

· 肿瘤介入 Tumor intervention ·

血清高迁移率组蛋白 B1、可溶性晚期糖基化终末产物受体、脱氧核糖核酸酶与 TACE 早期疗效相关性研究

施昌盛, 杨庆, 肖池金, 虞希祥, 郑冰汝, 李成

【摘要】 目的 探讨原发性肝癌患者血清高迁移率组蛋白 B1 (HMGB1)、人可溶性晚期糖基化终末产物 (sRAGE)、脱氧核糖核酸酶 (DNase) 对 TACE 近期疗效的评估价值。**方法** 对收治的 42 例患者 (共计 56 次 TACE 治疗) 分别在 TACE 术前、术后 24 h 采集外周静脉血标本, 用 ELISA 法检测外周血清中 HMGB1、sRAGE、DNase 的表达水平。根据 mRECIST 标准进行 TACE 术后疗效评估, 将完全缓解+部分缓解+疾病稳定的病例归为获益组, 疾病进展者归为无效组。比较 TACE 术前、术后, 获益组及无效组之间的血清 HMGB1、sRAGE、DNase 的表达水平, 并进行统计学分析。**结果** TACE 术前与术后 24 h 血清 HMGB1、sRAGE、DNase 表达水平比较差异有显著统计学意义 ($P=0.003, P=0.000, P=0.001$), 且术后较术前呈升高趋势。56 例次 TACE 中, 24 例次为稳定 (SD), 2 例次部分缓解 (PR), 30 例次为肿瘤进展 (PD), 将 SD 和 PR 患者归为获益组 ($n=26$), PD 患者为无效组 ($n=30$)。在 TACE 术前, 获益组与无效组血清 HMGB1、DNase 表达水平比较差异无统计学意义 ($P=0.395, P=0.091$); 在 TACE 术后 24 h, 血清 HMGB1、DNase 在获益组和无效组对比差异也无统计学意义 ($P=0.354, P=0.182$)。而 sRAGE 在获益组与无效组之间的表达水平在术前差异无统计学意义 ($P=0.143$), 而在术后 24 h, 两组间 sRAGE 表达水平差异有统计学意义 ($P=0.030$)。**结论** ①TACE 术后血清 HMGB1、sRAGE、DNase 表达水平较术前升高; ②中晚期肝癌患者外周血清中 sRAGE 与 TACE 疗效相关, 可以作为 TACE 治疗肝癌疗效早期评估的指标。

【关键词】 肝癌; 肝动脉化疗栓塞; 高迁移率组蛋白 B1; 可溶性晚期糖基化终末产物受体; 脱氧核糖核酸酶; 疗效

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2016)-08-0677-05

Correlation study between HMGB1, sRAGE, DNase and the short-term efficacy of TACE SHI Chang-sheng, YANG Qing, XIAO Chi-jin, YU Xi-xiang, ZHENG Bing-ru, LI Cheng. Department of Interventional Radiology, Third Affiliated Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang Province 325200, China
Corresponding author: YU Xi-xiang, E-mail: yudsa@126.com

【Abstract】 Objective To discuss the value of high-mobility group protein B1 (HMGB1), soluble receptor of advanced glycation end product (sRAGE) and deoxyribonuclease (DNase) in predicting the short-term efficacy of transcatheter arterial chemoembolization (TACE). **Methods** Serum samples were collected from 42 patients with hepatocellular carcinoma (HCC) before and 24 hours after TACE. A total of 56 times of TACE procedure were performed in the 42 patients. The expression levels of HMGB1, sRAGE and DNase in the peripheral serum samples were determined with ELISA method. According to RECIST criteria, the curative effects of TACE were evaluated. The patients of complete remission (CR), partial remission (PR), and stable disease (SD) were classified as the benefit group, and the patients with progress disease (PD) were classified

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2016.08.008

基金项目: 温州市科技计划项目 (Y20140390)

