

非小细胞肺癌组织中 ERCC1 mRNA 表达的及其与辅助化疗和预后的关系

钟宏¹, 冷雪峰², 阳诺², 陈铭伍², 郭建极², 洗磊^{2△}

(1. 广西壮族自治区北海市人民医院心胸外科 536000;

2. 广西医科大学第一附属医院心胸外科, 南宁 530021)

摘要:目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)患者切除修复交叉互补基因 1(ERCC1)mRNA 的表达情况及其与铂类药物辅助化疗和预后的关系。方法 应用逆转录-PCR(RT-PCR)实验技术,检测 85 例 NSCLC 和 34 例癌旁组织中 ERCC1 mRNA 的表达情况。回顾性分析 ERCC1 表达情况与患者辅助化疗后无进展生存期以及总生存期之间的关联性。结果 患者 ERCC1 mRNA 阴性表达较阳性表达具有更长的无进展生存期($P=0.001$)和总生存期($P=0.001$)。多因素分析显示,ERCC1 为无进展生存期($P=0.018$)和总生存期($P=0.027$)的独立预后指标。结论 NSCLC 患者 ERCC1 mRNA 的检测可能作为其术后的生存预测性因素,通过此项检测可对术后接受含铂辅助化疗的患者进行个体化的指导。

关键词:癌,非小细胞肺;ERCC1 mRNA;逆转录聚合酶链反应

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.09.012

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)09-1058-03

Analysis of ERCC1 mRNA expression to predict prognosis in patients with non-small cell lung cancer who received adjuvant chemotherapy

Zhong Hong¹, Leng Xuefeng², Yang Nuo², Chen Mingwu², Guo Jianji², Xian Lei^{2△}

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, the People's Hospital of Beihai City, Beihai, Guangxi

536000, China; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of

Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To discover the excision repair cross-complementing 1 (ERCC1) expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients and explore the prognostic value of ERCC1. **Methods** The ERCC1 mRNA expressions in NSCLC was tested from 85 tumor tissues and 34 adjacent tissue samples from patients who were after the surgery were used by semi-quantitative RT-PCR. The data of clinical features and progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were linked to ERCC1 expression by retrospective analysis. **Results** In 85 patients, the ERCC1 negative ones had a significantly longer survival than the ERCC1 positive expression ones (PFS, $P=0.001$; OS, $P=0.001$). During the multivariate analysis, ERCC1 was found to be a significant factor in PFS and OS ($P=0.018$ and $P=0.027$). **Conclusion** NSCLC patients who were undertaken platinum-based adjuvant chemotherapy after surgery could use the detection of ERCC1 mRNA as a determinant factor for the prognosis predicting of individualized treatment.

Key words: carcinoma, non-small cell lung; ERCC1 mRNA; reverse transcriptase polymerase chain reaction

非小细胞肺癌(NSCLC)在恶性肿瘤中占有一定比例,而且已经上升为死亡率第一的恶性肿瘤疾病^[1]。然而,多种原因引起的化疗耐药导致患者术后继续化疗失败,成为手术后出现的一个瓶颈。切除修复交叉互补基因 1(ERCC1)是一个 DNA 损伤修复基因,其编码 5'端核苷酸切除修复(NER)复合物的核酸内切酶,并且是 NER 通路中的关键酶之一,这个通路在消除铂类-DNA 加合物中起到必不可少的作用。临床研究发现 ERCC1 高表达与铂类药物为基础的化疗耐药相关,并且在进展期 NSCLC 患者预后较差^[2]。本研究通过逆转录-PCR(RT-PCR)实验检测 ERCC1 mRNA 在 85 例 NSCLC 患者癌组织标本中的表达情况,并结合这些接受手术治疗患者的临床资料,进一步阐明其阳性表达与铂类药物术后辅助化疗及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 NSCLC 组织来自 2007 年 8 月至 2009 年 4 月广西医科大学第一附属医院心胸外科经治的 85 例 NSCLC 患者^[3]。所有患者手术治疗前均未接受化学治疗、放射治疗、激素替代治疗、免疫治疗或其他任何治疗,平均年龄 57 岁,其中

