

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.35.025

Ⅲ A-N2 期非小细胞肺癌组织 TYMS 基因 mRNA 表达与 EGFR 基因突变的相关性研究

李 喆¹, 杨 扬¹, 刘延凤¹, 许瑞彬¹, 戎铁华², 张兰军^{2△}

(1. 延安大学附属医院胸外科, 陕西延安 716000; 2. 中山大学肿瘤防治中心胸科/华南肿瘤学国家重点实验室, 广州 510060)

[摘要] **目的** 探讨Ⅲ A-N2 期非小细胞肺癌(NSCLC)组织胸苷酸合成酶(TYMS)基因 mRNA 表达与表皮生长因子受体(EGFR)基因突变的相关性。**方法** 分别用分支 DNA-液相芯片法及突变富集-液相芯片法检测 30 例病理分期为Ⅲ A-N2 期的 NSCLC 组织 TYMS mRNA 表达及 EGFR 基因 19 号及 21 号外显子突变状况,并对检测结果进行整理分析。**结果** 30 例患者中, TYMS mRNA 低表达 14 例(46.7%),中偏低表达 7 例(23.3%),中表达 7 例(23.3%),中偏高表达 0 例,高表达 2 例(6.7%); 12 例检出 EGFR 基因突变,突变率为 40.0%,其中 6 例为 19 外显子缺失突变,6 例为 21 外显子置换突变。TYMS mRNA 表达水平与 EGFR 突变相关,EGFR 突变多发生在 TYMS mRNA 较低表达水平的患者肿瘤组织中($Z = -2.604, P = 0.009$)。**结论** NSCLC 组织中 TYMS mRNA 表达与 EGFR 基因突变相关,可为今后临床中针对不同条件的患者相关药物的选用提供参考。

[关键词] 癌,非小细胞肺;胸苷酸合成酶;受体,表皮生长因子;基因表达;基因突变**[中图分类号]** R734.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)35-4977-03

Study on correlation between TYMS gene mRNA expression and EGFR gene mutation in stage Ⅲ A-N2 non-small-cell lung cancer tissue

Li Zhe¹, Yang Yang¹, Liu Yanfeng¹, Xu Ruibin¹, Rong Tiehua², Zhang Lanjun^{2△}

(1. Department of Thoracic Surgery, Affiliated Hospital, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China; 2. Department of Thoracic Surgery/State Key Laboratory of Oncology in South China, Center of Tumor Prevention and Treatment, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510060, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation between TYMS gene mRNA expression level and EGFR mutation in stage Ⅲ A-N2 non-small-cell lung cancer tissue (NSCLC). **Methods** The branched DNA-liquidchip technology (bDNA-LCT) and mutant-enriched liquidchip (MEL) technology were used to detect the TYMS mRNA expression and EGFR mutations at exon 19 and 21 in NSCLC tissues from 30 patients with stages Ⅲ A-N2 NSCLC, and the results were analyzed. **Results** Among 30 cases, low TYMS mRNA expression was in 14 cases (46.7%), middle to low TYMS mRNA expression in 7 cases (23.3%), middle mRNA expression in 7 cases (23.3%), middle to high TYMS mRNA expression in 0 case and high TYMS mRNA expression in 2 cases (6.7%); 12 cases of EGFR mutation were detected out with the mutation rate of 40.0%, including 6 cases of exon 19 deletion and 6 cases of exon 21 missense mutation. The TYMS mRNA expression level was correlated with the EGFR mutation. The EGFR mutation commonly occurred in the tumor tissue of the patients with TYMS mRNA low expression ($Z = -2.604, P = 0.009$). **Conclusion** The TYMS mRNA expression in NSCLC tissue is correlated with the EGFR gene mutation, which can provide references for the drug selection aiming at the patients with different conditions.

[Key words] carcinoma, non-small-cell lung; thymidylate synthetase; receptor, epidermal growth factor; gene expression; gene mutation

肺癌目前已成为恶性肿瘤相关死亡的首要原因,其中非小细胞肺癌(non-small-cell lung carcinoma, NSCLC)约占总发病率的 80%^[1-3]。即使采取积极的治疗,NSCLC 患者的 5 年生存率仍然很低。随着全球范围内肿瘤学研究者的不断努力,目前对 NSCLC 的治疗逐渐从传统治疗向个体化、精准医疗转变,在基因层面找出药物作用靶点,提高药物疗效。胸苷酸合成酶(TYMS)是催化体内胸苷酸合成所必需的酶,是肿瘤生长的重要因子,为叶酸类似物氟甲蝶呤和培美曲塞的治疗靶点。培美曲塞目前已成为 NSCLC 中非鳞癌患者的一线用药,其疗效与 TYMS 基因 mRNA 表达水平呈负相关^[4-6]。以表皮生长因子受体(EGFR)基因突变为靶点的络氨酸激酶受体抑制剂(TKIs)目前也被纳入一线治疗方案以治疗存在 EGFR 基因突

