文章编号:1000-5404(2009)12-1201-04

论著

人非小细胞肺癌与外周血淋巴细胞表达ERCC1的相关性研究

郝 萍,赵伟鹏,刁鑫伟,王卫东,关华军,胡义德,陈正堂 (第三军医大学新桥医院全军肿瘤研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨切除修复交叉互补基因1(excision repair cross-complementation group 1, ERCC1)在人非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer NSCLC)癌组织和外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL)中的表达及其相关性,以期建立临床实用简便的肿瘤学指标。**方法** 采用间接二步法免疫荧光化学染色检测47例Ⅱ期、Ⅲ期NSCLC患者癌组织和PBL中ERCC1的表达及健康人PBL中ERCC1的表达。**结果** ERCC1在癌组织、NSCLC患者PBL和健康人PBL中的表达分别为53.19%(25/47)、48.94%(23/47)和20%(4/20),其中癌组织的ERCC1表达与NSCLC患者PBL的表达呈正相关,20例健康人PBL的ERCC1表达阳性率显著低于NSCLC患者。ERCC1的表达与临床病理类型无关。**结论** 检测NSCLC患者PBL的ERCC1表达可间接反应癌组织的ERCC1表达状况。

关键词: 切除修复交叉互补基因1;非小细胞肺癌;外周血淋巴细胞
中图法分类号: R331.144;R730.43;R734.2 **文献标识码:** A

ERCC1 expression in peripheral blood lymphocytes and non-small cell lung cancer

HAO Ping, ZHAO Wei-peng, DIAO Xin-wei, WANG Wei-dong, GUAN Huai-jun, HU Yi-de, CHENG Zheng-tang
(Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the correlation of the expression of excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) with non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues and peripheral blood lymphocytes (PBLs). Methods ERCC1 expressions in specimens and PBLs from 47 patients with Stage II and III NSCLC and healthy PBLs were detected with double immunofluorescence staining. Results The positive expression rates of ERCC1 were 53.19%, 48.94%, and 20% in carcinoma tissues, PBLs of NSCLC, and PBLs of healthy people, respectively. The expression rate of ERCC1 in carcinoma tissues was higher than that in PBLs of healthy people ($P<0.05$) and positively correlated with that in PBLs of the patients. Conclusion The expression of ERCC1 in PBLs of NSCLC patients can indirectly represent ERCC1 expression in carcinoma tissues.

Key words: excision repair cross-complementation group 1; non-small cell lung cancer; peripheral blood lymphocyte

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,化疗是其主要治疗手段之一。但有部分患者对化疗无效,而化疗结束后发现无效为时已晚。因此,在化疗前对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织进行相关基因检测可以使化疗药物的应用更个体化,更具科学性和合理性。但是,临床上存在大量因各种原因不能获得肺部肿瘤组织的患者,难以进行针对性治疗。因此,寻找一种较易获得的外周血细胞代替NSCLC细胞检测耐药相关蛋白具有重要的临床应用价值和意义。顺铂是NSCLC辅助化疗中常用的药物,研究表明,切除修复交叉互补基因1(excision repair cross-complementation group 1, ERCC1)在顺铂耐受中起重要作用[1]。为探讨人NSCLC肿瘤组织与外周血淋巴细胞表达ERCC1的相关性,本研究拟检测NSCLC患者手术标本与外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL)ERCC1的基因蛋白表达,以期建立临床实用的肿瘤学指标。

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 研究对象 2008年6-12月本院和大坪医院住院手术治疗的NSCLC患者47例,所有患者术前均经组织病理或细胞学确诊,未接受过放化疗。病理类型鳞癌21例,腺癌24例,

作者简介:郝 萍,女,云南省通海县人,博士研究生,主治医师,主要从事肺癌研究和肿瘤介入治疗方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68774626, E-mail:haoping833@hotmail.com
通信作者:陈正堂,电话:(023)68755626
收稿日期:2009-03-20;修回日期:2009-04-02

肺泡细胞癌 2 例。患者男性 33 例,女性 14 例。年龄 42 ~ 73 岁,中位年龄 55 岁。TNM 分期采用国际抗癌联盟(UICC)1997 年修订的分期标准,其中Ⅱ期 20 例,$Ⅲ_A$期 27 例。

1.1.2 试剂 ERCC1 驴抗羊单克隆抗体、羊抗小鼠 IgG/cy3 均购于 Sigma 公司。淋巴细胞分离液购自中国医学科学院生物工程研究所。激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)型号为 LEICATCSSP5。

