

· 实验研究 ·

新辅助化疗对乳腺癌耐药基因 ERCC1 表达的影响

傅建民 周颀 谢建生 李辉

【摘要】 目的 探讨核苷酸切除修复基因家族成员 ERCC1 基因在乳腺癌中的表达情况和新辅助化疗对其的影响及临床意义。方法 RT-PCR 检测 56 例术前未行治疗的乳腺癌标本和 36 例术前曾接受新辅助化疗的乳腺癌标本中 ERCC1 基因的表达。结果 未化疗组的乳腺癌中, ERCC1 基因阳性表达率为 37.5%, 其表达水平与患者的年龄 ($t = 0.229, P > 0.05$)、肿瘤大小 ($F = 0.586, P > 0.05$)、淋巴结转移 ($t = 0.365, P > 0.05$)、病理分型 ($t = 0.434, P > 0.05$)、组织学分级 ($F = 0.820, P > 0.05$)、ER ($t = 0.523, P > 0.05$)、PR ($t = 0.416, P > 0.05$) 和 HER-2 ($t = 0.847, P > 0.05$) 均无明显相关性。新辅助化疗组 ERCC1 基因的表达水平高于未化疗组, 差异有统计学意义 ($t = 3.428, P < 0.01$)。结论 耐药基因 ERCC1 的表达不受乳腺癌临床病理特征的影响, 但新辅助化疗可能上调 ERCC1 基因的表达水平, 在术后化疗中应予重视。

【关键词】 乳腺肿瘤; 新辅助化疗; 核苷酸切除修复; ERCC1; 多药耐药基因

【中图法分类号】R737.9, R730.53 **【文献标识码】** A

Influence of neoadjuvant chemotherapy on drug resistance gene ERCC1 in breast cancer FU Jian-min, ZHOU Jie, XIE Jian-sheng, LI Hui. Department of Breast, Shenzhen Maternal and Child Health Hospital, Southern Medical University, Shenzhen 518028, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression and clinical significance

基金项目:深圳市卫生局重点项目(200628)

作者单位:518028 广东 深圳,南方医科大学附属深圳市妇幼保健院乳腺科(傅建民、周颀),中心实验室(谢建生、李辉)

of ERCC1 gene, one member of the nucleotide excision repair gene family, in breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy. **Methods** The expression of ERCC1 gene was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in 56 specimens of breast cancer patients without any preoperative treatment and 36 tumor tissues of the patients who had been treated by neoadjuvant chemotherapy preoperatively. **Results** The positive expression rate of ERCC1 gene in breast cancer was 37.5%, and its expression had no relations with patient's age ($t=0.229, P>0.05$), tumor size ($F=0.586, P>0.05$), axillary lymph node metastasis ($t=0.365, P>0.05$), pathological type ($t=0.434, P>0.05$), histological grade ($F=0.820, P>0.05$), ER ($t=0.523, P>0.05$), PR ($t=0.416, P>0.05$), and HER-2 ($t=0.847, P>0.05$). The expression of ERCC1 gene in tumor was higher in neoadjuvant chemotherapy group than in the non-chemotherapy group, and there was a statistically significant difference ($t=3.428, P<0.01$). **Conclusions** The expression of ERCC1 gene is not affected by the clinical and pathological features of breast cancer, but may be increased by neoadjuvant chemotherapy, so postoperative neoadjuvant chemotherapy should be given much attention.

【Key words】 Breast neoplasms; Neoadjuvant chemotherapy; Nucleotide excision repair; ERCC1; Multidrug resistance gene

乳腺癌新辅助化疗对于临床Ⅱ_B、Ⅲ期患者具有使肿瘤降期、提高切除率和了解肿瘤对化疗敏感程度的重要作用。临床医师在专注于手术切除率及术后生存率的同时,却常常忽视新辅助化疗对肿瘤生物学特性改变及其基因表达水平的影响。ERCC1(excision repair cross complementation group1)基因是人类细胞DNA损伤后核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)途径基因家族的重要成员之一。它的表达产物通过形成一种杂合二聚体的结构,连接5'端的核酸内切酶,因此具有损伤识别和切除5'端的双重作用。近年来的研究显示,ERCC1的低表达常伴随着癌症发病率的增加,而高表达往往与化疗多药耐药有关^[1]。为初步了解ERCC1在乳腺癌中的表达情况及新辅助化疗对ERCC1基因表达水平的影响,本研究利用冻存的乳腺癌标本,采用成组设计的对照实验,用RT-PCR进行检测并对该基因的临床意义进行回顾性分析。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集2006年6月至2007年11月间在本院行手术治疗的乳腺癌病例共

