

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.02.012

胃癌组织 TSER 多态性与 5-Fu 体外药敏的关系

贺文兴¹, 邓艷云¹, 孙正魁¹, 王艳华¹, 陈文学¹, 刘弘晟²

Correlation between TSER Polymorphism and Sensitivity of Gastric Cancer Tissue to 5-Fluorouracil

HE Wen-xing¹, DENG Jin-yun¹, SUN Zheng-kui¹, Wang Yan-hua¹, CHEN Wen-xue¹, LIU Hong-sheng²
1. Jiangxi Provincial Cancer Hospital, Nanchang 330029, China; 2. Medical Department, Graduate School of Nanchang University

Corresponding Author: DENG Jin-yun, E-mail: jxshwx@126.com

Abstract: Objective To investigate correlation between thymidylate synthase enhancer region (TSER) polymorphism and the antitumor activities of 5-fluorouracil (5-Fu) determined by ATP sensitivity assay *in vitro*. **Methods** The carcinoma cells isolated from fresh gastric tissue in 45 patients were cultured *in vitro*. The sensitivity of these cells to 5-Fu were tested using ATP-TCA method. TSER genotypes were detected by PCR and the correlation between different of TSER genotypes and its chemosensitivity to 5-Fu was analyzed in this study. **Results** In all cases, the frequency distribution of TSER 2R/2R, 2R/3R and 3R/3R genotypes were 6.7%(3/45), 31.1%(14/45) and 62.2%(28/45), respectively. The overall effective rate of 3R/3R group to 5-Fu was 33.3%(14/42). In 2R/2R and 2R/3R genotype group its effective rate to 5-Fu was 56.3%(9/16), which was significantly higher than that of 3R/3R genotype group(19.2%, $P < 0.05$). **Conclusions** The results in the present study suggest that the polymorphism of TSER was associated with the antitumor activities of 5-fluorouracil, indicating that analysis of TSER polymorphisms might be useful to direct 5-fluorouracil-based antitumor chemotherapy.

Key words: Gastric cancer; Thymidylate synthase enhancer region (TSER) polymorphism; 5-fluorouracil; Chemosensitivity assay *in vitro*

摘要:目的 探讨胃癌组织胸苷酸合成酶增强子区(TSER)多态性与 5-Fu 体外药敏的关系。**方法** 对 45 例胃癌患者新鲜标本进行体外肿瘤细胞原代培养,用 ATP-TCA 法检测肿瘤细胞对 5-Fu 的敏感性并用 PCR 法检测肿瘤的 TSER 多态性,分析 TSER 多态性分布频率与体外药敏有效率的关系。**结果** TSER 多态性三种基因型频率分布:2R/2R、2R/3R、3R/3R 基因组分别为 6.7%(3/45)、31.1%(14/45) 和 62.2%(28/45)。5-Fu 总有效率为 33.3%(14/42)。3R/3R 基因组 26 例,有效 5 例,无效 21 例,有效率 19.2%;(2R/2R、2R/3R)基因组 16 例,有效 9 例,无效 7 例,有效率 56.3%。TSER 基因型组之间对 5-Fu 敏感性存在显著差异性($P < 0.05$)。**结论** TSER 多态性对 5-Fu 化疗敏感性可能有关,基因型检测可能有助于预测胃癌组织对 5-Fu 化疗敏感性。

关键词: 胃癌;胸苷酸合成酶增强子区多态性;5-氟尿嘧啶;体外药敏试验

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)02-0126-04

0 引言

抑制胸苷酸合成酶(TS)是 5-Fu 发挥其抗癌活性的途径。5-Fu 进入体内后经过一系列酶促反应,最后转变为其活性代谢产物 5-氟尿嘧啶脱氧核苷

(5-FdUMP),它能与 TS 结合形成等价的三联复合物 TS-FdUMP-CH₂FH₄,影响 dUMP 与 TS 的结合,从而抑制 dTMP 的形成,使 DNA 的合成受限,导致细胞生长受到抑制甚至死亡^[1]。胸苷酸合成酶增强子区(thymidylate synthase enhancer region, TSER)区存在 28bp 串联重复序列多态性,根据串联重复序列数目不同,主要分为含有重复 2 次的为 2R、3 次重复的为 3R。因此,常见的三种基因型为 3R/3R、2R/3R、2R/2R。TSER 多态性影响了 TS 基因 mRNA 的稳定和翻译效率,导致不同基因型 TS 表达效率不同,从而导致癌症患者对化疗药物的

