

- 18 (12): 1169-1175. DOI:10.1080/14737140.2018.1535315.
- [13] Zhu AX, Finn RS, Edeline J et al. Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib (KEYNOTE-224): a non-randomised, open-label phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol* 2018,19 (7): 940-952. DOI:10.1016/s1470-2045(18)30351-6.
- [14] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med* 2008,359 (4): 378-390. DOI:10.1056/NEJMoa0708857.
- [15] Cheng AL, Kang YK, Chen Z et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Lancet Oncol* 2009,10 (1): 25-34. DOI: 10.1016/s1470-2045(08)70285-7.
- [16] Kudo M, Finn RS, Qin S et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial [J]. *Lancet* 2018, 391 (10126): 1163-1173. DOI:10.1016/s0140-6736(18)30207-1.
- [17] Finn RS, Qin S, Ikeda M et al. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma [J]. *N Engl J Med* 2020, 382 (20): 1894-1905. DOI:10.1056/NEJMoa1915745.
- [18] Ren Z, Xu J, Bai Y et al. Sintilimab plus a bevacizumab biosimilar (IBI305) versus sorafenib in unresectable hepatocellular carcinoma (ORIENT-32): a randomised, open-label, phase 2-3 study [J]. *Lancet Oncol* 2021,22 (7): 977-990. DOI:10.1016/s1470-2045(21)00252-7.
- [19] Xu YJ, Lai ZC, He MK et al. Toripalimab Combined With Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy Versus Lenvatinib for Advanced Hepatocellular Carcinoma [J]. *Technol Cancer Res Treat* 2021, 20: 15330338211063848. DOI: 10.1177/15330338211063848.
- [20] Mei J, Li SH, Li QJ et al. Anti-PD-1 Immunotherapy Improves the Efficacy of Hepatic Artery Infusion Chemotherapy in Advanced Hepatocellular Carcinoma [J]. *J Hepatocell Carcinoma* 2021, 8: 167-176. DOI:10.2147/jhc.S298538.
- [21] Kudo M, Matsui O, Izumi N et al. JSH Consensus-Based Clinical Practice Guidelines for the Management of Hepatocellular Carcinoma: 2014 Update by the Liver Cancer Study Group of Japan [J]. *Liver Cancer* 2014, 3 (3-4): 458-468. DOI:10.1159/000343875.
- [22] Xin Y, Cao F, Yang H et al. Efficacy and safety of atezolizumab plus bevacizumab combined with hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Front Immunol* 2022, 13: 929141. DOI:10.3389/fimmu.2022.929141.
- [23] Mei J, Tang YH, Wei W et al. Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy Combined With PD-1 Inhibitors Plus Lenvatinib Versus PD-1 Inhibitors Plus Lenvatinib for Advanced Hepatocellular Carcinoma [J]. *Front Oncol* 2021, 11: 618206. DOI: 10.3389/fonc.2021.618206.
- [24] Zhang J, Zhang X, Mu H et al. Surgical Conversion for Initially Unresectable Locally Advanced Hepatocellular Carcinoma Using a Triple Combination of Angiogenesis Inhibitors, Anti-PD-1 Antibodies, and Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy: A Retrospective Study [J]. *Front Oncol* 2021, 11: 729764. DOI: 10.3389/fonc.2021.729764.
- [25] Zhang TQ, Geng ZJ, Huang ZL et al. Safety and Effectiveness of Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy Combined With Tyrosine Kinase Inhibitors and Immune Checkpoint Inhibitors for Advanced Hepatocellular Carcinoma in BCLC Stage C [J]. *Social Science Electronic Publishing*, 2021, DOI:10.2139/ssrn.3766985.
- [26] Lai Z, He M, Bu X et al. Lenvatinib, toripalimab plus hepatic arterial infusion chemotherapy in patients with high-risk advanced hepatocellular carcinoma: A biomolecular exploratory, phase II trial [J]. *Eur J Cancer* 2022,174: 68-77. DOI:10.1016/j.ejca.2022.07.005.
- [27] Gu YK, Zhang TQ, Zuo MX et al. Hepatic artery infusion chemotherapy (HAIC) combined with apatinib and camrelizumab for hepatocellular carcinoma (HCC) in BCLC stage c: A prospective, single-arm, phase II trial (TRIPLLET study) [J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40 (16-suppl): 4106-4106. DOI:10.1200/JCO.2022.40.16-suppl.4106.
- [28] Choi JH, Chung WJ, Bae SH et al. Randomized, prospective, comparative study on the effects and safety of sorafenib vs. hepatic arterial infusion chemotherapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis [J]. *Cancer Chemother Pharmacol* 2018, 82 (3): 469-478. DOI:10.1007/s00280-018-3638-0.
- [29] Ueshima K, Ogasawara S, Ikeda M et al. Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy versus Sorafenib in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma [J]. *Liver Cancer* 2020,9 (5): 583-595. DOI:10.1159/000508724.
- [30] He M, Li Q, Zou R et al. Sorafenib Plus Hepatic Arterial Infusion of Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin vs Sorafenib Alone for Hepatocellular Carcinoma With Portal Vein Invasion: A Randomized Clinical Trial [J]. *JAMA Oncol* 2019, 5 (7): 953-960. DOI:10.1001/jamaoncol.2019.0250.
- [31] Ikeda M, Shimizu S, Sato T et al. Sorafenib plus hepatic arterial infusion chemotherapy with cisplatin versus sorafenib for advanced hepatocellular carcinoma: randomized phase II trial [J]. *Ann Oncol* 2016, 27 (11): 2090-2096. DOI:10.1093/annonc/mdw323.
- [32] Chen S, Zhang K, Liu W et al. Hepatic arterial infusion of oxaliplatin plus raltitrexed in patients with intermediate and advanced stage hepatocellular carcinoma: A phase II, single-arm, prospective study [J]. *Eur J Cancer* 2020, 134: 90-98. DOI:10.1016/j.ejca.2020.03.032.
- [33] Ghiringhelli F, Vincent J, Bengrine L et al. Hepatic arterial chemotherapy with raltitrexed and oxaliplatin versus standard chemotherapy in unresectable liver metastases from colorectal cancer after conventional chemotherapy failure (HEARTO): a randomized phase-II study [J]. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019, 145 (9): 2357-2363. DOI:10.1007/s00432-019-02970-8.
- [34] Cui W, Fan W, Zhang Q et al. Comparison of two transarterial chemoembolization regimens in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: raltitrexed plus oxaliplatin versus 5-fluorouracil plus oxaliplatin [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(45): 79165-79174. DOI:10.18632/oncotarget.16298.
- [35] Zang M, Li Q, Hu X et al. Hepatic arterial infusion chemotherapy with oxaliplatin plus raltitrexed versus oxaliplatin plus fluorouracil in intermediate and advanced hepatocellular carcinoma: A retrospective study [J]. *J Clin Oncol*, 2022; 40 (16_suppl): e16166-e16166. DOI:10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.e16166

肝细胞癌病理分化及微血管侵犯术前预测 Nomograms 的构建及效能评估

林超群, 宋一帆, 吴雪云, 郑俊, 范应方
南方医科大学第三附属医院肝胆外科

摘要:目的 筛选与HCC的病理分化程度和MVI分级的相关的临床独立危险因素,构建临床可视化模型,进行病理分化程度和MVI分级的术前预测,并评估其预测效能。方法 收集684例HCC手术患者的临床及病理资料,分为训练队列($n=550$)和验证队列($n=134$)。采用单因素和多因素Logistic回归分析,筛选与HCC病理分化程度和MVI分级相关的临床独立危险因素。采用R 4.0软件分别构建病理分化程度和MVI分级的Nomograms,通过受试者工作特征曲线下面积(AUC)、校准曲线和决策曲线分析(DCA)评价两项Nomograms的预测效果、准确性和临床实用性。结果 单因素及多因素Logistic回归分析筛选出与肿瘤细胞病理分化程度相关的独立危险因素包括PIVKA-II、AFP、NLR和ALB,以此构建的Nomogram在训练队列和验证队列的AUC分别为0.877 (0.847~0.907)和0.883 (0.829~0.936),Hosmer-Lemeshow拟合优度检验结果为 $P=0.163$ 。单因素及多因素Logistic回归分析筛选的与MVI分级的独立危险因素包括PIVKA-II、AFP、NLR、肿瘤数目和肿瘤最长直径。构建的Nomogram在训练队列和验证队列的AUC分别为0.944 (0.927~0.961)和0.912 (0.864~0.960),Hosmer-Lemeshow拟合优度检验结果为 $P=0.395$ 。结论 NLR和PIVKA-II表达水平与HCC的细胞低分化和MVI阳性密切相关;联合NLR和PIVKA-II及其他危险因素构建的Nomograms对HCC病理分化程度和MVI分级具有良好的术前预测效能,对HCC围手术期治疗方案选择和手术规划制定具有指导意义。

关键词:肝细胞癌;病理分化程度;微血管侵犯;列线图

肝细胞癌(HCC)是全球高度致命的常见恶性肿瘤之一,5年总体生存率约12%~18%^[1],R0手术切除是最佳治疗方法之一^[2]。尽管近10余年,以介入联合靶向药物及精准肝切除等综合治疗措施也取得了良好效果,但HCC术后5年复发率仍高达70%^[3]。肿瘤细胞低分化和微血管侵犯(MVI)是公认的HCC复发与转移的危险因素^[4]。因此,术前精准预测HCC的分化程度和MVI分级,对HCC的全程综合治疗,尤其对可切除或临界可切除HCC的围手术期治疗具有重要指导意义。

肿瘤细胞分化程度和癌旁组织MVI这两项病理诊断只能通过术后标本确诊,虽对术后辅助治疗可以提供帮助,但不能对术前治疗方案及术中手术规划提供有效指导,存在滞后性^[5,6]。而术前能准确判断肿瘤细胞分化程度或MVI级别,则对围手术期治疗方案的优化选择或手术规划的制定具有极大指导意义,以最大程度提高R0切除率、改善患者肿瘤学预后^[7,8]。

如何术前预测肿瘤细胞分化程度和癌旁组织MVI一直是HCC精准治疗的重要研究内容。现有研究表明中性粒细胞-淋巴细胞计数比值(NLR)、异常凝血酶原(PIVKA-II)、肿瘤数目、肿瘤直径、 α -fetoprotein(AFP)、肝纤维化程度等均与HCC的不良组织学特征有关^[9-12]。但如何筛选上述临床、生化和影像学指标,构建可视化Nomograms,进行HCC病理分化程度和MVI分级术前预测的研究少见^[13]。我们对此进行研究,并评估其预测效能。

1 材料和方法

1.1 病人资料

回顾性收集南方医科大学珠江医院2018年1月~2023年4月期间手术且术后病理证实为“HCC”患者的临床资料($n=885$),按照纳排标准选纳入684例患者进行研究。其中2018年01月至2022年10月间550例患者数据作为训练队列,2022年11月至2023年04月间134例患者数据作为验证队列。本研究所有患者及家属均签署知情同意书,研究依据《赫尔辛基宣言》原则进行,经南方医科大学珠江医院医学伦理委员会批准(批准号:2024-KY-069-01)。

纳入标准:(1)年龄在18岁及以上;(2)Child-Pugh A/B级患者行肝切除术且经病理组织学证实为HCC;(3)临床资料完整,有血液学及术前AFP、PIVKA-II等肿瘤标志物检测;(4)具有明确的肿瘤细胞分化程度和MVI分级的病理诊断。排除标准:(1)既往接受抗肿瘤(介入、靶向、免疫、消融、移植等)治疗史;(2)存在LCS-GJ Vp3或Vp4型门静脉癌栓,肝静脉或下腔静脉的大血管侵犯;(3)术前2周内明显病原体感染、出血史或外伤史;(4)合并其他肿瘤病史;(5)术前检查或术后病理提示伴有肝外侵犯(淋巴结或远处器官转移);(6)使用影响血液检测类药物(华法林等抗凝药物)。研究对象纳入分析流程见图1。

1.2 临床变量

所有患者均在手术前2周内接受相关检查。影像

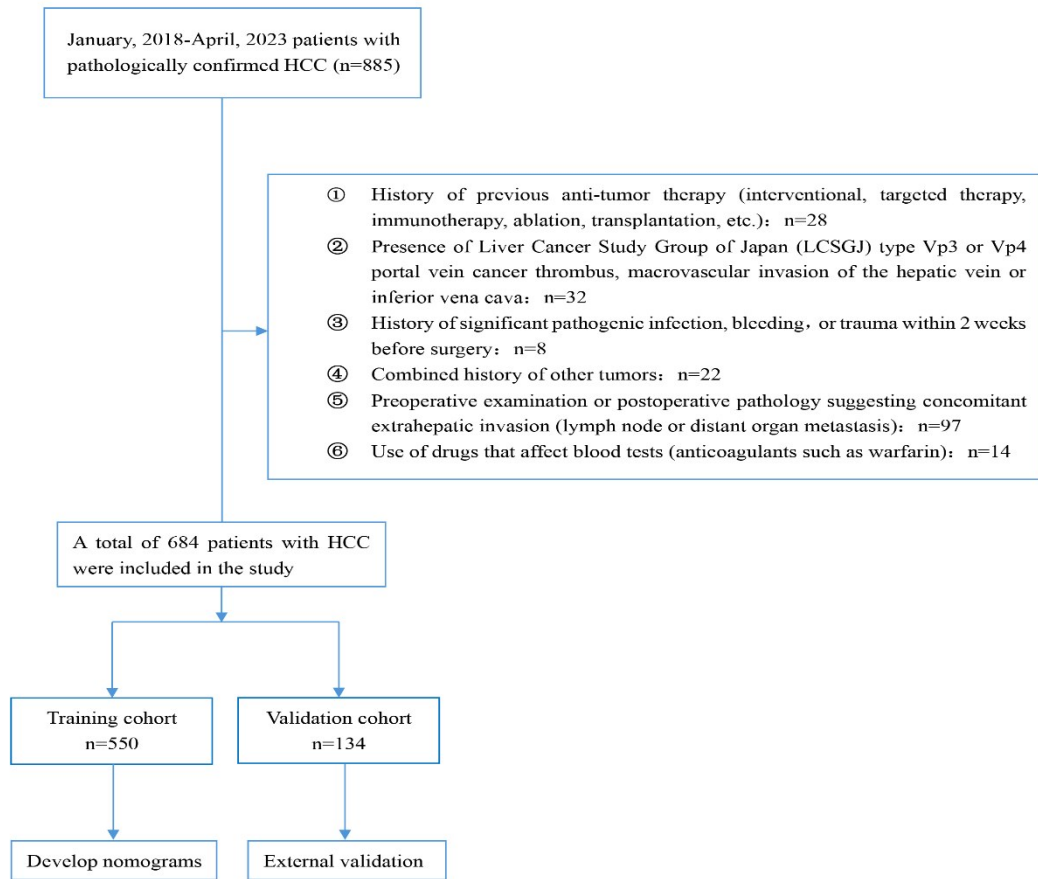


图1 研究对象纳入分析流程
Fig.1 Flow chart of study case inclusion analysis.

