

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.09.008

非小细胞肺癌 EGFR 基因突变与 ERCC1、TYMS mRNA 表达相关性的研究*

张全, 谭群友[△], 王如文, 陶绍霖, 康珀铭, 邓波, 周景海, 李坤, 钱凯, 蒋彬
(第三军医大学大坪医院野战外科研究所胸外科, 重庆 400042)

[摘要] 目的 探讨非小细胞肺癌表皮生长因子受体(EGFR)基因突变与核苷酸切除修复交叉互补基因 1(ERCC1)、胸苷酸合成酶(TYMS) mRNA 表达的相关性。方法 收集该科 2013 年 2~12 月符合入组条件的 NSCLC 患者 97 例, 肿瘤组织标本由术中切取或穿刺获得。使用 xTAG-液相芯片法检测 EGFR(E18、E19、E20、E21)基因突变, 使用分支 DNA-液相芯片法检测 ERCC1、TYMS mRNA 表达水平, 并分析 EGFR 基因突变与 ERCC1、TYMS mRNA 表达水平的相关性。结果 97 例检测样本中, EGFR 基因突变 29 例, 突变率为 30%(29/97), 女性、无吸烟史、腺癌患者 EGFR 基因突变检出率较高($P < 0.05$)。EGFR 突变与 ERCC1 mRNA 表达有相关性($\chi^2 = 4.088, P < 0.05$), 与 TYMS mRNA 表达无相关性($\chi^2 = 0.265, P > 0.05$)。结论 NSCLC EGFR 基因突变与 ERCC1 mRNA 表达存在相关性, 与 TYMS mRNA 表达无相关性。

[关键词] 非小细胞肺癌; 核苷酸切除修复交叉互补基因 1; 胸苷酸合成酶; 表皮生长因子受体

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)09-1177-03

Correlation of EGFR mutation with ERCC1 and TYMS mRNA expression in non-small cell lung cancer*

Zhang Quan, Tan Qunyou[△], Wang Ruwen, Tao Shaolin, Kang Poming, Deng Bo, Zhou Jinghai, Li Kun, Qian Kai, Jiang Bin
(Department of Thoracic Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital,
Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective** To investigate whether EGFR gene mutations are correlated with the gene expression of ERCC1 and TYMS in non-small-cell lung cancer. **Methods** Collected February to December 2013 of non-small cell lung cancer(NSCLC) patients eligible for enrolled 97 patients, tumor tissue specimens obtained by intraoperative cut or puncture. Gene expression of ERCC1 and TYMS were determined by branched-DNA liquid chip, while somatic mutations in EGFR(E18, E19, E20, E21) gene were detected by xTAG-liquid chip; And analysis of EGFR gene mutation associated with ERCC1, TYMS mRNA expression. **Results** Totally 29 cases of EGFR mutation were detected in all 97 specimens, with a mutation rate of 30%(29/97), and a relatively high detection rate was observed in female, adenocarcinoma and non-smoking patients($P < 0.05$). EGFR mutation was relevant to the expression of ERCC1($\chi^2 = 4.088, P < 0.05$), EGFR mutation was irrelevant to the expression of TYMS($\chi^2 = 0.265, P > 0.05$). **Conclusion** In NSCLC tissues, EGFR mutation is relevant to the expression of ERCC1 but irrelevant to the expression of TYMS.

[Key words] non-small cell lung cancer; ERCC1; TYMS; EGFR

肺癌是最常见的恶性肿瘤, 肺癌病理类型中非小细胞肺癌(NSCLC)占 75%~80%^[1]。I B~III A 期的 NSCLC 以手术治疗为主, 并在术后根据肿瘤分期进行辅助化疗^[2]。但部分 NSCLC 根治性切除后的辅助化疗效果欠佳。近年来, 临床上开展的分子靶标检查能够判别患者个体差异, 为 NSCLC 的化疗和靶向治疗的药物选择提供科学指导, 在 NSCLC 治疗中的作用越来越受到重视。

IPASS 研究发现表皮生长因子受体(EGFR)突变患者使用铂类化疗效果比野生型患者好^[3]。台湾大学 Wu 等^[4]发现 EGFR 突变患者使用培美曲塞化疗相对于野生型患者有更高的有效率。目前认为, 核苷酸切除修复交叉互补基因 1(ERCC1)和胸苷酸合成酶(TYMS)分别是铂类和培美曲塞化疗的作用靶点, 那么, EGFR 突变是否与 ERCC1 和 TYMS mRNA 具有相关性呢? 本研究将对此进行探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2013 年 2~12 月本科室收治的 I B~III A 期的 NSCLC 患者 97 例。其中, 腺癌 60 例(61.8%), 鳞癌

