

胃癌患者血浆游离 BRCA1 mRNA 表达水平与临床病理特征及生存时间的关系

曹向明^{1,2}, 沈洁¹, 禹立霞¹, 魏嘉¹, 沈伟生², 奚雷², 刘宝瑞^{1*}

(¹南京医科大学鼓楼临床医学院肿瘤中心, 江苏 南京 210008; ²东南大学医学院附属江阴医院肿瘤科, 江苏 江阴 214400)

[摘要] 目的:探讨胃癌患者外周血浆中乳腺癌易感基因 1(breast cancer susceptibility gene1, BRCA1)mRNA 表达水平与患者临床病理特征及生存时间的关系及意义。方法:采用荧光定量 PCR 方法检测胃癌患者外周血浆中 BRCA1 mRNA 的表达水平,并分析其表达水平与胃癌患者的临床病理特征以及预后之间的关系。结果:胃癌患者血浆 BRCA1 mRNA 表达水平与患者的性别、年龄、是否手术、手术切除方式、TNM 分期、肿瘤部位、Lauren 分型、浆膜、神经、脉管是否浸润无显著性相关,但与肿瘤大小有显著相关性($P = 0.033$)。生存分析提示胃癌患者血浆 BRCA1 mRNA 的表达与患者总生存时间显著相关($P = 0.034$)。结论:胃癌患者血浆 BRCA1 mRNA 表达水平在一定程度上能反映肿瘤的负荷,且能作为预后评估的分子标志。

[关键词] 胃癌;血浆;BRCA1 mRNA;临床病理

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)12-1731-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20151213

Plasma BRCA1 mRNA expression and clinicopathology in patients with gastric cancer

Cao Xiangming^{1,2}, Shen Jie¹, Yu Lixia¹, Wei Jia¹, Shen Weisheng², Xi Lei², Liu Baorui^{1*}

(¹Comprehensive Cancer Centre, Drum Tower Hospital, Affiliated to NJMU, Nanjing 210008; ²Department of Oncology, the Affiliated Jiangyin Hospital of Medical College of Southeast University, Jiangyin 214400, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the correlation of the plasma mRNA levels of the breast cancer susceptibility gene1 (BRCA1) with clinicopathological parameters in patients with gastric cancer. **Methods:** The plasma BRCA1 mRNA was measured using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, and the relationship between BRCA1 level and clinicopathological parameters as well as survival was studied. **Results:** BRCA1 expression was not related to age, gender, TNM stage, tumor location, Lauren's classification, vessel invasion, seros invasion, nerve invasion, differentiation, surgical peocedures and sample source. However, BRCA1 level was associated with tumor size ($P = 0.033$) and overall survival of patients ($P = 0.034$). **Conclusion:** The plasma BRCA1 mRNA level could reflect certain information of gastric cancer including the tumor size and predict the overall survival.

[Key words] gastric cancer; plasma; BRCA1 expression; clinicopathology

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(12): 1731-1734]

胃癌是世界第四大肿瘤,大多患者确诊时已为胃癌Ⅳ期,5年生存率低于5%^[1]。胃癌的化疗方案经历了一系列的变迁,但目前仍缺乏疗效显著的“标准方案”。

乳腺癌易感基因 1 (breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1) 是一种 DNA 修复基因,在细胞周期调控、DNA 修复、基因转录调节、蛋白泛素化方面发挥重要作用。既往研究表明, BRCA1 的高表达促进了抗微管生成药物介导的细胞凋亡,使肿瘤细胞对抗微管生成药物的敏感性增加超过 1 000 倍;但是 BRCA1 表达的升高也使肿瘤细胞对 DNA 损伤药物的耐药性增加了 10~1 000 倍^[2]。目前在肺癌、胃癌、

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81401969)

* 通信作者 (Corresponding author), E-mail: njglycancer-center@163.com

乳腺癌、膀胱癌等肿瘤中,相关临床前及临床研究已表明,BRCA1是一种双向性药敏相关分子,其表达水平与铂类和紫杉类药物的敏感性相关。

本课题组在前期研究中建立了检测胃癌患者外周血浆游离 BRCA1 mRNA 的稳定方法,本研究借助上述方法,初步探讨胃癌患者血浆 BRCA1 mRNA 表达水平与临床病理特征及总生存期之间的关系,为可能的个体化选药提供实时的临床参考。

1 对象和方法

1.1 对象

纳入南京鼓楼医院 2006—2013 年经过组织病理确认为胃癌的患者 62 例。年龄 23~83 岁,平均年龄为 58.8 岁,其中男 42 例,女 20 例。入组患者以中晚期为主,其中 I、II 期 19 例(30.6%),III、IV 期 43 例(69.4%)。电话随访,随访截止日期为 2015 年 6 月 30 日,生存期的计算从确诊日期开始,到随访截止日期或因复发、转移而死亡的日期为止,截尾值为 0。

