

卡培他滨为基础的辅助化疗在结直肠癌中的疗效及相关药物基因组学分析

陈青, 于法明, 刘月芬, 刘传文, 李慎柯

(濮阳油田总医院, 河南 濮阳 457001)

摘要: [目的] 探讨卡培他滨为基础的辅助化疗在结直肠癌患者中的疗效及相关药物基因组学分析。[方法] 纳入 176 例术后接受卡培他滨为基础辅助化疗的结直肠癌患者, 收集患者外周血及术后癌组织标本分别进行基因分型及表达测定。多态性位点的基因型和其他变量的相关性通过 Logistic 回归模型进行分析。不同基因型的激酶插入区受体(kinase insert domain receptor, KDR)表达通过非参检验分析, 基因型和预后的单变量分析用 Kaplan-Meier 生存分析方法, 并通过 Cox 风险比例模型对其他变量进行校正。[结果] 176 例患者的中位无疾病生存期(median disease free survival, mDFS)为 4.1 年, 中位总生存期(median overall survival, mOS)为 5.2 年。药物基因组学分析方面, 在 KDR 的多态性位点中, 只发现了 4397T>C 位点的临床意义。4397T>C 位点的分布频率为: TT 型 95 例(53.98%), TC 型 70 例(39.77%), CC 型 11 例(6.25%), 最小等位基因频率为 0.26, 三种基因型分布频率符合哈迪温伯格平衡($P=0.690$)。不同基因型在患者基线临床资料中分布均衡。携带 C 等位基因的 TC/CC 型患者和野生型 TT 型患者的 mDFS 分别为 4.4 和 3.2 年, 差异有统计学意义($P=0.012$)。TC/CC 型和 TT 基因型患者的 mOS 分别为 5.2 年和 4.0 年, 差异有统计学意义($P=0.007$)。对 OS 构建多变量的 Cox 模型校正后 TC/CC 基因型对 OS 的影响仍具有统计学意义($HR=0.55, P=0.011$)。另外, 进一步在 79 例术后癌组织标本的 mRNA 表达分析中发现, 4397T>C 位点 TC/CC 基因型患者相对于野生型 TT 型患者, 癌组织标本中 KDR mRNA 表达水平显著降低($P<0.001$)。[结论] KDR 基因 4397T>C 位点可能通过影响 KDR mRNA 的表达影响结直肠癌患者的预后。

关键词: 结直肠肿瘤; 激酶插入区受体; 基因遗传变异; 疗效

中图分类号: R735.3⁴ **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)12-01037-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.12.B003

The Clinical Outcomes of CRC Patients Received Capecitabine Based on Adjuvant Chemotherapy and the Corresponding Pharmacogenomics Analysis

CHEN Qing, YU Fa-ming, LIU Yue-fen, LIU Chuan-wen, LI Shen-ke

(The General Hospital of Puyang Oilfield, Puyang 457001, China)

Abstract: [Objective] To investigate the clinical outcomes of CRC patients received Capecitabine based adjuvant chemotherapy and the corresponding pharmacogenomics analysis. [Methods] 176 patients with colorectal cancer who underwent surgical treatment and received capecitabine based adjuvant chemotherapy were included in this study. Peripheral blood and the postoperative tissue specimen of the CRC patients were collected for the genotyping of polymorphism and mRNA expression of kinase insert domain receptor(KDR), respectively. The correlation of the polymorphism genotypes and other variables was analyzed by logistic regression model. The univariate analysis of genotypes and prognosis was carried out by Kaplan-Meier survival analysis, and multivariate were adjusted by Cox regression analysis. [Results] The median disease-free survival(mDFS) of the 176 CRC patients was 4.1 years, and the median overall survival (mOS) was 5.2 years. In terms of the pharmacogenomics analysis, the prevalence of 4397T>C in KDR among the study population were as follows: TT genotype 95 cases(53.98%), TC genotype 70 cases(39.77%), CC genotype 11 cases(6.25%), minor allele frequency of 4397T>C was 0.26. The distribution of three genotypes in accordance with Hardy-Weinberg Equilibrium($P=0.690$). There were no statistical differences in the distribution of the genotypes in baseline clinical data. The survival analysis of patients with different genotypes found that the mDFS of patients with C allele carriers and wild type TT genotype was 4.4 and 3.2 years ($P=0.012$). The mOS of the two genotypes were 5.2 and 4.0 years ($P=0.007$). Adjusted in multivariate Cox regression analysis for OS, TC/CC genotype was an independent factor for OS ($HR=0.55, P=0.011$). Additionally, of the 79 postoperative tissue specimens, gene expression analysis was conducted. And the results show that the expression of KDR in cancer tissues of the patients with TC/CC genotypes were significantly lower than those of the wild type TT genotype patients ($P<0.001$). [Conclusion] The polymorphism 4397T>C of KDR may influence the prognosis of CRC patients by affecting the mRNA expression of KDR.

