

肝癌新生血管的形态学异常及其临床意义

黄耿文, 杨连粤, 鲁伟群, 丁翔, 陶一明

Abnormality of Configuration of Microvessel in Hepatocellular Carcinoma

HUANG Geng-wen, YANG Lian-yue, LU Wei-qun, DING Xiang, TAO Yi-ming

Department of General Surgery and Liver Cancer Laboratory, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Abstract Objective To investigate the abnormality of configuration of microvessel in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Expressions of CD34 and Endoglin were studied through immunohistochemistry in fifty-six cases of HCC and their paraneoplastic liver tissue and six cases of normal liver tissue. The ultrastructure of microvessel was observed using transmission electron microscope. **Results** Microvessel density (MVD) denoted by CD34 and Endoglin were 127.1 ± 5.9 and 64.6 ± 11.1 respectively in HCC, contrasted with 7.1 ± 1.3 and 6.1 ± 1.2 in paraneoplastic liver tissue ($P < 0.01$). The structure of microvessel was loose and the permeability increased in HCC. Microthrombi formed in the microvessel in HCC. **Conclusion** There was a large amount of structurally defect microvessel in HCC, which provided route for cancer metastasis.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Neovascularization; Metastasis

摘要:目的 研究肝细胞癌(HCC)新生血管的形态学异常。方法 采用免疫组化 SABC 法检测 56 例 HCC 组织及其相应癌旁肝组织和 6 例正常肝组织中 CD34 和 Endoglin 的表达,并采用透射电镜观察微血管超微结构的改变。结果 56 例 HCC 组织中 CD34 和 Endoglin 表示的 MVD 值分别是 127.1 ± 5.9 和 64.6 ± 11.1 ,而癌旁肝组织的 MVD 值分别是 7.1 ± 1.3 和 6.1 ± 1.2 。HCC 组织的 MVD 值高于相应的癌旁肝组织,差异具有显著意义($P < 0.01$)。HCC 组织中微血管结构松散,通透性明显增加,可见微血管内微癌栓形成。结论 HCC 组织中新生血管生成明显增加,而且这些新生的微血管在结构上是有缺陷的,这为癌细胞的转移提供了门户。

关键词: 肝细胞癌; 新生血管生成; 转移

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)06-0449-02

0 引言

新生血管生成是肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 术后复发转移的重要机制之一,与 HCC 的预后密切相关。本文采用免疫组织化学和透射电镜对 HCC 新生血管的形态学异常进行研究,并探讨其临床意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

本实验所用组织标本取自中南大学湘雅医院 2000 年 3 月~2002 年 3 月手术切除的 HCC 标本,共 56 例。其中男 49 例,女 7 例,年龄 19~77 岁,平

均年龄 46.5 岁。全部病例乙肝表面抗原均为阳性,且术前均未接受其他治疗。癌旁组织为距上述 56 例 HCC 组织 1cm 的非癌肝组织,均有不同程度的肝病背景。正常肝组织 6 例,取自肝血管瘤或肝囊肿周围的正常肝组织。

1.2 免疫组织化学

采用链霉抗生物素-生物素-过氧化物酶复合体 (SABC) 法,操作步骤参见说明书。CD34 和 Endoglin 一抗采用相应的小鼠抗人单克隆抗体 (NEOMARKERS 公司),工作浓度均为 $2\mu\text{g/ml}$ 。以磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 代替一抗作为阴性对照。阳性染色呈棕黄色。微血管密度 (MVD) 结果判断标准参照 Weidner 标准。

1.3 透射电镜

组织经 2.5% 戊二醛固定、包埋、修块、定位。超薄切片机制片 (瑞典产 LKB- 型切片机)、铅铀双重染色,置日产 H-600 透射电镜下观察。

1.4 统计学分析

收稿日期: 2006-10-25; 修回日期: 2006-11-15

基金项目: 湘雅医院“百万人才战略工程”基金资助项目 (2005)

作者单位: 410008 长沙, 中南大学湘雅医院普外科, 肝癌研究室

作者简介: 黄耿文, 男, 博士, 副主任医师, 主要从事肝癌的基础和临床研究

根据本研究所得结果为计量资料的属性,用成组 t 检验分析组间差异, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 HCC 组织中 CD34 和 Endoglin 的表达

