

宫颈鳞状细胞癌化疗前后小分子 RNA-96 的表达变化 及其与化疗敏感性的关系

周 雯^{1,2}, 关 婷¹

¹广州军区广州总医院妇产科, 广州 510010

²广州中医药大学, 广州 510010

通信作者: 关 婷 电话: 020-88653527, 电子邮件: lxgdut@163.com

摘要: **目的** 探讨新辅助化疗对宫颈鳞状细胞癌小分子 RNA-96 (miR-96) 表达的影响及其与化疗疗效、敏感性及其与临床病理特征之间的关系。**方法** 采用茎环实时荧光逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 28 例 (I b2 期 ~ II a 期) 宫颈鳞状细胞癌患者新辅助化疗前、后癌组织中 miR-96 的表达, 分析 miR-96 表达变化与新辅助化疗的疗效、敏感性及其与临床病理特征的关系。**结果** RT-PCR 检测 miR-96 表达的敏感性和特异性良好; 新辅助化疗前宫颈癌组织中 miR-96 的相对表达量是化疗后宫颈癌组织中的 (5.330 ± 5.069) 倍, 差异具有统计学意义 ($P = 0.000$)。化疗前后 miR-96 的表达变化: 中、低分化者 (2.345 ± 1.153) 低于高分化者 (9.941 ± 5.359) ($P = 0.000$); 间质浸润深度 < 1/2 间质者 (8.236 ± 5.399) 高于 ≥ 1/2 间质者 (1.978 ± 1.030) ($P = 0.000$); 有淋巴结转移者 (1.848 ± 0.959) 明显低于无淋巴结转移者 (7.942 ± 5.348) ($P = 0.000$); 而年龄 ≤ 45 岁、> 45 岁, 临床分期为 I b2 期、II a 期者化疗前后 miR-96 的表达变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 新辅助化疗能有效降低宫颈鳞状细胞癌组织中 miR-96 的表达水平, 因此测定化疗前宫颈癌组织中 miR-96 的表达水平对新辅助化疗疗效及敏感性预测具有一定参考价值。

关键词: 宫颈鳞状细胞癌; 小分子 RNA-96; 新辅助化疗; 化疗敏感性

中图分类号: R711.74 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2014)02-0140-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2014.02.005

Expressions of MicroRNA-96 Before and After Chemotherapy and Its Relationship with Chemosensitivity in Cervical Squamous Cell Carcinoma

ZHOU Wen, GUAN Ting

Department of Obstetrics and Gynecology, General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China

Corresponding author: GUAN Ting Tel: 020-88653527, E-mail: lxgdut@163.com

ABSTRACT: Objective To investigate the expression profiles of microRNA-96 (miR-96) in cervical squamous cell carcinoma before and after neoadjuvant chemotherapy and to explore the effects of the treatment on expression of miR-96 and its relationship with clinical efficacy, chemosensitivity, and clinicopathologic features. **Methods** The expression of miR-96 was detected by real-time polymerase chain reaction in 28 patients with cervical squamous cell carcinoma (stage I b2-II a) before and after neoadjuvant chemotherapy. The correlations between the change of miR-96 and related clinicopathologic features of cervical cancer (age, pathologic pattern, histological grade, depths of interstitial infiltration, lymph node metastasis, and clinical stage) were further analyzed. **Results** The relative expression of miR-96 in cervical squamous cell carcinoma before treatment was (5.330 ± 5.069) times higher than after the treatment with neoadjuvant chemotherapy ($P = 0.000$). The rela-

tive change of the expressions of miR-96 in cervical cancer patients between pre-and post-neoadjuvant chemotherapy was closely related with clinicopathological features; it was significantly smaller in poorly-or moderately-differentiated patients (2.345 ± 1.153) than in well-differentiated patients (9.941 ± 5.359) ($P=0.000$), significantly larger in patients with the tumor invasion depth $<1/2$ interstice (8.236 ± 5.399) than in $\geq 1/2$ interstice (1.978 ± 1.030) ($P=0.000$), and significantly smaller in patients with lymph node metastasis (1.848 ± 0.959) than those without lymph node metastasis (7.942 ± 5.348) ($P=0.000$). There was no significant difference in terms of age and clinical stages (I b2- II a) ($P>0.05$). **Conclusions** Neoadjuvant chemotherapy can effectively reduce miR-96 expression in cervical squamous cell carcinoma tissues. It is therefore speculated that detection of the miR-96 expression before the chemotherapy for cervical cancer may be helpful to predict the therapeutic efficacy and sensitivity of the treatment.

