

论著

文章编号:1000-5404(2014)10-1068-06

## CD44、CD133 和 TF 与肝癌中门静脉癌栓形成及恶性预后相关

陈凯, 李中虎, 江鹏, 张曦, 张玉君, 江艳, 李晓武 (400038 重庆, 第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所)

**[摘要]** **目的** 探讨肝癌干细胞表面标志物 CD44、CD133 与组织因子(tissue factor, TF)在肝癌组织中的表达及分析其与肝癌临床病理资料及生存预后间的相互关系。**方法** 应用免疫组化法检测 387 例肝癌组织中 CD44、CD133 和 TF 的表达,比较其表达与肝癌临床病理资料及预后间的关系。**结果** ①387 例肝癌组织中 CD44、CD133 和 TF 的阳性率分别为 60.47%、55.81% 和 65.12%;CD44 与 CD133 双阳性表达(CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>)阳性率 41.60%;CD44、CD133 和 TF 三阳性表达(CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>TF<sup>+</sup>)阳性率 35.14%;②CD44、CD133 与 TF 单独阳性表达以及 CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>和 CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>TF<sup>+</sup> 均与肝癌患者门静脉癌栓、TNM 分期和 Edmendon 分级具显著相关性( $P < 0.01$ );③CD90、CD44 和 CD133 蛋白表达呈正相关( $P < 0.01$ );④CD44、CD133 和 TF 阳性组的总生存时间短于阴性组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>组总生存时间短于非 CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>组总生存时间及 CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>TF<sup>+</sup>组总生存时间短于非 CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>TF<sup>+</sup>组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );⑤多因素分析门静脉癌栓、TF<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>和 CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>TF<sup>+</sup>是影响肝癌预后的独立危险因素( $P < 0.01$ )。**结论** CD44、CD133 和 TF 均与门静脉癌栓形成及恶性预后密切相关,可作为判断患者预后的指标。

**[关键词]** 肝细胞癌;CD44;CD133;组织因子;免疫组织化学;预后

**[中图分类号]** R341;R730.43;R735.7

**[文献标志码]** A

## CD44, CD133 and TF correlate with formation of portal vein tumor thrombus and poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma

Chen Kai, Li Zhonghu, Jiang Peng, Zhang Xi, Zhang Yujun, Jiang Yan, Li Xiaowu (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** Investigate the expression of CD44, CD133 and tissue factor (TF) and their clinicopathologic significance in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The expression of CD44, CD133 and TF was detected using immunohistochemistry in 387 liver tissue samples from HCC patients. We further evaluated the relationship between the expression and clinical pathology and prognosis of HCC. **Results** The positive expression rates of CD44, CD133 and TF in HCC patients were 60.47%, 55.81%, and 65.12%, respectively. The positive rate of co-expression of CD44 and CD133 (CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>) was 41.60%. The positive rate of co-expression of CD44, CD133 and TF (CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>TF<sup>+</sup>) was 35.14%. Clinical analysis showed that single expression of CD44, CD133 or TF was associated with portal vein tumor thrombus, TNM staging and grading of Edmendon. CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> and CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>TF<sup>+</sup> had the same results ( $P < 0.01$  and  $P < 0.01$ , respectively). The difference of survival rate between CD44-positive and CD44-negative groups was observed, and the CD133-positive and CD133-negative groups as well as the TF-positive and TF-negative groups had the same result ( $P < 0.01$  all). The protein expression CD90, CD44 and CD133 was positively correlated ( $P < 0.01$ ). The total survival time of CD44, CD133 and TF positive groups was shorter than the negative groups and the differences were statistically significant (all  $P < 0.01$ ). The total survival time of CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> group was shorter than that of non-CD44<sup>+</sup> group ( $P < 0.01$ ). The total survival time of CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>TF<sup>+</sup> group was shorter than that of non-CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>TF<sup>+</sup> group and the differences were statistically significant ( $P < 0.01$ ). Multivariate analysis suggested that portal vein tumor thrombus, TF<sup>+</sup>,

CD44<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> and CD44<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> TF<sup>+</sup> were the independent risk factors of the prognosis of HCC ( $P < 0.01$  all). **Conclusion** The positive expression of CD44, CD133 and TF is associated with each other and closely correlated with the formation of portal vein tumor thrombus, indicating the poor prognosis of HCC.