学检查包括腹部超声、腹部增强CT、上腹部增强磁共振成像(MRI)等,影像学指标主要包括肿瘤部位、数目和最大直径、有无癌栓。血液学检查包括血常规(含中性粒细胞绝对值计数、淋巴细胞绝对值计数)、凝血功能、肝肾功能、传染病八项、肿瘤标志物(含AFP、PIVKA-II)检测等。NLR由中性粒细胞绝对计数除以淋巴细胞绝对计数计算得出。手术方式包括开腹或腹腔镜下肝部分切除术,手术标本由两名病理科医师进行组织学评估,病理报告结果包含Edmonson-Steiner病理学分级和MVI分级等内容。

HCC的病理分化程度按Edmonson-Steiner 4级法分为I、II、III、IV级。为便于分析,本研究将HCC病理分化程度分为高-中分化组和低分化组,其中Edmonson-Steiner分级I、II级定义为高-中分化组HCC,III-IV级定义为低分化组HCC。将MVI分级分为MVI阴性和MVI阳性两组,其中M0定义为MVI阴性,M1和M2定义为MVI阳性^[14]。

1.3 统计学方法

分类变量表示为频数(百分比),采用 χ^2 检验或

Fisher精确检验比较。连续变量用均值 \pm SD或中位数(四分位数间距)表示,采用t检验或Mann-Whitney U检验进行比较。

通过单因素分析评估训练队列中临床变量与病理分化程度和MVI分级的相关性,并将单因素分析中 $P < 0.05$ 的变量纳入多因素Logistic回归分析,进一步筛选与HCC病理分化程度和MVI分级分别相关的独立危险因素。基于多因素Logistic回归分析的结果,使用R 4.0软件分别构建预测病理分化程度和MVI分级的Nomograms。绘制ROC曲线,以AUC值评价预测模型的区分度;绘制校准曲线来评价Nomograms的一致性,采用Bootstrap法($B=1000$)进行内部验证评估校准曲线的准确度;通过DCA曲线评价模型的临床效用。采用R 4.0软件(<http://www.r-project.org/>)进行统计分析, $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

本研究共纳入684名HCC患者,训练队列550例中男性463例(84.1%),女性87例(15.9%),中位年龄57(49,65)岁。

组织学检查证实 MVI 阳性组 HCC 患者训练队列共计 263 例(47.8%),验证队列共计 68 例(50.7%)。低分化组 HCC 患者训练队列共计 166 例(30.2%),低分化共计 53 例(39.6%)。

2.1 病理分化程度预测的单因素分析和多因素 logistic 回归分析

单因素分析在高-中分化组 HCC 与低分化组 HCC 患者中筛选出谷草转氨酶、白蛋白(ALB)、PIVKA-II、AFP、肿瘤数目、肿瘤最大直径以及 NLR 等指标具有统

计学差异,分析结果详见附件表 1。多因素 Logistic 回归分析筛选的与 HCC 患者病理分化程度有关的独立危险因素包括:PIVKA-II(40-400 VS <40, OR=2.82; 95% CI: 1.20~7.76; P=0.027;>400 VS <40, OR=18.40; 95% CI:7.71~51.50; P>0.001)、AFP(20~400 VS<20, OR=1.03; 95% CI: 0.53~1.98; P=0.900; >400 VS<20, OR=4.06; 95% CI: 2.34- 7.15; P<0.001)、NLR(OR=1.98; 95% CI: 1.34~2.96; P<0.001)、ALB(OR=0.95; 95% CI: 0.91~0.99; P=0.022),分析结果详见附件表 2。

Tab.1 Baseline Characteristics and Univariate Analysis of Cases in the Well-Moderate Differentiation and Poor Differentiation Groups

Variables	Total (n=550)	Well-moderate differentiation (I-II, n=384)	Poor differentiation (III-IV, n=166)	P-value
Age (yr)	57.0(49.0,65.0)	57.0(50.0,65.0)	54.0(48.0,65.8)	0.246
Gender				0.951
Male	463(84.2%)	324(84.4%)	139(83.7%)	
Female	87 (15.8%)	60 (15.6%)	27 (16.3%)	
Hepatitis				0.070
None	89 (16.2%)	64 (16.7%)	25 (15.1%)	
HBV	444(80.7%)	304(79.2%)	140(84.3%)	
HCV	17 (3.1%)	16 (4.1%)	1 (0.6%)	
ALT (IU/L)	28.0(19.0,43.0)	27.5(19.0,43.3)	28.5(20.0,42.0)	0.493
AST (IU/L)	30.0(23.0,49.0)	30.0(22.0,45.0)	33.5(25.0,55.0)	0.015
TBiL (umol/L)				0.341
PT (s)	12.1(9.1,17.3)	12.5(9.0,17.5)	11.6(9.2,15.9)	0.342
ALB (g/L)	12.3(11.5,13.1)	12.3(11.5,13.1)	12.3(11.6,13.3)	0.041
PIVKA-II (mAU/mL)	38.0(34.6,41.2)	38.3(35.2,41.3)	36.8(33.0,40.7)	<0.001
<40	131(23.8%)	125(32.6%)	6 (3.6%)	
40-400	251(45.6%)	205(53.4%)	46 (27.7%)	
>400	168(30.6%)	54 (14.0%)	114(68.7%)	
AFP (ng/mL)				<0.001
<20	233(41.5%)	197(51.3%)	36 (21.7%)	
20-400	132(24.4%)	109(28.4%)	23 (13.9%)	
>400	185(34.1%)	78 (20.3%)	107(64.4%)	
Tumor Number				0.006
Single	406(73.8%)	297(77.3%)	109(65.7%)	
Multiple	144(26.2%)	87 (22.7%)	57 (34.3%)	
Tumor Maximum Diameter (cm)				<0.001
<3	113(20.5%)	96 (25.0%)	17 (10.2%)	
3-5	177(32.2%)	149(38.8%)	28 (16.9%)	
>5	260(47.3%)	139(36.2%)	121(72.9%)	
NLR	2.09(1.94,2.80)	2.02(1.92,2.60)	3.10(2.34,3.30)	<0.001

HBV: hepatitis B virus; HCV: hepatitis C virus; ALT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase; PT: prothrombin time; ALB: albumin; AFP: α-fetoprotein; PIVKA-II: protein induced by vitamin K absence-II; NLR: Neutrophil-lymphocyte ratio; TBIL: Total bilirubin.

Tab.2 Multivariate logistic regression analysis of clinical variables for prediction of degree of pathological differentiation

Variables	OR	95% CI	P-value
PIVKA-II (mAU/mL)			
40-400 vs <40	2.82	1.20-7.76	0.027
>400 vs <40	18.40	7.71-51.50	<0.001
AFP (ng/mL)			
20-400 vs <20	1.03	0.53-1.98	0.900
>400 vs <20	4.06	2.34-7.15	<0.001
ALB (g/L)	0.95	0.91-0.99	0.022
NLR	1.98	1.34-2.96	<0.001

ALB: albumin; AFP: α -fetoprotein; PIVKA-II: protein induced by vitamin K absence-II; NLR: neutrophil-lymphocyte ratio; OR : Odds Ratio; CI: Confidence Interval.

2.2 MVI分级预测的单因素分析和多因素 Logistic 回归分析

单因素分析在 MVI 阴性组 HCC 与 MVI 阳性组 HCC 患者中筛选出肝炎病史、谷草转氨酶、PIVKA-II、AFP、肿瘤数目、肿瘤最大直径以及 NLR 等指标具有统计学差异,分析结果详见附件表 3。多因素 Logistic 回归分析筛选的与 HCC 患者病理分化程度有关的独立危险因素包括:PIVKA-II(40~400 vs <40, OR=3.69; 95% CI: 1.51~9.89; $P=0.006$; >400 vs <40, OR=9.68; 95% CI: 3.61~28.20; $P<0.001$)、AFP(20~400 vs <20, OR=1.70; 95% CI: 0.86~3.34; $P=0.120$; >400 vs <20, OR=9.73; 95% CI: 4.96~19.90; $P<0.001$)、NLR (OR=3.54; 95% CI: 2.15~5.99; $P<0.001$)、肿瘤数目 (OR=6.47; 95% CI: 3.36-13.00; $P<0.001$)、肿瘤最长直径(3~5 vs <3, OR=1.21; 95% CI: 0.51~2.99; $P=0.700$; >5 vs <3, OR=10.10; 95% CI: 4.57~24.10; $P<0.001$),分析结果详见附件表 4。

2.3 模型的构建与验证

将所筛选的相关独立危险因素分别构建预测 HCC 患者病理分化程度和 MVI 分级的 Nomogram 分别见图 2 和图 6。

病理分化程度的 Nomogram 在训练队列和验证队列的 AUC 分别为 0.877(95% CI: 0.847~0.907)、0.883(95% CI: 0.829~0.936),表明 Nomogram 模型用于区分高-中分化 HCC 和低分化 HCC 患者具有较好效能,详见图 3。训练队列 Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验结果为 $P=0.163$ ($P>0.05$),Nomogram 的校准曲线在术前预测的病理分化程度与实际术后病理确诊的分化程度有较好的一致性,详见图 4。DCA 曲线显示了通过术前病理分化预测模型获益的概率大于两种极端情况,即应用该模型术前预测病理分化程度具有较高的临床有效性和适用性,详见图 5。

MVI 分级的 Nomogram 在训练队列和验证队列的 AUC 分别为 0.944(95% CI: 0.927~0.961)、0.912(95% CI: 0.864~0.960),说明 Nomogram 模型用于区分 MVI 阴性和 MVI 阳性患者具有较好效能,详见图 7。训练队列 Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验结果为 $P=0.395$ ($P>0.05$),Nomogram 的校准曲线在术前预测的 MVI 分级与实际术后病理确诊的 MVI 分级有较好的一致性,详见图 8。DCA 曲线显示了通过术前 MVI 分级预测模型获益的概率大于两种极端情况,即应用该模型术前预测 MVI 分级具有较高的临床有效性和适用性,详见图 9。

3 讨论

肿瘤细胞低分化程度和 MVI 阳性影响 HCC 的治疗效果和远期预后^[6,14]。我们研究结果表明,较高水平的 AFP、NLR、PIVKA-II,以及低蛋白血症与 HCC 不良分化程度显著相关;而较高水平的 AFP、NLR、PIVKA-II,肿瘤多发及肿瘤直径与 HCC 的 MVI 阳性密切相关。本研究基于 NLR 和 PIVKA-II 分别建立了术前预测 HCC 病理分化程度和 MVI 分级的 Nomogram 模型。病理分化程度 Nomogram 在独立验证队列的 AUC 为 0.888(95% CI: 0.835~0.941),MVI 分级 Nomogram 在独立验证队列的 AUC 为 0.909(95% CI: 0.859~0.958)。校准曲线表明,NLR 联合 PIVKA-II 预测 HCC 分化程度和 MVI 分级与实际观测的结果一致性良好,有助于临床医生科学地制定临床诊疗方案。

我们的研究发现血清较高水平的 NLR 和 PIVKA-II 与 HCC 不良病理组织学特征之间密切相关,基于 NLR 和 PIVKA-II 和其他指标构建的 Nomogram 对 HCC 病理分化程度和 MVI 分级具有良好预测性能,对临床医生进行 HCC 围手术期个体化治疗具有一定的指导价值。

多模态影像数据联合智能化算法在 HCC 病理分化程度和 MVI 分级的预测性研究中有着大量的应用范

Tab.3 Baseline characteristics and univariate analysis of cases in MVI absence and MVI presence groups

Variables	Total (n=550)	MVI absence (M0, n=287)	MVI presence (M1+M2, n=263)	P-value
Age (yr)	57.0(49.0,65.0)	57.0(50.0,64.5)	55.0(48.0,65.0)	0.243
Gender				0.498
Male	463(84.2%)	245(85.4%)	218(82.9%)	
Female	87 (15.8%)	42 (14.6%)	45 (17.1%)	
Hepatitis				0.020
None	89 (16.2%)	54 (18.8%)	35 (13.3%)	
HBV	444(80.7%)	220(76.7%)	224(85.2%)	
HCV	17 (3.1%)	13 (4.5%)	4 (1.5%)	
ALT (IU/L)	28.0(19.0,43.0)	26.0(18.0,40.0)	30.0(20.5,45.5)	0.051
AST (IU/L)	30.0(23.0,49.0)	29.0(21.0,41.5)	35.0(25.0,55.5)	<0.001
TBiL (umol/L)	12.1(9.1,17.3)	12.3(9.0,17.4)	12.1(9.3,17.3)	0.883
PT (s)	12.3(11.5,13.1)	12.4(11.5,13.2)	12.2(11.5,13.0)	0.121
ALB (g/L)	38.0(34.6,41.2)	38.0(34.8,41.2)	37.9(34.2,41.2)	0.557
PIVKA-II (mAU/mL)				<0.001
<40	131(23.8%)	120(41.8%)	11 (4.2%)	
40-400	251(45.6%)	136(47.4%)	115(43.7%)	
>400	168(30.6%)	31 (10.8%)	137(52.1%)	
AFP (ng/mL)				<0.001
<20	233(41.5%)	177(61.7%)	56 (21.3%)	
20-400	132(24.4%)	79 (27.5%)	53 (20.2%)	
>400	185(34.1%)	31 (10.8%)	154(58.5%)	
Tumor Number				<0.001
Single	406(73.8%)	254(88.5%)	152(57.8%)	
Multiple	144(26.2%)	33 (11.5%)	111(42.2%)	
Tumor Maximum Diame (cm)				<0.001
<3	113(20.5%)	99 (34.5%)	14 (5.3%)	
3-5	177(32.2%)	140(48.8%)	37 (14.1%)	
>5	260(47.3%)	48 (16.7%)	212(80.6%)	
NLR	2.09(1.94,2.80)	2.01(1.93,2.10)	2.82(2.50,3.17)	<0.001

HBV: hepatitis B virus; HCV: hepatitis C virus; ALT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase; PT: prothrombin time; ALB: albumin; AFP: α -fetoprotein; PIVKA-II: protein induced by vitamin K absence-II; NLR: Neutrophil-lymphocyte ratio; TBIL: Total bilirubin.

Tab.4 Multivariate logistic regression analysis of clinical variables for preoperative prediction of MVI grade

Variables	OR	95% CI	P-value
PIVKA-II (mAU/mL)			
40-400 vs <40	3.69	1.51-9.89	0.006
>400 vs <40	9.68	3.61-28.20	<0.001
AFP (ng/mL)			
20-400vs <20	1.70	0.86-3.34	0.120
>400 vs <20	9.73	4.96-19.90	<0.001
NLR	3.54	2.15-5.99	<0.001
Tumor Number	6.47	3.36-13.00	<0.001
Tumor Maximum Diameter (cm)			
3-5 vs <3	1.21	0.51-2.99	0.700
>5 vs <3	10.1	4.57-24.10	<0.001

ALB: albumin; AFP: α -fetoprotein; PIVKA-II: protein induced by vitamin K absence-II; NLR: Neutrophil-lymphocyte ratio; OR: Odds Ratio; CI: Confidence Interval.

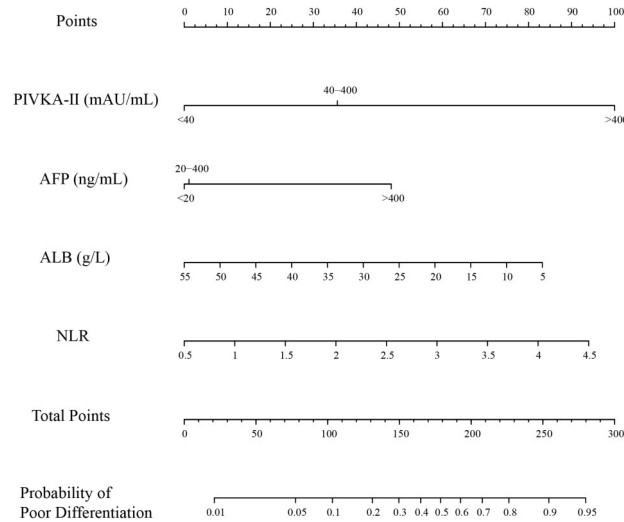


图2 预测病理分化程度的Nomogram

Fig.2 Nomogram for predicting the degree of pathologic differentiation.

