(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118511078 A
(43)申请公布日 2024.08.16

(21)申请号 202280083029.3
(22)申请日 2022.11.11
(30)优先权数据
10-2021-0155200 2021.11.11 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.06.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2022/017789 2022.11.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/085864 KO 2023.05.19
(71)申请人 韩国巴斯德研究所
地址 韩国京畿道
申请人 财团法人 峨山社会福祉财团
蔚山大学校产学协力团
(72)发明人 金冈模 徐幸卵 李秀燕 金珍善 宋研华 金相化
(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限责任公司 11290
专利代理师 李峥 杨国强
(51)Int.Cl.
G01N 33/574(2006.01)
C07K 16/40(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)

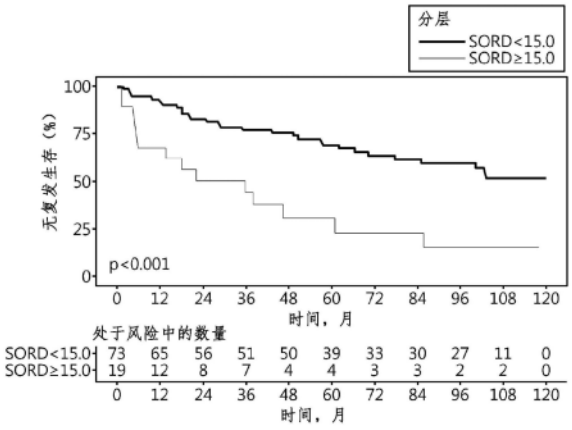
权利要求书1页 说明书12页 附图4页

(54)发明名称

作为预测肝癌手术后的预后的生物标志物的SORD

(57)摘要

本发明涉及通过在手术前在获得自肝癌患者的血液样品中检测SORD标志物或SORD标志物与AFP标志物一起,在早期术前预测肝癌手术后的预后的方法、组合物和试剂盒。



CN 118511078 A

1.一种从获得自肝癌患者的血液样品中检测L-艾杜糖醇-2脱氢酶(SORD)标志物以提供诊断肝癌手术后的预后所需的信息的方法。

2.根据权利要求1所述的方法,其中,所述信息是在肝癌手术之前提供的。

3.根据权利要求1所述的方法,其中,所述血液样品是血清。

4.根据权利要求1所述的方法,其中,所述方法包括:

-检测所述肝癌患者的血清中包含的SORD的水平;以及

-确定所述血清SORD水平是否大于或等于15ng/mL。

5.根据权利要求4所述的方法,其中,当所述血清SORD水平大于或等于15ng/mL时,提供用于诊断肝癌手术后的不良预后的信息。

6.根据权利要求4所述的方法,其中,所述方法进一步包括:

-检测所述肝癌患者的血清中包含的甲胎蛋白(AFP)水平;以及

-确定所述血清AFP水平是否大于或等于400ng/mL。

7.根据权利要求6所述的方法,其中,当所述血清SORD水平大于或等于15ng/mL并且所述血清AFP水平大于或等于400ng/mL时,提供用于预测肝癌手术后的不良预后的信息。

8.根据权利要求4或6所述的方法,其中,通过免疫测定或免疫染色进行所述SORD或AFP水平的检测。

9.根据权利要求8所述的方法,其中,使用特异性结合SORD或AFP的抗体进行所述免疫测定或免疫染色。

10.一种用于早期诊断肝癌手术的预后的组合物,所述组合物用于从血液样品中检测SORD标志物,所述组合物包括特异性结合L-艾杜糖醇-2脱氢酶(SORD)蛋白的抗体。

11.根据权利要求10所述的组合物,其中,所述组合物进一步包括特异性结合甲胎蛋白(AFP)的抗体。

12.根据权利要求10所述的组合物,其中,所述组合物是用于检测血清蛋白的组合物。

13.一种用于早期诊断肝癌手术的预后的试剂盒,所述试剂盒用于从血液样品中检测SORD标志物,所述试剂盒包括特异性结合L-艾杜糖醇-2脱氢酶(SORD)蛋白的抗体。

14.根据权利要求13所述的试剂盒,其中,所述试剂盒进一步包括特异性结合甲胎蛋白(AFP)的抗体。

15.根据权利要求13或14所述的试剂盒,其中,所述血液样品是血清,并且

所述试剂盒包括指示如下的手册:当血清SORD水平大于或等于15ng/mL时;或者当所述血清SORD水平大于或等于15ng/mL并且血清AFP水平大于或等于400ng/mL时,提供用于预测肝癌手术后的不良预后的信息。

作为预测肝癌手术后的预后的生物标志物的SORD

技术领域

[0001] 本申请要求于2021年11月11日提交的第10-2021-0155200号韩国专利申请的权益,并且以引用的方式将其申请文件和附图的全部公开内容整体并入本文。

[0002] 本公开涉及用于预测肝癌手术后的预后的生物标志物。

背景技术

[0003] 最近的生物标志物发现过程显示出增加开发成本同时降低成功率的趋势。这部分归因于基础研究和临床研究之间的差异。为了方便实验,基础研究人员使用细胞系进行实验,但细胞系中出现的现象与个体水平上的反应有显著差异。

[0004] 为了解决这些问题,培养与个体环境相似的细胞系的3D培养系统越来越受欢迎,并成为缩小基础研究和临床研究之间差距的方式。

[0005] 与单层培养(2D培养,其中,培养的细胞在培养基上以单层铺展开)不同,能够在类似于体内的3D环境下培养细胞的3D培养在许多论文中已经被报道,细胞和组织的特定功能以相对高的效能长时间保持,并且在2D培养、3D培养和体内系统之间对毒性药物的敏感性的比较中,据论文中报道,3D培养的结果与体内系统惊人地相似。

[0006] 另一方面,肝癌或肝细胞癌(HCC)是成年人中最常见的癌症类型,并且也已知为预后极差的癌症之一,手术不可切除的病例在1年内死亡,而即使在手术切除后,在5年内在超过50%的病例中观察到复发。考虑到这些临床现实,能够在早期预测癌症预后的技术是癌症治疗的最现实的可选方案和下一代肝癌护理的指南。

[0007] 目前,用于肝癌相关诊断、预后判断和治疗评价的最著名的生物标志物是AFP和维生素K缺乏诱导蛋白(PIVKA)-II,它们在特异性和敏感性方面都不令人满意。血液甲胎蛋白(AFP)在肝细胞癌诊断中的作用是公知的。除了晚期肝细胞癌的诊断外,定期的AFP测量对于早期检测是必要的,因为在自然病程中每年3%-10%的肝硬化患者会发生肝细胞癌。然而,AFP不仅在肝细胞癌中以高浓度升高,在诸如酒精性肝炎、慢性肝炎或肝硬化的良性疾病中也会升高,产生许多假阳性,实际阳性率仅为50%-60%。PIVKA-II是脱-r-羧基凝血酶原(DCP),即非凝血的异常凝血酶原,据报道,在诊断肝细胞癌时其敏感性和特异性分别为48.2%和95.9%,独立于血清AFP。这些生物标志物目前应用于临床领域,但它们并不反映所有肝癌的生物学特征。

