

# TS mRNA 水平对食管癌化疗的预测价值

邢国臣<sup>1</sup>, 张寒梅<sup>2</sup>, 王孝东<sup>1</sup>, 樊青霞<sup>3</sup>, 王瑞林<sup>3</sup>, 王留兴<sup>3</sup>, 李醒亚<sup>3</sup>, 韩建伟<sup>4</sup>,  
张明智<sup>3</sup>, 牛顺海<sup>4</sup>, 李景云<sup>1</sup>, 宗 红<sup>1</sup>

**Thymidylate Synthase mRNA Level in Untreated Esophageal Cancer Tissue and Its Prediction to Efficacy of Chemotherapy with Cisplatin and 5-fluorouracil**

XING Guo-chen<sup>1</sup>, ZHENG Han-mei<sup>2</sup>, WANG Xiao-dong<sup>1</sup>, FAN Qing-xia<sup>3</sup>, WANG Rui-lin<sup>3</sup>, WANG Liur-xing<sup>3</sup>, LI Jing-yun<sup>1</sup>, HAN Jian-wei<sup>4</sup>, ZHANG Ming-zhi<sup>3</sup>, NIU Shun-hai<sup>4</sup>, LI Jing-yun<sup>1</sup>, ZHONG Hong<sup>1</sup>

1. Zhengzhou city Central Hospital, Zhengzhou 450052, China; 2. Henan University Affiliated Huaihe Hospital; 3. The Cancer Department of the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou; 4. The Cancer Department of Renmin Hospital of the Hua County

**Abstract :Objective** To evaluate the predictive effect of the thymidylate synthase mRNA level to the response of the chemotherapy with cisplatin and fluorouracil in untreated esophageal cancer by detecting the thymidylate synthase. **Methods** 20 patients with untreated esophageal cancer accepted two cycles combined chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil. cisplatin 15 ~ 20mg/ m<sup>2</sup>/ d was intravenously infused in consecutive five days and 5-fluorouracil 375 ~ 500 mg/ m<sup>2</sup>/ d was intravenously infused for eight hours per day in consecutive five days per cycle, there were four weeks gap between two cycles.  $\beta$ -actin was used as a internal reference gene and the mRNA level of TS/  $\beta$ -actin in esophageal cancer tissue was determined by semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Data was analysed by Wilcoxon rank sum test in SPSS 10.0 statistical program. There was a statistical significance, when  $P < 0.05$  occurred with two-sided test. **Results** For 20 untreated esophageal cancer patients, the median of TS mRNA level from 11 responding patients was higher than that of 9 nonresponding patients. There was a significant difference between the two groups (Wilcoxon rank sum test,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The TS mRNA level has a certain predictive value to the efficacy of chemotherapy with cisplatin and fluorouracil in esophageal cancer.

**Key words** : Esophageal cancer; Thymidylate synthase; Cisplatin; 5-fluorouracil; Efficacy

**摘 要** :目的 探讨化疗前食管癌组织中胸苷酸合成酶(thymidylate synthase, TS) 转录水平及其对顺铂/5-氟脲嘧啶(DDP/5-Fu) 疗效的预测价值。方法 20 例食管癌患者均接受 2 个周期 DDP/5-Fu 化疗。DDP 15 ~ 20 mg/ m<sup>2</sup>/ d, iv d<sub>1-5</sub>; 5-Fu 375 ~ 500 mg/ m<sup>2</sup>/ d, ivgtt 8 h, d<sub>1-5</sub>, 休息 4 周后, 进行第二个周期化疗。以  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin) 作内参照, 应用半定量 RT-PCR 技术检测化疗前食管癌组织中 TS mRNA 水平, 以 TS/  $\beta$ -actin 比值表示。实验数据经 SPSS 10.0 统计软件处理, 化疗有效和无效组间 TS mRNA 水平间差异分析采用 Wilcoxon 秩和检验; 双侧检验, 取 0.05 作为显著性检验的标准。结果 20 例食管癌患者中, 11 例化疗有效者的 TS/  $\beta$ -actin mRNA 水平中位值为  $3.90 \times 10^{-1}$ , 而 9 例化疗无效者的 TS/  $\beta$ -actin mRNA 水平中位值为  $9.10 \times 10^{-1}$ , 两组差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 化疗前食管癌组织中 TS mRNA 水平对应用 DDP/5-Fu 治疗食管癌的疗效具有一定预测价值。

**关键词** : 食管癌; 胸苷酸合成酶; 顺铂; 5-氟脲嘧啶; 疗效

中图分类号: R735.1; Q789 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)04-0233-03

