

ERCC1、RRM1 和 TUBB3 指导个体化化疗方案治疗 晚期非小细胞肺癌的评价

柯 红, 崔 洁, 王小松, 聂成钢, 王雪梅, 罗 备, 涂 睿

(葛洲坝中心医院、三峡大学第三临床医学院肿瘤科, 宜昌 443002)

【摘要】目的:探讨切除修复交叉互补基因 1(excision repair cross complement group1, ERCC1)、核糖核苷酸还原酶 M1 亚基(ri-bonucleotide reduc tase, RRM1)、3 型 β 微管蛋白(tubulin beta-3, TUBB3)指导化疗药物个体化选择在晚期非小细胞肺癌(non-mall cell lung cancer, NSCLC)患者的疗效和安全性。**方法:**47 例晚期 NSCLC 患者, 按病理组织充足与否分个体化化疗治疗组(A 组)及对照组(B 组)。A 组采用分支 DNA-液相芯片技术测定 ERCC1、RRM1 及 TUBB3 的 mRNA 水平, 并根据测定结果确定化疗方案, B 组则使用吉西他滨+顺铂治疗。**结果:**A 组有效率为 63.2%, 明显高于 B 组($P<0.05$); A 组、B 组疾病控制率分别为 78.9% 和 50.0%($P<0.05$); A 组中吉西他滨+顺铂患者的有效率高于 B 组相同方案化疗者; 2 组生活质量均较治疗前明显提高($P<0.05$), 但 2 组改善率无显著差别($P>0.05$); 2 组不良反应无差异且均易耐受。**结论:**分支 DNA-液相芯片技术测定 ERCC1、RRM1 及 TUBB3 的 mRNA 水平用于指导晚期 NSCLC 个体化化疗方案, 能显著提高化疗有效率; 吉西他滨+顺铂方案在分子标志物指导策略下运用效果更明显, 但仍需进一步探索更有效的个体化治疗方案。

【关键词】非小细胞肺癌; 晚期; 切除修复交叉互补基因 1; 核糖核苷酸还原酶 M1 亚基; 3 型 β 微管蛋白; 个体化方案; 分支 DNA-液相芯片

【中国图书分类法分类号】R734.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-07-24

Evaluation of individualized chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer guided by ERCC1, RRM1 and TUBB3

KE Hong, CUI Jie, WANG Xiaosong, NIE Chenggang, WANG Xuemei, LUO Bei, TU Rui

(Department of Oncology, Gezhouba Central Hospital, the Third Clinical Medical College, China Three Gorges University)

【Abstract】Objective: To explore the efficacy and safety of individualized selection of chemotherapy drug guided by excision repair cross complement group1(ERCC1), ribonucleotide reduc tase 1(RRM1) and tubulin beta 3(TUBB3) in patients with advanced non-small cell lung cancer(NSCLC). **Methods:** Totally 47 cases of advanced NSCLC were divided into individualized chemotherapy treatment group(group A) and control group(group B) according to histopathological tissue sufficient or not. In group A, mRNA levels of ERCC1, RRM1 and TUBB3 were measured by branched DNA-liquid chip technique and chemotherapy regimen was formulated according to the measured results. Group B were treated by gemcitabine plus cisplatin. **Results:** Effective rate of group A was 63.2%, significantly higher than that of group B($P<0.05$). Disease control rates of group A and group B were 78.9% and 50.0% respectively ($P<0.05$). Effective rate was significantly higher in patients treated by gemcitabine plus cisplatin in group A than in patients received the same treatment in group B. Quality of life in both groups was improved significantly after treatment($P<0.05$) than before treatment, but there was no significant difference in improvement rate($P>0.05$). There was no difference in adverse reactions between both groups and all patients were well tolerated. **Conclusions:** Determination of mRNA levels of ERCC1, RRM1 and TUBB3 by branched DNA-liquid chip technique can guide individualized chemotherapy for advanced NSCLC and significantly improve chemotherapy efficiency; however, further exploration of more effective individualized treatment plan is needed.

