

卵巢癌患者循环肿瘤细胞中 ERCC1 表达与铂类药物敏感性的关系

赵海波, 徐翔, 丁佳佳, 赵恩锋

解放军总医院 妇产科, 北京 100853

摘要: **目的** 研究上皮性卵巢癌 (epithelial ovarian cancer, EOC) 患者外周血循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC) 中切除修复交叉互补基因 1 (excision repair cross-complementation group 1, ERCC1) 表达与铂类药物敏感性的关系。**方法** 以 2015 年 3 月 - 2017 年 6 月本院诊治的 60 例 EOC 患者为研究对象, 收集手术后化疗前及 3 个疗程化疗 (卡铂 / 紫杉醇) 后 1 周内患者外周血, 利用纳米滤膜结合 RNA 原位杂交技术分离检测 CTC 及 ERCC1 + CTC, 分析 ERCC1 + CTC 与临床特征、铂类药物敏感性的关系。**结果** 60 例患者中 83.3% (50 例) 检测出 CTC, 60% (36 例) 检测出 ERCC1 + CTC。将 36 例 ERCC1 + CTC 患者按照化疗前后 ERCC1+CTC 数目变化分为化疗后 ERCC1 + CTC 数目升高组 (ERCC1 + CTC-H 组, 12 例) 和 ERCC1 + CTC 数目未升高组 (ERCC1 + CTC-L 组, 24 例), 两组年龄、家族史、病理类型、腹水情况、腹水细胞学情况、残余病灶、FIGO 分期等临床特征无统计学差异 (P 均 > 0.05), ERCC1 + CTC-L 组中 62.5% (15 例) 铂类药物敏感, ERCC1 + CTC-H 组中 16.7% (2 例) 铂类药物敏感, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 外周血循环肿瘤细胞 ERCC1 阳性可预测铂类药物敏感性。

关键词: 切除修复交叉互补基因 1; 循环肿瘤细胞; 卵巢癌; 铂类敏感性

中图分类号: R 687.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2018)04-0279-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2018.04.003

网络出版时间: 2018-03-19 09:33

网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/10.1117.R.20180319.0933.004.html

Relationship between ERCC1 expression of circulating tumor cell and sensitivity to platinum in patients with ovarian cancer

ZHAO Haibo, XU Xiang, DING Jiajia, ZHAO Enfeng

Department of Obstetrics and Gynecology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: ZHAO Enfeng. Email: 301.zhao@163.com

Abstract: Objective To study the relationship between the expression of excision repair cross complementation group 1 (ERCC1) in circulating tumor cell (CTC) in peripheral blood of patients with epithelial ovarian cancer (EOC) and the sensitivity to platinum. **Methods** A total of 60 EOC patients in Chinese PLA General Hospital from March 2015 to June 2016 were enrolled. Peripheral blood of patients was collected before postoperative chemotherapy and within a week after the three courses of chemotherapy (carboplatin/paclitaxel). The Nanofiltration membrane and RNA in situ hybridization technique was used to separate and detect the CTC and ERCC1-positive CTC. The relationship between ERCC1-positive CTC and the sensitivity to platinum was analyzed. **Results** Of the 60 cases, CTC was observed in 50 cases (83.3%) and ERCC1-positive CTC in 36 cases (60%). According to the quantitative change of ERCC1 + CTC before and after chemotherapy, the 36 patients were divided into elevated ERCC1 + CTC group (ERCC1 + CTC-H group, 12 cases) and non-elevated ERCC1 + CTC group (ERCC1 + CTC-L group, 24 cases). No significant difference was between the two groups in age, family history, histology, ascites, ascites cytology, residual tumor, FIGO stage ($P > 0.05$). There were 15 cases (62.5%) in ERCC1 + CTC-L group and 2 cases (16.7%) in ERCC1 + CTC-H group were sensitive to platinum, with statistically significant difference between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The ERCC1 expression of CTC can predict the sensitivity to platinum.