1.2 方法

1.2.1 PBL 分离与涂片 手术前 1 d 晨起空腹抽取静脉血 4 ml(肝素抗凝),采用密度梯度离心法分离 PBL,室温下加入等体积淋巴细胞分离液中,2 000 r /min 离心 30 min,吸取中间乳白色淋巴细胞层, PBS 4 ml 洗涤,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,然后用 PBS 制备细胞悬液,将细胞浓度调至 1×10^6/L,取 50 μl 细胞悬液滴在预先用多聚赖氨酸包被的载玻片上,待风干后 -20 ℃保存待测。同时收集 20 例健康献血员的血液作正常对照(年龄 22 ~ 38 岁)。

1.2.2 间接二步法免疫荧光组织化学染色 将患者新鲜癌组织修剪成大小 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 大小,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h,再于 30% 蔗糖溶液中脱水过夜,恒冷切片机连续切片,厚度约 8 μm。第 1 天:0.01 mol/L PBS 漂洗,正常羊血清封闭 30 min,加入 ERCC1 抗体(1∶100), 37 ℃孵育 1 h 后 4 ℃过夜;第 2 天: 0.01 mol/L PBS 漂洗,加荧光二抗 IgG/cy3 (1∶100), 37 ℃孵育 1 h, PBS 漂洗, 羊血清封闭 30 min,加 DAPI(1∶1 000)复染细胞核,PBS 漂洗,缓冲甘油封片;其中用 PBS 代替一抗作为阴性对照,激光扫描共聚焦显微镜观察染色结果。

1.2.3 PBL 免疫荧光化学染色 细胞涂片置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 20 min,方法同免疫荧光组织化学染色。

1.2.4 结果判断 激光共聚焦显微镜下观察,胞核呈红色荧光为阳性细胞。计算 1 000 个肿瘤细胞中阳性细胞数。参照 Wachters 等[2]的方法来分析免疫组化 ERCC1 的表达水平,即:不表达或阳性细胞数 <10% 为阴性表达(-);视野中阳性细胞 >10% 为阳性表达(+)。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 13. 0 统计软件对计数资料进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 ERCC1 在细胞内的分布

cy3 标记呈红色荧光,ERCC1 主要呈细胞核染色,在细胞核内均匀分布,一些肿瘤细胞的胞质中也有表达,集中于核膜周围。见图 1。

2.2 NSCLC 癌组织和 PBL 的 ERCC1 表达

NSCLC 癌组织、PBL 和健康人的 PBL 的 ERCC1 阳性率分别为 53.19%、48.94% 和 20%,其中癌组织与 NSCLC 患者 PBL 的 ERCC1 阳性表达无显著性差异(癌组织和 PBL 的 ERCC1 阳性率比较 $P = 0.837$)。NSCLC 患者癌组织和 PBL 的 ERCC1 表达阳性率均高于健康人(癌组织、PBL 和健康人的 PBL 的 ERCC1 阳性率比较 $P = 0.016$, $P = 0.032$)。

2.3 NSCLC 癌组织与 PBL 表达 ERCC1 的相关性

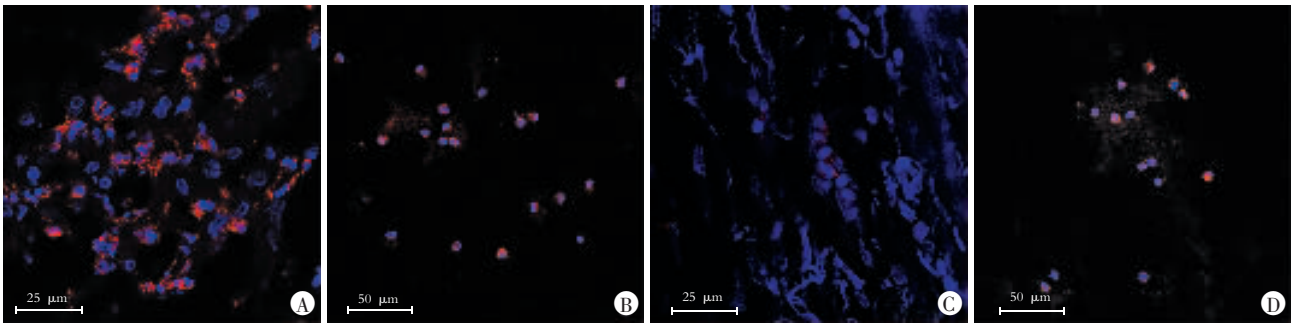
NSCLC 癌组织和 PBL 表达 ERCC1 均为阳性者 21 例,均为阴性者 20 例;NSCLC 癌组织表达 ERCC1 阳性而 PBL 表达阴性者 4 例;NSCLC 癌组织表达 ERCC1 阴性而 PBL 表达阳性者 2 例。经统计学分析, NSCLC 癌组织与 PBL 表达 ERCC1 呈显著一致性(Spearman orrelation = 0.748, Kappa = 0.745, $P < 0.01$)。

