

晚期乳腺癌胸苷酸合成酶 mRNA 表达与培美曲塞疗效的相关性研究

嵇守荣*, 秦春新, 矫璐宇, 杨建玲, 于浩(威海市立医院乳腺甲状腺外科, 山东威海 264200)

中图分类号 R737.9;R55;R979.1*2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)20-2821-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.20.30

摘要 目的:探讨培美曲塞治疗晚期乳腺癌的临床疗效与胸苷酸合成酶(TS)mRNA表达的关系。方法:选择晚期乳腺癌患者,采用培美曲塞治疗3个疗程,检测肿瘤组织中TS mRNA的表达情况,观察并比较不同化疗疗效与TS mRNA表达的关系。结果:共有58例患者接受了培美曲塞化疗方案并进行了疗效评估,其中完全缓解1例(1.7%),部分缓解19例(32.8%),稳定31例(53.4%),进展7例(12.1%),客观缓解率为34.5%,疾病控制率为87.9%。有55例患者完成了TS mRNA表达检测,其TS mRNA的表达水平为0.04~5.11,中位数为0.62。Mann-Whitney秩和检验结果显示,客观缓解组乳腺癌患者的TS mRNA表达量在不同检测时点均低于无客观缓解组,差异有统计学意义($P<0.05$)。 χ^2 检验结果显示,基线(化疗前)TS mRNA低表达组的客观缓解率(63.3%)明显高于高表达组(36.7%),差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:TS mRNA的表达水平与培美曲塞的疗效相关,这对于预测培美曲塞治疗晚期乳腺癌患者的疗效可能有一定的作用。

关键词 晚期乳腺癌;胸苷酸合成酶mRNA;培美曲塞;疗效;相关性

Relationship of TS mRNA Expression with Therapeutic Efficacy of Pemetrexed in the Treatment of Advanced Breast Cancer

ZHUO Shou-rong, QIN Chun-xin, JIAO Lu-yu, YANG Jian-ling, YU Hao (Dept. of Thyroid Breast Surgery, Weihai Municipal Hospital, Shandong Weihai 264200, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the potential correlation between clinical efficacy of pemetrexed in the treatment of advanced breast cancer and TS mRNA expression. **METHODS:** Patients with advanced breast cancer were recruited in our study. Three cycles of pemetrexed was given to these patients, TS mRNA expression of their tumor tissues were detected. The relationship of therapeutic efficacies of different chemotherapy with TS mRNA expression were observed and compared during the study period. **RESULTS:** 58 patients received pemetrexed chemotherapy and therapeutic efficacies of them were evaluated. One patient (1.7%) had complete response, 19 patients (32.8%) had partial response, 31 patients (53.4%) had stable response and 7 patients (12.1%) has progressive disease. Objective response rate was 34.5%, and disease control rate was 87.9%. TS mRNA expression level of 55 patients with completed TS mRNA expression analysis varied from 0.04 to 5.11, with a median of 0.62. Mann-Whitney rank test showed that, responders had lower TS mRNA expression than nonresponders at all visits, there was statistical significance ($P<0.05$). Chi-square test showed that patients with low expression level of baseline (before chemotherapy) TS mRNA had significantly higher objective response rate (63.3%) than those with high expression (36.7%), there was statistical significance ($P<0.05$). **CONCLUSIONS:** TS mRNA expression level is related to therapeutic efficacy of pemetrexed, which may be useful for predicting therapeutic efficacy of pemetrexed therapy in patients with advanced breast cancer.

