

ERCC-1、survivin 表达与含顺铂方案一线化疗治疗晚期肺腺癌患者疗效和预后关系

陈小兵^{1,2}, 李 宁², 罗素霞¹, 曾军杰²

Relationship between Expression of ERCC-1, survivin and both Efficiency and Prognosis of Cisplatin-contained First-line Chemotherapy in Advanced Lung Adenocarcinoma

CHEN Xiao-bing^{1,2}, LI Ning², LUO Su-xia¹, ZENG Jun-jie²

1. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, He'nan Province Tumor Hospital, Zhengzhou 450008, China; 2. He'nan Province Tumor Hospital

Abstract: Objective To analyze the relationship between expression of ERCC-1 (excision repair cross complement-1), survivin and sensitivity and prognosis of cisplatin-contained regimens first-line chemotherapy in advanced lung adenocarcinoma. **Methods** IHC was used to evaluate expression of ERCC-1 and survivin in 80 pathologically confirmed advanced lung adenocarcinoma patients given cisplatin-contained regimens first-line chemotherapy. The response rate and survival time were analyzed according to the expression of ERCC-1 and survivin. **Results** Only 77 patients could be reviewed by IHC staining. The expression rates of ERCC-1 and survivin were 33.77% and 53.25% respectively. The worse response rate and shorter TTP/PFS could be identified in ERCC-1 positive group. Patients with positive expression of survivin had worse survival time. **Conclusion** Expression of ERCC-1 may be a molecular marker of cisplatin-contained regimens first-line chemotherapy resistance and poor prognosis in advanced lung adenocarcinoma patients.

收稿日期:2007-09-13;修回日期:2008-02-03
 基金项目:河南省科技攻关计划资助项目(200538)
 作者单位:1. 450008 郑州大学第一附属医院;2. 河南省肿瘤医院内科
 通讯作者:罗素霞, E-mail: luosxrm@163.com
 作者简介:陈小兵(1973-),男,博士在读,主治医师,主要从事肺癌、乳腺癌及消化道癌的个体化化疗、肿瘤耐药和生物治疗研究

参考文献:

- [1] Chen KH, Wang FQ, Zhang JH, et al. Cloning and expression of a novel partial cDNA related to hypertension[J]. Clin Med J, 1998, 111(4): 383-384.
- [2] Chen KH, Guo X, Ma D, et al. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders[J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(11): 872-883.
- [3] Frina AR, Tacconelli A, Cappabianca L, et al. Inhibition of human MDA-MB-231 breast cancer cell invasion by matrix metalloproteinase 3 involves degradation of plasminogen[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(18): 4476-4483.
- [4] Hofmann WK, Takeuchi S, Xie D, et al. Frequent loss of heterozygosity in the region of D1 S450 at 1p36.2 in myelodysplastic syndromes[J]. Leuk Res, 2001, 25(5): 855-858.
- [5] Hogarty MD, Maris JM, White PS, et al. Analysis of genomic imprinting at 1p35-36 in neuroblastoma[J]. Med Pediatr Oncol, 2001, 36(32): 52-55.
- [6] 李志新. 癌增殖相关蛋白 1(CPRP1)重组腺病毒对不同肿瘤细胞系抑制效应的体内外研究[A]. 北京大学在职人员申请硕士学位论文[C]. 2003, 38-55.
- [7] Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, et al. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies[J]. Int J Dev Biol, 2004, 48(3): 411-424.
- [8] 张莉, 秦北宁, 任爱琴, 等. 大肠癌患者基质分解素-1 基因表达增强[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 9(10): 1210-1213.
- [9] 于秀文, 程慧, 王静芬. 大肠癌组织中 MMP-3 的表达及其临床意义[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13(1): 45-47.
- [10] 向志刚, 杨竹林. 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子与恶性肿瘤[J]. 国外医学 临床生物化学与检验学分册[J]. 2004, 25(3): 263-268.
- [11] Lebeau A, Nerlich AG, Sauer U, et al. Tissue distribution of major matrix metalloproteinases and their transcripts in human breast carcinomas [J]. Anticancer Res, 1999, 19(5): 4257-4264.
- [12] Remacle AG, Noel A, Duggan C, et al. Assay of matrix metalloproteinases types 1, 2, 3 and 9 in breast cancer [J]. Bri J Can, 1998, 77(6): 926-931.
- [13] Nakopoulou L, Giannopoulou J, Gakiopoulou H, et al. Matrix metalloproteinase-1 and -3 in breast cancer: correlation with progesterone receptors and other clinico-pathologic features [J]. Hum Pathol, 1999, 30(33): 436-442.
- [14] Brummer O, Athar S, Riethdorf L, et al. Matrix-metalloproteinase, 1, 2, 3, their tissue inhibitors, 1, 2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridization study [J]. Virchows Arch, 1999, 435(3): 566-573.
- [15] Sternlicht MD, Lochter A, Sympon CJ, et al. The stromal proteinase MMP-3/stromelysin-1 promotes mammary tumorigenesis[J]. Cell, 1999, 98(5): 137-146.

