

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.10.012

• 临床研究 •

晚期结肠癌组织中ERCC1和BRCA1的表达与奥沙利铂方案化疗疗效及预后的关系



顾术东, 茅国新

Correlation of ERCC1, BRCA1 Expression and Chemotherapeutic Effect and Prognosis of Oxaliplatin Regimens in Advanced Colon Cancer Tissues

GU Shudong, MAO Guoxin

Department of Tumor Chemotherapy, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China

Abstract: Objective To investigate the correlation of ERCC1, BRCA1 proteins expression and clinicopathological features, chemotherapeutic effect and prognosis of Oxaliplatin regimens in advanced colon cancer tissues. **Methods** Immunohistochemistry was used to measure ERCC1 and BRCA1 proteins expression in advanced colon cancer tissues. **Results** The positive rate of ERCC1 and BRCA1 proteins expression were 41.2% and 47.4% respectively. ERCC1 and BRCA1 proteins expression were not associated with gender, age, differentiation degree or the position of tumor ($P > 0.05$). The positive expression of ERCC1 protein had a significantly positive correlation with that of BRCA1 protein in advanced colon cancer ($r = 0.211$, $P = 0.038$). The response rate of chemotherapy in patients with ERCC1 and BRCA1 negative expression was significantly higher than that with positive expression ($P < 0.05$). Compared with ERCC1 positive patients, ERCC1 negative patients had longer median survival time (MST) with statistical difference ($P = 0.014$). Compared with BRCA1 positive patients, BRCA1 negative patients had longer MST without statistical difference ($P = 0.201$). COX multivariate analysis showed that ERCC1 protein expression and differentiation degree were independently factors correlated with the prognosis of advanced colon cancer patients. **Conclusion** The expression of ERCC1 and BRCA1 had a significant correlation. ERCC1 is a predictive marker for chemotherapeutic effect and prognosis of platinum-based regimen, however, BRCA1 is only a predictive factor for chemotherapeutic effect on advanced colon cancer patients and its value in the prognosis still needs more investigation.

Key words: Colon cancer; Excision repair cross-complementing gene 1 (ERCC1); Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1); Oxaliplatin; Prognosis

摘要: 目的 探讨晚期结肠癌组织中切除修复交叉互补基因1 (excision repair cross-complementing gene 1, ERCC1) 和乳腺癌易感基因1 (breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1) 的表达情况及其与临床病理特征、奥沙利铂方案化疗疗效及预后之间的关系。**方法** 采用免疫组织化学方法检测晚期结肠癌组织中ERCC1和BRCA1蛋白的表达状况。**结果** 晚期结肠癌组织中ERCC1和BRCA1蛋白表达阳性率分别为41.2%和47.4%。ERCC1和BRCA1蛋白的表达与患者的年龄、性别、肿瘤分化程度和肿瘤部位均无关 ($P > 0.05$)。结肠癌组织中ERCC1蛋白表达与BRCA1蛋白表达呈正相关 ($r = 0.211$, $P = 0.038$)。ERCC1和BRCA1蛋白表达阴性患者奥沙利铂方案化疗有效率高于表达阳性患者 ($P < 0.05$)。ERCC1蛋白表达阴性患者化疗后, 中位生存期 (median survival time, MST) 高于表达阳性患者 ($P = 0.014$); BRCA1蛋白表达阴性患者化疗后MST高于表达阳性患者, 但差异无统计学意义 ($P = 0.201$)。Cox回归模型分析结果显示ERCC1蛋白的表达状态和肿瘤分化程度是影响结肠癌预后的独立因素。**结论** 晚期结肠癌中ERCC1和BRCA1蛋白的表达存在相关性, ERCC1和BRCA1的表达对奥沙利铂方案化疗疗效具有预测价值, 并且ERCC1的表达状态可作为预后判断依据, 而BRCA1在晚期结肠癌预后判断中的价值则有待进一步研究。

关键词: 结肠癌; 修复交叉互补基因1 (ERCC1); 乳腺癌易感基因1 (BRCA1); 奥沙利铂; 预后

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A

收稿日期: 2013-03-08; 修回日期: 2013-06-13

作者单位: 226001 江苏南通, 南通大学附属医院肿瘤化疗科

作者简介: 顾术东 (1978-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事恶性肿瘤的综合治疗工作

