

## • 肿瘤介入 Tumor intervention •

mRNA-527 与经肝动脉化疗栓塞术治疗  
肝细胞癌预后的关系

吴 涛, 苗 牛, 张明勤, 刘阳阳, 杨冬谊

**【摘要】 目的** 探究 miR-527 与 TACE 治疗肝细胞癌(HCC)预后的关系。**方法** 前瞻性选取 2015 年 3 月至 2017 年 4 月在河南中医药大学第一附属医院就诊的 168 例 HCC 患者作为研究对象。采用实时荧光定量 PCR 法检测 HCC 患者血浆中 miR-527 水平。用 Cox 回归和限制性立方样条分析 miR-527 与 HCC 预后的关系。**结果** 3 年后生存组(114 例)术后 miR-527 水平高于死亡组(54 例), 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。术后 miR-527 诊断 HCC 患者预后的受试者工作特征(ROC)曲线下面积(AUC)、灵敏度和特异度分别为 0.839(95%CI:0.775~0.891)、74.07%和 84.21%, 其诊断效能高于术前 miR-527, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。Cox 回归分析结果显示肿瘤分期是 HCC 患者预后的独立危险因素( $P<0.05$ ), 索拉非尼和 miR-527 是 HCC 患者预后的独立保护因素( $P<0.05$ )。miR-527 与 HCC 患者预后有关( $P<0.05$ ), 且呈线性关系(非线性检验  $P>0.05$ )。当 miR-527<1.60 时, 与 miR-527=1.60 比较, 预后不良风险高; 当 miR-527>1.60 时, 与 miR-527=1.60 比较, 预后不良风险低。**结论** TACE 术后 miR-527 水平与 HCC 患者预后有关, 其水平低提示预后不良风险高。

**【关键词】** 肝细胞肝癌; 经肝动脉化疗栓塞术; 微 RNA-527; 预后

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2021)-03-0239-05

**Correlation between microRNA-527 level and the prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization treatment** WU Tao, MIAO Niu, ZHANG Mingqin, LIU Yangyang, YANG Dongyi. Department of Intervention, First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan Province 450000, China

Corresponding author: WU Tao, E-mail: a5g1u8@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the relationship between the microRNA-527(miR-527) level and the prognosis in patients with hepatocellular carcinoma(HCC) after receiving transcatheter arterial chemoembolization(TACE). **Methods** A total of 168 HCC patients, who were admitted to the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine of China from March 2015 to April 2017, were prospectively collected and used as the objects of study. Real-time fluorescence quantitative PCR method was used to detect the miR-527 levels in plasma of HCC patients. Cox regression and restrictive cubic spline were used to analyze the relationship between miR-527 and HCC prognosis. **Results** Three years after treatment, the miR-527 level in the survival group( $n=114$ ) was higher than that in the death group( $n=54$ ), the difference was statistically significant( $P<0.05$ ). The area under receiver operating characteristic(ROC) curve (AUC), the sensitivity and specificity of HCC patients' prognosis which were judged by postoperative miR-527 level were 0.839(95%CI:0.775-0.891), 74.07% and 84.21% respectively, its diagnostic efficacy was higher than those judged by preoperative miR-527 level, the differences were statistically significant( $P<0.05$ ). The results of Cox regression analysis indicated that tumor stage was an independent risk factor for the prognosis of HCC patients( $P<0.05$ ), and sorafenib and miR-527 were the independent protective factors for the prognosis of HCC patients( $P<0.05$ ). The miR-527 level was well related to the prognosis in HCC patients( $P<0.05$ ), presenting a linear relationship(non-linear testing  $P>0.05$ ). When miR-527<1.60, the risk of poor prognosis was higher

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2021.03.005

基金项目: 2019 年度留学人员科研择优项目(KY-A0364)、国家青年科学基金(81501567)

作者单位: 450000 郑州 河南中医药大学第一附属医院介入科

通信作者: 吴 涛 E-mail: a5g1u8@163.com

than miR-527=1.60; when miR-527 > 1.60, the risk of poor prognosis was lower than miR-527=1.60.

