

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.24.010

细胞因子在肝泡球蚴病肝组织边缘带的表达及意义*

张萍¹,樊海宁^{2,3,△},王海久^{2,3},王展^{2,3},乜国雁⁴,张朝霞¹,王花¹

(1. 青海卫生职业技术学院, 西宁 810000; 2. 青海大学附属医院肝胆胰外科, 西宁 810001; 3. 青海省包虫病研究重点实验室, 西宁 810001; 4. 青海省人民医院泌尿外科, 西宁 810007)

[摘要] **目的** 研究肝泡球蚴(HAE)组织中基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和 CD34 的表达,探讨二者在血管生成和侵袭转移中的作用。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法检测 MMP-2 和 CD34 在 HAE 组织及距病灶 5 cm 以外的正常肝组织标本(各 40 例)的表达及其与临床病理特性之间的关系。比较两组差异并分析 MMP-2 和 CD34 的相关性。**结果** MMP-2 和 CD34 的阳性表达程度以 HAE 病灶与正常肝组织交界的边缘带最明显。HAE 边缘带组织中 MMP-2、CD34 阳性表达率 60.0% 和 62.5%, 明显高于正常肝组织阳性表达率(27.5% 和 25.0%), 差异有统计学意义($P < 0.01$); 在发生转移的 HAE 边缘带组织中 MMP-2、CD34 的阳性表达率 78.9% 和 78.9%, 明显高于未发生转移的阳性表达率(42.9% 和 47.6%), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。MMP-2 和 CD34 的表达呈正相关($r = 0.442, P < 0.01$)。**结论** HAE 病灶边缘带组织 MMP-2 和 CD34 的表达可能参与了血管的新生,并与 HAE 的侵袭转移有关系。

[关键词] 棘球蚴病,肝;肝泡球蚴病;边缘带;基质金属蛋白酶-2;CD34;血管新生;侵袭转移**[中图分类号]** R532.32 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)24-3162-04

Expression and significance of cytokines in hepatic tissue peripheral zone of hepatic alveolar echinococcosis*

ZHANG Ping¹, FAN Haining^{2,3,△}, WANG Haijiu^{2,3}, WANG Zhan^{2,3},
NIE Guoyan⁴, ZHANG Zhaoxia¹, WANG Hua¹

(1. Qinghai Health Professional and Technical College, Xining, Qinghai 810000, China; 2. Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining, Qinghai 810001, China; 3. Qinghai Provincial Key Laboratory of Hydatid Disease Research, Xining, Qinghai 810001, China; 4. Department of Urology Surgery, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining, Qinghai 810007, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and CD34 in tissue of hepatic alveolar echinococcosis (HAE) and to explore their role in the angiogenesis, and invasion and metastasis. **Methods** The expressions of MMP-2 and CD34 in 40 cases of HAE tissue specimen and 40 cases of normal liver tissue specimen at 5 cm from the lesion were detected by using immunohistochemistry SP method and the correlation between the expression of MMP-2 and CD34 with clinicopathology features was analyzed. Meanwhile, the differences were compared between the two groups and the correlation between MMP-2 and CD34 was analyzed. **Results** The positive expression degree of MMP-2 and CD34 was most obvious in peripheral zone of the junction between HAE lesion and normal liver tissue. The positive expression rates of MMP-2 and CD34 in peripheral zone of HAE tissue were 60.0% and 62.5% respectively, which were significantly higher than 27.5% and 25.0% in normal liver tissue respectively, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The positive expression rates of MMP-2 and CD34 in peripheral zone of HAE tissues with metastasis occurrence were 78.9% and 78.9% respectively, which were significantly higher than 42.9% and 47.6% in HAE tissue without metastasis respectively, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expressions of MMP-2 and CD34 showed the positive correlation ($r = 0.442, P < 0.01$). **Conclusion** The expressions of MMP-2 and CD34 in peripheral zone tissue of HAE lesion might be involved in the angiogenesis and related to invasion and metastasis of HAE.

