

CD133和VEGF在肝细胞癌表达及其预后预测价值

吴黎明, 陈先祥, 程彩涛, 王江华, 马泽君 (湖北医药学院附属人民医院 肝胆胰腺外科, 十堰市 442000)

摘要: **目的** 研究肝细胞癌干细胞标记分子CD133与血管内皮生长因子VEGF在肝细胞癌组织中的表达及其预后价值。**方法** 应用免疫组织化学染色方法检测CD133、VEGF在190例肝细胞癌组织中的表达水平, 分析其与各项临床病理指标和无瘤生存之间的关系。**结果** CD133、VEGF在肝细胞癌组织中的阳性表达率分别为22.1% (42/190) 和52.1% (99/190)。CD133的表达水平与乙型肝炎病毒感染、肝细胞癌分化程度、镜下血管侵犯比较, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.05$); CD133表达与VEGF表达水平比较, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.001$)。生存分析表明, CD133阳性组术后无瘤生存期明显短于CD133阴性组, 差异有显著统计学意义 ($P = 0.036$)。**结论** 肝细胞癌组织中, CD133高表达与VEGF高表达、肝细胞癌低分化以及镜下血管侵犯密切相关; CD133表达水平与肝细胞癌术后无瘤生存呈负相关, CD133可能通过调节VEGF表达水平影响肿瘤局部新生血管形成从而影响肝细胞癌预后。

关键词: 肝肿瘤; CD133; 血管内皮生长因子; 预后

Expression of CD133 and VEGF in hepatocellular carcinoma and its prognostic value

WU Li-ming, CHEN Xian-xiang, CHENG Cai-tao, WANG Jiang-hua, MA Ze-jun
(Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of CD133 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in primary lesions of hepatocellular carcinoma (HCC) and its prognostic value. **Methods** The expression of CD133 and VEGF in 190 patients with HCC were detected by immunohistochemical staining. The correlation of CD133 expression with the clinicopathologic parameters and features after operation was analyzed. **Results** The expression of CD133 and VEGF in cancer tissues was 22.1% (42/190) and 52.1% (99/190), respectively. There was significant correlation between the expression of CD133 and HBV infection, tumor differentiation and microvessel invasion ($P < 0.05$). There was significant correlation between the expression of CD133 and VEGF ($P < 0.001$). Prognostic analysis demonstrated that the disease-free survival of CD133 positive group was significantly lower

than that of CD133 negative group ($P = 0.036$). **Conclusions** CD133 expression in HCC correlates significantly with VEGF expression, worse tumor differentiation and microvessel invasion. Patients with CD133 positive expression may suffer from shorter disease-free survival after operation. CD133 may influence the prognosis of HCC by regulating the expression of VEGF.

Key words: Liver neoplasms; CD133; Vascular endothelial growth factors; Prognosis

根据肿瘤干细胞理论,肿瘤可能起始于少数具有干细胞特征(包括自我更新、多向分化以及无限增殖能力)的肿瘤起源细胞(cancer initiating cells, CICs),肿瘤起源细胞不仅诱导肿瘤发生,同时在肿瘤进展过程中起重要作用,例如参与恶性肿瘤转移、复发以及多药耐药机制从而影响肿瘤预后^[1]。目前已知CD133分子可作为表面标记物筛选多种正常干细胞(例如神经干细胞),此外在包括脑肿瘤^[2]和乳腺肿瘤^[3]等多种肿瘤组织中CD133阳性肿瘤细胞具有肿瘤干细胞的特征。本研究应用免疫组织化学染色检测CD133、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在肝癌组织中的表达情况及其与临床病理指标间的关系,初步探讨CD133以及VEGF在预测肝细胞癌患者术后预后中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院2001年4月至2007年7月普外科收治的行肝细胞癌根治性切除术患者190例,其中男性176例,女性14例,年龄25~73岁,中位年龄58.7岁。所有患者术前未行局部治疗。肿瘤分期依据1997年UICC 制定的TNM临床分期标准:I 期51例(26.8%)、II 期63例(33.2%)、III 期76例(40%)。肿瘤病理分级依据Edmondson分级系统:I 级42例(22.1%)、II 级110例(57.9%)、III 级20例(10.5%)、IV 级18例(9.5%)。术后随访时间自手术时间起始至最后一次随访时间(2011年12月14日)或患者死亡截止。

