

网络出版时间: 2015-12-30 14:38 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20151230.1438.062.html>

CD90 和 CXCR4 在肝癌中的表达及其与术后早期复发的关系

马杰¹, 盛治勇², 许戈良¹, 刘文斌¹, 潘婷婷¹, 姚启杨¹, 李建生¹,
马金良¹, 英卫东¹, 葛勇胜¹, 余继海¹, 张传海¹, 任维华¹, 徐治军¹

摘要 目的 研究白细胞分化抗原 90 (CD90) 和趋化因子受体 4 (CXCR4) 在肝细胞癌组织中的表达及其与术后早期复发的关系。方法 采用免疫组化法检测 140 例肝癌组织标本中 CD90 和 CXCR4 蛋白的表达情况, 并分析二者之间的关系及其与肝癌术后早期复发间的关系。结果 肝癌组织标本中 CD90 阳性表达率和 CXCR4 高表达率分别为 80.71% 和 61.43%; CD90 和 CXCR4 在肝癌中的表达均与肿瘤的大小、结节数、血管侵犯和 TNM 分期相关 ($P < 0.05$), 而与年龄、性别、甲胎蛋白 (AFP) 和肝硬化均无关; CD90 与

HBsAg 状态和肿瘤分化程度相关 ($P < 0.05$), 而 CXCR4 与肿瘤包膜相关。CD90 阳性表达和 CXCR4 高表达呈正相关性 ($r = 0.394$, $P < 0.001$)。单因素分析结果表明, 肝癌早期复发与肿瘤大小、结节数、血管侵犯、TNM 分期、CD90 和 CXCR4 蛋白的表达程度均相关 ($P < 0.05$), 而与患者的年龄、性别、HBsAg 状态、AFP、肝硬化、肿瘤分化程度和包膜无关。多因素分析表明, 血管侵犯、CD90 蛋白阳性表达和 CXCR4 高表达是肝癌早期复发的独立危险因素。受试者工作特征 (ROC) 曲线结果提示, CD90 和 CXCR4 能预测肝细胞癌患者的早期复发, ROC 曲线下面积 (AUC) 分别为 0.648 和 0.657。结论 CD90 阳性表达和 CXCR4 高表达与肝细胞癌术后早期复发有关, 并可以作为肝细胞癌早期复发的独立预后因素。

关键词 癌; 肝细胞; 抗原, Thy-1; 趋化因子受体 4; 复发
中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)01-0129-05

肝细胞癌(简称“肝癌”)是富含血管的恶性肿

2015-10-12 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1408085MKL71); 安徽省科技平台建设计划项目(编号: 1206c0805035)

作者单位: ¹安徽医科大学附属省立医院肝脏外科、肝胆胰外科安徽省重点实验室, 合肥 230001

²中国科学技术大学研究生院, 合肥 230026

作者简介: 马杰, 男, 硕士研究生;

许戈良, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xugeliang2007@163.com

Perioperative transfusion trigger score project used in gynecological operation

Xie Benfa, Fang Weiping, Zhu Yan

(Dept of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To evaluate the safety and effectively of transfusion plan guided by POTTS in gynecological patients with Hb level ranged from 60 to 100 g/L. **Methods** 114 gynecological patients with perioperative Hb level ranged from 60 to 100 g/L were randomly divided into POTTS group ($n = 57$) and control group ($n = 57$). Patients in POTTS group received transfusion under the guidance of POTTS. Patients in control group received transfusion according to doctor's experience. The proportion of injecting RBCs, the amount of RBCs, the incidence of serious complications and mortality, ICU occupancy rate, postoperative Hb recovery, incision healing, hospitalization time, blood transfusion related costs and costs of hospitalization were observed and compared. **Results** The transfusion rate and volume in POTTS group were significantly lower than the control group ($P < 0.01$). Neither severe complications nor any mortality were found in each group. The transfusion costs in POTTS group were significantly less than the control group ($P < 0.01$). Two groups had no postoperative ICU admission; the postoperative Hb recovery, incision healing, hospitalization time and costs of hospitalization in two groups were not statistically significant. **Conclusion** POTTS could be safety and effectively used in gynecological patients with Hb level ranged from 60 to 100 g/L, also effectively save the blood, reduce the costs of blood transfusion, not increase perioperative mortality and the incidence of various complications.

