

AT1R 拮抗剂替米沙坦治疗后的血吸虫肝病患者血清 HA、PCⅢ浓度较治疗前明显下降,而血清 LN、CIV 浓度在治疗前后并未发生明显变化,推测可能与 LN、CIV 不能准确反映晚期血吸虫病肝硬化的纤维化程度相关。这也得到了相关研究的支持,Hou 等^[6]发现血清 HA 与血吸虫肝病患者的肝纤维化程度密切相关,血清 HA 可以成为血吸虫病肝纤维化的一个诊断指标。此外,欧洲肝纤维化评分系统就是通过检测血清中 3 种标志物即 HA、PCⅢ及金属蛋白酶组织抑制因子-1 来评估肝纤维化程度,尤其评价中至重度肝纤维化程度的价值更高^[7]。

本研究还发现,经 AT1R 拮抗剂替米沙坦治疗后的血吸虫肝病患者门静脉主干内径减小,门静脉平均流速增快,结合此前的一些研究^[1,8],推测 AT1R 拮抗剂可以减轻晚期血吸虫肝病患者门静脉压力。此外治疗前患者血清 HA 浓度与其门静脉主干内径、肠系膜上静脉内径均有明显的相关性,这表明,对于肝脏储备功能较好的晚期血吸虫肝病患者,联合超声和血清肝纤维化指标来评估其肝纤维化程度或许准确性更高。

参考文献

- [1] Debernardi-Venon W, Martini S, Biasi F, et al. AT1 receptor antagonist Candesartan in selected cirrhotic patients: effect on portal pressure and liver fibrosis markers. *J Hepatol*, 2007, 46:1026-1033.
- [2] 中华人民共和国卫生部疾病控制司. 血吸虫病防治手册. 3 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2000.
- [3] Zhou XN, Bergquist R, Leonardo L, et al. Schistosomiasis japonica control and research needs. *Adv Parasitol*, 2010, 72: 145-178.
- [4] Georgescu EF. Angiotensin receptor blockers in the treatment of NASH/NAFLD: could they be a first-class option?. *Adv Ther*, 2008, 25:1141-1174.
- [5] Jin H, Yamamoto N, Uchida K, et al. Telmisartan prevents hepatic fibrosis and enzyme-altered lesions in liver cirrhosis rat induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 364:801-807.
- [6] Hou XY, Ellis MK, McManus DP, et al. Diagnostic value of non-invasive bio-markers for stage-specific diagnosis of hepatic fibrosis in patients with advanced schistosomiasis japonica. *Int J Parasitol*, 2011, 41:325-332.
- [7] Parkes J, Roderick P, Harris S, et al. Enhanced liver fibrosis test can predict clinical outcomes in patients with chronic liver disease. *Gut*, 2010, 59:1245-1251.
- [8] Tóx U, Steffen HM. Impact of inhibitors of the Renin-angiotensin-aldosterone system on liver fibrosis and portal hypertension. *Curr Med Chem*, 2006, 13:3649-3661.

(收稿日期:2011-11-18)

(本文编辑:陆祎)

肝癌组织中血管内皮生长因子受体-1、Snail 的表达及临床意义

李涛 主余华 宗坚 荣春芳 石军 韩国庆 任万华

血管内皮生长因子受体-1(vascular endothelial growth factor receptor-1, VEGFR-1)是一种酪氨酸激酶的膜受体。实体肿瘤细胞膜上“异位”表达的 VEGFR-1 激活可增加肿瘤细胞侵袭力^[1]。核转录因子 Snail 参与介导胰腺癌和乳腺癌细胞中 VEGFR-1 活化引起的肿瘤侵袭力增加。本研究检测肝癌和癌旁组织中 VEGFR-1、Snail 的表达,分析其相关性及与临床病理特征和预后的关系,探讨其临床意义和预测价值。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2012.11.018

基金项目:山东省中青年基金(2007BS03005)

作者单位:250021 济南,山东大学附属省立医院感染科(李涛、主余华、荣春芳、石军、韩国庆、任万华);桓台县人民医院消化科(宗坚)

