

· 论 著 ·

非小细胞肺癌化疗相关基因标志物表达特征分析*

张诗珩, 李 峥, 彭 宇, 彭 杨, 杨宇馨, 李崇义, 肖 何, 王 东[△]

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心, 重庆 400042)

摘要:目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)化疗药物相关基因标志物的表达谱特征及其与病理类型的关系,为临床个性化化疗方案提供实验依据。**方法** 采用免疫组织化学分析 733 例 NSCLC 患者的剪切修复交叉互补基因 1(ERCC1)、乳腺癌易感基因(BRCA1)、脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 1(APE1)、核糖核苷还原酶 M1(RRM1)、 β -Tubulin III 家族(TUBB3)和胸苷酸合成酶(TS)6 种化疗药物相关标志物的表达特征,分析 6 种标志物与病理的关系及其相互间的相关性。**结果** BRCA1、TUBB3、TS 表达在腺癌、鳞癌、未分类癌 3 种病理类型间比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);且这 3 种标志物表达与病理类型有关($r = 0.107$ 、 $r = -0.229$ 、 $r = 0.168$, $P < 0.01$)。ERCC1 与 BRCA1、ERCC1 与 APE1、APE1 与 RRM1 之间呈正相关($r = 0.214$ 、 $r = 0.316$ 、 $r = 0.222$, $P < 0.01$)。**结论** NSCLC 化疗相关标志物表达与临床病理类型有关,多种标志物表达相互间具有显著相关性。对化疗药物相关标志物表达及病理类型进行联合检测有助于临床制订个体化化疗方案。

关键词:癌,非小细胞肺;抗肿瘤联合化疗方案;生物学标记;脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.11.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)11-1284-03

Expression characteristics of chemotherapeutic related genes in non-small cell lung cancer*

Zhang Shiheng, Li Zheng, Peng Yu, Peng Yang, Yang Yuxin, Li Chongyi, Xiao He, Wang Dong[△]

(Cancer Center, Daping Hospital, Research Institute of Field Surgery,

Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To analyze the expression characteristics of chemotherapeutic related genes (ERCC1, BRCA1, APE1, RRM1, TUBB3 and TS) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and their associations with the pathological types to provide the experimental evidences for clinical individual chemotherapy. **Methods** The immunohistochemical SP method was used to determine the expression of ERCC1, BRCA1, APE1, RRM1, TUBB3 and TS genes in 733 patients with NSCLC. Chi-square test was performed to analyze the gene expression characteristics among different pathological types. Spearman relationship was conducted to evaluate the associations among the six genes and different pathological types. **Results** The expression of BRCA1, TUBB3 and TS had statistical differences among three pathological types ($P < 0.01$); and these three genes showed a relationship with the pathological type ($r = 0.107$, -0.229 and 0.168 , respectively, $P < 0.01$). ERCC1 vs. BRCA1, ERCC1 vs. APE1 and APE1 vs. RRM1 showed the positive correlation ($r = 0.214$, 0.316 and 0.222 , respectively, $P < 0.01$). **Conclusion** The chemotherapeutic related gene expressions of NSCLC are related with the clinical pathological types. And the expressions of multiple markers are associated with each other. The combined detection of the chemotherapeutic related markers and the pathological types would be helpful to the decision making of individual chemotherapy in clinic.

Key words: carcinoma, non-small cell lung; antineoplastic combined chemotherapy protocols; biological markers; apurinic endonuclease

非小细胞肺癌(non-small cell Lung cancer, NSCLC)是最常见的肺癌类型,包括腺癌、鳞癌等,占肺癌患者的 80%~85%^[1]。治疗晚期 NSCLC 患者的主要化疗方案为以铂类为基础联合第三代化疗药物^[2]。尽管双药含铂化疗方案已成为 NSCLC 一线治疗的标准方案,但疗效却有很大异质性。近年来多位研究者探讨了根据化疗药物相关基因的表达来预测药物的敏感性,并制订个体化的化疗方案。化疗药物相关基因包括涉及 DNA 损伤修复的剪切修复交叉互补基因 1(excision repair cross-complementing 1, ERCC1)、乳腺癌易感基因(breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1);涉及 DNA 合成的核糖核苷还原酶 M1(ribonucleotide reductase subunit M1,

