

• 论著 •

经 TACE 治疗的肝细胞癌患者外周血单个核细胞中沉默信息调节因子 7 的表达及其与预后的关系

卢金兰 王丽丽 卢 哲

【摘要】 目的 检测肝细胞癌 (HCC) 患者接受经导管动脉化学治疗栓塞术 (TACE) 治疗后外周血单个核细胞中沉默信息调节因子 7 (SIRT7) 的表达水平, 并分析其与患者预后的关系。**方法** 选择 2016 年 8 月至 2018 年 3 月在武警北京市总队医院就诊的 104 例 HCC 患者作为研究对象。根据患者预后 3 年生存情况将其分为生存组 ($n=71$) 和死亡组 ($n=33$)。采用 Ficoll 密度梯度离心法提取外周血中的单个核细胞。采用蛋白质印迹法检测单个核细胞中 SIRT7 的表达水平。采用 ROC 曲线评估 SIRT7 判断经 TACE 治疗的 HCC 患者预后的效能。采用 Cox 比例风险回归模型分析经 TACE 治疗的 HCC 患者预后的影响因素。**结果** 与治疗前比较, 生存组和死亡组治疗后 SIRT7 的表达水平均较低, 差异均有统计学意义 (P 均 <0.05)。与死亡组比较, 生存组治疗前和治疗后 SIRT7 的表达水平均较低, 差异均有统计学意义 (P 均 <0.05)。治疗后 SIRT7 水平判断 HCC 患者预后生存的 ROC 曲线下面积 (AUC) 大于治疗前 SIRT7 水平及治疗前后 SIRT7 水平的差值 (P 均 <0.05)。Cox 比例风险回归模型分析结果显示, 肿瘤分期、肿瘤直径和治疗后 SIRT7 是经 TACE 治疗的 HCC 患者预后生存的独立危险因素 ($P<0.05$), 索拉非尼和利卡汀是其独立保护因素 ($P<0.05$)。**结论** 经 TACE 治疗的 HCC 患者外周血单个核细胞中 SIRT7 的表达水平与患者预后生存情况有关。

【关键词】 肝细胞癌; 经导管动脉化学治疗栓塞术; 外周血单个核细胞; 沉默信息调节因子 7; 预后

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-534X. 2022. 02. 008

Relationship between expression of silent information regulator 7 in peripheral blood mononuclear cells after TACE treatment of hepatocellular carcinoma and prognosis of patients

LU Jinlan. Department of Laboratory and Pathology, Beijing Armed Police Corps Hospital, Beijing 100027, China; WANG Lili, LU Zhe. Department of Clinical Laboratory, Sixth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

【Abstract】 Objective This paper aims to detect the expression level of silent information regulator 7 (SIRT7) in peripheral blood mononuclear cells of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) after transcatheter arterial chemoembolization (TACE), and to analyze its relationship with the prognosis of patients. **Methods** A total of 104 HCC patients who were treated in Beijing Armed Police Corps Hospital from August 2016 to March 2018 were selected and divided into the survival group ($n=71$) and the death group ($n=33$) according to their prognosis and 3-year survival. Mononuclear cells from peripheral blood were extracted by Ficoll density gradient centrifugation. The expression level of SIRT7 in mononuclear cells was detected by Western blotting. The ROC curve was used to evaluate the efficacy of SIRT7 in diagnosing the prognosis of TACE-treated HCC patients. The Cox proportional hazards regression model was used to

作者单位: 100027 武警北京市总队医院检验与病理科 (卢金兰); 100048 北京, 中国人民解放军总医院第六医学中心检验科 (王丽丽、卢哲)

