

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.05.016

循环内皮祖细胞计数在肝细胞肝癌中的临床意义

厉倩¹, 洪茂¹, 谭龙益¹, 彭阵雨² (1. 上海市第一人民医院宝山分院 检验科, 上海 200940; 2. 上海市第一人民医院宝山分院 消化内科, 上海 200940)

[摘要] 目的: 探讨循环内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)计数在肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)诊断及预后判断中的价值。方法: 选取2008年1月至2010年12月上海市第一人民医院宝山分院治疗的HCC患者($n=39$)及健康对照者($n=20$), 用淋巴细胞分层液Ficoll分离单个核细胞, 并用CD34-FITC、CD133-PE、VEGF-R2-APC进行荧光标记, 然后以流式细胞仪检测循环CD34⁺CD133⁺VEGF-R2⁺EPCs占外周血单个核细胞的比例, 并分析HCC患者循环中CD34⁺CD133⁺VEGF-R2⁺EPCs比例与临床分期等的病理特征相关性。结果: HCC患者循环CD34⁺CD133⁺VEGF-R2⁺EPCs比例为(0.138±0.05)%, 而健康对照人员循环EPCs比例为(0.027±0.013)%, 前者显著高于后者($P<0.01$)。HCC患者循环CD34⁺CD133⁺VEGF-R2⁺EPCs水平与HCC临床分期呈正相关。结论: HCC患者循环CD34⁺CD133⁺VEGF-R2⁺EPCs比例上调, 且与HCC临床分期相关, 在HCC的诊断和预后判断中可能有重要的价值。

[关键词] 肝细胞肝癌; 循环内皮祖细胞; 流式细胞术

[中图分类号] R735.7; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)05-0548-04

Clinical Significance of circulating endothelial progenitor cells counting in hepatocellular carcinoma

LI Qian¹, Hong Mao¹, TAN Long-yi¹, PENG Zhen-yu² (1. Department of Clinical Laboratory, Shanghai First People's Hospital Baoshan Branch, Shanghai 200940, China; 2. Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital Baoshan Branch, Shanghai 200940, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the clinical significance of circulating endothelial progenitor cells (EPCs) counting in diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** Thirty-nine patients with HCC and 20 healthy individuals were recruited from Shanghai First People's Hospital Baoshan Branch (Jan. 2008 to Dec. 2010) in this study. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by Ficoll density gradient centrifugation, then stained with antibodies against CD34, CD133, VEGFR-2 which were conjugated to FITC, PE and APC respectively. Circulating EPCs were characterized as CD34⁺CD133⁺VEGFR-2⁺ cells and its proportion in peripheral blood mononuclear cells was detected by flow cytometry. Relationship between the proportion of CD34⁺CD133⁺VEGF-R2⁺EPC and clinical stage, etc. of HCC was analyzed. **Results:** The level of circulating CD34⁺CD133⁺VEGF-R2⁺EPCs in HCC patients was significantly higher than that in healthy control (0.138±0.05)%, vs (0.027±0.013)% ($P<0.05$). Furthermore, the level of circulating EPCs in HCC patients was positively correlated to clinical stages. **Conclusion:** Circulating CD34⁺CD133⁺VEGF-R2⁺EPCs proportion is upregulated in HCC patients, and related to clinical stage of HCC, which may be significant in diagnosis and prognosis of HCC.

[Key words] hepatocellular carcinoma; circulating endothelial progenitor cells; flow cytometry

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(5): 548-551]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)恶性程度很高, 确诊时往往已经到了晚期, 患者的生活质量和预后都很差, 在我国居癌症死因第二位^[1]。HCC的又一特点是易复发、易转移, 有非常丰富的新生血管形成^[2]。以往认为肿瘤血管形成主要依靠现有血

[基金项目] 上海市卫生局青年科技基金资助项目(No. 2007Y43)。Project supported by the Science Foundation for Young Scholars of Shanghai Health Bureau (No. 2007Y43)

[作者简介] 厉倩(1980-), 女, 浙江省东阳市人, 硕士, 主要从事肿瘤标志物方面的研究。

[通信作者] 谭龙益(TAN Long-yi, corresponding author), E-mail: aqianmerry@yahoo.com.cn

管网中的内皮细胞出芽,即血管再生^[3],但近年来越来越多的研究^[4,5]表明,骨髓来源的内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)会被动员到外周血中,并进而到达肿瘤局部参与肿瘤血管的形成。EPCs是存在于骨髓和循环外周血的祖细胞亚群,具有在体内外分化为成熟内皮细胞的能力^[6]。本研究应用流式细胞术比较了不同临床分期HCC患者和健康对照者外周血中循环EPCs水平,为循环EPCs在HCC的诊断和预后判断中的价值提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