收稿日期:2008-01-23;修回日期:2008-04-30

基金项目:江西省卫生厅科技计划基金资助项目(20071119)

作者单位:1. 330029 南昌,江西省肿瘤医院;2. 南昌大学研究生院医学部

通信作者:邓艷云, E-mail: jxshwx@126.com

作者简介:贺文兴(1974-),男,硕士,主治医师,主要从事肿瘤化疗研究(药物遗传学/基因组学指导下的个体化疗)

敏感性存在差异。ATP-体外药物敏感性检测是体外观察化疗药物与细胞作用最直接的方法。研究两者的相关性,基因型检测有望成为预测肿瘤个体化治疗疗效评估、预后判断的指标。

1 资料和方法

1.1 临床资料

收集 2005 年 9 月~2007 年 11 月期间外科手术的胃癌患者新鲜标本 45 例,所有患者均在术后病理证实为胃癌。所有患者术前均未接受过化、放疗。其中男 29 例,女 16 例。患者年龄 35~71 岁,平均年龄 51 岁。浸润深度,PT1 为 4 例、PT2 为 13 例、PT3 和 PT4 分别为 23 例和 5 例。有淋巴结转移 33 例,无淋巴结转移 12 例。

1.2 标本处理

新鲜标本分为两份,一份装入含有 100 u/ml 的青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 RPMI1640 的离心管中,立即送于 ATP-TCA 法体外药物敏感性检测;另一份放入液氮中,转置 -80 $^{\circ}$ C 冻存以备 PCR 法检测其 TS 基因多态性。

1.3 ATP-TCA 法体外药敏试验和 PCR 法检测其 TS 基因型

1.3.1 ATP-TCA 法体外药敏试验 ATP-TCA 核心试剂盒(德国 DCS),购自深圳达科为生物技术公司;胶原酶 IV、透明质酸酶 V、DNA 酶 I、Ficoll-Hypaque 均购自上海试剂二厂;RPMI1640 干粉购自 GIBCO 公司。按照试剂盒使用说明书操作进行。配制 8000% 血浆峰浓度(peak plasma concentration, PPC)的化疗药物,100% PPC 5-Fu; 22.5 μ g/ml(试剂盒说明书附录);配制细胞解离酶。制备癌细胞悬液:无菌条件下清洗癌组织,清除脂肪,纤维组织,血块及坏死组织,将癌组织充分剪成小碎块,然后加入解离酶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 6 h,将细胞解离液通过 300 目的钢网过滤,1 500 r/min,离心 5 min \times 2,用 RPMI1640 重悬制备成单细胞悬液。Ficoll-Hypaque 梯度分离。肿瘤细胞原代培养癌细胞悬液用完全分析培养基稀释,调整细胞浓度至 2.5×10^5 个/ml;以每孔 0.1 ml 接种至 96 孔培养板内。按 400%、200%、100%、50%、25% 和 12.5% 的血浆峰值浓度,将药物加入培养孔每孔 0.1 ml,每个浓度 3 个平行孔,并设最大抑制(MI)和无药物(MO)对照孔,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 、>95% 湿度下细胞培养箱中孵育 6 d。ATP 提取和发光度测定。DCS 电子数据表自动算出 TGI、AUC、 IC_{50} 、 IC_{90} 和 S. I. 高 AUC,低 IC_{50} 、 IC_{90} 、S. I. 值和高 TGI 值,显示 100% 肿瘤细胞生长抑制,药物的敏感性高。低

AUC,高 IC_{50} 、 IC_{90} 、S. I. 值和低 TGI 值,表示药物的高耐药性。ATP-TCA 结果评估^[2]:强敏感(SS): $IC_{90} < 100\%$ PPC 和 $IC_{50} \leq 25\%$ PPC;中度敏感(IS): $IC_{90} > 100\%$ PPC 和 $IC_{50} \leq 25\%$ PPC。弱敏感(MS): $IC_{90} < 100\%$ PPC 和 $IC_{50} > 25\%$ PPC。耐药(R): $IC_{90} > 100\%$ PPC 和 $IC_{50} > 25\%$ PPC。体外有效 = SS + IS;体外无效 = MS + R。

