

高海拔地区 ERCC1 和 TSER 基因多态性与奥沙利铂联合希罗达治疗进展期胃癌的相关性研究

祁玉娟 才保加 杨应忠 陈海军 格日力

摘要 目的:探讨高海拔地区切除修复交叉互补基因1(excision repair cross-complementation group 1, ERCC1)、胸苷酸合成酶增强子(thymidylate synthase enhancer region, TSER)的基因多态性,及与奥沙利铂联合希罗达治疗进展期胃癌的相关性研究。方法:122例进展期胃癌患者入组并行奥沙利铂联合希罗达化疗,110例患者按要求完成治疗并随访。PCR-RFLP检测基因位点的多态性,分析基因多态性与化疗客观反应率(response rate, RR)和无进展生存(progression-free survival, PFS)的关系。结果:ERCC1 118C/T位点的多态性与奥沙利铂联合希罗达治疗后的RR、PFS期无相关性($P=0.221, P=0.186$)。TSER基因为2R/2R、2R/3R型患者的RR和PFS期优于3R/3R型($P=0.037, P=0.033$)。结论:高海拔地区,奥沙利铂联合希罗达治疗进展期胃癌中ERCC1基因多态性与RR、PFS期无相关性,TSER基因多态性与RR、PFS期具有一定的相关性。

关键词 进展期胃癌 单核苷酸多态性 奥沙利铂 希罗达

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.18.009

Correlation between Genetic Polymorphisms of Excision Repair Cross-Complementation Group 1 and Thymidylate Synthase Enhancer Region and Chemotherapeutic Effects of Oxaliplatin / Xeloda on Advanced Gastric Cancer in High-Altitude Localities

Yujuan Qi^{1,2}, Baojia Cai², Yingzhong Yang¹, Haijun Chen², Rili Ge¹

Correspondence to: Rili Ge; E-mail: geriligao@hotmail.com

¹Research Center for High Altitude Medical Sciences, Qinghai University School of Medicine, ²Affiliated Hospital, Qinghai University, Xining 810001, China

Abstract Objective: To investigate the value of genetic polymorphisms of excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) and thymidylate synthase enhancer region (TSER) in predicting the prognosis of advanced gastric cancer patients treated with oxaliplatin/ Xeloda chemotherapy. **Methods:** A total of 122 patients with advanced gastric cancer were enrolled in this study, of which 110 were eligible for analysis. All patients repeated received oxaliplatin / Xeloda chemotherapy every two cycles. PCR - RFLP method was used for analyzing the ERCC1 and TSER polymorphism. Then the relationships among the genetic polymorphisms and response rate (RR), progression free survival (PFS) time were analyzed. **Results:** No significant correlation in PFS and RR was observed between patients with the C / C or C / T genotype in ERCC1 118C / T and those with the T/T genotype ($P = 0.221, P = 0.186$). Meanwhile, a higher response rate and longer PFS was observed in patients with the 2R2R or 2R3R genotype in TSER compared to those with the 3R3R genotype ($P = 0.037, P = 0.033$). **Conclusion:** The genetic polymorphism of ERCC1 118C / T is not significantly correlated with PFS and RR in predicting the prognosis of advanced gastric cancer patients who underwent oxaliplatin /Xeloda chemotherapy. Conversely, the genetic polymorphism of TSER has a certain correlation with this therapy in high-altitude localities.

Keywords Advanced gastric cancer, Single nucleotide polymorphism, Oxaliplatin, Xeloda

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,确诊时多为中晚期,术后复发率高,5年生存率为20%左右。目前为止,铂类及5-FU为治疗胃癌的基本用药。奥沙利铂(L-OHP)是第3代铂类抗癌药,与DNA链上的G共价结合形成链间交联,阻断DNA的复制及转录。正常细胞中存在一些修复体系可以将受损的DNA进行修复,其中核苷酸切除修复系统(NER)是一种主要的DNA修复系统,ERCC1是核苷酸切除修

复(NER)途径中一种重要的酶,能及时有效地修复损伤的DNA,其活性高低直接影响铂类药物的疗效。5-FU单药有效率仅20%左右,胸苷酸合成酶(thymidylate synthase, TS)是核酸及5-FU体内代谢通路的关键酶,其表达水平与肿瘤进展、5-FU为基础的化疗敏感性以及预后有关^[1]。青海省(西宁市海拔2 295 m)的胃癌死亡率居全国之首,发病率高,发病年龄趋于年轻化。本研究探讨高海拔地区进展期胃癌ERCC1

