

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.36.007

文章编号: 1005-8982 (2018) 36-0031-06

叶酸受体 α 高表达与浆液性卵巢癌患者生存率的相关性研究

符吉芬, 裴雄越, 王爱丽

(海南省海口市中医院 妇产科, 海南 海口 570102)

摘要: **目的** 探讨浆液性卵巢癌患者叶酸受体 α (FR- α) 表达与卵巢癌患者生存率的相关性。**方法** 使用实时荧光定量 PCR 检测 91 例浆液性卵巢癌患者肿瘤组织中 FR- α 表达情况, 以及分析患者其他临床病理参数 [如 FIGO 分期、肿瘤分化程度、是否接受理想的手术、淋巴结转移、术前血清中肿瘤抗原 125 (CA125) 含量及 FR- α 表达等与患者无病生存率 (DFS) 和总生存率 (OS) 的关系]。**结果** FIGO 分期 I、II、III 及 IV 期的患者分别为 4、6、65 及 16 例, 44% 患者接受最佳肿瘤细胞减灭术。晚期患者或是接受次理想减积手术患者 FR- α 表达较高。愈后分析表明, FR- α 高表达是 DFS 较差的预后因子 [$\hat{H}R=2.70$ (1.20, 6.05), $P=0.016$], 也是 OS 较短的预后因素 [$\hat{H}R=3.51$ (2.93, 13.29), $P=0.035$]。**结论** FR- α 高表达是浆液性卵巢癌患者 DFS 和 OS 较差的预后因子, FR- α 是浆液性卵巢癌潜在的生物标志物和治疗靶点。

关键词: 卵巢肿瘤; 叶酸受体 α ; 肿瘤抗原 125; 生存率

中图分类号: R737.31

文献标识码: A

Association of folate receptor α with survival rates in serous ovarian carcinoma

Ji-fen Fu, Xiong-yue Pei, Ai-li Wang

(Department of Obstetrics and Gynecology, Haikou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Haikou, Hainan 570102, China)

Abstract: **[Objective]** To investigate the correlation between expression of folate receptor α (FR- α) and prognosis in patients with serous ovarian carcinoma. **Methods** Expression of FR- α in tumor tissues was determined by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for 91 patients with serous ovarian carcinoma. Relationship between clinicopathological parameters including FIGO stages, degree of tumor differentiation, acceptance of ideal operation, lymph node metastasis, preoperative serum CA-125 level and expression of FR- α and free disease survival (DFS) or overall survival (OS) was determined. **Results** There were 4, 6, 65, and 16 patients with FIGO stages I, II, III, and IV ovarian carcinoma (I: 0.451; II: 0.415; III: 0.652; and IV: 0.768; $P=0.004$), respectively. Forty-four percent of patients underwent optimal debulking. Expression of FR- α was higher in advanced patients or those who could not receive optimal debulking (received: 0.490; could not receive: 0.766, $P=0.003$). Prognostic analysis suggested that high expression of FR- α represented poor outcome for both DFS [$\hat{H}R=2.70$ (1.20, 6.05), $P=0.016$] and OS [$\hat{H}R=3.51$ (2.93, 13.29), $P=0.035$]. **Conclusion** High expression of FR- α represents a risk factor in patients with serous ovarian carcinoma, which may be a potential biomarker and a therapeutic target.

Keywords: ovarian neoplasms; folate receptor α ; CA-125; survival rate

收稿日期: 2018-06-14

卵巢癌是致死率高的妇科恶性肿瘤,其无明显病理特征、早期诊断困难及缺乏精确肿瘤标记等都是造成卵巢癌预后非常差的原因^[1]。其中浆液性卵巢癌占卵巢癌的 50%,因此寻找新生物标志物对于卵巢癌治疗方案评估与预后非常重要。