注:将 HCC 患者各临床指标数据代入该 Nomogram, 每个临床指标的数值对应相应得分(Points), 再把每个临床指标分数相加得到总得分(Total Points), 最后将总分根据 Nomogram 转化为 HCC 为低分化程度的预测概率。

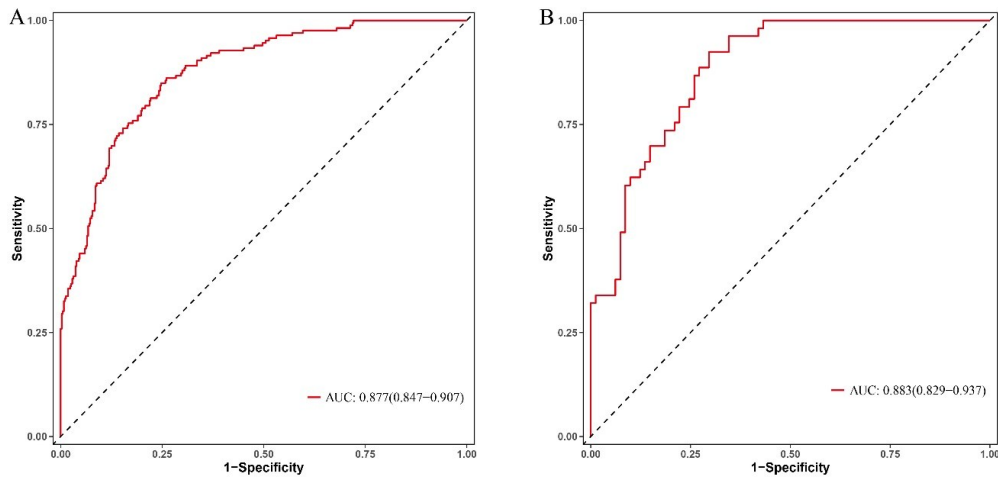


图3 预测病理分化程度Nomogram的ROC曲线,A:训练队列;B:验证队列。

Fig.3 ROC of nomogram for predicting the degree of pathological differentiation.

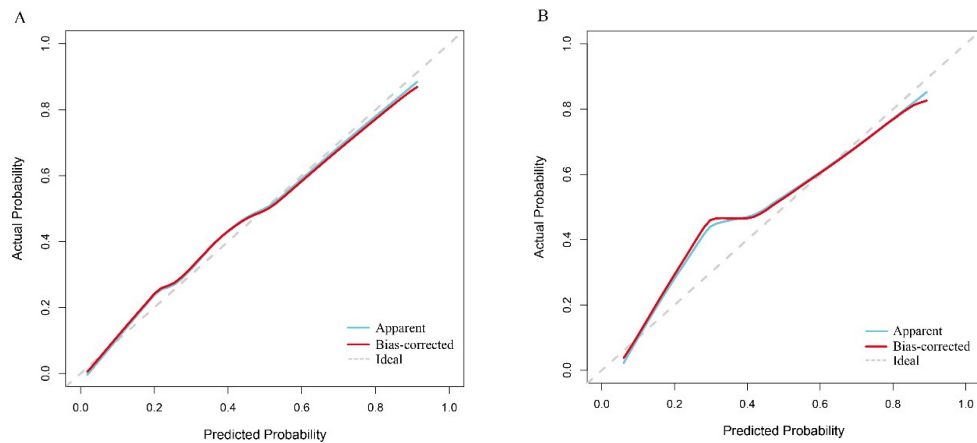


图4 预测病理分化程度 Nomogram 模型的校准曲线

Fig.4 Calibration curve of the nomogram for predicting the degree of pathological differentiation.

虚线(Ideal)表示理想标准曲线, 蓝线(Apparent)表示原始曲线, 红线(Bias-corrected)表示校准曲线, 该曲线通过 Bootstrap 法 1000 次自助抽样进行校正, 校准曲线接近理想标准曲线。A:训练队列(MAE=0.018, B=1000); B:验证队列(MAE=0.037, B=1000)。(MAE: mean absolute error)。

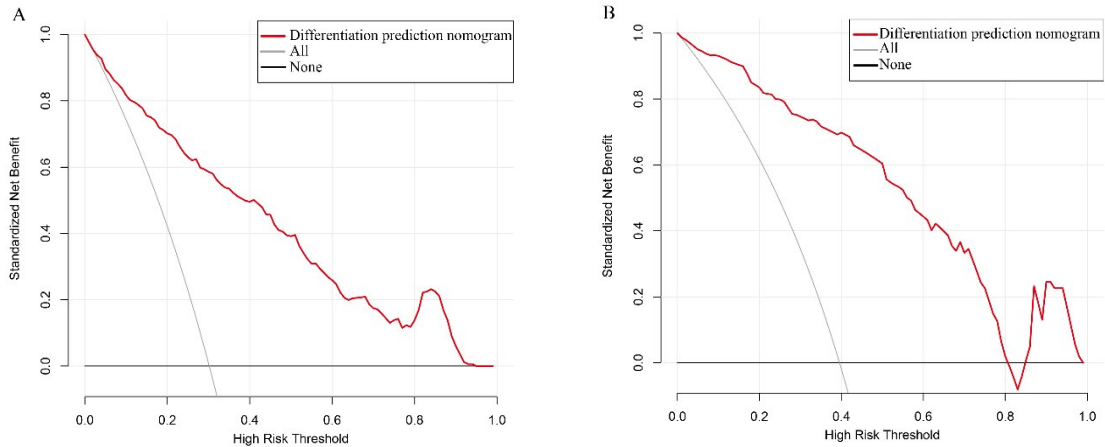


图5 预测病理分化程度Nomogram模型的DCA曲线

Fig.5 DCA of the nomogram for predicting the degree of pathological differentiation.

灰线(All)表示假设所有患者均为低分化程度(予治疗方案),黑线(None)表示假设所有患者均为高-中分化(无治疗方案),红线表示在不同阈值概率下预测病理分化程度Nomogram的净收益。A:训练队列; B:验证队列。

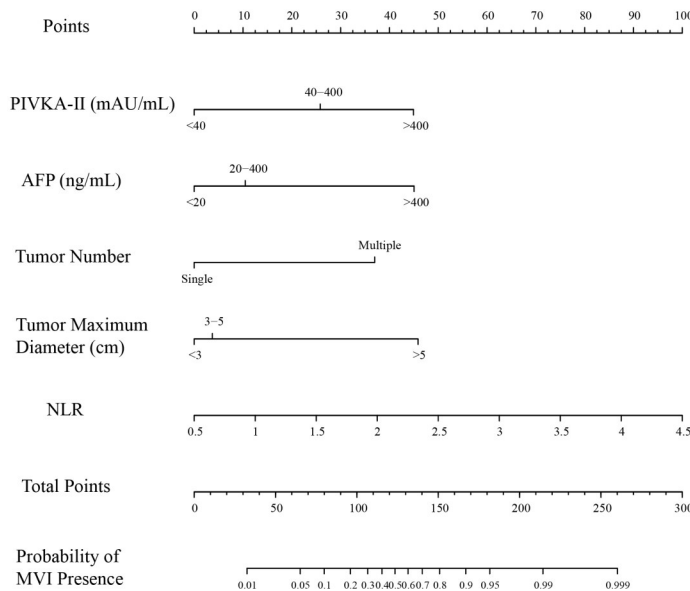


图6 预测MVI分级的Nomogram

Fig.6 Nomogram for predicting the MVI grade.

(注:将 HCC 患者各临床指标数据代入该 Nomogram,每个临床指标的数值对应相应得分(Points),再把每个临床指标分数相加得到总得分(Total Points),最后将总分根据 Nomogram 转化为 HCC 合并 MVI 阳性的预测概率)。PIVKA-II、AFP、NLR 和 ALB。

例。Mao等^[22]收集、提取AFP、AST等检验指标和钆塞酸二钠增强MRI放射学特征,运用机器学习算法构建了可以区分HCC病理分化程度的预测模型;此外,CT纹理特征、平扫磁共振成像(MRI)组学特征也应用于预测术前HCC组织学分级^[23, 24]。Banerjee等^[25]将CT特征和基因表达生物标志物结合,构建了放射基因组静脉侵犯(RVI),研究发现RVI预测模型在预测HCC的MVI方面具有较高的准确性。Xu等^[26]运用临床指标、肿瘤

形态学数据、放射基因组静脉侵犯(RVI)和放射组学评分等放射组学特征,创建了一种新的算法,该算法在预测MVI方面表现良好,在训练集与测试集中的AUC分别为0.909、0.889。然而,这些术前影像学基因表达特征诊断MVI的标准尚未得到广泛认可。Hyun和Ahn等^[27, 28]均建立了基于¹⁸F-FDG PET/CT标准化摄取值等参数的MVI预测模型,但PET/CT在全国医院中并未广泛应用。基于超声、CT和MRI等的一系列影像组学特

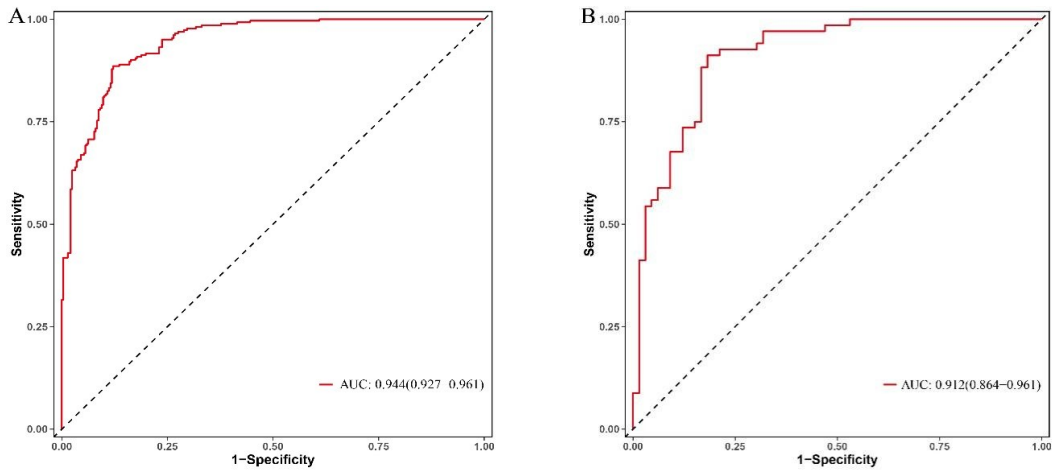


图7 预测MVI分级Nomogram模型的ROC曲线

Fig.7 ROC of the nomogram for predicting the MVI grade.

A:训练队列 AUC=0.944(95%CI:0.927~0.961); B:验证队列 AUC=0.912(95%CI: 0.864~0.961).

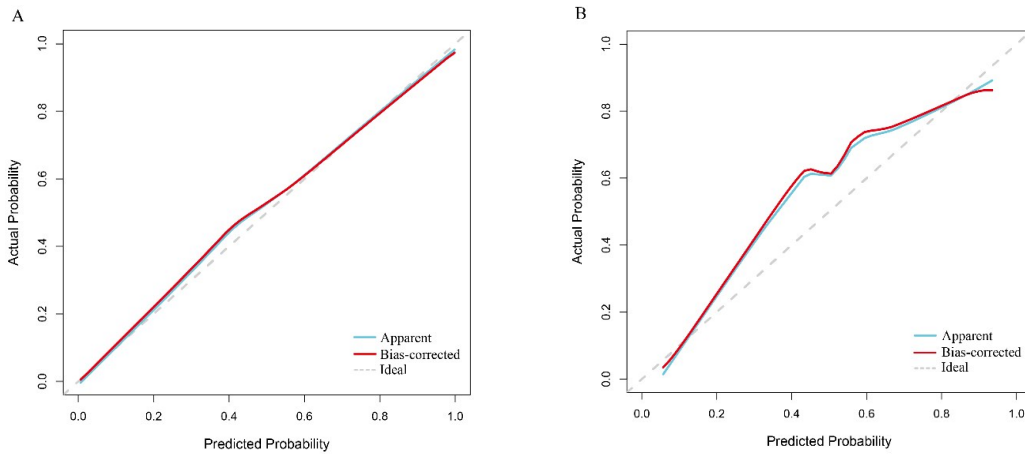


图8 预测MVI分级Nomogram模型的校准曲线

Fig.8 Calibration curve of the nomogram for predicting the MVI grade.

虚线(Ideal)表示理想标准曲线,蓝线(Apparent)表示原始曲线,红线(Bias-corrected)表示校准曲线,该曲线通过 Bootstrap 法 1000 次自助抽样进行校正,校准曲线接近理想标准曲线。A:训练队列(MAE=0.013, B=1000); B:验证队列(MAE=0.047, B=1000)(MAE: mean absolute error).

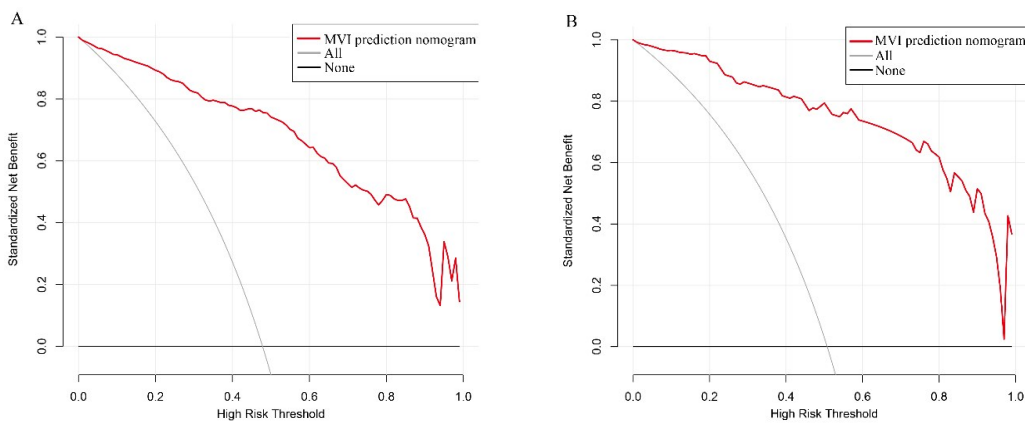


图9 术前预测MVI分级Nomogram模型的DCA曲线

Fig.9 DCA of the nomogram for predicting the MVI grade.

灰线(All)表示假设所有患者均为MVI阳性(予治疗方案),黑线(None)表示假设所有患者均为MVI阴性(无治疗方案),红线表示在不同阈值概率下预测MVI分级Nomogram的净收益。A:训练队列; B:验证队列.

征用于构建HCC病理分化程度和MVI分级的预测模型表现良好,但组学特征只能通过特定的硬件设备和相关专业软件获得;因此,它们并不适合临床外科医生使用,影像组学作为临床生物标志物的使用仍然需要改进和标准化^[29]。相对于影像组学特征,根据常规的实验室参数建立的模型,在普适性和推广方面具有优势。Pote等^[30]发现PIVKA-II表达增加,与肿瘤分化不良和MVI阳性显著相关,但该研究并未建立预测模型。Lei等^[18]建立了米兰标准下HBV-HCC患者的MVI预测模型。然而,HBV-HCC患者主要集中在中国,而我们的模型适用于所有不同病因的HCC的MVI预测。Li等^[16]开发了基于dNLR、PLR的Nomogram来预测I/II期HCC的MVI分级和病理分化程度,但模型仅包含少部分炎症指标,且分期受限于I/II期HCC,我们的模型不但包含炎症、肿瘤指标及影像学特征而且适用于所有分期的HCC病理分化程度和MVI分级的预测;Chen等^[19]建立了MVI、MVI-M2的预测模型,但并未关注到NLR和PIVKA-II对HCC病理分化程度的预测价值;Zhou等^[11]将AFP、PIVKA-II和MRI影像学资料建立了MVI诊断的术前预测模型(AUC=0.820),但并未纳入与肿瘤进展相关意义重大的炎症相关指标。在我们的模型中,HCC的炎症指标、肿瘤标志物水平以及影像学基本特征都是易获得、易推广、适用性高的,并且Nomogram准确性高,分辨力好,外科医生使用的净效益较高。

HCC的发生是炎症相关的癌变事件,超过90%的HCC在肝脏炎症损伤的背景下发生^[31]。中性粒细胞作为机体内主要的炎症细胞,可通过释放活性氧(ROS)等物质损伤DNA和形成中性粒细胞外陷阱(NETs)促进肿瘤进展,也可通过分泌MMP-9、TNF- α 、IL-6、IL-17等细胞因子和趋化因子激活NF- κ B、JAK-STAT3等信号通路,加速HCC的增殖浸润和血管生成;而淋巴细胞数量的减少,尤其是癌旁组织低淋巴细胞浸润的特性,形成了适合癌细胞增殖及转移的肿瘤微环境,进一步恶化了肿瘤预后^[32-34]。因此,NLR反映了机体促肿瘤炎症反应与抗肿瘤免疫反应之间平衡状态。Liebman等^[14,35]发现正常肝脏在维生素K作用下产生凝血酶原,但是在维生素K缺乏或HCC患者中因凝血酶原前体N端谷氨酸残基无法全部羧化,从而丧失凝血酶原活性产生异常凝血酶原(PIVKA-II),而其他肝病极少引起PIVKA-II升高,对HCC的诊断特异性优于AFP。PIVKA-II可以促进多种血管生成因子在HCC细胞中的表达,包括TGF- β 和bFGF,因而可能诱导癌细胞增殖与癌旁组织血管生成^[36];此外,PIVKA-II能与生长因子受体c-Met结合并激活JAK-1、VEGF和EGFR等一系列下游信号通路,诱导HCC恶性增殖^[37]。

