

MicroRNA在晚期大肠癌一线化疗 疗效中的预测作用

胡劲松 蔡三军

复旦大学附属肿瘤医院大肠外科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

[摘要] **背景与目的:** 大肠癌是一种高发病率的恶性肿瘤, 化疗可以减少肿瘤的生长和复发。当前较为重要的是探究标志物能够预测化疗耐药标志物, 从而帮助确定治疗方案。**方法:** 选取2007年11月—2010年5月复旦大学附属肿瘤医院大肠外科IV期大肠癌患者手术标本, 术后患者都使用大肠癌术后规范化一线化疗(希罗达+奥沙利铂)。选取化疗耐药与有效癌组织标本各3例共6例使用microRNA芯片检测。筛选出有统计学意义的miRNA: miR-4299、miR-196b、miR-324-5p、miR-455-3p和miR-939, 将候选miRNA在100例IV期大肠癌患者手术癌组织标本中进行real-time PCR验证。**结果:** 通过芯片筛选, 共5个miRNA可能与大肠癌一线化疗耐药有关。miR-4299和miR-196b对化疗耐药有显著诊断意义。miR-4299的AUC为0.784, 而miR-196b的AUC为0.647。两个联合诊断AUC为0.848, 敏感度和特异度分别为67.9%和90.9%。**结论:** miR-4299和miR-196b有可能作为诊断对大肠癌一线化疗耐药的标志物。

[关键词] 大肠癌; 化疗; 标志物; miR-4299; miR-196b

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2013.07.004

中图分类号: R735.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2013)07-0499-06

The microRNA of advanced colorectal cancer predict efficacy of first-line chemotherapy HU Jin-song, CAI San-jun (Department of Colorectal Cancer, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: CAI San-jun E-mail: caisanjun@gmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** Colorectal cancer (CRC) is the most frequently occurring primary malignant tumor. Chemotherapy can reduce the risk of local and distant relapse. Therefore, it is very important to find new biomarkers that can predict chemoresistant and help in treatment decisions. **Methods:** In this study, we examined the expression levels of 1 200 human miRNAs in 6 CRC tissues, using miRNA profiling assay arrays. A validation study was done to corroborate a subset of the results, including expression levels of miR-4299, miR-196b, miR-324-5p, miR-455-3p and miR-939, by analyzing 100 specimens of stage IV colorectal adenocarcinoma (not respond and respond to the chemotherapy) to quantitative real-time PCR. We modeled the relationship between the expression levels of these miRNAs and the survival rate of 100 CRC patients by Kaplan-Meier method. **Results:** Expression profiles in CRCs suggested that 5 miRNAs were candidate markers associated with the chemoresistance of colorectal cancer. We found that miR-4299 and -196b had significant diagnostic value for chemoresistance CRC. miR-4299 yielded an AUC (the areas under the ROC curve) of 0.784 and miR-196b yielded an AUC of 0.647 in discriminating CRC from controls. Combined ROC analysis using these 2 miRNAs revealed an elevated AUC of 0.848 with 67.9% sensitivity and 90.9% specificity in discriminating chemoresistance CRC. The low level of miR-4299 expression and the high level of -196b expression are significantly correlated with the good survival of CRC patients. **Conclusion:** These data suggest that miR-4299 and -196b have strong potential as novel biomarkers for chemoresistant detection of colorectal cancer.

[Key words] Colorectal cancer; Chemotherapy; Biomarkers; miR-4299; miR-196b

MicroRNAs(miRNAs)是一类广泛存在于多种生物体内的长度约18~25个核苷酸的非编码小分子RNA,具有调节基因表达的功能。它和mRNA存在互补序列,通常导致翻译的抑制和基因的沉默。异常的miRNAs表达和很多疾病密切相关,miRNA的失调也和很多类型肿瘤有密切关系^[1-2]。miRNA参与细胞增殖、分化和凋亡等多种重要细胞活动的调控。miRNA基因以多种形式存在于基因组中,近来研究发现miRNA能控制蛋白的表达,miRNA修饰表达能影响药物治疗效果^[3]。大肠癌是我国最常见的消化系统恶性肿瘤之一,化疗是进展期大肠癌治疗的重要临床措施^[4]。以手术为主的多学科综合治疗已经得到广泛的认同,全身化疗越来越受到重视,其目的是消灭患者体内的微转移灶,增加治愈机会,以延长患者生命,改善生活质量。本课题通过对IV期大肠癌组织标本miRNA表达谱的研究,获得对一线化疗希罗达+奥沙利铂(XELOX)耐药诊断的miRNA,探讨其与临床病理特征的关系,为大肠癌患者制定个体化化疗方案提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 临床资料

