

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2016.20160918

ERCC1 和 TUBB3 在卵巢癌组织中的表达及其临床意义

李 励¹, 刘胜楠¹, 郑唯强², 张俊洁^{1*}

1. 第二军医大学附属长海医院妇产科, 上海 200433

2. 第二军医大学附属长海医院病理科, 上海 200433

[摘要] **目的:**探讨 ERCC1 及 TUBB3 基因在上皮性卵巢癌中的表达及其临床意义。**方法:**采用液相芯片技术法检测 48 例上皮性卵巢癌的石蜡包埋标本中 ERCC1 和 TUBB3 的 mRNA 表达情况,通过统计学方法分析其与患者临床基本资料、血清肿瘤标志物、病理免疫组化相关指标和近期化疗疗效的相关性。**结果:**ERCC1 表达与卵巢癌患者手术病理分期存在明显相关,随着期别的增高而表达增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。ERCC1 与 TUBB3 及 P53 蛋白的表达存在正相关($P=0.002, r=0.438; P=0.004, r=0.414$)。ERCC1 表达阴性的患者近期化疗有效率高于阳性者($P=0.006$)。**结论:**ERCC1 在不同分期上皮性卵巢癌中的差异性表达提示 ERCC1 基因也许参与了卵巢癌的发展过程,并可能作为评判卵巢癌恶性程度的指标。ERCC1 和 TUBB3 基因在上皮性卵巢癌中的表达具有一定协同性,可能两者在肿瘤的发生、发展及预后有着一定的协同作用。ERCC1 基因可能与 P53 蛋白一样与卵巢癌预后有关,可作为一项独立的预后因素。ERCC1 表达强度可能影响卵巢癌患者近期对于化疗的敏感程度。综上,ERCC1 和 TUBB3 可能是评价卵巢癌患者肿瘤恶性程度、近期化疗疗效、远期预后的有效指标。

[关键词] 上皮性卵巢癌; ERCC1 基因; TUBB3 基因; 液相芯片技术法

[中图分类号] R 737.31 **[文献标志码]** A

Expression and significance of ERCC1 and TUBB3 in ovarian carcinoma

LI Li¹, LIU Sheng-nan¹, ZHENG Wei-qiang², ZHANG Jun-jie^{1*}

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective:** To study the expressions and significance of ERCC1 and TUBB3 in epithelial ovarian cancer. **Methods:** By using suspension array technology, the mRNA expression of ERCC1 and TUBB3 in 48 ovarian specimens was analyzed. The relationship between mRNA expression and patients' clinical data, serum tumor marker, pathological types and the effectiveness of the recent chemotherapy were statistically analyzed. **Results:** The expression of ERCC1 is correlated with the surgical-pathological staging, and it is increasing along with the stage increasing ($P<0.05$). The expression of ERCC1 is positively correlated with the expression of TUBB3 and P53 protein ($P=0.002, r=0.438; P=0.004, r=0.414$). The effectiveness of chemotherapy was statistically higher when ERCC1 expression is negative ($P=0.006$). **Conclusions:** The differential expression of ERCC1 in different stages of epithelial ovarian cancer is indicating the ERCC1 maybe participated in the development process of ovarian cancer, and it can evaluate the malignant degrees of ovarian carcinoma. ERCC1 and TUBB3 have similarity in indicating the epithelial ovarian cancer, and they are related to the occurrence, development and prognosis of ovarian carcinoma. ERCC1 and P53 may be related to the prognosis of ovarian carcinoma, and it can be an independent prognosis factor. ERCC1 expression intensity could affect the recent sensitivity of chemotherapy of patients with ovarian carcinoma. All in all, ERCC1 and TUBB3 may be the effective indicators of judging malignant degree of ovarian carcinoma, and it may also help predicting the effectiveness of chemotherapy and long-term prognosis.