小于或等于 60 岁 53 例,大于 60 岁 32 例;男 60 例,女 25 例;汉族 60 例,壮族 25 例。按美国抗癌协会肺癌分期(TNM 分期)标准(1997 年)分期,Ⅰ~Ⅱ期 48 例,Ⅲ~Ⅳ期 37 例;病理分级,G1~G2 级 58 例,G3 级 27 例;病理类型(WHO,2000 年),鳞癌 25 例,腺癌 60 例。28 例患者查见肺门及纵膈淋巴结转移(N1~N2 期),57 例患者无任何淋巴结转移(N0 期);79 例患者接受了标准的肺叶切除肺癌根治术,6 例患者接受了标准的单侧全肺切除肺癌根治术;患者术后行辅助化疗前的美国东部肿瘤协作组体能状态评分为:0 分 22 例,1 分 63 例。85 例 NSCLC 患者均接受 NSCLC 根治术,其中 I b 期患者 11 例,术后病理检查提示无高危因素故给予观察及定期随访;74 例患者在 NSCLC 根治术后 3 个月内予以至少 2 个周期含铂的辅助化疗。另取其中 34 例患者癌旁组织(即癌周围 5 cm 组织)作为实验对照。此项研究所涉及内容均向患者充分说明,并与患者沟通并签署知情同意书,本课题研究已经广西医科大学第一附属医院伦理委员会同意批准。

1.2 RT-PCR 检测 手术采集标本均以 -80 ℃ 冰冻保存备用。整块 NSCLC 以及其癌旁组织在手术切除后立即选择部

分无出血坏死的癌组织及癌旁组织进行切取并保存在液氮罐中,迅速转移至-80℃冰箱(海尔公司)保存以备研究使用。NSCLC 患者癌及癌旁组织中总 RNA 的提取采用 Trizol 法(试剂来自 Invitrogen 公司,美国)。将总 RNA 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,通过凝胶数字成像系统观察结果。特异性的 28S、18S 和 5S 3 条带清晰可见,其中 28S 亮度为 18S 亮度的 2 倍左右,说明总 RNA 未发生降解且适宜行接下来的 cDNA 逆转录。采用 Primer5.0 软件设计所需反应的引物,由上海捷瑞公司负责合成生产以及寄送。ERCC1 基因序列:Forward 5'-CCC TGG GAA TTT GGC GAC GTA A-3';Reverse 5'-CTC CAG GTA CCG CCC AGC TTC C-3'。β-actin 基因作为内参:Forward 5'-CTC GCG TAC TCT CTC TTT CTG G-3';Reverse 5'-GCT TAC ATG TCT CGA TCC CAC TTA A-3'。进行逆转录的试剂购自美国 Fermentas 公司。Takara 公司相关试剂操作规范推荐的 PCR 反应体系(25 μL)包括:模板 1 μL,上、下游引物所需各 1 μL,Takara Premix Ex Taq Version 2.0 (Loading dye Mix)加 12 μL,去离子水 10 μL 补足至 25 μL。按推荐给予预变性 94℃ 3 min 30 s,变性 94℃ 下 40 s,进而退火 59℃ 下 40 s,72℃ 下产物延伸 50 s。经过以上 30 个循环后,在 72℃ 下延伸 5 min 结束 PCR 反应。将 PCR 所得产物通过凝胶电泳以及凝胶成像系统进行观察。

1.3 结果观察 配制 2% 琼脂糖凝胶,在其中滴加 1~2 滴溴化乙锭,将检测 ERCC1 基因的 PCR 产物取约 5 μL 均匀上样。选择 120 V 恒压将凝胶在 0.5×Tris-硼酸缓冲液下电泳约 25~30 min,将电泳后的 PCR 产物放置入 Bio-Rad Gel Doc 2000 凝胶成像系统观察并将特异性基因片段表达进行拍照及电脑记录。将预实验中 ERCC1 基因 PCR 扩增产物条带较清晰的 PCR 产物寄送至北京诺赛基因组研究中心测序,见图 1。回报的测序结果在美国国立生物技术信息中心中 nucleotide blast 工具比对后完全符合其特异性要求。大样本检测的步骤和 PCR 反应体系同上,在 DNA 分子标记物作参照,内参表达完全正常前提下,ERCC1 基因扩增的 PCR 产物条带与预期片段大小相符时为阳性表达,否则为阴性表达。

