

## ·临床研究 Clinical research·

## 非小细胞肺癌患者射频消融治疗后血清 miR-28-3p 表达量变化及意义

唐钢琴, 赵振华, 梁晓超

**【摘要】 目的** 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)患者射频消融(RFA)治疗后血清 miR-28-3p 表达量变化及意义。**方法** 选取 2013 年 7 月至 2015 年 7 月治疗的 73 例 NSCLC 患者为研究对象。采用 RT-qPCR 法检测患者治疗前后血清 miR-28-3p 相对表达量。分析血清 miR-28-3p 相对表达量与 NSCLC 患者预后的关系。**结果** NSCLC 患者 RFA 治疗前血清 miR-28-3p 相对表达量为  $(12.62 \pm 2.51)$ , 经 RFA 治疗后血清 miR-28-3p 相对表达量降低  $[(10.46 \pm 2.10), P < 0.05]$ 。73 例 NSCLC 患者 3 年生存率为 61.6%(45/73)。NSCLC 生存组患者血清 miR-28-3p 相对表达量明显低于死亡组患者 ( $P < 0.05$ )。血清 miR-28-3p 评估 NSCLC 患者生存预后的曲线下面积(AUC)为 0.782。血清 miR-28-3p  $\geq 11.05$  的 NSCLC 患者 3 年平均总生存时间为 27.78(95%CI 为 24.30~31.27)个月, 明显低于血清 miR-28-3p  $< 11.05$  的 NSCLC 患者 3 年平均总生存时间 33.19(95%CI 为 30.84~35.55)个月, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。COX 单因素及多因素回归分析显示年龄、TNM 分期、肿瘤直径、淋巴结转移、miR-28-3p 与 NSCLC 患者 RFA 后生存时间密切相关。**结论** NSCLC 患者 RFA 后血清 miR-28-3p 相对表达量明显降低。血清 miR-28-3p 与 RFA 治疗后 NSCLC 患者生存预后密切相关。

**【关键词】** 非小细胞肺癌; 射频消融; 血清 miR-28-3p; 相对表达量; 预后

中图分类号: R734 文献标志码: B 文章编号: 1008-794X(2019)-009-0887-04

**Changes and significance of serum miRNA-28-3p expression in patients with non-small cell lung cancer after radiofrequency ablation** TANG Gangqin, ZHAO Zhenhua, LIANG Xiaochao. Department of Radiology, Shaoxing Municipal People's Hospital, Shaoxing, Zhejiang Province 312000, China

Corresponding author: TANG Gangqin, E-mail: hua15737547252543@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the changes of serum miRNA-28-3p expression in patients with non-small cell lung cancer(NSCLC)after radiofrequency ablation(RFA), and to discuss its clinical significance. **Methods** A total of 73 patients with NSCLC, who were treated with RFA during the period from July 2013 to July 2015, were selected as the subjects of study. The relative expressions of serum miRNA-28-3p before and after treatment were tested by RT-qPCR method. The correlation between the relative expressions of serum miRNA-28-3p and the prognosis of patients was analyzed. **Results** In NSCLC patients, the pre-RFA relative expression of serum miRNA-28-3p was  $(12.62 \pm 2.51)$  and the post-RFA relative expression of serum miRNA-28-3p decreased to  $(10.46 \pm 2.10)$ , the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). In the 73 NSCLC patients the 3-year survival rate was 61.64%(45/73). The relative expression of serum miRNA-28-3p in the patients of survival group was significantly lower than that in the patients of death group ( $P < 0.05$ ). The AUC of serum miRNA-28-3p in evaluating survival and prognosis of NSCLC patients was 0.782. The mean 3-year survival time in NSCLC patients with serum miRNA-28-3p  $\geq 11.05$  was 27.78 months (95% CI: 24.30-31.27 months), which was significantly lower than 33.19 months (95% CI: 30.84-35.55 months) in NSCLC patients with serum miRNA-28-3p  $< 11.05$ , the difference in 3-year survival time between the two groups was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Univariate and multivariate COX regression analysis showed that age, TNM stage, tumor diameter, lymph node metastasis, and miRNA-28-3p were closely related to the survival time of

NSCLC patients after RFA. Conclusion After RFA, the relative expression of serum miRNA-28-3p in NSCLC patients is significantly decreased. Serum miRNA-28-3p is closely related to the survival and prognosis of NSCLC patients after RFA. (J Intervent Radiol, 2019, 28: 887-890)

