

## 比较基因组杂交技术分析晚期非小细胞 肺癌一线化疗耐药及疗效

胡 毅<sup>1</sup>, 高燕宁<sup>2</sup>, 冯奉仪<sup>3</sup>, 林冬梅<sup>4</sup>, 焦顺昌<sup>1</sup>

<sup>1</sup>解放军总医院肿瘤内科, 北京 100853

<sup>2</sup>中国医学科学院 北京协和医学院 肿瘤医院 肿瘤研究所病因与癌变实验室, 北京 100021

<sup>3</sup>中国医学科学院 北京协和医学院 肿瘤医院 肿瘤研究所内科, 北京 100021

<sup>4</sup>中国医学科学院 北京协和医学院 肿瘤医院 肿瘤研究所病理科, 北京 100021

通信作者: 焦顺昌 电话: 010-66939761, 电子邮件: jiaosc@vip.sina.com

**摘要:** **目的** 分析非小细胞肺癌 (NSCLC) 组织染色体片段的扩增与缺失, 揭示这些异常改变与 NSCLC 化疗疗效的关系。**方法** 从 NSCLC 患者石蜡包埋肿瘤组织中提取基因组 DNA, 以简并寡核苷酸引物 PCR 扩增并标记探针, 采用比较基因组杂交方法, 检测染色体片段的扩增和缺失, 分析其与 NSCLC 化疗疗效及其他临床资料的关系。**结果** 样品扩增占 96.12%, 缺失占 3.88%。扩增频率最高区段是 19p13.1-13.3 (15/34, 44.12%), 其次为 9q12-q22 (10/34, 29.41%)、22q12-q13 (10/34, 29.41%) 和 Xq (11/34, 32.35%); 化疗敏感者染色体区段变异总数为 188, 化疗抗拒者染色体区段变异总数为 452; 化疗敏感与化疗抗拒染色体变异数目差异具有统计学意义 ( $P = 0.005$ )。14p12-p13 和 19p 扩增与化疗敏感相关 ( $P < 0.01$ ); 1q12-q22 ( $P = 0.005$ )、10q25-q26 ( $P = 0.029$ )、5p15.1-p15.3 ( $P = 0.039$ )、19q13.2-13.4 ( $P = 0.029$ )、20p11.2-p12 ( $P = 0.039$ )、21q22 ( $P = 0.016$ ) 和 Xp21-p22.1 ( $P = 0.006$ ) 扩增与化疗抗拒密切相关。染色体异常改变与其他临床资料, 包括术后较早复发转移和初诊晚期、病理分型、年龄、性别、临床分期 (ⅢB 和Ⅳ期) 无相关性。**结论** 采用比较基因组杂交的方法检测特异性染色体区段的扩增与缺失与以铂类为主的一线化疗疗效关系密切, 有助于进一步确立与化疗敏感性相关的具体的功能基因, 预测临床化疗疗效, 实现个体化治疗。

**关键词:** 非小细胞肺癌; 染色体异常; 比较基因组杂交; 化疗抗拒; 化疗敏感

**中图分类号:** R730.53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-503X(2010)04-0389-05

**DOI:** 10.3881/j.issn.1000-503X.2010.04.006

### Analysis of First-line Chemoresistance and Prediction of Chemoresponse in Non-small Cell Lung Cancer by Comparative Genomic Hybridization

HU Yi<sup>1</sup>, GAO Yan-ning<sup>2</sup>, FENG Feng-yi<sup>3</sup>, LIN Dong-mei<sup>4</sup>, JIAO Shun-chang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Oncology, PLA General Hospital, Beijing 100853, China

<sup>2</sup>Department of Etiology and Canceration, Cancer Hospital (Institute), CAMS and PUMC, Beijing 100021, China

<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, Cancer Hospital (Institute), CAMS and PUMC, Beijing 100021, China

<sup>4</sup>Department of Pathology, Cancer Hospital (Institute), CAMS and PUMC, Beijing 100021, China

Corresponding author: JIAO Shun-chang Tel: 010-66939761, E-mail: jiaosc@vip.sina.com

