

• 肿瘤介入 Tumor intervention •

血清 *nm23-H1* 水平对肝细胞肝癌 TACE 治疗预后的影响

郭建海, 杨仁杰

【摘要】 目的 探讨肝细胞肝癌患者血清 *nm23-H1* 基因水平及其对 TACE 治疗预后的影响。方法 收集 60 例行 TACE 治疗的肝细胞肝癌患者血清, 采用 ELISA 检测血清 *nm23-H1* 水平, 并与 12 例正常对照组进行比较。回顾性分析所有患者的临床病理资料, 对患者血清 *nm23-H1* 水平与临床资料进行相关性分析, 用 Kaplan-Meier 生存曲线分析患者生存率, 并用 log 等级检验比较。多因素分析方法评估血清 *nm23-H1* 水平及相关因素对预后的意义。结果 肝细胞肝癌患者血清 *nm23-H1* 平均水平为 (126.4 ± 51.3) ng/ml, 明显低于正常对照组的 (228.3 ± 38.9) ng/ml ($P < 0.01$)。患者血清 *nm23-H1* 水平与白蛋白水平呈负相关 ($r = -0.256, P = 0.048$), 而与患者年龄及血清 AFP、ALT、AST、GGT、胆红素水平均无相关性。随访 1 周 ~ 83 个月, 中位随访时间为 17.5 个月。单因素分析显示肝外转移、门静脉瘤栓、动静脉瘘和血清 AFP 升高是预后不良的因素。多因素 COX 模型分析显示血清 *nm23-H1* 水平是影响生存的因素之一。结论 血清 *nm23-H1* 水平有可能作为肝细胞肝癌患者 TACE 治疗疗效观察及预后判断的有用指标。

【关键词】 肝细胞肝癌; TACE; *nm23-H1* 基因; 预后; 酶联免疫吸附试验

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2010)-06-0463-04

Impact of serum *nm23-H1* level on the prognosis of hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization treatment GUO Jian-hai, Yang Ren-jie. Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Department of Interventional Therapy, School of Oncology, Peking University, Beijing Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China

Corresponding author: YANG Ren-jie

【Abstract】 Objective To discuss the impact of serum *nm23-H1* level on the prognosis of hepatocellular carcinoma (HCC) after transcatheter arterial chemoembolization (TACE) treatment. Methods By using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) serum *nm23-H1* levels were measured in randomly-selected 60 patients with HCC who received TACE. The results were compared with that of 12 healthy subjects. All patients' clinical data were retrospectively analyzed. Serum *nm23-H1* levels were correlated with clinical data of the HCC patients. The patients' survival rates were analyzed with Kaplan-Meier survival curves and compared by the log-rank test. The prognostic significance of serum *nm23-H1* levels and factors related to survival rate were evaluated by multivariate analysis. Results The mean serum *nm23-H1* level in HCC patients was (126.4 ± 51.3) ng/ml, which was significantly lower than that in healthy subjects (228.3 ± 38.9) ng/ml ($P < 0.001$). A significant negative correlation existed between serum *nm23-H1* level and serum albumin level ($r = -0.256, P = 0.048$). The serum *nm23-H1* level carried no significant correlations with the patient's age or with the levels of serum AFP, ALT, AST, GGT and bilirubin. A follow-up for one week to 83 months (median time of 17.5 months) was conducted. Single factor analysis showed that extra-hepatic metastasis, portal vein tumor thrombus, arterio-venous fistula formation and high serum AFP levels were unfavorable prognosis factors. By multivariate analysis, serum *nm23-H1* level was proved to be one of the potential prognostic factors affecting the survival rate. Conclusion Serum *nm23-H1* level may be used as an important reference for evaluating the therapeutic effect and judging the prognosis in patients with HCC after TACE treatment. (J Intervent Radiol, 2010, 19: 463-466)

基金项目: 国家传染病防治科技重大专项资助 (项目编号: 2008ZX10002-26)

作者单位: 100142 北京 北京大学临床肿瘤学院、北京肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所介入治疗科、恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室

通信作者: 杨仁杰

【Key words】 hepatocellular carcinoma; transcatheter arterial chemoembolization; *nm23-H1 gene*; prognosis; enzyme-linked immunosorbent assay