29 例(29.8%), 其他 8 例, 包括腺鳞癌 6 例、大细胞癌 2 例; 男 67 例, 女 30 例; 年龄 33~82 岁; 有吸烟史 55 例(56.7%), 无吸烟史 42 例(43.3%)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 组织标本来自手术中切取或经皮肺穿刺获得的肿瘤组织, 并经病理检查确诊。标本用 10% 甲醛固定后, 由广州益善生物公司检测中心检测分析。

1.2.2 基因突变检测 使用 SurPlex-xTAG70plex 液相芯片技术进行 EGFR(E18、E19、E20、E21)基因突变检测。主要步骤: 从固定样本中提取 DNA; 进行多重 PCR 扩增; 使用 EXO-SAP 对 PCR 反应产物进行消化处理; 进行等位基因特异引物延伸反应; 将扩增产物与交联特异探针微球进行杂交反应; 再将杂交后产物放入 Luminex 仪, 读取数据^[5]。

1.2.3 mRNA 表达水平检测 ERCC1、TYMS mRNA 表达使用分支 DNA-液相芯片方法定量检测。分支 DNA 液相芯片技术是省略 RNA 抽取、逆转录和纯化等步骤, 完成对 mRNA 表达水平的检测。在对样本裂解后, 经过微球捕获, 探针的多

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81172239)。 作者简介: 张全(1989-), 在读硕士, 主要从事肺癌的基础与临床研究。 △ 通讯作者, Tel: (023)68757986; E-mail: tanqy001@163.com。

位点配对、级联增大的方法完成信号的放大,使用液相芯片对结果进行读数。

1.3 结果判定标准

1.3.1 EGFR 基因突变结果判定 首先,对液相芯片各突变型位点 Cut-Off 值进行确定,然后对样本检测每一突变型磁珠荧光值与 Cut-Off 值进行比较,进而判定检测样本的阴(阳)性。当检测样本的所有突变型磁珠荧光值均大于 Cut-Off 值,判断该样本为突变阳性;相反,则判断为阴性^[6]。

1.3.2 ERCC1、TYMS mRNA 表达结果判定 检测结果以高、中、低表示,表达水平大于或等于 75% 为高表达,70%~<75% 为中偏高表达,40%~<70% 为中表达,25%~<40% 为中偏低表达,小于 25% 为低表达。各 mRNA 基因表达水平的高低,反映化疗耐药的高低,表达水平越低,化疗的药物敏感性越高。因此,根据基因检测结果,把 mRNA 表达水平的高表达、中偏高表达及中表达记为 ERCC1(+)、TYMS(+),低或中偏低表达记为 ERCC1(-)、TYMS(-)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析处理,EGFR 突变情况采用描述性统计分析方法,EGFR 突变与 ERCC1、TYMS mRNA 表达相关性分析采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR 基因突变情况 在 97 例检测样本中,发现 EGFR 基因突变 29 例,突变率为 30%。其中,大部分集中在 21 号外显子的点突变(48.3%,14/29)和 19 号外显子的缺失突变(37.9%,11/29);其余为 18 号外显子突变 2 例(6.8%,2/29),20 号外显子突变 2 例(6.8%,2/29),18 号外显子与 20 号外显子共同突变 1 例(3.4%,1/29)。EGFR 基因突变检出率方面,女性(70.0%,21/30)显著高于男性(11.9%,8/67), $P<0.05$;腺癌(48.3%,29/60)显著高于非腺癌(0.0%,0/37), $P<0.05$;无吸烟史患者(52.3%,22/42)突变率显著高于有吸烟史患者(12.7%,7/55), $P<0.05$ 。在肿瘤分期和年龄方面比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 EGFR 基因突变与临床特征之间的关系

指标	n	基因突变(n)	突变率(%)	χ^2	P
年龄(岁)				3.070	0.080
≤60	50	11	22.0		
>60	47	18	38.2		
性别				33.328	0.000
男	67	8	11.9		
女	30	21	70.0		
组织类型				25.510	0.000
腺癌	60	29	48.3		
非腺癌	37	0	0		
肿瘤分期				2.080	0.149
I~II	46	17	36.9		
III~IV	51	12	23.5		
吸烟史				17.867	0.002
是	55	7	12.7		
否	42	22	52.3		

