·论 著·

肝癌患者术中循环血肿瘤细胞的变化

李 玲[1,2,3],杜 磊[2],朱昭琼[1] (1. 遵义医学院附属医院麻醉科,贵州 遵义 563003;2. 四川大学华西医院麻醉科,四川 成都 610038;3. 第三军医大学西南医院麻醉科,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 研究肝癌切除手术是否会对肝癌患者循环血肿瘤细胞造成影响从而可能增加肝癌患者术后的转移率。**方法** 抽取 18 例肝癌患者术中切肝前与切肝后循环血及 20 名健康志愿者的循环血。所有血液样本均进行血常规检测计数白细胞和显微镜下全血有核细胞总数计数,并进行比较。采用免疫荧光法和细胞培养法检测比较各组血液样本中的肿瘤细胞数量与特性。免疫荧光法使用 AE1/AE3、CD133 标记肿瘤细胞。**结果** 肝癌患者术中切肝后白细胞数和全血有核细胞总数均较切肝前增高。存在 AE1/AE3 阳性细胞的样本总例数较存在 CD133 阳性细胞和双阳性细胞的样本总例数多($P<0.001$)。健康志愿者循环血中的 AE1/AE3 阳性细胞数量多于肝癌切肝后循环血($P<0.05$),CD133 阳性及双阳性的细胞数量在各组间比较无统计学差异($P>0.05$)。细胞培养克隆生成率在各组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),肝癌患者中形成克隆株的 3 例样本在肿瘤发生来源、肿瘤病理类型及分化程度上无明显区别。**结论** 肝癌患者术中切肝前后循环血、健康人群循环血中均存在肿瘤细胞;肝癌切除手术操作不会影响肝癌患者血液中的循环血肿瘤细胞数量与特性。

[关键词] 肝癌;肝癌切除手术;循环血肿瘤细胞;转移;复发

[中图分类号] R735.7 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)06-0578-05

Changes of circulating tumor cells of liver cancer patients during surgery

LI Ling, DU Lei, ZHU Zhao-qiong (Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi Guizhou 563003)

Abstract: Objective To study the effect of hepatectomy operation on circulating tumor cells of liver cancer patients during surgery. **Methods** Circulating blood was draw from 18 liver cancer patients before and after hepatectomy and 20 healthy volunteers. Blood routine examination for leukocyte enumeration and karyote counting by microscope were taken for every blood samples to compare with the number of leukocytes and karyotes between pre-hepatectomy and post-hepatectomy blood of liver cancer patients. Immunofluorescence and cell culture techniques were used to identify the tumor cells and compare with the numbers and characteristics of the circulating tumor cells in blood samples among all groups. Fluorescent antibodies, AE1/AE3 and CD133 were used to mark tumor cells. **Results** The number of leukocytes and karyotes in post-hepatectomy blood samples of liver cancer patients increased compared with pre-hepatectomy blood samples. The AE1/AE3 positive cells-samples were more than CD133 positive cells-samples and double positive cells-samples ($P<0.001$). AE1/AE3 positive cells of healthy volunteers' blood were more than post-hepatectomy blood of liver cancer patients ($P<0.05$). No significant differences in CD133 positive cells and double positive cells were found among all groups ($P>0.05$). There were no significant differences in clone formation rate after cell culture among all groups ($P>0.05$). For 3 clone formed samples of liver cancer patients, there were no differences in tumor source, pathologic type and differentiation level. **Conclusion** The circulating blood of liver cancer patients, non-cancer patients and healthy people all exist circulating tumor cells. Hepatoma resection does not affect the number and characteristics of circulating tumor cells in liver cancer patients' blood.