0 引言

结肠癌为我国常见恶性肿瘤之一, 在确诊时很多患者已属中晚期, 联合化疗是晚期结肠癌的主要治疗手段^[1]。奥沙利铂与亚叶酸钙和氟尿嘧啶

啖组成的FOLFOX方案,是晚期结肠癌的常用一线化疗方案,切除修复交叉互补基因1(ERCC1)和乳腺癌易感基因1(BRCA1)是奥沙利铂所致细胞DNA损伤修复的主要基因,与奥沙利铂耐药相关^[2-3]。目前有研究表明,在结肠癌中ERCC1的表达与铂类的疗效及预后相关,而对于BRCA1蛋白在结肠癌组织中的表达,特别是在晚期患者中的表达状况及其与ERCC1相关性的研究则较少。本研究采用免疫组织化学法检测晚期结肠癌组织中ERCC1、BRCA1蛋白的表达,探讨ERCC1与BRCA1蛋白表达的相关性,及其与患者临床病理特征、奥沙利铂方案化疗疗效及预后之间的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集南通大学附属医院肿瘤化疗科2008年1月—2010年12月间收治的经组织病理学证实、临床随访资料完整的晚期结肠癌患者97例,所有患者根据AJCC第七版TNM临床分期标准进行分期均为IV期,并且无手术治疗指征。患者年龄在32~78岁之间,中位年龄57岁,男54例,女43例;病理类型包括:腺癌63例,黏液腺癌21例,印戒细胞癌10例,腺鳞癌2例,鳞癌1例;PS评分 ≤ 2 分,预计生存期 > 3 月,重要脏器功能无明显异常,均为初治患者,有客观可测量病灶。所有病例接受mFOLFOX6方案化疗,具体剂量为:奥沙利铂 85 mg/m^2 静脉滴注2 h,第1天;亚叶酸钙 400 mg/m^2 静脉滴注2 h,第1天;5-Fu 400 mg/m^2 静脉推注,第1天,2 400 mg/m^2 持续静脉滴注46 h,每2周重复。所有患者至少接受4周期化疗后评价疗效。随访采用住院治疗、门诊及电话随访相结合的方式,截止时间为2012年11月30日。所有病例的肿瘤组织标本用免疫组织化学方法检测ERCC1、BRCA1蛋白的表达状态,根据蛋白的表达状况进行分组。

1.2 检测方法

结肠癌石蜡组织切片,采用EnVision二步法检测癌组织ERCC1、BRCA1蛋白表达,操作步骤如下:肿瘤组织经4%甲醛固定、脱水、石蜡包埋后,常规切片,厚度 $4 \mu\text{m}$;常规脱蜡、水化、抗原修复,3%的 H_2O_2 室温孵育,磷酸盐缓冲液冲洗;滴加1:100稀释的鼠抗人ERCC1或BRCA1单克隆抗体,室温培育,后经磷酸盐缓冲液冲洗,DAB显色,苏木精对比染色;再梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,于显微镜下镜检。

以磷酸盐缓冲液替代一抗作为阴性对照。

1.3 结果判断

ERCC1、BRCA1蛋白阳性表达主要表现为细胞核着色,以细胞核中出现明显的棕黄色颗粒判定为阳性,结果根据免疫反应评分进行判定,分别对染色强度和阳性细胞百分数进行计分,肿瘤细胞染色强度评分标准为:无着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,深棕色为3分;阳性细胞百分比评分标准为: $< 5\%$ 为0分,5~25%为1分, $> 25\sim 50\%$ 为2分, $> 50\sim 75\%$ 为3分, $> 75\%$ 为4分。将染色强度与阳性细胞百分数的计分相乘,乘积 ≥ 2 分为蛋白表达阳性,乘积0~1分为表达阴性。

1.4 化疗疗效及预后评价

按RECIST疗效评价标准评定化疗疗效,分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、疾病稳定(PD)、疾病进展(SD),有效率(RR)为CR与PR之和。总生存期(overall survival, OS)是指从患者化疗时间始至患者死亡或最后一次随访的时间(失访患者),计算中位生存期(median survival time, MST)和2年生存率。

1.5 统计学方法

所有结果均采用SPSS20.0统计软件进行分析处理。分析ERCC1、BRCA1蛋白表达与临床病理特征的关系采用卡方检验;ERCC1和BRCA1蛋白表达相关分析采用Spearman秩相关分析;生存分析使用Kaplan-Meier法,组间差异采用Log rank法检验;用Cox回归模型进行多因素分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌组织中ERCC1、BRCA1蛋白表达及其与临床病理特征关系

