

DOI:10. 3724/SP. J. 1008. 2009. 00309

• 综 述 •

肝细胞癌克隆起源研究进展

王 斌,丛文铭*
第二军医大学东方肝胆外科医院病理科,上海 200438

[摘要] 多结节和复发性肝细胞癌可分为肝内转移和多中心发生两种,其克隆起源方式与临床诊治密切相关,根据其克隆起源方式设计合理的治疗方案是肝脏外科亟待解决的新问题。本文就近来国内外关于肝癌多中心发生的临床病理学特点、分子诊断及临床意义作一综述。
[关键词] 肝肿瘤;肝细胞癌;肿瘤形成过程;多中心发生;肝内转移
[中图分类号] R 735. 7 [文献标志码] A [文章编号] 0258-879X(2009)03-0309-04

Clonal origin of hepatocellular carcinoma: recent progress

WANG Bin, CONG Wen-ming*
Department of Pathology, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[ABSTRACT] Multinodular and intrahepatic recurrent HCC can originate from intrahepatic metastasis and multiple origins, and their colnal origin is closely related to the clinical diagnosis and treatment. To designate suitable therapeutic strategies according to their colnal origin is a new challenge needs to be tackled urgently. This paper reviews recent progress in the clinicopathological features, molecular diagnosis and clinical outcomes of multiple origin HCC.
[KEY WORDS] liver neoplasms;hepatocellular carcinoma;neoplastic processes;multicentric occurrence;intrahepatic metastasis
[Acad J Sec Mil Med Univ,2009,30(3):309-312]

1976 年提出肿瘤的单克隆学说,即单克隆性增生是肿瘤的重要特征之一,为随后肿瘤性病变和增生性病变的鉴别奠定了重要的理论基础。此后多数学者一直沿袭这一理论,认为肝细胞癌的多结节灶、复发灶、卫星灶以及肝外转移灶系单克隆起源。直到 20 世纪 80 年代末,分子技术的发展推动了肝细胞癌克隆起源的研究,至此人们才逐渐认识到肝癌多中心发生(multicentric occurrence,MO)的存在。

1 肝癌克隆起源的临床病理学特点

1.1 组织病理学诊断标准 肝癌克隆起源的形态学基础主要源于对肝癌癌前病变、早期肝癌和微小肝癌的病理形态学观察。日本学者在此方面做了大量工作,并积累了自身的经验。Shimada 等^[1]从大体和镜下对多结节肝细胞癌肝内转移(intrahepatic metastasis,IM)的特点进行了描述:(1)肿瘤明显来自门静脉癌栓;(2)多发卫星结节围绕主瘤生长;(3)邻近主瘤的孤立癌灶具有与主瘤相似的组织学表现。对于复发性肝细胞癌,有资料显示如果复发肿瘤为中或低分化肝细胞癌,组织学分级与原发肿瘤相同或更低,可诊断为 IM。1997 年和 2000 年日本肝癌研究组先后提出并修订了同时性 MO(synchronous multicentric occurrence)的形态学诊断标

准,当多结节肝细胞癌符合以下一项或多项条件,可以考虑诊断为同时性 MO。具体为:(1)在腺瘤样增生(adenomatous hyperplasia,AH)或异型增生结节(dysplastic nodule,DN)内可见高分化肝细胞癌成分;(2)肝细胞癌呈高分化状态;(3)高分化肝细胞癌内含有中或低分化癌成分^[2]。该标准与 2000 年 WHO 提出的肝癌 MO 的诊断标准基本相似。
肝癌异时性 MO(metachronous multicentric occurrence)是临床上更为重视的一种肝癌复发形式,形态学诊断标准为:(1)原发肿瘤为中低分化肝细胞癌,复发肿瘤为高分化肝细胞癌;(2)原发及复发肿瘤均为高分化肝细胞癌;(3)复发肝癌呈结节内结节型;(4)复发肿瘤周边肝组织内可见异型增生结节。以上标准的制定主要依据高分化肝癌一般无转移或甚少转移。但是,某些 MO 的高分化肝癌也会迅速的去分化而表现为中或低分化^[3],且我国临床上收治的病例多为中晚期肝癌,此时仅依赖组织病理学表现很难对肝癌的克隆起源作出准确诊断。
1.2 临床特点 判断肝癌克隆起源除依靠组织病理学表现外,还常参考一些临床指标。有研究^[4]将 82 例 HBV 阳性的多结节性肝癌分为 MO 组和 IM 组进行比较分析,结果发现:Child 分级、门静脉癌栓、血清胆碱酯酶水平、肿瘤大小和