**Conclusion** Post-TACE miR-527 level is closely related to the prognosis in HCC patients. Low level of miR-527 indicates a high risk of poor prognosis. (J Intervent Radiol, 2021, 30: 239-243)

**【Key words】** hepatocellular carcinoma; transhepatic arterial chemoembolization; microRNA-527; prognosis

肝细胞癌(HCC)是一种常见的恶性肿瘤,位居我国男性恶性肿瘤发病率和死亡率的第2位,严重影响人们健康<sup>[1-2]</sup>。随着介入技术的发展,TACE已被认为是治疗HCC的一线治疗方案,能够提高患者的2年生存率<sup>[3-4]</sup>。然而,经临床随访得知相同肿瘤分期的HCC患者接受TACE治疗后存在疗效差异较大的情况<sup>[5]</sup>,因此,筛选出接受TACE治疗获益大的HCC患者具有重要意义,不仅可节省医疗资源,还可达到精准治疗的目的。然而,目前临床缺乏有效的指标评价TACE治疗的HCC患者预后。

miRNA是一种由20~24个核苷酸组成的单链RNA,不具备编码蛋白质功能,但可参与细胞的增殖、迁移及凋亡等过程<sup>[6]</sup>。miR-527属于miRNA,已被报道参与脑胶质瘤<sup>[7]</sup>、肺癌<sup>[8]</sup>等恶性肿瘤发病及进展。有研究<sup>[9]</sup>显示miR-527可靶向硫酸酯酶2(sulfate 6-O-endosulfatase, SULF2)下调转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )/Smad诱导的上皮间质转化。此外,还有研究证实SULF2在HCC组织中表达上调<sup>[10]</sup>。多数研究已表明上皮间质转化与化疗药物耐药有关<sup>[11-12]</sup>。本研究通过分析HCC患者TACE治疗前后miR-527与预后的关系,以期对TACE精准治疗奠定基础,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 临床资料** 前瞻性选取2015年3月至2017年4月在河南中医药大学第一附属医院就诊的168例HCC患者作为研究对象。根据《原发性肝癌规范化诊治专家共识》<sup>[13]</sup>诊治HCC。纳入标准:①年龄18~70岁;②临床资料完整;③接受TACE治疗;④Child-Pugh分级为A级或B级。排除标准:①预计生存时间短于3个月;②有TACE治疗禁忌证;③HCC复发再次治疗患者;④随访失联;⑤不能配合完成研究所需检查。168例HCC患者中男113例,女55例,年龄39~70(61.6±5.3)岁;Child-Pugh分级A级126例,B级42例;乙肝病毒表面抗原(HBsAg)阳性29例;AFP>400  $\mu$ g/L 96例;肿瘤直径>5 cm 87例;肿瘤单发63例,多发105例;肿瘤

分期Ib期17例,II期77例,IIIa期74例。本研究所有患者均签署了知情同意书,本研究经河南中医药大学第一附属医院医学伦理委员会批准。

**1.1.2 信息收集** 收集HCC患者年龄、性别、Child-Pugh分级、HBsAg、AFP、肿瘤数目、肿瘤直径、肿瘤分期及索拉非尼服用情况等资料。采用电话随访或复诊等方式了解HCC患者预后情况,于患者出院后1个月开始随访,首次随访采用复诊形式,之后每3个月随访1次,末次随访时间为2020年4月20日,中位随访时间为36(6~36)个月。

### 1.2 方法

**1.2.1 TACE治疗方案** TACE术前检查患者血、尿、粪便常规,心电图,肝、肾功能及凝血功能等。患者取仰卧位,常规消毒、铺巾,行局部麻醉,由股动脉入路置入导管鞘至腹腔动脉或肝总动脉,行血管造影,明确肿瘤供血动脉。将稀释好的药物(奥沙利铂和5-氟尿嘧啶)缓慢灌注至肿瘤供血动脉,然后用超液化碘油和阿霉素充分乳化的混悬液进行栓塞,然后注入明胶海绵悬浮液充分栓塞。最后拔出导管和导管鞘,包扎伤口。TACE术后密切观察患者,了解有无发热、恶心、呕吐、出血及并发症等,若出现上述症状,给予针对性治疗<sup>[14]</sup>。

**1.2.2 miR-527水平检测** 采用实时荧光定量PCR法<sup>[15]</sup>检测HCC患者血浆miR-527水平。抽取接受TACE治疗当天及术后4周时HCC患者肘部静脉血10 mL,室温下以3 000转/min转速离心15 min(离心半径10 cm),提取血浆,并将其保存在-80℃冰箱中。将TRIzol试剂(德国罗氏诊断有限公司,货号:11667165001)加至装有血浆的EP管中提取总RNA,检测总RNA纯度(A260/A280=1.8~2.1)后将其加至逆转录试剂盒(德国罗氏诊断有限公司,货号:5091284001)中获取cDNA,最后用定量PCR仪(德国罗氏诊断有限公司,LightCycler 96型)进行扩增,扩增条件为95℃ 5 min,95℃ 40 s,57℃ 40 s,72℃ 40 s,35个循环。内参为U6。采集了30例年龄、性别与之匹配的健康体检者血液样本,取其血浆miR-527表达平均值作为校正对照。miR-527序列F:5'-CTCAAGCTGTGACTGCAAAGG-3',R:5'-CCAAA

