/ μ g。两组间有显著差异($P < 0.01$)。

2.2 各种临床因子与术前 AFP mRNA 表达的关系 患者的性别、年龄、Child-pugh 分级、肿瘤的大小、肿瘤的个数、是否符合 Milan 标准、病理 Edmondson 分级与术前 AFP mRNA 的表达阳性率及表达量无显著相关性。肿瘤的分期与 AFP mRNA 的阳性表达:I 期患者 1/6 例,II 期患者 1/6 例,III 期 6/15 例,IV 期 2/4 例,其中在 III 期与 IV 期,III 期与 IV 期患者间 AFP mRNA 的表达无显著性差异,II 期与 III 期患者间存在非常显著性差异($P = 0.001$)。脉管浸润的患者 AFP mRNA 的表达阳性率(8/16)显著高于无脉管浸润者(2/15, $P = 0.029$)。

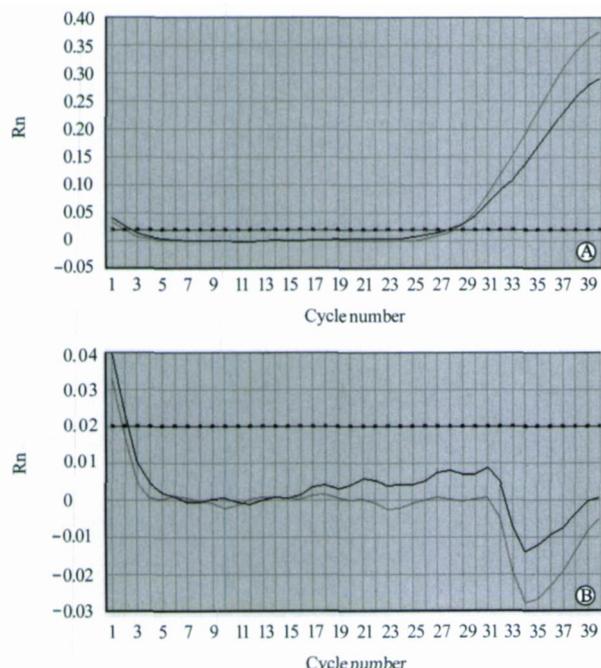


图1 实时定量 RT-PCR 检测 AFP mRNA 的表达

Fig 1 AFP mRNA expression determined by real-time quantitative RT-PCR

A: Positive; B: Negative

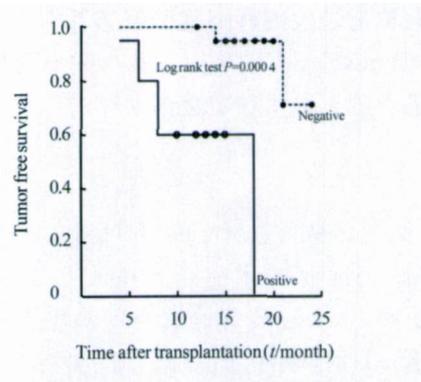


图3 患者肝移植术前 AFP mRNA 的表达与总体生存曲线的关系

Fig 3 Overall survival curves of patients who were AFP mRNA positive and negative before liver transplantation

2.3 肝移植患者术前 AFP mRNA 对无瘤累计生存率及总体累计生存曲线的影响 以肝癌患者术前的 AFP mRNA 的阳性表达及阴性表达分为两组,由 Kaplan-Meier 曲线可见肝移植术前阳性表达组与阴性表达组的无瘤累计生存曲线有非常显著性差异 ($P=0.0001$,图2)。由 Kaplan-Meier 曲线可见肝移植术前阳性表达组与阴性表达组的总体累计生存曲线有非常显著性差异 ($P=0.0004$,图3)。