[收稿日期] 2008-10-21 [接受日期] 2008-11-25
[基金项目] 国家自然科学基金(30872506). Supported by National Natural Science Foundation of China(30872506).
[作者简介] 王 斌,博士生. E-mail:wb5654@hotmail.com
* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81875191, E-mail:wmcong@smmu. edu. cn

组织学分级是区分二者的独立因素。另一些资料表明 MO 的一个重要的基础是 HBV 或 HCV 感染所致的慢性肝炎及肝硬化,且在 HCV 感染基础上的肝硬化比 HBV 感染者更易出现 MO^[5-7],而血小板计数与肝纤维化程度及门静脉压力有关,其计数下降反映肝硬化的程度,亦是鉴别 MO 和 IM 的参考指标之一^[1]。此外,亦有学者根据术前和复发时 AFP 的异同判别复发性肝癌的克隆起源,其水平升高可能与肝细胞癌 MO 密切相关^[8]。新近,Shirabe 等^[9]对 152 例肝细胞癌术后复发情况进行回顾性研究,结果发现复发结节数 ≤ 4 个可能与 MO 有关,这组患者临床病理学特点包括血清谷丙转氨酶升高、低蛋白血症、吡哆醇青绿储留率升高、HCV 感染、低血小板计数以及组织学呈活动性肝炎表现。

2 肝癌克隆起源的分子诊断

组织病理学以及临床特点往往难以准确地区分 IM 和 MO,鉴于肝癌常有基因突变、基因缺失、基因过表达和基因表型改变等特征,因而可以从分子水平鉴别肝癌克隆起源的差异。20 世纪 80~90 年代有学者相继应用分子生物学的方法检测 HBV-DNA 整合模式、p53 突变类型和 DNA 倍体模式等来确定肝癌克隆起源,以下主要介绍近年来发展的克隆性标志物及其应用。

2.1 线粒体 D 环区突变模式 人类恶性肿瘤中线粒体 DNA (mitochondria DNA, mtDNA) 发生高频的错义突变和移码突变,这些突变集中发生在非编码的 D 环区域,该区域是人类线粒体基因组中变异最大的部分,也是体细胞线粒体 DNA 突变的热点区域^[10-12]。据国外研究^[11,13]报道,原发性肝细胞癌线粒体 DNA 发生 D 环区突变的频率介于 39%~68%。国内黄学文等^[14]对 20 例原发性肝癌线粒体 DNA D 环区突变情况进行检测,结果显示 D 环区突变率为 40% (8/20),共发现突变位点 53 个,其中包括 2 个插入、11 个缺失和 40 个点突变。线粒体基因组的高突变率不但产生了大量的致病突变体,还产生了更多的序列多态性,如作为遗传标志的单核苷酸多态性位点。将线粒体 DNA D 环区突变的多态性作为克隆性标志为肿瘤克隆起源的研究提供了新思路^[11,15]。Nomoto 等^[11]采用直接测序法对 19 例复发性肝细胞癌线粒体 D 环区的突变进行检测,结果发现 13 例标本中每例至少有 1 个瘤结节存在线粒体 DNA 的突变,其中 3 例标本各瘤结节突变模式相同,认为是相同克隆起源;另 8 例肿瘤线粒体 DNA 突变模式不同,不同克隆来源可能性大;其余 2 例无法确定克隆起源,即复发肿瘤出现的某种突变在原发肿瘤中不存在,这可能与肿瘤进展过程中随时发生新的线粒体 DNA 突变有关。由于肝细胞癌中线粒体 DNA 具有高频突变和石蜡切片中仍呈高拷贝状态的特点,通过比较线粒体 D 环区突变模式确定肝细胞癌的克隆起源是一种高度敏感并具有临床应用前景的克隆性分析方法。

