

• 肿瘤介入 Tumor intervention •

肝细胞肝癌组织中硫氧还蛋白 9 表达水平与
经肝动脉化疗栓塞术治疗疗效的关系

潘杨军, 王 耀, 章喜林, 陆伟杰, 郑银元

【摘要】 目的 探究硫氧还蛋白 9(TXNDC9)在肝细胞肝癌(HCC)组织中的表达及其与 TACE 治疗疗效的关系。**方法** 选择 2013 年 1 月至 2016 年 1 月诊断为 HCC 的 97 例患者作为研究对象。用改良实体瘤疗效评价标准(mRECIST)评价 TACE 疗效。用免疫印迹法检测 HCC 组织中 TXNDC9 水平,并分析其与 HCC 患者 TACE 治疗疗效的关系。**结果** 完全缓解(CR)组(17 例)、部分缓解(PR)组(30 例)、疾病稳定(SD)组(21 例)和疾病进展(PD)组(29 例)HCC 组织中 TXNDC9 水平分别为(0.66±0.09)、(0.75±0.09)、(0.94±0.12)和(1.08±0.11),差异有统计学意义($P<0.05$)。HCC 组织中 TXNDC9 水平与 TACE 治疗疗效呈负相关($P<0.05$)。TXNDC9 诊断 HCC 预后的受试者工作特征(ROC)曲线下面积(AUC)、灵敏度和特异度分别为 0.930、73.91%和 96.08%。多因素 Cox 回归分析结果显示肿瘤直径、Child-Pugh 分级和 TXNDC9 是 HCC 患者预后的独立影像因素($P<0.05$)。**结论** HCC 组织中 TXNDC9 水平高提示 TACE 治疗疗效较差,预后不良风险较高。

【关键词】 肝细胞癌; 经肝动脉化疗栓塞术; 硫氧还蛋白 9; 疗效; 预后

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2021)-04-0346-05

The correlation between the expression level of thioredoxin domain containing protein 9 in hepatocellular carcinoma and the therapeutic effect of transcatheter arterial chemoembolization
PAN Yangjun, WANG Yao, ZHANG Xilin, LU Weijie, ZHENG Yinyuan. Department of Radiology, Huzhou Municipal First People's Hospital, Huzhou, Zhejiang Province 313000, China

Corresponding author: ZHENG Yinyuan, E-mail: zyy2570456@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the correlation between the expression level of thioredoxin domain containing protein 9(TXNDC9) in hepatocellular carcinoma(HCC) tissues and the curative efficacy of transcatheter arterial chemoembolization (TACE). **Methods** A total of 97 patients diagnosed as HCC from January 2013 to January 2016 were selected as the subjects of this study. Modified response evaluation criteria in solid tumor(mRECIST) was used to evaluate the efficacy of TACE treatment. The level of TXNDC9 in HCC tissues was detected by Western blotting, and its relationship to the curative efficacy of TACE treatment in HCC patients was analyzed. **Results** The levels of TXNDC9 in HCC tissues of complete remission(CR) group ($n=17$), partial remission(PR) group($n=30$), stable disease(SD) group($n=21$) and progression disease(PD) group($n=29$) were (0.66±0.09), (0.75±0.09), (0.94±0.12) and (1.08±0.11), respectively, and the differences were statistically significant($P<0.05$). A negative correlation existed between the TXNDC9 level in HCC tissues and the curative effect of TACE treatment($P<0.05$). The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve, the sensitivity and the specificity of TXNDC9 in predicting HCC prognosis were 0.930, 73.91% and 96.08%, respectively. Multivariate Cox regression analysis showed that tumor diameter, Child-Pugh classification and TXNDC9 level were the independent factors affecting prognosis in HCC patients($P<0.05$). **Conclusion** A high level of TXNDC9 in HCC tissues indicates a poor curative effect of TACE and a high

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2021.04.007

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(WKJ2012-2-037)

作者单位:313000 浙江 湖州市第一人民医院放射科(潘杨军、陆伟杰、郑银元)、普外科(王 耀)、中心实验室(章喜林)

通信作者:郑银元 E-mail: zyy2570456@126.com

risk of poor prognosis. (J Intervent Radiol, 2021, 30: 346-350)

