

# ERCC1 表达与晚期 NSCLC 吸烟患者预后的相关性研究

孙江涛<sup>1,2</sup> 原翔<sup>1,3</sup> 宋开放<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探讨切除修复交叉互补基因 1 (ERCC1) 在晚期非小细胞肺癌 (NSCLC) 吸烟患者中的表达及其与临床特征与预后的关系。方法 应用 PCR 技术检测 96 例晚期 NSCLC 吸烟患者肿瘤组织中 ERCC1 的表达水平, 分析其表达水平与晚期 NSCLC 患者临床病理因素、治疗效果及生存期的相关性。结果 ERCC1 的表达与吸烟指数有关 ( $P=0.029$ ), 与其他临床病理因素无关。ERCC1 低表达的患者化疗有效率、中位生存期均优于高表达的患者, 差异有统计学意义 ( $P=0.001$ ,  $P<0.01$ )。结论 ERCC1 的表达与吸烟指数有关且 ERCC1 低表达的患者化疗有效率和中位生存期均优于高表达的患者, 提示检测 ERCC1 对晚期 NSCLC 吸烟患者的治疗效果及预后的评估有一定参考价值。

**关键词** 非小细胞肺癌; 吸烟; ERCC1; 预后

**中图分类号** R 734.2

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2017)07-1069-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.029

肺癌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% 左右<sup>[1]</sup>。吸烟是导致肺癌发病的重要因素之一, 研究<sup>[2]</sup>表明每年患肺癌的男性 80% 以上与吸烟有关, 50% 以上女性患者直接或间接受到吸烟的致病影响。因肺癌的肿瘤生物学特性, 多数 NSCLC 患者确诊时已失去了手术治疗机会, 联合铂类的化学治疗可以有效延长患者的生存期, 提高患者的生活质量<sup>[3]</sup>, 目前仍然是 NSCLC 化学治疗的基础。然而, 与铂类细胞毒性代

谢相关的切除修复交叉互补基因 1 (excision repair cross complementing gene 1, ERCC1) 在晚期 NSCLC 吸烟患者中表达水平与患者治疗效果、生存期、吸烟因素相关性尚不明确。该研究旨在探讨 ERCC1 与晚期 NSCLC 吸烟患者治疗效果及预后的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集 2010 年 1 月~2012 年 6 月在河南科技大学第一附属医院确诊的 NSCLC 吸烟患者 96 例, 其中男 82 例 (85.4%), 女 12 例 (14.6%); 年龄 22~78 (45±16) 岁; 临床分期: III B 期 45 例 (46.9%), IV 期 51 例 (53.1%); 病理类型: 腺癌 52 例 (54.1%), 鳞癌 39 例 (40.6%), 其他 (包括大细胞癌 2 例, 混合型腺鳞癌 3 例) 5 例 (5.2%)。入组患者均为吸烟患者 (吸烟的定义为: 每日至少抽吸 1 支且最少持续 1 年以上), 其中吸烟指数 <400 的患者 45 例 (46.9%) (吸烟指数定义为: 平均每日吸烟支数与吸烟年数乘积), 吸烟指数 ≥400 的患者 51 例 (53.1%)。患者入组标准为: 患者均接受以铂类为基础的联合化疗治疗 4~6 周期且接受 ERCC1 基因检测, KPS 评分均 ≥70 分, 肝肾功能、凝血及心电图正常, 患者 PS 评分 <3 分, 预计生存期在半年以上。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 标本收集和主要试剂** 96 例标本 (经 CT 引导下肺穿刺活检获得组织标本 46 例, 经纤维支气管镜获得标本 32 例, 经胸腔镜辅助下获得标本 18 例) 在液氮中短暂保存后, 转移至 -80 °C 低温冰箱中长期保存。提取总 RNA 试剂盒 (离心柱型) 购自北京百泰克生物技术有限公司; 荧光定量 PCR 使用 SuperReal ColorPreMix (FP215) 购自北京天根生化科技有限公司; 探针及荧光定量试剂盒购自日本

2017-02-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: U1404817)

作者单位: <sup>1</sup>河南科技大学临床医学院, 洛阳 471003

<sup>2</sup>河南科技大学第一附属医院肿瘤外科, 洛阳 471003

<sup>3</sup>河南科技大学肿瘤研究所, 洛阳 471003

作者简介: 孙江涛, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: sunjiangtao135@163.com

the different types of OOC with individualized treatment plan could contribute to a curative effect. Age is correlated with Glazer evaluation and the curable effect. The findings provides clinical directive significance of the selection of treatment schedules for the different types of OOC.