Keywords: liver cancer; hepatectomy; circulating tumor cells

肝癌是中国乃至全世界发病率最高的肿瘤之一[1],目前手术切除仍然是治疗肝癌最有效的方法。作为人体内最大的器官,肝脏本身以及周围邻近组织丰富的血运,使得肝癌具有较高术后复发率和转移率,预后较差[2]。因此肿瘤术后复发及转移仍是外科医生面临的重大难题。本研究通过对肝癌患者术中循环血肿瘤细胞的研究,确定肝癌切除手术是否会增加肝癌患者术后肿瘤转移率及复发率,为临床治疗方式的选择提供参考。

1 资料与方法

1.1 病例收集

本研究为开放式研究,选取行手术治疗的肝癌患者为研究对象,以健康志愿者作为对照。记录所有研究对象的性别、年

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201406002

[基金项目] 卫生部卫生行业科研专项项目资助(201002005)

[通讯作者] 朱昭琼,E-mail:ganzhuzhaoqiong@sina.com

[收稿日期] 2014-08-12 [修回日期] 2014-09-24

龄、体质量。本研究共纳入 38 名研究对象。肝癌患者 18 名，男 17 名(94.4%)，女 1 名(5.6%)，平均年龄(51.19 ± 12.41)岁，体质量(60.81 ± 9.99) kg；健康志愿者 20 名，男 8 名(40%)，女 12 名(60%)，平均年龄为(30.90 ± 7.13)岁，体质量(57.43 ± 9.56) kg。

1.2 样本采集及实验分组

用无菌抗凝注射器抽取每位研究对象的循环血。肝癌患者在手术切皮开始后分别抽取切肝前和切肝后循环血各 20 mL；因本研究纳入的所有手术患者手术开始的时间均为上午 9:00 ~ 10:00，故健康志愿者采血时间定为 9:00 ~ 10:00，每人抽血 20 mL。

1.3 实验方法

1.3.1 血液样本检测 所有样本采集离体后即刻 4 ℃保存，于 24 h 内进行实验。常规检测：每例样本取 2 mL 进行血常规检测，主要对白细胞进行计数；取 20 μl 用牛鲍氏计数板进行显微镜下全血有核细胞计数。免疫荧光法检测：每例样本取 2 mL血样，使用红细胞裂解法富集有核细胞，富集的有核细胞即刻进行细胞涂片，每例样本涂片 2 张，经 4% 多聚甲醛固定后晾干备用。使用荧光抗体 CD133 标记细胞膜、荧光抗体 AE1/AE3 标记细胞浆，荧光染料 DAPI 标记细胞核进行荧光染色。染色完成后在多通道、放大倍数可调式荧光显微镜下进行观察和计数。随机选取 20 个视野计数其内的所有有核细胞数及抗体阳性表达的细胞数。

1.3.2 细胞培养 每例样本取 16 mL 血样在无菌环境下进行密度梯度离心分离富集有核细胞，制成细胞悬液用于细胞原代培养。培养 10 ~ 15 d，培养过程中观察细胞生长情况及细胞克隆成株情况，并记录克隆株的数量及形态。培养结束后将标本用 4% 多聚甲醛固定，再进行免疫荧光法检测。

1.4 统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用 SPSS 17.0 进行统计学处理。计算免疫荧光法结果的 95% 参考值范围(Reference range)。定量资料 2 组间均数比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)；定性数据比较采用 χ^2 检验，$P < 0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血常规检测与有核细胞计数

比较切肝前后样本经血常规检测到的白细胞数量和经显微镜计数到的全血有核细胞数，肝癌患者切肝后的白细胞数上升，切肝后血中的有核细胞总数也较切肝前增加(表 1)。

表 1 切肝前后白细胞数及有核细胞计数($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9$/mL)