[Key Words] epithelial ovarian cancer; ERCC1 gene; TUBB3 gene; suspension array technology

卵巢恶性肿瘤的发病率在妇科恶性肿瘤中居第 3 位,严重威胁妇女生命^[1],其发生是由多基因决定的,因此卵巢癌的早期筛查、病情评估及预后判

断需要联合分析多种生物指标。本实验通过液相芯片法检测核苷酸切除修复交叉互补组 1 (excision repair cross complementation group 1, ERCC1)和

[收稿日期] 2016-08-28 **[接受日期]** 2016-10-08

[作者简介] 李 励, 硕士, 住院医师. E-mail: 13764260296@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31162044, E-mail: zhangjj910@163.com

3 型 β 微管蛋白(β -tubulin-III, TUBB3)在卵巢癌中的表达,旨在发现 ERCC1 和 TUBB3 基因用于卵巢癌评估病情及预后的作用,以期发现更多具有临床意义的卵巢癌评判手段,为卵巢癌的恶性程度评价、化疗疗效及改善预后提供新的方法和思路。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取 2014 年 2 月至 2015 年 1 月第二军医大学附属长海医院妇科手术治疗并经病理诊断证实为原发性上皮性卵巢癌的卵巢石蜡标本 48 例(均需取得患者或其家属同意)。患者年龄 31 岁~64 岁,包括卵巢浆液性癌 32 例,卵巢粘液性癌 12 例,子宫内膜样癌 4 例;按照国际妇产科联盟(FIGO)2000 年标准:Ⅰ期 6 例、Ⅱ期 16 例、Ⅲ期 22 例、Ⅳ期 4 例,高中分化 20 例、低分化 28 例。入选条件:(1)患者既往无妇科手术病史,此次手术方式为卵巢癌分期手术或肿瘤细胞减灭术;(2)入院前未接受相关抗肿瘤药物治疗或放化疗;(3)术后采取正规的铂类+紫杉醇或铂类+多西紫杉醇的化疗方案,间隔 21 d,疗程 6~8 次,并停止化疗时间 4 周以上;(4)临床、病理及随访资料完整;(5)签署知情同意书及检测留取标本。

1.2 实验技术 液相芯片法制作与检测:应用改善生物科技公司所提供的试剂盒,采用分支 DNA-液相芯片技术定量测定卵巢癌组织 ERCC1、TUBB3 基因 mRNA 表达水平。具体步骤:裂解石蜡样本,使其释放 RNA,应用试剂盒中的微粒球捕获目标 RNA 并放大信号,仪器读取微球编码及其对应的信号,并检测目标 mRNA 的表达结果。通过程序软件对数据进行校正和均一化处理,得到的值即为 ERCC1、TUBB3 基因 mRNA 的相对表达量。

免疫组织化学:对石蜡标本脱蜡,通过内源过氧化氢酶灭活以及酸修复,1% BSA 封闭后,4℃过夜孵育 P53(abcam, ab1101, 1:100)及 Ki67(abcam, ab15580, 1:100)抗体,带有辣根过氧化物酶二抗孵育后,DAB 显色,苏木素染核后脱水封片。由病理科教授专人对样本的染色强度进行评分。

1.3 数据采集及分类

1.3.1 采集患者临床信息 采集信息包括:年龄、月经婚育史、术前血清肿瘤标志物水平(选取妇科肿瘤较常见的相关指标 CA125、CA199、CEA、AFP、SCC)、手术时间及方式、患者的 FIGO 分期、病理类型、癌组织分化程度、淋巴转

移及腹水的有无、近期化疗疗效、免疫组化 P53 及 Ki67 结果等。

1.3.2 数据分类 ① ERCC1 及 TUBB3 基因 mRNA 评判标准根据所得 ERCC1 及 TUBB3 数据界定,定义 $<30\%$ 提示低表达,统计过程中以阴性表示; $\geq 30\%$ 提示中高表达,统计过程中以阳性表示。② P53 及 Ki67 蛋白表达判断标准根据病理科教授评分,将(一)和(+)归为低表达组,统计过程中以阴性表示;将(++)和(+++)归为高表达组,统计过程中以阳性表示。

