

· 论著 ·

CYP2D6 * 10 基因多态性与服用他莫昔芬乳腺癌患者预后的相关性

田超 杨义 李卉

【摘要】 目的 探讨 CYP2D6*10 基因多态性与服用他莫昔芬(TAM)乳腺癌患者预后的相关性。方法 收集四川省肿瘤医院 2008 年 1 月至 2010 年 10 月期间 200 例服用 TAM 的乳腺癌患者的口腔黏膜,采用实时 RT-PCR 法检测 CYP2D6*10 基因多态性,并分为 CYP2D6 突变组(CYP2D6*10/*10)和 CYP2D6 正常组(CYP2D6 wt/*10 和 CYP2D6 wt/wt)。采用卡方检验及秩和检验分析 CYP2D6*10 基因多态性与临床病理特征的关系,采用 Cox 比例风险回归模型分析其与预后的关系。结果 在 200 例乳腺癌中,CYP2D6*10/*10 纯合子 94 例(47%),CYP2D6 wt/wt 野生型 48 例(24%),CYP2D6 wt/*10 杂合型 58 例(29%)。CYP2D6*10 基因多态性与患者的组织学分级、TNM 分期、HER-2 表达、肿瘤类型无关($Z = -0.444, P = 0.674; Z = -0.716, P = 0.500; \chi^2 = 0.066, P = 0.797; \chi^2 = 0.694, P = 0.405$)。Log-rank 检验分析显示 CYP2D6*10 突变组患者平均无瘤生存时间明显短于 CYP2D6*10 正常组患者(47.2 个月比 51.2 个月, $\chi^2 = 5.554, P = 0.018$)。Cox 比例风险回归模型显示,CYP2D6*10 基因型与患者无瘤生存时间明显相关($HR = 2.755, 95\% CI: 1.230 \sim 6.173, P = 0.014$)。结论 CYP2D6*10/*10 基因型乳腺癌患者服用他莫昔芬预后较差。

【关键词】 乳腺肿瘤; 他莫昔芬; 细胞色素 P450 CYP2D6; 预后

【中图分类号】 R737.9

【文献标志码】 A

Correlation between CYP2D6 * 10 gene polymorphism and prognosis of breast cancer patients treated with tamoxifen TIAN Chao*, YANG Yi, LI Hui. * Department of Breast Surgery, Sichuan Provincial Cancer Hospital, Chengdu 610041, China

Corresponding author: LI Hui, Email: hxtc2000@sohu.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the correlation of CYP2D6*10 gene polymorphism with prognosis of breast cancer patients taking tamoxifen. **Methods** The oral mucosa samples were taken from 200 breast cancer patients who received oral administration of tamoxifen from January 2008 to October 2010 in Sichuan Provincial Cancer Hospital. Real-time RT-PCR was used to determine CYP2D6*10 gene polymorphism. According to the results, the patients were divided into two groups: CYP2D6 mutation group(CYP2D6*10/*10) and CYP2D6 normal group(CYP2D6 wt/*10 and CYP2D6 wt/wt). The relationship between CYP2D6*10 gene polymorphism and clinicopathological characteristics was assessed by Chi-square test and rank sum test. Meanwhile, Cox proportional hazards regression model was established to display the prognostic value of CYP2D6*10 gene polymorphism. **Results** Among 200 cases of breast cancer patients, CYP2D6*10/*10 homozygotes were found in 94 cases (47%), CYP2D6 wt/wt wild type in 48 cases (24%) and CYP2D6 wt/*10 heterozygotes in 58 cases (29%). CYP2D6*10 gene polymorphism was not statistically related to histological grade, TNM staging, HER-2 expression, tumor types ($Z = -0.444, P = 0.674; Z = -0.716, P = 0.500; \chi^2 = 0.066, P = 0.797; \chi^2 = 0.694, P = 0.405$). Log-rank test showed that the disease-free survival in patients with CYP2D6 mutation was significantly shorter than that in patients without CYP2D6 mutation (mean 47.2 months

vs mean 51.2 months, $\chi^2=5.554$, $P=0.018$). Cox proportional hazards regression model showed that CYP2D6*10 genotype was significantly related to the disease-free survival of patients ($HR=2.755$, 95% CI : 1.230–6.173, $P=0.014$). **Conclusion** The breast cancer patients with CYP2D6*10/*10 genotype have a poor prognosis after tamoxifen administration.

