短篇论著

文章编号:1000-5404(2014)02-0184-03

非小细胞肺癌 ERCC1 C118T 多态性与 EGFR 突变的相关性

肖 何[1],王 阁[1],杨镇洲[1],张 旭[2],赵保健[2] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心[1];100087 北京,解放军空军总医院分子病理中心[2])

[摘要] **目的** 探讨晚期非小细胞肺癌外周血表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)激活突变与切除修复交叉互补基因1(excision repair cross-complementing gene 1,ERCC1) C118T 多态性相关性。**方法** 分别利用变性高效液相色谱法和直接测序法分析 EGFR 激活突变和 ERCC1 C118T 密码子多态性,分析 ERCC1 118 C/C 基因型在 EGFR 野生型和突变型群体中比例差异。**结果** 收集大坪医院肿瘤中心 69 例晚期非小细胞肺癌病例。ERCC1 118 C/C 基因型在 EGFR 突变组中比率略高于野生型组(61.5% *vs* 51.8%, $P=0.525$)。EGFR 突变组中 ERCC1 118 C/C 比率高于野生型组($OR=1.490$, 95% CI: 0.434~5.118, $P=0.527$),差异无统计学意义。**结论** 外周血 EGFR 突变与 ERCC1 C118T 密码子多态性无关。

[关键词] 表皮生长因子受体;切除修复交叉互补基因1;非小细胞肺癌;化疗;单核苷酸多态性
[中图法分类号] R394.3;R730.23;R734.2 [文献标志码] A

IPASS 临床实验(Iressa Pan-Asia Study)显示了在一线治疗中,卡铂/紫杉醇联合用药在表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因突变的患者中客观缓解率为47.3%,而在 EGFR 野生型患者中为23.5%[1]。有研究[2]发现晚期非小细胞肺癌血浆游离 DNA 中 EGFR 突变型患者对一线化疗敏感。这些结果均提示 EGFR 突变可能与铂类-DNA 加合物修复基因切除修复交叉互补基因1(excision repair cross-complementing gene 1, ERCC1)存在相关性。国内研究[3-4]报道了 EGFR 突变与瘤内 ERCC1 mRNA 表达的关系,探讨 EGFR 突变型患者对化疗敏感的原因。同时,越来越多证据表明 ERCC1 C118T 密码子多态性与铂类药物敏感性相关[5-7]。本研究通过检测外周血血浆游离 DNA EGFR 19 外显子和21 外显子激活突变与单核细胞 ERCC1 基因 C118T 多态性,为 EGFR 突变患者化疗缓解率较高找寻原因。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集2011年6月到2013年5月在第三军医大学大坪医院肿瘤中心经病理学证实的非小细胞肺癌住院患者资料69例。

1.2 EGFR 突变和 ERCC1 C118T 多态性分析

在患者知情同意情况下,于治疗前抽取 EDTA 抗凝静脉血5 mL,于 800×g 离心 10 min,分离血浆和血细胞,分别利用 QIAamp DNA Mini Kit 和 Biomed 全血基因组 DNA 快速提取试剂盒分别提取血浆游离 DNA 和有核细胞基因组 DNA。EGFR 19 缺失突变和21 外显子 L858R 置换突变采用酶切突变富集和变性高效液相色谱法(denaturing performance liquid chromatography, DHPLC)分析[8]。检测到这两个突变的病例定为 EGFR突变组,未检测到的为野生型组。ERCC1 118C/T 前向和反向引物为:5′-AGGAGGGCCCTGTGGTTATC-3′、5′-AGGCTTCTCATAGAAC-3′。前10个循环采用降落 PCR,热循环条件:初始变性 94.0 ℃、5 min,变性 95.0 ℃、30 s,退火 65.0 ℃、30 s,每个循环退火温度降低 0.5 ℃,延长 72.0 ℃、30 s。再以 95.0 ℃、30 s,61.5 ℃、30 s,72.0 ℃、30 s 进行35个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。扩增产物直接由相同引物和应用生物系统公司 BigDye Terminator v3.1 测序试剂盒及 ABI 3730XL 测序仪测序判读 ERCC1 118 密码子第3位核苷酸类型。所有分析均由解放军空军总医院分子病理中心完成。

