

网络出版时间: 2016-6-6 13:52:32 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160606.1352.048.html

## 晚期胃癌含铂方案化疗疗效与 miR-192 表达水平的研究

刘威, 顾康生, 李敏, 宁洁, 张逸寅, 黄娜娜

**摘要** 目的 探讨晚期胃癌患者癌组织 miR-192 的表达水平与一线含铂化疗方案疗效的关系。方法 采用 qRT-PCR 法检测 41 例晚期胃癌患者癌组织中 miR-192 的表达水平, 同时选取相匹配的癌旁组织标本 20 例作为对照。所有患者接受含铂方案化疗, 并评价其近期疗效。分析胃癌患者癌组织与癌旁组织中 miR-192 的表达水平及癌组织中 miR-192 的表达水平与临床病理特征和含铂化疗方案疗效的相关性。结果 癌组织中 miR-192 的表达水平高于癌旁组织 ( $Z = -2.045$ ,  $P = 0.041$ ), 癌组织中 miR-192 的表达水平与有无肝转移相关 ( $Z = -2.282$ ,  $P = 0.022$ ), 而与年龄、性别、ECOG 评分、癌组织分化和饮酒习惯无相关性。41 例患者中有 39 例可评价疗效, 其中 1 例完全缓解 (CR)、7 例部分缓解 (PR)、18 例稳定 (SD)、13 例进展 (PD), 客观缓解率 (ORR) 为 20.5%, 疾病控制率 (DCR) 为 66.7%。miR-192 的表达水平与化疗疗效呈正相关 ( $r_s = 0.156$ ,  $P = 0.035$ )。结论 胃癌组织中 miR-192 的表达水平与晚期胃癌患者一线含铂化疗方案的近期疗效有相关性。

**关键词** 胃癌; 微小 RNA; 铂; 化疗

中图分类号 Q 522; R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)07-1027-05

胃癌是我国最常见消化系统恶性肿瘤之一, 早期胃癌患者多无自觉症状, 约 1/3 患者初诊时已有远处转移, 4%~14% 患者转移至肝脏。晚期胃癌无法行根治性切除, 含铂方案化疗是晚期胃癌患者最主要的治疗手段。然而, 由于肿瘤细胞对铂类存在原发或继发耐药现象, 且铂类药物存在许多毒副作用, 使接受铂类化疗患者生活质量明显受到影响, 急需寻找预测铂类疗效的标志物。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类单链小分子 RNA, 其异常表达与肿瘤药物治疗敏感性密切相关<sup>[1]</sup>。本课题组前期通过对胃腺癌细胞株 SGC-7901 和铂类耐药细胞

株 SGC-7901/DDP 中 miRNA 表达谱的研究, 筛选出 miR-192 在 SGC-7901 和 SGC-7901/DDP 中明显差异表达, 相关研究<sup>[2]</sup> 也表明 miR-192 在胃癌组织中表达上调。该研究进一步探讨晚期胃癌患者癌组织中 miR-192 表达水平与含铂化疗方案疗效的关系, 为胃癌患者制定个体化化疗方案、为是否选择铂类联合方案提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 病例资料** 选取安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科 2014 年 12 月~2015 年 6 月住院的 41 例晚期胃癌初治患者, 其中男 28 例, 女 13 例; 年龄 32~81 岁, 中位年龄 61 岁; 低分化 25 例, 中分化 16 例; 美国东部肿瘤协作组 (ECOG) 体能评分: 0~1 分 29 例, 2 分 12 例; 有饮酒习惯者 16 例, 无饮酒习惯者 25 例。纳入标准: ① 胃镜组织病理学或穿刺细胞学确诊为晚期胃癌; ② 既往未接受过放疗、化疗; ③ 影像学检查证实有可测量的肿瘤靶病灶; ④ ECOG 评分  $\leq 2$  分; ⑤ 无其它恶性肿瘤病史; ⑥ 患者知情同意下至少接受 2 个周期的化疗并配合随访。病理科借取研究对象福尔马林固定石蜡包埋 (formalin fixed paraffin embedded, FFPE) 组织标本及距癌组织 2 cm 以上癌旁组织标本。