变的 NSCLC 患者。培美曲塞和 EGFR-TKIs 均以 NSCLC 患者为治疗对象,虽然前者不推荐鳞癌患者使用,但二者在患者选择上存在很大的交集。本研究旨在分析培美曲塞与 EGFR-TKIs 所针对的基因靶点是否存在一定的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集中山大学肿瘤防治中心及延安大学附属医院 2015 年 6 月至 2016 年 6 月收治的手术切除并经病理证实且分期为Ⅲ A-N2 期的 30 例患者 NSCLC 组织标本及完整的病例资料。所有患者均行肺癌根治术(原发瘤体肺叶完整切除+纵隔淋巴结清扫),术前均未行任何抗肿瘤治疗(包括化疗、靶向治疗及放疗)。30 例患者中男 18 例,女 12 例;年龄 44~69 岁,平均(55.87±1.39)岁;16 例(53.3%)患者有吸烟史,

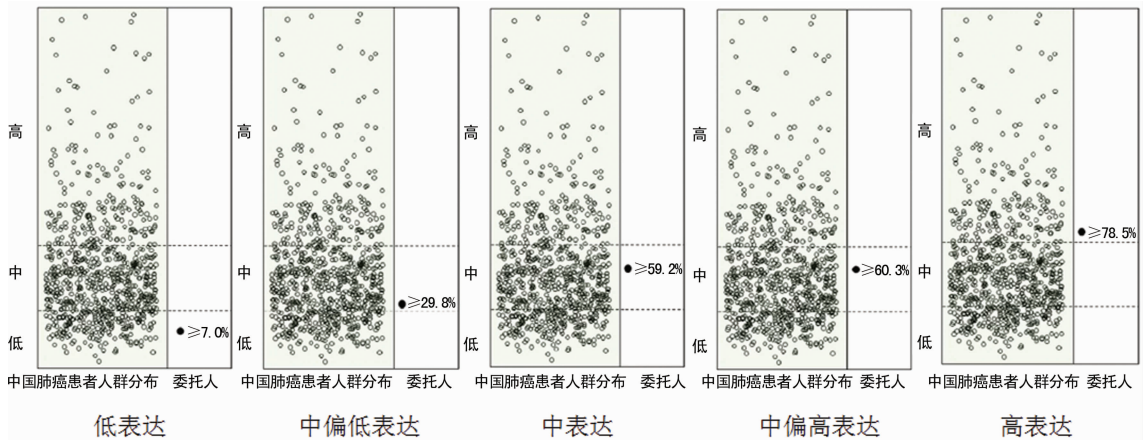


图1 TYMS mRNA 表达区分图

14例(46.7%)患者无吸烟史;按照世界卫生组织的标准进行病理分型:鳞癌8例(26.7%),腺癌17例(56.7%),其他病理类型5例(16.7%);病理分期:高度分化(G1期)2例(6.7%),中度分化(G2期)7例(23.3%),低分化(G3期)17例(56.7%),未分化(G4期)4例(13.3%)。

1.2 方法 分别用分支DNA-液相芯片法及突变富集-液相芯片法检测NSCLC组织TYMS mRNA表达及EGFR基因19号及21号外显子突变状况,由广州益善生物技术有限公司完成。

1.2.1 TYMS mRNA 表达的检测 甲醛固定石蜡包埋(FF-PE)组织标本按照以下步骤处理。将样品于均质溶液中65℃处理2h,反应后的混合物离心,去除残留的石蜡和碎片,将上清液转移到新的离心管,96孔板每孔加入40μL样品混合液,再加入18.5μL无RNA酶的去离子水,33.3μL裂解液,2μL阻断剂,1μL磁珠和5μL特异结合目标基因的探针。将96孔板密封后54℃750r/min摇床孵育18h,再用96孔过滤板过滤混合物。真空状态下,用250μL洗涤缓冲液(0.1×SSC和0.03%锂十二烷基硫酸钠)洗涤3次,去除未结合的RNA和其他杂质,再通过相关步骤检测结合的目标mRNA。用Luminex 200系统分析样品的荧光值,代入建立的特定人群检测数据库转换为百分比,特定人群数据库中mRNA表达水平在人群中25%、75%的位置为两条主要分界线,以此区分低和中、中和高表达,其中中表达又以40%、60%细分为中偏低、中及中偏高表达,最后分为低表达、中偏低表达、中表达、中偏高表达和高表达。