Subject words: colorectal cancer; kinase insert domain receptor; genetic variation; efficacy

项目基金: “十三五”重大新药创制专项子课题(2016ZX09101005)

通信作者: 李慎柯, 副主任, 副主任医师, 硕士生导师, 硕士; 濮阳市油田总医院呼吸科, 河南省濮阳市大庆路 124 号(457001); E-mail: lisklisk@126.com

收稿日期: 2018-10-08; **修回日期:** 2018-12-11

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)在我国每年新发病例约 37.5 万, 每年死亡病例约 19.1 万^[1]。近年来, 越来越多的不同作用靶点的药物给 CRC 患者带来了不同的治疗选择, 为患者带来了更多的生存获益^[2]。另外, 在辅助化疗领域, 基于对 IDEA 研究的认可, 2018 年第 1 版 NCCN 指南对于低危Ⅲ期结肠癌推荐 3 个月的卡培他滨联合奥沙利铂的辅助化疗方案^[3]。

肿瘤周围的微血管生长来源于肿瘤细胞分泌不同的血管生成生长因子的刺激。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是最有效的内皮细胞有丝分裂素, 而其受体激酶插入区受体(kinase insert domain receptor, KDR)则扮演了和 VEGF 结合, 共同传递血管新生信号的重要作用^[4]。研究表明 KDR 受体是和 VEGF 结合能力最强发挥信号传递最重要的受体, 因此靶向于该受体的雷莫芦单抗在结直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌中都有重要的治疗作用^[5]。

KDR 基因位于染色体 4q12, 包含了 30 个外显子, 其具有较多的多态性, 在不同人群中 KDR 的表达也呈现明显的个体差异^[6]。研究发现 4397 T>C 位点和前列腺癌的较好预后显著相关^[7]。另外, 在高加索人群中该位点和接受放射治疗的 NSCLC 患者较差的预后相关^[8]。在亚洲人群肝癌的研究中, 本研究旨在探讨 KDR 基因 4397T>C 位点对术后接受卡培他滨为基础辅助化疗的 CRC 患者疗效的影响。则发现该位点和较好的预后相关^[9]。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究为回顾性分析, 入组 2010 年 1 月至 2017 年 6 月在濮阳油田总医院普外科接受手术切除治疗的 CRC 患者 176 例。入组标准: 年龄 ≥ 18 岁, ECOG 0~2 分, 接受手术切除且术后接受卡培他滨为基础的辅助化疗。排除标准: 家族性腺瘤性息肉病, 其他遗传性 CRC 综合征, 失访患者。主要研究终点为总生存期(overall survival, OS), 次要研究终点为无复发生存期(disease free survival, DFS)。

入组 176 例患者资料见 Table 1, 入组患者中位年龄 54 岁(23~78), 男性 112 例(63.64%), ECOG 评分 0 分 108 例(61.36%), 结肠癌和直肠癌患者分别为 109 例和 67 例, 肿瘤分化中等患者 122 例(69.32%), 临床分期Ⅱ期 46 例、Ⅲ期 130 例。辅助化疗: 接受卡培他滨单药辅助化疗患者 55 例, 卡培他滨联合奥沙利铂辅助化疗患者 121 例。

1.2 血液样本收集及基因分型

治疗过程中收集患者的外周血样本约 4ml, 用苯酚氯仿法提取基因组 DNA, 之后于 -20℃ 保存。设计包含 4397 T>C(rs2071559)位点的上下游 PCR 引物, 上游引物为: 5'-TCACTAGGGCTCTTCGTTGG-3', 下游引物为: 5'-AGGGTATTTTGTTCGCCAGT-3', 产物片段为 196bp, 通过限制性片段长度多态性聚合酶链反应(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)方法对该位点进行基因分型。分析设置阴性参照, 多于 10% 的样本至少分析一次以此来确保样本不被污染, 部分样本的分型结果通过直接测序法进行验证。

