

•非血管介入 Non-vascular intervention•

外周血 IL-6 对早期肝癌微波消融后复发的预测

徐晓林, 丁建民, 高英堂, 王凤梅, 焦晓磊, 骆莹, 朱争艳, 王彦冬, 经翔

【摘要】 目的 探讨血清中白细胞介素-6(IL-6)和 IL-22 对早期乙型病毒性肝炎相关肝细胞癌患者(HBV-HCC)微波消融(MWA)治疗后复发的预测作用。**方法** 收集 49 例经 MWA 治疗早期 HBV-HCC 患者术前外周血,应用 ELISA 检测外周血 IL-6 与 IL-22 的含量,同期 30 例健康人作对照。据 x-tile 软件计算 cut-off 值将 IL-6 和 IL-22 水平分为高水平组和低水平组,Kaplan-Meier 分析两组的无瘤生存期,Log rank 检验差异性,Cox 回归筛选影响 HBV-HCC 复发的危险因素。**结果** HCC 组的 IL-6 与 IL-22 水平明显高于对照组(IL-6:13.20(11.87~15.79) pg/ml 和 10.47(9.50~13.82) pg/ml, $P=0.001$;IL-22:42.18(34.39~57.44) pg/ml 和 25.45(22.31~30.12) pg/ml, $P<0.001$)。Kaplan-Meier 分析显示 HCC 患者术前低 IL-6、高总胆红素和低白蛋白水平预示较短无瘤生存期,IL-22 对 HCC 复发的影响差异无统计学意义。Cox 回归多因素分析显示低 IL-6(≤ 13.2 pg/ml, $HR:3.721$,95% $CI:1.674\sim 8.272$, $P=0.001$)与低白蛋白水平(≤ 41.0 g/L, $HR:2.085$,95% $CI:1.101\sim 3.950$, $P=0.024$)是影响肝癌复发的独立危险因素。**结论** 术前 IL-6 和白蛋白水平可作为 MWA 治疗 HBV-HCC 患者预测复发的指标。

【关键字】 肝细胞癌;白细胞介素-6;微波消融;无瘤生存期

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2017)-03-0232-05

The application of peripheral serum interleukin-6 levels in predicting the recurrence of early hepatocellular carcinoma after receiving microwave ablation XU Xiaolin, DING Jianmin, GAO Yingtang, WANG Fengmei, JIAO Xiaolei, LUO Ying, ZHU Zhengyan, WANG Yandong, JING Xiang. The Third Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China

Corresponding author: JING Xiang, E-mail: dr.jingxiang@aliyun.com

【Abstract】 Objective To investigate the clinical application of serum interleukin-6 (IL-6) and interleukin-22 (IL-22) levels in predicting the recurrence of hepatitis B virus (HBV)-related early hepatocellular carcinoma (HCC) after receiving microwave ablation (MWA). **Methods** Preoperative peripheral blood samples were collected in 49 patients with early-stage HBV-related HCC, and serum concentrations of IL-6 and IL-22 were measured by using ELISA. Thirty healthy volunteers were recruited and used as the control group. The x-tile software was used to define the best cut-off value, and the IL-6 and IL-22 levels were divided into high-level group and low-level group. The tumor-free survivals of high-level and low-level groups were analyzed with Kaplan-Meier analysis, log rank test was adopted to determine the difference, and Cox regression model was employed to screen the risk factors affecting HBV-related HCC recurrence. **Results** The serum IL-6 and IL-22 levels of HCC group were 13.20 pg/ml (11.87-15.79 pg/ml) and 42.18 pg/ml (34.39-57.44 pg/ml) respectively, which were significantly higher than 10.47 pg/ml (9.50-13.82 pg/ml) and 25.45 pg/ml (22.31-30.12 pg/ml) of the control group ($P=0.001$ and $P<0.001$ respectively). Kaplan-Meier analysis revealed that preoperative lower IL-6, higher total bilirubin and lower albumin levels indicated a shorter disease-free survival (DFS), and IL-22 levels had no statistically significant effect on the recurrence of HCC. Cox regression multivariate analysis showed that lower serum IL-6 level (≤ 13.2 pg/ml; hazard ratio=3.721; 95%

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2017.03.010

基金项目:天津市卫生行业重点攻关项目(13KG111)