一项国际多中心的研究表明,MVI的发生率与切

除的HCC肿瘤的大小成正相关,特别是大于5 cm的HCC导致MVI风险明显增加,这可能与瘤内微血管为肿瘤非限制性生长提供营养物质有关^[38]。Numata等^[39]的研究还认为肿瘤直径越大,HCC细胞分化越差,但我们的研究多因素logistic回归并未筛选出肿瘤直径作为独立危险因素,这可能与医生主观测量误差有关。一些研究表明,在HCC中,多发肿瘤和AFP水平升高与MVI的可能性增加有关,我们的研究也得出了一致的结果^[18,40]。我们的结果中AFP升高与HCC的低分化程度显示出密切的关系,但也有团队研究得出HCC分化程度与血清AFP含量无明显相关性,这可能归因于病例数量和研究对象的选择等原因。白蛋白多用于衡量患者营养状况,已有研究充分表明低蛋白血症与消化道肿瘤预后较差相关^[41],我们的研究结果也显示出白蛋白减低与较差预后相关的低分化程度有关联性,这可能与低分化肿瘤的快速进展对机体消耗程度更大有关。同时,基于我们构建的预测模型可发现NLR和PIVKA-II也是对HCC分化程度和MVI等级影响权重较重的指标。手术切除和肝移植术后PIVKA-II水平降低并维持低水平者HCC复发风险显著降低且存活率增高^[42]。因此,在今后的HCC全程管理方案中密切观察NLR与PIVKA-II水平将是我们的工作重点。

4 结论

我们的研究发现血清较高水平的NLR和PIVKA-II与HCC不良病理组织学特征之间密切相关,基于NLR和PIVKA-II和其他指标构建的Nomogram对HCC病理分化程度和MVI分级具有良好预测性能,对临床医生进行HCC围手术期个体化治疗具有一定的指导价值。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *Ca: A Cancer Journal for Clinicians*. 2023; 73:17-48.
- [2] Toh MR, Wong E, Wong SH, Ng A, Loo LH, Chow PK, et al. Global epidemiology and genetics of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2023; 164:766-782.
- [3] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2019; 380: 1450-1462.
- [4] Martins-Filho SN, Paiva C, Azevedo RS, Alves V. Histological grading of hepatocellular carcinoma- a systematic review of literature. *Front Med (Lausanne)*. 2017; 4:193.
- [5] Rodriguez-Peralvarez M, Luong TV, Andreana L, Meyer T, Dhillon AP, Burroughs AK. A systematic review of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma: diagnostic and prognostic variability. *Ann Surg Oncol*. 2013; 20:325-39.
- [6] Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, Salem R, Saborowski A. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2022; 400:1345-1362.
- [7] Yang P, Si A, Yang J, Cheng Z, Wang K, Li J, et al. A wide-margin liver resection improves long-term outcomes for patients with hbv-

- related hepatocellular carcinoma with microvascular invasion. *Surgery*. 2019; 165:721-730.
- [8] Wang H, Du PC, Wu MC, Cong WM. Postoperative adjuvant transarterial chemoembolization for multinodular hepatocellular carcinoma within the barcelona clinic liver cancer early stage and microvascular invasion. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2018; 7:418-428.
- [9] Chang JT, Wang F, Chapin W, Huang RS. Identification of micrnas as breast cancer prognosis markers through the cancer genome atlas. *Plos One*. 2016; 11:e0168284.
- [10] Chen J, Fang A, Chen M, Tuoheti Y, Zhou Z, Xu L, et al. A novel inflammation - based nomogram system to predict survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Med-U.S*. 2018; 7: 5027-5035.
- [11] Zhou Q, Zhou C, Yin Y, Chen W, Liu C, Atyah M, et al. Development and validation of a nomogram combining hematological and imaging features for preoperative prediction of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma patients. *Ann Transl Med*. 2021; 9:402.
- [12] Chen Y, Yang Y, Zhang XY, Fan QS, Li X, Xin YJ, et al. Nomogram based on neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio to predict recurrence in patients with hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2021; 44:1551-1560.
- [13] Nakagawa H, Maeda S. Inflammation- and stress-related signaling pathways in hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2012; 18: 4071-81.
- [14] Zhou J, Sun H, Wang Z, Cong W, Zeng M, Zhou W, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of primary liver cancer (2022 edition). *Liver Cancer*. 2023; 12:405-444.
- [15] Okusaka T, Okada S, Ueno H, Ikeda M, Shimada K, Yamamoto J, et al. Satellite lesions in patients with small hepatocellular carcinoma with reference to clinicopathologic features. *Cancer-Am Cancer Soc*. 2002; 95:1931-7.
- [16] Li P, Huang W, Wang F, Ke YF, Gao L, Shi KQ, et al. Nomograms based on inflammatory biomarkers for predicting tumor grade and micro-vascular invasion in stage i/ii hepatocellular carcinoma. *Biosci Rep*. 2018; 38.
- [17] Witjes CD, Willemsen FE, Verheij J, van der Veer SJ, Hansen BE, Verhoef C, et al. Histological differentiation grade and microvascular invasion of hepatocellular carcinoma predicted by dynamic contrast-enhanced mri. *J Magn Reson Imaging*. 2012; 36: 641-7.
- [18] Lei Z, Li J, Wu D, Xia Y, Wang Q, Si A, et al. Nomogram for preoperative estimation of microvascular invasion risk in hepatitis b virus-related hepatocellular carcinoma within the milan criteria. *Jama Surg*. 2016; 151:356-63.
- [19] Chen S, Wang C, Gu Y, Ruan R, Yu J, Wang S. Prediction of microvascular invasion and its m2 classification in hepatocellular carcinoma based on nomogram analyses. *Front Oncol*. 2021; 11: 774800.
- [20] Lee S, Kim SH, Lee JE, Sinn DH, Park CK. Preoperative gadoteric acid- enhanced mri for predicting microvascular invasion in patients with single hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2017; 67: 526-534.
- [21] Hu HT, Wang Z, Huang XW, Chen SL, Zheng X, Ruan SM, et al. Ultrasound-based radiomics score: a potential biomarker for the prediction of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma. *Eur Radiol*. 2019; 29:2890-2901.
- [22] Mao Y, Wang J, Zhu Y, Chen J, Mao L, Kong W, et al. Gd-eob-dtpa- enhanced mri radiomic features for predicting histological grade of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2022; 11:13-24.
- [23] Oh J, Lee JM, Park J, Joo I, Yoon JH, Lee DH, et al. Hepatocellular carcinoma: texture analysis of preoperative computed tomography images can provide markers of tumor grade and disease- free survival. *Korean J Radiol*. 2019; 20:569-579.
- [24] Wu M, Tan H, Gao F, Hai J, Ning P, Chen J, et al. Predicting the grade of hepatocellular carcinoma based on non-contrast-enhanced mri radiomics signature. *Eur Radiol*. 2019; 29:2802-2811.
- [25] Banerjee S, Wang DS, Kim HJ, Sirlin CB, Chan MG, Korn RL, et al. A computed tomography radiogenomic biomarker predicts microvascular invasion and clinical outcomes in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2015; 62:792-800.
- [26] Xu X, Zhang HL, Liu QP, Sun SW, Zhang J, Zhu FP, et al. Radiomic analysis of contrast-enhanced ct predicts microvascular invasion and outcome in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2019; 70:1133-1144.
- [27] Hyun SH, Eo JS, Song BI, Lee JW, Na SJ, Hong IK, et al. Preoperative prediction of microvascular invasion of hepatocellular carcinoma using ¹⁸F-FDG pet/ct: a multicenter retrospective cohort study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2018; 45:720-726.
- [28] Ahn SY, Lee JM, Joo I, Lee ES, Lee SJ, Cheon GJ, et al. Prediction of microvascular invasion of hepatocellular carcinoma using gadoteric acid-enhanced mr and (18)f-fdg pet/ct. *Abdom Imaging*. 2015; 40:843-51.
- [29] Limkin EJ, Sun R, Dercle L, Zacharaki EI, Robert C, Reuze S, et al. Promises and challenges for the implementation of computational medical imaging (radiomics) in oncology. *Ann Oncol*. 2017; 28:1191-1206.
30. Pote N, Cauchy F, Albuquerque M, Voitot H, Belghiti J, Castera L, et al. Performance of pivka-ii for early hepatocellular carcinoma diagnosis and prediction of microvascular invasion. *J Hepatol*. 2015; 62:848-54.
- [31] Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer- related inflammation. *Nature*. 2008; 454:436-44.
- [32] Margetts J, Ogle LF, Chan SL, Chan A, Chan K, Jamieson D, et al. Neutrophils: driving progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma? *Br J Cancer*. 2018; 118:248-257.
- [33] Zeng F, Chen B, Zeng J, Wang Z, Xiao L, Deng G. Preoperative neutrophil- lymphocyte ratio predicts the risk of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma: a meta- analysis. *Int J Biol Markers*. 2019; 34:213-220.
- [34] Kuang D, Zhao Q, Wu Y, Peng C, Wang J, Xu Z, et al. Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2011; 54:948-955.
- [35] Lok AS, Sterling RK, Everhart JE, Wright EC, Hoefs JC, Di Bisceglie AM, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein as biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2010; 138:493-502.

- [36] Fujikawa T, Shiraha H, Ueda N, Takaoka N, Nakanishi Y, Matsuo N, et al. Des- gamma- carboxyl prothrombin- promoted vascular endothelial cell proliferation and migration. *J Biol Chem.* 2007; 282:8741-8.
- [37] Wang SB, Cheng YN, Cui SX, Zhong JL, Ward SG, Sun LR, et al. Des- gamma- carboxy prothrombin stimulates human vascular endothelial cell growth and migration. *Clin Exp Metastasis.* 2009; 26:469-77.
- [38] Pawlik TM, Delman KA, Vauthey JN, Nagorney DM, Ng IO, Ikai I, et al. Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: implications for selection of surgical treatment for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2005; 11:1086-92.
- [39] Numata K, Tanaka K, Kiba T, Saito S, Ikeda M, Hara K, et al. Contrast- enhanced, wide- band harmonic gray scale imaging of hepatocellular carcinoma: correlation with helical computed tomographic findings. *J Ultrasound Med.* 2001; 20:89-98.
- [40] Zhang C, Zhao R, Chen F, Zhu Y, Chen L. Preoperative prediction of microvascular invasion in non- metastatic hepatocellular carcinoma based on nomogram analysis. *Transl Oncol.* 2021; 14: 100875.
- [41] Qu Z, Lu YJ, Feng JW, Chen YX, Shi LQ, Chen J, et al. Preoperative prognostic nutritional index and neutrophil- to- lymphocyte ratio predict survival outcomes of patients with hepatocellular carcinoma after curative resection. *Front Oncol.* 2021; 11:823054.
- [42] Feng H, Li B, Li Z, Wei Q, Ren L. Pivka-ii serves as a potential biomarker that complements afp for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Bmc Cancer.* 2021; 21:401.

早期肠内肠外营养支持对肝硬化肝切除术后影响的研究

黄力, 华贇鹏, 赖佳明, 梁力建
中山大学附属第一医院肝胆胰外科中心胆胰外科

摘要:目的 探讨早期肠内营养和肠外营养对肝硬化肝部分切除术后病人的影响。方法 2007年~2008年选择中山大学附属第一医院肝胆外科行肝部分切除手术且术后病理证实有肝硬化的病人35例,其中行早期肠内营养(EEN组)16例,肠外营养(PN组)19例。两组均于术后24 h开始给予营养支持,共7天。观察术前、术后1天及术后8天病人一般情况、肝脏功能、临床营养、临床并发症等指标的变化。结果 两组病人在平均住院时间、术后肝功能、临床营养指标变化的差异无统计学意义;EEN组术后8天前白蛋白和白蛋白已恢复到术前水平,与营养支持相关的并发症发生率高于PN组,但较PN组轻。EEN组术后胃肠蠕动功能恢复较快,平均营养费用也明显低于PN组。结论 肝硬化肝部分切除术后进行早期肠内营养是安全、有效、合理的营养支持方式。
关键词:肝硬化;肝切除术;肠内营养;肠外营养

肝硬化病人常常合并有不同程度的营养不良和肝功能障碍,目前临床营养支持的效果已经得到肯定^[1]。如何对肝硬化肝切除术后实施合理的营养支持和有效保护肝脏功能仍是目前肝脏外科医师需要解决的问题。本研究回顾性分析中山大学第一医院肝胆外科2007年~2008年肝硬化肝切除术后行早期肠内营养和肠外营养病人的临床资料,在肝功能、临床营养指标、并发症和营养费用等方面进行比较,希望获得术后早期临床营养支持的合理途径。

1 资料与方法

1.1 一般资料

连续35例合并有肝硬化病人行肝部分切除手术,术后分别行早期肠内营养(EEN)和肠外营养(PN)支持治疗,两组病人入组标准:无严重心肺疾病,无内分泌和代谢性疾病(如糖尿病、甲亢、胰腺炎等),无胃肠道疾病,术前胃肠道功能正常,无胆道外引流管,术前肝功能Child-Pugh分级均为A级,年龄14~65岁;35例病人术后均经病理检查证实有肝硬化:其中EEN组16例,男10例,女6例。平均年龄(46.75±11.2)岁,术后用肠内营养;PN组19例,男14例,女5例,平均年龄(44.52±9.61)岁,术后用肠外营养。两组病人肝部分切除手术方式(见表1)比较,差异无统计学意义。

表1 两组病人肝部分切除手术方式比较(例)

组别	例数	左外叶切除	左半肝切除	右肝I段切除	右肝II段切除	右半肝切除
EEN组	16	3	4	3	2	4
PN组	19	4	6	2	3	4

1.2 临床营养支持方法 两组病人均分别于术后24 h开始进行等热量、等氮量的临床营养支持

EEN组:肝部分切除手术结束关腹前置入鼻空肠营养管(10Fr,科泰公司),营养管远端置于空肠远端15 cm处。术后24 h内用肠内营养泵(Flocare, Nutricia公司)从病人的预置鼻空肠营养管中加温滴入生理盐水500 mL,无胃肠反应后于术后24 h开始持续滴注肠内营养液瑞素(华瑞制药),从20 mL/h开始逐步过渡到100 mL/h,术后第1天给半量,第2天开始给全量,16~20 h内输注完毕,不足的水、电解质经外周静脉补充,连续7d。肠内营养日均补氮量为0.2 g/(kg·d),非蛋白质

热量日均为105 kJ/(kg·d)。

PN组:术后24 h开始从病人的深静脉管道中持续滴注 目前认为对肝硬化病人合理的肠外营养溶液^[2],营养液在工作台上配置:非蛋白质热量为105 kJ/(kg·d)(调整范围±5%),其中中或长链脂肪乳(力保,德国贝朗公司)提供热量的40%,葡萄糖提供热量的60%,氨基酸(安平,德国贝朗公司)补氮量为0.2 g/(kg·d),热/氮比125:1,胰岛素及电解质依照生化结果调整用量。每天16~20 h内滴注完毕,术后第1天给半量,第2天开始给全量,连续7 d,肠外营养治疗期间禁食或只进少量清流饮食。

1.3 观察分析指标

(1)临床指标:包括体质量、体温、脉搏、呼吸;是否存在腹胀、恶心、呕吐,记录腹围、记录术后排气、排便时间、住院时间及营养支持费用等;(2)临床并发症:包括手术并发症、置管并发症、营养并发症;(3)实验室检查指标:血常规、肝代谢和肝酶学指标、血生化指标、营养代谢指标(前白蛋白、转铁蛋白);(4)临床营养人体测量指标:上臂围和三头肌皮褶厚度。