肿瘤抗原 125 (carcinoma antigen 125, CA125) 是最常用于监控卵巢癌患者对治疗反应的一种生物指标^[2]。但 CA125 的升高也可见于一些良性的状况 (如子宫内膜异位、子宫肌瘤或盆腔炎等^[3-4])。叶酸参与细胞内代谢与 DNA 合成、修复,是正常细胞与肿瘤细胞的必需维生素。叶酸受体 α (α -folate receptor, FR- α) 分子量为 38 ~ 40 kD 的细胞膜蛋白,容易与氧化叶酸结合,在正常细胞中不表达,大量表达于各种非黏液性 (non-mucinous) 上皮组织肿瘤细胞中 (如卵巢癌)。但是 FR- α 在肿瘤细胞中高表达机制仍不清楚,一般认为是肿瘤在发展过程中用来调控从血清中摄取的叶酸量,或参与信号调控作用^[5-7]。本研究主要分析 FR- α 在浆液性卵巢癌中表达的临床意义,探讨其作为浆液性卵巢癌生物标志物和治疗靶点的潜能。

1 资料与方法

1.1 一般研究

选取 2005 年 1 月—2010 年 12 月海口市中医院接受分期手术与减积手术的 91 例浆液性卵巢癌患者,除 Ia 期及高分化患者,其他患者接受分期手术或减积手术后,接受 4 ~ 6 次以铂类药物为基础的化疗。患者年龄、绝经状态、术前 CA125 含量、治疗史、减积手术时疾病状态及复发与生存率等临床参数均来自患者医疗、外科及出院记录。术后残留肿瘤最大直径 ≤ 1 cm 时,便将此次减积手术定义为理想减积手术,否则归类为次理想减积手术。本研究通过医院伦理委员会审查通过,患者签署知情同意书。

1.2 随访

术后前 2 年,患者每隔 3 个月来院复查 1 次。复查项目包括病史询问、骨盆与直肠检查和局部淋巴结触诊;2 年后每半年复查 1 次。每次复查检测患者血清 CA125 含量与宫颈涂片检查。一旦怀疑复发,则进行 CT 与 MRI 检查。影像检查显示异常征象、腹水细胞学分析结果异常及 2 周 1 次肿瘤指标检查结果连续 2 次 \geq 正常最高值的 2 倍或是组织切片发现肿瘤细胞,则认为疾病复发。

1.3 卵巢癌肿瘤组织 FR- α 表达的检测

标本离体后 30 min 内取材,迅速置于液氮中冷冻

于 -80°C 冰箱冷冻保存。提取总 RNA,鉴定其浓度、纯度及完整性。FR- α 引物序列:正向 5'-ACCCAG AAGACTGTGGATGG-3',反向 5'-TGCTGTAGCCAAAT TCGTTG-3'。探针序列:FAM5'-ACTGCTGTCATGCC GTGCCCTCT-3'TAMR (FAM 和 TAMR 为探针两端发光基因)。GAPDH 引物序列:正向 5'-CCGGACTAGA CTGAGCCAGACGGAGAGC-3',反向 5'-CCGGAATTC GCAGGGATTTCCAGGTATCA-3';探针序列:FAM5'-ACTGCTGTCATGCCGTGCCCTCT-3'TAMR。反应条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 复温 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,循环 1 次;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,循环 40 次;60 $^{\circ}\text{C}$ 终末延伸 1 min,循环 1 次。反应结束后用 ABI prism 7000 SDS Software 进行标准曲线拟合并计算各目的基因拷贝数,FR- α 基因相对表达量为 FR- α 基因拷贝数与内参 GAPDH 基因拷贝数的比值。

1.4 CA125 检测

清晨空腹取血 5 ml,分离血清,采用流式荧光发光法检测癌胚抗原,仪器为上海透景生命科技有限公司生产的流式荧光发光仪 TELLGEN,使用厂家配套试剂。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,卵巢癌患者临床特征与术前血清 CA125 含量、FR- α 表达量关系用 Kruskal-Wallis H 检验及 Mann-Whitney U 检验,组间比较用 χ^2 检验;Kaplan-Meier 生存曲线分析患者生存率,并进行 Log-rank 检验;采用 Cox 回归单因素和多因素分析无病生存率 (free disease survival, FDS) 和总生存率 (overall survival, OS) 的影响因素, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 浆液性卵巢癌患者临床特征与术前血清 CA125 含量、FR- α 表达量的相关性