GGGAAGCACT-3';U6 序列 F:5'-CTCG-CTTCGGC AGCACA-3',R:5'-AACGCTTCACGAAT-TTGCCT-3'。 $\Delta Ct=CtmiR-527-CtU6$ ,用 2-DDct 计算 miR-527 水平。

### 1.3 统计学方法

用 SPSS 22.0 软件进行数据分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本  $t$  检验,TACE 治疗前、后 miR-527 水平比较采用配对样本  $t$  检验。计数资料用例或率[ $n(\%)$ ]表示。用受试者工作特征曲线(ROC)评价 miR-527 诊断 HCC 患者预后的效能。用 Kaplan-Meier 绘制生存曲线,并用 Log-Rank 法比较差异。用 COX 回归分析影响 HCC 患者预后的风险因素。用 R 3.6.3 软件拟合限制性立方样条和 COX 回归分析 miR-527 与 HCC 患者预后的关系。

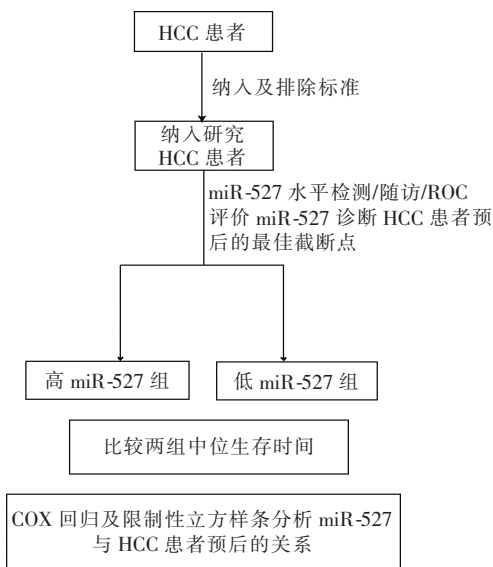


图 1 患者入组及课题设计流程图

## 2 结果

### 2.1 两组 miR-527 水平比较

168 例 HCC 患者 3 年生存率为 67.9% (114/168)。根据 HCC 患者生存预后情况将其分为生存组( $n=114$ )和死亡组( $n=54$ )。两组术后 miR-527 水平均高于术前,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。生存组术后 miR-527 水平高于死亡组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。

### 2.2 miR-527 评价 HCC 患者预后的价值

术后 miR-527 诊断 HCC 患者预后的受试者工作特征(ROC)曲线下面积(AUC)、最佳截断点、灵敏度和特异度分别为 0.839 (95%CI:0.775~0.891)、1.60、74.07%和 84.21%。术前 miR-527 诊断 HCC 患者预后的 ROC AUC、最佳截断点、灵敏度和特异

表 1 两组一般资料比较

分组	术前	术后	$T$ 值	$P$ 值
死亡组( $n=54$ )	1.10 $\pm$ 0.19	1.50 $\pm$ 0.25	11.011	<0.001
生存组( $n=114$ )	1.08 $\pm$ 0.20	1.85 $\pm$ 0.25	28.216	<0.001
$T$ 值	0.410	8.260		
$P$ 值	0.682	<0.001		

度分别为 0.519 (95%CI:0.440~0.596)、1.04、63.0%和 46.5%。术后 miR-527 诊断 HCC 患者预后的效能高于术前,差异有统计学意义( $Z=4.982$ , $P<0.001$ ),见图 2。