作者单位: 325200 浙江瑞安 温州医科大学附属第三医院 (瑞安市人民医院) 介入科

通信作者: 虞希祥 E-mail: yudsa@126.com

as the invalid group. The pre-TACE and post-TACE expression levels of HMGB1, sRAGE and DNase were compared between the two groups, and the results were statistically analyzed. **Results** The post-TACE expression levels of HMGB1, sRAGE and DNase were significantly different from pre-TACE ones, the differences were statistically significant ($P=0.003$, $P=0.000$ and $P=0.001$ respectively), moreover, the post-TACE expression levels of HMGB1, sRAGE and DNase showed an upward increasing trend. Of the 56 times of TACE procedure, SD was obtained in 24, PR in 2 and PD in 30. The patients of SD and PR were classified as the benefit group ($n=26$), and the patients of PD were classified as the invalid group ($n=30$). Before TACE, no statistically significant differences in the expression levels of HMGB1 and DNase existed between the benefit group and the invalid group ($P=0.395$, $P=0.091$), and 24 hours after TACE the differences in the expression levels of HMGB1 and DNase between the benefit group and the invalid group were also not statistically significant ($P=0.354$, $P=0.182$). The difference in pre-TACE expression level of sRAGE between the benefit group and the invalid group was not statistically significant ($P=0.143$), but 24 hours after TACE the difference in the level of sRAGE between the benefit group and the invalid group became statistically significant ($P=0.030$). **Conclusion** (1) The post-TACE expression levels of HMGB1, sRAGE and DNase are higher than the pre-TACE ones. (2) In advanced HCC patients, the expression level of sRAGE in peripheral serum bears a close relationship to the curative effect of TACE, therefore, it can be used as an index to evaluate the short-term efficacy of TACE for HCC. (J Intervent Radiol, 2016, 25: 677-681)

【Key words】 hepatocellular carcinoma; transcatheter arterial chemoembolization; high-mobility group protein B1; soluble receptor of advanced glycation end product; deoxyribonuclease; curative effect

原发性肝癌是临床上常见的恶性肿瘤之一,大多数肝癌患者在被确诊时已错过手术时机。TACE是中晚期肝癌最主要的治疗手段,因此一种易获得、常规且经济的监测指标来评估 TACE 治疗早期疗效尤为重要。血清脱氧核糖核酸酶(DNase)参与细胞凋亡核小体 DNA 的分解,而血清核小体表达水平与肝癌的 TACE 疗效有着密切关系^[1]。当肿瘤细胞坏死或受损时,核内的高迁移率组蛋白 B1(HMGB1)可释放到胞外,胞外 HMGB1 参与介导炎性免疫反应、细胞增殖、细胞分化、细胞迁移等^[2]。既往研究报道,人肝细胞癌组织中的 HMGB1 基因和蛋白表达水平比正常组织明显增高,其水平与肿瘤病理学分级、远处转移有关^[3]。HMGB1 有一个高亲和力受体,即晚期糖基化终末产物受体(RAGE),在恶性肿瘤中, HMGB1 可以通过与细胞表面 RAGE 特异性结合,起到促进肿瘤生长的作用。而血清 RAGE(sRAGE)是 RAGE 的内源分泌型,由 RAGE mRNA 选择剪切产生,可以与 RAGE 竞争性结合配体,抑制 RAGE 诱导的效应。本研究中我们对 HMGB1、sRAGE、DNase 在 TACE 治疗前后的变化进行分析研究,探讨其与 TACE 早期疗效的相关性,以指导临床。