**ABSTRACT: Objective** To explore the association between chromosomal disbalances and chemoresis-

tance/chemosensitivity in non-small cell lung cancer (NSCLC) using comparative genomic hybridization (CGH). **Methods** Genomic DNA samples were prepared from the tumor tissues in paraffin-embedded sections derived from 88 patients with advanced NSCLC (18 with chemosensitivity and 16 with chemoresistance). The DNAs were first amplified by a degenerate oligonucleotide prime-polymerase chain reaction protocol and then labeled with fluorescence as probes for CGH analyses. The correlations of the resulting chromosomal imbalances with the chemisensitivity and other pathological features of the patients were analyzed. **Results** A total of 640 abnormal chromosome regions including 96.12% gains and 3.88% losses were detected in 88 specimens. The results indicated that the most frequently gained chromosome regions were 19p13.1-13.3 (39/88, 44.12%), followed by 9q12-q22 (26/88, 29.41%), 22q12-q13 (26/88, 29.41%), and Xq (29/88, 32.35%). The total number of abnormal regions related with chemosensitivity was 188 (182 gains and 6 losses), while the number of the abnormal regions linked to the chemoresistance was 452 (431 gains and 21 losses) ( $P=0.005$ ). Gains of 14p12-p13 and 19p were significantly correlated with the chemosensitivity of the NSCLC ( $P=0.006$ ). Gains of 1q12-q22, 10q25-q26, 5p15.1-p15.3, 19q13.2-13.4, 20p11.2-p12, 21q22, and Xp21-p22.1 were also significantly correlated with the chemoresistance ( $P=0.005, 0.029, 0.039, 0.029, 0.039, 0.016, \text{ and } 0.006$ , respectively). No correlation between the chromosome abnormalities and other clinical features was observed. **Conclusions** The specific gains and losses of chromosome region is correlated with platinum-based first-line chemotherapy in NSCLC patients, as confirmed by CGH detection. This finding is useful for further identifying the chemosensitivity-related functional genes, predicting clinical effectiveness, and achieve individualized treatment in the future.

**Key words:** non-small cell lung cancer; chromosomal imbalances; comparative genomic hybridization; chemoresistance; chemosensitivity

*Acta Acad Med Sin*, 2010,32(4):389-393

肺癌已成为威胁人类健康和导致肿瘤特异性死亡的最主要原因之一,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)大约占有肺癌确诊患者的80%<sup>[1]</sup>,而其中约23%的患者可以仅依靠手术获得最大的生存受益,近80%的患者为局部晚期(ⅢA或ⅢB期)或已有远处播散(Ⅳ期)<sup>[1]</sup>,目前化疗依然在晚期NSCLC患者的治疗中占据主要地位。大多数对化疗敏感的患者可以获得生存的益处。晚期NSCLC一线标准用药是以铂类为主的联合三代化疗药物的两药联合方案,总有效率一般不超过40%<sup>[2]</sup>,一半以上的患者不能从一线的化疗中获益。研究提示NSCLC对化疗的敏感性绝非是单基因或某个蛋白组决定的,并且可能是由肿瘤患者本身内在的、固有的遗传学因素决定<sup>[3]</sup>。比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)技术通过观察NSCLC病理组织的染色体基因组的不平衡性,探索化疗敏感或抗拒相关的分子遗传学规律,以求能够对化疗抗拒做到临床预测,并进一步通过染色体变异的定位研究肿瘤耐药的机制,寻找更新的提高化疗疗效、克服耐药的分子靶点。

## 资料和方法

**资料** 收集中国医学科学院肿瘤医院及解放军总医院确诊为NSCLC患者的肿瘤石蜡包埋组织。标本采集要求:(1)病理确诊为NSCLC患者;(2)病期已晚(ⅢB或Ⅳ期),以化疗为初治手段或手术后3个月内即复发转移而行化疗;(3)采用的化疗方案为以铂类为主联合新药的两药联合方案,包括健择+顺铂,紫杉醇+卡铂及多烯紫杉醇+顺铂方案;(4)根据实体瘤疗效评价标准1.0及患者最终治疗结果,将治疗获得完全缓解、部分缓解者,定义为化疗敏感;将治疗无变化或肿瘤进展定义为化疗抗拒;(5)所获病理标本应保证足够的病理组织利于DNA提取;(6)病理切片厚度要求10 μm以上,保证可提取足量的DNA;(7)所有组织标本取自一线化疗前。

