

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.07.008
文章编号: 1005-8982 (2018) 07-0041-04

老年晚期非小细胞肺癌外周血 RRM1 表达与吉西他滨疗效及预后的相关性研究*

江波¹, 朱颖¹, 涂长玲¹, 何文杰¹, 聂俊¹, 杨承纲²

[昆明医科大学第三附属医院(云南省肿瘤医院) 1. 干部医疗科, 2. 病理科, 云南 昆明 650118]

摘要: 目的 探讨老年晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)外周血中核苷酸还原酶 M1(RRM1)的表达水平与吉西他滨化疗疗效及预后的相关性。**方法** 通过实时荧光定量聚合酶链反应方法(qRT-PCR)检测 40 例老年晚期 NSCLC 患者外周血中 RRM1 的表达水平,并对临床特征、吉西他滨化疗的疗效及预后的关系进行分析。**结果** 外周血 RRM1 的表达水平与性别、组织学类型及分期差异均无统计学意义($P > 0.05$)。低表达组的外周血 RRM1 化疗有效率(35%)及疾病控制率(60%)均高于高表达组(10%, 20%)($P < 0.05$)。生存分析显示:低表达组的外周血 RRM1 生存期(14.8 个月)及无疾病进展期(4.4 个月)均长于高表达组(11.6 个月, 3.2 个月)($P < 0.05$);低表达组的 1 年生存率(76.7%)及 2 年生存率(9.3%)均高于高表达组(53.3%, 0%)($P < 0.05$)。**结论** 老年晚期非小细胞肺癌外周血中 RRM1 低表达的患者对吉西他滨化疗反应率更高,生存期更长,是独立的预后因素。这为无法获取组织进行化疗药物筛选的老年晚期 NSCLC 患者提供了一种新的选择。

关键词: 老年; 非小细胞肺癌; 外周血 RRM1; 吉西他滨; 实时荧光定量聚合酶链反应
中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A

RRM1 expression in peripheral blood and efficacy and prognosis of Gemcitabine in aged advanced NSCLC*

Bo Jiang¹, Ying Zhu¹, Chang-ling Tu¹, Wen-jie He¹, Jun Nie¹, Chen-gang Yang²

[1. Department of Cadre Medical Oncology, 2. Department of Pathology, No. 3 Hospital Affiliated to Kunming Medical College (Yunnan Tumor Hospital), Kunming, Yunnan 650118, China]

Abstract: Objective To investigate the clinical efficacy and prognostic significance of ribonucleotide reductase M1 (RRM1) expression in peripheral blood of aged patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with Gemcitabine. **Methods** Blood samples were collected from 40 aged patients with advanced NSCLC to investigate the expression level of RRM1 in peripheral blood by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). Relationships of the RRM1 expression with clinical characters, efficacy, overall survival time of the patients with aged advanced NSCLC were analyzed. **Results** There was no correlation between RRM1 expression in peripheral blood and gender, pathological type or TNM stage ($P > 0.05$). The patients with low expression of RRM1 had higher response rate (35%) and disease control rate (60%) to Gemcitabine than the patients with over-expression of RRM1 (10% and 20%, $P < 0.05$). The RRM1 low-expression group had longer overall survival time (14.8 m vs. 11.6 m), longer progression-free survival time (4.4 m vs. 3.2 m) and higher 1-year survival rate (76.7% vs. 53.3%) and 2-year survival rate (9.3% vs. 0.0%) than the RRM1 over-expression group ($P < 0.05$). **Conclusions** The aged patients with low levels of RRM1 expression in peripheral blood have higher response to chemotherapy

收稿日期: 2017-04-11

* 基金项目: 云南省教育厅重点项目 (No: 2013Z113)

[通信作者] 朱颖, E-mail: misschu_99@foxmail.com

and longer survival time. RRM1 expression in peripheral blood is an independent prognostic factor. This study may provide a new option for aged patients with advanced NSCLC who are unable to gain lung tissue for screening of chemotherapeutic drugs.

