

细胞角蛋白 19 的表达对原发性肝癌术后的预后价值*

杨李军¹, 徐土炳² (1. 重庆市公共卫生医疗救治中心 400036; 2. 中国人民解放军第一六医院 普通外科, 新疆乌鲁木齐 836500)

【摘要】 目的 探讨细胞角蛋白 19(K19)表达对原发性肝癌肝切除术后预后价值。方法 对 152 例肝细胞肝癌(HCC)行手术切除肝组织的患者进行研究,采用免疫组化法评估其肝癌组织中 CK19 的表达。 $\geq 5\%$ 的肿瘤细胞中度以上的膜和(或)胞质的表达定义为 CK19 阳性。结果 CK19 阴性的患者术后 1 年和 5 年总生存率分别为 90.7%和 80.4%;CK19 阳性组术后 1 年和 5 年总生存率分别为 66.7%和 32.2%,差异具有统计学意义。结论 对于原发性肝癌患者,肝癌组织中 CK19 的表达增加往往表现为手术预后较差。

【关键词】 细胞角蛋白 19; 肝癌; 肝切除术; 预后

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.16.003 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)16-2199-02

Prognostic value of expression of cytokeratin 19 to liver resection for primary hepatic carcinoma* YANG Li-jun¹, XU Tu-bin² (1. Chongqing Infectious Disease Medical Center, Chongqing 400036, China; 2. Department of General Surgery, the 16th Hospital of PLA, Sinkiang 836500, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate prognostic value of expression of Cytokeratin (CK) 19 to liver resection for primary hepatic carcinoma. **Methods** One hundred and fifty two hepatocellular carcinoma (HCC) patients who underwent liver resections were studied. Immunohistochemistry was used to evaluate the expression of Cytokeratin 19 in cancerous tissues. CK19 positivity was defined as membranous and/or cytoplasmic expression in $\geq 5\%$ of tumor cells with moderate or strong intensity. **Results** The overall survival (OS) rate of CK19- HCC patients at 1 and 5 years after resections were 90.7% and 80.4%, respectively. OS rate of CK19+ HCC patients at 1 and 5 years after resections were 66.7% and 32.2%, respectively. The difference was significant ($P < 0.05$). **Conclusion** For the primary liver cancer patients, the increased expression of CK19 in cancerous tissues tends to show poor prognosis.

【Key words】 cytokeratin 19; hepatocellular carcinoma; liver resection; prognosis

肿瘤的治疗策略主要是基于肿瘤进展阶段的引导。对肝癌(HCC)的临床分期所采用的巴塞罗那临床肝癌分期系统(BCLC)已经被广泛认可^[1]。尽管考虑到了 HCC 患者的肿瘤分期、肝功能以及整体身体状况,对于相同的治疗手段,患者可能会出现非常不同的结果。曾有学者建议,肝癌在分子和形态学特征上的异质性,可能与治疗效果密切相关^[2-4]。本文旨在观察细胞角蛋白(CK)19 对原发性肝细胞癌肝切除术治疗预后的价值。

1 材料与方法

1.1 一般资料 所有病例均选自重庆市公共卫生医疗救治中心 2005 年 1 月至 2009 年 4 月手术切除的肝脏标本。所有患者标本具有病理检查证实为原发性肝细胞癌,共 152 例,其中

男 117 例,女 35 例,平均年龄(56.0 \pm 12.3)岁。这些患者经过 Child-Pugh 分级计分制显示均保存完好的肝功能。所有患者均未经历术前的癌症相关治疗,包括肝动脉栓塞化疗。

1.2 临床特点 CK19 阳性 HCC 和 CK19 阴性 HCC 患者的临床资料的比较见表 1。

1.3 肝癌的诊断标准 根据世界卫生组织定义的形态学标准,根据苏木精伊红(HE)染色结果来诊断肝癌。埃德蒙森和 Steiner 分级系统(ES, I-IV)被用来评估肝癌分化的程度。

1.4 CK19 阳性检测 CK19 抗体(单克隆抗体,DAKO, Glostrup, 丹麦, 1:50),以检测在肝癌组织中 CK19 阳性。CK19 阳性被定义为大于或等于 5%的中度以上的肿瘤细胞膜和(或)胞质中的表达。

表 1 CK19+HCC 和 CK19-HCC 患者的临床资料的比较[n(%)]

项目	n	年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	性别	吸烟史	饮酒史	癌症家族病史
CK19-HCC	43	59.4 \pm 12.5	17(39.5)	12(27.9)	15(34.9)	9(20.9)
CK19+HCC	109	60.7 \pm 12.4	70(64.22)	54(49.5)	52(47.7)	24(22.0)
P	—	0.098	0.065	0.075	0.764	0.128

