

• 论 著 •

ERCC1 基因多态性和蛋白表达与晚期非小细胞肺癌的 TP 化疗疗效关系的研究*

徐向勇¹, 许平², 王旭³, 王清^{2△}

(武汉钢铁(集团)公司第二职工医院: 1. 检验科; 2. 肿瘤科; 3. 外科 430085)

摘要:目的 探讨晚期非小细胞肺癌患者的切除修复交叉互补基因 ERCC1 基因多态性与表达情况与多西他赛+顺铂(TP)化疗方案疗效关系。**方法** 分别用测序和免疫组织化学法检测 100 例晚期非小细胞肺癌患者的 ERCC1 基因 C8092A 位点和 C118T 位点基因型,同时利用免疫组织化学法检测 ERCC1 基因在肿瘤组织中表达情况,并分析与 TP 的化疗疗效关系。**结果** ERCC1 的两个位点的基因型多态性均与顺铂疗效之间差异无统计学意义($P>0.05$);对两个位点组合分析,同为 CC 基因型患者疗效的有效率高于非同 CC 基因型患者,但差异无统计学意义($P>0.05$);Kaplan-Meier 生存曲线分析两位点基因多态性与无进展生存期(PFS)关系,C8092A 位点的 CC、CA+AA 基因型的中位 PFS 分别为 4.9 月、4.3 月,差异有统计学意义($P<0.05$);C118T 的 CC、CT+TT 基因型的中位 PFS 分别为 4.4 月、4.6 月,差异无统计学意义($P>0.05$);免疫组织化学结果显示 ERCC1 表达阴性患者中 TP 疗效总有效率(48.6%)显著高于阳性患者(23.3%),差异有统计学意义($P<0.05$)。ERCC1 阴性患者中位 PFS(5.0 月)显著高于阳性患者(3.8 月),差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** ERCC1 基因 C8092A 和 C118T 基因多态性 TP 疗效之间无显著性关系,C8092A 位点 CC 基因型的患者有较长的 PFS;ERCC1 的表达情况可以作为晚期非小细胞肺癌的 TP 化疗方案的预后因素之一。

关键词:晚期非小细胞肺癌; 切除修复交叉互补基因; 单核苷酸多态性; 疗效评价

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.09.011 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)09-1233-03

Correlation of gene polymorphism, ERCC1 expression level and effect of TP chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer*

XU Xiangyong¹, XU Ping², WANG Xu³, WANG Qing^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Oncology; 3. Department of Surgery, the Second Worker Hospital of Wuhan Iron and Steel Group, Wuhan, Hubei 430085, China)

Abstract: Objective To research the correlation of the gene polymorphism, expression level of excision repair cross complementation group 1 (ERCC1) and curative effect in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with platinum-based (TP) chemotherapy. **Methods** Sequencing was used for detecting the single nucleotide polymorphism (SNP) loci C8092A and C118T of ERCC1 in 100 patients with NSCLC, and immunohistochemical method (IHC) was used for detecting the expression of ERCC1 in tumor tissue. And the relationship of effect of chemotherapy and TP was analyzed. **Results** There were no correlation between polymorphism of C8092A, C118T and TP curative effect in patients with advanced NSCLC. Comprehensive analysis with two loci together found that there was better curative effect in both CC genotypes. However, the difference was not statistically significant. Progression free survival (PFS) of genotype CC and CA plus AA in C8092A loci were 4.9 months and 4.3 months, and there was significant difference between two groups ($P<0.05$). PFS of genotype CC and CT plus TT of C118T loci were 4.4 months and 4.6 months, but the difference was not statistically significant ($P>0.05$). The curative effect rate of patients with ERCC1 negative expression was 48.6%, and which of the ERCC1 positive expression was 23.3%, the difference was statistically ($P<0.05$). And PFS of patients with ERCC1 negative expression (5 months) patients was significantly higher than that of the patients with ERCC1 positive expression (3.8 months) ($P<0.01$). **Conclusion** There is no correlation between the genotype of ERCC1 C8092A or C118T loci and the curative effect of TP in patients with advanced NSCLC. Patients with genotype CC of C8092A loci have a longer PFS than other genotypes. Expression of ERCC1 can be used for one of prognostic factors in the advanced NSCLC patients treated with TP.