[0008] 此外,还没有开发出能够在肝细胞癌手术前准确预测预后的生物标志物测试,即使它们作为预后因素有任何显著性,但由于准确性不良,它们还没有被用作筛查测试。

[0009] 在本说明书的全文中引用了许多文献,并注明了引用内容。以引用的方式将所引的文献的公开内容以其整体并入本文,并且更清楚地解释了本公开所属的技术领域的水平和本公开的内容。

发明内容

技术目标

[0010] 本发明人寻求开发能够早期诊断肝癌的预后的方法,特别是能够在术前诊断肝癌患者的术后生存或复发的概率的分子诊断方法。因此,本发明人通过确定血液样品中的L-艾杜糖醇-2脱氢酶(SORD)蛋白与肝癌手术后的预后密切相关,可用于在手术前预测术后预后,从而完成了本公开。

[0011] 因此,本公开的目的在于提供从血液样品中检测SORD标志物以在术前诊断肝癌手术的预后的方法。

[0012] 本公开的另一个目的在于提供用于通过从血液样品中检测SORD标志物来早期诊断肝癌手术的预后的组合物。

[0013] 本公开的另一个目的在于提供用于通过从血液样品中检测SORD标志物来早期诊断肝癌的预后的试剂盒。

[0014] 更具体地,本公开提供了以下示例性实施方式:

[0015] 示例性实施方式1.一种从获得自肝癌患者的血液样品中检测L-艾杜糖醇-2脱氢酶(SORD)标志物以提供诊断肝癌手术后的预后所需的信息的方法。

[0016] 示例性实施方式2.根据示例性实施方式1所述的方法,其中,所述信息是在肝癌手术之前提供的。

[0017] 示例性实施方式3.根据前述示例性实施方式中任一项所述的方法,其中,所述血液样品是血清。

[0018] 示例性实施方式4.根据前述示例性实施方式中任一项所述的方法,其中,所述方法包括:

[0019] -在肝癌手术前检测所述肝癌患者的血清中包含的SORD的水平;以及

[0020] -确定所述血清SORD水平是否大于或等于15ng/mL。

[0021]

[0022] 示例性实施方式5.根据前述示例性实施方式中任一项所述的方法,其中,当所述血清SORD水平大于或等于15ng/mL时,提供用于诊断肝癌手术后的不良预后的信息。

[0023] 示例性实施方式6.根据前述示例性实施方式中任一项所述的方法,其中,所述方法进一步包括:

[0024] -在肝癌手术前检测所述肝癌患者的血清中包含的甲胎蛋白(AFP)的水平;以及

[0025] -确定所述血清AFP水平是否大于或等于400ng/mL。

[0026]

[0027] 示例性实施方式7.根据前述示例性实施方式中任一项所述的方法,其中,当所述血清SORD水平大于或等于15ng/mL,并且所述血清AFP水平大于或等于400ng/mL时,提供用于预测肝癌手术后的不良预后的信息。

[0028] 示例性实施方式8.根据前述示例性实施方式中任一项所述的方法,其中,通过免疫测定或免疫染色进行SORD或AFP水平的检测。

[0029] 示例性实施方式9.根据前述示例性实施方式中任一项所述的方法,其中,使用特异性结合SORD或AFP的抗体进行免疫测定或免疫染色。

[0030] 示例性实施方式10.一种用于早期诊断肝癌手术的预后的组合物,所述组合物用于从血液样品中检测SORD标志物,所述组合物包括特异性结合L-艾杜糖醇-2脱氢酶(SORD)蛋白的抗体。

[0031] 示例性实施方式11.根据前述示例性实施方式中任一项所述的组合物,其中,所述组合物进一步包括特异性结合甲胎蛋白(AFP)的抗体。

[0032] 示例性实施方式12.根据前述示例性实施方式中任一项所述的组合物,其中,所述组合物是用于检测血清蛋白的组合物。

[0033] 示例性实施方式13.一种用于早期诊断肝癌手术的预后的试剂盒,所述试剂盒用于从血液样品中检测SORD标志物,所述试剂盒包括特异性结合L-艾杜糖醇-2脱氢酶(SORD)蛋白的抗体。

[0034] 示例性实施方式14.根据前述示例性实施方式中任一项所述的试剂盒,其中,所述试剂盒进一步包括特异性结合甲胎蛋白(AFP)的抗体。

[0035] 示例性实施方式15.根据前述示例性实施方式中任一项所述的试剂盒,其中,所述血液样品是血清,并且所述试剂盒包括指示如下的手册:当血清SORD水平大于或等于15ng/mL时;或者当血清SORD水平大于或等于15ng/mL并且血清AFP水平大于或等于400ng/mL时,提供用于预测肝癌手术后的不良预后的信息。

[0036] 通过以下的本公开的详细说明、权利要求和附图,使本公开的其它目的和优点更加清楚。

技术方案

[0037] 本公开的一个方面在于提供从获得自肝癌患者的血液样品中检测L-艾杜糖醇-2脱氢酶(SORD)标志物以在早期(优选在肝癌手术前)提供诊断肝癌手术后的预后所需的信息的方法。

[0038] 肝细胞癌(HCC)是原发性肝癌最常见的类型,在亚洲具有高患病率和发病率。肝切除术是早期或可切除肝细胞癌患者的首选治疗方法,但结果并不令人满意。由于复发率高,这些患者的生存仍然很低。肝切除术后单个肝细胞癌(2cm)的5年复发率为68%,并且肝细胞癌的复发对患者的长期生存有不利影响。因此,预测肝细胞癌切除后的复发对于选择合适的手术候选而言是重要的。在先前的研究中,注意到术前血清甲胎蛋白(AFP)水平以及肿瘤的各种组织学特征(例如,肿瘤大小和微血管侵犯)是切除后复发的独立预测因素。然而,组织学特征是受限的,因为它们不能在术前评估。此外,AFP在准确预测肝细胞癌方面的敏感性和特异性相对低(Tateishi,R.等,Diagnostic accuracy of tumor markers for hepatocellular carcinoma:a systematic review,Hepatology international,2008(2):17-30),并且AFP与手术结果之间的关联仍有争议(Blank,S.等,Assessing prognostic significance of preoperative alpha-fetoprotein in hepatitis B-associated hepatocellular carcinoma:normal is not the new normal.,Ann Surg Oncol 2014(21):986-994;Shim,J.H.等,Is serum alpha-fetoprotein useful for predicting recurrence and mortality specific to hepatocellular carcinoma after hepatectomy?A test based on propensity scores and competing risks analysis.Ann Surg Oncol2012(19):3687-3696)。因此,仍然需要新的预后标志物来预测肝细胞癌患者切除后的预后。

