DOI:10.16016/j.1000-5404.201601141

食管鳞状细胞癌新辅助放化疗预后差异与 XRCC1 Arg399Gln 多态性特征的研究

王幸斋,王 阁,杨镇洲,胡 南,余 娴,任育江,马俊刚,刘岩海 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心)

[摘要] **目的** 探讨局部晚期食管癌患者 XRCC1 Arg399Gln 多态性与其放化疗敏感性的关系。**方法** 对 122 例胸部食管癌的原发灶和淋巴引流区进行 IMRT 计划设计,原发灶给予 40 Gy/20 f,同期给予以 TP 方案为主的化疗。采用直接测序法分析 122 例局部晚期食管癌患者肿瘤组织细胞 XRCC1 单核苷酸多态性,并通过 Kaplan-Meier 法计算 XRCC1 各基因分型与总生存时间之间的关系。**结果** 122 例入组患者 XRCC1 Arg399Gln 的 3 种表型 GG、GA 和 AA 分布频率分别为 44.3%、40.2%、15.6%。总体中位总生存时间为 41 个月(95% *CI*:37.2~44.8)。GG、GA、AA 组中位总生存时间分别为 52.9、35.9、28 个月(Log-Rank,$P<0.01$)。GA 组和 AA 组相对于 GG 组死亡风险显著增加(GA *vs* GG *HR*=3.164,95% *CI*:1.914~5.230;AA *vs* GG *HR*=6.868,95% *CI*:3.549~13.289)。**结论** XRCC1 Arg399Gln 单核苷酸多态性与食管癌放化疗敏感性相关,GG 基因型患者放化疗预后较好。

[关键词] 食管鳞癌;新辅助放化疗;XRCC1;单核苷酸多态性;生存预后
[中图法分类号] R394.3; R730.53; R735.1 [文献标志码] A

Correlation of XRCC1 Arg399Gln polymorphisms with prognosis of esophageal squamous cell carcinoma after neoadjuvant chemoradiotherapy

Wang Xingzhai, Wang Ge, Yang Zhenzhou, Hu Na, Yu Xian, Ren Yujiang, Ma Jungang, Liu Yanhai (Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the correlation of XRCC1 Arg399Gln polymorphisms with chemoradiotherapy sensitivity in Chinese patients with locally advanced esophageal cancer. Methods A total of 122 cases with pathologically confirmed advanced esophageal cancer who were admitted in our hospital from March 2009 to March 2013 were recruited in this study. Intensity-modulated radiation therapy (IMRT) plan was designed for the primary tumors and lymph drainage area, and the primary lesion was given 40 Gy/20f and prior TP scheme chemotherapy. Direct sequencing is used to analyze the XRCC1 single nucleotide polymorphisms in the 122 cases. Kaplan-Meier method was used to analyze the correlation of XRCC1 gene classification with the total survival time. Results XRCC1 gene polymorphisms showed the following expression patterns Arg399Gln GG, GA and AA, and the distribution frequency were 54 cases (44.3%), 49 cases (40.2%), and 19 cases (15.5%) in the subjects. The median overall survival time was 41 months (95% *CI*: 37.2~44.8). The median overall survival time was 52.9, 35.9 and 28.0 months respectively for the carriers of GG, GA and AA genotypes (Log-Rank, $P<0.01$). The carriers of GA and AA genotypes had a significantly increased risk for death when compared with the GG genotype patients (GA *vs* GG, *HR* = 3.164, 95% *CI*: 1.914~5.230; AA *vs* GG, *HR* = 6.868, 95% *CI*: 3.549~13.289). Conclusion XRCC1 Arg399Gln single nucleotide polymorphisms are associated with esophageal radiation and chemotherapy sensitivity. The GG genotype carriers have better prognosis after chemoradiotherapy.

