

基质金属蛋白酶-2和血管内皮生长因子在肝癌肝移植受体的表达和意义

曾纪晓¹, 夏慧敏¹, 朱德力¹, 何晓顺^{2*}, 马毅²

(1.广州市妇女儿童医疗中心普通外科,广东广州 510120;2.中山大学附属第一医院器官移植科,广东广州 510080)

摘要:【目的】探讨基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和血管内皮生长因子(VEGF)在肝癌肝移植受体中的表达和意义。【方法】肝移植受体分为4组:供体组($n=60$),肝硬化组($n=60$),肝癌无癌栓组($n=45$)和肝癌有癌栓组($n=35$),分别用ELISA法测定4组血MMP-2和VEGF浓度;荧光定量PCR法测定4组肝脏标本MMP-2 mRNA和VEGF mRNA的表达量。肝癌受体接受肝移植术后,随访了解肿瘤的复发情况,并测定血MMP-2、VEGF浓度。【结果】供体组、肝硬化组、HCC无癌栓组和HCC有癌栓组的MMP-2浓度(ng/mL)分别为 7.2 ± 2.5 、 30.3 ± 19.5 、 84.5 ± 45.3 和 151.6 ± 83.6 ($P < 0.01$);4组VEGF浓度(pg/mL)分别为 155.6 ± 21.7 、 200.3 ± 73.9 、 283.7 ± 104.3 和 371.1 ± 99.3 ($P < 0.01$);供体组、肝硬化组、HCC无癌栓组和HCC有癌栓组的MMP-2 mRNA表达量(对数值)分别为 4.9 ± 1.3 、 7.2 ± 5.5 、 11.2 ± 7.6 和 19.0 ± 9.2 拷贝数/ μL ($P < 0.01$);4组VEGF mRNA表达量(对数值)分别为 11.4 ± 2.1 、 13.5 ± 6.3 、 19.7 ± 8.4 和 24.7 ± 11.8 拷贝数/ μL ($P < 0.01$)。肝癌有癌栓组肝移植术后肿瘤复发率为66.67%,高于无癌栓组($P < 0.01$)。【结论】MMP-2和VEGF在肝癌肝移植受体呈高表达,与肿瘤的侵袭和转移行为密切相关,可作为肝癌肝移植受体选择和术后随访评判复发风险的因素。

关键词: 肝细胞癌;肝移植;基质金属蛋白酶;血管内皮生长因子

中图分类号:R617,R657

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2013)02-0262-04

Expression and Clinical Significance of MMP-2 and VEGF in Recipients of Hepatocellular Carcinoma Accepted Liver Transplantation

ZENG Ji-xiao¹, XIA Hui-min¹, ZHU De-li¹, HE Xiao-shun^{2*}, MA Yi²

(1. Department of General Surgery, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510120, China; 2. Department of Organ Transplantation, The First Affiliated Hospital of Sun-Yat Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstracts: 【Objective】 To investigate the expression and clinical significance of MMP-2 and VEGF in recipient of HCC accepted orthotopic liver transplantation (OLT). 【Methods】 Recipients were divided into 4 groups: the donor group ($n=60$), liver fibrosis group ($n=60$), HCC without tumor thrombi group ($n=45$) and HCC with tumor thrombi group ($n=35$). The serum concentration of MMP-2 and VEGF were assayed by ELISA. The expression of MMP-2 mRNA and VEGF mRNA in liver of patients were detected by fluorescent quantization polymerase chain reaction. Recipient of HCC were followed after accepted OLT and the serum concentration of MMP-2 and VEGF were assayed by ELISA. 【Results】 The serum concentration of MMP-2 were 7.2 ± 2.5 , 30.3 ± 19.5 , 84.5 ± 45.3 , and 151.6 ± 83.6 ng/mL ($P < 0.01$) in the donor group, liver fibrosis group, HCC without tumor thrombi group and HCC with tumor thrombi group. The serum concentration of VEGF were 155.6 ± 21.7 , 200.3 ± 73.9 , 283.7 ± 104.3 , and 371.1 ± 99.3 pg/mL ($P < 0.01$) in the 4 groups. The expression of MMP-2 mRNA were 4.9 ± 1.3 , 7.2 ± 5.5 , 11.2 ± 7.6 , and 19.0 ± 9.2 copy number/ μL logarithm value in the 4 groups, the expression of VEGF mRNA were 11.4 ± 2.1 , 13.5 ± 6.3 , 19.7 ± 8.4 , and 24.7 ± 11.8 copy number/ μL logarithm value in the 4 groups ($P < 0.01$). The recurrence rate of carcinoma in recipient of HCC with tumor thrombi was 66.67%, higher than HCC without tumor thrombi after OLT ($P < 0.01$). 【Conclusion】 The expression of MMP-2 and VEGF are highly correlated with invasion and metastasis in recipients of HCC accepted OLT, which may serve as a parameter for determining tumor metastasis and prognosis. It may be a new idea to choose and supervise the recipient of HCC for OLT.

