

ATP-TCA 实验及 EGFR mRNA 表达对中晚期结直肠癌化疗有效性的预测价值

蒋松琪¹,江晓晖¹,陈志刚¹,郭燕²,何松^{2*}

(¹南通市肿瘤医院外科,²病理科,江苏 南通 226361)

[摘要] 目的:分析生物荧光肿瘤药物敏感实验(ATP-tumor chemosensitivity assay, ATP-TCA)和表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR) mRNA 表达与中晚期结直肠癌疗效的关系及二者的临床预测价值,为临床个性化给药提供依据。方法:收集本院普外科 40 例中晚期结直肠癌病例,分别进行 ATP-TCA 实验和 EGFR 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测,观察氟尿嘧啶联合奥沙利铂(FOLFOX0)方案治疗效果。结果:①ATP-TCA 总符合率 80.00%,敏感符合率 76.00%,耐药符合率 86.67%,灵敏度 90.48%,特异性 68.42%;②EGFR mRNA 表达阴性 23 例,临床有效 18 例,有效率 78.26%,EGFR mRNA 表达阳性 17 例,临床有效 3 例,有效率 17.65%($\chi^2 = 12.07, P < 0.01$);③ATP-TCA 结果敏感且 EGFR mRNA 表达为阴性的有 20 例,其中 18 例临床有效,有效率 90.00%;ATP-TCA 结果耐药且 EGFR mRNA 表达为阳性的有 10 例($\chi^2 = 9.338, P < 0.05$),其中 1 例临床有效,有效率 10%($\chi^2 = 18.373, P < 0.05$)。结论:联合进行 ATP-TCA 实验及 EGFR mRNA 检测,可提高对中晚期结直肠癌预测化疗疗效的正确性,可作为患者个性化给药的实验室依据。

[关键词] FOLFOX0 方案;结直肠肿瘤;表皮生长因子;ATP-TCA

[中图分类号] R735.3

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2015)05-691-04

doi:10.7655/NYDXBNS20150519

结直肠癌是我国十大恶性肿瘤之一,在新诊断的结直肠癌患者中约有 25%左右的病例初诊时就已达临床中晚期,给手术根治带来了困难。目前普遍认为,对中晚期结直肠癌患者实行术前新辅助化疗,可以使部分患者的肿瘤降期和降级后达到切除条件,因而如何预测化疗的反应性显得尤为重要。已有许多报道证明生物荧光肿瘤药物敏感实验(ATP-tumor chemosensitivity assay, ATP-TCA)可评估肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,是预测化疗疗效的方法之一^[1-3]。另有研究发现,许多癌基因、抑癌基因也可影响肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是其中重要成员之一,但其在结直肠研究方面少有报道。本研究对 40 例中晚期结直肠癌患者在化疗前进行了 ATP-TCA 药敏实验和 EGFR mRNA 检测,观察两者与临床化疗疗效的关系,旨在为结直肠癌患者的个体化治疗提供依据。现将结果报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象

选择本院 2011 年 11 月~2013 年 1 月的 40 例中晚期结肠癌患者,所有病例均经电子结肠镜活检病理确诊。男 24 例,女 16 例,年龄 62~75 岁(中位年龄 65 岁),直肠癌 11 例,结肠癌 29 例。所有患者 Kamofsky 评分 ≥ 70 分,预计生存期 >3 个月;无肠梗阻;白细胞 $>4.0 \times 10^9$ 个/L,血小板 $>100 \times 10^9$ 个/L;无心、肝、肾严重功能障碍。同期另外取 15 例良性结直肠组织作为对照组,男 8 例,女 7 例。

1.2 方法

1.2.1 化疗方案

所有患者根据《NCCN 结(直)肠癌临床实践指南(2009)中国版》进行治疗,采用氟尿嘧啶联合奥沙利铂(FOLFOX0)方案化疗,奥沙利铂 85 mg/m² 静脉滴注 2 h,第 1 天,5-FU 400 mg/m² 静脉推注第 1 天,然后 1 200 mg/(m²·d),2 d 持续滴注(总量 2 400 mg/m²,滴注 48 h),每 2 周重复。

1.2.2 疗效判定

参照 WHO 实体瘤客观评价标准,分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、稳定(SD)和疾病进展(PD),临床有效(RR)=CR+PR。

1.2.3 ATP-TCA 检测方法

①样本:所有患者经硬式结肠镜取得至少 5 片

[基金项目] 南通市社会发展科技计划项目(S2009016)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:hesong515@sina.com