[**Key words**] esophageal neoplasm; neoadjuvant chemoradiotherapy; XRCC1 gene; single nucleotide polymorphism; prognosis

Corresponding author: Wang Ge, Tel: 86-23-68757171, E-mail: wangge70@hotmail.com

[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.20160612.0901.001.html(2016-06-12)

食管癌是我国最常见的消化系统恶性肿瘤之一,在所有恶性肿瘤中其死亡率位居第4位。与其他消化道恶性肿瘤不同,食管癌仅仅通过手术治疗无法使患者的生存预后得到根本上的改善[1]。新辅助治疗目的是通过缩小肿瘤原发病灶,最大化手术完整切除和最大程度实现局部控制,从而延长患者生存期。多项荟萃分析显示,新辅助治疗联合手术治疗食管癌,对肿瘤局部控制率和患者无病生存率带来质的飞跃[2-4]。但是,也有研究表明新辅助联合手术治疗食管癌与单用手术治疗相比较,并未给患者带来生存获益[5-6]。而且,术前放化疗会增加食管癌患者围手术期并发症发生的概率[7]。因此,如何明确食管癌新辅助放化疗的预后指标,进而筛选治疗获益人群,是目前亟待解决的问题。

近年来快速发展的分子生物学证明DNA损伤(包括双链断裂、单链断裂、碱基损伤和蛋白交联)和修复与放射敏感性密切相关[8]。X线修复交叉互补基因1(X-ray repair cross-complementing 1,XRCC1)是修复DNA损伤的一种关键的碱基切除修复基因,在DNA链断裂修复各个阶段与不同的促修复酶(如APE1、PARP-1和DNA连接酶Ⅲ)共同作用,参与DNA损伤修复[9-11]。XRCC1单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点超过60个,其中研究最深入的3个SNP位点,分别是Arg194Trp、Arg280His、Arg399Gln[12]。本研究拟通过分析XRCC1 Arg399Gln SNP与食管癌新辅助治疗患者近期疗效和预后生存的相关性,寻找具有潜在应用价值的预测放疗疗效和预后生存的基因位点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择本院2009年3月至2012年3月确诊的122例中晚期食管癌患者为研究对象。其中男性96例,女性26例,年龄48~73岁,中位年龄61岁。

1.2 放射治疗

采用三维适形或调强放射治疗,全组适形放疗87例,调强放疗35例,剂量分割方式40 Gy/20 f。照射范围包括食管病变以及周边区域淋巴引流区,如瘤床、食管旁、气管旁、锁骨上淋巴结和隆突下淋巴结等。

1.3 化疗方法

122例患者采用以奈达铂、紫杉醇为主的联合化疗,放疗第1周给予紫杉醇125 mg/m^2,第1天;奈达铂20 mg/m^2,第1~3天;21 d为1个周期,同期放化疗2个周期。

1.4 手术方式

放化疗结束后休息4~6周,行胸段食管切除和区域淋巴结清扫,食管胃胸顶或颈部吻合,常规清扫的淋巴结:气管隆突下淋巴结、食管旁淋巴结、左下肺静脉淋巴结、左下肺韧带淋巴结、左肺动脉淋巴结、贲门旁淋巴结和胃周淋巴结。

1.5 基因分型

选取术后瘤床病灶石蜡包埋组织,取10 mm厚的石蜡包埋组织切片5片,用于提取基因组DNA。基因组DNA直接作为模板,进行PCR扩增。XRCC1 Arg399Gln上下游引物为:5′-GATCACACCTAACTG-GCATCTTC-3′、5′-CTGGGACCACCTGTGTTC-3′。PCR扩增产物利用上述相同引物和应用生物系统公司Big-Dye Terminator v3.1测序试剂盒及ABI 3730XL测序仪测序判读XRCC1 399密码子第2、3位核苷酸类型。

1.6 随访

术前放化疗联合手术治疗后,前2年每3~6个月复查1次,2年后每年至少复查1次。

1.7 统计学方法

采用SPSS 16.0统计软件。XRCC1 Arg399Gln单核苷酸多态性基因型在不同临床病理特征组间分布采用χ^2检验或Fisher确切概率法。Hardy-Weinberg检验XRCC1 Arg399Gln实际基因型分布与理论频率的一致性。Kaplan-Meier生存曲线法联合对数秩检验比较XRCC1 Arg399Gln不同基因型组总生存期的差异。多变量Cox等比例风险回归模型分析对总生存的独立预后因素。采用双边检验,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 入组患者临床特征