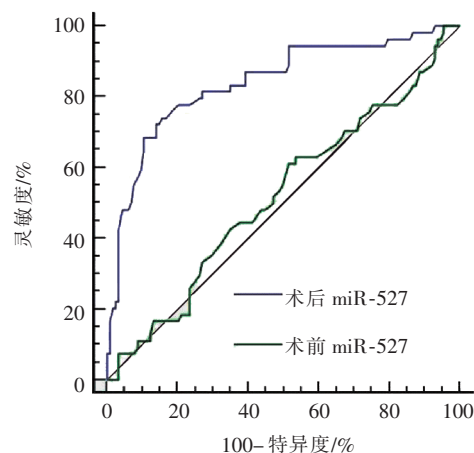


图 2 miR-527 评价 HCC 患者预后的 ROC 曲线

### 2.3 两组生存情况比较

以术后 miR-527 诊断 HCC 患者预后的最佳截断点将 HCC 患者分为高 miR-527 组( $n=110$ )和低 miR-527 组( $n=58$ )。高 miR-527 组中位生存时间高于低 miR-527 组(36 个月比 16 个月),差异有统计学意义(Log-Rank  $\chi^2=74.740$ , $P<0.001$ ),见图 3。

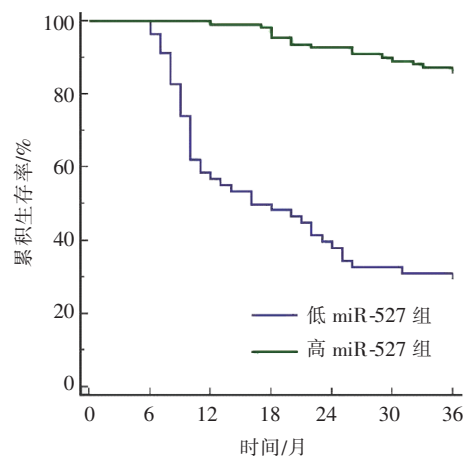


图 3 两组生存曲线

### 2.4 影响 HCC 患者预后的因素

将预后作为因变量,将 HCC 患者年龄、性别、Child-Pugh 分级、HBsAg、AFP、肿瘤数目、肿瘤直径、

肿瘤分期、索拉非尼和 miR-527(TACE 术后)作为自变量分别纳入 COX 单因素,结果显示 Child-Pugh 分级、AFP、肿瘤直径、肿瘤分期和 miR-527 与 HCC 患者预后有关( $P<0.05$ )。按  $P\leq 0.1$  标准,将 Child-Pugh 分级、AFP、肿瘤直径、肿瘤分期、索拉非尼和 miR-527 作为自变量纳入 COX 多因素分析,结果显

示肿瘤分期是 HCC 患者预后的独立危险因素( $P<0.05$ ),索拉非尼和 miR-527 是 HCC 患者预后的独立保护因素( $P<0.05$ ),见表 2。

## 2.5 miR-527 与 HCC 患者预后的关系

用限制性立方样条拟合 COX 回归分析 miR-527 与 HCC 患者预后的关系。通过比较不同节点个

表 2 影响 HCC 患者预后的 COX 回归分析

参数	COX 单因素分析			COX 多因素分析		
	HR	95%CI	P 值	HR	95%CI	P 值
年龄	1.005	0.956~1.056	0.859			
性别(男/女)	0.869	0.498~1.514	0.621			
Child-Pugh 分级(B/A)	2.134	1.237~3.683	0.007	0.864	0.467~1.600	0.644
HBsAg(+/-)	1.096	0.553~2.170	0.795			
AFP(>400/≤400, g/L)	1.940	1.085~3.471	0.026	1.751	0.944~3.246	0.077
肿瘤数目(多发/单发)	1.143	0.655~1.992	0.640			
肿瘤直径(>5/≤5, cm)	1.796	1.037~3.112	0.038	1.182	0.619~2.259	0.614
肿瘤分期(Ⅲa/Ⅲb+Ⅱ)	3.140	1.785~5.522	<0.001	7.167	3.769~13.631	<0.001
索拉非尼(服用/未服用)	0.175	0.025~1.255	0.085	0.025	0.003~0.203	<0.001
miR-527	0.007	0.002~0.025	<0.001	0.003	0.001~0.015	<0.001

数所对应的 AIC 值,最终确定节点个数为 3 时 AIC 值最小(AIC=460.397)。分析结果表明 miR-527 与 HCC 患者预后有关( $\chi^2=80.55, P<0.001$ ),且呈线性关系(非线性检验  $\chi^2=2.32, P=0.128$ )。以术后 miR-527 诊断 HCC 患者预后的最佳截断点为参考点,miR-527<1.60 时,与 miR-527=1.60 比较,预后不良风险高;当 miR-527>1.60 时,与 miR-527=1.60 比较,预后不良风险低,见图 4。