Keywords: aged; non-small cell lung cancer; ribonucleotide reductase M1 in peripheral blood; Gemcitabine; qRT-PCR

无驱动基因的晚期 NSCLC 的一线标准化疗方案目前仍然是铂类为基础的双药方案。既往临床实践提示：在化疗方案及药物剂量相同的情况下，不同个体对化疗的敏感性差异很大，这种差异使依靠临床经验进行化疗面临着极大的挑战。老年人是个特殊群体，器官功能与药物代谢和年轻人不同，临床中有很多老年患者因化疗疗效的不确定性和毒副反应的不可避免性而选择放弃治疗。DNA 是许多抗肿瘤药物的分子靶点，DNA 的修复能力影响着化疗药物的疗效，也和化疗药物的耐药性相关。为了提高药物的疗效，减轻毒副反应，可以通过对化疗药物相关基因或蛋白的表达水平或多态性进行检测，筛选出能够从化疗中获益的老年人群，从而提高疗效，减低毒副反应。现阶段定量分析 RRM1 表达水平的研究主要针对来源于纤维支气管镜活检或手术切除获得的肿瘤组织，而对于老年晚期患者来说，组织标本无法再次获取或者组织量较少的问题尤为突出。本研究采用实时荧光定量聚合酶链反应（qRT-PCR）检测老年晚期 NSCLC 患者外周血中 RRM1 的表达与吉西他滨化疗药物疗效及预后的相关性，旨在寻找一种简便易行的检测方法进行化疗药物的筛选。

1 资料与方法

1.1 临床资料

筛选云南省肿瘤医院 2013 年 9 月 -2015 年 12 月收治且经病理组织学诊断的晚期 NSCLC 患者 40 例，其中，男性 32 例，女性 8 例，男：女为 4：1，年龄 70 ~ 78 岁，平均 73 岁，PS 评分 ≤ 2 分。病理类型：鳞癌 30 例，均未行 EGFR 突变检测；腺癌 10 例，其中 6 例 EGFR 野生型，4 例 EGFR 突变未知型。III b 期 8 例，IV 期 32 例。化疗前行 CT，彩超和全身骨骼核素扫描，常规检查心、肺、肝、肾等功能。化疗采用吉西他滨单药的化疗方案：吉西他滨 1 000 mg/m² 第 1 和 8 天，每 21 ~ 28 d 为 1 个周期；连续 2 ~ 6 个周期。病理组织分型按 WHO 组织学分类（1998）标准，分期按 1997 年国际抗癌联盟（UICC）制订的标准。

1.2 试剂和仪器

外周血中 RNA 提取试剂盒，cDNA 合成试剂盒，荧光定量 PCR 试剂盒均购自北京天根生化科技公司。PCR 仪，凝胶成像系统由北京 BioRAD 公司生产。

1.3 引物设计和合成

根据 GeneBank 的序列 RRM1 及管家基因 β -actin 进行引物设计。RRM1 正向引物：5'-CCCTGACTATGCTATCCTGGC-3'，反向引物：5'-ACCATGGGAGAGTGTTC-3'；管家基因正向引物：5'-AGCCTCGCCTTTC CCG-3'，反向引物：5'-CTCGTCGCCCACATAGGAAT-3'。引物由北京 Invitrogen 公司合成。

1.4 外周血中 RNA 的提取及 cDNA 的合成

在化疗前和 2 个周期化疗后分别抽取患者外周静脉血 4 ml 置于 EDTA 抗凝管中，离心后弃去上层血浆，将细胞层移入离心管中。依据血液 RNA 提取试剂盒操作规程进行外周血中 RNA 的提取。依据 cDNA 合成试剂盒操作规程进行 cDNA 的合成反应。

1.5 qRT-PCR

将质粒标准品 RRM1 及管家基因质粒标准品等比稀释成 6 个浓度后，进行 SYBR qRT-PCR。反应体系中加入 Real Master Mix/SYBR Solution 22.5 μ l，正反向引物各 1 μ l，Rox reference dye 0.5 μ l，DNA 模板 5 μ l，DEPC 水 20.5 μ l。反应条件：聚合酶的活化 20 s，95℃，PCR 扩增 40 个循环。

1.6 疗效判断标准

疗效按 WHO 实体瘤标准判定分为：完全缓解（complete response, CR），部分缓解（partial response, PR），疾病稳定（stable disease, SD），疾病进展（progression disease, PD）。CR+PR 为有效，CR+PR+SD 为控制。无进展生存期（progression free survival, PFS）指自治疗首日至病变进展日；总生存期（overall survival, OS）为治疗首日至死亡日或失访日，均以月计。随访截止时间：2016 年 4 月。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析。进行

统计处理前, 治疗前外周血 RRM1 的表达以其中位数为界, 分为高表达组和低表达组。2 个样本率的比较采用 χ^2 检验, 生存分析采用 Kaplan-Meier 法、Log-rank 法检验及 Cox 多因素回归分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血 RRM1 及管家基因的电泳结果

以含有 RRM1 和管家基因的质粒作为模板进行 PCR 扩增, 产物经琼脂凝胶电泳检测, 条带清晰, 片段长度正确, 经测序证实两序列一致。见图 1。

2.2 外周血 RRM1 的表达水平

以管家基因 β -actin 作为内参, 计算 RRM1 的相对表达量。计算方法: RRM1mRNA 拷贝数 / β -actin mRNA 拷贝数, 计算平均值。外周血中 RRM1 的中位表达水平为: 26.7% (12.32% ~ 55.86%)。