[ **Key words** ] hepatocellular carcinoma, CD44, CD133, tissue factor, immunohistochemistry, prognosis

Corresponding author: Li Xiaowu, E-mail: lixw1966@163.com

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是恶性程度最高的恶性肿瘤之一, 在世界范围内, 肝癌分别是男性与女性第 2 位与第 6 位的癌症致死原因。<sup>[1]</sup> 据报道肝癌的 5 年生存率不足 30%, 肝癌侵袭门静脉形成门静脉癌栓 (portal vein tumor thrombus, PVTT), 从而导致肝癌转移的复发是影响肝癌长期生存率的最重要因素<sup>[2]</sup>。因此研究门静脉癌栓形成的危险因素对于提高肝癌的疗效有重要意义。

肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs) 是存在于肿瘤组织中的一类具有干细胞性质的细胞群体, 决定了肿瘤的发生、发展, 也是肿瘤转移复发的关键原因<sup>[3-4]</sup>。肝癌干细胞是肝癌侵袭转移与复发的重要原因, 并已鉴定出多个肝癌干细胞标志物, 如 CD44、CD90、CD133、OV-6、ABC2 和 EpCAM 等, 其中 CD44、CD133 较为常用<sup>[5-12]</sup>。组织因子 (tissue factor, TF) 除参与凝血机制外, 还涉及血管生成与恶性肿瘤的侵袭转移过程<sup>[13]</sup>。在乳腺癌<sup>[14]</sup>、结肠癌<sup>[15]</sup>、恶性黑色素瘤<sup>[16]</sup> 和胰腺癌<sup>[17]</sup> 等肿瘤中, TF 的表达增高促进肿瘤的侵袭和转移。近来研究发现, TF 与肿瘤干细胞之间存在着密切的联系, TF 在肿瘤干细胞微环境的形成中发挥重要作用。TF 通过促凝和信号传导等直接或间接的途径, 释放大量的细胞生长促进因子, 形成有利于肿瘤干细胞的微环境, 从而促进肿瘤转移复发<sup>[18]</sup>。

是否 TF 通过改变肿瘤微环境, 从而促进肿瘤干细胞的血管侵犯和血行转移, 与肝癌门静脉癌栓形成相关, 并影响到临床预后。因此, 本研究通过免疫组化方法来研究 CD44、CD133 和 TF 在肝癌组织中的表达情况。并进一步研究三者相互之间及其与肝癌临床病理因素间的关系, 尤其是与门静脉癌栓形成以及生存预后之间的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

本研究经西南医院伦理委员会批准 (KY200802), 选取 2005 年 11 月至 2008 年 11 月期间第三军医大学西南医院肝胆外科研究所行手术治疗的 387 例肝癌患者, 其中男性 339 例, 女性 48 例, 年龄  $\leq 50$  岁 203 例,  $> 50$  岁 184 例。387 例肝癌标本均经病理检查证实为原发性肝细胞癌, 并根据国际抗癌联合会 (UICC) 的临床分期标准分为 I ~ II 期 267 例, III ~ IV 期 120

例; Edmondson 分级 I ~ II 期 298 例, III ~ IV 期 89 例; 无门静脉癌栓 235 例, 有门静脉癌栓 152 例。肝癌患者门静脉癌栓位于肝段内者行肝癌肿瘤整块切除, 门静脉癌栓位于门静脉主干及主要分支者行肝癌切除, 门静脉癌栓自肝断面经门静脉断端取出或自门静脉主干静脉壁切开取出, 术后辅助行肝动脉化疗栓塞 (TACE)。387 例肝癌患者中, 临床资料均取自患者的住院病历, 由肝胆外科研究所临床随访中心进行追踪随访, 26 例失访。手术出院后每 3 个月电话随访 1 次至失访或患者死亡, 每隔 3 个月建议返院复查肝功能、血清 AFP、超声造影、CT 等。平均随访时间为 47 (7 ~ 96) 个月, 其中 117 例至 2013 年 11 月仍存活, 244 例在随访期内死亡。