92例,患者均为女性。其中术前接受新辅助化疗者36例(新辅助化疗组),年龄在28~59岁间,中位年龄40岁。依据第6版AJCC乳腺癌cTNM分期方案:Ⅱ期28例,Ⅲ期8例,无Ⅰ,Ⅳ期病例;伴淋巴结转移11例,不伴淋巴结转移25例;病理类型包括非特殊型癌(小叶癌和导管癌)31例和特殊型癌5例;组织学分级(Elston and Ellis分级法):Ⅰ级5例,Ⅱ级18例,Ⅲ级13例。该组接受ET方案2~4个周期,表柔比星(EPI)80 mg/m²,第1天,静脉注射;多西他赛(TXT)75 mg/m²,第1天,静脉注射,21 d为1个周期。依据WHO有关实体瘤药物治疗的疗效评价标准:临床缓解(CR)13例,其中病理完全缓解(pCR)7例;部分缓解(PR)18例,有效率(CR + PR)达86.1% (31/36),病情无变化(NC)5例,无疾病进展(PD)病例。新辅助化疗后10~14 d手术,其中20例行保乳手术,保乳手术率为55.6% (20/36)。其他56例患者术前未接受任何临床治疗(未化疗组),年龄在28~67岁间,中位年龄43岁;临床Ⅰ期17例,Ⅱ期31例,Ⅲ期8例,无Ⅳ期;伴淋巴结转移10例,不伴淋巴结转移46例;非特殊型癌(小叶癌和导管癌)48例和特殊型癌8例;组织学分级Ⅰ级12例,Ⅱ级24例,Ⅲ级20例。两组患者的年龄、淋巴结转移、临床分期、病理分型、组织分级情况近似,差异无统计学意义,具有可比性。本研究对未接受任何临床治疗的未化疗组进行临床病理特征分析,术前未知腋窝淋巴结情况的新辅助化疗组未纳入分析。

1.2 RT-PCR 检测

总RNA提取试剂盒及RT-PCR试剂盒购自深圳晶美生物公司。步骤:(1)总RNA提取。取乳腺癌组织300 mg,置入液氮预冷的研钵中研磨,用药匙收集进15 ml的EP管,加Trizol液(每100 mg组织加1 ml Trizol)充分混匀静置5 min。采用氯仿-异丙醇法提取总RNA,电泳可见28 S、18 S、5 S 3个条带。紫外分光光度计鉴定RNA的纯度,测定A_{260 nm}/A_{280 nm}的比值均在1.8~2.0之间。(2)第一链cDNA合成。总RNA 1 μg,oligo(dT)₁₈引物1 μl,焦碳酸二乙酯(DEPC)水补至12 μl,70 °C 5 min 孵育,冰上骤冷;顺序加入5 × buffer 4 μl, Ribonuclease inhibitor 20 U, 10 mmol/L dNTP 2 μl,置37 °C 5 min 孵育,加200 U M-MuLV,终体积20 μl。置42 °C 60 min 孵育,70 °C 10 min,冰上骤冷,cDNA -20 °C保存。(3)PCR。引物由上海生工公司合成,ERCC1 Sense 5'-

CAGGGCCGCCAGCAAGGAAG-3', Antisense 5'-AGCCGCCCATGGATG-TAGTCTG-3' (430 bp); β -actin Sense 5'-GCCGGAAATCGTGCGTGACATT-3', Antisense 5'-CACGAAACTACCTTCAACTCCATC-3' (233 bp)。反应体系: 10mmol/L dNTP 1 μ l, 10 \times PCR 缓冲液 5 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ l, 上下游特异引物各 25 pmol, cDNA 5 μ l, Taq 酶 2.5 U, 加去离子水至 50 μ l, 充分混匀, 短暂离心, 94 $^{\circ}$ C 预热 5 min, 扩增 30 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 94 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 稳压电泳 500 V/M 约 1.0 h, 5 g/L 溴化乙锭 (EB) 染色 20 min 后在紫外灯下观察、凝胶成像系统拍照成像, LabWork S4 图形分析处理系统分析, ERCC1 扩增带灰度与内参 β -actin 扩增带灰度之比值, 即表示 ERCC1 mRNA 的相对表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 完成统计处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 两小样本均数比较采用 *t* 检验或 *t'* 检验; 成组设计的单因素比较采用 ANOVA 方差分析; *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ERCC1 基因在未化疗组乳腺癌中的表达水平

