

非 HBV 感染型与 HBV 感染型原发性肝细胞癌病理特征分析

徐琛¹, 何湘漪², 张海兵², 沈斌², 余胜²

(1. 湖州市妇幼保健院, 浙江 湖州 313000; 2. 湖州市中心医院, 浙江 湖州 313000)

摘要: [目的] 探讨非 HBV 感染型和 HBV 感染型原发性肝细胞癌病理学特征的差异。[方法] 回顾性分析 89 例经手术切除并病理证实肝细胞性肝癌患者病理资料, 包括肿块大小、病灶数目、包膜完整性、卫星灶、细胞分化程度及 AFP、CD34、p53、Ki-67 等免疫组化染色病理学特征与 HBV 感染的相关性, 对各病理特征进行单因素 χ^2 检验和多因素 Logistic 回归分析。[结果] 89 例患者中, 25 例为非 HBV 感染型, 占 28.09%。单因素分析显示, 肿块大小、包膜完整性、卫星灶、细胞分化程度、AFP 及 CD34 在 HBV 感染组和非感染组间差异有统计学意义; 多因素 Logistic 分析结果显示, 肿块大小 ($\chi^2=10.360, P<0.01$)、Edmondson 分级 ($\chi^2=6.671, P=0.01$)、CD34 ($\chi^2=6.671, P<0.05$) 及 AFP ($\chi^2=7.638, P=0.01$), 两组间差异具有独立性。[结论] 非 HBV 感染型较 HBV 感染型原发性肝细胞癌具有就诊时肿块较大和相对完整的包膜、较高的分化程度、CD34 和 AFP 低表达等相对独特的病理特征。

关键词: 原发性肝癌; 肝细胞肝癌; 乙型肝炎病毒; 病理特征

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)08-0672-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.08.B005

Pathologic Characteristics of Non-HBV Related and HBV Related Primary Hepatocellular Carcinoma

XU Chen¹, HE Xiang-yi², ZHANG Hai-bing², et al.

(1. Huzhou Maternal and Child Healthcare Center, Huzhou 313000, China; 2. Huzhou Central Hospital, Huzhou 313000, China)

Abstract: [Objective] To compare the pathologic characteristics of non-HBV related primary hepatocellular carcinoma (PHC) with HBV related PHC. [Methods] The clinicopathological characteristics of 89 cases with pathologically confirmed PHC, including 25 non-HBV related cases and 64 HBV related cases, were retrospectively analyzed. The pathological data including tumor size, number of lesions, capsule integrity, satellite lesions, cell differentiation and AFP, CD34, p53, Ki-67 in immunohistochemistry, and the relationship of clinicopathological characteristics with HBV infection were analyzed by univariate and multivariate regression analysis. [Results] The univariate analysis showed that there were significant differences in tumor size, capsule integrity, satellite lesions, cell differentiation, AFP and CD34 levels between the two groups. Multivariate logistic analysis showed that the tumor size ($\chi^2=10.360, P<0.01$), Edmondson grading ($\chi^2=6.671, P=0.01$), CD34 ($\chi^2=6.671, P=0.01$) and AFP ($\chi^2=7.638, P=0.01$) were the independent factors associated with HBV related PHC. [Conclusion] Compared with HBV related PHC, non-HBV related PHC has the unique pathological features of larger tumor size, relatively complete capsule, the higher degree of differentiation and lower expression of CD34 and AFP.

Subject words: primary liver cancer; hepatocellular carcinoma; HBV; pathological feature

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)为高度恶性肿瘤, 约占所有人类肿瘤的 6%, 也是世界范围内

基金项目: 湖州市科技计划项目(2014GYB-02); 湖州市科技计划项目(2015GYB-04)

通讯作者: 张海兵, 主任医师, 硕士; 湖州市中心医院介入放疗科, 浙江省湖州市吴兴区红旗路 198 号(313000); E-mail: zhbzjh@126.com