## 0 引言

化疗在食管癌的治疗中占重要地位, 然而化疗并非对所有的食管癌患者都有效, 如何使食管癌化疗更

具针对性、有效性、减少盲目性, 已成为当前研究的热点。胸苷酸合成酶(Thymidylate synthase, TS) 是 5-Fu 作用的靶酶, 研究表明, TS 蛋白含量可预测晚期食管癌的化放疗疗效<sup>[1]</sup>, 但 TS mRNA 水平与食管癌 DDP/5-Fu 化疗疗效的关系国内外尚无报道。本研究旨在应用逆转录聚合酶链反应技术(RT-PCR), 检测化疗前食管癌组织中 TS mRNA 水平并分析其与

收稿日期: 2004-03-17; 修回日期: 2004-12-16

作者单位: 1. 450052 郑州市中心医院; 2. 河南大学附属淮河医院; 3. 郑州大学医学院第一附属医院肿瘤科; 4. 河南滑县人民医院肿瘤科

DDP/5-Fu 治疗食管癌疗效的关系,以探讨其在预测食管癌化疗疗效方面的临床应用价值。

### 1 材料和方法

1.1 临床资料 20 例经病理学确诊的食管癌患者均为安阳地区滑县人民医院肿瘤科自 2001 年 6 月~2002 年 6 月住院治疗患者。其中男性 13 例,女性 7 例,年龄 47~77 岁,中位年龄 56 岁。鳞癌 15 例,腺癌 4 例,腺鳞癌 1 例。国际 TNM 分期, 期 1 例, 期 2 例, 期 17 例。组织分化: 级 2 例, 级 14 例, 级 4 例。均以 DDP/5-Fu 进行了 2 个周期的化疗:CDDP 每日 15~20mg/m<sup>2</sup>,iv d<sub>1-5</sub>;5-Fu 每日 375~500mg/m<sup>2</sup>,ivgtt 8h,d<sub>1-5</sub>;4 周后重复。化疗前后均做上消化道钡餐造影,胸部 CT,肝脏及腹腔 B 超检查,临床完全缓解者复查胃镜及活检。根据 WHO(1981 年)实体瘤疗效统一评价标准判断疗效。完全缓解(CR)或部分缓解(PR)为有效,稳定(NC)或进展(PD)为无效。

1.2 标本处理 20 例标本均为初诊时内镜活检组织,活检后将 3 块活检组织,经 10%福尔马林固定,石蜡包埋切片,行常规病理检测;另将 3 块迅速置入经 0.1%焦碳酸二乙酯处理的 EP 管中,标记后放液氮备用。

1.3 TS mRNA 的 RT-PCR 检测 化疗前食管癌标本总 RNA 的提取,按照试剂盒说明操作进行(购自上海生工公司)。取总 RNA 0.5μg,随机六聚引物 0.2 μg,加去离子水至 11μl,70 放置 5min,冰上骤冷;顺序加入逆转录酶缓冲液 5 ×buffer 4μl,底物 4 ×dNTP (2.5 mmol/l) 4μl,RNA 酶抑制剂 RNasin (20<sup>u</sup>/μl) 1μl,加去离子水至 19μl,25 放置 5min;加 Mmulv 逆转录酶(200<sup>u</sup>/μl) 1μl,短暂离心,于 25 放置 10min,42 放置 60min,70 放置 10min,冰上骤冷。

目的基因 TS 的上游引物:5 GCGCGCTACA GCCTGA GAGATG 3,下游引物:5 GGCCCATGTCTCCGATCTCTG 3,扩增片段 475 bp;内参照基因 -肌动蛋白的上游引物:5 CGGGAAATCGTGCGTGACAT 3,下游引物:5 GAACTTTGGGGGATGCTCGC 3,扩增片段 700 bp。取 4 ×dNTP (2.5mmol/l) 4μl,10 ×PCR 缓冲液 5μl,25mmol/l MgCl<sub>2</sub> 3μl,上下游特异引物各 (2.5pmol/μl) 1μl,cDNA 5μl,Taq DNA 聚合酶 5<sup>u</sup>,加去离子水至 50μl,充分混匀,短暂离心,94 预变性 5min,94 变性 30s,55 退火 30s,72 延伸 40s,进行 30 个循环后,94 延伸 5min,置 4 保存,-肌动蛋白与 TS 共管扩增,作内参照。扩增产物在 1%琼脂糖凝胶上以 50V 电压直流电泳 1h,在透射反射紫外灯下观察电泳结果,