肝细胞肝癌(HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一。主要病因是乙型肝炎病毒感染所致肝炎肝硬化,大部分患者发现时病期较晚或合并肝硬化,失去了外科手术治疗的机会^[1-3], TACE 是不可切除肝癌的主要治疗手段。目前,对于 TACE 疗效的肿瘤标记物监测除了 AFP 检测外,缺少有效的血清学监测指标。*nm23-H1* 基因是癌转移抑制基因,研究发现 *nm23-H1* 基因在肿瘤转移过程中发挥负性调节作用^[4], *nm23-H1* 表达减少可促进肿瘤的转移。为了探讨 HCC 患者血清 nm23-H1 蛋白水平及其对 TACE 治疗预后的影响,我们用 ELISA 检测了 60 例 HCC 患者 TACE 前血清 nm23-H1 蛋白水平,并以健康正常人作对照,结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 收集 60 例原发性 HCC 患者,其中男 55 例,女 5 例,年龄 37 ~ 84 岁,介入治疗前采集患者静脉血分离血清。正常对照组 12 例,其中男 8 例,女 4 例。

1.1.2 设备与材料 Multistar T.O.P DSA 机(SIMENS, 德国)、18 G Seldinger 穿刺针、血管鞘(Terumo, 日本)、导丝(Terumo, 日本)、导管(Terumo, 日本)等,人 nm23-H1 蛋白 ELISA 检测试剂盒(长春汇力生物技术有限公司分装),酶标仪(BIO-RAD 680, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 TACE 方法 采用 Seldinger 技术穿刺股动脉成功后,置入 5 F 导管鞘,经导丝引入导管,在 DSA 血管造影机监视下,选择腹主动脉、腹腔干、肝动脉和肠系膜上动脉等造影探查肿瘤供血动脉,根据肿瘤大小、数目及患者全身情况,行肿瘤化疗栓塞,常用的化疗药包括:5-FU 750 ~ 1 000 mg、顺铂 50 ~ 60 mg、奥沙利铂 100 ~ 150 mg、吉西他滨 15 ~ 20 mg、阿霉素或表阿霉素 20 ~ 60 mg,栓塞剂一般采用超液化碘油 5 ~ 20 ml 与阿霉素或表阿霉素混合乳剂,有时加用明胶海绵颗粒。

1.2.2 血清 nm23-H1 检测 60 例患者均于介入治疗之前空腹采集静脉血 4 ml 置于含促凝剂的采血管内,于 2 h 内离心(3 000 g, 10 min)分离血清,分

装,置于-70℃低温冰箱保存。同样方法采集 12 例正常人血清,集中测定。采用 ELISA 法,按照说明书操作,在美国 BIO-RAD680 全自动酶标仪测量 450 nm 波长吸光度 *A* 值,根据标准品绘制标准曲线,最后求得血清 nm23-H1 水平(ng/ml)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS11.5 统计软件对数据进行分析,符合正态分布的计量资料变量用($\bar{x} \pm s$)表示,非正态分布的计量资料用中位数表示。计量资料用独立样本 *T* 检验。相关性用 Pearson 相关系数(*r*)表示。单因素生存分析采用 Kaplan-Meier 方法,多因素分析采用 Cox 回归模型。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者临床特点

60 例患者的基本临床特点详见表 1,其中 27 例采血前从未行 TACE 或 TAI 治疗,其余 33 例采血前至少做过 1 次 TACE 或 TAI 治疗。所有患者中有 7 例(11.7%)只做过 1 次 TACE 或 TAI,其余 53 例(88.3%)患者做过 2 ~ 21 次 TACE 或 TAI,平均每例患者的介入次数为 5.58 次。所有患者证实有肝硬化;其中 46 例为不可切除 HCC、9 例为外科术后复发、1 例为射频消融后复发、3 例为外科术后切缘阳性或血管侵犯、1 例为射频消融后持续 AFP 升高。无 TACE 或 TAI 相关死亡。