122例患者为首次接受食管癌治疗,入院均经食管镜检查并通过组织活检确认为食管鳞状上皮细胞癌,KPS评分>70分,临床分期为Ⅱ~Ⅲ期(2009年UICC第7版食管癌TNM分期标准)。122例患者均完成术前放化疗同步治疗,并分别测定XRCC1 399密码子第2、3位核苷酸类型,其中GG型54例、GA型49例、AA型19例。各型患者临床特征见表1。

2.2 XRCC1 Arg399Gln基因型分布与基线参数的关系

入组患者XRCC1 399密码子的3种基因型分别为GG、GA、AA,分布都符合Hardy-Weinberg平衡。XRCC1 Arg399Gln等位基因频率分别为44.3%、40.2%和15.6%。

表 1 XRCC1 Arg399Gln 基因多态性与临床因素相关性[例(%)]

临床因素	GG	GA	AA	χ^2	*P*
年龄(岁)					
≤60	24(42.1)	26(45.6)	7(12.3)	1.649	0.439
>60	30(46.2)	23(35.4)	12(18.5)		
性别					
女	10(38.5)	11(42.3)	5(19.2)	0.707	0.666
男	44(45.8)	38(39.6)	14(14.6)		
T 分期					
T1~T2	12(57.1)	6(28.6)	3(14.3)	1.774	0.404
T3~T4	42(41.6)	43(42.6)	16(15.8)		
N 分期					
N0	16(47.1)	12(35.3)	6(17.6)	0.492	0.782
N1~N3	38(43.2)	37(42.0)	13(14.8)		

2.3 XRCC1 Arg399Gln 基因型分布与生存相关参数的分析

122 例入组患者的中位总生存时间为 41 个月(95% *CI*:37.2~44.8)。GG、GA、AA 组中位总生存时间分别为 52.9、35.9、28 个月(Log-Rank,$P<0.01$,图 1)。GA 组和 AA 组相对于 GG 组死亡风险显著增加($P<0.01$,表 2)。

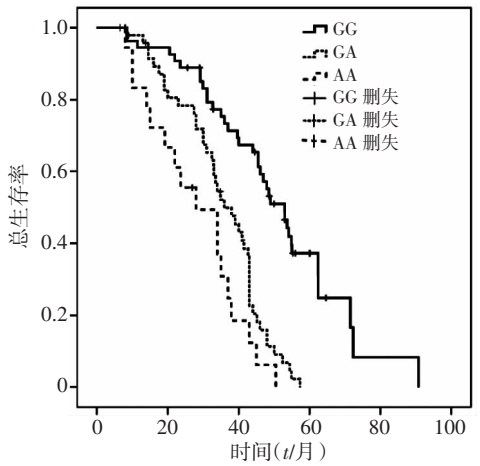


图 1 XRCC1 Arg399Gln 基因多态性分布的生存曲线比较

3 讨论

近年,van-Hagen 等[13]关于食管癌新辅助治疗的研究显示,术前新辅助放化疗能为食管癌患者带来显著生存获益,但临床实践中也发现部分患者无法通过新辅助治疗带来比单纯手术更大的治疗效果。目前推荐的术前放化疗联合手术治疗食管癌,并未考虑到不同个体放射敏感性的差异,在临床上也常常发现患者治疗后获益不一致的情况。随着分子生物学技术的高速发展,通过联系个体基因差异和疾病预后的影响,制定不同的治疗方案,从传统诊疗模式向精准医学迈进,是今后医学发展的努力方向。众所周知,肿瘤受照射病灶 DNA 损伤修复与放射治疗效果息息相关,DNA 损伤修复主要通过碱基切除修复和同源重组两种途径,而 XRCC1 作为碱基切除修复通路的关键元件,几乎参与放疗后 DNA 双链损伤修复的全过程。同时,铂类药物杀伤肿瘤的主要也是通过损伤 DNA 双链,耐药原因主要与碱基切除修复能力变化相关。食管癌新辅助治疗主要是以放疗联合铂类药物的治疗模式,因而 XRCC1 单核苷酸多态性变化可能作为食管癌新辅助放化疗预后指标。