**1.1.2 化疗方案** 奥沙利铂 100 mg/m<sup>2</sup> 静滴 (第 1 天) 或顺铂 20 mg 静滴 (第 1 天至第 5 天), 联合口服卡培他滨 1 000 mg/m<sup>2</sup>, 每 d 2 次 (第 1~14 天), 或替吉奥胶囊 25 mg/m<sup>2</sup>, 每 d 2 次 (第 1~14 天)。21 d 为 1 周期。

**1.1.3 疗效评价** 治疗 2 个周期后按照 RECIST1.1 版标准<sup>[3]</sup> 评价疗效, 观察指标为完全缓解 (complete response, CR)、部分缓解 (partial response, PR)、稳定 (stable disease, SD) 和进展 (progressive disease, PD)。本组患者肿瘤靶病灶为影像学检查 CT 或 MRI 测量所得最大径  $\geq 10$  mm 的病灶, 同一患者化疗前后使用同一种影像学方法评估, CT 或 MRI 检查结果均由同一检查者评估。若研究对象出

2016-03-23 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 140805MH203)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科, 合肥 230022

作者简介: 刘威, 男, 硕士研究生;

顾康生, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-

mail: 13805692145@163.com

现可能为 PD 的临床表现可提前评价疗效,该研究中 CR + PR 归为化疗有效组,PD 归为化疗无效组,以 CR + PR 计算客观缓解率(objective response rate, ORR),以 CR + PR + SD 计算疾病控制率(disease control rate, DCR)。

**1.1.4 实验试剂与仪器** miRNA 提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司;逆转录和荧光定量多聚酶链反应(real time quantitative PCR, qRT-PCR)试剂盒购自江苏南通 Biomics 公司;miR-192 及内参 U6 特异性检测引物由江苏南通 Biomics 公司设计合成;Mx3000P qRT-PCR 检测系统由安徽医科大学第一附属医院中心实验室提供。

## 1.2 方法

**1.2.1 FFPE 组织中 miRNA 的提取** 按试剂盒说明书操作,步骤简述如下:①切取 3 片 10  $\mu\text{m}$  厚组织置于 2 ml 无 RNA 酶的 EP 管中,加入 1 ml 二甲苯,剧烈振荡 10 s,室温下 16 000 r/min 离心 2 min,弃上清液;②加 1 ml 100% 乙醇溶液,剧烈混匀后,室温 16 000 r/min 离心 2 min,弃上清液;③风干后加入 150  $\mu\text{l}$  PKD 缓冲液及 10  $\mu\text{l}$  蛋白酶 K,振荡混匀 56  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min,然后 80  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min;④冰上孵育 3 min 20 000 r/min 离心 15 min 后转移上清液置于新的 EP 管中;⑤加入 16  $\mu\text{l}$  DNA 酶增强液及 10  $\mu\text{l}$  DNA 酶 I,混匀后室温孵育 15 min;⑥加入 320  $\mu\text{l}$  RBC 缓冲液及 1 120  $\mu\text{l}$  100% 乙醇溶液,混匀后取 680  $\mu\text{l}$  置于过滤柱中,10 000 r/min 离心 20 s,弃滤液,重复上述过程至全部样本通过过滤柱;⑦加 500  $\mu\text{l}$  RPE 缓冲液,10 000 r/min 离心 20 s,弃滤液,重复上述步骤 1 次;⑧将 miRNeasy MinElute 离心管置于新的收集管中,14 000 r/min 离心 5 min,弃滤液;⑨将 miRNeasy MinElute 离心管置于新的 RNA 收集管中,加 30  $\mu\text{l}$  无 RNA 酶水,14 000 r/min 离心 1 min,使用 NanoDrop<sup>TM</sup> 1000 spectrophotometer 测定总 RNA 纯度,用光密度(optical density, OD)表示,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值在 1.8 ~ 2.1。将提取的 RNA 置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中冻存备用。

**1.2.2 逆转录与 qRT-PCR 检测** 参照 EzOmics<sup>TM</sup> One-Step qPCR Kit 说明书进行 qRT-PCR,以 U6 为内参,加入 3  $\mu\text{l}$  总 RNA 提取液,再加 miR-192、U6 特异性逆转录引物、上游及下游引物、2  $\times$  Master Mix 配置成 25  $\mu\text{l}$  反应体系,不足部分用无 RNase 的 DEPC-H<sub>2</sub>O 补齐。将准备好反应物的 PCR 8 联管放