91 例浆液性卵巢癌患者随访中位时间为 19 个月 (5 ~ 78) 个月,确诊时患者年龄中位数为 55 岁 (41 ~ 66 岁)。91 例患者中包括 4 例 FIGO I 期、6 例 FIGO II 期、65 例 FIGO III 期、16 例 FIGO IV 期,其中 40 例患者 (44%) 术后残余肿瘤直径 ≤ 1 cm,术前血清中 CA125 含量中位值 1 402 u/ml,卵巢癌组织中 FR- α 表达量为 0.652。

晚期和接受次理想减积手术患者卵巢癌组织

FR- α 表达量高于早期或是接受理想减积手术患者。术前晚期卵巢癌患者 CA125 血清含量高于早期患者 ($P < 0.05$), 但接受理想减积手术和次理想减积手术患者与早、晚期手术患者血清 CA125 含量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 影响 FDS 的 Cox 逐步回归分析

单因素分析显示, FIGO 分期、肿瘤分化程度与淋巴结转移并不影响到患者 FDS。即使将患者以术前 CA125 含量 1 000 u/ml 为阈值分为两组, CA125 也与 FDS 无关。但是单因素分析显示, 患者不能接受理想减积手术、患者接受治疗后 63 d 血清中 CA125 含量不能降至正常值以下 (< 35 u/ml)、卵巢癌组织 FR- α 高表达 3 个因素与患者较 FDS 相关。多因素分析发现,

血清中 CA125 在患者接受治疗 63 d 后无法降至正常值以下与卵巢癌组织 FR- α 高表达是 FDS 的危险预后因子 ($P < 0.05$)。见表 2、3。

2.3 影响 OS 的预后因子分析

单因素分析表明 FIGO 分期、肿瘤分化程度与淋巴结转移与否对 OS 无影响。术前 CA125 含量 $\geq 1 000$ u/ml 对 OS 也无影响。然而未接受理想减积手术、患者血清 CA125 接受治疗后 63 d 未降至正常值以下、FR- α 高表达与 OS 相关。多因素分析显示, 患者血清中 CA125 接受治疗后 63 d 未降至正常值以下和 FR- α 高表达是 OS 的危险预后因子。见表 4、5。

将患者分为 FR- α 高表达组 (FR- α /GADPH ≥ 1.0) 和 FR- α 低表达组 (FR- α /GADPH < 1.0 , 比较两

表 1 91 例浆液性卵巢癌患者临床特征与术前血清 CA125 含量、FR- α 表达量关系分析 [M (P₂₅, P₇₅)]

指标	n	CA125/ (u/ml)	H/U 值	P 值	FR- α 表达量	H/U 值	P 值
FIGO 期							
I	4	352 (56, 789)			0.451 (0.223, 0.394)		
II	6	456 (96, 3 456)	3.852	0.012	0.415 (0.134, 0.428)	5.624	0.004
III	65	1 772 (126, 18 972)			0.652 (0.172, 1.049)		
IV	16	1 123 (682, 4 872)			0.768 (0.514, 1.265)		
分化程度							
I	8	1 225 (182, 6 820)			0.805 (0.416, 1.278)		
II	20	1 794 (39, 7 480)	0.158	0.918	0.582 (0.089, 1.983)	0.346	0.237
III	63	1 322 (58, 26 136)			0.637 (0.079, 1.432)		
理想减积手术							
是	40	901 (39, 26 136)	0.527	0.182	0.490 (0.079, 1.278)	6.741	0.003
否	51	1 689 (59, 16 200)			0.766 (0.089, 1.983)		

表 2 卵巢癌患者 FDS 影响因素的单因素分析

因素	b	S _b	χ^2 值	P 值	\hat{HR}	95%CI	
						下限	上限
年龄							
<55 岁 39 例 VS ≥ 55 岁 52 例	-0.914	0.589	2.386	0.118	0.393	0.120	1.285
FIGO 分期							
III & IV 81 例 VS I & II 10 例	0.117	0.545	0.046	0.828	1.409	0.601	3.302
肿瘤分化程度							
高分化 63 例 VS 中低分化 28 例	-0.472	0.765	0.381	0.538	1.046	0.607	1.818
理想减积手术							
否 51 例 VS 是 40 例	1.537	0.589	0.683	0.011	2.023	1.174	3.515
淋巴结转移							
是 25 例 VS 否 66 例	-0.508	0.569	0.824	0.375	1.010	0.451	2.282