作者单位:①青海大学医学院高原医学研究中心(西宁市810001);②青海大学附属医院

通信作者:格日力 geriligao@hotmail.com

及TSER多态性与奥沙利铂联合希罗达疗效的相关性。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2009年1月至2011年1月,选取青海大学附属医院经病理学检查确诊的进展期胃癌(包括初治和复治)122例进行研究。所有病例均有CT、B超及MRI证实的可测量肿瘤病灶。其中2例基因型未能成功获得,3例不能按规定评估疗效,5例失访,2例因不良反应等原因未完成规定方案治疗。最终110例患者符合标准,进行统计学分析。110例患者中,男性72例(65.5%),女性38例(34.5%);年龄<55岁49例(44.5%),≥55岁61例(55.5%);体力评价采用美国东部协作肿瘤组(Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG)评分标准分为:0分67例(60.9%),1、2分43例(39.1%);病理类型大部分为腺癌,中高分化41例(37.3%),低分化62例(56.4%),其他7例(6.3%)。所有患者均系长期居住高海拔地区(海拔2 200 m左右)。

1.2 方法

1.2.1 化疗方案和疗效评价 所有患者均采用奥沙利铂联合希罗达方案治疗。奥沙利铂130 mg/m², d1静脉滴注;希罗达1 000 mg/m², bid口服,连续使用14 d,每21天为1个周期。疗效评价按照实体瘤的疗效评价标准(response evaluation criteria in solid tumors, RECIST),每2个周期评价疗效1次,若出现可能为病情进展的临床表现可提前评价疗效。

1.2.2 ERCC1、TSER基因型测定 使用聚合酶链-限制性片段长度多态性(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)法。所有患者治疗前抽静脉血2 mL,置乙二胺四乙酸钠抗凝管, QIAamp DNA提取试剂盒提取DNA,引物由上海Invitrogen公司合成, ERCC1上游引物为5'-GCAGAGCTCACCT-GAGGAAC-3',下游引物为5'-GAGGTGCAAGAAGAGGTGGA-3',产物大小208 bp; TSER上游引物为5'-GTGGCTCCTGCGTTTCCCCC-3',下游引物为5'-CCAAGCTTGGCTCCGAGCCGGCCACAGGCATGGCGCGG-3',产物大小242 bp。2×Taq PCR Master MIX 购自TIANGEN公司,琼脂糖由西班牙BIOWEST公司生产。PCR反应体系25 μL,2 μL DNA模板,上下游引物各1 μL,2×Taq DNA聚合酶12.5 μL,加双蒸水至25 μL。ERCC1反应条件:预变性95℃ 2 min,后续循环96℃ 20 s,64℃ 30 s,72℃ 30 s,35个循环后,72℃延长7 min。反应结束PCR产物用BsrD1限制性内切酶(New England BioLabs公司)60℃孵育16 h,2.5%琼脂糖凝胶电泳。TSER反应条件:预变性96℃ 2 min,

后续循环96℃ 20 s,62℃ 30 s,72℃ 30 s,30个循环后,72℃延长5 min。反应结束后PCR产物为5 μL,用2.5%琼脂糖凝胶电泳。

1.3 统计学方法

采用SPSS 13.0软件进行统计分析,基因分布情况经Hardy-Weinberg遗传平衡定律检验。基因多态性与RR的相关性用Fisher精确检验。生存分析采用Kaplan-Meier法,各因素水平之间的比较采用Log-rank法,Cox回归模型分析预后相关因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ERCC1、TSER基因型分布及遗传平衡检验

ERCC1 118C/T多态性判断标准: ERCC1的C/C型,酶切产物片段大小为208 bp; C/T型,产物片段大小为208、128、80 bp; T/T型,产物片段大小为128、80 bp(图1)。TSER多态性判断标准:TSER PCR扩增产物片段大小215 bp的双串联重复系列纯合子为2R/2R型,产物片段大小245 bp的三串联重复系列纯合子为3R/3R型,产物片段大小215、245 bp两者的杂合子为2R/3R型(图2)。