阴性对照切片均无阳性染色。CD34 和 Endoglin 阳性染色主要位于内皮细胞胞膜,见图 1、2。56 例 HCC 中 CD34 和 Endoglin 表示的 MVD 分别是 127.1 ± 5.9 和 64.6 ± 11.1 , 而癌旁肝组织的 MVD 值分别是 7.1 ± 1.3 和 6.1 ± 1.2 。HCC 组织的 MVD 值高于相应的癌旁肝组织,差异具有显著意义 ($P < 0.01$)。

2.2 HCC 组织中新生血管的超微形态学观察

与癌旁肝组织相比, HCC 组织中的微血管形态失常,呈扩张扭曲状。内皮细胞间的连接松散、扩大,甚至消失。内皮细胞与周细胞间连接松散,基底膜结构疏松,见图 3、4。有时可见肿瘤细胞整合于血管壁上,或经微血管的空隙侵入血管管腔形成微小癌栓,见图 5。内皮细胞胞浆中的线粒体和内质网水肿,呈空泡样变。

3 讨论

新生血管生成是恶性肿瘤复发转移的重要机制之一。若没有新生血管生成,肿瘤细胞不仅不能增殖,更无法发生转移。因此,研究恶性肿瘤新生血管的形态学异常对于了解恶性肿瘤复发转移机理至关重要。

血管生成实质上是内皮细胞的增殖过程。然而在普通显微镜下内皮细胞呈极薄的透明状而无法显现。通过免疫组织化学的方法标记内皮细胞上的分子标志物可以清楚地显现内皮细胞。本研究采用免疫组化的方法检测 CD34 和 Endoglin 这两个指标的表达用以标记微血管密度,结果显示 HCC 组织中的微血管密度远大于癌旁肝组织,这提示 HCC 组织中具有活跃的内皮细胞增殖过程。血管生成促进因子(如血管内皮生长因子、表皮生长因子等)表

达上调和抑制因子(如 Thrombospondin-1 等)表达下调是 HCC 组织中内皮细胞活跃增殖的原因^[1,2]。从免疫组化的结果我们还观察到, HCC 组织中微血管形态失常,呈扩张扭曲状。这使得 HCC 微血管中血流淤滞,肿瘤细胞处于相对缺氧状态,这进一步增加了肿瘤细胞的侵袭性^[3]。

不仅如此,本研究采用透射电镜对 HCC 中微血管的超微结构进行了观察,发现内皮细胞间连接松散,出现较大的空隙,甚至消失,内皮细胞与周细胞连接松散,基底膜结构疏松。这些结构特点均可以导致血管的渗透性增加。这不仅说明 HCC 组织中新生血管生成明显增加,而且这些新生的微血管在结构上是有缺陷的。这样的结构特点不仅有助于为肿瘤细胞提供营养底物以促进肿瘤细胞的增殖,而且为肿瘤细胞的转移提供了门户。电镜显示癌细胞嵌塞于微血管空隙形成微栓塞即是证明。由于 HCC 新生血管在结构上与非肿瘤性新生血管具有如此显著的不同,据此可以推定 HCC 的新生血管内皮细胞应具有不同于非肿瘤性新生血管内皮细胞的独特的分子特征。Croix 等在结肠癌中证实了这一推测^[4]。因此,进一步对 HCC 新生血管内皮细胞的分子标志物进行筛选和鉴定,有望找到能预警 HCC 复发转移的指标和基因治疗的有效靶点^[5]。

(本文图见插页 2)

参考文献:

- [1] 黄耿文,杨连粤,杨建青,等. 肝细胞癌中表皮生长因子与血管内皮生长因子过量表达的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(6): 564-566.
- [2] 文卫,杨连粤,黄耿文,等. TSP-1 和 VEGF 在肝细胞癌新生血管生成中的作用[J]. 中华肝胆外科杂志, 2005, 11(1): 17-19.
- [3] 黄耿文,杨连粤. 缺氧致肿瘤恶性转化的分子机制[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 9(11): 1300-1304.
- [4] St Croix B, Rago C, Velculescu V, et al. Genes expressed in human tumor endothelium[J]. Science, 2000, 289(5482): 1197-1202.
- [5] Neri D, Bicknell R. Tumour vascular targeting[J]. Nature Reviews Cancer, 2005, 5(6): 436-445.