Key words: hepatocellular carcinoma; liver transplantation; matrix metalloproteinase; vascular endothelial growth factor

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(2):262-265]

收稿日期:2012-09-29

基金项目:广东省医学科研基金(A2012509)

作者简介:曾纪晓,博士,副主任医师,研究方向:小儿普通外科,E-mail:zengjixiao@gmail.com; *何晓顺,通信作者,教授,博士生导师,E-mail:gdtc@163.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是原位肝移植(orthotopic liver transplantation, OLT)的适应证之一,但术后HCC复发和转移严重影响受体的长期存活^[1-3]。基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase, MMP-2)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是反映HCC复发和转移的常用分子标记物^[4-8],有关MMP-2、VEGF在HCC肝移植受体中的表达和意义未见报道。本研究检测HCC肝移植受体中MMP-2、VEGF的表达,并分析两者在HCC肝移植受体的选择和术后随诊中的意义。

1 材料与方 法

1.1 主要材料和实验分组

标本来源:选择2005年11月至2009年1月中山大学附属第一医院移植科成功接受肝移植手术后出院的移植受体共140例,病毒性乙型肝炎后肝硬化受体60例,CT检查排除合并原发性HCC等病变;HCC受体80例,术前常规行CT检查,以排除门静脉主干或主要分支癌栓、肝静脉主干癌栓、下腔静脉癌栓和肝外肿瘤转移,按CT检查是否有癌栓分为2组:HCC无癌栓组($n=45$);HCC有癌栓组($n=35$)。肝移植供体60例,实验室检测排除各类肝炎、肝硬化和肿瘤等。

实验对象分为4组:对照(供体)组($n=60$),肝硬化组($n=60$),HCC无癌栓组($n=45$),HCC有癌栓组($n=35$)。供肝修剪术中,常规取左叶边缘 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 大小肝脏标本;受体于肝脏切除术后,肝硬化受体常规取左叶边缘 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 大小肝脏标本,HCC受体取肿瘤标本 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 大小。

小鼠抗人MMP-2、VEGF ELISA试剂盒(博士德,中国),Trizol RNA提取试剂盒(Invitrogen, USA),Bio-Rad450酶标仪(Coulter, USA),引物和探针由上海博亚生物公司合成。

1.2 ELISA法测定各组血清MMP-2、VEGF浓度

供、受体术前0.5 h静脉采血,无菌EP管收集标本5 mL,常温下静置30 min,4 000 r/min($r=15\text{ cm}$)离心5 min,收集上清后 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存,按试剂盒操作流程测定血MMP-2、VEGF浓度。