2.2 生存期

随访 0.23 ~ 83 个月,生存期以第 1 次 TACE 日期为起点,中位生存期为 17.5 个月。

2.3 血清 nm23-H1 水平与患者临床资料的关系

60 例 HCC 患者血清 nm23-H1 水平平均为(126.4 ± 51.3)ng/ml,明显低于正常对照组(228.3 ± 38.9 ng/ml)(*P* < 0.01)。33 例采血前做过 TACE 治疗的患者血清 nm23-H1 水平与 27 例既往未做过 TACE 治疗患者相比,无统计学差异[各为(127.0 ± 50.6)ng/ml 和 (125.6 ± 53.0)ng/ml](*P* = 0.921)。BCLC C 期患者血清 nm23-H1 水平高于 BCLC A 和 B 期者,差异有统计学意义(*P* = 0.030);女性患者血清 nm23-H1 水平高于男性患者,但差异无统计学意义(*P* = 0.331);Child-Pugh 评分 B 级患者的血清 nm23-H1 水平高于 A 级者,差异也无统计学意义(*P*

= 0.250)。肿瘤最大径超过 10 cm、有门静脉瘤栓、有动静脉瘘及有肝外转移患者的血清 nm23-H1 水平分别与肿瘤最大径小于 10 cm、无门静脉瘤栓、无动静脉瘘及无肝外转移者相比,均无统计学差异(表 2)。患者血清 nm23-H1 水平与血清白蛋白水平呈负相关($r = -0.256$, $P = 0.048$),血清 nm23-H1 水平与年龄、血清 AFP、ALT、AST、GGT、PLT 计数或胆红素水平等均无相关性($P > 0.05$)。

2.4 血清 nm23-H1 水平对预后的影响

Kaplan-Meier 生存分析显示肝外转移 ($P < 0.01$)、门静脉瘤栓 ($P < 0.01$)、动静脉瘘 ($P < 0.05$) 和血清 AFP 升高 (> 86.36 ng/ml) ($P < 0.05$) 是预后不良的因素。将血清 nm23-H1 及单因素分析显示影响预后的变量带入 COX 回归模型,结果见表 3,从结果我们可以看出血清 nm23-H1 是影响预后的因素之一。

表 1 患者临床资料

参数	测值
性别, n (%)	
男	55 (91.7%)
女	5 (8.3%)
年龄 (岁)	62 (37 ~ 84)
病毒学, n (%)	
HBV	48 (80.0%)
HCV	8 (13.3%)
HBV 合并 HCV	4 (6.7%)
Child-Pugh 分级, n (%)	
A	51 (85.0%)
B	9 (15.0%)
BCLC 分期, n (%)	
A	10 (16.7%)
B	34 (56.7%)
C	16 (26.7%)
AFP (ng/ml)	86.36 (1.04 ~ 124961)
ALB (g/L)	39.79 \pm 4.131
TBIL (μ mol/L)	14.40 (5.1 ~ 42.1)
ALT (u/L)	41.5 (12 ~ 210)
AST (u/L)	42.5 (18 ~ 174)
GGT (u/L)	101.5 (18 ~ 656)
肿瘤直径	
≤ 10 cm, n (%)	50 (83.3%)
> 10 cm, n (%)	10 (16.7%)
门静脉瘤栓, n (%)	
有	10 (16.7%)
无	50 (83.3%)
动静脉瘘, n (%)	
有	6 (10.0%)
无	54 (90.0%)
肝外转移, n (%)	
有	7 (11.7%)
无	53 (88.3%)
肿瘤数目, n (%)	
≤ 3 个	26 (43.3%)
> 3 个	34 (56.7%)

