

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.06.015

# β-tubulin-Ⅲ 基因表达与Ⅱ期非小细胞肺癌患者化疗敏感度的关系

江洪<sup>1</sup>, 周星明<sup>1</sup>, 王小红<sup>2</sup>, 苏丹<sup>3</sup>, 陶开义<sup>1</sup>

## Relationship between Expression Level of β-tubulin-Ⅲ and Sensitivity of Chemotherapy in Patients with Stage Ⅱ Non-small Cell Lung Cancer

JIANG Hong<sup>1</sup>, ZHOU Xingming<sup>1</sup>, WANG Xiaohong<sup>2</sup>, SU Dan<sup>3</sup>, TAO Kaiyi<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Thoracic Tumor Diagnosis (Lung, Esophagus) and Treatment Technology Research Department of Thoracic Surgery, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China, 2. Department of Chemotherapy; 3. Zhejiang Cancer Institute

Corresponding Author: ZHOU Xingming, E-mail: hh110120@126.com

**Abstract: Objective** To explore the relationship between chemotherapy sensitivity and the expression level of β-tubulin-Ⅲ mRNA in patients with stage Ⅱ NSCLC. **Methods** The expression of β-tubulin-Ⅲ mRNA was measured by Quanti-Gene assay. All patients accepted NP chemotherapy, and disease-free survival time (DFS) and overall survival time (OS) was analyzed. **Results** The OS of patients was related with the expression level of β-tubulin-Ⅲ ( $P < 0.01$ ), the DFS was related with the expression level of β-tubulin-Ⅲ and lymph node metastasis ( $P < 0.01$ ). The OS and DFS in patients with lower-expression level of β-tubulin-Ⅲ were longer than those with over-expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of β-tubulin-Ⅲ in patients with stage Ⅱ NSCLC might be a predictive factor for chemotherapy sensitivity and the prognosis, and a reference for agents choose.

**Key words:** Lung cancer; Chemotherapy; β-tubulin-Ⅲ

**摘要:目的** 探讨Ⅱ期非小细胞肺癌(NSCLC)中Ⅲ型β微管蛋白(β-tubulin-Ⅲ)mRNA表达与诺维本+顺铂(NP)方案化疗敏感度的关系。**方法** 单基因定量法检测已手术Ⅱ期NSCLC患者肿瘤组织中β-tubulin-Ⅲ mRNA表达,所有患者行NP方案化疗,并随访患者的无瘤生存时间(DFS)和总体生存率(OS),统计学分析β-tubulin-Ⅲ mRNA表达水平与患者DFS和OS的关系。**结果** 73例患者的OS与β-tubulin-Ⅲ的表达有关( $P < 0.01$ ),患者的DFS与β-tubulin-Ⅲ的表达及淋巴结转移情况有关( $P < 0.01$ )。β-tubulin-Ⅲ低表达者的OS、DFS均高于β-tubulin-Ⅲ高表达者( $P < 0.05$ )。**结论** Ⅱ期NSCLC患者肿瘤组织中β-tubulin-Ⅲ表达水平可能是预测患者预后及化疗敏感度的一个指标,为选择合适化疗药物提供参考。

**关键词:** 肺肿瘤;化疗;β-tubulin-Ⅲ

**中图分类号:** R734.2 **文献标识码:** A

### 0 引言

辅助化疗是 NSCLC 治疗的重要组成部分,2011 年肺癌 NCCN 指南中指出:对于行 R<sub>0</sub> 切除的Ⅱ期非小细胞肺癌,术后需行辅助化疗(一类证据)。化疗方案的选择主要参照病理类型、分期及体能状

态等临床因素。然而,同一种病理类型和分期的 NSCLC 患者对同一种化疗方案的敏感度差异很大。根据分子标志物选择化疗方案是肺癌治疗的未来方向,特异的肿瘤分子标志物是识别患者个体差异的良好途径。研究表明,β微管蛋白Ⅲ(β-tubulin-Ⅲ)的表达与微管蛋白结合类药物化疗的敏感度有关,但结果仍存在争议<sup>[1]</sup>。

