

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.08.008
文章编号: 1005-8982 (2018) 08-0039-05

KRT19 基因多态性对化疗联合靶向治疗 NSCLC 疗效的影响

周小果

(河南省南阳市中心医院 呼吸内科, 河南 南阳 473000)

摘要:目的 探讨细胞角蛋白 19 片段(*KRT19*)基因多态性与化疗联合靶向治疗非小细胞肺癌(NSCLC)疗效的相关性。**方法** 对 146 例接受化疗联合靶向治疗的晚期 NSCLC 患者进行临床疗效评价, 采用 PCR-RFLP 分析 *KRT19* (-99G>C) 基因, 分析不同基因型与化疗联合靶向治疗疗效的相关性。**结果** *KRT19* (-99G>C) 中 GG 基因型患者与 GC+CC 基因型患者的化疗联合靶向治疗的有效率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 携带 C 基因型者对化疗联合靶向治疗的敏感性是 T 基因型的 1.897 倍 [$\hat{OR} = 1.897$ (95%CI: 1.103, 3.647) $P = 0.001$]; *KRT19* (-99G>C) 等位基因 C 携带者 (GC+CC) 的 MST 短于 GG 基因型携带者 ($P < 0.05$)。Cox 模型分析显示, *KRT19* (-99G>C) 变异等位基因 C 是影响晚期 NSCLC 预后的独立危险因素, 其变异等位基因 C 携带者 (GC+CC) 的 OR 是 GG 基因型携带者的 2.014 倍 ($P < 0.05$)。**结论** *KRT19* (-99G>C) 位点基因多态性是影响晚期 NSCLC 患者化疗联合靶向治疗预后的独立危险因素, 且与化疗联合靶向治疗敏感性相关。

关键词: 非小细胞肺癌; 细胞角蛋白 19 片段; 化疗; 分子靶向治疗; 基因多态性

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Effect of *KRT19* gene polymorphism on efficacy of chemotherapy combined with targeted therapy for non-small cell lung cancer

Xiao-guo Zhou

(Department of Respiratory Medicine, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan 473000, China)

Abstract: Objective To investigate the association of the polymorphism of Cytokeratin 19 fragment (*KRT19*) gene with the effect of chemotherapy combined with targeted therapy for non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Totally 146 patients with advanced NSCLC were treated by chemotherapy combined with targeted therapy and the clinical efficacy was evaluated. Using PCR-RFLP, *KRT19* (-99G>C) gene was analyzed, the relationships between different genotypes of *KRT19* and the efficacy of chemotherapy combined with targeted therapy were analyzed. **Results** The effective rate of chemotherapy with targeted therapy was significantly different between the patients with GG genotype and those with GC+CC genotype of *KRT19* (-99G>C) ($P < 0.05$). The chemotherapy combined with targeted therapy was 1.897 times more sensitive in the patients carrying C genotype than that in the patients carrying T genotype [$\hat{OR} = 1.897$ (95% CI: 1.103, 3.647), $P = 0.001$]. MST of the *KRT19* (-99G>C) C allele carriers (GC+CC) was shorter than that of the GG genotype carriers ($P < 0.05$). Cox model analysis showed that the variant allele C of *KRT19* (-99G>C) was the independent risk factor for the prognosis of advanced NSCLC, OR of the variant allele carriers (GC+CC) was 2.014 times that of the GG genotype carriers ($P = 0.003$). **Conclusions** *KRT19* gene (-99G>C) polymorphism is the independent risk factor for the prognosis of the patients with advanced NSCLC receiving chemotherapy combined with targeted therapy, and is significantly associated with the sensitivity of

收稿日期: 2016-09-20

chemotherapy combined with targeted therapy.

Keywords: non-small cell lung cancer; Cytokeratin 19 fragment; chemotherapy; molecular targeted therapy; gene polymorphism