凝胶扫描仪扫描定量。

设置 RT-PCR 阴性对照,逆转录阴性对照,PCR 阴性对照,并用同一标本于 2 日内至少进行 2 次 RT-PCR 以检验实验的可重复性。

1.4 统计学处理 TS mRNA 水平高表达及低表达组间临床病理资料及疗效差异分析采用 Fisher's 确切概率法;化疗有效和无效组间 TS mRNA 水平差异分析采用 Wilcoxon 秩和检验;化疗疗效与 TS mRNA 水平间相关性检验采用 Spearman's 等级相关分析;双侧检验,取 0.05 作为检验标准。

### 2 结果

#### 2.1 TS mRNA 表达水平

20 例食管癌标本中,TS mRNA 水平从 2.84 × 10<sup>-1</sup> 到 1.27,约相差 4.5 倍。TS mRNA 的表达情况,见图 1。

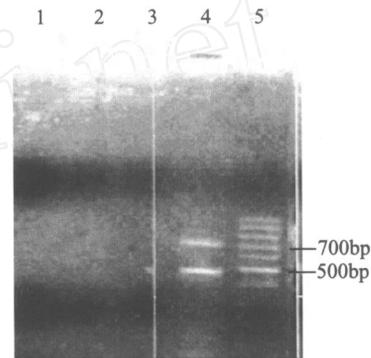


图 1 TS RT-PCR 电泳图

1. 泳道 RT-PCR 阴性对照;2. 泳道 PCR 阴性对照;3. 泳道 RT 阴性对照;4. 泳道 TS 及 -肌动蛋白共管扩增;5. 泳道 分子量标志

#### 2.2 TS mRNA 水平及其与临床指标的关系

20 例食管癌标本中,TS mRNA 水平从 2.84 × 10<sup>-1</sup> 到 1.27,平均值 7.39 × 10<sup>-1</sup>;以 TS mRNA 平均值把 20 例患者分为高、低水平 2 组,高、低水平组间患者年龄、性别、病理类型、分化程度、分期及疗效差异见表 1。

#### 2.3 TS mRNA 水平与化疗疗效的相关性分析

以 TS mRNA 平均值为界值,把 20 例食管癌患者分为高水平及低水平两组,低水平组 8 例化疗均有效,而高水平组 12 例仅 3 例化疗有效,差异具有统计学意义 (P = 0.001);11 例化疗有效者的 TS mRNA 水平中位值为 3.90 × 10<sup>-1</sup>,而 9 例化疗无效者的 TS mRNA 水平中位值为 9.10 × 10<sup>-1</sup>,两组差异也具有统计学意义 (P < 0.05)。把食管癌化疗前标本中 TS mRNA 水平与化疗疗效的有效(完全缓解、部分缓解)和无效(稳定、无效)作等级相关分析,求得等级相关系数 r<sub>s</sub> 为 -0.584, P = 0.007,可认为 TS mRNA 水平与化疗疗效间存在负相关,即:TS

表 1 TS mRNA 高低水平组间临床病理资料分析

临床病理资料	n	高水平组	低水平组	P
年龄				
60	9	4	5	1.000
< 60	11	6	5	
性别				
男	13	7	6	0.356
女	7	3	4	
病理				
鳞癌	16	8	8	0.619
腺癌 + 腺鳞癌	4	2	2	
分期				
+	3	1	2	0.537
	17	9	8	
分级				
+	16	8	8	0.619
	4	2	2	
疗效				
有效	11	3	8	0.001
无效	9	9	0	

注: Fisher's 确切概率法

mRNA 水平越低, 化疗疗效越好。

### 3 讨论

DDP/5-Fu 是目前临床上治疗食管癌的基础化疗方案, 该方案的有效率为 50% ~ 60%<sup>[2-4]</sup>。本研究用该方案化疗的 20 例食管癌病例中, 11 例有效, 有效率为 55%, 与上述文献报道的有效率相近。

TS 基因位于 18P<sup>11,32</sup>, 有 7 个外显子, 6 个内含子, 长 16kb<sup>[5]</sup>, 编码的胸苷酸合成酶, 是 DNA 从头合成途径的关键酶, 是控制 DNA 合成速率的瓶颈, 是 5-Fu 作用的主要分子靶, 因此, 抑制 TS 活性, 是 5-Fu 主要的抗癌机制<sup>[6]</sup>。