组别	血常规检测	镜下计数
切肝前	3.95 ± 1.32	4.38 ± 2.14
切肝后	6.34 ± 3.18 *	5.84 ± 2.79 *

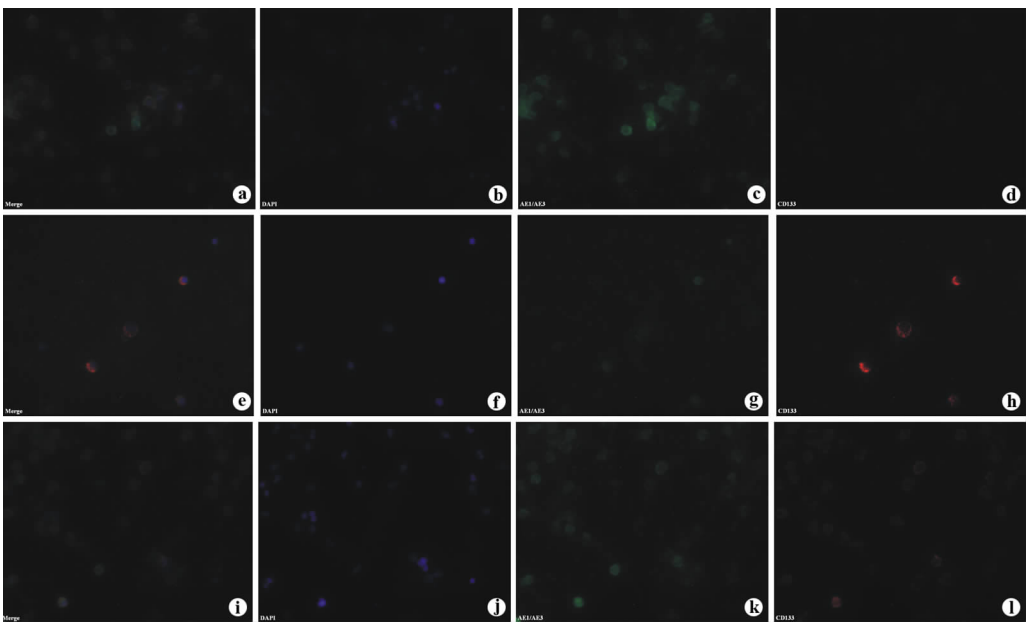
*：与切肝前比较，$P < 0.01$

2.2 免疫荧光检测结果

2.2.1 免疫荧光染色结果 免疫荧光检测发现的阳性细胞有 3 种表现，分别为 AE1/AE3 阳性和 CD133 阴性、AE1/AE3 阴性和 CD133 阳性、AE1/AE3 阳性和 CD133 阳性，3 种阳性细胞在各组样本中均有发现(图 1)。

2.2.2 各类阳性细胞样本例数比较 统计出各组样本中存在不同阳性细胞的样本例数如表 2 所示，各类阳性样本例数在各组间比较，无统计学差异($P > 0.05$)。3 组 AE1/AE3 阳性细胞的总样本数为 55 例(98.2%)，与 CD133 阳性细胞样本总数 10 例(17.9%)和双阳性细胞的样本总数 28 例(50.0%)比较，差异有统计学意义($\chi^2 = 74.137$，$P < 0.001$)。

2.2.3 各组阳性细胞数比较 由全血有核细胞计数结果和显微镜下的阳性细胞计数结果换算得出每例样本中各类阳性细胞的总数量(公式：阳性细胞数 = 全血有核细胞计数 × 镜下



a、b、c、d：AE1/AE3$^+$ & CD133$^-$；e、f、g、h：AE1/AE3$^-$ & CD133$^+$；i、j、k、l：AE1/AE3$^+$ & CD133$^+$

图 1 免疫荧光染色阳性细胞(10 × 40)

观察到的细胞涂片上阳性细胞所占比率),结果显示 AE1/AE3 阳性细胞的个数两两比较,对照组与切肝前、后组阳性细胞数量存在统计学差异($P<0.05$),CD133 阳性细胞和双阳性细胞数量在各组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)(表 3)。

表 2 各组样本存在各类阳性细胞的样本[例(%)]

	n	AE1/AE3$^+$	CD133$^+$	双阳性
切肝前	18	18(100.0)	4(22.2)	10(55.6)
切肝后	18	17(94.4)	5(27.8)	8(44.4)
对照组	20	20(100.0)	1(5.0)	10(50.0)

表 3 各组样本荧光染色总体抗体表达阳性细胞数($\bar{x}\pm s$, $\times 10^9$/mL)

分组	AE1/AE3$^+$	CD133$^+$	双阳性
切肝前	0.014 ±0.011	0.007 ±0.019	0.002 ±0.004
切肝后	0.007 ±0.007	0.007 ±0.020	0.004 ±0.011
对照组	0.024 ±0.022 *	0.003 ±0.011	0.009 ±0.029