选取2007年11月—2010年5月在复旦大学附属肿瘤医院大肠外科行原发病灶切除术的IV期大肠癌患者的手术标本100例,术后进行了规范标准的一线XELOX方案化疗。本课题分为两部分,第一部分在100例患者中配对选择对化疗耐药和有效标本各3例,共6例。第二部分为验证部分,共100例患者癌组织标本,分为耐药组和有效组。

1.2 试剂

总RNA提取使用mirvana miRNA Isolation kit (Ambion, USA), miRNA表达谱使用Agilent human miRNA v162.0 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)。miRNA扩增和逆转录使用cDNA Synthesis Kit(EXIQON, Denmark), Master Mix(EXIQON, Denmark)。

1.3 方法

1.3.1 化疗后评估标准及分组治疗反应依据 RECIST(version1.0)

每9周进行临床和CT检查,按照化疗后评估标准分为部分缓解(partial response, PR)和完全缓解(complete response, CR),并归为有效组($n=43$);稳定(stable disease, SD)和进展(progressive disease, PD)归为耐药组($n=57$),所有CT检查都由同一检查者评估。

1.3.2 大肠癌miRNA基因芯片表达检测及RT-PCR

所有组织标本为我院标本库-80℃冰箱保存,研究者对实验标本采用双盲。总RNA提取使用miRNA Isolation kit。结果测定使用NanoDrop ND-1000分光光度计。miRNA表达谱使用Agilent human miRNA v162.0^[5]。芯片共有探针1367个,表达对照为各研究组织标本中的U6含量。根据miRNA芯片结果共选择5个有统计学差异的miRNA进行大样本验证,使用RT-PCR^[6],首先使用miRNA Isolation kit在组织标本中提取总RNA,测定各组总RNA的浓度,然后转录与扩增使用cDNA synthesis kit和Mix,共40个循环的PCR扩增。反应体系(共10 μL): Master Mix 5 μL, Primer Forward (1 μmol)1 μL, Primer Reverse(1 μmol)1 μL, DNA 1 μL, MiliQ 2 μL。两步法扩增条件: 95℃ 10 min, 1个循环; 95℃ 30 s, 60℃ 1 min, 共40个循环。所有数据以各研究组织标本中的U6为内参照。PCR产物取10 μL进行2%琼脂糖凝胶电泳,检测扩增条带大小。所有RT-PCR重复3次,取平均值。

1.4 统计学处理

所有数据使用SPSS 19.0分析软件(SPSS, Inc, Chicago, IL)处理。对不同组间比较使用Mann-Whitney U检验或者Kruskall-Wallis检验。ROC曲线评判诊断价值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 临床资料

耐药组57例患者以结肠癌为多，中分化腺癌和低分化腺癌为主；肿瘤组织全部侵入浆膜或浆膜外；1~3枚淋巴结转移28例，3枚以上淋巴结转移29例。TNM分期：全部为IV期，其中肝转移48例，肺转移7例。有效组43例患者以

直肠癌为多，中分化腺癌为主；肿瘤组织全部侵入浆膜或浆膜外；1~3枚淋巴结转移29例，3枚以上淋巴结转移14例。TNM分期：全部为IV期，其中肝转移29例，肺转移15例。两组患者在性别、年龄、标本部位方面差异无统计学意义($P>0.05$)，但在肺转移方面差异有统计学意义($P=0.007$ ，表1)。