1.2.2 EGFR 基因突变的检测 首先用DNA提取试剂盒提取组织标本DNA,通过多重PCR获得各基因外显子上含有常见等位基因型的基因片段;再将PCR产物经核酸外切酶酶切及碱性磷酸酶水解,去除多余的引物和dNTP;产物再以等位基因特异性引物延伸(ASPE)特异地识别各等位基因,并形成延伸产物;ASPE引物上的Tag序列与聚苯乙烯微球上的Anti-Tag序列特异结合(杂交反应),37℃杂交30min后加入25μL链霉素亲和素-藻红蛋白(SA-PE)工作液,继续37℃反应10min,用Luminex 200系统分析样品的荧光值。

1.3 统计学处理 采用SPSS16.0统计软件进行统计分析,二分类变量资料的分析采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法;有序多分类资料比较采用Kruskal Wallis H 检验;采用Mann-Whitney U 检验对有序多分类资料与二分类变量间的关系进行分析。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学

意义。

2 结果

2.1 TYMS mRNA 表达与EGFR 基因突变情况 TYMS mRNA表达区分图见图1,图中每个圆圈代表一个数据点。30例患者NSCLC组织TYMS mRNA低表达者14例(46.7%),中偏低表达者7例(23.3%),中表达者7例(23.3%),中偏高表达者0例,高表达者2例(6.7%)。30例患者NSCLC组织EGFR突变率为40.0%(12/30),其中6例(20.0%)为19外显子缺失突变,6例(20.0%)为21外显子置换突变。

2.2 TYMS mRNA 表达、EGFR 基因突变与患者临床病理特征的关系 30例患者NSCLC组织标本TYMS mRNA表达及EGFR基因突变与各临床病理特征无明显相关性($P>0.05$),见表1。

表1 TYMS mRNA 表达、EGFR 基因突变与患者临床病理特征的关系

临床病理特征	构成比 [n(%)]	P	
		TYMS mRNA 表达	EGFR 基因突变
性别		0.098	0.136
男	18(60.0)		
女	12(40.0)		
年龄		0.412	0.722
≥56岁	15(50.0)		
<56岁	15(50.0)		
吸烟史		0.563	0.073
有	16(53.3)		
无	14(46.7)		
病理类型		0.777	0.576
腺癌	17(56.7)		
鳞状细胞癌	8(26.7)		
其他	5(16.7)		
病理分化程度		0.332	0.401
G1	2(6.7)		
G2	7(23.3)		
G3	17(56.7)		
G4	4(13.3)		

2.3 TYMS mRNA 表达与 EGFR 基因突变的相关性 12 例 EGFR 基因突变者 TYMS mRNA 表达水平中位数及范围为 1 (1~3), 18 例野生型 EGFR 基因患者 TYMS mRNA 表达水平中位数及范围为 2 (1~5), TYMS mRNA 表达水平与 EGFR 基因突变明显相关, EGFR 突变多发生在 TYMS mRNA 较低表达水平者肿瘤组织中 ($Z = -2.604, P = 0.009$)。

3 讨 论

基于患者的临床、病理特征选择 NSCLC 化疗方案只有少数患者获益, 其有效率仅 20%~40%, 平均生存时间为 8~10 个月, 5 年生存率低于 15%, 此外部分患者有严重的不良反应。因此, 个体化、精准医疗逐渐被广大学者提倡, 从基因层面寻求更多药物作用靶点, 选择精确、不良反应小的药物, 使更多的患者受益, 增加患者生存率。

目前 NSCLC 患者以腺癌最为常见, 而 EGFR 基因突变通常发生在亚裔、女性、不吸烟及腺癌患者中^[1,7], 这些患者往往能从 EGFR-TKIs 治疗中获益。培美曲塞目前作为非鳞癌患者化疗的一线用药, 主要针对腺癌患者, 部分研究发现其靶点基因 TYMS mRNA 在男性、吸烟及非腺癌患者中高表达^[8-10]。培美曲塞与 EGFR-TKIs 针对的患者存在很大的交集, 其作用的靶点基因是否存在一定的相关性尚不明确。本研究结果显示, 培美曲塞所作用的靶点基因 TYMS mRNA 表达水平与 EGFR 基因突变存在明显的相关性, EGFR 基因突变多发生在 TYMS mRNA 较低表达水平的患者肿瘤组织中 ($P = 0.009$)。