1.4 化疗疗效的评定 患者术后按照卵巢癌一线化疗方案铂类(顺铂或卡铂)+紫杉醇(或多西紫杉醇)行系统治疗,间隔 21 d 为一疗程,行 6~8 个疗程,并停止化疗时间 4 周以上。疗效评价根据盆腔及腹部检查、肿瘤标志物水平(如 CA125、CA199、CEA、AFP、SCC 等)同时联合 B 超、CT 或二次探查术所见进行判断。每次化疗前行妇科检查及肿瘤标志物检测,必要时行 B 超及 CT、MRI、PET-CT 检查。结合文献^[2]评判近期化疗疗效,标准为:完全缓解(CR):可见肿瘤完全消失,至少 4 周。部分缓解(PR):肿瘤缩小 $>50\%$,无疾病进展表现,至少 4 周。稳定(SD):肿瘤缩小 $\leq 50\%$,增大 $\leq 25\%$,至少 4 周。进展(PD):肿瘤增大 $>25\%$ 或出现新病灶。患者第 6 个或第 8 个(部分患者行 8 次化疗)疗程结束后进行化疗反应评价,CR+PR 为化疗有效,SD+PD 为化疗无效。

1.5 统计学方法 所有数据采用统计学软件 SPSS 17.0 进行分析,ERCC1 和 TUBB3 基因表达与上皮性卵巢癌临床病理参数的相关性及卵巢癌近期疗效的关系,用 χ^2 检验,Fisher 确切概率法分析,检验水准(α)为 0.05。ERCC1、TUBB3 基因与 P53、Ki67 蛋白表达之间的相关性,采用 McNemar χ^2 检验,Spearman 相关分析,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 ERCC1 和 TUBB3 在上皮性卵巢癌组织中的表达 48 例卵巢癌组织中 ERCC1 低表达(阴性)16 例,中高表达(阳性)32 例,TUBB3 低表达(阴性)16 例,中高表达(阳性)32 例,阳性率均为 66.7%。

2.2 ERCC1 和 TUBB3 表达与上皮性卵巢癌临床病理参数的关系 ERCC1 在Ⅰ~Ⅱ期卵巢癌患者中阳性率为 27.3%;在Ⅲ~Ⅳ期卵巢癌患者中的阳性率为 100%,随着期别的增高而表达增加,差别具

有统计学意义($P<0.05$)。TUBB3 的阳性表达与临床参数均无相关性($P>0.05$,表 1)。

表 1 ERCC1 及 TUBB3 与卵巢上皮性癌临床病理参数的关系

指标	例数 <i>n</i>	ERCC1		TUBB3	
		阳性 <i>n</i> (%)	<i>P</i> 值	阳性 <i>n</i> (%)	<i>P</i> 值
绝经			0.238		0.072
是	14	10(71.4)		12(85.7)	
否	34	18(52.9)		20(58.8)	
妊娠次数			0.104		0.098
<3	28	19(67.9)		16(57.1)	
≥3	20	18(90.0)		16(80.0)	
术前肿瘤标志物			0.233		0.157
阳性	36	20(55.6)		22(61.1)	
阴性	12	9(75.0)		10(83.3)	
病理类型			0.755		0.815
浆液性	32	22(68.8)		21(65.6)	
黏液性	12	8(66.7)		8(66.7)	
子宫内膜样	4	2(50.0)		2(50.0)	
手术分期			<0.001		0.025
Ⅰ+Ⅱ	22	6(27.3)		10(45.5)	
Ⅲ+Ⅳ	26	26(100.0)		18(69.2)	
分化程度			0.117		0.898
高分化	6	6(100.0)		4(66.7)	
中分化	14	10(71.4)		10(71.4)	
低分化	28	16(57.1)		18(64.3)	
腹水			0.101		0.665
有	32	20(62.5)		22(68.8)	
无	16	6(37.5)		10(62.5)	
淋巴转移			0.265		0.101
有	26	16(61.5)		20(76.9)	
无	22	10(45.5)		12(54.5)	