**Key words** OOC; biofeedback; Spearman analysis

TaKaRa 公司;ABI 7500 Real Time PCR 扩增仪购自美国应用生物系统公司。

**1.2.2 主要步骤** 将模板 RNA 在冰上解冻:5×g DNA Buffer、FQ-RT Primer Mix、10×Fast RT Buffer、RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 在室温 15~25 °C 解冻,解冻后迅速置于冰上。将配制好的反应液(10×Fast RT Buffer 2 μl, RT Enzyme Mix 1 μl, FQ-RT Primer Mix 2 μl, RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 10 μl) 加到反转录中的 Mix 中, 42 °C 孵育 15 min; 95 °C 孵育 3 min。然后进行 PCR 扩增。反应条件为:95 °C、15 s, 60 °C、30 s, 40 个循环。反应结束后分析荧光值变化曲线和基因熔解曲线。ERCC1 的熔解曲线见图 1。

**1.2.3 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,然后在 1 000 例正常基因表达数据库(上海宝藤公司建立)中进行比较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-)。

**1.3 治疗方案及患者随访** 96 例晚期 NSCLC 患者经确诊后行 4 周期的铂类为基础的联合药物化疗。如 GP 方案:吉西他滨(1 000 mg/m<sup>2</sup> 静脉滴注,第 1、8 天)+顺铂(75 mg/m<sup>2</sup> 静脉滴注,第 1~2 天),每 3 周 1 次;TP 方案:多西紫杉醇(75 mg/m<sup>2</sup> 静脉滴注,第 1 天)+顺铂(75 mg/m<sup>2</sup> 静脉滴注,第 1~2 天);NP 方案:长春瑞滨(25 mg/m<sup>2</sup> 静脉滴注,第 1、8 天)+顺铂(75 mg/m<sup>2</sup> 静脉滴注,第 1~2 天),每 3 周 1 次。资料的随访方式包括:定期复查、电话随访、家庭访问。

**1.4 疗效评估** 为了评估治疗效果,常规化疗 2~4 周期后患者均行胸片、胸腹部 CT、颅脑 MRI、腹部 B 超等影像学检查,参照 WHO 关于肿瘤化疗疗效评价标准: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)。化疗有效率:CR+PR 患者所占全部化疗患者的百分率。生存时间:指患者从确诊之日起至死亡或未次随访时间。本研究随访截止日期为 2016 年 3 月,生存时间以月为单位。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 21.0 软件进行分析,计数资料的比较采用  $\chi^2$  或 Fisher 确切概率法,使用 Kaplan-Meier 统计学方法计算患者的生存期并绘制生存曲线,采用 Log-rank 进行差异检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,所有  $P$  值都是双侧检测的结果。

## 2 结果

**2.1 ERCC1 的表达与 NSCLC 吸烟患者的临床病理特征关系** ERCC1 在 96 例患者高表达 55 例(57.2%),低表达为 41 例(42.8%),ERCC1 在 NSCLC 吸烟患者中的表达与性别、年龄、病理类型、分化程度、TNM 分期等因素无关。而 ERCC1 的高表达与吸烟指数有关( $\chi^2 = 4.744, P = 0.029$ )。见表 1。

**2.2 ERCC1 的表达与 NSCLC 吸烟患者化疗疗效的关系** ERCC1 高表达的吸烟患者化疗疗效为:CR 3 例,PR 13 例,SD 18 例,PD 22 例,化疗有效率为 28.5%(16/56);ERCC1 低表达的吸烟患者 CR 6 例,PR 19 例,SD 9 例,PD 6 例,化疗有效率为 62.5%(25/40),两组化疗疗效对比后,差异有统计学意义( $\chi^2 = 10.97, P = 0.001$ )。见表 2。

