

细胞角蛋白19片段基因多态性与化疗联合贝伐珠单抗治疗晚期非小细胞肺癌疗效的相关性研究

吴洪 朱晓丹

[摘要] 目的 探究细胞角蛋白19片段(CYFRA21-1)基因多态性与化疗联合贝伐珠单抗治疗晚期非小细胞肺癌疗效的相关性。方法 选取晚期非小细胞肺癌患者120例,采用多态性标志检测(PCRRFLF)分析CYFRA21-1(-99G>C)。治疗后进行影像学检查,按照实体瘤疗效评价标准分为影像学缓解组(72例)和影像学未缓解组(48例),分析影响疗效的影响因素。结果 经过相对应的限制性核酸内切酶剪切后,GG基因型频率为20.83%(25/120),酶切产物片段的大小为168 bp;GC基因型频率为42.50%(51/120),酶切产物片段大小为168 bp、135 bp、65 bp;CC基因型频率为36.67%(44/120),酶切产物片段大小为135 bp、65 bp。单因素分析结果显示,影像学缓解组和影像学未缓解组的性别、年龄、吸烟史、病理类型与临床分期等因素比较,差异均无统计学意义(χ^2 分别=0.15、1.09、1.61、0.56、0.95, P 均>0.05),两组的体力状况(KPS)评分与基因分型比较,差异均有统计学意义(χ^2 分别=8.34、15.61, P 均<0.05)。进一步分析显示,基因分型和KPS评分是化疗联合贝伐珠单抗治疗效果的影响因素(OR 分别=2.43、3.01, P 均<0.05)。截止到随访时间,120例晚期非小细胞肺癌患者死亡62例,GG型患者的存活时间(21.19±2.96)月明显长于(GC+CC)型患者的存活时间(16.35±2.72)月,差异有统计学意义($t=10.26, P<0.05$)。结论 CYFRA21-1基因多态性是影响晚期非小细胞肺癌的化疗联合贝伐珠单抗治疗效果的因素,并且与化疗联合贝伐珠单抗治疗敏感相关。

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

Association between cytokeratin 19 fragment gene polymorphism and the efficacy of chemotherapy combined with bevacizumab in the treatment of advanced non-small cell lung cancer WU Hong, ZHU Xiaodan. Department of Respiratory Medicine, Yiwu Central Hospital, Yiwu 322000, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the association between cytokeratin 19 fragment gene polymorphism and the efficacy of chemotherapy combined with bevacizumab in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. **Methods** Totally 120 patients with advanced non-small cell lung cancer were selected as the study subjects. Polymorphism marker detection (PCR RFLF) was used to analyze CYFRA21-1 (-99G>C). After treatment, imaging examinations were performed. The patients were divided into the imaging remission group (72 cases) and the imaging non-remission group (48 cases). The influencing factors of efficacy were analyzed. **Results** After the corresponding restriction endonuclease cleaving, the frequency of GG genotype was 20.83%(25/120), the size of the cleavage product fragment was 168 bp. The frequency of GC genotype was 42.50%(51/120), the size of cleavage product fragment was 168 bp, 135 bp, and 65 bp. The frequency of CC genotype was 36.67%(44/120), and the size of cleavage product fragment was 135 bp and 65 bp. Univariate analysis showed that there were no significant differences in gender, age, smoking history, pathological type and clinical stage between the two groups ($\chi^2=0.15, 1.09, 1.61, 0.56, 0.95, P>0.05$). But the differences in KPS score and genotype between the two groups were statistically significant ($\chi^2=8.34, 15.61, P<0.05$). Genotyping and KPS score are risk factors influencing the efficacy of chemotherapy combined with bevacizumab ($OR=2.43, 3.01, P<0.05$). At the end of followed-up, of 120 patients with advanced non-small cell lung cancer, 62 cases died, and the survival time of GG type patients were (21.19±2.96) months which was significantly longer than that of GC + CC type patients

($t=10.26, P<0.05$). **Conclusion** CYFRA21-1 gene polymorphism is risk factor of the ef-

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2019.03.006

作者单位: 322000 浙江义乌, 义乌市中心医院呼吸内科

ficacy of chemotherapy combined with bevacizumab in advanced non-small cell lung cancer, which is related to the sensitivity of chemotherapy combined with bevacizumab.

