论著

文章编号:1000-5404(2006)07-0714-04

CD105在原发性肝细胞癌血管内皮细胞的表达及临床意义

李 颖,陈 平,朱 瑾,段世刚 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织血管内皮细胞CD105表达与根治术后早期复发的关系。**方法** HCC行根治性切除术后随访1年以上患者32例(分为1年内有复发组和无复发组),用免疫组织化学法和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法,检测肝癌组织血管内皮细胞CD105的表达情况。**结果** CD105在边缘癌组织、癌旁组织及正常肝组织的阳性例数分别为21、8、2例,其差异具有显著性意义($P<0.01$);边缘癌组织CD105的阳性表达率与术后早期复发有关($P=0.004$)。1年复发组边缘癌组织微血管密度IMVD-CD105(53.69±12.16)明显高于1年未复发组(37.80±16.62),差别有显著意义($t=3.37$, $P=0.002$);而癌旁组织IMVD-CD105的表达在两组之间无统计学意义($t=1.52$, $P=0.199$)。中心处癌组织中CD105 mRNA的表达水平为(0.45±0.02),明显高于正常肝组织(0.26±0.02)($P<0.05$);肿瘤边缘处癌组织中CD105 mRNA的表达水平为(0.65±0.08),明显高于中心处癌组织($P<0.05$)。边缘癌组织CD105 mRNA高表达与根治术后早期复发有关($t=4.34$, $P<0.01$);中心处癌组织CD105 mRNA表达与根治术后早期复发无关($t=0.93$, $P>0.05$);边缘癌组织IMVD、CD105 mRNA表达与患者年龄、癌肿的大小、临床病理分期和病理类型等均无关($P>0.05$)。**结论** CD105-IMVD与原发性肝细胞癌术后早期复发密切相关,可能是肝细胞癌的一个独立的预后指标;HCC边缘处癌组织CD105 mRNA表达水平明显高于中心处癌组织及正常肝组织,且其表达与肝癌的术后早期复发有关。

关键词: 原发性肝细胞癌;CD105;IMVD-CD105;CD105 mRNA

中图法分类号: R322.12; R730.23; R735.7 **文献标识码:** A

Expression and significance of CD105 in endothelial cells of primary hepatocellular carcinoma

LI Ying, CHEN Ping, ZHU Jin, DUAN Shi-gang (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship of CD105 expression in hepatocellular carcinoma (HCC) patients and its significance indicating the early recurrence. **Methods** A total of 32 cases of HCC patients followed up over 1 year after radical resection, were divided into two groups: recurrence group (17 cases) and non-recurrence group (15 cases). CD105 expression was detected by immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the tissues at the center of HCC focus, 1, 1.5, 7 cm to the edge of the HCC focus. **Results** Positive CD105 expression in the tumor periphery (1.5 cm), the adjacent liver tissue (1 cm) and normal liver tissue (7 cm) were 21, 8 and 2 cases respectively ($P<0.01$). The overexpression of CD105 in the tumor peripheral tissue was related to recurrence ($P=0.017$). There was a significant difference in IMVD-CD105 between recurrence group and non-recurrence group ($t=3.37$, $P=0.002$) but no significant difference was found in the expression of IMVD-CD105 in the adjacent liver tissues ($t=1.52$, $P=0.199$) of the two groups. The difference in CD105 mRNA expression between the tumor center and normal liver tissue was significant ($t=51.78$, $P=0.000$), and the expression was significantly higher at the tumor periphery than that at the tumor center ($t=14.37$, $P=0.000$). CD105 mRNA overexpression in the tumor peripheral tissue was related to recurrence ($t=4.34$, $P<0.001$), but no significant difference was found in the expression of CD105 mRNA in the tumor center tissue ($t=0.93$, $P>0.05$). IMVD CD105 and CD105 mRNA were not related to age, tumor size, pathologic stage or pathologic type ($P>0.05$). **Conclusion** CD105 overexpression may play a crucial role in early recurrence of HCC in patients after operation. The expression of CD105 mRNA in the tumor peripheral tissue was much higher than in the tumor center and normal liver tissue, which indicated CD105 was related to early recurrence.