**病例资料:**入选患者88例,均经病理确诊。男性61例、女性27例;年龄42~75岁,中位年龄57岁;其中46例腺癌、21例鳞癌、13例腺鳞癌、5例

大细胞癌、2例细支气管肺泡癌、1例分化差的NSCLC；所选方案均为目前经典的一线含铂的联合三代化疗药物两药方案。临床ⅢB期38例、Ⅳ期21例、复发转移29例。

健康成人外周全血：选取我院健康成年男女志愿者各10例，抽取全血50 ml，分离淋巴细胞制备中期染色体片及提取DNA作为CGH实验正常对照。

**正常人外周血淋巴细胞中期染色体的制备** 无菌条件下抽取各组受试者外周血4 ml。立即置于RPMI 1640培养液中37℃恒温培养箱中培养6~9 h，加入秋水仙素液(10 μg/ml) 0.2 ml，继续培养2~3 h后将培养物吸入离心管内，1 000 r/min离心8 min，用吸管小心吸掉上清液。将预温37℃的低渗液(0.075 mol/L KCl溶液) 5 ml加入离心管中，混匀后放入37℃水浴锅中低渗处理25 min。取出离心管，加入1 ml新鲜固定液(甲醇:冰醋酸按3:1配制)，缓慢混匀，常规法置备染色体片。将标本片在1% Giemsa染液中染色10 min，自来水轻轻冲洗，空气干燥。显微镜下观察、照相、分析核型。将制备好的染色体切片浸于100%的乙醇中，按45℃→75℃→94℃→75℃→45℃顺序各12 s，完成染色体片老化。

#### 肺癌组织块CGH分析

石蜡包埋肺癌组织块基因组DNA的提取与鉴定：根据肺癌化疗敏感组和化疗抗拒组选择石蜡组织包埋块进行检测，提取基因组DNA。病理科专家复阅切片明确肿瘤并在显微镜下标记肿瘤组织切割范围。毛细玻璃管置于酒精灯火焰上小心抽拉，制作细针刀用于显微切割。显微镜下切割刮取标记的肿瘤组织。将刮取的带蜡屑的组织小心移入盛有50 μl二甲苯溶液的Eppandorff小管中，室温过夜。离心3 min，弃去上清，加入二甲苯混匀离心3 min×2次；弃上清，然后加入100%的乙醇离心2 min，弃上清；加入95%的乙醇离心2 min，弃上清；加入70%的乙醇离心2 min，弃上清；加入50%的乙醇离心2 min，弃上清；加入双蒸水离心2 min，弃上清。沉淀物室温下干燥30 min。加入相当于沉淀物体积5~10倍DNA提取液(蛋白酶K 20 mg/ml，10×PCR缓冲液加入使其终浓度为1×PCR)，65℃水浴3 h。95℃水浴5 min，缓慢冷却，使蛋白酶K失活。12 000 r/min离心3 min，吸取上清。沉淀物溶于100 μl双蒸水中装入另一清洁的1.5 ml Eppandoff小管中，-20℃贮存。依照QIAGEN试剂盒的操作程序，对DNA进行纯化。基因组DNA含量及纯度测定采用

紫外分光光度计检测吸光度值及琼脂糖凝胶电泳观察。

石蜡包埋肺癌组织块基因组CGH分析：参照DeVries法<sup>[4]</sup>，中期染色体载片已经过标准的细胞遗传学载玻片准备方法处理，染色体长度为400~550横纹，是使用核型正常的男性或女性志愿者的外周血淋巴细胞采用同步拦截法培养制备而成。

图象的获取：CGH图象经荧光显微镜获取，使用63倍物镜观察，运用Cytovision 2.7软件分析CGH图象。

CGH实验结果的判断标准和分析：图象的分析应用Leica Digital Image Analysis System的CGHcytovision 2.7分析软件(Q-FISH/Q-CGH Software Package, Leica Microsystems Imaging Solutions, Ltd. Cambridge, UK)。DNA拷贝数扩增或缺失的荧光强度阈值(肿瘤荧光强度/正常荧光强度)分别为大于1.20和小于0.80，确定两组(化疗敏感与抗拒)资料的差异表达。分析NSCLC化疗敏感与抗拒情况与特异性染色体DNA扩增、缺失的关系。

**统计学处理** 采用SPSS 10.0统计学软件处理，Fisher确切概率及t检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 结 果

**NSCLC患者病理组织染色体变异情况** 88例NSCLC病理组织进行CGH检测，其中7例未检测到明显的染色体变异，其他81例均有不同程度的扩增和缺失，共640处，其中扩增615处，占96.12%；缺失26处，占3.88%。扩增涉及全部24条染色体(包括XY染色体)，缺失主要表现在8条染色体上，分别为11q23、13p13、13q33-q34、14q31-q32、15q15-q21、18q22-q23、20q11.2-q13.1和Yq。总体上看，拷贝数增加的频率明显高于拷贝数减少的频率。在所检测的肿瘤组织中，扩增频率最高的是19p13.1-13.3(39/88, 44.12%)，其次为9q12-q22(26/88, 29.41%)、22q12-q13(26/88, 29.41%)、Xq(29/88, 32.35%)；另外较常见的扩增有1q12-q25(23/88, 26.47%)、4q32-q35、10q25-q26、14p12-p13、19q13.2-q13.4、20p、21p11.2-p13，扩增率为20.59%(18/88)；7q31-q36、11q24-q25、13q33-q34、16p13.2-p13.3、16q23-q24、20q13.2-q13.3、22p12-p13、Xp扩增率为17.65%(15/88)。