1 材料与方法

1.1 临床资料

将在我科连续收住的 42 例接受 TACE 治疗的

中晚期肝癌患者纳入本研究,其中男 33 例,女 9 例,平均年龄为 58.1 岁。所有入组患者都是在 2015 年 1 月至 6 月期间在本院收住并进行 TACE 治疗。其中 18 例患者是首次治疗,24 例患者是第 2 次或以上治疗。所有肝癌患者的诊断都是经病理诊断或影像学诊断(2 种及以上影像学检查支持)或联合诊断标准(一种影像学支持加 AFP 支持)^[4]。所有患者均自愿参与且知情同意。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 入组患者都是在 DSA 透视下进行 TACE 治疗。患者取仰卧位,常规消毒、铺巾,局麻下以 Seldinger 技术经股动脉穿刺置入 4 F 动脉鞘,将导管选择性插入到腹腔干开口处及肠系膜上动脉造影,查看肿瘤供血动脉及有无变异的动脉参与肿瘤供血。确定肿瘤供血动脉,尽量超选择到肿瘤供血动脉分支。经导管灌注化疗药物氟尿嘧啶及奥沙利铂,将适量碘油与吡柔比星混合成均匀乳剂,然后在透视下栓塞肿瘤供血动脉,注意推注速度要缓慢,防止反流。对于肿瘤较大、血流较快的,可以适当使用微球混合到乳剂中作肿瘤供血动脉栓塞。

用生化管分别在 TACE 术前及术后 24 h 采集患者外周静脉血标本,并在采集后 2 h 内用离心机以 3 000 r/min 的速度离心 15 min,分离血清,储存于 -80°C 的冰箱中低温保存待测。采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)计算待测样本浓度。

1.2.2 疗效评定 所有中晚期肝癌患者在接受 TACE 术后 1 个月左右行 CT 或 MRI 检查进行疗效评估。TACE 后中位疗效评估时间为 41 d (30 ~ 50 d)。疗效评价根据改良实体瘤治疗疗效评价标准 1.0 版 (mRECIST) [5]。

1.3 统计方法

TACE 术前与术后 24 h 的各指标浓度对比采用非参数秩和检验 (Wilcoxon test), 获益组与无效组间的各指标浓度对比采用非参数秩和检验 (Wilcoxon test)。所有统计学计算采用 SPSS 17.0 统计软件完成。 $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TACE 术后疗效评估结果

本研究中 42 例入组的患者共行 TACE 治疗 56 次, 影像学评估疗效结果为: 56 次 TACE 治疗, 2 次表现为部分缓解 (PR), 24 次表现为疾病稳定 (SD); 而剩下的 30 次则为肿瘤进展 (PD, $n = 30$), 在本研究中, 把 PR 和 SD 患者归为获益组 ($n = 26$), PD 患者为无效组 ($n = 30$)。

2.2 HMGB1、sRAGE、DNase 的变化

HMGB1、sRAGE、DNase 的检测结果显示见表 1。TACE 术后 24 小时血清中 HMGB1 浓度的中位数从术前的 25.74 ng/ml 升至 32.72 ng/ml, 百分比中位数为 19.41%; DNase 浓度的中位数从术前的 33.61 ng/ml 升至 36.29 ng/ml, 百分比中位数增为 8.08%; sRAGE 浓度的中位数从术前的 52.06 ng/L 升至 55.33 ng/L, 百分比中位数为 5.76%; HMGB1、sRAGE、DNase 整体呈上升趋势, 术后与术前对比差异均有统计学意义, P 值分别为 0.0003、0.000、0.001。

表 1 术前术后各指标情况 ($n = 56$)

参数	中位数	四分位范围	总范围	<i>P</i> 值
HMGB1/(ng/ml)				
术前24 h	25.74	19.84~31.44	9.87~63.07	0.03
术后24 h	32.72	23.03~37.75	7.24~56.34	
sRAGE/(ng/L)				
术前24 h	52.06	43.08~60.72	21.20~75.90	0.00
术后24 h	55.33	46.90~61.74	17.34~76.10	
DNase/(ng/ml)				
术前24 h	33.61	29.56~39.23	21.75~50.45	0.01
术后24 h	36.29	31.36~41.14	15.12~55.32	

2.3 HMGB1、sRAGE、DNase 与预后的相关性

TACE 术前和术后 24 h 的 HMGB1 表达水平在获益组与无效组之间均无统计学意义 ($P = 0.395$, $P = 0.354$); TACE 术前, 获益组与无效组的 sRAGE 表