【Key words】 hepatocellular carcinoma; transcatheter arterial chemoembolization; thioredoxin domain containing protein 9; curative effect; prognosis

肝细胞肝癌(HCC)血供丰富,90%以上血供来自肝动脉^[1]。TACE已被公认为治疗HCC的有效手段之一^[2]。有报道显示,相同肿瘤分期的HCC患者接受TACE治疗,但疗效不尽相同^[3]。筛选适合接受TACE治疗的HCC患者可有效降低医疗成本,达到精准医疗的目的。因此,探寻灵敏度和特异度均较高的生物标志物评价HCC患者TACE疗效具有重要意义。

硫氧还蛋白9(thioredoxin domain containing protein 9, TXNDC9)是一种具有ATP结合蛋白活性的硫氧还蛋白^[4]。有研究表明敲除TXNDC9基因可抑制MYC与染色质结合^[5],从而抑制HCC细胞生长。此外, TXNDC9还可通过靶向核因子E2相关因子2(nuclear factor-E2 related factor2, Nrf2)调节自噬,从而减弱大肠癌细胞对奥沙利铂的灵敏度^[6]。从而推测, HCC组织中TXNDC9水平能反映TACE疗效,遂开展本研究,以期HCC患者选择合适的治疗方案提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 入选患者临床资料

选择2013年1月至2016年1月诊断为HCC的97例患者作为研究对象。根据《原发性肝癌规范化诊治专家共识》^[7]诊断HCC并进行治疗。纳入标准:①年龄18~70岁;②病理活检确诊为HCC;③接受TACE治疗;④Child-Pugh分级A或B;⑤能配合完成相关检查及随访;⑥签署了知情同意书;⑦有保存在液氮罐中完好的肿瘤组织(经皮穿刺活检获取)。排除标准:①TACE治疗禁忌证;②肿瘤分期Ⅲb期或Ⅳ期患者;③美国东部协作组(ECOG)评分高于2分;④接受射频消融术、微波消融术或靶向药物治疗等。收集患者年龄、性别、乙肝表面抗原(HBsAg)、Child-Pugh分级、肿瘤数目、肿瘤直径、甲胎蛋白(AFP)等临床资料。97例HCC患者中男性66例,女性31例,年龄51~70岁,平均年龄(62.6±5.3)岁。本研究经本院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 TACE治疗 ①术前常规检查患者肝、肾功能、血常规、尿常规、凝血功能及心电图等。②根据HCC患者肿瘤位置确定手术姿势,常规消毒、

铺巾,行局部麻醉。采用Seldinger改良法经股动脉置入导管鞘,将其插管至肝总动脉或腹腔动脉处,行肿瘤病灶血管造影,了解其血供情况。了解清楚肿瘤病灶供血情况后将表柔比星、奥沙利铂和超液化碘油的混悬液灌注至肿瘤供血动脉。术中根据肿瘤病灶血供及大小决定乳化剂的用量,确保完全栓塞肿瘤供血动脉。③术后密切观察患者有无TACE并发症发生,若出现发热、肝区闷痛、恶心等,则给予对症处理。针对TACE治疗疗效较差的患者,根据患者病情给予针对性治疗。

1.2.2 HCC组织中TXNDC9水平检测 用蛋白质免疫印迹法检测HCC组织中TXNDC9水平^[8]。实验步骤:①滴加RIPA裂解液裂解细胞,4℃4 000 r/min离心10 min,离心半径8 cm,提取上层清液;②用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量;③80 V凝胶电泳15 min,然后增加电压至120 V,直至溴酚蓝跑出胶面;④300 mA转膜60 min;⑤滴加兔抗人TXNDC9单克隆抗体,4℃孵育过夜,第2日滴加二抗,室温孵育1 h;⑥用ELC电化学发光曝光显影,最后用Image J软件分析结果。本实验所用抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2.3 TACE治疗疗效评价 用实体瘤疗效评价标准的修订标准(mRECIST)^[9]评价首次TACE治疗的疗效。完全缓解(CR)为CT或MRI检查所有目标病灶内动脉期无增强显影;部分缓解(PR)为CT或MRI检查目标病灶的直径总和降低30%;疾病稳定(SD)为CT或MRI检查目标病灶的直径总和降低(未达到PR标准)或升高程度低于20%;疾病进展(PD)为CT或MRI检查目标病灶的直径总和升高20%或有新病灶出现。

