

ERCC1 多态性与肺癌铂类化疗耐药的关系研究 *

李代蓉¹ 杨燕青² 黄新华²

(1 重庆市肿瘤研究所肿瘤内科 重庆 400030; 2 生物芯片上海国家工程研究中心 上海 201203)

摘要 目的:研究 DNA 切除修复交叉互补基因 1 (excision repair cross-complementing gene1, ERCC1) 单核苷酸多态性与非小细胞肺癌铂类药物化疗敏感性的关系。**方法:**应用基因测序方法检测 89 例以铂类药物为主要化疗方案的非小细胞肺癌患者的 ERCC1 Asn118Asn 基因型, 比较不同基因型与化疗疗效的关系。**结果:**89 例患者化疗总有效率为 29.2%。携带 ERCC1 CC 基因型、含至少一个变异基因型(TC 和 TT 基因型)患者的有效率分别为 38.5%和 61.5%($X^2=2.151$, $p=0.142$), 基因型在化疗有效组和无效组之间的分布无差异($p>0.05$)。**结论:**ERCC1 Asn118Asn 单核苷酸多态性可能与非小细胞肺癌对铂类药物化疗的敏感性无关。

关键词:DNA 切除修复交叉互补基因 1; 非小细胞肺癌; 化疗; 药物敏感性

中图分类号:R730.43 R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-519-04

Correlation of excision repair cross-complementing gene1 polymorphisms and platinum chemotherapy resistance of lung cancer*

LI Dai-rong¹, YANG Yan-qing², HUANG Xin-hua²

(1 Department of oncology, Chongqing tumor Institute, Chongqing, China 400030;

2 National Engineering Center for Biochip at Shanghai, Shanghai, China 201203)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between ERCC1 single nucleotide polymorphisms and sensitivity to Platinum-based chemotherapy among patients with advanced non small cell lung cancer. **Methods:** We used gene sequencing analysis to determine the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of excision repair cross-complementing gene1 (ERCC1) in DNA from peripheral lymphocytes. Totally 89 patients with NSCLC were treated with Platinum-based chemotherapy, and clinical response was evaluated after 2 cycles. The association between ERCC1 gene polymorphisms and chemosensitivity were analyzed. **Results:** The overall response rate was 29.2. The overall response rate of ERCC1 CC genotypes and TT/CT genotypes were 38.5% and 61.5% ($X^2=2.151$, $p=0.142$). Chemotherapy response did not show statistically significant differences between the wild genotypes and the variant genotypes for the ERCC1 gene (38.5% vs 61.5%, $X^2=2.151$, $p=0.142$). **Conclusion:** ERCC1 Asn118Asn SNP may be not associated with sensitivity to platinum-based chemotherapy in NSCLC patients.

Key words: excision repair cross-complementing gene1; non small cell lung cancer; sensitivity; chemotherapy

Chinese Library Classification: R730.43, R734.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)03-519-04

目前以铂类药物为基础的联合化疗是晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的一线标准治疗方案。铂类药物的主要作用机制是与 DNA 上的鸟嘌呤、腺嘌呤和胞嘧啶结合形成 Pt-DNA 加合物, 导致 DNA 的链间交联或链内交联, 引起 DNA 损伤, 从而导致细胞死亡^[1]。作为铂类药物的作用靶点, DNA 修复能力不同将直接导致肿瘤细胞对 DNA 相关细胞毒性药物敏感性的个体间差异^[2]。因此研究 DNA 修复基因单核苷酸多态性与 NSCLC 铂类药物化疗敏感性之间的关系对于指导临床个体化治疗可能有重要意义。DNA 切除修复交叉互补基因 1 (excision repair cross-complementing gene1, ERCC1) 作为 DNA 碱基切除修复途径的限速酶, 在铂类药物引起的 DNA 损伤修复过程有重要作用。我们观察了 89 例以铂类药物为基础化疗的晚期 NSCLC 患者的近期疗效, 同时检测其 ER-