Key words: cervical squamous cell carcinoma; microRNA-96; neoadjuvant chemotherapy; chemosensitivity

Acta Acad Med Sin, 2014,36(2):140-144

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤，占女性生殖道恶性肿瘤首位。以往认为宫颈癌属化疗不敏感肿瘤，因此手术和放疗为宫颈癌的主要治疗方法，直至1984年Friedlander等^[1]指出宫颈癌是化疗敏感性肿瘤，并首次提出新辅助化疗（neoadjuvant chemotherapy, NACT）的概念，从此NACT作为宫颈癌的治疗手段逐渐受到重视。有报道显示，NACT后再手术的患者盆腔淋巴结转移、宫旁组织侵袭率和血管间隙受侵率等预后不良相关病理因素显著减少^[2]。但是，迄今为止尚未发现公认的能够准确预测NACT疗效和敏感性的工具。小分子RNA是一种内源性、大小约22个核苷酸、不能编码蛋白质的单链小分子RNA，可以通过特异性靶基因沉默来调控基因表达，发挥类似癌基因或抑癌基因的作用，参与人类肿瘤的发生和发展^[3]。同时，小分子RNA在肿瘤疾病预后预测及放化疗敏感性预测和肿瘤干预治疗方面显示出强大优势。研究显示抗肿瘤药物可改变小分子RNA的表达^[4-6]，小分子RNA表达的改变能影响化疗药物的敏感性^[7-9]。小分子RNA-96（microRNA-96, miR-96）位于人类染色体7q32.2，研究显示miR-96在多种人类恶性肿瘤中表达异常，并参与广泛的细胞调节过程，包括调节细胞增殖^[10-13]、衰老^[14]、细胞迁移^[15-16]和转移^[10]，另外，研究显示miR-96能改变肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[17]。本研究应用实时荧光定量PCR的方法，检测miR-96在新辅助化疗前、后宫颈鳞状细胞癌组织中的表达情况，旨在进一步探讨其对新辅助化疗的疗效、敏感性及其与临床病理特征间的关系。

资料和方法

资料 选取2011年5月至2012年12月广州军区

广州总医院妇产科28例行新辅助化疗+宫颈癌根治术的宫颈鳞状细胞癌患者新辅助化疗前、后的癌组织标本，所有标本经病理诊断证实。患者年龄32~64岁，平均 (48.8 ± 8.4) 岁， ≤ 45 岁12例， >45 岁16例；手术分期：按2009年国际妇产科联盟的分期标准，I b2期15例，II a期13例；病理分化程度：高分化11例，中、低分化17例；有盆腔淋巴结转移者12例，无盆腔淋巴结转移者16例；间质浸润深度 $<1/2$ 间质13例， $\geq 1/2$ 间质15例。

NACT方法 28例患者均采用全身静脉滴注化疗，采用紫杉醇联合卡铂3周方案（卡铂AUC5+紫杉醇 175 mg/m^2 ）化疗2个疗程，间隔疗程为3周。化疗后监测血常规、肝肾功能，必要时给予对症治疗。患者完成2个化疗后3周行妇科检查及影像学检查，判断肿瘤消退情况，并行相关手术前化验检查，无禁忌证者行广泛子宫切除加盆腔淋巴结切除术，年龄 ≤ 45 岁者保留一侧卵巢，术后病理回报盆腔淋巴结、卵巢及宫旁组织有转移的患者追加盆腔外照射，术后病理阴道断端距病灶1.5 cm以内者追加后装放疗；年龄 >45 岁的患者同时行双侧附件切除，术中剖视子宫，根据术后病理结果，对间质浸润 $>1/2$ 宫颈管壁、盆腔淋巴结转移、脉管癌栓、切缘阳性等危险因素的患者术后加用外放射治疗，全盆放疗，同时予紫杉醇联合卡铂方案化疗4疗程。