1.3 统计学分析

临床基线特征在 ERCC1 C118T 不同基因型的比例以及 EGFR 突变与基线特征的关系或 ERCC1C118T 基因型相关性采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。Logistic 回归进一步分析 ERCC1 C118T 基因型与 EGFR 突变的联系。均为双侧检验。采用 SPSS 20.0 统计软件。

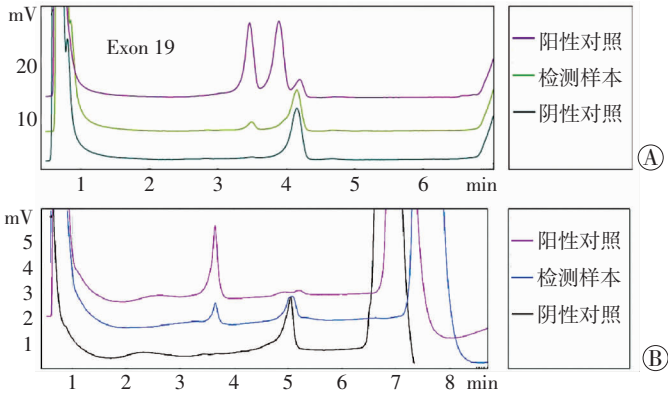
2 结果

2.1 基线特征及其与 ERCC1 C118T 的相关性

研究全体中,男性和吸烟者占多数,分别占 75.4% 和 65.2%,腺癌类型占 56.5%。EGFR 总突变 13 例,总突变率 18.8%。其中 19 外显子缺失突变5例,21 外显子 L858R 点突变8例,没有同时突变的病例。典型的缺失突变异源双链和 L858R 点突变酶切片段洗脱曲线见图1。ERCC1 C118T C/C、C/T、T/T基因型分别有 37(53.6%)、30(43.5%)、2(2.9%)例,符合哈迪-温伯格平衡($\chi^2=2.013$, $P=0.156$)。ERCC1

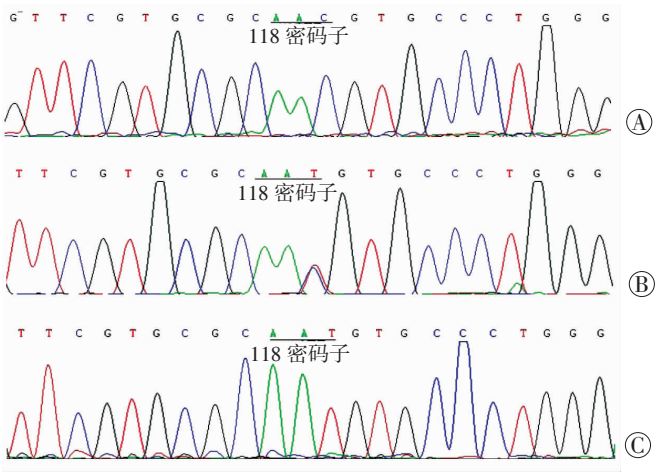
[通信作者] 王 阁,电话:(023)68757171,E-mail: wangge70@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131014.0941.003.html(2013-10-14)

C118T C/C、C/T、T/T 3 种基因型代表性测序结果见图 2。男性和有吸烟史患者 ERCC1 C/T 和 T/T 基因型比例显著高于女性和无吸烟患者($P<0.05$,表 1)。



A:19 外显子缺失突变;B:21 外显子 L858R 点突变

图 1 EGFR 突变的 DHPLC 洗脱曲线图



A:ERCC1 C118T C/C 野生型;B:ERCC1 C118T C/T 杂合变异;C:ERCC1 C118T T/T 纯合变异

图 2 ERCC1 C118T 密码子 3 种基因型测序结果

表 1 ERCC1 C118T 基因型与基线特征关系[例(%)]

特征	CC	CT + TT	*P*
性别			
男	24(46.2)	28(53.8)	0.030
女	13(76.5)	4(23.5)	
年龄			
≤60 岁	16(47.1)	18(52.9)	0.281
>60 岁	21(60.0)	14(40.0)	
吸烟史			
有	18(40.0)	27(60.0)	0.002
无	19(79.2)	5(20.8)	
分期			
$\text{ⅡA}\sim\text{ⅡB}$期	15(65.2)	8(34.8)	0.172
Ⅳ期	22(47.8)	24(52.2)	
组织学类型			
腺癌	24(61.5)	15(38.5)	0.133
非腺癌	13(43.3)	17(56.7)	