[0039] 各种肝病诱导的炎症、坏死和肝再生在促进肝细胞癌的发展中起着重要作用。超过90%的肝细胞癌与肝损伤和炎症有关地发生,使它们成为炎症相关癌症的明确的实例。山梨醇脱氢酶(SORD)是多元醇途径中将山梨醇转化为果糖的酶,反映了肝损伤。SORD,类似

于丙氨酸氨基转移酶(ALT),在肝中占主导地位。

[0040] 本公开的目的在于确定山梨醇脱氢酶(SORD)(反映肝损伤的酶)的水平是否与无复发生存(RFS)期有关。本公开的发现在于,SORD水平≥15ng/mL与较短的无复发生存有关,该发现可能有助于确定哪些患者更适合HCC手术。

[0041] 在一个示例性实施方式中,本公开的方法可以是体外方法。本公开的方法可包括在肝癌手术之前检测肝癌患者的血清中包含的SORD的水平;以及确定血清SORD水平是否大于或等于15ng/mL,其中,当血清SORD水平大于或等于15ng/mL时,可以提供用于诊断肝癌手术后的不良预后的信息。

[0042] 特别地,在优选的示例性实施方式中,血清AFP和SORD水平被用作RFS的两个独立的预后因素。具体地,所述方法进一步包括在肝癌手术前检测肝癌患者的血清中包含的甲胎蛋白(AFP)水平;以及确定血清AFP水平是否大于或等于400ng/mL。

[0043] 当根据术前血清SORD和/或AFP水平对患者进行分层时,如果血清SORD水平大于或等于15ng/mL,则提供用于诊断肝癌手术后的不良预后的信息,并且血清SORD水平高于或等于15ng/mL且血清AFP水平大于或等于400ng/mL的患者具有显著不良的预后与最低的RFS率。

[0044] 因此,术前血清SORD是切除后肝细胞癌的有效预后因素,并且预期其为选择适合手术的患者提供临床帮助,尤其是在检查例如血清AFP水平时。

[0045] 在本公开的预后诊断方法中,SORD和/或AFP蛋白的表达水平的分析可以通过本领域已知的多种方法进行。优选地,可以根据免疫测定或免疫染色方案进行分析。

[0046] 免疫测定或免疫染色的形式包括但不限于放射免疫测定、免疫沉淀、酶联免疫吸附测定(ELISA)、捕获ELISA、抑制或竞争测定、夹心测定、流式细胞术、免疫荧光染色和免疫亲和纯化。免疫测定或免疫染色的方法描述于Enzyme Immunoassay,E.T.Maggio编著,CRC Press,Boca Raton,Florida,1980;Gaastra,W.,Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),in Methods in Molecular Biology,第1卷,Walker,J.M.编著,Humana Press,NJ,1984;以及Ed Harlow和David Lane,Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999,以引用的方式将其并入本文。

[0047] 例如,如果根据放射免疫测定法施行本公开的方法,则可以使用标记有放射性同位素(例如,C14、I125、P32和S35)的抗体(特异性结合标志物的抗体)。

[0048] 如果本公开的方法以ELISA方式施行,则本公开的具体示例性实施方式可以包括(i)用待分析的未知样品包被固体基质的表面;(ii)使样品与作为一抗的标志物特异性抗体反应;(iii)使步骤(ii)的所得产物与结合了酶的二抗反应;以及(iv)测量酶的活性。

[0049] 烃类聚合物(例如,聚苯乙烯和聚丙烯)、玻璃、金属或凝胶或微量滴定板可能适合作为固体基质。

[0050] 与二抗结合的酶包括但不限于催化显色反应、荧光反应、发光反应或红外反应的酶,包括例如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶、荧光素酶和细胞色素P450。当将碱性磷酸酶用作与二抗结合的酶时,可以将诸如溴氯吲哚基磷酸盐(BCIP)、硝基蓝四氮唑(NBT)、萘酚-AS-B1-磷酸盐和增强化学荧光(ECF)的显色底物用作底物;并且如果使用辣根过氧化物酶,则可以使用诸如氯萘酚、氨乙基咔唑、二氨基联苯胺、D-荧光素、光泽精(双-N-甲基吖啶硝酸盐)、苄氧基试卤灵(resorufin benzyl ether)、鲁米诺、Amplex Red试剂

(10-乙酰基-3,7-二羟基吩噁嗪)、对苯二胺-HCl和邻苯二酚(HYR)、四甲基联苯胺(TMB)、2,2'-联氮-双[3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐](ABTS)、邻苯二胺(OPD)和萘酚/派若宁、葡萄糖氧化酶和硝基蓝四氮唑(t-NBT)以及吩嗪硫酸甲酯(m-PMS)的底物。

[0051] 如果本公开的方法以捕获ELISA方式施行,则本公开的具体示例性实施方式包括:(i)用作为捕获抗体的针对分子标志物的抗体包被固体基质的表面;(ii)使样品与捕获抗体反应;(iii)使步骤(ii)的所得产物与与标签结合的针对分子标志物的检测抗体反应以生成信号;以及(iv)测量从标签生成的信号。

[0052] 检测抗体具有生成可检测信号的标签,其中,所述标签包括但不限于化学物质(例如生物素)、酶(例如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶和细胞色素P450)、放射性物质(例如,C14、I125、P32和S35)、荧光物质(例如荧光素)、发光物质、化学发光和荧光共振能量转移(FRET)。在Ed Harlow和David Lane,Using Antibodies:ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999中描述了各种标签和标记方法。

[0053] 在ELISA方法和捕获ELISA方法中,可以根据本领域已知的各种方法施行最终的酶活性测量或信号测量。如果使用生物素作为标签,则可以容易地用链霉亲和素检测信号,而如果使用荧光素酶,则用荧光素检测信号。

[0054] 另一方面,本公开的方法可以通过常规流式细胞术(Ormerod,M.G.编著,1990,Flow Cytometry:A Practical Approach.IRL Press)、磁激活细胞分选(MACS;Robert David等,Stem Cells,23:477-482(2005)),或免疫亲和纯化(Ed Harlow和David Lane,Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999)来施行。

[0055] 特异性结合分子标志物的抗体可以通过本领域常规进行的方法制备,例如融合法(Kohler和Milstein,European Journal of Immunology,6:511-519(1976))、重组DNA法(美国专利No.4,816,567)或噬菌体抗体库法(Clackson等,Nature,352:624-628(1991)以及Marks等,J.Mol.Biol.,222:58,1-597(1991))。抗体制备的一般过程详细描述于Harlow,E.和Lane,D.,Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,New York,1999;Zola,H.,Monoclonal Antibodies:A Manual of Techniques,CRC Press,Inc.,Boca Raton,Florida,1984;以及Coligan,CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY,Wiley/Greene,NY,1991,以引用的方式将其并入本文。