### 1.2 免疫组织化学检测

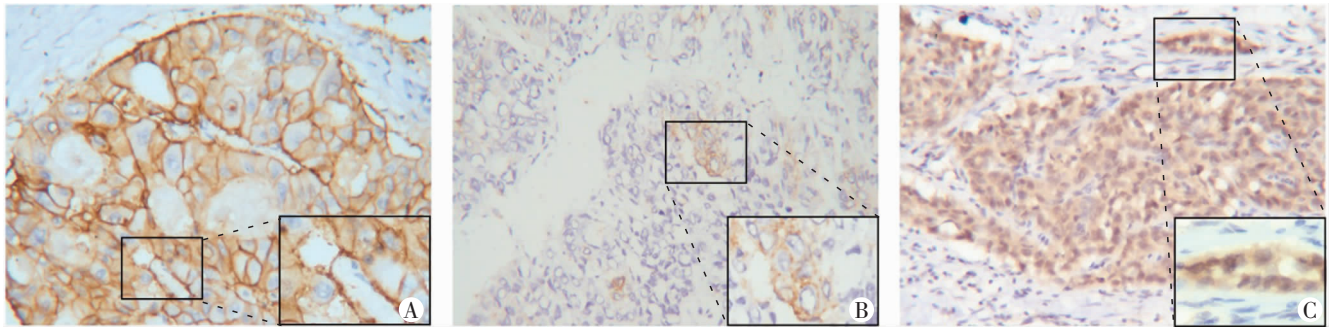
所有标本均用 10% 甲醛固定, 常规行石蜡包埋连续切片, 厚 3  $\mu\text{m}$ ; 脱蜡, 梯度酒精脱水, 高温高压抗原修复自然冷却至室温, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗片 5 min 3 次。30 mL/L 过氧化氢溶液室温封闭 30 min 阻断内源性过氧化物酶活性, PBS 洗片 5 min 3 次后滴加第一抗体 CD44 (兔抗人单克隆抗体 Abcam 1:100); CD133 (兔抗人多克隆抗体 Abcam 1:100), TF (兔抗人单克隆抗体 Boster 1:200) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 第 2 天 37  $^{\circ}\text{C}$  复温后倒掉一抗, PBS 洗片 5 min 3 次。滴加第二抗体 EnVision<sup>TM</sup> (鼠/兔通用型 Doka), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min, PBS 洗片 3 min 3 次。光镜控制下 DAB 显色 3 ~ 5 min, 以自来水充分冲洗终止显色。苏木精复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。每次实验均设置阴阳性对照。阴性对照以 PBS 替代一抗, 用已知阳性标本作阳性对照。

### 1.3 结果判定标准

所有免疫组化结果分析由 2 位不知道患者临床资料的病理科医生完成。先在低倍 ( $\times 100$ ) 光镜下随机选择 10 个有阳性染色视野, 再用图像分析系统 (MetaMorph Imaging System version 6.0) 在高倍 ( $\times 400$ ) 光镜视野下进行细胞计数, 每个视野计数 100 个细胞, 共 1 000 个细胞, 计算阳性细胞比例。CD44 抗原定位于细胞膜, CD133 与 TF 抗原定位于细胞质或细胞膜。阳性组织判断标准: CD44<sup>[19-20]</sup> 以肿瘤细胞膜上棕黄色至深棕色染色, 阳性细胞率  $> 10\%$  为阳性,  $\leq 10\%$  为阴性; CD133<sup>[21]</sup> 以肿瘤细胞膜上或细胞质中出现棕色至深棕色染色即为阳性; TF<sup>[22]</sup> 以肿瘤细胞膜上或细胞质中出现棕色至深棕色染色且其染色强度高于背景非特异染色为阳性染色细胞, 阳性细胞率  $> 50\%$  为 TF 阳性,  $\leq 50\%$  为 TF 阴性。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析。计数资料用  $\chi^2$  检验; 相关性分析采用 Spearman-rank 相关分析; 单因素生存分析采用 Log-rank 检验, 用 Kaplan-Meier 法绘制生存率曲线。影响预后多因素分析应用 Cox 回归分析。



A: CD44; B: CD133; C: TF (方框中为放大400倍局部)

图1 CD44、CD133与TF在肝癌组织中的表达(二步法×100)

## 2 结果

### 2.1 CD44、CD133与TF在门静脉癌栓组中的表达

CD44、CD133与TF肝癌组织中均有阳性表达(图1)。在387例肝癌组织中,CD44、CD133、TF、CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>和CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>TF<sup>+</sup>在门静脉癌栓组阳性表达远高于无门静脉癌栓组,差异有统计学意义(均为 $P < 0.01$ )。见表1、2。Spearman rank分析提示CD44、CD133与TF之间呈正相关( $P < 0.01$ )。

表1 387肝癌患者CD44、CD133和TF表达与临床病理因素之间的关系(例)