[Key words] echinococcosis, hepatic; hepatic alveolar echinococcosis; peripheral zone; matrix metalloproteinase-2; CD34; angiogenesis; invasion and metastasis

* 基金项目:2014 年青海省卫计委指导性科研课题(青卫科[2014] 43 号)。 作者简介:张萍(1969-),教授,硕士,主要从事包虫病方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: fanhaining@medmail. com. cn。

肝泡球虫病(HAE)是一种危害极大的致死性寄生虫病,在我国西北地区尤其是青藏高原地区广泛流行。该病几乎均原发于肝脏,具有与恶性肿瘤尤其是肝癌类似的浸润和转移的生物学行为^[1]。HAE 手术切除率低,病死率高,故有“虫癌”之称^[2]。有学者认为在 HAE 病灶边缘可能存在着“浸润带”或“生物学边界”^[3],是有活性的棘球蚴囊赖以生存和增殖的基础,故边缘带成为 HAE 研究的一个重点。多项研究表明,基质金属蛋白酶-2(MMP-2)在肿瘤血管生成、侵袭转移过程中起着重要作用;CD34 高表达可促进多种肿瘤新生血管形成。笔者研究 MMP-2 和 CD34 在 HAE 边缘带组织的表达,并结合临床病理特性,探讨新生血管在 HAE 浸润性生长中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集青海大学附属医院、青海省人民医院 2014 年 7 月至 2017 年 7 月手术后经病理诊断为 HAE 的组织及距病灶边缘 5 cm 以外的正常肝组织标本各 40 例。所有患者均知情并签署知情同意书。其中男 16 例,女 24 例;年龄 15~57 岁,平均(34.6±5.8)岁;藏族 32 例,汉族 8 例;19 例发生转移(包括肝内外转移)。所有患者术前均未接受任何包虫病药物治疗。

1.2 方法

1.2.1 试验方法 采用免疫组织化学 SP 法。即用型鼠抗人 MMP-2 单克隆抗体(ZM-0330)、鼠抗人 CD34 单克隆抗体(ZM-0046)等购自北京中杉金桥生物技术有限公司。自动组织包埋机(Leica EG1160)及石蜡切片机(Leica 2245)均为德国 Leica 公司生产;显微镜(CX31RBSF)和数码相机(C-7070 Wide Zoom)均为日本 Olympus 公司生产。标本经 10% 甲醛固定,石蜡包埋后 4 μm 连续切片,行苏木素-伊红染色(HE)和免疫组织化学 SP 染色,同时以磷酸盐缓冲液(PBS)替代一抗做阴性空白对照。

1.2.2 结果判定 每张切片观察 5 个高倍镜视野,参照 MATTEM 等^[4]的方法判定免疫组织化学染色阳性细胞所占的百分数来计算结果。(1)显色深浅:不显色或显色不清为 0 分,黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,深褐色为 3 分;(2)着色细胞占计数细胞百分率:未见着色细胞为 0 分,≤25% 为 1 分,>25%~50% 为 2 分,>50% 为 3 分。二者之和为 0~2 分判为阴性,3~6 分判为阳性。每张切片均要求有两位病理医师采用双盲法阅片。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件,计数资料以频数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验,相互关联采用 Spearman 相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HAE 大体标本观察 HAE 病灶由无数小结节或小囊泡(直径多为 1~3 mm)集合,为海绵状团块,颜色呈灰白与淡黄色相间,与周围肝组织分界不清,触之质地硬似软骨,刀切常有砂粒样感觉,切面为淡黄色的坏死区与灰白色发亮的纤维层交错出现,外观似蜂巢状或虫蚀状改变,病变中央有时呈胶冻状。巨块型的可见灰黄色豆渣样大片坏死,伴液化,见图 1。

2.2 HE 染色观察 病变界限不清,呈浸润性生长,可见多灶性凝固性坏死和边缘带典型泡球蚴肉芽肿。肉芽肿由呈栅栏状排列的上皮样组织细胞组成,纤维组织增生明显,有较多淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞等炎性细胞浸润,病灶边缘残余少量肝组织结构,泡壁周围肝组织血管扩张充血,见图 2。