NACT疗效评价 手术前（化疗结束后3周）行妇科检查及影像学检查（B超、CT或核磁共振成像检查），根据宫颈肿瘤消退情况，判断近期疗效^[18]。肿瘤消退情况按WHO实体瘤疗效标准评定：完全缓解：妇科检查及影像学检查肿瘤完全消退；部分缓解：肿瘤病灶的最大直径及其最大垂直横径的乘积缩小50%

以上；稳定：肿瘤病灶的两径乘积缩小不足 50%，或增大不超过 25%；进展：肿瘤病灶的两径乘积增大 25% 以上或出现新病灶。将完全缓解和部分缓解判定为有效，稳定和进展判定为无效。

试剂与仪器 Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司，逆转录试剂盒、实时荧光定量试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司，引物由广州锐博生物公司设计，其余试剂均为国产分析纯。NANODROPND-2000 紫外分光光度计购自 Thermo 公司，荧光定量 PCR 仪 Rotor Gene-6000 购自德国 Qiagen 公司，凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司。

标本收集、总 RNA 的抽提与纯化 收集 28 例新辅助化疗前、后宫颈鳞状细胞癌患者组织标本。所有标本离体后 30 min 内，置于液氮冻存备用。按照 Trizol 试剂盒使用说明书从组织中提取总 RNA。紫外分光光度计测定 RNA 提取液的 OD260、OD280 吸光度值，计算纯度和浓度，1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

逆转录反应 20 μ l 反应体系，25 $^{\circ}$ C 5 min，42 $^{\circ}$ C 30 min，再以 85 $^{\circ}$ C 5 min 灭活逆转录酶，产物 -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

实时荧光定量 PCR 反应 将逆转录产物稀释至 1~2 倍，混匀。20 μ l 反应体系，先 95 $^{\circ}$ C 3 min 活化 Tag 酶，然后 95 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s，共 45 个循环，72 $^{\circ}$ C 10 min 延伸，所有反应均设 3 复孔。

miR-96 表达水平的计算方法 以 U6 为内参，测定循环阈值 (cycle threshold, Ct)，计算 Δ Ct 值， Δ Ct = miR-96 平均 Ct 值 - U6 平均 Ct 值，而 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示新辅助化疗前 miR-96 的表达相对于新辅助化疗后的变化倍数，取新辅助化疗后癌组织中 miR-96 的表达水平为 1，以此为对照，计算宫颈癌患者新辅助化疗前、后癌组织中 miR-96 的表达变化 (以倍数表示)^[19]。 Δ Ct 值与基因拷贝数呈反比， Δ Ct 值越高，基因的表达水平越低。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值越大说明新辅助化疗前后 miR-96 的表达差异越大，代表化疗效果越好。

统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析，宫颈癌临床病理参数与新辅助化疗前后 miR-96 表达变化的相对定量结果之间的关系分析采用 Mann-Whitney 检验，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用 *t* 检验， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

miR-96 在新辅助化疗前、后组织中的相对表达量

实时荧光定量 PCR 结果显示，新辅助化疗前组织中 miR-96 的相对表达量是化疗后组织中的表达量的 (5.330 \pm 5.069) 倍，差异具有统计学意义 ($t = 4.521$, $P = 0.000$)。

新辅助化疗前后 miR-96 表达变化与临床病理参数之间的关系 miR-96 的表达变化：中、低分化 (G2、G3 级) 者 (2.345 \pm 1.153) 低于高分化 (G1 级) 者 (9.941 \pm 5.359) ($P = 0.000$)；间质浸润深度 $< 1/2$ 间质者 (8.236 \pm 5.399) 高于 $\geq 1/2$ 间质者 (1.978 \pm 1.030) ($P = 0.000$)；有淋巴结转移者 (1.848 \pm 0.959) 明显低于无淋巴结转移者 (7.942 \pm 5.348) ($P = 0.000$)；而年龄 ≤ 45 岁、 > 45 岁，临床分期为 I b2 期、II a 期者化疗前后 miR-96 的表达变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