表 1 大肠癌患者临床资料

Tab. 1 Clinicopathological factors of colorectal cancer patients

Factors	Non-responders (n=57)	Responders (n=43)	P	[n(%)]
Age ($\bar{x}\pm s$)	57.3±10.1	58.0±12.5	0.813	
Gender			0.226	
Male	33(57.9)	30(69.8)		
Female	24(42.1)	13(30.2)		
Pathological type				
Adenocarcinoma	57(100)	43(100)		
Histological grade			0.797	
Well differentiated	-	-		
Moderately differentiated	33(57.9)	26(60.5)		
Poorly differentiated	24(42.1)	17(39.5)		
Infiltration depth ss, se, si	All	All		
Lymphatic metastasis			0.068	
≤3	28(49.1)	29(67.4)		
>3	29(50.9)	14(32.6)		
Liver metastasis			0.050	
No	9(15.8)	14(32.6)		
Yes	48(84.2)	29(67.4)		
Lung metastasis			0.007	
No	50(87.7)	28(65.1)		
Yes	7(12.3)	15(24.9)		
Location of colorectal cancer			0.113	
Rectum	23(40.4)	27(62.8)		
Left colonic carcinoma	21(36.8)	6(14.0)		
Right colonic carcinoma	13(22.8)	10(23.3)		

ss: Subserosa; se: Penetration of serosa; si: Invasion of adjacent structures.

2.2 大肠癌miRNA基因芯片表达

选取化疗耐药(耐药组n=3)和化疗有效(有效组n=3)共6例使用miRNA基因芯片检测(图1)。miRNA基因芯片共有探针1 367个，其中人miRNA探针共1 200个，共发现5个差异有统计学意义的miRNA。分别为miR-4299、miR-196b、miR-324-5p、miR-939、miR-455-3p，其中miR-196b、miR-324-5p、miR-455-3p在耐药组中低表达，miR-4299、miR-939在耐药组中高表达(表2)。

2.3 miR-4299、miR-196b、miR-324-5p、miR-939和miR-455-3p在大肠癌中的表达

通过RT-PCR验证研究miRNA在大肠癌中的表达，研究分两组，耐药组和有效药组共100例。miR-4299耐药组为5.51±4.78，有效组为1.90±2.41。miR-196b耐药组为10.67±7.72，有效组为20.74±26.47。miR-324-5p耐药组为0.33±1.18，有效组为0.58±0.88。miR-455-3p耐药组为1.29±3.49，有效组为3.00±4.93。miR-939耐药组为2.65±13.04，有效组为0.10±0.39。两组miR-4299和miR-196b的表达差异有统计学意义

($P < 0.01$), miR-324-5p、miR-939和miR-455-3p 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$, 图2)。

