

PARP1 在可手术非小细胞肺癌组织中的表达及临床预后价值

王均惠¹, 陈建新¹, 彭永海², 解方为²

(1. 浙江大学衢州医院, 浙江 衢州 324000; 2. 中国人民解放军南京军区福州总医院, 福建 福州 350025)

摘要: [目的] 探讨 PARP1 在可手术非小细胞肺癌组织中的表达情况及其临床预后价值。[方法] 采用免疫组化法对 81 例非小细胞肺癌患者手术标本进行 PARP1 蛋白表达的定量分析; 运用卡方检验对 PARP1 表达结果与临床参数间进行比较, 其中分期情况视为等级资料采用 Wilcoxon 秩和检验; 采用 Cox 回归及 Kaplan-Meier 生存分析曲线评价 PARP1 对可手术非小细胞肺癌的临床预后价值。[结果] 81 例非小细胞肺癌患者组织样本中 PARP1 蛋白表达水平与性别、年龄、吸烟状况、病理类型、淋巴结转移状况等临床参数之间无统计学差异 ($P>0.05$)。81 例患者中 PARP1 阳性标本中表达量为 (+)、(++)、($\geq$ +++) 样本比例分别为 33.33% (13/39)、35.90% (14/39)、30.77% (12/39)。Cox 多因素分析结果显示, 在 76 例具有完整生存随访资料患者中, PARP1 表达情况与患者无疾病生存期相关, PARP1 阴性表达组及阳性表达组 DFS 分别为 36.2 个月和 23.5 个月 (Cox 多因素分析结果 $P=0.003$); 但与总生存期无关, PARP1 阴性表达组及阳性表达组 OS 分别为 49.6 个月和 44.0 个月 (Cox 多因素分析 $P=0.341$)。[结论] PARP1 阴性可手术的非小细胞肺癌患者在接受手术后可能获得较长的无疾病生存期, 但可能并不能转化为总生存期上的获益。

关键词: 非小细胞肺癌; ERCC1; PARP1; 预后

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)01-0022-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.01.B005

Expression of PARP1 in Non-Small Cell Lung Cancer and Its Prognosis Value

WANG Jun-hui¹, CHEN Jian-xin¹, PENG Yong-hai², et al.

(1. The Affiliated Quzhou Hospital of Zhejiang University, Quzhou 324000, China;

2. Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350025, China)

Abstract: [Objective] To analyze the expression level of PARP1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its prognosis value. [Methods] Immunohistochemistry was applied to detect the expression level of PARP1 in 81 NSCLC patients. The survival of patients was assessed by Kaplan-Meier survival curve; the relationship between PARP1 expression level and clinical characteristics and prognosis of patients was analyzed by Cox regression model. [Results] There were no correlation between the expression level of PARP1 and gender, age, smoking status, pathology subtypes, and nodal status ($P>0.05$). The positive expression rates of PARP1 with levels of (+), (++) and ($\geq$ +++) were 33.3% (13/39), 35.9% (14/39) and 30.8% (12/39), respectively. Among 71 patients with completed follow-up data, there was significant correlation between disease-free survival (DFS) and expression of PARP1; the DFS of PARP1-negative group and PARP1-positive group were 36.2 and 23.5 months, respectively ($P=0.003$). However, there was no correlation between overall survival (OS) and PARP1 expression in NSCLC patients; OS of PARP1-negative group and PARP1-positive group were 49.6 and 44.0 months, respectively ($P=0.341$). [Conclusion] The operable NSCLC patients with PARP1 negative may have longer DFS after surgery and adjuvant chemotherapy, while there is no correlation of PARP1 expression with OS.

