

### 【临床研究】

作者简介:孙江涛(1971-),男,河南洛阳人,硕士,副主任医师,副教授,研究方向:肺癌的基础研究与外科治疗。

目前,肺癌的发病率及病死率均呈逐年上升趋势,已经成为我国首位恶性肿瘤死亡原因。其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)发病率约占肺癌总数的80%。因肺癌特殊的肿瘤生物学特性,多数患者确诊时已丧失了手术机会,晚期NSCLC的5 a生存率低于5%<sup>[1]</sup>。以铂类为基础的联合化学治疗目前仍然是NSCLC化学治疗的基础,可以有效延长患者的生存期<sup>[2-3]</sup>,尤其是顺铂联合吉西他滨(GP)方案,在NSCLC治疗中占有重要的地位。本研究通过收集131例接受GP化学治疗方案的NSCLC患者临床资料并检测患者肿瘤组织中切除修复交叉互补基因1(excision repair cross complementing gene 1, ERCC1)和核糖核苷酸还原酶亚单位1(ribonucleotide reductase M1, RRM1)的表达,探讨其表达水平与患者临床特征、化学治疗疗效及生存期的关系,为NSCLC的临床治疗提供实验依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 回顾性收集2010年1月至2012年6月在河南科技大学第一附属医院确诊的NSCLC肿瘤患者131例(化学治疗前均有完整的标本基因检测结果),其中经手术切除获得肿瘤组织标本61例,经电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)引导下肺穿刺活检获得肿瘤组织标本26例,经纤维支气管镜获得标本38例,经胸腔镜辅助下获得标本6例。其中男84例(64.1%),女47例(35.9%);年龄21~83岁,平均 $(53.6 \pm 18.3)$ 岁;临床分期:I期21例(16.1%),II期47例(35.6%),III期31例(23.7%),IV期32例(24.4%);病理类型:腺癌68例(51.9%),鳞状细胞癌63例(48.1%);有吸烟史患者(包括患病后戒烟的患者)67例(51.1%),无吸烟史患者64例(48.9%)。入组标准:(1)患者接受化学治疗前均签有化学治疗知情同意书及组织标本基因检测知情同意书;(2)经病理确诊为NSCLC患者;(3)患者均接受GP化学治疗方案治疗4~6个疗程且有ERCC1和RRM1基因检测结果;(4)有影像学上可测量的病灶;(5)美国东部协作肿瘤组织(Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG)体力评价评分 $\leq 2$ 分,预计生存期在0.5 a以上;(6)肝肾功能、凝血及心电图正常。排除标准:(1)病理学确诊为小细胞肺癌或非小细胞癌混合型肿瘤患者;(2)曾接受放射治疗、非GP化学治疗方案或有分子靶向治疗史;

(3)合并严重心脏、肝脏、肾脏等疾病患者;(4)妊娠、哺乳期患者。

**1.2 主要仪器和试剂** 提取ERCC1 RNA(ADx-ER01)和RRM1 RNA(ADx-RR01)试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司),荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)使用Super Real Color Pre Mix(FP215)荧光定量预混试剂彩色版(北京天根生化科技有限公司),探针及荧光定量试剂盒(日本TaKaRa公司),ABI 7500 Real Time PCR扩增仪(美国Stratagene公司),氯仿、异丙醇、无水乙醇(上海展云化工有限公司)(色谱纯试剂),三蒸水(杭州娃哈哈有限公司),体积分数75%乙醇、焦碳酸二乙酯处理水溶液(diethylpyrocarbonate- $H_2O$ , DEPC- $H_2O$ )(上海前尘生物科技有限公司),磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer solution, PBS)(上海城凌生物公司),寡聚脱氧胸苷纤维素(上海生工生物工程有限公司),随机核苷酸引物N9(北京庄盟国际生物基因科技有限公司),M-MLV反转录酶试剂盒(美国Stratagene公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 主要实验步骤** 收集的131例肿瘤组织标本均已长期保存于本实验室标本数据库中。基因检测操作时首先取少量组织标本经过研磨、抽打匀浆、冰上孵育、离心等操作提取RNA组织。将模板RNA在冰上解冻后迅速置于冰上然后进行以下操作:将配制好的反应液( $10 \times$  Fast RT缓冲液2  $\mu$ L, RT酶混合物1  $\mu$ L, FQ-RT引物混合液2  $\mu$ L, DEPC- $H_2O$  10  $\mu$ L)加到反转录中的混合液中,42  $^{\circ}C$ ,孵育15 min;95  $^{\circ}C$ ,孵育3 min。然后进行PCR扩增。反应条件:95  $^{\circ}C$  15 s, 60  $^{\circ}C$  30 s, 40个循环。