RRM1)和胸苷酸合成酶(thymidilate synthase, TS);以及参与细胞微管形成的 β -Tubulin III 家族(class III β -Tubulin, TUBB3)。有研究表明,脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 1(apurinic endonuclease 1, APE1)在 DNA 碱基切除修复及氧化还原信号调控等多个重要生物学过程中发挥重要作用^[3]。NSCLC 的组织学类型与许多基因标志物的表达有密切联系,有研究证实 TUBB3 mRNA 表达水平在腺癌患者显著高于鳞癌患者^[4-5],但上述相关基因表达在 NSCLC 的特点尚少见系统研究。作者对 2008 年 1 月至 2013 年 12 月本院所收治的 733 例 NSCLC 患者,采用免疫组织化学检测每例患者癌组织内 TUBB3、TS、RRM1、ERCC1、BRCA1 和 APE1 表达,并进一步

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171904)。 作者简介:张诗珩(1988—),硕士研究生,主要从事肿瘤个体化治疗与基因损伤修复研究。 [△] 通讯作者, Tel:(023)68757151; E-mail:dongwang64@hotmail.com。

分析其表达的相关性,以及其与临床病理的关联性,为临床治疗 NSCLC 的药物选择及制订化疗方案提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2008 年 1 月至 2013 年 12 月在本院肿瘤中心治疗的 NSCLC 患者 733 例,男 493 例,女 240 例;年龄 30~85 岁,平均 59.85 岁;其中 60 岁以下的患者 342 例(46.66%)。患者均经组织学证实,其中肺腺癌 489 例(66.71%),肺鳞癌 157 例(21.42%),未分类癌 87 例(11.87%)。

1.2 方法

1.2.1 化疗药物相关标志物表达检测 每例患者均收集病理组织石蜡标本,采用免疫组织化学方法评估 TUBB3、TS、RRM1、ERCC1、BRCA1 和 APE1 蛋白表达。6 种标志物的一抗为中杉金桥公司工作液,分别为鼠抗人 BRCA1 单抗,兔抗人 RRM1 多抗,兔抗人 TUBB3 单抗,鼠抗人 TS 单抗和鼠抗人 ERCC1 蛋白单抗。APE1 蛋白抗体为实验室自制多克隆抗体^[6],使用时按 1:10 000 比例稀释。二抗购自北京西雅金桥生物技术有限公司(批号:P0-7000)。所有标本切片后 60℃ 烘烤 4 h,经脱蜡、水合后以 10% 过氧化氢溶液封闭,按照各自所需修复要求以枸橼酸钠(pH 6.0)或乙二胺四乙酸(EDTA,pH 8.0)修复抗原,一抗 4℃ 孵育过夜,二抗 37℃ 孵育 25 min,然后 3,3-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,盐酸乙醇脱色,饱和碳酸锂镧化后脱水、封片。

1.2.2 蛋白表达水平评估标准 蛋白表达水平的评估以细胞染色程度与内部对照细胞(淋巴细胞及间质细胞)进行比较,其表达水平由 0~++++ 表示,在肿瘤细胞中无表达为 0,在少于 10% 的肿瘤细胞中有少量核表达为 +;在超过 10% 肿瘤细胞中细胞核有弱到中等强度表达为 ++;在超过 10% 肿瘤细胞中整个细胞核强表达则定为 +++。+++~++++ 定义为阳性,0~+ 定义为阴性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。采用

χ^2 检验分析 6 种肿瘤标志物表达阳性率与不同临床基线特征间的关系,采用 Spearman 等级相关检验 6 种标志物与病理类型的相关性以及标志物彼此间的相关性。所有检验为双边检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 6 种化疗相关标志物的表达特征 ERCC1、BRCA1 与 TS 呈核浆表达,RRM1 与 TUBB3 则多为细胞质表达,APE1 多为核表达,NSCLC 6 种化疗相关标志物表达的免疫组织化学染色结果,见图 1。RRM1 与 APE1(因组织结构未达分析标准而剔除 1 例)表达的阳性率最高,分别为 79.94% 和 79.26%;TUBB3 和 ERCC1 表达率相似,阳性率分别为 55.53% 和 52.80%;阳性率最低的为 TS,仅 66 例(9.00%)表达阳性,见表 1。