2 结果

2.1 两组病人的一般情况

两组病人均完成治疗,住院期间无死亡,均康复出院。两组病人病种及术式比较差异无统计学意义($P>0.05$),住院时间、术后白蛋白用量差异无统计学意义,但肛门恢复排气排便时间、平均每日营养费用的差异有统计学意义(表2)。

表2 两组病人一般情况的比较

组别	肝癌 [n(%)]	肝胆管结石 [n(%)]	肛门恢复 排气时间(h)	恢复 排便时间(h)	白蛋白用量(g)	平均营养 费用(元/d)	住院时间(d)
EEN组(n=16)	11(68.6)	5(31.4)	52.7±7.6	87.3±17.6	36.3±8.1	203.3±9.5	24.9±12.8
PN组(n=19)	11(57.9)	8(42.1)	73.8±11.2 ¹⁾	131.8±22.3	39.4±7.8	335.5±5.9	25.1±14.3

注:1)与EEN组比较 $P<0.05$;其余 $P>0.05$ 。

2.2 两组病人手术前后肝功能改变

(1)两组病人术前、术后1d、术后8d肝功能比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);(2)术后8d与术前比较,EEN组AST、ALP升高、ALB下降,差异均无统计学意义,而ALT、TBIL升高差异有统计学意义($P<0.05$)。

PN组AST、ALP升高,差异均无统计学意义;ALT、TBil升高、ALB下降差异有统计学意义($P<0.05$);(3)术后8d与术后1d比较,两组AST、ALT、TBil、ALP下降,ALB升高,差异均有统计学意义,详见表3。

表3 两组病人手术前后肝酶学和肝代谢指标的变化

组别	AST(U/L)	ALT(U/L)	TBil(mmol/L)	ALB(g/L)	ALP(U/L)
EEN组(n=16)					
术前	44.9±17.9	42.9±20.1	13.8±5.1	41.9±3.6	108.7±53.9
术后1d	516.4±375.9 ¹⁾	649.5±559.3 ¹⁾	26.8±9.1 ¹⁾	31.3±6.2 ¹⁾	187.3±70.8 ¹⁾
术后8d	60.2±15.9 ²⁾	186.8±94.3 ¹⁾²⁾	18.6±6.8 ¹⁾²⁾	37.8±3.6 ²⁾	126.4±63.3 ²⁾
PN组(n=19)					
术前	51.1±27.5	50.8±27.5	14.5±6.3	39.9±4.7	134.1±81.3
术后1d	578.9±506.2 ¹⁾	670.3±525.6 ¹⁾	32.7±13.9 ¹⁾	30.9±4.4 ¹⁾	219±115.8 ¹⁾
术后8d	63.2±23.1 ²⁾	144.2±75.2 ¹⁾²⁾	21.4±8.5 ¹⁾²⁾	34.3±4.7 ¹⁾²⁾	154.8±97.3 ²⁾

注:1)与同组术前同项目比较 $P<0.05$;2)与同组术后1d同项目比较 $P<0.05$;其余 $P>0.05$ 。

2.3 术前后体质量、上臂围(AC)和三头肌皮褶厚度(TSF)变化

两组术前、术后8d上臂围和三头肌皮褶厚度比较

差异均无统计学意义;术后8d与术前比较,两组差异均有统计学意义($P<0.05$)。详见表4。

表4 两组病人手术前后体质量、AC、TSF、血清前白蛋白和转铁蛋白变化

组别	体质量(kg)	AC(cm)	TSF(mm)	前白蛋白(mg/L)	转铁蛋白(g/L)
EEN组(n=16)					
术前	59.1±10.9	29.7±2.7	14.3±4.6	196.6±65.9	2.1±0.3
术后8d	57.4±10.8 ¹⁾	28.2±2.6 ¹⁾	10.9±3.6 ¹⁾	156.5±60.1	1.7±0.2 ¹⁾
PN组(n=19)					
术前	58.8±7.5	28.7±3.0	13.6±3.9	191.7±55.4	2.1±0.5
术后8d	7.3±7.4 ¹⁾	27.3±3.2 ¹⁾	9.7±3.5 ¹⁾	136.5±58.8 ¹⁾	1.7±0.6 ¹⁾

注:1)与同组术前同项目比较 $P<0.05$,其余均 $P>0.05$ 。

2.4 血清前白蛋白(PA)和转铁蛋白(TF)的变化

两组术前血清前白蛋白比较差异无统计学意义($t=0.285, P>0.05$), 术后8d两组比较差异无统计学意义($t=0.872, P>0.05$); EEN组术后8d与术前比较, 差异无统计学意义($P=0.26$), PN组差异则有统计学意义($P=0.01$)。两组术前血清转铁蛋白比较差异无统计学意义($t=0.246, P>0.05$), 术后8d两组比较差异无统计学意义($t=0.953, P>0.05$); 两组术后8d与术前比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。详见表4。

2.5 临床并发症

两组病人在手术并发症方面, EEN组分别出现右胸积液1例, 右膈下积液1例; PN组有右胸积液1例, 胆漏1例, 右膈下积液1例, 伤口感染1例, 两组并发症差异无统计学意义。在与营养相关的并发症方面, EEN组有4例出现腹胀, 2例出现腹泻, 给予止泻收敛剂或减慢肠内营养液输注速度后缓解; PN组1例因导管感染出现脓毒血症, 1例出现腹胀, 经减慢PN输液速度后缓解, 两组间差异有统计学意义。

3 讨论

早期的实验研究发现, 小肠的肠蠕动和肠鸣音在开腹手术结束后2 h就会恢复。腹部外科手术, 小肠的蠕动和吸收功能会受到一定的抑制, 但在手术后6至8 h就很快恢复正常, 其吸收功能足以满足机体的需要^[3], 这为开腹手术后早期使用肠内营养提供了理论依据。本组资料表明, 肝硬化肝部分切除术后早期进行肠内营养, 与目前认为合理肠外营养比较, 在住院时间、临床营养人体测量指标和实验室营养检测指标方面无明显差异, 说明早期进行肠内营养并不影响肝硬化肝部分切除病人术后的恢复。我们早期研究发现^[2], 肝硬化肝癌病人行肝部分切除术后给予富含BCAA的氨基酸溶液的肠外营养有利于硬化肝功能的恢复和改善与PN相关的胆汁淤积, 本组PN病人给予富含BCAA的氨基酸溶液, 结果表明EEN和PN两组病人术后第8天AST、ALT、TBil、ALB、ALP等指标差异无统计学意义, 提示EEN在促进肝功能恢复和改善胆汁淤积方面可达到与目前合理的肠外营养支持相似的效果。

文献^[4-5]动物和临床研究表明, 术后进行早期肠内营养, 可以促进胃肠蠕动, 从而促进消化液和胃肠激素的分泌, 促进肠屏障功能的恢复, 减少肠道细菌的易位。门静脉提供70%的肝脏血流, 肠内营养在增加肝门

静脉血流的同时, 也增加了肝细胞营养因子的水平, 改善肝肠循环^[6], 为肝细胞的修复和肝脏再生提供良好的营养环境。本临床研究发现, 两组肝硬化肝部分切除术后病人机体内的白蛋白、前白蛋白及转铁蛋白均明显下降, 出现低蛋白血症, 虽经肠内营养或肠外营养支持后有所改善, 但在术后8d, 只有肠内营养组病人的前白蛋白和白蛋白恢复到术前的水平, 提示早期肠内营养支持在改善硬化肝蛋白合成代谢方面, 优于肠外营养, 即使采用了目前临床认为合理的PN配方, 但肠外营养支持仍不能提高肝硬化病人肝部分切除术后蛋白质水平, 其具体机制仍有待进一步研究。

本临床结果显示, 在肝硬化肝部分切除术后并发症方面, 两组病人手术并发症发生率无明显差异, 无肝性脑病和住院死亡, 可能与本组无严重肝功能不全病例入选有关。虽然早期肠内营养组与营养有关的并发症多于肠外营养组, 但比较轻微, 主要为腹泻、腹胀, 考虑与滴速过快和营养液的耐受性有关, 经处理后均很快缓解, 并未出现营养液反流、呕吐和吸入性肺炎等严重的并发症而影响病人的恢复, 表明肝部分切除术后早期经鼻空肠营养管行肠内营养的安全性和耐受性较好, 与目前各种置管造口技术的不断成熟有密切关系。而在术后胃肠功能恢复方面, 肝部分切除术后早期行肠内营养组肛门恢复排气排便的时间均明显比肠外营养组快, 优于肠外营养。早期肠内营养在临床营养支持费用上也远低于肠外营养组, 符合经济学原则。因此, 肝硬化肝部分切除术后的营养支持应优先考虑肠内营养。

参考文献:

- [1] Merli M, Nicolini G, Angeloni S, et al. Malnutrition is a risk factor in cirrhotic patients undergoing surgery [J]. *Nutrition*, 2002, 18 (11-12): 978-986.
- [2] 罗时敏, 梁力建, 赖佳明. 氨基酸溶液对肝癌肝切除术后肠外营养的应用价值 [J]. *中国实用外科杂志*, 2004, 24(6): 357-359.
- [3] Bisgard T, Kehlet H. Early oral feeling after elective abdominal surgery—what are the issues? [J]. *Nutrition*, 2002, 18(11): 944-948.
- [4] Campos AC, Matias JE, Coelho JC. Nutritional aspects of liver transplantation [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2002, 5(3): 297-307.
- [5] Javid PJ, Collier S, Richardson D, et al. The role of enteral nutrition in the reversal of parenteral nutrition-associated liver dysfunction in infants [J]. *J Pediatr Surg*, 2005, 40(6): 1015-1018.
- [6] Kaufman SS. Prevention of parenteral nutrition-associated liver disease in children [J]. *Pediatr Transplant*, 2002, 6(1): 37-42.

基于钆塞酸二钠MRI定量评估HCC影像学水平的肿瘤内异质性的研究

吴雪云, 范应方
南方医科大学第三附属医院

恶性肿瘤是由具有不同分子表型特征的单个细胞组成的异质性集合, 这种现象被称为肿瘤内异质性 (ITH), 其可表现在单个肿瘤内存在不同的遗传因素、表观遗传、表型和功能特征, 其与肿瘤的生长、进展、侵袭和转移有关, 这意味着肿瘤的不同部分可能具有不同的遗传或分子特征, 进而导致不同的复发和/或转移风险, 以及患者层面对不同治疗的不同敏感性^[1]。肝细胞癌 (HCC) 是一种生物学异质性复杂的恶性肿瘤, 接受根治性肝切除的极早期/早期 HCC 患者, 术后 2 年复发率从 43.1% 到 76.2% 不等, 其肿瘤内异质性 (ITH) 导致处于同一分期的 HCC 患者具有不同的术后复发和/或转移风险。

然而, 现广泛应用的巴塞罗那-临床肝癌 (BCLC) 分期中只考虑到肿瘤的大小与数目因素, 并且, 已有研究证明^[2], 在现有的 HCC 分期系统中, 额外添加 ITH 的评估可以改善肝癌的预后预测, 这表明了解 HCC 的 ITH 对于患者的评估及有效的治疗方案制定是必要的。因此, 在 BCLC 分期的基础上, 探索术前准确评估 ITH 的非侵入性技术, 补充 ITH 评估, 可以提高对 HCC 预后评估的准确性。

CT 或 MRI 等成像技术是临床上常用的肿瘤诊断、分期和监测方法。它可以显示肿瘤的整体情况, 潜在地以非侵入性的方式提供对其生物学和异质性的观察与评估, 既往研究已在乳腺癌^[3]、肺腺癌^[4]中显示出有前景的应用价值。并且, 钆塞酸二钠 (Gd-EOB-DPTA) 是一种肝脏特异性造影剂, 在肝胆特异性期 (HBP) 上可提供更好的组织对比度, 提高了 HCC 的检出率和诊断的准确性^[5]。由于在 HBP 上肝细胞摄取 Gd-EOB-DPTA 的行为与 HCC 分子特征之间存在关系^[6], 故钆塞酸二钠 MRI 的 HBP 成像具有作为预测性生物标志物的潜能。近年来, HBP 图像上 HCC 的信号强度作为患者潜在的成像生物标志物的研究方向受到越来越多的关注^[6-9], 通过定量肿瘤对 Gd-EOB-DPTA 的摄取, 有研究表明的组织病理学分级与信号强度或 T1 弛豫时间^[10, 11]的变化密切相关。此外, 近年来, “影像组学”, 一种分析影像数据的“组学”方法, 已经成为提高 HCC 诊断和预后预测准确性的新工具^[12]。这一研究方法利用从医学影像图像中高通量提取纹理特征数据^[13]来开发非侵入性的手段

以预测病变表型和预后^[14]。影像组学将肿瘤作为一个整体进行评估, 因此有望准确地评估 ITH 的特征, 我们推测, 定量影像图像特征可以帮助评估 HCC 的 ITH。

据文献调研结果, 基于钆塞酸二钠 MRI 的定量的影像图像特征分析方法在评估 HCC 的 ITH 这一领域的应用还不是很多, 大部分影像组学在 HCC 中的研究集中在 HCC 诊断与鉴别诊断、肿瘤病理及 MVI 预测、预后预测、疗效评估等方向的研究^[15-20], 虽也有不少研究表明钆塞酸二钠 MRI 对 HCC 患者预后存在预测价值^[18, 19, 21], 但上述研究的方法直接探索基于肿瘤整体空间体积或扩展肿瘤周围范围的全体影像组学特征与患者预后之间的关系, 很少考虑到使用定量影像组学特征开展对 HCC 的 ITH 评估。此外, 到目前为止, 只有一项研究^[22]探索了 HCC 在钆塞酸二钠 MRI 上的图像上的亚区域图像特征分布情况, 以从 ITH 的角度评估接受根治性肝切除术后的 HCC 患者预后相关的研究。但此研究基于肿瘤的体素信号强度展开分析, 与使用影像组学特征不同, 可能结果会受到影像数据类型的干扰而缺乏可泛化性, 且此研究结论尚未进行外部验证。借助钆塞酸二钠 MRI 的独特优势, 通过定量的影像组学的方法探索 HCC 的 ITH 方向的研究很少。为了探索接受根治性肝切除术的患者间 HCC 的 ITH, 在本研究中, 我们旨在基于孤立性 HCC, 通过利用患者术前钆塞酸二钠 MRI 评估 HCC 影像学水平的 ITH, 继而探索其与病理分化程度、MVI 及术后预后状况的相关性。即本研究将从三个部分进行探索:

(1) ITH 的病理学和分子特征评估需依靠术前穿刺或术后组织学样本, 但在临床实践中, HCC 的临床诊断不常规推荐活检, 而依靠术后病理检查获取的 ITH 诊断具有滞后性, 导致现有 ITH 评估并不能真正对围手术期诊疗方案的制定提供前瞻性帮助。故迫切需要探索术前准确评估 ITH 的非侵入性技术, 以辅助 HCC 的术前精确分期及分级, 从而制定个体化围手术期诊疗决策, 提高 HCC 患者预后。本研究第一部分基于术前的钆塞酸二钠 MRI 的 HBP 图像量化 HCC 影像学水平的 ITH, 并探讨通过影像组学分析得到的 ITHscore 与术后病理结果及患者复发与生存状况之间的相关性, 明确了 ITHscore 与孤立性 HCC 的预后具有密切相关性;

(2)在现有的HCC的BCLC/CNCL分期系统中,增加对ITH的评估有望改善HCC患者术后的预后预测。在第二部分研究中,在内部(224例)及外部(109例)队列的共333例HCC患者中,联合ITHscore和术前临床指标,使用Cox比例风险模型分别构建基于RFS及OS的预后预测模型,应用列线图进行模型可视化,并在内部和外部队列中分别验证了其模型效能及校准度。证实了ITHscore是个良好的影像组学生物标志物,且基于ITHscore的影像组学模型对BCLC 0期及A期的HCC患者具有良好的预后预测能力。