[编辑校对:安 凤]

Simiary expression of survivin predicates poor prognosis for patients with advanced lung adenocarcinoma.

Key words: Lung adenocarcinoma; ERCC-1; survivin; Cisplatin

摘要:目的 分析晚期肺腺癌患者组织中错配切除修复蛋白(excision repair cross complement-1, ERCC-1)、凋亡抑制蛋白 survivin 表达同含顺铂方案一线化疗疗效和生存时间之间的关系。方法 收集 1999 年 1 月~2005 年 12 月在本院接受含顺铂方案一线化疗的、病理确诊为晚期肺腺癌患者的蜡块 80 例。采用免疫组化方法检测 ERCC-1、survivin 的表达,并同化疗疗效和生存时间进行比较。结果 共有 77 例可以评价染色,ERCC-1 阳性率为 33.77%,survivin 阳性率为 53.25%。ERCC-1 阳性表达患者一线化疗有效率低,并且 TTP 和 PFS 较短,survivin 阳性表达患者生存较差。结论 ERCC-1 阳性同晚期肺腺癌含顺铂方案一线化疗耐药和预后不良相关,survivin 阳性表达提示晚期肺腺癌预后不良。

关键词:肺腺癌; ERCC-1; survivin; 顺铂

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A

文章编号: 1000-8578(2008)05-0335-04

0 引言

非小细胞肺癌是引起肿瘤相关死亡的主要原因之一,晚期患者如不治疗,中位生存时间仅约 4~6 个月^[1]。肺腺癌是我国常见的一类非小细胞肺癌,因早期诊断困难,多数患者确诊时已到晚期,失去手术根治机会,使化疗成为其主要治疗手段,但化疗耐药的存在使其总治愈率仍低于 15%^[2]。因此,寻找化疗耐药的分子指标,实现晚期患者的个体化化疗成为研究热点。以顺铂为基础的联合化疗是晚期肺腺癌的一线化疗方案,顺铂主要是与肿瘤细胞的 DNA 结合,形成顺铂-DNA 加合产物,导致 DNA 链间交联或者链内交联,引起 DNA 损伤^[3]。顺铂耐药有多种机制,其中 DNA 损伤修复能力增强是重要分子基础^[4]。核酸切除修复(nucleotide excision repair,NER)基因是最常见的修复基因。而在 NER 家族中,ERCC-1(excision repair cross complement-1)又是非常重要的成员,有研究认为 ERCC-1 可能是切除修复的关键酶^[5]。survivin 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis,IAP)家族的新成员,可参与细胞凋亡和细胞分裂双相调控,在已检测的多种人类肿瘤中均高表达^[6],但在肺腺癌中的表达目前报道甚少。本研究利用免疫组化方法研究晚期肺腺癌 ERCC-1、survivin 蛋白表达与含顺铂一线化疗方案疗效及预后的关系,以进一步指导临床工作。

1 资料和方法

1.1 临床资料

收集 1999 年 1 月~2005 年 12 月在本院使用含顺铂一线化疗方案治疗的、病理确诊为晚期肺腺癌

患者的蜡块共 80 例。其中男性患者 58 名,女性患者 22 名。年龄范围为 22~81 岁,中位年龄为 55 岁。45 名患者确诊为 I 期患者,35 例为 II 期患者(其中 A 期 11 例, B 期 24 例)。所有患者均接受至少两个周期的含顺铂方案一线化疗(37 例采用 TP 方案:Taxol 175mg/m² + DDP 80mg/m²;27 例采用 NP 方案:NVB 25 mg/m²,d1、8, + DDP 80 mg/m²;16 例采用 GP 方案:Gemcitabine 1.0 g/m²,d1、8, + DDP 80 mg/m²),疗效根据 WHO 标准确定。每两个疗程复查 CT 评价疗效,达到完全缓解(CR)或部分缓解(PR)为化疗有效,稳定(SD)或进展(PD)为化疗无效。有效患者完成至少 4 个疗程化疗,无效患者换用其他方案或者采用其他治疗方式。从停止治疗后 2 个月开始随访,每隔 2 个月重复一次,直到患者死亡。随访 1~33 个月,中位随访 18 个月。