入 Mx3000P qRT-PCR 检测系统。反应参数设置为:42  $^{\circ}\text{C}$  逆转录 30 min;95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 20 s、60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s、72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,共 40 个循环,并在 72  $^{\circ}\text{C}$  收集荧光信号。 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{miR-192}} - \text{Ct}_{\text{U6}}$ ,  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  表示晚期胃癌患者 FFPE 组织中 miR-192 相对表达量<sup>[4]</sup>。实验重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 使用 SPSS 17.0 软件进行分析。对 Mx3000P qRT-PCR 检测软件导出的数据进行 Mann-Whitney U 检验,通过受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve, ROC)判断 miR-192 表达水平对晚期胃癌一线含铂方案化疗疗效的预测价值。

## 2 结果

**2.1 晚期胃癌患者癌及癌旁组织中 miR-192 的表达** 胃癌患者癌与癌旁组织中 miR-192 相对表达量中位数和四分位数间距分别为 0.055 和 0.038、0.105 和 0.051,平均值和标准差分别为 0.118 和 0.053、0.127 和 0.054,胃癌患者癌组织 miR-192 相对表达量高于癌旁组织( $Z = -2.045$ ,  $P = 0.041$ )。见图 1。

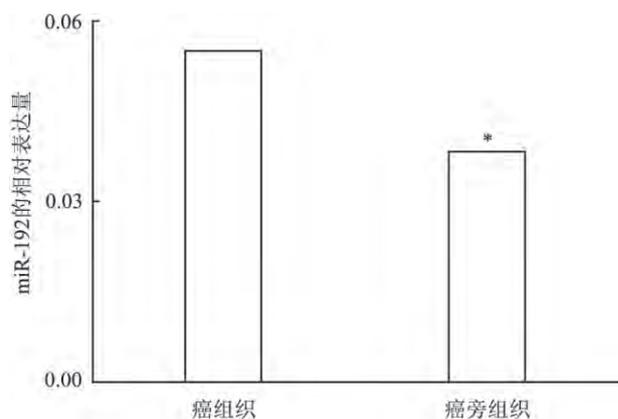


图1 miR-192 在胃癌癌组织和癌旁组织中的相对表达量与癌组织比较: \*  $P < 0.05$

**2.2 晚期胃癌患者化疗有效组及无效组 miR-192 的表达** 39 例可评价疗效的胃癌患者中化疗有效组 8 例,无效组 13 例,miR-192 相对表达量中位数和四分位数间距分别为 0.089 和 0.022、0.214 和 0.409,平均值和标准差分别为 0.238 和 0.135、0.406 和 0.143,化疗有效组 miR-192 相对表达量高于无效组( $Z = -2.287$ ,  $P = 0.010$ )。见图 2。

**2.3 晚期胃癌患者癌组织中 miR-192 PCR 反应**

表1 胃癌患者癌组织中 miR-192 表达变化与临床病理特征的关系

临床病理参数	n	百分比 (%)	$2^{-\Delta\Delta Ct} [M(P_{25}, P_{75})]$	Z 值	P 值
性别				-0.084	0.933
男	28	68	0.031(0.008 0.105)		
女	13	32	0.033(0.014 0.122)		
年龄(岁)				-0.241	0.810
≥65	25	61	0.032(0.009 0.133)		
<65	16	39	0.029(0.011 0.097)		
ECOG 评分(分)				-1.862	0.063
0~1	29	71	0.041(0.021 0.125)		
2	12	29	0.011(0.004 0.085)		
癌组织分化				-0.668	0.504
高+中	16	39	0.037(0.022 0.101)		
低+差	25	61	0.030(0.006 0.132)		
肝转移				-2.282	0.022
有	14	34	0.104(0.022 0.472)		
无	27	66	0.022(0.006 0.043)		
饮酒				-1.629	0.103
有	23	56	0.024(0.006 0.099)		
无	18	44	0.048(0.022 0.211)		