1.2 方法

1.2.1 外周血的采集

取 4 mL EDTA 抗凝血(BD 紫色盖采血管),取血后要立即颠倒混匀,2 h 之内进行离心,3 000 r/min,4℃ 15 min,取上清,加 TRIzol LS,混匀,放置-80℃超低温冰箱。

1.2.2 RNA 提取及 cDNA 的合成

RNA 的提取:每 1 mL TRIzol LS 血浆混匀液中加入 200 μ L 氯仿,剧烈震荡充分混匀,放于冰上 10 min。在 4℃ 下 14 000 r/min 离心 10 min;取上清,加入 300 μ L 异丙醇、20 μ L 醋酸钠及 2.5 μ L 糖原,混匀后-20℃放置 1 h。取出 EP 管,4℃,14 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 150 μ L 75%乙醇,4℃,14 000 r/min,离心 5 min,弃上清,于 60℃晾干,加无酶水,混匀离心,60℃孵育 5 min,提前拿出缓冲液解冻,每管加入 10 \times 缓冲液 6 μ L,酶 1.5 μ L,轻轻震荡、离心后,于 37℃孵育 30 min,加 DNA 酶处理抑制剂 6 μ L,11 000 r/min,4℃震荡离心 1 min,吸取上清为所提取总 RNA。

cDNA 合成:采用 MML-V 逆转录酶(Invitrogen 公司,美国),按照逆转录试剂盒(Invitrogen 公司,美国)说明书步骤将 RNA 逆转录为 cDNA,-20℃保存。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测

在 ABI 7900HT 型 RT-PCR 仪上进行实时荧光定量 PCR,扩增条件为 95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 15 s,60℃ 退火延伸 1 min,40 个循环。以 β -actin

作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 BRCA1 的相对表达。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计学软件,变量间的比较采用卡方检验或确切概率法,对 BRCA1 的表达量与无进展生存时间(progress-free survival,PFS)和总生存时间(overall survival,OS)之间的相关性进行 Kaplan-Meier 生存分析,以及单因素/多因素 Cox 回归分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆 BRCA1 mRNA 表达与胃癌患者临床病理特征的关系

胃癌患者血浆 BRCA1 mRNA 表达水平的中位值为 0.30(表达范围为 0~30.59),利用此中位值将患者分为高表达、低表达两组,其中高表达组 30 例,低表达组 32 例。经统计分析发现,胃癌患者血浆 BRCA1 mRNA 的表达水平与患者的性别、年龄、是否手术、切除方式、TNM 分期、分化、肿瘤部位、Lauren 分型、浆膜、神经、脉管是否浸润等无明显相关性,但血浆 BRCA1 mRNA 表达水平和肿瘤大小有关($P=0.033$,表 1)。

2.2 血浆 BRCA1 mRNA 表达与胃癌患者预后关系

在 62 例中,35 例获得了完整的随访资料。研究发现:血浆 BRCA1 mRNA 高表达组 OS(平均值为 579.6 d) 优于低表达组(OS 平均值为 245.7 d, $P=0.034$,图 1),血浆 BRCA1 mRNA 高表达组胃癌 PFS(平均值为 304.1 d) 优于血浆 BRCA1 低表达组(平均值为 193.3 d),虽然尚未达到统计学差异($P=0.127$,图 1)。35 例有完整随访资料的胃癌患者中,OS 除与患者血浆 BRCA1 表达、分期相关外,与年龄、性别、肿瘤部位、分级以及淋巴结转移情况无显著性相关。采用多因素 Cox 回归显示,调整协变量后 BRCA1 表达水平与患者 OS 的关联性仍然具有统计学意义($P=0.001$),这提示血浆 BRCA1 具有作为胃癌预后及实时疗效评估指标的潜在价值(表 2)。

3 讨论

Hall^[3]首次发现乳腺癌易感基因 BRCA1,Skolnick 第一次克隆定位,全长 100 kb,分子量约 180~220 kDa,包括 22 个内含子和 24 个外显子。目前认为 BRCA1 对于细胞的生长、增殖起负向的调控作用。BRCA1 基因被认为是基因组的看护者,在 DNA 双链断裂修复中起重要作用,其突变和低表达是诱

表 1 62 例血浆 BRCA1 mRNA 表达与胃癌患者临床病理特征的关系

Table 1 The correlation of BRCA1 expression with clinicopathologic features in gastric cancer patients