**【Key words】** Non-small cell lung cancer; radiofrequency ablation; serum miRNA-28-3p; relative expression; prognosis

肺癌是癌症相关死亡的主要原因,其中非小细胞肺癌(NSCLC)发病率约占所有肺癌的 85%<sup>[1]</sup>。相关研究指出,尽管给予 NSCLC 患者相应的治疗,但患者的 5 年生存率仍较低<sup>[2]</sup>。寻找安全性高、疗效确切的治疗方式成为临床研究的主要方向。射频消融(RFA)是一种微创疗法,具有安全性高、临床疗效好的特点,被临床广泛应用于实体瘤的治疗<sup>[3]</sup>。越来越多无法应用手术切除治疗的实体瘤患者倾向于采用该法治疗<sup>[4-5]</sup>。RFA 治疗后患者疗效确切,但仍有部分患者治疗后发生远处转移。因此及时了解 NSCLC 患者预后情况具有重要意义,但目前缺乏灵敏、准确的生物学标志物。

微小 RNA(miRNA, miR)是一种小的非编码 RNA,通过降解或抑制靶向转录物的翻译来调节基因表达<sup>[6-8]</sup>。miR-28-3p 为 miR 家族一员,其具有调节癌细胞增殖活性的作用。相关研究指出,miR-28-3p 在 NSCLC 中异常表达<sup>[9]</sup>,本研究以 NSCLC 患者为研究对象,通过 RT-qPCR 法检测血清 miR-28-3p 相对表达量,分析其与 NSCLC 患者 RFA 治疗后预后的关系,以期临床评估 NSCLC 患者预后情况提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般资料

前瞻性选取 2013 年 7 月至 2015 年 7 月我院治疗的 73 例 NSCLC 患者为研究对象。所有患者均经病理活检证实为 NSCLC。纳入标准:①经病理活检诊断为 NSCLC;②接受 RFA 治疗;③入院 Karnofsky 功能状态(KPS)评分 $\geq 60$ 分;④预计生存时间超过 3 个月。排除标准:①无明确病理学诊断;②心肺功能不全;肝肾功能严重障碍;③合并有其他恶性肿瘤;④处于妊娠期或哺乳期患者。73 例 NSCLC 患者中男 45 例,女 28 例,平均年龄(61.2 $\pm$ 7.4)岁,TNM 分期Ⅲ期 39 例,Ⅳ期 34 例,肿瘤直径(2.83 $\pm$ 0.37)cm。所有患者均签署知情同意书。本研究获得本院医学伦理委员会批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 RFA 术 根据患者肿瘤位置选择合适的体

位,常规 CT 平扫并行三维重建,在体表位置放置定位器,行定位扫描。无菌操作以利多卡因(2%, 10 mL)局部麻醉,重复局部 CT 扫描确定进针位置及角度,在患者平静呼吸下采用 RITA 公司 RFA 针标记位置进针至靠近病灶位置,后再行 CT 扫描,确认针尖达到肿瘤内部位置,根据肿瘤大小选择针打开长度,确保消融边缘超过病灶边缘 0.5~1.0 cm。重复 CT 扫描,确认消融范围后连接 RFA 机,开始治疗,设定温度为 90℃,治疗完毕后观察患者一般状态。RFA 术后 1 个月进行复查,观察肿瘤是否完全消融,若瘤体仍有残留,3 个月、6 个月继续复查,观察瘤体是继续萎缩还是增长,对于增长瘤体给予重复射频消融。术后 CT 复查发现肺内出血、胸腔积液、肺部感染、咯血、胸痛、发热等,均给予对症治疗。

1.2.2 资料收集 收集患者年龄、性别、TNM 分期、吸烟史、肿瘤直径、病理类型、淋巴结转移等资料。

1.2.3 RT-qPCR 法检测 NSCLC 患者血清 miR-28-3p 相对表达量 抽取患者治疗前及治疗后 3 d 外周静脉血 10 mL,3500 r/min 离心 20 min,分离上层血清,置于-20℃冰箱中待测。用 TRIzol 试剂提取总 RNA。用 TaqMan MicroRNA 反转录试剂盒合成 cDNA,PCR 扩增。反应条件为:95℃ 60 s,95℃ 15 s,15s 退火,72℃ 45 s,40 个循环。miR-28-3p 正向:5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACT-3',反向:5'-CACTATAGGTTTTTTTTTTTCG-3'。以 GAPDH 为内参,正向:5'-GGAGCGAGATCCCTC-CAAAAT-3',反向:5'-GGCTGTTGTCATACT-TCTCATGG-3'。用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示 miR-28-3p 相对表达量。