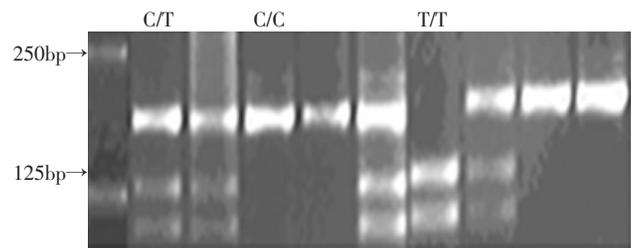


图1 ERCC1 118C/T多态性

Figure 1 Results of polymorphisms of ERCC1 118C/T

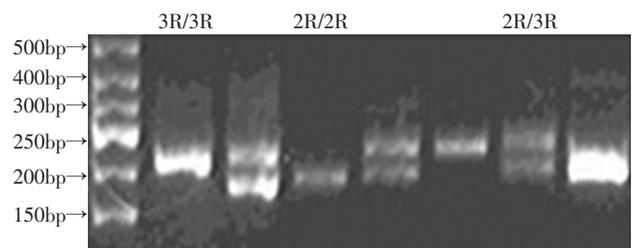


图2 TSER多态性

Figure 2 Results of polymorphisms of TSER

110例进展期胃癌患者ERCC1基因频率分别为:C/C型51.8% (57/110), C/T型41.8% (46/110), T/T型6.4% (7/110)。TSER基因2R/2R, 2R/3R和3R/3R型分别为8.2% (9/110), 29.1% (32/110)和62.7% (69/110)。经Hardy-Weinberg遗传平衡定律检验,差异无统计学意义($P > 0.05$),该样本基因分布达到了遗传平衡,能够代表中国一般人群基因分布情况。

2.2 ERCC1和TSER基因型与临床特征的关系

ERCC1 118C/T 基因型与进展期胃癌临床特征如:年龄、性别、组织学类型及分级、淋巴结转移及 TSER 多态性均无相关性(表1)。

表1 高海拔地区110例进展期胃癌临床特征与 ERCC1 118C/T 基因型关系

Table 1 Correlation between ERCC1 118C/T genotypes and clinical features in 110 patients with advanced gastric cancer in high-altitude areas

临床特征	C/C(%)	C/T 或 T/T(%)	P
全部患者	57(51.8)	53(48.2)	
年龄(岁)			
<55	26(45.6)	23(43.4)	0.815
≥55	31(54.4)	30(56.6)	
性别			
男	37(64.9)	35(66.0)	0.901
女	20(35.1)	18(34.0)	
行为状态评分(分)			
0	35(61.4)	32(60.4)	0.912
1、2	22(38.6)	21(39.6)	
N分期			
N ₀₋₁	10(17.5)	11(20.8)	0.669
N ₂₋₃	47(82.5)	42(79.2)	
组织学分级			
高分化	2(3.5)	1(1.9)	0.396
中分化	19(33.3)	19(35.8)	
低分化	32(56.2)	30(56.6)	
无具体分型	4(7.0)	3(5.7)	
组织学类型			
腺癌	41(71.9)	41(77.3)	0.442
黏液癌	7(12.3)	5(9.4)	
印戒细胞癌	5(8.8)	4(7.6)	
其他	4(7.0)	3(5.7)	
TSER 多态性			
2R/2R	5(8.8)	4(7.5)	0.096
2R/3R	16(28.1)	16(30.2)	
3R/3R	36(63.1)	33(62.3)	

表2 110例进展期胃癌 ERCC1、TSER 基因多态性与化疗疗效的相关性

Table 2 Correlation of ERCC1 118C/T and TSER genotypes with the response rates to chemotherapy in 110 case of advanced gastric cancer

化疗疗效	C/C(%)	C/T 或 T/T(%)	P	3R/3R(%)	2R/2R 或 2R/3R(%)	P
所有患者	57(51.8)	53(48.2)		69(62.7)	41(37.3)	
OR (CR + PR)	27(47.4)	19(35.9)	0.221	20(29.0)	20(48.8)	0.037
CR	2(3.5)	1(1.9)		1(1.5)	2(4.9)	
PR	25(43.9)	18(34.0)		19(27.5)	18(43.9)	
SD	20(35.1)	23(43.4)		32(46.4)	14(34.1)	
PD	10(17.5)	11(20.7)		17(24.6)	7(17.1)	