97例晚期结肠癌患者中ERCC1蛋白表达阳性率为41.2% (40/97), BRCA1蛋白表达阳性率为47.4% (46/97)。ERCC1、BRCA1蛋白的表达与患者性别、年龄、病理分化程度、肿瘤部位无明显相关性($P > 0.05$),见表1。结肠癌组织中ERCC1、BRCA1蛋白表达结果见图1、2。

2.2 结肠癌组织中ERCC1蛋白与BRCA1蛋白表达相关性

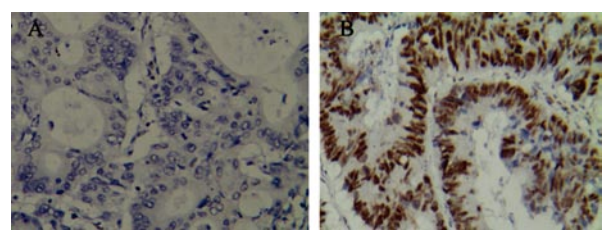
97例结肠癌患者中,ERCC1和BRCA1蛋白表达均为阳性24例(24.7%),ERCC1和BRCA1蛋白表达均为阴性35例(36.1%),ERCC1蛋白阳性BRCA1阴性16例(16.5%),ERCC1蛋白阴性BRCA1蛋白阳性22例(22.7%),ERCC1蛋

表1 ERCC1、BRCA1蛋白的表达及其与结肠癌临床病理特征关系

Table1 The relationship of ERCC1 and BRCA1 expression with clinicopathological features in colon cancer tissues

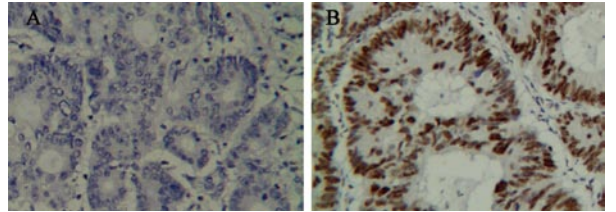
Clinicopathological features	n	ERCC1 expression				BRCA1 expression			
		+	Positive rate(%)	χ^2	P	+	Positive rate(%)	χ^2	P
Gender									
Male	54	24	44.4	0.517	0.472	28	51.9	0.958	0.328
Female	43	16	37.2			18	41.9		
Age(years)									
<60	52	21	40.4	0.034	0.855	24	46.2	0.072	0.788
≥60	45	19	42.2			22	48.9		
Position of tumor									
Left	30	14	46.6	0.528	0.467	14	46.7	0.010	0.921
Right	67	26	38.8			32	47.8		
Differentiation									
High	24	7	29.2	2.997	0.223	8	33.3	3.828	0.147
Middle	43	18	34.0			20	46.5		
Low	30	15	50.0			18	60.0		

Notes: ERCC1:excision repair cross-complementing gene 1; BRCA1: breast cancer susceptibility gene 1



A:negative expression of ERCC1 protein in colon cancer tissues; B: positive expression of ERCC1 protein in colon cancer tissues

图1 ERCC1蛋白在结肠癌中的表达(EnVision ×200)
Figure1 Expression of ERCC1 protein in colon cancer tissues (EnVision ×200)



A: negative expression of BRCA1 protein in colon cancer tissues; B: positive expression of BRCA1 protein in colon cancer tissues

图2 BRCA1蛋白在结肠癌中的表达(EnVision ×200)
Figure2 Expression of ERCC1 protein in colon cancer tissues(EnVision ×200)

白表达与BRCA1蛋白表达呈正相关（ $r=0.211$ ， $P=0.038$ ），见表2。

表2 结肠癌ERCC1与BRCA1蛋白表达的相关性分析
Table2 Correlative analysis of ERCC1 and BRCA1 expression in colon cancer tissues

ERCC1 expression	Total	BRCA1 expression		r	P
		+	-		
+	40	24	16	0.211	0.038
-	57	22	35		
Total	97	46	51		

2.3 结肠癌ERCC1、BRCA1蛋白表达与化疗疗效关系

97例结肠癌患者化疗总有效率为48.5%。ERCC1

蛋白表达阳性患者化疗有效率为32.5%，表达阴性患者化疗有效率为59.6%，两组差异有统计学意义（ $P=0.008$ ）；BRCA1蛋白表达阳性患者化疗有效率为37.0%，表达阴性患者化疗有效率为58.8%，两组差异有统计学意义（ $P=0.031$ ）；ERCC1和BRCA1蛋白表达均为阳性者化疗有效率为29.2%，表达均为阴性者化疗有效率为60.0%，两组差异有统计学意义（ $P=0.020$ ），见表3。