1.2.4 随访 于出院后1个月复查CT或MRI,了解HCC患者碘油沉积情况、肿块体积变化及有无新肿瘤病灶等。第2次及以后随访采用电话方式了解HCC患者5年生存预后情况。每月随访1次,末次随访时间为2020年2月16日,平均随访时间为43.74(6~60)个月。

1.3 统计学分析

用SPSS 22.0软件进行统计学分析。正态分布的计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,四组间比较

采用单因素方差分析,组间两两比较采用 S-N-K 检验。计数资料用例或率 $[n(\%)]$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验。用 Spearman 相关分析 TXNDC9 水平与 TACE 治疗疗效的关系。用受试者工作特征(ROC)曲线下面积(AUC)评价 TXNDC9 诊断 HCC 预后的效能。用 Kaplan-Meier 绘制 TXNDC9 ≥ 0.94 和 TXNDC9 < 0.94 的 HCC 患者生存曲线,用 Log-Rank 法比较差异。用 Cox 回归分析影响 HCC 患者预后的因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组基线资料

97 例 HCC 患者首次接受 TACE 治疗后,17 例(17.53%)CR,30 例(30.93%)PR,21 例(21.65%)SD,29 例(29.90%)PD。四组在年龄、性别、HBsAg、Child-Pugh 分级、肿瘤数目、肿瘤直径和 AFP 方面比较,差异均无统计学意义(P 均 > 0.05),见表 1。

2.2 HCC 患者 TACE 疗效与 TXNDC9 的关系

CR 组、PR 组、SD 组和 PD 组 HCC 组织中

表 1 各组基线资料比较

参数	CR(n=17)	PR(n=30)	SD(n=21)	PD(n=29)	$F\chi^2$	P 值
年龄/岁	62.1 \pm 5.7	62.0 \pm 5.4	64.0 \pm 5.8	62.6 \pm 3.6	0.670	0.571
性别/n(%)						
男	11(64.7)	20(66.7)	15(71.4)	20(69.0)	0.235	0.972
女	6(35.3)	10(33.3)	6(28.6)	9(31.0)		
HBsAg/n(%)						
+	5(29.4)	6(20.0)	0(0)	6(20.7)	6.452	0.092
-	12(70.6)	24(80.0)	21(100.0)	23(79.3)		
Child-Pugh 分级/n(%)						
A	16(94.1)	27(90.0)	20(95.2)	23(79.3)	3.122	0.373
B	1(5.9)	3(10.0)	1(4.8)	6(20.7)		
肿瘤数目/n(%)						
1 个	14(82.4)	18(60.0)	14(66.6)	17(58.6)	3.122	0.373
≥ 2 个	3(17.6)	12(40.0)	7(33.3)	12(41.4)		
肿瘤直径/n(%)						
< 5 cm	7(41.2)	11(36.7)	7(33.3)	3(10.3)	7.193	0.066
≥ 5 cm	10(58.8)	19(63.3)	14(66.7)	26(89.7)		
AFP/n(%)						
< 40 ug/L	4(23.5)	6(20.0)	5(23.8)	9(31.0)	1.002	0.801
≥ 40 ug/L	13(76.5)	24(80.0)	16(76.2)	20(69.0)		

TXNDC9 水平分别为 0.66 ± 0.09 、 0.75 ± 0.09 、 0.94 ± 0.12 和 1.08 ± 0.11 , 差异有显著统计学意义($F=77.815$, $P < 0.001$)。CR 组 TXNDC9 水平低于 PR 组、SD 组和 PD 组, 差异均有统计学意义($q=3.933$ 、 11.655 、 18.501 , $P < 0.05$)。PR 组 TXNDC9 水平低于 SD 组和 PD 组, 差异均有统计学意义($q=9.167$ 、 17.117 , $P < 0.05$)。SD 组 TXNDC9 水平低于 PD 组, 差异有统计学意义($q=6.453$, $P < 0.05$)。HCC 组织中 TXNDC9 水平与 TACE 治疗疗效呈负相关关系($r_s = -0.849$, $P < 0.001$)。

