

胸苷磷酸化酶 rs11479 位点多态性对术后结直肠癌患者接受卡培他滨为基础辅助化疗疗效的影响

张胜威, 邓业巍, 李晓洁

(郑州人民医院, 河南 郑州 450000)

摘要: [目的] 探讨胸苷磷酸化酶(Thymidine Phosphorylase, TYMP)的基因变异对术后结直肠癌(colorectal cancer, CRC)患者接受辅助化疗疗效的影响。[方法] 纳入 198 例术后接受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进行 TYMP 基因 rs11479 分型及 TYMP 基因表达测定。Rs11479 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 TYMP mRNA 表达通过非参数检验分析, 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] TYMP 基因 rs11479 位点在 CRC 患者中的突变频率为: CC 型 126 例(63.64%), CT 型 61 例(30.81%), TT 型 11 例(5.55%), 最小等位基因频率为 0.21, 三种基因型分布频率符合哈迪温伯格平衡($P=0.323$)。在预后比较上, 将 CT 型和 TT 型患者合并, 单变量的生存分析结果显示: 野生型的 CC 型患者无复发生存(DFS)显著低于携带突变基因的 CT 型和 TT 型患者($P=0.002$)。经多变量 Cox 模型校正之后发现 CC 基因型患者的预后影响意义依然存在($P=0.012$)。87 例癌组织标本的 mRNA 表达分析中发现, 突变的 CT 或 TT 型患者相对于野生型的 CC 型患者, 癌组织中 TYMP 的 mRNA 表达明显较高($P=0.019$)。[结论] 在结直肠癌患者中, TYMP 基因 rs11479 位点可能通过影响 TYMP 基因 mRNA 的表达从而使更多的卡培他滨代谢为 5-Fu 进而使 CRC 患者从卡培他滨的治疗中获益。

关键词: 结直肠肿瘤; 胸苷磷酸化酶; 卡培他滨; 多态性

中图分类号: R735.3*5; R735.3*7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)04-0305-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.04.B004

Association between Thymidine Phosphorylase Polymorphism and Clinical Outcomes of Postoperative Colorectal Cancer Patients with Capecitabine Based Adjuvant Chemotherapy

ZHANG Sheng-wei, DENG Ye-wei, LI Xiao-jie

(Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the association between Thymidine Phosphorylase (TYMP) polymorphism and clinical outcomes of postoperative colorectal cancer (CRC) patients treated with capecitabine based adjuvant chemotherapy. [Methods] One hundred and ninety-eight patients with colorectal cancer, who underwent surgical treatment and received postoperative capecitabine based adjuvant chemotherapy, were enrolled in the study. Peripheral blood and cancer tissue specimen were collected for TYMP rs11479 genotyping and TYMP mRNA expression detecting, respectively. The correlation of rs11479 genotypes and other variables was analyzed by logistic regression model. The expression of TYMP in different genotypes was analyzed by non-parametric test. The survival of patients was analyzed with Kaplan-Meier method, the association between TYMP genotypes and survival of patients was examined with univariate and multivariate Cox regression analysis. [Results] The prevalence of TYMP rs11479 genotype CC was 63.64%(126/198), genotype CT was 30.81%(61/198), genotype TT was 5.55%(11/198). The minor allele frequency of rs11479 was 0.21, the distribution of three genotypes was in accordance with Hardy-Weinberg Equilibrium ($P=0.323$). There were no statistical differences in the distribution of the genotypes in baseline clinical data. The disease-free survival (DFS) of patients with wild genotype CC was significantly lower than that of those with CT and TT genotypes($P=0.002$). Multivariate Cox regression analysis showed that CC genotype was an independent factor for poor DFS ($P=0.012$). The expression of TYMP mRNA in cancer tissues of the patients with CT or TT genotypes was significantly higher than that of CC genotype patients ($P=0.019$). [Conclusion] TYMP gene expression may be affected by the rs11479 polymorphism, which might be associated with the efficacy of capecitabine based adjuvant chemotherapy in postoperative CRC patients.