通信作者: 王丽丽, Email: wang13716@sina.com

analyze the prognostic factors of HCC patients treated with TACE. **Results** Compared with the expression levels of SIRT7 before treatment, those after treatment in the survival group and the death group are lower, with statistically significant differences ($P < 0.05$). Compared with the death group, the expression levels of SIRT7 before and after treatment in the survival group are lower, with statistically significant differences ($P < 0.05$). The area under the ROC curve (AUC) of the SIRT7 after treatment to diagnose the prognosis of HCC patients is greater than that of the pre-treatment SIRT7 and that of the post-treatment SIRT7 ($P < 0.05$). The results of Cox proportional hazards regression model analysis show that tumor stage, tumor diameter, and SIRT7 after treatment are independent risk factors for the prognosis of HCC patients treated with TACE ($P < 0.05$), and sorafenib and licatin are independent protective factors ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression level of SIRT7 in peripheral blood mononuclear cells of HCC patients treated with TACE is related to the prognosis of patients.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; Transcatheter arterial chemoembolization; Peripheral blood mononuclear cells; Silent information regulator 7; Prognosis

肝细胞癌 (HCC) 是一种富血供的恶性肿瘤, 90% 以上的血供来自于肝动脉^[1]。经导管动脉化学治疗栓塞术 (TACE) 可有效阻断肿瘤的血供, 并将化学治疗药物集中靶向肿瘤病灶, 已成为治疗 HCC 常用的非手术方法之一。研究报道, HCC 在中国的发病率较高, 约占全球 HCC 新发病例总数的 55%^[2]。近年来, 随着肿瘤治疗技术的发展, HCC 的病死率显著降低^[3]。研究发现, 给予相同肿瘤分期的 HCC 患者 TACE 治疗后存在预后差异较大的情况^[4], 因此, 探究能够准确评估 TACE 治疗预后的生物标志物具有重要意义。

沉默信息调节因子 7 (SIRT7) 是去乙酰化酶 Sirtuins 家族中的一员, 已被报道可通过靶向 p53 依赖性细胞死亡途径调控 HCC 细胞对阿霉素的敏感度^[5], 并可调节 HCC 细胞的生长、增殖及肿瘤免疫微环境等^[6-8]。因上述机制均与 TACE 治疗的临床获益关系密切, 由此推测 SIRT7 的表达水平可能与经 TACE 治疗的 HCC 患者预后有关。本文检测了经 TACE 治疗的 HCC 患者外周血单个核细胞中 SIRT7 的表达水平, 并分析其与患者预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

前瞻性选择 2016 年 6 月至 2018 年 3 月在武警北京市总队医院就诊的 104 例 HCC 患者作为研究对象。参照《原发性肝癌诊疗规范 (2011 年版)》^[9] 诊断 HCC。纳入标准: (1) 首次确诊并接受 TACE 治疗; (2) Child-Pugh 分级为 A 级或 B 级; (3) 预计生存期 > 3 个月。排除标准: (1) HCC 分期为 III b 期或 IV 期; (2) 对碘对比剂过敏; (3) 存在 TACE 治疗禁忌证, 如肝肾功能严重障碍、无法纠

正的凝血功能严重减退等; (4) 年龄 > 80 岁; (5) 接受过射频消融或微波消融治疗。所有入组患者均签署了知情同意书, 本研究经医院医学伦理委员会批准。

1.2 TACE 治疗方案

所有入组患者在 TACE 治疗前均进行血常规、尿常规、凝血功能、肝肾功能及心电图等常规检查, 收集患者的年龄、性别、Child-Pugh 分级、乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)、甲胎蛋白 (AFP)、肿瘤直径、肿瘤数量、肿瘤分期及治疗方案等信息。采用 Seldinger 技术经股动脉穿刺插管至腹腔动脉, 行血管造影, 明确 HCC 的供血动脉。通过 CT 或 MRI 检查明确是否存在肝外供血动脉。经肝动脉灌注化学治疗药物奥沙利铂 (100 mg/m^2) 和 5-氟尿嘧啶 (500 mg/m^2), 并注入已充分乳化的阿霉素 (40 mg/m^2), 然后与超液化碘油混悬液栓塞, 最后用明胶海绵颗粒栓塞, 栓塞终点为栓塞血管呈“干树枝”状。根据 HCC 的大小及血供情况决定乳化剂用量, 最大程度做到完全栓塞。TACE 治疗后常规给予保肝、止吐、营养支持及镇痛等治疗, 密切观察有无并发症发生。医嘱患者在 TACE 治疗后 4 周复诊, 观察碘油沉积、HCC 组织坏死及有无新的 HCC 病灶等情况^[10]。