CC1 单核苷酸多态性, 探讨该基因多态性与晚期 NSCLC 铂类药物化疗敏感性的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 研究对象 2006 年 3 月至 2008 年 12 月在重庆市肿瘤医院肿瘤内科住院化疗的 89 例 NSCLC 患者。所有病例均为经病理学确诊的初次治疗患者, 均经 CT 扫描证实有可测量病灶, 预计生存期 3 个月以上。其中男性 64 例, 女性 25 例, 年龄 21~84 岁, 平均年龄 59.08 岁。89 例中腺癌 43 例, 鳞癌 30 例, 腺鳞癌、肺泡细胞癌及未分类的共 16 例; 临床分期: IIIa 期 12 例, IIIb 期 18 例, IV 期 59 例。化疗前患者 ECOG 评分 0~2, 无重要器官功能严重受损, 血常规、肝肾功能及心电图在正常范

* 基金项目: 重庆市卫生局科研基金(编号 07-2-180)

作者简介: 李代蓉(1972-), 女, 博士, 副主任医师, 研究方向: 肺癌的基础研究与临床应用。

Tel: 023-65313873; E-mail: lidairong@sohu.com

△通讯作者: 李代蓉 E-mail: lidairong@sohu.com

(收稿日期: 2010-10-15 接受日期: 2010-11-10)

围内。

1.1.2 化疗方案 所有患者均接受以铂类药物为基础的化疗方案,其中采用铂类联合吉西他滨(GEM)化疗者 3 例,联合紫杉醇(TAX)和多西紫杉醇(DOC)化疗者 73 例,联合长春瑞滨(nvb)化疗者 13 例,联合其他药物化疗者? 例。具体用量: CDDP 30mg/m²,d 1~3;NVB25mg/m²,d 1,d 8;TAX 135mg/m² d 1, DOC 70mg/m² d 1,GEM 1000mg/m²,d 1、d 8;每 3 周重复。

1.1.3 疗效评价及分组 患者经 2 个周期化疗后均行 CT 扫描以评价其近期疗效。按照 RECIST 1.1 实体瘤疗效评定标准进行疗效评价。以 CR 和 PR 为有效计算总有效率。CR 和 PR 者为化疗敏感组,SD 和 PD 者为化疗不敏感组。

1.2 基因型分析

化疗前所有病例抽静脉血 2 ml,置乙二胺四乙酸钠抗凝管,置 -80 ℃低温冰箱保存备用。

1.2.1 全血基因组 DNA 提取 采用 EZgeneTM DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。

1.2.2 基因型分析 DNA 模版进行 PCR 反应。PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。正向引物:AGGGACTGTCCAGGGTTAGG; 反向引物:CTCCAGCTCTTGTGTCAGT。PCR 反应体系共 15 uL: 10 X PCR Buffer 1.5uL,Mg²⁺(25mM) 0.3 uL,dNTPs 0.3 uL,

引物各 1 uL,DNA 模板 1 uL,1 rTaq(5U/uL) 0.1 uL,1*Q-solution 2 uL。采用降落 PCR(touchdown PCR)方法,PCR 扩增参数: 首先 95 ℃ 5 min,然后 95 ℃ 30s、60℃ 30s、72℃ 45s,3 5 个循环,最后 72℃延伸 10min,扩增结束 4℃保温。反应结束取 3uL PCR 产物进行 1%琼脂糖电泳。PCR 产物长度 505bp。

1.2.3 测序 采用 ABI 3730 测序仪检测 PCR 产物。

1.3 统计学分析

应用 SPSS10 软件进行统计分析,分别计算 3 种基因型的频率,确认其是否符合 hardy-weinberg 平衡。率的比较采用 χ^2 检验,用 logistic 回归模型计算比值比(OR)及其 95%可信区间(CI)比较基因型对化疗敏感性的影响。