续表 2

因素	b	S _e	χ ² 值	P 值	HR̂	95%CI	
						下限	上限
CA125 含量 >1 000 u/ml							
是 52 例 VS 否 39 例	-0.483	0.508	0.978	0.445	1.247	0.738	2.109
CA125 降至正常需要的时间							
高于 39 例 VS 低于 52 例	-2.493	0.671	13.880	0.001	3.86 4	2.185	6.836
FR-α 的表达量							
高表达 13 例 VS 低表达 78	1.742	0.632	7.990	0.008	3.611	1.631	8.022

表 3 卵巢癌患者 FDS 影响因素的多因素分析

因素	b	S _e	χ ² 值	P 值	HR̂	95%CI	
						下限	上限
理想减积手术							
否 51 例 VS 是 40 例	-0.483	0.776	0.392	0.549	1.284	0.706	2.358
CA125 降至正常需要的时间							
高于 39 例 VS 低于 52 例	1.541	0.838	7.180	0.008	3.350	1.822	6.134
FR-α 的表达量							
高表达 13 例 VS 低表达 78 例	1.012	0.840	5.489	0.016	2.706	1.208	6.052

组 FDS 和 OS 后发现,FR-α 高表达时,FDS 更短 [HR̂= (1.844, 11.482), P=0.001]。见附图。
2.073 (1.051, 4.084), P=0.043] 和 OS 更差 [HR̂=4.592

表 4 卵巢癌患者 OS 影响因素的单因素分析

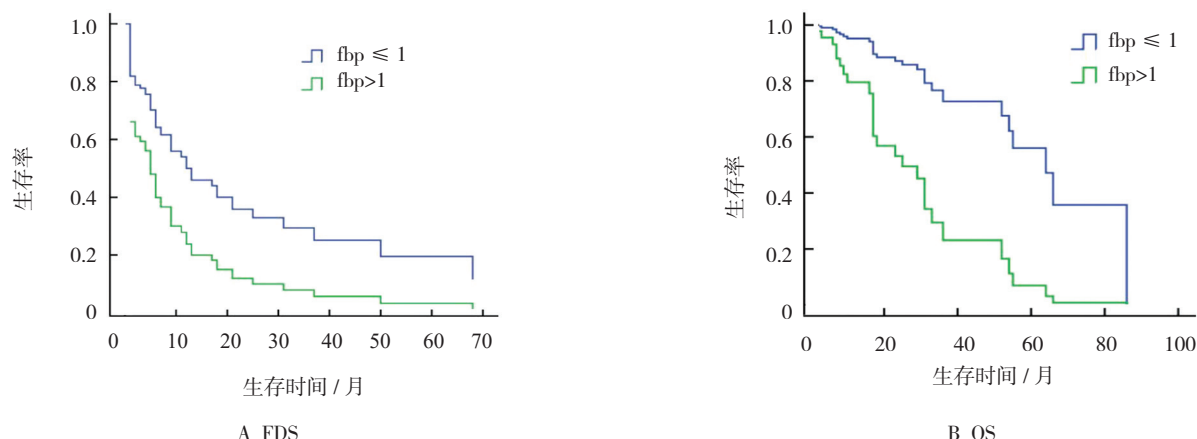
因素	b	S _e	χ ² 值	P 值	HR̂	95%CI	
						下限	上限
年龄							
<55 岁 39 例 VS ≥ 55 岁 52 例	-0.962	0.692	1.497	0.118	0.492	0.24	2.31
FIGO 分期							
III & IV, 81 例 VS I& II, 10 例	0.228	0.656	0.157	0.872	2.354	0.552	10.031
肿瘤分化程度							
高分化 63 例 VS 中低分化 28 例	-0.583	0.812	0.493	0.664	0.682	0.314	1.485
理想减积手术							
否 51 例 vs 是 40 例	0.892	0.889	10.783	0.002	3.478	1.436	8.412
淋巴结转移							
是 25 例 VS 否 66 例	-0.720	0.781	0.946	0.596	1.134	0.297	4.383
CA-125 含量 >1 000 u/ml							
是 52 例 VS 否 39 例	-0.594	0.619	0.889	0.556	1.845	0.815	4.196