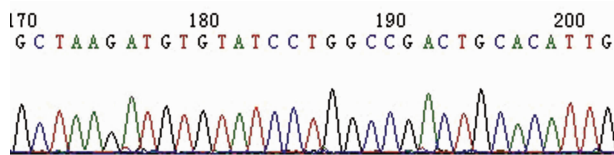


图 1 ERCC1 目的基因测序图

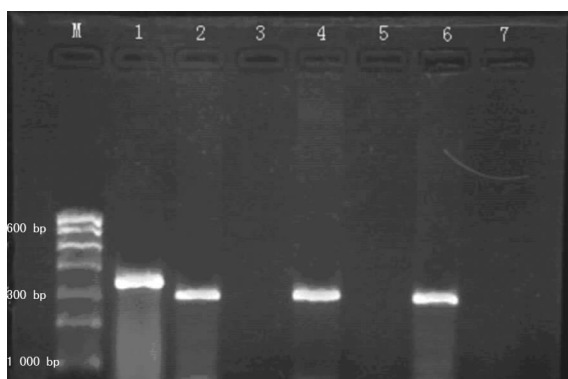
1.4 随访 85 例 NSCLC 患者均接受随访。随访始于 NSCLC 确诊后,截止时间为 2011 年 6 月 1 日,以电话或来院复查形式完成随访。85 例 NSCLC 患者均有完整的临床、病理资料及随访资料。无进展生存期是指患者由术后直至肿瘤进展或患者死亡时间的长短,只要肿瘤进展(包括远处转移),则达到研究的终点。总生存期是指从手术当天开始至直到因各种原因导致死亡的时间。随访 2.3~42.6 个月,45 例患者因 NSCLC 死亡,中位随访时间为 23.3 个月。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理。ERCC1 mRNA 表达情况与 NSCLC 患者临床特征之间的关系选用 χ^2 检验或者 Fisher 确切概率检验。利用 Kaplan-Meier 进行患者生存分析,通过 Log-Rank 检验其差异;多因素生存分析使用 Cox 比例风险模型;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ERCC1 基因电泳结果 以 DNA 分子标记物作为相对分子质量标准,无模版添加的 PCR 反应体系作为阴性对照,发现片

段大小为 273 bp 的 ERCC1 基因特异性目的条带为阳性表达,反之则为阴性表达。85 例 NSCLC 患者的癌组织及相关的 34 例癌旁组织中 ERCC1 mRNA 表达分别为 58.8%、55.9%,差异无统计学意义($P=0.769$),见图 2。



M: 分子标记物; 1: β-actin; 2: 阳性对照; 3: 空白对照; 4、6: NSCLC 阳性表达; 5、7: NSCLC 阴性表达。

图 2 肺癌组织 ERCC1 基因 RT-PCR 琼脂糖电泳图

2.2 ERCC1 基因表达和患者临床特点的关系 TNM 分期以及淋巴结转移与 ERCC1 表达之间存在统计学相关。TNM III、IV 期的患者中 ERCC1 mRNA 表达率较 I、II 期高($P=0.006$);出现肺门及纵膈淋巴结转移的患者 ERCC1 mRNA 表达高于无淋巴结转移患者($P=0.010$)。但 ERCC1 mRNA 在性别($P=0.111$)、年龄($P=0.708$)、民族($P=0.191$)、组织类型($P=0.191$)及病理分级($P=0.597$)中差异无统计学意义。

