

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003029

XRCC1 基因的 DNA 甲基化在胃癌患者铂类药物化疗疗效中的预测作用

王 萍¹, 郭 美¹, 王 兵², 周恒花³, 严 华¹

(上海交通大学医学院附属第九人民医院 1. 消化内科; 2. 普外科; 3. 病理科, 上海 200011)

【摘要】目的:探讨 XRCC1 基因的 DNA 甲基化对接受含奥沙利铂方案辅助化疗胃癌患者的疗效预测价值。**方法:**经病理确诊的胃癌患者 116 例, 接受奥沙利铂和氟尿嘧啶类联合的方案化疗至少 6 周期。采用亚硫酸氢盐测序法对胃癌手术标本进行 XRCC1 基因的甲基化水平检测, 并分析其与胃癌患者化疗疗效的相关性。**结果:**不同性别、年龄、是否淋巴结转移、不同肿瘤直径、不同分化程度、是否接受辅助化疗的胃癌患者之间 XRCC1 基因的 DNA 甲基化水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。术后接受化疗和未接受化疗的胃癌患者的平均生存期分别为 (42.82 ± 3.57) 个月和 (25.68 ± 4.90) 个月, 接受化疗的胃癌患者生存期更长 ($\chi^2=7.208, P=0.07$)。化疗有效组的平均甲基化率为 51.60%, 化疗无效组为 38.31%, 2 组比较差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论:**XRCC1 基因的 DNA 甲基化率与奥沙利铂的敏感性呈正相关, 是潜在的预测胃癌患者化疗有效性及预后的分子标记物。

【关键词】胃肿瘤; 化学疗法; 辅助; 甲基化; 预后**【中图分类号】**R735.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2021-08-31

XRCC1 gene DNA methylation on predicting the efficacy of oxaliplatin-based chemotherapy in patients with gastric cancer

Wang Ping¹, Guo Mei¹, Wang Bing², Zhou Henghua³, Yan Hua¹

(1. Department of Gastroenterology; 2. Department of General Surgery; 3. Department of Pathology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine)

【Abstract】Objective: To investigate the value of XRCC1 gene DNA methylation in predicting the efficacy of oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with gastric cancer. **Methods:** A total of 116 patients with gastric cancer received at least 6 cycles of combination chemotherapy of oxaliplatin and fluorouracil. Bisulfite sequencing was used to analyze the methylation of XRCC1 gene in gastric cancer surgical specimens, and the correlation with the efficacy of chemotherapy in patients with gastric cancer were also analyzed. **Results:** There was no statistically significant difference in the average methylation rates of XRCC1 gene among gastric cancer patients with different gender, age, lymph node metastasis, tumor diameters, differentiation, and whether they received adjuvant chemotherapy ($P>0.05$). The average survival time of gastric cancer patients receiving chemotherapy and not receiving chemotherapy were (42.82 ± 3.57) months and (25.68 ± 4.90) months, respectively. The survival time of gastric cancer patients receiving chemotherapy was longer ($\chi^2=7.208, P=0.007$). The average methylation rate of chemotherapy effective group was 51.60%, and that of chemotherapy ineffective group was 38.31%, with significant differences between the two groups ($P<0.05$). **Conclusion:** The DNA methylation rate of XRCC1 gene is positively correlated with the sensitivity of oxaliplatin, which is a potential molecular marker to predict the efficacy and prognosis of chemotherapy in patients with gastric cancer.

【Key words】stomach neoplasm; chemotherapy; adjuvant; methylation; prognosis

胃癌是消化道常见的恶性肿瘤之一, 居我国恶性肿瘤死因第 3 位^[1-2]。我国是胃癌高发大国, 大多

数胃癌发现时已是进展期, 5 年生存率仅 35.1%^[1,3]。手术治疗联合辅助化疗是进展期胃癌的主要治疗手段, 铂类和氟尿嘧啶类联合化疗是进展期胃癌常用的化疗方案, 而化疗耐药则是化疗失败的主要原因之一^[1,4]。X 线修复交叉互补 (X-ray repair cross-complementing group1, XRCC1) 基因参与 DNA 损伤

作者介绍: 王 萍, Email: lily7410@163.com,

研究方向: 消化道疾病。

通信作者: 严 华, Email: luoxia88881@sina.com。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220517.0927.004.html>

(2022-05-17)

