

GNAS1 T393C 多态性与放射性肺炎的相关性研究

龚虹云, 宋启斌, 胡伟国, 王 琪, 李 萌, 朱恒博

(武汉大学人民医院肿瘤中心, 湖北 武汉 430060)

摘要: [目的] 分析 *GNAS1* T393C 多态性与肺癌放疗疗效、血液毒性、放射性食管炎和放射性肺炎的相关性。[方法] 共收集经病理证实的接受放疗的Ⅲ~Ⅳ期肺癌患者 67 例。应用 PCR 扩增目的基因片段, sanger 双脱氧测序方法分析 *GNAS1* T393C 位点单核苷酸多态性的基因型。应用卡方检验和 Logistic 回归分析临床因素及基因型与肺癌放疗疗效、血液毒性、放射性食管炎和放射性肺炎的相关性。[结果] 本组研究病例中位年龄为 61 岁。单因素分析显示同时使用化疗可以增加肺癌放疗疗效 ($P=0.045$), 但是相应的骨髓抑制发生率增加 ($P=0.004$)。肺鳞癌患者更容易发生放射性肺炎 ($P=0.015$)。 *GNAS1* T393C 等位基因 T 携带者发生放射性肺炎的比例明显高于等位基因 C 携带者 ($P=0.035$); 进一步通过 Logistic 回归分析校正其他可能临床因素影响后, 提示 *GNAS1* TT 基因型发生放射性肺炎的可能性更大 ($P=0.06$, OR=0.26, 95%CI: 0.06~1.09)。[结论] *GNAS1* T393C 等位基因 T 与放射性肺炎相关, 可能成为其预测因素, 需要扩大样本量进行更深入的研究。

关键词: *GNAS1* T393C; 单核苷酸多态性; 肺肿瘤; 放射治疗; 不良反应

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)02-0093-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.02.B004

Association of Single Nucleotide Polymorphisms of *GNAS1* T393C with Radiation Pneumonitis

GONG Hong-yun, SONG Qi-bin, HU Wei-guo, et al.

(Centre of Cancer, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: [Purpose] To examine the possible relationship between SNP of *GNAS1* T393C and curative effect of radiotherapy and radiation-induced hematological toxicity, esophagitis and pneumonia. [Methods] Genomic DNA was extracted from whole blood of 65 advanced lung cancer patients underwent radiotherapy. Allelic discrimination of *GNAS1* was performed by quantitative real-time polymerase chain reaction. Genotyping was correlated with curative effect of radiotherapy and radiation-induced hematological toxicity, esophagitis and pneumonia. The endpoint was grade ≥ 3 hematological toxicity and grade ≥ 2 radiation-induced esophagitis and pneumonia. The Chi-square criterion method and Logistic regression analysis were used to assess the significance of the clinical factors and genotypes for curative effect of radiotherapy and radiation-induced hematological toxicity, esophagitis and pneumonitis. [Results] Median age was 61 years old (ranged 35 to 80 years). At univariate analysis, chemotherapy could improve the efficacy of radiotherapy in lung cancer ($P=0.045$), but increased the hematotoxicity ($P=0.004$). Patients with squamous type and allele T carrier in *GNAS1* T393C gene had more higher incidence of radiation pneumonitis ($P=0.015$, $P=0.035$). [Conclusions] Genetic polymorphism in the *GNAS1* T393C might relate to radiation pneumonitis, which may be a prognostic factor. The results need large sample research to identify.

Subject words: *GNAS1* T393C; SNP; lung neoplasms; radiotherapy; side effects

放射治疗是肿瘤治疗中不可缺少的手段之一,

有不少肿瘤可以用放疗治愈, 如早期的舌癌、鼻咽癌、喉癌和宫颈癌^[1]。放疗在杀灭肿瘤的同时, 会引起正常组织 (包括放射野内正常组织及远处组织如骨髓) 的非目标效应, 这也是制约放疗疗效的主要原因。

基金项目: 国家自然科学基金资助(81372407)

通讯作者: 宋启斌, 教授, 主任医师, 博士; 武汉大学人民医院肿瘤中心, 湖北省武汉市武昌区张之洞路 99 号(430060); E-mail: qibinsong@163.com