淋巴细胞分层液(Ficoll)购自GE公司,抗人CD133/1(AC133)-PE及同型对照购自美天旎生物科技有限公司,抗人VEGFR2(KDR)-APC和抗人CD34-FITC及同型对照抗体购自R&D公司。

1.2 病例收集

收集来自上海市第一人民医院宝山分院2008年1月至2010年12月的原发性肝癌患者39例。患者年龄范围33~81岁,中位年龄55岁,其中男性29例、女性10例。HCC分期标准参照2002年美国癌症学会(AJCC)的标准,其中Ⅱ期12例、Ⅲ期12例、Ⅳ期15例。所有病例均在治疗前完成外周血的采集。同时设健康对照20例,其中男性15例、女性5例,年龄范围30~61岁,中位年龄40岁。所有受试者均签署知情同意书,并报医院伦理委员会批准。

1.3 循环EPCs的检测

把EDTA抗凝外周血1ml小心加入1ml淋巴细胞分层液中,水平离心机4℃500×g,20min,收集单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)层,PBS洗涤3次,调整细胞密度至 2×10^6 /ml,加入Fc受体阻断剂,室温孵育15min,加入CD34-FITC、CD133-PE、VEGF-R2-APC各15μl,并设同型对照,4℃孵育30min,洗涤后以流式细胞仪(BD LSR II)检测,计数CD34⁺CD133⁺VEGF-R2⁺细胞,循环EPCs水平以CD34⁺CD133⁺VEGF-R2⁺细胞占外周血PBMC比率表示。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS(v16)软件,以 t 检验,或方差分析 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC患者循环EPCs水平高于健康对照组

如图1所示,将分离得到PBMC荧光标记后用

流式细胞仪进行检测,首先通过对FSC/SSC物理图设门去除细胞碎片、血小板及残留粒细胞,然后根据FITC通道对CD34阳性细胞进一步设门,最后根据PE和APC通道计算CD34、CD133和VEGFR三标记阳性细胞占PBMC中的比率。健康对照者循环EPCs平均水平为 $(0.027 \pm 0.013)\%$,HCC患者循环EPCs平均水平为 $(0.138 \pm 0.05)\%$,两者差异有统计学意义($P < 0.01$)。

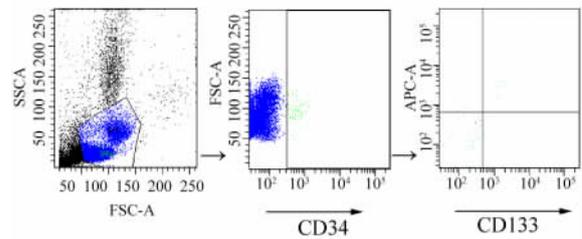


图1 人类外周血中CD34⁺CD133⁺VEGFR-2⁺EPCs的检测
Fig.1 Detection of CD34⁺CD133⁺VEGFR-2⁺EPCs in human peripheral blood

2.2 HCC患者循环EPCs水平与临床分期呈正相关

进一步将HCC患者根据肿瘤大小、有无淋巴结转移、有无远处转移的AJCC分期标准分成Ⅱ期、Ⅲ期、Ⅳ期3组,比较不同组间循环EPCs的水平差异。如表1所示,HCCⅣ期组EPCs水平 $[(0.154 \pm 0.049)\%]$ 高于Ⅱ期组 $[(0.095 \pm 0.042)\%]$,差异有统计学意义($P = 0.045$),而Ⅲ期组 $[(0.125 \pm 0.061)\%]$ 与Ⅱ期组的差异没有统计学意义,但有增高的趋势。而不同年龄、不同性别HCC患者的循环EPCs水平没有显著性差异。以上结果提示,HCC患者循环EPCs水平与临床分期正相关。

3 讨论

自从1997年Asahara等^[4]在人外周血PBMC中发现了EPCs亚群后,越来越多的研究^[5,7-10]证实了EPCs在出生后血管发生中的重要作用。EPCs能够迁移、增殖、分化为成熟内皮细胞,形成血管网络,进而在各种生理、病理条件下发挥重要作用,尤其是与肿瘤血管形成的相关性提示EPCs可能在肿瘤诊断、治疗方面有重要价值^[6]。有关EPCs在肿瘤血管生成中的作用已有多项报道^[7-20],不仅动物实验^[7-9]证明EPCs参与肿瘤血管生成并与肿瘤的转移关系密切,而且在人类肿瘤血管中发现了CD133⁺EPCs,且多种肿瘤患者循环EPCs水平上升,如肺癌^[11-12]、肝癌^[13-14]、乳腺癌^[15]、结直肠癌^[16]、淋巴瘤^[17]、恶性神经胶质瘤^[18-19]和肾癌^[20]。