1.3 SIRT7 表达水平检测

采用 Ficoll 密度梯度离心法提取外周血中的单个核细胞。抽取 HCC 患者 TACE 治疗前和治疗后 (首次治疗后 7 d) 的空腹肘部静脉血 10 mL, PBS 溶液稀释, 置于 Ficoll 分离液中低温离心、分离; PBS 溶液重悬, 再次离心, 重复 2 次, 吸取单个核细胞。采用蛋白质印迹法检测单个核细胞中 SIRT7 的表达水平^[11]。步骤如下: (1) 使用含蛋白抑制

剂的 RIPA 溶液裂解单个核细胞,离心,提取总蛋白;(2)使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白质定量;(3)在 80 V 电压下凝胶电泳 15 min,然后电压升至 120 V,直至溴酚蓝跑出胶面;(4)缓冲液漂洗,转膜;(5)5%脱脂奶粉封闭 2 h,滴加一抗(购自武汉菲恩生物科技有限公司),4℃环境下孵育过夜;(6)缓冲液漂洗,滴加二抗(购自武汉菲恩生物科技有限公司),室温下孵育 2 h;(7)曝光显影,应用 ImageJ 1.8.0 软件读取实验图像。

1.4 随访

采用电话和复诊方式了解患者的预后生存情况。在 HCC 患者出院后 4 周采用复诊方式进行首次随访,之后每 3 个月随访 1 次,为期 36 个月,末次随访时间为 2021 年 3 月 2 日,以患者死亡作为随访终点事件。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。计数资料以例(%)表示。采用重复测量方差分析法比较生存组和死亡组治疗前后 SIRT7 的表达水平。采用 ROC 曲线评估 SIRT7 判断经 TACE 治疗的 HCC 患者预后的效能。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,用 log-rank 检验比较生存曲线的差异。采用 Cox 比例风险回归模型对经 TACE 治疗的 HCC 患者的预后影响因素进行单因素和多因素分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

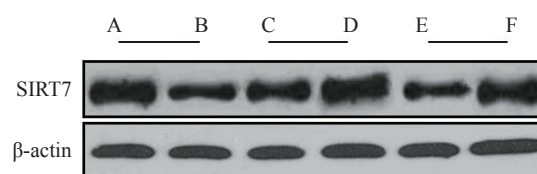
2.1 HCC 患者的临床特征

104 例 HCC 患者中男性 68 例,女性 36 例;年龄 48~70 岁,平均年龄为(62.11 ± 4.56)岁;Child-Pugh 分级为 A 级有 78 例,B 级有 26 例;肿瘤分期为 I b 期有 9 例,II 期有 44 例,III a 期有 51 例;HBsAg 阳性有 86 例,阴性有 18 例;AFP>400 g/L 有 61 例,≤400 g/L 有 43 例;肿瘤直径>5 cm 有 50 例,直径≤5 cm 有 54 例;肿瘤单发有 40 例,多发有 64 例;伴血管侵犯有 51 例;接受 1 次 TACE 治疗者有 68 例,而≥2 次者有 36 例;后续接受索拉非尼治疗有 11 例,接受利卡汀治疗有 13 例。

2.2 两组的 SIRT7 相对表达水平比较

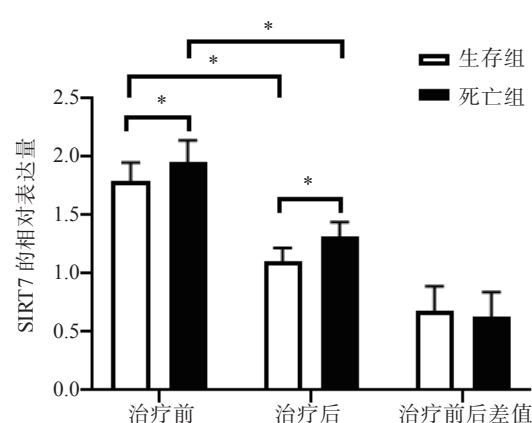
与治疗前比较,生存组和死亡组治疗后 SIRT7 的表达水平均较低,差异均有统计学意义(P 均<0.05)。与死亡组比较,生存组治疗前和治疗