ERCC1 基因在 37.5% (21/56) 的乳腺癌中有较高的表达, 阳性结果为 430 bp 的亮带 (图 1), 相对灰度值为 0.973 ± 0.042 。以患者的年龄、肿瘤大小、淋巴结转移、病理分型、组织学分级、ER、PR 和 HER-2 情况分组后发现, 其表达水平各组间差异无统计学意义 (*P* < 0.05, 表 1)。

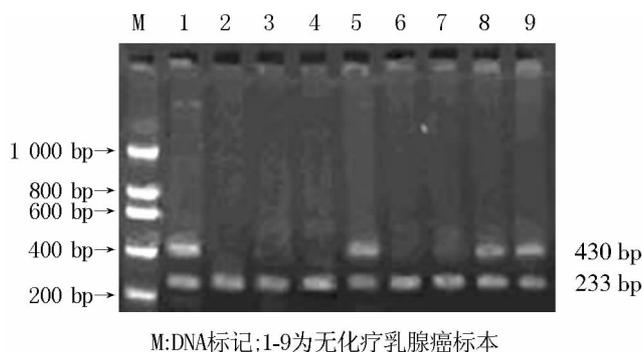


图 1 ERCC1 在乳腺癌组织中的表达

表 1 ERCC1 表达水平与乳腺癌临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	ERCC1/ β -actin	统计参数
年龄			$t = 0.229$
≤ 40 岁	26	0.961 ± 0.047	$P = 0.82$
> 40 岁	30	0.973 ± 0.033	
腋淋巴结			$t = 0.365$
+	10	1.003 ± 0.035	$P = 0.72$
-	46	0.962 ± 0.036	
肿块大小			$F = 0.586$
< 2 cm	27	0.958 ± 0.021	$P = 0.56$
2 ~ 5 cm	24	1.003 ± 0.048	
> 5 cm	5	1.010 ± 0.026	
病理类型			$t = 0.434$
非特殊型癌	48	0.974 ± 0.041	$P = 0.67$
特殊型癌	8	1.002 ± 0.040	
组织学分级			$F = 0.820$
I	12	1.041 ± 0.041	$P = 0.45$
II	24	0.965 ± 0.048	
III	20	0.946 ± 0.041	
ER			$t = 0.523$
+	36	0.965 ± 0.042	$P = 0.60$
-	20	0.991 ± 0.020	
PR			$t = 0.416$
+	29	0.982 ± 0.059	$P = 0.68$
-	27	0.962 ± 0.023	
HER-2			$t = 0.847$
++/+++	18	1.003 ± 0.023	$P = 0.40$
-/+	38	0.957 ± 0.029	

2.2 新辅助化疗对 ERCC1 表达的影响

新辅助化疗组给予 ET 方案治疗后, 41.7% (15/36) 新辅助化疗后标本有 ERCC1 阳性表达, 其相对灰度值较未化疗组 ERCC1 基因表达水平有明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 2, 图 2)。

表2 ERCC1 表达与新辅助化疗的关系

组别	例数	ERCC1/ β -actin	统计学参数
未化疗组	56	0.973 \pm 0.042	$t = 3.428$
新辅助化疗组	36	1.868 \pm 0.102	$P = 0.00$

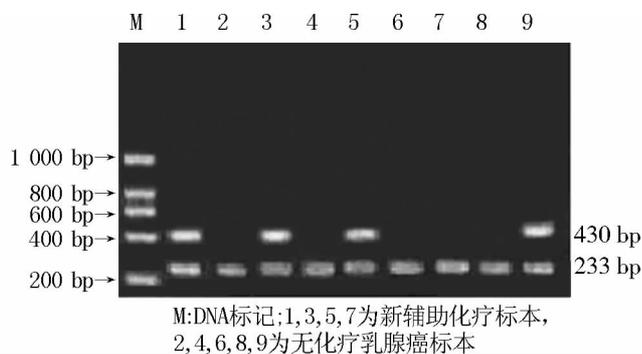


图2 ERCC1 在有若无新辅助化疗标本中的表达差异

3 讨论

在人类细胞中,由化学药物造成的DNA损伤主要通过核苷酸切除修复途径进行修复,其中ERCC1基因在修复过程中起着关键作用。ERCC1基因位于染色体19q13.2,长度15 kb,编码由297个氨基酸残基组成的蛋白质,与酵母、大肠杆菌的DNA修复基因具有同源性。ERCC1的表达产物可以特异性的连接5'端的核酸内切酶,具有损伤识别和切除5'端的双重作用。因此,近年来有研究认为ERCC1等核苷酸切除修复(nucleotide excision repair,NER)相关基因的低表达常伴随着癌症发病率的增加,而高表达往往与铂类和吉西他滨等多药耐药有关^[2-3]。