因此,本研究筛选出 73 例接受手术且术后病理明确为Ⅱ期非小细胞肺癌患者,术后均给予长春瑞滨联合顺铂辅助化疗,并检测癌组织中 β-tubulin-Ⅲ 基因的 mRNA 表达,随访患者无瘤生存时间和总体生存率,统计学分析基因表达与无瘤生存时间和

收稿日期:2012-12-21;修回日期:2013-02-21

基金项目:浙江省教育厅基金资助课题(2007-01345)

作者单位:1. 310022 杭州,浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室 浙江省肿瘤医院胸外科,2. 化疗科,3. 浙江省肿瘤研究所

通信作者:周星明, E-mail: hh110120@126.com

作者简介:江洪(1972-),男,硕士,副主任医师,主要从事胸部肿瘤的基础及临床研究工作

总体生存率的关系,探讨  $\beta$ -tubulin-III mRNA 表达与化疗药物的相关性,希望能为个体化治疗方案的制定提供依据。

## 1 资料和方法

### 1.1 临床标本及资料收集

所有标本均从浙江省肿瘤医院标本库中筛选(所有入标本库患者均签定知情同意书,医院伦理委员会讨论通过)。术后病理按照国际抗癌联盟(UICC)TNM 分期标准进行分期,共筛选 2007 年 9 月—2010 年 6 月经根治性手术切除的 II 期非小细胞肺癌患者 73 例。提取肿瘤组织约 0.5 cm<sup>3</sup>,做成石蜡标本,用于  $\beta$ -tubulin-III 基因的 mRNA 检测。临床特征如下:年龄  $\leq 60$  岁 55 例、 $> 60$  岁 18 例;肿瘤大小  $\leq 3$  cm 22 例、 $> 3$  cm 51 例;T1a 6 例、T1b 16 例、T2a 26 例、T2b 19 例、T3 6 例;无淋巴结转移 28 例、有淋巴结转移 45 例;高-中分化 53 例、低分化 20 例;腺癌 33 例、鳞癌 36 例、其他病理类型 4 例;II A 期 57 例、II B 期 16 例。

### 1.2 辅助化疗

术后长春瑞滨联合顺铂化疗,顺铂 75 mg/m<sup>2</sup> 分三天给予,静脉滴注,长春瑞滨 25 mg/m<sup>2</sup>,d1、8,静脉滴注,以上方案每 3 周重复。其中 1 例患者因骨转移只进行 2 周期化疗,其余患者均完成 3~4 周期的化疗。

### 1.3 随访资料(无瘤生存时间和总体生存率)的收集

所有患者均通过电话随访,由指定医生完成,每 3 月随访一次。共随访 70 例,失访 3 例,随访率为 95.89%。

### 1.4 $\beta$ -tubulin-III mRNA 检测

mRNA 的检测用单基因定量方法(Quantigene Assay)分别进行,由基因科技(上海)有限公司检测,Affymetrix 公司的 Quanti Gene Plex 2.0,(Affymetrix, CA)试剂来完成。步骤如下:先将 3~5 片石蜡切片样本直接用 200  $\mu$ l 裂解液裂解完全消化后,离心取上清液,与 60  $\mu$ l 反应混合液包括特异的目标基因的 Quanti Gene 2.0 探针序列混合,加入到 capture plate 的反应孔中,在 54  $^{\circ}$ C 条件下过夜混合杂交,然后利用磁力洗去未杂交到微珠上的杂质。接着对捕捉到的 RNA 信号利用 bDNA 技术做级联放大,通过预放大、放大、标记探针,分别在 50  $^{\circ}$ C 的条件下杂交 1 h,每一步杂交后都用洗涤液洗 3 次。最后做 SAPE 标记后利用 Luminex 200 读取基因表达数据。详细的检测过程按 Eastham 等<sup>[2]</sup>描述的方法进行。HPRT1 基因作为质量控制

基因,每个样本均检测待检基因和 HPRT1 基因拷贝数。

### 1.5 统计学方法

采用 Cox 模型进行单因素分析,Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,并经 Log rank 检验,所有资料采用 SPSS 17.0 软件完成。