Key words perioperative period; indications for transfusion; hemoglobin; safety; effectivity

瘤,且具有侵袭血管的特点^[1]。目前,外科手术仍然是肝癌的一线治疗手段,但是术后高的复发率仍是影响患者长期生存的关键^[2]。肝癌干细胞被认为是肝癌发生、发展、转移和复发的根源之一^[3]。研究^[4]表明,白细胞分化抗原 90 (cluster of differentiation 90, CD90) 是肝癌干细胞标记分子,且其标记的肝癌细胞表现出内皮细胞的特性,并与肝癌的术后复发密切相关。趋化因子受体 4 (C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4) 是目前备受关注的趋化因子受体,在肝癌组织表达上调,与肝癌的进展有关^[5]。该研究采用免疫组化法检测 CD90 和 CXCR4 蛋白在肝癌组织中的表达,并探讨了二者表达的关系及其与肝癌早期复发的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2009 年 1 月~2013 年 2 月于安徽医科大学附属省立医院肝脏外科首次行手术切除的肝癌组织标本 140 例,术后均经病理检查证实,临床病历资料完整。术前均未行放疗、化疗和介入等相关辅助治疗。男 107 例,女 33 例,年龄 21~78 (51.7 ± 12.4) 岁。术前肝功能评分均为 Child-Pugh A 级。术后随访:采用门诊复查和定期电话回访进行,术后 1 年内每 2~3 个月复查 1 次,以后每 3~6 个月复查 1 次,每次常规行甲胎蛋白、腹部 B 超和胸片检查复发情况,必要时行 CT、MRI 或 PET-CT 检查,随访截止到 2015 年 4 月。

1.2 主要试剂 兔抗人 CD90 和 CXCR4 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司。SP 免疫组织化学染色试剂盒 PV-6000、浓缩型 DAB 显色试剂盒、乙二胺四乙酸(EDTA)抗原修复液均购自北京中杉金桥生物技术公司。

1.3 免疫组化检测 所有常规石蜡包埋的组织,制成 4 μ m 厚连续切片,分别行 HE 和免疫组化染色,按照试剂盒说明书进行染色,最后在光学显微镜下观察显色情况。

1.4 临床病理指标 肿瘤早期复发认为是术后 2 年内复查发现肝内复发或肝外转移灶,非早期复发为术后 2 年内未出现肝内复发或肝外转移灶^[6]。肿瘤直径选取肿瘤最大径;多结节认为一个结节伴肉眼可见的子灶或两个以上的结节;血管侵犯是指显微镜下血管内有肿瘤组织与血管内膜相连或充满管腔;肿瘤包膜是指在肉眼瘤体切面肿瘤组织与周围组织有清晰的分界,肿瘤压迫周围组织形成纤维包膜,而无包膜指瘤体与周围组织界限不清;肝癌分

化程度是依据埃德蒙森-斯坦纳(Edmondson-stein)分级而定;肝癌分期按 2010 版国际抗癌联盟/美国肿瘤联合会修订的原发性肝癌 TNM 分期标准。

1.5 结果判断 CD90 主要定位于内皮细胞,以出现粗细不等的棕黄色细颗粒为阳性细胞。CXCR4 主要定位于肿瘤细胞的质膜,以质膜出现棕黄色为阳性细胞。显微镜下双盲法阅片,高倍镜($\times 400$)下随机选取 10 个视野,计数每个视野 100 个细胞中的阳性细胞数。CD90 阳性细胞数占癌细胞总数的 5% 以上为阳性,阳性细胞数少于癌细胞总数的 5% 或全部不着色为阴性^[4]。CXCR4 阳性细胞数占癌细胞总数的 20% 以上为高表达,阳性细胞数少于癌细胞总数的 20% 为低表达^[7]。

1.6 统计学处理 使用 SPSS 16.0 软件进行分析。计数资料采用 χ^2 检验,相关分析采用在 χ^2 检验的基础上计算 Pearson 列联系数,多因素分析采用 Cox 回归分析模型。