Table 1 Comparison of baseline characteristics of 176 CRC patients according to 4397 T>C genotype status

Characteristics	Total (n=176, %)	4397 T>C genotypes		P
		TT (n=95)	TC/CC (n=81)	
Age(years)	54(23~78)	54(23~75)	54(25~78)	0.755
Gender				
Male	112(63.64)	60(63.16)	52(64.20)	0.886
Female	64(36.36)	35(36.84)	29(35.80)	
ECOG score				
0	108(61.36)	58(61.05)	50(61.73)	0.927
1~2	68(38.64)	37(38.95)	31(38.27)	
Tumor location				
Colon cancer	109(61.93)	59(62.11)	50(61.73)	0.959
Rectal cancer	67(38.07)	36(37.89)	31(38.27)	
Tumor differentiation				
Well	37(21.02)	20(21.05)	17(20.99)	0.877
Intermediate	122(69.32)	66(69.47)	56(69.14)	
Poor	17(9.66)	9(9.47)	8(9.87)	
Staging				
Ⅱ	46(26.14)	25(26.31)	21(25.93)	0.953
Ⅲ	130(73.86)	70(73.69)	60(70.07)	
Adjuvant chemotherapy regimens				
Capecitabine	55(31.25)	30(31.58)	25(30.86)	0.919
Capecitabine plus Oxaliplatin	121(68.75)	65(68.42)	56(69.14)	

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

1.3 组织样本收集及 KDR 表达分析

手术过程中收集每例患者被切除的结直肠癌癌组织标本,癌组织标本先前均未接受过放化疗。最终纳入 79 例术后癌组织标本,液氮保存。后用 Trizol 试剂进行 RNA 提取,再继续逆转录为 cDNA 进行 KDR 基因表达水平测定,上游引物为:5'- ATGCA-GAGCAAGGTGCTGC-3',下游引物为:5'- TTAAAC-AGGAGGAGAGCTCAGTG-3'。实时定量 PCR 反应体系如下:SYBN Premix Ex Tag 溶液 10μl,KDR F primer (20μM) 0.2μl,KDR R primer (20μM) 0.2μl,ddH₂O 7.6μl,cDNA2μl,反应体系总计 20μl,之后用上海罗氏 real-time PCR 仪器进行 KDR mRNA 表达实验,GAPDH mRNA 表达作为内参。KDR mRNA 用相对定量法 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算。

1.4 统计学处理

采用 SPSS22.0 进行 (IBM,Armonk,NY) 统计分析。 χ^2 检验分析多态性位点基因分型是否符合哈迪温伯格平衡。在基线临床资料当中,离散型的变量和 4397 T>C 位点不同基因型的分布采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验。连续型的变量和 4397T>C 位点不同基因型的分析采用非参检验的 Mann-Whitney U (两组间) 检验。通过 Stata 14.0 绘制 Kaplan-Meier 曲线比较不同基因型患者 DFS 和 OS 的差异,曲线间的差异用对数秩检验进行比较。DFS 为患者完成手术时间到出现肿瘤复发或者死亡的时间,OS 从开始手术时间到患者因任何原因死亡或最后一次随访结束。多变量分析时,对 OS 构建采用 Cox 风险比例模型,用向后 LR 的选择步骤来筛选和校正潜在的混杂变量。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4397 T>C 位点基因分型情况

4397 T>C 位点的基因分型 TT 型 95 例 (53.98%),TC 型 70 例 (39.77%),CC 型 11 例 (6.25%),最小等位基因频率为 0.26,3 种基因型分布频率符合哈迪温伯格平衡 ($P=0.690$)。该位点在基线临床资料的分布均衡,为预后差异的比较奠定了均衡性的基础。见 Table 1。

2.2 KDR 基因 4397 T>C 位点对患者预后的影响

考虑到突变纯合子 CC 型患者相对较少 (11 例),后期的预后分析中将 CC 型和 TC 型患者合并,共 81 例。在针对 DFS 的单变量分析当中,如 Figure 1 所示,携带 C 等位基因的 TC/CC 型患者和野生型 TT 型患者的 mDFS 分别为 4.4 年和 3.2 年,差异有统计学意义 ($P=0.012$)。