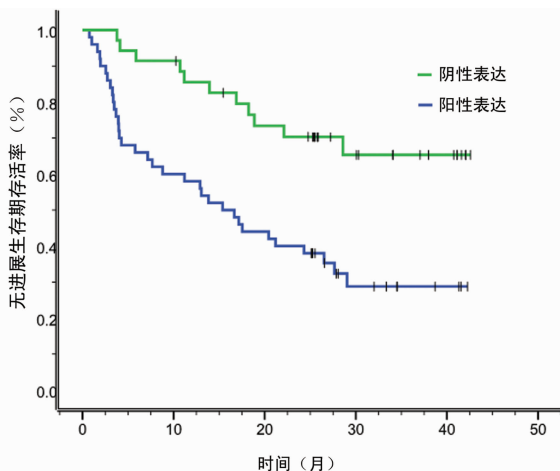


图 3 ERCC1 表达相关的无进展生存期曲线

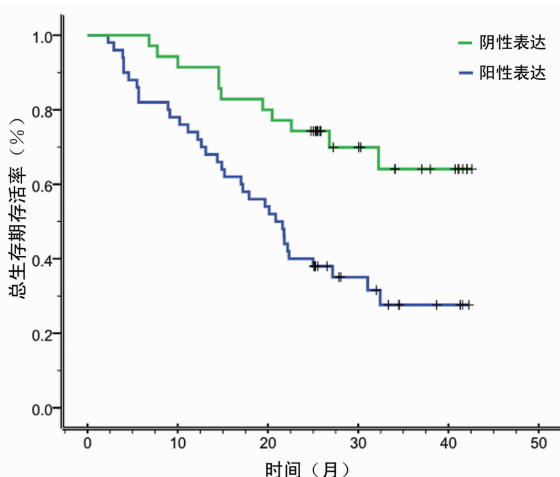


图 4 ERCC1 表达相关的总生存期曲线

2.3 ERCC1 与患者术后生存间的关系 纳入研究的患者其中位总生存期和中位无进展生存期分别为 27.2 个月和 26.5 个月。癌组织中 ERCC1 mRNA 阴性表达的患者相较阳性表达者拥有更长的无进展生存期 (>42.6 个月 *vs.* 15.4 个月, $P=0.001$) 及总生存期 (>42.6 个月 *vs.* 20.9 个月, $P=0.001$), 见图 3、4。ERCC1 基因的阳性表达无论在单因素 ($P=0.001$) 或多因素 ($P=0.018$) 分析中差异均有统计学意义, 风险比 (HR) 为 0.043, 95% CI: 0.211~0.864。

3 讨论

我国肺癌发病及死亡的预计和流行趋向研究指出, 在中国, 肺癌的发病率呈逐年上升趋势, 平均每年增加约 1.63%^[4]。随着 NSCLC 术后辅助化疗药物不断发展, 美国国立综合癌症网络的 NSCLC 临床实践指南和日常诊疗过程指出, 铂类联合非铂类药物已成为患者的一线治疗方案^[5]。但铂类药物在临床使用中常会出现较高的毒性不良反应以及耐药现象, 使得只有较少患者才能从各种治疗方案中获得益处。随着近几年个体化药物及个体化治疗的涌现, 在使用铂类相关细胞毒性药物治疗肺癌的同时, 可以选择性地检测一些分子生物标记来评估和预测临床疗效, 并根据不同患者的差异和化疗耐药相关分子标志物的表达来个体化分配药物治疗方案。