Key words: advanced non-small cell lung cancer; excision repair cross-complementing; single-nucleotide polymorphism; curative effect

肺癌的发病率和病死率目前均已跃居恶性肿瘤的首位,占肺实质恶性肿瘤的 90%~95%,包括小细胞肺癌(SCLC)及非小细胞肺癌两种类型,其中后者大约占全部肺癌的 80%^[1]。化疗虽仍是目前治疗晚期 NSCLC 最有效的手段,然而晚期 NSCLC 最好的化疗的有效率也只有 20%~40%,多西他赛+顺铂(TP)组合化疗方案是目前临床上用于治疗晚期 NSCLC

的首选化疗方案之一^[2]。但临床发现,有些晚期 NSCLC 患者对其不敏感,其疗效受基因多态性的影响已经被证实,且药物本身具有细胞毒性,致使某些患者在接受化疗后不但肿瘤没有得到有效控制,反而因许多不良反应,影响患者生活质量^[3]。因此,对于晚期 NSCLC 化疗敏感并实施个体化治疗具有重要意义。

* 基金项目:武汉市临床医学科研项目(WX14C28)。

作者简介:徐向勇,男,副主任技师,主要从事基因扩增检验和临床基础检验方面的研究。△ 通信作者, E-mail:575847321@qq.com。

切除修复交叉互补组 1 (ERCC1) 是核苷酸切除修复途径的重要成分,通过对铂类 DNA 复合物的切除修复而影响铂类药物的疗效^[4]。研究显示 ERCC1 C8092A 和 C118T 位点单核苷酸多态性与表达水平在影响晚期 NSCLC 的 TP 的疗效^[5-6],但目前已有的研究仍存在争议。本研究评价 ERCC1 多态性与免疫组化表达水平与 TP 的疗效在晚期 NSCLC 治疗效果,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 8 月至 2015 年 3 月在武汉钢铁第二职工医院住院治疗晚期 NSCLC 患者 100 例,患者年龄 40~72 岁,平均 61 岁;其中男 66 例,女 34 例;ⅢB 期 35 例,Ⅳ期 65 例。患者的诊断按 2009 年国际肺癌研究中心 (IASLC) 第 7 版 TNM 分期标准。所有患者均经 CT 确诊具可测量肿瘤病灶。化疗前患者血常规、肝肾功能均正常,心电图无明显异常,功能状况评分均大于 60 分。组织标本均经纤维支气管镜或 CT 引导下穿刺活检确诊。所有患者化疗前抽静脉血 2 mL,置乙二胺四乙酸纳抗凝管。

1.2 方法 首次化疗前所有患者均应未接受任何治疗,确诊后均给予 TP 方案,全身化疗。多西他赛 75 mg/m²,顺铂 75 mg/m²,并给予水化、止吐等常规治疗,每 3 周为一周期,100 例患者均接受 2~4 个周期 TP 方案全身化疗,总计完成 145.0 个周期,平均化疗 2.4 个周期,所有患者在至少化疗 2.0 个周期后评价疗效。

1.3 评价标准 参照实体实体瘤近期客观疗效评定标准 (RECIST) 分为完全缓解 (CR):所有目标病灶消失且持续 4 周以上;部分缓解 (PR):肿瘤最大径之和至少减少 30%,并保持 4 周以上;疾病进展 (PD):基线病灶长径总和增加大于或等于 20% 或出现新病灶;病灶稳定 (SD):缩小未达 PR 或增加未达 PD。参考国内外同类研究,设定 CR+PR 为有效,SD+PD 为无效。疾病进展时间 (TTP) 以治疗开始计算至患者肿瘤进展即无进展生存期 (PFS) 或随访结束。随访日期截至 2016 年 1 月 31 日。随访结束日止,无进展的患者定义为删失数据。