2 结果

2.1 CD90 在肝癌组织中的表达 CD90 主要定位于内皮细胞,阴性细胞不着色,细胞核呈紫蓝色。见图 1。140 例肝癌组织中 CD90 阳性表达率为 80.71% (113/140)。CD90 的表达与肝癌临床病理指标的关系见表 1。CD90 阳性表达在有乙肝病史、肿瘤 > 5 cm、多结节、微血管受侵犯、肿瘤分化程度 III/IV 级、TNM 分期 III/IV 期的患者高于无乙肝病史、肿瘤 ≤ 5 cm、单结节、血管未受侵犯、肿瘤分化程度 I/II 级、TNM 分期 I/II 期患者 ($P < 0.05$)。CD90 的表达与患者的年龄、性别、AFP 水平、肝硬化

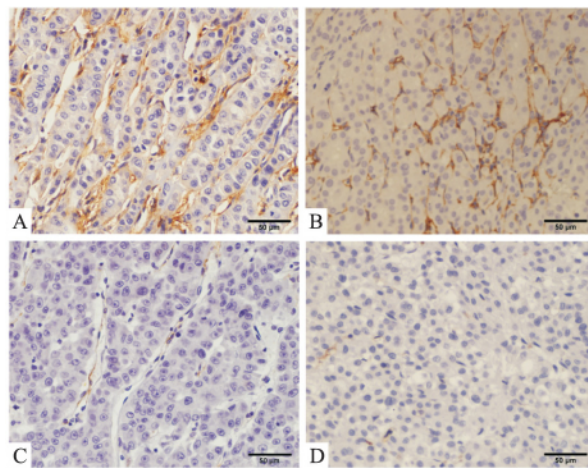


图 1 肝癌组织 CD90 和 CXCR4 的表达 SP $\times 400$

A: CD90 阳性表达; B: CXCR4 高表达; C: CD90 阴性表达; D: CXCR4 低表达

有无以及包膜是否完整无关。

2.2 CXCR4 在肝癌组织中的表达 CXCR4 主要在肝癌细胞的质膜上表达,阴性细胞不着色。见图1。140例肝癌组织中CXCR4阳性表达率为61.43% (86/140)。CXCR4的表达与肝癌临床病理指标的关系见表1。CXCR4高表达在肿瘤>5 cm、多结节、血管受侵犯、包膜不完整、TNM分期Ⅲ/Ⅳ期患者高于肿瘤≤5 cm、单结节、血管未受侵犯、包膜完整、TNM分期Ⅰ/Ⅱ期患者($P < 0.05$)。CXCR4的表达与患者的年龄、性别、AFP水平高低、肝硬化有无和肿瘤分化程度无关。

表1 肝癌临床病理指标与CD90和CXCR4的关系(n)

临床指标	n	CD90		χ^2 值	P 值	CXCR4		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性			高表达	低表达		
年龄(岁)									
≤50	61	47	14	0.933	0.334	41	20	1.527	0.217
>50	79	66	13			45	34		
性别									
女	33	24	9	2.465	0.116	18	15	0.279	0.597
男	107	99	18			58	39		
HBsAg									
阴性	31	21	10	4.304	0.038	15	16	2.858	0.091
阳性	109	92	17			71	38		
AFP(ng/ml)									
≤10	53	40	13	1.506	0.220	31	22	0.311	0.577
>10	87	73	14			55	32		
肝硬化									
无	14	9	5	2.687	0.101	78	48	0.121	0.728
有	126	104	22			8	6		
肿瘤大小(cm)									
≤5	55	39	16	5.595	0.018	27	28	5.820	0.016
>5	85	74	11			59	26		
结节数									
单个	88	64	24	9.709	0.002	63	25	10.327	0.001
多个	52	49	3			23	29		
血管侵犯									
无	44	26	18	19.274	0.000	17	27	14.068	0.000
有	96	87	9			69	27		
包膜									
完整	46	34	12	2.036	0.154	34	12	4.507	0.034
不完整	94	79	15			52	42		
肿瘤分化程度									
Ⅰ/Ⅱ	84	76	8	12.856	0.000	55	29	1.452	0.228
Ⅲ/Ⅳ	56	37	19			31	25		
TNM分期									
Ⅰ/Ⅱ	54	34	20	17.795	0.000	23	31	7.495	0.006
Ⅲ/Ⅳ	86	79	7			63	23		

2.3 CD90 和 CXCR4 在肝癌组织中表达的相关性

CD90 与 CXCR4 共同表达阳性者 80 例,共同表达阴性者 21 例。113 例 CD90 表达阳性病例中,CXCR4 高表达者 80 例(70.80%),27 例 CD90 表达阴