【Key words】 Breast neoplasms; Tamoxifen; Cytochrome P-450 CYP2D6; Prognosis

他莫昔芬(tamoxifen, TAM)是激素受体阳性乳腺癌患者术后辅助内分泌治疗的一线药物,提高了乳腺癌患者的无瘤生存率及总生存率^[1]。然而,TAM 治疗效果个体间存在巨大差异^[2]。在激素受体阳性的乳腺癌患者中约 50% 的患者对 TAM 治疗无效,最终导致肿瘤进展^[2]。TAM 是一种前体药物,本身抗雌激素活性很弱,进入体内后必须经过 CYP2D6 酶代谢为活化型 4-羟基-他莫昔芬(4-OH-TAM)才具有更强的抗雌激素活性^[3]。因此,CYP2D6 酶异常将会严重影响 TAM 的疗效,而研究证明 CYP2D6 基因存在着多个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP),其中亚洲人群中最常见的突变是 CYP2D6*10^[3]。本研究旨在中国乳腺癌患者中探讨 CYP2D6*10 基因多态性与预后的相关性。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取四川省肿瘤医院 2008 年 1 月至 2010 年 10 月期间激素受体阳性乳腺癌患者 200 例,均为女性患者,年龄 31~57 岁[(42.49±2.43)岁],术后 TNM 分期 I 期 24 例,II 期 141 例,III 期 35 例;肿瘤分级 I 级 51 例,II 级 78 例,III 级 71 例;HER-2 阳性 42 例,阴性 158 例;浸润性导管癌 170 例,其他类型 30 例。依据药代动力学研究,CYP2D6*10 纯合型突变(CYP2D6*10/*10)导致 CYP2D6 酶活性降低,而 CYP2D6*10 杂合型突变及野生型(CYP2D6 wt/*10 和 CYP2D6 wt/wt) CYP2D6 酶活性基本正常^[4-5],因此,将患者分为 CYP2D6 突变组(CYP2D6*10/*10)和 CYP2D6 正常组(CYP2D6 wt/*10 和 CYP2D6 wt/wt)。患者治疗均依据美国国家癌症综合网络(NCCN)乳腺治疗指南进行手术、化疗和(或)放射治疗。患者化疗后服用 TAM(10 mg 口服,一日两次)至出现肿瘤转移后停用。DFS 定义为从手术后至出现复发的时间。术后随访按照:术后 2 年内每 3 个月门诊复查,术后 2~5 年每 6 个月门诊复查,术后 5 年

以上每年门诊复查,有临床复发病状立即门诊复查。采用上海主健细胞分子遗传医学检验中心提供的口腔黏膜上皮细胞专用采样器材采集患者双侧口腔内壁黏膜上皮细胞。

对所有研究对象均已事先告知该研究的相关内容,并取得患者本人同意。

1.2 硅胶吸附法提取基因组 DNA

将口腔拭子浸泡于含有去离子水的 EP 管中,震荡使口腔黏膜细胞脱落并悬浮于去离子水中。取 1 ml 悬浮液加入 1 ml 裂解液及 5 μ l 硅胶,以 4000 r/min(离心机半径为 5 cm)离心 30 s,弃上清液。加入 70% 乙醇 1 ml,漩涡震荡 5 s,离心 30 s(离心方法同上),弃上清液。加入 1 ml 丙酮,离心 30 s(离心方法同上),弃上清液,60 $^{\circ}$ C 干燥 15 min,加入 150 μ l TE(Tris+EDTA)缓冲液。离心 2 min(离心方法同上),取含 DNA 的上清液备用。

1.3 实时 RT-PCR 检测基因多态性

按照参考文献[6]报道的 TaqMan[®]MGB Real-time RT-PCR 方法检测 CYP2D6 基因多态性,相关仪器、试剂均购自美国 ABI 公司。PCR 扩增含 CYP2D6*10 突变位点的 DNA 片段。上游引物为 5'-CTTCACCTCCCTGCTGCAG-3',下游引物为 5'-TCACCAGGAAAGCAAAGACA-3',探针为 5'-FAM-CCGGCCAGCCACCATGG-TAMRA-3',扩增片段长度 89 bp;内参照 albumin 上游引物为 5'-TGT TGCATGAGAAAACGCCA-3',下游引物为 5'-GTC GCCTGTTCAACCAAGGAT-3',探针为 5'-VIC-AA GTGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAG-TAMRA-3',扩增片段长度 72 bp。每个反应体系为总体积 25 μ l,包含 20 ng DNA 模板,1 \times TaqMan[®]Universal Master Mix 12.5 μ l,TaqMan[®]MGB 探针 200 nmol/L,上下游引物 300 nmol/L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 10 min,随后进行 40 个循环的扩增(95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min),反应结束后在 ABI 7900 型荧光定量 PCR 仪上读取样品孔中的终点荧光,利用其分析软件确定各个样本的基因分型结果。