2.3 HCC 预后与 TXNDC9 的关系

97 例 HCC 患者 1 年、3 年和 5 年生存率分别为 84.5% (82/97)、68.0% (66/97) 和 52.6% (51/97)。TXNDC9 诊断 HCC 预后的 ROC AUC 为 0.930 (95%CI: 0.859~0.972), 最大约登指数为 0.700, 其所对应的最佳截断点、灵敏度和特异度分别为 0.9、73.9% 和 96.1%, 见图 1。以 TXNDC9 诊断 HCC 预后的最佳截断点为界, 将 HCC 患者分为两组: TXNDC9 ≥ 0.94 组($n=37$)和 TXNDC9 < 0.94 组($n=60$)。TXNDC9 \geq

0.94 组中位生存时间低于 TXNDC9 < 0.94 组(24 个月比 60 个月), 差异有显著统计学意义(Log-Rank Chi-square=64.538, $P < 0.001$), 见图 2。

2.4 影响 HCC 预后的因素分析

将 HCC 患者预后(生存=0, 死亡=1)作为因变

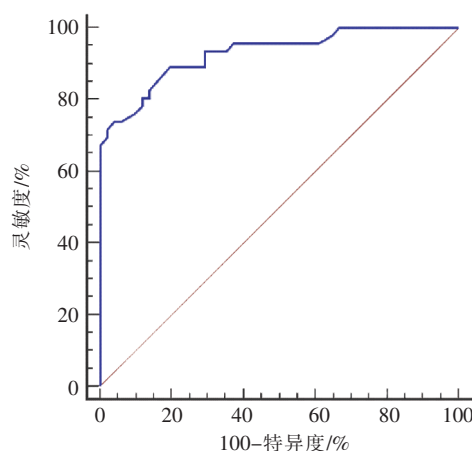


图 1 TXNDC9 诊断 HCC 预后的 ROC 曲线

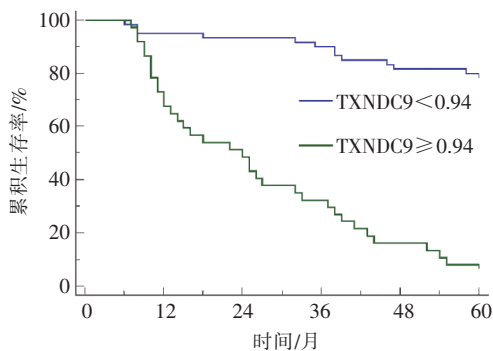


图2 不同 TXNDC9 水平 HCC 患者生存曲线

量,将年龄、性别(女=0,男=1)、HBsAg(-=0,+=1)、Child-Pugh 分级(A=0,B=1)、肿瘤数目(1个=0,≥2个=1)、肿瘤直径、AFP 和 TXNDC9 作为自变量纳入

单因素 Cox 回归分析,结果显示肿瘤直径、Child-Pugh 分级和 TXNDC9 与 HCC 预后有关($P<0.05$)。将年龄、肿瘤直径、Child-Pugh 分级和 TXNDC9 作为自变量(纳入标准 $P\leq 0.1$),将 HCC 患者预后作为因变量纳入多因素 Cox 回归分析,结果显示肿瘤直径、Child-Pugh 分级和 TXNDC9 是 HCC 患者预后的独立危险因素($P<0.05$),见表 2。

3 讨论

目前,临床多采用 CT 或 MRI 等影像学检查手段了解 TACE 治疗后碘油沉积及肿瘤体积变化等情况评价 TACE 治疗效果。但 CT 或 MRI 等影像学检查费用较贵,多次复查了解 HCC 病灶变化会增

表2 影响 HCC 患者预后的因素分析

参数	Cox 单因素分析			Cox 多因素分析		
	HR	95%CI	P 值	HR	95%CI	P 值
年龄	1.055	0.997~1.116	0.064	1.020	0.955~1.089	0.561
性别	1.096	0.587~2.048	0.775			
HBsAg	0.830	0.373~1.848	0.650			
Child-Pugh 分级	2.607	1.216~5.588	0.014	2.344	1.008~5.450	0.049
肿瘤数目	0.730	0.391~1.365	0.327			
肿瘤直径	2.785	1.301~5.960	0.009	3.105	1.397~6.900	0.006
AFP	0.951	0.494~1.832	0.882			
TXNDC9	10.352	5.242~20.447	<0.001	11.417	5.488~23.752	<0.001