Keywords: excision repair cross-complementation group 1; circulating tumor cell; ovarian cancer; sensitivity of platinum

卵巢癌是病死率最高的妇科恶性肿瘤, 早期无明显特异性症状, 70% 确诊时已属晚期。虽然肿瘤减灭术 + 铂类为基础的联合化疗可以使多数患者达到临床缓解, 但仍有超过 50% 患者出现复发, 少数患者甚至在化疗过程中出现复发^[1]。铂类耐药是上皮性卵巢癌 (epithelial ovarian cancer,

EOC) 复发的主要原因。研究表明只有 20% 复发患者在随访早期发现, 绝大多数复发患者发现时已失去最佳治疗时机^[2]。所以寻找一种能够早期预测铂类药物敏感性的指标是目前 EOC 治疗研究的主要方向。核酸切除修复 (nucleotide excision repair, NER) 途径是修复铂类药物导致的 DNA 损伤的重要机制。切除修复交叉互补基因 1 (excision repair cross-complementation group 1, ERCC1) 是 NER 途径的限速酶^[3-6]。早期研究显示肿瘤组织中 ERCC1 表达产物 (如蛋白质或 mRNA) 可作为预测铂类化

收稿日期: 2018-01-10

基金项目: 吴阶平医学基金 (320.6750.16108)

Supported by the Wu Jieping Medical Fund (320.6750.16108)

作者简介: 赵海波, 男, 在读硕士, 医师。Email: zhb493@126.com

通信作者: 赵恩锋, 男, 硕士, 主任医师。Email: 301.zhao@163.com

疗疗效的生物学指标。但目前研究表明基于肿瘤组织的 ERCC1 表达产物不能指导临床预测铂类药物敏感性^[7-9]。这可能与肿瘤细胞的异质性有关。循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC) 是原发或转移肿瘤组织脱落入循环系统的肿瘤细胞, 能够实时反映肿瘤细胞在体内情况^[10]。本文研究 CTC 中 ERCC1 的表达与 EOC 患者临床特征、铂类药物敏感性的关系。

对象和方法

1 对象 以 2015 年 3 月 - 2017 年 6 月本院诊治的 60 例 EOC 患者为研究对象。纳入标准: 1) 病理诊断为 EOC; 2) 已行满意的肿瘤细胞减灭术 (残留病灶直径 < 1 cm), 术后计划行 6 个疗程卡铂/紫杉醇化疗 (周期为 21 d); 3) 化疗完成后达到完全临床缓解。排除标准: 1) 同时合并其他恶性肿瘤; 2) 化疗期间更改化疗方案; 3) 未完成 6 个疗程化疗; 4) 出现严重并发症化疗延迟。均经患者本人及家属签署知情同意书, 研究方案经解放军总医院伦理委员会批准。

2 标本收集 所有患者手术后化疗前、3 个疗程化疗后 1 周内分别抽取空腹外周血 5 ml 至含有

EDTA 抗凝剂中, 抽血部位为肘正中静脉, 为防止穿刺皮肤时皮肤细胞污染, 每次都弃去前面的 2 ml 血。

3 样本处理 肿瘤细胞富集: 将 5 ml 外周血样本颠倒混匀, 加入 15 ml 红细胞裂解液混匀, 室温静置 30 min 裂解红细胞。500 × g 离心 5 min, 去除上清液; 使用终浓度为 4% 的甲醛固定剩余细胞沉淀 8 min; 将固定后的细胞转移至过滤管中 (含滤膜), 使用真空抽滤泵将细胞过滤至滤膜上。过滤后的含细胞的滤膜, 使用 4% 甲醛继续室温固定 1 h。固定后的含有细胞的滤膜使用 PBS 洗涤 3 次, 置于 24 孔板中。加入 0.1 mg/ml 蛋白酶 K 进行处理, 室温静置 1 h, 增加细胞膜通透性。加入特异性捕获探针, 包括上皮型生物标记探针 EpCAM、CK8/18/19、间质型生物标记探针 (vimentin、twist、zeb1)、白细胞标记物 CD45、ERCC1 探针进行杂交, 显微镜进行自动拍照分析, 根据标记红色荧光信号 (上皮型标记物) 或绿色荧光信号 (间质型标记物) CTC 分型 (图 1), 标记蓝信号点代表白细胞, 紫色信号点代表 ERCC1 的表达 (图 2)。通过荧光信号判断白细胞、CTC 以及 ERCC1 的表达情况。