变量	CD44		CD133		TF	
	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
性别						
男	137	202	151	188	122	217
女	16	32	20	28	13	35
年龄(岁)						
≤50	80	123	95	108	70	133
>50	73	111	76	108	65	119
HBsAg						
阴性	30	36	30	36	22	44
阳性	123	198	141	180	113	208
AFP(μg/L)						
≤400	73	91	77	87	59	105
>400	80	143	94	129	76	147
Child分级						
A级	145	217	158	204	129	233
B级	8	17	13	12	6	19
肿瘤直径(cm)						
≤5	52	70	65 <sup>b</sup>	57 <sup>b</sup>	45	77
>5	101	164	106 <sup>b</sup>	159 <sup>b</sup>	90	175
Edmondson分级						
I~II	129 <sup>a</sup>	169 <sup>a</sup>	153 <sup>a</sup>	145 <sup>a</sup>	112 <sup>b</sup>	186 <sup>b</sup>
III~IV	24 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	71 <sup>a</sup>	23 <sup>b</sup>	66 <sup>b</sup>
TNM分期						
I~II	131 <sup>a</sup>	136 <sup>a</sup>	146 <sup>a</sup>	121 <sup>a</sup>	115 <sup>a</sup>	152 <sup>a</sup>
III~IV	22 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	25 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
门静脉癌栓						
无	112 <sup>a</sup>	123 <sup>a</sup>	120 <sup>a</sup>	115 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	140 <sup>a</sup>
有	41 <sup>a</sup>	111 <sup>a</sup>	51 <sup>a</sup>	101 <sup>a</sup>	40 <sup>a</sup>	112 <sup>a</sup>

$\chi^2$ 检验结果:a: $P < 0.01$ ;b: $P < 0.05$

### 2.2 TF、CD44与CD133表达与门静脉癌栓形成相关 CD44、CD133或TF阳性表达均与肝细胞癌患者门静脉癌

栓、TNM分期和Edmondson分级具显著相关性,其差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),而与年龄、性别、肝硬化、甲胎蛋白(AFP)、Child-Pugh分级无相关性( $P > 0.05$ )。除此之外,CD133阳性表达还与肿瘤大小具显著相关性( $P < 0.01$ ,表1)。CD44与CD133双阳性(CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>)表达和TF、CD44、CD133三阳性(TF<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>)表达与门静脉癌栓、TNM分期和Edmondson分级具显著相关性(均为 $P < 0.01$ ),而与年龄、性别、肝硬化、AFP、Child分级、肿瘤大小均无相关性(均为 $P > 0.05$ ,表2)。

表2 387肝癌患者CD44、CD133双阳性与CD44、CD133、TF三阳性表达临床病理因素之间的关系(例)

变量	CD44、CD133		CD44、CD133、TF	
	非双阳性	双阳性	非三阳性	三阳性
性别				
男	200	139	222	117
女	26	22	29	19
年龄(岁)				
≤50	124	79	137	66
>50	102	82	114	70
HBsAg				
阴性	38	28	41	25
阳性	188	133	210	111
AFP(μg/L)				
≤400	100	64	109	55
>400	126	97	142	81
Child分级				
A级	211	151	235	127
B级	15	10	16	9
肿瘤直径(cm)				
≤5	80	42	85	37
>5	146	119	166	99
Edmondson分级				
I~II	195 <sup>a</sup>	103 <sup>a</sup>	212 <sup>a</sup>	86 <sup>a</sup>
III~IV	31 <sup>a</sup>	58 <sup>a</sup>	39 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>
TNM分期				
I~II	190 <sup>a</sup>	77 <sup>a</sup>	203 <sup>a</sup>	64 <sup>a</sup>
III~IV	36 <sup>a</sup>	84 <sup>a</sup>	48 <sup>a</sup>	72 <sup>a</sup>
门静脉癌栓				
无	160 <sup>a</sup>	75 <sup>a</sup>	170 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>
有	66 <sup>a</sup>	86 <sup>a</sup>	81 <sup>a</sup>	71 <sup>a</sup>