(3)拟进一步扩展预测模型的临床应用价值,在第三部分研究中,基于第二部分预测模型的可视化列线图,扩展构建术前患者危险分层模型,将患者分为基于复发或死亡事件的低、中、高危风险组。危险分层模型在内部及外部验证中,均通过Kaplan-Meier生存曲线分析证实了各风险组对不同RFS($P<0.0001$, $P=0.0002$)及OS($P<0.0001$, $P=0.022$)的区分度。上述结果证实了基于ITHscore的影像组学预测模型,可对BCLC和CNLC分期及预后评估具有良好的补充,且CNLC联合ITHscore的HCC患者术前分层分析,可额外补充HCC影像学水平的ITH相关信息,辅助提高早期识别术后不同预后风险等级的BCLC 0期及A期HCC患者的能力。

展望:ITH的病理学和分子特征评估需依靠术前穿刺或术后组织学样本,但在临床实践中,HCC的临床诊断不常规推荐活检,故依靠术后病理检查获取的ITH诊断可能是破译影像学、病理学特征和分子驱动因素之间重要关联的手段。针对性地筛选可接受根治性肝切除的HCC患者,并广泛收集其术前临床与影像资料,及术后病理资料,并进一步收集此部分患者术后临床结局相关的生存数据,将有助于各模态数据间关联性的深入研究。

在明确哪些复合影像组学特征可能映射到特定的病理学或分子特征因素的过程中,可使用基于像素/体素的信号强度分析,或基于整体定量影像组学特征展开关联分析,且大多数分析是以有监督算法进行分类任务的训练,少数使用无监督算法进行的关联探索,可能在探索的过程中提供新思路,并使得单纯基于定量影像特征及计算机算法的影像组学研究,在前期走向生物或临床可解释性角度;此外,相较于复杂的复合影像组学特征,经过标准化及转化后产生的影像组学生物标志物,可能使得模型的普适性得到进一步地扩展。

影像组学生物标志物与患者术后临床结局相关的生存数据相关联后,可使其进一步走向真正具有可解释性的患者临床结局。并且,在预测准确性角度,区别于局限于某一个横断面截点的二分类结果验证,针对某一

个患者的全临床路径的关注,可实现纵向的短期/长期结局时间点的多重关系验证,一定程度上提高了预测模型的准确性。

现有的针对HCC的BCLC/CNLC分期系统,是基于患者预后的评估进行首诊时的危险分层,并进行治疗方案推荐的,其中肿瘤相关的评估指标仅包含数目和大小,而未考虑患者间肿瘤ITH的信息,进而可发现接受根治性肝切除的HCC患者术后2年复发率从43.1%到76.2%不等,显示出患者间预后情况的巨大差异。因此,在此基础上,开发出基于术前影像的ITH评估,可能对围手术期诊疗方案的制定提供前瞻性帮助,并改善HCC患者的预后。

上述的预期目标一旦建立,标准化的报告和在治疗推荐算法中纳入影像组学生物标志物,有望改善患者的治疗选择和临床结局。我们未来的工作,一方面应对影像学 and 病理学特征之间的关系探索中遵循更严格空间相关性,在方法上使得ITH的评估从单一平面走向整体空间分布。另一方面,应该着眼于在更大数据集的多中心队列中进一步优化和验证本研究的结果,并有机会在前瞻性队列中验证其临床效用(包括评估可重复性及准确性)。

参考文献:

- [1] Sarobe P, Corrales F. Getting insights into hepatocellular carcinoma tumour heterogeneity by multiomics dissection [J/OL]. *Gut*, 2019, 68(11): 1913-1914. DOI:10.1136/gutjnl-2019-319410.
- [2] Morris J S, Hassan M M, Zohner Y E, et al. HepatoScore-14: Measures of Biological Heterogeneity Significantly Improve Prediction of Hepatocellular Carcinoma Risk [J/OL]. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 2021, 73(6): 2278-2292. DOI:10.1002/hep.31555.
- [3] Choi Y, Kim S H, Youn I K, et al. Rim sign and histogram analysis of apparent diffusion coefficient values on diffusion-weighted MRI in triple-negative breast cancer: Comparison with ER- positive subtype [J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177903. DOI:10.1371/journal.pone.0177903.
- [4] Yuan M, Pu X H, Xu X Q, et al. Lung adenocarcinoma: Assessment of epidermal growth factor receptor mutation status based on extended models of diffusion-weighted image [J/OL]. *Journal of magnetic resonance imaging*, 2017, 46(1): 281-289. DOI:10.1002/jmri.25572.
- [5] Van Beers B E, Pastor C M, Hussain H K. Primovist, Eovist: What to expect? [J/OL]. *Journal of Hepatology*, 2012, 57(2): 421-429. DOI:10.1016/j.jhep.2012.01.031.
- [6] Kitao A, Matsui O, Yoneda N, et al. The uptake transporter OATP8 expression decreases during multistep hepatocarcinogenesis: correlation with gadoxetic acid enhanced MR imaging [J/OL]. *European Radiology*, 2011, 21(10): 2056-2066. DOI:10.1007/s00330-011-2165-8.
- [7] Choi J W, Lee J M, Kim S J, et al. Hepatocellular carcinoma: imaging patterns on gadoxetic acid-enhanced MR Images and their

- value as an imaging biomarker [J/OL]. *Radiology*, 2013, 267(3): 776-786. DOI:10.1148/radiol.13120775.
- [8] Choi J Y, Lee J M, Sirlin C B. CT and MR imaging diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma: part II. Extracellular agents, hepatobiliary agents, and ancillary imaging features [J/OL]. *Radiology*, 2014, 273(1): 30-50. DOI:10.1148/radiol.14132362.
- [9] Kitao A, Matsui O, Yoneda N, et al. Hypervascular hepatocellular carcinoma: correlation between biologic features and signal intensity on gadoxetic acid-enhanced MR images [J/OL]. *Radiology*, 2012, 265(3): 780-789. DOI:10.1148/radiol.12120226.
- [10] Haimerl M, Utpatel K, Götz A, et al. Quantification of contrast agent uptake in the hepatobiliary phase helps to differentiate hepatocellular carcinoma grade [J/OL]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 22991. DOI:10.1038/s41598-021-02499-2.
- [11] Peng Z, Jiang M, Cai H, et al. Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging combined with T1 mapping predicts the degree of differentiation in hepatocellular carcinoma [J/OL]. *BMC cancer*, 2016, 16: 625. DOI:10.1186/s12885-016-2607-4.
- [12] Lambin P, Leijenaar R, Deist T, et al. Radiomics: the bridge between medical imaging and personalized medicine [J/OL]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2017, 14: 749-762. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.141.
- [13] Lambin P, Rios-Velazquez E, Leijenaar R, et al. Radiomics: extracting more information from medical images using advanced feature analysis [J/OL]. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 2012, 48(4): 441-446. DOI:10.1016/j.ejca.2011.11.036.
- [14] Aerts H J W L, Velazquez E R, Leijenaar R T H, et al. Decoding tumour phenotype by noninvasive imaging using a quantitative radiomics approach [J/OL]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4006. DOI:10.1038/ncomms5006.
- [15] Dankerl P, Cavallaro A, Tsybmal A, et al. A retrieval-based computer-aided diagnosis system for the characterization of liver lesions in CT scans [J/OL]. *Academic Radiology*, 2013, 20(12): 1526-1534. DOI:10.1016/j.acra.2013.09.001.
- [16] Mokrane F Z, Lu L, Vavasour A, et al. Radiomics machine-learning signature for diagnosis of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with indeterminate liver nodules [J/OL]. *European Radiology*, 2020, 30(1): 558-570. DOI:10.1007/s00330-019-06347-w.
- [17] Chong H, Gong Y, Zhang Y, et al. Radiomics on Gadoxetate Disodium-enhanced MRI: Non-invasively Identifying Glypican 3-Positive Hepatocellular Carcinoma and Postoperative Recurrence. [J/OL]. *Academic radiology*, 2023, 30(1): 49-63. DOI:10.1016/j.acra.2022.04.006.
- [18] Chong H H, Yang L, Sheng R F, et al. Multi-scale and multi-parametric radiomics of gadoxetate disodium-enhanced MRI predicts microvascular invasion and outcome in patients with solitary hepatocellular carcinoma ≤ 5 cm [J/OL]. *European radiology*, 2021, 31(7): 4824-4838. DOI:10.1007/s00330-020-07601-2.
- [19] Gao W, Wang W, Song D, et al. A predictive model integrating deep and radiomics features based on gadobenate dimeglumine-enhanced MRI for postoperative early recurrence of hepatocellular carcinoma [J/OL]. *Radiol Med*, 2022, 127(3): 259-271. DOI: 10.1007/s11547-021-01445-6.
- [20] Xu B, Dong S Y, Bai X L, et al. Tumor Radiomic Features on Pretreatment MRI to Predict Response to Lenvatinib plus an Anti-PD-1 Antibody in Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Multicenter Study [J/OL]. *Liver cancer*, 2023, 12(3): 262-276. DOI:10.1159/000528034.
- [21] Kim S, Shin J, Kim D Y, et al. Radiomics on Gadoxetic Acid-Enhanced Magnetic Resonance Imaging for Prediction of Postoperative Early and Late Recurrence of Single Hepatocellular Carcinoma [J/OL]. *Clinical cancer research*, 2019, 25(13): 3847-3855. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-18-2861.
- [22] Zhang Y, Yang C, Sheng R, et al. Predicting the recurrence of hepatocellular carcinoma (≤ 5 cm) after resection surgery with promising risk factors: habitat fraction of tumor and its peritumoral micro-environment [J/OL]. *Radiol Med*, 2023, 128(10): 1181-1191. DOI:10.1007/s11547-023-01695-6.

评估循环微量营养素对肝硬化的因果影响:来自大规模孟德尔随机化分析的证据

林俊龙, 陈嘉林, 李智超, 钱柏锋*, 华贇鹏*
中山大学第一附属医院肝外科, 广东 广州 510080

摘要:目的 观察性研究已经发现体内循环的微量营养素水平与慢性肝病之间的关联。然而,缺乏随机对照实验阻碍了建立微量营养素与肝硬化之间因果关系的能力。因此,本次孟德尔随机化分析的目的是探讨微量营养素对肝硬化的因果影响。**方法** 我们从针对欧洲血统个体的大规模基因组研究中选择了与12种微量营养素相关的遗传工具变量,涵盖了超过9,851,867个单核苷酸多态性(SNPs)和460,351名参与者的数据。我们利用了FinnGen数据库中的肝硬化患者数据,采用两样本孟德尔随机化方法,旨在建立基因的因果估计。我们的主要分析使用了随机效应和逆方差加权(IVW)方法,并进行了额外的敏感性分析以进行验证。孟德尔随机化(MR)-Egger截距分析和Cochran的Q检验被用于评估水平多效性和异质性。此外,还进行了多变量孟德尔随机化(MVMR)分析,以解决潜在的混杂变量。**结果** IVW和加权中位数方法显示,大多数微量营养素与肝硬化的遗传易感性之间没有显著关联。然而,MR分析的结果显示,循环维生素D水平与降低肝硬化风险之间存在显著关联【比值比(OR)IVW = 0.53, $P < 0.01$ 】。MR-Egger截距分析显示无水平多效性的证据($P = 0.178$),而Cochran的Q检验未发现异质性($P = 0.799$)。此外,在MVMR分析中,维生素D被确定为一种独立降低肝硬化风险的因素。**结论** 本研究是该领域最全面的孟德尔随机化研究之一。研究提供了支持循环维生素D水平与肝硬化发生率之间保护性关联的证据,建议维持充足的维生素D水平可能作为一种成本效益高的早期干预策略用于肝硬化的防治。

关键词:微量营养素;肝硬化;孟德尔随机化;维生素D

1 介绍

肝硬化是一种由一种或多种因素引起的慢性或反复性肝损伤,导致肝星状细胞(HSCs)持续受到刺激,并引起细胞外基质(ECM)的异常积累。常见原因包括乙型肝炎、酒精性肝病和非酒精性脂肪肝病^[1,2]。全球约有1.23亿人患有肝硬化,肝硬化位居全球第11大死亡原因,每年导致约148万人死亡。2肝硬化会导致不可逆的肝脏损伤和功能恶化,约10%的患者会发展为失代偿性肝硬化,表现为腹水、胃肠道出血、肝性脑病、肝肾综合征,甚至可能发展为肝细胞癌(全球癌症相关死亡的第三大原因)。由于中国乙型肝炎的高发病率,中国的肝硬化发病率和死亡率在全球居于首位,估计约有700万受影响个体,并且在肝细胞癌病例中占据主导地位(占全球总数的近50%)^[3,4]。然而,尽管肝硬化对全球健康造成了重大影响,除了解决潜在病因外,目前尚缺乏有效的预防和治疗策略。因此,探讨肝硬化进展的新机制并探索创新的预防和治疗手段至关重要。

重要的维生素和必需矿物质是人体代谢过程中所需的小量营养素,它们参与调控细胞信号传导、运动、分化、凋亡和增殖,进而调节组织的生长、功能和稳态^[5,6]。

^{5,6}大多数微量矿物质和维生素被称为“微量营养素”,而钙、磷和镁等必需营养素被分类为“宏量”矿物质,因为它们需要的量较大。一些营养素如胆碱、精氨酸和牛磺酸,虽然是条件必需的,但在维持整体健康方面也发挥重要作用,尽管它们不被归类为微量营养素^[5]。身体需要多种维生素和矿物质来正常运作,包括维生素C、A、D、E、B6、B12和叶酸,以及铁、锌、铜和硒等矿物质。这些营养素对多种身体功能至关重要,包括支持免疫系统、抗氧化保护以及整体健康维护^[5]。

营养缺乏对患有胃肠疾病的患者构成重大威胁,导致住院时间延长^[7,8],手术并发症^[9],以及比营养状况良好者更高的死亡率^[7]。必需营养素摄入不足问题已越来越被认为是一项重大公共卫生问题。疾病相关的营养不良,包括蛋白质、热量和微量营养素摄入不足,可能在慢性和急性病例中导致各种临床症状,并与不良治疗结果相关^[9]。研究表明,补充维生素和微量元素可以减少婴儿和儿童的发病率和死亡率^[10,11]。在肝病的晚期阶段,存在脂肪吸收问题、脂溶性维生素缺乏、水溶性维生素水平降低以及微量营养素代谢的改变,导致营养不良和肌肉减少症^[12]。因此,营养状况和饮食摄入对于肝病患者的治疗和预后至关重要^[13,14]。然而,营养与肝病之间的确切关系仍不清楚^[6,15,16]。

孟德尔随机化(MR)是一种先进的统计技术,它利用与特定暴露相关的遗传标记作为工具变量来确定暴露与结果之间的因果关系^[17]。MR依赖于在配子形成

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金(编号:2023A1515012531)、广东省基础与应用基础研究基金(编号:2022A1515010537)以及广州市科技项目(编号:2024B03J1256)的资助

通信作者:钱柏锋, E-mail: yubinol@163.com; 华贇鹏, E-mail: hyp0427@163.com

和受精期间遗传变异的随机分配,使其独立于潜在的混杂因素。因此,MR分析的结果较少受到逆向因果关系和混杂因素的偏倚影响^[18]。本研究中,我们利用来自欧洲血统个体的广泛遗传数据,应用MR框架来探讨循环中的微量营养素水平与肝硬化风险之间的潜在因果联系。

多变量孟德尔随机化(MVMR)使用SNP(单核苷酸多态性)等遗传变异作为工具变量来估计各种暴露对结果的直接因果效应,从而减少混杂因素的偏倚^[19]。该方法类似于随机对照试验,因为它能够最小化未观察到的混杂、测量误差和逆向因果关系的偏倚^[20]。研究暴露与结果之间的因果关系非常有益。随着全基因组关联研究(GWAS)汇总数据的广泛可用,MR已成为评估潜在因果关系的一种具有成本效益且受欢迎的方法。利用具有已知生物功能的基因中的遗传变异有助于揭示因果机制^[21]。

微量营养素在肝病进展中起着至关重要的作用,因为不同的饮食元素可能影响该疾病的发展^[22-24]。虽然肝硬化与铜、锌、铁和维生素等微量元素密切相关,但目前缺乏关于它们之间因果关系或其他关联的研究。本研究的主要目标是通过利用MR技术,包括两样本MR和MVMR方法,探索肝硬化与微量营养素之间的因果关系。该研究旨在确定是否通过改善营养状况能够潜在地减少肝硬化的发生和进展。