达水平无统计学意义 ($P = 0.143$); 但 TACE 术后 24 h, 两组间 sRAGE 表达水平有统计学差异 ($P = 0.030$); 无论在术前和术后 24 h, 获益组与无效组的 DNase 表达水平均无统计学差异 ($P = 0.091$, $P = 0.182$), 见表 2。

表 2 获益组和无效组各指标情况 ($n = 56$)

参数	获益组	无效组	P 值
HMGB1/(ng/ml)			
术前	26.74	25.08	0.395
术后	33.13	31.43	0.354
sRAGE/(ng/L)			
术前	57.02	45.93	0.143
术后	60.34	49.83	0.030
DNase/(ng/ml)			
术前	34.48	33.32	0.091
术后	36.87	35.87	0.182

3 讨论

目前, 原发性肝癌可手术切除率约为 20% [6]。对于已经失去手术机会, 或外科手术无法完全切除的肝癌患者, 只能通过放疗、化疗等非手术治疗手段控制病情进展, 以提高生活质量、延长生存期。TACE 是一种临床应用较广且疗效较好的治疗方法, 与支持治疗相比, TACE 可以明显延长中晚期肝癌患者的生存期 [7-8]。

然而, 并不是所有肝癌患者都能从 TACE 中获益。在接受 TACE 治疗的患者中, 只有 30% ~ 50% 的患者肿瘤广泛坏死, 2% 以下的患者肿瘤完全坏死 [9]。临床上, 通常采用 CT、MRI 等影像学手段评估 TACE 的疗效 [10], 但肿瘤宏观体积发生改变一般都要在数月后, 所以需要寻找能早期反映肝癌治疗疗效的血生物标志, 以便及早评价 TACE 的疗效, 及时调整治疗方案, 使患者得到最佳治疗时机, 达到最佳治疗效果。

放疗或化疗治疗肿瘤是通过诱导细胞凋亡而抑制肿瘤增长, 肿瘤细胞在发生凋亡的同时, 从非免疫原性细胞转化为免疫原性细胞, 并由此激发抗体内抗肿瘤的免疫杀伤效应, 这需要一系列信号分子和细胞因子参与。因此我们可以动态监测中晚期肝癌患者 TACE 前及术后血清中肿瘤细胞免疫原性死亡相关分子的表达, 来评估其疗效及预后。

HMGB1 是肿瘤细胞免疫原性死亡相关分子之一, 其与染色体关系密切, 在转录过程扮演着重要的角色 [11], 其存在于各种细胞的细胞核和细胞质中, 是一种与炎症反应相关的细胞因子。早期研究认为 HMGB1 主要在细胞坏死的初期释放, 但最近研究发

现,凋亡后继承性坏死的细胞也可以释放 HMGB1^[12]。细胞外的 HMGB1 由炎性细胞释放时,其作为危险相关分子(danger associated molecular, DAM)发挥效应,但由坏死细胞或应激细胞被动释放时,它充当炎性介质发挥作用。坏死细胞释放的免疫复合体中含有 DNA 片段以及与之结合的 HMGB1 分子,其中 HMGB1 分子可以和细胞膜上的 TLR2 受体结合,从而活化该受体介导的信号通路,诱导树突状细胞分化成熟,并提高 CD40、CD54 和 MHC II 等的表达水平^[13]。近年,越来越多的证据表明,危险相关分子模式(danger associated molecular pattern, DAMP)信号参与肿瘤细胞免疫原性凋亡,这可能是基于生化特性的坏死和凋亡,其对持续化疗的影响至关重要。相比之下,去除 HMGB1 和 TLR4 诱发的免疫反应,从而降低体内外抗癌反应,并导致治疗效果不佳。目前,仍不清楚血清 HMGB1 对癌症疾病疗效预测的相关性。除触发 T 细胞免疫反应外, HMGB1 还能促进血管生成,在胃肠肿瘤中, HMGB1 及其受体 RAGE 的超表达对肿瘤的浸润及转移有重要作用^[14]。