2.2 化疗药物相关标志物表达与临床病理类型的关系 BRCA1、TUBB3 和 TS 3 个蛋白的阳性率在腺癌、鳞癌、未分类癌 3 种病理类型间比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。相关性分析中,上述 3 种蛋白也分别与病理类型相关($P < 0.01$)。BRCA1 的阳性率在鳞癌(25.48%)、未分类癌(27.59%)中均显著高于腺癌(16.77%),而 TUBB3 的阳性率则在腺癌和未分类癌中较高,分别为 62.99% 和 64.37%;TS 的阳性率在 3 种病例类型中普遍较低,最低的是腺癌,仅为 6.13%,见表 2。

2.3 化疗药物相关标志物两两相关性分析 ERCC1 分别与 APE1 和 BRCA1 呈正相关($r = 0.316, 0.214, P < 0.01$); RRM1 分别与 APE1 及 ERCC1 呈正相关($r = 0.222, 0.109, P < 0.01$);TS 与 BRCA1 呈正相关($r = 0.188, P < 0.01$);TUBB3 与 APE1 呈正相关($r = 0.107, P = 0.004$)。BRCA1 与 APE1、TS 与 ERCC1、RRM1 与 BRCA1、TUBB3 与 RRM1 具有微弱的相关性($r = 0.083, 0.0129, 0.09, 0.090, P < 0.05$)。

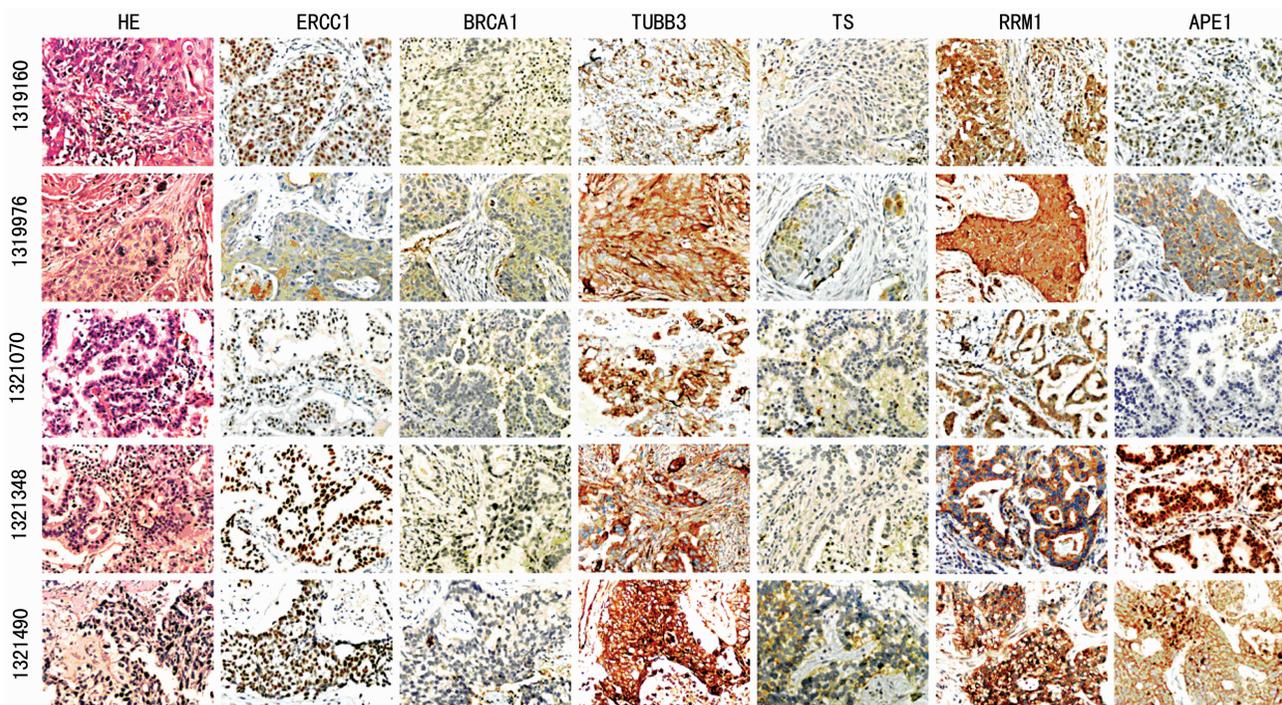


图 1 NSCLC 6 种化疗相关标志物表达的免疫组织化学染色(×200)