1.4 仪器与试剂 DNA 扩增使用 BIO-RAD C1000 PCR 仪;DNA 提取试剂为 Qiagen 的 DNA 提取试剂盒;DNA 扩增使用含 DNA 反应所需 Mg 离子等预混 Taq 酶 (大连宝生物公司) 的试剂盒。免疫组化 ERCC1 单克隆抗体和免疫组化检测试剂 (丹科医疗器械技术服务有限公司,上海)。

1.5 方法

1.5.1 DNA 提取 ERCC1 基因扩增与 C8092A 与 C118T 位点分析 DNA 的提取按照试剂盒说明进行,提取 DNA 进行凝胶电泳后经紫外成像系统判定提取效果;ERCC1 的基因扩增中引物设计、扩增方法按照王敬慧等^[5]描述的方法进行,扩增产物进行凝胶电泳后经紫外成像系统判定扩增效果;扩增后产物经克隆送测至商业公司进行测序;测序结果用 Bioedit (Hall,199) 软件打开生成的文件,观察序列统计 C8092A 与 C118T 位点的多态性。

1.5.2 ERCC1 基因免疫组化表达 获取的组织进行经脱水、透明、石蜡包埋后制成 4 μm 的薄片,后经免疫组织化学检测,免疫组化的检测使用手工法,步骤按照试剂盒方法进行,染色结果在显微镜观察。ERCC1 阳性细胞表现为细胞核棕黄色或棕红色,采用国内通用标准,根据阳性细胞所占的百分数分级,大于“+”定义为阳性。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析。计数资料采用百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验;生存曲线分析采用 Kaplan-Meier 法,生存率比较使用 Log-rank 分析,预后因素分析使用 Cox 多因素回归分析;以 $P < 0.05$ 为差异有统计

学意义。

2 结果

2.1 ERCC1 基因多态性及 TP 方案疗效评价 100 例患者 C8092A 的 CC、CA、AA 基因型所占百分比分别为:52.0%、36.0%、12.0%;C118T 的 CC、CT、TT 的基因型所占百分比分别为:49.0%、36.0%、15.0%。不同基因型经 TP 方案化疗后的总有效率为 32.0% (CR+PR)。通过分析,C8092A 各基因型在疗效之间差异无统计学意义 ($P=0.443$),同样 C118T 各基因型之间差异也无统计学意义 ($P=0.170$)。见表 1。

表 1 ERCC1 基因 C8092A、C118T 位点多态性与 TP 化疗方案的疗效评价

| 基因位点 | 基因型 | CR+PR(n) | SD+PD(n) | 合计(n) | 有效率(%) |
|--------|-----|----------|----------|-------|--------|
| C8092A | CC | 18 | 34 | 52 | 34.6 |
| | CA | 10 | 26 | 36 | 27.8 |
| | AA | 2 | 10 | 12 | 16.7 |
| C118T | CC | 19 | 30 | 49 | 38.8 |
| | CT | 8 | 28 | 36 | 22.2 |
| | TT | 3 | 12 | 15 | 25.0 |

2.2 ERCC1 基因 C8092A 与 C118T 多态性联合与 TP 方案疗效比较 本研究对 ERCC1 的 2 位点多态性联合进行了分析,将 C8092A 位点和 C118T 的 CA 与 AA 基因型和 CT 与 TT 基因型组合归类分析 TP 方案的疗效见表 2,结果显示,CC 基因的有效率要高于其他基因组合,其中同时含突变位点的基因型有效率最低为 14.8%,但各基因型组合之间差异无统计学意义 ($P=0.19$)。

表 2 ERCC1 基因 C8092A、C118T 位点多态性联合与 TP 化疗方案的疗效比较

| 基因型 | | CR+PR | SD+PD | 合计 | 有效率 |
|--------|-------|-------|-------|-----|------|
| C8092A | C118T | (n) | (n) | (n) | (%) |
| CC | CC | 11 | 17 | 28 | 39.2 |
| CC | CT+TT | 7 | 17 | 24 | 29.2 |
| CA+AA | CC | 8 | 13 | 21 | 28.1 |
| CA+AA | CT+TT | 4 | 23 | 27 | 14.8 |