通信作者:任万华,Email: ganbingzx@163.com

一、材料与方法

1. 材料:选取山东大学附属省立医院 2006 年 5 月至 2007 年 4 月间 92 例肝癌接受根治性手术患者,收集癌组织 92 份,距离癌组织 5 cm 以上的癌旁组织 31 份(仅与 Edmondson II 级癌组织匹配),共 123 份标本。男 76 例,女 16 例;年龄 30~72 岁;有血管侵袭 41 例,有肝内转移 45 例,有包膜侵袭 42 例;TNM 分期 I 和 II 期 50 例,III 期 42 例;Edmondson I 级 29 例,II 级 31 例,III 级 32 例。术后每 3 至 4 个月随访 1 次,行肝功能、肿瘤标志物和超声检查,若怀疑复发则再行 CT 检查。随访截至 2010 年 11 月,失访率为 9.8%(9/92),平均随访 36.1 个月,计算累积无复发率(RFS)和累积生存率(OS)。

2. 组织芯片制作:组织标本获取后均予甲醛固定,石蜡包埋,切片后 HE 染色,标记典型病变位置,选取癌和癌

旁组织共 123 个位点。以组织芯片制作仪依次从供体蜡块上穿取直径 2 mm 的组织芯,插入 2 个 32 点的受体蜡块和 1 个 62 点的受体蜡块,4 μm 连续切片。

3. 免疫组织化学染色和结果判定: 抗 VEGFR-1 抗体、抗 Snail 抗体均购自美国 Abcam 公司。免疫组织化学相关试剂盒购自北京中杉金桥公司。按说明书进行 SP 法免疫组织化学染色,枸橼酸钠高压抗原修复。PBS 代替一抗做阴性对照。染色阳性信号呈棕黄或棕褐色。染色强度分阴性(无色,1 分)、弱阳性(淡黄色,2 分)、中等阳性(黄色,3 分)、强阳性(棕褐色,4 分)。观察 6 个高倍视野(×400),计数不少于 100 个细胞中的阳性细胞数。综合计量积分=1×阴性细胞百分比+2×弱阳性细胞百分比+3×中等阳性细胞百分比+4×强阳性细胞百分比。以综合计量积分中位值作为判断 VEGFR-1 与 Snail 表达水平高低的界值。

4. 统计学处理: 使用 SPSS 15.0 软件进行统计分析。配对数据行配对 *t* 检验,组间差异行 χ^2 检验,相关性行 Pearson 分析。以 Kaplan-Meier 法和 Cox 模型进行单因素和多因素生存分析。用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC 曲线)分析诊断效率。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 肝癌和癌旁组织中 VEGFR-1、Snail 的表达: 染色过程中丢失 VEGFR-1 组织芯 5 份(Edmondson I 级 1 份、III 级 2 份、癌旁组织 2 份)。VEGFR-1 特异性染色位于胞膜,Snail 则位于胞核。Edmondson II 级癌组织 VEGFR-1 和 Snail 的综合计量积分分别为 2.52 ± 0.82 和 2.21 ± 0.13 ,对应的癌旁组织分别为 1.21 ± 0.36 和 1.55 ± 0.10 ,

癌组织中的表达水平均高于癌旁组织,差异均有统计学意义($t=8.315, 4.863, P$ 均 < 0.01)。见图 1。

2. VEGFR-1、Snail 表达的相关性: 免疫组织化学染色过程中,3 例患者的癌组织在染色过程中脱片。剩余 89 份匹配的肝癌组织中 VEGFR-1 和 Snail 表达水平呈正相关($r=0.41, P=0.001$)。

3. 与临床病理特征的关系: 高表达 VEGFR-1 和 Snail 的患者更易出现肝内转移、血管侵袭、高 TNM 分期、低病理分化,与低表达者差异均有统计学意义,但与肿瘤最大径、HBsAg、肝硬化无关。肝癌组织中 Snail 高表达还与包膜侵袭有关。见表 1。

4. 生存分析: 单因素生存分析显示,肿瘤最大径 > 5 cm、有血管侵袭、有肝内转移、有包膜侵袭、高 TNM 分期、VEGFR-1 和 Snail 高表达与低 RFS 和低 OS 有关。多因素 Cox 模型分析显示,高 TNM 分期、AFP $> 523 \mu\text{g/L}$ 、高 VEGFR-1 和 Snail 表达水平均为复发的独立危险因素,HBsAg 阳性、高 TNM 分期和高 Snail 表达水平均为死亡的独立危险因素。见表 2。