表 1 NSCLC 6 种化疗药物相关标志物表达情况[n(%)]

项目	ERCC1(n=733)	BRCA1(n=733)	APE1(n=732)	RRM1(n=733)	TS(n=733)	TUBB3(n=733)
0	160(21.83)	377(51.43)	64(8.74)	25(3.41)	420(57.30)	159(21.69)
+	186(25.38)	210(28.65)	87(11.88)	122(16.64)	247(33.70)	167(22.78)
++	318(43.38)	131(17.87)	362(49.45)	404(55.12)	61(8.32)	277(37.79)
+++	69(9.41)	15(2.05)	219(29.92)	182(24.83)	5(0.68)	130(17.74)
阳性	387(52.80)	146(19.92)	581(79.37)	586(79.94)	66(9.00)	407(55.53)
阴性	346(47.20)	587(80.08)	151(20.63)	147(20.05)	667(91.00)	326(44.47)

表 2 肿瘤标志物检测阳性与临床病理类型间的关系[n(%)]

病理类型	n	ERCC1	BRCA1	APE1 ^a	RRM1	TS	TUBB3
腺癌	489	254(51.94)	82(16.77)	392(80.33)	397(81.19)	30(6.13)	308(62.99)
鳞癌	157	90(57.32)	40(25.48)	124(78.98)	123(78.34)	21(13.38)	43(27.39)
未分类癌	87	43(49.43)	24(27.59)	65(74.71)	66(75.86)	15(17.24)	56(64.37)
χ^2		1.832	9.290	1.441	1.625	15.780	64.108
P		0.400	0.010	0.487	0.444	0.000	0.000
r ^b		0.015	0.107	-0.042	-0.010	0.168	-0.229
P ^c		0.676	0.004	0.259	0.785	0.000	0.000

^a: APE1 检测在腺癌中剔除 1 例; ^b: 蛋白表达采用实际评级变量; ^c: 表示相关性 P 值。

3 讨论

本研究分析了 6 种化疗药物相关基因标志物在 NSCLC 患者组织中的表达特征及其与病理类型的关系。BRCA1 在本研究中阳性率仅 19.92%，低于 Toffart 等^[7]研究报道的 30%，此研究对象多为欧洲高加索人群，其原因可能与人群特征不同有关。此外，Kang 等^[8]报道 BRCA1 表达在接受“紫杉醇类+铂类”新辅助化疗手术切除的患者中超过 30%，提示 BRCA1 表达在 NSCLC 治疗前、后可能发生改变。其余 5 种基因表达基本与文献报道一致^[7,9]。

近年来研究证实，多种肿瘤基因改变仅发生在特定的组织学亚型，而且许多基因水平或表现水平的分子改变在鳞癌中与腺癌不同^[5]。本组数据显示，BRCA1 在非腺癌中的阳性率表达显著高于腺癌，与国外相关研究结果相同^[10-11]。Toffart 等^[7]也报道了相同趋势，但未达到统计学差异 ($P < 0.05$)；该研究发现，TUBB3 在腺癌中表达显著增高 ($P = 0.005$)，与本文结果一致。本研究发现，TS 表达阳性率在腺癌中显著低于非腺癌，仅占 6.13%，与 2011 年日本 2 150 例大样本研究结果一致^[12]，在一定程度上可以解释培美曲塞治疗 NSCLC 疗效在不同病理类型间的异质性。