表3 结肠癌ERCC1、BRCA1蛋白表达与化疗疗效关系
Table3 The relationship of ERCC1 and BRCA1 expression with chemotherapeutic efficacy in colon cancer tissues

Groups	<i>n</i>	CR	PR	NC	PD	CR+PR(%)	χ^2	<i>P</i>
ERCC1								
+	40	1	12	15	12	32.5	6.937	0.008
−	57	3	31	13	10	59.6		
BRCA1								
+	46	2	15	14	15	37.0	4.630	0.031
−	51	2	28	14	7	58.8		
ERCC1+BRCA1								
+	24	1	6	7	10	29.2	5.428	0.020
−	35	2	19	8	6	60.0		

2.4 结肠癌ERCC1、BRCA1蛋白表达与预后关系
97例结肠癌患者MST为15月（95%CI：12.242~17.758），2年OS为33.0%。ERCC1蛋白表达阳性患者MST为13月（95%CI：10.521~15.479），2年OS为20.0%，ERCC1蛋白表达阴性患者MST为19月（95%CI：12.535~25.465），2年OS为42.1%，两组间差异有统计学意义（ $\chi^2=6.025$ ， $P=0.014$ ），生存曲线见图3。BRCA1蛋白表达阳性患者MST为14月（95%CI：11.517~16.483），2年OS为28.3%，BRCA1蛋白表达阴性患者MST为18月（95%CI：12.760~23.240），2年OS为37.3%，两组差异无

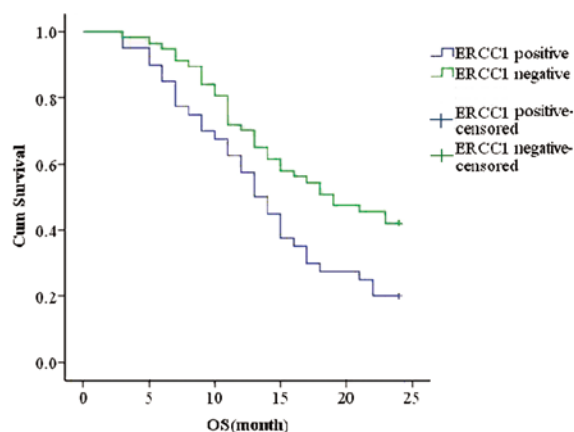


图3 ERCC1蛋白表达阳性组与表达阴性组的Kaplan-Meier生存曲线

Figure3 Kaplan-Meier survival curves of positive and negative expression of ERCC1 protein

统计学意义 ($\chi^2=1.632$, $P=0.201$), 生存曲线见图4。ERCC1和BRCA1蛋白表达均为阳性患者MST为12月(95%CI: 9.600~14.400), 2年OS为16.7%, ERCC1和BRCA1蛋白表达均为阴性患者MST为19月(95%CI: 9.727~28.273), 2年OS为42.9%, 两组间差异有统计学意义 ($\chi^2=6.370$, $P=0.012$), 生存曲线见图5。COX比例风险回归模型分析结果显示ERCC1蛋白的表达状态和肿瘤分化程度是影响晚期结肠癌患者预后的独立因素, 风险度分别为1.585 ($P=0.035$, 95%CI: 1.034~2.431) 和2.431 ($P=0.004$, 95%CI: 1.319~4.478)。

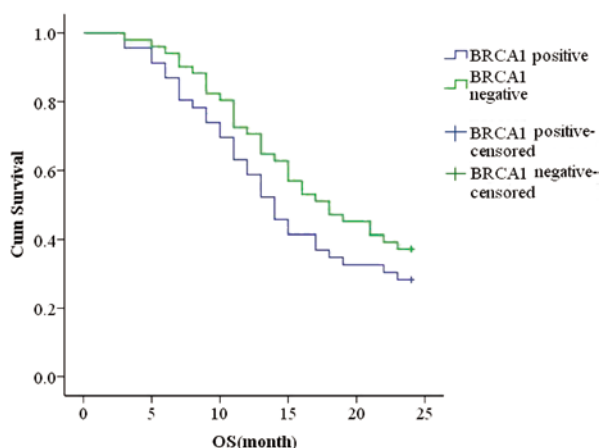


图4 BRCA1蛋白表达阳性组与表达阴性组的Kaplan-Meier生存曲线

Figure4 Kaplan-Meier survival curves of positive and negative expression of BRCA1 protein