1.3.2 PCR 法检测其 TS 基因型 提取 DNA 过程:胃癌标本 DNA 的提取,按照试剂盒说明操作进行。DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司,型号为 TIANamp Genomic DNA kit;引物由上海 Generay 公司合成;2 \times Taq PCR MasterMIX 购自 TIANGEN 公司;琼脂糖由西班牙 BIOWEST 公司生产。上游引物 5'-GTGGCTCCTGCGTTTC-CCCC-3',下游引物 5'-GCTCCGAGCCGCCA-CAGGCATGGCGCGG-3'^[3],反应体系为 25 μ l,其中 0.2 μ g DNA 模板,引物各 1 μ l,2 \times MasterMIX 12.5 μ l,加双蒸水至 25 μ l。反应条件:预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min,后续循环 94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,30 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延长 5 min。反应结束后取 5 μ l 反应产物,用 2% 琼脂糖凝胶电泳。胸苷酸合成酶增强子区(TSER)多态性判断标准^[4]:PCR 扩增产物 215 bp(双串联重复系列纯合子)为 2R/2R,243 bp(三串联重复系列纯合子)为 3R/3R,215 bp/243 bp(两者的杂合子)为 2R/3R。基因测序:PCR 产物纯化及 DNA 测序参照试剂盒说明书,核苷酸顺序经 XM2007-410C1 全自动 DNA 测序仪读序。

1.4 统计学方法

统计分析用 SSPS13.0 软件进行。用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验法分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

基因型检测结果:2R/2R、2R/3R、3R/3R 基因型分别为 3 例、14 例和 28 例。体外药敏检测结果:45 例胃癌组织 5-Fu 体外药敏检测,3 例有失败,其中 1 例细胞数少,2 例为培养板污染。体外有效 14 例(33.3%);体外无效 28 例(66.7%)。

42 例标本中,3R/3R 基因型 26 例,有效 5 例,无效 21 例;2R/3R 基因型 13 例,其中有效 7 例,无效 6 例;2R/2R 基因型占 3 例,其中有效 2 例,无效 1 例。3R/3R 基因型组与(2R/2R、2R/3R)基因型组之间对 5-Fu 敏感性差异有统计学意义($P < 0.05$)。

42 例标本中,男性患者标本为 27 例,体外有效率 29.6%;女性患者标本为 15 例,体外有效率 40.0%,高于男性有效率,但差异无统计学意义。患

者年龄范围 35~71 岁,中位年龄 53 岁,以中位年龄为切点分组,53 岁以下患者肿瘤标本组 20 例;53 岁及以上患者肿瘤标本组 22 例 ($P>0.05$)。浸润深度:PT1 + PT2 组体外有效率 37.5%,高于 PT3 + PT4 组有效率 30.8% ($P>0.05$)。有淋巴结转移组 31 例,体外有效率 32.3%;无淋巴结转移组 11 例,体外有效率 36.4% ($P>0.05$),见表 1。本研究中发现性别、年龄、浸润深度、淋巴结转移与 5-Fu 体外药敏无关。

表 1 患者基本情况和 TSER 多态性与 5-Fu 药敏的关系
Tab 1 Analysis of TSER Polymorphism in clinic gastric cancer samples and its sensitivity to 5-fluorouracil

	<i>n</i>	Effective (%)	Ineffective (%)	<i>P</i>
Gender				
Male	27	8(29.6)	19(70.4)	>0.05
Female	15	6(40.0)	9(60.0)	
Age(years)				
<53	20	7(35.0)	13(65.0)	>0.05
≥ 53	22	7(31.8)	15(68.2)	
Tumor stage				
PT1 + PT2	16	6(37.5)	10(62.5)	>0.05
PT3 + PT4	26	8(30.8)	18(69.2)	
LM				
Positive	31	10(32.3)	21(67.7)	>0.05
Negative	11	4(36.4)	7(63.6)	
TSER genotype				
3R/3R	26	5(19.2)	21(80.8)	<0.05
2R/2R,2R/3R	16	9(56.3)	7(43.8)	