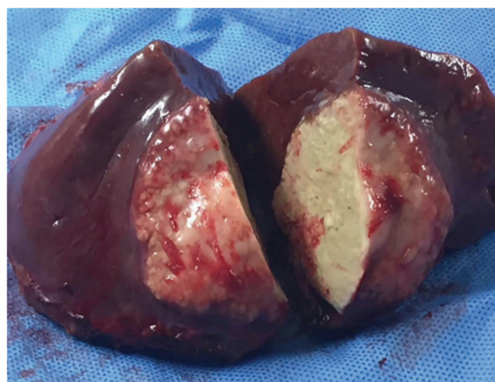


图 1 HAE 病灶大体标本

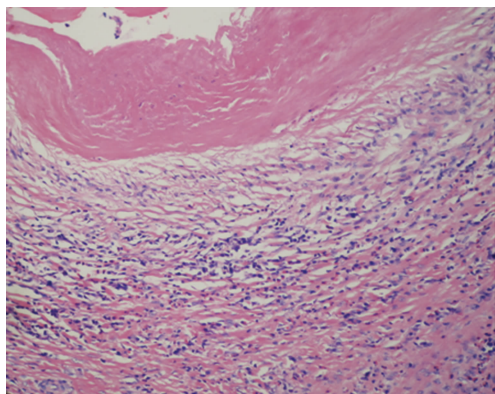


图 2 HAE 组织 HE 染色(×200)

2.3 MMP-2 和 CD34 在 HAE 组织中表达 HAE 病灶内可见大片凝固性坏死,MMP-2 和 CD34 的阳性表达程度以 HAE 病灶与正常肝组织交界的边缘带最明显。边缘带主要为囊泡壁周围肉芽肿炎症细胞和周边部分残存肝细胞,MMP-2 以细胞质和部分细胞膜呈棕黄色为阳性细胞(图 3);CD34 定位于血管内皮细胞的胞质,呈棕黄色,CD34 染色内皮细胞呈点状、线状、半环状、环状散在分布(图 4)。HAE 边缘带组织中 MMP-2 阳性表达率为 60.0%(24/40),高于病灶旁正常肝组织中阳性表达率为 27.5%(11/40),差

异有统计学意义($P < 0.01$)。HAE 边缘带组织中 CD34 阳性表达率 62.5%(25/40)明显高于病灶旁正常肝组织中阳性表达率 25.0%(10/40),差异有统计学意义($P < 0.01$)。

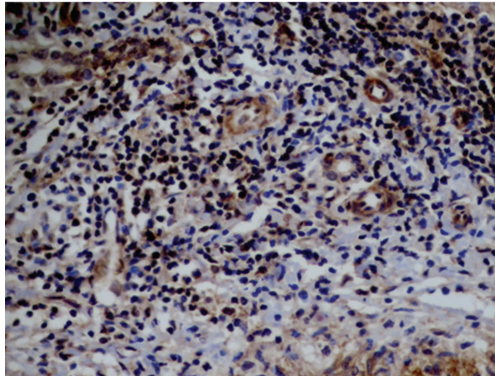


图 3 MMP-2 在 HAE 边缘带表达(SP, ×200)

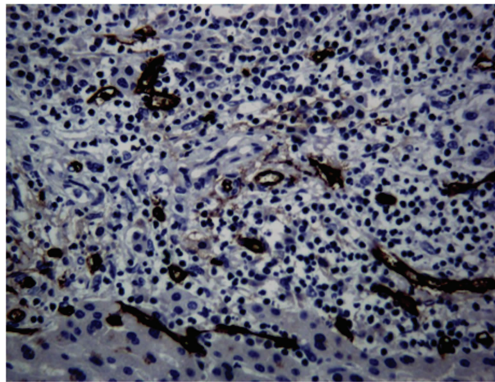


图 4 CD34 在 HAE 边缘带表达(SP, ×200)

2.4 MMP-2 和 CD34 在 HAE 边缘带表达与临床病理特性关系 在发生转移的 HAE 边缘带组织中 MMP-2、CD34 的阳性表达率分别为 78.9%(15/19)和 78.9%(15/19),明显高于未发生转移的 MMP-2、CD34 的阳性表达率[42.9%(9/21)和 47.6%(10/21)],差异有统计学意义($P < 0.05$);MMP-2 和 CD34 在 HAE 边缘带阳性表达与 HAE 患者的性别、年龄、民族、甲胎蛋白(AFP)、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、病灶大小等因素无关,见表 1。

表 1 MMP-2 和 CD34 的表达与 HAE 临床病理的关系[n(%)]

项目	n	MMP-2 阳性	χ^2	P	CD34 阳性	χ^2	P
性别			0.156	>0.05		1.778	>0.05
男	16	9(56.3)			12(75.0)		
女	24	15(62.5)			13(54.2)		
年龄(岁)			2.157	>0.05		0.009	>0.05
<50	31	21(67.7)			19(61.3)		
≥50	9	3(33.3)			6(66.7)		
民族			1.100	>0.05		1.500	>0.05
藏族	32	21(65.6)			22(68.8)		