性病例中,CXCR4 高表达者 6 例(22.22%),经 χ^2 检验($\chi^2 = 21.702$)计算 Pearson 相关分析检验,CD90 阳性表达与 CXCR4 高表达在肝癌组织中表达呈正相关性($r = 0.394$, $P < 0.001$)。

2.4 CD90、CXCR4 与肝癌早期复发的关系 140 例肝癌患者早期复发 85 例,早期复发率为 60.71%。CD90 阳性表达者早期复发率为 70.80% (80/113),阴性表达者早期复发率 18.52% (5/27),CD90 阳性表达者的早期复发率高于阴性表达者,差异有统计学意义($\chi^2 = 24.970$, $P < 0.001$);CXCR4 高表达者早期复发率为 75.58% (65/86),低表达者早期复发率 37.04% (20/54),CXCR4 高表达者的早期复发率高于低表达者,差异有统计学意义($\chi^2 = 20.661$, $P < 0.001$)。见表 2。

表2 肝癌患者临床病理指标与早期复发的关系(n)

临床指标	n	复发		χ^2 值	P 值
		早期	非早期		
年龄(岁)					
≤50	61	36	25	0.131	0.718
>50	79	49	30		
性别					
女	33	16	17	2.707	0.100
男	107	69	38		
HBsAg					
阴性	31	21	10	0.824	0.364
阳性	109	64	45		
AFP(ng/ml)					
≤10	53	33	20	1.644	0.200
>10	87	52	35		
肝硬化					
无	14	9	5	0.083	0.773
有	126	76	50		
肿瘤大小(cm)					
≤5	55	26	29	6.862	0.009
>5	85	59	26		
结节数(个)					
单结节	88	45	43	9.112	0.003
多结节	52	40	12		
血管侵犯					
无	44	14	33	28.372	0.000
有	96	71	22		
包膜					
完整	46	25	21	1.164	0.281
不完整	94	60	34		
肿瘤分化程度					
Ⅰ/Ⅱ	84	49	35	0.499	0.480
Ⅲ/Ⅳ	56	36	20		
TNM分期					
Ⅰ/Ⅱ	54	21	33	16.304	0.000
Ⅲ/Ⅳ	86	64	22		
CD90					
阴性	27	5	22	24.970	0.000
阳性	113	80	33		
CXCR4					
低表达	54	20	34	20.661	0.000
高表达	86	65	21		

单因素分析结果表明,肝癌患者的早期复发与肿瘤的大小、结节是否数个、血管是否受侵犯、TNM分期、CD90 和 CXCR4 蛋白的表达程度均相关($P < 0.05$),但与患者的年龄、性别、HBsAg 状态、AFP 水平、肝硬化、肿瘤分化程度和包膜是否完整无关。多因素分析显示,血管侵犯[相对危险度(relative risk, RR) = 2.210, 95% 可信区间(confidence interval, CI): 1.506 ~ 3.245, $P < 0.001$]、CXCR4 蛋白表达(RR = 1.909, 95% CI : 1.268 ~ 2.873, P = 0.002) 和 CD90 蛋白表达(RR = 6.191, 95% CI : 3.124 ~ 12.269, $P < 0.001$) 是影响肝癌患者早期复发的独立危险因素。见表 3。

表 3 多因素分析影响肝癌患者预后的因素

因素	回归系数	标准误	P 值	RR	95% CI
血管侵犯	0.793	0.196	0.000	2.210	1.506 ~ 3.245
CD90	1.823	0.349	0.000	6.191	3.124 ~ 12.269
CXCR4	0.646	0.209	0.002	1.909	1.268 ~ 2.873

2.5 CD90 和 CXCR4 预测肝癌早期复发的能力

受试者工作特征(ROC)曲线结果显示,CD90 [ROC 曲线下面积(area under the curve, AUC): 0.648, 95% CI : 0.567 ~ 0.729, $P < 0.001$] 和 CXCR4 (AUC = 0.657, 95% CI : 0.578 ~ 0.736, $P < 0.001$) 能预测肝癌的早期复发。见图 2。

