

VEGFA 基因多态性与晚期非小细胞肺癌含铂方案近期疗效的相关性

闫其星, 罗静茹, 李永富, 方 草, 林海锋, 唐文军

(海南医学院第二附属医院, 海南 海口 570311)

摘要: [目的] 探讨 VEGFA rs699947 与 rs833069 位点的单核苷酸多态性与晚期非小细胞肺癌含铂方案近期疗效的关系。[方法] 收集经病理确诊、驱动基因阴性且接受含铂方案化疗的晚期非小细胞肺癌患者 95 例及其临床资料, 采集静脉血标本, 提取血液基因组 DNA, 高通量测序鉴定 rs699947 和 rs833069 位点的基因型, 分析各基因型与近期疗效之间的相关性。[结果] 95 例晚期非小细胞肺癌患者中 25 例 (26.3%) 评估为部分缓解, 70 例 (73.7%) 为稳定或进展。近期疗效与性别、年龄、吸烟状态、ECOG 评分、病理类型、组织分化程度、临床分期、淋巴结转移、远处转移、化疗方案以及 rs833069 位点的单核苷酸多态性无关 ($P>0.05$), 与 rs699947 位点的单核苷酸多态性相关 ($P=0.044$)。携带 CC 基因型患者的部分缓解率为 37% (17/46), 显著性高于携带 AA 或 AC 基因型患者的 16.3% (8/49) ($OR=0.333, 95\%CI: 0.127\sim 0.874; P=0.022$)。[结论] VEGFA rs699947 位点的单核苷酸多态性与驱动基因阴性的晚期非小细胞肺癌患者的近期疗效有关, rs699947 CC 基因型可能是对含铂方案敏感的分子标志物。

关键词: 血管内皮生长因子 A; 单核苷酸多态性; 非小细胞肺癌; 疗效

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1671-170X(2019)09-0783-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.09.B004

Association of VEGFA Gene Polymorphisms with Response of Platinum-Based Chemotherapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer

YAN Qi-xing, LUO Jing-ru, LI Yong-fu, FANG Cao, LIN Hai-feng, TANG Wen-jun

(The Second Affiliated Hospital, Hainan Medical College, Haikou 570311, China)

Abstract: [Objective] To evaluate the association between the polymorphisms in VEGFA rs699947/rs833069 and the response of platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. [Methods] 95 cases with pathologically confirmed whose driver gene was negative and received platinum-based chemotherapy. Genomic DNA was extracted using a blood genome extraction kit. Single nucleotide polymorphism of rs699947/rs833069 was conducted using high-throughout sequencing technology, and the relationship between the genotypes and chemotherapeutic response was analyzed by logistic regression. [Results] 25 patients were partial remission (26.3%) and 70 patients were stable or progressive (73.7%) in 95 advanced non-small cell lung cancer. The chemotherapeutic response was unrelated with gender, age, smoking status, ECOG, histology, differentiation, stage, lymphatic metastasis, distant metastasis, chemotherapy program and the genotypes of VEGFA rs833069 ($P>0.05$). The genotypes of rs699947 were related with the chemotherapeutic response ($P=0.044$). The partial remission rate of CC genotype was 37% (17/46), which was higher than the individuals with AA and AC genotypes with partial remission rate of 16.3% (8/49) ($OR=0.333, 95\%CI: 0.127\sim 0.874, P=0.022$). [Conclusion] The polymorphisms of VEGFA rs699947 are associated with the chemotherapeutic response of advanced non-small cell lung cancer, and rs699947 CC genotype may be a predictor for which received platinum-based chemotherapy.

Subject words: vascular endothelial growth factor A; single nucleotide polymorphisms; non-small cell lung cancer; chemotherapeutic response

肺癌是发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,

其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占 85% 左右^[1]。由于缺乏特征性临床表现和早期诊断方法, 多数患者发现时已为晚期, 对于驱动基因阴性的晚期 NSCLC 患者来说, 多数会接受以铂类为基

基金项目: 海南省科技厅重点项目(ZDYF2017133)

通信作者: 唐文军, 主治医师, 博士; 海南医学院第二附属医院药学部, 海南省海口市白水塘路 48 号(570311); E-mail: 304200886@qq.com