续表 1 MMP-2 和 CD34 的表达与 HAE 临床病理的关系[n(%)]

项目	n	MMP-2 阳性	χ^2	P	CD34 阳性	χ^2	P
汉族	8	3(37.5)			3(37.5)		
HBsAg			0.059	>0.05			
阳性	8	5(62.5)			6(75.0)	0.167	>0.05
阴性	32	19(59.4)			19(59.4)		
病灶大小(cm)			0.753	>0.05		1.118	>0.05
≥5	23	14(60.9)			16(69.6)		
<5	17	8(47.1)			9(52.9)		
AFP			0.008	>0.05		0.052	>0.05
阳性	6	3(50.0)			4(66.7)		
阴性	34	21(61.8)			21(61.8)		
有无转移			5.414	<0.05		4.177	<0.05
有	19	15(78.9)			15(78.9)		
无	21	9(42.9)			10(47.6)		

2.5 MMP-2 和 CD34 在 HAE 组织中表达的相关性 在40例患者中,MMP-2 和 CD34 均为阳性表达的有 19 例,均为阴性表达的有 10 例;MMP-2 阳性表达和 CD34 阴性表达的有 5 例,MMP-2 阴性表达而 CD34 阳性表达的有 6 例。Spearman 相关分析显示,MMP-2 和 CD34 两者之间的表达存在正相关($r = 0.442, P < 0.01$)。

3 讨 论

恶性肿瘤的发生、发展、浸润、转移等生物学行为都与新生血管密切相关,而 HAE 病灶与肿瘤相比具有相似的生长方式[5]。

MMP-2 为锌离子依赖性内肽酶,能降解血管基底膜和细胞外基质中的 IV 型胶原成分,使肿瘤细胞易于突破结构屏障,与肿瘤内血管生成、侵袭、转移相关[6]。有研究表明,MMP-2 基因敲除的小鼠表现出肿瘤组织血管新生能力的减弱从而导致的肿瘤生长减慢[7]。本研究中 MMP-2 阳性表达率在 HAE 边缘带组织高于正常肝组织($P < 0.01$);有转移灶边缘带表达高于无转移灶边缘带($P < 0.05$)。本课题组前期研究表明,MMP-2 高表达可能具有促进生物学行为,类似癌细胞的 HAE 的浸润和转移[8]。马少波等[9]报道,小鼠血清 MMP-2 水平升高可能与泡状棘球蚴的浸润性生长存在相关性。本研究结果提示,HAE 边缘带 MMP-2 的高表达可能使细胞外基质降解加速,破坏基底膜并可能促进 HAE 新生血管的形成,进而促使 HAE 的浸润转移。

CD34 是高度糖基化的 I 型跨膜蛋白,研究表明,CD34 不仅具有造血作用,还可以通过促进内皮细胞转移进而促进血管新生[10]。本研究中 CD34 阳性表

达率在 HAE 边缘带组织高于正常肝组织 ($P < 0.01$), 有转移灶边缘带表达高于无转移灶边缘带 ($P < 0.05$)。张示杰等^[11]报道, 在早期沙鼠肝泡球蚴组织中存在 CD34 高表达的现象。姚冰等^[12]研究报道, 对 HAE 边缘区域 CT 灌注成像并与组织病理对照发现, HAE 病灶与周围肝组织间存在边缘浸润带, 该区域血流灌注高于病灶内部及周围肝脏组织。宋涛等^[13]报道, HAE 病灶周边存在着一边框样的增强带, 结合超声造影剂的增强原理, 此边框样的增强带代表了 HAE 病灶的边缘区存在着较为丰富的微血供状态。以上结论支持了本研究的结果。上述结果提示, CD34 的高表达可能促使 HAE 新生血管形成, 这说明血管生成可能是 HAE 浸润性生长的机制之一。