1.2 方法 190例标本于手术切除后15分钟内用10%甲醛溶液固定,每例石蜡组织标本行4 μm 连续贴邻切片,HE染色明确病理诊断与分级后,行免疫组织化学染色(ABC法),ABC试剂盒购自美国Santa Cruz公司。

染色步骤:常规脱蜡,梯度乙醇水化,微波加热行抗原修复,3%双氧水灭活内源性过氧化物酶,PBS冲洗。一抗分别为鼠抗人CD133 单克隆抗体(购自德国Miltenyi Biotec公司,1:40)以及兔抗人VEGF多克隆抗体(购自美国Santa Cruz公司,1:40)。DAB显色,苏木精复染,树脂封片。CD133阳性细胞为细胞膜和(或)细胞浆呈棕黄色或褐色染色者。VEGF阳性细胞为细胞浆呈棕黄色或褐色染色者。阳性对照采用试剂公司提供的阳性石蜡切片,阴性对照以PBS代替一抗。

1.3 统计学处理 应用SPSS 13.0统计软件统计学分析。CD133表达水平与肝细胞癌临床病理指标间的关系采用Fisher确切概率法;应用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,Log-rank 检验比较生存曲线,采用Cox比例风险回归模型进行生存分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 CD133、VEGF表达检测结果 190例肝细胞癌组织中,有42例(22.1%)CD133表达呈阳性、99例(52.1%)VEGF表达阳性。CD133、VEGF免疫组织化学染色结果见图1。

2.2 CD133表达情况与VEGF及各临床病理指标相关性 肝细胞癌组织中,CD133表达水平与VEGF表达水平、肝细胞癌分化程度、镜下血管侵犯以及乙型肝炎病毒感染相关。42例CD133阳性肝癌中,VEGF阳性组为34例,VEGF阴性组为8例,两者差异有显著统计学意义($P < 0.001$);低分化肝细胞癌组(III 期+ IV 期)为34例,高分化肝细胞癌组(I 期+ II 期)为8例,两者差异有显著统计学意义($P < 0.001$)。42例CD133阳性肝细胞癌中,存在镜下血管侵犯组为33例,无镜下血管侵犯组