收稿日期: 2015-10-06; **修回日期:** 2015-11-23

近年来大量与放疗相关分子靶点的发现加速了我们对组织放疗效应的理解,尤其是在 DNA 损伤修复基因与肿瘤及正常组织对放疗反应的相关性研究中已得到了充分证据的证实^[2-5]。虽然不能根据这些信息决定是否选择放射治疗手段,但是可以通过这些生物标记特征显示哪些患者可能不能耐受放疗,为临床放疗副反应试验提供一个重要的参考指标。除此以外,对于放射敏感性个体差异分子机制的进一步理解,通过发现这些生物标记预测哪些患者可能会出现严重的放疗副反应,合理地制定药物策略预防正常组织损伤并帮助组织修复。现阶段主要是实验性研究,包括候选 SNP (single nucleotide polymorphism, SNP) 相关性研究、广泛基因组相关性研究及大量序列比对试图来解释上述肿瘤及正常组织对放疗敏感性和耐受性的个体差异。本文选取 *GNAS1* 基因 SNPs 来研究其与放疗患者有效性及其副反应的相关性,为放射治疗敏感性个体化差异提供新的生物标记。

1 资料与方法

1.1 研究对象

纳入研究对象为 2010 年 3 月至 2012 年 3 月在武汉大学人民医院肿瘤中心接受过放射治疗的肺癌患者共 67 例。入选标准为以手术切除的肿瘤组织或病理学检查为依据,不限制患者的性别、年龄、病理类型和肿瘤分期等。

1.2 放射治疗

67 例接受过放疗肺癌患者,应用 6-Mv X 射线放疗(Varian600en),总剂量 50~70Gy,分次剂量 2Gy,每周 5 天。采用三维适形放疗计划(3D-CRT),3D-CRT 设计采用 CT 模拟定位,并用三维治疗计划系统(Pinnacle3 version7.40)制定计划。肺癌 GTV 为模拟定位 CT 上显示的病变,参考治疗前胸部 CT、MRI、PET 或纤支镜检查等检查结果,肺部原发灶在肺窗上(窗宽:1600,窗位:-600)勾画 GTV,在纵隔窗(窗宽:400,窗位:20)纵隔淋巴结>1cm 判定为阳性。肺内病变范围及纵隔受侵淋巴结区域作为 CTV,CTV 基础上外放 5~10mm 为 PTV。治疗多采用 3 野至 5 野共面照射技术,双肺 V_{20} 要求<25%~30%,脊髓的剂量<45Gy,根据患者一般状况和肺功能确定

治疗计划。

1.3 放疗疗效评估方法

为了评价客观疗效,应用 Recist 标准对基线状态的肿瘤总负荷进行评估,以便与治疗后的结果进行比较,只有在基线状态有可测量病灶的患者才能进入研究。目标病灶应代表所有累积的器官,每个脏器最多选择 5 个可测量的病灶,作为目标病灶在基线状态评价时测量并记录。目标病灶应根据可测量病灶最大径和可准确重复测量性来选择。近期疗效评价:CR(完全缓解)、PR(部分缓解)、SD(疾病稳定)均为有效,PD(疾病进展)为无效。

1.4 放射相关不良反应观察

根据常用药物毒性标准 V3.0(CTCAE)评价治疗期间出现骨髓抑制分级,统计Ⅲ度及以上骨髓抑制病例数。

放射性肺炎多于放射治疗后 2~3 周出现症状,常有刺激性、干性咳嗽、伴气急、心悸和胸痛,不发热或低热、偶有高热。根据 RTOG 急性放射性损伤分级标准评价治疗期间出现放射性肺炎分级。气急随肺纤维化加重呈进行性加剧、容易产生呼吸道感染而加重呼吸道症状,诊断放射性肺炎时必须排除肺内感染及肺内病变进展且相关症状分级至少较治疗前增加 1 级。统计 2 级或 2 级以上放射性肺炎,评价由三位中高级放射治疗专业医师共同完成。

1.5 基因组 DNA 的提取及基因测序

清晨空腹抽取纳入本研究患者治疗前肘静脉血 2ml,EDTA 抗凝管采集全血后,-80℃保存。基因组 DNA 提取时,从-80℃低温冰箱中取出血样,在 37℃水浴使其融化。取 500μl 全血 TiangenDNA 提取试剂盒说明书进行 DNA 抽提后-20℃保存。