[0056] 通过上文所述的免疫测定过程分析最终信号的强度,可以预测肝癌手术后的预后。

[0057] 本公开的另一个方面在于提供用于早期诊断肝癌手术的预后的组合物,所述组合物用于从血液样品中检测SORD标志物,包括特异性结合L-杜糖醇-2脱氢酶(SORD)蛋白的抗体。

[0058] 在优选的示例性实施方式中,用于早期诊断肝癌手术的预后的组合物可进一步包括特异性结合甲胎蛋白(AFP)蛋白的抗体,并且可以是用于检测血清蛋白的组合物。

[0059] 本公开的另一个方面在于提供用于早期诊断肝癌手术的预后的试剂盒,所述试剂盒用于从血液样品中检测SORD标志物,包括特异性结合L-艾杜糖醇-2脱氢酶(SORD)蛋白的抗体。

[0060] 在优选的示例性实施方式中,用于早期诊断肝癌手术的预后的试剂盒可进一步包

括特异性结合甲胎蛋白(AFP)蛋白的抗体。

[0061] 试剂盒可以是使用血清作为血液样品来检测血清蛋白的试剂盒,其中,试剂盒可以包括指示如下的手册:当血清SORD水平大于或等于15ng/mL时;或者优选地,当血清SORD水平大于或等于15ng/mL并且血清AFP水平大于或等于400ng/mL时,提供用于诊断肝癌手术后的不良预后的信息。

[0062] 如果将本公开的用于早期诊断肝癌手术的预后的试剂盒应用于免疫测定,则本公开的试剂盒可任选地包括二抗和标签的底物。此外,本公开的试剂盒可以制备成包括上文所述试剂组分的多个单独的包装或分隔间。

有益效果

[0063] 本公开提供了通过检测获得自肝癌患者的血液样品中的SORD标志物(优选与AFP标志物一起)来在肝癌手术前预测术后预后的技术。因此,本公开有助于对合适的手术靶点进行决策,以避免对预期具有低存活率的患者进行不必要的手术。

附图说明

[0064] 图1a示出了肝细胞癌患者根治性切除后无复发生存(RFS)的Kaplan-Meier图,指示根据术前血清SORD水平将患者分层为两组(<15ng/mL和≥15ng/mL)。

[0065] 图1b示出了肝细胞癌患者根治性切除后无复发生存(RFS)的Kaplan-Meier图,指示根据术前血清SORD水平将患者分层为四组(<5ng/mL、5ng/mL-10ng/mL、10ng/mL-15ng/mL、≥15ng/mL)。

[0066] 图2示出了患者多个亚组中根据术前血清SORD水平的无复发生存的森林图,指示了血清SORD水平升高(≥15ng/mL)的患者与血清SORD水平低(<15ng/mL)的患者相比的风险比。

[0067] 图3示出了根据AFP和SORD的血清水平分层的无复发生存的Kaplan-Meier图,指示了根据性别和吲哚菁绿15分钟滞留率(ICG R15)调整的风险比。

具体实施方式

[0068] 在下文中,将通过示例性实施方式更详细地描述本公开。这些示例性实施方式仅旨在更具体地描述本公开,并且对于本公开所属领域的技术人员来说显而易见的是,本公开的范围不受这些示例性实施方式的限制。

[0069]

[0070] 实施例

[0071] I.材料和方法

[0072] 1.研究设计和人群

[0073] 将如下的150名患者的记录随机化并纳入分析:所述患者在2011年1月至2012年12月在首尔峨山医疗中心因肝细胞癌接受肝切除术,并将外周血储存在峨山医学中心生物资源中心。所有患者都签署了在未来的研究中使用这些信息的知情同意书。排除标准包括(a)接受肝移植的患者,(b)肿瘤未完全切除的患者,以及(c)分类为巴塞罗那临床肝癌(BCLC)B期或C期的患者。这些BCLC B期或C期的患者随后被纳入扩展分析。最终,92名患者被纳入初级分析,以及120名患者被列入扩展分析。首尔峨山医疗中心的机构审查委员会在签署知情

同意书的基础上批准了该研究方案(No.2020-1173)。这项研究是根据赫尔辛基宣言进行的。

[0074]

[0075] 2.SORD的测量

[0076] SORD是用从首尔峨山医疗中心生物资源中心采集的血清样品进行测量的。血清样品在-196℃的新鲜冷冻状态下储存。在解冻样品后,在开始酶促反应之前消耗24小时的足够的预培养时间。这提高了测量的准确性,因为血清的代谢物(尤其是酮)可能与血清中的SORD发生反应。根据制造商的说明,使用人山梨醇脱氢酶ELISA试剂盒(MyBioSource,San Diego,CA,USA)测量SORD的基线血清水平。

[0077]

[0078] 3.风险因素和结果

[0079] 收集临床病理学数据,包括通过Child-Pugh分类进行的肝功能的初步评估、白蛋白-胆红素分级(ALBI分级)和吲哚菁绿15分钟滞留率(ICG-R15)。根据Couinaud分类,如果切除了4个以上的段,则将肝切除术分类为大范围切除(major resection),以及如果切除了少于4个段,则将其分类为小范围切除(minor resection)。将肿瘤大小定义为手术试样中最大肿瘤的直径。

[0080] 感兴趣的结果是无复发生存(RFS)。RFS定义为手术的日期与复发或死亡的日期之间的时间间隔。进行了动态计算机断层扫描或磁共振成像,以及肿瘤标志物(包括血清甲胎蛋白(AFP)和维生素K缺乏或拮抗剂II诱导蛋白(PIVKA-II))测量(切除后1个月,此后前2年以3个月间隔进行,且随后年份每3至6个月)。从手术的日期起对所有患者进行追踪,直至肿瘤复发或死亡的日期,或直到2020年12月31日。

[0081]

[0082] 4.统计分析

[0083] 技术统计数据表示为中位数(各连续变量和分类变量的四分位距和带有百分比的数字)。使用Mann-Whitney U检验对连续变量进行比较。使用Fisher精确检验或卡方检验对分类变量进行比较。使用Kaplan-Meier分析确定时间-事件的生存曲线,并根据术前SORD水平使用对数秩检验进行比较。使用Cox比例风险模型计算RFS的风险比(HR)和95%置信区间(CI)。估计术前SORD水平与RFS的其它预后因素之间的Spearman秩相关系数。使用R统计软件3.5.0版(R Foundation for Statistical Computing,维也纳,奥地利;http://cran.r-project.org/)。所有测试均为双侧的,认为$p<0.05$为统计学显著。

[0084]

[0085] II.结果

[0086] 1.患者的基本特征

[0087] 因肝细胞癌接受根治性肝切除术的共92名患者被纳入研究。他们的中位年龄为55.0岁,并且大多数是男性(76/92,82.6%),其中,HCC的病因是慢性乙肝(82/92,89.1%),并且他们的Child-Pugh评分为5(80/92,87.0%),并接受了小范围切除(74/92,80.4%)。其它人口统计数据(包括肝功能特征、治疗方法和临床病理因素)在表1中示出。当根据术前血清SORD水平将患者分为两组时,73例术前SORD小于15ng/mL,以及19例术前SORD大于或等于15ng/mL。除切除类型外,两组的所有基线特征相似。术前SORD大于或等于15ng/mL的患者比