本研究以特异性引物对乳腺癌组织中ERCC1基因进行RT-PCR检测,结果显示ERCC1在37.5%的乳腺癌中有表达,但在组织中的实际表达水平较低。将56例未接受新辅助化疗的患者以其临床病理特征进行分组比较,发现ERCC1基因的表达水平与之均无明显关系。ERCC1的表达与其他的乳腺癌相关基因的相关性还有待进一步研究。

乳腺癌新辅助化疗已成为临床解决不可切除或切除困难的局部晚期乳腺癌和炎性乳腺癌的一种规范疗法。它能有效缩小肿瘤原发病灶,杀灭外周微转移灶,在乳腺癌临床降期、提高手术切除率和了解肿瘤对化疗的敏感程度方面起着重要作用,同时它也使许多乳房体积相对较小的患者具有保留乳房的可能。本研究有36例患者接受2~4周期ET方案新辅助化疗,临床效果良好。

但是随后的手术治疗将肿瘤和腋窝淋巴结切除后,也失去了相应的临床体征,使得在后续的治疗中缺乏常用的临床监测指标,可能导致治疗不足或过度,尤其是术后化疗的耐药。众所周知化疗耐药是乳腺癌治疗后复发的主要根源。在以往的新辅助化疗研究中,人们普遍关注于切除率的提高而忽视了耐药的产生。对于非小细胞肺癌、膀胱癌、卵巢癌等以铂类为基础的化疗方案的临床研究均提示化疗多药耐药与 ERCC1 基因的高表达有关^[4-5],因此探讨新辅助化疗后乳腺癌组织中 ERCC1 基因表达水平的变化,对术后辅助化疗方案的选择具有一定的临床指导意义。这一点与 EORTC 10994/BIG00-01 (European Organization for Research and Treatment of Cancer 10994/Breast International Group) 临床试验思想相一致^[6]。

本研究中新辅助化疗组 ERCC1 基因的表达水平是未化疗组的 2 倍以上,提示 ET 方案新辅助化疗可能有上调 ERCC1 基因表达的作用。但由于本研究无足够的新辅助化疗前穿刺新鲜标本,未能进行自身配对,存在一定的局限性,在以后的研究中笔者将进行前瞻性配对试验,如能明确排除临床病理相关的混杂因素而得到相同的结论,那么在乳腺癌化疗蒽环类耐药或乳腺癌复发后使用铂类药物解救治疗时,检测患者乳腺癌组织中 ERCC1 基因的表达水平就非常有意义。对于 ERCC1 基因表达水平有明显升高趋势者应避免使用铂类药物。

参考文献

- [1] Rosell R, Felip E, Paz Ares L *et al.* How could pharmacogenomics help improve patient survival? *Lung Cancer*, 2007, 57: S35 - S41.
- [2] Peters G J, Van Moorsel C J, Lakerveld B, *et al.* Effects of gemcitabine on cisplatin-DNA adduct formation and repair in a panel of gemcitabine and cisplatin-sensitive or resistant human ovarian cancer cell lines. *Int J Oncol*, 2006, 28: 237 - 244.
- [3] 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. *Clin Cancer Res*, 2004, 2: 1318 - 1325.
- [4] Cobo M, Isla D, Massuti B, *et al.* Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2007, 25: 2747 - 2754.
- [5] Bellmunt J, Paz Ares L, Cuello M, *et al.* Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol*, 2007, 18: 522 - 528.
- [6] 王姝姝. 乳腺癌新辅助化疗基因组标志物的建立: EORTC 10994/BIG 00-01 临床试验的亚组研究. *中华乳腺病杂志: 电子版*, 2008, 2: 369 - 374.

(收稿日期: 2008-07-30)

(本文编辑: 范林军)

傅建民, 周颀, 谢建生, 等. 新辅助化疗对乳腺癌耐药基因 ERCC1 表达的影响[J/CD]. *中华乳腺病杂志: 电子版*, 2009, 3(1): 53 - 59.