1.2 免疫组化试验方法

采用免疫组化方法检测 ERCC-1、survivin 蛋白在肺腺癌患者蜡块中的表达。ERCC-1 单抗购自 neomarker 公司;survivin 单抗和二抗试剂均购自 DA KO 公司。具体操作如下:石蜡切片脱蜡,3% H₂O₂ 室温下孵育 10 min,以消除内源性过氧化物酶活性。蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min,正常血清工作液封闭,室温孵育 10 min,倾去血清,加稀释后 ERCC-1 一抗(1:100)和 survivin 一抗(1:100),4℃ 过夜,PBS 冲洗,滴加二抗,室温下孵育 1 h,PBS 冲洗,滴加辣根酶标记的工作液,室温下孵育 30 min。PBS 冲洗三次,使用 DAB 染色,封片。

1.3 免疫组化结果判断

由资深病理科医生在不明临床资料的情况下进行标本的染色程度判断。ERCC-1 在细胞核中出现棕黄色颗粒为阳性染色,survivin 在细胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性。随机选取 10 个视野从染色强度和染色百分比进行评估:胞核染色阳性细胞比例 < 10% 为阴性,10%~50% 为阳性,> 50% 为强阳性。

1.4 统计学方法

使用统计学软件 SPSS10.0 进行统计分析,生存资料和时间的比较采用 Kaplan-meier 方法分析。两组间比较采用卡方检验。1 年生存率的计算采用 Life table 方法。

2 结果

2.1 ERCC-1 和 survivin 表达同临床特征之间的关系

80 例晚期肺腺癌患者中共有 77 例可进行免疫

组化染色分析,其余 3 例因组织过少,不能判读结果,77 例患者中有 26 例(33.77%)患者 ERCC-1 染色阳性,41 例(53.25%)患者 survivin 染色阳性,见图 1。不同临床分期,不同性别的 ERCC-1 和 survivin 的表达没有差异,见表 1。

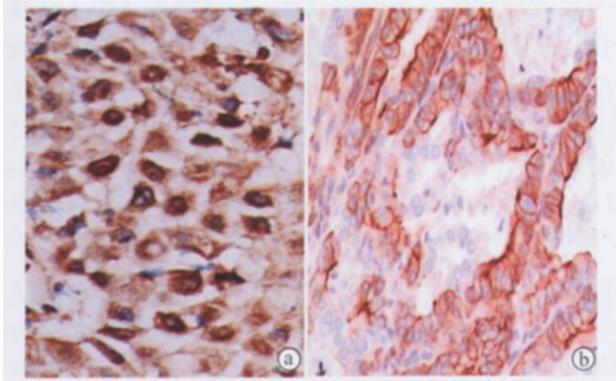


图 1 ERCC-1(a) 和 survivin(b) 阳性染色

Fig 1 Positive picture of ERCC-1(a) and survivin(b)

表 1 晚期肺腺癌患者组织中 ERCC-1、survivin 表达同临床特征间关系

Tab 1 Relationship of expression of ERCC-1 and survivin in lung adenocarcinoma patients with clinical characteristics

Tumor markers	Clinical stage			Sex		P value
	P value	Male	Female	P value		
ERCC-1						
positive	14	12	0.118	21	5	0.335
negative	18	33		36	15	
survivin						
positive	20	21	0.170	32	9	0.390
negative	12	24		25	11	

2.2 ERCC-1 和 survivin 表达同化疗疗效及生存时间关系

ERCC-1 阳性组化疗有效率为 26.92% (7/26), 阴性组有效率为 54.90% (28/51), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.437, P = 0.02$)。survivin 阳性组化疗有效率为