术前SORD小于15ng/mL的患者更频繁地接受大范围切除。研究人群的这些基本特征如下表1所示。

[0088] 表1

	总计 [N = 92]	SORD <15ng/mL [N = 73]	SORD ≥15ng/mL [N = 19]	p值
年龄.中位数[IQR].y	55.0 [47.8, 60.3]	54.0 [46.0, 61.0]	57.0 [51.0, 59.5]	0.396
男性，n（%）	76 (82.6)	58 (79.5)	18 (94.7)	0.220
病因，n（%）				0.791
乙肝	82 (89.1)	65 (89.0)	17 (89.5)	
丙肝	3 (3.3)	2 (2.7)	1 (5.3)	
其它	7 (7.6)	6 (8.2)	1 (5.3)	
糖尿病，n（%）	19 (20.7)	12 (16.4)	7 (36.8)	0.101
[0089] 之前的TACE，n（%）	15 (16.3)	11 (15.1)	4 (21.1)	0.779
AFP, ng/mL	32.1 [6.3, 300.5]	51.4 [6.4, 278.0]	11.6 [7.0, 1501.5]	0.838
<400, n (%)	70 (76.1)	57 (78.1)	14 (68.4)	0.564
≥400, n (%)	22 (23.9)	16 (21.9)	6 (31.6)	0.564
PIVKA-II, mAU/mL	45.0 [21.8, 366.5]	45.0 [23.0, 309.0]	68.0 [19.0, 495.5]	0.912
<40, n (%)	43 (46.7)	34 (46.6)	9 (47.4)	1.000
≥40, n (%)	49 (53.3)	39 (53.4)	10 (52.6)	1.000
AST.中位数[IQR]，IU/L	31.5 [26.8, 44.0]	31.0 [26.0, 42.0]	38.0 [28.0, 56.0]	0.180
ALT.中位数[IQR]，IU/L	33.0 [24.0, 44.5]	32.0 [24.0, 43.0]	36.0 [28.0, 53.0]	0.243
血小板.中位数[IQR]，x10⁹/L	131.50 [110.8, 175.5]	131.0 [113.0, 178.0]	132.0 [102.0, 159.5]	0.534
白蛋白.中位数[IQR]，g/dL	3.9 [3.6, 4.2]	3.9 [3.6, 4.2]	3.7 [3.5, 4.2]	0.319
胆红素.中位数[IQR]，IU/L	0.9 [0.7, 1.1]	0.9 [0.7, 1.1]	0.9 [0.7, 1.2]	0.892
肌酐.中位数[IQR]，mg/dL	0.8 [0.7, 0.9]	0.8 [0.7, 0.9]	0.8 [0.8, 1.0]	0.535
凝血酶原时间.中位数[IQR]，INR	1.06 [1.01, 1.13]	1.06 [1.01, 1.13]	1.06 [1.01, 1.14]	0.599
Child-Pugh评分.n（%）				0.565
5	80 (87.0)	63 (86.3)	17 (89.5)	
6	9 (9.8)	8 (11.0)	1 (5.3)	
7	3 (3.3)	2 (2.7)	1 (5.3)	

[0090]

ALBI分级，n（%）				0.556
1	38 (41.3)	31 (42.5)	7 (36.8)	
2	52 (56.5)	41 (56.2)	11 (57.9)	
3	2 (2.2)	1 (1.4)	1 (5.3)	
ICG-R15，中位数[IQR]，%	11.2 [8.2, 13.8]	11.0 [8.2, 13.4]	13.6 [8.9, 16.8]	0.230
切除类型*，n（%）				0.014
大范围	18 (19.6)	10 (13.7)	8 (42.1)	
小范围	74 (80.4)	63 (86.3)	11 (57.9)	
肿瘤大小，中位数[IQR]，cm	3.0 [2.3, 4.2]	3.0 [2.1, 4.3]	3.3 [2.8, 3.5]	0.322
显微镜下血管侵犯，n（%）	24 (26.1)	16 (21.9)	8 (42.1)	0.136
Edmondson分级，n（%）				1.000
I或II	19 (20.7)	15 (20.5)	4 (21.1)	
III或IV	73 (79.3)	58 (79.5)	15 (78.9)	
复发，n（%）	43 (46.7)	29 (39.7)	14 (73.7)	0.017
随访，中位数[IQR]，月	57.1 [19.8, 102.6]	66.3 [25.7, 104.3]	19.7 [5.3, 44.1]	0.003

[0091] 将遵循非正态分布的连续变量报告为中位数(四分位距[IQR])。将分类变量报告为带有百分比(%)的数字。

[0092] *大范围切除定义为去除四个以上的肝段,其余被视为小范围切除。

[0093] AFP,甲胎蛋白;ALBI分级,白蛋白-胆红素分级;AST,天冬氨酸氨基转移酶;ALT,丙氨酸氨基转移酶;ICG-R15,吲哚菁绿15分钟滞留率;INR,国际标准比值;IU,国际单位;IQR,四分位距;PIVKA-II,维生素K缺乏或拮抗剂II诱导蛋白;SORD,山梨醇脱氢酶;TACE,经导管动脉化疗栓塞。

[0094]

[0095] 2.根据SORD水平的复发

[0096] 在43例患者中观察到复发,中位随访时间为57.1个月。复发者和无复发者之间存在显著差异,中位血清SORD水平分别为10.0ng/mL和7.1ng/mL。在有复发和无复发的患者中,肿瘤因素没有显著差异,所述肿瘤因素例如其它基本特征(包括肝功能(Child-Pugh评分、白蛋白-胆红素(ALBI)分级、吲哚菁绿(ICG)去除率)、大小、显微镜下血管侵犯和Edmondson分级)。

[0097] 图1所示为无复发生存(RFS)的Kaplan-Meier估计,其通过根据血清SORD水平对肝细胞癌患者在根治性切除后的无复发生存(RFS)的Kaplan-Meier图进行分层而获得。图1a示出了根据术前血清SORD水平分层为两组的患者(<15ng/mL和≥15ng/mL),而图1b示出了根据术前血清SORD水平分层为四组的患者(<5ng/mL、5ng/mL-10ng/mL、10ng/mL-15ng/mL、≥15ng/mL)。总的来说,HCC的根治性切除后中位数和2年RFS率分别为100.3个月和76.3%。当根据术前血清SORD水平将受试者分层为两组(≥15ng/mL与<15ng/mL)时,水平较高的组的结果较差,2年RFS率为50.1%,相比于血清SORD水平低的组RFS率为83.0%(p<0.001)(图