表 1 HCC 患者临床情况与循环 EPCs 水平的关系(%)

Tab. 1 The level of circulating EPCs and clinical features in patients with HCC (%)

Clinical feature	EPCs	P
Age		0.902
>60(n = 13)	0.135 ± 0.048	
≤60(n = 26)	0.143 ± 0.057	
Gender		0.891
Male(n = 29)	0.146 ± 0.059	
Female(n = 10)	0.134 ± 0.047	
Clinical stage		0.122
II(n = 12)	0.095 ± 0.042	
III(n = 12)	0.125 ± 0.061	
IV(n = 15)	0.154 ± 0.049	0.045

目前,流式细胞术和集落形成实验(colony-forming assay)是评价 EPCs 水平的两个主要手段,这两种手段各有局限性。集落形成实验侧重于 EPCs 的功能评价,而流式细胞术更适合用于 EPCs 的计数。Ho 等^[13]利用集落形成实验发现,肝癌患者的循环 EPCs 水平显著高于肝硬化患者和健康对照者。Yu 等^[14]也利用集落形成实验证实,肝癌患者组外周血中 EPCs 水平高于健康对照组。本研究选择细胞表面分子 CD34、CD133、VEGFR-2 作为 EPCs 的特异性分子标志,利用流式细胞术检测了外周血中 EPCs 水平,其结果与之前利用集落形成实验的两项研究^[13-14]结论一致。本研究发现,HCC 患者的循环 EPCs 水平显著高于健康对照者,且循环 EPCs 水平与肝癌分期正相关。以往研究^[21]表明 HCC AJCC 临床分期与治疗后 3 年生存率密切相关,HCC II 期、III 期、IV a 期的 3 年生存率分别为 60.0%、28.0%、12.1%。因此本研究结果提示,应用流式细胞术对循环 EPCs 进行计数可能是肝癌患者诊断和预后判断的一个理想方法。

在 EPCs 的动员机制中,血管内皮生长因子(vein endothelial growth factor, VEGF)被公认为是相关性最高的细胞因子。循环 EPCs 水平在 VEGF 作用后 24 h 内上升,且多个研究小组证明肿瘤患者外周血中的 VEGF 水平与 EPCs 水平呈正相关^[12,14-15]。

联合检测外周血中的 VEGF 与 EPCs 水平可能有益于 HCC 的病情评估和治疗效果判断。

有研究^[22]表明,治疗前后检测循环 EPCs 水平有利于判断肿瘤患者的治疗反应性。本研究只比较了 HCC 患者治疗前和健康对照者循环 EPCs 水平的差异,如果能进一步收集到 HCC 患者治疗后的标本,对同一患者治疗前后的循环 EPCs 水平进行比较,并进行 3 年生存率、复发率等跟踪随访,将对进一步阐明循环 EPCs 在 HCC 患者的临床意义有重要作用。

总之,循环 EPCs 水平与 HCC 疾病进程相关,应用流式细胞术对循环 EPCs 计数可能为 HCC 的诊断、病情评估和预后判断提供重要依据。

[参考文献]

- [1] Pei Y, Zhang T, Renault V, et al. An overview of hepatocellular carcinoma study by omics-based methods [R]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2009, 41(1): 1-15.
- [2] Fernández M, Semela D, Bruix J, et al. Angiogenesis in liver disease [R]. J Hepatol, 2009, 50(3): 604-620.
- [3] Patenaude A, Parker J, Karsan A. Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization [R]. Microvasc Res, 2010, 79(3): 217-223.
- [4] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. Science, 1997, 275(5302): 964-967.
- [5] Dome B, Dobos J, Tovari J, et al. Circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells: Characterization, mobilization, and therapeutic considerations in malignant disease [R]. Cytometry A, 2008, 73(3): 186-193.
- [6] Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells [R]. Annu Rev Med, 2005, 56(1): 79-101.
- [7] Gao DC, Nolan DJ, Mellick AS, et al. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis [J]. Science, 2008, 319(5860): 195-198.
- [8] Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis [J]. Science, 2003, 300(5622): 1155-1159.
- [9] Goon PK, Lip GY, Boos CJ, et al. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer [R]. Neoplasia, 2006, 8(2): 79-88.
- [10] Yu DC, Chen J, Sun XT, et al. Mechanism of endothelial progenitor cell recruitment into neo-vessels in adjacent non-tumor tissues in hepatocellular carcinoma [J]. BMC Cancer, 2010, 10(4): 435.
- [11] Dome B, Timar J, Dobos J, et al. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer [J]. Cancer Res, 2006, 66(14): 7341-7347.
- [12] Nowak K, Rafat N, Belle S, et al. Circulating endothelial progenitor cells are increased in human lung cancer and correlate with stage of disease [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2010, 37(4):