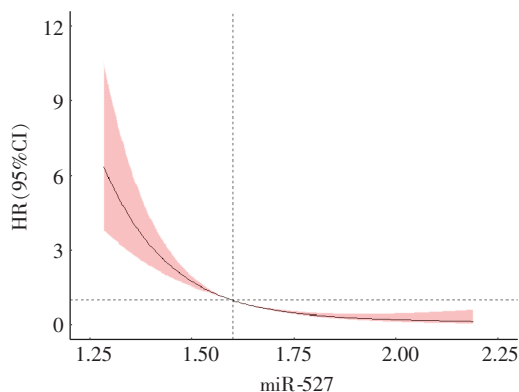


图 4 miR-527 与 HCC 患者预后的限制性立方样条图

## 3 讨论

近年来,越来越多研究表明 miRNA 与 HCC 患者预后有关,如 miR-187-3p 在 HCC 组织中低表达,并可反映 HCC 患者预后<sup>[16]</sup>;外泌体 miR-224 表达水平高的 HCC 患者预后不良风险高<sup>[17]</sup>。目前,鲜有关于 miR-527 与 HCC 患者预后的研究。现有研究表明 miR-527 可靶向 SULF2 下调 TGF- $\beta$ /Smad 诱导的

上皮间质转化<sup>[9]</sup>。已知上皮间质转化可降低肿瘤细胞对化疗药物的灵敏度,是化疗耐药的主要原因之一<sup>[18]</sup>。基于上述研究,推测 miR-527 可能通过调节上皮间质转化影响 TACE 治疗疗效。本研究通过比较 TACE 治疗前、后 HCC 患者血浆 miR-527 水平,结果发现两组(死亡组和生存组)术后血浆 miR-527 水平均升高,且生存组血浆 miR-527 水平高于死亡组,上述结果表明 miR-527 可能与 HCC 患者预后有关,检测其水平或可评估 HCC 患者预后。

目前,已有多宗研究表明 HCC 组织中蛋白或基因表达水平可反映患者预后,如磷脂酶 C $\beta$ 1(phospholipase C $\beta$ 1, PLC $\beta$ 1)在 HCC 组织中高表达,其表达水平升高增加患者预后不良风险<sup>[19]</sup>。此外,还有研究表明 CC 趋化因子受体 1(C-C motif chemokine receptor 1, CCR1)在肝癌组织中高表达,检测其表达水平可反映患者生存预后<sup>[20]</sup>。然而,上述研究均检测的肿瘤组织中的蛋白表达水平,在取材上不具便利性,不适用于未经手术治疗的 HCC 患者。本研究采用血清学指标 miR-527 评价 HCC 患者预后,经 ROC 曲线评价诊断效能,结果显示术后 miR-527 诊断 HCC 患者预后的 ROC AUC、灵敏度和特异度分别为 0.839、74.07%和 84.21%,该结果表明术后 miR-527 诊断 HCC 患者预后的效能较高,可辅助评价 HCC 患者预后。

既往研究表明肿瘤分期和服用索拉非尼可改善 HCC 患者预后。郑家平等<sup>[21]</sup>研究表明肝功能良好的 HCC 患者 TACE 后服用索拉非尼可获得较长



的生存时间和疾病稳定状态;Huo 等<sup>[22]</sup>研究证实 HCC 分期越低患者预后不良风险越低。本研究采用 COX 回归分析影响 HCC 患者预后的因素,结果显示肿瘤分期是 HCC 患者预后的独立危险因素,索拉非尼是 HCC 患者预后的独立保护因素,与上述研究结果一致。此外本研究结果还显示 miR-527 是 HCC 患者预后的独立保护因素,此外,限制性立方样条分析结果还显示当 miR-527<1.60 时,与 miR-527=1.60 比较,预后不良风险高;当 miR-527>1.60 时,与 miR-527=1.60 比较,预后不良风险低。推测其原因可能是高 miR-527 水平抑制上皮间质转化的效果更强,检测其水平可反映 HCC 上皮间质转化程度,进而反映 TACE 治疗效果,但关于其病理生理机制仍有待开展基础研究进一步证实。

本研究仍存在一定不足:样本例数偏小,且为单中心研究,在样本选择上存在一定偏倚,下一步将增加样本量,开展多中心研究,验证本研究结果。综上所述,HCC 患者 TACE 后血浆 miR-527 水平升高。TACE 后血浆 miR-527 水平与 HCC 患者预后有关。TACE 后血浆 miR-527 水平低提示 HCC 患者预后不良风险较高。