36.59% (15/41), 阴性组有效率为 52.77% (19/36), 差异没有统计学意义 ($\chi^2 = 2.038, P = 0.153$)。在 77 名患者中,两种蛋白均为阳性的有 14 例,其化疗有效率为 28.57%;均为阴性的有 23 例,有效率为 39.1%。一种指标为阳性的有 40 例,有效率为 55%。但是差异无统计学意义 ($\chi^2 = 3.451, P = 0.178$)。对两种指标行 TTP (time to progression), PFS (free progression survival) 和生存时间的分析发现,ERCC-1 阳性表达的患者 TTP、PFS 和中位生存时间(15 个月)均比阴性表达的患者(中位生存时间 16 个月)短,并且差异有统计学意义。而 survivin 阳性表达的患者虽然 TTP、PFS 和中位生存时间(14 个月)较阴性患者(15.5 个月)短,但是并没有统计学意义,见图 2~4。进一步分析两个指标共表达同生存的关系发现,虽然全部阳性表达患者生存时间(中位生存时间 15 个月)比全部阴性患者生存时间(中位生存时间 20 个月)短,但是统计学也无意义 ($P = 0.1307$)。

3 讨论

含顺铂方案目前用于多种实体肿瘤的治疗,而顺铂耐药也是临床上十分常见的问题。越来越多的研究资料表明 ERCC-1 基因同顺铂耐药密切相关。李体远等^[7]研究发现,通过重组质粒转染细胞,将反义 ERCC-1 探针导入卵巢癌细胞内,可以使细胞内的 ERCC-1 mRNA 水平明显下降,达到封闭 ERCC-1 蛋白表达的目的。经不同浓度的顺铂处理,转染反义 ERCC-1 基因后,细胞对顺铂造成的 DNA 损伤修复能力明显下降。同样,在大肠癌中也有人报道 ERCC-1 基因的多态性同顺铂治疗相关,这种多态性也是和 ERCC-1 基因的低表达相关^[8]。Rosell 通过定量 PCR 分析了肺癌石蜡组织中 ERCC-1 mRNA 表达,回顾性分析发现其高表达者对顺铂耐药,并且生存率低于低表达者^[4]。Olaussen 在 2006 年发表的文章研究了

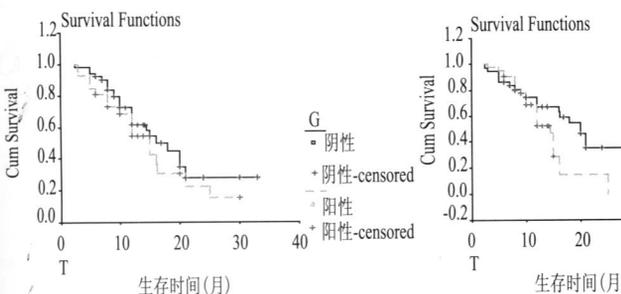


图 2 ERCC-1 阳性组和阴性组生存曲线比较

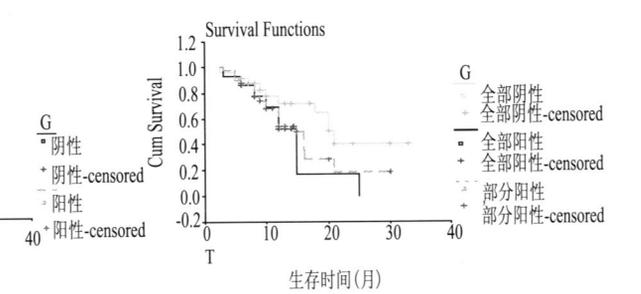


图 3 survivin 阳性组和阴性组生存曲线比较

图 4 ERCC-1 和 survivin 全部阳性表达、部分阳性表达和全部阴性表达之间的生存比较

Fig 2 Survival curves of ERCC-1 positive team and ERCC-1 negative team

Fig 3 Survival curves of survivin positive team and negative team

Fig 4 Survival curves of both positive, both negative and partial positive of ERCC-1 and survivin

761 名手术治疗的肺癌患者 ERCC-1 的阳性表达率为 44% , 并且辅助化疗能够明显延长 ERCC-1 阴性患者的生存时间 , 但是对于阳性病人则无效^[8]。

目前对 ERCC-1 的研究多数集中在 mRNA 水平上 , 吴一龙等^[8]研究发现 ERCC-1 mRNA 水平高表达的患者化疗的有效率明显低于低表达患者 (37.7% vs 56.6%) , 差异有统计学意义。而在生存时间和 TTP 的比较时 , 虽然低表达患者的生存时间相对较长 , 但是却没有任何统计学意义。本研究使用免疫组化的方法探讨晚期肺腺癌 ERCC-1 蛋白水平上表达程度对含顺铂方案一线化疗疗效的影响。结果显示 , ERCC-1 阳性患者的化疗有效率明显低于阴性患者 , 差异有统计学意义。同时 , 阴性表达的患者还具有较长的 TTP 和 PFS。但是 , ERCC-1 蛋白的表达情况同患者的长期生存却没有相关性。本结果同以往文献报道基本一致。