作者单位:300170 天津医科大学第三中心临床学院(徐晓林);天津市第三中心医院超声科(丁建民、王彦冬、经翔)、消化(肝病)科(王凤梅)、天津市肝胆疾病研究所(高英堂、焦晓磊)、天津市人工细胞重点实验室(高英堂、骆莹、朱争艳)

通信作者:经翔 E-mail: dr.jingxiang@aliyun.com

$CI=1.674-8.272$; $P=0.001$) and lower serum albumin level (≤ 41.0 g/L; hazard ratio=2.085; 95% $CI=1.101-3.950$; $P=0.024$) were independent risk factors affecting HBV-related HCC recurrence. **Conclusion** Preoperative serum IL-6 level and serum albumin level can be used as the predictors of HCC recurrence in patients with HBV-related early HCC who are receiving MWA treatment. (J Intervent Radiol, 2017, 26: 232-236)

【Key words】 hepatocellular carcinoma; interleukin-6; microwave ablation; tumor-free survival

影像引导的热消融技术已成为早期肝细胞癌(HCC)的根治性治疗方法之一。微波消融(MWA)等热消融技术治疗 HCC 的临床应用日益广泛^[1-2],但治疗后仍有较高的复发率^[3]。因此对 HCC 患者 MWA 治疗后复发的有效预测有助于制定个性化的治疗策略和随访,进一步改善患者的预后。

文献报道血清 IL-6 可作为 HCC 的肿瘤标记物^[4]。也有研究显示血清 IL-6 治疗前水平与预后密切相关,但由于肿瘤分期、治疗方法等不同研究结果也不尽相同^[5-6]。本研究分析 IL-6、IL-22 以及不同临床因素与 MWA 术后复发的关系,旨在探究血清标记物对 HBV-HCC 患者经 MWA 治疗后复发的预测作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 入选病例 本研究选取 2011 年 1 月至 2014 年 12 月在天津市第三中心医院接受 MWA 的 HCC 患者 49 例,其中男 38 例,女 11 例;年龄(58 ± 9)岁;均有乙型肝炎病史;血清 AFP 20.81($5.94\sim 102.06$) ng/ml。患者入组标准为:年龄 18~75 岁;符合米兰标准的早期 HCC:单个病灶 ≤ 5 cm,多个病灶,病灶数小于 3 个,每个病灶 ≤ 3 cm;Child-Pugh A 级或 B 级;所有患者术前行增强 CT 或/和 MRI,并经超声引导下获取活组织做病理检查确诊。排除标准:肿瘤位于特殊部位,不能确保病灶周围 5 mm 安全消融边界;希望接受外科手术或肝移植治疗;有血管浸润或转移。同期选择 30 名健康人作对照,其中男 16 例,女 14 例,年龄(46 ± 6)岁,无肝炎或其他肿瘤病史。本研究获得本院伦理委员会通过,并经患者知情同意。

1.1.2 MWA 治疗的仪器 采用 Philips iU22、Aloka 5000 型彩色多普勒超声诊断仪,凸阵探头频率 1.0~5.0 MHz。MWA 治疗采用南京庆海微波电子研究所生产的 MTC 3 型微波治疗仪,频率 2 450 MHz,输出功率 40~80 W,可切换 16 G 冷循环式微波凝固治疗辐射器。采用局部麻醉加静脉麻醉经皮 MWA 治疗,对所有患者均监测生命体征,确保手术安全。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 超声引导下穿刺置入微波辐射天线,接通循环水内冷却系统及微波输出系统,根据需要调整微波输出功率及时间。MWA 治疗后 1 个月和 3 个月分别行增强 CT 或/和 MRI 检查判断 MWA 疗效,其后每 2~3 个月行超声或超声造影检查并检测肿瘤标志物,每 6 个月行增强 CT 或/和 MRI 检查监测肿瘤有无复发。复发灶定义为在随访期间增强 CT 或/和 MR 检查中发现消融灶内部或其周边出现动脉期增强和延迟期消退的病灶^[7]。复发时间定义为 MWA 当日到最初发现复发的时间间隔。随访截止日期为 2016 年 5 月 15 日。