**1.3.2 结果判断** 根据PCR反应检测得到的Ct值,比较目的基因Ct值与内参基因Ct值的差异,将目的基因与正常人基因表达的数据库做对比(上海宝藤公司筛选1 000例正常人基因表达所建立的数据库),比较目的基因在数据库中的表达水平。在数据库中位于高位25%为高表达(标记为+),其余为中低表达(标记为-)。

**1.4 治疗方案及患者随访** 131例NSCLC患者经确诊后均已接受4个疗程GP方案治疗:注射用盐酸吉西他滨(南京正大天晴制药有限公司,国药准字I-20093403)1 250  $mg \cdot m^{-2}$ 静脉滴注,第1、8天,顺铂注射液(江苏豪森药业股份有限公司,国药准字H20040813)75  $mg \cdot m^{-2}$ 静脉滴注,第1~2天;每

3 周 1 次。随访方式包括定期复查、电话随访、家庭访问,随访截止日期为 2016 年 6 月,生存时间以月为单位。

**1.5 疗效评估** 为了评估治疗效果,常规化学治疗 2~4 个疗程后患者均行胸片、胸腹部 CT、颅脑磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)、腹部 B 超等影像学检查,参照世界卫生组织关于肿瘤化学治疗疗效评价标准分为完全缓解(complete response, CR)、部分缓解(partial response, PR)、稳定期(stable disease, SD)和进展期(progression disease, PD)。治疗有效率:CR + PR 患者所占全部化学治疗患者的百分率。生存时间:指患者从确诊之日起至死亡或末次随诊时间。

**1.6 统计学处理** 应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,肿瘤组织中 ERCC1 和 RRM1 表达水平与患者的临床病理特征的关系、ERCC1 和 RRM1 共同表达

表 1 ERCC1 和 RRM1 的表达与 NSCLC 患者的临床病理特征关系

Tab.1 Relationship between expression of ERCC1,RRM1 and clinicopathological features in NSCLC patients

临床病理特征	ERCC1		$\chi^2$	P	RRM1		$\chi^2$	P
	+ / 例	- / 例			+ / 例	- / 例		
性别								
男	46	38	3.269	0.071	50	34	0.054	0.817
女	18	29			27	20		
年龄								
<60 岁	28	34	0.643	0.423	33	29	1.498	0.221
≥60 岁	36	33			44	25		
病理类型								
腺癌	33	35	0.006	0.983	45	23	3.194	0.074
鳞癌	31	32			32	31		
临床分期								
I + II 期	35	33	0.387	0.534	38	30	0.490	0.484
III + IV 期	29	34			39	24		
吸烟史								
有	38	29	3.392	0.066	44	23	2.689	0.101
无	26	38			33	31		

**2.2 NSCLC 患者肿瘤组织中 ERCC1 和 RRM1 共同高表达情况** ERCC1 和 RRM1 在 131 例 NSCLC 患者肿瘤组织中共同高表达的患者 34 例(26.0%),共同低表达的患者 24 例(18.3%),ERCC1 和 RRM1 两者共同高表达与共同低表达比较差异无统计学意义( $\chi^2 = 1.651, P > 0.05$ )。

**2.3 ERCC1 和 RRM1 表达与 NSCLC 患者化学治疗疗效的关系** ERCC1 高表达患者化学治疗后 CR 6 例,PR 20 例,SD 21 例,PD 17 例,化学治疗有效率为 40.1% (26/64);ERCC1 低表达患者化学治疗后 CR 16 例,PR 26 例,SD 12 例,PD 13 例,化学治疗有效率为 62.7% (42/67),ERCC1 低表达的患者化学治疗有效率显著高于 ERCC1 高表达的患者,

关系的分析均采用  $\chi^2$  或 Fisher 确切概率法分析;采用 Kaplan-Meier 法(log-rank 检验)分析 ERCC1 和 RRM1 的表达与患者生存期的关系。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