2 方法

2.1 研究设计

理论上,孟德尔随机化(MR)依赖于三个关键假设:排他性、独立性和关联性。排他性假设认为,单核苷酸多态性(SNPs)仅通过暴露变量影响结果变量,不会通过其他途径产生影响。独立性假设要求SNPs与任何混杂因素不相关,确保它们与外部变量无关联,从而避免扭曲结果。关联性假设要求SNPs与暴露变量之间有强关联,通常通过F统计量大于10来支持,这表明SNPs与暴露变量有可靠的遗传关联。

我们的研究遵循了观察性研究报告强化指南-孟德尔随机化(STROBE-MR),以确保方法的严谨性^[26]。图1展示了本研究中使用的MR的设计和流程。此外,研究按照**随机对照试验报告的统一标准(CONSORT)**指南进行报告,以确保透明度和准确性^[27]。

2.2 数据

关于微量营养素和混杂变量的总结数据集来自于**Open GWAS**数据库(<https://gwas.mrcieu.ac.uk/>),而关于欧洲血统人群肝硬化的信息则从**FinnGen**数据库获取(<https://www.finnngen.fi/>)。在FinnGen数据库中,肝硬化被定义为“肝硬化是指瘢痕组织取代健

康的肝组织”。

2.3 工具变量(IVs)的选择

我们选取了所有达到全基因组显著性水平的遗传变异作为工具变量(IVs),并采用P值阈值 5×10^{-5} 。对于连锁不平衡度较高的SNP($r^2 > 0.001$ 或集群窗口小于10,000kb),我们用于识别具有强相关性的SNP。F值的计算公式为: $F = [R^2 / (1 - R^2)] * [(N - K - 1) / K]$ 。²⁸其中, R^2 代表所选IV对暴露变量解释的总方差, N 表示GWAS的样本量, K 代表配对样本数。当F值超过10时,表明自变量与暴露变量之间的关联足够强,从而减少弱工具变量偏差对MR分析结果的影响^[29]。

2.4 多变量孟德尔随即分析

我们进行了多变量孟德尔随机化(MVMR)分析,纳入了在非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、酒精摄入、慢性乙型肝炎(CHB)、原发性硬化性胆管炎(PSC)、原发性胆汁性胆管炎(PBC)和维生素A代谢研究中达到全基因组显著性的SNP。通过“TwoSampleMR”包中的`mv_multiple`函数,评估了遗传预测的风险因素的影响。

2.5 伦理

我们的研究广泛依赖于之前已发表研究的数据显示和记录,这些研究已获得适当伦理委员会的批准。因此,这项研究无需进一步的伦理审批。

2.6 统计分析

在这项研究中,我们使用了R版本4.3.2中的“TwoSampleMR”(0.6.0)包进行MR分析。为评估水平多效性和异质性,采用了MR-Egger、MR-PRESSO和Cochran的方法。通过MR-Egger截距评估水平多效性,其中 $P \geq 0.05$ 表示没有显著的多效性,支持排他性假设。异质性通过Cochran的Q统计量进行评估, $P \geq 0.05$ 表示没有显著的异质性。我们进行了逐一排除敏感性分析,以评估MR结果的稳定性,结果表明,当所有组合效应量一致时,结果保持稳健。本研究的主要评估方法是逆方差加权(IVW)方法,这使得在考虑多效性的情况下进行无偏因果分析成为可能^[30]。次要评估方法包括加权中位数法和MR-Egger法。加权中位数法对错误和异常值的敏感性较低,而MR-Egger法则在存在多效性的情况下有效进行因果分析(见表1)。

3 结果

3.1 GWAS和FinnGen数据

铜(Copper)数据集(ieu-a-1073)包含2,603名欧洲个体和2,543,646个相关的SNP。胡萝卜素(Carotene)(ukb-b-16202)、叶酸(Folate)(ukb-b-11349)、铁(Iron)(ukb-b-20447)、钾(Potassium)(ukb-b-17881)、维生素

Tab.1 Summary of applied MR methods for the study of appraising the causal effects of circulating micronutrients on liver cirrhosis

Method	Assumptions	Strengths	Weaknesses	PubMed ID
IVW	All genetic instruments are considered valid.	Optimal statistical power	Estimates are biased if there is directional pleiotropy	24114802 37217291
MR-Egger	The associations of genetic instruments with the exposure are assumed to be uncorrelated with pleiotropic effects of the instruments on the outcome.	Quantifies directional pleiotropy and produces a consistent estimate even with pleiotropic genetic variants.	Low precision and can be heavily influenced by outliers	29040600 28527048
Simple mode	Describes the control of a single gene on a single trait.	Provides the foundation for genetic theory, and can be used for sensitivity analysis.	An overly simplified model may fail to explain all genetic phenomena,	35615025 36741410
Weighted median	More than half of the weighting is derived from valid genetic instruments.	The estimate is supported by the majority of evidence.	Less efficient	37217291 35615025
Weighted mode	The IVW mode-based estimate is obtained by weighting the empirical distribution of ratio estimates with the inverse variance of each estimate.	Less bias and lower Type I error rates compared to other estimators, and can be used for sensitivity analysis.	Lower statistical power in detecting a causal effect	35615025 29040600

Abbreviation: IVW, inverse variance weighted; MR, Mendelian randomization.

B6(Vitamin B6)(ukb-b-19524)、维生素 B12(Vitamin B12)(ukb-b-7864)、维生素 C(Vitamin C)(ukb-b-19390)、维生素 D(Vitamin D)(ukb-b-18593)和维生素 E(Vitamin E)(ukb-b-6888)数据集包含 64,979 名欧洲个体和 9,851,867 个相关的 SNP。硒(Selenium)数据集(ieu-a-1077)包含 2,603 名欧洲个体和 2,543,617 个相关的 SNP。另一硒数据集(ieu-a-1079)同样包含 2,603 名欧洲个体和 2,543,610 个相关的 SNP。经过独立性测试和排他性测试后,铜有 37 个 SNP,硒有 35 个 SNP,锌有 43 个 SNP,铁有 107 个 SNP,叶酸有 109 个 SNP,胡萝卜素有 97 个 SNP,钾有 112 个 SNP,维生素 B6 有 95 个 SNP,维生素 B12 有 109 个 SNP,维生素 C 有 97 个 SNP,维生素 D 有 87 个 SNP,维生素 E 有 97 个 SNP 被纳入研究。肝硬化(cirrhosis of liver)数据集(finn-gen_R10_CHIRHEP_NAS)提供了 409,067 名欧洲个体的 GWAS 数据。

3.2 MR 分析结果

我们利用孟德尔随机化(MR)评估了所包含的每种微量营养素暴露与结果之间的因果关联关系。为了提高清晰度,为每种包含的微量营养素制作了森林图、散点图、漏斗图和逐一剔除图,这些图可在补充图 1~4 中找到。

3.3 微量营养素对肝硬化的影响

IVW 和加权中位数分析显示,铜 [IVW 赔率比 (OR): 1.04, 95% 置信区间 (CI): 0.97~1.12, $P=0.268$]、硒 (IVW OR: 1.04, 95% CI: 0.94~1.16, $P=0.441$)、锌 (IVW OR: 1.10, 95% CI: 1.00~1.20, $P=0.062$)、铁

(IVW OR: 0.96, 95% CI: 0.68~1.36, $P=0.808$)、叶酸 (IVW OR: 1.21, 95% CI: 0.84~1.73, $P=0.310$)、胡萝卜素 (IVW OR: 1.04, 95% CI: 0.75~1.43, $P=0.832$)、钾 (IVW OR: 0.79, 95% CI: 0.57~1.08, $P=0.138$)、维生素 B6 (IVW OR: 1.15, 95% CI: 0.83~1.61, $P=0.404$)、维生素 B12 (IVW OR: 1.09, 95% CI: 0.80~1.50, $P=0.585$)、维生素 C (IVW OR: 0.83, 95% CI: 0.59~1.16, $P=0.280$) 和维生素 E (IVW OR: 0.95, 95% CI: 0.67~1.33, $P=0.748$) 与肝硬化的遗传易感性没有显著关联(图 2、图 3、表 2、补充表 S1)。然而,IVW (OR: 0.53, 95% CI: 0.37~0.76; $P<0.001$) 和加权中位数 (OR: 0.53, 95% CI: 0.31~0.90, $P=0.018$) 显示维生素 D 与降低肝硬化的遗传易感性显著相关,而 MR-Egger (OR: 0.98, 95% CI: 0.38~2.56, $P=0.973$) 并未观察到这种效应。维生素 D 的逐一剔除图、森林图、漏斗图和散点图如图 4 所示。根据 MR 结果,我们可以观察到维生素 D 与肝硬化发生之间存在强因果关系(图 4A)。我们还证明,即使在逐一剔除每个 SNP 后,MR 估计依然高度可靠(图 4B)。漏斗图的对称形状表明,研究效应与其精确度之间没有系统性关系(图 4C),进一步支持了因果解释。此外,该关系显然是负向的(图 4D)。

3.4 异质性和多效性分析

异质性检验显示, Cochran Q 统计量的 P 值超过 0.05 阈值 ($P=0.799$),表明维生素 D 对 SNPs 的影响估计没有异质性。MR-Egger 回归截距显示没有显著的多效性证据 ($P=0.178$) (表 2、3),并通过逐一剔除敏感性分析验证了结果的稳健性(补充图 4、图 4B)。

Tab.2 Association of genetic predisposition to circulating micronutrients level with the risk of liver cirrhosis

Items	IVW (random effects)		Weighted median		MR-Egger		Simple mode		Weighted mode	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Copper	1.04 (0.97-1.12)	0.268	1.08 (0.95-1.22)	0.259	1.03 (0.92-1.16)	0.584	1.14 (0.89-1.45)	0.313	1.10 (0.98-1.23)	0.119
Selenium	1.04 (0.94-1.16)	0.441	1.04 (0.91-1.18)	0.602	1.11 (0.88-1.39)	0.388	1.18 (0.93-1.50)	0.189	1.07 (0.90-1.26)	0.475
Zinc	1.10 (1.00-1.21)	0.062	1.05 (0.91-1.21)	0.515	1.17 (0.95-1.44)	0.145	0.97 (0.72-1.31)	0.862	0.99 (0.76-1.29)	0.919
Iron	0.96 (0.68-1.36)	0.808	0.93 (0.55-1.56)	0.765	0.77 (0.33-1.77)	0.532	1.11 (0.32-3.82)	0.872	1.11 (0.37-3.33)	0.856
Folate	1.21 (0.84-1.73)	0.310	1.35 (0.81-2.25)	0.255	0.77 (0.35-1.67)	0.502	1.45 (0.44-4.76)	0.546	1.61 (0.56-4.62)	0.375
Carotene	1.04 (0.75-1.43)	0.832	0.78 (0.47-1.28)	0.318	0.89 (0.42-1.88)	0.755	0.67 (0.19-2.50)	0.551	0.61 (0.17-2.13)	0.439
Potassium	0.79 (0.57,1.08)	0.138	0.89 (0.57-1.40)	0.608	0.63 (0.29-1.38)	0.256	1.32 (0.46-3.81)	0.613	1.16 (0.44-3.32)	0.786
Vitamin B6	1.15 (0.83-1.61)	0.404	0.90 (0.52-1.55)	0.696	0.80 (0.41-1.56)	0.512	1.23 (0.39-3.86)	0.728	0.91 (0.40-2.08)	0.820
Vitamin B12	1.09 (0.80-1.50)	0.585	1.03 (0.65-1.62)	0.901	0.82 (0.39-1.74)	0.605	1.12 (0.34-3.71)	0.859	1.20 (0.41-3.50)	0.734
Vitamin C	0.83 (0.59-1.16)	0.279	0.90 (0.55-1.46)	0.670	0.68 (0.31-1.48)	0.333	1.23 (0.36-4.17)	0.744	1.19 (0.40-3.57)	0.752
Vitamin D	0.53 (0.37-0.76)	<0.001**	0.53 (0.31-0.90)	0.018*	0.98 (0.38-2.56)	0.973	0.61 (0.18-2.03)	0.419	0.56 (0.17-1.82)	0.335
Vitamin E	0.95 (0.67-1.33)	0.748	0.93 (0.55-1.58)	0.794	1.04 (0.50-2.15)	0.923	0.54 (0.15-2.02)	0.364	0.75 (0.32-1.77)	0.510

The odds ratio (OR) was estimated using inverse variance weighting (IVW). When $P < 0.05$, it is bolded and marked with *, and when $P < 0.01$, it is bolded and marked with **. Abbreviation: CI, confidence interval; MR, Mendelian randomization.

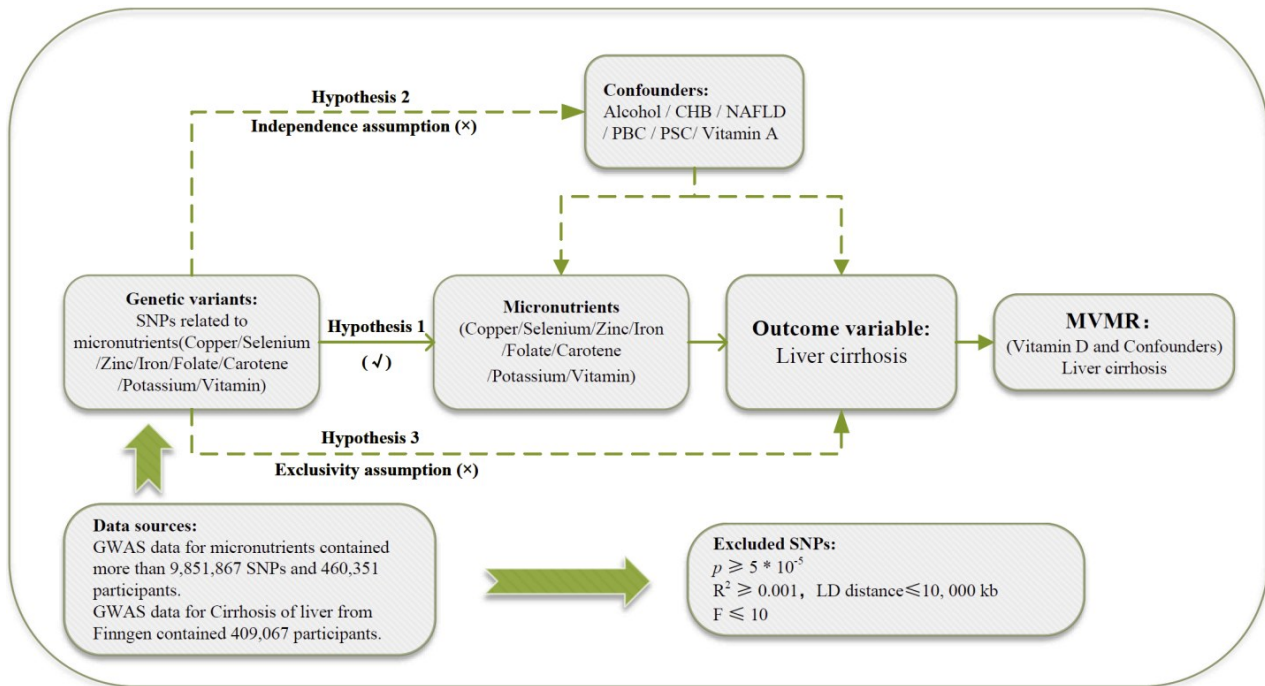


Fig.1 Study design of appraising the causal effects of circulating micronutrients on liver cirrhosis. MR design for circulating micronutrients levels on genetic susceptibility to liver cirrhosis. CHB, chronic hepatitis B infection; GWAS, Genome-wide association; MVMR, Multivariable Mendelian Randomization; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; PBC, primary biliary cholangitis; PSC, primary sclerosing cholangitis; SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms.