收稿日期: 2016-12-02; **修回日期:** 2017-01-11

主要的致死原因之一^[1,2]。在我国, PLC 中 90% 为原发性肝细胞癌(primary hepatocellular carcinoma, PHC), 且与病毒性乙型肝炎的感染高度相关, 乙型肝炎病毒通过多个方面影响肝细胞癌的发生发展及预后。但据 2014 年中国 CDC 统计显示, 我国乙肝流行性下降趋势十分明显, 非 HBV 感染型原发性肝

胞癌比例正逐年上升^[1]。与 HBV 感染型肝细胞癌相比,非 HBV 感染型肝细胞癌因无乙型肝炎病毒的致病作用,在病理特征、生物学行为及预后等方面可能存在差异,进一步探索非 HBV 感染型肝细胞癌的病理特征,为患者提供更加合适的诊治方法、准确的预后判断及随访指导意见。本文回顾性分析湖州市中心医院接受手术治疗 89 例肝细胞癌患者的病理资料,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2012 年 1 月至 2015 年 12 月就诊于湖州市中心医院行首次手术切除的原发性肝癌患者的临床及病理资料,入组标准:(1)术前均行血清乙型肝炎标志物检测;(2)HBV 感染诊断标准依据 2015 版《慢性乙型肝炎防治指南》;(3)组织病理学诊断为肝细胞肝癌;(4)既往无肝脏手术及肝移植病史;(5)术前无相关抗肿瘤治疗;(6)无甲肝、丙肝、戊肝及艾滋病史。符合标准者共 89 例,其中非 HBV 感染型 25 例(28.1%);男性 13 例,女性 12 例,年龄 41~68 岁;HBV 感染型 64 例(71.9%);男性 45 例,女性 19 例,年龄 31~78 岁。

1.2 研究方法

以 2011 版《原发性肝癌规范化病理诊断方案专家共识》^[2]为标准,整理并记录大体标本特征(肿瘤大小、病灶数目),镜下所见(包膜情况、卫星灶、病理分级),免疫组化检测(CD34、Ki-67、P53、AFP)等结果,行单因素分析后将具有统计学意义的指标纳入 Logistic 回归模型进行多因素分析,比较上述病理特征与 HBV 感染之间的关系。

1.3 免疫组化染色

鼠抗人 CD34 单克隆抗体、鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体、鼠抗人 P53 单克隆抗体、鼠抗人 AFP 单克隆抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。运用 Envision 二步法染色,实验步骤按试剂盒说明进行,并以 PBS 溶液代替一抗为阴性对照。

1.4 判读标准

计数 10 个高倍镜视野的抗原定位正确的细胞数,取平均值>15%为阳性。Ki-67、p53、AFP 均以肿瘤细胞质或细胞核出现棕黄色颗粒为阳性。CD34

阳性为在肿瘤组织中的特征性微血管内皮染色。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件包对数据进行统计分析,单因素分析运用 χ^2 检验,多因素分析运用 Logistic 回归模型, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体标本

非 HBV 感染型组中:小肝癌($\leq 3\text{cm}$)为 9 例,占 36.0%,单发病灶 22 例,占 88.0%;HBV 感染型组中小肝癌 45 例,占 70.3%,单发病灶 45 例,占 70.3%,单因素分析显示两组间肿块大小(小肝癌和非小肝癌)差异具有统计学意义($P<0.001$)。见 Table 1。

Table 1 The pathological characteristics of HBV related and Non-HBV related PHC

Characteristic	HBV (n=64)	Non-HBV (n=25)	χ^2	P
Gross specimen				
Tumor size(cm)				
≤ 3	45	9	8.77	<0.001
> 3	19	16		
Number of tumor				
=1	45	22	2.99	0.08
> 1	19	3		
Seen in microscope				
Tumor capsul				
Complete	31	20	7.24	0.01
Incomplete	33	5		
Satellite lesions				
Yes	24	3	5.47	0.02
No	40	22		
Edmondson				
I ~ II	21	21	18.69	<0.001
II ~ IV	43	4		
Immunohistochemical				
CD34				
+	43	5	15.93	<0.001
-	21	20		
Ki-67				
+	44	13	2.16	0.14
-	20	12		
p53				
+	25	11	0.18	0.67
-	39	14		
AFP				
+	43	3	21.68	<0.001
-	21	22		