2.3 外周血 RRM1 表达与临床特征的关系

外周血 RRM1 的表达水平以中位数 26.7% 为界分为高表达组和低表达组。高表达组的表达水平为: (51.65% ± 4.21%); 低表达组的表达水平为: (15.33% ± 3.01%)。两组与临床特征的相关性见表 1。

2.4 外周血 RRM1 表达与化疗疗效的关系

本组患者共接受单药吉西他滨方案化疗 146 周期, 无 CR 患者, 9 例 PR, 总有效率 (CR+PR) 为 22.5%, 8 例 SD (20%), 疾病控制率 (CR+PR+SD) 为 42.5%, 23 例 PD (57.5%)。RRM1 低表达组有效率 (RR) 40% (8/20), RRM1 高表达组有效率 5% (1/20),

两组差异有统计学意义 ($P = 0.023$)。RRM1 低表达组疾病控制率 (disease control rate, DCR) 65% (13/20), RRM1 高表达组疾病控制率 20% (4/20), 两组差异有统计学意义 ($P = 0.004$), 见表 2。

2.5 外周血 RRM1 表达与生存期的关系

本组病例中位总生存期 (OS) 为 13.3 个月, 1 年生存率为 66.7%, 2 年生存率为 4.6%。RRM1 低表达组和高表达组, 中位 OS 分别为 14.8 个月和 11.6 个月, 1 年生存率分别为 76.7% 和 53.3%; 2 年生存率分别为 9.3% 和 0%。经 Log-rank 检验, 差异有统计学意义 ($P = 0.004$), 见图 1。OS 与性别 (男: 13 个月 vs 女: 15 个月, $P = 0.052$)、病理类型 (鳞癌: 14 个月 vs 腺癌:

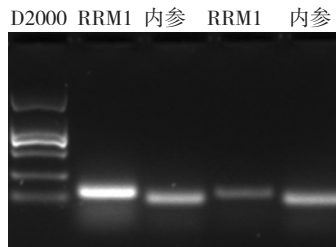


图 1 外周血中 RRM1 不同表达水平的电泳结果

表 1 外周血 RRM1 表达与临床特征的相关性

组别	性别		病理类型		分期	
	男性	女性	鳞癌	腺癌	III B	IV
高表达组	17	3	14	6	5	15
低表达组	15	5	16	4	3	17
χ^2 值	0.156		0.133		0.156	
P 值	0.693		0.715		0.693	

表 2 外周血 RRM1 表达水平与化疗疗效的关系 (n=20)

组别	RRM1 ($\bar{x} \pm s$)	CR/例	PR/例	SD/例	PD/例	RR/例	χ^2 值	P 值	DCR/%	χ^2 值	P 值
高表达组	51.65 ± 4.21	0	1	3	16	5	5.161	0.023	20	8.286	0.004
低表达组	15.33 ± 3.01	0	8	5	7	40			65		

14.5 个月, $P = 0.139$)、分期 (III B 期: 13.2 个月 vs IV 期: 14.5 个月, $P = 0.148$) 均无相关性。

本组病例中位无进展生存期 (PFS) 为 3.7 个月。RRM1 低表达组和高表达组, 中位 PFS 分别为 4.4 个月和 3.2 个月; 经 Log-rank 检验, 差异有统计学意义 ($P = 0.012$)。见图 2、图 3。