表 2 血清 nm23-H1 水平 HCC 患者临床资料之间的关系

一般资料	例数	nm23-H1 (ng/ml)	P 值
性别			
男	55	124.4 \pm 51.25	0.331
女	5	147.9 \pm 51.98	
年龄			
≤ 62 y	32	127.0 \pm 51.46	0.920
> 62 y	28	125.7 \pm 52.01	
病毒学			
HBV	48	128.9 \pm 50.53	0.369
HCV	8	127.7 \pm 60.08	
HBV 合并 HCV	4	90.1 \pm 41.35	
Child-Pugh 分级			
A	51	123.2 \pm 50.24	0.250
B	9	144.6 \pm 56.37	
BCLC 分期			
A + B	44	117.8 \pm 49.65	0.030
C	16	150.0 \pm 49.66	
肿瘤大小			
≤ 10 cm	50	125.2 \pm 54.39	0.695
> 10 cm	10	132.3 \pm 32.98	
门静脉瘤栓			
有	10	137.2 \pm 39.88	0.469
无	50	124.2 \pm 53.34	
动静脉瘘			
有	6	159.7 \pm 40.51	0.093
无	54	122.7 \pm 51.31	
肝外转移			
有	7	132.9 \pm 53.24	0.723
无	53	125.5 \pm 51.48	
肿瘤数目			
≤ 3 个	26	140.0 \pm 53.85	0.071
> 3 个	34	115.9 \pm 47.38	

表 3 多因素 COX 回归模型分析结果

项目及测值	B	P	相对危险度 exp(B)	95.0% 置信区间
血清 nm23-H1 水平 (> 126.38 和 < 126.38 ng/ml)	-1.087	0.013	0.337	0.143 0.795
肝外转移 (有和无)	1.970	0.001	7.170	2.360 21.782
血清 AFP 水平 (> 86.36 和 < 86.36 ng/ml)	1.718	0.001	5.576	2.115 14.698

3 讨论

影响 TACE 治疗 HCC 的预后因素很多。比较肯定的因素有肝功能分级、肿瘤大小、门脉瘤栓、血清 AFP 水平等^[5-7]。目前,对于 TACE 疗效及预后的监测仍以影像学检查及甲胎蛋白 (AFP) 检测为主,然而,影像学检查不能及时反映肿瘤组织坏死的情况,无法及时反映治疗的疗效,且因其检查费用高、接触射线、无法量化等因素限制了其在临床实际当中的应用;AFP 的检测水平有赖于肝癌组织的完全坏死,对于栓塞早期,缺氧对肿瘤细胞造成的影响,其作为观察评价指标的应用价值有限;尤其对于 AFP 阴性的患者 (约占肝癌患者的 20% ~ 40%),目前缺少有效的血清学监测指标。临床工作中希望能够找到可重复性好、检测方便、可以量化、并能客观反映 HCC 介入治疗预后的有效评价指标。

nm23-H1 基因是 1988 年由 Steeg 等^[8]首次在 K21735 鼠黑色素瘤细胞株中用消减杂交法分离出来,其编码产物主要为二磷酸核苷激酶,参与体内磷酸核苷的生成,通过影响微管聚合状态及 G 蛋白

介导的信号传导通路而调节细胞代谢,在肿瘤细胞增殖、分化、凋亡和侵袭转移中起重要作用^[4,9-10]。与 *nm23-H1* 抑制肿瘤转移有关的机制主要包括 3 方面:针对 ATP-柠檬酸裂解酶、醛缩酶 C、ras 基因酶抑制剂的组胺酸酶活性,使细胞分裂素活化蛋白激酶失活;结合蛋白能结合多余的 *nm23-H1*,使其抑制转移的活性减低;改变下游基因表达^[11]。动物实验研究发现,在敲除了 *nm23* 基因的小鼠和野生型小鼠体内诱发肝癌时,虽然 2 种小鼠肝内肿瘤形成方面没有差别,但是敲除 *nm23* 基因的小鼠发生肺转移概率是野生型的 2 倍^[12]。研究还发现 *nm23-H1* 基因在肿瘤转移过程中发挥负性调节作用,表达减少可促进肿瘤的转移,并且与预后不良有关。Yamaguchi 等^[13]通过对 HCC 标本的免疫组化研究发现,*nm23-H1* 蛋白表达与 HCC 肝内转移发生相关,而与肿瘤大小组织病理学分类以及包膜浸润等无关,可以作为判断预后的指标。有人把肝癌组织与正常肝组织或癌旁组织进行比较发现,肝癌组织 *nm23-H1* 蛋白表达阳性率明显低于正常肝组织或癌旁组织,且 *nm23-H1* 的表达与肿瘤大小、包膜有无、AFP 水平、HBV 感染情况、肝硬化的存在与否、TNM 分期等无关,对于判断肝癌术后转移和复发可能有用^[14]。本研究结果显示 *nm23-H1* 蛋白在正常人血清含量明显高于 HCC 患者 ($P < 0.01$),但能否作为诊断 HCC 的指标还需进一步研究。女性患者血清 *nm23-H1* 蛋白含量高于男性,且有统计学意义,BCLC C 期、肿瘤最大径大于 10 cm、有门静脉瘤栓、有动-静脉瘘及肿瘤数目不超过 3 个的患者血清 *nm23-H1* 蛋白水平分别高于 BCLC A 和 B 期、肿瘤最大径不大于 5 cm、无门静脉瘤栓、无动-静脉瘘及肿瘤数目超过 3 个者,但均无统计学意义。患者血清 *nm23-H1* 蛋白水平与白蛋白水平呈负相关,但其临床意义尚不明确。