2.2 镜下所见

单因素分析提示 HBV 感染组较非 HBV 感染组包膜不完整 (包括无包膜) 及卫星结节 (癌旁组织中出现的肉眼或显微镜下的小癌灶) 比例高,以 Edmondson 分级评价原发性肝细胞肝癌分化程度:非 HBV 感染型较 HBV 感染型原发性肝癌分化程度高。见 Table 1,Figure 1。

2.3 免疫组化结果

非 HBV 感染型组和 HBV 感染型组比较,两组间 Ki-67、p53 表达差异无统计学意义,但 CD34 及 AFP 在非 HBV 感染组中呈低表达($P<0.001$)。见 Table 1,Figure 2。

2.4 多因素分析

将上述单因素分析提示两组间具有统计学差异的因素行 Logistic 回归分析,显示两组间肿块大小 ($\chi^2=10.360, P<0.01$)、Edmondson 分级 ($\chi^2=6.671, P<0.05$)、CD34 表达 ($\chi^2=6.671, P<0.05$) 及 AFP 表达 ($\chi^2=7.638, P<0.01$) 具有独立的差异。见 Table 2。

3 讨 论

PHC 的常见病因包括病毒性肝炎、黄曲霉菌污染、遗传等因素,其中乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的感染与 PHC 关系最为密切^[3]。但随着乙肝疫苗的普及和人们饮食习惯及环境的改变,乙肝病毒感染患者逐渐减少;另外,近年来,代谢异常与 PHC 的关系受到重视,如肥胖、胰岛素抵抗、II 型糖尿病相关的非酒精性脂肪性肝病和 PHC 密切相关,特别在无肝硬化的非酒精性脂肪性肝病中,PHC 的比例远高于其他因素,因此,越来越多的非乙肝患者罹患肝癌^[4,5]。霍宏蕾等^[1]研究结果显示,PHC 患者中 HBV 相关所占比例由 1999 年的 89.81% 下降为 2009 年的 70.72%,可能与抗病毒治疗的开展有关。本研究回顾性资料显示,PHC 中 71.9% 为 HBV 感染型,而 28.1% 的 PHC 患者为非 HBV 感染型,与上述结果相似,但高于既往的统计资料^[3]。非 HBV 感染的 HCC 患者因无乙肝病毒的致癌作用,其肿瘤病理特征及生物学行为与 HBV 感染的 HCC 可能存在差异。本研究资料结果显示,非 HBV 感染型原发性肝癌中小肝癌患者比例较 HBV 感染型性少,可能原因与乙肝患者定期的随访复查,特别是腹部超声

Table 2 Logistic regression analysis of HBV related and non-HBV related PHC on the pathological characteristics

Pathological characteristics	β	χ^2	P	OR (95%CI)
Tumor capsule	-0.68	0.18	0.68	0.51 (0.02~12.08)
Edmondson	2.53	6.67	0.01	12.59 (1.84~85.00)
Satellite lesions	1.99	1.38	0.24	7.30 (0.26~201.8)
Tumor size	-6.00	10.36	0.00	2.00×10^{-2} ($6.43\times10^{-5}\sim0.10$)
CD34	3.60	1.41	0.01	36.84 (2.34~579.92)
AFP	2.97	7.63	0.01	19.47 (2.37~159.93)

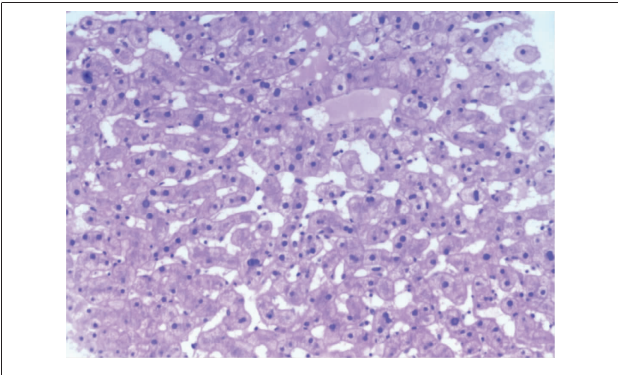


Figure 1 Primary hepatocellular carcinoma by microscope(HE×200)