LM:Lymphatic metastasis

3 讨论

3.1 TSER 多态频率分布

可能由于遗传背景的多样性和复杂性,不同种族人群中 TS 基因多态分布频率有很大差别。余开焕等^[5]通过 PCR 技术检测 160 例原发性胃癌、结直肠癌患者 TSER 多态性。结果:2R/2R、2R/3R 及 3R/3R,分别为 8%、24%、68%。本研究 TSER 多态性三种基因型分布:2R/2R、2R/3R、3R/3R 基因型分别为 6.7% (3/45)、31.1% (14/45) 和 62.2% (28/45)。与余开焕等^[5]检测 TSER 多态频率分布的结果相差不大。

3.2 体外药敏

ATP-体外药物敏感性检测是体外观察化疗药物与细胞作用最直接的方法,是通过细胞内 ATP 与荧光素-荧光素酶复合物作用产生可测定荧光,检测荧光值计算 ATP 量来反映活细胞数,具有相对敏感、快速、与临床相关性较好的特点。田海梅等^[6]通过 ATP-TCA 研究大肠癌 5-Fu 单药敏感性为

29.1%,认为与临床报道的大肠癌单药有效率 21% 基本相符。本研究胃癌 5-Fu 单药敏感性为 33.3%,与临床报道的胃癌单药有效率 21% 相差不大^[7]。

3.3 胃癌组织 TSER 多态性与 5-Fu 敏感性

基因多态性可引起不同个体药理学及毒理学效果差异。抑制 TS 是 5-Fu 发挥其抗癌活性的途径,故 TS 蛋白高表达时,5-Fu 的敏感性差。三种基因型导致肿瘤细胞中 TS 表达水平不同。在 TS 基因型与蛋白表达关系的研究中,3R/3R 基因型蛋白表达效率通常较 2R/2R、2R/3R 基因型高。Morganti 等^[8]通过 48 例结直肠癌患者研究显示 3R/3R 基因型的癌组织 TS mRNA 表达水平显著高于 2R/2R、2R/3R 基因型。本研究中 3R/3R 基因型组相对 (2R/2R、2R/3R) 基因型组对 5-Fu 敏感性差。Vil-lafranca E 等^[9]研究直肠癌患者结果示:3R/3R 基因型组与 (2R/3R、2R/2R) 基因型组经以 5-Fu 为基础的化疗的降期率分别为 22% 和 60%,表明 (2R/3R、2R/2R) 基因型组化疗降期率较 3R/3R 基因型组要高。(2R/3R、2R/2R) 基因型与 3R/3R 基因型 3 年无病生存率分别为 81% 和 41%。认为 TS 重复序列多态性可作为肿瘤降期的预测指标,可作为 5-Fu 为基础化疗方案疗效预测新手段。因此,药物基因组学是一个有效预测药物和毒性的重要工具;TS 基因多态性能准确、快速、有效地预测氟尿嘧啶类药物的耐药性和毒性^[10]。本研究中 3R/3R 基因型组相对 (2R/2R、2R/3R) 基因型组对 5-Fu 敏感性差,差异有统计学意义 ($P<0.05$),认为 TSER 多态性对 5-Fu 化疗敏感性可能有关,基因型检测可能有助于预测胃癌组织对 5-Fu 化疗敏感性。

本研究仅检测了 TS 基因,而没有考虑胸苷磷酸化酶 (TP) 基因、胸苷激酶 (TK) 基因等因素对 5-Fu 敏感性的影响,体外药敏不能完全反应人体内环境药敏,因而具有一定的局限性。目前国内外对 TS 基因多态性与 5-Fu 敏感性的关系报道也不多,故尚需进行大样本前瞻性随机对照研究,以进一步验证该研究结果,更好地指导治疗。

参考文献:

- [1] 陈新,林文博,施作霖. 胸苷酸合成酶对结肠癌 5-Fu 治疗耐药的影响[J]. 临床与实验病理学杂志,2004,20(4):423-427.
- [2] Kurbacher CM, Cree IA, Bruckner HW, et al. Use of an ex vivo ATP luminescence assay to direct chemotherapy for recurrent ovarian cancer[J]. Anticancer Drugs, 1998, 9(1):51-57.
- [3] Marsh S, Collie-Duguid ES, Li T, et al. Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among caucasian and asian populations[J]. Genomics, 1999, 58: 310-312.
- [4] 董稚明,崔雅静,邝刚,等. 胸苷酸合成酶基因多态性及其蛋白

表达与食管鳞状细胞癌淋巴结转移的关系[J]. 癌症, 2005, 24(10): 1225-1229.