2.6 晚期 NSCLC 预后的 Cox 多因素分析

将 OS 单因素分析中有统计学意义的变量纳入多因素分析时, Cox 回归分析显示: RRM1 表达是有统计学意义的预后因素, 见表 3。

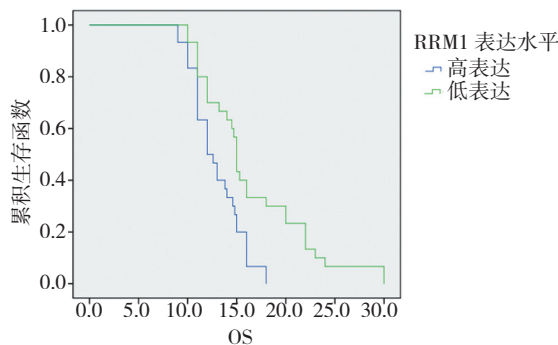


图 2 外周血 RRM1 表达水平与生存期的关系

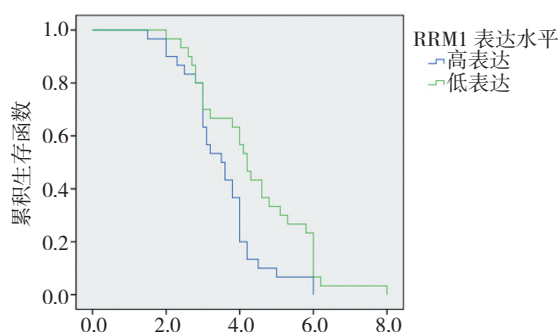


图 3 外周血 RRM1 表达水平与无进展生存期的关系

表 3 Cox 回归变量分析

项目	b	S _b	Wald χ^2	P 值	\hat{OR}	95.0%CI	
						下限	上限
RRM1	0.624	0.036	6.012	0.013	0.511	0.271	0.898

3 讨论

已有研究^[2-4]提示：吉西他滨用于肿瘤细胞时，RRM1 的表达水平增高会使肿瘤细胞的耐药性增加。既然晚期 NSCLC 患者中 RRM1 的表达水平与肿瘤细胞对吉西他滨耐药的相关性已经明确，RRM1 的表达水平应该可以成为筛选患者的一项指标。多项 Meta 分析^[5-7]提示：RRM1 低表达的患者对吉西他滨化疗更敏感，生存期也更长；RRM1 的表达可预测吉西他滨化疗的疗效。ZHANG 等^[8]的研究同时检测了外周血中 RRM1 和 ERCC1 的表达，发现外周血 RRM1 低表达的患者比 RRM1 高表达的患者有更高的化疗有效率和更长的无进展生存期及总生存期；而外周血 ERCC1 的表达水平与吉西他滨和铂类化疗的疗效及生存期无相关性。从现有的标本来看，外周血中的表达检测相对简便而且容易获取，对于无法获取组织及组织标本量较少的老年患者来说，外周血替代组织标本检测是可行的。

本研究以老年晚期 NSCLC 为研究对象，化疗药物选择单药吉西他滨，排除了铂类药物的影响因素，使研究因素较为单一，因此能较好地反应外周血 RRM1 的表达与吉西他滨疗效间的关系。研究显示：外周血 RRM1 的表达水平与老年晚期 NSCLC 患者的

性别，病理类型及分期均无相关性。外周血 RRM1 低表达的患者比 RRM1 高表达的老年患者有更高的化疗有效率，疾病控制率和更长的无进展生存期及总生存期，说明老年晚期 NSCLC 外周血 RRM1 低表达的患者更能从吉西他滨的化疗中获益。而生存期与老年患者的性别，分期，病理类型无明显的相关性。多因素分析还显示外周血 RRM1 的表达水平是老年晚期 NSCLC 独立的预后因素。通过本项研究为晚期 NSCLC 无法再获取组织标本的老年患者如何选择化疗药物提供了理论依据。

参 考 文 献：

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics, 2009[J]. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, 2009, 59(4): 225-249.
- [2] BEPLER G, WILLIAMS C, SCHELL M J, et al. Randomized international phase III trial of ERCC1 and RRM1 expression-based chemotherapy versus gemcitabine/carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2013, 31(19): 2404-2412.
- [3] ZHANG Y, LI X, CHEN Z, et al. Abstract 5537: Ubiquitination of RRM1 by Ring1B (RNF2) promotes its degradation and nuclear export[J]. *Cancer Research*, 2011, 71(8 Supplement): 5537.
- [4] BEPLER G, OLAUSSEN K A, VATAIRE A L, et al. ERCC1 and RRM1 in the international adjuvant lung trial by automated quantitative in situ analysis[J]. *American Journal of Pathology*, 2011, 178(1): 69-78.
- [5] ZENG C, FAN W, ZHANG X. RRM1 expression is associated with the outcome of gemcitabine-based treatment of non-small cell lung cancer patients—a short report[J]. *Cellular Oncology*, 2015, 38(4): 319-325.
- [6] YAN ZHANG, XIN S U, YI SHI. Relationship between RRM1 expression and therapeutic effects of gemcitabine for advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis[J]. *Med J Chin Pla*, 2012, 37(2): 135-140.
- [7] GONG W, ZHANG X, WU J, et al. RRM1 expression and clinical outcome of gemcitabine-containing chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis[J]. *Lung Cancer*, 2012, 75(3): 374-380.
- [8] ZHANG G B, CHEN J, WANG L R, et al. RRM1 and ERCC1 expression in peripheral blood versus tumor, tissue in gemcitabine/carboplatin-treated advanced non-small, cell lung cancer[J]. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, 2012, 69(5): 1277-1287.

(张西倩 编辑)