1.2.2 血清细胞因子的检测 HCC 患者 MWA 治疗前即刻采外周静脉血 3 ml,以 3 000 r/min 离心 10 min,取血清置于 -80°C 冰箱保存待测。人 IL-6 及 IL-22 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购于美国 R&D 公司,酶标仪为芬兰 Fortune Labsystems 公司的 Multiskan EX 酶标仪。实验操作严格按试剂盒说明书进行。

1.3 统计分析

使用 x-tile 文件找出 IL-6 与 IL-22 预测 HCC 术后复发的最佳 cut-off 值^[8]。其中 IL-6 和 IL-22 最佳 cut-off 值分别为 13.2 pg/ml 和 48.2 pg/ml。根据患者血清浓度(低和高)分为两组进行比较。使用 Mann-Whitney U 检验比较 HCC 组与对照组的差异。使用 Kaplan-Meier 方法分析细胞因子和临床指标对复发的影响,Log rank 检验差异性。为了寻找影响 HCC 复发的独立危险因素,将 Kaplan-Meier 和 Cox 回归单因素分析 $P<0.05$ 的选项代入到多元 Cox 回归模型中进行分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。所有的统计分析均由 SPSS 20.0 完成。

2 结果

2.1 临床资料

49 例 HBV-HCC 患者基本情况见表 1。

2.2 HCC 患者外周血 IL-6 与 IL-22 水平

49 例 HCC 患者及对照组的 ELISA 结果显示,HCC 组血清 IL-6 和 IL-22 水平分别为 13.20($11.87\sim$

表 1 49 例 HCC 患者临床资料

参数	HBV-HCC 患者(n=49)
年龄/岁	58.45±9.23
男/女/%	38/11 (77/23)
白细胞/ $10^9/L$	4.92(3.76~6.21)
血小板/ $10^9/L$	131.10±57.36
肿瘤大小/cm	2.68±0.86
肿瘤数目/(%)	
1	38(77)
2	11(23)
肿瘤分期/(%)	
低分化	24(49)
中分化	4(8)
高分化	21(43)
AFP/(ng/ml)	20.81(5.94~102.06)
Child-Pugh 评分(%)	
5	33(67)
6	13(27)
7~9	3(6)
白蛋白/(g/L)	39.97±5.57
总胆红素/($\mu\text{mol/L}$)	15.50(12.30~21.40)

注:表中数据以均数±标准差或中位数(四分位数)表示

15.79) pg/ml 和 42.18(34.39~57.44) pg/ml, 显著高于正常对照 10.47(9.50~13.82) pg/ml 和 25.45(22.31~30.12) pg/ml, 差异有统计学意义(IL-6: $P=0.001$; IL-22: $P<0.001$)。

2.3 临床指标与免疫因子对经 MWA 治疗 HCC 患者复发的生存分析

HCC 患者的随访时间为 8~60 个月, 中位随访时间为 26 个月, 随访期间有 42 例患者复发(均为肝内复发), 7 例患者至随访结束仍未复发。所有患者至随访结束均存活。HCC 患者的中位无瘤生存期为 28 个月, 1、2、3 年无瘤生存率分别为 75.5%(37/49)、56.6%(25/49)、29.8%(12/49)。将患者按 IL-6 和 IL-22 的 cut-off 值、总胆红素和白蛋白的中位数分为高低组, 用 Kaplan-Meire 生存分析比较两组之间的差异, 发现 IL-6、总胆红素和白蛋白两组之间差异明显, P 值分别为 <0.001 、0.015 和 0.025, 结果见表 2 及图 1~3。IL-22 Kaplan-Meire 生存分析高低组之间差异不明显($P=0.773$)。

2.4 临床指标与免疫因子对经 MWA 治疗 HCC 患者复发的 Cox 回归分析

使用单因素与多因素分析寻找预测 HCC 复发的免疫因子和临床指标。Cox 回归单因素分析显示 IL-6、总胆红素和白蛋白的水平可作为预测复发的因素($P=0.001$, $P=0.021$, $P=0.034$), 多因素分析显示白蛋白水平($HR: 2.085$, 95% $CI: 1.101\sim3.950$, $P=0.024$)和 IL-6 水平($HR: 3.721$, 95% $CI: 1.674\sim8.272$, $P=0.001$)为预测 HCC 患者经 MWA 治疗后复发的