$\chi^2$ 检验结果:a: $P < 0.01$ ;b: $P < 0.05$

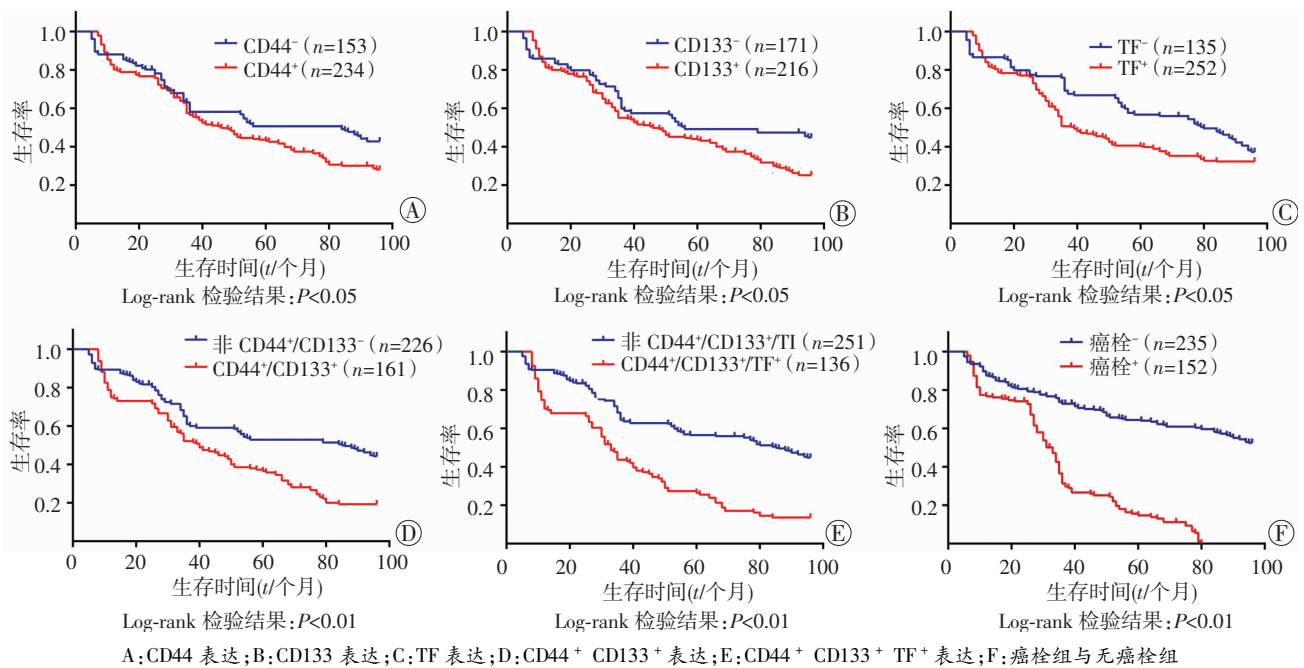


图2 各组肝癌患者的Kaplan-Meier生存曲线

表3 387例肝癌患者预后危险因素的单因素分析

变量	例数	中位生存时间(个月)	3年生存率(%)	5年生存率(%)
HBsAg				
阴性	66	58.8	60.6	51.5
阳性	321	55.8	59.5	44.9
AFP( $\mu\text{g/L}$ )				
$\leq 400$	89	50.1	51.6	39.9
$> 400$	298	58.1	58.9	48.0
Child 分级				
A 级	362	56.6	58.3	46.4
B 级	25	52.6	42.2	42.2
肿瘤直径(cm)				
$\leq 5$	122	62.0	65.9	52.4
$> 5$	265	53.8	53.2	43.2
Edmendonson 分级				
I ~ II	165	60.1	59.8 <sup>b</sup>	52.1 <sup>b</sup>
III ~ IV	222	53.5 <sup>c</sup>	55.2 <sup>b</sup>	41.5 <sup>b</sup>
TNM 分期				
I ~ II	267	61.8	63.4 <sup>a</sup>	53.2 <sup>a</sup>
III ~ IV	120	43.5 <sup>d</sup>	42.8 <sup>a</sup>	29.2 <sup>a</sup>
门静脉癌栓				
无	235	68.8	72.8 <sup>a</sup>	64.5 <sup>a</sup>
有	152	34.8 <sup>e</sup>	31.3 <sup>a</sup>	14.8 <sup>a</sup>
CD44				
阴性	153	61.0	58.3 <sup>b</sup>	50.6 <sup>b</sup>
阳性	234	53.3 <sup>f</sup>	56.6 <sup>b</sup>	43.2 <sup>b</sup>
CD133				
阴性	171	60.6	59.9 <sup>a</sup>	49.3 <sup>a</sup>
阳性	216	53.0 <sup>g</sup>	55.2 <sup>a</sup>	43.7 <sup>a</sup>
TF				
阴性	135	64.2	69.1 <sup>b</sup>	56.8 <sup>b</sup>
阳性	252	52.1 <sup>f</sup>	50.7 <sup>b</sup>	40.2 <sup>b</sup>
CD44 + CD133				
阴性	226	62.6	60.9 <sup>a</sup>	52.9 <sup>a</sup>
阳性	161	47.5 <sup>g</sup>	52.2 <sup>a</sup>	36.6 <sup>a</sup>
CD44 + CD133 + TF				
阴性	251	64.7	64.5 <sup>a</sup>	56.5 <sup>a</sup>
阳性	136	40.6 <sup>g</sup>	43.8 <sup>a</sup>	26.5 <sup>a</sup>

$\chi^2$  检验结果: a:  $P < 0.01$ , b:  $P < 0.05$ ; c:  $P < 0.05$ , 与 Edmendonson 分级 I ~ II 比较; d:  $P < 0.01$ , 与 TNM 分期 I-II 比较; e:  $P < 0.01$ , 与无门静脉癌栓比较; f:  $P < 0.05$ , 与阴性比较; g:  $P < 0.01$ , 与阴性比较