Key words: primary hepatocellular carcinoma; CD105; IMVD CD105; CD105 mRNA

作者简介: 李 颖(1971-),男,河南省洛阳市人,硕士研究生,主治医师,主要从事肝脏肿瘤诊断治疗方面的研究。电话:13206063079,E-mail:9999liying@163.com.cn

通讯作者: 陈 平,电话:(023)68773078

收稿日期: 2005-10-31;**修回日期:** 2005-11-26

根治性切除是治疗肝细胞癌的首选方式。但术后5年内仍有60%～70%的患者出现转移或复发,其中术后1年的复发率所占比例高达51.4%～72.3%,是临床大多数患者治疗失败和死亡的主要因素[1]。目前的研究认为,血管形成在实体肿瘤的生长、浸润、转移中起着重要作用[2,3]。CD105是一种新的内皮细胞增殖相关的标记,能准确反映内皮细胞的增殖状态[4]。本研究应用免疫组织化学和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法从蛋白表达部位及基因表达情况定性、定量分析肝癌组织中的血管内皮细胞CD105表达,并结合临床资料进行分析。对研究原发性肝细胞肝癌的发展、复发和转移提供一定的理论依据。

1　材料与方法

1.1　标本来源

肝癌组织标本取自我院肝胆外科2003年5月至2004年6月收治的行根治性手术和病理组织学证实的肝细胞癌标本32例。所有病例术前均未行化疗和放疗,术前检查均未见有大血管侵犯。依据随访结果分为1年内肝内复发组17例和未复发组15例。全组男性23例,女性9例;年龄29～78岁,平均49.9岁。HBsAg阳性者26例;有肝硬变者24例;甲胎蛋白≤400者17例;肿瘤直径≤5 cm者18例;肿瘤有完整包膜者27例;Child分级A级23例,B级9例;Edmonson分级1～2级25例,≥3级7例。取材在手术标本离体30 min内进行,每例患者均取肿瘤中心处非坏死癌组织、肿瘤边缘癌组织(距肿瘤边缘1 cm的癌组织)、近癌癌旁肝组织(距肿瘤边缘1.5 cm的肝组织)和距癌灶7 cm以上的癌旁正常肝组织,每例标本分2份:1份及时经4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液固定,常规石蜡包埋,并做厚度4 μm连续石蜡切片;1份标本迅速置于液氮中冻存。

1.2　免疫组化染色及结果判定

采用免疫组化EnVison法检测CD105的表达。鼠抗人CD105单克隆抗体(ZM-0297)购于北京中山生物技术有限公司;EnVison试剂盒购于DAKO基因公司。结果判定标准:CD105以血管内皮细胞细胞膜呈棕黄色者为阳性细胞标志。高倍镜下(×400)每张切片计数200个细胞,依据阳性染色细胞所占的百分比,将结果分为:阴性(－),0～10%;阳性(＋),10%～50%;强阳性(＋＋),>50%。

IMVD-CDD105计数方法:首先在低倍视野(×100)选取组织内3个血管最多的癌间质区,即"热点"(hotspot),再在高倍(×400)视野下计数染成棕色的血管数目,每例标本分别计数3个视野,取平均值作为平均微血管数[5]。在肿瘤区凡是染成棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞簇,与邻近的微血管、肿瘤细胞或其他结缔组织分开,作为1个血管计数。但肌层较厚及管腔面积大于8个红细胞直径的血管不计数。

1.3　RT-PCR检测CD105 mRNA表达

1.3.1　总RNA的提取　　选取肿瘤中心处非坏死癌组织、边缘处癌组织及癌旁正常肝组织并按Tripure试剂盒(瑞士罗氏公司)说明提取总RNA。提取的RNA经琼脂糖凝胶电泳观察RNA纯度。再经紫外分光光度仪测定$D(260)$和$D(280)$值,再根据$D(260)$值计算RNA的浓度。