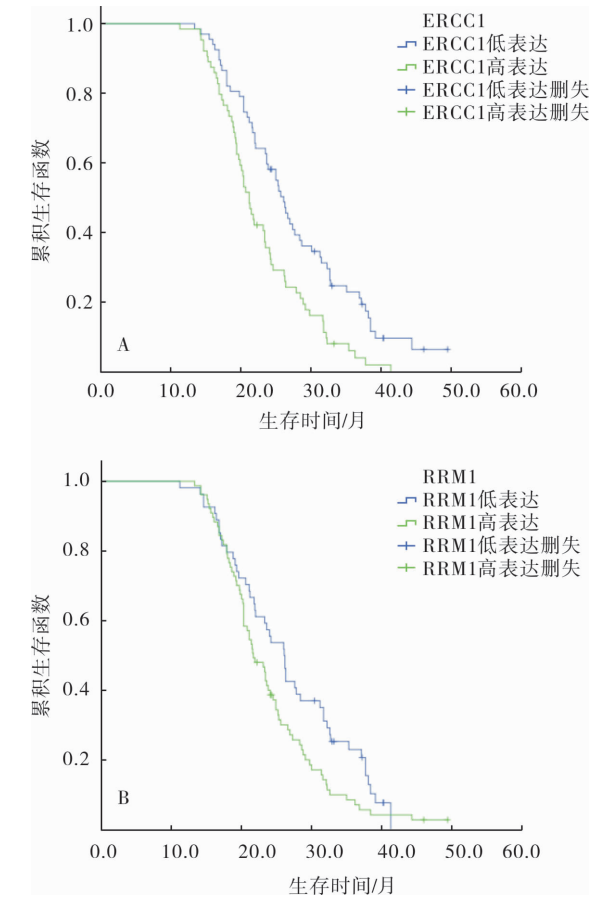
2 结果

**2.1 ERCC1 和 RRM1 表达与 NSCLC 患者的临床病理特征关系** 结果见表 1。ERCC1 在 131 例患者中高表达 64 例(48.9%),低表达 67 例(51.1%)。ERCC1 在 NSCLC 患者中的表达与性别、年龄、病理类型、吸烟史、临床分期等因素无关( $P > 0.05$ )。RRM1 在 131 例患者中高表达 77 例(58.8%),低表达 54 例(41.2%)。RRM1 在 NSCLC 患者中的表达也与性别、年龄、病理类型、吸烟史、临床分期等因素无关( $P > 0.05$ )。

差异有统计学意义( $\chi^2 = 6.382, P < 0.05$ )。RRM1 高表达的患者化学治疗为 CR 8 例,PR 14 例,SD 21 例,PD 11 例,化学治疗有效率为 40.7% (22/54);RRM1 低表达患者化学治疗后 CR 19 例,PR 27 例,SD 12 例,PD 19 例,化学治疗有效率为 59.7% (46/77),RRM1 低表达患者化学治疗有效率显著高于 RRM1 高表达的患者,差异有统计学意义( $\chi^2 = 4.592, P < 0.05$ )。

**2.4 ERCC1 和 RRM1 表达与 NSCLC 患者预后的关系** 结果见图 1。131 例 NSCLC 患者中,64 例 ERCC1 高表达的患者其中位生存期为 22.8 个月(95% CI:21.1~24.5),67 例 ERCC1 低表达的患者其中位生存期为 27.8 个月(95% CI:25.5~30.1),

ERCC1 低表达的患者生存期显著长于 ERCC1 高表达的患者,差异有统计学意义( $\chi^2 = 12.100, P < 0.01$ )。77 例 RRM1 高表达的患者中位生存期为 24.1 个月(95% CI:22.3 ~ 25.8),54 例 RRM1 低表达的患者中位生存期为 26.8 个月(95% CI:24.5 ~ 29.1),RRM1 低表达的患者生存期显著长于 RRM1 高表达的患者,差异有统计学意义( $\chi^2 = 4.337, P = 0.037$ )。



A:ERCC1;B:RRM1。

图 1 ERCC1 和 RRM1 表达与患者生存期的关系

Fig. 1 Relationship between the expression of ERCC1, RRM1 and survival time of patients