[Key words] cytokeratin 19 fragment; gene polymorphism; chemotherapy; non-small cell lung cancer; targeted therapy

非小细胞肺癌是一种临床上常见的癌症。据相关研究报道非小细胞肺癌在肺癌发病中占比较高^[1],是威胁人类生命健康最常见的恶性肿瘤之一。近几年来,随着分子靶向技术的应用,尤其是在治疗恶性肿瘤方面,非小细胞肺癌患者已经取得了明显的临床改善效果^[2,3]。因此,本次研究探讨细胞角蛋白19片段(cytokeratin 19 fragment, CYFRA21-1)基因多态性与化疗联合贝伐珠单抗治疗非小细胞肺癌疗效的相关性。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取在2012年8月至2017年8月期间义乌市中心医院收治的晚期非小细胞肺癌患者120例,其中男性75例、女性45例;年龄52~76岁,平均年龄(62.42±7.65)岁;按照国际肺癌标准临床分期为:Ⅲa期42例、Ⅲb期43例、Ⅳ期35例;鳞癌68例、腺癌52例。纳入标准:①确诊为非小细胞肺癌;②无其他部位的癌症;③治疗前血常规检查和肝肾功能正常,体力状况(Karnofsky, KPS)评分≥70分,且符合接受化疗联合靶向治疗的身体要求;④患者及其家属知情同意;⑤采取化疗联合靶向治疗。排除其他影响治疗疾病因素的影响。

1.2 方法

1.2.1 患者外周血标本制备及DNA的提取 采集外周静脉血3 ml,放置于EDTA管中,-80℃深冻冰箱中保存。取血标本2 ml,采用基因组DNA快速提纯试剂盒(由美国Promega生物试剂公司)提取DNA,然后保存在-40℃的冰箱中留作备用。

1.2.2 PCR-RFLP应用 DNA引物设计由上海英俊生物科技工程有限公司生产。采用Light Scanner Primer Design软件设计细胞角蛋白19片段(-99G>C)基因相应位点的引物,全部都采用小片段扩增引物。正向引物:5'-CCGGTACATGGCCTATTA-ACGTGCATACGG-3',反向引物:5'-CGTTGCG-CAATGCTGACCGATCA-3',PCR产物片段长度为170 bp。

1.2.3 目的基因的扩增 PCR扩增体系为20 ml,包含4 mlPCRMix,正反向引物各0.5 ml,1 ml LC

Green和1 ml DNA模板,其他为双蒸馏水。然后在95℃预变性2 min,93℃下变性30 s,55℃下退火30 s,73℃延伸45 s,93℃下变性45 s,45℃退火30 s,周而复始,总共循环40次,然后在72℃下继续延伸5 min。延伸后取5 μl PCR产物,使用37℃限制性核酸内切酶Rsal进行切割,持续时间2 h。把切割之后的产物放入含有2%琼脂糖凝胶中进行电泳,采用溴化乙脞进行染色,使用紫外线透射仪检测PCR扩增是否成功,并鉴定其特异性。

120例患者实施化疗联合贝伐珠单抗抗血管生成药物治疗,具体化疗方案根据患者的肺癌细胞类型及相应的身体状况制定,其主要采取顺铂或卡铂联合其他化疗药物的化疗方式。30例患者采取顺铂联合紫杉醇联合治疗方案,30例患者实施卡铂联合去甲长春碱化疗方案,30例患者给予顺铂联合培美曲塞二钠化疗方案,30例采用顺铂联合吉西他滨化疗方案。治疗方案均为每21天为1周期,共4周期。然后在化疗治疗的基础上联合靶向药物贝伐珠单抗定位治疗,贝伐珠单抗单剂7.5 mg/m²+0.9%氯化钠注射液溶液250 ml静脉滴注,一周1次,21 d为1周期。贝伐珠单抗滴注第一次持续90 min,如果耐受性良好,第二次持续60 min,第三次持续30 min。

1.3 观察指标及评价标准 采用问诊或电话方式进行随访,随访时间截止2018年8月。搜集性别、年龄、病理类型、临床分期和基因型等一般资料。化疗4个周期后进行影像学检查,按照实体瘤疗效评价标准(response evaluation criteria in solid tumors, RECIST)^[4],采用单径测量法评价肿瘤的客观疗效,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(progressive disease, PD)。将CR+PR患者纳入影像学缓解组,SD+PD患者纳入影像学未缓解组。

1.4 统计学方法 采用SPSS 22.0统计软件分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。计量资料比较采用配对样本t检验或独立样本t检验;计数资料采用独立样本 χ^2 检验。多因素分析采用logistic回

归分析。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CYFRA21-1 经限制性核酸内切酶剪切后基因频率情况 GG 基因型频率为 20.83% (25/120), 酶切产物片段的大小为 168 bp; GC 基因型频率为 42.50% (51/120), 酶切产物片段大小为 168 bp、135 bp、65 bp; CC 基因型频率为 36.67% (44/120), 酶切产物片段大小为 135 bp、65 bp。