后 SIRT7 的表达水平均较低,差异均有统计学意义(P 均<0.05)。见图 1、图 2。



注: A (治疗前)和 B (治疗后)、C (治疗后)和 D (治疗前)分别为死亡组中 2 例患者的 SIRT7 样本条带, E (治疗后)和 F (治疗前)为生存组中患者的 SIRT7 样本条带

图 1 两组 SIRT7 的蛋白质印迹图



注: 两组相比较, * $P<0.05$

图 2 两组 SIRT7 的相对表达量

2.3 SIRT7 判断经 TACE 治疗的 HCC 患者预后的效能

治疗前 SIRT7 水平判断经 TACE 治疗的 HCC 患者预后生存的 ROC 曲线下面积(AUC)、最佳截断值、敏感度和特异度分别为 0.750 (95%CI: 0.648~0.853)、1.85、63.64% 和 83.10%; 治疗后 SIRT7 水平判断 HCC 患者预后生存的 AUC、最佳截断值、敏感度和特异度分别为 0.894 (95%CI: 0.828~0.959)、1.23、75.76% 和 88.73%; 治疗前后 SIRT7 水平差值判断 HCC 患者预后生存的 AUC、最佳截断值、敏感度和特异度分别为 0.567 (95%CI: 0.444~0.691)、0.60、48.48% 和 70.42%。以上结果显示,治疗后 SIRT7 水平判断 HCC 患者预后的 AUC 大于治疗前 SIRT7 及治疗前后 SIRT7 水平的差值,差异均有统计学意义($Z=2.299, P=0.022; Z=5.645, P<0.001$)。见图 3。

2.4 SIRT7 的表达水平与经 TACE 治疗的 HCC 患者预后的关系

根据 104 例 HCC 患者 SIRT7 的相对表达量的

中位数 (1.15), 将患者分为 SIRT7 高表达组 ($n=48$) 和 SIRT7 低表达组 ($n=56$)。SIRT7 高表达组的中位生存时间为 25 个月, 短于 SIRT7 低表达组 (36 个月), 差异有统计学意义 ($\log\text{-rank } \chi^2=18.261, P<0.001$)。见图 4。