【Key words】non-small cell lung cancer; advanced period; excision repair cross complement group 1; ribonucleotide reduc tase 1; tubulin beta 3; individualized chemotherapy regimens; branched DNA-liquid chip

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌总数的 80%, 70% 的 NSCLC 患者确诊时已

属晚期, 只能采用以化疗为主的综合治疗方法缓解病情。既往研究发现, 晚期 NSCLC 化疗效果有限, 肿瘤细胞对化疗药物耐药是导致化疗疗效不尽如人意的的主要原因之一^[1]。

近年来, 以药物敏感相关基因为检测目标的研

作者介绍: 柯 红, Email: kh196651@163.com,

研究方向: 肿瘤化学治疗。

通信作者: 崔 洁, Email: cuijie6758@163.com。

究快速发展,分子标志物指导恶性肿瘤个体化化疗越来越受到人们的关注。切除修复交叉互补基因 1 (excision repair cross complement group1, ERCC1)、核糖核苷酸还原酶 M1 亚基(ribonucleotide reductase, RRM1)、 β 微管蛋白(tubulin beta-3, TUBB3)基因 mRNA 表达水平与化疗药物疗效的相关研究,为患者个体化治疗提供了依据^[2,3],但至今为止,多数研究限于回顾性分析,少有前瞻性研究。在既往回顾性分析晚期 NSCLC 患者肺癌组织穿刺样本中 ERCC1、RRM1 和 TUBB3 基因的 mRNA 表达与顺铂联合吉西他滨化疗疗效的关系基础上,采用分支 DNA-液相芯片技术,进一步探讨了 3 种基因表达在 NSCLC 化疗药物个体化策略选择中的指导意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择我院肿瘤科 2010 年 3 月-2011 年 6 月诊断为 NSCLC 的病例,所有病例均经细胞学及(或)病理学确诊;经 CT 扫描证实具有可测量的肿瘤病灶;临床诊断为 IIIb 或 IV 期的局部晚期或转移性肿瘤,不能手术;初诊未经治疗者,体力状况(performance status, PS)评分 ≤ 2 分(5 分法),生存期估计超过 3 个月,无重要器官功能障碍,实验室检查符合化疗基本要求。其中病理组织较充分的 19 例患者作为治疗组(A 组),使用分支 DNA-液相芯片技术对穿刺样本的 ERCC1、RRM1 和 TUBB3 基因的 mRNA 表达进行检测,病理组织缺乏或仅有细胞学证据的 28 例患者作为对照组(B 组)。2 组患者临床资料比较差异无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

1.2 治疗

1.2.1 mRNA 表达检测 运用分支 DNA-液相芯片技术对 A 组肺癌穿刺样本的 ERCC1、RRM1 和 TUBB3 基因的 mRNA 表达进行检测。基因 mRNA 按表达量划分为低表达、高表达及无表达。

1.2.2 个体化化疗方案 A 组患者根据 3 种基因的 mRNA 表达量设计化疗方案 ERCC1 无表达或低表达者使用铂类为主的双药化疗;RRM1 无表达或低表达者使用吉西他滨为主的双药化疗或单药化疗^[3];TUBB3 高表达者则避免使用紫杉类为主的化疗^[4]。共出现以下 5 种情况:ERCC1、RRM1 和

TUBB3 均低表达或无表达 7 例,使用吉西他滨+顺铂方案;ERCC1、RRM1 均低表达或无表达、TUBB3 高表达 4 例,均使用吉西他滨+顺铂方案;ERCC1、TUBB3 均低表达或无表达、RRM1 高表达 4 例,使用顺铂+多西他赛方案;ERCC1、TUBB3 均高表达,RRM1 无表达 2 例,使用吉西他滨单药方案;ERCC1、RRM1 高表达、TUBB3 低表达 2 例,使用多西他赛单药方案。B 组 28 例均使用吉西他滨+顺铂方案。所有化疗药物均按照体表面积给予常规治疗剂量。化疗进行 2 周期后进行疗效评价。所有患者均根据不良反应情况给予预防止吐、升白细胞、升血小板等对症处理,缓解化疗不良反应。