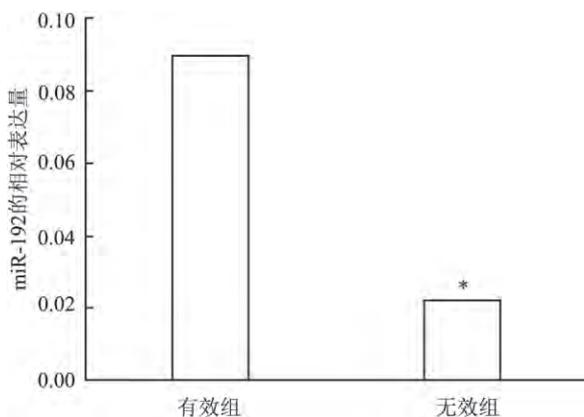


图2 胃癌患者含铂化疗有效组和无效组 miR-192 的相对表达量与有效组比较: \* P < 0.05

PCR 反应扩增曲线见图 3A ,PCR 产物溶解曲线见图 3B 癌组织中提取的 miR-192 无非特异性扩增 ,有良好的扩增效率。

**2.4 晚期胃癌患者癌组织中 miR-192 的表达与临床病理特征的关系** 晚期胃癌患者癌组织中 miR-192 的表达水平与有无肝转移相关( P < 0.05) ,而与年龄、性别、ECOG 评分、癌组织分化和饮酒习惯无相关性。见表 1。

**2.5 晚期胃癌患者癌组织中 miR-192 的表达与含铂化疗方案疗效的关系** 41 例患者中有 2 例失访 ,其余 39 例可评价疗效 ,其中 1 例 CR、7 例 PR、18 例 SD、13 例 PD ,ORR 为 20.5% ,DCR 为 66.7% ,miR-192 的相对表达量与化疗疗效呈正相关性( Spearman

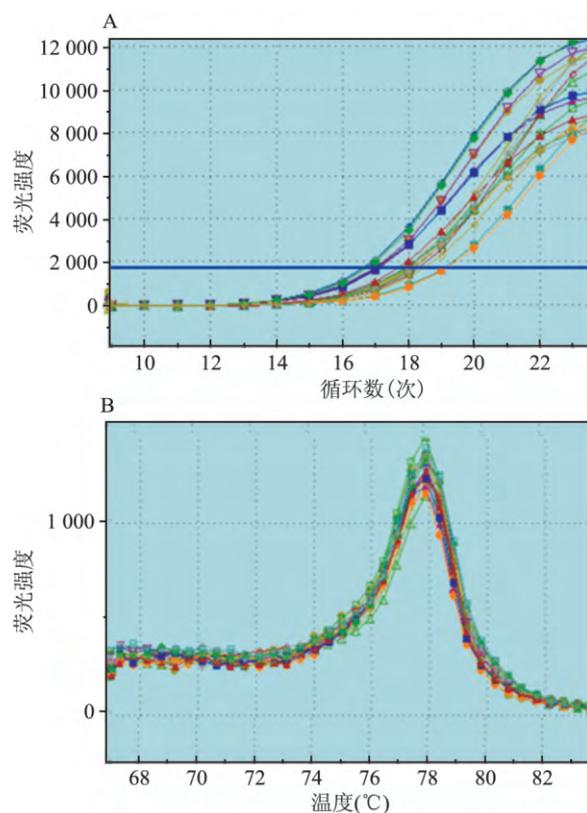


图3 miR-192 PCR 反应 A: 扩增曲线; B: 溶解曲线

秩相关系数  $r_s = 0.156$  , $P = 0.035$ ) 。进一步采用 ROC 曲线判断 miR-192 表达水平预测化疗后疾病控制的最佳截断值 ,曲线下面积( area under the ROC curve ,AUC) 为 0.711 ,95% 置信区间: 0.542 ~

0.880, 取约登指数的最大值为 0.497 时, miR-192 的相对表达量为 0.027, 预测含铂方案化疗后疾病控制的灵敏度为 0.857, 特异度为 0.640。见图 4。