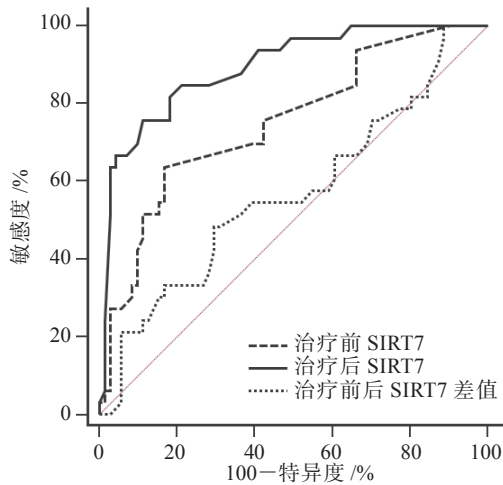


图 3 SIRT7 判断经 TACE 治疗的 HCC 患者预后的 ROC 曲线

2.5 影响经 TACE 治疗的 HCC 患者预后生存的相关因素

将 104 例 HCC 患者的预后生存情况作为因变量, 将患者年龄、性别、Child-Pugh 分级、肿瘤分

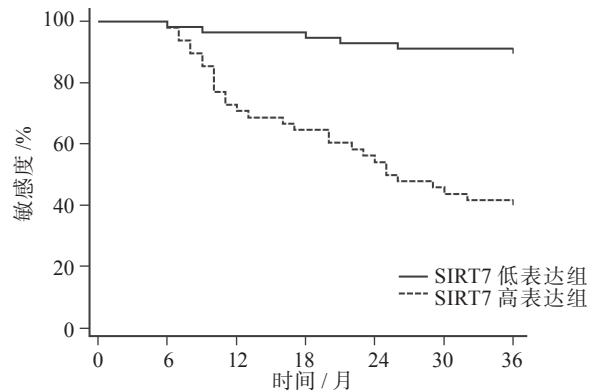


图 4 SIRT7 高表达组和低表达组的生存曲线

期、HBsAg、AFP、肿瘤直径、肿瘤数量、TACE 治疗次数、索拉非尼、利卡汀和治疗后 SIRT7 水平作为自变量, 纳入 Cox 单因素回归分析, 结果显示肿瘤分期、肿瘤直径、索拉非尼、利卡汀和治疗后 SIRT7 水平与经 TACE 治疗的 HCC 患者预后生存有关 ($P<0.05$)。将 104 例 HCC 患者的预后生存情况作为因变量, 将单因素分析中 $P<0.10$ 的项目, 包括 Child-Pugh 分级、肿瘤分期、肿瘤直径、索拉非尼、利卡汀和治疗后 SIRT7 水平作为自变量, 纳入 Cox 多因素回归分析, 结果显示肿瘤分期、肿瘤直径和治疗后 SIRT7 是经 TACE 治疗的 HCC 患者预后生存的独立危险因素 ($P<0.05$), 索拉非尼和利卡汀是其独立保护因素 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 影响经 TACE 治疗的 HCC 患者预后生存的单因素和多因素 Cox 比例风险回归分析

项目	单因素分析			多因素分析		
	HR 值	95%CI	P 值	HR 值	95%CI	P 值
年龄 ($>60/\leq 60$ 岁)	0.870	0.424~1.789	0.707			
性别 (男/女)	0.886	0.438~1.795	0.739			
Child-Pugh 分级 (B/A 级)	1.850	0.913~3.750	0.090	1.755	0.849~3.626	0.131
肿瘤分期 (Ⅲ a/Ⅰ b+Ⅱ 期)	2.283	1.204~4.328	0.012	4.222	1.910~9.331	<0.001
HBsAg (阳性/阴性)	1.060	0.439~2.558	0.898			
AFP ($>400/\leq 400$ g/L)	1.806	0.862~3.781	0.119			
肿瘤直径 ($>5/\leq 5$ cm)	2.634	1.281~5.416	0.009	3.483	1.537~7.895	0.003
肿瘤数量 (多发/单发)	1.532	0.732~3.208	0.260			
TACE 次数 ($\geq 2/1$ 次)	1.288	0.636~2.610	0.485			
索拉非尼 (接受/未接受)	0.607	0.324~0.863	0.012	0.420	0.051~0.643	0.024
利卡汀 (接受/未接受)	0.581	0.178~0.894	0.037	0.494	0.146~0.761	0.025
治疗后 SIRT7 水平 ($>1.15/\leq 1.15$)	9.001	3.481~23.270	<0.001	5.861	2.122~16.187	0.001

3 讨论

SIRT7 是唯一存在于细胞核中的 Sir2 家族成员, 是 RNA 聚合酶 I 转录的激活因子^[12], 参与了肝脏脂质代谢、线粒体稳态、染色体结构和转录

功能调节等过程^[13-15]。另有研究显示, SIRT7 参与了 HCC、胃癌等的发生和发展过程^[5-8,16]。本文主要探讨了经 TACE 治疗的 HCC 患者外周血单个核细胞中 SIRT7 的表达水平与患者预后的关系。

本研究结果显示,生存组和死亡组治疗后 SIRT7 的表达水平均低于治疗前,且生存组治疗前后 SIRT7 的表达水平均低于死亡组,这提示外周血单个核细胞中 SIRT7 的表达水平与 HCC 患者的预后生存情况可能有关。本研究进一步构建了 SIRT7 预测 HCC 患者预后生存的 ROC 曲线,结果显示治疗后 SIRT7 水平判断经 TACE 治疗的 HCC 患者预后生存的 AUC 大于治疗前 SIRT7 水平和治疗前后 SIRT7 水平的差值,这提示治疗后 SIRT7 水平可辅助评估经 TACE 治疗的 HCC 患者的预后情况。