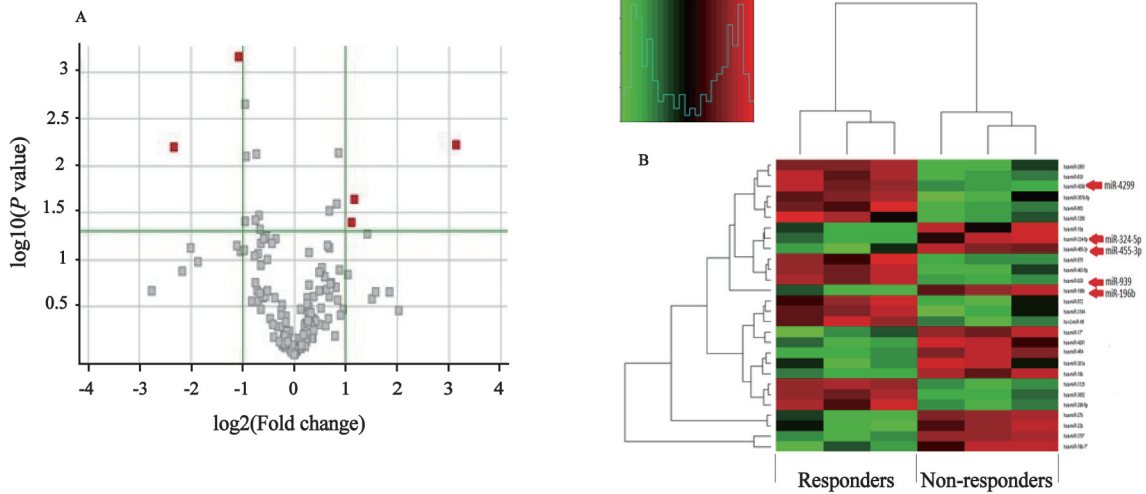


图 1 大肠癌miRNA基因芯片图

Fig. 1 Dysregulation of miRNA in human mCRC by the miRNA profiling analysis

A: Volcano plot illustrating the biological and statistical significances of differential miRNA expressions between non-respond and respond in human colorectal cancer; B: Heat map diagram generated 5 significantly dysregulated miRNAs in their human CRCs.

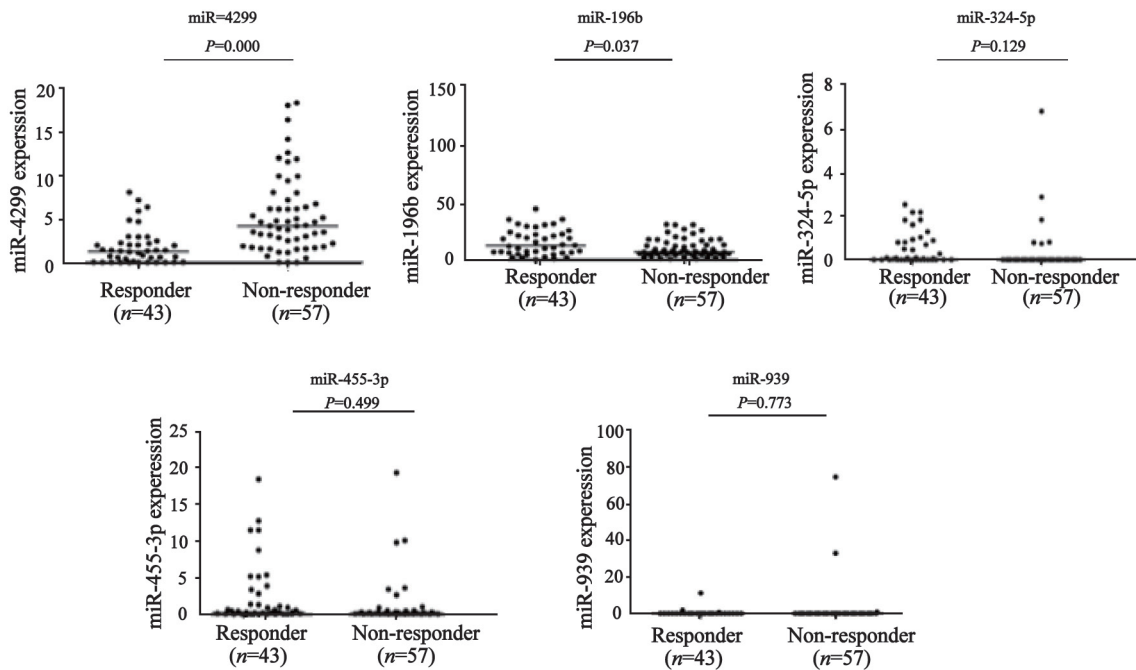


图 2 差异性miR-4299、miR-196b、miR-324-5p、miR-455-3p和miR-939在有效组合耐药组中的散点图

Fig. 2 Dots indicate of the relative quantification (RQ) values of miR-4299, miR-196b, miR-324-5p, miR-455-3p and miR-939 expression levels, normalized by U6

表2 对一线化疗(希罗达+奥沙利铂)耐药组和敏感组比较差异 miRNA表达

Tab. 2 Significant dysregulation of miRNAs in chemoresistant

CRCs		
miRNA	P	Mean fold change
hsa-miR-196b	0.005 9	8.502
hsa-miR-324-5p	0.022 4	2.28
hsa-miR-455-3p	0.039 1	2.082
hsa-miR-4299	0.006 2	0.191
hsa-miR-939	0.000 7	0.472

hsa: Represent the genes acquired from human-being.