注:—表示无数据。

1.5 随访 患者进行定期随访。收集患者肝功能和肿瘤标志物的数据。每 6 个月定期进行肝脏 CT 的检查。所有患者随访直至死亡或至少 12 个月的时间。复发定义为术后出现新的

病变。早期复发定义为任何 12 个月内复发。所有复发病例均进行肿瘤病理组织学分析。

1.6 统计学方法 使用 SPSS15.0 软件进行统计分析。临床

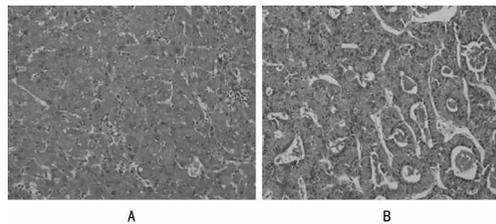
* 基金项目:全军医学科技青年培育项目(13QNPO23)。

作者简介:杨李军,男,本科,主治医师,主要从事普通外科研究。

病理特征之间的比较采用 χ^2 检验。采用 Kaplan-Meier 法计算总生存期(OS),并使用 Log-rank 检验生存率的差异。原发性肝癌根治性切除术后预后影响因素的单因素分析采用 log-rank 检验评估。多因素分析采用 Cox 比例风险模型。

2 结 果

2.1 病理评估 肝癌的诊断是根据 HE 染色结果。152 例中 109 例为 CK19 阳性 HCC 患者,43 例为 CK19 阴性 HCC 患者(图 1)。



注:A 为细胞角蛋白 19 阴性肝癌(CK19- HCC);B 为细胞角蛋白 19 阳性肝癌(CK19+ HCC)。

图 1 原发性肝癌的病理特征(HE×200)

2.2 临床预后的比较 自 2005 年 7 月 1 日起随访至 2013 年 5 月 31 日,所有患者中共失访 6 例,共有 146 例具有完整资料。其中 CK19 阴性 41 例,CK19 阳性 105 例。随访成功率为 94.1%。CK19 阴性的患者术后 1 年和 5 年总生存率分别为 90.7%和 80.4%;CK19 阳性组术后 1 年和 5 年总生存率分别为 66.7%和 32.2%,差异具有统计学意义。

2.3 原发性肝癌根治性切除后的预后因素分析 影响肝切除术后因素包括年龄、性别、肝硬化、肿瘤大小、肿瘤数目、卫星结节共存、血管侵犯、淋巴结转移等。本研究在调整了这些危险因素的干扰后,CK19 阳性仍是影响患者预后的独立危险因素(表 2)。

表 2 原发性肝癌肝切除术后预后影响因素

变量	单因素分析		多因素分析	
	P	HR	95%CI	P
CK19+	0.000	3.56	1.22~7.66	0.012
年龄	0.672	—	—	—
性别	0.121	—	—	—
肝硬化	0.533	—	—	—
肿瘤大小	0.002	—	—	—
血管侵犯	0.000	—	—	—
淋巴结转移	0.000	2.43	1.66~5.76	0.032
卫星结节	0.001	1.96	1.02~4.76	0.037

注:—表示无数据。

3 讨 论

虽然目前世界卫生组织对于原发性肝癌的分类仍是指导治疗的标准,但是随着研究的进展,现代医学更加注重形态表型类别与病理遗传的影响^[5]。几项临床研究支持在肝癌患者的分类中存在多种亚群,而其中 CK19 阳性表达就是一种重要的表型^[6]。已经有研究表明,尽管在形态上类似肝癌的治疗效果也会存在着截然不同的结果,但正如本研究中所证实,CK19 阳性的原发性肝癌患者临床预后明显较差。

CK19 为细胞骨架蛋白的一种亚型,通常表达于胆管上皮细胞,成熟肝细胞及原发性肝癌细胞不表达^[7]。研究发现,即使生长特性和组织形态典型的原发性肝癌也能表达 CK19。表达于肝癌细胞质和细胞膜的 CK19 可分泌至细胞外,与细胞外基质互相作用,将后者的信号传递到胞膜的整联蛋白,激活

细胞内信号通路,诱导各种基质降解酶的释放,破坏基质,最终引起细胞形态的改变。同时,CK19 可诱导产生自身抗体,通过免疫反应破坏细胞外基质,利于肿瘤细胞转移、迁徙,可发生更具侵袭性的生物学行为,从而降低总体生存率。

CK19 作为一种已知的干细胞标记物,其阳性反应了其细胞的起源(祖细胞)。研究原发性肝癌的祖细胞来源常常使用 CK19 的肝干细胞进行标记^[8-11]。此外,最近的一项研究报告指出,CK19 与肿瘤的侵袭性密切相关^[12]。另外研究还证实,CK19 的表达常与表皮生长因子相关,从而提高 HCC 的增长能力。