通过计算机生物学方法仔细研究 *GNAS1* 基因结构,选定 T393C SNP 位点 rs7121(57478807 C>T)为中心的区域进行测序引物的设计与合成。利用 Primer5.0 软件设计一对引物包含选定基因 *GNAS1* T393C 周围的 SNP 位点。具体引物如下:Forward primer:5'-CAGCCCACATTAGGGAGCATAT-3'(22bp, GC%=50%);Reverse primer:5'-TAATCCCTGCCTATGCTCACA-3'(22bp, GC%=50%);PCR product:807bp;引物退火温度为 54.9℃。将保存的基因组 DNA 原液用 DNA 溶解液稀释至 5~10ng/L。样本 PCR 反应体系为 20μl,10×扩增缓冲液 2μl;4 种 dNTP 混合物各

200 μ mol/L;引物各 10~100pmol;模板 DNA 0.1~2 μ g;Taq DNA 聚合酶 2.5U;Mg²⁺ 1.5mmol/L;加双或三蒸水至 20 μ l;PCR 后进行琼脂糖凝胶电泳,鉴定 PCR 产物大小后再次扩增反应体系至 100 μ l,利用 DNA sanger 双脱氧测序方法对基因进行分型。

1.6 随访及统计学处理

患者治疗过程中每周评价血常规、肝肾功能、消化道反应、放射性损伤情况,治疗结束后 3 个月、6 个月复查胸部 CT,并对放射性肺炎分级进行评价,随访患者生存情况。所得资料经整理后,用 Excel 建立数据库,数据导入 SPSS12.0 软件。应用卡方检验和 Logistic 回归分析临床因素及基因型与肺癌放疗疗效、血液毒性、放射性食管炎和放射性肺炎的相关性。 $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 一般资料

本研究纳入 67 例晚期肺癌患者,男性居多,占 76%;年龄最大 80 岁,最小 31 岁,平均年龄为 61 岁。分析 *GNAS1* T393C 及其位点周围的 SNP 位点基因型,发现其他位点突变率不高,大多数患者具有统一性。因此本文仅分析此位点与肺癌患者放疗疗

效及不良反应的相关性。在 *GNAS1* T393C 位点中 34 例(51%)为 TT 型,15 例(22%)为 TC 型,18 例(27%)为 CC 型(Table 1)。截至随访时间为止,中位生存时间为 14 个月,1 年和 2 年的总生存率为 61%和 35%。

2.2 放疗疗效及不良反应影响因素分析

单因素分析结果发现,与化疗同用可以提高肺癌放疗疗效($P=0.045$);而 PS 评分会影响放疗疗效,但不具有统计学意义(Figure 1)。放疗同时应用化疗更容易发生骨髓抑制($P=0.004$)(Figure 2)。不同病理类型肺癌患者与放射性肺炎发生率具有相关性,鳞癌患者更容易发生放射性肺炎($P=0.015$)。而且 *GNAS1* T393C 基因 T 等位基因更容易发生放射性肺炎($P=0.035$)(Figure 3)。进一步通过 Logistic 回归分析校正其他可能临床因素影响后,提示 *GNAS1* TT 基因型发生放射性肺炎的可能性更大($P=0.06$,OR=0.26,95%CI:0.06~1.09)。

3 讨论

放射治疗是局部治疗手段,与同样为局部治疗手段的外科手术相比,其适应范围更为广泛。不仅能用于局部病变的治疗(早期合并内科疾病、高龄或者

Table 1 Correlation analysis between clinical parameters and radiation effective and complications

Parameters		N	Curative effect		Myelosuppression		Radiation pneumonitis		Radiation esophagitis	
			N(%)	P	N(%)	P	N(%)	P	N(%)	P
Sex	Male	51	32(63)	0.247	26(51)	0.251	11(22)	0.500	10(20)	0.274
	Female	16	7(44)		5(31)		2(13)		1(6)	
Age(years)	≥ 60	39	21(54)	0.457	19(49)	0.804	10(26)	0.210	7(18)	0.750
	<60	28	18(64)		12(43)		3(11)		4(14)	
PS	≥ 2	16	6(38)	0.081	6(38)	0.567	1(6)	0.165	1(6)	0.274
	<2	51	33(65)		25(49)		12(23)		10(20)	
Smoking	Yes	17	12(71)	0.231	6(35)	0.401	3(18)	1.000	3(18)	1.000
	No	50	27(54)		25(50)		10(20)		8(16)	
Medical history	Yes	49	27(55)	0.421	20(41)	0.173	10(20)	1.000	8(16)	1.000
	No	18	12(67)		11(61)		3(17)		3(17)	
Pathology	Adeno	31	20(65)	0.457	15(48)	0.809	2(6)	0.015	4(13)	0.526
	Squa	36	19(53)		16(44)		11(31)		7(19)	
Chemotherapy	Yes	55	35(64)	0.045	30(55)	0.004	10(18)	0.689	10(18)	0.673
	No	12	4(33)		1(8)		3(25)		1(8)	
<i>GNAS1</i>	TT	34	18(53)	0.640	19(56)	0.165	10(29)	0.120	7(20)	0.692
	TC	15	10(67)		4(27)		1(7)		2(13)	
	CC	18	11(61)		8(44)		2(11)		2(11)	
	TC+CC	33	21(64)		12(36)		3(9)		4(12)	