著名的国际 III 期注册临床研究 LUX-Lung 3 比较了 EGFR-TKIs 药物阿法替尼与化疗药物培美曲塞联合顺铂治疗伴 EGFR 突变的 III b 期或 IV 期肺腺癌患者的疗效, 主要终点为无进展生存期 (PFS), 结果显示: 阿法替尼组患者较培美曲塞联合顺铂组的 PFS 显著延长 (11.1 个月 *vs.* 6.9 个月, $HR = 0.58, P = 0.0004$)。值得重视的是, 在伴有 EGFR 突变型 (19 位点缺失和 L858R 突变占有 EGFR 突变的 90%) 的患者中, 接受阿法替尼治疗后中位 PFS 超过 1 年 (13.6 个月), 而对照组仅 6.9 个月 ($P < 0.01$)^[11]。虽然该项临床研究显示 EGFR 基因突变的肺腺癌患者用阿法替尼较化疗延长了中位 PFS, 但后续的试验及荟萃分析显示与化疗药物比较, 一线应用 EGFR-TKIs 药物并不能延长 EGFR 基因突变的 NSCLC 患者的总生存期^[12]。上述临床试验仅筛选了 EGFR 基因突变阳性的患者, 并未检测及筛选针对铂类药物的 ERCC1 mRNA 及针对培美曲塞的 TYMS mRNA 表达。肺癌化疗疗效受许多耐药机制的影响, 为多基因、多步骤综合作用的结果。临床数据及本研究结果显示, TYMS 基因 mRNA 低表达及 EGFR 基因突变在 NSCLC 患者中存在很大的交集, 所以在今后的临床试验及临床用药中是否应该予以考虑值得思考。

本研究 TYMS mRNA 表达及 EGFR 基因突变与临床病理特征之间未发现明显相关性, 可能与样本量较小有关。但研究发现 TYMS mRNA 表达水平与 EGFR 基因突变存在明显的相关性, EGFR 基因突变多发生在 TYMS mRNA 较低表达水平的患者肿瘤组织中。这种肿瘤多基因间的相关性, 提示今后在临床试验设计、临床药物选择中应该全方面考虑, 探讨出更合理的方案, 达到个体化、精确化用药。

参考文献

[1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global Cancer Statis-

tics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.

- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.
- [3] Chen WQ, Zheng RS, Zhang SW, et al. The incidences and mortalities of major cancers in China, 2009 [J]. Chin J Cancer, 2013, 32(3): 106-112.
- [4] National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: Lung and Bronchus Cancer [EB/OL]. (2014-08-14) [2017-03-21]. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>
- [5] Shimizu T, Nakanishi Y, Nakagawa Y, et al. Association between expression of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase, and glycinamide ribonucleotide formyltransferase and efficacy of pemetrexed in advanced non-small cell lung cancer [J]. Anticancer Res, 2012, 32(10): 4589-4596.
- [6] Buqué A, Aresti U, Calvo B, et al. Thymidylate synthase expression determines pemetrexed targets and resistance development in tumour cells [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63338.
- [7] Russo A, Franchina T, Ricciardi GR, et al. A decade of EGFR inhibition in EGFR-mutated non small cell lung cancer (NSCLC): old successes and future perspectives [J]. Oncotarget, 2015, 6(29): 26814-26825.
- [8] Ceppi P, Volante M, Saviozzi S, et al. Squamous cell carcinoma of the lung compared with other histotypes shows higher messenger RNA and protein levels for thymidylate synthase [J]. Cancer, 2006, 107(7): 1589-1596.
- [9] Righi L, Papotti MG, Ceppi P, et al. Thymidylate synthase but not excision repair cross-complementation group 1 tumor expression predicts outcome in patients with malignant pleural mesothelioma treated with pemetrexed-based chemotherapy [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(9): 1534-1539.
- [10] Han YI, Wang XB, Xiao N, et al. mRNA expression and clinical significance of ERCC1, BRCA1, RRM1, TYMS and TUBB3 in postoperative patients with non-small cell lung cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(5): 2987-2990.
- [11] Sequist LV, Yang JC, Yamamoto NA, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations [J]. J Clin Oncol, 2013, 31(27): 3327-3334.
- [12] Deng W, Lei YY, Liu SY, et al. Comparing overall survival between first Generation EGFR-TKIs and chemotherapy in lung cancer patients with Del19/L858R [J]. Chin J Cancer Res, 2016, 28(3): 339-347.

(收稿日期: 2017-07-23 修回日期: 2017-09-30)