KEYWORDS Advanced breast cancer; TS mRNA; Pemetrexed; Therapeutic efficacy; Relationship

晚期乳腺癌患者的治疗主要通过化疗使大多数肿瘤原发和转移病灶降期,从而提高患者生存率和手术治疗的可能性^[1]。目前,主要化疗药物有蒽环类、紫杉醇类和抗代谢类等^[2]。其中,培美曲塞是作用于叶酸代谢途径的多个靶点的抗代谢药,通过抑制胸苷酸合成酶(Thymidylate synthase, TS)、二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate reductase, DHFR)等多种DNA合成酶而抑制叶酸代谢^[3]。这些酶可能是预测培美曲塞化疗疗效的生物标志物。目前,关于TS mRNA表达和培美曲塞疗效相关性的研究主要集中在肺腺癌和胃癌等人群,而关于乳腺癌患者的研究较少。本研究旨在通过临床试验探讨培美曲塞治疗晚期乳腺癌的临床疗效与TS mRNA表达的关系。

1 资料与方法

*副主任医师。研究方向:乳腺癌的早期诊断和综合治疗。电话:0631-5224816。E-mail:zsr1968@hotmail.com

1.1 临床资料

纳入2012年1月—2013年12月在我科诊治的乳腺癌患者。研究对象纳入标准:(1)经病理学诊断的晚期乳腺癌患者(包括T₄N₀M₀~T₄N₂M₁期);(2)患者之前未接受过培美曲塞治疗;(3)年龄≥18岁,且预计生存期>3个月;(4)患者或家属自愿参加本研究并签署知情同意书。排除合并严重心、肝、肾等器官功能障碍及并存其他严重危害生命安全的躯体疾病者。本研究方案经医院医学伦理委员会审核通过。

1.2 研究方法

1.2.1 主要治疗方案 培美曲塞500 mg/m²静脉滴注(10 min, d1),21 d为1个化疗周期,共2~6个周期。首次给药前1周开始补充叶酸和维生素B₁₂。其中,叶酸350~1 000 μg/d(口服),最后1次培美曲塞给药后21 d停药;维生素B₁₂ 100 μg/次,每9周1次(肌肉注射)。培美曲塞用药前1天、给药当天和第2天给予地塞米松口服(4 mg/次,2次/d)。若患者出现严重的血液

系统不良反应[中性粒细胞计数(ANC) $<0.5 \times 10^9 L^{-1}$ 且血小板计数 $\geq 50 \times 10^9 L^{-1}$ 者减少25%的培美曲塞剂量;血小板计数 $< 50 \times 10^9 L^{-1}$ (无论ANC是否降低)者减少50%的培美曲塞剂量]或根据美国癌症研究所(NCI)的常规化疗毒性分级标准(Common toxicity criteria, CTC)评定为3级及以上毒性时进行减量或延迟化疗(延迟化疗超过42 d者视为退出研究);出现疾病严重进展时停止化疗并改用其他治疗方法。

1.2.2 主要试剂 组织总RNA抽提试剂盒购自广州美基生物科技有限公司;逆转录试剂盒(ReverAid First strand cDNA Synthesis Kit)购自美国Thermo Fisher公司;目标基因TS和内参基因磷酸甘油酸激酶(PGK)的PCR引物及探针由上海Invitrogen公司合成。具体序列:5' -GCCTCGGTGTGCCTTCA-3' (上游引物)、5' -CGTGATGTGCGCAATCATG-3' (下游引物)、5' -CATCGCCAGCTACGCCCTGCTC-3' (探针)。

1.2.3 TS mRNA 表达的检测 研究期间共采集乳腺癌肿瘤标本3次,分别是①T1:化疗前(至少补充叶酸和维生素B₁₂ 5 d后);②T2:第1周期培美曲塞给药结束后24 h内;③T3:第3周期培美曲塞给药结束后24 h内。每次取乳腺癌组织切片(约4 μm 厚度)冰冻贮存,从15片冰冻切片中提取总RNA。采用逆转录荧光定量PCR法检测切片中TS mRNA表达水平,主要过程:取待检标本50 mg,剪碎后转入离心管,按照组织总RNA抽提试剂盒的说明书提取标本总RNA。再按照ReverAid First strand cDNA Synthesis Kit试剂盒说明书逆转录成cDNA第1链。以cDNA为模板进行荧光定量PCR,分别扩增目标基因和内参基因(β -actin)。PCR反应条件:95 $^{\circ}C$ 预变性2 min,95 $^{\circ}C$ 变性5 s,60 $^{\circ}C$ 退火/延伸30 s,共40个循环^[4]。计算循环阈值(Ct值),以乳腺癌癌旁组织为参照,按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对定量表达水平。