修复,已有研究证实其在胃癌发生发展过程中存在表达变化或多态性,并与化疗耐药密切相关^[5]。DNA 甲基化作为表观遗传学的主要内容,和遗传因素一起参与肿瘤的发生发展,亦与化疗耐药有关^[6-8]。目前,尚无 *XRCC1* 基因 DNA 甲基化和胃癌患者铂类化疗药物疗效之间的相关性分析。本文拟通过分析 *XRCC1* 基因的 DNA 甲基化水平和胃癌患者接受铂类药物化疗药物疗效的相关性,初步探讨 DNA 甲基化在化疗耐药中的作用,为预测胃癌患者化疗疗效、实现个体化治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取 2011 年 1 月至 2013 年 12 月在上海第九人民医院普外科收治的 116 例胃癌患者。临床病理相关特征见表 1。所有胃癌组织标本取材后经液氮速冻后置-80℃保存。纳入标准:①胃癌根治术后取组织送检,经病理组织学检查确诊为胃腺癌,术前均未接受过化疗、放疗及其他有关肿瘤治疗;②符合胃癌根治术的治疗指征,临床分期为 II/III 期(采用 AJCC 胃癌 TNM 分期标准(2009 年第七版));③术后接受铂类和氟尿嘧啶类联合的方案化疗,化疗周期数至少 6 个^[9];④年龄≥18 岁;⑤签署知情同意书,经医院伦理委员会批准(批准号:201094)。排除标准:①治疗前即有远处转移;②合并其他恶性肿瘤病史;③曾接受放化疗;④合并严重内科疾病;⑤临床资料收集不全;⑥随访丢失。

表 1 *XRCC1* 基因的 DNA 甲基化率与临床病理特征

临床病理特征	总例数	甲基化率/%	P 值
性别			
男	80	61.86	0.108
女	36	51.03	
年龄/岁			
≤65	53	61.01	0.461
>65	63	56.39	
淋巴结转移			
有	94	59.46	0.531
无	22	54.45	
肿瘤直径/cm			
≥5	68	60.57	0.431
<5	48	55.57	
分化程度			
高/中分化	37	59.51	0.824
低分化	79	58.03	
辅助化疗			
否	31	51.02	0.148
是	85	61.23	

1.2 研究方法

1.2.1 治疗方法 入组患者均接受铂类和氟尿嘧啶类联合方案化疗。化疗药物具体用量如下:给予静脉滴注奥沙利铂(85 mg/m²)与四氢叶酸(400 mg/m²),静脉静注氟尿嘧啶(400 mg/m²),而后静脉滴注氟尿嘧啶(2 400 mg/m²)持续 46 h。3 周为 1 个周期,化疗至少进行 6 个周期。

1.2.2 观察指标与随访 采用门诊、电话等方式随访 5 年,6~12 个月随访胃镜、胸腹部 CT。所有患者随访至 2018 年 12 月 1 日。

1.2.3 疗效评价 综合患者胃镜、胸腹部 CT 检查结果,参照 RICEST 1.1 实体瘤疗效评定标准评价疗效^[9],分为 4 种结果:完全缓解(complete response, CR)、部分缓解(partial response, PR)、稳定(stable disease, SD)和进展(progressive disease, PD)。CR:所有靶病灶消失;PR:靶病灶最长径之和与基线状态比较,至少减少 30%;PD:靶病灶最长径之和与治疗开始之后所记录到的最小靶病灶最长径之和比较,增加 20%,或者出现 1 个或多个新病灶;SD:介于部分缓解和疾病进展之间。CR+PR 为化疗有效组,SD+PD 为化疗无效组。

1.2.4 *XRCC1* 基因的 DNA 甲基化检测 采用亚硫酸氢钠测序法(bisulfite genomic sequencing, BSP)分析 DNA 甲基化。提取胃癌组织中的基因组 DNA(QIAamp DNA mini kit;QIAGEN 公司),严格按照说明书进行操作,-80℃保存。取 1 μg DNA 进行亚硫酸氢盐修饰(EpiTect Bisulfite Kits;QIAGEN 公司),然后进行后续 BSP 实验。针对基因启动子区域设计 BSP 引物为 5'-TTTTTGTGGAAGAATTTTAGGATAG-3' 和 5'-CAAAATCTCTTCAAATAACTCAAAC-3' (基因登录号:NM_006297)。产物长度 246 bp,退火温度 56℃。PCR 反应体系:25 μL,含 3 μL 修饰 DNA,2.5 μL 10 × Buffer,2 μL dNTP (2.5 mmol/L),1 μL PrimerF (10 pmol/μL),1 μL PrimerR (10 pmol/μL),0.25 μL TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL)。反应条件:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 40 个循环,最后 72℃延伸 5 min。2%琼脂糖凝胶观察 PCR 结果。所有 PCR 产物送上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析。化疗疗效差异、不同临床病理特征的胃癌患者之间基因甲基化水平比较采用非参数检验,检验水准 α=0.05。生存分析采用 Kaplan-Meier 生存曲线和 log-rank 检验。