## 2 结果

### 2.1 患者的 $\beta$ -tubulin-III mRNA 表达水平

患者的  $\beta$ -tubulin-III mRNA 表达经单基因定量测定,结果显示 70 例患者 mRNA 表达均值为 1.250011、中位值为 0.939473、极小值为 0.2893、极大值为 4.9174、方差 1.018。

将结果按照 Eastham 等<sup>[2]</sup>描述的方法进行评判:取中位值 0.939473 为界,结果  $> 0.939473$  为高表达,表达水平  $< 0.939473$  为低表达。

### 2.2 随访结果

在 70 例有随访资料的患者中,19 例在随访期间死亡,3 年生存率为 75.1%,5 年生存率为 56.6%。中位生存时间 68 月(95%CI:45.21~90.79 月),见图 1。

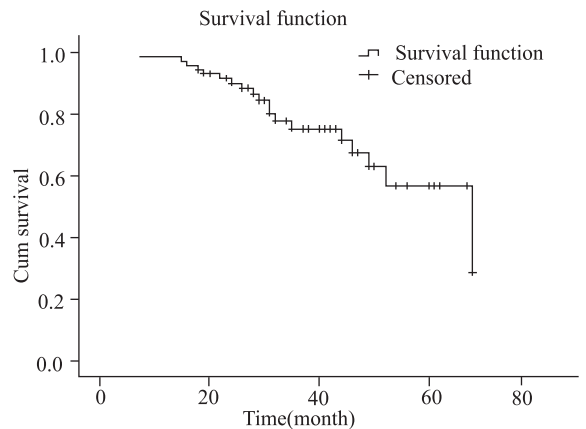


图 1 70 例非小细胞肺癌患者的生存曲线图

Figure 1 Survival curve of 70 NSCLC patients

### 2.3 70 例患者 Cox 模型分析结果

用 Cox 模型分别进行 OS 和 DFS 的单因素分析,发现患者的 OS 与  $\beta$ -tubulin-III 的表达有关;患者的 DFS 与  $\beta$ -tubulin-III 的表达及淋巴结转移有关,见表 1、2。

### 2.4 生存分析结果

用 Kaplan-Meier 法将随访数据绘制成生存曲线,可以发现, $\beta$ -tubulin-III 低表达患者的 OS、DFS 均高于  $\beta$ -tubulin-III 高表达患者,见图 2、3。

## 3 讨论

2006 年《新英格兰医学杂志》发表了肺癌个体

表 1 70 例非小细胞肺癌患者 OS 的单因素 Cox 分析

Table 1 The single factor Cox analysis of OS of 70 NSCLC patients

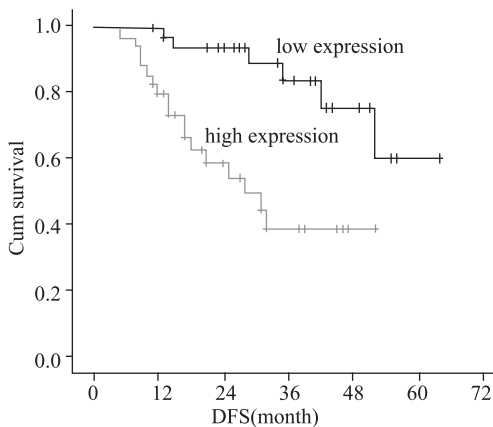
Variables	B	SE	Walsh	df	Sig.	Exp(B)	95%CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
Gender	-0.0606	0.653	0.860	1	0.354	0.546	0.152	1.963
Age	0.564	0.400	1.991	1	0.158	1.758	0.803	3.847
TUBβ3	0.402	0.178	9.032	1	0.003	1.548	1.152	1.992
Pathology	-0.0049	0.401	0.015	1	0.902	0.952	0.434	2.090
Tumor size	0.409	0.301	1.848	1	0.174	1.506	0.835	2.716
Differentiation	0.999	1.038	0.926	1	0.336	2.716	0.355	20.779
LNLM	0.216	0.158	1.855	1	0.173	1.241	0.910	1.693