如 Figure 2 所示,TC/CC 型和 TT 型患者的 mOS 分别为 5.2 年和 4.0 年,差异有统计学意义 ($P=0.007$)。Cox 风险比例模型结果显示,4397 T>C 位点对 OS 独立的影响意义依然存在 ($HR=0.55, P=0.011$),其他有统计学意义的变量为年龄 ($HR=1.31, P=0.021$)、ECOG 评分 ($HR=2.21, P=0.005$)、肿瘤分期 ($HR=2.88, P=0.003$) 和联合化疗 ($HR=2.33, P=0.015$)。见 Table 2。

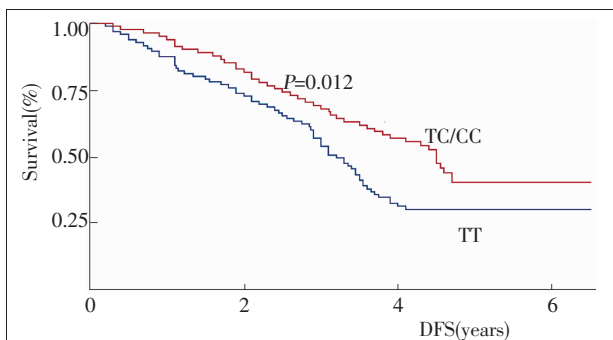


Figure 1 Disease free survival of the 176 CRC patients according to KDR 4397 T>C status

Table 2 Multivariate Cox regression analysis for OS according to baseline characteristics and polymorphism

Characteristics	n	HR(95%CI)	df	P
Age (years)				
<54	85	1 (reference)		
≥54	91	1.31(0.99~1.78)	1	0.021
ECOG score				
0	108	1 (reference)		
1~2	68	2.21(1.31~3.54)	1	0.005
Staging				
II	46	1 (reference)		
III	130	2.88(1.76~4.35)	1	<0.001
Adjuvant chemotherapy regimens				
Capecitabine	55	1 (reference)		
Capecitabine plus Oxaliplatin	121	2.33(1.54~3.65)	1	0.015
KDR 4397 T>C				
TT	95	1 (reference)		
TC/CC	81	0.55(0.21~1.03)	1	0.011

ECOG:Eastern Cooperative Oncology Group,HR:Hazard Ratio,CI:Confidence Interval,df:Degree of Freedom

2.3 KDR 基因 4397 T>C 位点对 KDR 基因 mRNA 表达的影响

79 例癌组织标本中,TT 型 43 例,TC 型 31 例,CC 型 5 例,三种基因型分布频率符合哈迪温伯格平衡($P=0.852$)。将 CC 型和 TC 型合并,共计 36 例。79 例患者及不同基因患者的基线临床资料见 Table 3。TC/CC 基因型患者相对于野生型的 TT 型患者,癌组织标本中 KDR mRNA 表达水平显著降低($P<0.001$) (见 Figure 3)。另外,本研究以 KDR mRNA 表达水平中位值为阈值将患者分为高表达组和低表达组, KDR mRNA 高表达患者相对于低表达患者的 OS 具有较差的趋势,但差异无统计学意义 ($P=0.085$) (Figure 4)。

3 讨 论

发现 KDR 基因 4397 T>C 位点 TC/CC 基因型的患者相对于野生型的 TT 型患者具有较好的 OS, 并通过 79 例组织标本的 KDR 基因 mRNA 表达水平分析发现该位点不同的基因型患者 mRNA 表达水平呈现差异明显。4397 T>C 位点可能通过影响 KDR 基因的 mRNA 表达进而影响了患者预后。

本研究结果和 Dong 等^[10]团队的研究结果基本一致,他们的研究纳入了 408 例经手术切除的 CRC 患者,结果表明 4397 T>C 位点和术后 CRC 较低的复发风险相关。另外,本研究结果也和西班牙 Paré-Brunet 等^[11]的研究结果一致,该研究纳入 172 例接受奥沙利铂为基础化疗的晚期 CRC 患者,结果表明 TC/CC 基因型的患者预后较好,不过他们的研究中 4397 T>C 位点的最小等位基因频率达到了 0.5,而本研究中只有 0.26,这也进一步表明了 4397 T>C 位点的多态性具有明显的种族差异。Butkiewicz 等^[8]研究高加索人群中 350 例不可手术切除的非小细胞肺癌患者,同样发现 4397 T>C 位点在高加索人群中最小等位基因频率为 0.46,疗效结果表明 TC/CC 基因型