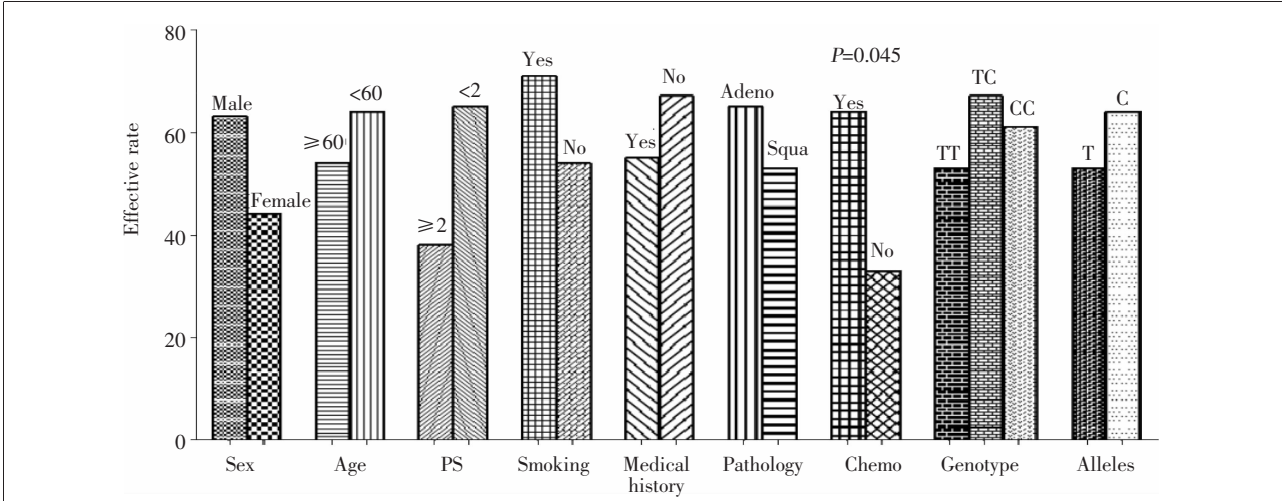


Figure 1 Correlation analysis between clinical parameters and radiation efficacy

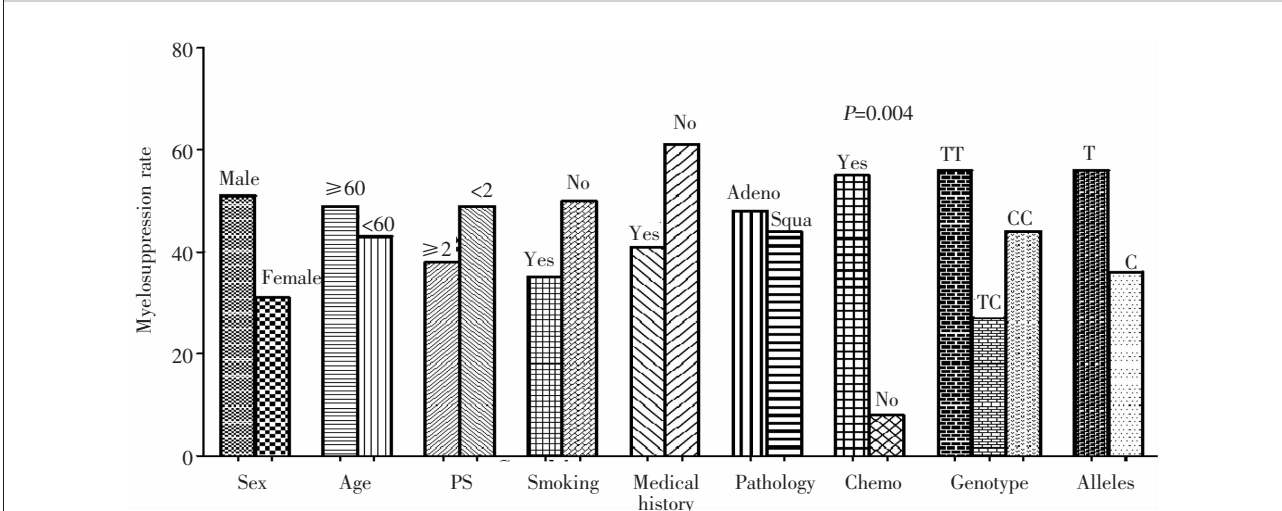


Figure 2 Correlation analysis between clinical parameters and radiation-induced myelosuppression

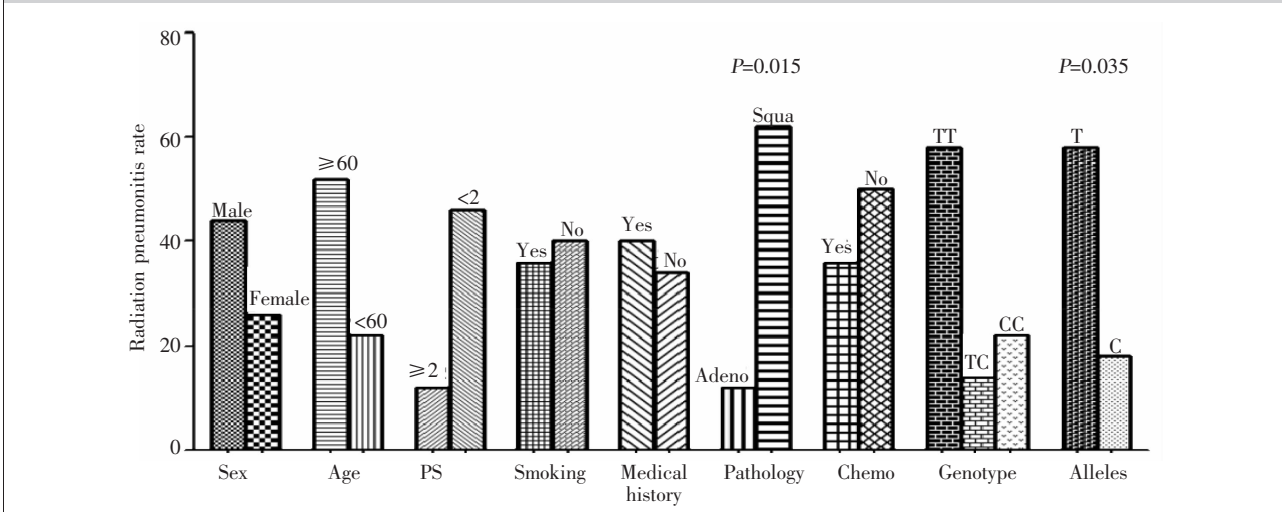


Figure 3 Correlation analysis between clinical parameters and radiation-induced pneumonia

拒绝手术和局部晚期病例),而且对晚期病例,合理地选择放射治疗,也能获得满意的姑息治疗效果^[6]。在肺癌患者放疗中,放射性肺炎是最常见也是临床医生最为关注的并发症。放射性肺炎不仅会降低局部肿瘤控制率,而且严重影响患者的生活质量,由此造成的呼吸衰竭是放射性损伤的主要致死原因之一。不仅如此,最近 Kozin 等^[7]在乳腺癌和肺癌的原位动物模型中的研究结果表明放疗后刺激瘤内 SDF 表达增高,募集 BMDC 诱导血管再生从而促进肿瘤复发和转移。Underti 认为放射刺激机体大量表达前列腺素 E2 促进了肿瘤浸润和转移^[8]。因此在胸部肿瘤放疗过程中防治放射性肺炎的发生尤为重要。影响放射性肺炎发生发展的因素包括患者的一般状况、肺功能情况、放射物理及放射生物因素、合并治疗情况等。尽管临床实践中已经考虑到这些因素的影响,不同个体发生放射性肺炎的差异仍然很大,临床及物理的因素不能完全地解释这些差异的存在。