1.3 疗效评价标准

每21天完成1个化疗周期后对疗效进行评价。按照实体瘤疗效评价标准(RECIST1.1)^[5]分为完全缓解(CR):所有体征和可测量的病症完全消失,且未出现新的病灶;部分缓解(PR):病灶最大直径与最大垂直横径乘积总和减少50%以上,且未出现新病灶或已有病灶增大;稳定(SD):各病灶两垂直直径乘积总和减少 $<0\%$,或增大 $<25\%$,且未出现新病灶;进展(PD):病灶的双径乘积总和增加25%以上,或出现新病灶^[5]。客观缓解率(RR)=(CR+PR)/总例数 $\times 100\%$,疾病控制率(DCR)=(CR+PR+SD)/总例数 $\times 100\%$ 。每周期化疗完成后按照CTC评定化疗的毒副作用,分为0~4级^[6]。

1.4 统计学方法

所有资料经Epidata 3.0软件建立数据库,采用统一的标准录入。运用SPSS 17.0软件进行统计学处理。计量资料采用 t 检验或Mann-Whitney秩和检验,计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

共有58例患者接受了培美曲塞化疗并完成了疗效评估。其中,19例(32.7%)为一线治疗,39例(67.3%)为二线治疗;年龄最小者31岁,最大者72岁,中位年龄49岁;乳腺浸润性导管癌52例(89.7%),小叶癌4例(6.9%),浸润性导管癌并小叶癌2例(3.4%);绝经前28例(48.3%),绝经后30例(51.7%);T₁N₀M₀期4例(6.9%),T₁N₁M₀期40例(69.0%),T₁N₁M₁期6例(10.3%),T₁N₂M₀期5例(8.6%),T₁N₂M₁期3例(5.2%);乳腺癌根治性手术后复发转移的患者42例(72.4%);曾接受辅助化

疗者38例(65.5%),其中接受蒽环类或紫杉类药物化疗者30例(51.7%)。

2.2 近期疗效及毒副作用

58例患者总共完成了169个化疗周期,其中53例(91.4%)患者接受了3个完整培美曲塞化疗疗程,5例患者由于化疗副作用或PD只完成2个化疗疗程。58例患者中CR 1例(1.7%),PR 19例(32.8%),SD 31例(53.4%),PD 7例(12.1%),RR=34.5%,DCR=87.9%。

根据CTC评定结果,研究期间发生的化疗相关毒副作用主要有白细胞减少、中性粒细胞减少、血小板减少、天冬氨酸氨基转移酶升高、丙氨酸氨基转移酶升高和呕吐等,其中3级和4级副作用主要有丙氨酸氨基转移酶升高(17例)和天冬氨酸氨基转移酶升高(12例),其次为中性粒细胞减少(4例)。培美曲塞化疗相关毒副作用发生情况见表1。

表1 培美曲塞化疗相关毒副作用发生情况[例(%)]

Tab 1 Toxic side reaction related to pemetrexed chemotherapy [case(%)]

毒副作用	1级	2级	3级	4级
白细胞减少	10(17.2)	6(10.3)	0	0
中性粒细胞减少	10(17.2)	8(13.8)	0	4(6.9)
血小板减少	21(36.2)	9(15.5)	2(3.4)	0
天冬氨酸氨基转移酶升高	26(44.8)	21(36.2)	12(20.7)	0
丙氨酸氨基转移酶升高	25(43.1)	20(34.5)	16(27.6)	1(1.7)
呕吐	31(53.4)	17(29.3)	2(3.4)	0
其他	15(25.9)	9(15.5)	3(5.2)	0

注:“其他”包括腹泻、恶心、头痛等

Note:“others”include diarrhea, nausea, headache, etc.