以往的研究显示, HMGB1 在大多数肿瘤中表达水平升高,包括结肠癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤^[15];有学者进一步研究发现,在胃癌、肝癌、肺癌中, HMGB1 与肿瘤的浸润和转移密切相关,是影响这些肿瘤预后的重要因素^[16]。本研究发现,在 TACE 后 24 h,血清 HMGB1 含量较术前有所增加,且 TACE 前与术后 24 h 对比差异有统计学意义。引起血清中 HMGB1 表达增高的原因可能是化疗药物引起细胞凋亡,凋亡细胞或应激细胞被动释放 HMGB1;还有可能是肝动脉栓塞后,肝组织供血减少,低氧环境下可以诱导肝细胞释放 HMGB1^[17]。而 TACE 术前及术后 24 h HMGB1 表达水平在无进展及无效组差异均无统计学意义,暂不能确定其在中晚期肝癌中的预后评估价值。

RAGE 是 HMGB1 的重要受体之一,与 HMGB1 具有高亲和力。研究表明 RAGE 在肿瘤细胞的浸润及转移中起着重要的调节作用^[18]。RAGE 作为癌蛋白,通过 RAGE-HMGB1 轴激活 Race, JNK/SAPK, p44/p42, p38, NF- κ B 等信号通路,促进肿瘤细胞的生长、转移。sRAGE 为 RAGE 的胞外段,是胞外配体结合部位,在 RAGE 诱导的信号转导通路中有着重要作用。血清 sRAGE 是 RAGE 的内分泌型,可以与 RAGE 竞争性结合 HMGB1,从而抑制 HMGB1-RAGE 信号通路诱导的促肿瘤生长、转移的效应。有研究表明,在肝癌组织中,血清 RAGE 呈

高表达状态^[19],在本研究中发现, TACE 术前及术后 24 h 血清 sRAGE 表达水平对比有统计学意义,且术后较术前呈整体升高的趋势,这可能是 TACE 术后,在低血供环境下的早期,肝癌通过诱导 RAGE 的表达获得对低氧环境的耐受^[20]。我们还发现在 TACE 术前 24 h,血清 sRAGE 在稳定和无效组中均无统计学差异,而在术后 24 h,血清 sRAGE 在获益组和无效组中差异有统计学意义,且发现肝癌患者 sRAGE 表达水平越高的,其预后越好。这一结果与 Stoetzer 等^[21]在乳腺癌新辅助化疗评估中相一致。这可能是高表达的 sRAGE 作为诱骗受体,竞争性抑制 RAGE-HMGB1,抑制增殖、侵袭和转移效应,减缓肿瘤生长。

DNase 在细胞凋亡时可以促使染色体分解为小的染色体片段,可以在血液中清除核小体发挥相应的作用。既往研究报道,在头颈部癌症患者中, DNase 活性在治疗有效的患者中比治疗后进展的患者中表达更高^[22]。在我们的研究设置中这可能是一种很有前途的生物标记物,正如预期的那样, DNase 在 TACE 术后 24 h 与术前对比呈上升趋势;且两者对比差异有统计学意义,然而,获益组和无效组之间,不论是在术前还是在术后均无统计学差异。

此外,我们将术前 HMGB1、sRAGE、DNase 的表达水平与已接受 TACE 次数(0, 1 次,及 2 次或以上)的关系进行统计分析,结果差异均无统计学意义($P>0.05$),尚不能肯定 TACE 次数对 HMGB1、sRAGE、DNase 的表达有影响。

[参考文献]