2 结果

2.1 ERCC1 基因分型

ERCC1 基因型分布符合 hardy-weinberg 平衡($X^2=0.32$, $p=0.57$),表明该组病例具有群体代表性。89 例 NSCLC 患者中,携带 ERCC1 118 基因 CC、TC、TT 基因型的频率分别为 45 例(50.6%)、35 例(39.3%)和 9 例(10.1%)。差异无统计学意义($p>0.05$)。各基因型图谱详见图 1。

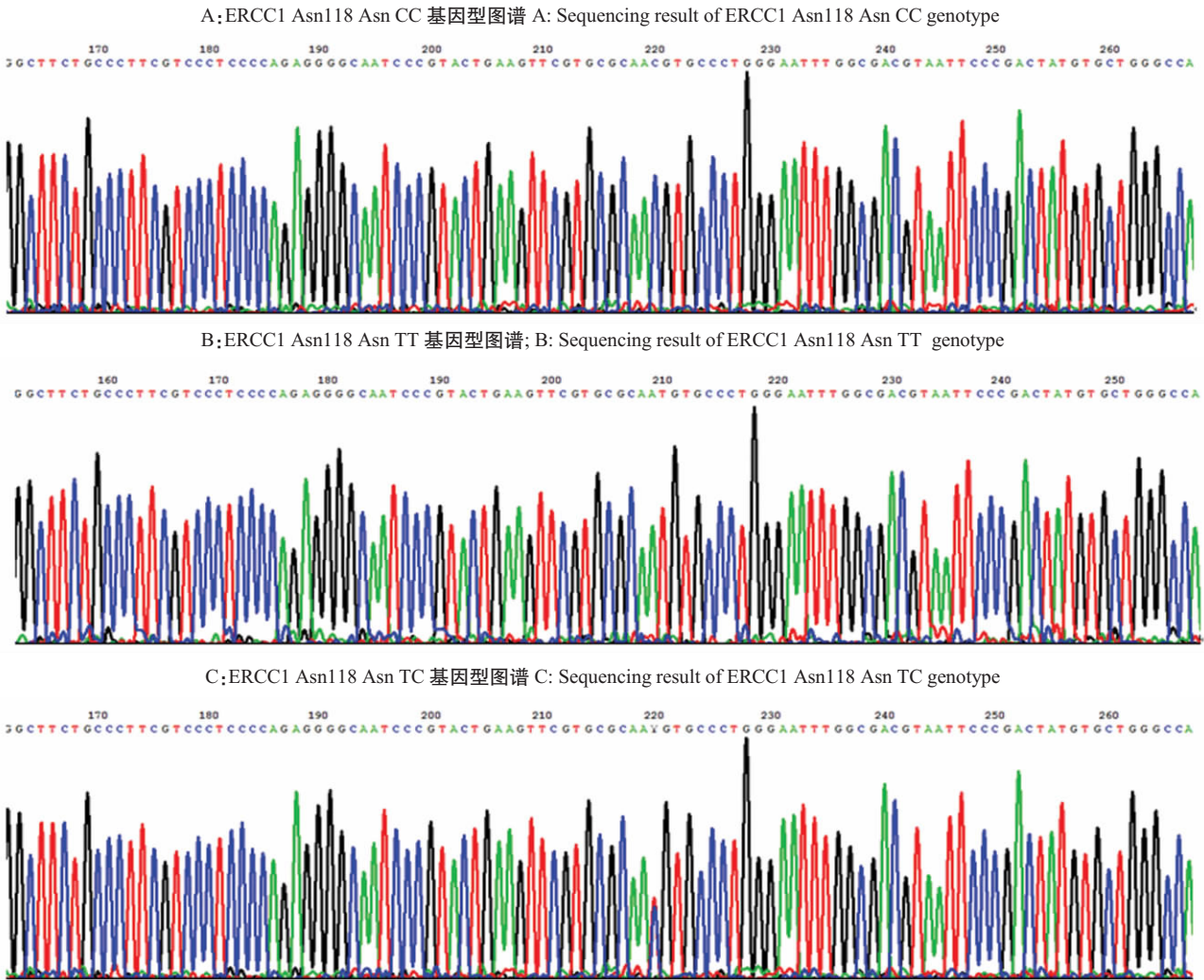


图 1 ERCC1 Asn118 Asn 单核苷酸多态性检测
Fig.1 The genotyping results of ERCC1 Asp118 Asn single nucleotide polymorphisms