*:与切肝前、切肝后比较,$P<0.05$

2.3 各组细胞培养克隆生成率比较

细胞培养过程中,各组样本均发现有克隆株生成(图 2)。比较各组的克隆生成率并无统计学差异($\chi^2=0.634$, $P>0.05$)。培养后免疫荧光染色结果提示,各组均发现抗体阳性表达的单细胞,各组发现的阳性细胞染色亮度、形态无明显差别(图 3)。

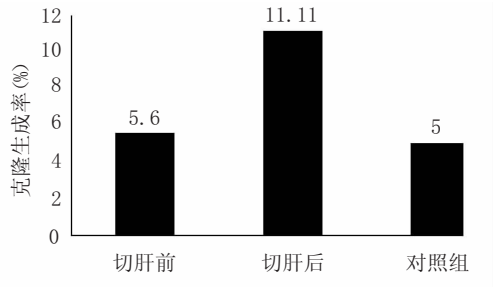
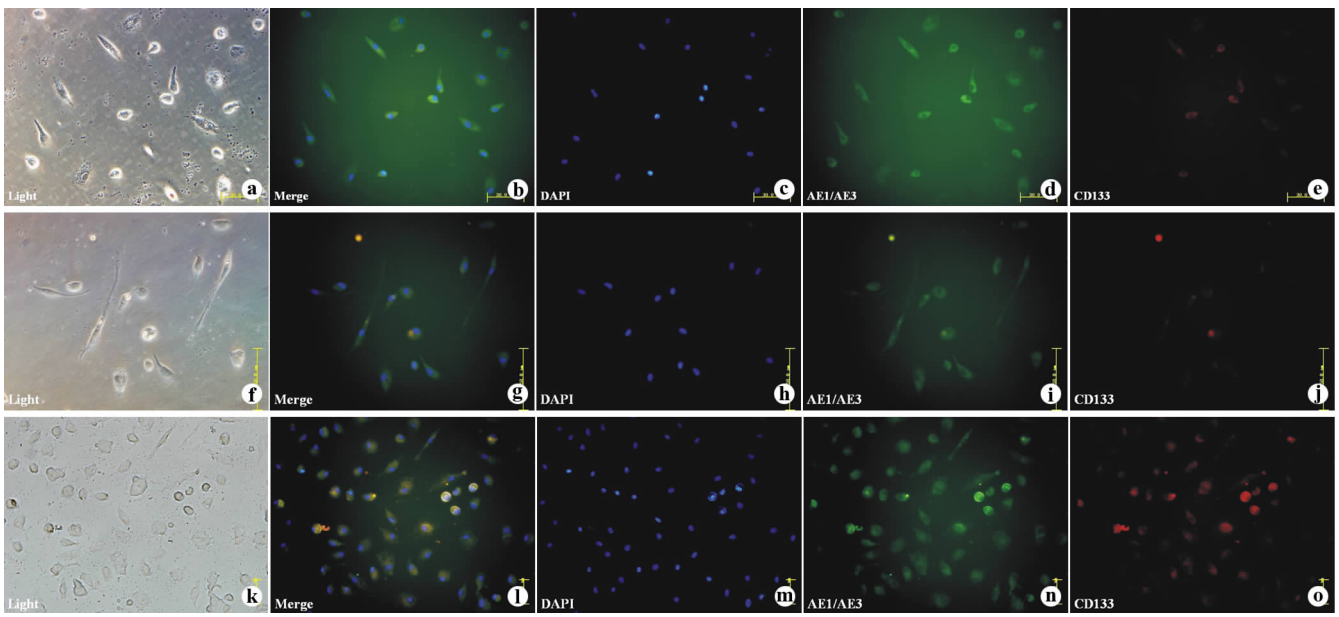


图 2 各组样本细胞培养克隆生成率



a、b、c、d、e:切肝前;f、g、h、i、j:切肝后;k、l、m、n、o:对照组

图 3 培养后免疫荧光染色阳性细胞

3 讨论

肝脏是人体内最大的实体器官,门静脉、肝动脉血液流经肝脏经肝血窦 - 肝静脉汇入下腔静脉,进入体循环。肝脏组织丰富的血运也往往造成肝癌组织体积较大、切除困难,手术操作对肿瘤组织机械刺激较多。不排除有肿瘤细胞因受手术操作的机械挤压而随肝脏血流进入体循环,造成肝癌的术后血行性转移复发的可能。本研究结果提示,肝癌患者切肝后白细胞数和总的有核细胞数均明显高于切肝前,手术操作对肝癌患者的白细胞数和有核细胞总数造成一定影响,可能是由于机体对手术所产生应激反应的结果。