5. 联合检测 VEGFR-1 和 Snail 对肝癌复发和死亡的 ROC 曲线分析: 根据 VEGFR-1 和 Snail 表达水平,将患者分为 I (均高表达)、II (VEGFR-1 低表达但 Snail 高表达)、III (VEGFR-1 高表达但 Snail 低表达)、IV (均低表达)组。I 组和 IV 组的 RFS 和 OS 均差异有统计学意义(Kaplan-Meier 法, $P=0.019, 0.002$)。与 Cox 模型中的各独立危险因素相比,联合检测 VEGFR-1 和 Snail 对肝癌复发的诊断效率最高(ROC 曲线下面积为 0.766, $P=0.005$),同时也能较准确地预测死亡(ROC 曲线下面积为 0.645, $P=0.026$)。

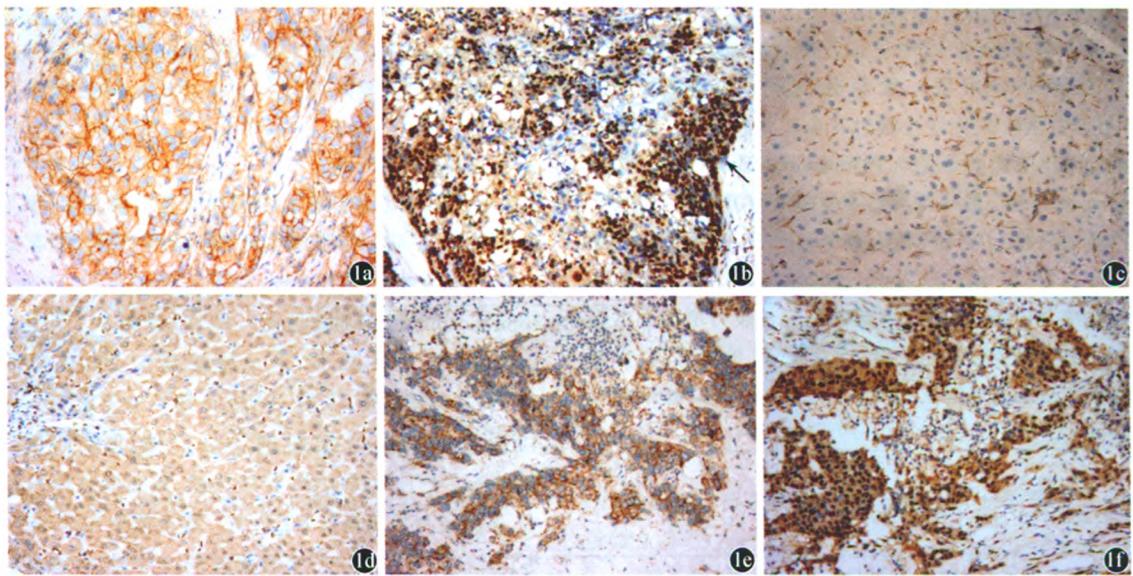


图 1 肝癌和癌旁组织血管内皮生长因子-1 和 Snail 的表达 免疫组织化学染色 ×200 1a 肝癌组织血管内皮生长因子-1 的表达 1b 肝癌组织 Snail 的表达,癌组织边缘(箭头所示)Snail 表达显著增强 1c 癌旁组织窦状隙内皮细胞血管内皮生长因子-1 的表达 1d 癌旁组织中肝细胞 Snail 的表达 1e、1f 1 例肝癌患者癌组织边缘血管内皮生长因子-1(1e)、Snail(1f)均高表达