1a)。当根据术前血清SORD水平将患者分为四组(<5ng/mL、5ng/mL-10ng/mL、10ng/mL-15ng/mL、≥15ng/mL)时,RFS在水平<15ng/mL的患者中相似(图1b)。然而,与其它组相比,SORD水平≥15ng/mL的患者的RFS显著较低。

[0098] 当将巴塞罗那肝癌(BCLC)B期或C期患者纳入扩展分析时,结果与原始分析的结果相似,基线血清SORD水平≥15ng/mL的患者的结果较差。

[0099]

[0100] 3.与无复发生存相关的预后因素

[0101] 进行单变量和多变量Cox比例风险回归分析,以研究根治性肝切除术后RFS的预后因素(见下表2)。

[0102] 表2

[0103]

变量	单变量分析			多变量分析		
	HR	95% CI	p值	HR	95% CI	p值
年龄≥60岁	1.02	0.52-1.98	0.96	----	----	----
男性	2.57	0.92-7.18	0.073	1.83	0.64-5.21	0.261
ICG R15≥10%	1.71	0.90-3.36	0.099	1.77	0.93-3.38	0.083
Child-Pugh评分≥6	0.77	0.30-1.97	0.591	----	----	----
ALBI分级≥2	1.37	0.74-2.54	0.310	----	----	----
肿瘤大小 ≥5cm	0.98	0.44-2.21	0.966	----	----	----
显微镜下血管侵犯	1.48	0.77-2.83	0.242	----	----	----
AFP ≥400 ng/mL	1.68	0.86-3.27	0.129	2.03	1.01-4.07	0.047
PIVKA-II ≥40 mAU/mL	1.24	0.68-2.27	0.479	----	----	----
SORD ≥15 ng/mL	3.29	1.72-6.28	<0.001*	3.46	1.76-6.81	<0.001
大范围肝切除术*	1.63	0.80-3.30	0.18	----	----	----

[0104] *大范围切除被定义为去除四个以上的肝段。

[0105] AFP,甲胎蛋白;ALBI分级,白蛋白-胆红素分级;CI,置信区间;HR,风险比;ICG-R15,吲哚菁绿15分钟滞留率;PIVKA-II,维生素K缺乏或拮抗剂II诱导蛋白;SORD,山梨醇脱氢酶。

[0106]

[0107] 在多变量回归分析中,将高血清甲胎蛋白(AFP)水平(≥400ng/mL;风险比(HR),2.03,95%置信区间(CI,1.01-4.07,p=0.047))和高血清SORD水平(≥15ng/mL;HR,3.46,95% CI 1.76至6.81,p<0.001)确定为RFS的独立的预后因素(见表2)。

[0108] 患者亚组中根据术前血清SORD水平的无复发生存的森林图如图2所示,这涉及与血清SORD水平低(<15ng/mL)的患者相比的血清SORD水平高(≥15ng/mL)的患者的RFS风险比。当进行亚组分析时,发现与术前SORD水平低的患者相比,术前SORD水平高的患者在所有亚组中具有更差的RFS(见图2)。

[0109] 作为参考,与血清AFP水平低的患者(<400ng/mL;HR,2.22;95% CI,0.99-5.00;p=0.054)相比,血清AFP水平高的患者(≥400ng/mL;HR,8.87;95% CI,2.14-36.78;p=0.003)中术前SORD水平对RFS的影响大小高。这表明,术前血清SORD水平是血清AFP水平高的患者的结果的特别好的预测指标,并与血清AFP水平一起进一步对处于高复发风险中的患者进行分层。基于这些结果,当根据术前血清SORD和AFP对患者进行分层时,AFP和SORD水平均升高的患者的RFS率最低且预后明显不良(HR,22.08;95% CI,6.91至70.50;p<0.001)。发现其它两组的RFS率相似(HR,1.40;95% CI,0.71-2.78;p=0.30)(见图3)。

[0110]

[0111] 4.与血清SORD相关的因素

[0112] 计算Spearman秩相关系数以检验与SORD水平相关的因素。SORD水平与吲哚菁绿15分钟滞留率(ICG-R15)(r=0.27,p=0.008)和AST(r=0.23,p=0.027)呈正相关,与白蛋白(r=-0.26)(r=-0.26;p=0.011)呈负相关。SORD水平与其它肿瘤标志物之间没有相关性,所述其它肿瘤标志物包括AFP(r=0.002,p=0.99)和维生素K缺乏或拮抗剂II诱导蛋白(PIVKA-II)(r=0.08,p=0.46)。

[0113] 在评估HCC的病理特征与术前血清SORD水平之间的相关性时,微血管侵犯或Edmonson-Steiner分级的存在与术前SORD水平无关。然而,ALBI分级较高的受试者往往具有较高的血清SORD水平。当BCLC B期或C期患者被纳入扩展分析时,发现ALBI分级较高或Child-Pugh评分较高的患者的术前血清SORD水平较高。这指示基线术前SORD水平可能反映肝功能。

[0114]

[0115] III.讨论

[0116] 本研究评价了接受肝细胞癌根治性切除的患者中术前血清SORD水平与手术结果之间的关系。与术前血清SORD水平低(<15ng/mL)的患者的2年RFS为83.0%的情况相比,术前血清SORD水平高(≥15ng/mL)的患者具有显著更差的2年预后,为50.1%。在多变量Cox回归分析中,将高SORD水平鉴别为与HCC根治性切除后RFS相关的统计学显著的预后因素。作为参考,在亚组分析中,与血清AFP水平低(<400ng/mL)的患者相比,血清AFP水平高(≥400ng/mL)的患者术前SORD水平是手术结果的特别好的预测因素。当根据术前血清AFP和SORD水平对患者进行分层时,术前AFP和SORD水平均升高的患者具有明显不良的预后。

[0117] SORD是主要见于肝中的酶,尽管它存在于身体的许多组织中。一般来说,血清SORD水平低,但在肝损伤的情况下,水平随着ALT和AST而升高。这暗示SORD水平升高指示肝细胞损伤。慢性肝细胞损伤和肝细胞坏死引起肌成纤维细胞活化,导致肝纤维化和肝硬化。在肝硬化中,持续的肝细胞损伤通过破坏端粒、释放活性氧族和改变细胞微环境中的旁分泌信号传导而有助于癌变。此外,先前的蛋白组学研究表明,在肝细胞癌患者的肝组织中较低的SORD表达引起低存活(Human Protein Atlas.线上可获得:https://www.proteinatlas.org/ENSG00000140263-SORD/pathology/liver+can cer(于7月26日访问))

[0118] 当肝中SORD活性较低或不存在时,山梨醇可能在肝细胞中积聚。如果糖醇(包括山梨醇)由于缺乏SORD活性而在肝中积累,它们可能有助于肝癌的发展。此外,如果SORD活性的缺乏激活了相应的途径(例如癌症细胞中的多元醇途径),则可能有助于山梨醇的进一步