### 3 讨论

依据基因表达而选择化学治疗方案是近年来肺癌研究的热点,ERCC1 定位于人类第 19 号染色体上,它是核苷酸剪切修复(nucleotide excision repair pathway,NER)家族中的重要成员之一,在剪切修复核苷酸过程中,与 DNA 修复酶缺乏互补基因 F 相结合形成了异源二聚体,主要参与 DNA 链的切割与损伤识别、修复紫外线和多种化学物质所引起的损伤,以此来达到维持基因组稳定的目的<sup>[4]</sup>。而顺铂的作用原理主要为通过与肿瘤细胞内的亲核 DNA 相

结合,从而形成铂-DNA 加合物,从而诱导肿瘤细胞的凋亡<sup>[5-6]</sup>。NER 途径在铂-DNA 加合物的切除修复中扮演了关键作用,因此,可以推测铂类化学治疗药物与 ERCC1 的表达密切相关。LORD 等<sup>[7]</sup>用 PCR 技术检测 56 例晚期 NSCLC 患者肿瘤组织中 ERCC1 的表达水平,并且所有患者接受标准的 GP 化学治疗方案治疗,结果显示,ERCC1 mRNA 低表达患者的中位生存期显著长于高表达患者。OLAUSSEN 等<sup>[8]</sup>收集了 761 例 NSCLC 患者术后肿瘤组织标本,采用免疫组织化学的方法检测标本中 ERCC1 mRNA 的表达,结果发现,与未接受铂类的化学治疗组相比,接受顺铂为基础的辅助化学治疗可使患者获益,且 ERCC1 低表达的患者生存期明显长于高表达的患者。本实验研究结果显示,与 ERCC1 高表达的患者相比,ERCC1 低表达的患者获得更高的化学治疗有效率,更长的生存期,与 OLAUSSEN 等<sup>[8]</sup>研究结果基本一致,提示检测 ERCC1 表达水平可在 NSCLC 患者中预测含铂类化学治疗药物的治疗效果及生存期。

RRM1 被证实是一种定位于染色体 11p15.5 区域的肿瘤抑制基因。吉西他滨属于嘧啶类抗代谢药物,属细胞周期特异性抗肿瘤药物,它主要作用于 DNA 合成期,即 S 期的各种细胞<sup>[9]</sup>。吉西他滨对核糖核苷酸还原酶(ribonucleotide reductase,RR)有抑制活性的作用,而 RR 是合成 RRM1 的前体物质,因此,可以推测 RRM1 的表达与吉西他滨疗效有关<sup>[10]</sup>。本实验研究结果显示,RRM1 低表达的患者生存期优于高表达的患者;在化学治疗效果对比上,RRM1 低表达患者化学治疗有效率优于高表达患者。与 ROSELL 等<sup>[11]</sup>研究结果基本一致,提示 RRM1 低表达的 NSCLC 患者更有可能在化学治疗中受益。

此外,ROSELL 等<sup>[12]</sup>研究发现,ERCC1 mRNA 表达水平与 RRM1 mRNA 表达水平有明显的相关性,RRM1 与 ERCC1 共同低表达的患者可以获得更长的中位生存期。而 XU 等<sup>[13]</sup>研究发现,ERCC1 和 RRM1 表达水平无明显相关性。本研究结果显示,在 131 例 NSCLC 患者中,ERCC1 和 RRM1 共同高表达的患者为 34 例(26.0%),共同低表达的患者为 24 例(18.3%),ERCC1 和 RRM1 两者表达水平之间比较差异无统计学意义,与 XU 等<sup>[12]</sup>研究结果一致。分析其原因可能是由于 ERCC1 基因和 RRM1 基因存在多态性,且肺癌患者的种族、性别、年龄、标本来源、吸烟因素、mRNA 提取与检测方法

不同等都有可能影响基因表达的相关性,其原因有待于今后进一步研究。

综上所述,ERCC1 和 RRM1 表达可预测 NSCLC 患者的治疗效果及生存期,为 NSCLC 患者的治疗及预后提供新的研究方向。

参考文献:

[1] 梁绪中,刘合代,倪裕丰,等. ERCC1 和 Pim-1 表达与非小细胞肺癌化疗疗效的相关性[J]. 现代肿瘤医学,2015,23(22):3242-3245.