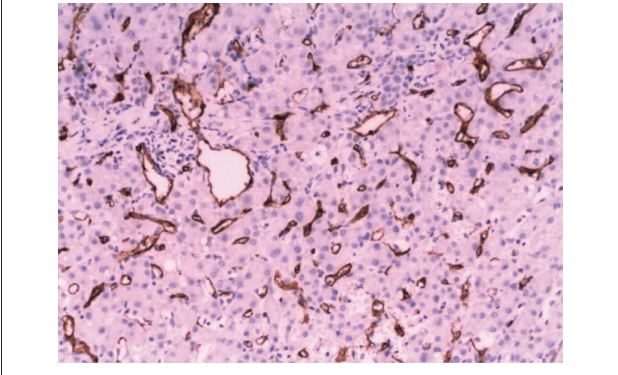


Figure 2 CD34 positive in primary hepatocellular carcinoma (Envision, ×200)

检查及血清甲胎蛋白(AFP)的普及有关,更易早期发现无症状小肝癌患者,而非乙肝患者常因肝癌的隐匿性,待有明显症状就诊时病灶已较大。HCC 有多中心发生倾向,且与病毒感染密切相关。本研究资料显示,瘤灶数目非 HBV 感染型与 HBV 感染型两组之间无明显差异,可能与病例数较少有关;另外本组资料均为接受手术患者,可能存在因多病灶无法手术的患者被排除在外等因素。肿瘤细胞分化差及包膜不完整是肿瘤生物学特性恶性转化的重要标志。Xie 等^[6]研究报道,与非 HBV 感染的肝癌相比,HBV

相关肝癌肿瘤细胞分化程度低、预后差,且染色体的稳定性较低。刘杨安等^[7]研究报道,无肿瘤包膜肝细胞癌比有包膜的肝细胞癌分化程度更低,且更易发生血管侵犯,术后复发率更高,总生存率更差。本研究结果显示,非 HBV 感染型肝癌较 HBV 感染型原肝癌包膜完整、分化程度高,特别是 Edmondson 分级经多因素分析后仍具有独立的差异。存在上述差别的可能原因是乙肝病毒独立的致癌作用,HBV 促进肝癌细胞细胞周期各期的过渡、缩短细胞周期从而导致肝癌细胞的快速生长和增殖^[8,9]。肿瘤卫星结节的形成与细胞分化程度及肿瘤大小密切相关,且有卫星结节的患者更容易复发转移,是总生存期差的重要预测因素^[10,11]。本研究结果显示,单因素分析非 HBV 感染患者卫星结节发生率低,可能与非 HBV 感染型肝细胞癌细胞分化较好,侵袭性低有关,虽然由于有症状就诊而肿瘤偏大,但卫星结节发生率并不高,多因素分析提示此差异并非独立存在,可能由于本研究入组病例较少有关。

p53 是目前发现的所有人类肿瘤中突变频率最高且最重要的抑癌基因,p53 基因的突变与肝癌的发生、发展亦有密切的关系,对肝癌的预后具有重要的预测作用^[3]。HBV 及黄曲霉毒素(AFB1)均可引起 p53 突变^[3]。Ki-67 是一种增殖细胞核蛋白,具有特异性标志增殖细胞的特性,其在肝癌中有较高的表达。温红梅等^[12]应用组织芯片和免疫组织化学法分别检测 p53 和 Ki-67 在 87 例肝细胞癌中的表达情况,结果表明 p53 及 Ki-67 的表达率均较高,但与 HBV 感染情况无相关性。本研究结果显示,PHC 患者 p53 和 Ki-67 表达率均较高,但与 HBV 感染无相关性,与上述报道结果一致,可能与非 HBV 感染型肝细胞肝癌和 HBV 感染型肝细胞癌具有部分相同的致癌因素有关。在我国,HCC 中 60%~70%的患者 AFP 水平升高,AFP 是目前公认的诊断 HCC 的重要指标之一。HBV 可通过与肝癌细胞整合,通过免疫反应引起肝组织损伤致使肝细胞非典型增生、HCC 发生,并最终激发 AFP 基因重新开放,而使肝癌细胞合成 AFP 的能力增强。苏士珂等^[13]研究报道,用免疫组化 SP 法检测 40 例 HCC、癌旁肝组织标本的 HBsAg 与 AFP 表达,结果显示,HCC 及癌旁肝组织中 HBsAg 阳性者 AFP 表达阳性率明显高于 HBsAg 阴性者。本研究结果表明,非 HBV 感染型肝细胞癌