表 2 49 例 HBV-HCC 患者经 MWA 治疗后复发的 Kaplan-Meire 生存分析结果

参数	中位生存期/月	2 年无瘤生存率/%	P 值
IL-6			
≤ 13.2 pg/ml	24.5	48	<0.001
> 13.2 pg/ml	30.9	83	
总胆红素			
≤ 15.6 $\mu\text{mol/ml}$	34.3	76	0.015
> 15.6 $\mu\text{mol/ml}$	26.0	54	
白蛋白			
≤ 41.0 g/L	25.0	50	0.025
> 41.0 g/L	30.5	82	

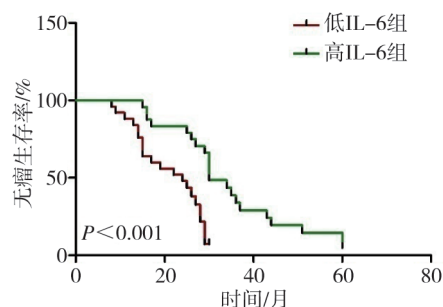


图 1 HCC 患者血清中 IL-6 高、低组的无瘤生存率比较

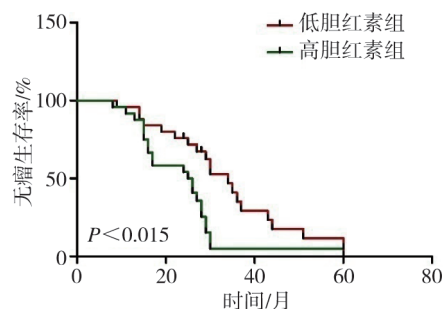


图 2 HCC 患者总胆红素高、低组的无瘤生存率比较

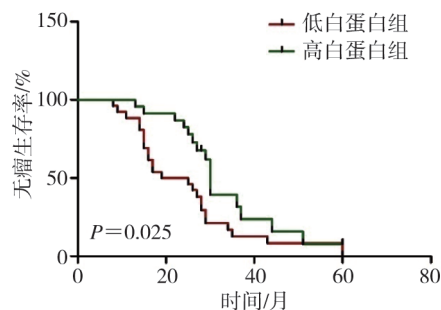


图 3 HCC 患者白蛋白高、低组的无瘤生存率比较

独立危险因素。见表 3。

3 讨论

多数 HCC 是由慢性肝炎进展而来, 而炎症被认为是恶性肿瘤发生发展的关键因素^[9]。肿瘤微环境中的炎症因子会促进或抑制 HCC 的发生发展。

表 3 单因素和多因素分析各临床病理因素与 49 例 HBV-HCC 患者经 MWA 治疗复发情况

参数	例数	单因素分析	多因素分析	P 值
		P 值	HR(95%CI)	
性别(男/女)	38/11	0.873		NA
年龄*(>58 岁)	25/24	0.249		NA
白细胞*($>4.92 \times 10^9/L$)	25/24	0.824		NA
血小板*($>127.5 \times 10^9/L$)	25/24	0.742		NA
肿瘤大小*(>2.65 cm)	25/24	0.708		NA
肿瘤数目(1/2)	38/11	0.953		NA
肿瘤分化程度(低/中/高)	24/4/21	0.782		NA
AFP(>200 ng/ml)	37/12	0.705		NA
Child-Pugh(5/6/7-9)	33/13/3	0.253		NA
IL-22(≤ 48.2 pg/ml)	32/17	0.730		NA
IL-6(≤ 13.2 pg/ml)	25/24	0.001	3.721(1.674~8.272)	0.001
白蛋白*(≤ 41.0 g/l)	26/23	0.034	2.085(1.101~3.950)	0.024
总胆红素*(>15.6 $\mu\text{mol/l}$)	24/25	0.021	1.868(0.939~3.714)	0.075

注: NA:未能进入多因素分析; *使用中位数分组; HR, Hazard Ratio, 危险比; CI: 可信区间

因此, 需要验证微环境中炎性因子对 HCC 进展起到的作用。本研究分析了 IL-6、IL-22 水平以及多种临床因素探究对早期 HBV-HCC 患者 MWA 治疗后复发的预测效能。