Subject words: colorectal cancer; thymidine phosphorylase; capecitabine; polymorphism

通信作者: 邓业巍, 主任医师, 学士; 郑州人民医院肛肠外科, 河南省郑州市

金水区黄河路 33 号(450000); E-mail: dengyw93@163.com

收稿日期: 2018-03-01; **修回日期:** 2018-06-21

结肠癌(colorectal cancer,CRC)在我国每年新发病例为37.5万,每年死亡病例为19.1万^[1]。近年来,随着大肠癌领域分子分型的进一步深入,越来越多的不同作用靶点的药物给大肠癌患者带来了不同的治疗选择,从而为患者带来了更多的生存获益^[2]。在辅助化疗领域,基于对IDEA研究的认可,2018年第1版NCCN指南对于低危的Ⅲ期结肠癌推荐3个月的XELOX辅助化疗方案,该方案经过Ⅲ期临床研究证实疗效不劣于5-Fu为基础的方案^[3]。XELOX方案在临床应用过程中化疗疗效有较大的个体差异,部分患者也会出现耐药的情况。因此,尚需要进一步研究其敏感人群。

卡培他滨代谢中最关键的一步为胸苷磷酸化酶(thymidine phosphorylase,TYMP)的代谢^[4],此过程将卡培他滨转化为具有细胞毒作用的5-Fu,因此TYMP酶对于卡培他滨疗效的发挥具有至关重要的作用。另一方面,研究表明,TYMP酶在肿瘤细胞内和血小板衍生内皮细胞生长因子结构非常相似,具有促进肿瘤血管新生和转移的重要作用^[5]。研究也发现在不同的肿瘤中TYMP均高表达^[6]。因此,人体内的TYMP扮演着双重角色,其表达水平对于CRC患者是否具有积极的治疗意义值得探讨。

TYMP基因位于染色体22q13.33,包含10个外显子。作为内皮细胞血管生长因子家族的一员,TYMP基因在中国人群并不保守,在不同个体中TYMP的表达也呈现较大的个体差异^[4]。Huang等^[7]的研究探讨了在晚期胃肠道肿瘤中TYMP基因多态性位点rs11479的临床意义,结果表明,在晚期胃肠道肿瘤中,携带T等位基因的患者TYMP基因的表达水平较高。

因此,本研究旨在评估TYMP基因rs11479位点对接受卡培他滨为基础辅助化疗CRC患者无复发生存期的影响,另外探讨该位点和化疗前结肠癌组织中TYMP基因表达的关联性。

1 材料与方法

1.1 实验设计及入组患者资料

本研究为回顾性分析,入组2010年1月至2016年12月在郑州人民医院肛肠外科接受手术切除治疗的CRC患者198例。入组标准:(1)年龄≥18岁,ECOG评分0~2分,心功能正常(左心室射血分数>50%),肾功能正常(肌酐≤1.5 X ULN),骨髓功能正常(中性粒细胞计数≥1.5×10⁹/L,血小板计数≥100×10⁹/L,血红蛋白≥9g/dl);(2)预期寿命至少3个月。排除标准:家族性腺瘤性息肉病;其他遗传性CRC综合症;失访患者。

辅助化疗:术后3~4周,卡培他滨,1000mg/m²,每天2次,第1~14d,每21d为1个周期。奥沙利铂,80~130mg/m²,静脉滴注,第1d。辅助化疗结合患者情况6~8个周期。根据治疗过程中出现的血液学或者非血液学毒性调整相应的给药剂量,一旦发生可能威胁生命的毒性反应时中止治疗。本研究得到郑州人民医院伦理委员会的批准,入组的患者均签署知情同意书。

入组的198例患者基线临床资料见Table 1,中位年龄53岁,男性126例(63.64%);结肠和直肠癌

Table 1 Comparison of baseline characteristics of 198 CRC patients according to rs11479 genotype status