#### [参考文献]

- [1] Chow PK, Choo SP, Ng DC, et al. National cancer centre Singapore consensus guidelines for hepatocellular carcinoma[J]. Liver Cancer, 2016, 5: 97-106.
- [2] Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16: 589-604.
- [3] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2018, 69: 182-236.
- [4] Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival[J]. Hepatology, 2003, 37: 429-442.
- [5] 孙伟航,张懿丹,李巍. 预后营养指数联合磁共振表观扩散系数在肝细胞癌肝动脉化疗栓塞中的临床应用价值[J]. 中华医学杂志, 2019, 99: 2581-2585.
- [6] Sun HX, Yang ZF, Tang WG, et al. MicroRNA-19a-3p regulates cell growth through modulation of the PIK3IP1-AKT pathway in hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer, 2020, 11: 2476-2484.
- [7] Liu J, Hou K, Ji H, et al. Overexpression of circular RNA circ-CDC45 facilitates glioma cell progression by sponging miR-516b and miR-527 and predicts an adverse prognosis[J]. J Cell Biochem, 2020, 121: 690-697.
- [8] Liu H, Han L, Liu Z, et al. Long noncoding RNA MNX1-AS1 contributes to lung cancer progression through the miR-527/BRF2 pathway[J]. J Cell Physiol, 2019, 234: 13843-13850.
- [9] Huo W, Zhu XM, Pan XY, et al. MicroRNA-527 inhibits TGF- $\beta$ /SMAD induced epithelial-mesenchymal transition via down-regulating SULF2 expression in non-small-cell lung cancer[J]. Math Biosci Eng, 2019, 16: 4607-4621.
- [10] Alhasan SF, Beale GS, Newell DR, et al. Suppression of SULF2, an extracellular endosulfatase up-regulated in hepatocellular cancers, modulates WNT signalling and inhibits cell growth[J]. Gut, 2012, 61(Suppl 2): A111-A112.
- [11] Hu JL, Wang W, Lan XL, et al. CAFs secreted exosomes promote metastasis and chemotherapy resistance by enhancing cell stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. Mol Cancer, 2019, 18: 91.
- [12] Ko YS, Jin H, Lee JS, et al. Radioresistant breast cancer cells exhibit increased resistance to chemotherapy and enhanced invasive properties due to cancer stem cells[J]. Oncol Rep, 2018, 40: 3752-3762.
- [13] 中国抗癌协会肝癌专业委员会, 中国抗癌协会临床肿瘤学协作委员会, 中华医学会肝病学会分会肝病学组. 原发性肝癌规范化诊治专家共识[J]. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14: 259-269.
- [14] 中国医师协会介入医师分会. 中国肝细胞癌经动脉化疗栓塞治疗(TACE)临床实践指南[J]. 中华医学杂志, 2018, 98: 3811-3819.
- [15] Li W, Chen Z, Cai C, et al. MicroRNA-505 is involved in the regulation of osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells partially by targeting RUNX2[J]. J Orthop Surg Res, 2020, 15: 143.
- [16] 刘璐璐,赵慧金,李胜棉. 肝细胞癌组织 microRNA-187-3p 表达预后意义[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24: 1059-1064.
- [17] Cui Y, Xu HF, Liu MY, et al. Mechanism of exosomal microRNA-224 in development of hepatocellular carcinoma and its diagnostic and prognostic value[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25: 1890-1898.
- [18] Chen P, Li X, Zhang R, et al. Combinative treatment of  $\beta$ -elemene and cetuximab is sensitive to KRAS mutant colorectal cancer cells by inducing ferroptosis and inhibiting epithelial-mesenchymal transformation[J]. Theranostics, 2020, 10: 5107-5119.
- [19] 褚亚,周石,王黎洲,等. 磷脂酶 C $\beta$ 1 上调表达与肝细胞肝癌增殖和预后相关[J]. 介入放射学杂志, 2018, 27: 29-34.
- [20] 武正山,刘一纬,吴晓峰. 肝癌组织 CCR1 表达与患者预后的关系[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2019, 39: 1737-1740.
- [21] 郑家平,邵国良,罗君,等. 索拉非尼治疗中晚期肝细胞癌安全性和预后因素分析[J]. 介入放射学杂志, 2014, 23: 222-225.
- [22] Huo T, Liu PH, Hsu CY. Staging and restaging for hepatocellular carcinoma: solution of confusion? [J]. Hepatology, 2019, 69: 464-465.

(收稿日期:2020-04-27)

(本文编辑:俞瑞纲)