表 1 ERCC1 的表达与 NSCLC 吸烟患者的临床病理特征关系 [n(%)]

临床病理特征	ERCC1(+)	ERCC1(-)	$\chi^2$ 值	$P$ 值
性别				
男	48(85.7)	36(90.0)	0.392	0.531
女	8(14.3)	4(10.0)		
年龄(岁)				
<60	25(44.6)	19(47.5)	0.077	0.782
≥60	31(55.4)	21(52.5)		
病理类型				
腺癌	32(57.1)	20(50.0)	0.549	0.760
鳞癌	21(37.5)	18(45.0)		
其他	3(5.4)	2(5.0)		
分化程度				
高	11(19.6)	4(10.0)		
中	19(33.9)	14(35.0)	1.739	0.419
低	26(46.4)	22(55.0)		
TNM 分期				
ⅢB	25(44.6)	20(50.0)	0.269	0.604
Ⅳ	31(55.3)	20(50.0)		
吸烟指数(支/年)				
<400	21(37.5)	24(60.0)	4.744	0.029
≥400	35(62.5)	16(40.0)		

表 2 ERCC1 的表达与 NSCLC 吸烟患者化疗疗效的关系(n)

化疗效果	ERCC1(+)	ERCC1(-)	$\chi^2$ 值	$P$ 值
CR	3	5	-	-
PR	13	20	-	-
SD	18	19	-	-
PD	22	6	-	-
CR+PR	16	25	10.97	0.001
SD+PD	40	15	-	-

**2.3 ERCC1 的表达与 NSCLC 吸烟患者预后的关系** 本组 96 例 NSCLC 吸烟患者中 1 例失访,实际

随访患者 95 例。最终在 55 例 ERCC1 高表达的吸烟患者其中位生存期为 11.8 个月(95% CI: 11.18 ~ 12.41), 40 例 ERCC1 低表达的吸烟患者其中位生存期为 15.2 个月(95% CI: 14.27 ~ 16.13), 两组患者总生存期差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 24.90, P < 0.01$ )。见图 2。

在以铂类为基础的化疗吸烟指数不同的患者预后的关系分析中, 吸烟指数 < 400 的 44 例患者(1 例失访) 中位生存期 13.9 个月(95% CI: 12.91 ~ 14.87), 吸烟指数  $\geq 400$  的患者中位生存期为 11.8 个月(95% CI: 11.01 ~ 12.59), 两组患者总生存期差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 7.480, P = 0.006$ )。见图 3。

