

转移性中低位直肠癌患者同步放化疗后外周血 miR - 29a miR - 345 水平对预后的预测价值

姜黎丽 冯菲菲 王伟

【摘要】目的 分析转移性中低位直肠癌患者同步放化疗后外周血微小 RNA - 29a (miR - 29a)、微小 RNA - 345 (miR - 345) 水平对预后的预测价值。**方法** 选择 2015 年 4 月至 2018 年 5 月无锡市太湖医院收治的 98 例接受同步放化疗 (长程放疗, 期间同时口服卡培他滨) 且随访 3 年的转移性中低位直肠癌患者为研究对象。患者均于同步放化疗 5 周后检测血清 miR - 29a、miR - 345 水平, 根据随访 3 年结果分为预后良好组 45 例与预后不良组 53 例。比较两组同步放化疗 5 周后血清 miR - 29a、miR - 345 水平及临床资料 (组织学分化程度、原发灶肿瘤直径、脏器转移个数、单个脏器转移个数转移肿瘤数目等), Cox 多因素分析同步放化疗后 3 年内患者预后不良的影响因素, 绘制受试者工作特征 (ROC) 曲线, 以曲线下面积 (AUC) 分析患者血清 miR - 29a、miR - 345 水平单独及联合检测对同步放化疗后 3 年预后的预测价值。**结果** 预后不良组血清 miR - 29a、miR - 345 水平高于预后良好组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 单因素分析显示, 预后不良组组织学分化为低分化、原发灶肿瘤直径 ≥ 5 cm、脏器转移个数 > 1 个、同步放化疗后血浆清蛋白 ≤ 35 g/L 例数占比均高于预后良好组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Cox 多因素分析显示, 脏器转移个数 > 1 个、血清 miR - 29a、miR - 345 水平为患者 3 年内预后不良的影响因素 ($P < 0.05$); ROC 曲线结果显示, 患者同步放化疗后血清 miR - 29a、miR - 345 水平二者联合检测预测 3 年内预后不良的 AUC 值为 0.740, 高于单独检测 miR - 29a、miR - 345 水平的 AUC 值 (0.687/0.667), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 转移性中低位直肠癌同步放化疗后血清 miR - 29a、miR - 345 水平是患者预后不良的独立影响因素, 二者联合检测对患者 3 年预后判定具有较高价值。

【关键词】 微小 RNA - 29a; 微小 RNA - 345; 转移性中低位直肠癌; 同步放化疗; 预后

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2022.10.019

直肠癌中以中低位直肠癌 (经 MRI 评估肿瘤下极距离肛缘 10 cm 以下) 占比最高, 占直肠癌的 70% ~ 75%^[1]。中低位直肠癌早期多无明显症状, 多数患者确诊时已发生其他脏器转移, 丧失手术时机, 仅可采用化疗、放疗为主的姑息治疗^[2-3]。研究^[4-5]发现, 转移性中低位直肠癌患者行同步放化疗的疗效较好, 然而其预后效果仍需要进一步提升。目前, 临床上尚缺乏预测转移性中低位直肠癌同步放化疗预后的有效评价指标, 因此, 寻求预测转移性中低位直肠癌同步放化疗预后的指标具有重要的临床意义。微小 RNA (MicroRNA, miRNA) 为一种非编码 RNA 分子, 其可与 mRNA 结合或通过介导切断靶基因 mRNA 分子来对靶基因产生抑制作用^[6]。研究^[7]发现, 微小 RNA - 29a (MicroRNA - 29a, miR - 29a) 与转移性直肠癌的病情密切相关, 且可用于诊断患者是否发生肝转移。微小 RNA - 345 (MicroRNA - 345, miR - 345) 可预测局部晚期结直肠癌患者放化疗后的疗效^[8]。然而, 目前国内有关转移性中低位直肠癌患者同步放化疗后外周血 miR - 29a、miR - 345 水平对其预后的预测价值的研究报道较少,