1.2.4 随访 采用电话随访及复诊等方式对 NSCLC 患者进行为期 3 年的随访,每月随访 1 次,了解 NSCLC 患者生存情况,随访起始时间为 RFA 术后,截止时间为 2018 年 9 月 3 日,中位随访时间为 28 个月。

### 1.3 统计学方法

用 SPSS 19.0 软件和 MedCalc 15.2.2 软件进行统计分析。服从正态分布的计量资料用均数 $\pm$ 标准

差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组独立样本比较采用独立样本  $t$  检验;配对样本则采用配对样本  $t$  检验。用受试者工作特征(ROC)曲线评价 miR-28-3p 诊断结 NSCLC 患者生存预后的效能。用 COX 单因素及多因素回归分析影响 NSCLC 患者 RFA 术后生存预后的相关因素。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 NSCLC 患者 RFA 治疗前后血清 miR-28-3p 相对表达量比较

NSCLC 患者 RFA 治疗前血清 miR-28-3p 相对表达量为  $(12.62\pm 2.51)$ ,明显高于治疗后  $(10.46\pm 2.10)$ ,差异有统计学意义( $t=5.639, P<0.001$ )。

### 2.2 不同预后 NSCLC 患者血清 miR-28-3p 相对表达量比较

73 例 NSCLC 患者 3 年生存率为 61.6%(45/73),病死率为 38.4%(28/73)。死亡组患者血清 miR-28-3p 相对表达量为  $(11.73\pm 2.26)$ ,明显高于生存组患者  $(9.67\pm 1.94)$ ,差异有统计学意义( $t=3.994, P<0.001$ )。

### 2.3 RFA 术后血清 miR-28-3p 评估 NSCLC 患者预后的效能

RFA 术后血清 miR-28-3p 评估 NSCLC 患者生存预后的曲线下面积(AUC)、灵敏度、特异度、最大约登指数及最佳截断值分别为 0.782 (0.670~0.870)、82.14%、68.89%、0.510、11.05。(图 1)。

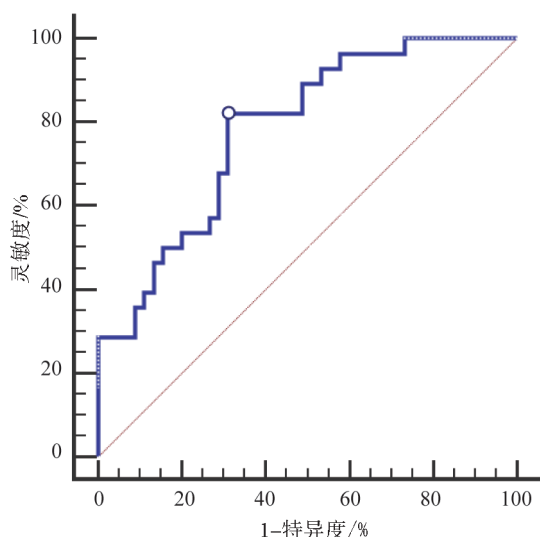


图 1 RFA 术后血清 miR-28-3p 评估 NSCLC 患者预后的 ROC 曲线

### 2.4 不同血清 miR-28-3p 相对表达量 NSCLC 患者生存情况

血清 miR-28-3p  $\geq 11.05$  的 NSCLC 患者 3 年平均总生存时间为 27.78 (95%CI 为 24.30~31.27)个

月,明显低于血清 miR-28-3p  $< 11.05$  的 NSCLC 患者 3 年总生存时间 33.19 (95%CI 为 30.84~35.55)个月,两组患者总生存时间比较,差异有统计学意义( $\chi^2=8.094, P=0.004$ )。(图 2)。