既往大量研究已经证实,在恶性肿瘤患者循环血中存在具有增殖特性的肿瘤细胞[3-7]。Riethdorf 等[7]通过一种用于富集和计数的实验系统即 CellSearch system 检测了 92 名患有转移性乳腺癌的患者的外周血,在这些样本中,发现循环血肿瘤细胞最高达 1 920 个/7.5 mL。同时,Cristofanilli 等[5]的研究还证实,循环肿瘤细胞数量与肿瘤患者预后有关,当每 7.5 mL 循环血液中含有的肿瘤细胞大于 5 时,患者的总体生存率要显著小于每 7.5 mL 循环血液含有小于 5 个肿瘤细胞的患者。肿瘤细胞具有自我复制、更新以及分化的能力[8-9],与干细胞特性类似,也有人称肿瘤细胞的这种特性为无法控制的自我复制和更新能力[10]。干

细胞标记物 CD133 已经被证实与多种肿瘤的形成相关,如大脑肿瘤、膀胱癌、结肠癌、胶质母细胞瘤等[7,11-12]。我国学者 Yin 等[13]证实 CD133 阳性的肝细胞性癌癌细胞具有更高的成瘤活性。肝癌属于上皮来源的肿瘤,表达上皮细胞相关抗体,即角蛋白抗体[14]。Pantel 等[15]的综述中提到角蛋白抗体 CK 阳性的肿瘤细胞更易表达多种特异性癌基因,并且比 CK 阴性的肿瘤细胞更易发生远处转移。AE1/AE3 的生物效能相当于 CK1-CK7、CK10、CK14-CK16、CK19,并且在大鼠、小鼠、人、灵长类动物等多种生物体内的上皮细胞中表达[16-17]。因此,本研究选取 CD133 和 AE1/AE3 标记肿瘤细胞。AE1/AE3 和 CD133 均为阳性的双阳性细胞表示该细胞为来源于上皮细胞的干细胞,具有明显的肿瘤干细胞特性,因此,我们把这类细胞归为高危细胞。只单独表达 AE1/AE3 或 CD133 的细胞为无分化增殖能力的肝癌细胞、正常上皮类细胞或者正常组织的干细胞,因此,这两类细胞成为相对安全细胞。

本研究免疫荧光法检测结果提示,在肝癌患者循环血中发现有 AE1/AE3 和 CD133 均表达的双阳性细胞,说明在肝癌患者血液中存在有循环肿瘤细胞(CTCs,circulating tumor cells);同时细胞培养结果提示肝癌患者无论是切肝前循环血还是切肝后循环血,均培养有克隆株形成。说明肝癌患者血液中存在的 CTCs 具有自我复制增殖的能力,这可能是肝癌患者术后仍有高复发率的原因。比较各类阳性细胞在 2 组样本中的数目发现,肝癌患者切肝前后并无差别,并且 CD133 阳性及双阳性的细胞数目在所有实验组间比较均无统计学差别;细胞培养结果也提示,肝癌患者术中切肝后血液培养并不比切肝后血液培养更易形成克隆株,并且形成克隆株的样本病例的肿瘤来源、肿瘤病理类型及分化程度在两组间也无明显区别。这说明手术操作并不影响肝癌患者循环血 AE1/AE3 阳性、CD133 阳性及双阳性细胞的数量。也就证明肝癌切除手术并不会对肝癌患者血液中的 CTCs 造成影响,手术操作本身不会增加肝癌术后转移复发的概率。免疫荧光法检测结果也发现,存在 AE1/AE3 阳性细胞的样本总例数多于存在 CD133 阳性细胞和双阳性细胞的样本总例数,说明健康人血液中即存在有大量的上皮类细胞。健康志愿者循环血中的 AE1/AE3 阳性细胞数量多于肝癌患者术中切肝后的循环血 AE1/AE3 阳性细胞数量。因此,本研究推测,肿瘤可能会影响血液中正常上皮细胞的数量,导致其数量减少。