2.3 TS mRNA 的表达及其与疗效的相关性

58例晚期乳腺癌患者中,共有55例(94.8%)患者的肿瘤标本符合PCR检测要求并完成了TS mRNA表达的检测。55例患者中,19例有客观缓解(CR+PR),36例无客观缓解(SD+PD),TS mRNA表达水平为0.04~5.11,中位数为0.62。Mann-Whitney秩和检验结果显示,有客观缓解组患者的TS mRNA表达水平在不同检测时点均低于无客观缓解组,差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表2。

表2 不同时点不同疗效组的TS mRNA表达水平比较

Tab 2 Comparison of TS mRNA expression among different groups at different time points

检测时点	疗效分组		P
	有客观缓解(n=19)	无客观缓解(n=36)	
T ₁	0.18~1.66(0.27)	0.92~2.30(0.76)	0.021
T ₂	0.11~1.51(0.31)	0.85~3.18(1.02)	0.017
T ₃	0.25~1.68(0.23)	1.05~2.72(0.79)	0.039

注:括号中为中位数

Note: indicated by quartile (median)

以TS mRNA表达水平的中位数为截断值,分为TS高表达(+)和TS低表达(-)。 χ^2 检验结果显示,基线(化疗前)TS mRNA低表达组的RR(63.3%)明显高于高表达组(36.7%),差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表3。亚组分析结果显示,无客观缓解组的第1周期化疗后的TS mRNA水平较化疗前明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);有客观缓解组在不同时点的TS mRNA表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

化疗作为目前治疗晚期乳腺癌的常用方法已经被大众广泛接受,化疗耐受是导致肿瘤治疗失败的主要原因之一。有

表3 不同基线(化疗前)TS mRNA表达组的疗效比较[例(%)]
 Tab 3 Comparison of therapeutic efficacies among different baseline (before chemotherapy) TS mRNA expression groups[case(%)]

TS mRNA表达分组	疗效		χ^2	P
	有客观缓解	无客观缓解		
高表达	22(36.7)	38(64.3)	8.838	0.003
低表达	36(63.3)	20(35.7)		

临床研究显示,不同个体对化疗药物的敏感性和耐药性与基因表达的差异有关,提示寻找相关的基因、蛋白等生物标志物并对癌组织进行检测分析可能是合理选择化疗药物、提高化疗疗效的重要途径之一^[7]。

培美曲塞是一种多靶点抗叶酸化疗药物,近年来在非小细胞肺癌、消化系统肿瘤等治疗方面得到广泛应用^[8]。研究发现,培美曲塞在不同病理类型的肿瘤患者中有不同的疗效^[9]。体外试验则显示,TS mRNA表达水平较高的肿瘤细胞系对培美曲塞的敏感性较低^[10]。本研究通过对58例接受了培美曲塞化疗的晚期乳腺癌患者进行疗效评估和TS mRNA表达的检测,发现TS mRNA表达水平与培美曲塞的疗效相关。

本研究结果显示,58例患者的RR为34.5%,DCR为87.9%,与江素华等^[11]观察的培美曲塞联合奈达铂治疗晚期乳腺癌的疗效接近。55例完成了TS mRNA表达检测的患者中,TS mRNA表达水平为0.04~5.11,中位数为0.62,提示不同乳腺癌患者TS mRNA的表达水平悬殊。有研究对93例乳腺癌标本进行了检测,结果显示TS mRNA表达水平为0.12~1.01(平均为0.27)^[12],本研究结果略高,可能与本研究样本均为晚期乳腺癌有关。秩和检验和卡方检验结果显示,有客观缓解组的TS mRNA表达水平在不同检测时点均低于无客观缓解组,差异有统计学意义($P<0.05$);基线(化疗前)TS mRNA低表达组的RR(63.3%)明显高于高表达组(36.7%),差异有统计学意义($P<0.05$)。目前针对乳腺癌患者TS mRNA表达水平的研究较少,李惠翔等^[13]进行了一项乳腺癌患者长期预后随访研究,结果显示,高TS mRNA或蛋白表达的患者总生存期短于低表达者,显示出较差的临床预后。有针对培美曲塞治疗非小细胞肺癌患者的Meta分析结果显示,TS mRNA低水平表达与较高的RR有关,并且指出TS可能是判断培美曲塞化疗敏感性的合适标志物^[14]。本研究结果与以上结论相符合,进一步证实了TS是培美曲塞化疗疗效的重要标志物。