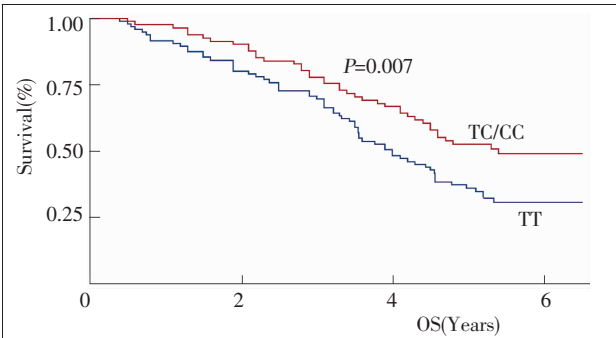


Figure 2 Overall survival of the 176 CRC patients according to KDR 4397 T>C status

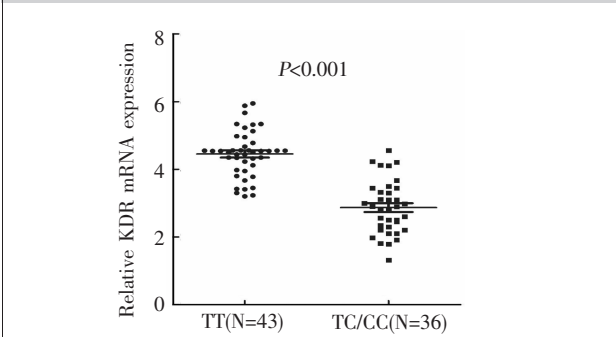
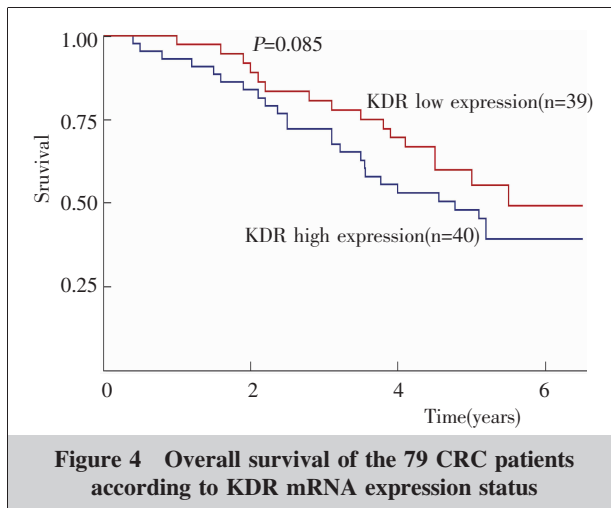


Figure 3 Relative KDR mRNA expression according to KDR 4397 T>C status

Table 3 Comparison of baseline characteristics of 79 CRC patients(postoperative tissue specimen subgroup) according to 4397 T>C genotype status

Characteristics	Total (n=79, %)	4397 T>C genotypes (%)		P
		TT (n=43)	TC/CC (n=36)	
Age(years)	56 (25~69)	55 (30~69)	56 (25~61)	0.411
Gender				
Male	49 (62.03)	27 (62.79)	22 (61.11)	0.878
Female	30 (37.97)	16 (37.21)	14 (38.89)	
ECOG score				
0	51 (64.56)	28 (65.12)	23 (63.89)	0.910
1~2	28 (35.44)	15 (34.88)	13 (36.11)	
Tumor location				
Colon cancer	46 (58.23)	25 (58.14)	21 (58.33)	0.986
Rectal cancer	33 (41.77)	18 (41.86)	15 (41.67)	
Staging				
II	19 (24.05)	10 (23.26)	9 (25.00)	0.857
III	60 (75.95)	33 (76.74)	27 (75.00)	
Adjuvant chemotherapy regimens				
Capecitabine	25 (31.65)	13 (30.23)	12 (33.33)	0.768
Capecitabine plus Oxaliplatin	54 (68.35)	30 (69.77)	24 (66.67)	

的患者预后较差,这与我们的研究结果相反。这些研究结果不一致的原因可能归结为疾病状态的差异、种族差异以及研究纳入的样本量不一致等。这些变异均可以改变 KDR 蛋白的产生或活性,进而在血管