肺癌的致死率和发病率居全球恶性肿瘤的首位,其中非小细胞肺癌(non-small cell carcinoma, NSCLC)占肺癌的80%^[1]。目前治疗NSCLC的方法有手术、化疗、放疗等。研究表明,NSCLC患者根治术后行化疗,能延长患者生存时间。临床研究证实,细胞角蛋白19片段(keratin 19, KRT19)为肺癌肿瘤标志物^[2]。目前化疗联合分子靶向治疗对晚期NSCLC患者生存时间的影响,以及KRT19基因多态性与化疗联合靶向治疗预后的关系研究较少。本研究旨在探讨KRT19(-99G>C)基因多态性与化疗联合靶向治疗疗效的相关性,为临床治疗晚期NSCLC提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2010年4月-2012年4月在河北省南阳市中心医院呼吸内科接受外科根治术后行化疗联合靶向治疗的晚期NSCLC患者146例。其中,男性93例,女性53例;年龄51~75岁,中位年龄61岁,有吸烟史患者78例,按照国际抗癌联盟肺癌TNM分期标准分为:Ⅲa期52例,Ⅲb期53例,Ⅳ期41例;鳞癌82例,腺癌64例。美国东部肿瘤协作组的功能状态评分 ≤ 2 分。患者在化疗联合靶向治疗前,血常规和肾功能均在正常范围内,心电图正常,体力状况(Karnofsky, KPS)评分 ≥ 70 分。纳入标准:①经手术或穿刺活检病理证实,有可评估的病灶,且无其他部位肿瘤;②首次接受化疗联合靶向治疗方案,治疗前无血常规、肝肾功能异常,心电图正常;③患者依从性好,签订知情同意书,愿意接受术后随访。排除标准:①合并有严重的肝肾功能或造血系统疾病;②严重心脑血管疾病或精神疾病;③依从性差或不愿接受随访。

1.2 治疗方案

146例患者采用化疗联合尼妥珠单抗靶向治疗。化疗方案依据患者肺癌细胞类型及全身状况制定,主要采用顺铂DDP或卡铂CBP方案为主的化疗,其中18例患者采用DDP或CBP联合伊立替康治疗;51例患者采用DDP或CBP联合吉西他滨治疗;32例患者采用DDP或CBP联合去甲长春碱治疗;30例患者采用DDP或CBP联合紫杉醇联合治疗;15例患者DDP联合培美曲塞二钠联合治疗。具体用药剂量为:

第1天,DDP 75 mg/m²或者CBP曲线下面积5~6g;第1和8天,吉西他滨1250 mg/m²;第1天,紫杉醇135~175 mg/m²维持 ≥ 3 h;第1和8天,去甲长春碱25 mg/m²;第1天,培美曲塞二钠500 mg/m²。在化疗治疗的基础上联合尼妥珠单抗治疗,尼妥珠单抗200 mg静脉滴注,1次/周,连续用药6周,6周后改为1次/2周。21d为1个治疗周期,治疗4个周期。

1.3 近期疗效评估

根据美国国立癌症研究所制定的有关实体瘤的疗效评定标准,分为完全缓解(complete response, CR)、部分缓解(partial response, PR)、稳定(stable disease, SD)和进展(progressive disease, PD)。以CR+PR,且持续时间 ≥ 24 周为临床有效。对化疗联合靶向治疗有效且病灶稳定的患者,采取停止化疗和尼妥珠单抗靶向治疗,进入观察随访时间,若出现新的病灶则需要进行二线治疗。患者生存时间指确诊为肺癌至患者死亡或末次随访时间,随访截止时间为2016年5月23日。随访采用电话咨询或者门诊随访。

1.4 方法

1.4.1 外周血标本及DNA提取 采集癌症患者外周静脉血5 ml,置于含EDTA的真空管中,-80℃冰箱中保存。取血样标本2 ml,采用基因组DNA快速提纯试剂盒(美国Promega生物试剂公司)提取DNA,保存于-40℃冰箱中备用。

1.4.2 PCR-RFLP应用 引物设计参照文献[1],由上海英俊生物科技工程有限公司合成。采用Light Scanner Primer Design软件设计KRT19(-99G>C)基因相应位点引物,均采用小片段扩增引物。KRT19(-99G>C)(C)正向引物:5'-CCGCTACATGGCCTATTAACGTGCATACCG-3',反向引物:5'-CGTTGCGCAATGCTGACCGATCA-3',PCR产物片段长度168 bp。

1.4.3 目的基因扩增 PCR扩增体系为25 ml,其中含5 ml PCR Mix,正反向引物各0.5 ml,1 ml LC Green和1 ml DNA模板,剩余加入双蒸水。KRT19(-99G>C)的扩增反应条件为:95℃预变性2 min,93℃变性30 s,55℃退火30 s,73℃延伸45 s,93℃变性45 s,45℃退火30 s,共40个循环,72℃继续延伸5 min,限制性内切酶为Rsa I。取PCR产物10 μ l于37℃酶切2 h,在含2%琼脂糖凝胶上电泳,溴化乙锭染色,