续表 4

因素	b	S_b	χ^2 值	P 值	\hat{HR}	95%CI	
						下限	上限
CA-125 降至正常需要的时间							
高于 39 例 VS 低于 52 例	-1.921	0.876	4.520	0.039	4.017	1.758	9.162
α -FR 的表达量							
高表达 13 例 VS 低表达 78 例	2.938	0.867	13.217	0.001	5.503	1.625	18.643

表 5 卵巢癌患者 OS 影响因素的多因素分析

因素	b	S_b	χ^2 值	P 值	\hat{HR}	95%CI	
						下限	上限
理想减积手术							
否 51 例 VS 是 40 例	-0.893	0.286	0.297	0.327	1.953	0.741	5.316
CA-125 降至正常需要的时间							
高于 39 例 VS 低于 52 例	1.485	0.572	10.293	0.005	2.624	1.043	6.615
α -FR 的表达量							
高表达 13 例 VS 低表达 78 例	1.273	0.672	8.924	0.007	3.515	2.932	13.296



附图 FR- α 表达与浆液性卵巢癌患者生存状况的关系

3 讨论

CA125 是目前公认的卵巢癌标志物, 也是卵巢癌术前评估的重要指标。然而, CA125 对早期浆液性卵巢癌的敏感度相当低^[8]。除肿瘤分期, 组织学类型、肿瘤分化程度及是否接受理想减积手术, 都是能够影响卵巢癌患者的预后因子^[9]。与以往关于卵巢癌恶性度研究类似, 本研究结果表明, 术前患者 CA125 血清含量不能作为预估患者是否可以接受理想减积手术的标志物。此外, 本研究发现晚期卵巢癌患者卵巢癌组织 FR- α 高表达。TOFFOLI 等研究也表明, 晚期卵巢

癌患者 FR- α 表达高于早期患者, 提示 FR- α 在卵巢癌发生、发展过程中发挥重要作用^[10]。本研究还发现, FR- α 高表达与患者无法接受理想减积手术无关。P53 及 M2-PK 等其他生物标志物也与患者是否能接受理想减积手术相关。因此, 联合检查该生物标志物评估卵巢癌患者是否能接受理想减积手术是潜在的研究方向。

虽然 FR- α 在肿瘤细胞中的作用仍不清楚, FR- α 在卵巢癌、肾脏癌及肝癌与乳癌等多种非黏液性恶性肿瘤中异常高表达。此外, FR- α 也是肿瘤抗原之一, 约 70% 左右的卵巢癌或者乳癌女性会对 FR- α 产生

免疫反应。因为细胞膜蛋白酶与糖基化磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C、D 结合,使表达于细胞表面的可溶解 FR- α 释放。然而, MANTOVANI 等研究表明,只有 41% 患者能在血清中检测到 FR- α 。KALLI 等则报道 72% 上皮卵巢癌患者(浆液性为 81.7%, 内膜样为 66.7%, 透明细胞型为 63.3%, 黏液癌为 22.2%) 中 FR- α 阳性反应。但是目前尚无检测 α -FR 表达的标准方法,因此本研究采用管家基因 GAPDH 表达量作为基准评估 FR- α 基因的表达量。

FR- α 高表达与浆液性卵巢癌生存率呈负相关。本研究结果显示 FR- α 高表达患者 FDS 和 OS 较差。进一步分析,以 α -FR/GAPDH 比值 1.0 为临界值时,比值 <1 的患者 FDS 和 OS 更短。KALLI 等则研究表明,FR- α 状态与卵巢癌复发时间或者整体生存率无关。造成研究结果不一致的原因可能是,本研究将患者限定为浆液性卵巢癌患者,而 KALLI 等的研究中则包含其他各种组织学类型,如浆液性,黏液性与透明细胞癌等。因此,未来仍需收集大样本卵巢癌患者分析 FR- α 表达能否作为卵巢癌的预后因子。