1.3 荧光定量PCR法检测肝脏MMP-2 mRNA、VEGF mRNA的表达量

引物和探针:MMP-2 F:5'-TTGATGGCATCG CTCAGATC-3', MMP-2 R:5'-TGTCACGTGGCGT CACAGT-3', VEGF F:5'-GCGAGGCCACGGCTTA T-3', VEGF R:5'-TGAGTTGAGGTTGGCCTGTTC-3', GAPDH F:5'-GAAGCTGAAGGTCCGAGTC-3', GAPDH R:5'-GAAGATGGTGATGGGATTTCC-3', MMP-2 Probe 5'-FAM-CGCCAAATGAACCGG TC CTTGAAG -TAMARA -3', VEGF Probe 5'-FAM-AAGCAAAGATCTGGAGGAGCAGT-TAMARA -3', GAPDH Probe 5'-FAM -CAAGCTTCCCGTT CTCAGCC-TAMARA-3'。逆转录反应条件:93 $^{\circ}\text{C}$ 3 min 预变性,93 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,共35个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。反应后取8 μL PCR扩增产物用2%的琼脂糖凝胶进行电泳。阳性定量模板(GAPDH)按倍比稀释而成。扩增反应条件为:93 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,93 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共40个循环。

1.4 HCC受体肝移植术后随访

HCC受体出院后定期随访,第1个月每周复诊1次,第2个月1~2周复诊1次,此后每月复诊。HCC受体肝移植术后自第2个月起,每个月行肝脏B超检查,若有异常行CT扫描。CT证实有HCC复发、转移者,检测其血MMP-2、VEGF浓度。检测同期HCC无复发、转移的肝移植受体血MMP-2、VEGF浓度($n=30$),健康对照组($n=50$)为健康体检者。

1.5 统计学方法

数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验和方差分析,率的比较采用卡方检验。采用SPSS 11.0软件包, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HCC受体术前血浆MMP-2、VEGF的浓度

HCC无癌栓组和有癌栓组血MMP-2浓度高于供体组($P < 0.01$)和肝硬化组($P < 0.05$, $P < 0.01$),有癌栓组MMP-2浓度高于无癌栓组($P < 0.01$)。HCC无癌栓组和有癌栓组血VEGF浓度高于供体组($P < 0.01$)和肝硬化组($P < 0.01$),有癌栓组VEGF浓度高于无癌栓组($P < 0.01$,表1)。

2.2 HCC受体肝癌组织中MMP-2 mRNA、VEGF mRNA的表达量

表 1 HCC 肝移植受体血 MMP-2、VEGF 浓度和肿瘤 MMP-2 mRNA、VEGF mRNA 的表达量

Table 1 The expression of MMP-2 mRNA and VEGF mRNA in HCC tissues and the concentration of serum MMP-2 and VEGF in patients of HCC accepted OLT

Groups	n	MMP-2/(ng/mL)	VEGF/(pg/mL)	MMP-2mRNA/(lg copies/ μ L)	VEGF mRNA/(lg copies/ μ L)
Donor	60	7.2 \pm 2.5	155.6 \pm 21.7	4.9 \pm 1.3	11.4 \pm 2.1
Liver fibrosis	60	30.3 \pm 19.5 ¹⁾	200.3 \pm 73.9 ¹⁾	7.2 \pm 5.5 ¹⁾	13.5 \pm 6.3 ¹⁾
HCC without tumor thrombi	45	84.5 \pm 45.3 ²⁾	283.7 \pm 104.3 ²⁾	11.2 \pm 7.6 ²⁾	19.7 \pm 8.4 ²⁾
HCC with tumor thrombi	35	151.6 \pm 83.6 ³⁾	371.1 \pm 99.3 ³⁾	19.0 \pm 9.2 ³⁾	24.7 \pm 11.8 ³⁾

One-Way ANOVA, compared with the control group, 1) $P < 0.05$, compared with the liver fibrosis group and the control group, 2) $P < 0.01$; compared with HCC without tumor thrombi group, the liver fibrosis group and the control group, 3) $P < 0.01$

HCC 无癌栓组和有癌栓组 MMP-2 mRNA 表达量高于供体组 ($P < 0.01$) 和肝硬化组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 有癌栓组 MMP-2 mRNA 表达量高于无癌栓组 ($P < 0.01$)。HCC 无癌栓组和有癌栓组 VEGF mRNA 表达量高于供体组 ($P < 0.01$) 和肝硬化组 ($P < 0.01$), 有癌栓组 VEGF mRNA 表达量高于无癌栓组 ($P < 0.01$, 表 1)。