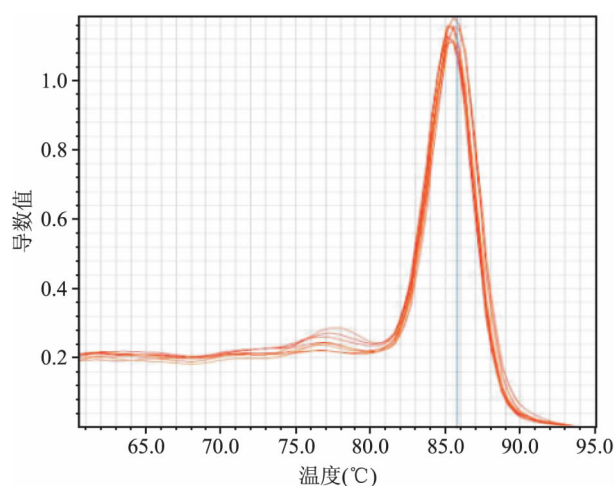


图 1 ERCC1 的基因熔解曲线

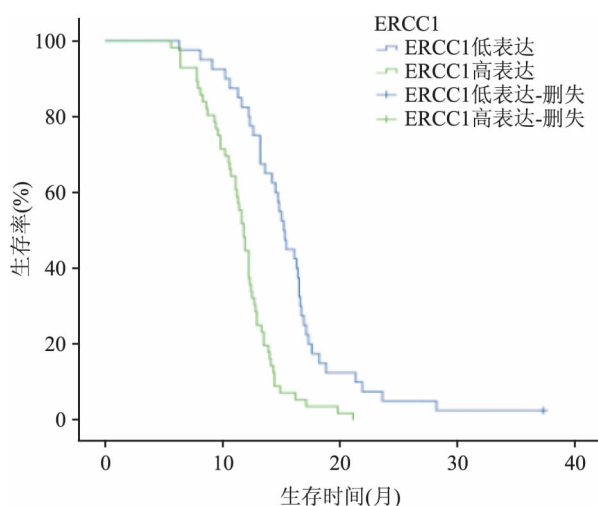


图 2 ERCC1 的表达与患者生存期关系

### 3 讨论

ERCC1 定位于人类第 19 号染色体上, 全部长度

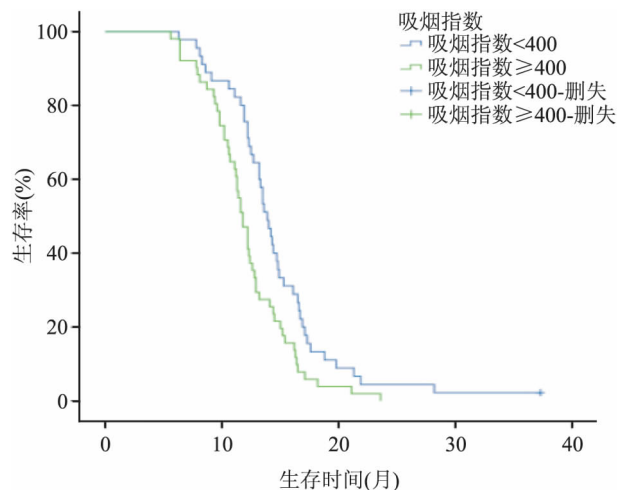


图 3 吸烟指数与患者生存期关系

约 17 000 bp, 其是核苷酸剪切修复 (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>。而铂类化疗药物作用原理为主要通过肿瘤细胞内的亲核 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]</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疗药与 ERCC1 的表达密切相关。

Xu et al<sup>[6]</sup> 研究发现: 在 257 例 NSCLC 患者中, ERCC1 的高低表达与患者性别、年龄、肿块大小、病理类型、吸烟与否等临床病理因素无相关性; 而穆清爽等<sup>[7]</sup> 对 80 例维族 NSCLC 患者肿瘤组织中 ERCC1 与 BRCA1 的表达水平进行检测结果显示: ERCC1 的表达与吸烟与否有关, ERCC1 在吸烟患者中高表达的患者多于不吸烟的患者。本实验结果显示: 在吸烟患者中 ERCC1 的高表达与吸烟指数有关, 与其他临床病理因素无关, 分析原因可能是由于种族因素、病史采集、实验分组、mRNA 检测方法不同造成的。

Lord et al<sup>[8]</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 化疗方案治疗, 结果显示: ERCC1 mRNA 低表达的患者的中位生存期明显长于高表达患者 (61.6 周 vs 20.4 周), 差异有统计学意义。然而 Toffart et al<sup>[9]</sup> 对 537 例 NSCLC 患者的研究中显示, ERCC1、BRCA1 等基因的表达水平不能预测患

者的化疗有效率、中位无病生存期和中位生存期。本实验结果显示 ERCC1 低表达的吸烟患者化疗有效率 (62.5%) 明显高于高表达的吸烟患者 (28.5%) ,差异有统计学意义。ERCC1 低表达患者的中位生存期为 15.2 个月 ,高于高表达患者的 11.8 个月 ,差异有统计学意义。结果与研究<sup>[8]</sup>结果一致 ,分析研究差异原因可能是因为各研究组采用的检测方法、实验对象不同造成的。Lord et al<sup>[8]</sup>运用免疫组化方法分析 ERCC1 等目的基因的表达水平 ,与 PCR 原理分析 mRNA 的表达水平不同的是免疫组化是在蛋白表达水平进行分析研究 ,实验材料往往需要较大的组织标本 ,并且实验结果的判断往往依据病理科医师的主观判断。而 PCR 是定量研究 ,较小的组织标本即可参与研究 ,更能方便和准确地应用于临床。