加患者辐射和经济负担,需探寻一种准确率高且检查费用低的生物标志物评价 TACE 治疗疗效。有学者用平均血小板容积评价 TACE 治疗 HCC 的疗效,结果显示 TACE 术前及术后平均血小板容积值的变化在 TACE 术后疗效评估方面有一定价值^[10]。但对于骨髓造血功能异常的 HCC 患者而言,平均血小板容积值异常,用其评价 TACE 术后疗效的准确度会大大降低。此外,化疗药物也会对骨髓造血功能有一定影响,进而影响平均血小板容积值,因此,单纯用平均血小板容积评价 TACE 治疗疗效不适用于合并全身化疗或有造血功能异常的 HCC 患者。此外,还有学者用血清白细胞介素-6 和 γ 谷氨酰转移酶评价 TACE 治疗疗效,结果显示二者联合对 TACE 治疗疗效及预后评价的价值较高^[11]。白细胞介素-6 在炎症性疾病中高表达, γ 谷氨酰转移酶在肝纤维化中表达异常,因此,对于合并炎症性疾病或肝纤维化的 HCC 患者,采用白细胞介素-6 和 γ 谷氨酰转移酶评价 TACE 治疗疗效,其准确性有待考证。

TXNDC9 是硫氧还蛋白家族中成员,在抗氧化应激损伤中具有重要作用^[12]。目前,已有研究证实

TXNDC9 在前列腺癌^[13]、肝细胞癌^[5]和大肠癌^[14]中高表达,并参与肿瘤进展。癌细胞自噬水平已被证实与化疗耐药密切相关^[15-17]。干扰 TXNDC9 表达,大肠癌细胞中 Nrf2 水平也随之降低,进而阻断了细胞自噬过程,同时细胞凋亡蛋白表达水平升高,在奥沙利铂诱导下调亡^[6]。笔者推测 HCC 细胞也通过 TXNDC9/Nrf2 通路调控自噬水平,进而下调对化疗药物的灵敏度。检测 HCC 组织中 TXNDC9 可反映 TACE 治疗疗效。

本研究通过比较 CR 组、PR 组、SD 组和 PD 组 HCC 组织中 TXNDC9 水平,结果显示其水平依次升高,此外,HCC 组织中 TXNDC9 水平与 TACE 治疗疗效呈负相关关系。上述结果证实了课题组推测,HCC 组织中 TXNDC9 水平能反映 TACE 治疗疗效。为进一步分析 HCC 组织中 TXNDC9 水平与 TACE 治疗远期疗效的关系,本课题对接受 TACE 治疗的 HCC 患者进行了随访,结果显示其 1 年、3 年和 5 年生存率分别为 84.54%、68.04%和 52.58%,与伏旭等^[18]随访结果接近。构建 TXNDC9 诊断 HCC 预后的 ROC 曲线,结果显示其 ROC AUC、灵敏度和特异度分别为 0.930、73.91%和 96.08%,该结果提示

TXNDC9 对 HCC 预后评估有极高价值,但灵敏度较低,可辅助评价 HCC 患者预后。进一步采用单因素和多因素 Cox 回归分析影响 HCC 患者预后的因素,结果显示肿瘤直径、Child-Pugh 分级和 TXNDC9 是 HCC 患者预后的独立预测因素。张长坤等^[19]、刘光华等^[20]研究表明,伴随 HCC 肿瘤直径增加和 Child-Pugh 分级增高,患者预后不良风险也随之增加。推测 HCC 组织中 TXNDC9 水平高,表明癌细胞调节自噬的能力强,进而对化疗药物灵敏度降低,检测 HCC 组织中 TXNDC9 水平可反映癌细胞自噬水平,进而反映 TACE 治疗疗效。

综上所述,HCC 组织中 TXNDC9 水平高,提示患者接受 TACE 治疗疗效较差,获益较低。此外,高 TXNDC9 水平还表明 HCC 患者预后不良风险较高。检测 HCC 组织中 TXNDC9 水平可辅助评价 TACE 治疗疗效及远期预后。课题组下一步将开展基础研究,阐明 TXNDC9 与化疗灵敏度的关系。

[参 考 文 献]