### 2.3 CD44、CD133 与 TF 表达提示预后不良

CD44 阳性表达组患者中位生存时间(53.3 个月), 远低于 CD44 阴性组患者中位生存时间(61.0 个月), 差异显著 ( $P < 0.01$ , 表 3); CD44 阳性组总生存时间较阴性组显著降低 ( $P < 0.05$ , 图 2A)。CD133 阳性表达组患者中位生存时间(53.0 个月) 显著低于 CD133 阴性组患者中位生存时间(60.6 个月,  $P < 0.01$ , 表 3); CD133 阳性组总生存时间较阴性组显著降低 ( $P < 0.05$ , 图 2B)。TF 阳性表达组患者中位生存时间(52.1 个月) 显著低于 TF 阴性组患者中位生存时间(64.2 个月,  $P < 0.01$ , 表 3); TF 阳性组总生存时间较阴性组显著降低 ( $P < 0.05$ , 图 2C)。CD44<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> 组患者中位生存时间(47.5 个月) 显著低于非 CD44<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> 组患者中位生存时间(62.6 个月,  $P < 0.05$ , 表 3); CD44<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> 组总生存时间较非 CD44<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> 组显著降低 ( $P < 0.01$ , 图 2D)。CD44<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> TF<sup>+</sup> 组患者中位生存时间(40.6 个月) 显著低于非 CD44<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> TF<sup>+</sup> 组患者中位生存时间(64.7 个月,  $P < 0.01$ , 表 3); CD44<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> TF<sup>+</sup> 组总生存时间较非 CD44<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> TF<sup>+</sup> 组显著降低 ( $P < 0.01$ , 图 2E)。门静脉癌栓组患者中位生存时间(34.8 个月) 显著低于无门静脉癌栓患者中位生存时间(68.8 个月,  $P < 0.01$ , 表 3); 门静脉癌栓组总生存时间较无门静脉癌栓组显著降低 ( $P < 0.01$ , 图 2F)。

### 2.4 影响预后的危险因素

单因素生存分析显示门静脉癌栓、TNM 分期、Edmendonson 分级、CD44、CD133 或 TF 阳性表达、CD44<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> 与 CD44<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> TF<sup>+</sup> 均为影响生存的危险因素(均为  $P < 0.05$ )。对影响预后的危险因素的单因素进行多因素分析 Cox 回归分析, 显示门静脉癌栓 ( $P < 0.01$ )、TF<sup>+</sup> ( $P < 0.05$ )、CD44<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> ( $P < 0.01$ ) 和 CD44<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> TF<sup>+</sup> ( $P < 0.01$ ) 是影响肝癌预后的独立危险因素。

### 3 讨论

既往研究发现,肝癌中门静脉癌栓的发生率为20%~70%,甚至小肝癌门静脉癌栓发生率亦高达49.6%<sup>[23-24]</sup>。门静脉癌栓形成意味着肝癌病程已经是中晚期,如果不治疗,预后极差,中位生存期仅2.7个月<sup>[25]</sup>。在我们的研究中,发现有门静脉癌栓组患者平均生存时间仅34.8个月,远低于无门静脉癌栓患者68.8个月的平均生存时间( $P < 0.01$ )。5年生存率仅14.8%,远低于无门静脉癌栓组64.5%( $P < 0.01$ )。并且危险因素分析显示门静脉癌栓是影响肝癌预后的独立危险因素( $P < 0.01$ )。

关于门静脉癌栓形成的机制目前仍然不明确。近年的肿瘤干细胞研究认为,肿瘤组织并非由单一性质的肿瘤细胞构成。肿瘤组织中绝大部分肿瘤细胞只具有相对的增殖能力,不会导致肿瘤的转移复发。肿瘤组织中的一小部分肿瘤干细胞决定了肿瘤的发生发展,它们是肿瘤转移复发的关键原因<sup>[3-4]</sup>。我们猜想是否肝癌干细胞与门静脉癌栓形成间存在联系?首先,我们发现肝癌干细胞表面标志物CD44、CD133的阳性表达在门静脉癌栓组远高于无癌栓组( $P < 0.01$ ),且CD44、CD133的表达与门静脉癌栓形成显著相关(均为 $P < 0.01$ ),CD44与CD133阳性表达组预后也更差( $P < 0.01$ )。提示以CD44、CD133为标志的肝癌细胞可能是肝癌干细胞并参与了门静脉癌栓的形成,促进了肿瘤的转移与复发,从而导致患者预后更差。