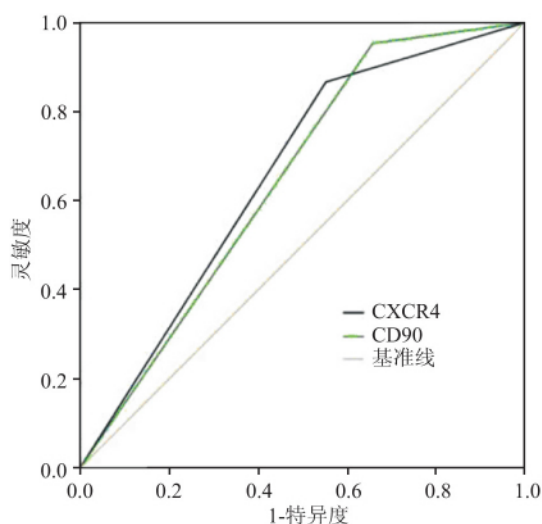


图 2 CD90 和 CXCR4 蛋白表达预测肝癌早期复发的 ROC 曲线

3 讨论

目前,肝癌早期复发的机制尚不完全清楚,其主要原因在于肿瘤的自身因素。肝癌早期复发可能是由于术前肿瘤细胞已离开原发部位或手术操作(如

肿瘤接触分离和间断性肝门阻断等)导致肉眼无法识别的转移。一般认为,众多的肿瘤细胞可以进入血液循环,但仅极少数具有干细胞特性的“种子”能逃离免疫监视等而幸存,最终迁移到合适的“土壤”环境而生存,导致肿瘤的治疗后复发。

CD90 是一种细胞黏附分子免疫球蛋白,在肝脏的发育过程中表达于卵原细胞,但在成人肝脏中极少表达。在黑色素瘤中,CD90 是微血管内皮细胞活化的标志,参与肿瘤新生血管的形成。本研究显示,CD90 标记的细胞在肝癌组织中不仅具有高的阳性表达率,而且也表现出微血管内皮细胞的形态特征,这与相关研究^[4]结果一致,且 CD90 标记的这群细胞具有肿瘤干细胞的特性已被证实。这一结果的原因可能是:一方面,CD90 标记细胞具有间充质细胞的高侵袭转移能力,表现出肿瘤干细胞的特性,与肿瘤的转移复发密切相关^[8];另一方面,CD90 标记的细胞具有形成新生血管能力,表现为血管内皮细胞的特性,与肿瘤的快速生长有关^[9]。在肝癌中,CD90 标记的细胞不仅存在于人肝癌细胞系和肝癌组织,而且也存在于循环的外周血^[4]。目前,单纯的外科手术仅去除了肝癌病灶,但不能根除已进入血液循环中的肿瘤干细胞,这为肝癌的复发创造了条件。本研究显示,CD90 在肝癌组织中的阳性表达与肝癌的早期复发有关,与文献^[10]报道相符。

趋化因子及其受体的基本功能是趋化特定的细胞到特定的组织器官,其介导的细胞运动是肿瘤细胞定向迁移的关键环节,在肿瘤发生、侵袭和转移的过程中发挥重要作用。有研究^[7]显示,CXCR4 在肝癌组织中高表达,且其配体 SDF-1 在肝癌病灶周围组织中高表达,这为肿瘤细胞的定向迁移创造了条件,与肝癌的术后转移复发有关。本研究显示,CXCR4 高表达与 CD90 阳性表达存在正相关。CXCR4 在 CD90 标记的肝癌干细胞高表达^[4],最近有研究者从肝癌细胞系 HepG2 中分离出了少量的共表达 CD90 和 CXCR4 的肝癌细胞^[11],并证明其不仅具有肿瘤干细胞的成瘤特性,而且表现出较强的转移能力。这从一个新的角度解释了肝癌的复发,但其机制仍待于深入研究。

综上所述,CD90 和 CXCR4 蛋白的表达与肝癌的早期复发有关,且可作为肝癌早期复发的独立预后因素。肝癌早期复发对患者的预后具有显著的影响,早发现肝癌术后复发是当前肝癌研究的重点。发现肝癌术后复发能尽可能早地采取针对性的防治措施和提高患者的总体疗效。因此,寻找预示肝癌