1.3 疗效评价

疗效评价标准采用 RECIST 1.0 版分为完全缓解(complete remission, CR)、部分缓解(partial remission, PR)、稳定(stabledisease, SD)和进展(progressive disease, PD),以 CR+PR 计算总有效率(response rate, RR),CR+PR+SD 计算疾病控制率(disease control rates, DCR)。治疗前后进行 PS 评分,评价生活质量;治疗前与治疗后 PS 评分差值 ≥ 2 者为显著改善,差值=1 者为改善,差值=0 者为稳定,差值 ≤ 1 者为下降。改善率以显著改善+改善计算。不良反应评价采用根据 WHO 化疗药物毒副作用评价标准,将毒副作用分为 I~IV 度(以下省略单位“度”)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理。中位数比较采用配对秩和检验,组间率的比较采用卡方检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

A 组 19 例中获 PR 12 例,SD 3 例,PD 4 例。B 组 28 例中 PR 9 例,SD 5 例,PD 14 例。A 组和 B 组的 RR 分别为 63.2%和 32.1%($P<0.05$)两组的 DCR 分别为 78.9%和 50.0%($P<0.05$)。A 组中吉西他滨+顺铂方案 11 例,其中 PR 8 例,SD 1 例,PD 2 例,RR 为 72.7%,与相同方案的 B 组(RR 为 32.1%)比较,有效率显著增高($\chi^2=4.5207$, $P=0.0335$),但校正卡方检验无意义($\chi^2=3.6717$, $P=0.0553$)。

A 组及 B 组组内治疗前后 PS 评分中位数配对秩和检验差异均有统计学意义($P<0.05$),生活质量均较治疗前改善。A 组及 B 组治疗前后 PS 评分改善率差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。两组不良反应比较见表 3。

表 1 患者临床资料

Tab.1 Patients' clinical data

分组	例(n)	年龄(岁)	PS评分(n,%)				病理组织分类(n,%)		肿瘤分期(n,%)	
			0	1	2	≥ 3	鳞状细胞癌	腺癌	III _b	IV
A组	19	54.7 $\pm$ 11.8	5(26.3)	12(63.2)	2(10.5)	0	8(42.1)	11(57.9)	7(36.8)	12(63.2)
B组	28	56.5 $\pm$ 14.0	7(25.0)	15(53.6)	6(21.4)	0	11(39.3)	17(60.7)	12(42.9)	16(57.1)
χ^2 值				0.9792				0.0324		0.1700
P值				0.6129				0.8467		0.6801

表 2 2 组治疗前后 PS 评分变化比较

Tab.2 Comparison of PS score changes between two groups before and after treatment

分组	例数 (n)	PS 评分 (中位数, 范围)		治疗前后 PS 评分改善率 (n, %)
		治疗前	治疗后	
A 组	19	1 (0~2)	3 (0~3) ^a	13 (68.4)
B 组	28	1 (0~2)	3 (0~3) ^a	17 (60.7)

注: a, 组内配对比较, $P < 0.05$

表 3 2 组不良反应比较 (n, %)

Tab.3 Comparison of adverse reactions between two groups (n, %)

分组	血液系统		消化道		其他	
	I + II	III + IV	I + II	III + IV	I + II	III + IV
A 组	7 (36.8)	3 (15.8)	5 (26.3)	1 (5.3)	2 (10.5)	0
B 组	13 (46.4)	4 (14.3)	8 (28.6)	2 (7.1)	4 (14.3)	0
χ^2 值	0.302 5		0.283 3		0.044 7	
P 值	0.582 3		0.594 5		0.832 5	

注: III+IV 为严重不良反应, 3 种不良反应中严重不良反应行 χ^2 检验, $\chi^2=3.505 1, P=0.061 2$

3 讨 论

2009 年美国临床肿瘤学会年会中提出肿瘤个体化治疗的新理念, NSCLC 治疗更应遵循这一原则。个体化治疗是根据肿瘤生物学和药物基因组学的改变进行的针对性治疗。这是建立在循证医学基础上, 在分子、蛋白、基因水平上指导肺癌治疗, 是目前肺癌治疗的理想之路。本文就 ERCC1、RRM1、TUBB3 基因表达在晚期 NSCLC 的个体化化疗方面的应用进行了尝试。