2 结果

2.1 患者基本临床特征

入组病例 121 例,对其进行临床病理资料登记,随访至 2018 年 12 月 1 日,共随访 116 例并获完整资料,建立患者

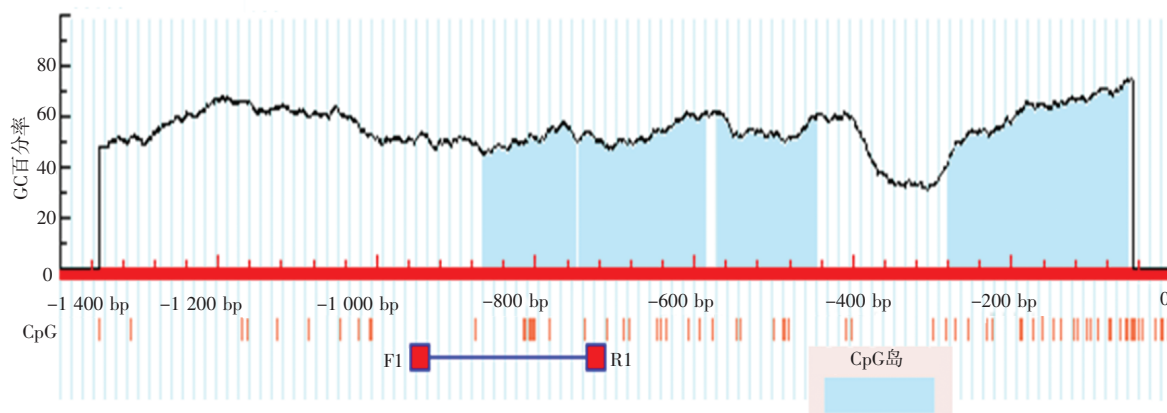


图 1 XRCC1 基因启动子区 CpG 岛预测图

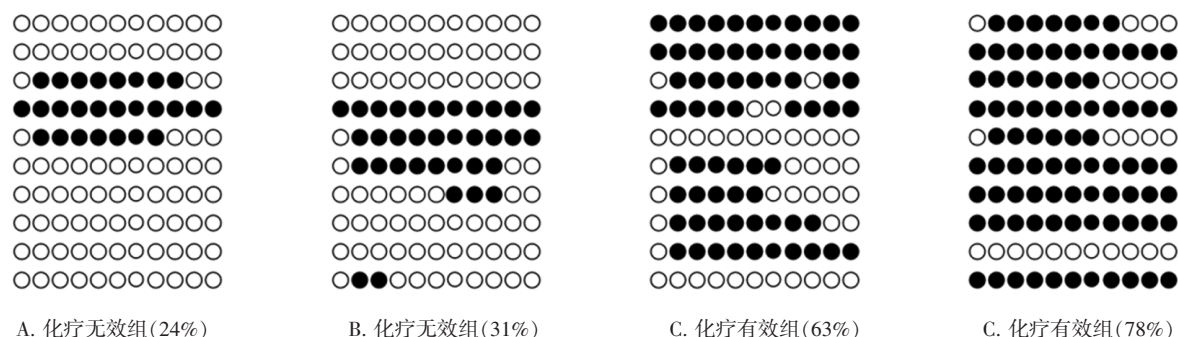


图 2 部分胃癌组织中 XRCC1 基因的 DNA 甲基化率

临床资料 Excel 数据库。入组患者中,男性 80 例,女性 36 例;
>65 岁 63 例,≤65 岁 53 例;有淋巴结转移 94 例,无淋巴结
转移 22 例;肿瘤直径≥5 cm 68 例,<5 cm 48 例;高/中分化
程度者 37 例,低分化者 79 例;接受化疗者 85 例,未化疗者
31 例(表 1)。