左右活检样本或者 20 mg 肿瘤组织块; ②仪器试剂: 生物荧光抗癌药物敏感性检测试剂盒(湖州海创生物科技有限公司), 板式化学发光检测仪 Orion II (Berthold DS, 德国), CO₂ 培养箱、倒置显微镜、无菌操作台、离心机等; ③实验过程: 新鲜肿瘤组织剪成 1 mm³ 碎块, 转移至含组织消化液的离心管中 37℃ 消化 2~3 h, 每 15 min 混匀 1 次, 200 目筛网过滤。1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 1 mL 培养基重悬成单细胞悬液, 最后调整细胞密度为 (1.5~2.5) × 10⁵ 个/mL, 取单细胞悬液接种于 96 孔培养板。实验药物氟尿嘧啶 (5-FU, 天津金耀集团) 25 μg/mL, 奥沙利铂 (L-OHP, 江苏恒瑞医药股份有限公司) 4.5 μg/mL, 分别配制为 5 个实验药物浓度, 即 200%、100%、50%、25%、12.5% PPC, 每孔各加入 100 μL 的 5-FU 和 L-OHP, 每个浓度设 2 个平行孔, 同时设定无药对照孔 (M0) 和最大抑制孔 (MI)。将培养板置于 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱内 5~6 d。培养板各孔加入 ATP 提取液 100 μL 室温下 30 min, 每孔取 50 μL 细胞混合液于检测板并加入荧光素-荧光素酶 50 μL 混匀, 将检测板置于板式化学发光检测, DCS 软件系统进行数据分析; ④体外药敏实验结果判定: 参考 Blumenthal RD2005 标准^[4], 根据计算出的肿瘤生长抑制百分率 (TGI) 及抑制 50% 肿瘤细胞长时的药物浓度 (IC₅₀) 和抑制 90% 肿瘤细胞时的药物浓度 (IC₉₀) 对体外药敏结果进行判定。高度敏感: IC₅₀ < 25% TDC 及 IC₉₀ < 100% TDC, 中度敏感: IC₅₀ < 25% TDC 及 IC₉₀ > 100% TDC, 低度敏感: IC₅₀ > 25% TDC 及 IC₉₀ < 100% TDC, 耐药: IC₅₀ > 25% TDC 及 IC₉₀ > 100% TDC (TDC 代表测试药物浓度), 敏感=高度敏感+中度敏感, 耐药=低度敏感+耐药。

1.2.4 RT-PCR 检测方法

按 Tripure 试剂说明提取组织总 RNA, 取 2 μg RNA 按 RT-PCR 试剂盒说明书反转合成 cDNA。根据 GenBank 提供的 EGFR cDNA 序列设计合成引物; EGFR 上游引物: 5'-GGCAGGAGTCATGGGA-GAA-3', 下游引物: 5'-GCCATGGACGGGATCTTAG-3'; 产物长度: 153 bp; 反应体系: 15 μL Q-PCR SYBR mix, 上下游引物各 200 nmol, 3 μL cDNA 模板, 加水至 30 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个循环; 以 GAPDH 基因为内参照。用美国 ABi 公司的 7500 荧光定量 PCR 仪进行检测, 分析统计数据; 15 例良性组织的 EGFR mRNA 表达平均值为 3.2, 以此为参照, 结直肠癌患者

EGFR mRNA 表达 > 3 为阳性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件处理数据, 组间比较采用 χ^2 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATP-TCA 实验与化疗疗效

40 例中晚期结直肠癌患者中临床有效 21 例 (CR 19 例, PR 2 例), 无效 19 例 (SD 15 例, PD 4 例)。ATP-TCA 实验结果: 敏感 25 例 (高度敏感 11 例, 中度敏感 14 例), 耐药 15 例 (轻度敏感 9 例, 耐药 6 例)。ATP-TCA 实验与临床化疗疗效的关系见表 1。ATP-TCA 实验与临床疗效总符合率为 80.00% (32/40), 敏感符合率为 76.00% (19/25), 耐药符合率为 86.67% (13/15), 灵敏度 [真阳性/(真阳性+假阴性)] 90.48% (19/21), 特异度 [真阴性/(假阳性+真阴性)] 68.42% (13/19)。

表 1 ATP-TCA 实验与化疗疗效的关系 (例)

ATP-TCA 结果	化疗疗效		
	有效	无效	合计
敏感	19	6	25
耐药	2	13	15
合计	21	19	40

2.2 EGFR mRNA 表达与化疗疗效

40 例结直肠癌中, EGFR mRNA 表达阴性 23 例, 临床有效 18 例, 有效率 78.26%; EGFR mRNA 表达阳性 17 例, 临床有效 3 例, 有效率 17.65% ($\chi^2=12.07, P < 0.01$)。