**染色体表达差异与临床特征相关性** 88例 NSCLC 检测标本中病理分型分布不平衡,病理分型及年龄、性别、临床分期染色体表达差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**初治化疗敏感性与染色体变异的关系** 化疗敏感者病例数 52 例,抗拒者病例数 36 例,两组病例年龄、性别、病理类型、临床分期等一般资料分布平衡或一致 ( $P = 0.437$ )。化疗敏感者变异总数为 188 个拷贝数 (扩增 182、缺失 6),化疗抗拒者变异总数为 452 个拷贝数 (扩增 431、缺失 21),化疗敏感与化疗抗拒两者染色体变异数目差异具有统计学意义 ( $P = 0.005$ )。

染色体多条区带的扩增与缺失差异与化疗疗效密切相关,其中 14p12-p13、19p 高表达与化疗敏感相关 ( $P < 0.01$ ); 1q12-q22、10q25-q26、5p15.1-p15.3、19q13.2-13.4、20p11.2-p12、21q22、Xp21-p22.1 扩增与化疗抗拒密切相关 ( $P < 0.05$ )。其中 19 号染色体为扩增频率最高的区域,短臂区及长臂区均有高频率的扩增区域。

## 讨 论

本研究 88 例 NSCLC 患者中仅 7 例未出现染色体变异,其他病理标本均可见到不同程度的染色体变异,而且变异涉及到所有 24 条染色体,绝大多数表现为染色体的扩增,缺失情况极少见。研究显示 DNA 扩增带来的基因剂量增加是基因表达上调的常见遗传机制,而且与肿瘤的侵袭性相关<sup>[5-6]</sup>。

文献显示总体拷贝数扩增明显多于拷贝数缺失<sup>[7-8]</sup>。本研究结果与文献报道相仿。孙崇秀等<sup>[9]</sup>研究显示更多的缺失区域,本研究未得出同样的结果,可能与本研究入选病例均为晚期、复发转移的患者,肿瘤增殖活跃,癌基因呈现高表达状态有关<sup>[10]</sup>。

本研究未发现与病理类型相关的特征性染色体变异。研究提示年龄、性别、临床分期与染色体变异无显著相关性,对于特异的染色体改变与上述临床一般资料的关系,各家报道不一,多数结果显示差异无统计学意义,提示染色体变异是患者内在的遗传学因素。

研究显示化疗敏感者与化疗抗拒者在染色体变异程度上(染色体扩增与缺失数目)差异具有统计学意义。Struski 等<sup>[11]</sup>在耐药的人卵巢癌细胞株中发现染色体扩增数目明显多于药物敏感的细胞株。本

研究提示化疗耐药者染色体变异数目明显增多的原因可能是耐药基因位点具有多重性和多样性特点,而且耐药者癌基因拷贝数明显扩增,肿瘤增殖活跃,最终引起化疗失败,肿瘤进展。

本研究提示 19p、14p12-p13 的扩增与化疗敏感密切相关。其中位于 19p 区域的与化疗敏感性相关基因为目前研究的热点,包括表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂的作用位点表皮生长因子受体的细胞膜内酪氨酸激酶的功能基因位点。

本研究 19q13.2-13.4、1q12-q22 等区段扩增与化疗抗拒密切相关。染色体 19q13.2-13.4 是本研究与化疗抗拒有关的最高频率扩增的区段,该区域是目前研究与铂类耐药关系最为密切的染色体区带。铂类药物杀伤肿瘤的细胞毒作用机制是与 DNA 形成加合物从而抑制 DNA 的复制合成,而 DNA 可通过损伤修复机制移除加合物最终造成对铂类耐药。这种损伤修复机制中最关键的途径是核苷酸剪切修复<sup>[12-13]</sup>。近年研究表明切除修复交叉互补基因、DNA 修复蛋白 O6-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶、脱嘌呤/嘧啶核酸内切酶、人类 X 射线损伤修复交叉互补基因 1 等是 NER 作用的关键基因,这些基因多数定位在 19q13.2-13.4 区域,该区域的这些功能基因扩增与化疗药物铂类的疗效及放射治疗的疗效高度相关,同时与肺癌发生的高风险密切相关<sup>[14-18]</sup>。