本研究结果显示, SIRT7 高表达组的中位生存时间短于 SIRT7 低表达组,这提示 SIRT7 的表达水平与 HCC 患者的预后有关。本研究指出,治疗后 SIRT7 水平是经 TACE 治疗的 HCC 患者预后生存的独立危险因素,推测其原因可能是 SIRT7 可参与调控 HCC 细胞对化学治疗药物的敏感度,并可调节 HCC 细胞的生长、增殖及肿瘤免疫微环境等^[5-8],进而可反映患者的预后情况。此外,本研究结果还显示肿瘤分期和肿瘤直径是 HCC 患者预后的独立危险因素,索拉非尼和利卡汀是其独立保护因素,这与既往报道结果相符^[17-19]。

综上所述,经 TACE 治疗的 HCC 患者外周血单个核细胞中 SIRT7 的表达水平与患者预后生存情况有关。本研究仅检测了 HCC 患者治疗前及首次接受 TACE 治疗后 7 d 的外周血单个核细胞中 SIRT7 的表达水平,尚不能确定判断 HCC 患者预后的 SIRT7 的最佳检测时间点,下一步将增设 SIRT7 的检测时间点,以弥补本研究的不足。此外,今后还需开展大样本、前瞻性研究以验证本研究的结论。

参 考 文 献

- 1 Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(10): 589-604.
- 2 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- 3 许智婷. 肝细胞癌(HCC)靶向治疗的研究进展[J]. *复旦学报:医学版*, 2019, 46(2): 276-280.
- 4 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(33): 2581-2585.
- 5 Zhao J, Wozniak A, Adams A, et al. SIRT7 regulates hepatocellular carcinoma response to therapy by altering the p53-dependent cell death pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 252.
- 6 Li Y, Shi H, Yuan J, et al. Downregulation of circular RNA circPVT1 restricts cell growth of hepatocellular carcinoma through downregulation of Sirtuin 7 via microRNA-3666[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47(7): 1291-1300.
- 7 Yanai M, Kurata M, Muto Y, et al. Clinicopathological and molecular analysis of SIRT7 in hepatocellular carcinoma[J]. *Pathology*, 2020, 52(5): 529-537.
- 8 Xiang J, Zhang N, Sun H, et al. Disruption of SIRT7 increases the efficacy of checkpoint inhibitor via MEF2D regulation of programmed cell death 1 ligand 1 in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(3): 664-678. e24.
- 9 中华人民共和国卫生部. 原发性肝癌诊疗规范(2011年版)[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2011, 16(10): 929-946.
- 10 中国医师协会介入医师分会. 中国肝细胞癌经动脉化疗栓塞治疗(TACE)临床实践指南[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(47): 3811-3819.
- 11 Ye G, Qin Y, Wang S, et al. Lamc1 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma cells by regulating PKM2 expression through AKT pathway[J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20(5): 711-719.
- 12 Ford E, Voit R, Liszt G, et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(9): 1075-1080.
- 13 Yoshizawa T, Karim MF, Sato Y, et al. SIRT7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway[J]. *Cell Metab*, 2014, 19(4): 712-721.
- 14 Ryu D, Jo YS, Lo Sasso G, et al. A SIRT7-dependent acetylation switch of GABPβ1 controls mitochondrial function[J]. *Cell Metab*, 2014, 20(5): 856-869.
- 15 Vazquez BN, Thackray JK, Simonet NG, et al. SIRT7 promotes genome integrity and modulates non-homologous end joining DNA repair[J]. *EMBO J*, 2016, 35(14): 1488-1503.
- 16 林海鹏, 卢晓明, 王莉霞, 等. 沉默信息调节因子7和p53在胃癌组织的表达及临床意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(5): 850-852.
- 17 雷海科, 李小升, 赵玉兰, 等. 原发性肝癌患者生存预后及影响因素分析(附3106例报告)[J]. *中华消化外科杂志*, 2020, 19(2): 179-184.
- 18 张扬帆, 李强, 张佃, 等. 索拉非尼联合与未联合TACE治疗巴塞罗那C期肝细胞癌患者预后分析[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2020, 26(7): 526-529.
- 19 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(10): 926-930.

(收稿日期: 2021-04-09)

(本文编辑: 周骏)