白蛋白水平反映肝脏合成和储备功能。肝脏受损时白蛋白合成减少。多项研究表明高白蛋白水平的 HCC 患者预后良好^[10-11], HCC 复发率较低^[12]。Nojiri 等^[13]的研究表明白蛋白通过提升 p21 和 p27 的表达抑制 Rb 蛋白磷酸化, 使细胞停留在 G1 期, S 期和 G2/M 期的细胞明显减少, 抑制肝癌细胞的增殖。Nojiri 等^[13]推测白蛋白也通过改变胶体渗透压影响肝癌细胞增殖。本研究结果中白蛋白 >41 g/L 患者的无瘤生存期较长, 与先前研究^[10-11]结果一致, 表明白蛋白水平是影响 HCC 复发的重要因素。

以往研究表明肿瘤大小、肿瘤数目、AFP、Child-Pugh 分级、总胆红素是影响 HCC 经根治性治疗后复发的独立危险因素^[6,14-16]。但本研究中总胆红素只在单因素分析中有意义, 多因素分析中没有意义。本研究入组患者肿瘤直径均小于 5 cm, 肿瘤数目为 1 个或 2 个, 肿瘤负荷小, AFP 水平多数偏低, 所以可能对复发影响不明显。本研究入组患者肝功能多数为 Child-Pugh A 级, 5 分、6 分与 7~9 分患者分别为 33 例、13 例与 3 例, 其中 7~9 分患者较少, 统计学偏倚较大, Child-Pugh 分级和总胆红素对复发的影响未体现出来。Jiang 等^[17-18]的研究中外周血高水平 IL-22(>189 pg/ml)与 HCC 较短的生存时间相关。

有研究认为 IL-6 是重要的促瘤因子之一, 可通过激活核因子- κ B(NF- κ B)和信号传导与转录激活子-3(STAT3)促进 HCC 的增殖^[19]。多项研究显示 HCC 患者外周血中 IL-6 水平升高, 认为 IL-6 可作为 HCC 的肿瘤标记物^[4-5,20]。Jang 等^[5]报道高水平

IL-6(>10 pg/ml)是预测经 TACE 治疗的不可切除 HCC 患者较短生存期的独立危险因素。Sheng 等^[21]研究中高水平 IL-6(>150 pg/ml)的 HCC 患者无瘤生存期较短, 本研究中 HCC 患者外周血中 IL-6 水平明显高于健康对照, 与前述研究^[5,20]结果一致, 高水平 IL-6(>13.2 pg/ml)预示较长的无瘤生存期, 与前述研究结果^[5,21]不一致。经分析, 这些研究纳入的病例中晚期 HCC 患者占多数, 而本研究只纳入早期的 HBV-HCC 患者, 肿瘤直径均小于 5 cm, 没有转移或血管浸润, 可能是结果不一致的原因之一。有研究证实 IL-6 可以抑制人和鼠 HCC 细胞的增殖^[22-23], 表明 IL-6 有抑制 HCC 的发生发展的作用。Cho 等^[6]的研究中早期 HCC 患者术前高水平 IL-6(>33 pg/ml)预示较长无瘤生存期, 与本研究结果一致。由以上数据可知, 高水平的 IL-6 有可能只在晚期 HCC 患者中与不良预后相关, 而在早期 HCC 中则预示较好的预后。基于现由研究结果与 HCC 分期, 我们推测可能 IL-6 在 HCC 发展早期主要发挥抗肿瘤效应, 在晚期发挥促进 HCC 进展的作用。所以我们需要找到一个在 HCC 发展进程中作用恰当的转折点。本研究中 IL-6 的 HR 明显高于其他临床因素, 说明术前 IL-6 是预测 MWA 治疗后早期复发的重要因素。

本研究证实 IL-6 和白蛋白是预测早期 HBV-HCC 患者经 MWA 治疗后复发的独立危险因素。早期 HBV-HCC 患者经 MWA 治疗后, 术前高 IL-6 和白蛋白水平预示较长无瘤生存期, 我们建议经 MWA 治疗的早期 HCC 患者如果术前 IL-6 和白蛋白水平较低, 则在治疗后需加强随访。本研究纳入的 HCC 患者较少, 随访时间短, 后期还需要更大的样本量来探究 IL-6 在早期 HCC 发生发展进程中起