2.2 XRCC1 基因的 DNA 甲基化检测

所有组织标本均采用 BSP 进行 XRCC1 基因 DNA 甲基
化水平检测。针对 XRCC1 基因启动子区域的 CpG 岛设
计 DNA 亚硫酸氢盐修饰后测序引物,扩增区域分别为-959~
-741 bp(图 1)。每个圈均代表 1 个基因的 CG 位点,黑色实
心代表发生甲基化的基因位点,白色实心代表未发生甲基
化的基因位点。甲基化率=甲基化的 CG 数/CG 总数×100%
(图 2)。

2.3 胃癌组织中 XRCC1 基因 DNA 甲基化率与临床病理参 数的相关性

将不同性别、年龄、是否淋巴结转移、不同肿瘤直径、不
同分化程度、是否接受辅助化疗的胃癌患者 XRCC1 基因
DNA 甲基化率进行比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见
表 1。

2.4 XRCC1 基因 DNA 甲基化水平与化疗疗效的关系

术后随访 5 年,应用 Kaplan-Meier 生存曲线分析显示:
术后接受化疗和未接受化疗的胃癌患者平均生存期分别为

(42.82±3.57)个月和(25.68±4.90)个月,接受化疗的胃癌患
者生存期较长($\chi^2=7.208, P=0.007$)(图 3)。对接受化疗的胃癌
患者进一步分析显示:化疗有效组(CR+PR)55 人,平均甲基
化率为 51.60%;化疗无效组(SD+PD)30 人,平均甲基化率为
38.31%,2 组差异具有统计学意义($P=0.018$),见表 2。

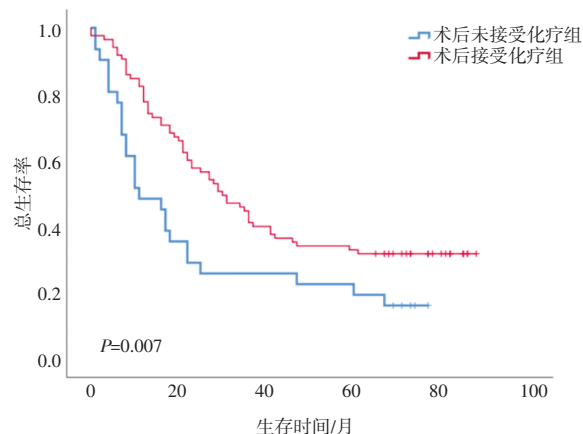


图 3 术后接受化疗和未接受化疗的胃癌患者的生存曲线

表 2 XRCC1 基因 DNA 甲基化水平与奥沙利铂化疗疗效的关系

分组	总例数	甲基化率/%	P 值
SD+PD	55 (64.71)	38.31	0.018
CR+PR	30 (35.29)	51.60	

3 讨论

在我国,大多数胃癌患者就诊时已为进展期,生存率低。手术切除联合辅助化疗是进展期胃癌的主要治疗手段,但化疗耐药是导致治疗失败及引起复发转移和生存率低的主要因素^[4]。目前临床上尚无有效手段用于预测化疗药物有效性。铂类和氟尿嘧啶类联合方案是进展期胃癌常用化疗方案^[3-4]。奥沙利铂属于第 3 代铂类化疗药物,在细胞内的代谢产物可通过与 DNA 交联,形成 DNA 复合物,从而终止肿瘤细胞复制,引起细胞凋亡^[10]。DNA 损伤修复基因可修复不同原因导致的 DNA 损伤,从而保护遗传信息完整性^[10]。因此,肿瘤细胞的 DNA 损伤修复能力(DNA repair capacity, DRC)改变是铂类耐药的重要分子基础^[10-11]。

XRCC1 基因参与铂剂造成的 DNA 损伤修复过程,在碱基切除修复和单链断裂修复中发挥重要作用^[12-13]。已有研究证实,*XRCC1* 在胃癌、结肠癌、肺癌等多种肿瘤中表达下调,并与肿瘤发生发展有关^[13-15]。进一步研究发现,*XRCC1* 基因多态性及蛋白表达水平均可能影响肿瘤细胞对受损 DNA 的修复能力,进而影响肿瘤对化疗药物的敏感性。多项研究发现 *XRCC1*Arg399Gln (G→A) 基因多态性与肺癌^[16]、结肠癌^[17]、卵巢癌^[18]等化疗疗效有关,但研究结果并不一致。有研究发现,G/G 基因型患者(野生型患者)可能受益于铂类药物化疗^[16-17],但也有认为基因多态性并不影响化疗疗效^[18-19]。