2.3 ERCC1 基因 C8092A、C118T 多态性与 PFS 的相关性比较 本研究分别对 2 个位点进行了 Kaplan-Meier 生存曲线分析。其中 C8092A 位点 CC 基因型与 CA+AA 基因 PFS 中位数分别为 4.9 月和 4.3 月,不同基因型之间差异有统计学意义 ($P=0.03$)。C118T 位点 CC 基因型与 CT+TT 基因 PFS 中位数分别为 4.4 月和 4.6 月,不同基因型之间差异无统计学意义 ($P=0.35$)。通过 Cox 多因素回归进行分析 C8092A 和 C118T,2 个位点不是 PFS 的独立因素,多态性均不是影响晚期 NSCLC 癌患者 PFS 的独立因素,差异无统计学意义 ($P=0.07$)。

2.4 ERCC1 表达与 TP 化疗疗效关系 ERCC1 在晚期肺癌组织中表达阳性率为 41.0%,其中肺腺癌阳性率为 46.7% (21/45) 高于肺鳞癌阳性率 [32.6% (14/43)],两者之间差异无统计学意义 ($P=0.18$)。ERCC1 表达阳性、阴性 TP 化疗有效率分别为 23.3% 和 48.6%,两者之间差异有统计学意义 ($P=0.02$)。ERCC1 的表达与性别、年龄、病理分期、病理类型无关,见表 3。

2.5 ERCC1 表达与 PFS 的关系 ERCC1 阳性和阴性的患者

的 PFS 中位数 3.8 月和 5.0 月,两者之间差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。通过 Cox 多因素回归进行分析 C8092A、C118T 基因型与免疫组化表达情况,ERCC1 表达情况可以作为晚期 NSCLC 的 TP 化疗预后的独立影响因素,差异有统计学意义 ($P = 0.03$)。

表 3 ERCC1 表达与临床特征的关系 (n)

| 临床特征 | 亚组 | ERCC1 阳性 | ERCC1 阴性 | P |
|------|-------|----------|----------|------|
| 性别 | 男 | 36 | 30 | 0.48 |
| | 女 | 16 | 18 | |
| 年龄 | ≥60 岁 | 24 | 31 | 0.24 |
| | <60 岁 | 25 | 20 | |
| 病理分期 | Ⅲ B | 15 | 20 | 0.29 |
| | Ⅳ | 35 | 30 | |
| 病理类型 | 腺癌 | 21 | 24 | 0.18 |
| | 鳞癌 | 14 | 29 | |
| | 其他 | 5 | 7 | |
| 疗效评定 | CR+PR | 7 | 23 | 0.02 |
| | SD+PD | 34 | 36 | |

3 讨 论

ERCC1 基因位于常染色体 19q13-2,编码 297 个氨基酸的蛋白,是核酸切除修复酶家族(NER)中重要成员,其可以修复铂类化疗药物对于肿瘤 DNA 的损伤,RCC1 基因在 NER 修复途径中起到关键作用,因此 ERCC1 基因与铂类药物的耐药密切相关^[4]。铂类药物是目前晚期 NSCLC 的主要化疗药物。本研究联合 ERCC1 的 SNP 多态性位点和表达情况与铂类化疗药物的疗效关系。

本研究对 2 个 SNP 位点分别进行了疗效和生存曲线分析。其中 2 个位点的基因型与疗效之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),这可能与 C118T 的多态性未改变相应的密码子编码的氨基酸有关,而 C8092A 位点位于 3' 端的非编码区有关,对 2 个位点联合分析发现,同为 CC 的纯和基因较其他组合对于铂类药物的疗效有效性高,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$);这与王敬慧等^[5]研究结果相同。然而,也有研究与上述结果有所差异,如 Bandeira 等^[7]对 C118T 不同基因与顺铂类药物疗效研究发现,纯和 CC 基因较其他 2 种基因的疗效高,不同基因型之间存在差异;王伟力等^[8]研究发现 C118T 位点 TT 基因型铂类药物化疗疗效有效率与 CT+CC 基因型之间存在显著性差异,而 C8092A 位点两组之间差异无统计学意义。本研究中对 2 个位点不同基因型进行了 PFS 分析,得到不同的结果,结果显示 C8092A 位点不同基因型的 PFS 差异有统计学意义 ($P < 0.05$),CC 基因型较其他基因型 PFS 长;而 C118T 不同基因型的 PFS 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。对于这一结果与 Kalikaki 等^[9]对于 C8092A 位点的中位生存期研究相反,CA+AA 基因型较 CC 基因型有更长的生存期,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