- 758-763.
- [13] Ho JW, Pang RW, Lau C, et al. Significance of circulating endothelial progenitor cells in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2006, 44(4): 836-843.
- [14] Yu D, Sun X, Qiu Y, et al. Identification and clinical significance of mobilized endothelial progenitor cells in tumor vasculogenesis of hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(13): 3814-3824.
- [15] Furstenberger G, von Moos R, Lucas R, et al. Circulating endothelial cells and angiogenic serum factors during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(4): 524-531.
- [16] Willett G, Boucher Y, di Tomaso E, et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer [J]. *Nat Med*, 2004, 10(2): 145-147.
- [17] Igreja C, Courinha M, Cachaco AS, et al. Characterization and clinical relevance of circulating and biopsy-derived endothelial progenitor cells in lymphoma patients [J]. *Haematologica*, 2007, 92(4): 469-477.
- [18] Zheng PP, Hop WC, Luider TM, et al. Increased levels of circulating endothelial progenitor cells and circulating endothelial nitric oxide synthase in patients with glioma [J]. *Ann Neurol*, 2007, 62(1): 40-48.
- [19] Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, et al. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients [J]. *Cancer cell*, 2007, 11(1): 83-95.
- [20] Bhatt RS, Zurita AJ, O' Neill A, et al. Increased mobilisation of circulating endothelial progenitors in von Hippel-Lindau disease and renal cell carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(1): 112-127.
- [21] Zhou XD. Recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma: Progress and prospects [R]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2002, 1(1): 35-41.
- [22] Farace F, Gross-Goupil M, Tournay E, et al. Levels of circulating CD45(dim)CD34(+)VEGFR2(+) progenitor cells correlate with outcome in metastatic renal cell carcinoma patients treated with tyrosine kinase inhibitors [J]. *Br J Cancer*, 2011, 104(7): 1144-1150.
- [收稿日期] 2011 - 08 - 05 [修回日期] 2011 - 09 - 20
[本文编辑] 韩丹

· 编者 · 作者 · 读者 ·

抵制不端行为, 净化学术风气

学术不端行为是指在科学研究和学术活动中的各种造假、抄袭、剽窃和其他违背科学共同体惯例的行为。为抵制学术不端行为, 净化学术风气, 中国科协在 2007 年 1 月发布了《科技工作者科学道德规范(试行)》规范, 规范中将学术不端行为概括为以下 7 条:

1. 故意陈述错误, 捏造数据或结果, 破坏原始数据的完整性, 篡改实验记录和图片, 在项目申请、成果申报、求职和提职申请中做虚假的陈述, 提供虚假获奖证书、论文发表证明、文献引用证明等。
2. 侵犯或损害他人著作权, 故意省略参考他人出版物, 抄袭他人作品, 篡改他人作品的内容; 未经授权, 利用被自己审阅的手稿或资助申请中的信息, 将他人未公开的作品或研究计划发表或透露给他人或为己所用; 把成就归功于对研究没有贡献的人, 将对研究工作做出实质性贡献的人排除在作者名单之外, 僭越或无理要求著者或合著者身份。
3. 成果发表时一稿多稿。
4. 采用不正当手段干扰和妨碍他人研究活动, 包括故意毁坏或扣压他人研究活动中必需的仪器设备、文献资料, 以及其他与科研有关的财物; 故意拖延对他人项目或成果的审查、评价时间, 或提出无法证明的论断; 对竞争项目或成果的审查设置障碍。
5. 参与或与他人合谋隐匿学术劣迹, 包括参与他人的学术造假, 与他人合谋隐藏其不端行为, 监察失职, 以及对投诉人打击报复。
6. 参加与自己专业无关的评审及审稿工作; 在各类项目评审、机构评估、出版物或研究报告审阅、奖项评定时, 出于直接或间接或潜在的利益冲突而作出违背客观、准确、公正的评价; 绕过评审组织机构与评议对象直接接触, 收取评审对象的馈赠。
7. 以学术团体、专家的名义参与商业广告宣传。

(本刊编辑部)