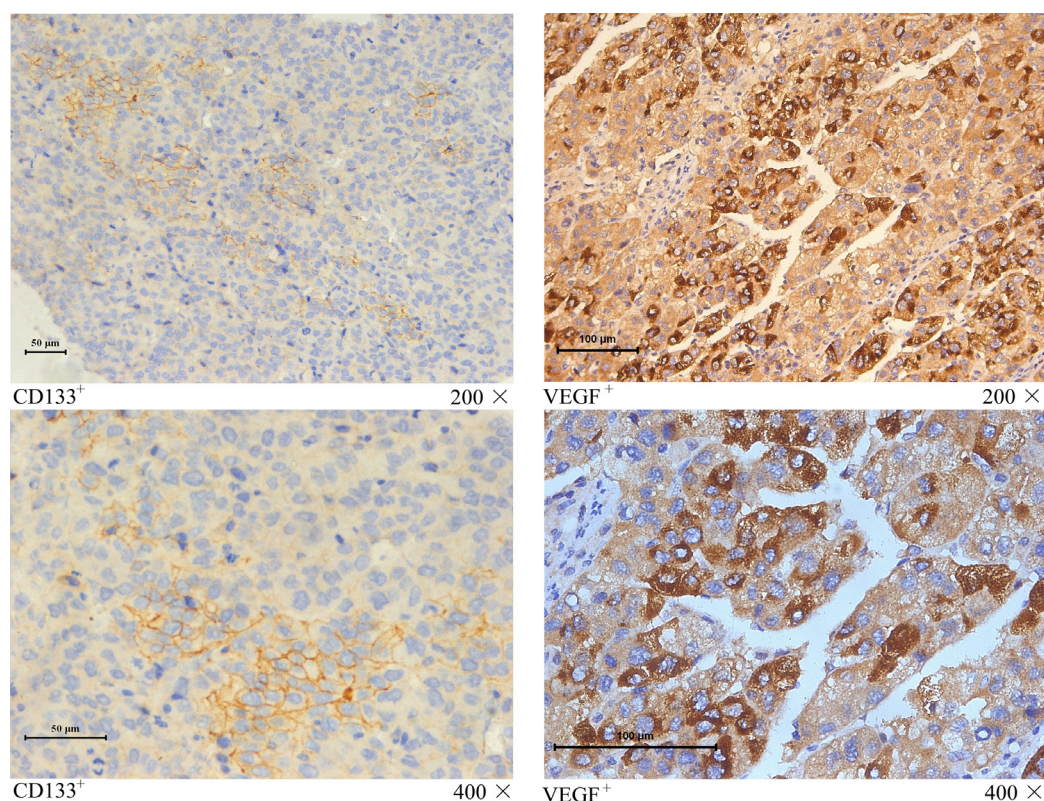


图 1 CD133、VEGF在肝细胞癌组织中的阳性染色结果(ABC免疫酶染色法)

注: A: CD133阳性表达位于肝癌细胞膜表面; B: VEGF 阳性表达位于肝癌细胞浆内; C: CD133阳性表达位于肝癌细胞膜表面; D: VEGF 阳性表达位于肝癌细胞浆内

为9例,两者差异有显著统计学意义($P = 0.016$)。CD133与VEGF表达及各临床病理指标间关系见表1。

2.3 CD133、VEGF表达的生存分析结果 190例肝细胞癌组织中,CD133阳性42例,阴性148例,CD133阳性组无瘤生存期明显低于CD133阴性组,差异有显著统计学意义($P < 0.05$); VEGF阳性组99例,VEGF阴性组91例,VEGF阳性组无瘤生存期低于VEGF阴性组,两组差异有显著统计学意义($P < 0.05$)。Kaplan-Meier法绘制生存曲线见图2、3。

3 讨论

现已证实肿瘤组织中存在少数特殊肿瘤细胞,这些细胞具有类似于正常干细胞的自我更新、无限增殖和多向分化能力,这些细胞被称为肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)。目前文献报道已在血液系统肿瘤^[4]、神经系统肿瘤^[5]、乳腺癌^[6]、肺癌^[7]和肝细胞癌^[8,9]等肿瘤中分离纯化和鉴定出肿瘤干细胞。Brien等^[10]用CD133作为表面标记在结肠癌中分离出少数CD133⁺结肠癌细胞,其成瘤能力明显高于CD133⁻结肠癌细胞,并且CD133⁺细胞能够在NOD/SCID裸鼠

体内连续传代成瘤,具有肿瘤干细胞的特征。VEGF是血管形成的关键因子,其通过与血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)结合后使受体磷酸化激活细胞内信号转导通路而实现促血管形成作用^[11]。

肝内复发是影响肝细胞癌患者术后无瘤生存的重要原因之一,目前认为其原因主要是由于肝细胞癌侵犯门静脉形成瘤栓(镜下或肉眼)后随门静脉血流迁移到肝内其他部位从而形成继发灶所致^[12]。肿瘤干细胞理论认为,肿瘤干细胞具有更强的成瘤、血管侵袭能力,能够迁移到其他部位然后增殖形成继发瘤;增殖过程中肿瘤干细胞可能释放化学因子刺激局部形成适合肿瘤干细胞生长的微环境,而新生血管是肿瘤微环境中最重要的因素之一,其能够为肿瘤干细胞提供生长所需的氧气、营养物质等。目前研究认为,肿瘤干细胞与肿瘤血管微环境之间作用是双向的。一方面新生血管形成是肿瘤干细胞微环境不可缺少的因素之一,新生血管不仅为肿瘤干细胞提供氧气、营养等,缺乏新生血管甚至