本研究发现 11 例化疗有效者的 TS mRNA 水平中位值为  $3.9 \times 10^{-1}$ , 而 9 例化疗无效者的 TS mRNA 水平中位值为  $9.1 \times 10^{-1}$ , 两组差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ; TS mRNA 低水平组 8 例化疗均有效, 而高水平组 12 例仅 3 例化疗有效, 差异具有统计学意义 ( $P = 0.001$ ), 相关性分析表明, TS mRNA 水平与化疗疗效呈负相关 (等级相关系数  $r_s$  为 -0.584,  $P = 0.007$ )。Lenz<sup>[7]</sup> 等对 65 例胃癌应用 CDDP, (甲酰四氢叶酸) LV 和持续静滴 5-Fu 新辅助化疗, 发现化疗有效和无效者间, 肿瘤组织 TS mRNA 水平有显著差异 (分别为  $2.6 \times 10^{-3}$  和  $6.81 \times 10^{-3}$ ,  $P < 0.003$ ), 其中 57 例可评价化疗疗效, 28 例低 TS mRNA 水平者中 15 例化疗有效, 而 29 例高 TS mRNA 水平者仅有 5 例化疗有效, 支持我们的研究结果。Alexander<sup>[8]</sup> 及 Yeh<sup>[9]</sup> 的研究也得到了类似的结果。Tajima<sup>[10]</sup> 对 13 例晚期食管癌, 用免疫组化检测了放化疗前 TS 的变化, 并分析了其与放化疗 (DDP 10mg/m<sup>2</sup>/d, 5-Fu 335 mg/m<sup>2</sup>/

d ivgtt d<sub>1-5</sub>, d<sub>15-19</sub>; 同时放疗 TD 30 Gy) 疗效的关系, 发现 TS 可作为晚期食管癌放化疗疗效的预测标志, 与我们的研究结果相一致。

本研究表明化疗前食管癌组织中 TS mRNA 水平与 DDP/5-Fu 化疗疗效负相关, 化疗前癌组织中 TS mRNA 水平对食管癌 DDP/5-Fu 方案化疗疗效具有一定预测价值。该研究提示, 化疗前对食管癌内镜活检标本进行 TS 基因检测, 有助于筛选出部分对 DDP/5-Fu 化疗敏感的患者进行针对性治疗, 而对那些对 DDP/5-Fu 化疗敏感性差的患者可采取别的方案或对策, 从而避免了不必要的化疗毒副反应, 这无疑将为食管癌治疗开辟一个更为广阔的前景。

但本研究仅检测了 TS 基因, 而没有检测与 5-Fu 代谢密切相关的胸苷磷酸化酶 (TP)、胸苷激酶 (TK)、二氢尿嘧啶脱氢酶 (DPD) 等, 也没有检测与顺铂 (DDP) 化疗敏感性密切相关的核苷酸切除修复交叉互补基因, 因而具有一定的局限性。且由于该研究样本例数较少, 故尚需进行大样本前瞻性随机对照研究, 以进一步验证该研究结果, 更好地指导食管癌治疗。

### 参考文献:

- [1] Tajima M, Ichikawa W, Takagi Y, et al. Chemoradiotherapy with low-dose cisplatin and 5-Fu for advanced esophageal cancer [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2000, 27(12): 1816.
- [2] Ajani JA. Contributions of chemotherapy in the treatment of carcinoma of the esophagus: results and commentary [J]. J. Semin. Oncol, 1994, 21(4): 474.
- [3] 李醒亚, 王瑞林, 樊青霞, 等. 紫杉醇治疗食管癌疗效分析 [J]. 癌症, 1999, 18(3): 327.
- [4] 王留兴, 李醒亚, 王瑞林, 等. 顺铂加 5-氟尿嘧啶联合治疗食管癌 156 例 [J]. 中华肿瘤杂志, 1999, 21(5): 389.
- [5] Peter V, Danenberg, Harjotoh Malli, et al. Thymidylate synthase inhibitors [J]. Seminars in Oncology, 1999, 26(6): 621.
- [6] Shinichi Miyamoto, Atsushi Ochiai, Narikazu Boku, et al. Discrepancies between the gene expression, protein expression, and enzymatic activity of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in human gastrointestinal cancers and adjacent normal mucosa [J]. International Journal of Oncology, 2001, 18(4): 705.
- [7] Lenze HJ, Leichman CG, Danenberg KD, et al. Thymidylate synthase mRNA level in denocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival [J]. Jclin Oncol, 1996, 14(2): 176-182.
- [8] Alexander HR, Grem JL, Hamilton JM, et al. Thymidylate synthase protein expression [J]. Cancer J. Sci. Am., 1995, 1: 49.
- [9] Yeh K-H, Shun C-L, et al. High expression of thymidylate synthase is associated with the drug resistance of gastric carcinoma to high dose 5-fluorouracil-based systemic chemotherapy [J]. Cancer, 1998, 82(10): 1626-1631.
- [10] Tajima M, Ichikawa W, Takagi Y, et al. Chemoradiotherapy with low-dose cisplatin and 5-Fu for advanced esophageal cancer [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2000, 27(12): 1816-1818.

[编辑: 刘红武; 校对: 贺文]