- [1] Yu B, Li A, Zhang M, et al. High expression of IL-1 β and NF κ B in tumor tissue predicts a low recurrence rate of hepatocellular carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11: 6002-6009.
- [2] Zuo MX, Huang JH. The history of interventional therapy for liver cancer in China[J]. J Intervent Med, 2018, 1: 70-76.
- [3] 孙伟航,张鹭丹,李 巍. 预后营养指数联合磁共振表观扩散系数在肝细胞癌肝动脉化疗栓塞中的临床应用价值[J]. 中华医学杂志, 2019, 99:2581-2585.
- [4] Ma FH, Hou LM, Yang LG. TXNDC9 is required for meiotic maturation of mouse oocytes[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 6265890.
- [5] Chen D, Zou J, Zhao Z, et al. TXNDC9 promotes hepatocellular carcinoma progression by positive regulation of MYC-mediated transcriptional network[J]. Cell Death Dis, 2018, 9: 1110.
- [6] Zhou W, Fang C, Zhang L, et al. Thioredoxin domain-containing protein 9(TXNDC9) contributes to oxaliplatin resistance through regulation of autophagy-apoptosis in colorectal adenocarcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 524: 582-588.
- [7] 中国抗癌协会肝癌专业委员会, 中国抗癌协会临床肿瘤学协作委员会, 中华医学会肝病学会肝癌学组. 原发性肝癌规范化诊治专家共识[J]. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14:259-269.
- [8] Ye G, Qin Y, Wang S, et al. Lmc1 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma cells by regulating PKM2 expression through AKT pathway[J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20: 711-719.
- [9] Lencioni R, Llovet JM. Assessment for hepatocellular carcinoma[J]. Semin Liver Dis, 2010, 30: 52-60.
- [10] 王海瑞,刘兆玉.平均血小板容积对肝细胞癌 TACE 术后疗效判断的临床价值[J]. 介入放射学杂志, 2018, 27:257-262.
- [11] 王京艳,王华明,刘 妍,等. 血清白细胞介素-6 和 γ -谷氨酰转氨酶联合检测对 TACE 治疗 AFP 阴性肝癌患者的疗效与预后评价[J]. 解放军医学杂志, 2019, 44:394-399.
- [12] 王蒲雄志,韩丁培,陈雪华,等. TXNDC9 在结肠直肠癌组织中的表达及其影响[J]. 外科理论与实践, 2011, 16:264-269.
- [13] Feng T, Zhao R, Sun F, et al. TXNDC9 regulates oxidative stress-induced androgen receptor signaling to promote prostate cancer progression[J]. Oncogene, 2020, 39: 356-367.
- [14] Lu A, Wangpu X, Han D, et al. TXNDC9 expression in colorectal cancer cells and its influence on colorectal cancer prognosis[J]. Cancer Invest, 2012, 30: 721-726.
- [15] Hu Y, Zhang HR, Dong L, et al. Enhancing tumor chemotherapy and overcoming drug resistance through autophagy-mediated intracellular dissolution of zinc oxide nanoparticles[J]. Nanoscale, 2019, 11: 11789-11807.
- [16] Vehlow A, Cordes N. DDR1(discoidin domain receptor tyrosine kinase 1) drives glioblastoma therapy resistance by modulating autophagy[J]. Autophagy, 2019, 15: 1487-1488.
- [17] Huang T, Wan X, Alvarez AA, et al. MIR93(microRNA-93) regulates tumorigenicity and therapy response of glioblastoma by targeting autophagy[J]. Autophagy, 2019, 15: 1100-1111.
- [18] 伏 旭,何 健,史 炯,等. 肝细胞癌大体形态分型的临床意义[J]. 中华消化外科杂志, 2015, 14:120-126.
- [19] 张长坤,张龙辉,王 东,等. 术前肝功能 Child-Pugh 评分与白蛋白-胆红素评分对肝癌患者肝切除术后肝衰竭和预后的预测价值[J]. 中华消化外科杂志, 2018, 17:474-482.
- [20] 刘光华,俞炬明,范国平,等. 肝细胞癌患者伴发糖尿病行肝动脉化疗栓塞术的预后因素分析[J]. 介入放射学杂志, 2017, 26:926-930.

(收稿日期:2020-04-15)

(本文编辑:俞瑞纲)