[编辑:贺文;校对:马福元]

肝癌新生血管的形态学异常及其临床意义

(正文见 449 页)

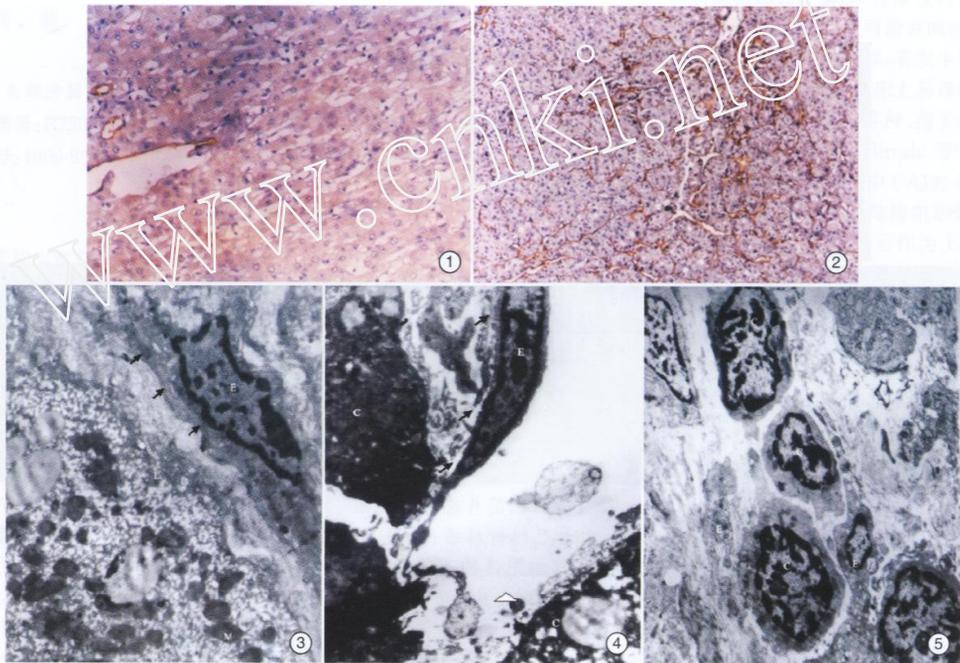


图 1 癌旁肝组织中 CD34 的表达(SABC × 400)

图 2 HCC 组织中 CD34 的表达(SABC × 400)

图 3 癌旁肝组织微血管超微结构(× 8000) E: 内皮细胞; L: 肝细胞; M: 线粒体; ↑: 基底膜

图 4 HCC 组织微血管超微结构(× 6000) E: 内皮细胞; C: 癌细胞; ↑: 基底膜; △: 内皮细胞连接中断

图 5 HCC 组织微血管内微血栓形成(× 5000) E: 内皮细胞; C: 癌细胞; P: 血管周细胞

不同条件下 NK 细胞在小鼠黑色素瘤内的浸润

(正文见 432 页)

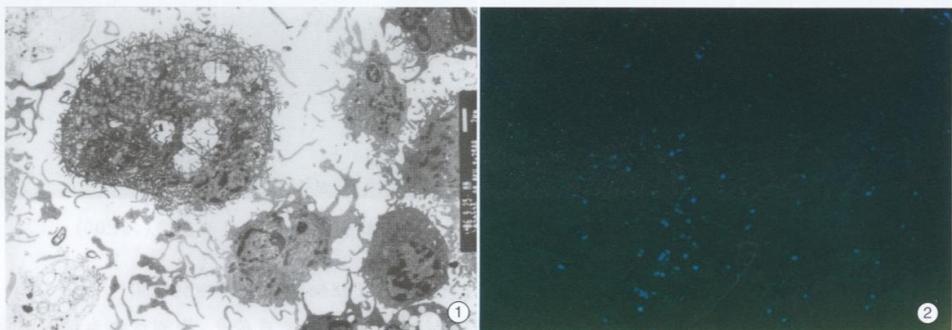


图 1 NK 细胞及 DC 聚集在靶细胞周围, 靶细胞溶解坏死(透射电镜 × 2500)

图 2 荧光显微镜下可见 NK 细胞分布在肿瘤组织内部(免疫荧光法 × 100)