2.3 ERCC1、TUBB3 在上皮性卵巢癌组织中的相互关系 48 例卵巢癌组织中 ERCC1 和 TUBB3 同时表达为阳性的有 26 例,同时表达为阴性的为 10 例。通过 McNemar χ^2 检验、Spearman 秩相关系数分析证实卵巢癌组织中 ERCC1 与 TUBB3 表达具有正相关性($P=0.002$; $r=0.438$,表 2)。

2.4 ERCC1、TUBB3 与 P53、Ki67 蛋白表达之间的相关性 24 例卵巢癌组织中 ERCC1 和 P53 蛋白同时表达为阳性的有 22 例,同时表达为阴性的为 12 例。通过 McNemar χ^2 检验、Spearman 秩相关系数分析证实卵巢癌组织中 ERCC1 与 P53 蛋白表

达具有正相关性($P=0.004$; $r=0.414$,表 3)。TUBB3 与 P53、Ki67 蛋白表达均无相关性,ERCC1 与 Ki67 蛋白表达无相关性。

表 2 ERCC1 与 TUBB3 在卵巢癌组织中表达的关系

TUBB3	ERCC1		总计	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
	阳性/ <i>n</i>	阴性/ <i>n</i>			
阳性	26	6	32	0.438	0.002
阴性	6	10	16		
合计	32	16	48		

表 3 ERCC1 与 P53 蛋白在卵巢癌组织中表达的关系

P53	ERCC1		总计	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
	阳性/ <i>n</i>	阴性/ <i>n</i>			
阳性	22	4	26	0.414	0.004
阴性	10	12	22		
合计	32	16	48		

2.5 ERCC1 与 TUBB3 表达与近期化疗疗效的关系 ERCC1 表达阴性者化疗有效率明显高于表达阳性者($P=0.006$),TUBB3 表达阴性的患者虽然化疗效果好于阳性者,但未发现有统计学意义,可能需更大样本量的研究,见表 4。

表 4 ERCC1 和 TUBB3 表达与卵巢癌近期化疗反应的关系

指标		例数 <i>n</i>	有效	无效	有效率(%)	<i>P</i> 值
ERCC1	+	32	10	22	31.25	0.006
	-	16	12	4	75.00	
TUBB3	+	32	12	20	37.50	0.131
	-	16	10	6	62.50	

3 讨论

卵巢恶性肿瘤的发病率在妇科恶性肿瘤中仅次于宫颈癌以及子宫内膜癌,其 5 年生存率仅为 20%~30%^[3],死亡率如此高,一方面原因是缺乏简单特异性的早期筛查标准,另一个重要的原因为肿瘤对化疗药物的耐药性。铂类联合紫杉醇化疗是目前我院最常用的化疗方案,两种药物对应的耐药基因分别是 ERCC1 和 TUBB3。本研究主要通过液相芯片技术,探究 ERCC1 以及 TUBB3 在卵巢癌中的表达情况,探讨 ERCC1、TUBB3 对于卵巢癌诊断、治疗以及预后判断的关系。