鉴于此, 本文对 98 例接受同步放化且随访 3 年的转移性中低位直肠癌患者的临床资料进行回顾分析, 探讨外周血 miR - 29a、miR - 345 水平对转移性中低位直肠癌同步放化疗预后的预测价值, 旨在临床对此类患者拟定治疗方案、改善预后提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 4 月至 2018 年 5 月无锡市太湖医院收治的 98 例接受同步放化疗且随访 3 年的转移性中低位直肠癌患者为研究对象。其中男性 57 例, 女性 46 例; 年龄 45 ~ 77 岁, 平均 (56.74 ± 5.13) 岁。病例纳入标准: ①所有患者符合转移性中低位直肠癌的诊断标准^[9], 且经病理学证实; ②卡氏 (Karnofsky, KPS) 评分 ≥ 70 分; ③均接受同步放化疗治疗; ④肝肾功能正常者; ⑤均为首次确诊者; ⑥3 年随访资料完整。排除标准: ①合并造血系统疾病者; ②预计生存期 ≤ 3 个月者; ③合并其他类型恶性肿瘤者; ④哺乳期或妊娠期女性; ⑤合并精神系统疾病者; ⑥患自身免疫疾病者; ⑦合并急慢性感染性疾病者。

1.2 方法 依据随访3年结果,参照《临床诊疗指南·肿瘤分册》^[10]中预后判定标准将患者分为预后良好组(无进展生存)45例与预后不良组(死亡或进展生存)53例。比较两组患者血清 miR-29a、miR-345 水平及临床资料,包括年龄、性别、吸烟史、饮酒史、合并基础疾病、病理分型、组织学分化程度、原发灶肿瘤直径、是否实施巩固化疗、脏器转移个数数目、单个脏器转移个数转移肿瘤数目、同步放化疗后血浆清蛋白水平差异。将上述差异有统计学意义的指标纳入多因素 logistic 回归分析患者同步放化疗后3年内预后不良的影响因素。绘制受试者工作特征(receiver operating characteristics, ROC)曲线,以曲线下面积(area under the curve, AUC)分析患者同步放化疗后血清 miR-29a、miR-345 水平单独及联合检测对同步放化疗后3年内预后的预测价值。

1.2.1 同步放化疗方案 放疗:采用CT进行模拟定位,随后勾画肿瘤靶区(gross tumor volume, GTV)(影像学、肠镜确诊的直肠肿瘤区域);临床靶区(clinical target volume, CTV),包括淋巴结引流区域与原发病灶,具体为骶前区、直肠系膜区域、盆腔侧壁、坐骨直肠窝等区域,真骨盆内缘为CTV侧界,肛管下缘与L5椎体分别为CTV下界与上界,骶骨皮质后缘与膀胱后壁1/4~1/3分别为CTV后界与前界;计划靶区(planning target volume, PTV)为CTV外扩0.5~1 cm。GTV区域剂量为50 Gy,PTV处方剂量为45 Gy,每次1.8~2.0 Gy,1次/天,5次/周,持续放疗5周,期间口服卡培他滨(国药准字H20123425,连云港润众制药有限公司)825 mg/m²,2次/日,每周5天。巩固化疗:采用CapeOx方案(即奥沙利铂+卡培他滨)治疗。奥沙利铂(国药准字H20020648,成都长青制药有限公司)130 mg/m²,静脉滴注,大于2小时,第1天;卡培他滨1 000 mg/m²,2次/天,口服,第1~14天,随后休息7天,每3周重复1次。同步放化疗完成后按照患者的个人意愿行巩固化疗。

1.2.2 外周血 miR-29a、miR-345 水平的检测 采用实时荧光定量PCR测定外周血 miR-29a、miR-345 水平。同步放化疗后采集所有患者全血标本4 mL,随后通过TD-4M低速离心机(离心半径为10 cm,离心转速为3 000 r/min 山东博科)分离血清,离心10 min后取上清液于-70℃条件下保存,通过miR试剂提取盒提取miRNA(上海雅吉生物科技有限公司,货号:DE-01001),随后采用Nanodrop2000分光

光度计(上海在途生物科技有限公司)定量miRNA,采用miScript Reverse Transcription Kit反转录试剂盒(货号:DXT-218061,上海科敏生物科技有限公司),选择1 μg RNA实施反转录反应,具体操作参照试剂盒,U6下游引物为5'-TCCTTTGAAACCTTGTGA-3',上游引物为5'-ACGGTTAACCGTAATGCC-3';miR-345下游引物:5'-GTGCACCGTCGCAGGT-3',上游引物5'-GCTCAGTGCTACTCCA-3';miR-29a下游引物为5'-GAAATCGGTTA-3',上游引物为:5'-TAGCACCATCT-3';随后采用ABI7500荧光定量PCR仪(美国生物系统公司)对miR-29a、miR-345进行扩增,以U6作为内参,采用2^{-ΔΔCt}算法计算血清miR-29a、miR-345水平。