紫外线透射仪观察 PCR 扩增是否成功, 鉴定其特异性。全部测序由 ABI3100 测序分析仪(美国 ABI 公司)完成。为准确测定基因分型结果, 随机选取 10% 样本采用直接测序法进行验证。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计数资料以率表示, 基因型频率的观察值与预期值行 χ^2 检验及 Hardy-Weinberg 平衡分析, 生存分析采用 Kaplan-Meier 法, 各因素水平间采用 Log-rank 检验, 影响死亡的因素采用 Cox 比例风险模型分析, 均校正患者的性别、临床分期、病理类型、PS 评分及化疗方案。统计学检验结果均为双侧概率检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *KRT19* (-99G>C) 基因频率

经限制性内切酶剪切后, *KRT19* (-99G>C) 存在 3 种基因型, 其中 GG 型酶切产物片段大小为 168 bp; GC 型酶切产物片段大小为 168、135 和 65 bp; CC 型酶切产物片段大小为 135 和 65 bp。PCR 检测结果显示, GG 型基因频率为 21.92% (32/146), GC 型为 40.41% (59/146), CC 型为 37.67% (55/146)。见图 1。

2.2 *KRT19* (-99G>C) 基因平衡检测

应用 Hardy-Weinberg 定律对 *KRT19* (-99G>C) 基因型分布行遗传平衡检测, *KRT19* (-99G>C) 位点的检测结果比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=2.147$, $P=0.112$), 该样本来自同一孟德尔群体, 符合遗传平衡。

2.3 临床因素与化疗联合靶向治疗敏感性的关系

性别、年龄、吸烟史、临床分期、病理类型、组织学分级及 KPS 评分对晚期 NSCLC 患者化疗联合靶向治疗的敏感性无明显影响 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.4 *KRT19* (-99G>C) 基因多态性与化疗联合靶向治疗疗效的关系

GG 基因型患者与 GC+CC 基因型患者化疗联合靶向治疗的有效率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 携带 C 基因型者对化疗联合靶向治疗的敏感性是 T 基因型的 1.897 倍。见表 2。

2.5 *KRT19* (-99G>C) 基因多态性与生存率的相关性

至随访截止时间, 146 例晚期 NSCLC 患者中死亡 67 例, 无失访者, 治疗后中位生存时间 (middle

survival time, MST) 为 22.1 个月。*KRT19* (-99G>C) 等位基因 C 携带者 (GC+CC) 的 MST 短于 GG 基因型携带者 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 2。

2.6 Cox 模型多因素分析

化疗联合靶向治疗、*KRT19* (-99G>C) 变异等位基因 C 是影响晚期 NSCLC 患者预后的独立危险因素, 其变异等位基因 C 携带者 (GC+CC) 的 OR 是 GG 基因型携带者的 2.014 倍 ($P < 0.05$)。见表 4。

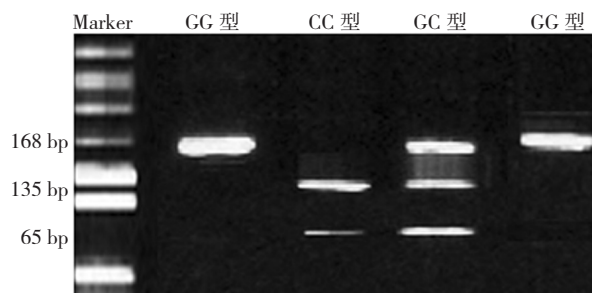


图 1 *KRT19* (-99G>C) 基因多态性位点的琼脂糖凝胶电泳图

表 1 临床因素与晚期 NSCLC 患者化疗联合靶向治疗敏感性的关系 (%)

临床因素	CR+PR	SD+PD	χ^2 值	P 值
性别				
男	32	61	0.114	0.734
女	20	33		
年龄				
≥ 61 岁	23	51	0.392	0.535
< 61 岁	29	43		
吸烟史				
是	21	57	2.968	0.071
否	31	37		
病理类型				
鳞癌	27	55	2.832	0.083
腺癌	25	39		
组织学分级				
高分化	19	38	1.326	0.196
中、低分化	33	56		
临床分期				
III	35	70	1.752	0.098
IV	17	24		
KPS 评分				
70 ~ 79 分	12	29	1.853	0.091
80 ~ 89 分	18	32		
≥ 90 分	22	33		

表 2 *KRT19* (-99G>C) 基因多态性与化疗联合靶向治疗疗效的关系 例 (%)

基因型	CR+PR	SD+PD	\hat{OR}	95%CI		χ^2 值	P 值
				下限	上限		
GG	35 (46.05)	41 (53.95)	1.289	1.036	3.525	8.639	0.001
GC+CC	17 (24.29)	53 (75.71)	1.897	1.103	3.647		