临床治疗中我们经常发现,食管癌患者在接受放射治疗后,其肿瘤病灶缓解率和放射性食管炎发生率存在个体差异,有研究提示该放疗治疗效果和放疗副反应程度与 DNA 损伤修复相关[14]。XRCC1 基因表达参与 DNA 双链修复的关键环节,其修复能力强弱与其多态性息息相关。因此,研究放射治疗与 XRCC1 的相关性多集中在其单核苷酸多态性与放射生物效应的联系上。XRCC1 基因的保守序列区有 3 个 SNP 位点,分别是 Arg194Trp、Arg280His、Arg399Gln,其中 Arg399Gln 位点多态性变化与 DNA 修复能力强弱变化显著相关,可能与该位点位于 BRCT 结构域有关。BRCT 结构域是 DNA 损伤修复系统重要的信号传导和蛋白靶向结构域,是 XRCC1 功能结构域中负责与 ADP 核糖聚合酶结合的区域[15]。研究显示,ADP 核糖

表 2 总生存多变量 Cox 回归分析结果

临床因素	*β*	*SE*	*Wald*	*P*	*HR*	95% *CI*
性别(女 *vs* 男)	−0.201	0.265	0.576	0.448	0.818	0.486~1.375
年龄(>60 岁 *vs* ≤60 岁)	0.017	0.220	0.006	0.937	1.018	0.661~1.566
T 分期(T3~T4 *vs* T1~T2)	0.489	0.229	4.560	0.033	1.631	1.041~2.554
N 分期(N1~N3 *vs* N0)	0.590	0.198	8.879	0.003	1.804	1.224~2.659
GA *vs* GG	1.152	0.256	20.186	<0.01	3.164	1.914~5.230
AA *vs* GG	1.927	0.337	32.735	<0.01	6.868	3.549~13.289

聚合酶与该区域结合,不仅是 DNA 损伤修复启动的关键环节,还与细胞周期检查点激活相关[15]。

本研究通过回顾性分析,入组患者术前均接受以调强放疗为基础的新辅助治疗,对 122 例食管癌患者进行生存预后分析,得出食管鳞癌患者行术前新辅助同步放化疗,个体之间生存预后情况与 XRCC1 Arg399Gln 单核苷酸多态性相关,其中 GG 基因型患者中位总生存期最长。同时,建立 Cox 比例风险回归模型,计算性别、年龄、TNM 分期和 XRCC1 基因多态性与入组患者预后的风险比。结果表明,T、N 分期和 XRCC1 399 密码子多态性皆可作为风险预后因子。其中,T 分期较晚患者死亡风险增加(T3 ~ T4 *vs* T1 ~ T2 $HR = 1.631$, $P = 0.033$);淋巴结有无转移可作为患者预后评测因素(N1 ~ N3 *vs* N0 $HR = 1.804$, $P = 0.003$)。与 GG 基因型患者生存期最长相同,GG 基因型患者死亡风险比低于 GA、AA 型患者(GA *vs* GG $HR = 3.164$;AA *vs* GG $HR = 6.868$)。最近有研究指出,XRCC1 等 DNA 损伤修复基因 SNP 变化不能预测食管癌患者以铂类为主的新辅助化疗疗效[16]。但该入组患者为食管腺癌,而我国食管癌患者以鳞癌为主,并且本研究立足放化同步治疗,在协同增敏的情况下,XRCC1 单核苷酸多态性可能对以调强放疗为基础的食管癌新辅助治疗预后产生影响。现阶段尚缺乏以调强放疗为基础的食管癌新辅助放化疗的大型临床数据,上述结果还需多中心、大样本量的患者生存预后数据进行验证,同时开展相关放射性生物学研究,以待进一步揭示食管癌新辅助放化疗与 DNA 修复相关基因多态性的内在分子机制,为不同食管癌患者实行个体精准治疗奠定基础。

参考文献:

[1] Morita M, Yoshida R, Ikeda K, *et al*. Advances in esophageal cancer surgery in Japan: an analysis of 1000 consecutive patients treated at a single institute[J]. Surgery, 2008, 143(4): 499 - 508. DOI: 10.1016/j.surg.2007.12.007

[2] Fu T, Bu Z D, Li Z Y, *et al*. Neoadjuvant chemoradiation therapy for resectable esophago-gastric adenocarcinoma: a meta-analysis of randomized clinical trials[J]. BMC Cancer, 2015, 15: 322. DOI: 10.1186/s12885-015-1341-7

[3] Gebski V, Burmeister B, Smithers B M, *et al*. Survival benefits from neoadjuvant chemoradiotherapy or chemotherapy in oesophageal carcinoma: a meta-analysis[J]. Lancet Oncol, 2007, 8(3): 226 - 234. DOI: 10.1016/S1470-2045(07)70039-6

[4] Sjoquist K M, Burmeister B H, Smithers B M, *et al*. Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(7): 681 - 692. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70142-5

[5] Burmeister B H, Smithers B M, Gebski V, *et al*. Surgery alone versus chemoradiotherapy followed by surgery for resectable cancer of the oesophagus: a randomised controlled phase Ⅲ trial[J]. Lancet Oncol, 2005, 6(9): 659 - 668. DOI: 10.1016/S1470-2045(05)70288-6

[6] Greer S E, Goodney P P, Sutton J E, *et al*. Neoadjuvant chemoradiotherapy for esophageal carcinoma: a meta-analysis[J]. Surgery, 2005, 137(2): 172 - 177. DOI: 10.1016/j.surg.2004.06.033

[7] Barnett S A, Rizk N P. Randomized clinical trials in esophageal carcinoma[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2010, 19(1): 59 - 80. DOI: 10.1016/j.soc.2009.09.007

[8] Ivashkevich A, Redon C E, Nakamura A J, *et al*. Use of the γ-H_2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research[J]. Cancer Lett, 2012, 327(1/2): 123 - 133. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.12.025

[9] Doherty R, Madhusudan S. DNA Repair Endonucleases: Physiological Roles and Potential as Drug Targets[J]. J Biomol Screen, 2015, 20(7): 829 - 841. DOI: 10.1177/1087057115581581

[10] Caldecott K W. Protein ADP-ribosylation and the cellular response to DNA strand breaks[J]. DNA Repair (Amst), 2014, 19: 108 - 113. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.03.021

[11] Cuneo M J, Gabel S A, Krahn J M, *et al*. The structural basis for partitioning of the XRCC1/DNA ligase Ⅲ-alpha BRCT-mediated dimer complexes[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(17): 7816 - 7827. DOI: 10.1093/nar/gkr419

[12] Borchiellini D, Etienne-Grimaldi M C, Thariat J, *et al*. The impact of pharmacogenetics on radiation therapy outcome in cancer patients. A focus on DNA damage response genes[J]. Cancer Treat Rev, 2012, 38(6): 737 - 759. DOI: 10.1016/j.ctrv.2012.02.004

[13] van-Hagen P, Hulshof M C, van-Lanschot J J, *et al*. Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer[J]. N Engl J Med, 2012, 366(22): 2074 - 2084. DOI: 10.1056/NEJMoa1112088

[14] Bourguignon M H, Gisone P A, Perez M R, *et al*. Genetic and epigenetic features in radiation sensitivity Part I: cell signalling in radiation response[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2005, 32(2): 229 - 246.

[15] Li M, Lu L Y, Yang C Y, *et al*. The FHA and BRCT domains recognize ADP-ribosylation during DNA damage response[J]. Genes Dev, 2013, 27(16): 1752 - 1768. DOI: 10.1101/gad.226357.113

[16] Ott K, Rachakonda P S, Panzram B, *et al*. DNA repair gene and MTHFR gene polymorphisms as prognostic markers in locally advanced adenocarcinoma of the esophagus or stomach treated with cisplatin and 5-fluorouracil-based neoadjuvant chemotherapy[J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(9): 2688 - 2698. DOI: 10.1245/s10434-011-1601-y

(收稿:2016-01-27;修回:2016-05-17)

(编辑 汪勤俭)