Characteristics	Total (N=198,%)	Rs11479 genotypes(%)		χ ²	P
		CC (n=126)	CT/TT(n=72)		
Age(years)	53(23~75)	53(25~75)	52(23~75)	-	0.815
Gender					
Male	126(63.64)	78(61.90)	48(66.67)	0.449	0.503
Female	72(36.36)	48(38.10)	24(33.33)		
Tumor location					
Colon cancer	122(61.62)	73(57.94)	49(68.06)	1.984	0.159
Rectal cancer	76(38.38)	53(42.06)	23(31.94)		
Tumor differentiation					
Well	41(20.71)	26(20.63)	15(20.83)	0.015	0.904
Intermediate	135(68.18)	87(69.04)	48(66.67)		
Poor	14(7.07)	9(7.13)	5(6.93)		
Not available	8(4.04)	4(3.17)	4(5.55)		
Staging					
II	53(26.77)	35(27.78)	18(25.00)	0.156	0.693
III	135(68.18)	85(67.46)	50(69.44)		
IV	10(5.05)	6(4.76)	4(5.56)		
Adjuvant chemotherapy					
Capecitabine	65(32.83)	41(32.54)	24(33.33)	0.013	0.909
Oxaliplatin+capecitabine	133(67.17)	85(67.46)	48(66.67)		

分别为 122 和 76 例, 肿瘤分化中等 135 例 (68.18%)。临床分期, II 期患者 53 例, III 期 135 例, IV 期 10 例。结肠癌患者 122 例 (61.62%), 其中, 45 例右半结肠, 12 例横结肠, 65 例左半结肠; 直肠癌患者 76 例 (38.38%)。

辅助化疗情况: 所有患者均接受术后辅助化疗, 其中 XELOX 方案 (卡培他滨联合奥沙利铂) 方案 133 例 (67.17%), 卡培他滨单药方案 65 例 (32.83%)。

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 4ml, 用苯酚氯仿法提取基因组 DNA, 之后于 -80℃ 保存。采用 real-time PCR 技术方法对 *TYMP* 基因 rs11479 位点进行基因分型。每个 PCR 反应体系中用标准的溶液配比进行。等位基因分型采用 Fast ABI-7500 (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Foster City, CA, 美国) 进行, 按照说明书的标准操作步骤对每个样本进行基因分型。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没有被污染, 部分样本的分型结果通过酶切的方法进行验证。

1.3 组织样本收集及 *TYMP* 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, 最终纳入研究共 87 例组织标本, 液氮保存。之后用 Trizol 试剂进行 RNA 提取, 用上海罗氏 real-time PCR 仪器进行 *TYMP* mRNA 表达实验, GAPDH mRNA 表达用作内参。 *TYMP* mRNA 用相对定量法 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算^[8]。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 统计分析软件进行 (IBM, Armonk, NY) 数据分析。 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 rs11479 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 rs11479 位点不同基因型的分析采用非参检验的 Mann-Whitney U (两组间) 或 Kruskal-Wallis H (多组间) 检验。绘制 Kaplan-Meier 曲线比较不同基因型患者无复发生存期 (DFS) 的差异, 差异采用对数秩检验进行比较。DFS 的计算为从开始手术时间到患者出现疾病复发或者任何原因出现的死亡或最后一次随访时间。多变量分析时, 对 DFS 构建采用 Cox 风险比例模型, 采用向后 LR 的选择步骤筛选和校正潜在

的混杂变量。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Rs11479 位点基因分型情况

Rs11479 位点的基因分型结果为: 野生 CC 型 126 例 (63.64%), CT 型 61 例 (30.81%), TT 型 11 例 (5.55%), 最小等位基因频率为 0.21, 三种基因型分布频率符合哈迪温伯格平衡 ($P = 0.323$)。考虑到突变纯合子 TT 型患者相对较少, 后期分析中, 将 CT 和 TT 型患者合并。如 Table 1 所示, 该位点不同基因型在基线临床资料中的分布基本均衡, 这为预后差异的比较奠定了均衡性的基础。