2.4 ERCC-1 表达与非小细胞肺癌组织学类型的关系

47 例非小细胞肺癌中,ERCC-1 在鳞癌、腺癌及支气管肺泡细胞癌的阳性表达率分别为 61.9%, 45.83%, 50%。ERCC1 表达与病理类型未见明显关系(鳞癌与腺癌 ERCC-1 阳性表达率比较 $P = 0.373$,鳞癌、腺癌与支气管肺泡细胞癌 ERCC-1 阳性表达率比较 $P = 1.000$, $P = 1.000$)。

3 讨论

顺铂是 NSCLC 辅助化疗中常用的药物,核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)能力与铂类药物的耐药密切相关[3]。顺铂进入细胞后与 DNA 结合形成 DNA 链内交联、链间交联、DNA 蛋白质交联。形成的铂-DNA 加合物导致链内和链间的交链,引起 DNA 分子结构断裂,螺旋体结构破坏,从而导致 DNA 损伤,细胞凋亡[4]。而这些 DNA 损伤主要是通过 NER 途径进行修复的。NER 途径是顺铂化疗药物间



A:肺鳞癌中 ERCC1 阳性表达;B:肺鳞癌患者 PBL 中 ERCC1 阳性表达;C:肺腺癌中 ERCC1 阳性表达;D:肺腺癌患者 PBL 中 ERCC1 阳性表达;红色荧光代表 ERCC1

图 1 激光共聚焦显微镜观察 ERCC1 在肺癌组织和 PBL 中的表达

接耐药或敏感的关键途径。ERCC1 蛋白在 NER 通路中对于识别和去除 Pt-DNA 加合物、修复 DNA 链间交链、参与 DNA 再合成过程至关重要[5],ERCC1 与 DNA 修复酶缺乏互补基因 F 形成二聚体,该二聚体是一个特异性的连接 5′端的核酸内切酶,具有损伤识别和切除 5′端的双重作用,这一复合物在 DNA 损伤切除中是必须的。当 NER 完成,DNA 被修复并恢复正常螺旋形态。ERCC1 不足时,损伤 DNA 不能被修复,被改变的 DNA 不能复制和完成正常功能,以致细胞死亡。ERCC1 基因缺陷的个体对 DNA 的修复有致命缺陷[6]。由于 DNA 损伤的识别/切除是限速步骤,起主导作用的 ERCC1 限速酶的功能活性的高低可反映整个 NER 修复活性的水平。ERCC1 基因定位于人类染色体 19q13.2-13.3,编码产物为 297 个氨基酸的蛋白质。ERCC1 基因表达与肺癌的发生以及化疗抵抗均有较密切的关系。一些回顾性分析研究表明, ERCC1 mRNA 表达与晚期卵巢癌、结直肠癌、食管癌等的铂类药物化疗抵抗密切相关[7-9]。Ceppi 等[10]应用实时 RT-PCR 方法对 70 例晚期 NSCLC 患者纤维支气管镜下细针穿刺活检标本的 ERCC1 mRNA 表达进行了检测并结合顺铂化疗及生存状况进行了分析,认为 ERCC1 阴性患者较 ERCC1 阳性患者应用顺铂化疗有较长的生存期,ERCC1 可能成为 NSCLC 应用顺铂化疗后生存相关的独立预测指标。

肺癌耐药的检测常规采用病理标本,但肺癌患者就诊时大多已处于中晚期,已经失去手术切除的机会。临床通常经纤支镜或经皮肺穿刺获取肺癌肿瘤组织进行诊断,但上述操作为有创检查,过多取材可能导致出血、气胸、血胸等并发症,也易引起肿瘤种植转移,而外周血细胞取材方便,可以动态观察耐药情况。Yang 等[11]对 22 例头颈部鳞癌患者同时测定了患者外周血淋巴细胞和肿瘤组织的 ERCC1 mRNA 水平,发现两者之间存在显著正相关($P<0.01$)。Warnecke-Eberz 等[9]分析了食管癌患者肿瘤组织和正常上皮的 ERCC1 mRNA 表达水平,发现两者数值在相似的范围,外周血淋巴细胞 ERCC1 表达可间接反映肿瘤细胞对铂类化疗药物的耐受程度。因此,检测外周血淋巴细胞 ERCC1 表达可了解肿瘤组织标本耐药情况,指导临床制定合理的化疗方案。但上述研究均是从分子水平探讨 ERCC1 与铂类药物化疗耐药的关系,缺乏体内蛋白质水平的研究,而蛋白质水平决定基因最后的效应,对临床的指导意义也更大。