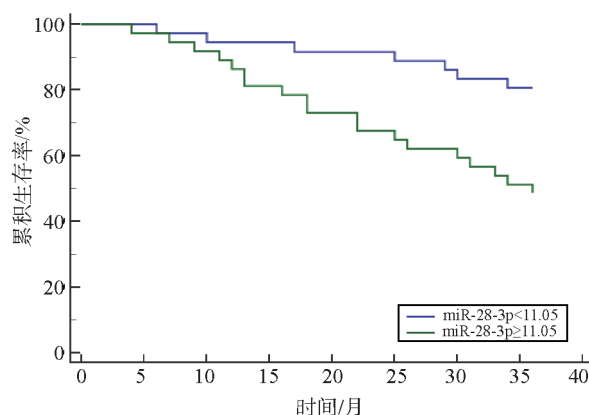


图 2 不同血清 miR-28-3p 相对表达量 NSCLC 患者生存曲线

### 2.4 影响 NSCLC 患者 RFA 术后生存时间的 COX 分析

将性别、年龄、TNM 分期、吸烟史、肿瘤直径、病理类型、淋巴结转移及 miR-28-3p 纳入 COX 单因素分析,结果显示年龄、TNM 分期、肿瘤直径、淋巴结转移、miR-28-3p 表达与 NSCLC 患者 RFA 术后生存时间存在关系( $P<0.05$ )。将单因素分析有统计学意义的指标年龄、TNM 分期、肿瘤直径、淋巴结转移、miR-28-3p 等纳入 COX 多因素回归分析,结果显示年龄、TNM 分期、肿瘤直径、淋巴结转移、miR-28-3p 与 NSCLC 患者 RFA 术后预后密切相关。表 1。

## 3 讨论

miR-28-3p 是一种功能性 miRNA,近年来大量证据表明 miR-28-3p 与多种肿瘤疾病关系密切<sup>[10]</sup>。Almeida 等<sup>[12]</sup>证实,miR-28-3p 在结直肠癌中高表达,且与肿瘤的远处转移和侵袭密切相关。本研究通过 RT-qPCR 法检测 NSCLC 患者血清 miR-28-3p 相对表达量,分析其与 NSCLC 患者预后的关系。

本研究比较了 NSCLC 患者 RFA 治疗前后血清 miR-28-3p 相对表达量,结果发现 NSCLC 患者治疗后血清 miR-28-3p 相对表达量明显低于治疗前,表明 miR-28-3p 相对表达量降低可能与 RFA 杀灭肿瘤细胞有关。本课题组同时对 73 例 NSCLC 患者进行跟踪随访,了解患者预后情况,并比较不同预后 NSCLC 患者血清 miR-28-3p 相对表达量,结果显示,RFA 治疗后生存组患者血清 miR-28-3p 相对表

表 1 影响 NSCLC 患者射频消融术后生存时间的多因素分析

项目	COX 单因素			COX 多因素		
	HR	95%CI	P 值	HR	95%CI	P 值
性别(男/女)	1.593	0.776~2.408	0.089	—	—	—
年龄( $\geq 60$ / $< 60$ 岁)	3.751	1.448~6.103	0.021	3.172	1.515~5.693	0.016
TNM 分期(III~IV/I~II)	4.352	1.638~6.732	0.014	3.884	1.779~6.249	0.008
吸烟史(有/无)	1.730	0.865~2.543	0.081	—	—	—
肿瘤直径( $\geq 3$ cm/ $< 3$ cm)	4.163	1.550~5.958	0.017	3.652	1.529~5.932	0.013
病理类型(鳞癌/腺癌/大细胞癌)	2.003	0.915~2.942	0.068	—	—	—
淋巴结转移(有/无)	4.812	1.707~7.621	0.008	4.307	1.794~7.461	0.004
miR-28-3p 表达量( $\geq 11.05$ / $< 11.05$ )	3.526	1.430~5.693	0.024	2.943	1.413~4.820	0.019

赋值:性别(男为 1,女为 0);年龄( $\geq 60$  岁为 1, $< 60$  岁为 0);TNM 分期(III~IV 期为 1,I~II 期为 0);吸烟史(有 1,无 0);肿瘤直径( $\geq 3$  cm 为 1, $< 3$  cm 为 0);病理类型(鳞癌为 1,腺癌/大细胞癌为 0);淋巴结转移(有 1,无 0);miR-28-3p 表达量( $\geq 11.05$  为 1, $< 11.05$  为 0);预后(死亡为 1,生存为 0)。