2.2 *TYMP* 基因 rs11479 位点对预后的影响

将 CT 和 TT 型患者合并, 共计 72 例。在针对 DFS 的单变量分析当中, 如 Figure 1 所示, 野生型 CC 和突变型 CT 及 TT 型两组患者在 DFS 上差异有统计学意义, 野生型 CC 型的患者相对于 CT 和 TT 型的患者具有显著较差的 DFS ($P = 0.002$)。另外, 本研究构建了 Cox 风险比例模型, 将可能影响 DFS 的风险因素如年龄、性别、肿瘤分化、病理分期以及 rs11479 位点纳入该模型。经过多变量校正 rs11479 位点对 OS 独立的影响意义依然存在, 差异有统计学意义 ($OR = 0.64, P = 0.012$), 其他有意义的变量为年龄 ($P = 0.005$)、病理分期 ($P < 0.001$)。见 Table 2。

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

Characteristics	OR(95%CI)	df	P
Age(years)			
<53	1 (reference)	1	0.005
≥53	1.51(0.91~2.54)		
Pathological staging			
II	1 (reference)	1	<0.001
III	1.77(1.10~2.35)		
Rs11479			
CC genotypes	1 (reference)	1	0.012
CT/TT genotypes	0.64(0.23~0.96)		
Gender			
Male	1 (reference)	1	0.887
Female	0.998(0.997~1.003)		
Tumor differentiation			
Well	1 (reference)	1	0.213
Intermediate	1.13(1.07~1.17)		

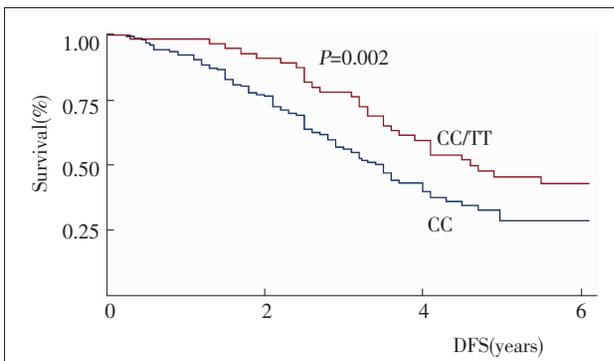


Figure 1 Disease free survival of the 198 CRC patients according to *TYMP* rs11479 status

2.3 *TYMP* 基因 rs11479 位点对 *TYMP* 基因 mRNA 表达的影响

本研究纳入了 87 例术后切除的癌组织标本,通过提取的 RNA 对 *TYMP* 的表达情况进行分析。87 例癌组织标本中,CC 型 55 例,CT 型 27 例,TT 型 5 例,三种基因型分布频率符合哈迪温伯格平衡($P=0.495$)。TT 型患者相对较少,同样将 TT 型和 CT 型患者合并,共计 32 例。野生型 CC 型相对于突变型 CT 和 TT 型患者,*TYMP* mRNA 表达水平明显较低,差异有统计学意义($P=0.019$)。见 Figure 2。