2.3 HCC 受体随诊结果

80 例 HCC 受体接受肝移植后均痊愈出院, 随诊 3 ~ 31 个月不等。HCC 无癌栓组 ($n = 45$), 7 例失访, 9 例肿瘤复发、转移 (23.68%); HCC 有癌栓组 ($n = 35$), 5 例失访, 20 例发生复发、转移 (66.67%)。HCC 有癌栓组肝移植术后肿瘤复发率为 66.67%, 高于无癌栓组 ($P < 0.01$)。HCC 无复发组血 MMP-2 浓度高于对照组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), HCC 复发组血 MMP-2 浓度高于对照组和无复发组 ($P < 0.01$)。HCC 无复发组血 VEGF 浓度高于对照组 ($P < 0.05$), HCC 复发组血 VEGF 浓度高于对照组和无复发组 ($P < 0.01$, 表 2)。

3 讨 论

肝移植作为 HCC 的治疗方法已广为认可, 近年来研究结果显示超过 Milan 标准的 HCC 肝移植同样取得良好的效果^[1-3, 9]。我国是 HCC 的高发国家, HCC 病人的占肝移植病例的 40%, 并且肿瘤的分期和进展程度比西方差, 为挽救患者生命, 在一定时期内 HCC 患者作为肝移植的适应人群亦有扩大^[3]。本中心将术前证实有癌栓但排除肝脏主要血管癌栓和肝外肿瘤转移的 HCC 患者, 列入受体名单, 这一努力和尝试有助于总结我国 HCC 肝

表 2 HCC 受体肝移植术后血 MMP-2、VEGF 的变化

Table 2 The concentration of serum MMP-2 and VEGF in patients of HCC after OLT

Group	n	MMP-2/(ng/mL)	VEGF/(pg/mL)
The control group	50	8.3 \pm 3.7	137.4 \pm 40.1
HCC without recurrence group	38	16.9 \pm 10.6 ³⁾	214.1 \pm 112.7 ¹⁾
HCC recurrence group	29	171.8 \pm 40.4 ⁴⁾	402.3 \pm 160.6 ²⁾

One-Way ANOVA, compared with the control group, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, 3) $P > 0.05$, 4) $P < 0.01$

移植的经验。

HCC 肝移植术后肿瘤的复发和转移, 大大降低了肝移植的疗效^[1-3, 9]。HCC 的复发和转移是一个多环节、复杂的过程。MMP-2 和 VEGF 是公认的反映 HCC 浸润、复发和转移的分子标记物^[4-8]。本研究结果显示肝癌组 MMP-2、VEGF 的浓度均高于肝硬化组和对照组, 有癌栓组受体血浆 MMP-2、VEGF 浓度高于无癌栓组。

本研究表明肝硬化肝移植受体的血 MMP-2 浓度明显高于正常人群, 显示血清 MMP-2 浓度与肝硬化之间存在一定的因果关系。肝纤维化病变进展可引起肝小叶改建, 导致肝硬化。MMP 及其抑制物的平衡在肝纤维化过程中起至关重要的作用^[4]。血清 MMP-2 水平与门静脉坏死及肝纤维化程度有关^[10]。MMP 是一类能降解 ECM 的内肽酶家族, 在血管生成过程中的基底膜降解、细胞运动和管腔形成中起重要作用, 与 HCC 的侵袭和转移关系密切^[4-6, 8]。本研究结果显示, MMP-2 在 HCC 受体中呈高表达, 明显高于正常人群和肝硬化受体; HCC 合并癌栓患者的血 MMP-2 浓度要高于无癌栓者, 说明 MMP-2 与 HCC 浸润生长、肿瘤的血管生成和转移过程关系密切。VEGF 是目前所知