2.2 基于 X 染色体基因的多态性分析 很多恶性肿瘤的克隆性分析基于女性体细胞 X 染色体失活的嵌合性。X 染色体的失活具有遗传稳定性,所有来源于这一细胞的子代细胞,无论是正常的还是发生了转化的肿瘤细胞,都是相同的染色体失活。因此,每个肿瘤中所有的瘤细胞只有 1 条失活

的 X 染色体 (paternal X chromosome, X^P; 或 maternal X chromosome, X^M), 而正常组织或反应性增生病变是多克隆细胞群体,其中失活的 X^P 和失活的 X^M 都存在,二者约为 1:1。根据这一特征,可区分肿瘤性增生和反应性增生以及分析多发肿瘤中不同瘤结节的克隆关系,明确克隆起源^[16-17]。目前该项克隆性检测技术常用的多态性位点包括磷酸甘油酸激酶 (phosphoglycerate kinase, PGK)、人雄激素受体和单胺氧化酶基因。国内和国外的数据表明,约 1/3 女性具有 PGK 基因的多态性,而人雄激素受体和单胺氧化酶基因杂合性比率更高,分别为 90% 和 75%^[18]。目前通过分析人雄激素受体基因的多态性已经成为许多良性病变及肿瘤克隆性研究的主要方法^[18]。Okuda 等^[19]通过检测 X 染色体上人雄激素受体基因的多态性对 4 例多结节肝细胞癌进行克隆性分析,发现 2 例患者的多个肿瘤结节 PCR 产物电泳结果显示分了量不同的单一条带,故提示 MO; 另 2 例各瘤结节则表现为分子质量相同的单一条带,表明为 IM。Lin 等^[20]应用相同的方法对 4 例多结节肝细胞癌的克隆性进行研究,结果显示 1 例为 IM, 3 例为 MO, 这与微卫星杂合性缺失 (loss of heterozygosity, LOH) 分析的结果完全一致。X 染色体基因多态性的克隆性分析技术具有方法简单、所需样本量较少、适用性和可靠性较强的优点,但该方法仅适用于女性肝癌患者,而肝癌以男性患者居多,因此该方法在肝癌克隆起源的研究上受到了一定的限制。

2.3 DNA 甲基化谱式 在肝癌发生的分子基础中,遗传和表观遗传机制均起着重要的作用。表观遗传学是一门新兴学科,主要研究非 DNA 序列变化引起的,在细胞分裂中可遗传的基因修饰作用,其中 DNA 甲基化属于表观遗传的范畴。目前研究^[21]发现,肝癌是一种高频率的抑癌基因启动子 CpG 岛高甲基化肿瘤,启动子区的高甲基化可能是除突变和缺失以外导致抑癌基因功能失活的又一关键机制,DNA 甲基化异常与肝癌的发生、发展密切相关。按照表观遗传学理论,肿瘤特异的 CpG 岛高甲基化在细胞分裂和增殖中能够稳定传递,且肝癌 DNA 异常甲基化发生频率较高,故可将 DNA 的甲基化谱式作为肝癌克隆性分析的分子标志。Anzola 等^[22]应用甲基化特异性 PCR 技术 (methylation-specific PCR, MSP) 检测了 30 例肝细胞癌中 67 个瘤结节的 p16^{INK4a}、p14^{ARF} 和 GSTP1 基因的甲基化状态,结果发现 3 个基因的异常甲基化率分别为 56.7%、43.3% 和 17.9%,进一步比较各结节甲基化谱式的异同,最后认为 23 例为 MO, 7 例为 IM。Nomoto 等^[23]使用相同的技术联合检测 11 个抑癌基因 (p16, DAP-Kinase, MGMT, GSTP1, APC, RIZ1, SFRP1, SFRP2, SFRP5, RUNX3 和 SOCS1) 甲基化状态来确定多结节肝癌的克隆起源,并通过分析线粒体 DNA 突变模式对结果进行验证。结果显示 19 例患者中每例至少存在 1 种基因的异常甲基化,每例患者的肿瘤组织均可通过 11 个抑癌基因的甲基化检测谱来确定多结节以及复发性肝癌的克隆起源。他们认为该方法的敏感性超过了其他所有分子生物学方法,如果进一步增加待检测基因的数量,将更加准确并且敏感地反映肝癌的克隆起源。