铂类制剂是卵巢癌治疗的一线化疗药品,它通过抑制细胞 DNA 复制,从而抑制肿瘤细胞分裂^[4]。ERCC1 基因是 DNA 损伤修复基因,其意义在于修

复致癌因素所致的基因组功能紊乱,具有抗击肿瘤的作用。然而有研究报道 ERCC1 基因参与了铂类药物造成 DNA 的损伤修复,降低了化疗疗效,肿瘤中 ERCC1 基因的表达水平与铂类药物对患者的化疗疗效密切相关^[5]。国外研究在对结直肠癌、非小细胞肺癌等恶性肿瘤进行基因检测时发现,ERCC1 基因表达水平与化疗疗效和长期生存期呈负相关^[6-8]。本实验发现,48 例卵巢癌组织中 ERCC1 阳性率为 66.7%,随着临床期别的增加,ERCC1 表达也逐渐增强,它在 III~IV 期卵巢癌组织中的阳性表达率及表达强度明显高于 I~II 期卵巢癌组织,提示 ERCC1 基因可能参与了卵巢癌的发展过程:卵巢癌组织 ERCC1 表达高,DNA 损伤修复活性强,可维持癌细胞基因组的稳定,破坏正常基因组功能整体性,增强了癌细胞的生理活性。有研究认为卵巢癌的发生可能与排卵期的基因突变有关,所以长期的不间断排卵可能易患卵巢癌,但本实验中 ERCC1 基因的表达与绝经与否、妊娠次数等临床参数无明显相关性,这与大部分同行的研究结果一致^[9-10]。为了研究 ERCC1 是否可以预测卵巢癌患者预后,我们探讨其与 P53 及 Ki67 的相关性,发现卵巢癌组织中 ERCC1 基因 mRNA 与肿瘤中的 P53 表达具有正相关性,与 Ki67 表达未发现明显相关性。由于随访时间较短,未能获得完整的生存和无疾病时间,无法分析 ERCC1 是否独立影响卵巢癌患者的预后,但是 P53 蛋白的表达状态可作为预测患者对一线化疗方案敏感性的指标^[11],其表达率越高,患者对一线化疗方案的敏感性越低^[12]。基于此,我们认为 ERCC1 可以联合 P53 作为预测卵巢癌患者预后的指标。

TUBB3 是人体众多微管蛋白的亚型,紫杉醇、多西紫杉醇等抗微管化疗药物作用于细胞微管,干扰细胞有丝分裂过程,导致肿瘤细胞发生凋亡^[13]。文献报道 TUBB3 的表达与抗微管化疗药物的疗效有相关性,可能作为一个预后指标。国内郭智兴等^[14]实验研究表明 TUBB3 在肝细胞癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织和正常肝组织,在肿瘤直径>6 cm、多发肿瘤和 TNM III 期中表达较高,是术后总生存的危险因素,TUBB3 表达与紫杉醇耐药呈正相关。Hetland 等^[15]对卵巢癌组织的实验研究发现 TUBB3 表达高低与患者年龄、组织学恶性程度、分期、术后残余病灶大小等指标无关。本实验结果显示,48 例卵巢癌组织中 TUBB3 表达阳性率

为 66.7%,基于研究者在肝癌组织中的研究结论,我们可以猜测卵巢癌组织中 TUBB3 基因表达可能高于癌旁组织和正常组织,需进行进一步的扩大实验研究。为了探讨多基因联合检测对卵巢恶性肿瘤的评估,我们做了两两分析,发现 TUBB3 与 P53、Ki67 蛋白表达均无相关性,但卵巢癌组织中 ERCC1 与 TUBB3 表达存在正相关,可能二者在肿瘤的发生、发展及预后中有着一定的协同作用。

本研究通过对比分析临床病例化疗疗效与 ERCC1、TUBB3 基因 mRNA 表达关系发现,两种基因表达阴性者近期化疗有效率分别高于表达阳性者($P=0.006$ 和 0.131),但 TUBB3 的表达强度与近期化疗有效率无统计学意义。分析原因如下:其一,需要进一步大样本的研究以证实其与卵巢癌化疗疗效的关系;其二,手术是上皮性肿瘤的主要治疗方法,包括全子宫切除、附件切除、网膜切除、肿瘤细胞减灭术以及盆腔淋巴结清扫等,满意的肿瘤细胞减灭术要求残余病灶直径小于 1 cm,若手术未达到此标准,术后复发率高。故近期化疗疗效的评判不仅与肿瘤对化疗药物的敏感性有关,还与残余病灶大小、药物剂量、肿瘤病理分级等因素有关。由此也提示,判断 ERCC1 与 TUBB3 基因 mRNA 表达与铂类、紫杉醇类药物化疗耐药性的相关性及其耐药机制,需要后期更长时间的观察统计及更大样本量的研究。