DNA 修复蛋白 O6-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶基因位于染色体 10q26 区域,是 O<sup>6</sup>-烷基鸟嘌呤-甲基转移酶的编码基因。多数耐药肿瘤细胞都有该基因的过度表达<sup>[16]</sup>。编码增殖细胞核抗原的基因定位于染色体 20pter-p12 区域,与铂类耐药关系密切<sup>[18]</sup>。

综上,本研究提示特异性染色体区段的扩增与缺失与化疗疗效关系密切,这些区域的判定对进一步明确功能基因的定位发挥了重要作用,使全基因组芯片的筛选更有方向性,并最终确立与化疗敏感性相关的具体的功能基因,为临床预测疗效,寻找治疗靶点,改变治疗现状提供更多的参考信息。

## 参 考 文 献

- [1] Greenlee RT, Murray T, Bolden S, *et al.* Cancer statistics, 2000 [J]. CA Cancer J Clin, 2000, 50(1):7-33.
- [2] 胡毅,冯奉仪. 非小细胞肺癌的化疗研究现状及展望 [J]. 国外医学肿瘤学分册, 2002, 29(3):197-201.
- [3] Gariboldi MB, Ravizza R, Riganti L, *et al.* Molecular determinants of intrinsic resistance to doxorubicin in human

- cancer cell lines [J]. *Int J Oncol*, 2003, 22(5):1057-1064.
- [4] DeVries S, Gray JW, Pinkel D, *et al.* Comparative genomic hybridization [M]. San Francisco, USA : University of California at San Francisco, 2001: 81-85.
- [5] Bishop JM. The molecular genetics of cancer [J]. *Science*, 1987, 235(4786):305-311.
- [6] Tsongalis GJ, Cartun RW, Ricci A Jr. Gene amplification as means for determining therapeutic strategies in human cancers [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2000, 38(9):837-839.
- [7] Sy SM, Wong N, Lee TW, *et al.* Distinct patterns of genetic alterations in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung [J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40(7):1082-1094.
- [8] Wong MP, Fung LF, Wang E, *et al.* Chromosomal aberrations of primary lung adenocarcinomas in nonsmokers [J]. *Cancer*, 2003, 97(5):1263-1270.
- [9] 孙崇秀, 单祥年, 宗卉, 等. 17例原发性非小细胞肺癌的比较基因组杂交研究 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2002, 19(5):438-439.
- [10] Luk C, Tsao MS, Bayani J, *et al.* Molecular cytogenetic analysis of non-small cell lung carcinoma by spectral karyotyping and comparative genomic hybridization [J]. *Ca Genet Cytogenet*, 2001, 125(2):87-99.
- [11] Struski S, Doco-Fenzy M, Koehler M, *et al.* Cytogenetic evolution of human ovarian cell lines associated with chemoresistance and loss of tumorigenicity [J]. *Anal Cell Pathol*, 2003, 25(3):115-122.
- [12] Rosell R, Taron M, Ariza A, *et al.* Molecular predictors of response to chemotherapy in lung cancer [J]. *Semin Oncol*, 2004, 31(1 Suppl 1):20-27.
- [13] Rosell R, Taron M, Alberola V, *et al.* Genetic testing for chemotherapy in non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2003, 41(Suppl 1):S97-S102.
- [14] Li XQ, Li J, Shi SB, *et al.* Expression of MRP1, BCRP, LRP and ERCC1 as prognostic factors in non-small cell lung cancer patients receiving postoperative cisplatin-based chemotherapy [J]. *Int J Biol Markers*, 2009, 24(4):230-237.
- [15] Jones MB, Michener CM, Blanchette JO, *et al.* The granulins-epithelin precursor/PC-cell-derived growth factor is a growth factor for epithelial ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(1):44-51.
- [16] Rosell R, Lord RV, Taron M, *et al.* DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2002, 38(3):217-227.
- [17] Thompson LH. Properties and applications of human DNA repair genes [J]. *Mutat Res*, 1991, 247(2):213-219.
- [18] Vogel U, Laros I, Jacobsen NR, *et al.* Two regions in chromosome 19q13.2-3 are associated with risk of lung cancer [J]. *Mutat Res*, 2004, 546(1-2):65-74.

(收稿日期: 2010-05-04)