Subject words: NSCLC; ERCC1; PARP1; prognosis value

肺癌是临床上常见的恶性肿瘤, 其发病率和死

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81572452); 福建省自然科学基金面上课题 (2016J01579)

通讯作者: 解方为, 副主任医师, 博士; 中国人民解放军南京军区福州总医院 肿瘤科, 福建省福州市鼓楼区西二环北路 156 号 (350025); E-mail: zjxfw@vip.tom.com

收稿日期: 2017-02-08; **修回日期:** 2017-09-14

亡率在男性恶性肿瘤谱中均排名第一, 且其发病率和死亡率均呈上升趋势^[1]。非小细胞肺癌 (NSCLC) 发病人数占肺癌患者的 80%~85%^[2]。约有 60% 的早期患者手术后会出现复发和转移^[3], 对于术后及术后复发的患者, 目前以铂类为基础的三联

药物化疗方案作为标准,该方案可以降低患者 11% 死亡率,并提高 5.4% 的 5 年生存期^[4,5]。然而,受患者个体差异性影响,不同患者对铂类药物的化疗敏感性不一,且随着化疗药物的体内蓄积、铂类耐药复合物的形成以及机体 DNA 修复基因的激活,铂类耐药现象在非小细胞肺癌患者化疗过程中的出现似乎不可避免^[6,7]。其中尤以 DNA 的修复途径激活导致耐药最为常见^[8,9]。

DNA 损伤修复是 DNA 遭到破坏时的保护性机制。当细胞有较弱的修复能力时倾向于死亡,而当细胞有足够的修复能力时会产生抵抗。目前多条 DNA 修复途径已经被证实与肿瘤的化疗耐药相关,主要包括碱基切除修复(base excision repair, BER)、核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)、错配修复、同源修复等^[10]。目前相关研究结果显示,与非小细胞肺癌铂类耐药相关性较为密切的修复途径主要集中在 BER^[11]。PARP1 参与 BER 修复途径,在结肠癌、乳腺癌、小细胞肺癌、卵巢癌等肿瘤中已得到证实^[12-15],相关研究结果提示 PARP1 抑制剂对于逆转铂类耐药方面存在较好的应用价值^[14]。本研究采用免疫组化方法检测早中期可手术非小细胞肺癌患者手术组织标本中 PARP1 的表达情况,探讨其对术后无疾病生存期和总生存期的判断价值。

1 资料与方法

1.1 病例特征

本研究纳入 81 例病例为 2004 年 6 月至 2009 年 6 月在南京军区福州总医院初治的非小细胞肺癌患者,病例标本均由病理科提供,手术治疗在该院的心胸外科完成。根据术后组织标本病理明确为非小细胞肺癌,依据 AJCC 第七版术前分期为 I b 期(高危)~III a 期。R0 切除术后均接受含铂两药方案辅助化疗 4 个周期,术后采用“紫杉醇 135mg/m² ivgtt d₁ + 顺铂 75mg/m² ivgtt d₂/Q21d”或“吉西他滨 1200mg/m² ivgtt d_{1,8} + 顺铂 75mg/m² ivgtt d₁/Q21d”化疗方案,术前已接受诱导放疗及新辅助化疗者予以排除,未完成规定周期内辅助化疗者予以排除。回顾性分析患者临床特征包括性别、年龄、吸烟状况、病理类型、分期、淋巴结转移状况等。生存期及疾病进展情况随访以电话形式结合患者门诊或住院影像学检查的形式

随访至 2015 年 4 月。

1.2 免疫组化

免疫组化染色时,先行脱蜡及梯度酒精(100%、95%、90%、80%、70%)脱水,切片及铺片后,用 PBS 液振洗 3 次,浓度为 0.01mmol/L 柠檬酸钠煮沸后将载玻片置入加热 10min,3%浓度的过氧化氢-甲醇溶液室温下孵育淬灭内源性过氧化物酶活性,经 1%的 BSA 封闭后,加入兔抗人 PARP1 单克隆抗体(美国 Santa Cruz)后 4℃孵育过夜。对照组为未添加一抗的样品片,辣根过氧化物酶在 37℃条件下处理 30min。倒置显微镜下观察免疫组化结果。

观察免疫组化结果时,由 2 名未知患者病情的病理科主治医师进行交叉读片。判读标准为:根据单个高倍镜视野内肿瘤细胞比例(随机 3 个视野中的均数):0 为未见肿瘤细胞;(+)为肿瘤细胞比例 1%~10%;(++)为肿瘤细胞比例为 11%~50%;(≥+++)为肿瘤细胞比例大于 50%。荧光强度评价:0 为无荧光现象;(+)为荧光强度 1%~10%;(++)为荧光强度 11%~50%;(≥+++)为荧光强度大于 50%。最终结果以肿瘤细胞比例(≥+)且荧光强度(≥+)判读为免疫组化阳性。2 名病理科医生交叉读片结果进行对比,同一标本不同意见者请病理科副主任医师进行辨别读片后出具判读结果。