本研究还对化疗前、第1周期化疗后和第3周期化疗后的TS mRNA表达水平分别进行了检测。亚组分析结果显示,无客观缓解组第1周期化疗后的TS mRNA表达水平较化疗前显著升高,而有客观缓解组在不同时点的TS mRNA表达水平无明显差异,提示在化疗过程中对TS mRNA的表达水平进行监测也有助于预测培美曲塞的疗效。但本研究观察时间较短,仅分析了培美曲塞治疗晚期乳腺癌的近期临床疗效,未获得无进展生存时间,在后续研究中将进一步随访观察培美曲塞化疗的长期疗效,以期对TS mRNA表达指导培美曲塞的治疗提供更充分的依据。

综上所述,TS mRNA的表达水平与培美曲塞的疗效相关,对于预测培美曲塞治疗晚期乳腺癌的疗效可能有一定的作用。

参考文献

- [1] 陈占红,王晓稼.晚期乳腺癌药物研究与治疗进展[J].临床药物治疗杂志,2014,12(2):1.
- [2] 朱珍,张凤春.晚期乳腺癌的化疗进展[J].现代肿瘤医学,2009,17(6):1179.
- [3] Joerger M, Omlin A, Cerny T, *et al.* The role of pemetrexed in advanced non small-cell lung cancer: special focus on pharmacology and mechanism of action [J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(1):37.
- [4] 陶国华,仲崇俊,曹兴建,等.外周血TS mRNA和DPD mRNA临床应用价值探讨[J].中国实验诊断学,2008,12(12):1548.
- [5] Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, *et al.* New response evaluation criteria in solid tumors: revised RECIST guideline (version 1.1) [J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45(2):228.
- [6] Trotti A, Byhardt R, Stetz J, *et al.* Common toxicity criteria: version 2.0. an improved reference for grading the acute effects of cancer treatment: impact on radiotherapy [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2000, 47(1):13.
- [7] Hodgkinson VC, Eagle GL, Drew PJ, *et al.* Biomarkers of chemotherapy resistance in breast cancer identified by proteomics: current status[J].*Cancer*, 2010, 294(1):13.
- [8] Deng Q, Huang X, Ye L, *et al.* Phase II trial of Loubou® (Lobaplatin) and pemetrexed for patients with metastatic breast cancer not responding to anthracycline or taxanes [J]. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 2013, 14(1):413.
- [9] Scagliionti GV, Parikh P, von Pawel J, *et al.* Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(21):3543.
- [10] Joerger M, Omlin A, Cerny T, *et al.* The role of pemetrexed in advanced non small-cell lung cancer: special focus on pharmacology and mechanism of action[J]. *Curr Targets*, 2010, 11(1):37.
- [11] 江素华,黄慧,蔡燕燕,等.培美曲塞联合奈达铂治疗晚期复治乳腺癌的疗效观察[J].临床肿瘤杂志,2010,15(5):432.
- [12] 王连军,李惠翔,张发顺,等.中国人乳腺癌组织中TP、TS、DPD mRNA和蛋白的表达及其与临床病理关系的研究[J].中国社区医师,2008,10(14):3.
- [13] 李惠翔,Suo ZH,张云汉,等.乳腺癌组织中TP和TS及DPD mRNA表达与预后的关系[J].中华肿瘤杂志,2004,26(11):669.
- [14] Wang L, Wang R, Pan Y, *et al.* The pemetrexed-containing treatments in the non-small cell lung cancer, is -/low thymidylate synthase expression better than +/high thymidylate synthase expression: a meta-analysis[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:205.

(收稿日期:2015-01-04 修回日期:2015-04-24)

(编辑:胡晓霖)