2.2 EGFR 突变与基线及 ERCC1 C118T 基因型的关系

女性 EGFR 突变率显著高于男性,但突变率在组织学类型间无显著差异。EGFR 突变组中 ERCC1 CC 基因型占 61.5%(8/13),野生型组中 CC 基因型占 51.8%(29/56),未达到显著水平($\chi^2=0.404$, $P=0.525$)(表 2)。同样,Logistic 回归表明突变组中 CC 基因型比例高于野生型组,但差异无统计学意义($OR=1.490$, 95% $CI=0.434\sim5.118$, $P=0.527$)。

表 2 EGFR 突变与基线和 ERCC1 基因型关系

特征	野生型组 ($n=5$)	EGR 突变组 ($n=13$)	*P*
性别			
男	46(88.5)	6(11.5)	0.018
女	10(58.8)	7(41.2)	
年龄			
≤60 岁	28(82.4)	6(17.6)	0.803
>60 岁	28(80.0)	7(20.0)	
吸烟史			
有	40(88.9)	5(11.1)	0.054
无	16(66.7)	8(33.3)	
分期			
$\text{ⅡA}\sim\text{ⅢB}$期	19(82.6)	4(17.4)	1.000
Ⅳ期	37(80.4)	9(19.6)	
组织学类型			
腺癌	32(82.1)	7(17.9)	0.829
非腺癌	24(80.0)	6(20.0)	
ERCC1 C118T			
CC	29(78.4)	8(21.6)	0.525
CT + TT	27(84.4)	5(15.6)	

3 讨论

除了 IPASS 临床实验以及 Bai 等[2]研究外,INTEREST 临床试验也表明在二线化疗中,EGFR 突变群体总缓解率也高于野生型患者(21.1% *vs* 9.8%)[9]。国内王殿军等[3]和李惠等[4]探讨过 EGFR 突变与 ERCC1 mRNA 表达水平的关联性,但结论相反。前者表明 EGFR 突变型群体中 ERCC1 表达水平显著低于野生型,并认为 ERCC1 低水平表达可能是 EGFR 基因突变患者对铂类化疗响应率较高的原因,而后者得出否定结论。

ERCC1 蛋白表达与其 SNP 对化疗疗效的影响可能有相互独立的机制。ERCC1 C118T 不同基因型与其蛋白表达水平并无相关性,可独立影响可手术切除肺癌患者的总生存率[10]。基础研究同样表明,ERCC1 C118T 多态性并不改变胞内表达水平,因此,该单核苷酸多态性对铂类化疗的影响可能是与其存在连锁不平衡的其他修复基因共同参与的结果[11]。ERCC1 C118T 单核苷酸多态性与晚期非小细胞肺癌化疗缓解的相关性已有大量研究。研究[5-6]表明对于晚期非小细胞肺癌含铂系统化疗,CC 基因型的总缓解率均高于 CT 和 TT 基因型。556 例样本的荟萃分析同样揭示 CC 基因型化疗缓解率较高($OR=2.17$, 95% $CI=$

1.43～3.33),表明ERCC1 118 CC是对铂类药物敏感的优势基因型[7]。本研究并没有检测到ERCC1 118 CC基因型与EGFR激活突变有关联,在EGFR突变群体中CC基因型比率略高于野生型群体。

研究[2]表明化疗可显著降低外周血EGFR突变率。本研究的病例多数经历过一线化疗,因此,从外周血浆游离DNA检测到的EGFR总体突变率较低。因回顾性研究的限制,EGFR突变例数较少,使得检验效能降低,难于检测到EGFR突变与ERCC1多态性的相关性。EGFR突变与ERCC1的表达及其SNP三者的关系还需进一步研究。

参考文献:

[1] Mok T S, Wu Y L, Thongprasert S, *et al*. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. N Engl J Med, 2009, 361(10): 947-957.

[2] Bai H, Wang Z, Chen K, *et al*. Influence of chemotherapy on EGFR mutation status among patients with non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2012, 30(25): 3077-3083.