1.3 统计学处理

数据分析采用 SPSS17.0 软件,采用 Pearson χ^2 卡方检验分析 PARP1 蛋白表达与临床病理特征之间的关系,临床参数中的肿瘤分期视为等级资料采用 Wilcoxon 秩和检验。Kaplan-Meier 法比较组间无疾病生存期及总生存期差异。采用 Cox 回归模型进行预后影响因素的多因素分析。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化检测样本中 PARP1 表达情况

免疫组化结果显示 PARP1(-)42 例,(+)15 例,(++)10 例,(≥+++)14 例(Table 1)(Figure 1)。

2.2 非小细胞肺癌患者 PARP1 表达与临床病理参数间的关系

PARP1 表达与患者的性别、年龄、吸烟状况、病

Table 1 PARP1 protein expression tested by IHC

Cell Proportion	Fluorescence Intensity			
	(-)	(+)	(++)	(≥+++)
(+)	17	6	3	0
(++)	14	4	3	2
(≥+++)	11	5	4	12

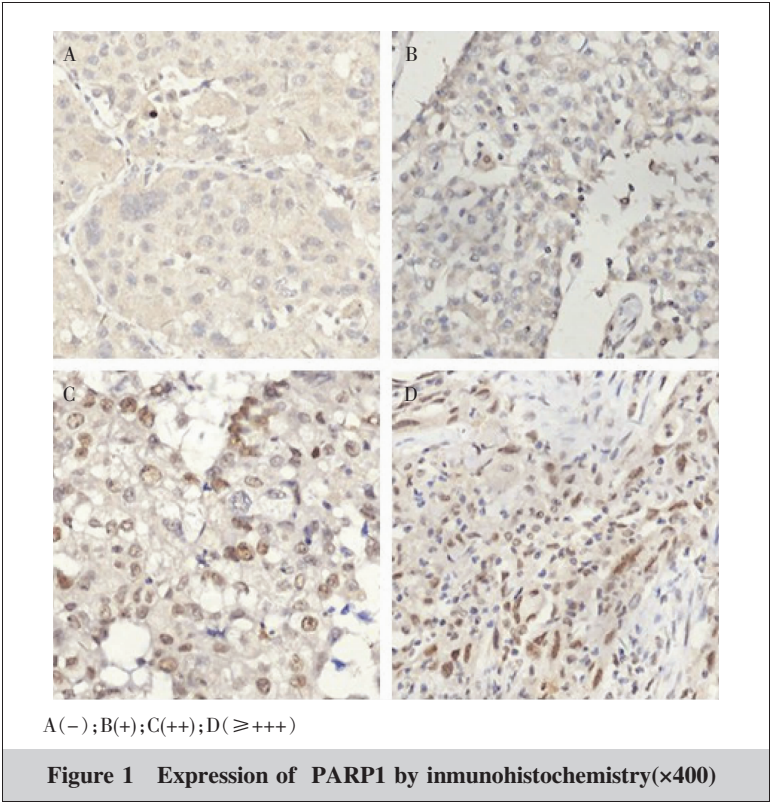


Table 2 Correlationship between PARP1 expression and clinical parameters

Variable	N	PARP1 Positive	PARP1 Negative	Positive Rate	χ^2	P
Gender					0.153	0.110
Male	51	24	27	0.471		
Female	30	15	15	0.500		
Age(years old)					0.106	0.346
<60	33	18	15	0.546		
≥60	48	21	27	0.438		
Smoking History					-0.015	0.897
Yes	38	18	20	0.474		
No	43	21	22	0.488		
Pathological type					0.135	0.228
Adenocarcinoma	40	22	18	0.550		
Squamous cell carcinoma	41	17	24	0.415		
TNM stage					0.346	0.002
I / II	17	13	4	0.765		
III a	64	26	38	0.406		
Lymphatic metastasis					-0.125	0.266
Yes	30	12	18	0.400		
No	51	27	24	0.529		