收稿日期: 2019-05-03; 修回日期: 2019-06-08

础的全身化疗,然而其疗效却存在明显的个体差异^[2]。血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 基因位于 6p21.3, 包含 7 个内含子和 8 个外显子, 其编码的 VEGFA 蛋白是一种促进新生血管和淋巴管形成的信号蛋白, 它不仅在肿瘤增殖、浸润和转移的过程中扮演重要的角色, 还可以通过增加血管通透性, 影响化疗疗效^[3]。VEGFA 基因存在多个单核苷酸多态位点 (single nucleotide polymorphism, SNP) 可影响肿瘤组织中 VEGF mRNA 和蛋白的表达状态, 并与肿瘤不良预后相关^[4-5]。研究提示 VEGFA 基因多态可能是化疗药物疗效的敏感标志物。因此, 本研究通过对驱动基因阴性、接受含铂方案作为一线治疗的晚期 NSCLC 患者外周血 VEGFA rs699947 和 rs833069 位点的基因型进行检测, 分析其与近期疗效的相关性, 评估其能否作为预测含铂方案近期疗效的分子标志物并用于指导临床治疗。

1 资料与方法

1.1 病例选择及一般资料

收集 2014 年 1 月至 2017 年 11 月在海南医学院第二附属医院就诊经病理确诊并具有完整临床资料的 NSCLC 患者 95 例, 入组病例均送检 EGFR、ALK、ROS1 基因检测且结果为阴性。所有患者均为汉族, 年龄 38~82 岁, 中位年龄 64 岁, 其中腺癌 74 例, 鳞癌 18 例, 非典型类癌 1 例, 神经内分泌癌 1 例, 大细胞癌 1 例。按肺癌诊疗标准及国际肺癌 TNM 分期, 入组病例均为 III B 期/IV 期的晚期 NSCLC 患者, 既往无合并其他恶性肿瘤病史, 无放化疗史, 无心、肝、肾等重要脏器功能不全, PS 评分 0~2 分, 预计生存 >3 个月。

抽取 3ml 空腹外周静脉血, 3% EDTA 抗凝, -80℃ 冰箱冻存。本研究经医院伦理委员会审核通过, 研究对象均知情同意并签字。

1.2 实验室检测

使用血液基因组 DNA 提取试剂盒 (购自天根生

物科技公司) 提取基因组 DNA, 采用紫外分光光度法鉴定 DNA 的浓度及纯度。委托上海翼和生物科技有限公司设计并合成 PCR 引物 (Table 1), 采用多重 PCR 技术对目标区域扩增, 并对扩增子进行高通量测序。

1.3 治疗方法

患者治疗前完善常规检查和基线评估, 均给予含铂方案化疗 (紫杉醇 175mg/m², d1+顺铂 75mg/m² d1 或卡铂 AUC=5, d1, 吉西他滨 1250mg/m², d1、8+顺铂 75mg/m², d1 或卡铂 AUC=5, d1, 培美曲塞 500mg/m², d1+卡铂 AUC=5, d1), 每 3 周为 1 个周期, 共 4 个周期。每 2 个周期后进行一次疗效评估。所有入选患者均接受至少 2 个周期化疗。

1.4 临床疗效评估

采用修订的实体瘤疗效评价标准 (modified response evaluation criteria in solid tumors, mRECIST) 评估疗效。完全缓解 (complete remission, CR): 所有靶病灶动脉期强化消失; 部分缓解 (partial remission, PR): 所有目标病灶的长径总和减少 ≥30%; 稳定 (stable disease, SD): 变化介于 PR 和 PD 之间; 进展 (progressive disease, PD): 所有目标病灶的长径总和增加 ≥20%, 并且长径总和增加绝对值 ≥5mm, 或出现新病灶。评定指标根据每治疗 2 个周期后复查 CT 所示的肿瘤病灶。

1.5 统计学处理

应用 SPASS 18.0 软件进行分析。组间差异比较采用 *t* 检验; 计数变量比较用 χ^2 检验; 以比值比 (odds ratio, OR) 及其 95% 可信区间 (confidence interval, CI) 表示相对危险度; 采用 Logistic 回归分析评估各指标与化疗疗效的关系。统计学检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 近期疗效

95 例晚期非小细胞肺癌患者中 25 例 (26.3%) 评估为 PR, 70 例 (73.7%) 评估为 SD+PD。Logistic 回归分析评估近期疗效与一般资料的相关性, 结果显示, 近期疗效与性别、