对于健康人群循环血中的肿瘤细胞,本研究的结果与既往研究并不一致。Allard 等[3]的研究证实循环血肿瘤细胞仅存在于恶性肿瘤患者的循环血液中,而不存在于非肿瘤患者及健康人循环血液中。而本研究的免疫荧光法检测结果则发现,健康人群循环血液中存在一定数量的 AE1/AE3 和 CD133 双阳性的细胞,细胞数量范围分别为 $0 \sim 6.5 \times 10^7$/mL、$0 \sim 1.3 \times 10^7$/mL。细胞培养结果发现在这两组样本中均有克隆株生成,然而免疫荧光染色并未发现抗体表达强阳性的同源多核细胞克隆株,故推测这可能为成纤维类细胞分裂增殖所形成。因此,对于健康人群血液中的 CTCs,还有待进一步的研究证实。

[参考文献]

[1] Chen ZM, Liu BQ, Boreham J, et al. Smoking and liver in China: Case-control comparison of 3,6000 liver cancer deaths vs 1,7000 cirrhosis deaths[J]. International Journal of Cancer, 2003, 107(1): 106 – 112.

[2] 曾永毅,张 翔,刘景丰,等. 肝癌发生肺转移的危险因素分析[J]. 中华消化外科杂志, 2013, 12(9): 668 – 671.

[3] Allard WJ, Matera J, Miller MC, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases[J]. Clinic Cancer Research. 2004, 10(20): 6897 – 6904.

[4] Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology[J]. Nature, 2007, 450(20): 1235 – 1239.

[5] Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer[J]. The New England Journal of Medicine, 2004, 351(8): 781 – 791.

[6] Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer[J]. Clinic Oncology, 2008, 26(19): 3213 – 3221

[7] Riethdorf S, Fritsche H, Miller V, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system[J]. Clinic Cancer Research. 2007, 13(3): 920 – 928.

[8] Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumors: accumulating evidence and unresolved questions[J]. Nature Reviews Cancer, 2008, 10(8): 755 – 768.

[9] Sullivan JP, Minna JD, Shay JW. Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor intiation progression and targeted therapy[J]. Cancer Metastasis Review, 2010, 29(1): 61 – 72.

[10] Stephanie MA, Chan KW, Hu L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells[J]. Gastroenterology, 2007, 132(7): 2542 – 2556.

[11] Tabatabai G. Glioblastama Stem Cells[J]. Cell and Tissue research. 2011, 343(3): 459 – 465.

[12] Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells[J]. Cancer Research, 2005, 65(23): 10946 – 10951.

[13] Yin SY, Li J, Hu C, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity[J]. International Journal

of Cancer, 2007, 120(7): 1444 – 1450.
[14] Karantza V. Katatins in Health and Cancer: More than Mere Epithelial Cell Markers[J]. Oncogene, 2010, 30(2): 127 – 138.
[15] Pantel K, Cote RJ, Fodstad Y. Detection and clinical importance of micrometastatic disease[J]. Journal of the National Cancer Institute, 1999, 91(13): 1113 – 1123.
[16] Woodman JR, Mansfield KJ, Lazzaro VA, et al. Immunoctochemical characterisation of cultures of human bladder mucosal cells[J]. BMC Urology, 2011, 11(5): 1471 – 1480.
[17] Rasweiler JJ, Badwaik NK, Salame G, et al. Endothelial cell hyperrolifferation ans stratification in uteropalcental blood vessels of the black mastiff bat, molossus refus[J]. Placenta, 2011, 32(9): 633 – 644.