1.2.3 随访 以门诊复查的形式进行随访,随访内容为患者是否死亡、转移、复发,调查的资料及时录入,资料录入准确,保证数据的真实性,不可随意篡改数据。每3个月随访1次,随访3年。以复发、转移、死亡或随访时间截止为随访终点。

1.3 统计学方法 采用SPSS 21.0软件分析研究数据。计数资料以例或百分率表示,采用 χ^2 检验;符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验;采用Cox比例风险回归模型分析同步放化疗后3年内患者预后不良的影响因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 预后良好组与预后不良组血清 miR-29a、miR-345 水平比较 同步放化疗后,预后不良组血清 miR-29a、miR-345 水平高于预后良好组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 预后良好组与预后不良组血清 miR-29a、miR-345 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	miR-29a	miR-345
预后良好组	45	0.43 ± 0.12	8.41 ± 1.75
预后不良组	53	0.82 ± 0.19	15.32 ± 3.29
t 值		11.897	12.646
P 值		<0.001	<0.001

2.2 患者预后不良的单因素分析 预后不良组患者组织学分化程度为低分化、原发灶肿瘤直径 ≥ 5 cm、脏器转移个数 >1 个、同步放化疗时血浆清蛋白 ≤ 35 g/L例数占比均高于预后良好组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表 2 患者预后不良的单因素分析

临床资料	预后不良组(53 例)	预后良好组(45 例)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁)	56.45 ± 5.09	57.08 ± 5.21	0.604	0.547
性别[例(%)]			0.849	0.357
男性	32(60.38)	23(51.11)		
女性	21(39.62)	22(48.89)		
有吸烟史[例(%)]	19(35.85)	16(35.56)	0.001	0.976
有饮酒史[例(%)]	22(41.51)	20(44.44)	0.086	0.770
高血压[例(%)]	15(28.30)	12(26.67)	0.033	0.857
高血脂[例(%)]	12(22.64)	10(22.22)	0.002	0.960
糖尿病[例(%)]	9(16.98)	6(13.33)	0.250	0.617
病理分型[例(%)]			0.441	0.802
溃疡型	23(43.40)	21(46.67)		
隆起型	11(20.75)	7(15.56)		
浸润型	19(35.85)	17(37.78)		
分化程度[例(%)]			4.603	0.032
低分化	24(45.28)	11(24.44)		
中高分化	29(54.72)	34(75.56)		
原发灶直径[例(%)]			9.717	0.002
<5 cm	21(39.62)	32(71.11)		
≥5 cm	32(60.38)	13(28.89)		
巩固化疗[例(%)]			0.002	0.960
是	12(22.64)	10(22.22)		
否	41(77.36)	35(77.78)		
同步放化疗时血浆清蛋白[例(%)]			6.184	0.013
≤35 g/L	31(58.49)	15(33.33)		
>35 g/L	22(41.51)	30(66.67)		
脏器转移个数[例(%)]			16.305	<0.001
1 个	21(39.62)	36(80.00)		
>1 个	32(60.38)	9(20.00)		

2.3 同步放化疗后 3 年内患者预后不良的 Cox 多因素分析 将组织学分化、原发灶肿瘤直径、脏器转移个数数目、同步放化疗时血浆清蛋白、血清 miR-29a、miR-345 水平纳入 Cox 比例风险回归模型,赋值:低分化=1,中高分化=0;原发灶肿瘤直径≥5 cm=1,原发灶肿瘤直径<5 cm=0;同步放化疗时血浆清蛋白≤35 g/L=1,血浆清蛋白>35 g/L=0;脏器转移个数>1

个=1,脏器转移个数为 1 个=0;其余为连续变量。以转移性中低位直肠癌同步放化疗后 3 年内的预后情况为因变量(预后良好=0,预后不良=1),Cox 多因素分析显示,脏器转移个数>1 个、同步放化疗时血清 miR-29a、miR-345 水平为转移性中低位直肠癌同步放化疗后 3 年内预后不良的影响因素($P<0.05$)。见表 3。

表 3 同步放化疗后 3 年内患者预后不良的 Cox 多因素回归分析

因素	回归系数	标准误	Wald χ^2 值	P 值	RR 值	95% CI
脏器转移个数>1 个	1.853	0.427	18.832	<0.001	6.379	2.625 ~ 15.503
同步放化疗后血清 miR-29a 水平	1.341	0.518	6.702	<0.001	3.823	1.573 ~ 9.291
同步放化疗后血清 miR-345 水平	1.009	0.367	7.559	<0.001	2.743	1.129 ~ 6.666