1.4 统计学方法

采用 SPSS18.0 统计软件进行统计学分析。用卡方检验和秩和检验分析 CYP2D6 基因多态性与临床病理特征的关系。采用 Kaplan-Meier 法计算各组乳腺癌患者的无瘤生存期并用 Log-rank 检验进行比较,采用 Cox 比例风险回归模型进行多因素分析。变量纳入及排除标准:进行单因素分析(Kaplan-Meier 分析),变量 $P < 0.05$ 纳入 Cox 回归分析,否则排除 Cox 回归分析。多因素分析赋值说明:基因类型(0 = 正常组 wt/*10+wt/wt; 1 = 突变组 *10/*10);随访期内是否复发(0 = 无复发; 1 = 复发);TNM 分期(0 = I 期; 1 = II 期; 2 = III 期);组织学分级(0 = 1 级; 1 = 2 级; 2 = 3 级);病理类型(0 = 浸润性导管癌; 1 = 其他);HER-2 状态(0 = 阳性; 1 = 阴性)。 $P < 0.050$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CYP2D6*10 基因多态性检测结果

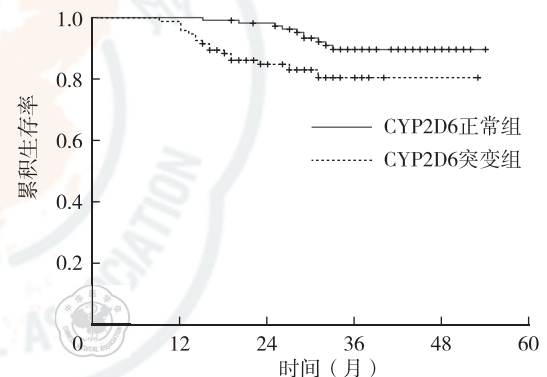
200 例乳腺癌患者中检测到 CYP2D6 *10/*10 纯合子 94 例(47%, 94/200), CYP2D6 wt/wt 野生型 58 例(29%, 58/200), CYP2D6 wt/*10 杂合型 48 例(24%, 48/200)。

2.2 CYP2D6*10 基因多态性与临床病理指标的关系

乳腺癌患者中 CYP2D6 *10 基因多态性与组织学分级、TNM 分期、HER-2 表达及肿瘤类型均无关(统计结果详见表 1)。

2.3 CYP2D6*10 基因多态性与预后相关性

200 例患者中位随访时间为 31.5 个月(9 ~ 58 个月), Log-rank 检验显示 CYP2D6 突变组患者平均无瘤生存时间为 47.2 个月(95% CI: 43.2 ~ 49.3), CYP2D6 正常组患者平均无瘤生存时间为 51.2 个月(95% CI: 49.6 ~ 52.9), 两组间差异有统计学意义($\chi^2 = 5.554, P = 0.018$, 图 1)。Cox 回归分析显示:经过各临床因素(TNM 分期、组织学分级、病理类型以及 HER-2)校正后, CYP2D6 *10/*10 基因型($HR = 2.755$, 95% CI 为 1.230 ~ 6.173, $P = 0.014$)是影响复发时间的不利因素;肿瘤 TNM 分期晚及 HER-2 阳性状态也是影响无瘤生存时间的不利因素($HR = 3.485$, 95% CI 为 1.744 ~ 6.964, $P = 0.000$; $HR = 2.293$, 95% CI 为 1.014 ~ 5.185, $P = 0.046$)(表 2)。



$P = 0.018$, CYP2D6 突变组与 CYP2D6 正常组比较($\chi^2 = 5.554$)

图 1 CYP2D6 基因型与乳腺癌预后的关系

表 1 CYP2D6 *10 基因多态性与临床病理特征的关系

CYP2D6 基因分型	例数	组织学分级[例(%)]			TNM 分期[例(%)]			HER-2[例(%)]		肿瘤类型[例(%)]	
		1 级	2 级	3 级	I 期	II 期	III 期	+	-	浸润性导管癌	其他
突变组(*10/*10)	94	24(47)	38(49)	32(45)	10(42)	67(48)	17(49)	19(20)	75(80)	82(87)	12(13)
正常组(wt/*10+wt/wt)	106	27(53)	40(51)	39(55)	14(58)	74(52)	18(51)	23(22)	83(78)	88(83)	18(17)
检验值		$Z = -0.444$			$Z = -0.716$			$\chi^2 = 0.066$		$\chi^2 = 0.694$	
P 值		0.674 ^a			0.500 ^a			0.797 ^b		0.405 ^b	