研究结果的不一致说明可能存在其他机制参与化疗耐药。化疗耐药是多因素、多种基因参与的复杂过程,除遗传因素外,还涉及表观遗传学改变。DNA 甲基化是目前研究最多的表观遗传学修饰,通常某些特定区域如启动子区高甲基化状态静默基因表达,低甲基化则使增加基因表达^[6,20]。现有研究表明,DNA 甲基化异常与肿瘤化疗耐药有关^[21]。Matei D 等^[22]研究发现,异常的 DNA 甲基化与卵巢癌铂类药物获得性耐药有关,去甲基化药物可恢复卵巢癌化疗耐药患者对铂类药物的敏感性,改善其预后,是潜在的卵巢癌治疗靶点。在肺癌^[23]、结肠癌^[24]、睾丸生殖细胞肿瘤^[25]等中也发现多个基因 DNA 甲基化与化疗耐药有关。但是目前尚未见 *XRCC1* 基

因 DNA 甲基化与胃癌患者化疗敏感性之间的相关文献报道。既往研究发现,在胃癌发生发展过程中 *XRCC1* 基因表达下调,而且通过 DNA 甲基化下调其基因表达^[13]。那么 DNA 甲基化除了调控基因表达,是否还参与铂类药物的获得性耐药过程? 本研究结果显示,术后随访 5 年应用 Kaplan-Meier 生存曲线分析显示:术后接受化疗和未接受化疗的胃癌患者平均生存期分别为 (42.82 ± 3.57) 个月和 (25.68 ± 4.90) 个月,接受化疗的胃癌患者生存期更长 ($\chi^2=7.208, P=0.07$)。对接受化疗的胃癌患者进一步分析显示,化疗有效组的平均甲基化率为 51.60%,化疗无效组为 38.31%,2 组差异具有统计学意义。因此,在肿瘤的发生发展过程中,*XRCC1* 可能发挥双重作用,即同时与肿瘤易感性及化疗敏感性密切相关。肿瘤早期,*XRCC1* 基因启动子区 DNA 高甲基化,基因表达减少,对 DNA 损伤的修复能力减弱,使患者患肿瘤的风险增加;但在化疗过程中,*XRCC1* 基因低甲基化水平的胃癌患者,其基因表达增加,使得肿瘤细胞对化疗药物造成的受损 DNA 修复能力增强,减弱了奥沙利铂对肿瘤细胞的细胞毒作用,产生耐药。由此,*XRCC1* 基因 DNA 甲基化可以作为分子标志物预测胃癌患者化疗疗效及预后。本研究还发现,将不同性别、年龄、是否淋巴结转移、不同肿瘤直径、不同分化程度、是否接受辅助化疗的胃癌患者之间的 *XRCC1* 基因 DNA 甲基化率进行比较,差异均无统计学意义。这一结果表明 *XRCC1* 基因甲基化是胃癌发生的早期事件,且化疗过程可能不改变其甲基化水平,还需要进一步扩大样本量、多中心前瞻性的临床研究,以及体外耐药机制研究等予以证实。

综上所述,*XRCC1* 基因 DNA 甲基化与奥沙利铂的敏感性呈正相关,是潜在的预测胃癌患者化疗有效性及预后的分子标记物。今后可通过 *XRCC1* 基因 DNA 甲基化水平来预测铂类药物的化疗疗效,选择个体化的化疗方案。

参 考 文 献

- [1] 张思维,杨之洵,郑荣寿,等. 2013 年中国胃癌发病与死亡分析[J]. 中华肿瘤杂志,2017,39(7):547-552.
- Zhang SW, Yang ZX, Zheng RS, et al. Incidence and mortality of stom-