生成和淋巴肿瘤传播方面引起不同的个体变异,从而在肿瘤进展和分化过程中产生差异。

另外,本研究还在 79 例组织标本中探讨了 4397 T>C 位点和 *KDR* 基因 mRNA 表达的相关性,结果表明野生型 TT 型患者 *KDR* 基因 mRNA 表达显著较高。而 *KDR* 受体是和 VEGF 结合能力最强发挥信号传递最重要的受体,其表达水平在血管新生过程中将发挥至关重要的作用。现已表明,肿瘤细胞内较高的 *KDR* 基因表达水平使其更容易新生出血管从而更易复发和转移^[12]。

总之,本研究发现了在中国 CRC 人群当中 *KDR* 基因的 4397 T>C 位点是一个独立的 OS 影响因素。但本研究也有一定局限性,首先纳入研究的样本量不大;另外,作为回顾性分析有一些偏倚无法避免。总体本研究较充分地 4397 T>C 位点的预后影响意义进行了评估,同时也从 *KDR* 基因 mRNA 表达层面去揭示了该位点造成预后差异的部分原因,对 CRC 患者预后具有一定的临床指导意义。

参考文献:

- [1] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in China,2015[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.
- [2] Wang Z,Sun YX,Li HJ,et al. The clinical observation of combined chemotherapy with cetuximab and chemotherapy alone in the treatment of k-ras wild-type advanced colorectal cancer[J]. Journal of Chinese Oncology,2017,23(1): 45-48.[王哲,孙玉秀,李皓静,等. 西妥昔单抗联合化疗与单纯化疗治疗 k-ras 野生型晚期结直肠癌临床观察

- [J]. 肿瘤学杂志,2017,23(1):45-48.]
- [3] Lonardi S,Sobrero A,Rosati G,et al. Phase III trial comparing 3-6 months of adjuvant FOLFOX4/XELOX in stage II-III colon cancer:safety and compliance in the TOSCA trial[J]. Ann Oncol,2017,28(12):3110.
- [4] Wang T,Li D,Peng JJ,et al. miR-375 regulates the expression of PDGFC gene and inhibits the angiogenesis of liver cancer[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology,2017, 44(20):1007-1013. [王涛,李东,彭晶晶,等. miR-375 调控 PDGFC 基因表达抑制肝癌血管生成[J]. 中国肿瘤临床,2017,44(20):1007-1013.]
- [5] Arnold D,Fuchs C,Tabernero J,et al. Meta-analysis of individual patient safety data from six randomized,placebo-controlled trials with the antiangiogenic VEGFR2-binding monoclonal antibody ramucirumab[J]. Ann Oncol, 2017,28(12):2932-2942.
- [6] Estevez-Garcia P,Castano A,Martin AC,et al. PDGFRalpha/beta and VEGFR2 polymorphisms in colorectal cancer:incidence and implications in clinical outcome [J]. BMC Cancer,2012,12:514.
- [7] Solini A,Simeon V,Derosa L,et al. Genetic interaction of P2X7 receptor and VEGFR-2 polymorphisms identifies a favorable prognostic profile in prostate cancer patients[J]. Oncotarget,2015,6(30):28743-28754.
- [8] Butkiewicz D,Krzesniak M,Drosik A,et al. The VEGFR2, COX-2 and MMP-2 polymorphisms are associated with clinical outcome of patients with inoperable non-small cell lung cancer[J]. Int J Cancer,2015,137(10):2332-2342.
- [9] Zheng YB,Huang JW,Zhan MX,et al. Genetic variants in the *KDR* gene is associated with the prognosis of transarterial chemoembolization treated hepatocellular carcinoma [J]. Tumour Biol,2014,35(11):11473-11481.
- [10] Dong G,Guo X,Fu X,et al. Potentially functional genetic variants in *KDR* gene as prognostic markers in patients with resected colorectal cancer [J]. Cancer Sci,2012,103 (3):561-568.
- [11] Pare-Brunet L,Sebio A,Salazar J,et al. Genetic variations in the VEGF pathway as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy[J]. Pharmacogenomics J,2015,15(5):397-404.
- [12] Jinesh GG,Manyam GC,Mmeje CO,et al. Surface PD-L1, E-cadherin,CD24,and VEGFR2 as markers of epithelial cancer stem cells associated with rapid tumorigenesis[J]. Sci Rep,2017,7(1):9602.