4 随访 通过住院病历及电话随访收集患者的年

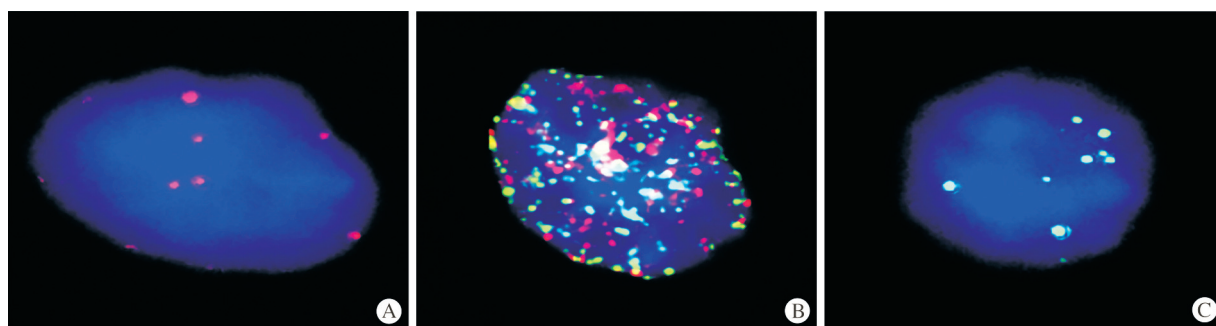


图 1 CTC 分型镜检图 (×100 倍油镜)

A: 上皮型 CTC (红); B: 混合型 CTC (红+绿); C: 间质型 CTC (绿)

Fig.1 Different types of CTC images by fluorescence microscope

A: Epithelial CTC (red fluorescence); B: E-M mixed CTC (red and green fluorescence); C: Mesenchymal CTC (green fluorescence)

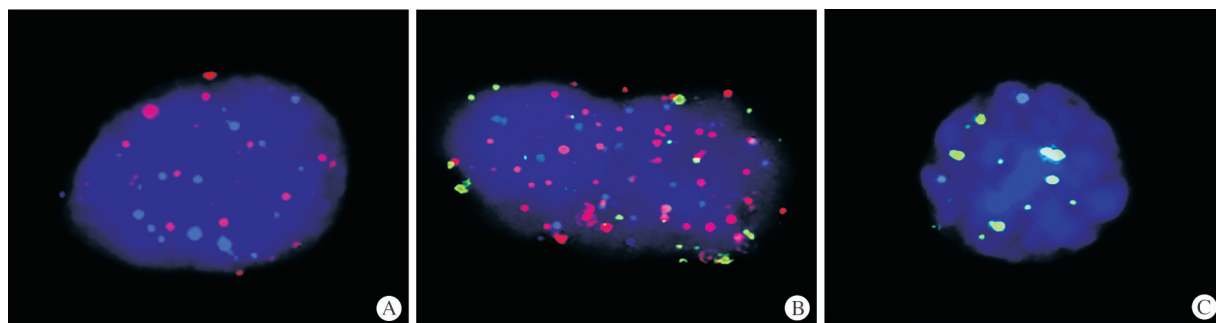


图 2 CTC 中 ERCC1 表达 (紫色) (×100 倍油镜)

A: 上皮型 CTC 中 ERCC1 表达; B: 混合型 CTC 中 ERCC1 表达; C: 间质型 CTC 中 ERCC1 表达

Fig.2 ERCC1 expression of CTC (the purple fluorescence for ERCC1 expression)

A: ERCC1 expression in epithelial CTC; B: ERCC1 expression in E-M mixed CTC; C: ERCC1 expression in mesenchymal CTC

龄、家族史、病理类型、腹水情况、腹水细胞学情况、残余病灶、FIGO 分期等方面资料。铂类敏感型复发：铂类药物化疗结束后达到完全临床缓解后复发，复发时间 > 6 个月；铂类耐药型复发：铂类药物化疗结束后达到完全临床缓解后复发，复发时间 < 6 个月。根据化疗前后 ERCC1 + CTC 数目变化将 ERCC1 + CTC 患者分为化疗后 ERCC1 + CTC 数目升高组 (ERCC1 + CTC-H 组) 和 ERCC1 + CTC 数目未升高组 (ERCC1 + CTC-L 组)。随访截止时间为 2018 年 1 月 1 日，因随访时间短未完成全部患者无进展生存期及总生存期随访。

5 统计学方法 数据分析应用 SPSS24.0 软件进行处理，计数资料采用率表示，两组间比较采用 Fishers 精确检验；计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 ERCC1 + CTC 检出率 60 例中 83.3%(50 例) 检测出 CTC，60%(36 例) 检测出 ERCC1 + CTC。36 例 ERCC1 + CTC 阳性中，检出率最高为混合型 CTC 32 例 (86.11%)，上皮型及间质型分别 28 例 (77.78%)、26 例 (72.22%)。