理类型、分期、淋巴结转移等临床病理参数均无关 (均 $P>0.05$), 但 TNM 分期与 PARP1 的表达呈相关性 ($P=0.002$)(Table 2)。

2.3 PARP1 表达与辅助化疗后无疾病生存期及总生存期关系

全组患者中位 DFS 29.1 个月(95%CI: 8.6~96.4), 中位 OS 47.3 个月 (95%CI: 9.8~112.7)。PARP1 的表达情况与非小细胞肺癌患者手术后无疾病生存时间相关 (Table 3)。PARP1 阴性表达组及阳性表达组的 DFS 分别为 36.2 个月和 23.5 个月 (Cox 多因素分析 $P=0.003$) (Figure 2); PARP1 阴性表达组及阳性表达组的 OS 分别为 49.6 个月和 44.0 个月 (Cox 多因素分析 $P=0.341$)(Figure 3)。

PARP1 的表达与非小细胞肺癌中临床参数中性别、年龄、吸烟及病理类型、OS 无相关性, 而与 TNM 分期及 DFS 有相关性 ($P<0.05$)(Table 3)。

3 讨 论

目前, 在非小细胞肺癌可供选择的化疗方案中, 无论是术前术后抑或姑息治疗, 铂类在两药方案中仍不可或缺。然而, 由于个体差异及药物使用, 多数患者存在铂类原发性耐药或治疗过程中出现的获得性耐药, 从而限制了铂类疗效^[16]。PARP1 因其修复铂类引起的 DNA 损伤作用而被用于预测铂类敏感性的潜在因子^[17]。目前 PARP1 蛋白的检测方法主要有免疫组化、免疫荧光、酶联免疫吸附反应、蛋白质印迹法等^[18-21]。其中免疫荧光多用于目标蛋白的定位, 定量检测结果主观性大; 酶联免疫吸附反应主要用于目标抗原的检测和疾病诊断, 流程较为繁琐; 蛋白质印迹法用于蛋白定量检测, 准确性高, 但实验流程复杂且耗时长, 多用于基础实验研究; 免疫组化因其操作简单、结果可靠被广泛应用于临床组织

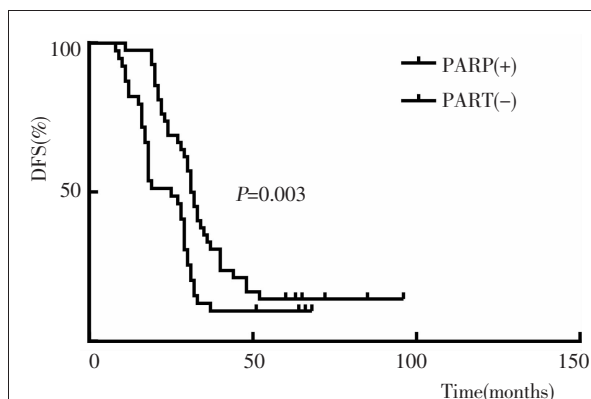


Figure 2 Disease-free survival according to PARP1 expression level

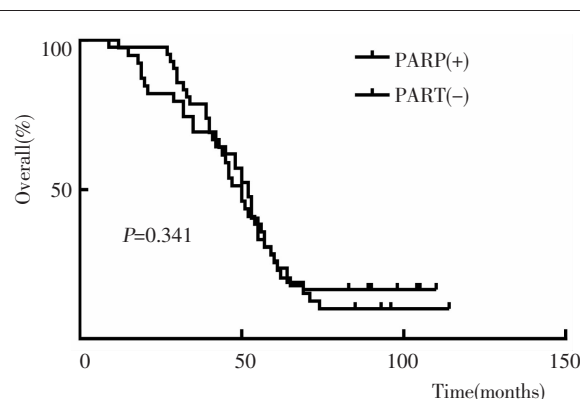


Figure 3 Survival curve according to PARP1 expression level

Table 3 Multivariate analysis for overall survival and disease-free survival of NSCLC patients