组 AFP 表达明显低于 HBV 感染型肝细胞癌组,多因素分析显示 HBV 感染亦为 AFP 影响因素,与上述报道结果一致。CD34 作为肝脏癌变时一种血管内皮细胞特异性标志物,常用来测定肿瘤内微血管密(microvascular density,MVD),CD34 的高表达提示肿瘤内存在丰富的新生血管,并与肿瘤复发转移及预后相关。研究表明^[14,15]HBV 能通过对环氧化酶-2(COX-2)的上调及稳定缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)从而提高 VEGF 表达,促进新生血管的生成,这可能是两组间存在差别的原因之一。耿晓霞等^[16]研究报道,HBV 感染组和非 HBV 感染组的 CD34 阳性表达率分别为 55.56%(20/36)、28.00%(7/25),HBV 感染组的阳性表达率显著高于非 HBV 感染组 ($P<0.05$),即 HBV 感染型肝癌具有较高的肿瘤内微血管密度。本研究结果显示非 HBV 感染组和非 HBV 感染组之间 CD34 的表达存在显著差异,而且此差异独立存在,与上述研究结果一致。

综上所述,非 HBV 感染型肝细胞癌患者正逐渐增多,非 HBV 感染型肝细胞癌由于无 HBV 的致癌作用及且初诊发现方式的差异,具有相对完整的包膜、较高的分化程度、CD34 及 AFP 的低表达及就诊时肿块已较大等病理特征,不同于 HBV 感染型肝细胞癌。以上差别提示非 HBV 感染型肝细胞肝癌在临床诊断、治疗方法、及复发转移等方面可能与 HBV 感染型原发性肝细胞肝癌不同,值得进一步临床研究,以改善非 HBV 感染型肝细胞癌的疗效及预后。

参考文献:

- [1] Huo HL, Ren S, Wang SZ, et al. Ratio analysis of HBV-related liver disease and primary liver carcinoma development over 10 years in patients who received no antiviral therapy versus those treated with antiviral therapy[J]. Chinese Journal of Hepatology, 2014, 22 (1): 68-70. [霍宏蕾, 任姗, 王曙照, 等. 抗病毒治疗前后 10 年 HBV 相关性肝病及肝癌的构成比分析 [J]. 中华肝脏病杂志, 2014, 22 (1): 68-70.]
- [2] Chinese Societies of Liver Cancer and Clinical Oncology, Chinese AntiCancer Association. Experts consensus on pathological diagnosis of primary liver cancer[J]. National Medical Journal of China, 2011, 91(12): 802-804. [中国抗癌协会肝癌专业委员会, 原发性肝癌规范化病理诊断方案专家共识[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(12): 802-804.]