表 3 *KRT19* (-99G>C) 基因多态性与生存率的关系

基因型	例数 (%)	MST/月	95%CI		t 值	P 值
			下限	上限		
GG	76 (52.05)	25	12.36	22.91	6.820	0.017
GC+CC	70 (47.95)	18	6.83	15.28		

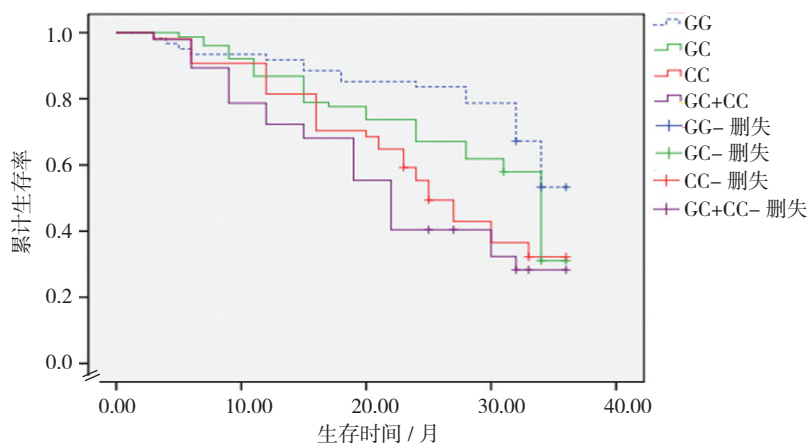


图 2 *KRT19* (-99G>C) 基因多态性患者的生存曲线

表 4 晚期 NSCLC 患者预后影响因素的 Cox 多因素回归分析参数

变量	b	S _b	Wald χ^2 值	P 值	\hat{RR}	95%CI	
						下限	上限
性别	0.179	0.259	0.263	0.622	1.069	0.872	1.956
年龄	0.346	0.301	1.042	0.186	1.231	0.932	1.499
吸烟史	0.218	0.354	2.096	0.096	1.122	0.935	1.658
临床分期	0.263	0.303	2.893	0.082	1.153	0.914	1.895
化疗联合靶向治疗	0.369	0.153	8.536	0.007	1.596	1.063	2.884
<i>KRT19</i> GC+CC	0.623	0.339	10.857	0.003	2.014	1.023	3.547

3 讨论

NSCLC 是全球范围内死亡率和致死率最高的恶性肿瘤之一，多数患者确诊时已属晚期，失去最佳手术时机，因此多需要进行内科治疗为主的综合治疗。铂类药物联合吉西他滨、紫杉醇或长春见等药物进行化疗是主要标准方案，但有效率仅为 30% 左右，同时个体差异等不同化疗效果也不尽相同^[3-4]。近年来，分

子靶向治疗正逐渐受到重视，其对可能导致细胞变恶环节，如原癌基因和抑癌基因失衡、肿瘤血管异常增生、细胞信号传导通路等，选择具有针对性、有效性的阻断剂，能够从分子水平阻止或者逆转这种正常细胞的恶变，从而能够抑制肿瘤生长、复发或转移^[5]。本研究中化疗药物不同，主要是针对不同患者体质，采取相应化疗方案。而分子靶向治疗药物选择的是尼

妥珠单抗, 为人表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的人源化单克隆抗体, 能够抑制 EGFR 在肿瘤发生、发展中发挥生物学作用, 而 EGFR 被认为与 NSCLC 的发生、发展密切相关^[6]。越来越多的学者采用尼妥珠单抗联合常规化疗的方案, 来治疗晚期 NSCLC 患者, 结果显示, 尼妥珠单抗不仅能够通过阻断 EGFR, 来抑制癌细胞的恶性生物学行为, 同时可以增加癌细胞对化疗药物的敏感性^[7]。这也是本研究采用化疗联合靶向治疗 NSCLC 的主要原因。另有研究表明, 尼妥珠单抗联合常规化疗方案治疗晚期 NSCLC 患者的 CR、PR、SD 比例高于常规组^[8]。