Note: TUBβ3:β-tubulin-III; LNLM; lymph node metastasis

表 2 70 例非小细胞肺癌患者 DFS 的单因素 Cox 分析

Table 2 The single factor Cox analysis of DFS of 70 NSCLC patients

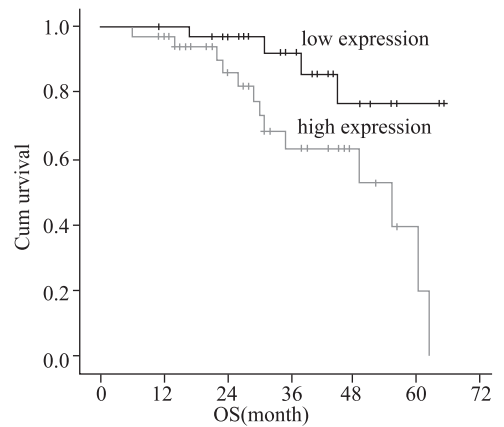
Variables	B	SE	Walsh	df	Sig.	Exp(B)	95%CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
Gender	-0.032	0.506	0.004	1	0.950	0.969	0.359	2.614
Age	0.399	0.317	1.585	1	0.208	1.491	0.801	2.775
TUBβ3	0.423	0.140	9.097	1	0.003	1.526	1.160	2.009
Pathology	0.304	0.354	0.741	1	0.389	1.356	0.678	2.712
Tumor size	0.123	0.218	0.316	1	0.574	1.131	0.737	1.735
Differentiation	1.038	0.741	1.962	1	0.161	2.823	0.661	12.062
LNLM	0.345	0.120	8.191	1	0.004	1.412	1.115	1.788



$\chi^2 = 5.693, P = 0.015$ ; DFS: disease-free survival

图 2 不同 β-tubulin-III 表达患者的 DFS 曲线图

Figure 2 DFS graph of patients with different beta tubulin-III expressions



$\chi^2 = 8.369, P = 0.004$ ; OS: overall survival

图 3 不同 β-tubulin-III 表达患者的 OS 曲线图

Figure 3 OS graph of patients with different beta tubulin-III expressions

化化疗里程碑式的文章<sup>[3]</sup>,认为只有肿瘤核苷酸剪切修复复合体(ERCC1)蛋白低表达者可从辅助化疗中获益。此后以药物基因组学、药物遗传学为基础的个体化化疗引起了医学界的高度重视,化疗敏感度预测和预后的相关因子研究成为焦点。目前已发现核苷酸剪切修复复合体(ERCC1)的5'核酸内切酶、核糖核苷酸还原酶的调节亚基(RRM1)、乳腺癌易感基因家族1(BRCA-1)等因子的表达水平和化疗药物疗效及预后密切相关,并已成为预测个体

化化疗疗效的重要因素<sup>[4+5]</sup>。

研究表明微管蛋白是许多抗肿瘤药物的作用位点,β微管蛋白有7种异构体,编码β-tubulin的基因定位于6p21.3,通过等电聚焦和质谱仪联合检测发现,在7种异构体中只有β-tubulin-III才是微管作用药物耐药的唯一标志物。目前认为抗微管类药物作用机制可能是:紫杉类药物促进微管蛋白聚合,防止解聚,阻止微管动态重组过程,使细胞增殖阻滞于G<sub>2</sub>/M期,引起细胞死亡。长春碱类化疗药主要

与  $\beta$  微管蛋白  $\beta$  亚基结合, 阻断微管二聚体聚合, 破坏有丝分裂, 导致肿瘤细胞凋亡<sup>[6]</sup>。

多项临床研究已经证实:  $\beta$ -III 微管蛋白浓度增高与紫杉醇类药物的敏感度降低相关<sup>[7]</sup>。那么  $\beta$ -tubulin-III 的表达水平与长春碱类药物疗效的关系怎么样呢? 我们的研究结果表明: 在手术切除后经过 NP 方案化疗的 II 期非小细胞肺癌患者,  $\beta$ -tubulin-III mRNA 低表达者 DFS、OS 均高于  $\beta$ -tubulin-III mRNA 高表达者。 $\beta$ -tubulin-III 表达可能是预测 NP 方案化疗敏感度的指标。