1.3.2　逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)　　根据RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司)说明操作,取1 μl总RNA,在同一反应体系中同时对CD105和β-actin进行逆转录及cDNA扩增。先进行逆转录反应,反应条件为42 ℃反转录30 min,94 ℃ 5 min灭活逆转录酶,逆转录反应体系体积为20 μl;然后进行30个周期的PCR扩增反应。选取β-actin为内参照物,β-actin上游引物5′-AAGAGAGGCATCCTCACCCT-3′下游引物5′-TACATGGCTGGGGTGTTGAA-3′;CD105上游引物5′-CGCACCGATCCAGACCACTC-3′,下游引物5′-CCCGGCTCGATGGTGTTGGA-3′。每个周期为94 ℃变性1 min,60 ℃退火1 min,72 ℃延伸80 s,整个PCR反应体系体积为50 μl。CD105和β-actin的反应条件相同。CD105产物片段长396 bp。β-actin产物片段长500 bp。PCR扩增产物在含有溴化乙锭的2%琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下照相并保存。经图像分析软件TotalLabv 2.01进行半定量分析。用CD105与β-actin的比值表示。

1.4　根治性切除标准

完整切除肿瘤,切缘距肿瘤1 cm以上,无肝外转移灶。

1.5　临床随访

所有患者均通过门诊、住院复查、通信及电话随访,并做记录。

1.6　统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件进行t检验和χ^2检验或Fisher精确检验。

2　结果

2.1　CD105在边缘癌组织、癌旁及正常肝组织血管内皮细胞的表达

免疫组化染色:32例肝边缘癌组织血管内皮细胞有21例(65.6%)CD105表达阳性(图1),其中10例强阳性;癌旁组织有8例阳性表达(图2),正常肝组织有2例阳性表达(图3)。癌旁组织和正常肝组织分别与边缘癌组织比较有显著的统计学意义($P<0.01$)。

2.2　CD105在组织血管内皮细胞表达与早期复发的关系

统计在CD105在1年内复发组和未复发组的表达。1年内复发组和未复发组边缘癌组织强阳性、阳性、阴性例数分别为:9、6、2;1、5、9。两组癌旁组织强阳性、阳性、阴性例数分别为:2、3、12;0、3、12。两组比较结果表明:1年内复发组边缘癌组织CD105表达明显高于未复发组,提示CD105表达水平与早期复发有明显关系($P=0.004$),癌旁组织CD105表达与早期复发无关($P=0.390$)。

2.3　IMVD-CD105在边缘癌组织、癌旁及正常肝组织血管内皮细胞的分布

边缘癌组织中CD105表达阳性的微血管内皮细胞均被染色呈圆形、椭圆形、芽胞状及线形等,在癌组织中微血管分布密集、广泛;癌旁和正常肝组织中,微血管主要分布在汇管区和中

央静脉区，而肝小叶则呈现少量的微血管分布。32 例原发性肝癌组织中 IMVD-CD105 分布为(49.31 ± 13.48)，癌旁组织为(33.50 ± 13.53)，正常肝组织为(25.70 ± 5.26)，癌旁组织和正常肝组织分别与边缘癌组织进行独立样本 t 检验。结果显示：边缘癌组织中 IMVD- CD105 的分布与在癌旁及正常肝组织血管内皮细胞的分布有显著性差异($P=0.01$)。