新辅助化疗前、后宫颈癌组织中 miR-96 的表达水平与化疗疗效的关系 所有患者 NACT 后，化疗的总有效率为 82.14% (23/28)，其中 12 例 (42.86%) 患者达到临床完全缓解，无 1 例临床进展病例。新辅助化疗有效组 (完全缓解 + 部分缓解) 与无效组 (病灶稳定 + 疾病进展) 相比，有效组化疗后组织中 miR-96 表达水平 (14.937 \pm 1.459) 与化疗前 (12.677 \pm 1.162) 相比明显下降，差异具有统计学意义 ($P = 0.000$)，miR-96 在无效组化疗前 (10.479 \pm 0.294)、化疗后 (10.372 \pm 0.403) 组织中表达水平变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。新辅助化疗前有效组组织中 miR-96 表达水平 (12.677 \pm 1.162) 明显低于无效组 (10.479 \pm 0.294) ($P = 0.001$)。

讨 论

宫颈癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一，近年来发病率呈逐年上升的趋势且青年女性宫颈癌的发病呈明显上升趋势。虽然宫颈癌可以根据不规则阴道流血、阴道排液等症状，宫颈脱落细胞学检查、电子阴道镜下活检等辅助检查得到早期诊断，但仍有许多患者就诊时已为晚期，临床治疗十分棘手。新辅助化疗应用于治疗局部晚期宫颈癌显示出良好的前景，可以使肿瘤降期、降低手术难度、获得化疗方案的体内敏感性，已经成为治疗恶性肿瘤不可或缺的重要方法^[20]，但由于肿瘤细胞对化疗的敏感性不同、抗肿瘤药物耐药性等因素，如何预测宫颈癌新辅助化疗疗效及敏感性，正确选择化疗、放疗等有效治疗手段和把握最佳治疗时机，提供患者更合理的个体化治疗是临

床研究的重点。

本研究实时荧光定量 PCR 检测结果显示宫颈鳞状细胞癌患者新辅助化疗后组织中 miR-96 的表达水平明显下降;新辅助化疗前有效组肿瘤组织中 miR-96 表达水平明显低于无效组的表达水平;化疗临床疗效:中、低分化者低于高分化者,间质浸润深度 <1/2 间质者高于 ≥1/2 间质者,有淋巴结转移者明显低于无淋巴结转移者。由此推断,化疗前、后肿瘤组织中 miR-96 的表达水平变化与临床疗效关系密切,可作为宫颈鳞状细胞癌新辅助化疗疗效及化疗敏感性的重要预测因子。

目前关于小分子 RNA 表达的改变影响化疗敏感性的研究刚刚开始,多数研究旨在阐明小分子 RNA 分子靶标机制与药物敏感性和耐药性间关系,如最近发现小分子 RNA 通过调控作为癌症治疗靶点或耐药机制的关键基因(表皮生长因子受体基因、多耐药基因 1、人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因、程序性细胞死亡基因 4 等),参与药物的耐药机制,影响抗肿瘤药物的耐药性,同时可作为个性化治疗的重要的生物标志^[21];小分子 RNA 通过直接或间接调控其下游相关肿瘤基因的表达,促进肿瘤细胞凋亡,降低肿瘤细胞迁移和侵袭力,从而增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[22-24]。抗肿瘤药物能改变 miR-96 在宫颈癌组织中的表达,宫颈癌中 miR-96 的表达变化是否能影响抗肿瘤药物的敏感性将有待进一步证实。有研究显示新辅助化疗能总体上降低宫颈鳞状细胞癌患者组织中骨桥蛋白表达强度,延缓宫颈癌病情进展,且骨桥蛋白在宫颈癌组织中的表达强度与化疗敏感性及化疗效果有关^[25]。因此:通过 miR-96 介导 RNA 干扰技术沉默骨桥蛋白的表达,探讨 miR-96 是否通过下调骨桥蛋白的表达从而促进宫颈癌细胞株(Hela)对卡铂(AUC 5)的敏感性,将成为进一步研究的重点,相信在未来局部晚期宫颈癌的治疗进展中,针对 miR-96 和骨桥蛋白为靶点提高化疗敏感性的肿瘤治疗方面将会出现新的突破。