KRT19 是一种分化特异的蛋白质, 广泛存在于上皮细胞, 是一种重要的肺癌肿瘤标志物, 对 NSCLC 具有重要的诊断价值, 根据其分子量及双向电泳等特点分析显示, 其有 2 个亚群, 1 个是酸性蛋白、1 个为碱性蛋白^[9]。有报道指出, 尼妥珠单抗联合三维适形放射治疗晚期 NSCLC 能够降低 *KRT19* 含量, 此外 *KRT19* 与 EGFR 具有相关性^[10]。*KRT19* (-99G>C) 位于 *KRT19* 基因外显子区域内。有报道指出(-99G>C) 基因位点 G 等位基因突变为 C 基因后, 肺癌发生率显著增加^[11]。本研究结果显示, *KRT19* (-99G>C) 等位基因 C 携带者 (GC+CC) 的 MST 短于 GG 基因型携带者; Cox 模型基因分析发现, *KRT19* (-99G>C) 变异等位基因 A 携带者 (GC+CC) 的 OR 是 GG 基因型携带者的 2.014 倍, 表明 *KRT19* (-99G>C) 基因多态性影响化疗联合靶向治疗的敏感性。需要指出的是, 以往研究发现化疗治疗晚期 NSCLC 患者的 MST 在 8 ~ 12 个月^[12-13], 而本研究发现化疗联合靶向治疗晚期 NSCLC 患者 MST 在 22 个月左右, 患者生存时间延长。

综上所述, *KRT19* (-99G>C) 位点基因多态性是影响晚期 NSCLC 患者化疗联合靶向治疗预后的独立危险因素, 且与化疗联合靶向治疗敏感性相关。

参 考 文 献

- [1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10.
- [2] LIN J C, CHEN K Y, WANG W Y, et al. Evaluation of cytokeratin-19 mRNA as a tumor marker in the peripheral blood of nasopharyngeal carcinoma patients receiving concurrent chemoradiotherapy[J]. Int J Cancer, 2002, 197(4): 548-553.
- [3] FUJITA J, DOHMOTO K, HOJO S, et al. The point mutation in the promoter region and the single nucleotide polymorphism in exon 1 of the cytokeratin 19 gene in human lung cancer cell lines[J]. Lung Cancer, 2001, 34(3): 387-394.
- [4] GALVANI E, PETERS G J, GIOVANNETTI E. EGF receptor-targeted therapy in non-small-cell lung cancer: role of germline polymorphisms in outcome and toxicity[J]. Future Oncol, 2012, 8(8): 1015-1029.
- [5] HUANG W F, LIU A H, ZHAO H J, et al. BIM Gene polymorphism lowers the efficacy of EGFR-TKIs in advanced nonsmall cell lung cancer with sensitive EGFR mutations: a systematic review and meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(33), DOI: 10.1097/MD.0000000000001263.
- [6] ADJEI A A, SALAVAGGIONE O E, MANDREKAR S J, et al. Correlation between polymorphisms of the reduced folate carrier gene (SLC19A1) and survival after pemetrexed-based therapy in non-small cell lung cancer: a north central cancer treatment group-based exploratory study[J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(9): 1346-1353.
- [7] DY G K, MANDREKAR S J, NELSON G D, et al. A randomized phase II study of gemcitabine and carboplatin with or without cediranib as first-line therapy in advanced non-small-cell lung cancer: north central cancer treatment group study N0528[J]. J Thorac Oncol, 2013, 8(1): 79-88.
- [8] ARAUJO L H, TIMMERS C, BELL E H, et al. Genomic characterization of non-small-cell lung cancer in african americans by targeted massively parallel sequencing[J]. J Thorac Oncol, 2015, 33(17): 1966-1973.
- [9] HEIST R S, CHRISTIANI D. EGFR-targeted therapies in lung cancer: predictors of response and toxicity[J]. Pharmacogenomics, 2009, 10(1): 56-68.
- [10] NIE Q, WANG Z, ZHANG G C, et al. The epidermal growth factor receptor intron1 (CA) n microsatellite polymorphism is a potential predictor of treatment outcome in patients with advanced lung cancer treated with Gefitinib[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 570(1/2/3): 171-175.
- [11] HAGHGOO S M, ALLAMEH A, MORTAZ E, et al. Pharmacogenomics and targeted therapy of cancer: focusing on non-small cell lung cancer[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 754: 82-91.
- [12] PANG L, WANG J, JIANG Y, et al. Decreased levels of serum cytokeratin 19 fragment CYFRA 21-1 predict objective response to chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer[J]. Exp Ther Med, 2013, 6(2): 355-360.
- [13] TANAKA K, HATA A, KAJI R, et al. Cytokeratin 19 fragment predicts the efficacy of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor in non-small-cell lung cancer harboring EGFR mutation[J]. J Thorac Oncol, 2013, 8(7): 892-898.

(童颖丹 编辑)