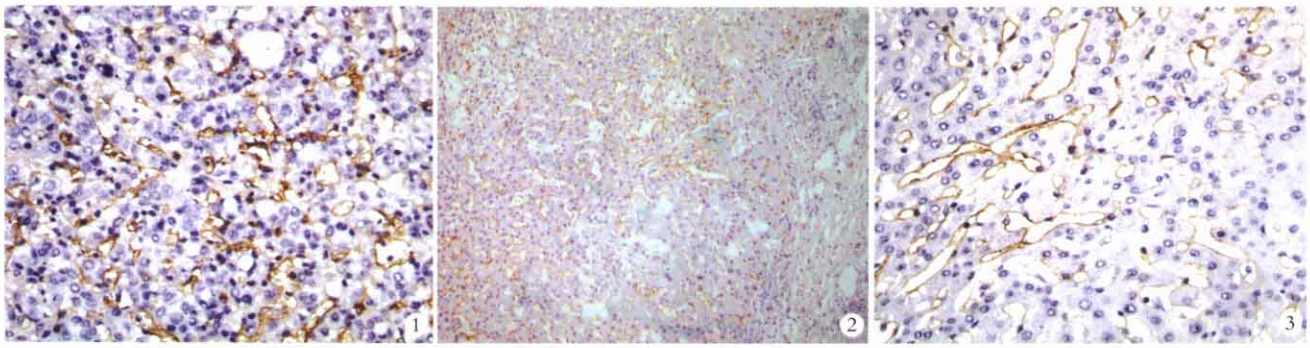
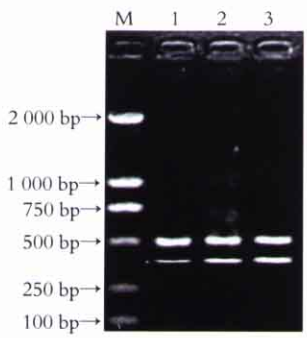


图1 HCC 边缘癌组织血管内皮细胞 CD105 强阳性表达 (EnVison 法 ×400)
图2 HCC 癌旁组织血管内皮细胞 CD105 强阳性表达 (EnVison 法 ×200)
图3 HCC 正常肝组织血管内皮细胞 CD105 阳性表达 (EnVison 法 ×400)

2.4 CD105 mRNA 在组织中的表达

HCC 中心处癌组织、边缘癌组织及正常肝组织 RT-PCR 产物的电泳结果见图 4。肿瘤中心处癌组织中 CD105 mRNA 的表达水平为(0.45 ±0.02)，边缘处癌组织为(0.65 ±0.08)，正常腺体组织为(0.26 ±0.02)。方差分析结果显示，三者间差异有统计学意义，其中肿瘤边缘处癌组织 CD105 mRNA 表达水平明显高于中心处癌组织和正常肝组织($t=14.37$, $P<0.05$；$t=27.71$, $P<0.05$)，中心处癌组织 CD105 mRNA 表达水平明显高于正常肝组织($t=51.78$, $P<0.05$)。



M：标准；1：正常肝组织；2：中心处癌组织；3：边缘处癌组织
图4 不同组织中 CD105 mRNA 的 RT-PCR 检测

2.5 CD105 mRNA 在组织血管内皮细胞的表达与术后早期复发的关系

1 年内复发组和未复发组组织中 CD105 mRNA 的表达水平。经两样本均数的 t 检验，结果显示：原发性肝细胞癌边缘癌组织 CD105 mRNA 高表达与术后早期复发有关($t=4.34$, $P<0.01$)；中心处癌组织、正常肝组织 CD105 mRNA 表达与术后早期复发无关($t=0.93$, $P>0.05$；$t=0.30$, $P>0.05$)。

2.6 边缘癌组织中 IMVD- CD105、CD105 mRNA 与临床病理参数之间的关系

分析结果显示：边缘癌组织中 CD105-IMVD、CD105 mRNA 分布与性别、年龄、HBsAg、肝硬化、肝功能 Child 分期、AFP 值、肿瘤的大小、有无子瘤、有无包膜无明显关系，与肿瘤细胞分化程度亦无明显关系($P>0.05$)，见表 1。