指标	BRCA1		P 值
	高表达组	低表达组	
年龄			0.660
≥50 岁	22	25	
<50 岁	8	7	
性别			0.783
男	22	21	
女	9	10	
分期			0.783
I、II	9	10	
III、IV	22	21	
组织学分级			0.909
2	9	11	
3	12	13	
2~3	7	10	
肿瘤大小			0.033
≥5 cm	5	12	
<5 cm	27	18	
肿瘤部位			0.524
上部	11	10	
中部	10	12	
下部	12	7	
Lauren 分型			0.730
肠型	10	9	
弥漫型	11	13	
混合型	11	8	

发肿瘤的主要原因之一^[4]。正常情况下, BRCA1 对细胞的增殖、分化具有很强的调控、抑制作用, 且抑制作用强弱与 BRCA1 的表达水平呈平行关系; 当 BRCA1 发生突变时, 其表达结构异常或表达水平下降导致抑制功能减弱甚至消失, 就可能使细胞分化异常或者过度增殖, 从而导致细胞的恶变、

肿瘤的发生。Hu 等^[5]研究发现, 在正常胃黏膜中 BRCA1 主要表达于细胞核, 而癌前病变及胃癌 BRCA1 蛋白在细胞浆内表达明显。目前有观点认为在癌前病变及胃癌中 BRCA1 的异位表达与其他端粒蛋白 TRF1、TRF2、TIN2、TERT、KuT0 的过表达共同作用缩短端粒长度, 可能对胃癌的多阶段癌变有促进作用。

胃癌的化疗自 20 世纪 80 年代获得应用以来, 化疗方案经历诸多演变, 药物主要包含 5-Fu、葱环、紫杉类、铂类。然而, 所有方案化疗的有效率不超过 50%。目前已证明, 依据 BRCA1 表达水平的个体化化疗在非小细胞肺癌^[6]、乳腺癌^[7]、膀胱癌^[8]患者中可以获得良好中位生存期和 2 年生存率。Papadaki 等^[9]研究发现, 在接受以多西紫杉醇为基础的一线化疗的晚期/转移性非小细胞肺癌患者中, BRCA1 mRNA 高表达者比低表达者拥有更有效率或缓解率(42% vs. 20%, $P=0.028$)和更长的无进展生存期(6 个月 vs. 3 个月, $P=0.021$), 因而认为 BRCA1 的表达可作为紫杉类药物耐药预测指标。BRCA1 基因多态性也被证实与铂类^[10]、紫杉类^[11]药物的疗效有关。南京鼓楼医院肿瘤中心对上千名胃癌患者进行长期随访, 并检测肿瘤组织 BRCA1 mRNA 表达水平, 发现胃癌 BRCA1 高表达的患者接受紫杉醇化疗中位生存时间为 24.9 个月, 而 BRCA1 低表达者仅仅 9.5 个月^[12]。然而上述研究均是基于肿瘤组织标本, 胃癌患者血浆 BRCA1 mRNA 表达水平与临床病理参数及生存的相关性尚未见报道。

本研究采用新建立的血浆游离 mRNA 的定量检测方法, 本着实时个体化治疗的理念, 初步探讨了血浆游离 BRCA1 与胃癌临床病理特征及生存时间的关系, 为后续实时个体化治疗提供理论依据。本研究表明, 血浆游离 BRCA1 mRNA 表达水平与切除方式包括近端切除/远端切除或者是根治性切

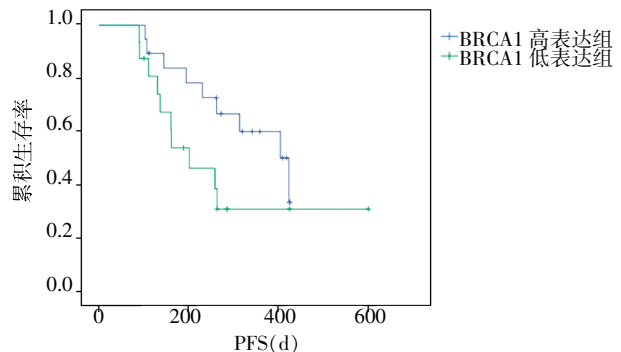
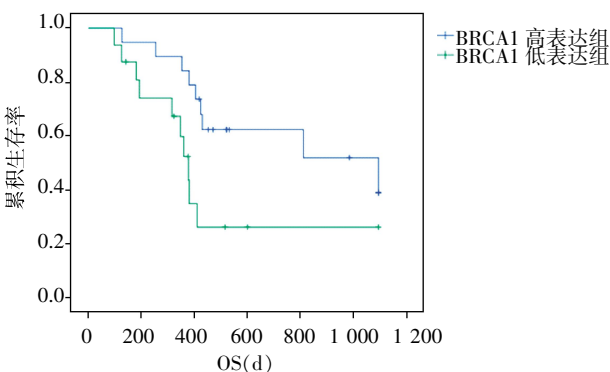