(编辑:周小林)

· 个案与短篇 ·

双源性胆囊动脉变异 1 例

汤志敏[1],宋信柔[1],苏 薇[1],王骏豪[1],贺桂琼[2] (重庆医科大学:1. 2011 级临床救援 3 班;2. 解剖学教研室,重庆 400016)

[关键词] 双胆囊动脉;肝右动脉;胰十二指动脉上后动脉;解剖学;变异
[中图分类号] R322.121 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2014)06-0582-01

作者在解剖 1 具老年男性尸体腹腔动脉及分支时,发现其双源性胆囊动脉变异,一条起自肝右动脉,另一条起自胰十二指动脉上后动脉(图 1)。该双源性胆囊动脉的变异经查询相关文献罕见,为积累国人解剖学数值资料和为临床提供参考,现报告如下。

1 资料与方法

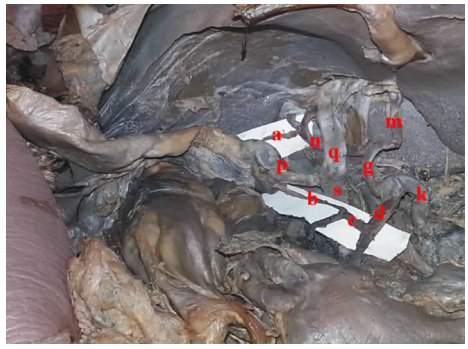
经 10% 福尔马林固定的老年男性尸体 1 具,身高 151 cm。通过常规方法解剖暴露腹腔内的肝胆结构、腹腔动脉及分支的起点、走行、分支及分布情况。用游标卡尺(精度 0.02 mm)测量分支分出点及解剖学长度,记录并拍照(图 1)。

2 结果

胆囊双动脉变异,腹主动脉在第一腰椎高度自前壁发出腹腔动脉,进而分出胃左动脉、脾动脉、肝总动脉。肝总动脉长约 21.20 mm,其向上发出长 14.01 mm 的肝固有动脉,向下发出长约 43.92 mm 的胃十二指肠动脉;肝固有动脉向左上发出长 25.12 mm 的肝左动脉入左半肝,向上方发出长 43.05 mm 的肝右动脉入右半肝;在距肝右动脉根部 2.20 mm 处,在胆囊三角内可见肝右动脉发出长约 17.54 mm 的胆囊动脉入胆囊;胃十二指肠动脉向下走行 13.21 mm 后发出胰十二指动脉上后动脉,该动脉走行 8.00 mm 后向右上发出长约 46.74 mm 的胆囊动脉,骑跨于胆囊管表面上行,于胆囊三角外进入胆囊(见图 1)。

3 讨论

中国人解剖学数值[1]报道,国人单胆囊动脉的类型分六型,起自胰十二指动脉上后动脉仅出现 1% ~6%,且该单胆囊



a:胆囊动脉;b:胆囊动脉;c:胰十二指肠上后动脉;d:胃十二指肠动脉;k:肝总动脉;g:肝固有动脉;m:肝左动脉;n:肝右动脉;p:胆囊管;q:肝总管;s:胆总管

图 1 双源性胆囊动脉变异

动脉进入胆囊的部位仅占 0.1% ~1%[2];其他腹部单支胆囊动脉起源于肝右动脉者占 84.0%,其余可能源于肝左动脉、肝固有动脉、肝中动脉等,约 23.8% 为双胆囊动脉[3]。故本案例变异出现概率经计算仅 0.004 8% ~0.048%,十分罕见。在行胆囊切除等外科手术时,需仔细辨认各种变异的胆囊动脉,包括各种起止、走形(与胆囊三角的关系)、形态等变异,以免错误结扎其他结构。因为本例变异十分罕见,临床医生在腹腔镜胆囊切除术等腹腔手术时易忽略起自胰十二指动脉上后动脉的胆囊动脉而导致结扎不全,或错误结扎以致大出血。故本例报道具有一定参考意义和临床价值。

[参考文献]

[1] 黄 瀛,吴晋宝. 中国人解剖学数值[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:7 – 117.
[2] 张智锋,梁楚琪,杨佩峰,等. 胆囊动脉起自胰十二指动脉上后动脉一例[J]. 医学美学美容(中旬刊), 2013(7):164.
[3] 黄洁夫. 腹部外科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:1299.

(编辑:杨 颖)

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201406003
[收稿日期] 2014-07-11 [修回日期] 2014-07-28