2.2 化疗疗效

89 例 NSCLC 患者中,CR 3 例(3.4%),PR 23 例(25.8%),SD 51 例(57.3%),PD 12 例(13.5%),化疗总有效率 29.2%。

2.3 基因型与化疗疗效的关系

89 例晚期非小细胞肺癌患者中, 其中携带 CC 基因型、含

至少一个变异基因型(TC 和 TT 基因型)患者的有效率分别为 38.5%(10/26)、61.5%(16/26), 差异无统计学意义($\chi^2=2.151, p=0.142$)。

TC+TT 基因型患者的化疗敏感性高于携带 CC 基因型的患者($OR=1.997, 95\%CI=0.778\sim5.062, p=0.145$)。见表 1。

表 1 ERCC1 118 基因型与晚期非小细胞肺癌化疗敏感性的关系
Table 1 Response to Treatment of the Patients With Advanced NSCLC According to ERCC1 genotype

genotype	response		P
	CR+ PR	SD+ PD	
CC	10(22.2%)	35(77.8%)	0.142
TC+TT	16(36.3%)	28(63.7%)	
Total	26	63	

2.4 基因型与肺癌组织学类型的关系

不同基因型和病理类型患者间化疗有效率比较无统计学

差异($p>0.05$), 详见表 2。

表 2 ERCC1 基因型与晚期非小细胞肺癌病理及化疗敏感性的关系
Table 2 Association between Response to Treatment of the Patients With Advanced NSCLC According to ERCC1 genotype and the histology of lung cancer

genotypes	AC		SCC		Others	
	CR+PR	SD+PD	CR+PR	SD+PD	CR+PR	SD+ PD
CC	5(%)	18(%)	2(%)	9(%)	3(%)	8(%)
TC+TT	7(%)	13(%)	7(%)	12(%)	2(%)	3(%)
Total	12(100%)	31(100%)	9(100%)	21(100%)	5(100%)	11(100%)

3 讨论

单核苷酸多态性(SNP)是指基因组 DNA 序列中频率>1% 的单个核苷酸的变异,这种变异可导致其编码蛋白结构和功能的改变而影响其生物学功能。DNA 修复基因的 SNP 可能改变修复酶活性而导致不同个体 DNA 损伤修复能力的差异。NSCLC 是最常见的肺癌类型,而大多数 NSCLC 确诊时已是晚期,丧失了手术机会,化疗是目前治疗晚期 NSCLC 的主要方法。耐药是目前肿瘤化疗失败的主要原因之一。肿瘤细胞耐药常伴随 DNA 损伤修复能力增强,从而影响铂类药物的化疗敏感性。人类参与 DNA 修复的主要途径有核苷酸切除修复途径(nucleotide excision repair, NER)、碱基切除修复途径(base excision repair, BER)、错配修复(MMR)、同源重组(HR)。ERCC1 基因定位于染色体 19q13.2-13.3, 作为 NER 系统的关键基因^[9],ERCC1 在铂类药物引起的 DNA 损伤修复过程有重要作用,其正常表达是维持该修复酶功能的分子基础。已有很多文献报道了 ERCC1 多态性与铂类药物的敏感性密切相关^[4-7],其 mRNA 表达水平可以当成铂类药物化疗效果的独立预测指标^[8,9]。ERCC1 基因第 118 密码子 Asn-Asn 多态, 核苷酸序列由 AAC 转化为 AAT,虽然为无义突变,但该无义突变却能够影响 ERCC1 蛋白的表达水平。C 型变异为 T 型增高了 ERCC1mR-