- [3] Tang ZY. Modern oncology[M]. Shanghai: Fudan University Press, 2011. 890–934. [汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 第3版, 上海: 复旦大学出版社, 2011. 890–934.]
- [4] Dongiovanni P, Romeo S, Valenti L. Hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver: role of environmental and genetic factors [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(36): 12945–12955.
- [5] Chen HP, Shieh JJ, Chang CC, et al. Metformin decreases hepatocellular carcinoma risk in a dose-dependent manner: population-based and in vitro studies [J]. Gut, 2013, 62(4): 606–615.
- [6] Xie KL, Zhang YG, Liu J, et al. MicroRNAs associated with HBV infection and HBV related HCC [J]. Theranostics, 2014, 4(12): 1176–1192.
- [7] Liu YA, Liu FY, Zhang EL, et al. Clinicopathologic features of hepatocellular carcinoma without fibrous capsule and the postoperative prognostic analysis [J]. Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong, 2013, 42(5): 592–596. [刘杨安, 刘富瑶, 张二雷, 等. 无肿瘤包膜的肝细胞癌临床病理特征及术后预后分析[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2013, 42(5): 592–596.]
- [8] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle kinases in cancer [J]. Curr Opin Genet Dev, 2007, 17(1): 60–65.
- [9] Ma L, Yang L, Kuang JY, et al. Hepatitis B virus X promotes HepG2 cell cycle progression and growth via down-regulation expression of p16 protein [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2013, 21(4): 614–618. [麦丽, 杨林, 邝建玉, 等. 乙型肝炎病毒 X 蛋白抑制 p16 蛋白表达及其促进 HepG2 肝癌细胞生长[J]. 中华肝脏病杂志, 2013, 21(4): 614–618.]
- [10] Chiche L, Menahem B, Bazille C, et al. Recurrence of hepatocellular carcinoma in noncirrhotic liver after hepatectomy [J]. World J Surg, 2013, 37(10): 2410–2418.
- [11] Lim C, Mise Y, Sakamoto Y, et al. Above 5 cm, size does not matter anymore in patients with hepatocellular carcinoma [J]. World J Surg, 2014, 38(11): 2910–2918.
- [12] Wen HM, Liang JM. Expression and clinical implications of p53 and proliferation cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2013, 30(9): 1955–1957. [温红梅, 梁家铭. p53 和细胞核增殖抗原在肝癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(9): 1955–1957.]
- [13] Su SK, Pan L, Meng FY, et al. Expression of HBsAg and AFP in hepatocellular carcinoma and its correlation [J]. Shandong Medical Journal, 2011, 51(23): 23–24. [苏士珂, 潘雷, 孟凡迎, 等. HBsAg 及 AFP 在肝细胞癌组织中的表达及其相关性[J]. 山东医药, 2011, 51(23): 23–24.]
- [14] Li D, Fang XF, Zheng BY, et al. Effect of Cyclooxygenase-2 on the Proliferation of HL7702/HBx Cells [J]. Journal of Fujian Medical University, 2014, 48(5): 285–289. [李丹, 方雪芬, 郑碧云, 等. 环氧合酶-2 在 HL7702/HBx 肝细胞增殖中的作用[J]. 福建医科大学学报, 2014, 48(5): 285–289.]
- [15] Floreczyk U, Czauderna S, Stachurska A, et al. Opposite effects of HIF-1a and HIF-2a on the regulation of IL-8 expression in endothelial cells [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 51(10): 1882–1892.
- [16] Geng XX, Lin JH, Yang XX, et al. Differential expression of VEGF and CD34 in HBV-related and Non-HBV-related hepatocellular carcinoma and their correlations with tumor angiogenesis [J]. Journal of Cancer Control and Treatment, 2015, 28(2): 57–62. [耿晓霞, 林健梅, 杨兴祥, 等. HBV 感染型与非 HBV 感染型肝细胞肝癌 VEGF 与 CD34 的表达及其与肿瘤血管生成关系的研究[J]. 肿瘤预防与治疗, 2015, 28(2): 57–62.]

《肿瘤学杂志》关于提交“作者投稿无学术不端行为承诺书”的申明

本刊已开通网上在线投稿系统 (<http://www.chinaoncology.cn>), 作者登录网站后, 请在左上角选择《肿瘤学杂志》, 选中后进入首页, 首次投稿作者请先注册, 在完成稿件上传、作者信息填写等程序后, 请您在网站首页 (<http://www.chinaoncology.cn>) “下载中心”栏中下载《肿瘤学杂志》的“作者投稿无学术不端行为承诺书文档”, 填写后 1 周内连同单位介绍信、基金证明复印件快递寄至本刊编辑部, 本刊确认收到上述材料后, 该文稿才能进入审稿编辑流程。