2.3 ATP-TCA 实验结合 EGFR mRNA 表达与化疗疗效的关系

40 例结直肠癌中, ATP-TCA 结果敏感且 EGFR mRNA 表达为阴性的 20 例患者 18 例临床化疗有效, 有效率 90.00%; 耐药且 EGFR mRNA 表达为阳性的 10 例患者, 1 例临床有效, 有效率 10.00%, 二者之间具有明显差异 ($\chi^2=18.373, P < 0.05$, 表 2)。

3 讨论

5-FU 联合亚叶酸钙 (calcium folinate, CF) mFOLFOX6 是 NCCN 推荐的 1 类治疗结肠癌的方案, 常用于中晚期结直肠癌患者的术前新辅助化疗, 可使部分患者的肿瘤降期和降级。Yoon 等^[5]观察了 351 例接受新辅助化疗后的直肠癌患者的肿瘤病理反应, 发现其中 167 例 (47.6%) 出现不同程度的病理降期, 109 例 (29.3%) 被观察到肿瘤组织

表 2 ATP-TCA 实验结合 EGFR mRNA 表达与化疗疗效的关系 (n)

观察指标	化疗疗效		
	有效	无效	合计
ATP-TCA 结果敏感且 EGFR 表达阴性	18	2	20
ATP-TCA 结果耐药且 EGFR 表达阳性	1	9	10
合计	19	11	30

$\chi^2=18.373, P < 0.05$ 。

坏死和缩小,另外有 51 例(14.5%)观察到肿瘤组织完全消退。罗永忠等^[6]应用 FOLFOX6 方案治疗中晚期结直肠癌临床近期有效率为 51.6%。本组 40 例患者应用 FOLFOXO 方案化疗的临床有效率 52.5%(21/40),与文献相近。

如何较好地预测肿瘤化疗的反应性是临床实行个体化治疗的重要问题之一。ATP 生物荧光法是近年发展起来的可预测肿瘤细胞对化疗药物敏感性的实验方法,其原理是当细胞受损时,ATP 合成下降,细胞死亡时,ATP 迅速水解消失,通过测定细胞内源性 ATP 的含量,即可反映细胞活性和活细胞的数量。国内外学者应用 ATP-TCA 药敏实验进行了多种肿瘤的临床研究,表明其在一定程度上可提高临床治疗的有效性。本文对 40 例中晚期结直肠癌患者进行体外药敏实验,结果显示与临床疗效总符合率为 80.00%,敏感符合率为 76.00%,耐药符合率为 86.67%,灵敏度 90.48%,特异性 68.42%,提示其与临床疗效有着较高的相关性,由此认同其可作为预测中晚期结直肠癌患者化疗疗效的指标之一。

EGFR 是 ErbB 家族成员,在多种人类肿瘤中高表达,其具有酪氨酸激酶活性,当其配体结合时,通过激活酪氨酸蛋白激酶途径,可促进肿瘤细胞生长和迁移、肿瘤血管形成及抑制肿瘤细胞凋亡^[7]。研究发现,在多种肿瘤组织如:乳腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、肝癌、卵巢癌、胃癌、肾癌等中均有 EGFR 过表达现象。在结直肠癌方面,有关 EGFR 的研究主要集中在 EGFR 表达或突变与患者临床病理参数之间的关系方面以及以 EGFR 为靶点的靶向治疗方面。大量研究表明,EGFR 表达与结直肠癌细胞分化差、浸润复发、肝转移、临床分期晚、预后不良等有关,所以普遍认为结直肠癌 EGFR 检测有助于评估患者的预后。针对 EGFR 为靶点的靶向药物,如西妥昔单抗、帕尼单抗等,近年来在结直肠癌治疗方面也取得了长足进展,多数临床研究认为靶向药物可延长患者的总生存时间和无进展生存期^[8-10]。然而,有关 EGFR 与传统化疗疗效之间关系的文献很少,仅国外见有少量报道。

Park 等^[11]对 217 例非小细胞肺癌的研究结果显示,EGFR 突变状态可作为细胞毒化疗方案的预测标记物。类似研究在食管癌^[12]和口咽癌^[13]中也得到了相似结果。但在结直肠癌方面,目前尚未见到 EGFR 表达与化疗疗效关系的报道。本文对 40 例样本的研究结果显示 EGFR mRNA 表达阴性 23 例,临床化疗有效 18 例,有效率 78.26%,EGFR mRNA 表达阳性 17 例,临床有效 3 例,有效率 17.65%。EGFR mRNA 表达阳性的患者化疗效果较差,差异有统计学意义($\chi^2=12.07, P < 0.01$)。