图 1 血浆 BRCA1 mRNA 高表达及低表达组的 OS 和 PFS

Figure 1 Overall survival progression free survival rate of gastric cancer patients estimated according to BRCA1 expression

表2 35例胃癌患者的单因素和多因素Cox回归分析

Table 2 Univariate and multivariate survival analysis of clinicopathological factors in 35 cases of gastric cancer patients

指标	单因素分析			多因素分析		
	RR	95%CI	P值	RR	95%CI	P值
血浆游离 BRCA1 mRNA	1.546	0.855~2.473	<0.001	1.763	0.834~2.897	0.001
年龄	1.621	0.834~2.359	0.889	1.598	0.503~2.225	0.745
性别	1.345	0.894~1.998	0.675	1.356	0.513~2.415	0.654
分期	1.542	0.752~2.063	0.005	1.503	0.684~2.144	0.011
组织学分级	1.532	0.834~2.259	0.051	1.482	0.704~2.426	0.071
肿瘤大小	1.456	0.704~1.878	0.546	1.346	0.789~2.428	0.587
肿瘤部位	1.546	0.834~2.159	0.239	1.536	0.783~2.184	0.245
Lauren 分型	1.645	0.901~2.205	0.679	1.798	0.705~2.346	0.563

除/姑息性切除、TNM分期、分化、肿瘤部位、Lauren分型、浆膜神经管是否浸润的表达水平无明显相关性,仅与肿瘤大小有相关性,这在一定程度上表明血浆游离BRCA1能反映肿瘤的负荷大小,具有实时监测肿瘤负荷和疗效的作用。同时,本研究发现血浆游离BRCA1 mRNA高表达的患者预后相对较好,这可能是由于患者大多接受了含多西紫杉醇方案的化疗。而根据以往文献和本研究发现,BRCA1 mRNA低表达患者对铂类更敏感,高表达患者对紫杉类更敏感,同时对铂类药物耐药,因而这些血浆BRCA1高表达的患者可能出现对紫杉类药物相对敏感,从而表现为生存获益。这在一定程度上预示着血浆游离BRCA1 mRNA有实时预测疗效与预后的潜在价值。

[参考文献]

- [1] Wang Q, Yang Y, Yp Z, et al. Prognostic value of carbohydrate tumor markers and inflammation-based markers in metastatic or recurrent gastric cancer [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(12):289
- [2] 徐露娟,魏嘉,禹立霞,等. 进展期非小细胞肺癌BRCA1 mRNA和RAP80 mRNA表达水平与临床病理特征的关系[J]. *中国癌症杂志*, 2011, 21(11):21
- [3] Scully R, Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2 [J]. *Nature*, 2000, 408(6811):429-432
- [4] Metcalfe KA, Lubinski J, Ghadirian P, et al. Predictors of contralateral prophylactic mastectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation: the Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(7):1093-1097
- [5] Hu H, Zhang Y, Zou M, et al. Expression of TRF1, TRF2, TIN2, TERT, KU70, and BRCA1 proteins is associated with telomere shortening and may contribute to multistage carcinogenesis of gastric cancer. [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(9):1407-1414
- [6] Rosell R, Perez Roca L, JJ S, et al. Customized treatment in non-small-cell lung cancer based on EGFR mutations and BRCA1 mRNA expression [J]. *PLoS One*, 2009, 4(5):5133
- [7] Margeli M, Cirauqui B, Castella E, et al. The prognostic value of BRCA1 mRNA expression levels following neoadjuvant chemotherapy in breast cancer [J]. *PLoS One*, 2010, 5(3):9499
- [8] Grothey A. Adjuvant chemotherapy in colon cancer-is it worth it? [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(10):1768-1769
- [9] Papadaki C, Tsaroucha E, Kaklamanis L, et al. Correlation of BRCA1, TXR1 and TSP1 mRNA expression with treatment outcome to docetaxel-based first-line chemotherapy in patients with advanced/metastatic non-small-cell lung cancer [J]. *Br J Cancer*, 2011, 104(2):316-323
- [10] Chen W, Wang J, Li X, et al. Prognostic significance of BRCA1 expression in gastric cancer [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1):423
- [11] Moiseyenko VM, Volkov NM, Suspistin EN, et al. Evidence for predictive role of BRCA1 and bTUBIII in gastric cancer [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(2):545
- [12] Wei J, Costa C, Ding Y, et al. mRNA expression of BRCA1, PIAS1, and PIAS4 and survival after second-line docetaxel in advanced gastric cancer [J]. *J Nat Cancer Ins*, 2011, 103(20):1552-1556

[收稿日期] 2015-06-17