大多数研究肝癌 CK19 表达采用免疫组化分析。有研究认为,评估 CK19 基因与蛋白的表达是研究 CK19 较好的方法。但在本研究中,笔者采用免疫组化的方法进行研究,也得到了预期的结果。尽管在本研究中已经证实 CK19 阳性的患者预后较差,甚至在调整了其他危险因素的干扰后,CK19 阳性仍然是严重影响 HCC 患者术后不良预后的独立指标,但是研究的样本量相对较小,对于结果的稳定性上需要进一步的研究来证实。

参考文献

- [1] Forner A, Reig ME, de Lope CR, et al. Current strategy for staging and treatment; the BCLC update and future prospects[J]. Semin Liver Dis, 2010, 30(1): 61-74.
- [2] Boyault S, Rickman DS, de Reyniès A, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets[J]. Hepatology, 2007, 45(1): 42-52.
- [3] Katoh H, Ojima H, Kokubu A, et al. Genetically distinct and clinically relevant classification of hepatocellular carcinoma; putative therapeutic targets[J]. Gastroenterology, 2007, 133(9): 1475-1486.
- [4] Lu XY, Xi T, Lau WY, et al. Hepatocellular carcinoma expressing cholangiocyte phenotype is a novel subtype with highly aggressive behavior[J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(10): 2210-2217.
- [5] 刘振虹, 闫石, 王明娟, 等. 大鼠肝癌发生过程中超微结构、c-myc 和 HER-2 表达变化及意义[J]. 重庆医学, 2013, 42(20): 2401-2403.
- [6] Durnez A, Verslype C, Nevens F, et al. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma[J]. Histopathology, 2006, 49(1): 138-151.
- [7] 马洪波, 黄涛, 韩风, 等. 3 种肿瘤标志物联合检测对胆管癌诊断的临床意义[J]. 重庆医学, 2012, 41(25): 2603-2604.
- [8] Kim H, Choi GH, Na DC, et al. Human hepatocellular carcinomas with "Stemness"-related marker expression; keratin 19 expression and a poor prognosis[J]. Hepatology, 2011, 54(8): 1707-1717.
- [9] Ariizumi S, Kotera Y, Katagiri S, et al. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma had poor outcomes after hepatectomy regardless of Allen and Lisa class or the predominance of intrahepatic cholangiocarcinoma cells within the tumor[J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19(9): 1628-1636. (下转第 2202 页)

两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 7:1组患者 PT、APTT 检测结果 7:1 对照组 PT (13.3 ± 2.98)s, 抗凝剂比例 7:1 组 PT (15.9 ± 3.4)s, 两组结果差异有统计学意义($P < 0.05$); 7:1 对照组 APTT (38.3 ± 4.46)s, 抗凝剂比例 7:1 组 APTT (41.6 ± 4.66)s, 两组结果差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 从试验结果可以看出, APTT 在血液和抗凝剂比例为 8:1 时, 对结果有影响; PT 在血液和抗凝剂比例为 7:1 时, 对结果有影响; 所以在血液与抗凝剂比例为 8:1 时, PT 结果能作为临床参考。

3 讨论

血液凝固是一个复杂的过程, 凝血功能检测标本采用浓度为 109 mmol/L 的枸橼酸钠抗凝, 临床采集方法要求枸橼酸钠与全血比例为 1:9, 抗凝剂过多会造成血液稀释, 影响检测结果的准确性^[2]。抗凝剂与血的比例是基于 HCT (0.45 ± 0.05), 血浆 (0.55 ± 0.05) 这一基础, 实质是抗凝剂与血浆的比例为 1:5, 当 HCT 超出或低于正常范围时, 应用计算公式随时调整抗凝剂的用量, 以保证抗凝剂在血浆中的绝对含量不变。公式如下: 抗凝剂用量 (mL) = $0.00185 \times$ 全血量 (mL) \times (1 - HCT%)^[3]。当血量为 2.7 mL 时, 枸橼酸钠和钙离子比例恰当, 钙离子完全被枸橼酸钠络合封闭, 凝血过程被阻断; 当血量不足 2.7 mL 时, 枸橼酸钠则过量, 但测定 PT、APTT 所加入的钙离子是定量的, 测定时过量的枸橼酸钠络合了部分加入的钙离子, 造成凝血过程中钙离子不足, 导致 PT、APTT 结果延长。