早期复发的标志具有重要的临床意义。

参考文献

- [1] Paschoal J P , Bernardo V , Canedo N H , et al. Microvascular density of regenerative nodule to small hepatocellular carcinoma by automated analysis using CD105 and CD34 immunoeexpression [J]. *BMC Cancer* , 2014 , 14: 72.
- [2] Fan S T , Mau Lo C , Poon R T , et al. Continuous improvement of survival outcomes of resection of hepatocellular carcinoma: a 20-year experience [J]. *Ann Surg* , 2011 , 253(4) : 745 – 58.
- [3] Yamashita T , Wang X W. Cancer stem cells in the development of liver cancer [J]. *J Clin Invest* , 2013 , 123(5) : 1911 – 8.
- [4] Yamashita T , Honda M , Nakamoto Y , et al. Discrete nature of EpCAM + and CD90 + cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology* , 2013 , 57(4) : 1484 – 97.
- [5] Ghanem I , Riveiro M E , Paradis V , et al. Insights on the CX-CL12-CXCR4 axis in hepatocellular carcinoma carcinogenesis [J]. *Am J Transl Res* , 2014 , 6(4) : 340 – 52.
- [6] 周 峥 ,解长估 ,曾志平 ,等. 173 例肝癌切除术后早期复发时间分析 [J]. *中华肝胆外科杂志* 2014 20(10) : 746 – 7.
- [7] Neve Polimeno M , Ierano C , D'Alterio C , et al. CXCR4 expression affects overall survival of HCC patients whereas CXCR7 expression does not [J]. *Cell Mol Immunol* , 2015 , 12(4) : 474 – 82.
- [8] Karnoub A E , Dash A B , Vo A P , et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis [J]. *Nature* , 2007 , 449(7162) : 557 – 63.
- [9] Wang R , Chadalavada K , Wilshire J , et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium [J]. *Nature* , 2010 , 468(7325) : 829 – 33.
- [10] Guo Z , Li L Q , Jiang J H , et al. Cancer stem cell markers correlate with early recurrence and survival in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol* 2014 , 20(8) : 2098 – 106.
- [11] Zhu L , Zhang W , Wang J , et al. Evidence of CD90 + CXCR4 + cells as circulating tumor stem cells in hepatocellular carcinoma [J]. *Tumour Biol* , 2015 , 36(7) : 5353 – 60.

Expressions of CD90 and CXCR4 are associated with early recurrence after resection of hepatocellular carcinoma

Ma Jie¹ , Sheng Zhiyong² , Xu Geliang¹ , et al

(¹Dept of Hepatic Surgery , The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Anhui Province Key Laboratory of Hepatopancreatobiliary Surgery , Hefei 230001;

²Graduate School of University of Science and Technology of China , Hefei 230026)

Abstract Objective To study expressions of CD90 (Thy-1) and C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4) in hepatocellular carcinoma (HCC), and its relationship with early recurrence after resection of HCC. **Methods** A total of 140 HCC tissue specimens were used for immunohistochemical staining of CD90 and CXCR4 expressions, and the correlation between the two proteins and early recurrence was also analyzed. **Results** The positive expressions rate of CD90 was 80.71% and the over-expressions rate of CXCR4 was 61.43% in HCC tissue specimens. The expressions of CD90 and CXCR4 were correlated with tumor size, the number of tumor nodes, vascular invasion, and TNM stage ($P < 0.05$). CD90 expressions was correlated with HbsAg status and the tumor differentiation degree in HCC tissue ($P < 0.05$), and CXCR4 expressions was correlated with tumor capsule ($P < 0.05$). The expressions of CD90 and CXCR4 were not correlated with age, sex, liver cirrhosis, and tumor capsule. There was significant positive correlation between CD90 and CXCR4 ($r = 0.394$, $P < 0.001$). Univariate analysis showed that the early recurrence of HCC was correlated with tumor size, the number of tumor nodes, vascular invasion, TNM stage, and the expressions of CD90 and CXCR4 ($P < 0.05$), but not significantly correlated with age, sex, HbsAg status, AFP, liver cirrhosis, tumor differentiation degree and tumor capsule. Multivariate analysis showed that the vascular invasion and expressions of the two proteins, CD90 and CXCR4, were independent risk factors for early recurrence after resection of HCC. The results of receiver operating characteristic (ROC) curve showed that expressions of CD90 and CXCR4 might be the most important factors predicting the early recurrence of HCC after resection, and the areas under curve (AUC) were 0.648 and 0.657 respectively. **Conclusion** The expressions of CD90 and CXCR4 are related to the early recurrence of HCC after resection, and both can be used as independent-prognosis factors for the early relapse with HCC.

Key words carcinoma; hepatocellular; antigen; Thy-1; chemokine receptor-4; recurrence