有研究证实, ERCC1 的基因突变将导致单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP), ERCC1 的 SNP 与铂类药物抵抗存在明显关系。ERCC1 mRNA 的高水平表达与顺铂诱导的 DNA 加合物清除增加及顺铂耐药相关。在 1 项 ERCC1 基因表达与顺铂耐药的相关性研究中发现, NSCLC 患者中低 ERCC1 mRNA 表达的患者对顺铂的敏感性明显高于 ERCC1 高表达患者^[9]。RRM1 表达与吉西他滨耐药相关吉西他滨是嘧啶类抗代谢药, 作用于 DNA 合成期, 使 DNA 合成发生障碍。RRM1 是盐酸吉西他滨耐药的一个重要预测指标, 也是 DNA 合成与修复的限速酶。Rosell 等^[10]对晚期 NSCLC 患者标本的 RRM1 mRNA 进行了检测, 发现 RRM1 mRNA 低表达者明显受益于吉西他滨方案化疗。一项回顾性分析^[7]中也发现 RRM1 mRNA 高表达对吉西他滨耐药, 因此 RRM1 mRNA 水平低的 NSCLC 患者接受吉西他滨/顺铂, 而 RRM1 mRNA 水平高的患者接受抗微管药物/顺铂化疗对患者生存有益。TUBB3 的 mRNA 表达水平则与抗微管类化疗药的疗效密切相关, 即高表达时 NSCLC 患者对抗微管类药物耐

药, 而低表达时则受益^[8]。

基于上述研究, 本文对 3 种基因不同表达结果进行了个体化给药方案设计, 临床疗效评价表明, 个体化治疗方案使晚期 NSCLC 患者的化疗有效率及疾病控制率明显提高, 此外, 在晚期 NSCLC 患者, 采用 3 种分子标志物测定结果, 选择性使用吉西他滨联合顺铂化疗, 较普遍性、非选择性应用此方案治疗更有效。观察所见, 采用个体化化疗方案患者生存质量明显改善, 且不良反应与常规化疗方案相似。

本研究中 mRNA 表达水平检测方法有别于传统的免疫组化检测方法, 使用目前较为先进的分支-DNA 液相芯片检测技术。分支-DNA 液相芯片检测技术适用于各种类型的样本, 例如石蜡切片、组织、细胞等, 因其灵敏度高、特异性好、可多靶标并行检测而广泛用于临床检测中。该技术无需进行 mRNA 提取、逆转录过程, 大幅降低操作过程或多步误差积累对结果的影响。

综上所述, 个体化化疗在 NSCLC 治疗中已经显示良好的效果和应用前景, 但目前的研究结果大部分是回顾性分析, 缺乏大型前瞻性随机对照临床试验的结果支持。故还需不断地探索以获得更多的循证医学证据, 指导个体化治疗。本研究虽为前瞻性研究, 但因样本量较少、观察时间较短, 尚未评价患者化疗方案与生存时间的相关性等, 不足以说明 3 种标志物对制定个体化化疗方案的指导意义。因此, 还需广泛积累 ERCC1、RRM1 和 TUBB3 基因的 mRNA 表达或其它更多的分子生物学指标, 在指导晚期 NSCLC 确定化疗方案的临床经验, 且对不同的检测方法进行比较, 以期建立标准化、规范化的指导方案。

肿瘤诊断技术与基因治疗

DOI: 10.11699/cyxb20130513

促血管生成素 2 在胃癌中的表达及其反义基因转染
对人胃癌细胞 SGC-7901 的影响

曾 松,王继见,朱 鹏

(重庆医科大学附属第二医院胃肠外科,重庆 400010)