[2] BONI C,ZANELLI F,AMBROGGI M,et al. Non-small-cell lung cancer;which platinum for gemcitabine[J]. *Ann Oncol*,2006,17(5):79-81.

[3] 赵莹莹,钟根深,袁晓梅,等. 非小细胞肺癌组织中基质金属蛋白酶-3 的表达与患者预后的关系[J]. 新乡医学院学报,2016,33(5):379-383.

[4] 张莉,刘婷,张建清,等. 多项肿瘤标记物的检测与晚期非小细胞肺癌化疗疗效及预后的关系[J]. 中华肿瘤杂志,2011,33(3):212-216.

[5] 谷海燕,项锋钢,信芳杰,等. NSCLC 含铂新辅助化疗后 ERCC1 和 BRCA1 表达及其与疗效关系[J]. 齐鲁医学杂志,2012,27(2):98-100.

[6] 刘勇,张艳莉,刘岩,等. 培美曲塞联合顺铂治疗晚期非小细胞肺癌疗效观察[J]. 新乡医学院学报,2015,32(9):874-876.

[7] LORD R V,BRABENDER J,GANDARA D,et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gem-

citabine chemotherapy in non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*,2002,8(7):2286-2291.

[8] 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.

[9] 孙秀威,陈玉玲,黄鹏,等. 非小细胞肺癌中核糖核苷酸还原酶亚单位 M1 表达及其与吉西他滨化学治疗敏感性相关研究[J]. 新乡医学院学报,2011,28(2):157-160.

[10] KWON W S,RHA S Y,CHOI Y H,et al. Ribonucleotide reductase M1(RRM1) 2464G>A polymorphism shows an association with gemcitabine chemosensitivity in cancer cell lines[J]. *Pharmacogenet Genomics*,2006,16(6):429-438.

[11] ROSELL R,FELIP E,TARON M,et al. Gene expression as a predictive marker of outcome in stage IIIB-IIIA-IIIB non-small-cell lung cancer after induction gemcitabine-based chemotherapy followed by resectional surgery[J]. *Clin Cancer Res*,2004,10(Suppl):4215-4219.

[12] ROSELL R,DANENBERG K D,ALBEROLA V,et al. Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*,2004,10(4):1318-1325.

[13] XU C W,WANG G,WANG W L,et al. Association between epidermal growth factor receptor mutations and the expression of excision repair cross-complementing protein 1 and ribonucleotide reductase subunit M1 mRNA in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Exp Ther Med*,2015,9(3):880-884.

( 本文编辑:徐刚珍 英文编辑:孟 月)

《新乡医学院学报》2017 年征订启事

《新乡医学院学报》(Journal of Xinxiang Medical University)创刊于1984年,是新乡医学院主管主办、国内外公开发行的综合性医学学术期刊。国际标准连续出版物号:ISSN 1004-7239,国内统一连续出版物号:CN 41-1186/R。现为月刊,每月5日出版,大16开本,每期80页。本刊设有专家论坛、专题报告、国家自然科学基金专题评述、基础研究、临床研究、技术与方法、护理研究、综述、医学教育研究、名院·名科·名医等栏目。编辑部对来稿审理及时并严格执行“三审制”,对国家级、省部级科研基金项目资助的研究性论文优先发表。

本刊为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、中国精品科技期刊、中国高校优秀科技期刊、河南省一级期刊,目前被《中国学术期刊(光盘版)全文检索数据库》、《万方数据-数字化期刊群》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、英国《公共卫生数据库》(Global Health)、《中国学术期刊文摘》、《中国医学文摘》、《中国药学文摘》等国内外权威性数据库、文摘期刊收录,标志着在本刊发表的论文将有机会被国内外著名检索系统收录,这对提高作者知名度及论文的影响力不无裨益。欢迎国内外医药工作者踊跃投稿。欢迎广大订户前往当地邮局订阅,邮发代号:36-145,每期定价10.00元,全年120.00元。编辑部地址:河南省新乡市金穗大道东段新乡医学院学报编辑部,邮政编码:453003。电话:0373-3029086,传真:0373-3831371,网址:www.xxyxyxb.com,E-mail:xxyxyxb@163.com。

本刊编辑部