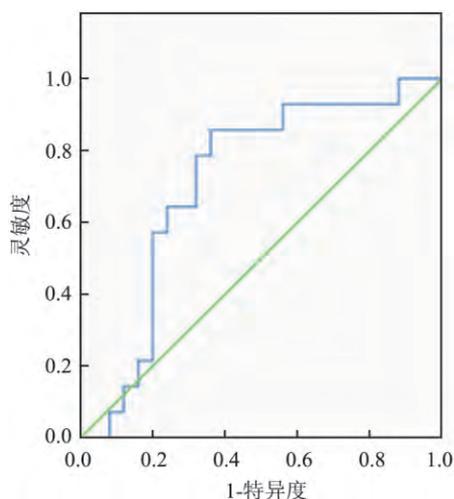


图4 miR-192 表达水平预测胃癌患者含铂方案化疗近期疗效的 ROC 曲线

### 3 讨论

胃癌是一种高发病率的恶性肿瘤, 根据 2015 年《肿瘤登记年报》数据, 中国胃癌发病率位居恶性肿瘤第二位, 死亡率居第三位<sup>[5]</sup>。晚期胃癌患者预后差, 5 年生存率 < 10%, 因此, 化疗成为晚期患者改善预后的重要方法。目前, 铂类化疗药物, 特别是草酸铂和顺铂, 是晚期胃癌治疗的基石。然而, 由于肿瘤细胞对铂类化疗药物存在原发或继发耐药, 使得临床应用时仅部分患者对以铂类为基础的化疗方案敏感, 且铂类有较严重的不良反应, 因而寻找预测铂类化疗疗效的敏感性标志物成为实现胃癌个体化治疗的关注点。

miRNA 是一类长度约 22 个核苷酸的单链非编码小分子 RNA, 其通过与靶 mRNA 分子的 3' 端非编码区互补匹配, 在转录后水平对目的基因的表达实现负调控, 导致靶 mRNA 分子降解或翻译受到抑制<sup>[6-7]</sup>。miRNA 是近年来研究的热点, 其异常表达与肿瘤化疗敏感性密切相关, 可能会成为对肿瘤化疗疗效有潜在预测作用的新型标志物。张芳等<sup>[8]</sup>应用 qRT-PCR 及质粒转染的方法表明 miR-192 在转录后水平靶向负调控促凋亡基因 Bim 的表达, 从而诱导肺癌细胞顺铂耐药。Odenthal et al<sup>[9]</sup> 研究结果表明 miR-192 的表达与新辅助化疗疗效相关, 化

疗后有效患者 miR-192 表达显著下调。miRNA 的异常表达与卵巢癌含铂方案化疗敏感性密切相关<sup>[10]</sup>。我们前期细胞实验提示 miR-192 在 SGC-7901 和 SGC-7901/DDP 中明显差异表达, 进一步验证了 miR-192 通过靶向调控核苷酸切除修复途径中 ERCC3 和 ERCC4 的表达, 增加胃癌细胞的 DNA 损伤修复能力, 从而诱导胃癌细胞顺铂耐药。然而, 在晚期胃癌患者组织中 miR-192 的表达与含铂方案化疗敏感性的研究尚未见报道, 故本研究进一步探讨胃癌患者癌组织中 miR-192 的表达与含铂方案化疗有无相关性。

本研究通过 qRT-PCR 法分析了晚期初治胃癌患者癌组织与相匹配癌旁组织中 miR-192 的表达, 显示其在癌组织表达上调, 与研究<sup>[2, 11]</sup> 结果一致。肝转移患者 miR-192 表达水平较无转移者升高, 与研究<sup>[12]</sup> 结论相符, 提示 miR-192 可能在胃癌发生发展过程中充当癌基因的作用。为进一步探讨 miR-192 在晚期胃癌患者一线含铂方案化疗疗效预测中的可能作用, 本研究观察了癌组织中 miR-192 的表达与化疗疗效的关系, 显示含铂方案化疗有效组 miR-192 的表达量显著高于无效组, miR-192 的表达水平与一线含铂化疗疗效呈正相关性, 这与前期研究 SGC7901/DDP 相对于 SGC7901 miR-192 的表达水平下调相符合。与此同时, 本研究进一步分析了 miR-192 表达水平预测晚期胃癌患者一线含铂方案化疗后疾病控制的最佳截断值, 表明 miR-192 相对表达量大于 0.027 时, 接受含铂方案化疗可能获得化疗后疾病控制。但本实验获得的 ROC 曲线的 AUC 值为 0.711, 且约登指数较小, 预测胃癌患者化疗疗效的检验效能一般, 有待于进一步增加样本量提高效能。

同时, 本实验也存在一些不足之处: ① 样本量较少, 可能对实验结果造成偏倚; ② 由于晚期胃癌患者胃镜取材量不足或取材不当, 造成检测结果阴性。

综上所述, 晚期胃癌患者癌组织较癌旁组织中 miR-192 表达水平上调, miR-192 的表达水平与晚期胃癌患者一线含铂方案化疗的近期疗效相关。但由于随访时间短和样本量有限, 尚未进行晚期胃癌患者的远期生存分析, 相关研究结果尚需要大样本前瞻随机性对照研究加以验证, 以期早日应用于肿瘤患者的个体化治疗。