血液标本的采集和检验分别由护理和检验两个不同学科人员完成, 标本采集由临床护士完成, 检验前由检验人员按检验专业标准判断标本质量是否合格^[4]。标本质量是保证检验结果准确性的重要前提, 如果标本采集不合格, 即使使用最先进的仪器设备, 有最高的检验技术水平, 也不能弥补标本质量不合格造成的误差和错误^[5]。在 ISO15189 文件中, 这属于分析前质量管理^[6]。分析前质量即是指从临床医生开出医嘱开始, 到分析检验程序启动。此流程是实验室质量保证体系中最重要、最关键的环节之一。据报道, 临床反馈不准确的检验结果, 最终 80% 可溯源至实验分析前程序的不规范, 而最重要的则为标本采集的不规范、不准确^[7]。分析前质量管理工作由临床医生、护士、卫生员在医学实验室以外完成, 检验科工作人员很难控制, 而标本的质量又是检验结果准确的基础。因此, 必须高度重视分析前质量控制工作, 如果没有一份准确的抽血样本, 就不能获得可信的检测结果, 这一关键问题应当受到临床医务人员的重视^[8]。检验分析前质量控制是国内外医学实验室管理的热点, 是我国质量管理最薄弱的环节, 最易出现问题, 是潜在因素最多、最难控制的环节。该环节直接影响试验结果的准确性, 甚至导致临床误诊, 延误病情。凝血四项检测结果的准确性也与这些分析前因素密切相关。本院 2012 年 3 月至

2013 年 10 月共有 270 000 份送检标本做凝血四项测定, 其中不合格标本 1 080 例, 占 0.4%, 其中采血量不足标本 623 例。作者通过试验结果证实, 要保证凝血试验结果的准确性, 标本采集的准确度是一个不容忽视的问题。因此检验科应联合护理部门对护士进行培训, 使其做到熟练掌握静脉穿刺、各种真空采血管的正确使用及标本处理的标准程序等技能, 认识护理工作对确保检验质量的重要性, 确立提高医疗质量的服务理念。应把它作为检验科重要的工作内容, 这也是全面质量管理的关键环节。但对分析前阶段的质量控制, 只有通过科室之间互相学习与沟通, 正确、规范化采集标本, 做好各环节的质量保证措施, 才能提高分析前阶段的质量控制水平, 使检验结果能正确、可靠、真实^[9-10]。

综上所述, 分析前质量控制是关系检测结果是否忠实反映患者情况的重要因素, 而临床护士抽血量是否准确又是分析前质量控制的重要环节。凝血功能检测对 1:9 抗凝剂比例要求非常严格, 血量过少会对结果尤其是 APTT 造成极大的影响。因此, 抽血时务必要求精确定量至 3 mL 以保证结果的可靠性。

参考文献

- [1] 丛玉隆, 王金良, 李晓军, 等. 实用检验医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009.
- [2] 陈永玲, 袁琳, 王昌富. 影响 PT、aPTT 测定结果的实验前样本因素[J]. 血栓与止血学, 2006, 12(1): 37-38.
- [3] 杨继明, 张爱华, 肖中华, 等. 标本采集量对凝血项目检测结果的影响[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(1): 75.
- [4] 容桂荣, 张萍萍, 赵立民, 等. 血液标本采集与运送的质量控制现状[J]. 中华护理杂志, 2008, 43(7): 645-647.
- [5] 金岚, 陈倩, 吴慕琳, 等. 门诊抽血室与检验科互动式沟通对标本质量的影响[J]. 中国医药导报, 2013, 10(7): 138-140.
- [6] 丛玉隆, 张海鹏, 任珍群. 血液学检验分析前质量控制的重要因素—标本的采取及其控制[J]. 中华医学检验杂志, 1998, 21(1): 51-54.
- [7] 孟冬娅, 薛文成, 胡晓芳. 从护理角度提高检验质量的分析前变异控制[J]. 解放军护理杂志, 2002, 19(3): 49-50.
- [8] 郭光辉, 束振华. 影响凝血四项测定结果的分析前因素[J]. 海南医学, 2010, 21(24): 108-109.
- [9] 王巧兵. 血凝检测结果影响因素的分析[J]. 中国现代医生, 2010, 48(12): 83.
- [10] 季明德, 郭长青, 梁鑫. 抽取血液量减少时对凝血酶原时间检测结果的影响[J]. 医学检验与临床, 2008, 19(2): 66-67.

(收稿日期: 2013-12-10 修回日期: 2014-02-16)

(上接第 2200 页)

- [10] Andersen JB, Loi R, Perra A, et al. Progenitor-derived hepatocellular carcinoma model in the rat[J]. Hepatology, 2010, 51(8): 1401-1409.
- [11] Van Hul NK, Abarca-Quinones J, Sempoux C, et al. Relation between liver progenitor cell expansion and extracellular matrix deposition in a CDE-induced murine model of

chronic liver injury[J]. Hepatology, 2009, 49(8): 1625-1635.

- [12] 郝文胜, 周俊平, 付贵峰. 血清中癌胚抗原和细胞角蛋白片段 19 对局部中晚期肺癌疗效的评价[J]. 重庆医学, 2013, 42(11): 1216-1217.

(收稿日期: 2013-12-22 修回日期: 2014-04-09)