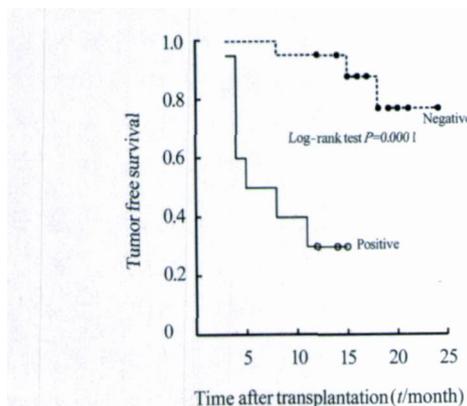


图2 患者肝移植术前 AFP mRNA 表达与无瘤生存曲线的关系

Fig 2 Tumor free survival curves of patients who were AFP mRNA positive and negative before liver transplantation

2.4 肿瘤复发情况 10 例术前阳性表达的患者 8 例分别在术后的 3、4、4、4、5、8、8、11 个月(平均 5.9 个月)出现了肿瘤的复发,肺、肝、骨骼的转移与复发。2 例未出现肿瘤的复发与转移。21 例术前阴性表达患者有 6 例患者分别在 8、12、14、15、15、18 个月(平均 13.7 个月)出现了肿瘤的复发。二组间存在非常显著性差异 ($P=0.001$)。

3 讨论

原发性肝细胞癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤之一^[6],理论上肝移植是肝细胞癌治疗的最佳选择,但是早期开展的肝癌肝移植患者,50%~70%的病例在移植肝或远处复发,即使符合 Milan 标准的肝癌患者的 5 年存活率也在 70%左右。目前,影响肿瘤复发的临床因素、标准都无法准确预测肿瘤的复发^[6-8]。肝移植术后肿瘤复发的机制仍未被人们所认识。

3.1 肝癌患者肝移植术前外周血 AFP mRNA 的表达水平 31 例患者在肝移植术前共有 10 例(32.3%)患者在外周血检测出 AFP mRNA 的表达,表达量为 57~10 400 copy/ μ g,中位数为 360 copy/ μ g,有 21 例(67.7%)患者术前为阴性。目前国内外文献报道肝癌患者的肝切除术前检测的 AFP mRNA 的表达率大概为 30%~60%不等, Ijichi 等^[9]报道为 36%,赵挺等^[10]应用巢式 RT-PCR 检测 102 例 PHC、AFP mRNA 的阳性率 56.86%,刘扬等^[11]报道巢式 RT-PCR 检测其周围静脉血中 AFP mRNA,21 例伴有肝外远处器官转移的原发性肝癌患者血液 AFP mRNA 均表达阳性(100%);19 例复发性肝癌中有 7 例血液 AFP mRNA 表达阳性

(36.8%)。因此,阳性表达的率与不同病患人群的差异有关,也可能与实验室之间的系统误差有关,本组病例的 AFP mRNA 表达情况与国外文献比较基本相似。

3.2 患者术前 AFP mRNA 阳性表达率与肿瘤复发关系 肝脏位于体循环与门静脉系统的交汇处,血液供应相当丰富,肝癌细胞在早期即可侵袭血管进入外周循环,肝癌的这一特点使在外周血中检测肝癌细胞成为可能。AFP mRNA 在细胞质内是翻译、合成 AFP 的物质基础,游离在外周血中的 mRNA 非常不稳定,易被 RNA 酶降解。因此,AFP mRNA 只能存在于尚具活性的肝癌细胞中^[12],在排除包括生殖器肿瘤在内的其他有关因素干扰的前提下,在外周血中检测到 AFP mRNA 就能肯定肝癌细胞在原发部位已经突破血管壁并侵袭入外周血中。本结果证实,外周血癌细胞中 AFP mRNA 的表达与肝癌患者肿瘤的血管浸润、肿瘤复发密切相关,因此可以认为,外周血 AFP mRNA 是肝癌细胞存在于外周血的直接证据,是肝癌发生血管浸润并形成或可能形成转移的重要标志,也是肝癌患者肝移植术后肿瘤复发的肿瘤复发的根源^[1,2,13]。因此,术前 AFP mRNA 的阳性表达显示肿瘤细胞通过脉管浸润而进入外周血,可能导致肝移植术前的外周血中存在游离的肿瘤细胞,并且可能存在未被临床发现的微转移病灶,在肝移植术后,微转移的肿瘤迅速生长,从而导致肿瘤在移植术后的复发。