Zhu等<sup>[7]</sup>发现在肝癌细胞系中,一部分单独CD133阳性的肿瘤细胞不能形成增殖分化,不能形成转移瘤,没有反映出肿瘤干细胞的特性。而联合检测CD44与CD133,从CD133阳性的肿瘤细胞中分出的CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞与CD133<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>细胞相比,更具有肿瘤干细胞的特性。从而认为单独应用一个干细胞标志物鉴定肝癌干细胞存在不足,联合应用两个干细胞标志物鉴定出的肿瘤细胞较单独干细胞标志物鉴定的细胞更具有干细胞的特性。与之类似,在前列腺癌与结肠癌的研究中也发现联合应用CD44与CD133也能更有效的鉴定出肿瘤干细胞<sup>[26-28]</sup>。因此我们联合检测CD44与CD133表达,发现CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>与门静脉癌栓形成显著相关( $P < 0.01$ )。并且CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>组患者平均生存期(47.5个月)明显短于CD44阳性组(53.3个月)、CD133阳性组(53.0个月)与非CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>组(62.6个月),CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>组预后较非CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>差( $P < 0.01$ )。并且Cox分析提示CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>是影响肝癌预后的独立危险因

素( $P < 0.01$ ),而CD44阳性或CD133阳性均不是独立危险因素。提示联合表达CD133和CD44的肿瘤细胞与单独表达CD44或CD133阳性的肿瘤细胞相比,该肿瘤细胞是肿瘤干细胞的特异性更强,从而导致肝癌转移复发可能性越大,引起患者生存期更短。所以这可能是CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>组较非CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>组生存率低的原因之一。

近来研究发现,肿瘤干细胞需要适宜的肿瘤微环境从而利于其存活和生长,这包括各种促生长因子、趋化因子、黏附分子、各种调节细胞生长的细胞外基质等,称之为肿瘤干细胞微环境<sup>[29]</sup>。TF与肿瘤干细胞微环境之间存在密切的关系,TF通过促凝和信号传导等直接或间接的途径影响肿瘤干细胞的生长。研究表明不论是肿瘤细胞上表达的TF还是肿瘤周围基质(如成纤维细胞、血管内皮细胞、炎症细胞等)表达的TF均易激活肿瘤细胞外周的凝血系统,从而导致纤维蛋白沉积,血小板以及TF/PAR信号系统的激活。通过这种作用释放丰富且大量的细胞生长促进因子,形成有利于肿瘤干细胞的微环境从而影响肿瘤干细胞的进展,导致肿瘤侵袭转移<sup>[18]</sup>。另外,研究发现TF可通过促血管生成蛋白VEGF的增加来促进血管生成<sup>[22,30-31]</sup>。血管生成不但为肿瘤干细胞提供了生长所需的营养而且为肿瘤干细胞的侵袭转移提供了通道。我们发现TF与肝癌细胞癌患者门静脉癌栓形成有显著相关性( $P < 0.01$ );同时用Spearman-rank分析,发现TF与CD44、CD133均呈正相关( $P < 0.01$ );TF、CD44、CD133三阳性表达与门静脉癌栓形成有显著相关性( $P < 0.01$ )。提示三者可能协同参与了门静脉癌栓形成。进一步生存分析发现:TF阳性表达组患者预后较TF阴性组差( $P < 0.01$ ),CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>TF<sup>+</sup>组患者预后最差( $P < 0.01$ )。多因素分析提示TF阳性表达与CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>TF<sup>+</sup>是影响肝癌预后的独立危险因素( $P < 0.01$ )。由此我们推测CD44、CD133和TF的表达可能存在着协同作用,TF可能通过为以CD44、CD133为表面标志的肝癌干细胞提供了适宜的微环境,并通过血管生成成为其转移提供了通道,促进了门静脉癌栓的形成,导致肝癌患者预后极差。

总的来说,我们发现肝癌有门静脉癌栓组患者总生存时间与5年生存率远低于无门静脉癌栓患者,并且门静脉癌栓是影响肝癌预后的独立危险因素之一。我们同时发现CD44、CD133与TF在癌栓组中的表达明显高于无门静脉癌栓组,其在肝癌中的表达与肝癌门静脉癌栓形成相关。CD44、CD133与TF阳性表达患者预后明显差于阴性表达患者,而三者共同阳性表达患者预后最差。提示联合检测CD44、CD133和TF

可能是预测肝癌临床预后有效手段之一,也为进一步研究肝癌门静脉癌栓形成机制与防治门静脉癌栓提供了新的思路。

### 参考文献

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al.* Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.

[2] Minagawa M, Makuuchi M, Takayama T, *et al.* Selection criteria for hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma and portal vein tumor thrombus[J]. *Ann Surg*, 2001, 233(3): 379-384.