综上所述,ERCC1 在上皮性卵巢癌中的表达与肿瘤分期密切相关,其在不同分期卵巢癌中的差异性表达提示该基因可能参与了卵巢癌的发展过程,可作为评判卵巢癌恶性程度的指标。此外,该基因可与 P53 蛋白联合预测卵巢癌预后,其表达强度影响卵巢癌患者近期对于化疗敏感程度。ERCC1 和 TUBB3 在上皮性卵巢癌中的表达具有一定协同性,可能两者在肿瘤的发生、发展及预后有着一定的协同作用,日后有望作为评价卵巢癌患者肿瘤恶性程度、近期化疗疗效、远期预后的有效指标。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015,65(1):5-29.
- [2] 蔡圣芸,郑惟强,惠宁. EGFR、GnRHR 和 LRP 在卵巢癌中的表达及临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(26): 4074-4077.
- [3] Coleman RL, Monk BJ, Sood AK, et al. Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer[J]. Nat

- Rev Clin Oncol, 2013,10(4):211-224.
- [4] Hildebrandt MA, Gu J, Wu X. Pharmacogenomics of platinum-based chemotherapy in NSCLC[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2009,5(7):745-755.
- [5] Reed E. ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy[J]. Clin Cancer Res, 2005,11(17):6100-6102.
- [6] Lord RV, Brabender J, Gandara D, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2002,8(7):2286-2291.
- [7] Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy[J]. N Engl J Med, 2006,355(10):983-991.
- [8] Shirota Y, Stoecklacher J, Brabender J, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy[J]. J Clin Oncol, 2001,19(23):4298-4304.
- [9] Smith S, Su D, Rigault de la Longrais IA, et al. ERCC1 genotype and phenotype in epithelial ovarian cancer identify patients likely to benefit from paclitaxel treatment in addition to platinum-based therapy[J]. J Clin Oncol, 2007,25(33):5172-5179.
- [10] Darcy KM, Tian C, Reed E. A Gynecologic Oncology Group study of platinum-DNA adducts and excision repair cross-complementation group 1 expression in optimal, stage III epithelial ovarian cancer treated with platinum-taxane chemotherapy[J]. Cancer Res, 2007,67(9):4474-4481.
- [11] 姜秋红, 程能能, 高惠君. 上皮性卵巢癌中 P53 蛋白的表达与化疗敏感相关性[J]. 中国新药与临床杂志, 2012,31(11):689-692.
- [12] Yang-Hartwich Y, Soteras MG, Lin ZP, et al. p53 protein aggregation promotes platinum resistance in ovarian cancer[J]. Oncogene, 2015,34(27):3605-3616.
- [13] 廖巧, 赵玉茹, 屈彪, 等. STMN1 与 TUBB3 蛋白在胃癌和癌旁组织中的表达与临床意义[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015,20(12):1335-1339.
- [14] 郭智兴, 林佳锐, 陈智远, 等. TUBB3 在体外化疗药物敏感试验肝细胞癌标本中的表达及意义[J]. 广东医学, 2012,33(18):2750-2753.
- [15] Hetland TE, Hellesylt E, Flørenes VA, et al. Class III β -tubulin expression in advanced-stage serous ovarian carcinoma effusions is associated with poor survival and primary chemoresistance[J]. Hum Pathol, 2011,42(7):1019-1026.

[本文编辑] 廖晓瑜, 贾泽军