Variables	DFS		OS	
	HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
Gender	1.801(1.000~3.244)	0.061	1.824(1.001~3.323)	0.073
Age	0.774(0.462~1.298)	0.331	1.015(0.618~1.668)	0.952
Smoking history	1.176(0.704~1.965)	0.536	1.018(0.603~1.718)	0.947
Pathological type	0.837(0.514~1.362)	0.473	0.824(0.412~1.227)	0.276
TNM stage	2.352(1.825~2.920)	0.027	2.274(1.563~2.910)	0.016
PARP1	2.392(1.349~4.243)	0.003	1.058(0.596~1.876)	0.341

标本目标蛋白的检测。因此本研究采用免疫组化的方法对 PARP1 蛋白进行检测。本研究旨在探讨 PARP1 用于非小细胞肺癌临床预后价值,入组患者为 I b~III a 期可接受手术获取组织病理标本的病例,其中 I b 期患者存在高危因素(如低分化肿瘤包括肺神经内分泌瘤、脉管受侵犯、楔形切除、肿瘤长径大于 4cm、脏层胸膜受侵和不完整的淋巴结取样)并接受 4 个周期含铂两药联合化疗方案辅助治疗。根据第一观察终点 DFS 结果显示,PARP1 阴性表达患者的无疾病生存期要明显优于 PARP1 阳性患者,提示 PARP1 介导的 BER DNA 损伤修复途径的异常激活可能导致了铂类的原发性耐药,该结果与 Zhai 等^[22]在乳腺癌中的研究结果类似。由此可知,PARP1 抑制剂在选择性 PARP1 阳性表达患者联合铂类辅助化疗中的使用可能会更加具有针对性。然而,在疾病进展后的生存随访时间内,我们发现 PARP1 阴性表达组 DFS 上的延长并未转化为总生存期上的获益,这与当前其他肿瘤中 PARP1 表达与 OS 存在负相关论断的结果不一致^[23-25]。回顾本研

究病例资料,在 PARP1 阴性表达组患者在 TNM 分期方面显然要比 PARP1 阳性表达组患者为晚 (PARP1 阴性组 I/II 期:III 期=4:38;PARP1 阳性组 I/II 期:III 期=13:26, $P<0.05$),分期方面的偏倚或许能部分解释 PARP1 阴性组在 OS 上的劣势表现,或还可能与疾病进展后的后续治疗及患者体能状况相关,但 PARP1 的表达情况对非小细胞肺癌患者总生存期的影响以及 PARP1 抑制剂联合铂类在

PARP1 阳性非小细胞肺癌中的作用价值,仍待进一步的研究来验证。

综上所述,PARP1 表达与可手术非小细胞肺癌接受手术及辅助化疗后 DFS 相关,PARP1 阴性患者 DFS 较 PARP1 阳性患者更具优势,但本研究中 PARP1 阴性患者较长的 DFS 并未转化为 OS 上的获益,该结果是否与病例 TNM 分期的偏倚直接相关仍待进一步的商榷,此亦本研究的不足之处,病例时间早,跨度时间大,多数患者疾病复发或进展后的后续治疗方案及部分患者资料缺失等。根据本研究中 PARP1 阴性患者 DFS 上的获益,我们仍有理由相信,PARP1 是可手术非小细胞肺癌接受手术及辅助化疗后较为可靠的疗效预测指标,OS 上是否存在更为显著的获益仍待大样本前瞻性的临床试验来进一步证实。

参考文献:

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Santarpia M, Karachaliou N, Rosell R. Beyond platinum