[3] 王殿军, 梁乃新, 莫敏俐, 等. 非小细胞肺癌患者EGFR基因突变与ERCC1基因表达水平间的关联[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(1): 56-59.

[4] 李惠, 张树鹏, 谢玲, 等. 非小细胞肺癌组织中EGFR基因突变与ERCC1基因表达的关系[J]. 山东医药, 2012, 52(6): 67-68.

[5] Su D, Ma S, Liu P, *et al*. Genetic polymorphisms and treatment response in advanced non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2007, 56(2): 281-288.

[6] Cheng J, Ha M, Wang Y, *et al*. A C118T polymorphism of ERCC1 and response to cisplatin chemotherapy in patients with late-stage non-small cell lung cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(2): 231-238.

[7] Wei S Z, Zhan P, Shi M Q, *et al*. Predictive value of ERCC1 and XPD polymorphism in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving platinum-based chemotherapy: a systematic review and meta-analysis[J]. Med Oncol, 2011, 28(1): 315-321.

[8] 杨卓, 龙美娟, 王斐, 等. 酶切富集联合DHPLC检测肿瘤患者外周血EGFR和KRAS基因突变及其临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(4): 327-332.

[9] Douillard J Y, Shepherd F A, Hirsh V, *et al*. Molecular predictors of outcome with gefitinib and docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer: data from the randomized phase Ⅲ INTEREST trial[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(5): 744-752.

[10] Takenaka T, Yano T, Kiyohara C, *et al*. Effects of excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) single nucleotide polymorphisms on the prognosis of non-small cell lung cancer patients[J]. Lung Cancer, 2010, 67(1): 101-107.

[11] Gao R, Reece K, Sissung T, *et al*. The ERCC1 N118N polymorphism does not change cellular ERCC1 protein expression or platinum sensitivity[J]. Mutat Res, 2011, 708(1/2): 21-27.

(**收稿**:2013-08-02;**修回**:2013-09-10)

(编辑　汪勤俭)

短篇论著

文章编号:1000-5404(2014)02-0186-03

miR-363-3p在胃癌中的表达及其临床意义

陈兆峰[1,2],刘晓光[1],刘　敏[1],刘小军[1],贾　娇[1],姬　瑞[1,2],郭庆红[1,2],周永宁[1,2]　(730000 兰州,兰州大学第一医院消化内科[1],甘肃省胃肠病重点实验室[2])

[**摘要**]　**目的**　探讨miR-363-3p在胃癌中的表达及其与胃癌临床病理特征的关系。**方法**　应用Real-time PCR方法检测7种不同分化程度胃癌细胞株和56例胃癌组织及其对应非癌胃黏膜组织中miR-363-3p的表达,并结合临床资料分析其与胃癌临床病理特征的关系。**结果**　miR-363-3p的表达除AGS高分化胃癌细胞株外,在其余6种胃癌细胞株中均显著低于正常胃黏膜细胞株GES-1($P<0.05$),且胃癌细胞的分化程度越差,其表达量越低;miR-363-3p在胃癌组织中的表达量显著低于非癌胃黏膜组织($P<0.01$);miR-363-3p在高/中分化胃癌组织中的表达显著高于低分化胃癌组织($P=0.035$),不同TNM分期患者miR-363-3p的表达量在Ⅰ/Ⅱ期显著高于Ⅲ/Ⅳ期($P=0.046$),miR-363-3p的表达量在有淋巴结转移的患者中显著低于无淋巴结转移的患者($P=0.021$)。**结论**　miR-363-3p在胃癌细胞和组织中表达明显下调,且与胃癌的分化程度、病理分期及淋巴结转移等密切相关。

[**关键词**]　胃肿瘤;miR-363-3p;临床病理学

[**中图法分类号**]　R394.2;R730.23;R735.2　　[**文献标志码**]　A

[**基金项目**]　"西部之光"人才培养计划(科兰发人字[2012]18号);甘肃省卫生行业科研计划(GSWST09-03);甘肃省自然科学基金(1308RJZA223)

[**通信作者**]　周永宁,电话:(0931)8356872,E-mail:yongningzhou@sina.com

[**优先出版**]　http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131014.1035.013.html(2013-10-14)