2.2 EGFR 突变与 ERCC1 mRNA 表达的关系 29 例 EGFR 突变病例中,ERCC1 阴性表达率 62.1%(18/29),阳性表达率

37.9%(11/29);68 例 EGFR 野生型病例中,ERCC1 阴性表达率 39.7%(27/68),阳性表达率 60.2%(41/68)。EGFR 突变与 ERCC1 表达有相关性($\chi^2=4.088$, $P<0.05$),见表 2。ERCC1 基因表达与患者各临床特征间无显著相关性,见表 3。

表 2 EGFR 基因突变与 ERCC1 mRNA 表达水平的关系(n)

EGFR 基因突变	ERCC1 表达		合计	χ^2	P
	(-)	(+)			
野生型	27	41	68	4.088	0.043
突变型	18	11	29		
合计	45	52	97		

表 3 ERCC1 mRNA 表达情况与临床特征间的关系(n)

指标	n	(-)	(+)	χ^2	P
年龄(岁)				1.695	0.193
≤60	50	20	30		
>60	47	25	22		
性别				1.844	0.175
男	67	28	39		
女	30	17	13		
组织类型				1.412	0.235
腺癌	60	25	35		
非腺癌	37	20	17		
肿瘤分期				1.176	0.278
I~II	46	24	22		
III~IV	51	21	30		
吸烟史				0.372	0.542
是	55	27	28		
否	42	18	24		

表 4 EGFR 基因突变与 TYMS mRNA 表达水平的关系(n)

EGFR 基因突变	TYMS 表达		合计	χ^2	P
	(-)	(+)			
野生型	36	32	68	0.265	0.607
突变型	17	12	29		
合计	53	44	97		

表 5 TYMS mRNA 表达情况与临床特征间的关系(n)

指标	n	(-)	(+)	χ^2	P
年龄(岁)				0.470	0.493
≤60	50	29	21		
>60	47	24	23		
性别				1.325	0.250
男	67	34	33		
女	30	19	11		

续表 5 TYMS mRNA 表达情况与临床特征间的关系 (n)

指标	n	(-)	(+)	χ^2	P
组织类型				0.866	0.352
腺癌	60	35	25		
非腺癌	37	18	19		
肿瘤分期				0.003	0.956
I~II	46	25	21		
III~IV	51	28	23		
吸烟史				1.578	0.209
是	55	27	28		
否	42	26	16		

2.3 EGFR 突变与 TYMS mRNA 表达的关系 29 例 EGFR 突变病例中, TYMS 阴性表达率 58.6% (17/29), 阳性表达率 41.3% (12/29), 68 例 EGFR 突变阴性病例中, TYMS 阴性表达率 52.9% (36/68), 阳性表达率 47.1% (32/68)。EGFR 突变与 TYMS 表达无明显相关性 ($\chi^2 = 0.265, P > 0.05$), 见表 4。TYMS mRNA 表达与患者各临床特征间无显著相关性 ($P > 0.05$), 见表 5。

3 讨论

近年来, 随着肿瘤分子生物学和分子遗传学的不断发展, 分子靶标基因检测在 NSCLC 个体化治疗中的作用越来越受到重视。依托靶标检查进行的肺癌个体化治疗, 是通过检查肺癌患者携带的药物疗效相关的靶标基因, 按照患者个体的基因检测结果, 为肺癌患者制订最佳的治疗方案, 从而避免传统治疗的盲目性。本研究通过检查 EGFR 突变与 ERCC1 和 TYMS 在 NSCLC 患者肿瘤组织中的 mRNA 表达水平, 并分析其间的相关性, 为 NSCLC 的个体化治疗提供新的思路。

研究显示, 靶向治疗只对 EGFR 基因突变的患者有效, 而对 EGFR 基因野生型基本无效, 因此, NSCLC 靶向治疗前检测 EGFR 基因突变就显得尤为重要^[7]。本研究结果显示, EGFR 基因突变率为 30%, 主要为 21 号外显子的点突变和 19 号外显子的缺失, 在女性、无吸烟史、腺癌患者 EGFR 突变检出率远高于男性、有吸烟史、鳞癌的患者, 与 IPASS 研究报道相符^[3]。