## 参考文献

- [1] Huang D Z, Wang H Y, Liu R, et al. miRNA27a is a biomarker for predicting chemosensitivity and prognosis in metastatic or recurrent gastric cancer[J]. *J Cell Biochem* 2014, 115(3): 549–56.
- [2] Xu Y J, Fan Y. MiR-215/192 participates in gastric cancer progression[J]. *Clin Transl Oncol* 2015, 17(1): 34–40.
- [3] Watanabe H, Okada M, Kaji Y, et al. New response evaluation criteria insolid tumours-revised RECIST guideline( version 1.1) [J]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2009, 36(13): 2495–501.
- [4] Tanaka K, Miyata H, Yamasaki M, et al. Circulating miR-200c levelssignificantly predict response to chemotherapy and prognosis of patients undergoing neoadjuvant chemotherapy for esophageal cancer[J]. *Ann Surg Oncol* 2013, 20 Suppl 3: S607–15.
- [5] 陈万青, 赵平. 中国肿瘤登记年报[M]. 5版. 北京: 军事医学科学出版社 2015.
- [6] Siomi H, Siomi M C. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals[J]. *Mol Cell* 2010, 38(3): 323–32.
- [7] Stefani G, Slack F J. Small non-coding RNAs in animal development[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, 9(3): 219–30.
- [8] 张芳, 李洋, 吴衢, 等. MiR-192 靶向负调控 Bim 表达诱导肺癌顺铂耐药[J]. *中国肺癌杂志* 2014, 17(5): 384–90.
- [9] Odenthal M, Bollschweiler E, Grimminger P P, et al. MicroRNA profiling in locally advanced esophageal cancer indicates a high potential of miR-192 in prediction of multimodality therapy response [J]. *Int J Cancer* 2013, 133(10): 2454–63.
- [10] Gadducci A, Sergiampietri C, Lanfredini N, et al. Micro-RNAs and ovariancancer: the state of art and perspectives ofclinical research[J]. *Gynecol Endocrinol* 2014, 30(4): 266–71.
- [11] Jin Z, Selaru F M, Cheng Y, et al. MicroRNA-192 and -215 are upregulated in human gastric cancer *in vivo* and suppress ALCAM expression *in vitro* [J]. *Oncogene* 2011, 30(13): 1577–85.
- [12] Chen Q, Ge X, Zhang Y, et al. Plasma miR-122 and miR-192 as potential novel biomarkers for the early detection of distant metastasis of gastric cancer[J]. *Oncol Rep* 2014, 31(4): 1863–70.

## On the correlation between miR-192 expression and the efficacy of platinum-based chemotherapy in patients with advanced gastric carcinoma

Liu Wei, Gu Kangsheng, Li Min, et al

(Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the correlation between miR-192 expression in the tumor tissues and the efficacy of first-line platinum-based chemotherapy in the patients of advanced gastric carcinoma. **Methods** The miR-192 expression was measured by real-time quantitative PCR in the tumor tissues from 41 patients with advanced gastric carcinoma and in the adjacent non-tumorous normal tissues from 20 patients. All the enrolled patients were received platinum-based chemotherapy and the chemotherapeutic efficacy was evaluated. miR-192 expression level in tumorous and non-tumorous component and its correlation with clinicopathological characteristics and platinum-based chemotherapy efficacy were evaluated. **Results** The miR-192 expression was higher inside the tumor tissues than adjacent non-tumorous normal tissues ( $Z = -2.045, P = 0.041$ ) and its level in carcinomatous component was statistically correlated with the presence of liver metastasis ( $Z = -2.282, P = 0.022$ ), while independent of age, sex, ECOG score, tumor grade and drinking behavior. Thirty-nine patients were considered evaluable for efficacy. There were CR in 1 case, PR in 7 cases, SD in 18 cases, and PD in 13 cases. ORR was 20.5% and DCR was 66.7%. miR-192 expression level was positively correlated with chemotherapy efficacy ( $r_s = 0.156, P = 0.035$ ). **Conclusion** miR-192 expression in the tumor tissues is correlated with the short-term chemotherapeutic efficacy of patients with advanced gastric carcinoma treated with platinum-based chemotherapy.

**Key words** gastric carcinoma; microRNA; platinum; chemotherapy