表1 边缘癌组织中 IMVD- CD105、CD105 mRNA 与临床病理参数之间的关系

临床病理参数		n	IMVD- CD105	n	CD105 mRNA
性别	男性	16	50.66 ± 12.54	23	0.65 ± 0.08
	女性	5	45.00 ± 16.02	9	0.65 ± 0.09
年龄(岁)	≤60	18	49.25 ± 13.44	24	0.66 ± 0.07
	>60	3	49.70 ± 15.03	8	0.62 ± 0.08
HBsAg	阳性	19	48.57 ± 13.51	26	0.65 ± 0.08
	阴性	2	56.40 ± 12.70	6	0.62 ± 0.07
肝硬化	有	14	49.75 ± 13.45	24	0.65 ± 0.08
	无	7	48.44 ± 14.02	8	0.63 ± 0.08
甲胎蛋白	≤400	10	49.43 ± 13.57	17	0.66 ± 0.07
	>400	11	49.21 ± 13.72	15	0.63 ± 0.09
肿瘤大小	≤5 cm	12	47.86 ± 15.11	18	0.63 ± 0.08
	>5 cm	9	51.26 ± 11.20	14	0.65 ± 0.07
肿瘤包膜	有	13	49.54 ± 13.20	21	0.65 ± 0.07
	无	8	45.94 ± 11.75	11	0.65 ± 0.09
病灶	单个	15	51.58 ± 13.57	22	0.65 ± 0.08
	有子瘤	6	45.64 ± 12.92	10	0.63 ± 0.06
Child 分级	A	15	50.74 ± 14.45	24	0.65 ± 0.08
	B	6	45.75 ± 10.49	8	0.65 ± 0.08
Edmonson	Ⅰ	7	48.36 ± 14.69	8	0.65 ± 0.08
分级	Ⅱ	10	49.01 ± 15.27	20	0.64 ± 0.08
	≥Ⅲ	4	44.25 ± 7.40	4	0.61 ± 0.06

由于 Edmonson 分级Ⅳ级 CD105 阳性仅 1 例，故与Ⅲ级合并，共 4 例

3　讨论

CD105 是一种内皮细胞增殖相关的标记，是转化生长因子——TGF-β 受体复合物的成分之一[6]。能独立存在于细胞表面[7]。CD105 是一种较Ⅷ-RA、CD31、CD34 等泛血管标记物更好的肿瘤血管内皮标志物[8]。血管生成是实性肿瘤普遍存在的特征，与肿瘤的侵袭、转移密切相关。关于 CD105 在肝细胞癌组织中的表达的分析研究尚少，且结果不一致。姚卫东等[9]通过检测 143 例肝细胞癌组织 CD105 的表达情况，发现 CD105 的表达与肝癌的组织分化程度无关（$P>0.05$）；CD105 高表达可能提示预后较差。Ho 等[10]研究发现，IMVD-CD105 与肝癌根治术后早期复发转移无关，但 CD105 在癌旁组织高表达与术后早期复发转移有关。

本研究表明：本组肝细胞肝癌边缘癌组织中血管内皮细胞 CD105 阳性表达率及 IMVD-CD105 均高于癌旁组织、正常肝组织的表达，三者之间有显著性差异（$P<0.01$）。边缘癌组织中 CD105-IMVD 分布与性别、年龄、HBsAg、肝硬化、肝功能 Child 分期、AFP 值、肿瘤的大小、有无子瘤、有无包膜无明显关系，与肿瘤细胞分化程度亦无明显关系（$P>0.05$）。1 年内复发组边缘癌组织 IMVD-CD105 明显高于未复发组，2 组有显著性差异，说明肝癌边缘癌组织 IMVD- CD105 高分布与术后早期复发密切相关，是肝细胞癌的一个独立的预后指标。而癌旁组织 IMVD-CD105 与复发无关。