一般认为晚期肺癌患者 ERCC1 高表达,增加了对铂类药物所致的 DNA 损伤的修复能力,导致癌细胞对铂类制剂耐药,从而导致化疗有效率下降,继而化疗失败[12]。Olaussen 等[13]对参加 IALC 临床试验(the International Adjuvant Lung Cancer Trial)的 761 例肺癌患者的肿瘤标本通过免疫组化分析进行 ERCC1 表达的回顾性评价,发现相对于 ERCC1 低水平未接受化疗和 ERCC1 高水平接受化疗的患者,接受铂为主的化疗的 ERCC1 低水平患者统计学上有显著的生存获益。Cobo 等[14]首先利用 ERCC1 mRNA 水平来指导 NSCLC 患者化疗的前瞻性随机试验,444 例ⅢB期、Ⅳ期 NSCLC 患者,随机分为对照组给予标准的 DDP/多西他塞化疗,基因型组 ERCC1 高水平者给予不含铂化合物的健择/多西他塞化疗,ERCC1 低水平者接受者 DDP/多西他塞化疗。试验组患者(基因型指导)尽管无进展生存和总生存率无显著差异,但其反应率与对照组患者相比在统计学上有显著差异。

本研究从蛋白质水平分析了 ERCC1 基因蛋白在 NSCLC 癌组织和 PBL 表达情况,显示 NSCLC 癌组织与 PBL 的 ERCC1 表达呈显著正相关($P<0.001$);47 例 NSCLC 患者癌组织与 PBL 表达 ERCC1 均阳性者 44.68%, NSCLC 患者癌组织和 PBL 的 ERCC1 表达阳性率均高于健康人(癌组织、PBL 和健康人的 PBL 的 ERCC1 阳性率比较 $P=0.016$, $P=0.032$);ERCC1 表达与病理类型未见明显关系(鳞癌与腺癌 ERCC-1 阳性表达率比较 $P=0.373$,鳞癌、腺癌与支气管肺泡细胞癌 ERCC-1 阳性表达率比较 $P=1.000$, $P=1.000$),与周彩存等[15]的报道均有不同,原因不祥,考虑与患者样本少有关。我们将增加研究样本数,进一步研究 ERCC1 与病理类型的关系。NSCLC 患者 PBL 的 ERCC1 表达率与癌组织一致,具有较好的相关性。因此,检测 NSCLC 患者 PBL 中 ERCC1 的表达,有助于间接反映 NSCLC 癌组织 ERCC1 的表达,提示可以用 PBL 来预测 NSCLC 癌组织对铂类药物的敏感性,指导 NSCLC 患者个体化化疗。

参考文献:

[1] Altaha R, Liang X, Yu J J, *et al*. Excision repair cross complementing-group 1: gene expression and platinum resistance[J]. Int J Mol Med, 2004, 14(6): 959-970.

[2] Wachters F M, Wong L S, TimensW, *et al*. ERCC1, hRad51, and BRCA1 protein expression in relation to tumour response and survival of stage Ⅲ/Ⅳ NSCLC patients treated with chemotherapy[J]. Lung Cancer, 2005, 50(2): 211-219.

[3] Sarries C, Haura E B, Roig B, *et al*. Pharmacogenomic strategies for developing customized chemotherapy in non-small cell lung cancer[J]. Pharmacogenomics, 2002, 3(6): 763-780.