肝癌组织标本中 *nm23-H1* 表达降低与侵袭、转移相关,是预后不良的因素。但是,本研究中 Kaplan-Meier 生存分析显示血清 *nm23-H1* 蛋白水平的高低与生存率并不相关 ($P = 0.104$),这说明 *nm23-H1* 基因在组织标本和血清中的表达不完全一致,它们之间的关系需要进一步研究。而将血清 *nm23-H1* 及其他影响预后的变量带入 COX 回归模型,结果提示血清 *nm23-H1* 蛋白水平可能是影响预

后的因素之一。随着对 *nm23-H1* 基因的不断深入研究,将为 HCC 转移复发、预后预测提供新的理论基础,进而为 HCC 的靶向治疗提供新的思路。

[参考文献]

- [1] 汤钊猷. 肝癌诊治现状与前景[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2003, 10: 191.
- [2] 吴孟超, 吴东, 等. 原发性肝癌综合治疗的现状与展望[J]. 癌症进展杂志, 2005, 3: 411 - 412.
- [3] 汤钊猷. 临床肝癌学[M]. 上海: 上海科技教育出版社, 2001: 24.
- [4] Steeg PS. Perspectives on classic articles: metastasis suppressor genes [J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96: E4.
- [5] 刘嵘, 王建华, 周康荣, 等. 肝动脉化疗栓塞治疗原发性 HCC 中碘化油沉积良好患者疗效观察[J]. 介入放射学杂志, 2001, 10: 212 - 214.
- [6] Greten TF, Papendorf F, Bleck JS, et al. Survival rate in patients with hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis of 389 patients[J]. Br J Cancer, 2005, 92: 1862 - 1868.
- [7] 倪鑒达, 傅青春, 陈成伟, 等. 不同介入模式治疗伴失代偿性肝硬化肝癌[J]. 介入放射学杂志, 2007, 16: 249 - 252.
- [8] Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential [J]. J Natl Cancer Inst, 1988, 80: 200 - 204.
- [9] Ishikawa N, Shimada N, Takagi Y, et al. Molecular evolution of nucleoside diphosphate kinase genes: conserved core structures and multiple-layered regulatory regions[J]. J Bioenerg Biomembr, 2003, 35: 7 - 18.
- [10] Roymans D, Willems R, van Blockstaele DR, et al. Nucleoside diphosphate kinase (NDPK/NM23) and the waltz with multiple partners: possible consequences in tumor metastasis [J]. Clin Exp Metastasis 2002, 19: 465 - 476.
- [11] Steeg PS, Horak CE, Miller KD. Clinical-Translational Approaches to the Nm23-H1 Metastasis Suppressor [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14: 5006 - 5012.
- [12] Boissan M, Wendum D, Arnaud-Dabernat S, et al. Increased lung metastasis in transgenic NM23-Null/SV40 mice with hepatocellular carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97: 836 - 845.
- [13] Yamaguchi A, Urano T, Goi T, et al. Expression of human nm23-H1 and nm23-H2 proteins in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 1994, 73: 2280 - 2284.
- [14] Liu YB, Gao SL, Chen XP, et al. Expression and significance of heparanase and nm23-H1 in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11: 1378-1381.

(收稿日期:2010-01-26)