表 1 两组患者的临床特征分析

Tab. 1 General clinical characteristics of two groups

Clinical characteristics	ERCC1 + CTC-H (n=12)	ERCC1 + CTC-L (n=24)	<i>P</i>
Age (yrs)	54.6 ± 8.7	53.3 ± 7.7	0.652
Family history			0.289
Positive	8	10	
Negative	4	14	
FIGO Stage			0.700
I - II	4	6	
III - IV	8	18	
Histology			0.691
Serous	10	18	
Other	2	6	
Ascites			0.709
Positive	3	9	
Negative	9	15	
Ascites cytology			0.725
Positive	5	13	
Negative	7	11	
Residual tumor			0.292
No	9	13	
< 1 cm	3	11	
Platinum sensitivity			0.014
Sensitive	2	15	
Resistant	10	9	

2 ERCC1 + CTC 患者临床特征 36 例检测出 ERCC + CTC 患者中，浆液性癌 28 例 (77.78%)，FIGO 分期 III 期、IV 期 26 例 (72.22%)。ERCC1 + CTC-L 组 24 例 (66.67%)，ERCC1 + CTC-H 组 12 例 (33.33%)。两组年龄、家族史、病理类型、腹水情况、腹水细胞学情况、残余病灶、FIGO 分期等均无统计学差异 ($P > 0.05$)。ERCC1 + CTC-L 组中 62.5%(15 例) 铂类药物敏感，ERCC1 + CTC-H 组中 16.7%(2 例) 铂类药物敏感，两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

讨 论

目前多项临床研究已经证明 CTC 是导致肿瘤转移和复发的主要原因，其在肿瘤疗效评估方面有广泛的应用^[11-16]。目前研究表明 ERCC1 在铂类耐药中起关键作用^[17-18]。因此 EOC 患者外周血 CTC 中 ERCC1 表达可作为预测铂类药物敏感性的一个指标。

本研究入组 60 例患者，CTC 表达 ERCC1 患者 36 例 (60%)，根据化疗前后 ERCC1 + CTC 数目变化分为 ERCC1 + CTC-H 组和 ERCC1 + CTC-L 组，结果显示，两组年龄、家族史、病理类型、腹水情况、腹水细胞学情况、残余病灶、FIGO 分期等均无统计学差异 ($P > 0.05$)，铂类药物敏感性差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，提示 ERCC1 表达量增加提高了肿瘤组织 DNA 损伤修复能力，临床上表现为对铂类药物的耐药性增强。Du 等^[19] 体外研究发现，慢病毒介导的 RNAi 沉默 ERCC1 基因能逆转耐药性 EOC 细胞 SKOV3/DDP 对顺铂的耐药性，提示 ERCC1 表达量下降可增强铂类药物敏感性，与本研究的结果一致。

本研究采用纳米滤膜结合 RNA 原位杂交技术，CTC 检出率为 83.3%(50/60)，ERCC1 + CTC 检出率为 60%(36/60)。Kuhlmann 等^[1] 对 143 例 EOC 患者进行研究，14% CTC 被检出，8% ERCC1 + CTC 被检出。Kuhlmann 等利用免疫磁性分离技术富集 CTC，其原理是利用特异性抗体 (EpCAM/MUC/mucin1) 与 CTC 表面特异性抗体结合，将 CTC 直接分离出来。造成其 CTC 检出率低的可能原因：1) 这种分离方法主要依赖 CTC 表面抗原表达，不表达或低表达目标抗原的 CTC 将会被漏筛。恰恰其所使用抗体均为上皮细胞抗体，无法筛选间质型 CTC；2) 在磁场中会发生细胞聚集且与磁柱结合的 CTC 不易洗脱；3) 在磁场中聚集的细胞活性和形态受

到影响^[20]。由于循环肿瘤细胞的检出率低,使得 ERCC1 + CTC 检出率也下降。本研究采用纳米滤膜结合 RNA 原位杂交技术,利用肿瘤细胞直径较一般体细胞大的特点,有效避免了由于部分抗原缺失及磁场因素导致的 CTC 漏筛。此技术可将 CTC 进一步分为上皮型、混合型、间质型,并可根据荧光强度对 ERCC1 表达量进行分级。CTC 分型及 ERCC1 表达分类有助于对 ERCC1 + CTC 进一步深入研究。

综上所述,ERCC1 + CTC 在 EOC 患者中有较高的检出率,其在 EOC 患者治疗过程中的动态变化与化疗疗效有一定的关系,有可能作为预测铂类药物敏感性的有效指标,指导 EOC 患者的个体化治疗,提高 EOC 治疗疗效。但由于本研究随访时间短,样本例数少,未能完成无进展生存期及总生存期的统计,需进一步扩大样本量并延长随访时间,进一步研究 ERCC1 + CTC 与 EOC 预后的关系。