survivin 是新近发现的 IAP 家族成员 , 在人类常见肿瘤中均有表达 , 而不表达于正常成人组织 , 能抑制 caspase 活性而发挥抗凋亡作用^[9]。由于 survivin 特异表达在 G₂/M 期并与细胞有丝分裂装置相互作用 , 可能具有选择性的细胞分裂抗凋亡作用 , 以使转化细胞通过有丝分裂进行恶变^[10]。本研究晚期肺腺癌 survivin 的表达率为 53.25% , 同文献水平接近。同时进一步分析还发现 , 虽然 survivin 的表达同患者的疗效、TTP 等没有相关性 , 但是阴性表达的患者有更好的生存 , 并且差异有统计学意义。

本研究在 77 名患者中 , 共有 14 名患者同时阳性表达两种蛋白 , 23 名患者不表达任何蛋白 , 但是进一步的分析显示蛋白的表达同患者的生存时间和化疗疗效并不明显相关。虽然 P 值并没有统计学意义 , 但是全部蛋白阳性表达的患者生存时间比全部阴性的患者生存时间相对较长 , 可能因为本研究入组患者有限 , 影响研究结果。

总之 , 晚期肺腺癌 ERCC-1 蛋白表达同含顺铂一线化疗方案的疗效密切相关 , 阳性表达的患者化疗有效率较低 , 维持时间较短 , 但是对患者的生存时期没有影响。由于缺乏非含铂化疗方案的对比 , 本

研究 ERCC-1 蛋白阳性表达化疗有效率除了与顺铂耐药有关外 , 也可能是 NVB 或 Taxol 或 GEM 耐药的问题。survivin 蛋白的阳性表达虽不影响含顺铂方案的化疗疗效 , 但是阴性表达的患者有更好的生存时间。因此 , 有必要进行大型前瞻性研究以及与非含铂化疗方案的对比研究 , 以确定 ERCC-1 蛋白、survivin 蛋白在晚期肺腺癌化疗中的作用 , 从而实现肺腺癌患者的个体化治疗。

参考文献 :

- [1] Rosell R, Felip E. Predicting response to paclitaxel/ carboplatin-based therapy in non-small lung cancer [J]. *Semin Oncol*, 2001, 28(4 Suppl 14): 37-44.
- [2] Hirsch FR, Franklin WA, Veve R, et al. HER2/ neu expression in malignant lung tumors [J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(1 suppl 4): 51-58.
- [3] 袁凡, 缪小平, 张雪梅, 等. 核苷酸切除修复系统基因多态性与晚期肺小细胞肺癌患者顺铂药物敏感性关系 [J]. *癌症*, 2005, 24(12): 1510-1513.
- [4] 林莉, 刘晓晴, 宋三泰. DNA 损伤修复与顺铂耐药研究进展 [J]. *中国肿瘤*, 2006, 15(1): 29-31.
- [5] Yang LY, Li L, Jiang H, et al. Expression of ERCC-1 antisense RNA abrogates gemcitabine-mediated cytotoxic synergism with cisplatin in human colon tumor cells defective in mismatch repair but proficient in nucleotide excision repair [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(3): 773-781.
- [6] Falleni M, Pellegrini C, Marchetti A, et al. Survivin gene expression in early stage non small cell lung cancer [J]. *J Pathol*, 2003, 200(5): 620-626.
- [7] 李体远, Yu JJ, Reed E. 封闭 ERCC-1 基因表达对卵巢癌细胞耐药的影响 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2004, 11(2): 92-95.
- [8] Olausson, KA, Dunant A, Fourret P, et al. DNA repair by ERCC-1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy [J]. *N Eng J M*, 2006, 355(10): 983-991.
- [9] 吴一龙. 核苷酸切除修复系统基因表达水平与化疗药物耐药相关性的系列研究 [J]. *循证医学*, 2006, 6(1): 2-6.
- [10] Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, et al. Expression of Survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy [J]. *Int J Cancer*, 2001, 95(2): 92-95.
- [11] Kamihira S, Yamada Y, Hirakata Y, et al. Aberrant expression of caspase cascade regulatory genes in adult T cell leukemia: Survivin is an important determinant for prognosis [J]. *Br J Haematol*, 2001(1): 63-69.

[编辑: 贺文; 校对: 安凤]