- [1] Kohles N, Nagel D, Jungst D, et al. Relevance of circulating nucleosomes and oncological biomarkers for predicting response to transarterial chemoembolization therapy in liver cancer patients [J]. BMC Cancer, 2011, 11: 202.
- [2] Naglova H, Bucova M. HMGB1 and its physiological and pathological roles [J]. Bratisl Lek Listy, 2012, 113: 163-171.
- [3] Dong YD, Cui L, Peng CH, et al. Expression and clinical significance of HMGB1 in human liver cancer: knockdown inhibits tumor growth and metastasis in vitro and in vivo [J]. Oncol Rep, 2013, 29: 87-94.
- [4] Song do S, Bae SH. Changes of guidelines diagnosing hepatocellular carcinoma during the last ten-year period [J]. Clin Mol Hepatol, 2012, 18: 258-267.
- [5] Lencioni R, Llovet JM. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma [J]. Semin Liver Dis, 2010, 30: 52-60.

- [6] 乔彬彬, 虞希祥, 王舒婷, 等. TACE 术中灌注氟尿嘧啶、奥沙利铂及吡柔比星治疗原发性肝癌的临床效果分析[J]. 介入放射学杂志, 2015, 24: 349-353.
- [7] Bolondi L, Sofia S, Siringo S, et al. Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma; a cost effectiveness analysis[J]. Gut, 2001, 48: 251-259.
- [8] Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival[J]. Hepatology, 2003, 37: 429-442.
- [9] Takayasu K, Arai S, Ikai I, et al. Prospective cohort study of transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma in 8510 patients[J]. Gastroenterology, 2006, 131: 461-469.
- [10] Llovet JM, Real MI, Montana X, et al. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial[J]. Lancet, 2002, 359: 1734-1739.
- [11] 庄利萍, 于璐, 杨倩, 等. HMGB1 RAGE 蛋白在肝癌中的表达及临床意义[J]. 河北医学, 2015, 21: 377-382.
- [12] Shrivastava S, Mansure JJ, Almajed W, et al. The role of HMGB1 in radio-resistance of bladder cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2016, 15: 471-479.
- [13] Luo J, Chen J, He L. Mir-129-5p attenuates irradiation-induced autophagy and decreases radioresistance of breast cancer cells by targeting HMGB1[J]. Med Sci Monit, 2015, 21: 4122-4129.
- [14] 王婷婷, 韩菲菲, 陈国千. 高迁移率族蛋白 B1 与消化系统恶性肿瘤[J]. 医学研究生学报, 2013, 26: 1083-1087.
- [15] Lehner J, Wittwer C, Fersching D, et al. Methodological and preanalytical evaluation of an HMGB1 immunoassay[J]. Anticancer Res, 2012, 32: 2059-2062.
- [16] 王新军, 周少龙, 付旭东, 等. 人脑胶质瘤组织 HMGB1 表达临床意义初步分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21: 1339-1342.
- [17] Cheng BQ, Jia CQ, Liu CT, et al. Serum high mobility group box chromosomal protein 1 is associated with clinicopathologic features in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Digest Liver Dis, 2008, 40: 446-452.
- [18] Delgado-Lopez F, Rojas A. RAGE at tumor microenvironment. looking at tumor-associated macrophages[J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2015, 18: 725-726.
- [19] Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, et al. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation[J]. J Transl Med, 2009, 7: 17.
- [20] Kostova N, Zlateva S, Ugrinova I, et al. The expression of HMGB1 protein and its receptor RAGE in human malignant tumors [J]. Mol Cell Biochem, 2010, 337: 251-258.
- [21] Stotzer OJ, Fersching DM, Salat C, et al. Circulating immunogenic cell death biomarkers HMGB1 and RAGE in breast cancer patients during neoadjuvant chemotherapy[J]. Tumour Biol, 2013, 34: 81-90.
- [22] Patel PS, Patel BP, Rawal RM, et al. Evaluation of serum alkaline DNase activity in treatment monitoring of head and neck cancer patients[J]. Tumour Biol, 2000, 21: 82-89.

(收稿日期:2016-01-05)

(本文编辑:俞瑞纲)