年龄、吸烟状态、ECOG 评分、病理类型、组织分化程度、临床分期、

Table 1 Primers used for VEGFA rs699947 and rs833069 genotyping

SNP	Forward primer	Reverse primer
rs699947	5'-TTTGGTTAAATTGAGGGAAATTGC-3'	5'-CATCCCATTTCTTGCATATAGGAAG-3'
rs833069	5'-ATCCAAACCACAACGGAACAAAAG-3'	5'-GGGCTCAGCCTAATGGGATC-3'

淋巴结转移、远处转移及化疗方案的差异均无统计学意义 ($P>0.05$) (Table 2)。

2.2 rs699947 和 rs833069 多态性与近期疗效的相关性

rs699947 和 rs833069 基因型分布及等位基因分布频次如 Table 3 所示,rs699947 各基因型在 PR 组和 SD+PD 组中的分布差异具有统计学差异 ($P=0.044$),携带 CC 基因型患者的部分缓解率为 37% (17/46),显著性高于携带 AA 或 AC 基因型患者的 16.3% (8/49),且差异有统计学意义 ($OR=0.333$, $95\%CI:0.127\sim0.874$; $P=0.022$)。而 rs833069 各基因型或等位基因的分布频次在两组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 rs699947 和 rs833069 多态性与临床指标的相关性

按各临床指标 (病理类型、远处转移、淋巴结转移、分化程度、临床分期) 进行分组,rs699947 和 rs833069 各基因型在各组间的分布差异均无统计学意义 ($P>0.05$) (Table 4)。

3 讨 论

本研究系统性评估了 VEGFA 基因 rs699947 与 rs833069 位点的 SNPs 与接受含铂方案治疗晚期 NSCLC 患者近期疗效之间的关系,发现近期疗效与 rs699947 多态性相关,与患者的性别、年龄、吸烟状态、ECOG 评分、病理类型、组织分化程度、临床分期、淋巴结转移、远处转移及化疗方案无关,携带 rs699947 AA 或 AC 基因型的患者经至少 2 个周期含铂方案化疗后的部分缓解率仅为携带 CC 基因型患者的 1/3,差异有统计学意义,提示 rs699947 CC 基因型可能是对含铂方案敏感的分子标志物;而 rs833069 多态性则与晚期 NSCLC 患者的近期疗效无关。

Table 2 Association of general information with chemotherapeutic response in advanced NSCLC by Logistic regression

Variables	N	PR	SD+PD	OR(95%CI)	P
Gender					
Male	59	14	45	1	0.464
Female	36	11	25	1.414(0.559~3.580)	
Age(years old)					
≤60	45	16	29	1	0.052
>60	50	9	41	0.398(0.155~1.024)	
Smoking status					
Yes	40	11	29	1	0.823
No	55	14	41	0.900(0.358~2.263)	
ECOG					
0	34	7	27	1	0.216
1	47	16	31	1.991(0.713~5.561)	
2	14	2	12	0.643(0.116~3.562)	
Histology					
Adenocarcinoma	74	18	56	1	0.917
Others	21	7	14	1.059(0.361~3.301)	
Differentiation					
High or middle	53	17	36	1	0.152
Poor	42	8	34	0.498(0.190~1.304)	
Stage					
III	19	5	14	1	1.000
IV	76	20	56	1.000(0.319~3.123)	
Lymphatic metastasis					
N0	12	2	10	1	0.877
N1	7	2	5	2.000(0.214~18.687)	
N2	48	13	35	1.857(0.358~9.634)	
N3	28	8	20	2.000(0.356~11.23)	
Distant metastasis					
Yes	76	20	56	1	1.000
No	19	5	14	1.000(0.319~3.132)	
Chemotherapy program					
Paclitaxel+platinum	19	5	14	1	0.887
Gemcitabine+platinum	27	7	20	0.980(0.258~3.726)	
Pemetrexed+platinum	49	15	34	1.235(0.376~4.053)	

Table 3 Association of genotype frequencies of rs699947 and rs833069 with chemotherapeutic response in advanced NSCLC

Variables	Short-term effects		OR(95%CI)	P
	PR	SD+PD		
rs699947				0.044
CC	17	29	1	0.104
AC	6	37	0.277(0.097~0.791)	
AA	2	4	0.853(0.141~5.159)	
AA+AC	8	41	0.333(0.127~0.874)	
C	40	95	1	0.301
A	10	45	0.528(0.242~1.150)	
rs833069				
AA	7	32	1	0.142
AG	13	28	2.122(0.743~6.062)	
GG	5	10	2.286(0.593~8.813)	
AG+GG	18	38	2.165(0.803~5.837)	
A	27	92	1	0.142
G	23	48	1.633(0.847~3.148)	