- [5] 余开焕, 王竹平. 原发性胃肠恶性肿瘤胸苷酸合成酶增强子的多态性[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(4): 369-370.
- [6] 田海梅, 李艳芬, 吴健雄, 等. 应用 ATP 生物荧光肿瘤体外药敏检测技术研究大肠癌药敏的异质性[J]. 癌症进展杂志, 2005, 3(5): 436-441.
- [7] 孙燕, 周际昌. 临床肿瘤内科手册[M]. 第 4 版. 人民卫生出版社, 2004: 331.
- [8] Morganti M, Ciantelli M, Giglioni B, et al. Relationships between promoter polymorphisms in the thymidylate synthase gene and mRNA levels in colorectal cancers[J]. Eur J Cancer,

2005, 41(14): 2176-2183.

- [9] Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, et al. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer[J]. J Clin Oncol, 2001, 19(6): 1779-1786.
- [10] Salgado J, Zabalegui N, Gil C, et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes predict response and toxicity to capecitabine-raltitrexid in colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2007, 17(2): 325-328.

[编辑校对: 贺文]

• 简讯 •

《肿瘤防治研究》杂志诚聘审稿专家

《肿瘤防治研究》杂志是由中华人民共和国卫生部主管、中国抗癌协会主办的肿瘤医学学术期刊, 是传播我国肿瘤学领域最新科研成果和学术进展的重要载体, 是外界了解我国肿瘤学领域的一个重要窗口。多年来, 本刊一直以“百花齐放、百家争鸣”为办刊的指导原则, 严格执行同行审稿、编审专家组集体定稿的制度。本刊审稿专家队伍以编委为主体, 由近百位具有较深学术造诣的肿瘤学各专业学者组成, 这支高水平的审稿专家队伍对于《肿瘤防治研究》杂志保持学术权威性和领先地位发挥着重要的作用。

为了进一步提高审稿质量, 加快审稿速度, 提高论文发表时效性, 满足广大作者与读者的热切需求, 本刊决定面向全国公开遴选肿瘤学领域各学科(专业)审稿专家, 使更多有学识、有水平, 并热心期刊工作的优秀专家参与到本刊审稿工作中来, 从而进一步提高本刊学术质量, 更好地发挥《肿瘤防治研究》杂志作为我国肿瘤学领域主流学术期刊应有的作用。凡具备下述条件者, 请和我们联系:

1. 作风正派, 学风严谨, 关心并支持《肿瘤防治研究》杂志的各项工作;
2. 热心审稿工作并对此项工作有一定了解, 有充裕的时间和充沛的精力, 能承诺按时反馈审稿意见;
3. 有较高的学术水平, 较深的学术造诣并取得了一定的学术成就, 熟悉并了解肿瘤学相关领域在国内外的现状和发展趋势;
4. 精于科学研究和论文写作, 特别是近年来在国内外知名学术期刊上发表过多篇学术论文或曾主编出版过学术专著;
5. 具有高级技术职称或博士学位;
6. 有较好的英文水平, 系统掌握统计学知识;
7. 有相对固定的工作单位, 通讯方便、快捷, 懂电脑操作, 能进行网络审稿。

具备以上条件, 并愿意承担《肿瘤防治研究》杂志审稿工作的肿瘤学各学科专家, 请向编辑部索取并填写《肿瘤防治研究杂志审稿专家登记表》, 连同个人简历一份, 通过电子邮件发送到编辑部邮箱(hongwu1222@126.com), 经审查合格后予以确认。

凡本刊审稿专家, 均可享受以下待遇: (1) 您撰写的论文免收审稿费, 一经留用, 优先发表; (2) 您推荐的论文, 其推荐意见可作为定稿讨论时的参考; (3) 每期赠送杂志一册; (4) 对审稿工作酌致酬劳。

通信地址: 武汉武昌卓刀泉南路 116 号《肿瘤防治研究》编辑部

邮政编码: 430079

电话/传真: 027-87670126

联系人: 刘红武

E-mail: hongwu1222@126.com

网址: <http://www.zlfzyj.com>