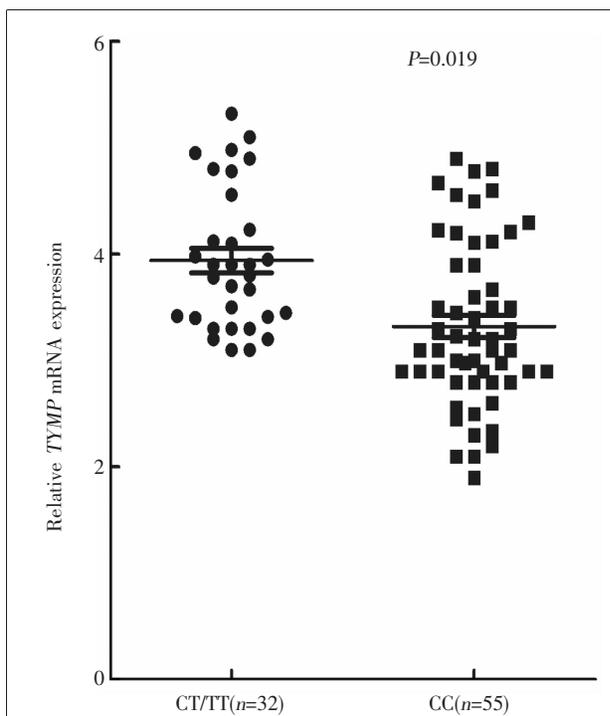


Figure 2 Relative *TYMP* mRNA expression according to *TYMP* rs11479 status

3 讨论

本研究通过对 *TYMP* 基因 rs11479 位点基因分型进而和患者的预后进行相关性分析,发现该位点野生型 CC 基因型患者相对于携带 T 等位基因的 CT 和 TT 基因型患者来说具有显著较差的 DFS,并通过 87 例组织标本的 *TYMP* 基因 mRNA 表达水平分析发现该位点不同的基因型患者的 mRNA 表达水平呈现较大的差异。Rs11479 位点可能通过影响 *TYMP* 基因的表达进而将更多的卡培他滨代谢为 5-Fu 从而使 CRC 患者更能从卡培他滨为基础的辅助化疗中获益。

结直肠癌是异质性很强的恶性肿瘤,具有不同的分子生物学亚型,在治疗反应和预后上也有较大的个体差异^[9]。现有大量可以预测结直肠癌疗效的生物标志物的研究成果:2015 年报道的 *CYP3A5* 多态性对 FOLFIRI 治疗结果的影响^[10];2017 年报道的四氢叶酸转移酶 *MTHFR* 多态性对 5-Fu 疗效的影响^[11];2016 年报道的胸苷酸合成酶 TS 多态性对结肠癌一线 5-Fu 放疗疗效的影响^[12]。

我们的研究首次报道了在中国 CRC 患者接受卡培他滨为基础的辅助化疗方案时,*TYMP* 基因 rs11479 位点的 T 等位基因携带者可同通过影响该基因的表达,从而使得该基因型患者对卡培他滨更为敏感,进而从卡培他滨的辅助化疗当中获益。我们的研究结果和先前 Huang 等^[7]的研究结果基本一致,他们的研究纳入晚期的胃肠道肿瘤患者,结果表明 rs11479 位点的 T 等位基因携带者和较高的 *TYMP* 基因表达水平有关,这和我们的研究当中 CT/TT 型患者的 *TYMP* mRNA 表达水平较高一致。然而,可能由于样本量较少,他们的研究并没有发现该位点和 OS 的明显相关性。另外,Jennings 等^[13]的研究结果发现 rs11479 位点的 T 等位基因携带者和接受卡培他滨治疗的 CRC 患者的较多的毒副作用有关,这也部分和我们的研究结果相似,都表明 rs11479 位点的 T 等位基因携带者对卡培他滨可能更为敏感。另一方面,在 *TYMP* 基因表达水平和 CRC 预后的关系上,目前的研究尚存在较大的争议。我们的研究表明 *TYMP* 基因 mRNA 高表达的人群更能从卡培他滨的治疗中获益,从而具有较好的预后,这和先前 Lu 等^[14]的研究结果一致。他们的研

究纳入了 57 例 1 线接受卡培他滨联合紫杉醇治疗的晚期胃癌患者,分析了胸苷磷酸化酶 mRNA 的表达水平和治疗的反应率以及 OS 的关系,发现高表达的人群反应率较高,OS 较好。然而,另一方面也有研究发现, *TYMP* 基因是促进肿瘤血管新生的重要因子,因此该基因高表达时通常伴随了较高的肿瘤负荷,从而肿瘤更易复发和转移,进而预后更差^[15]。但是这些研究当中并没有观察卡培他滨的治疗情况。*TYMP* 基因在体内具有双重作用,一方面通过刺激肿瘤细胞血管新生促进肿瘤生长,另一方面,该基因是卡培他滨的重要代谢基因,是 5-Fu 类化疗药物发挥细胞毒作用的关键基因从而具有杀灭肿瘤细胞的作用。