NA 的水平,增强 DNA 修复能力,导致铂类耐药^[10]。体外实验证明:在人卵巢癌细胞株中,含有野生型 ERCC1 序列的细胞株比第 118 密码子变异型的细胞株对铂类药物较敏感^[11]。Rosell 等^[9]将晚期肺癌患者根据其肿瘤组织表达 ERCC1 mRNA 的情况选择不同的化疗方案,低表达者选用含铂的多西他赛 / 顺铂方案,高表达者选用非铂的多西他赛 / 吉西他滨方案,对照组不论 ERCC1mRNA 的表达情况均使用常规含铂多西他赛 / 顺铂方案。结果显示,含多西他赛 / 顺铂的方案对 ERCC1mRNA 低表达肺癌患者的有效率达 56.6%效果好; 非铂的多西他赛 / 吉西他滨方案治疗 ERCC1mRNA 高表达的 NSCLC, 有效率为 37.7%,对照组为 40.4%,ERCC1 mRNA 低表达组与其它两组相比,差异有统计学意义($P=0.02$)。Park^[10,12]等研究发现,ERCC1 第 118 位密码子的多态性可影响患者的生存率和疗效, 基因型为 C/C 的患者中位生存期高于基因型为 C/T 或 T/T 的患者(486 天 vs281 天),认为 ERCC1 第 118 位密码子 C/C 基因型可作为预测以顺铂为基础治疗 NSCLC 患者疗效的指标。本试验所观察到的结果是 ERCC1 118 各基因型之间疗效差异无统计学意义, 目前没有支持 ERCC1 多态性与对肺癌铂类疗效相关的证据,考虑不同结果产生的原因可能与不同人种,突变等位基因频率不同以及样本量相对较小有关。总之,目前有关 ERCC1 的 SNPs 与肺癌化疗敏感性的关系研究国内报道较少,但结果并不统一。ERCC1 基因多态性是

否能作为判断肿瘤患者接受铂类药物化疗敏感性的指标还有待进一步加大样本量的研究, 同时还需联合其他 DNA 修复基因多态的研究。

参考文献(References)

- [1] Hildebrandt MA, Gu J, Wu X. Pharmacogenomics of platinum-based chemotherapy in NSCLC[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2009, 5(7):745-755
- [2] Kiyohara C, Takayama K, Nakanishi Y. Association of genetic polymorphisms in the base excision repair pathway with lung cancer risk: a meta-analysis[J]. Lung Cancer, 2006,54(3):267-283
- [3] Sarries C, Haura EB, Roig B, et al. Pharmacogenomics strategies for developing customized chemotherapy in non-small cell lung cancer. Pharmacogenomics, 2002;3(6):763-780
- [4] 进展期非小细胞肺癌中 ERCC1 单核苷酸多态性与铂类化疗敏感性的 Meta 分析[J].宋勇,吴颖,申萍.循证医学,2009,9(2):98-100
Song Yong, Wu Ying, Shen Ping. A Meta-Analysis of ERCC1 SNP and Chemosensitivity to Cisplatin in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer [J]. Journal of Evidence-Based Medicine, 2009,9(2): 98-100 (In Chinese)
- [5] Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy [J]. N Engl J Med, 2006,355:983-991
- [6] Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil Chemotherapy[J]. J Clin Oncol, 2001;19: 4298-4304
- [7] Lord RVN, Brabender J, Gandara D, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small-cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2002;8:2286-2291
- [8] Cobo M, Isla D, Massuti B, et al. Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer [J]. Clin Oncol, 2007,25: 2747-2754
- [9] Rosell R, Lord RV, Taron M, et al. DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer[J]. Lung cancer, 2002;38:217-227
- [10] Park SY, Hong YC, Kim JH, et al. Effect of ERCC1 polymorphisms and the modification by smoking on the survival of non-small cell lung cancer patients[J]. Med Oncol, 2006,23:489-498
- [11] Yu JJ, Lee KB, Mu C, et al. Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene [J]. Int J Oncol, 2000, 16(3):555-560
- [12] Ryu JS, Viguier J, Praz F. Genetic effect of ERCC1 codon 118 polymorphism and confounding factors [J]. Clin Cancer Res, 2006,12: 4784-4785