2.4 患者同步放化疗后血清 miR-29a、miR-345 水平单独及联合检测对患者 3 年内预后的预测价值 以同步放化疗后 3 年内预后情况为因变量,对 Cox 多因素分析中有意义的 miR-29a、miR-345 采用 ROC 曲线分析各个指标的预测效能,ROC 曲线结果显示,

患者同步放化疗后血清 miR-29a、miR-345 水平联合检测预测 3 年内预后不良的 AUC 值为 0.740,高于血清 miR-29a、miR-345 单独检测的 AUC 值为 0.687、0.667,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4、图 1。

表4 同步放化疗后血清 miR-29a、miR-345 水平单独及联合检测对患者3年预后的预测价值

指标	最佳截断点	灵敏度(%)	特异度(%)	AUC	95% CI	约登指数	P 值
miR-29a	0.39	67.92	80.00	0.687	0.598~0.767	0.495	<0.001
miR-345	8.96	64.15	77.78	0.667	0.578~0.749	0.420	<0.001
miR-29a 联合 miR-345 检测	-	66.04	86.67	0.740 ^{①②}	0.654~0.814	0.527	<0.001

注:与 miR-29a 比较,^① $P<0.05$;与 miR-345 比较,^② $P<0.05$ 。

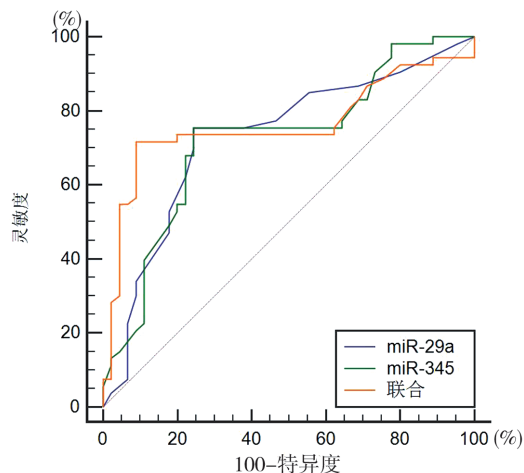


图1 同步放化疗后血清 miR-29a、miR-345 水平单独及联合检测预测患者3年预后的 ROC 曲线

3 讨论

近年来,虽然转移性中低位直肠癌临床治疗水平不断提高,但患者5年生存率仍然较低^[11]。同步放化疗可保留器官功能、避免手术创伤,且能够尽可能杀死已经发生远处转移的癌细胞^[12]。但部分转移性中低位直肠癌患者行同步放化疗治疗的预后仍然不佳^[13]。本文探讨转移性中低位直肠癌患者同步放化疗后联合检测外周血 miR-29a、miR-345 水平对治疗后3年预后的预测价值,旨在临床拟定治疗方案、改善预后提供参考依据。

本研究结果显示,同步放化疗后,预后不良组患者血清 miR-29a、miR-345 水平显著高于预后良好组,表明预后不良的转移性中低位直肠癌患者同步放化疗后外周血 miR-29a、miR-345 水平高表达,与王华胜等^[14]研究结果类似(预后不良的结肠癌患者 miR-29a 水平更高),分析原因 miR-29a、miR-345 低表达与直肠癌患者肿瘤进展调控有关。同时本组资料显示,脏器转移个数>1个、同步放化疗后血清 miR-29a、miR-345 水平为转移性中低位直肠癌同步放化疗后3年内预后不良的影响因素。此结果与张令巧^[15]、张弛等^[16]发现的多器官转移是转移性结直肠癌预后不良的独立危险因素的结果类似。同时,本组资料显示,转移性中低位直肠癌同步放化疗后血清 miR-29a、

miR-345 水平联合检测对预测患者3年内预后的 AUC 显著高于两指标单独检测的 AUC ($P<0.05$),表明转移性中低位直肠癌同步放化疗后血清 miR-29a、miR-345 水平联合检测对预测患者3年内预后较两指标单独检测具有重要参考价值。相关研究指出,miR-29a 在结直肠癌患者肿瘤转移中发挥重要的调控作用,该作用主要针对上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition,ETM),其基本原理为先有效结合相应的靶点,从而来抑制 E-钙粘连蛋白表达,进而刺激 EMT 过程,同时该研究表明,有肝转移患者体内 miR-29a 水平呈过表达状态,可用于预测不良预后^[17]。研究^[18]指出,miR-345 潜在的重要靶点为 RUNX3、BBC3 与 CDKN1A,其中 CDKN1A 为一种周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制剂,可诱导细胞周期的停滞,miR-345 可能是下调了 CDKN1A 的表达水平来促进结肠癌的进展。国外有研究^[8]表明,miR-345 可能作为预测局部晚期直肠癌患者放化疗后疗效的一种新型标志物。