本研究采用血液当中提取的 DNA 来进行基因分型,因为多态性位点属于生殖细胞系突变所以血液样本即可进行检测,而且由于样本容易获取后期也便于临床推广。总之,本研究发现了在中国 CRC 人群当中 *TYMP* 基因 rs11479 位点是一个独立的 DFS 影响因素。本研究也有一定局限性,首先纳入研究的样本量不大,没有在大样本当中评估该位点的预后指导意义。另外,本研究为回顾性分析,无法避免偏倚。不过本研究还是比较充分地对比 rs11479 位点的预后影响意义进行了评估,同时也从 *TYMP* 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 患者预后的指导有一定意义。

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] Pan XF,Fan NJ,Gao CF. Advances in the diagnosis and treatment of LncRNA and colorectal cancer [J]. Journal of Chinese Oncology,2017,23 (2):111-115.[潘雪峰, 范乃军, 高春芳. LncRNA 与结直肠癌诊断治疗的研究进展 [J]. 肿瘤学杂志,2017,23(2):111-115.]
- [3] McQuade RM,Stojanovska V,Bornstein JC,et al. Colorectal cancer chemotherapy:the evolution of treatment and new approaches[J]. Curr Med Chem,2017,24(15):1537-1557.
- [4] Lam SW,Guchelaar HJ,Boven E.The role of pharmacogenetics in capecitabine efficacy and toxicity [J]. Cancer Treat Rev,2016,50:9-22.
- [5] Elamin YY,Rafee S,Osman N,et al. Thymidine phosphorylase in cancer;enemy or friend?[J]. Cancer Microenviron,2016,9(1):33-43.
- [6] Zhang Q,Zhang Y,Hu X,et al. Thymidine phosphorylase promotes metastasis and serves as a marker of poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Lab Invest,2017,97(8):903-912.
- [7] Huang L,Chen F,Chen Y,et al. Thymidine phosphorylase gene variant,platelet counts and survival in gastrointestinal cancer patients treated by fluoropyrimidines [J]. Sci Rep,2014,4:5697.
- [8] Freitag D,Koch A,Lawson McLean A,et al. Validation of reference genes for expression studies in human meningiomas under different experimental settings[J]. Mol Neurobiol,2018,55(7):5787-5797.
- [9] Shaikh T,Handorf EA,Meyer JE,et al. Mismatch repair deficiency testing in patients with colorectal cancer and nonadherence to testing guidelines in young adults[J]. JAMA Oncol,2018,4(2):e173580.
- [10] Dong N,Meng F,Wu Y,et al. Genetic polymorphisms in cytochrome P450 and clinical outcomes of FOLFIRI chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer [J]. Tumour Biol,2015,36(10):7691-7698.
- [11] Yeh CC,Lai CY,Chang SN,et al. Polymorphisms of MTHFR C677T and A1298C associated with survival in patients with colorectal cancer treated with 5-fluorouracil-based chemotherapy [J]. Int J Clin Oncol,2017,22 (3):484-493.
- [12] Patricia Rios-Ibarra C,Janeth Rodriguez-Silva C,Alonso Lopez-Chuken Y,et al. Thymidylate synthase polymorphism in Mexican patients with colon cancer treated with 5-fluorouracil[J]. J Buon,2016,21(4):935-940.
- [13] Jennings BA,Loke YK,Skinner J,et al. Evaluating predictive pharmacogenetic signatures of adverse events in colorectal cancer patients treated with fluoropyrimidines [J]. PLoS One,2013,8(10):e78053.
- [14] Lu M,Gao J,Wang XC,et al. Expressions of thymidylate synthase,thymidine phosphorylase,class III beta-tubulin, and excision repair cross-complementing group I predict response in advanced gastric cancer patients receiving capecitabine plus paclitaxel or cisplatin[J]. Chin J Cancer Res,2011,23(4):288-294.
- [15] Huang X,Wang L,Chen Y,et al. Poor prognosis associated with high levels of thymidine phosphorylase and thrombocytosis in patients with renal cell carcinoma [J]. Urol Int,2017,98(2):162-168.