3 讨论

奥沙利铂是结肠癌化疗的常用药物, 主要作用靶点为DNA, 通过与细胞DNA的结合形成铂

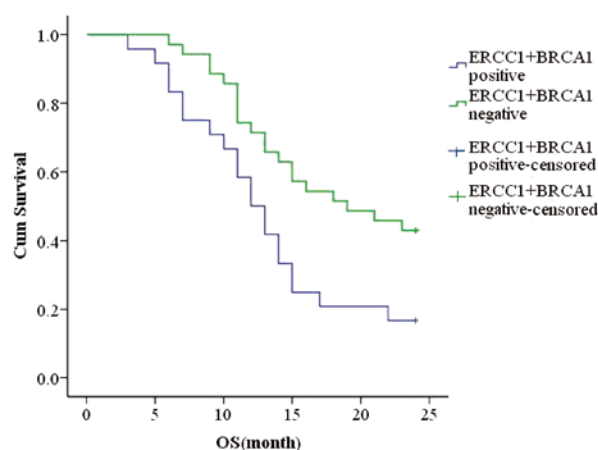


图5 ERCC1和BRCA1蛋白表达均为阳性组与表达均为阴性组的Kaplan-Meier生存曲线

Table5 Kaplan-Meier survival curves of positive and negative expression of ERCC1 and BRCA1 proteins

DNA加合物, 导致链内或链间交联, 引起DNA的损伤, 导致肿瘤细胞的凋亡, 若DNA的损伤被修复则会形成对奥沙利铂的耐药。核苷酸切除修复系统(nucleotide excision repair, NER)是细胞DNA损伤修复的重要途径, 同时也是铂类药物所致DNA损伤修复的主要途径, ERCC1、BRCA1是NER途径的关键基因, 与铂类的耐药有关^[4]。

ERCC1基因定位于第19号染色体, 基因组DNA全长约15 kb, 编码的蛋白质含297个氨基酸残基, ERCC1基因表达产物可与DNA修复酶缺乏互补基因F形成复合物, 该复合物具有损伤识别功能和核酸内切酶活性, 通过识别和去除铂类化合物并修复DNA链间交联来参与DNA再合成过程, ERCC1基因表达的增加, 会增强肿瘤细胞DNA的修复活性, 从而导致铂类耐药^[5-6]。研究表明, ERCC1 mRNA的水平可以反映肿瘤组织对铂类所致DNA损伤修复的能力, 并且与铂类药物化疗的敏感度呈负相关^[7]。Li等^[8]在对Ⅲ期结肠癌接受辅助化疗的研究中发现, ERCC1表达阴性患者较表达阳性患者接受铂类方案化疗后有着更长的无病生存期及总生存期, 而这一现象在接受非铂类方案治疗的患者中没有观察到。本研究中, ERCC1蛋白表达阴性晚期结肠癌患者化疗有效率及MST明显高于阳性患者 ($P<0.05$), 表明ERCC1阴性患者接受奥沙利铂方案化疗可获益, ERCC1表达状态可预测化疗疗效及预后, 这一结果与文献报道相近。

BRCA1基因定位于17号染色体, 基因组DNA长约100 kb, 编码的蛋白质含1 863个氨基酸残基, BRCA1基因表达产物在DNA双链断裂修复中

起着重要作用, BRCA1基因的突变或功能缺陷会使肿瘤细胞对导致DNA断裂的化疗药物如铂类的敏感度增加, 而表达增强则会出现铂类的耐药。Rosell等^[9]研究表明, 在乳腺癌细胞株中下调BRCA1 mRNA表达水平可以增加癌细胞对顺铂的敏感度, 而上调BRCA1 mRNA的表达水平可以增加癌细胞株对顺铂的耐药性。研究证实, 在非小细胞肺癌、卵巢癌中BRCA1的表达状态对化疗疗效及预后具有预测价值, BRCA1低表达的患者可从铂类为基础的化疗中获益, 并有着更长的生存期^[10-11]。目前, 在接受铂类方案辅助化疗的结直肠癌患者中, BRCA1表达对预后的预测价值有着不同的观点, 曾令海等^[12]研究认为BRCA1低表达患者较高表达患者有着更长的无病生存期, BRCA1的表达状态对预后具有预测价值, 但是也有研究表明BRCA1的预测作用尚不明确, 仍有待进一步研究^[13]。而在晚期结肠癌患者中, BRCA1的表达与铂类化疗疗效及预后关系的研究甚少, 具体价值尚不明确。我们在研究中对BRCA1的表达与晚期结肠癌铂类化疗疗效及预后的关系进行探讨, 结果显示BRCA1蛋白表达阴性的晚期结肠癌患者化疗有效率高于表达阳性患者 ($P < 0.05$), BRCA1蛋白的表达对铂类化疗方案的疗效具有预测价值, 两组患者的MST比较, BRCA1表达阴性患者略高于阳性患者, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), BRCA1蛋白表达阴性患者化疗后生存获益不明显, BRCA1的表达对预后的意义需扩大样本量进一步研究。