- ach cancer in China, 2013 [J]. Chin J Oncol, 2017, 7(39): 547–552.
- [2] 王少明, 郑荣寿, 张思维, 等. 2015 年中国胃癌流行特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2019, 40(12): 1517–1521.
- Wang SM, Zheng RS, Zhang SW, et al. Epidemiological characteristics of gastric cancer in China, 2015[J]. Chin J Epidemiol, 2019, 40(12): 1517–1521.
- [3] 国家卫生健康委员会. 胃癌诊疗规范(2018 年版)[J]. 中华消化病与影像杂志(电子版), 2019, 9(3): 118–144.
- National Health Commission. Gastric Cancer Diagnosis and Treatment Standards (2018)[J]. J Dig Med Imageology Electron Ed, 2019, 9(3): 118–144.
- [4] Wagner AD, Syn NL, Moehler M, et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2017, 8(8): CD004064.
- [5] Afifah NN, Diantini A, Intania R, et al. Genetic polymorphisms and the efficacy of platinum-based chemotherapy: review[J]. Pharmacogenomics Pers Med, 2020, 13: 427–444.
- [6] Ortiz-Barahona V, Joshi RS, Esteller M. Use of DNA methylation profiling in translational oncology[J]. Semin Cancer Biol, 2020[Epub ahead of print]. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.12.011.
- [7] Uddin MS, Mamun AA, Alghamdi BS, et al. Epigenetics of glioblastoma multiforme: from molecular mechanisms to therapeutic approaches [J]. Semin Cancer Biol, 2020[Epub ahead of print]. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.12.015.
- [8] Brown R, Curry E, Magnani L, et al. Poised epigenetic states and acquired drug resistance in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(11): 747–753.
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 胃癌规范化诊疗指南(试行)[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2013, 5(8): 29–36.
- State Health and Family Planning Commission of the people's Republic of China. Gastric Cancer Diagnosis and Treatment Standards(Trial)[J]. Chin J Front Med Sic Electron Version, 2013, 5(8): 29–36.
- [10] Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance[J]. Oncogene, 2012, 31(15): 1869–1883.
- [11] Nagasubramanian R, Innocenti F, Ratain MJ. Pharmacogenetics in cancer treatment[J]. Annu Rev Med, 2003, 54: 437–452.
- [12] Fujii N. Potential strategies to target protein-protein interactions in the DNA damage response and repair pathways[J]. J Med Chem, 2017, 60(24): 9932–9959.
- [13] Wang P, Tang JT, Peng YS, et al. XRCC1 downregulated through promoter hypermethylation is involved in human gastric carcinogenesis [J]. J Dig Dis, 2010, 11(6): 343–351.
- [14] 刘源. ERCC1、XRCC1 表达对晚期 NSCLC 患者化疗疗效与预后的影响[J]. 实用癌症杂志, 2016, 31(9): 1396–1398.
- Liu Y. Effects of ERCC1 and XRCC1 expression on the efficacy and prognosis of chemotherapy for advanced NSCLC[J]. Pract J Cancer, 2016, 31(9): 1396–1398.
- [15] Tudek B. Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers[J]. Mol Aspects Med, 2007, 28(3/4): 258–275.
- [16] Zhao W, Hu LM, Xu JL, et al. Polymorphisms in the base excision repair pathway modulate prognosis of platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2013, 71(5): 1287–1295.
- [17] Lv HY, Li QC, Qiu WS, et al. Genetic polymorphism of XRCC1 correlated with response to oxaliplatin-based chemotherapy in advanced colorectal cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2012, 18(4): 1009–1014.
- [18] Zhai XH, Huang J, Wu FX, et al. Impact of XRCC1, GSTP1, and GSTM1 polymorphisms on the survival of ovarian carcinoma patients treated with chemotherapy[J]. Oncol Res Treat, 2016, 39(7/8): 440–446.
- [19] Zhang Z, Xiang Q, Mu GY, et al. XRCC1 polymorphism and overall survival in ovarian cancer patients treated with platinum-based chemotherapy: a systematic review and MOOSE-compliant meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(45): e12996.
- [20] Oleksiewicz U, Machnik M. Causes, effects, and clinical implications of perturbed patterns within the cancer epigenome[J]. Semin Cancer Biol, 2020[Epub ahead of print]. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.12.014.
- [21] Cheng Y, He C, Wang MN, et al. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials[J]. Signal Transduct Target Ther, 2019, 4: 62.
- [22] Matei D, Fang F, Shen CY, et al. Epigenetic resensitization to platinum in ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2012, 72(9): 2197–2205.
- [23] Yu SL, Ao Z, Wu Y, et al. ZNF300 promotes chemoresistance and aggressive behaviour in non-small-cell lung cancer[J]. Cell Prolif, 2020, 53(11): e12924.
- [24] Cervena K, Siskova A, Buchler T, et al. Methylation-based therapies for colorectal cancer[J]. Cells, 2020, 9(6): 1540.
- [25] Fazal Z, Singh R, Fang F, et al. Hypermethylation and global remodelling of DNA methylation is associated with acquired cisplatin resistance in testicular germ cell tumours[J]. Epigenetics, 2021, 16(10): 1071–1084.

(责任编辑:唐秋姗)