ERCC1 与铂类化疗药物耐药的发生有关, ERCC1 mRNA 表达高低与铂类药物化疗效果呈负相关, 在使用铂类药物化疗前检测 ERCC1 mRNA 表达可预测铂类药物化疗的耐药性或敏感性^[8-9]。Kalogeraki 等^[10] 分析了 45 例 NSCLC 的 EGFR 突变及 ERCC1 mRNA 表达情况, 发现 ERCC1 低表达者具有更高的总生存率 (OS), ERCC1 阳性表达中 EGFR 突变率为 14.8%, ERCC1 阴性表达中 EGFR 突变率为 33.3%。研究发现, 受损的核苷酸切除修复酶可引起细胞 DNA 的损害, 致使 EGFR 突变率升高, ERCC1 低表达肺肿瘤细胞 DNA 受损修复能力较差, 导致 EGFR 基因更易出现突变, 最终产生的结果是 EGFR 基因突变对铂类为基础的化疗药物敏感性更高^[11]。本研究显示, EGFR 基因突变与 ERCC1 mRNA 表达具有显著的相关性, 与文献报道一致^[10, 12-13]。

研究显示, TYMS 与培美曲塞的耐药发生相关, 低表达的 TYMS mRNA 患者使用培美曲塞化疗效果较好, 而高表达患者疗效较差; 对晚期肺腺癌患者采用培美曲塞单药治疗, EGFR 突变组 RR 和中位 PFS 均优于野生组^[4, 14]。为什么 EGFR

突变组的生存率要优于野生组呢? Giovannetti 等^[15] 研究发现, EGFR 突变的 H1650 细胞株表达低水平的 TYMS 酶可能是导致 EGFR 突变组生存率较好的原因。但本研究显示, EGFR 基因突变与 TYMS 基因表达无明显相关性。分析其原因, 可能是本研究样本量较小, 尚有待今后大样本的研究进一步证实。

本研究发现了非小细胞肺癌 EGFR 突变患者中 ERCC1 阴性表达率较高, 由此推断 EGFR 突变的 NSCLC 使用铂类的化疗效果可能较好。但临床上是否能得出这一结论, 还需要对这些患者进行长期随访。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Ettinger DS, Akerley W, Borghaei H, et al. Non-small cell lung cancer, version 2. 2013[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2013, 11(6): 645-653.
- [3] Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS)[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(21): 2866-2874.
- [4] Wu SG, Yang CH, Yu CJ, et al. Good response to pemetrexed in patients of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations[J]. Lung Cancer, 2011, 72(3): 333-339.
- [5] Xu J, He J, Yang H, et al. Somatic mutation analysis of EGFR, KRAS, BRAF and PIK3CA in 861 patients with non-small cell lung cancer[J]. Cancer Biomark, 2011, 10(2): 63-69.
- [6] Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, et al. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(2): 504-512.
- [7] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(2): 121-128.
- [8] Larminat F, Bohr VA. Role of the human ERCC-1 gene in gene-specific repair of cisplatin-induced DNA damage[J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22(15): 3005-3010.
- [9] 钟宏, 冷雪峰, 阳诺, 等. 非小细胞肺癌组织中 ERCC1 mRNA 表达的及其与辅助化疗和预后的关系[J]. 重庆医学, 2014, 43(9): 1058-1060.
- [10] Kalogeraki A, Karvela-Kalogeraki I, Tamiolakis D, et al. ERCC1 expression correlated with EGFR and clinicopathological variables in patients with non-small cell lung cancer. An immunocytochemical study on fine-needle aspiration biopsies samples[J]. Rev Port Pneumol, 2014, 20(4): 200-207.
- [11] Olaussen KA, Fouret P, Kroemer G. ERCC1-specific immunostaining in non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2007, 357(15): 1559-1561. (下转第 1183 页)

达的检测结果表明,作者发现 HIF-1 α 蛋白的大量表达与胃癌浸润程度大、TNM 分期高、发生淋巴结转移之间存在正相关性。MACC1 最早发现于结肠癌组织中,其与结肠癌的转移密切相关^[14]。MACC1 可以调控 c-Met 的表达,调节 HGF/c-Met 途径,增强肿瘤细胞迁移侵袭的能力,促进胃癌细胞的淋巴结转移和浸润。研究发现 MACC1 的表达程度将直接影响胃癌患者生存率^[15]。本研究结果得出相同结论,胃癌浸润程度越大、TNM 分期越高、伴随转移淋巴结的标本中,MACC1 表达阳性率越大。FOXO4 属于 FOXO 转录因子家族,因其具有下调 HIF-1 α 蛋白表达、抑制肿瘤血管生成、抑制肿瘤细胞增殖的作用而成为近年来的研究热点^[16]。本研究发现 FOXO4 在胃癌组织中表达明显低于癌旁组织,而且其表达水平与胃癌浸润程度、TNM 分期、淋巴结转移有显著负相关性。大量的临床研究发现,HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 的表达水平会严重影响胃癌患者的预后,他们与胃癌复发、远端淋巴结转移密切相关^[13,15-16]。本研究随访发现 HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 的表达情况直接影响胃癌患者的 5 年生存率,而且 HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 因子之间存在显著相关性,共同影响胃癌患者的预后生存水平。