作用最强的一种促血管生长因子^[4,7,11]。Poon 等^[11]发现 HCC 患者血清 VEGF > 245 ng/L 提示预后较差,无瘤生存率低,多因素分析提示 VEGF 是判断预后的独立危险因素。HCC 侵犯大血管是 HCC 肝移植预后的独立危险因素之一^[3]。血管的再生和血窦的毛细血管化可发生于肝炎病毒感染所致的慢性炎症,可以预见 VEGF 可能在肝硬化患者中有所增加^[12]。本研究表明 VEGF 在肝硬化和 HCC 受体中均呈高表达,其中 HCC 受体血 VEGF 浓度明显高于正常人群和肝硬化受体;HCC 合并癌栓受体血 VEGF 浓度要高于无癌栓者,可以认为 VEGF 与 HCC 的进展和血管转移有关,对肝癌的浸润和转移起作用,是衡量 HCC 生长、转移的重要指标。

本实验中进一步运用荧光定量 PCR 法检测各组受体肝脏 MMP-2 和 VEGF mRNA 的表达水平。结果显示各组血浆 MMP-2、VEGF 的水平与肝组织中 MMP-2 mRNA、VEGF mRNA 的过度表达是一致的,提示 HCC 和肝硬化受体血 MMP-2、VEGF 增高系肝脏组织产生过多并释放入血液所致。对 HCC 肝移植术后受体随诊,结果显示有癌栓组 HCC 受体肿瘤复发率明显高于无癌栓组,提示 HCC 合并癌栓患者不是肝移植的合适受体。随诊进一步发现肿瘤复发时,受体血 MMP-2、VEGF 浓度高于正常人群和无复发者,可以监测肿瘤是否复发。

本研究结果表明 MMP-2、VEGF 可作为预测 HCC 肝移植术后复发、转移的生物学指标, MMP-2、VEGF 基因表达水平较高的 HCC 行肝移植术后预后差,复发率高。此外,实验结果还表明, MMP-2 与 VEGF 表达水平平均上调的 HCC 患者复发、转移潜能很大,而 MMP-2 与 VEGF 表达水平平均不高的 HCC 患者复发、转移潜能较小,因此将 MMP-2 与 VEGF 的检测结合起来分析,更有助于 HCC 肝移植受体的选择和移植术后预后的判断。

参考文献:

- [1] Washburn K, Half G. Hepatocellular carcinoma and liver transplantation [J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2011, 16(3): 297-300.
- [2] Castroagudín JF, Molina E, Bustamante M, et al. Orthotopic liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a thirteen-year single-center experience [J]. *Transplant Proc*, 2008, 40(9): 2975-2977.
- [3] Zheng SS, Xu X, Wu J, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Hangzhou experiences [J]. *Transplantation*, 2008, 85(12): 1726-1732.
- [4] Yang JD, Nakamura I, Roberts LR. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: current status and therapeutic targets [J]. *Semin Cancer Biol*, 2011, 21(1): 35-43.
- [5] Matsunaga Y, Koda M, Murawaki Y. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in hepatocellular carcinoma tissue, compared with the surrounding non-tumor tissue [J]. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 2004, 115-116: 143-150.
- [6] Ogasawara S, Yano H, Momosaki S, et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in cultured hepatocellular carcinoma (HCC) cells and surgically resected HCC tissues [J]. *Oncol Rep*, 2005, 13(6): 1043-1048.
- [7] Amaoka N, Saio M, Nonaka K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors is closely related to the histological grade of hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2006, 6(1): 3-10.
- [8] Altadill A, Rodríguez M, González LO, et al. Liver expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in hepatocellular carcinoma [J]. *Dig Liver Dis*, 2009, 41(10): 740-748.
- [9] Ravaioli M, Grazi GL, Piscaglia F, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: results of down-staging in patients initially outside the Milan selection criteria [J]. *Am J Transplant*, 2008, 8(12): 2547-2557.
- [10] Boeker KH, Haberkorn CI, Mebets D, et al. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as matrix of liver fibrosis in patient with chronic hepatitis C [J]. *Clin Chim Acta*, 2004, 316(1/2): 71-811.
- [11] Poon R T, Ho J W, Tong C S, et al. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Br J Surg*, 2004, 91(10): 1354-1360.
- [12] Amarapurkar AD, Amarapurkar DN, Vibhav S, et al. Angiogenesis in chronic liver disease [J]. *Ann Hepatol*, 2007, 6(3): 170-173.

(编辑 刘清海)