2.3 ERCC1 和 TSER 基因型与化疗疗效的关系

全部110例患者均完成2个周期以上化疗,进行疗效评价并4周后确认疗效。110例患者 ERCC1 118C/T 分布中因 T/T 基因型理论频数较小(6.4%),将其与性质类似的 C/T 合并,C/C、C/T+T/T 基因型化疗有效率分别为47.4%、35.9%,不同的基因型与化疗疗效之间无显著性差异($P>0.05$,表2)。TSER 分布结果中因 2R/2R 组理论频数亦较小(8.2%),将其并入性质类似的 2R/3R 组进行统计;2R/2R+2R/3R、3R/3R 两组化疗有效率分别为48.8%、29.0%,结果显示差异有统计学意义($P<0.05$,表2)。分析 RR 和基因型及其他可能影响疗效的因素:年龄、性别、ECOG 体力评分、淋巴结转移和分化程度等之间的关系,采用 χ^2 检验,结果提示仅淋巴结转移对 RR 差异有统计学意义($P<0.05$)。

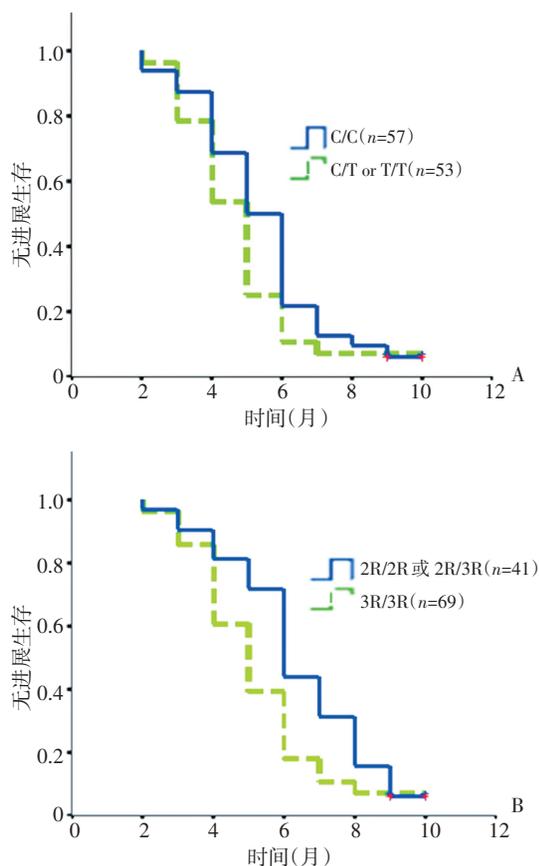
2.4 ERCC1 118C/T、TSER 基因型与化疗 PFS 期的相关性

2.4.1 ERCC1 118C/T 基因型与 PSF 期的相关性

2009年1月至2011年1月对完成化疗方案的患者进行15个月的随访,将至少含有1个T碱基的等位基因型合并(C/T+T/T),其中位PFS期为5.1个月,与纯合基因型C/C中位PFS期5.9个月相比,Log-rank 检验差异无统计学意义($\chi^2=1.75, P=0.186$)。Cox 比例回归模型将年龄、性别、淋巴结转移、分化程度、ECOG 评分等可能影响的因素进行多步骤校正后发现,ERCC1 仍然与 PFS 期无显著相关性(OR=0.452, $P=0.167$,图3A)。

2.4.2 TSER 基因型与 PFS 期的相关性

TSER 基因型中 2R/2R+2R/3R 患者的中位 PFS 期为 6.8 个月,与 3R/3R 基因型中位 PFS 期 5.4 个月相比,Log-rank 检验差异有统计学意义($\chi^2=4.53, P=0.033$)。Cox 比例回归模型将年龄、性别、淋巴结转移、分化程度、ECOG 评分等可能影响的因素进行多步骤校正后发现,TSER 仍然与 PFS 期有相关性(OR=0.317, $P=0.021$,图3B)。



A: ERCC1 不同基因型; B: TSER 不同基因型

图3 高海拔地区110例不同基因型进展期胃癌患者PFS曲线

Figure 3 Relationship between the genetic polymorphism of ERCC1 and TSER with progression-free survival time