在此基础上,本文还分析了 ATP-TCA 药敏联合 EGFR mRNA 表达来评价其对化疗疗效的预测价值。结果显示,ATP-TCA 结果敏感且 EGFR mRNA 表达为阴性的 20 例患者 18 例化疗有效,有效率 90.00%;ATP-TCA 结果耐药且 EGFR mRNA 表达为阳性的 10 例患者,1 例临床有效,有效率 10.00% ($\chi^2=18.373, P < 0.05$)。由此初步认为,在化疗前进行 ATP-TCA 和 EGFR mRNA 的联合检测,能从 2 个不同角度客观分析药物的有效性,可在一定程度上提高预测中晚期结直肠癌疗效的正确性,为临床科学制定有效的个体化治疗方案提供实验依据。然而,本组研究样本含量较小,并缺少最终随访结果,因而目前结论是初步的,待将来积累更多资料进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Lee JH, Kim MC, Oh SY, et al. Predictive value of in vitro adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay in advanced gastric cancer patients who received oral 5-fluorouracil after curative resection [J]. *Cancer Res Treat*, 2011, 43(2): 117-123
- [2] 赵丹, 吴令英, 王小兵, 等. 三磷酸腺苷—肿瘤体外药敏试验在预测原发性卵巢上皮癌化疗敏感性中的应用价值[J]. *中华肿瘤杂志*, 2010, 32(5): 368-372
- [3] Kim HA, Yom CK, Moon BL, et al. The use of an *in vitro* adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay to predict chemotherapeutic response in breast cancer[J]. *Breast*, 2008, 17(1): 19-26
- [4] Blumenthal RD. Chemosensitivity testing using microplate adenosine triphosphate-based luminescence measurements. *Method in molecular medicine*TM, chemosensitivity volume1: in vitro assays[M]. Human Press Inc, 2005: 101-120
- [5] Yoon SM, Kim DY, Kim TH, et al. Clinical parameters predicting pathologic tumor response after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer [J]. *Int J Radiat*

- Oncol Biol Phys, 2007, 69(4): 1167-1172
- [6] 罗永忠, 欧阳周. XELOX 与 FOLFOX6 方案一线治疗晚期结直肠癌的近期疗效及不良反应比较[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(1): 125-128
- [7] Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer [J]. J Clin Oncol, 2007, 25(13): 1658-1664
- [8] Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer [J]. N Engl J Med, 2007, 357(20): 2040-2048
- [9] Bokemeyer C, Bondarenko L, Makhson A, et al. Fluorouracil leucovorin and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(5): 663-671
- [10] Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer [J]. J Clin Oncol, 2007, 25(13): 1658-1664
- [11] Park JH, Lee SH, Keam B, et al. EGFR mutations as a predictive marker of cytotoxic chemotherapy [J]. Lung Cancer, 2012, 77(2): 433-437
- [12] Hickey K, Grehan D, Reid I, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen predicts response of esophageal squamous cell carcinoma to chemotherapy [J]. Cancer, 1994, 74(6): 1693-1698
- [13] Magen N, Pivot X, Bensadoun RJ, et al. The relationship of epidermal growth factor receptor levels to the prognosis of unresectable pharyngeal cancer patients treated by chemo-radiotherapy [J]. Eur J Cancer, 2001, 37(17): 2169-2177

[收稿日期] 2014-11-19

参考文献著录原则和方法

1. 为了反映论文的科学依据和作者尊重他人研究成果的严肃态度, 以及读者提供有关信息的出处, 应在论文的结论(无致谢段时)或致谢之后列出参考文献。
2. 参考文献列出的一般应限于作者直接阅读过的、最主要的、发表在正式出版物上的文献。私人通信和未公开发表的资料, 一般不宜列入参考文献, 可紧跟在引用的内容之后注释或标注在当页的地脚。
3. 参考文献著录应执行 GB7714-2005 的规定, 建议采用顺序编码制。
4. 顺序编码制的要求如下:
 - (1) 在引文处按论文中引用文献出现的先后, 用阿拉伯数字连续编序, 将序号置于方括号内, 并视具体情况把序号作为上角标, 或作为语句的组成部分。如“张xx^[1]研究发现……”, “李xx等^[2]认为……”, “模型构建参考文献[3]”。
 - (2) 参考文献的每条文献著录项目应齐全, 著录格式为:
主要责任者. 题名: 其他题名信息[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项. 出版地: 出版者, 出版年, 引文页码[引用日期]. 获取和访问路径
 - (3) 论文中若同一篇参考文献出现引用多次的情况, 则不需重复著录, 按参考文献首次出现的顺序标注上角即可。

(本刊编辑: 接雅俐)