*10/*10; CYP2D6*10 纯合型突变; wt/*10; CYP2D6*10 杂合型突变; wt/wt; CYP2D6*10 野生型; a: 秩和检验; b: χ^2 检验

表 2 乳腺癌患者无瘤生存时间的 Cox 比例风险回归模型分析

变量	偏回归系数	标准误	Wald 统计量	P 值	Exp(B) 值	相对危险度及 95% 可信区间
基因型	1.013	0.412	6.065	0.014	2.755	2.755(1.230 ~ 6.173)
TNM 分期	1.249	0.353	12.497	0.000	3.485	3.485(1.744 ~ 6.964)
HER-2	0.830	0.416	3.972	0.046	2.293	2.293(1.014 ~ 5.185)
组织学分级	0.764	0.436	3.067	0.080	2.147	2.304(0.913 ~ 5.048)

3 讨论

雌激素在激素受体(hormone receptor, HR)阳性乳腺癌的发生及发展中具有非常重要的作用,内分泌治疗是 HR 阳性乳腺癌患者全身治疗的重要组成部分^[7-8]。他莫昔芬作为 HR 阳性乳腺癌患者内分泌治疗的标准用药已有 30 多年历史,目前仍是早期 HR 阳性乳腺癌患者术后辅助治疗或复发转移乳腺癌患者内分泌治疗的基本用药^[9-10]。研究表明,无论绝经前或绝经后 HR 阳性乳腺癌患者,术后接受 5 年他莫昔芬辅助治疗,可分别降低乳腺癌患者每年复发风险和死亡风险 47% 和 26%^[1,10]。近年来,对绝经后 HR 阳性乳腺癌患者的内分泌治疗,大型临床研究及指南均推荐芳香化酶抑制剂。因其具有更好的疗效现已逐渐替代 TAM 成为一线用药。但是在中国,70% 的乳腺癌患者是绝经前妇女,TAM 因为良好的治疗效果及较低的治疗费用,目前无论绝经前还是绝经后乳腺癌,其仍具有不可替代的作用。

乳腺癌患者中约 60% 为 HR 阳性,而其中只有约 50% 的患者用 TAM 有效,并且部分用 TAM 有效的患者,在治疗期间也会对其产生耐受^[2]。TAM 原发性或获得性耐药严重影响了接受 TAM 治疗患者的预后。引起 TAM 耐药的因素很多:如 HR 表达减少,HR 通路共活化因子和共抑制因子比例失衡,生长因子受体高表达等^[2]。更为重要的是,TAM 是一种前体药物,本身抗雌激素活性很弱,TAM 进入体内后被 CYP2D6 代谢为 4-OH-TAM。4-OH-TAM 与 ER 结合力是 TAM 的 100 倍,其抑制 HR 阳性乳腺癌细胞增殖的能力则是 TAM 的 30 ~ 100 倍^[11-12]。因此,CYP2D6 酶异常将会严重影响 TAM 的疗效。而研究证明 CYP2D6 基因存在着多个 SNP,某些类型 SNP 明显降低或失去 CYP2D6 酶代谢 TAM 的活性,导致体内活性型 TAM 浓度降低,从而降低 TAM 的疗效^[11]。

Goetz 等^[13]的研究显示,CYP2D6 不同的基因型影响了 TAM 的代谢。在欧美国家,最常见的变异型是 CYP2D6 * 4^[13]。研究也显示,携带 CYP2D6 * 4/* 4 的乳腺癌患者,无瘤生存率及总生存率明显低于 CYP2D6 * 4 杂合型及野生型的患者,特别是 5 年无瘤生存率,携带 CYP2D6 * 4/* 4 纯合型患者的 5 年无瘤生存率仅有 49%,不携带 * 4 等位基因患者的 5 年无瘤生存率高达 83%^[13]。近年来,许多研究均关注 CYP2D6 基因多态性与

TAM 代谢的相关性,结果均显示携带某一基因型的患者因为 TAM 活性代谢产物的血浆浓度较低而影响了 TAM 的临床疗效^[14-16]。韩国 Lim 等^[17]研究也证实了 CYP2D6 * 10 位点突变是亚洲人群的主要变异体,发生频率为 38% ~ 70%,并且,对转移性乳腺癌的研究发现,具有 CYP2D6 * 10/* 10 纯合子的患者与其他 CYP2D6 基因型相比,血浆内 TAM 活性代谢物浓度显著降低。TAM 辅助治疗时,具有 CYP2D6 * 10/* 10 纯合子的患者与野生型相比复发率显著增高。本研究结果显示,中国乳腺癌患者中 CYP2D6 * 10/* 10 的发生率为 47% (94/200),明显高于欧美国家及亚洲正常人群的发生率^[12-15],同时,本研究还发现 CYP2D6 * 10 基因型是 DFS 的影响因子;携带 CYP2D6 * 10/* 10 基因型患者的中位 DFS 明显短于另外两种基因型的患者。这提示在临床上 CYP2D6 * 10/* 10 基因型患者不适宜使用 TAM 进行治疗,或者需要较大的剂量才可以达到有效的血药浓度,但这可能引发更加严重的不良反应,增加患者使用药物的风险。