核苷酸切除修复途径 (nucleotide excision repair, NER) 在铂类诱导的 DNA 损伤修复中发挥重要作用，Joerger 等^[13]曾报道过 ERCC1 表达在铂类诱导 DNA 损伤修复中的作用；BRCA1 与铂类药物敏感性和抵抗密切相关，有研究证实 BRCA1 mRNA 表达对于局部进展的 NSCLC 患者生存期有预测作用^[5]。本研究发现，ERCC1 与 BRCA1 表达具有显著相关性 ($r = 0.214, P < 0.01$)，与文献报道一致^[13]，这种相关性可能是由于二者均参与了 NER 途径及 DNA 损伤修复。APE1 作为碱基切除修复 (base excision repair, BER) 途径的重要蛋白，在 DNA 损伤修复过程中发挥重要作用，Wu 等^[14]研究发现，细胞质内 APE1 表达增加可能作为 NSCLC 预后不良的预测因子。本研究发现 ERCC1 与 APE1 之间存在显著相关性，进一步验证了 APE1 在铂类敏感性预测的作用。

RRM1 是核糖核苷还原酶的调节亚单位，Bepler 等^[15]研

究表明，细胞内 RRM1 表达降低能够增强细胞对吉西他滨及铂类的敏感性。本研究发现 RRM1 与 APE1 呈正相关，也观察到 RRM1 与 ERCC1 之间的微弱相关性 ($r = 0.109, P = 0.003$)，提示 RRM1 与铂类的敏感性可能是由于联合其他铂类敏感相关基因。

双药含铂方案是目前一线化疗的标准方案，根据不同的患者基因表达谱特征筛选对相应化疗药物敏感的人群，对于提高患者的疗效可能具有重要作用。本文对大量临床样本进行了化疗药物敏感基因表达的免疫组织化学研究，发现 BRCA1、TUBB3 和 TS 表达与病理学类型有关，且多种敏感基因表达之间具有相关性，提示病理学诊断及相关标志物联合检测对于临床化疗方案决策可能具有更深入的指导作用。本研究也发现 6 种基因之间存在广泛的关联性，提示 NSCLC 化疗药物敏感性及抵抗是一个复杂的网络效应，进一步研究各标志物在细胞及分子水平的相互作用具有重要临床意义，药物敏感基因表达特征对化疗敏感的潜在预测价值仍然有待深入研究。

参考文献:

- [1] Ramalingam SS, Owonikoko TK, Khuri FR. Lung cancer: New biological insights and recent therapeutic advances [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 91-112.
- [2] Zarogoulidis K, Zarogoulidis P, Darwiche K, et al. Treatment of non-small cell lung cancer(NSCLC)[J]. J Thorac Dis, 2013, 5(Suppl 4): S389-396.
- [3] Tell G, Fantini D, Quadrioglio F. Understanding different functions of mammalian AP endonuclease (APE1) as a promising tool for cancer treatment[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(21): 3589-3608.
- [4] Lu H Y, Su D, Pan X D, et al. Mutation and expression of multiple treatment response-related genes in a population with locally advanced non-small cell lung cancer[J]. Oncol Lett, 2012, 3(2): 415-420.
- [5] Mountzios G, Dimopoulos MA, Soria JC, (下转第 1289 页)

一定的理论基础。

参考文献:

- [1] Zimmefli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(16):1645-1654.
- [2] Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(14):1422-1429.
- [3] Ha US, Cho YH. Catheter-associated urinary tract infections; new aspects of novel urinary catheters[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2006, 28(6):485-490.
- [4] Zhao H, Gan TX, Liu XD, et al. Identification and characterization of novel reptile cathelicidins from elapid snakes [J]. *Peptides*, 2008, 29(10):1685-1691.
- [5] Zhang BY, Li SM, Gao ZH, et al. Protective effects of snake venom antimicrobial peptide OH-CATH on *E. coli* induced rabbit urinary tract infection models[J]. *Zoolog Res*, 2013, 34(1):27-32.
- [6] Muzzarelli RA, Muzzarelli C, Tarsi R, et al. Fungistatic activity of modified chitosans against *Saprolegnia parasitica*[J]. *Biomacromolecules*, 2001, 2(1):165-169.
- [7] Cruz J, Kawasaki M, Gorski W. Electrode Coatings Based on Chitosan Scaffolds[J]. *Anal Chem*, 2000, 72(4):680-686.
- [8] Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS, et al. Ultrasensitive assay for endogenous antimicrobial polypeptides[J]. *Immunol Methods*, 1991, 137(2):167-173.
- [9] Chen Y, Mant CT, Farmer SW, et al. Rational design of alpha-helical antimicrobial Peptides with enhanced activities and specificity/ therapeutic index[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(13):12316-12329.
- [10] Wang Y, Hong J, Liu X, et al. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics [J]. *PLoS One*, 2008, 3(9):e3217.
- [11] Chen XX, Yu GY, Zhang Y, et al. Effects of the Antimicrobial Peptide OH-CATH on *Escherichia coli*[J]. *Zoolog Resh*, 2009, 30(2):171-177.
- [12] Kavitha K, Sutha S, Prabhu M, et al. In situ synthesized novel biocompatible titania-chitosan nanocomposites with high surface area and antibacterial activity[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 93(2):731-739.
- [13] 周继章. 抗菌肽抗病的 研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(7):204-208.
- [14] Fantner GE, Barbero RJ, Gray DS, et al. Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy[J]. *Nat Nanotechnol*, 2010, 5(4):280-285.
- [15] 张白羽, 李思嫚, 高振华, 等. 蛇毒抗菌肽 OH-CATH 对大肠杆菌引起家兔泌尿系感染的保护作用[J]. *动物学研究*, 2013, 34(1):25-32.
- (收稿日期:2013-09-14 修回日期:2013-12-24)
- (上接第 1286 页)
- et al. Histopathologic and genetic alterations as predictors of response to treatment and survival in lung cancer; a review of published data[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2010, 75(2):94-109.
- [6] Cao XJ, Dai N, Yi WJ, et al. Preparation and characterization of rabbit anti-human apurinic/aprimidinic endonuclease(APE1) polyclonal antibody[J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2009, 5(4):325-327, 331.
- [7] Toffart AC, Timsit JF, Couraud S, et al. Immunohistochemistry evaluation of biomarker expression in non-small cell lung cancer(Pharmacogenoscan study)[J]. *Lung Cancer*, 2014, 83(2):182-188.
- [8] Kang CH, Jang BG, Kim DW, et al. The prognostic significance of ERCC1, BRCA1, XRCC1, and beta III-tubulin expression in patients with non-small cell lung cancer treated by platinum and taxane-based neoadjuvant chemotherapy and surgical resection[J]. *Lung Cancer*, 2010, 68(3):478-483.
- [9] Chang A. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC[J]. *Lung Cancer*, 2011, 71(1):3-10.
- [10] Kotoula V, Krikelis D, Karavasilis V, et al. Expression of DNA repair and replication genes in non-small cell lung cancer (NSCLC): a role for thymidylate synthetase (TYMS)[J]. *BMC cancer*, 2012(12):342.
- [11] Rosell R, Skrzypski M, Jassem E, et al. BRCA1; a novel prognostic factor in resected non-small-cell lung cancer [J]. *PLoS One*, 2007, 2(11):e1129.
- [12] Tanaka F, Wada H, Fukui Y, et al. Thymidylate synthase (TS) gene expression in primary lung cancer patients; a large-scale study in Japanese population[J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(8):1791-1797.
- [13] Joerger M, deJong D, Burylo A, et al. Tubulin, BRCA1, ERCC1, Abraxas, RAP80 mRNA expression, p53/p21 immunohistochemistry and clinical outcome in patients with advanced non small-cell lung cancer receiving first-line platinum-gemcitabine chemotherapy[J]. *Lung Cancer*, 2011, 74(2):310-317.
- [14] Wu HH, Chu YC, Wang L, et al. Cytoplasmic ape1 expression elevated by p53 aberration may predict survival and relapse in resected non-small cell lung cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20 Suppl 3:S336-347.
- [15] Bepler G, Kusmartseva I, Sharma S, et al. RRM1 modulated in vitro and in vivo efficacy of gemcitabine and platinum in non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(29):4731-4737.
- (收稿日期:2013-12-08 修回日期:2014-02-10)