值得注意的是在接受铂类为基础化疗的患者中 ,吸烟指数不同的两组吸烟患者其生存期存在较大差异 ,吸烟指数<400 的患者中位生存期优于吸烟指数≥400 的患者 (13.9 个月 vs 11.8 个月) 。分析原因可能是 ERCC1 在吸烟指数<400 的患者中低表达的患者较多 ,化疗有效率较高 ,患者中位生存期较长。Nordquist et al<sup>[10]</sup>发现在晚期 NSCLC 患者中不吸烟的患者预后明显优于吸烟患者 ,吸烟数量的多少是影响患者预后的独立危险因素。Yano et al<sup>[11]</sup>研究发现与吸烟患者相比 ,不吸烟患者往往淋巴结转移较晚 ,预后较好。虽然大量研究<sup>[10-11]</sup>表明吸烟因素是影响 NSCLC 患者预后的独立危险因素 ,但其导致化疗耐药、患者免疫抵抗、预后不良等原因目前仍在探索阶段 ,在今后的研究中有待于进一步探讨。

综上所述 ,吸烟指数影响 ERCC1 的表达水平 ,检测 ERCC1 表达水平可在 NSCLC 吸烟患者中预测含铂类化疗药的治疗效果及生存期 ,为 NSCLC 吸烟

患者的治疗及预后提供新的研究方向。

### 参考文献

[1] Han Y , Wang X B , Xiao N , et al. mRNA expression and clinical significance of ERCC1 , BRCA1 , RRM1 , TYMS and TUBB3 in postoperative patients with non-small cell lung cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev* , 2013 , 14(5) :2987-90.

[2] Jemal A , Bray F , Center M M , et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin* , 2011 , 61(2) :69-90.

[3] Boni C , Zanelli F , Ambroggi M , et al. Non-small-cell lung cancer: which platinum for gemcitabine? [J]. *Ann Oncol* , 2006 , 17 Suppl 5 :v79-81.

[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) :212-6.

[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] 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) :880-4.

[7] 穆清爽 , 韩利梅. 维吾尔民族非小细胞肺癌组织中的 ERCC1、BRCA1 的表达及预后关系的研究 [J]. *重庆医科大学学报* , 2011 , 36(10) :1197-201.

[8] Lord R V , Brabender J , Gandara D , et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res* , 2002 , 8(7) :2286-91.

[9] Toffart A C , Timsit J F , Couraud S , et al. Immunohistochemistry evaluation of biomarker expression in non-small cell lung cancer (Pharmacogenoscan study) [J]. *Lung Cancer* , 2014 , 83(2) :182-8.

[10] Nordquist L T , Simon G R , Cantor A , et al. Improved survival in never-smokers vs current smokers with primary adenocarcinoma of the lung [J]. *Chest* , 2004 , 126(2) :347-51.

[11] Yano T , Miura N , Takenaka T , et al. Never-smoking non-small cell lung cancer as a separate entity: clinicopathologic features and survival [J]. *Cancer* , 2008 , 113(5) :1012-8.

## Relationship between expression of ERCC1 and prognosis of smoking patients with advanced NSCLC

Sun Jiangtao<sup>1,2</sup> , Yuan Xiang<sup>1,3</sup> , Song Kaifang<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>College of Clinical Medicine , Henan University of Science and Technology Luoyang 471003; <sup>2</sup>Dept of Surgical Oncology , The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology Luoyang 471003; <sup>3</sup>Cancer Research Institute , Henan University of Science and Technology Luoyang 471003)

**Abstract Objective** To investigate the expression of ERCC1 in smoking patients with advanced non-small cell (下转第 1077 页)