本研究前瞻性的综合了 ERCC1 基因的 SNP 和表达情况两方面的研究,先前的研究同时对这 2 方面研究较少。本研究结果显示 ERCC1 的在肺腺癌的阳性率高于肺鳞癌,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。对于 ERCC1 的在肺腺癌和鳞癌的表达情况与先前研究结果不尽相同,梁英平等^[10]研究显示 ERCC1 的表达与病理类型无相关性;然而单利等^[11]研究显示 ERCC1 在肺腺癌中表达显著高于肺鳞癌,肺腺癌的高表达与临床化疗敏感性低于鳞癌有关。另外,本研究还对 ERCC1 基

因表达与 PFS 进行了分析,发现阴性表达的中位 PFS 显著高于阳性表达的患者,对 C8092A 位点、C118T 位点基因型和表达情况进行 Cox 回归分析发现 ERCC1 表达情况可以作为预后的独立预测因素 ($P = 0.03$)。这一结果与大部分研究结果一致,廖茂良等^[12]研究结果显示采用铂类药物进行治疗患者的 ERCC1 低表达组化疗有效率显著高于高表达组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。综合本研究和先前的研究显示 ERCC1 的表达可以作为晚期 NSCLC 患者铂类药物化疗的预后指标之一。

参考文献

- [1] Katanoda K, Yako-Suketomo H. Trends in lung cancer mortality rates in Japan, USA, UK, France and Korea based on the WHO mortality database[J]. Jpn J Clin Oncol, 2012, 42(3): 239-240.
- [2] Bartolucci R, Wei J, Sanchez JJ. XPG mRNA expression levels modulate prognosis in resected non-small-cell lung cancer in conjunction with BRCA1 and ERCC1 expression [J]. Clin Lung Cancer, 2009, 10(1): 47-52.
- [3] Spiro SG, Silvestri GA. The treatment of advanced non-small cell lung cancer[J]. Curt Opin Pulm Med, 2005, 11(4): 287-291.
- [4] Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(5): 1291-1295.
- [5] 王敬慧, 张权, 张卉, 等. ERCC1 基因多态性与晚期非小细胞肺癌患者铂类化疗疗效的关系[J]. 结核病与胸部肿瘤, 2010, 13(4): 106-110.
- [6] 陈金鸣, 姚伟荣. ERCC1 基因与非小细胞肺癌关系的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(4): 956-959.
- [7] Bandeira N, Tsur D, Frank A, et al. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(6): 1797-1783.
- [8] 王伟力, 潘红, 钟文, 等. ERCC1 基因多态性与非小细胞肺癌预后的相关性[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(5): 854-857.
- [9] Kalikaki A, Kanaki M, Vassalou H, et al. DNA repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome in advanced non-small cell lung cancer[J]. Clin Lung Cancer, 2009, 10(2): 118-123.
- [10] 梁英平, 刘娟妮, 白国栋, 等. ERCC1、 β -Tubulin 在非小细胞肺癌中的表达及其与肺癌预后相关性研究[J]. 陕西医学杂志, 2015, 44(7): 801-804.
- [11] 单利, 韩志刚, 刘莉, 等. 晚期非小细胞肺癌 ERCC1 和 BRCA1 的表达及与顺铂耐药性的临床研究[J]. 肿瘤, 2009, 29(6): 571-574.
- [12] 廖茂良, 古华, 潘小稼. ERCC1 和 TYMS 的表达与晚期非小细胞肺癌患者采用替吉奥联合铂类化疗疗效的关系研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(10): 1561-1564.