表 1 肝癌组织中血管内皮生长因子-1 和 Snail 表达与临床病理特征的关系

特征	血管内皮生长因子-1				Snail					
	总例数	低表达(例)	高表达(例)	χ^2 值	P 值	总例数	低表达(例)	高表达(例)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)				0.183	0.669				0.451	0.502
≤50	36	20	16			36	18	18		
>50	53	27	26			56	24	32		
性别				1.572	0.210				1.867	0.172
男	73	40	33			76	38	38		
女	16	6	10			16	5	11		
HBsAg 阳性				1.948	0.163				0.001	0.977
有	75	42	33			75	35	40		
无	14	5	9			17	8	9		
肝硬化				0.187	0.666				0.313	0.576
有	76	40	36			77	35	42		
无	13	6	7			15	8	7		
甲胎蛋白($\mu\text{g/L}$)				0.090	0.760				0.720	0.396
≤523	47	25	22			47	24	23		
>523	42	21	21			45	19	26		
肿瘤最大径(cm)				2.555	0.110				2.671	0.102
≤5	42	25	17			43	24	19		
>5	47	20	27			49	19	30		
血管侵袭				4.994	0.025				13.067	<0.01
有	38	14	24			41	11	30		
无	51	31	20			51	33	18		
肝内转移				4.854	0.028				21.516	<0.01
有	42	17	25			45	9	36		
无	47	30	17			47	32	15		
包膜侵袭				3.159	0.076				11.797	0.001
有	39	16	23			42	11	31		
无	50	30	20			50	31	19		
TNM 分期				5.882	0.015				10.247	0.001
I 和 II 期	47	30	17			50	31	19		
III 期	42	16	26			42	12	30		
Edmondson 分级				9.333	0.009				10.320	0.006
I 级	28	21	7			29	20	9		
II 级	31	14	17			31	11	20		
III 级	30	11	19			32	10	22		

表 2 肝癌复发与生存的单因素及多因素分析

因素	累积无复发生率				累积生存率			
	单因素分析 P 值	多因素 Cox 模型分析			单因素分析 P 值	多因素 Cox 模型分析		
		风险比	95%可信区间	P 值		风险比	95%可信区间	P 值
年龄(≤50 岁比>50 岁)	0.645	未纳入	未纳入	未纳入	0.537	未纳入	未纳入	未纳入
性别(男比女)	0.097	未纳入	未纳入	未纳入	0.081	未纳入	未纳入	未纳入
HBsAg(阴性比阳性)	0.059	未纳入	未纳入	未纳入	0.001	2.457	1.225~4.929	0.011
肝硬化(无比有)	0.208	未纳入	未纳入	未纳入	0.114	未纳入	未纳入	未纳入
甲胎蛋白(≤523 $\mu\text{g/L}$ 比>523 $\mu\text{g/L}$)	0.031	1.001	1.000~1.001	0.021	0.040	1.001	1.000~1.001	0.138
肿瘤最大径(≤5 cm 比>5 cm)	<0.01	0.976	0.878~1.085	0.653	<0.01	0.957	0.847~1.081	0.476
血管侵袭(无比有)	<0.01	1.133	0.145~8.881	0.905	<0.01	1.635	0.205~13.070	0.643
肝内转移(无比有)	<0.01	0.582	0.266~1.273	0.175	<0.01	0.774	0.320~1.870	0.569
包膜侵袭(无比有)	<0.01	0.736	0.089~6.113	0.777	<0.01	0.391	0.043~3.515	0.402
TNM 分期(I 和 II 期比 III 期)	<0.01	6.509	3.089~13.717	<0.01	<0.01	6.696	3.018~14.857	<0.01
Edmondson 分级(I 级比 II 级比 III 级)	0.427	未纳入	未纳入	未纳入	0.239	未纳入	未纳入	未统计
血管内皮生长因子-1(低表达比高表达)	0.009	0.583	0.343~0.991	0.046	0.028	0.729	0.388~1.368	0.325
Snail(低表达比高表达)	0.041	2.631	1.444~4.794	0.002	0.007	2.220	1.038~4.751	0.040