3 讨论

奥沙利铂为第3代铂类抗癌药,与顺铂(DDP)及卡铂(CBP)的作用位点一致,但其形成的铂-DNA加合物体积更大,更能有效地抑制DNA合成。ERCC1基因能与修复复合体的其他成员,组成一个蛋白质复合物,在DNA聚合酶的作用下合成完好如初的核苷酸双链。ERCC1基因缺陷的个体对DNA的修复有致命缺陷^[2]。Kim等^[3]研究表明L-OHP/5-FU治疗效果与ERCC1表达差异无统计学意义($P=0.768$)。Chang等^[4]的研究发现进展期大肠癌疗效与ERCC1的118位密码子多态性显著相关。Wei等^[5]研究表明,在晚期胃癌化疗中,ERCC1蛋白阴性或mRNA低表达的患者中位总生存时间较长,缓解率RR较高,但ERCC1 118基因型与疾病预后无明显相关。梁军等^[6]在晚期大肠癌化疗的研究表明,ERCC1基因型与TTP明显相关($P<0.01$),奥沙利铂对携带CC型患者治疗疗效较好。本研究中,ERCC1 118C/T不同的基因型与化疗疗效及PFS期之间无相关性,考虑可能与胃癌和结肠癌的不同生物学特性相关。Yun等^[7]研究表明,在进展期胃癌中一线接受铂类为基础的化疗中ERCC1阴性表达较阳性表达者治疗反应率

高,但差异无统计学意义,两者的1年生存率相似(61%和70%)。

希罗达为新一代口服5-FU制剂,具有高效、方便等特点。5-FU作用靶点是TS酶,TS基因的5'非翻译区的有一个独特的含有28个碱基对的衔接重复序列,起增强TS基因转录的作用,增强子区域的基因多态性使得TS的表达水平高低不一^[8],导致癌症患者对化疗药物的敏感性存在差异。

余开焕等^[9]用PCR技术检测160例胃癌、结肠直肠癌患者TSER基因型频率分布,结果与本研究TSER多态性结果近似。Villafranca等^[10]研究发现结肠直肠癌患者2R/3R、2R/2R基因型的化疗降期较3R/3R基因型高,表明晚期结肠直肠癌患者TSER多态性与5-FU为基础方案疗效可能存在相关性。但也有相反的研究报道,Lecomte等^[11]对90例大肠癌研究表明,5'-UTR和3'-UTR多态性与5-FU疗效和生存率无关。Jeung等^[12]对进展期胃癌研究表明,OPRT mRNA的高表达和TS mRNA低表达者PFS($P=0.024$)及OS($P=0.007$)的延长差异有统计学意义。本研究2R/3R、2R/2R组较3R/3R组化疗有效率高($P<0.05$),PFS期延长。表明本地区晚期胃癌患者TSER多态性与5-FU为基础方案疗效可能存在相关性。

本研究结果显示,未因海拔差异导致ERCC1、TSER基因型频率分布及疗效与平原地区不一致,但需扩大样本及行不同民族分层,并通过探讨mRNA表达和蛋白水平的关系,获取总生存期的随访数据,为研究结果的可靠性提供更多的依据,对判断ERCC1、TSER基因多态性与生存期之间的相关性具有价值和意义。

总之,通过检测晚期胃癌患者ERCC1 118C/T和TSER的多态性,结合患者的疗效情况,分析基因多态性与化疗近期疗效及无进展生存期之间的关系,筛选预测胃癌化疗疗效差异的基因型,为晚期胃癌化疗方案的选择提供一定的实验依据。

参考文献

- 1 Kawakami K, Graziano F, Watanabe G, et al. Prognostic role of thymidylate synthase polymorphisms in gastric cancer patients treated with surgery and adjuvant chemotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11 (10): 3778-3783.
- 2 Jaspers NG, Raams A, Silengo MC, et al. First reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe developmental failure[J]. Am J Hum Genet, 2007, 80(3):457-466.
- 3 Kim SH, Kwon HC, Oh SY, et al. Prognostic value of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase pi for 5-FU/oxaliplatin chemotherapy in advanced colorectal cancer[J]. Am J Clin Oncol, 2009, 32(1): 38-43.