参考文献

- Kuhlmann JD, Wimberger P, Bankfalvi A, et al. ERCC1-positive circulating tumor cells in the blood of ovarian cancer patients as a predictive biomarker for platinum resistance [J]. *Clin Chem*, 2014, 60 (10): 1282-1289.
- Du Bois A, Quinn M, Thigpen T, et al. 2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GFIG OCCC 2004) [J]. *Ann Oncol*, 2005, 16 (Suppl 8): viii7-viii12.
- Bai Y, Wang L, Li G, et al. Genetic variability of ERCC1 genes in NER pathway influences the treatment outcome of gastric cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8 (10): 13367-13373.
- Chitale S, Richly H. Timing of DNA lesion recognition: Ubiquitin signaling in the NER pathway [J]. *Cell Cycle*, 2017, 16 (2): 163-171.
- Ma XJ, Shang L, Zhang WM, et al. Mitotic regulator Nlp interacts with XPA/ERCC1 complexes and regulates nucleotide excision repair (NER) in response to UV radiation [J]. *Cancer Lett*, 2016, 373 (2): 214-221.
- Park JM, Kang TH. Transcriptional and Posttranslational Regulation of Nucleotide Excision Repair: The Guardian of the Genome against Ultraviolet Radiation [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (11): E1840.
- Grimminger PP, Shi M, Barrett C, et al. TS and ERCC-1 mRNA expressions and clinical outcome in patients with metastatic colon cancer in CONFIRM-1 and -2 clinical trials [J]. *Pharmacogenomics J*, 2012, 12 (5): 404-411.
- Liu YP, Ling Y, Qi QF, et al. The effects of ERCC1 expression levels on the chemosensitivity of gastric cancer cells to platinum agents and survival in gastric cancer patients treated with oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5 (3): 935-942.
- Vandenput I, Capoen A, Coenegrachts L, et al. Expression of ERCC1, p53, and class III beta-tubulin do not reveal chemoresistance in endometrial cancer: results from an immunohistochemical study [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21 (6): 1071-1077.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65 (2): 87-108.
- Bulfoni M, Turetta M, Del Ben F, et al. Dissecting the Heterogeneity of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer: Going Far Beyond the Needle in the Haystack [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (10): E1775.
- Meyer CP, Pantel K, Tennstedt P, et al. Limited prognostic value of preoperative circulating tumor cells for early biochemical recurrence in patients with localized prostate cancer [J]. *Urol Oncol*, 2016, 34 (5): 235.e211-236.
- 董小丽, 杨雯, 王丽兴, 等. 卵巢癌中循环肿瘤细胞阳性率及分型与临床特征的关系 [J]. *解放军医学院学报*, 2017, 38 (3): 202-205.
- Shi J, Li Y, Liang S, et al. Analysis of circulating tumor cells in colorectal cancer liver metastasis patients before and after cryosurgery [J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17 (9): 935-942.
- Goldkorn A, Ely B, Quinn DI, et al. Circulating tumor cell counts are prognostic of overall survival in SWOG S0421: a phase III trial of docetaxel with or without atrasentan for metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32 (11): 1136-1142.
- Ning Y, Hanna DL, Zhang W, et al. Cytokeratin-20 and Survivin-Expressing Circulating Tumor Cells Predict Survival in Metastatic Colorectal Cancer Patients by a Combined Immunomagnetic qRT-PCR Approach [J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14 (10): 2401-2408.
- Ciaparrone M, Caspiani O, Biccio G, et al. Predictive Role of ERCC1 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients Treated with Surgery and Adjuvant Cisplatin-Based Chemoradiation [J]. *Oncology*, 2015, 89 (4): 227-234.
- Cao ZH, Yin HP, Jiang N, et al. Association between ERCC1 and ERCC2 gene polymorphisms and chemotherapy response and overall survival in osteosarcoma [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14 (3): 10145-10151.
- Du P, Zhang X, Liu H, et al. Lentivirus-Mediated RNAi silencing targeting ERCC1 reverses cisplatin resistance in cisplatin-resistant ovarian carcinoma cell line [J]. *DNA Cell Biol*, 2015, 34 (7): 497-502.
- 杜凤彩, 陈剑. 循环肿瘤细胞的富集分离和检测 [J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24 (21): 3487-3490.

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