参 考 文 献

- [1] Friedlander ML, Atkinson K, Coppleson JV, et al. The integration of chemotherapy into the management of locally advanced cervical cancer: a pilot study [J]. *Gynecol Oncol*, 1984, 19(1):1-7.
- [2] Cai HB, Chen HZ, Yin HH. Randomized study of preoperative chemotherapy versus primary surgery for stage IB cervical cancer [J]. *J Obstet Gynecol Res*, 2006, 32(3):315-323.
- [3] Barrel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2):281-297.
- [4] 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.
- [5] Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of human MicroRNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(7):2113-2119.
- [6] Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, et al. MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia [J]. *Oncogene*, 2007, 26(28):4148-4157.
- [7] Blower PE, Verducci JS, Lin S, et al. MicroRNA expression profile for the NCL-60 cancer cell panel [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(5):1483-1491.
- [8] Blower PE, Chung JH, Verducci JS, et al. MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(1):1-9.
- [9] Nakajima G, Hyashi K, Xi Y, et al. Non-coding microRNAs has-Let-7g and has-miR-181b are associated with chemoresponse to S-1 in colon cancer [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2006, 3(5):317-324.
- [10] Segura MF, Hanniford D, Menendez S, et al. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(6):1814-1819.
- [11] Lin H, Dai T, Xiong H, et al. Unregulated miR-96 induces cell proliferation in human breast cancer by downregulating transcriptional factor FOXO3a [J]. *PLoS ONE*, 2011, 5(12):e15797.
- [12] Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, et al. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(1):367-377.
- [13] Gutilla IK, White BA. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(35):23204-23216.
- [14] Li G, Luna C, Qiu J, et al. Alterations in microRNA expression in stress-induced cellular senescence [J]. *Mech Ageing Dev*, 2009, 130(11-12):731-741.
- [15] Lowery AJ, Miller N, Dwyer RM, et al. Dysregulated miR-183 inhibits migration in breast cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10:502.
- [16] Sarver AL, Li L, Subramanian S. MicroRNA miR-183 func-

- tions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23):9570-9580.
- [17] Wang YM, Huang JW, Calses P, et al. MiR-96 downregulates REV1 and RAD51 to promote cellular sensitivity to cisplatin and PARP inhibition [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(16):4037-4046.
- [18] Cho YH, Kim DY, Kim JH, et al. Comparative study of neoadjuvant chemotherapy before radical hysterectomy and radical surgery alone in stage I B2-II A bulky cervical cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 20(1):22-27.
- [19] 谭志琴, 刘伏香, 唐海林, 等. 子宫内膜癌患者血清中 has-miR-155 的表达及其临床意义 [J]. *中华妇产科杂志*, 2010, 45(10):772-774.
- [20] Mossa B, Mossa S, Marziani R. Adjuvant chemotherapy versus radiation therapy after radical surgery in high-risk positive node stage I B/II A cervical cancer [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2010, 31(5):545-550.
- [21] Allen KE, Weiss GJ. Resistance may not be futile: micro-RNA biomarkers for chemoresistance and potential therapeutics [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(12):3126-3136.
- [22] Si ML, Zhu S, Wu H, et al. miR-21-mediated tumor growth [J]. *Oncogene*, 2007, 26(19):2799-2803.
- [23] Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangio carcinoma cell lines [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(7):2113-2129.
- [24] Zhao X, Yang L, Wang Y, et al. Down-regulation of miR-27a might inhibit proliferation and drug resistance of gastric cancer cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30:55.
- [25] 吴婷婷, 关婷. 宫颈鳞状细胞癌化疗前后骨桥蛋白变化及与化疗效果的关系 [J]. *广东医学*, 2011, 32(14):1597-1599.

(收稿日期: 2013-08-23)