表 1 CD133在肝细胞癌组织中的表达与临床病理指标间关系比较

临床病理指标		CD133		P
		阳性	阴性	
性别（例）	男性	39	137	0.873
	女性	3	11	
年龄（岁）	> 52	16	79	0.115
	≤ 52	26	69	
肝硬化（例）	有	32	114	0.912
	无	10	34	
Child肝功能分级（例）	A级	34	111	0.669
	B级	6	30	0.655
	C级	2	6	0.611
乙型肝炎病毒感染（例）	阳性	35	96	0.024
	阴性	7	52	
丙型肝炎病毒感染（例）	阳性	1	10	0.461
	阴性	41	138	
肿瘤分化程度（例）	I ~ II	8	88	< 0.001
	III ~ IV	34	60	
肿瘤数目（例）	单个	15	66	0.377
	多个	27	82	
肿瘤包膜（例）	完整	14	63	0.373
	不完整	28	85	
肿瘤边界	清晰	35	121	0.892
	不清晰	7	27	
淋巴结转移（例）	有	0	3	0.954
	无	42	145	
肉眼瘤栓（例）	有	8	31	0.793
	无	34	117	
镜下瘤栓（例）	有	33	57	0.016
	无	9	91	
TNM 分期（例）	I + II	9	105	0.431
	III	33	43	
VEGF表达情况（例）	阳性	34	65	< 0.001
	阴性	8	83	