综上,转移性中低位直肠癌同步放化疗后血清 miR-29a、miR-345 水平联合检测对预测患者3年预后具有较高参考价值。鉴于本研究选取的样本量不大,本结果后续仍需要扩大样本量来进一步验证。

参考文献

- [1] DENG X, LIU P, JIANG D, et al. Neoadjuvant radiotherapy versus surgery alone for stage ii/iii mid-low rectal cancer with or without high-risk factors: a prospective multicenter stratified randomized trial[J]. Ann Surg, 2020, 272(6): 1060-1069.
- [2] MCQUADE R M, STOJANOVSKA V, BORNSTEIN J C, et al. Colorectal cancer chemotherapy: the evolution of treatment and new approaches[J]. Curr Med Chem, 2017, 24(15):1537-1557.
- [3] BAHADOER R R, DIJKSTRA E A, VAN ETEN B, et al. Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2021, 22(1):

- 29-42.
- [4] ZHU J, LIU A, SUN X, et al. Multicenter, randomized, phase iii trial of neoadjuvant chemoradiation with capecitabine and irinotecan guided by UGT1A1 status in patients with locally advanced rectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(36):4231-4239.
- [5] WO J Y, ANKER C J, ASHMAN J B, et al. Radiation therapy for rectal cancer: executivesummary of an astro clinical practice guideline[J]. *Pract Radiat Oncol*, 2021, 11(1):13-25.
- [6] BAHADOER R R, DIJKSTRA E A, VAN ETTEN B, et al. Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(1):29-42.
- [7] 周德君,袁航. 血清 miR-29a、COX-2 及 MMP2 水平在结直肠癌肝转移中的表达意义[J]. *中华全科医学*, 2017, 15(11):1944-1947.
- [8] YU J, LI N, WANG X, et al. Circulating serum microRNA-345 correlates with unfavorable pathological response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(39):64233-64243.
- [9] 中华医学会消化内镜学分会,中国抗癌协会肿瘤内镜学专业委员会. 中国早期结直肠癌筛查及内镜诊治指南(2014 年,北京)[J]. *胃肠病学*, 2015(6):345-365.
- [10] 中华医学会. 临床诊疗指南·肿瘤分册[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:156-159.
- [11] 师成英,漆亚文,师成玲. BRCA1/MIC-1/mTOR 在老年结直肠癌组织中的表达及其临床意义[J]. *医学临床研*
- 究, 2021, 38(1):32-34, 38.
- [12] YANG B, SHAN J, FENG Y, et al. Transcatheter rectal arterial chemoembolization with oxaliplatin plus S-1 concurrent chemoradiotherapy can improve the pathological remission rate in locally advanced rectal cancer: a comparative study[J]. *Radiat Oncol*, 2020, 15(1):94.
- [13] LIU W Y, JIN J, TANG Y, et al. Safety and efficacy of preoperative chemoradiotherapy in fit older patients with intermediate or locally advanced rectal cancer evaluated by comprehensive geriatric assessment: a planned interim analysis of a multicenter, phase II trial[J]. *J Geriatr Oncol*, 2021, 12(4):572-577.
- [14] 王华胜,李晓洁,王东,等. 结直肠癌中医辨证分型与 miR-29、miR-34a 表达的相关性分析[J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(10):1806-1811.
- [15] 张令巧. 西妥昔单抗与化疗一线治疗 KRAS/RAS 野生型转移性结直肠癌的疗效及预后因素分析[J]. *实用癌症杂志*, 2021, 36(10):1690-1692, 1710.
- [16] 张弛,王新,李世霞,等. 转移性结直肠癌生存率、预后因素及预后风险预测评分的建立及验证[J]. *中国肿瘤临床*, 2021, 48(19):983-990.
- [17] OROSZ E, KISS I, GYÖNGYI Z, et al. Expression of circulating miR-155, miR-21, miR-221, miR-30a, miR-34a and miR-29a: comparison of colonic and rectal cancer[J]. *In Vivo*, 2018, 32(6):1333-1337.
- [18] YUAN Z, BAKER K, REDMAN MW, et al. Dynamic plasma microRNAs are biomarkers for prognosis and early detection of recurrence in colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(8):1202-1210.

(2022-01-12 收稿)

(本文编校:刘菲,胡欣)