积累,这可能导致HCC分化不良。

[0119] 在本公开中,基于多变量Cox回归分析,将高血清AFP水平(≥400ng/mL)和高血清SORD水平(≥15ng/mL)鉴别为RFS的两个独立的预后因素,但在本研究中,SORD预测手术结果的作用大小大于AFP的作用大小。有趣的是,相互作用(亚组)分析显示,SORD和AFP在预测手术结果方面相互作用,并且SORD的预测能力在AFP水平升高的患者中有所提高。这些结果表明,SORD可补充AFP在接受HCC切除以求完全治愈的肝细胞癌患者中的预后能力。事实上,SORD和AFP水平均升高的患者在中位RFS不到六个月的时间内预后严重。

[0120] 根治性切除后肝细胞癌复发的其它公知的预后因素包括微血管侵犯和肿瘤大小。然而,在目前的研究中,这些组织学因素与RFS没有显著关联。这可能是由于BCLC 0期或A期的具有小肿瘤(中位值,3.0cm)患者的特征造成的。在本研究中没有纳入晚期BCLC分期的患者和具有大尺寸肿瘤的患者,因为切除以求完全治愈不是护理标准。先前的研究指出,微血管侵袭不会影响长期手术结果,尤其是在早期肝细胞癌患者中。

[0121] 据我们所知,以前没有研究检测血清SORD水平与肝细胞癌其它预后因素之间的相关性。在本研究中,SORD水平与诸如肿瘤大小、AFP和PIVKA-II的肿瘤预后因素之间没有显著关联。然而,SORD水平与AST水平、ICG-R15和ALBI分级呈正相关,这反映了肝损伤或肝功能。与其它常规肿瘤标志物(例如AFP和PIVKA-II)相比,SORD水平在预测预后和反映肝功能方面具有优势。然而,还需要进一步的研究来确定SORD水平在评估肝功能方面的有效性。尽管如此,与组织样品不同,由于血液样品更容易获得,SORD可以在HCC患者的临床实践中用作更有效和有用的预后预测因子。

[0122] 总之,术前血清SORD水平升高(≥15ng/mL)与根治性切除后肝细胞癌患者的不良预后显著关联。此外,术前血清SORD和AFP水平在联合使用时能更好地预测结果,并可能预测不良预后,尤其是在SORD(≥15ng/mL)和AFP(≥400ng/mL)水平升高的患者中。基于这些结果,预计单独使用血清SORD或与AFP水平联合使用将有助于在临床领域中在选择适合手术治疗的患者时进行决策,并避免对预期具有低术后存活的患者进行不必要的手术。

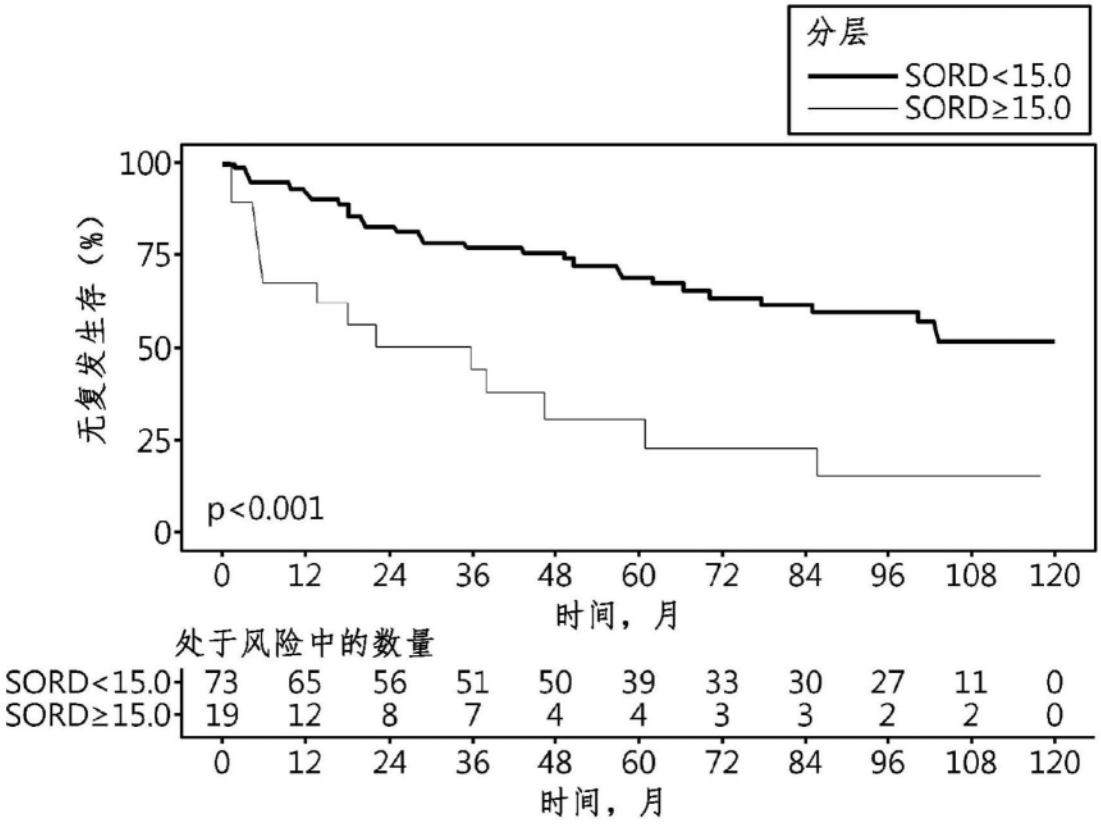

分层
SORD<15.0
SORD≥15.0
无复发生存（%）
100
75
50
25
0
p<0.001
0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120
时间，月
处于风险中的数量
SORD<15.0 73 65 56 51 50 39 33 30 27 11 0
SORD≥15.0 19 12 8 7 4 4 3 3 2 2 0
0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120
时间，月