3.5 多变量孟德尔随机化结果

肝硬化的风险与酒精、慢性乙型肝炎(CHB)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、原发性胆汁性胆管炎(PBC)、原发性硬化性胆管炎(PSC)和维生素 A 相关。在我们的研究中,我们进行了多变量孟德尔随机化(MVMR)

分析,以最小化这些因素可能影响的多效性,并考虑与肝硬化相关的已知风险因素。在调整了可能的混杂变量后,发现维生素 D 与肝硬化之间存在显著的独立关系(OR: 0.39, 95% CI: 0.16~0.94, $P=0.035$)(图 5)。

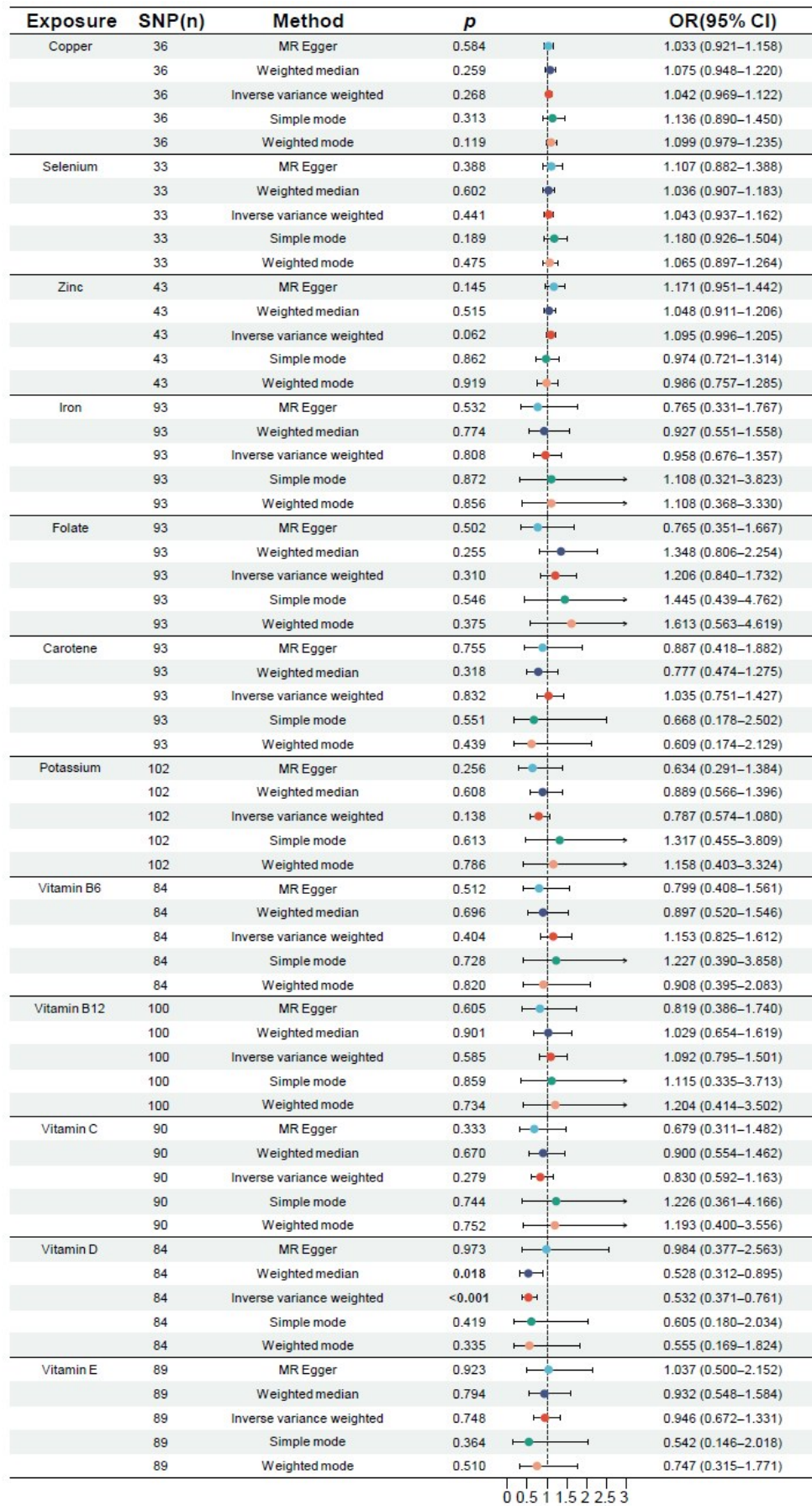


Fig.2 Association of genetic predisposition to micronutrients with the risk of Cirrhosis. Forest plots of univariable Mendelian randomization (MR) estimates between circulating micronutrients levels and risk of liver cirrhosis. The odds ratio (OR) was estimated using inverse variance weighting (IVW). P-values that are statistically significant ($P < 0.05$) are bolded. CI, confidence interval; SNP, single nucleotide polymorphisms.

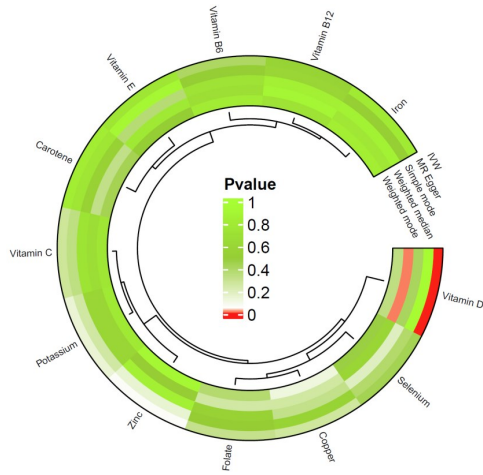


Fig.3 The p-value of genetic predisposition to micronutrients with the risk of Cirrhosis. The circo plot of p-value of Mendelian randomization (MR) estimates between circulating micronutrients levels and cirrhosis risk in GWAS. GWAS, Genome-wide association; IVW, inverse variance weighted.

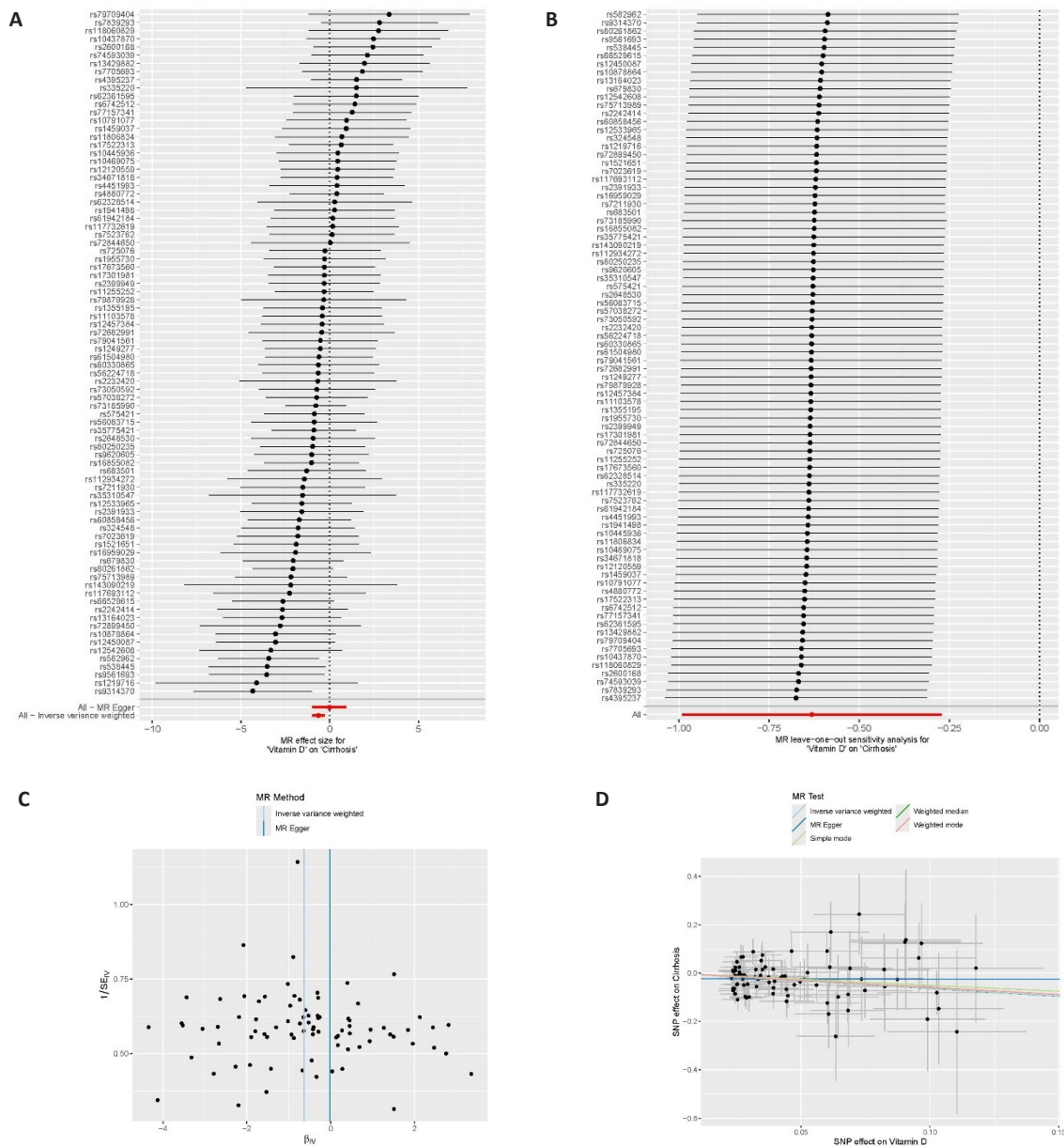


Fig.4 Causal association of genetic predisposition to vitamin D with the risk of liver cirrhosis. (A) Forest plots of Mendelian randomization (MR) estimates between circulating vitamin D levels and liver cirrhosis risk; (B) Leave-one-out sensitive analysis demonstrated that the MR estimates remain highly reliable even after removing each individual single nucleotide polymorphism (SNP); (C) Funnel plot of MR analysis indicates that there is no systematic relationship between the study effects and their precision; (D) Scatter plot of MR analysis for vitamin D on genetic susceptibility to liver cirrhosis.

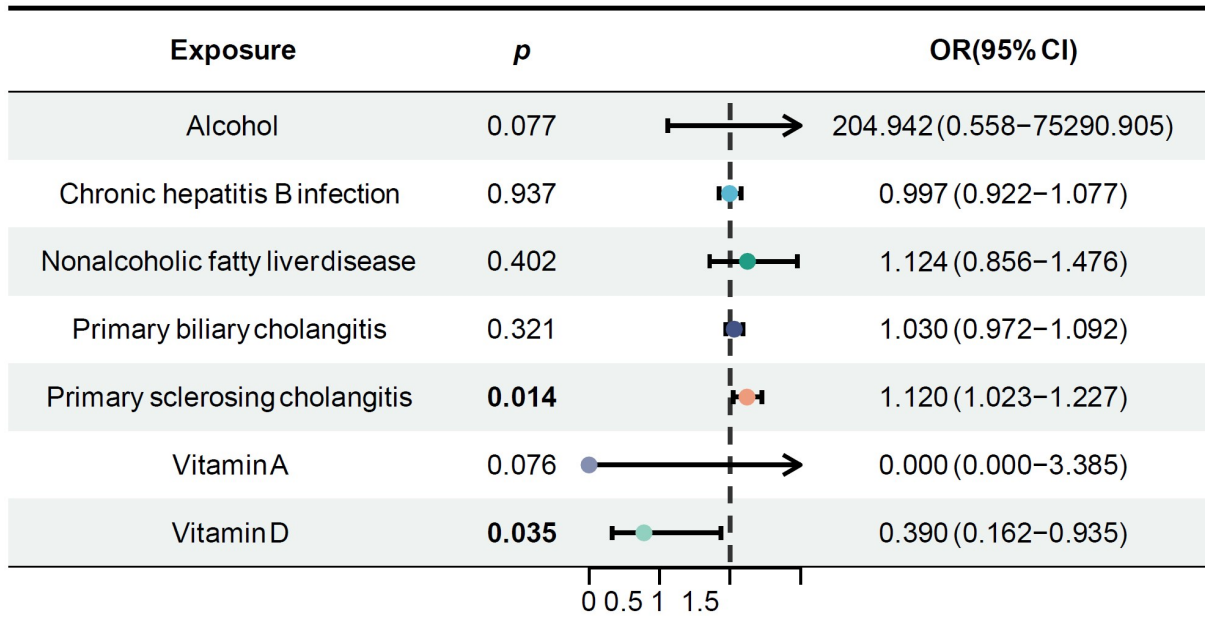


Fig.5 Multivariable Mendelian randomization (MVMR) analysis for the associations of circulating vitamin D levels with the risk of liver cirrhosis. MVMR analysis for the associations of circulating vitamin D and confounders with the risk of liver cirrhosis. P-values that are statistically significant ($P<0.05$) are bolded. CI, confidence interval; OR, odds ratio.

4 讨论

本项广泛的遗传关联研究考察了循环中微量营养素水平与肝硬化易感性之间的潜在关联,使用了最大规模的欧洲人群GWAS数据集。虽然大多数微量营养素与肝硬化之间没有直接的因果联系,但我们最新的MR研究得益于更大的样本量和可靠的工具,提供了强有力的证据,支持基因预测的循环维生素D水平与肝硬化发生风险之间的因果关系(OR: 0.53, 95% CI: 0.37~0.76, $P<0.001$)。此外,多变量Mendelian随机化分析显示,循环维生素D水平(OR: 0.39, 95% CI: 0.16~0.94, $P=0.035$)在考虑酒精消费、慢性乙型肝炎(CHB)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、原发性胆汁性肝硬化(PBC)、原发性硬化性胆管炎(PSC)和维生素A后,独立保护肝硬化。

维生素D在细胞分化与生长、心血管健康、免疫系统功能及维持体内钙和磷的适当水平方面发挥着重要作用^[32, 33]。研究表明,维生素D水平不足与乌昔脱氧胆酸(UDCA, 一种重要的FDA批准药物)反应降低以及肝硬化进展相关^[34]。此外,基线维生素D水平不足被确定为与肝脏相关死亡或肝移植需求的独立预测因子。最近的研究详细阐述了25(OH)D缺乏与慢性肝病中纤维化进展之间的关联^[35], 这与肝脏激活及此类疾病患者中维生素D普遍缺乏相关。

最近的研究表明,维生素D的缺乏可能在多种肝脏疾病的发生中发挥重要作用^[36, 37]。然而,目前尚不清

楚这种缺乏是慢性肝病的后果还是原因。忽视维生素D缺乏可能导致肝硬化的发展,正如Stokes等人所述。他们强调导致肝硬化中维生素D水平降低的各种因素,包括肝细胞羟化减少、肠道吸收减少、饮食摄入不足、未诊断的慢性肝病、结合蛋白(如维生素D结合蛋白和白蛋白)水平不足,以及脂肪组织对维生素D的增加隔离^[38]。肝纤维化的主要机制是细胞外基质的过度积累和非实质性肝细胞的激活。值得注意的是,肝组织缺乏维生素D受体的表达,但在非实质性肝细胞中存在^[39]。研究表明,微小RNA155抑制细胞因子信号1通路与维生素D受体之间的沟通减少,可能导致细胞因子信号抑制的不充分,从而促进肝病的进展^[40]。此外,维生素D已被证明能够抑制I型和III型胶原的合成,同时促进基质金属蛋白酶-8(MMP8)的上调,后者是降解细胞外基质的关键酶^[41]。维生素D对T细胞介导的免疫反应的影响包括降低肝脏中炎症性CD28- T细胞的存在,并防止其在胆管附近聚集^[39]。这种调节对于维持免疫系统的平衡和防止过度炎症至关重要。通过控制关键免疫细胞的分布和活动,维生素D有助于促进整体免疫功能,并保护免受自身免疫和炎症性疾病的影响。这表明维生素D在通过调节特定组织中T细胞反应来支持适当免疫功能方面发挥了重要作用,从而提供了抵御肝硬化的防护。

最近的研究突显了维生素D与肝硬化之间关系的不确定性^[6, 15, 16]。正如Kang及其同事的研究所指出,1,