2.2 化疗 4 周后, CR+PR 共有 72 例为影像学缓解组, SD+PD 共有 48 例为影像学未缓解组, 化疗后影响患者是否得到影像学缓解的单因素分析见表 1。

表1 化疗后影响患者是否得到影像学缓解的单因素分析(例/%)

指标		影像学缓解组 (n=72)	影像学未缓解组 (n=48)
性别	男性	44(61.11)	31(64.58)
	女性	28(38.89)	17(35.42)
年龄	≥63岁	32(44.44)	26(54.17)
	<63岁	40(55.56)	22(45.83)
吸烟史	有	35(48.61)	29(60.42)
	无	37(51.39)	19(39.58)
病理类型	鳞癌	37(51.39)	28(58.33)
	腺癌	35(48.61)	20(41.67)
临床分期	Ⅲ期	48(66.67)	36(75.00)
	Ⅳ期	24(33.33)	12(25.00)
KPS评分	70~79分	17(23.61)	15(31.25)
	80~89分	25(34.72)	16(33.33)
	≥90分	30(41.67)	17(35.42)
基因分型	GG	26(36.11)	35(72.92)
	GC+CC	46(63.89)	13(27.08)

由表 1 可见, 单因素分析结果显示, 影像学缓解组和影像学未缓解组的性别、年龄、吸烟史、病理类型与临床分期等因素比较, 差异均无统计学意义 (χ^2 分别=0.15、1.09、1.61、0.56、0.95, P 均>0.05), 两组的 KPS 评分与基因分型比较, 差异均有统计学意义 (χ^2 分别=8.34、15.61, P 均<0.05)。

2.3 晚期非小细胞肺癌患者治疗效果影响因素的二元 logistic 回归分析见表 2

由表 2 可见, 基因分型和 KPS 评分是化疗联合贝伐珠单抗治疗效果的影响因素 (OR 分别=2.43、3.01, P 均<0.05)。

表2 晚期非小细胞肺癌患者治疗效果影响因素的二元 logistic 回归分析

变量	<i>B</i>	<i>S.E.</i>	Wald χ^2	<i>P</i>	<i>OR</i>
基因型	0.89	0.44	4.02	<0.05	2.43
KPS评分	1.10	0.28	15.96	<0.05	3.01
常量	-2.04	1.63	1.57	>0.05	

2.4 KRT19 基因多态性与化疗联合贝伐珠单抗治疗对患者存活时间的影响 截止到 2018 年 8 月, 120 例晚期非小细胞肺癌患者死亡 62 例, 全部访问, GG 型患者的存活时间 (21.19 ± 2.96) 月明显长于 (GC+CC) 型患者的存活时间 (16.35 ± 2.72) 月, 差异有统计学意义 ($t=10.26, P < 0.05$)。

3 讨论

非小细胞肺癌在临床上越来越常见^[5]。由于初期该病的症状并不明显, 许多患者并没有留意, 但是随着病情地恶化, 大多数患者就在就诊时基本上发展为肺癌晚期, 错过最佳的手术治疗时期^[6,7]。因此, 近几年, 许多临床工作者对非小细胞肺癌的发病机制、诊断方式及治疗方法进行了大量的研究^[8,9]。

CYFRA21-1 是由肺泡上皮细胞凋亡后, 其中的角蛋白碎片溶解在血液中形成可溶性物质。李玲等^[10]研究表明, CYFRA21-1 是晚期非小细胞肺癌治疗效果的重要评价指标。其分子结构中由 2 个亚群、1 个酸性蛋白、1 个碱性蛋白等组成。鲁广等^[11]研究指出, 尼妥单抗联合三维适形放射治疗晚期非小细胞肺癌可以明显地降低血液中 CYFRA21-1 的溶度, 临床治疗效果明显。Haghoo 等^[12]在研究中指出, 当 G 基因的等位基因发生突变之后, 等位基因变成 C 时, 肺癌的发病率明显增加。贝伐珠单抗是 VEGF 的单克隆抗体, 其通过抑制 VEGF 活性, 包括内皮细胞增强血管通透性活性, 促有丝分裂活性和其他促血管生成活性, 从而抑制新生血管形成, 减少肿瘤血供而抑制肿瘤生长。