Table 4 Association of clinical characteristics with the genotype frequencies of rs699947 and rs833069

Variables	rs699947				rs833069			
	AA	AC	CC	P	AA	AG	GG	P
Histology								
Adenocarcinoma	6	33	35	0.402	30	32	12	0.970
Others	0	10	11		9	9	3	
Distant metastasis								
Yes	4	37	35	0.352	31	36	9	0.070
No	2	6	11		8	5	6	
Lymphatic metastasis								
Yes	5	37	41	0.867	35	33	15	0.127
No	1	6	5		4	8	0	
Differentiation								
High or middle	3	25	25	0.897	24	20	9	0.485
Poor	3	18	21		15	21	6	
Stage								
III	2	6	11	0.352	8	5	6	0.070
IV	4	37	35		31	36	9	

VEGFA 基因编码合成的 VEGF 蛋白是作用最强的促血管生成因子之一。VEGF 蛋白不仅可与受体 VEGFR 结合,促进肿瘤的发生发展^[6];还可以通过增加血管的通透性,使瘤体间质内的静水压增加,导致治疗药物向肿瘤输送降低,影响化疗药物的疗效^[3,7]。然而,VEGF 蛋白并非在所有肿瘤患者中均呈高表达,其表达及生物学活性具有明显的个体差异和遗传倾向性^[8]。

rs699947 位于 VEGFA 基因的启动子区,该位点 SNP 与 VEGF 蛋白的表达密切相关。研究表明,携带 rs699947 A 等位基因 NSCLC 患者的肿瘤组织中的呈过表达^[9],而较高的 VEGF 蛋白表达水平与可能会促进血管内皮细胞增殖和新生血管形成,并促进肿瘤进展。为此,Koukourakis 等^[10]评估了 rs699947 多态性与微血管密度的关系,结果显示:该位点的基因型和 NSCLC 患者的微血管密度密切相关,AA 或 AC 基因型患者的微血管密度显著性高于 CC 基因型,说明相对于 AA 或 AC 基因型,携带 rs699947 CC 基因型的 NSCLC 患者的预后可能较好。这与我们的研究结论一致,提示 rs699947 CC 基因型可能是对含铂方案敏感的分子标志物。Masago 等^[11]研究表明,与 CC+AC 基因型相比,AA 基因型的 NSCLC 的患者预后更差,这也支持我们的研究结果。此外,与我们研究结果类似的是,Song Y 等^[12]也认为 rs699947 C 等位基因是膀胱癌发病的保护因素^[12]。然

而,Furuya 等^[13]却研究认为,rs699947 位点的 C 等位基因与胃癌进展和预后差相关,该项研究入组均为胃癌患者,以氟尿嘧啶为基础的化疗。因此,我们认为这可能与导致不同瘤种进展的信号传导通路不同或是采用治疗方案不同有关。

rs833069 位于 VEGFA 基因的 2 号内含子,其与疾病的相关性研究多局限在视网膜病变和心脑血管病变,其与肿瘤的相关性研究较少。在本研究中,该位点基因型或等位基因分布频次与 NCSLC 对含铂方案的敏感性无关。与我们研究类似,Zhao P 等^[14]研究显示,该位点的多态性与胶质瘤的发病也无相关性,说明该位点的 SNP 与 VEGF 蛋白表达及微血管生成可能无关。

此外,我们对这两个位点的 SNPs 与 NSCLC 的各个临床特征进行了相关分析,结果显示其与病理类型、临床分期、淋巴结转移、远处转移和分化程度均无相关性。研究显示 rs699947 多态性与尿路上皮癌的发病显著性相关,但与瘤肿程度及临床分期无相关性,这也与我们的研究结果一致^[15]。

综上所述,遗传背景的差异是影响药物疗效和预后的重要因素之一,VEGFA rs699947 CC 基因型可能是对含铂方案治疗敏感的分子标志物,对驱动基因阴性的晚期 NSCLC 患者进行该基因位点的多态性检测,可能有助于对含铂方案疗效的预测,为晚期 NSCLC 患者是否选择含铂方案化疗提供参考。

参考文献:

- [1] Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global epidemiology of lung cancer [J]. Ann Glob Health, 2019, 85(1):pii8.
- [2] Pérez-Ramírez C, Cañadas-Garre M, Molina MÁ, et al. Contribution of genetic factors to platinum-based chemotherapy sensitivity and prognosis of non-small cell lung cancer [J]. Mutat Res, 2017, 771:32-58.
- [3] Röhrig F, Vorlová S, Hoffmann H, et al. VEGF-ablation therapy reduces drug delivery and therapeutic response in ECM-dense tumors [J]. Oncogene, 2017, 36(1):1-12.
- [4] Bi MM, Shang B, Wang Z, et al. Expression of CXCR4 and VEGF-C is correlated with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer [J]. Thorac Cancer, 2017, 8(6):

- 634-641.
- [5] Kim YJ, Chung WC, Jun KH, et al. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor(VEGF) associated with gastric cancer recurrence after curative resection with adjuvant chemotherapy [J]. BMC Cancer, 2019, 19:483.
 - [6] Zhang SD, McCrudden CM, Kwok HF. Prognostic significance of combining VEGFA, FLT1 and KDR mRNA expression in lung cancer[J]. Oncol Lett, 2015, 10(3):1893-1901.
 - [7] Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor[J]. Semin Oncol, 2002, 29(6 Suppl 16):3-9.
 - [8] Costache MI, Ioana M, Iordache S, et al. VEGF expression in pancreatic cancer and other malignancies: a review of the literature [J]. Rom J Intern Med, 2015, Jul-Sep, 53(3): 199-208.
 - [9] Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection [J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(1):260-264.
 - [10] Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, et al. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2004, 46(3):293-298.
 - [11] Song Y, Yang Y, Liu L, et al. Association between five polymorphisms in vascular endothelial growth factor gene and urinary bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis involving 6671 subjects[J]. Gene, 2019, 698:186-197.
 - [12] Masago K, Fujita S, Kim YH, et al. Effect of vascular endothelial growth factor polymorphisms on survival in advanced-stage non-small-cell lung cancer [J]. Cancer Sci, 2009, 100(10):1917-1922.
 - [13] Furuya TK, Jacob CE, Tomitão MTP, et al. Association between polymorphisms in inflammatory response-related genes and the susceptibility, progression and prognosis of the diffuse histological subtype of gastric cancer[J]. Genes (Basel), 2018, 9(12):pii: E631.
 - [14] Zhao P, Chen A, Qi Q, et al. Impact of VEGFA polymorphisms on glioma risk in Chinese[J]. Oncotarget, 2017, 8(48):83712-83722.
 - [15] Ben Wafi S, Kallel A, Ben Fradj MK, et al. Haplotype-based association of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms with urothelial bladder cancer risk in Tunisian population[J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(9):e22610.

《肿瘤学杂志》编辑部关于启用稿件远程处理系统的通知

本刊已启用稿件远程处理系统,该系统包括作者在线投稿/查询、主编办公、专家审稿、编辑办公等功能,通过网上投稿、网上查稿、网上审稿,实现作者、编辑、审稿专家的一体化在线协作处理,从而构建一个协作化、网络化、角色化的编辑稿件业务处理平台。对于广大作者而言,该系统最大的优点是支持在线投稿,方便作者及时了解稿件处理进程,缩短稿件处理时滞。使用过程中具体注意事项如下:

(1)第1次使用本系统投稿的作者,必须先注册,才能投稿。注册时各项信息请填写完整。作者自己设定用户名和密码,该用户名密码长期有效。

(2)已注册过的作者,请不要重复注册,否则将导致查询稿件信息不完整。如果遗忘密码,可以致电编辑部查询。

(3)作者投稿请点击“作者登录”,登录后按照提示操作即可。投稿成功后,系统自动发送回执邮件,作者投稿后请随时关注邮箱提示,也可随时点击“作者登录”,获知该稿件的审理情况、处理进展、审稿意见等。

(4)网上投稿成功1周内,请将以下文件邮寄至编辑部:①单位介绍信;②作者投稿无学术不端行为承诺书(本处理系统中下载后填写);③文章若属于基金项目资助,附上基金项目批文的复印件。编辑部收到上述文件后,稿件将进入审稿程序。

稿件远程处理系统启用后,我刊只接受网上投稿,不再接收电子邮件投稿和纸质稿。

《肿瘤学杂志》网址:<http://www.chinaoncology.cn>

如有任何问题,请与编辑部联系! 联系电话:0571-88122280。