但目前的国内外研究结果不一, 甚至相互矛盾。Sève 等<sup>[8]</sup>以 I B~II 期的 NSCLC 患者为研究对象, 发现在行单纯手术治疗的患者中,  $\beta$ -tubulin-III 高表达者, 其无进展生存期和总生存期均短于低表达者; 而在接受术后 NP 方案辅助化疗的患者中, 情况正好相反:  $\beta$ -tubulin-III 高表达者, 其无进展生存期和总生存期均优于低表达者。在 III~IV 期 NSCLC 中, 以免疫组织化学法检测肿瘤组织  $\beta$ -tubulin-III 的表达, 发现其表达程度与长春瑞滨治疗的反应率无关, 但与疾病进展时间有关, 高表达者无进展生存期和总生存期均短于低表达者, 提示高表达者对长春瑞滨耐药<sup>[9]</sup>。Reiman 等<sup>[10]</sup>探讨了 JBR. 10 等 4 个临床试验中 1 149 例已切除非小细胞肺癌的患者预后与  $\beta$ -tubulin-III 表达之间的关系, 发现  $\beta$ -tubulin-III 表达水平可以作为预测患者预后的指标, 但不能作为预测化疗疗效的指标。

为什么会上述不一致的结果呢? 对这种不同结果的解释可能是: (1)  $\beta$ -tubulin-III 表达对早、晚期的 NSCLC 本身就存在着不同的预测结果; (2) 检测的样本、方法和标准的不同: 目前的研究多为晚期病例, 多采用穿刺或纤支镜标本, 用免疫组织化学方法和 PCR 定性方法检测较为多见, 而定量的方法较少见; (3) 样本量的限制; (4) 随访时间的长短。上述因素均有可能是造成结果不同的原因。这也反映了  $\beta$ -tubulin-III 的表达对长春瑞滨的预测作用不如对紫杉类的预测, 还需大样本前瞻性试验的确定<sup>[11]</sup>。因此, 我们正在尝试使用更多的方法、收集更多的样本来检测癌组织中  $\beta$ -tubulin-III 基因的表达水平, 以期获得更加准确的结果。

#### 参考文献:

- [1] Seve P, Dumontet C. Class III beta tubulin expression in non-small cell lung cancer[J]. Rev Mal Respir, 2010, 27(4): 383-6.
- [2] Eastham LL, Mills CN, Niles RM. PPARalpha/gamma expression and activity in mouse and human melanocytes and melanoma cells[J]. Pharm Res, 2008, 25(6): 1327-33.
- [3] Olaussen 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): 983-91.
- [4] Papadaki C, Sfakianaki M, Ioannidis G, et al. ERCC1 and BRAC1 mRNA expression levels in the primary tumor could predict the effectiveness of the second-line cisplatin-based chemotherapy in pretreated patients with metastatic non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(4): 663-71.
- [5] Craig Reynolds, Coleman Obasaju, Michael J, et al. randomized phase III trial of gemcitabine - based chemotherapy with in situ RRM1 and ERCC1 protein levels for response prediction in non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(34): 5808-15.
- [6] Sève P, Reiman T, Dumontet C. The role of  $\beta$  III tubulin in predicting chemoresistance in non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2010, 67(2): 136-43.
- [7] Koh Y, Jang B, Han SW, et al. Expression of class III beta-tubulin correlates with unfavorable survival outcome in patients with resected non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(3): 320-5.
- [8] Sève P, Lai R, Reiman T, et al. Class III beta-tubulin expression and benefit from adjuvant cisplatin/vinorelbine chemotherapy in operable non-small-cell lung cancer: analysis of NCIC JBR. 10[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(3): 994-9.
- [9] Sève P, Isaac S, Trédan O, et al. Expression of class III {beta}-tubulin is predictive of patient outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving vinorelbine-based chemotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(15): 5481-6.
- [10] Reiman T, Lai R, Veillard AS, et al. Cross-validation study of class III beta-tubulin as a predictive marker for benefit from adjuvant chemotherapy in resected non-small-cell lung cancer: analysis of four randomized trials[J]. Ann Oncol, 2012, 23(1): 86-93.
- [11] Stengel C, Newman SP, Leese MP, et al. Class III beta-tubulin expression and in vitro resistance to microtubule targeting agents[J]. Br J Cancer, 2010, 102(2): 316-24.

[编辑: 刘红武; 校对: 安 凤]