本次研究结果显示, CYFRA21-1 基因经过相对应的限制性核酸内切酶剪切后, 产生三种基因型 GG、GC 及 CC, 基因酶切产物片段大小为 168 bp、135 bp、65 bp; 单因素分析结果显示, 影像学缓解组和影像学未缓解组的性别、年龄、吸烟史、病理类型与临床分期等因素比较, 差异均无统计学意义 (P 均>0.05), 两组的 KPS 评分与基因分型比较, 差异均有统计学意义 (P 均<0.05)。截止到随访时间, 120 例晚期非小细胞肺癌患者死亡 35 例, 全部访问, GG 型患者的存活时间明显长于 (GC+CC) 型患者 (P

<0.05);基因分型和KPS评分是影响患者的治疗效果的因素($P<0.05$)。由此可见,CYFRA21-1基因多态性与化疗联合贝伐珠单抗治疗能有效延长患者的生存时间,GC+CC基因型对化疗联合靶向治疗有较高的关联性。但是本次研究由于样本量、肿瘤患者的个体差异及肿瘤本身的差异性等因素,本结论只能作为一种诊断参考指标。

综上所述,CYFRA21-1基因多态性是影响晚期非小细胞肺癌的化疗联合靶向治疗效果的因素,并且与化疗贝伐珠单抗治疗敏感相关。

参考文献

- Atici AG, Erkan L, Findik S, et al. Clinical features of non-small cell lung cancer cases [J]. *Tüberküloz Ve Toraks*, 2004, 52(2):150-152.
- 朱代峰, 桂淑玉. 非小细胞肺癌的治疗进展[J]. *临床肺科杂志*, 2010, 15(3):372-374.
- 石园, 陈颖, 侯英勇, 等. 核不均一核糖核蛋白A2/B1在非小细胞肺癌发病机制中作用的探讨[J]. *中华肿瘤杂志*, 2011, 33(2):110-114.
- 高少勇, 林其昌, 陈公平, 等. 联合检测肿瘤指标在非小细胞肺癌临床诊断中的应用[J]. *实用医学杂志*, 2012, 28(23):3927-3929.
- 韦淑贞, 山顺林. 非小细胞肺癌多学科治疗的新进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2010, 18(4):828-830.
- 梁启军, 杨玉萍, 李存霞. 非小细胞肺癌发病机制及中西医结合治疗路径再探析[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 21(5):1355-1357.
- Heist RS, Christiani D. EGFR-targeted therapies in lung cancer: predictors of response and toxicity[J]. *Pharmacogenomics*, 2009, 10(1): 59-68.
- 程婷婷, 杨谨. 晚期非小细胞肺癌维持治疗的研究进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2011, 18(20):1651-1655.
- 李玲, 宋丽华, 丁士超, 等. 癌胚抗原和细胞角蛋白19片段作为晚期非小细胞肺癌疗效评价指标的临床价值[J]. *中华肿瘤杂志*, 2010, 32(11):850-854.
- 刘敏, 陈昌国, 马聪, 等. 多种指标联合检测非小细胞肺癌的诊断价值[J]. *检验医学与临床*, 2014, 16(22):3116-3118.
- 鲁广, 夏冰, 柴枫, 等. 尼妥珠单抗联合三维适形放射治疗晚期非小细胞肺癌的临床效果观察[J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 41(2):154-156.
- Haghgoo SM, 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(20):82-91.

(收稿日期 2018-10-06)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第211页)

此基础上进一步研究,发现一些对于临床更为有效的数据。

参考文献

- Wang P, Zhang Y, Yang H, et al. Characteristics of fibrinolytic disorders in acute promyelocytic leukemia[J]. *Hematology*, 2018, 23(10):756-764.
- Castaman G, Pieri L. Management of thrombocytopenia in cancer[J]. *Thromb Res*, 2018, 164(Suppl 1):S89-S93.
- David S, Mathews V. Mechanisms and management of coagulopathy in acute promyelocytic leukemia[J]. *Thromb Res*, 2018, 164(Suppl 1):S82-S88.
- Russell L, Madsen MB, Dahl M, et al. Prediction of bleeding and thrombosis by standard biochemical coagulation variables in haematological intensive care patients [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2018, 62(2):196-206.
- 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京:科学技术出版社, 1998.168-194.
- Shahmarvand N, Oak JS, Cascio MJ, et al. A study of disseminated intravascular coagulation in acute leukemia reveals markedly elevated D-dimer levels are a sensitive indicator of acute promyelocytic leukemia[J]. *Int J Lab Hematol*, 2017, 39(4):375-383.
- Sehgal S, Sharma S, Chandra J, et al. Coagulation profile during induction chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2017, 60(1):50-56.

(收稿日期 2018-11-23)

(本文编辑 蔡华波)