ERCC1 基因位于人类染色体 19q13.2-q13.3 上, 全长 5 000 bp, 包含 10 个外显子, 编码一种含 297 个氨基酸的蛋白, 具有 4 个亚型, 分别为 201、202、203、204, 且和 XPF 共同完成 DNA 单链损伤的 5' 端剪切, 是 NER 途径的一个限速酶^[6]。铂类化疗药物主要依靠其形成链内铂类-DNA 加合物和链间两股 DNA 链的交联造成其细胞毒性。这些加合物在基因组 DNA 中的去除和链间 DNA 交联的修复以及其重组过程是通过不同的 DNA 修复通路相关组件来调节的。ERCC1 在铂类药物诱导的加合物相关 NER 途径中是一个关键因素^[7]。在 NER 途径中, ERCC1/XPF 切除 DNA 链并移除损伤的结构、铂类加合物或者紫外线诱导生成的胸腺嘧啶二聚体。有研究表明在铂类耐药的肺癌 A549 细胞系中, ERCC1 存在高表达现象^[8], 证明在 NSCLC 中 ERCC1 基因的高表达可以抑制铂类药物的药效。2002 年, Lord 等^[9]第一次阐述了接受顺铂药物为基础化疗的 56 名晚期患者中, ERCC1 mRNA 低表达的患者有着良好的预后。在可手术切除的 NSCLC 患者中, Simon 等^[10]的研究提示 ERCC1 的表达水平与手术切除患者的预后紧密相连 (中位总生存时间 94.6 *vs.* 35.5 个月, $P=0.010$)。即使如此, 少量关于 ERCC1 阳性表达的研究指出, 这类患者可能与更好的预后有关^[11]。但总的来说, 经 Meta 分析总结, 无论使用何种检测方法, ERCC1 低表达者的患者较高表达的拥有更好的预后和铂类药物的治疗效果^[12]。类似研究差异可能与组织固定标准化和染色方法的缺乏, 实验者主观评价标准较难统一, 以及实验选材、试剂差异和实验过程的不同有关。本研究结果显示, ERCC1 mRNA 在 TNM III、IV 期患者的表达明显高于在 I、II 期的患者 ($P=0.006$), 淋巴结发生转移的患者较没有转移者的表达率要高 ($P=0.010$), 这些与上述相关研究结果一致^[10-12]。随访结果显示, ERCC1 阴性表达的患者较阳性表达者有着更长的中位无进展生存期 (>42.6 个月 *vs.* 15.4 个月) 以及总生存期 (>42.6 个月 *vs.* 20.9 个月), 表明 ERCC1 基因表达阳性的患者预后相对较差, 并且意味着是一个晚期事件。由于肿瘤组织中 33% ERCC1 蛋白阳性表达的在 qRT-PCR 中表现为低表达, 相反 32% 免疫组织化学阴性表达的在 qRT-PCR 中高表达^[13]。虽然这也可能是技术误差或者转录后调控水平差异等因素造成, 使得本研究也可能存

在一定的局限性。

总之, ERCC1 基因表达阴性的患者在手术后确实获得了较长的生存时间, 虽然有样本来源的区域限制性, 但对于广西壮族自治区内逐渐开展检测 ERCC1 mRNA 指导个体化的化疗疗效以及提高 NSCLC 患者的生存时间是有益的。

参考文献:

- [1] Olausson 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(10): 983-991.
- [2] Chen W, Zhang S, Zou X, et al. Evaluation on the incidence, mortality and tendency of lung Cancer in China[J]. *Thoracic Cancer*, 2010, 1(1): 35-40.
- [3] 冷雪峰. 非小细胞肺癌组织中 ERCC1、BAG-1、BRCA1、RRM1 和 TUBB3 基因 mRNA 表达及其与辅助化疗和预后的关系[D]. 南宁: 广西医科大学, 2012.
- [4] 陈万青, 张思维, 邹小农. 中国肺癌死亡的估计和流行趋势研究[J]. *中国肺癌杂志*, 2010, 13(5): 488-493.
- [5] Crino L, Weder W, van Meerbeeck J, et al. Early stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Ann Oncol*, 2010, 21 (Suppl 5): 103-115.
- [6] Su Y, Orelli B, Madireddy A, et al. Multiple DNA binding domains mediate the function of the ERCC1-XPF protein in nucleotide excision repair[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(26): 21846-21855.
- [7] Gossage L, Madhusudan S. Current status of excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1) in Cancer[J]. *Cancer Treat Rev*, 2007, 33(6): 565-577.
- [8] Li JJ, Ding Y, Li DD, et al. The overexpression of ERCC-1 is involved in the resistance of lung Cancer cells to cetuximab combined with DDP[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(20): 1914-1921.
- [9] Lord RV, 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(7): 2286-2291.
- [10] Simon GR, Sharma S, Cantor A, et al. ERCC1 expression is a predictor of survival in resected patients with non-small cell lung Cancer[J]. *Chest*, 2005, 127(3): 978-983.
- [11] 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.
- [12] Roth JA, Carlson JJ. Prognostic role of ERCC1 in advanced non-small-cell lung Cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Lung Cancer*, 2011, 12(6): 393-401.
- [13] Friboulet L, Barrios-Gonzales D, Commo F, et al. Molecular characteristics of ERCC1-Negative versus ERCC1-Positive tumors in resected NSCLC[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(17): 5562-5572.