[3] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, *et al.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-111.

[4] Pardoll R, Clarke M F, Morrison S J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(12): 895-902.

[5] Chiba T, Kita K, Zheng Y W, *et al.* Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties [J]. *Hepatology*, 2006, 44(1): 240-251.

[6] Ma S, Chan K W, Hu L, *et al.* Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7): 2542-2556.

[7] Zhu Z, Hao X, Yan M, *et al.* Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> population in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(9): 2067-2078.

[8] Yang Z F, Ngai P, Ho D W, *et al.* Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer[J]. *Hepatology*, 2008, 47(3): 919-928.

[9] Yamashita T, Ji J, Budhu A, *et al.* EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(3): 1012-1024.

[10] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, *et al.* Characterization of CD133<sup>+</sup> hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(4): 820-824.

[11] Yin S, Li J, Hu C, *et al.* CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(7): 1444-1450.

[12] Lara-Pezzi E, Serrador J M, Montoya M C, *et al.* The hepatitis B virus X protein (HBx) induces a migratory phenotype in a CD44-dependent manner: possible role of HBx in invasion and metastasis[J]. *Hepatology*, 2001, 33(5): 1270-1281.

[13] Belting M, Ahamed J, Ruf W. Signaling of the tissue factor coagulation pathway in angiogenesis and cancer [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(8): 1545-1550.

[14] Ueno T, Toi M, Koike M, *et al.* Tissue factor expression in breast cancer tissues; its correlation with prognosis and plasma concentration [J]. *Br J Cancer*, 2000, 83(2): 164-170.

[15] Seto S, Onodera H, Kaido T, *et al.* Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis[J]. *Cancer*, 2000, 88(2): 295-301.

[16] Wang X, Wang M, Amarguoui M, *et al.* Downregulation of tissue factor by RNA interference in human melanoma LOX-L cells reduces pulmonary metastasis in nude mice [J]. *Int J Cancer*, 2004, 112(6): 994-1002.

[17] Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y, *et al.* Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(7): 2531-2539.

[18] Milsom C, Magnus N, Meehan B, *et al.* Tissue factor and cancer stem cells; is there a linkage? [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(12): 2005-2014.

[19] Wang Z, Shi Q, Wang Z, *et al.* Clinicopathologic correlation of cancer stem cell markers CD44, CD24, VEGF and HIF-1 $\alpha$  in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: an immunohistochemistry-based pilot study[J]. *Pathol Res Pract*, 2011, 207(8): 505-513.

[20] Kokko L L, Hurme S, Maula S M, *et al.* Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous-cell carcinoma[J]. *Oral Oncol*, 2011, 47(6): 510-516.

[21] Shmelkov S V, Butler J M, Hooper A T, *et al.* CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> metastatic colon cancer cells initiate tumors[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(6): 2111-2120.

[22] Poon R T, Lau C P, Ho J W, *et al.* Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(14): 5339-5345.

[23] Cedrone A, Rapaccini G L, Pompili M, *et al.* Portal vein thrombosis complicating hepatocellular carcinoma. Value of ultrasound-guided fine-needle biopsy of the thrombus in the therapeutic management [J]. *Liver*, 1996, 16(2): 94-98.

[24] Chau G Y, Lui W Y, Wu C W. Spectrum and significance of microscopic vascular invasion in hepatocellular carcinoma[J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2003, 12(1): 25-34, viii.

[25] Llovet J M, Bustamante J, Castells A, *et al.* Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials[J]. *Hepatology*, 1999, 29(1): 62-67.

[26] Collins A T, Berry P A, Hyde C, *et al.* Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 10946-10951.

[27] Haraguchi N, Ohkuma M, Sakashita H, *et al.* CD133<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> population efficiently enriches colon cancer initiating cells[J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(10): 2927-2933.

[28] Chen K L, Pan F, Jiang H, *et al.* Highly enriched CD133(+) CD44(+) stem-like cells with CD133(+) CD44(high) metastatic subset in HCT116 colon cancer cells [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2011, 28(8): 751-763.

[29] Dick J E. Stem cell concepts renew cancer research [J]. *Blood*, 2008, 112(13): 4793-4807.

[30] Khorana A A, Ahrendt S A, Ryan C K, *et al.* Tissue factor expression, angiogenesis, and thrombosis in pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(10): 2870-2875.

[31] Kaushal V, Mukunyadzi P, Siegel E R, *et al.* Expression of tissue factor in prostate cancer correlates with malignant phenotype [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2008, 16(1): 1-6.

(收稿:2014-03-04;修回:2014-04-22)

(编辑 邓强庭)