3.3 患者术前 AFP mRNA 阳性表达的临床意义

(1) 寻找更好的诊断为转移的方法,并且在供体极度缺乏时将此类患者列为相对禁忌证。(2) 在术前对此类患者进行抗肿瘤的治疗。(3) 在术中尤其无肝期寻求靶向定位的核素放疗及其他治疗的可能性。(4) 术后严格规律的抗肿瘤治疗,包括抗肿瘤血管生成药物的治疗。(5) 密切随访,及早发现肿瘤的复发,积极的行抗肿瘤的综合治疗,可能获得良好的带瘤生存。

综上所述,肝移植术前的 AFP mRNA 表达水平是肿瘤复发的危险因素,是术前可能存在肝外微转移的指标,术前的高表达患者可能预示肿瘤微转移的风险,可作为预后的判断因子。

[参考文献]

- [1] Komeda T, Fukuda Y, Sando T, et al. Sensitive detection of circulating hepatocellular carcinoma cells in peripheral venous blood[J]. *Cancer*, 1995, 75:2214.
 - [2] Matsumura M, Niwa Y, Kato N, et al. Detection of fetoprotein mRNA, and indicator of hemagenous spreading hepatocellular carcinoma, in the circulation: a possible predictor of metastatic hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 1994, 20:1418-1425.
 - [3] Witzigmann H, Geissler F, Benedix F, et al. Prospective evaluation of circulating hepatocytes by alpha-fetoprotein messenger RNA in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Surgery*, 2002, 131:34-43.
 - [4] Llovet JM, Vilana R, Bru C, et al. Increased risk of tumor seeding after percutaneous radiofrequency ablation for single hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2001, 33:1124-1129.
 - [5] Cillo U, Vitale A, Navaglia F, et al. Role of blood AFP mRNA and tumor grade in the preoperative prognostic evaluation of patients with hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11:6920-6925.
 - [6] 夏穗生. 肝癌肝移植争论的热点[J]. *中国实用外科杂志*, 2004, 24:38-40.
 - [7] Llovet JM, Fuster J, et al. Liver transplantation for small hepatocellular carcinoma: the tumor-node-metastasis classification dose not have prognostic power[J]. *Hepatology*, 1998, 27:1572.
 - [8] Marsh JW, Dovorchik I, Bonham CA, et al. Is the pathologic TNM staging system for patients with hepatoma predictive of outcome[J]? *Cancer*, 2000, 88:538.
 - [9] Ijichi M, Takayama T, Matsumura M, et al. alpha-Fetoprotein mRNA in the circulation as a predictor of postsurgical recurrence of hepatocellular carcinoma: a prospective study[J]. *Hepatology*, 2002, 35:853-860.
 - [10] 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, 7:976-979.
 - [11] 刘扬, 张柏, 钱光相, 等. 肝细胞癌患者血液 AFP mRNA 检测的临床意义[J]. *第二军医大学学报*, 1999, 20:121-123.
 - [12] Wong IH, Lau WY, Leung T, et al. Hematogenous dissemination of hepatocytes and tumor cells after surgical resection of hepatocellular carcinoma: a quantitative analysis[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5:4021-4027.
 - [13] Lemoine A, Le Bricon T, Salvucci M, et al. Prospective evaluation of circulating hepatocytes by alpha-fetoprotein mRNA in humans during liver surgery[J]. *Ann Surg*, 1997, 226:43-50.
- [收稿日期] 2006-05-10 [修回日期] 2006-09-21
[本文编辑] 孙岩