到的作用。

参考文献

- [1] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update[J]. *Hepatology*, 2011, 53: 1020-1022.
- [2] Tombesi P, Di Vece F, Sartori S. Resection vs thermal ablation of small hepatocellular carcinoma: What's the first choice?[J]. *World J Radiol*, 2013, 5: 1-4.
- [3] Tiong L, Maddern G J. Systematic review and meta-analysis of survival and disease recurrence after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma[J]. *Br J Surg*, 2011, 98: 1210-1224.
- [4] Porta C, De Amici M, Quaglini S, et al. Circulating interleukin-6 as a tumor marker for hepatocellular carcinoma[J]. *Ann Oncol*, 2008, 19: 353-358.
- [5] Jang JW, Oh BS, Kwon JH, et al. Serum interleukin-6 and C-reactive protein as a prognostic indicator in hepatocellular carcinoma[J]. *Cytokine*, 2012, 60: 686-693.
- [6] Cho HJ, Kim SS, Ahn SJ, et al. Low serum interleukin-6 levels as a predictive marker of recurrence in patients with hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma who underwent curative treatment[J]. *Cytokine*, 2015, 73: 245-252.
- [7] Yu J, Liang P, Yu X, et al. Local tumour progression after ultrasound-guided microwave ablation of liver malignancies: risk factors analysis of 2529 tumours[J]. *Eur Radiol*, 2015, 25: 1119-1126.
- [8] Camp RL, Dolled-Filhart M, Rimm DL. X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 7252-7259.
- [9] Chow MT, Moller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22: 23-32.
- [10] Ma H, Zhang L, Tang B, et al. γ -Glutamyltranspeptidase is a prognostic marker of survival and recurrence in radiofrequency-ablation treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21: 3084-3089.
- [11] Xu XS, Chen W, Miao RC, et al. Survival analysis of hepatocellular carcinoma: a comparison between young patients and aged patients[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2015, 128: 1793-1800.
- [12] Di Costanzo GG, Signoriello S, Tortora R, et al. A prognostic index for patients within the intermediate stage of hepatocellular carcinoma[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 28: 592-598.
- [13] Nojiri S, Joh T. Albumin suppresses human hepatocellular carcinoma proliferation and the cell cycle[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 5163-5174.
- [14] 周 铁, 孔文韬, 仇毓东, 等. 小肝癌射频消融治疗后患者生存及肝内肿瘤复发的有关因素分析[J]. *中国微创外科杂志*, 2010, 10: 387-390.
- [15] 原 强, 靳 勇, 白旭明, 等. 经肝动脉化疗栓塞联合射频消融治疗原发性肝癌及术后复发性肝癌的疗效比较及预后因素分析[J]. *中国介入影像与治疗学*, 2016, 13: 146-150.
- [16] 任 炜, 杨 薇. 射频消融治疗复发性肝癌疗效及预后因素分析[J]. *介入放射学杂志*, 2015, 24: 923-927.
- [17] Jiang R, Zhang C, Xia Y, et al. Serum interleukin-22 level is a negative prognostic indicator in patients with HBV related hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2014, 59: 1208.
- [18] Waidmann O, Kronenberger B, Scheiermann P, et al. Interleukin-22 serum levels are a negative prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2014, 59: 1207.
- [19] He G, Karin M. NF-kappaB and STAT3-key players in liver inflammation and cancer[J]. *Cell Res*, 2011, 21: 159-168.
- [20] Wong VW, Yu J, Cheng AS, et al. High serum interleukin-6 level predicts future hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124: 2766-2770.
- [21] Sheng T, Wang B, Wang SY, et al. The Relationship between serum interleukin-6 and the recurrence of hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma after curative resection[J]. *Medicine(Baltimore)*, 2015, 94: e941.
- [22] Moran DM, Mayes N, Koniaris LG, et al. Interleukin-6 inhibits cell proliferation in a rat model of hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Int*, 2005, 25: 445-457.
- [23] Moran DM, Mattocks MA, Cahill PA, et al. Interleukin-6 mediates G0/G1 growth arrest in hepatocellular carcinoma through a STAT 3-dependent pathway[J]. *J Surg Res*, 2008, 147: 23-33.

(收稿日期:2016-07-11)

(本文编辑:俞瑞纲)