2.4 染色体 LOH 模式 肝癌常有高频染色体或微卫星杂

合性缺失,如染色体 1p、4q、5q、8p、8q、9p、10q、11p、13q、14q、16q、17p 和 22q 上的 LOH 十分常见。迄今尚未发现肝癌具有染色体特异性位点的丢失,据此采用限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism,RFLP)的分析方法,通过对多结节和复发性肝癌 LOH 模式的比较分析,可了解肝癌克隆起源的方式。选用多种探针针对 19 例肝癌的 43 个癌结节的 LOH 模式进行分析,结果发现经组织学诊断的 11 例多中心肝癌中有 8 例至少在 1 个或多个位点上检测到染色体 16 的 LOH,且各结节间 LOH 模式不相同,提示为 MO;5 例组织学诊断为相同克隆起源者,各结节 LOH 模式相同;另 5 例不能确定克隆起源的多结节肝癌中,4 例出现 LOH,其中 2 例各结节出现不同的 LOH 模式,提示为 MO^[24]。RFLP 技术存在步骤繁琐、工作量大、成本较高以及多态信息含量低等不足,因而临床应用受到很大限制。微卫星 DNA 作为衡量细胞基因组整体稳定性的良好标志,具有更多的优点,如 PCR 分析更加简便、位标更致密、便于更确切地定位和突变频率低等。因此,选择多个高频率 LOH 染色体和更多微卫星标志将有助于提高诊断肝癌克隆起源的准确性^[24]。Ng 等^[25]比较了微卫星 LOH、p53 突变类型和 HBV-DNA 整合模式 3 种方法在鉴别多结节肝癌的克隆起源上的差别,认为微卫星 LOH 是 3 种方法中应用范围最广泛,对于 DNA 含量少的标本,如针吸活检或者肝组织活检均适用。此外,微卫星 LOH 分析还适用于甲醛固定石蜡包埋的肝癌组织。但对于相同克隆起源的癌结节,其 LOH 模式也可能存在一定的异质性,在利用 LOH 模式进行克隆源性分析时要考虑到这部分变异的情况^[26]。

3 肝癌克隆分析的临床意义

肝癌术后复发一直是制约肝癌治疗效果的主要原因,鉴别多结节和复发性肝癌的克隆起源不仅对肝癌复发机制有重大理论价值且更有实践意义。许多研究者对肝癌 MO 和 IM 的预后进行了对比分析。Yasui 等^[27]比较研究了经外科手术治疗的 18 例肝细胞癌 MO 和 64 例 IM;前者 3 年无病生存率为 39%,3 年生存率为 70%,均明显高于 IM 组;与孤立性肝细胞癌比较,虽然手术时 MO 组患者肿瘤分期晚,但术后两组存活率无显著差别。Arii 等^[7]报道了肝癌术后肝内复发再切除后 1 年、3 年存活率,MO 组为 100%与 80%,而 IM 组为 91.7%与 38.1%,认为复发性肝癌属 MO 者手术切除预后更好。另一项研究^[28]表明,246 例肝细胞癌患者根治切除术后早期复发(≤1 年)80 例、晚期复发(>1 年)46 例,其中 9 例行再切除术的早期复发肿瘤中有 8 例诊断为 IM,而 6 例行再切除术的晚期复发均诊断为 MO,晚期复发患者中位生存期较早期复发者明显延长(15.8 个月 vs 29.6 个月, $P=0.005$)。目前临床上治疗肝癌的手段除外科手术切除外还有肝移植和很多微创疗法,如射频消融、微波凝固及无水乙醇注射等。从理论上讲,多克隆起源的术后复发性肝癌在本质上是新生肿瘤,具有与原发性肝癌相似的生物学特征,再次手术切除仍可望获得良好疗效,而单克隆起源的术后复发性肝癌在本质上是癌栓或卫星灶等残癌组织的持续生长,更应注重综合治疗。今后还应进一步探索简便、准

确的肿瘤克隆分子诊断技术,在肿瘤克隆起源理论指导下制订科学的个体化治疗方案,并在临床实践中验证肿瘤克隆起源方式与临床治疗模式的关系,不断提高肝癌治疗水平。

[参考文献]

[1] Shimada M, Hamatsu T, Yamashita Y, Rikimaru T, Taguchi K, Utsunomiya T, et al. Characteristics of multicentric hepatocellular carcinomas: comparison with intrahepatic metastasis[J]. *World J Surg*, 2001, 25: 991-995.