讨论 高通量的组织芯片技术可快速检测多个组织标本中的目的蛋白,同时可平行研究组织细胞形态及蛋白表达,避免了传统技术因实验条件不同导致的结果差异,对比性和可重复性强。本研究结果显示,肝癌细胞表达 VEGFR-1,其表达水平与肝癌进展密切相关,与艾军华等^[2]的研究结果基本一致。有研究发现体外激活肝癌细胞 VEGFR-1 可导致其侵袭力增加^[3]。这或许可解释 VEGFR-1 与肝癌进展的关系。Snail mRNA 水平与肝癌进展密切相关,对肝癌复发有显著影响^[4]。本研究结果与之基本一致。本研究还证实,Snail 高表达是肝癌复发和死亡的独立危险因素,提示其可作为判断肝癌预后的重要指标。本研究结果显示,肝癌组织中 VEGFR-1 和 Snail 表达水平呈正相关。Snail 作为重要的核转录因子,参与介导多种细胞因子的功能^[5],可能参与介导 VEGFR-1 激活所致的肝癌侵袭力增加。有价值的肝癌术后预后预测指标目前尚很少。本研究结果显示,VEGFR-1 和 Snail 高表达均是肝癌术后复发的独立危险因素,联合检测 VEGFR-1 和 Snail 对肝癌复发的诊断效率较优,两者均高表达者的 RFS 和 OS 低。临床联合检测肝癌组织中 VEGFR-1 和 Snail 表达将有助于判断肝癌预后,尤其是肝癌复发。

参 考 文 献

[1] Yang AD, Camp ER, Fan F, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res*, 2006,66:46-51.

[2] 艾军华,郑树国,曾永毅,等. 血管内皮生长因子受体-1 对肝癌侵袭转移的影响. *中华消化外科杂志*,2008,7:123-125.

[3] Yi ZY, Feng LJ, Xiang Z, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells. *J Invest Surg*, 2011,24:67-76.

[4] Miyoshi A, Kitajima Y, Kido S, et al. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 2005,92:252-258.

[5] Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival; implications in development and cancer. *Development*, 2005,132:3151-3161.

(收稿日期:2011-08-04)

(本文编辑:杨学文)

超声弹性成像诊断大鼠肝纤维化的价值

林森浩 丁红 毛枫 薛立云 朱虹光 王文平

肝纤维化是各种慢性肝病的重要病理特征,常伴有炎症反应,并可发展为肝硬化^[1]。研究表明,早期的肝纤维化在经过临床干预后可以逆转。因此,早期肝纤维化的诊断对于临床上慢性肝病患者诊疗方案的制定具有重要意义。肝活组织病理检查是诊断肝纤维化的“金标准”,但有一定的局限性,比如出血、取样误差及观察者的主观依赖性等^[2]。无创评估肝纤维化一直是肝病领域的研究热点之一。目前,超声弹性成像如瞬时弹性成像、声脉冲辐射力成像及实时组织弹性成像技术等的研究备受瞩目。本研究对声脉冲辐射力成像及实时组织弹性成像技术在大鼠肝纤维化的诊断价值方面进行探讨,并比较两者的优劣。

一、材料与方法

1. 肝纤维化动物模型的制备: Wistar 大鼠 80 只,雄性,清洁级,体质量为 140~180 g。将大鼠分为实验组 70 只,对照组 10 只。实验组大鼠腹腔腔一次性注射大剂量二甲基亚硝胺(50 mg/kg)制作肝纤维化模型^[3];对照组大鼠腹腔腔一次性注射等量 0.9% NaCl 溶液。然后将大鼠分笼饲养,正常喂食。

2. 超声弹性成像检查: 在造模后第 5、7、10、14、21 和 28 天,从实验组中取 9~10 只大鼠,从对照组中取 1~2 只大鼠,进行声脉冲辐射力成像及实时组织弹性成像检查。检查前大鼠禁食 1 d。

声脉冲辐射力成像检查采用 Siemens Acuson S2000 彩色多普勒超声诊断仪,9L4 线阵探头,频率 4~9 MHz。检查时将探头轻放在大鼠腹壁上,避免额外外力压迫造成结果偏差。先在二维图像上观察到大鼠肝脏最靠近腹壁的中叶位置,然后置换成弹性条件,将取样框置于中叶肝组织位置,避开大血管及叶间裂所在,触发脉冲波,此时屏幕右上方将显示一个反映相应肝组织硬度的剪切波速度 (shear wave velocity, Vs),单位 m/s。

实时组织弹性成像检查采用 Hitachi HI Vision

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2012.11.019

基金项目:国家自然科学基金(30872409);上海市重点学科建设项目(B112)

作者单位:200032 上海,复旦大学附属中山医院超声科 上海市影像医学研究所(林森浩、丁红、毛枫、薛立云、王文平);复旦大学上海医学院病理学系(朱虹光)

通信作者:丁红,Email: ding.hong@zs-hospital.sh.cn