研究表明,CA125 降至正常值以下的时间与卵巢癌预后密切相关。本研究与以往研究均为发现术前血清 CA125 含量与预后相关。但本研究与其他研究结果都显示出血清 CA125 降至正常值以下的时间是卵巢癌患者治疗响应率和生存率的预后因子。本研究表明卵巢癌患者开始化疗后,血清中 CA125 在 63 d 内消退至正常范围 (<35 u/ml),则患者 FDS 与 OS 更长。因此,血清中 CA125 下降越快提示卵巢癌细胞对化学药物敏感度越高。

FR- α 是卵巢癌治疗的潜在生物标志物,目前化疗依旧是治疗晚期卵巢癌的主要方法。卵巢癌易对化疗药物产生抗药性,因此选择个性化的化疗方案对卵巢癌治疗具有重要意义。由于 FR- α 具有组织特异性,可以在肿瘤治疗过程中以 FR- α 为载体将细胞毒性药物靶向运送至肿瘤细胞,从而避免对其他非肿瘤细胞和组织造成副作用。研究人员最近也使用与叶酸结合的治疗药物(如小分子化学药物、负载药物的脂质体及反义寡核苷酸与免疫制剂等)都成功的将药物运送至 FR- α 阳性反应的肿瘤细胞,以达肿瘤治疗效果。

由于 FR- α 在多种癌症中均呈现高水平表达,且目前没有标准、统一的检测方法,且本研究属于小样本量研究,故仍需进一步在大样本中深入研究 FR- α 在卵巢中的价值。

综上所述,FR- α 高表达的浆液性卵巢癌患者 FDS 和 OS 较短。确认 FR- α 表达能否作为卵巢癌存活率的生物预后标志物,仍需要在大样本量中研究证实。

参 考 文 献:

- [1] YADAV B S, SHARMA S C, PATEL F D, et al. Gynecological cancer as a second malignancy in patients with breast cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2017, 3(12): 154-160.
- [2] ESSELEN K M, CRONIN A M, BIXEL K, et al. Use of CA-125 tests and computed tomographic scans for surveillance in ovarian cancer[J]. *JAMA Oncol*, 2016, 2(11): 1427-1433.
- [3] PRADJATMO H, PRADJATMO H. Impact of preoperative serum levels of CA 125 on epithelial ovarian cancer surv IV al[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(4): 1881-1886.
- [4] GADDUCCI A, NOTARNICOLA M, MENICHETTI A, et al. Has serum CA 125 assay at the time of relapse a prognostic relevance for patients with recurrent ovarian carcinoma after primary cytoreduction and platinum- and paclitaxel-based chemotherapy[J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2016, 37(2): 182-188.
- [5] MOORE K N, BORGHAEI H, O'MALLEY D M, et al. Phase 1 dose-escalation study of mirvetuximab soravtansine (IMGN853), a folate receptor α -targeting antibody-drug conjugate, in patients with solid tumors[J]. *Cancer*, 2017, 24(8): 162-166.
- [6] CAI L, MICHELAKOS T, FERRONE C R, et al. Expression status of folate receptor alpha is a predictor of survival in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23): 37646-37656.
- [7] ZUO S, WEN Y, PANHA H, et al. Modification of cytokine-induced killer cells with folate receptor alpha (FR α)-specific chimeric antigen receptors enhances their antitumor immunity toward FR α -positive ovarian cancers[J]. *Mol Immunol*, 2017, 85(9): 293-304.
- [8] TIWARI R K, SAHA K, MUKHOPADHYAY D, et al. Evaluation of preoperative serum levels of CA 125 and expression of p53 in ovarian neoplasms: a prospective clinicopathological study in a tertiary care hospital[J]. *J Obstet Gynaecol India*, 2016, 66(2): 107-114.
- [9] 刘恩令, 糜若然, 周玉秀, 等. 卵巢癌新辅助化疗前后血 CA125 的变化规律及其对预后的价值 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(2): 352-353.
- [10] TOFFOLI G, CERNIGOI C, RUSSO A, et al. Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers[J]. *Int J Cancer*, 1997, 74(2): 193-198.

(王荣兵 编辑)