目前,已有大量的研究结果证实患者个体的内在因素同样能影响放射性损伤的发生。已知多种因素影响照射后的细胞存活,对放射敏感突变细胞株的研究显示至少存在着 10 种以上相关基因^[9]。例如, *XRCC4* 也是双链断裂修复的一个关键基因^[10]。最近毛细血管扩张共济失调基因也被克隆出来^[11]。这些基因中任何一个突变都会导致放射敏感性的增加,这为将来甄别这些基因的突变提供了可能性,与细胞周期关卡和凋亡基因一起有助于放射敏感性的预测。Damaraju 等^[12]在接受放疗的前列腺肿瘤患者中探讨了 DNA 损伤修复基因、类固醇代谢基因单核苷酸多态性与临床放疗毒性的相关性,发现 *LIG4*、*ERCC2* 和 *CYP2D6* 基因多态性与晚期直肠癌和膀胱癌放疗毒性具有显著相关性,可能作为预测前列腺患者放疗后副反应的生物标记分子。Isomura 等在接受放疗的乳腺癌患者中研究发现 *IL12RB2* 和 *ABCA1* 基因多态性与放射性皮炎的发生率相关,这与组织对放疗的敏感性有关联,需要进一步研究其基因功能在放疗敏感性过程中发挥的作用^[13]。Giotopoulos 等^[14]报道了 *XRCC1* 和 *TGFβ1* 单核苷酸多态性与毛细血管扩张、纤维化、萎缩等放疗晚期损伤的相关性,但需进一步排除放疗剂量对正常组织损伤的影响。

单核苷酸多态(SNP)属于 DNA 多态性的一种,

具有高密度、高遗传稳定性和易于自动化检测等优点,成为继第一代限制性片段长度多态性标记和第二代微卫星标记后的第三代基因遗传标记,已经广泛用于探索复杂性疾病的病因学和病因学和药物基因组学研究。本研究选取的 *GNAS1* 基因位于染色体 20q13,包含 13 个外显子,是一个复杂位点编码多种重叠转录本。*GNAS1* 编码 Gs 蛋白的 α 亚基,结合 GTP 和刺激腺苷酸环化酶产生第二信使环磷酸腺苷 cAMP。实验证实 Gas 表达增加刺激腺苷酸环化酶信号传导级联反应引起 cAMP 的累积,从而在凋亡过程发挥重要作用^[15]。*GNAS1* 体细胞激活突变可能是 McCune Albright 综合征和散发或孤立的内分泌肿瘤的病因,这是支持 *GNAS1* 在肿瘤发生和进展中作用的主要证据^[16-18]。*GNAS1* 基因的突变可能通过抑制或激活信号转导引起其功能的丢失或获得,从而导致激素生理作用的缺失或过剩,抑制种系突变可能引起 Albright 遗传性骨营养不良 AHO;激活突变导致生长激素瘤、甲状腺瘤、肾上腺和性腺瘤等内分泌肿瘤的发生^[19]。大量文献证实其常见的同义 SNP (T393C) 在 *GNAS1* 第五外显子与肺癌等多种恶性肿瘤预后相关^[20]。本文探讨了 *GNAS1* 基因 T393C 多态性等多种因素对放疗有效性、骨髓抑制、放射性肺炎的影响。研究结果显示同时使用化疗能明显增加放疗的疗效,但同时增加放疗血液毒性,而对放射性肺损伤的影响不大。但是鳞癌患者更容易发生放射性肺炎,这可能与肺鳞癌更多属于中央型肺癌、正常肺组织受照射面积更大有关。本课题研究的重点 *GNAS1* T393C 单核苷酸多态性而言,携带等位基因 T 的患者发生放射性肺炎更多,说明肺组织对放疗的敏感性与个体遗传差异性明显相关,虽然多因素分析结果未达到统计学意义,但结果已经显示 TT 基因型与发生放射性肺炎具有指向性关系,可以进一步扩大样本研究 T 等位基因与放射性肺炎的相关性。并进一步研究其多态性的功能差异与放疗敏感性的关系,系统证实其病理生理过程,为临床医生选择治疗手段的一个可以参考的指标。

参考文献:

- [1] Perez CA, Mutic S. Advances and future of radiation oncology[J]. Rep Pract Oncol Radiother, 2013, 18(6): 329-332.
- [2] Sugimoto Y, Tsukahara S, Ishikawa E, et al. Breast cancer

- resistance protein: molecular target for anticancer drug resistance and pharmacokinetics/pharmacodynamics[J]. *Cancer Sci*, 2005, 96(8): 457–465.
- [3] de Jong FA, Marsh S, Mathijssen RH, et al. ABCG2 pharmacogenetics: ethnic differences in allele frequency and assessment of influence on irinotecan disposition[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(17): 5889–5894.
- [4] Kasuya K, Tsuchida A, Nagakawa Y, et al. Prediction of a side effect and efficacy of adjuvant chemotherapy with gemcitabine for post operative patient of pancreatic cancer by a genetic polymorphism analysis[J]. *Hepatogastroenterology*, 2011, 59(117): 1609–1613.
- [5] Hogle WP. The state of the art in radiation therapy [J]. *Semin Oncol Nurs*, 2006, 22(4): 212–220.
- [6] Faria SL. Role of radiotherapy in metastatic non-small cell lung cancer[J]. *Front Oncol*, 2014, 4: 229.
- [7] Kozin SV, Kamoun WS, Huang Y, et al. Recruitment of myeloid but not endothelial precursor cells facilitates tumor regrowth after local irradiation[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(14): 5679–5685.
- [8] Eijkelkamp N, Wang H, Garza-Carbajal A, et al. Low nociceptor GRK2 prolongs prostaglandin E2 hyperalgesia via biased cAMP signaling to Epac/Rap1, protein kinase Cepsilon, and MEK/ERK[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(38): 12806–12815.
- [9] Hayashi T, Hayashi I, Shinohara T, et al. Radiation-induced apoptosis of stem/progenitor cells in human umbilical cord blood is associated with alterations in reactive oxygen and intracellular pH[J]. *Mutat Res*, 2004, 556(1–2): 83–91.
- [10] Biaglow JE, Ayene IS, Koch CJ, et al. Radiation response of cells during altered protein thiol redox [J]. *Radiat Res*, 2003, 159(4): 484–494.
- [11] Morales A, Miranda M, Sánchez-Reyes A, et al. Oxidative damage of mitochondrial and nuclear DNA induced by ionizing radiation in human hepatoblastoma cells [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1998, 42(1): 191–203.
- [12] Damaraju S, Murry D, Dufour J, et al. Association of DNA repair and steroid metabolism gene polymorphisms with clinical late toxicity in patients treated with conformal radiotherapy for prostate cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(8): 2545–2554.
- [13] Damaraju S, Murray D, Dufour J, et al. IL12RB2 and ABCA1 genes are associated with susceptibility to radiation dermatitis[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(20): 6683–6689.
- [14] Giotopoulos G, Symonds RP, Foweraker K, et al. The late radiotherapy normal tissue injury phenotypes of telangiectasia, fibrosis and atrophy in breast cancer patients have distinct genotype-dependent causes[J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(6): 1001–1007.
- [15] Colic M, Vucevic D, Jandric D, et al. 8-Chloro-cAMP modulates apoptosis of thymocytes and thymocyte hybridoma[J]. *Transplant Proc*, 2001, 33(3): 2347–2349.
- [16] Diaz A, Danon M, Crawford J. McCune-Albright syndrome and disorders due to activating mutations of GNAS1[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2007, 20(8): 853–880.
- [17] Aldred MA, Trembath RC. Activating and inactivating mutations in the human GNAS1 gene[J]. *Hum Mutat*, 2000, 16(3): 183–189.
- [18] Bastepe M, Jüppner H. Identification and characterization of two new, highly polymorphic loci adjacent to GNAS1 on chromosome 20q13.3 [J]. *Mol Cell Probes*, 2000, 14(4): 261–264.
- [19] Rickard SJ, Wilson LC. Analysis of GNAS1 and overlapping transcripts identifies the parental origin of mutations in patients with sporadic albright hereditary osteodystrophy and reveals a model system in which to observe the effects of splicing mutations on translated and untranslated messenger RNA[J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 72(4): 961–974.
- [20] Xie FJ, Zhao P, Kou JY, et al. The T393C polymorphism of GNAS1 as a predictor for chemotherapy sensitivity and survival in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gemcitabine plus platinum[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69: 1443–1448.