达量明显低于死亡组患者,因此推测血清 miR-28-3p 或可作为评估 NSCLC 患者生存预后的生物学指标。为验证假设,本研究构建了血清 miR-28-3p 评估 NSCLC 患者预后的受试者工作特征(ROC)曲线,结果显示,血清 miR-28-3p 评估 NSCLC 患者预后的 AUC 为 0.782,提示血清 miR-28-3p 评估 NSCLC 患者预后情况具有一定价值。此外,本研究同时分析了不同 miR-28-3p 相对表达量的 NSCLC 患者的生存情况,结果发现,miR-28-3p $\geq 11.05$  的 NSCLC 患者的生存时间明显低于 miR-28-3p $< 11.05$  的患者,表明血清 miR-28-3p 可能与 NSCLC 患者的生存时间有关。因此,本研究采用 COX 单因素及多因素分析影响 NSCLC 患者生存时间的相关因素,结果发现年龄、TNM 分期、肿瘤直径、淋巴结转移、miR-28-3p 与 NSCLC 患者射频消融术后生存时间密切相关,miR-28-3p 相对表达量越高,NSCLC 患者预后死亡率越高。此前有报道<sup>[12]</sup>显示,miR-28-3p 具有调节 NM23-H1 基因表达的作用。NM23-H1 基因能够限制肿瘤细胞的侵袭性,当 miR-28-3p 相对表达量升高时,影响 NM23-H1 对肿瘤细胞的抑制作用,进而诱导肿瘤的转移及侵袭,因此笔者推测 miR-28-3p 通过调节 NM23-H1 基因的表达,进而影响 NSCLC 患者的预后。

综上所述,NSCLC 患者 RFA 术后血清 miR-28-3p 与预后关系密切,检测 NSCLC 患者 RFA 术后血清 miR-28-3p 相对表达量有助于了解患者生存预后情况。本研究下一步将进行大样本量、多中心研究,避免样本量、个体差异造成的误差。

#### [参考文献]

[1] 刘宝东. 非小细胞肺癌射频消融热点问题探讨[J]. 介入放射

学杂志, 2018, 27: 7-11.

- [2] Huang Q, Li L, Li L, et al. MDM2 knockdown mediated by a triazine-modified dendrimer in the treatment of non-small cell lung cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7: 44013-44022.
- [3] 任衍乔, 郑传胜. 肝癌射频消融术后各种影像学评价应用与进展[J]. 介入放射学杂志, 2018, 27: 89-92.
- [4] Tanaka K, Kojima T, Hiraguchi E, et al. Laparoscopy-guided transthoracic transdiaphragmatic radiofrequency ablation for hepatic tumors located beneath the diaphragm[J]. J Laparoendosc Adv Surg Tech A, 2016, 26: 180-184.
- [5] 陈娟, 陈超伍, 陈炜炜, 等. 胆管射频消融联合金属支架置入治疗胆道恶性肿瘤的临床研究[J]. 中华消化内镜杂志, 2017, 34:262-264.
- [6] Diederichs S, Bartsch L, Berkman JC, et al. The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations[J]. EMBO Mol Med, 2016, 8: 442-457.
- [7] 周威, 杨万里, 张洪伟, 等. 微 RNA-483 与消化系统肿瘤关系的研究进展[J]. 中华消化外科杂志, 2018, 17: 522-526.
- [8] Kaur P, Rong TJ, Karolina DS, et al. A long non-coding RNA, BC048612 and a microRNA, miR-203 coordinate the gene expression of neuronal growth regulator 1 (NEGR1) adhesion protein[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1863: 533-543.
- [9] Zhang Y, Roth JA, Yu H, et al. A 5'-MicroRNA signature identified from serum microRNA profiling predicts survival in patients with advanced stage non-small cell lung cancer[J]. Carcinogenesis, 2018, 14: 1093-1124.
- [10] Liu SG, Qin XG, Zhao BS, et al. Differential expression of miRNAs in esophageal cancer tissue [J]. Oncol Lett, 2013, 5: 1639-1642.
- [11] 苗润生, 蔡林, 勘武生, 等. 微小 RNA-28-3p 对骨巨细胞瘤生物学行为的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34: 261-263.
- [12] Almeida M I, Nicoloso MS, Zeng L, et al. Strand-specific miR-28-5p and miR-28-3p have distinct effects in colorectal cancer cells[J]. Gastroenterology, 2012, 142:886-896.

(收稿日期:2019-03-04)

(本文编辑:俞瑞纲)