总之,乳腺癌患者在服用 TAM 前均应推荐检测 CYP2D6 * 10/* 10 变异体。临床医师应该改变单纯依靠 HR 来判断患者是否接受 TAM 治疗的现状,用基于 CYP2D6 的基因分型来指导个体化的 TAM 内分泌辅助治疗。

参考文献

- [1] Allred DC, Anderson SJ, Paik S, et al. Adjuvant tamoxifen reduces subsequent breast cancer in women with estrogen receptor-positive ductal carcinoma *in situ*; a study based on NSABP protocol B-24 [J]. J Clin Oncol, 2012, 30 (12): 1268-1273.
- [2] 鞠放,王宁,王雅杰. 三苯氧胺耐药的分子生物学机制研究进展[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2010, 4(6): 783-785.
- [3] Xu Y, Sun Y, Yao L, et al. Association between CYP2D6 * 10 genotype and survival of breast cancer patients receiving tamoxifen treatment [J]. Ann Oncol, 2008, 19(8): 1423-1429.
- [4] Abraham JE, Maranian MJ, Driver KE, et al. CYP2D6 gene variants and their association with breast cancer susceptibility [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011, 20(6): 1255-1258.
- [5] Rae JM, Drury S, Hayes DF, et al. CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients [J]. J Natl Cancer Inst, 2012, 104(6): 452-460.
- [6] Regan MM, Leyland-Jones B, Bouzyk M, et al. CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with

- endocrine-responsive breast cancer: the breast international group 1-98 trial [J]. J Natl Cancer Inst, 2012, 104(6): 441-451.
- [7] Dezentjé VO, Guchelaar HJ, Nortier JW, et al. Clinical implications of CYP2D6 genotyping in tamoxifen treatment for breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(1): 15-21.
- [8] 王明浩, 姜军. 托瑞米芬治疗乳腺疾病的临床研究进展[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2013, 7(2): 130-134.
- [9] 高德明, 李金茂, 何显力, 等. 托瑞米芬治疗男性乳房肥大症的疗效观察 [J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2012, 6(6): 688-690.
- [10] Hertz DL, McLeod HL, Irvin WJ, et al. Tamoxifen and CYP2D6: a contradiction of data [J]. Oncologist, 2012, 17(5): 620-630.
- [11] Higgins MJ, Rae JM, Flockhart DA, et al. Pharmacogenetics of tamoxifen: who should undergo CYP2D6 genetic testing? [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2009, 7(2): 203-213.
- [12] Schroth W, Hamann U, Fasching PA, et al. CYP2D6 polymorphisms as predictors of outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen: expanded polymorphism coverage improves risk stratification [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(17): 4468-4477.
- [13] Goetz MP, Schaid DJ, Wickerham DL, et al. Evaluation of CYP2D6 and efficacy of tamoxifen and raloxifene in women treated for breast cancer chemoprevention: results from the NSABP P1 and P2 clinical trials [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(21): 6944-6951.
- [14] Sideras K, Ingle JN, Ames MM, et al. Coprescription of tamoxifen and medications that inhibit CYP2D6 [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(16): 2768-2776.
- [15] Dezentjé VO, van Blijderveen NJ, Gelderblom H, et al. Effect of concomitant CYP2D6 inhibitor use and tamoxifen adherence on breast cancer recurrence in early-stage breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(14): 2423-2429.
- [16] Irvin WJ Jr, Walko CM, Weck KE, et al. Genotype-guided tamoxifen dosing increases active metabolite exposure in women with reduced CYP2D6 metabolism: a multicenter study [J]. J Clin Oncol, 2011, 29(24): 3232-3239.
- [17] Lim HS, Ju Lee H, Seok Lee K, et al. Clinical implications of CYP2D6 genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2007, 25(25): 3837-3845.

(收稿日期: 2013-07-19)

(本文编辑: 罗承丽)

田超, 杨义, 李卉. CYP2D6 * 10 基因多态性与服用他莫昔芬乳腺癌患者预后的相关性 [J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2013, 7(6): 406-410.