[2] Liver Cancer Study Group of Japan. The general rules for the clinical and pathological study of primary liver cancer[M]. 4th edn. Tokyo: Kanahara, 2000: 32-33.

[3] Utsunomiya I. Pathological study on multicentric occurrence of hepatocellular carcinoma[J]. *Kurume Med J*, 2005, 52: 133-138.

[4] Wang J, Li Q, Sun Y, Zheng H, Cui Y, Li H, et al. Clinicopathologic features between multicentric occurrence and intrahepatic metastasis of multiple hepatocellular carcinomas related to HBV[J]. *Surg Oncol*, 2009, 18: 25-30.

[5] Oikawa T, Ojima H, Yamasaki S, Takayama T, Hirohashi S, Sakamoto M. Multistep and multicentric development of hepatocellular carcinoma: histological analysis of 980 resected nodules[J]. *J Hepatol*, 2005, 42: 225-229.

[6] Portolani N, Coniglio A, Ghidoni S, Giovanelli M, Benetti A, Tiberio G A, et al. Early and late recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: prognostic and therapeutic implications[J]. *Ann Surg*, 2006, 243: 229-235.

[7] Arii S, Yamaoka Y, Futagawa S, Inoue K, Kobayashi K, Kojima M, et al. Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas: a retrospective and nationwide survey in Japan. The Liver Cancer Study Group of Japan[J]. *Hepatology*, 2000, 32: 1224-1229.

[8] Toyoda H, Kumada T, Kiriya S, Sone Y, Tanikawa M, Hisanaga Y, et al. Simultaneous multicentric occurrence of early hepatocellular carcinoma in a patient with persistent alpha-fetoprotein elevation[J]. *Hepatol Res*, 2007, 37: 988-989.

[9] Shirabe K, Wakiyama S, Gion T, Motomura K, Koyanagi T, Sakamoto S, et al. Clinicopathological risk factors linked to recurrence pattern after curative hepatic resection for hepatocellular carcinoma—results of 152 resected cases[J]. *Hepato-gastroenterology*, 2007, 54: 2084-2087.

[10] Yoneyama H, Hara T, Kato Y, Yamori T, Matsuura E T, Koike K. Nucleotide sequence variation is frequent in the mitochondrial DNA displacement loop region of individual human tumor cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2005, 3: 14-20.

[11] Nomoto S, Yamashita K, Koshikawa K, Nakao A, Sidransky D. Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8: 481-487.

[12] Pang L J, Shao J Y, Liang X M, Xia Y F, Zeng Y X. Mitochondrial DNA somatic mutations are frequent in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7: 198-207.

[13] Wheelhouse N M, Lai P B, Wigmore S J, Ross J A, Harrison

D J. Mitochondrial D-loop mutations and deletion profiles of cancerous and noncancerous liver tissue in hepatitis B virus-infected liver[J]. Br J Cancer,2005,92:1268-1272.

[14] 黄学文,赵 琪,陈道桢,张丽珊. 肝癌组织中线粒体 DNA D-Loop 区碱基变异与 ROS 水平[J]. 遗传, 2005,27:14-17.

[15] Giunti L, Bernini G, Forni M, Tucci F, Wheeler E, Sardi I. Clonality analysis of pediatric multiple tumors: two case reports and laboratory investigation[J]. J Pediatr Hematol Oncol,2006,28:241-248.

[16] Guedj N, Dargere D, Degos F, Janneau J L, Vidaud D, Belghiti J, et al. Global proteomic analysis of microdissected cirrhotic nodules reveals significant biomarkers associated with clonal expansion[J]. Lab Invest,2006,86:951-958.