参考文献

- [1] Glehen O, Gilly FN, Arvieux C, et al. Peritoneal carcinomatosis from gastric cancer; a multi-institutional study of 159 patients treated by cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy[J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(9): 2370-2377.
- [2] Cavallaro U, Christofori G. Multitasking in tumor progression; signaling functions of cell adhesion molecules[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2004, 1014(4): 58-66.
- [3] 刘兴振, 沈康平. 缺氧诱导因子 1 功能调节及其在凋亡中的研究进展[J]. *重庆医学*, 2010, 39(19): 2675-2677.
- [4] Corzo CA, Condamine T, Lu L, et al. HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(11): 2439-2453.
- [5] Wang J, Ni Z, Duan Z, et al. Altered expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and its regulatory genes in gastric cancer tissues[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99835.
- [6] 王圣巍, 成延萍, 魏晓萍, 等. HIF-1 α 在胃癌组织中的表

达及其意义[J]. *山东医药*, 2012, 29(52): 20-22.

- [7] Shimokawa H, Uramoto H, Onitsuka T, et al. Overexpression of MACC1 mRNA in lung adenocarcinoma is associated with postoperative recurrence[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2011, 141(4): 895-898.
- [8] Shirahata A, Sakata M, Kitamura Y, et al. MACC1 as a marker for peritoneal-disseminated gastric carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(9): 3441-3444.
- [9] Xu MM, Mao GX, Liu J, et al. Low expression of the FoxO4 gene may contribute to the phenomenon of EMT in non-small cell lung cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(9): 4013-4018.
- [10] Kim JW, Evans C, Weidemann A, et al. Loss of fibroblast HIF-1 α accelerates tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(13): 3187-3195.
- [11] Koh MY, Lemos R, Liu X, et al. The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 α -to HIF-2 α -dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(11): 4015-4027.
- [12] Isobe T, Aoyagi K, Koufujii K, et al. Clinicopathological significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) expression in gastric cancer[J]. *Int J Clin Oncol*, 2013, 18(2): 293-304.
- [13] Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics[J]. *Trends Mol Med*, 2002, 4(8): S62-S67.
- [14] Stein U, Walther W, Arlt F, et al. MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis[J]. *Nat Med*, 2009, 15(1): 59-67.
- [15] Ma J, Ma J, Meng Q, et al. Prognostic value and clinical pathology of MACC-1 and c-MET expression in gastric carcinoma[J]. *Pathol Oncol Res*, 2013, 19(4): 821-832.
- [16] Su L, Liu X, Chai N, et al. The transcription factor FOXO4 is down-regulated and inhibits tumor proliferation and metastasis in gastric cancer[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1): 378.

(收稿日期: 2014-10-10 修回日期: 2014-12-10)

(上接第 1179 页)

- [12] 李梅芳, 欧阳学农, 余宗阳, 等. 非小细胞肺癌 EGFR 突变与 ERCC1 和 BRCA1 表达相关性的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2012, 19(18): 1393-1396.
- [13] Gandara DR, Grimminger P, Mack PC, et al. Association of epidermal growth factor receptor activating mutations with low ERCC1 gene expression in non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(12): 1933-1938.
- [14] Kotoula V, Krikelis D, Karavasilis V, et al. Expression of DNA repair and replication genes in non-small cell lung cancer (NSCLC): a role for thymidylate synthetase

(TYMS) [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(1): 342. doi: 10.1186/1471-2407-12-342.

- [15] Giovannetti E, Lemos C, Tekle C, et al. Molecular mechanisms underlying the synergistic interaction of erlotinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with the multitargeted antifolate pemetrexed in non-small-cell lung cancer cells[J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 73(4): 1290-1300.

(收稿日期: 2014-10-03 修回日期: 2014-12-13)