2.4 miR-4299和miR-196b对耐药大肠癌诊断的价值

ROC曲线分析表明, miR-4299的AUC为

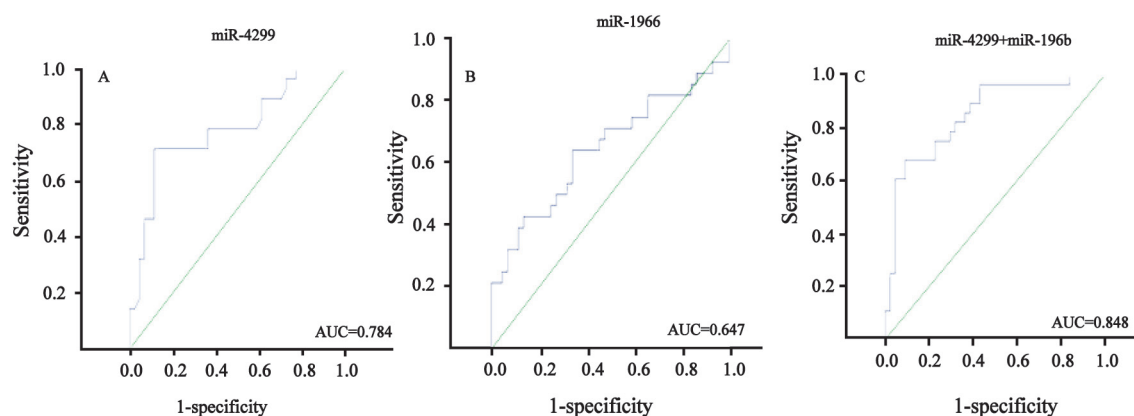


图3 miR-4299、miR-196b、miR-4299+miR-196b的ROC曲线分析图

Fig. 3 Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis using miR-4299 and miR-196b for discriminating colorectal tumors of chemoresistance

A: miR-4299 yielded an AUC (the areas under the ROC curve) of 0.784 (95%CI: 0.670-0.897) with 71.4% sensitivity and 88.6% specificity in discriminating non-responder; B: miR-196b yielded AUC of 0.647 for miR-196b (95%CI: 0.508-0.786) with 64.3% sensitivity and 65.9% specificity of in discriminating non-responder; C: Combined ROC analysis revealed an elevated AUC of 0.848 (95%CI: 0.756-0.941) with 67.9% sensitivity and 90.9% specificity in discriminating non-responder.

3 讨论

大肠癌为常见的消化系统肿瘤之一, 治疗主要以手术为主的综合性治疗。而手术患者中约50%在术后5年内出现复发或转移。术前新辅助化疗可降低大肠癌分期、改善术式选择、提高近期疗效; 术后化疗可抑制大肠癌复发、治疗肿瘤转移。Tournigand等^[7]的一项Ⅲ期随机研究显示, 化疗使转移性大肠癌患者的总生存期延长20.6~21.5个月。因此, 化疗的成败将直接关系大肠癌患者的预后^[8]。其疗效取决于肿

0.784(95% CI: 0.670 ~0.897), miR-196b的AUC为0.647(95%CI: 0.508~0.786), 表明miR-4299对耐药大肠癌有较好的诊断价值。根据ROC曲线获得miR-4299的截断值为1.459, 敏感度为71.4%, 特异度为88.6%(图3A)。miR-196b的截断值为9.454, 敏感度为64.3%, 特异度为65.9%(图3B)。miR-4299联合miR-196b的AUC为0.848 (95% CI: 0.756~0.941), 敏感度为67.9%, 特异度为90.9%(图3C), 能进一步提高对耐药大肠癌的诊断价值。

瘤对化疗药物的敏感程度, 这由肿瘤自身的生物学特性决定。究其原因可能是由于肿瘤的多药耐药(multidrug resistance, MDR)。MDR指肿瘤细胞被一种药物诱发耐药后, 同时对其他多种结构和作用机制完全不同的药物产生交叉耐药的一种现象^[9]。MDR是一个多基因参与、涉及多种基因产物的复杂过程。满意的化疗是指在获得有效的治疗效果的同时, 药物毒性更小。若能尽早预测大肠癌患者对化疗药物的耐药, 可增加医疗效费比, 缩短患者化疗时间, 减少不良反应。