[17] McCarthy R P, Wang M, Jones T D, Strate R W, Cheng L. Molecular evidence for the same clonal origin of multifocal papillary thyroid carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12: 2414-2418.

[18] Li H, Chen Q, Zhu R, Gu D H, Zhu H G. Clonality analysis of intraductal proliferative lesions using the human androgen receptor assay[J]. Neoplasia,2007,54:490-494.

[19] Okuda T, Wakasa K, Kubo S, Hamada T, Fujita M, Enomoto T, et al. Clonal analysis of hepatocellular carcinoma and dysplastic nodule by methylation pattern of X-chromosome-linked human androgen receptor gene[J]. Cancer Lett,2001, 164:91-96.

[20] Lin Y W, Lee H S, Chen C H, Huang G T, Lee P H, Sheu J C. Clonality analysis of multiple hepatocellular carcinomas by loss of heterozygosity pattern determined by chromosomes 16q and 13q[J]. J Gastroenterol Hepatol,2005,20:536-546.

[21] Zhang C, Li Z, Cheng Y, Jia F, Li R, Wu M, et al. CpG island methylator phenotype association with elevated serum alpha-fetoprotein level in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res,2007,13:944-952.

[22] Anzola M, Cuevas N, López-Martínez M, Martínez de Pancorbo M, Burgos J J. Patterns of methylation profiles as diagnostic markers for multiple hepatocellular carcinomas[J]. Scand J Gastroenterol,2004,39:246-251.

[23] Nomoto S, Kinoshita T, Kato K, Otani S, Kasuya H, Takeda S, et al. Hypermethylation of multiple genes as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma[J]. Br J Cancer,2007, 97:1260-1265.

[24] Li Q, Wang J, Juzi J T, Sun Y, Zheng H, Cui Y, et al. Clonality analysis for multicentric origin and intrahepatic metastasis in recurrent and primary hepatocellular carcinoma[J]. J Gastrointest Surg,2008,12:1540-1547.

[25] Ng I O, Guan X Y, Poon R T, Fan S T, Lee J M. Determination of the molecular relationship between multiple tumour nodules in hepatocellular carcinoma differentiates multicentric origin from intrahepatic metastasis[J]. J Pathol, 2003, 199: 345-353.

[26] Morimoto O, Nagano H, Sakon M, Fujiwara Y, Yamada T, Nakagawa H, et al. Diagnosis of intrahepatic metastasis and multicentric carcinogenesis by microsatellite loss of heterozygosity in patients with multiple and recurrent hepatocellular carcinomas[J]. J Hepatol,2003,39:215-221.

[27] Yasui M, Harada A, Nonami T, Takeuchi Y, Taniguchi K, Nakao A, et al. Potentially multicentric hepatocellular carcinoma: clinicopathologic characteristics and postoperative prognosis[J]. World J Surg,1997,21:860-864.

[28] Poon R T, Fan S T, Ng I O, Lo C M, Liu C L, Wong J. Different risk factors and prognosis for early and late intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma [J]. Cancer,2000, 89:500-507.

[本文编辑] 贾泽军



• 书 讯 •

《医学信息检索与利用》(第 2 版)已出版

本书由曹洪欣、彭骏等主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-81060-854-1,16 开,定价 39.00 元。

本书广泛吸收了国内外信息检索与利用的最新研究成果,结合当前我国信息环境的特点以及医药卫生工作者的信息需求,以信息检索的基本知识为基础,以国内外经典和重要的生物医学信息源为主线,以信息利用为重点,按照检索基础—信息资源—资源利用的思路,系统阐述了信息检索基本原理、国内外生物医学信息数据库的使用方法和技巧、医学科技论文(含学位论文)写作以及医学情报调研和循证医学等内容。全书案例丰富,资料翔实,具有较强的实用性和针对性,既可作为高等医学院校研究生、本科生教学用书,也可供广大医药卫生工作者参阅。

通讯地址:上海市翔殷路 800 号,邮编:200433
邮购电话:021-65344595
<http://www.smmup.com>