- treatment for NSCLC: what does the future hold? [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2017, 17(4): 293–295.
- [3] Palma DA, Nguyen TK, Kwan K, et al. Short report: interim safety results for a phase II trial measuring the integration of stereotactic ablative radiotherapy (sabr) plus surgery for early stage non-small cell lung cancer (missile-nscle)[J]. *Radiat Oncol*, 2017, 12(1): 30.
- [4] Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the lace collaborative group[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(21): 3552–3559.
- [5] Bahl A, Falk S. Meta-analysis of single agents in the chemotherapy of NSCLC: what do we want to know? [J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(9): 1143–1145.
- [6] Wu C, Wang Y, Xia Y, et al. Wilms' tumor 1 enhances cisplatin-resistance of advanced NSCLC[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(24): 4566–4572.
- [7] Caiola E, Salles D, Frapolli R, et al. Base excision repair-mediated resistance to cisplatin in kras (g12c) mutant NSCLC cells[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 30072–30087.
- [8] Duan S, Tsai Y, Keng P, et al. IL-6 signaling contributes to cisplatin resistance in non-small cell lung cancer via the up-regulation of anti-apoptotic and DNA repair associated molecules [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (29): 27651 – 27660.
- [9] Scartozzi M, Franciosi V, Campanini N, et al. Mismatch repair system(MMR) status correlates with response and survival in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients[J]. *Lung Cancer*, 2006, 53(1): 103–109.
- [10] Wang D, Xiang DB, Yang XQ, et al. Ape1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of ape1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells[J]. *Lung Cancer*, 2009, 66(3): 298–304.
- [11] Li XD, Han JC, Zhang YJ, et al. Common variations of DNA repair genes are associated with response to platinum-based chemotherapy in NSCLCS [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(1): 145–148.
- [12] Guo ZP, Hu YC, Xie Y, et al. Mln4924 suppresses the brca1 complex and synergizes with parp inhibition in NSCLC cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483(1): 223–229.
- [13] Heerma van Voss MR, Brilliant JD, Vesuna F, et al. Combination treatment using DDX3 and PARP inhibitors induces synthetic lethality in brca1-proficient breast cancer [J]. *Med Oncol*, 2017, 34(3): 33.
- [14] Brown JS, O'Carrigan B, Jackson SP, et al. Targeting DNA repair in cancer: beyond parp inhibitors [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(1): 20–37.
- [15] Lok BH, Gardner EE, Schneeberger VE, et al. Parp inhibitor activity correlates with slfn11 expression and demonstrates synergy with temozolomide in small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(2): 523–535.
- [16] Li QQ, Xie YK, Wu Y, et al. Sulforaphane inhibits cancer stem-like cell properties and cisplatin resistance through mir-214-mediated downregulation of c-myc in non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(7): 12067–12080.
- [17] Ge R, Liu L, Dai W, et al. Xeroderma pigmentosum group a promotes autophagy to facilitate cisplatin resistance in melanoma cells through the activation of PARP1[J]. *J Invest Dermatol*, 2016, 136(6): 1219–1228.
- [18] Kossatz S, Weber W, Reiner T. Detection and delineation of oral cancer with a PARP1-targeted optical imaging agent[J]. *Mol Imaging*, 2017, 16: 1536012117723786.
- [19] Murthyak B, Kouhsari MC, Hershkovitch R, et al. PARP1 expression and its correlation with survival is tumour molecular subtype dependent in glioblastoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(28): 46348–46362.
- [20] Pignochino Y, Capozzi F, D'Ambrosio L, et al. PARP1 expression drives the synergistic antitumor activity of trabectedin and PARP1 inhibitors in sarcoma preclinical models[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 86.
- [21] Nogueira A, Assis J, Faustino I, et al. Base excision repair pathway: PARP1 genotypes as modulators of therapy response in cervical cancer patients[J]. *Biomarkers*, 2017, 22 (1): 70–76.
- [22] Zhai L, Li S, Li X, et al. The nuclear expression of poly (adp-ribose) polymerase-1(PARP1) in invasive primary breast tumors is associated with chemotherapy sensitivity [J]. *Pathol Res Pract*, 2015, 211(2): 130–137.
- [23] Xie KJ, He HE, Sun AJ, et al. Expression of ERCC1, MSH2 and PARP1 in non-small cell lung cancer and prognostic value in patients treated with platinum-based chemotherapy [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(6): 2591–2596.
- [24] Choi EB, Yang AY, Kim SC, et al. PARP1 enhances lung adenocarcinoma metastasis by novel mechanisms independent of DNA repair[J]. *Oncogene*, 2016, 35(35): 4569–4579.
- [25] Malyuchenko NV, Kotova EY, Kulaeva OI, et al. PARP1 inhibitors: antitumor drug design[J]. *Acta Naturae*, 2015, 7 (3): 27–37.