[4] Rabik C A, Dolan M E. Molecular mechanisms of resistance and toxic-

ity associated with platinating agents[J]. Cancer Treat Rev, 2007, 33(1): 9-23.
[5] Niedernhofer L J, Odijk H, Budzowska M, *et al*. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(13): 5776-5787.
[6] Jaspers N G, Raams A, Silengo M C, *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.
[7] Reed E, Dabholkar M, Thornton K, *et al*. Evidence for in the appearance of mRNAs of nucleotide excision repair genes, in human ovarian cancer tissues[J]. Oncol Rep, 2000, 7(5): 1123-1128.
[8] Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, *et al*. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy[J]. J Clin Oncol, 2001, 19(5): 4298-4304.
[9] Warnecke-Eberz U, Metzger R, Miyazono F, *et al*. High specificity of quantitative excision repair cross-complementing 1 messenger RNA expression for prediction of minor histopathological response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(11): 3794-3799.
[10] Ceppi P, Volante M, Novello S, *et al*. ERCC1 and RRM1 gene expressions but not EGFR are predictive of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine[J]. Ann Oncol, 2006, 17(12): 1818-1825.
[11] Yang M, Kim W H, Choi Y, *et al*. Effects of ERCC1 expression in peripheral blood on the risk of head and neck cancer[J]. Eur J Cancer Prev, 2006, 15(3): 269-273.
[12] Rosell R, Taron M, Alberola V, *et al*. Genetic testing for chemotherapy in non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2003, 41(Suppl 1): S97-S102.
[13] Olaussen K A, 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): 983-991.
[14] Cobo M, Isla D, Massuti B, *et al*. Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase Ⅲ trial in non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(19): 2747-2754.
[15] 周彩存, 徐 妍, 苏春霞, 等. ERCC1在非小细胞肺癌中表达及其临床意义[J]. 中国癌症杂志, 2006, 16(8): 622-625.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)12-1204-01

经颞下入路治疗中后颅窝三叉神经鞘瘤3例

李 多,孟 辉,冯 华 (第三军医大学西南医院神经外科,全军神经系统疾病微创诊治专科中心,重庆 400038)

三叉神经鞘瘤(trigeminal neurinomas,TN)为颅内少见良性肿瘤,因其位于颅底,且可以向后颅窝发展,形成跨中后颅窝的哑铃状肿瘤,手术入路多、难度大、并发症较多,但如能手术全切,患者可获治愈[1]。我科自2007年10月至2008年6月以来收治3例中后颅窝TN患者,采用颞下入路手术治疗后效果良好,现总结报告如下。

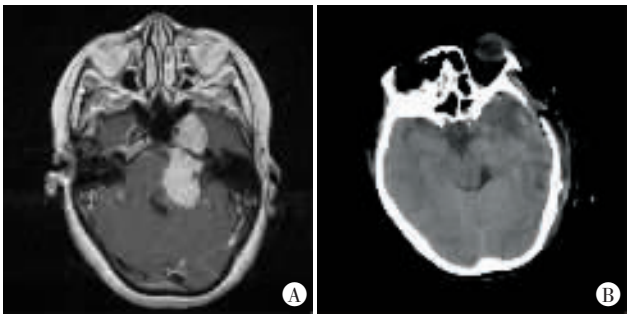
1 资料与方法

1.1 临床资料

本组3例患者中,男性1例,女性2例,年龄42~52岁,平均46.6岁。病程:2个月至11年,平均45.8个月。3例均有头痛表现,2例首发症状为三叉神经损害的症状和体征,其中1例表现为三叉神经分布区的面部牙槽麻木,1例表现为同侧麻木、疼痛、咀嚼无力、颞肌萎缩。

1.2 影像学检查与分型

经CT检查,2例岩尖骨质破坏,内听道无扩大。行MRI检查,肿瘤表现为中后颅窝不规则异常信号,T_1加权呈低信号,T_2加权呈稍高混杂信号,增强后明显强化,最大径6.84 cm×4.20 cm(图1A)。根据Gwak等[2]分型方法将其分为5型:M型(中颅窝)、P型(后颅窝)、Mp型(中颅窝肿瘤直径是后颅窝肿瘤直径的2倍以上)、M=P型(中、后颅窝肿瘤体积大致相当)、Pm型(后颅窝肿瘤直径是中颅窝肿瘤直径的2倍以上)。本组中M型1例,Mp型2例。2例Mp型向内侵犯海绵窦和颈内动脉,1例肿瘤内可见囊变,3例均无三叉神经鞘瘤家族史。



A:术前增强MRI表现,见肿瘤明显强化,其内侧侵犯海绵窦及颈内动脉;B:术后复查CT表现见肿瘤全切

图1 中后颅窗三叉神经鞘瘤的影像表现

作者简介:李 多,男,重庆市綦江县人,主治医师,主要从事颅脑创伤方面的研究,现在重庆市綦江县人民医院脑外科工作。电话:(023)48621172,E-mail:qj.ld1978@163.com
通信作者:冯 华,E-mail:fenghua8888@yahoo.com.cn
收稿日期:2008-09-25;修回日期:2008-10-25

(下转1208页)