肿瘤复杂的发生和进展过程都要依靠新血管的不断生成。Miller 等[11]将肺癌组织与正常肺组织的内皮细胞采用 CD34 标记的方法进行分离，利用 PT-PCR、免疫杂交技术检测 CD105 mRNA 及蛋白的含量，发现癌组织中 CD105 mRNA 与蛋白含量均增高，而正常肺组织中未检测到 CD105 mRNA 及蛋白；并通过免疫组化双标技术，进一步证实 CD105 主要表达于肿瘤组织边缘的内皮细胞，与细胞增殖指标 CyclinA、Ki67 的表达明显相关，提示 CD105 表达可能与细胞周期调节有关。本研究结果表明，肝细胞癌边缘癌组织中 CD105 mRNA 的表达水平明显高于正常肝组织中的表达水平，提示过度表达的 CD105 可以作为肝细胞癌诱导新血管形成的标志。同时，肿瘤边缘癌组织的 CD105 mRNA 的表达水平明显高于肿瘤中心处癌组织，表明通常在肿瘤组织边缘新生的血管水平最高。CD105 mRNA 的高表达与术后早期复发有关（$P<0.05$），而与肿瘤大小、临床病理分期和病理类型无关（$P>0.05$）。进一步说明肝细胞癌边缘癌组织中 CD105 的高表达有可能成为术后早期复发转移的标志物。本研究结果提醒我们，在研究肝癌组织 CD105 基因表达与肿瘤发展预后的关系中，要注意肝癌组织取材的规范，因在肝癌组织不同部位－中心部位、边缘部位 CD105 mRNA 表达水平是不同的，不规范取材必定会影响结果的准确性。

以 CD105 为作用靶点、抗 CDl05 抗体作为载体、化疗药物、生物毒素、放射性核素等与之结合的复合物能够特异性导向肿瘤部位，直接杀伤肿瘤细胞，可能将成为治疗原发性肝细胞癌具有显著的抑瘤效果而无明显毒副作用的好方法。

参考文献：

[1] FIDLER I J. Cancer biology: invasions and metastasis[M]// ABELOFF M D, ARMITAGE J O, LICHTER A S, *et al.* Clinical Oncology. 2nd ed. Orlando: Harcourt Publishers Limited, 2001: 29－53.

[2] FOLKMAN J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? [J]. J Natl Cancer Inst, 1990, 82(1): 4－6.

[3] 齐庆安，别　平. 原发性肝细胞肝癌血小板源性生长因子的表达和肿瘤血管形成关系的相关研究[J]. 消化外科, 2005, 4(2): 119－123.

[4] LI C, GUO B, WILSON P B, *et al.* Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer[J]. Int J Cancer, 2000, 89(2): 122－126.

[5] SELLKE F W, LI J, STAMLER A, *et al.* Angiogenesis induced by acidic fibroblast growth factor as an alternative method of revascularization for chronic myocardial ischemia[J]. Surgery, 1996, 120(2): 182－188.

[6] VERMEULEN P B, GASPARINI G, FOX S B, *et al.* Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation[J]. Eur J Cancer, 1996, 32A(14): 2474－2484.

[7] FONSATTI E, SIGALOTTI L, ARSLAN P, *et al.* Emerging role of endoglin(CD105) as a marker of angiogenesis with clinical potential in human malignancies[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2003, 3(6): 427－432.

[8] WANG J M, KUAMAR S, PYE D, *et al.* A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues [J]. Int J Cancer, 1993, 54(3): 363－370.

[9] 姚卫东，姜惠峰，曲桂梅，等. 肝细胞癌组织中 endoglin(CD_{105})和 VEGF 及 $p57^{kip2}$ 表达与预后的关系[J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(5): 360－364.

[10] HO J W, POON R T, SUN C K, *et al.* Clinicopathological and prognostic implications of endoglin(CD105) expression in hepatocellular carcinoma and its adjacent non-tumorous liver[J]. World J Gastorenterol, 2005, 11(2): 176－181.

[11] MILLER DW, GRAULICH W, KARGES B, *et al.* Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells[J]. Int J Cancer, 1999, 81(4): 568－572.

（编辑　张大春）