本研究结果初步表明, 晚期结肠癌患者ERCC1和BRCA1蛋白的表达状况可能成为奥沙利铂方案化疗疗效及预后的预测指标, 对化疗方案的选择具有指导意义。

参考文献:

- [1] Tang ZY. Modern Oncology[M]. Third edition. Shanghai: Fudan University Press, 2011: 964-83. [汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 3版. 上海: 复旦大学出版社, 2011: 964-83.]
- [2] Xu YJ, Liu YY, Yao ZH, *et al.* Expression of ercc1 of rrm1 genes in invasive non-hodgkin's lymphoma and clinical significance[J]. Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu, 2013, 40(5): 451-4. [许英君, 刘艳艳, 姚志华, 等. ercc1、rrm1基因在侵袭性非霍奇金淋巴瘤中的表达及临床意义[J]. 肿瘤防治研究, 2013, 40(5): 451-4.]
- [3] Gallagher DJ, Konner JA, Bell-McGuinn KM, *et al.* Survival in epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis incorporating BRCA mutation status and platinum sensitivity[J]. Ann Oncol, 2011, 22(5): 1127-32.
- [4] Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, *et al.* Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes[J]. Pharmacol Rev, 2012, 64(3): 706-21.
- [5] Croteau DL, Peng Y, Van Houten B. DNA repair gets physical: mapping an XPA-binding site on ERCC1[J]. DNA Repair (Amst), 2008, 7(5): 819-26.
- [6] Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents[J]. Cancer Treat Rev, 2007, 33(1): 9-23.
- [7] Xian-Jun F, Xiu-Guang Q, Li Z, *et al.* ERCC1 and BRCA1 mRNA expression predicts the clinical outcome of non-small cell lung cancer receiving platinum-based chemotherapy[J]. Pak J Med Sci, 2014, 30(3): 488-92.
- [8] Li P, Fang YJ, Li F, *et al.* ERCC1, defective mismatch repair status as predictive biomarkers of survival for stage III colon cancer patients receiving oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy[J]. Br J Cancer, 2013, 108(6): 1238-44.
- [9] Rosell R, Cobo M, Isla D, *et al.* Pharmacogenomics and gemcitabine[J]. Ann Oncol, 2006, 17 Suppl 5: v13-16.
- [10] Weberpals J, Garbuio K, O'Brien A, *et al.* The DNA repair proteins BRCA1 and ERCC1 as predictive markers in sporadic ovarian cancer[J]. Int J Cancer, 2009, 124(4): 806-15.
- [11] Yang Y, Xie Y, Xian L, *et al.* Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) predict clinical outcome in platinum- and taxol-based chemotherapy in non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients: a system review and meta-analysis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2013, 32: 15.
- [12] Zeng LH, Wang YX, Xie K, *et al.* Clinical significance of mRNA expression level of ERCC1, BRCA1 and TYMS gene and polymorphism investigation of UGT1A1 gene in individualized chemotherapy of the patients with advanced colorectal cancer[J]. Xian Dai Yi Yao Wei Sheng, 2014, 30(12): 1761-4. [曾令海, 王亚旭, 谢凯, 等. ERCC1、BRCA1、TYMS的mRNA表达水平和UGT1A1多态性检测在结直肠癌患者个体化化疗中的临床意义[J]. 现代医药卫生, 2014, 30(12): 1761-4.]
- [13] Xu GH, Li Y, Ye SL, *et al.* ERCC1 and BRCA1 expressions in the tissues of colorectal cancer and its relationship with clinical significance of platinum-based chemotherapy[J]. Fu Dan Xue Bao (Yi Xue Ban), 2011, 38(4): 315-8, 323. [徐光辉, 李玉, 叶胜龙, 等. 结直肠癌组织中ERCC1和BRCA1的表达及其与铂类化疗疗效的相关性[J]. 复旦学报(医学版), 2011, 38(4): 315-8, 323.]

[编辑: 刘红武; 校对: 杨卉]