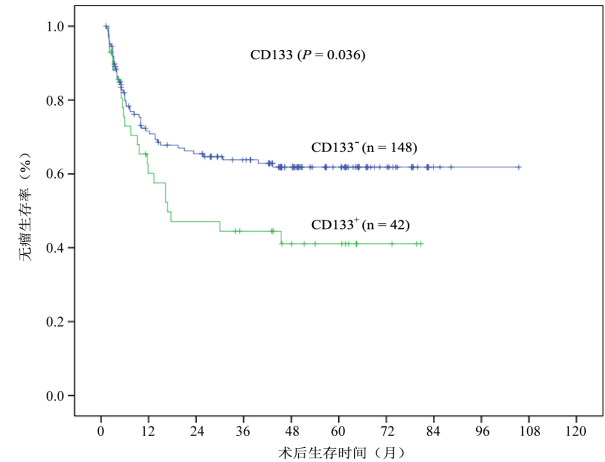


图 2 CD133无瘤生存分析

注：CD133阳性组无瘤生存率显著低于阴性组， $P < 0.05$

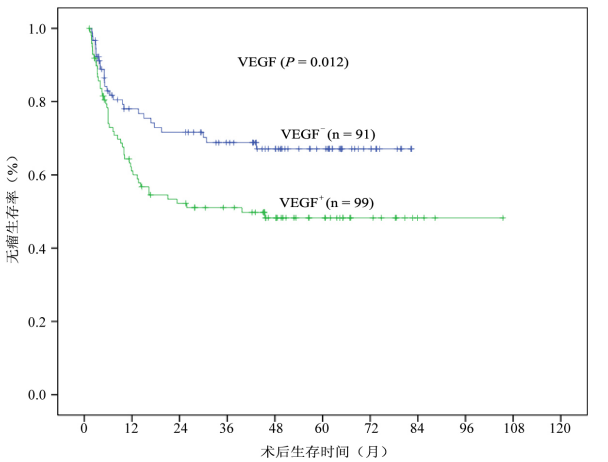


图 3 VEGF无瘤生存分析

注：VEGF阳性组无瘤生存率显著低于阴性组， $P < 0.05$

可直接抑制肿瘤干细胞自我更新。Calabraese等^[13]发现,脑肿瘤中nestin⁺CD133⁺肿瘤干细胞常常位于微血管周围,抑制VEGF信号转导通路不仅直接导致新生血管减少,且nestin⁺CD133⁺肿瘤干细胞数量明显降低,肿瘤增殖迟缓。另一方面,肿瘤干细胞可能通过旁分泌方式直接启动血管形成过程,Yao等^[14]研究发现,与CD133⁻神经胶质瘤细胞相比较,CD133⁺神经胶质瘤干细胞生长的培养基中VEGF水平明显增高,同时CD133⁺神经胶质瘤干细胞移植到裸鼠后形成的肿瘤高表达VEGF,而CD133⁻神经胶质瘤干细胞几乎不能形成肿瘤。与普通肿瘤细胞相比,肿瘤干细胞分泌产生包括VEGF在内更多的血管形成因子,表现出更强的促进血管形成能力,从而在肿瘤新生血管形成方面起重要作用。本研究结果表明,肝细胞癌组织中CD133表达与VEGF密切相关,CD133⁺肝细胞癌细胞高表达VEGF,提示CD133⁺肝细胞癌细胞可能通过高表达VEGF刺激转移灶新生血管形成,从而创造一个适合继发瘤生长的肿瘤微环境。

目前CD133阳性细胞亚群的研究多集中在肝细胞癌细胞系的研究,有关CD133在肝细胞癌组织中的表达与临床病理及其患者预后关系的报道较少见。本研究结果显示,肝细胞癌组织中存在CD133的表达,而在正常肝组织中不表达,肝细胞癌分化程度越低CD133表达越高。这一结果表明,CD133表达程度与肝细胞癌细胞分化程度呈负相关,恶性程度更高的低分化肝细胞癌细胞中CD133呈高表达,与在肝细胞癌细胞系研究中发现的高侵袭转移潜能肝细胞癌细胞系中CD133表达高于低转移潜能肝细胞癌细胞系的结果一致^[15]。

综上所述,CD133蛋白表达与VEGF表达明显相关,CD133⁺肝细胞癌细胞可能通过高表达VEGF促进肝细胞癌侵袭转移从而影响肝细胞癌患者术后无瘤生存。CD133与VEGF可用于临床预测肝细胞癌术后复发转移风险,但CD133与VEGF的相互作用及其机制仍需通过细胞系实验的进一步研究加以证实。

参考文献

- [1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. *Nature*,2001,414:105-111.
- [2] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of

- human brain tumour initiating cells[J]. *Nature*,2004,432:396-401.
- [3] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2003,100:3983-3988.
- [4] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell[J]. *Nat Med*,1997,3:730-737.
- [5] 费喜峰, 张全斌, 董军, 等. 人脑胶质瘤新生血管的细胞来源与血液流通功能的初步评价[J]. *中华肿瘤杂志*, 2011,33:726-731.
- [6] Ding J, Jin W, Chen C, et al. Tumor associated macrophage cancer cell hybrids may acquire cancer stem cell properties in breast cancer[J]. *PLoS One*,2012,7: e41942.
- [7] Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population[J]. *Cell Death Differ*,2008,15:504-514.
- [8] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90⁺ cancer stem cells in human liver cancer[J]. *Cancer Cell*, 2008,13:153-166.
- [9] Tang KH, Ma S, Lee TK, et al. CD133 (+) liver tumor-initiating cells promote tumor angiogenesis, growth, and self-renewal through neurotensin/interleukin-8/CXCL1 signaling[J]. *Hepatology*,2012,55:807-820.
- [10] O' Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice[J]. *Nature*,2007,445:106-110.
- [11] Sitohy B, Nagy JA, Dvorak HF. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: reassessing the target[J]. *Cancer Res*, 2012,72:1909-1914.
- [12] Tang ZY, Zhou XD, Lin ZY, et al. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma and related basic research with special reference to recurrence and metastasis[J]. *Chinese Medical Journal*,1999,112:887-891
- [13] Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells[J]. *Cancer Cell*,2007,11:69-82.
- [14] Yao XH, Ping YF, Chen JH, et al. Glioblastoma stem cells produce vascular endothelial growth factor by activation of a G-protein coupled formylpeptide receptor FPR[J]. *J Pathol*,2008,215:369-376.
- [15] Yin S, Li J, Hu C, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity[J]. *Int J Cancer*,2007,120:1444-1450.

收稿日期: 2012-11-12