图1a

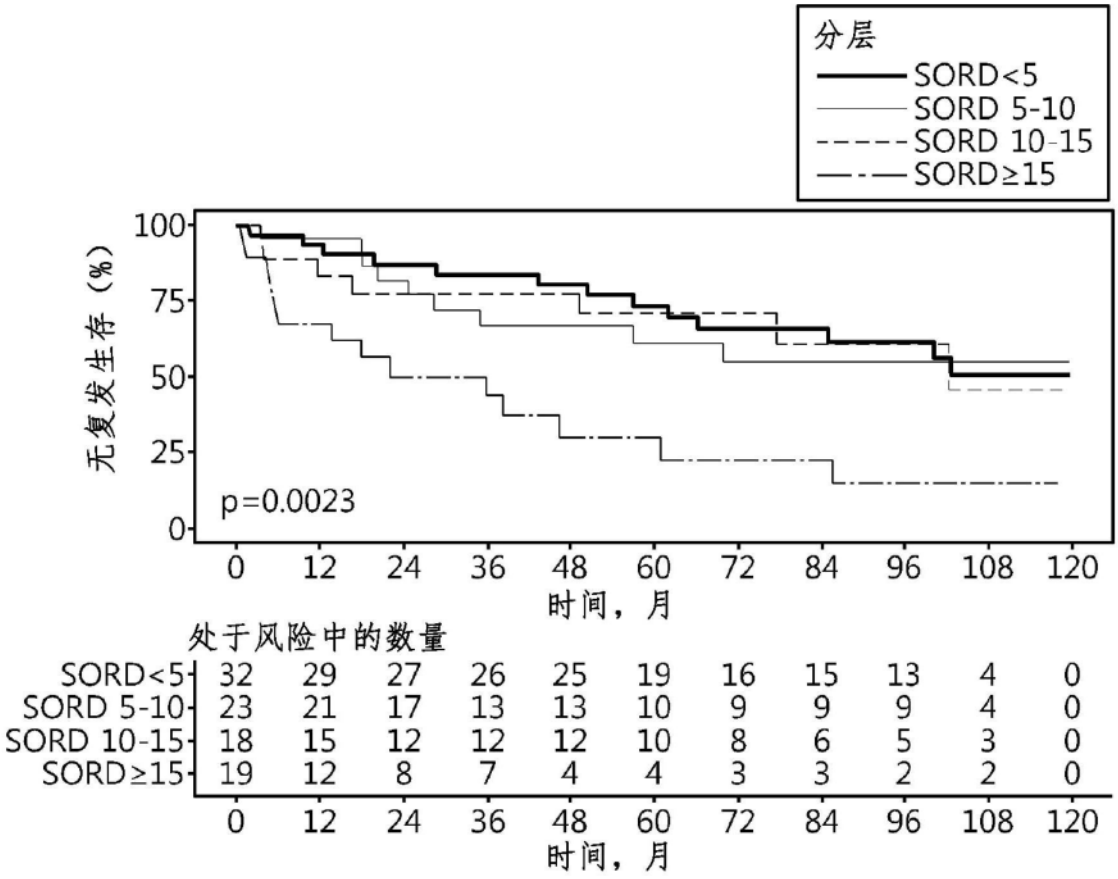

分层
SORD<5
SORD 5-10
SORD 10-15
SORD≥15
无复发生存（%）
100
75
50
25
0
p=0.0023
0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120
时间，月
处于风险中的数量
SORD<5 32 29 27 26 25 19 16 15 13 4 0
SORD 5-10 23 21 17 13 13 10 9 9 9 4 0
SORD 10-15 18 15 12 12 12 10 8 6 5 3 0
SORD≥15 19 12 8 7 4 4 3 3 2 2 0
0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120
时间，月

图1b

变量	患者	事件	风险比	95% CI	p值
年龄，岁					
<60	65	31	3.02	1.41-6.48	0.004
≥60	27	12	6.1	1.49-24.89	0.012
性别					
女性	16	4	6.26	0.57-69.35	0.135
男性	76	39	2.81	1.43-5.52	0.003
ICG R15					
<10%	34	14	2.39	0.74-7.65	0.143
≥10%	58	29	3.83	1.74-8.43	<0.001
肿瘤大小，cm					
<5	76	37	3.17	1.57-6.38	<0.001
≥5	16	7	3.36	0.60-18.69	0.167
微血管侵犯					
否	68	30	3.58	1.57-8.19	0.003
是	24	13	2.56	0.85-7.70	0.095
AFP, ng/mL					
<400	70	31	2.22	0.99-5.00	0.054
≥400	22	12	8.87	2.14-36.78	0.003
PIVKA-Ⅱ, mAU/mL					
<40	43	19	3.39	1.27-9.08	0.015
≥40	49	24	3.12	1.32-7.38	0.01

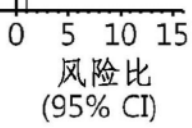


图2

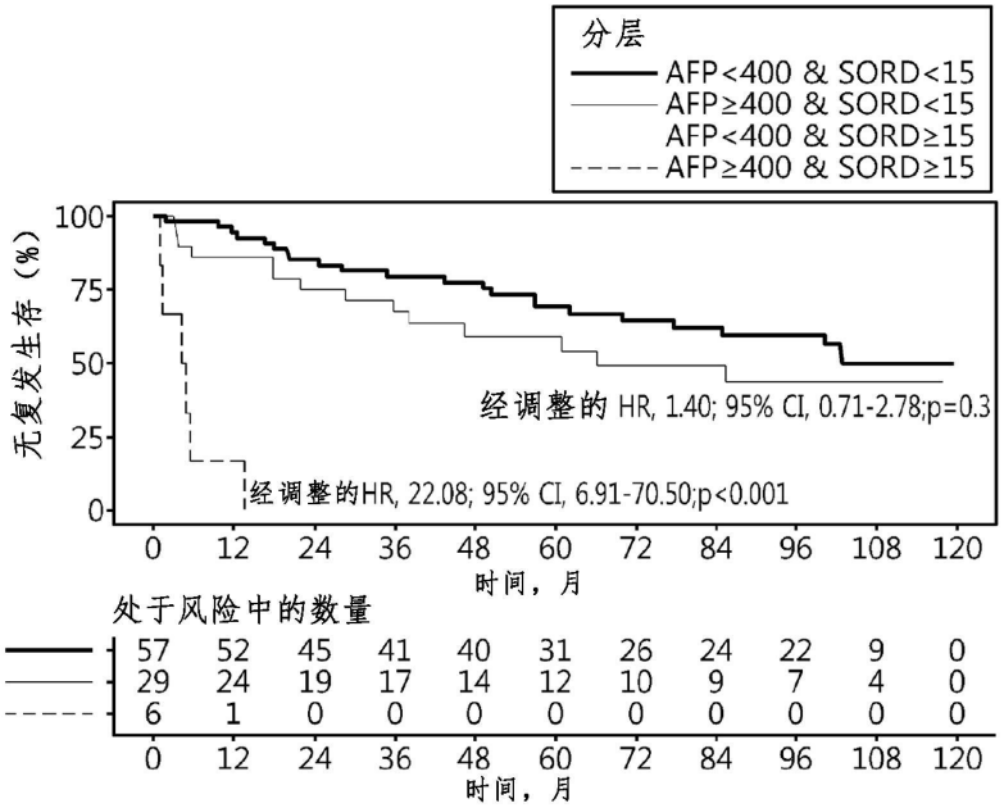

分层
AFP<400 & SORD<15
AFP≥400 & SORD<15
AFP<400 & SORD≥15
AFP≥400 & SORD≥15
无复发生存（%）
100
75
50
25
0
经调整的 HR, 1.40; 95% CI, 0.71-2.78;p=0.3
经调整的HR, 22.08; 95% CI, 6.91-70.50;p<0.001
0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120
时间，月
处于风险中的数量
57 52 45 41 40 31 26 24 22 9 0
29 24 19 17 14 12 10 9 7 4 0
6 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120
时间，月

图3