【摘要】目的:探讨促血管生成素 2(angiotensinogen,Ang2)在胃癌组织中的表达及其与肿瘤病理分期的联系;观察反义 Ang2 基因转染对人胃癌细胞 SGC-7901 的影响。**方法:**用 Western blot 法检测 Ang2 蛋白在 10 例胃癌组织及 10 例正常胃黏膜组织中的表达,用免疫组化法检测 53 例不同病理分期的胃癌组织中 Ang2 蛋白的表达;应用脂质体转染法将既往实验合成^[1]的 pEGFP-N1-anti Ang2 转染体外培养的人胃癌细胞 SGC-7901,以空载体(pEGFP-N1)转染组和未转染组作对照,RT-PCR 及免疫组化检测转染后 Ang2 基因及蛋白的表达,MTT 法和流式细胞仪(flow cytometry,FCM)检测反义 Ang2 基因转染对细胞生长和细胞凋亡的影响;分别用上述 3 组细胞注射于裸鼠皮下,对比观察肿瘤生成的速度和肿瘤组织中的血管生成数量。**结果:**Ang2 蛋白在正常胃黏膜组织中不表达,在不同病理分期的胃癌组织中均呈阳性表达($F=166.76, P<0.0001$);RT-PCR 及免疫组化显示反义 Ang2 基因转染组无 Ang2 mRNA 及 Ang2 蛋白的表达,MTT 法检测显示反义 Ang2 基因转染组细胞体外增殖能力明显低于其他两组($F=10.39, P=0.0024$),FCM 检测显示其活细胞比率明显低于其他两组($\chi^2=3188.9805, P<0.0001$);转染了反义 Ang2 基因的胃癌细胞成瘤速度较其它两组明显减慢[第 6 天($F=10.18, P=0.0005$)、第 18 天($F=7.80, P=0.0021$)及第 30 天($F=79.58, P<0.0001$)],肿瘤组织中血管生成的数量较其它两组明显减少[第 1 周($F=15.18, P<0.0001$)、第 2 周($F=3.50, P=0.0444$)、第 3 周($F=39.02, P<0.0001$)]。**结论:**胃癌组织中 Ang2 的表达与胃癌血管生成及胃癌侵袭能力密切相关;反义 Ang2 基因转染可封闭人胃癌细胞 SGC-7901 中 Ang2 mRNA 及 Ang2 蛋白的表达,抑制其体外生长,促进其凋亡;并对其体外成瘤性及其新生血管的生成有明显的抑制作用。

【关键词】新生血管形成;促血管生成素 2;反义真核表达载体;人胃癌细胞株;基因转染

【中国图书分类法分类号】R735.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-09-24

作者介绍:曾 松,Email:462168892@qq.com,

研究方向:胃肠道肿瘤。

通信作者:朱 鹏,Email:526679209@qq.com。

基金项目:重庆医科大学科研创新基金资助项目(编号: CX200503)。

参 考 文 献

- [1] Paredes L A, Blanco G C, Elizondo E M, et al. Expression of proteins associated with multidrug resistance and resistance to chemotherapy in lung cancer[J]. Arch Bronconeumol, 2007, 43(9): 479-484.
- [2] 周彩存, 徐崇锐. 原位 RRM1 和 ERCC1 蛋白表达水平预测吉西他滨为基础化疗方案对非小细胞肺癌的疗效[J]. 循证医学, 2010, 10(1): 26-27.
- [3] 陈 芹, 周彩存, 张 颖. ERCC1、RRM1 和 BRCA1 在非小细胞肺癌中的表达及预后意义[J]. 肿瘤, 2007, 27(9): 719-722.
- [4] Azuma K, Sasada T, Kawahara A, et al. Expression of ERCC1 and class III beta-tubulin in non-small cell lung cancer patients treated with carboplatin and paclitaxel[J]. Lung Cancer, 2009, 64(3): 326-333.
- [5] Wang L, Wei J, Qian X, et al. ERCC1 and BRCA1 mRNA expression levels in metastatic malignant effusions is associated with chemosensitivity to cisplatin and/or docetaxel[J]. BMC Cancer, 2008, 8: 97.
- [6] Rosell R, Danenberg K D, Alberola V, et al. Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(4): 1318-1325.
- [7] Zheng Z, Chen T, Li X, et al. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer[J]. N Engl J Med, 2007, 356(8): 800-808.
- [8] 冷雪峰, 洗 磊, 陈铭伍, 等. 非小细胞肺癌组织中 ERCC1 及 TUBB3 基因 mRNA 的表达及其临床意义[J]. 肿瘤预防与治疗, 2012, 25(1): 1-5.
- [9] Leng X F, Xian L, Chen M W, et al. The Expression and Significance of ERCC1 and TUBB3 Gene mRNA in non-small cell lung cancer[J]. Journal of Cancer Control and Treatment, 2012, 25(1): 1-5.

(责任编辑: 关蕴良)