近年研究表明, miRNA在多种恶性肿瘤

中表达对肿瘤具有诊断价值并参与肿瘤的进展^[10-11]。本研究通过1 200个探针针对大肠癌组织标本进行筛选, 筛选同时对组织标本进行配对研究, 以减少干扰因素。结果显示, miR-4299、miR-196b、miR-324-5p、miR-939、miR-455-3p可能与大肠癌一线化疗耐药有关。通过对miR-4299和miR-196b进行ROC曲线的分析, miR-4299和miR-196b对化疗耐药有明显诊断意义。miR-4299的AUC为0.784, 而miR-196b的AUC为0.647。两个联合的AUC升高为0.848, 敏感度和特异度分别为67.9%和90.9%, 较单个miR敏感性和特异性有所提高, 更有应用价值。Svoboda等^[12]曾对20例新辅助放疗化疗术后患者组织标本进行研究, 通过microRNA芯片检测, 认为miR-196b有可能作为预测放疗化疗标志物, 但该文献没有表明能否单独对耐药患者进行预测, 且研究标本较少。Popovic等^[13]报道miR-196b过表达对正常骨髓造血细胞增殖和生存有显著影响。Tsaihe等^[14]报道miR-196b在胃癌组织中频繁表达为低甲基化, 有可能作为肿瘤标志物存在。

总之, miR-4299和miR-196b有可能作为诊断对大肠癌一线化疗耐药的标志物, 尤其对术后化疗有一定的指导意义。但需要更多大样本的其他肿瘤数据加以证实和深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] HRAŠOVEC S, GLAVAČ D. MicroRNAs as novel biomarkers in colorectal cancer [J] . *Front Genet*, 2012, 3: 180.
- [2] FABER C, KIRCHNER T, HLUBEK F. The impact of microRNAs on colorectal cancer [J] . *Virchows Arch*, 2009, 454(4): 359-367.
- [3] ROSSI L, BONMASSAR E, FARAONI I. Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil in vitro [J] . *Pharmacol Res*, 2007, 56(3): 248-253.
- [4] 汪晓东, 曹霖, 曾天芳, 等. 多学科协作诊治模式下新辅助/辅助化疗联合结直肠癌手术的临床效果 [J] . *中国普外基础与临床杂志*, 2008, 15(8): 615-619.
- [5] HUGHES T R, MAO M, JONES A R, et al. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer [J] . *Nat Biotechnol*, 2001, 19(4): 342-347.
- [6] AKÇAKAYA P, EKELUND S, KOLOSENKO I, et al. miR-185 and miR-133b deregulation is associated with overall survival and metastasis in colorectal cancer [J] . *Int J Oncol*, 2011, 39(2): 311-318.
- [7] TOURNIGAND C, ANDRE T, ACHILLE E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study [J] . *J Clin Oncol*, 2004, 22(2): 229-237.
- [8] WOODCOCK T M. Colorectal cancer chemotherapy [J] . *J Ky Med Assoc*, 2009, 107(3): 93-94.
- [9] JÄEGER W. Classical resistance mechanisms [J] . *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2009, 47(1): 46-48.
- [10] CALIN G A, FERRACIN M, CIMMINO A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia [J] . *N Engl J Med*, 2005, 353(17): 1793-1801.
- [11] TAKAMIZAWA J, KONISHI H, YANAGISAWA K, et al. Reduced expression, of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival [J] . *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3753-3756.
- [12] SVOBODA M, SANA J, FABIAN P, et al. MicroRNA expression profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients [J] . *Radiat Oncol*, 2012, 7: 195. doi: 10.1186/1748-717X-7-195.
- [13] POPOVI C R, RIESBECK L E, VELU C S, et al. Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization [J] . *Blood*, 2009, 113(14): 3314-3322.
- [14] TSAI K W, HU L Y, WU C W, et al. Epigenetic regulation of miR-196b expression in gastric cancer [J] . *Gene Chromosome Cancer*, 2010, 49(11): 969-980.

(收稿日期: 2013-01-23 修回日期: 2013-05-25)