本研究经双变量相关分析显示, MMP-2 和 CD34 表达呈正相关性 ($r = 0.442, P < 0.01$), 表明 MMP-2 与 CD34 表达可能有一致性和协同作用, 共同促进 HAE 病灶新生血管形成和浸润转移。有研究表明癌细胞可以通过自身分泌或旁分泌等方式合成大量的 MMP-2, 破坏基底膜的完整性, 发生侵袭和转移^[14]。VUITTON 等^[15]提到“多房泡球绦虫幼虫自身所分泌的类细胞因子物质可能促进其周围肉芽肿内血管生成”。血管新生是一个复杂过程, 任何组织血管生成都不会是单一因素作用的结果, 另外是否还有其他促转移因子等的作用, 还需进一步研究^[8-9, 16]。

综上所述, 在 HAE 边缘带组织中存在 MMP-2 和 CD34 高表达, 表明 HAE 病灶组织中存在血管新生迹象, 初步说明血管新生可能参与了 HAE 在宿主体内的侵袭转移过程, 而且 MMP-2 可能促使 HAE 组织血管新生。由于 HAE 的生长方式与肿瘤类似, 人们借助肿瘤的浸润转移机制来研究 HAE 的发病机制, 希望通过对 HAE 血管生成、浸润转移机制的研究能找到阻止其对宿主损伤的途径, 帮助临床上开发新药、寻找新的治疗方法以达到治疗包虫病的目的。

参考文献

- [1] PIARROUX M, PIARROUX R, GIORGI R, et al. Clinical features and evolution of alveolar echinococcosis in France from 1982 to 2007; results of a survey in 387 patients[J]. *J Hepatol*, 2011, 55(5): 1025-1033.
- [2] SHOHEI H, TADA O, FUMIAKI S, et al. Pediatric alveolar echinococcosis invading the diaphragm and spreading to the chest and abdominal wall[J]. *J Pediatr Surg*, 2010, 45(2): 13-16.
- [3] CHARBONNET P, BUHLER L, SAGNAK E, et al. Long-term follow up of patients with alveolar echinococcosis[J]. *Ann Chir*, 2004, 129: 337-342.
- [4] MATTEM J, STAMMLER G, KOOMAGI R, et al. Association of vascular endo-thelial growth factor expression with tumor cell proliferation in ovarian carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 1997, 17(17): 621-624.
- [5] 任波, 王静, 刘文亚, 等. MR 扩散加权成像的肝泡状棘球蚴边缘带影像特征与组织病理学对照分析[J]. *中华放射学杂志*, 2012, 46(1): 57-60.
- [6] E1-BADRAWY M K, YOUSEF A M, SHAALAN D, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in lung cancer patients and its relation to serum mmp-9 activity, pathologic type, and prognosis[J]. *J Bronchology Interv Pulmonol*, 2014, 21(4): 327-334.
- [7] ITOH T, TANIOKA M, YOSHIDA H, et al. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A deficient mice[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(5): 1048-1051.
- [8] 张萍, 邓勇, 樊海宁, 等. 相关细胞因子的表达对肝泡型棘球蚴侵袭转移关系的研究[J]. *重庆医学*, 2013, 42(33): 3989-3991.
- [9] 马少波, 卞志远, 夏海洋, 等. MMP-2、TIMP-2 在小鼠原发性肝泡球蚴病中的表达及意义[J]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2013, 31(4): 477-480.
- [10] SIEMERINK M J, KLAASSEN I, VOGELS I M, et al. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis*, 2012, 15(1): 151-163.
- [11] 张示杰, 吴何兴, 李琪, 等. 沙鼠肝泡球蚴组织中微血管密度、血管内皮生长因子的表达及意义[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2015, 22(2): 134-138.
- [12] 姚冰, 王海涛, 刘文亚, 等. 肝泡球蚴病边缘区域 CT 灌注成像与组织病理对照研究[J]. *腹部影像学*, 2010, 16(3): 215-220.
- [13] 宋涛, 李海涛, 杨凌菲, 等. 大鼠肝泡球蚴病灶浸润增殖区微血管密度与超声造影的相关性研究[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2014, 32(3): 200-204.
- [14] LI J, JIANG K, ZHAO F. Oxymatrine suppresses proliferation and facilitates apoptosis of human ovarian cancer cells through upregulating microRNA-29b and downregulating matrix metalloproteinase-2 expression[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5369-5374.
- [15] VUITTON D A, GOTTSTEIN B. Echinococcus multilocularis and its intermediate host; a model of parasite-host interplay[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010: 923193.
- [16] 张龙, 张示杰, 曹玉文, 等. 骨桥蛋白与肝泡型棘球蚴转移的相关性研究[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2011, 29(1): 33-36.