- pha-2a vs. interferon alpha-2a on intrahepatic covalently closed circular DNA in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2016, 40(3): 304-8.
- [6] Cho H, Kelsall B L. The role of type I interferons in intestinal infection, homeostasis, and inflammation [J]. *Immunol Rev*, 2014, 260(1): 145-67.
- [7] Guidotti L G, Chisari F V. Cytokine-mediated control of viral infections [J]. *Virology*, 2000, 273(2): 221-7.
- [8] Li L, Lei Q S, Zhang S J, et al. Suppression of USP18 potentiates the anti-HBV activity of interferon alpha in HepG2. 2. 15 cells via JAK/STAT signaling [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159019.
- [9] Wu L, Wang W, Zhang X, et al. Anti-HBV activity and mechanism of marine-derived polyguluronate sulfate (PGS) *in vitro* [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 143: 139-48.
- [10] 徐艳玲, 刘令九, 侯丽娟, 等. 干扰素  $\alpha$ -2a 与白细胞介素-2 联合作用对体外 HepG2. 2. 15 细胞增殖及乙型肝炎病毒复制的影响 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26(7): 969-73.
- [11] 周尧远, 蒋孟军, 张荣军, 等. 干扰素  $\alpha$ -2b 对 HepG 2.2.15 细胞增殖、凋亡及 HBsAg 与 HBeAg 表达的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(5): 733-5.
- [12] 管世鹤, 杨凯, 陆蒙吉, 等. 乙型肝炎病毒及其抗原成分对干扰素信号传导途径分子和抗病毒蛋白表达的影响 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2011, 19(6): 440-4.
- [13] Liongue C, O'Sullivan L A, Trengrove M C, et al. Evolution of JAK-STAT pathway components: mechanisms and role in immune system development [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32777.
- [14] Schindler C, Plumlee C. Interferons pen the JAK-STAT pathway [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 19(4): 311-8.
- [15] Bai L, Zhang W, Tan L, et al. Hepatitis B virus hijacks CTHRC1 to evade host immunity and maintain replication [J]. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7(6): 543-56.

## Differential expressions of HBsAg and HBeAg by HepG2. 2. 15 cells and their reactivity to IFN- $\alpha$

Tang Bo<sup>1</sup>, Wei Jiajia<sup>2</sup>, Xu Bingfa<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>*School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

<sup>2</sup>*Dept of Pharmacy, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230061)*

**Abstract** 10 single-cell clones of HepG2. 2. 15 cells were isolated by limited dilution and their expressions of HBsAg and HBeAg were determined by ELISA. According to expressions of HBsAg and HBeAg, the highest, medium and the lowest-expression clones were selected. Cytotoxicity of IFN- $\alpha$  were analyzed by MTT assay and the results suggested that IFN- $\alpha$  showed similar cytotoxicity to the different clonal cell lines. The clones were treated with IFN- $\alpha$  and HBsAg and HBeAg expressions were determined by ELISA. IFN- $\alpha$  weakly inhibited HBeAg expression and strongly inhibited HBsAg expression and HBV DNA replication, and the inhibition effect was stronger for those with higher expression levels. HBsAg and HBeAg were differentially expressed in HepG2. 2. 15 cells and the highly expressed clones were more sensitive to IFN- $\alpha$ .

**Key words** HepG2. 2. 15; HBV; IFN- $\alpha$

(上接第 1072 页)

lung cancer (NSCLC) and its relationship with clinical features and prognosis. **Methods** The expression of ERCC1 was detected in 96 patients with advanced NSCLC by PCR assay. The clinicopathologic factors, treatment effect and survival time were observed. **Results** The expression of ERCC1 was related to smoking index ( $P=0.029$ ), but it was not related to other clinicopathological factors. The patients with low expression of ERCC1 had better response rate and median survival time when compared to those with high expression patients. The difference was statistically significant ( $P=0.001$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion** ERCC1 expression is associated with smoking index and the patients with low expression of ERCC1 shows higher chemotherapy efficiency and longer median survival than patients with high expression, which indicates that detection of ERCC1 may be a useful parameter in evaluating the therapeutic effect and prognosis of smoking patients with advanced NSCLC.

**Key words** non-small cell lung cancer; smoking; ERCC1; prognosis