

LIG4 及 HSPB1 基因单核苷酸多态性与 肺癌放射性肺损伤的相关性研究

刘丹¹ 孙成英¹ 赵玉霞¹ 白露²

¹ (中国医科大学附属第四医院肿瘤放射治疗科 沈阳 110032)

² (中国医科大学附属第一医院肿瘤放射治疗科 沈阳 110001)

摘要 对辽宁地区 170 例临床确诊不可手术的肺癌接受放疗者放疗中及放疗后评价放射性肺炎发生情况。170 例患者中, 非小细胞肺癌(NSCLC)112 例, 小细胞肺癌(SCLC)58 例, 33 例发生 2 级以上的放射性肺炎(19.4%)。其中 2 级 21 例, 3 级 9 例, 4 级 1 例, 5 级 2 例。男性 26 例(78.8%), 女性 7 例(21.2%)。采用外周血标本酚-氯仿法提取 DNA, Taqman real-time PCR 方法进行单核苷酸多态性的基因分型。应用 SPSS 13.0 软件进行数据整理分析, $p < 0.05$ 时认为有统计学显著性差异。以 χ^2 检验比较人口学特征、相关危险因素暴露及 SNPs 基因型在组间分布的差异; 以 logistic 回归计算比值比(Odds ratio, OR)及 95%可信区间(Confidence interval, CI)表示相对危险度。结果显示, 全组一般状况和接受治疗情况均与放射性肺炎的发生无显著关联($p > 0.05$)。LIG4rs1805388 与 HSPB1rs2868371 基因型分布频率在未发生放射性肺炎组和发生放射性肺炎组间分布无明显差异($p > 0.05$), 表明 LIG4rs1805388 与 HSPB1rs2868371 位点基因单核苷酸多态性与肺癌放射性肺损伤无关。

关键词 肺癌, 单核苷酸多态性, 放射性肺损伤, LIG4, HSPB1

中图分类号 R734.2

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2015.rj.33.020204

肺癌的发病率逐年上升, 已成为全世界发病率和死亡率首位的恶性肿瘤^[1]。恶性肿瘤的综合治疗以手术、放疗、化疗及生物治疗为主要手段。随着放疗在临床中的不断应用, 放射线引起的正常组织损伤也引起广泛关注。放射性肺损伤是胸部肿瘤放射治疗后常见的并发症, 同步放化疗时发生率为 7%–39%^[2-3], 是严重制约胸部恶性肿瘤的疗效提高和影响患者生存和生活质量的重要因素。临床观察到, 即使年龄、营养状态及放射物理等因素相近的患者放疗后正常组织放射性损伤的差别也很大, 可见对正常组织放射性损伤起到更深刻作用的是个体放射生物学的差异。基因的差异可能决定了个体放射生物学的差异。

电离辐射引起的 DNA 损伤的修复主要由 DNA 双链断裂修复通路参与^[4]。研究发现 LIG4 (DNA 连接酶 4) 是 DNA 双链断裂修复通路中一个重要的

修复因子^[5-6]。热休克蛋白 B1(Heat shock protein B1, HSPB1)在 DNA 修复方面起着重要的作用^[7]。两项以白种人为主的研究^[8-9]显示, HSPB1 基因 rs2868371 位点的 CC 基因型, LIG4rs1805388T 等位基因增加放射性肺炎发生危险。

本研究拟探讨 HSPB1 及 LIG4 基因单核苷酸多态性与中国人群肺癌放射性肺损伤的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 入组标准

2009 年 9 月至 2011 年 12 月, 选取辽宁地区 170 例临床确诊(组织学或病理)不可手术的接受放疗的肺癌患者, 预计生存期 > 6 个月, KPS (Karnofsky, 卡氏) 评分 > 60。排除标准: 既往接受胸部放射治

基金资助: 辽宁省科技厅科学计划项目(011225019)、市社会发展科技攻关项目(12-193-9-40)中国医科大学附属第四医院青年创新发展计划基金资助

第一作者: 刘丹, 女, 1979 年 7 月出生, 2003 年毕业于中国医科大学临床医学, 现为中国医科大学附属第四医院放疗科主治医师, E-mail: unbbuem@163.com

通讯作者: 赵玉霞, 博士, 教授, E-mail: zyx_yd@163.com

收稿日期: 初稿 2014-11-10; 修回 2014-12-27

疗史,肺部手术者,严重慢性支气管炎、肺气肿、肺心病,FEVI (Forced expiratory volume in one second,一秒用力呼气容积)<预计值 60%,或其他严重疾病,如 6 个月内发生过心肌梗塞者等。

1.1.2 参数选择

临床计数参数包括性别、病理类型、吸烟史、临床分期和治疗模式(单纯放疗,同步化疗或序贯化疗)。临床计量和 DVH (Dose volume histogram 剂量体积直方图) 计量参数包括年龄、肿瘤靶体积(GTV)和双肺 V20。

1.2 治疗

1.2.1 放射治疗

患者仰卧于真空垫上,抽成真空定型后,体模固定,并在体模上做好标记。由螺旋 CT(Toshiba, Japan) 以 5 mm 层厚连续扫描病变区域。将 CT 扫描信息传输到三维治疗计划系统(Pinnacle³, ADAC) 上,由 2 名医师勾画靶区及危及器官。在纵膈窗勾画靶区,影像所见肿瘤体积(GTV)包括原发病灶和纵膈内短径>1 cm 的淋巴结。计划靶体积(PTV)在 GTV 基础上外扩 1-1.5 cm。采用 5 个共面或非共面适形照射野,用剂量体积直方图(DVH)和等剂量曲线评价治疗计划,控制脊髓等危及器官的受照剂量。治疗前经医师、物理师和技师核对计划无误后,采用 SIMENS 公司 PRJMUS 直线加速器行等中心三维适形放射治疗。以 90% 的等剂量曲线为处方剂量线,6 MV X-射线,治疗总剂量范围在 50-60 Gy,每日 1 次,每周 6 次。并从计划系统中得出 GTV 和 V20。V20 为肺组织在达到 20 Gy 的体积占全肺体积的百分数。

1.2.2 化疗

170 例放疗患者中,35 例患者接受单独放疗。135 例接受化疗,其中 23 例行同步放化疗,化疗方案为以铂类为基础的两药联合化疗,21 d 一个疗程,放疗期间行 2 周期化疗。112 例患者行序贯化疗,化疗方案同样为以铂类为基础的两药联合化疗。

1.3 肺损伤评价

肺损伤评价按 RTOG 急性放射性肺炎标准评价。0 级:症状体征同疗前;1 级:轻微的干咳或用力时呼吸困难;2 级:持续性咳嗽,需要麻醉性镇咳药,轻微用力时呼吸困难;3 级:严重咳嗽,麻

醉性镇咳药无效,安静时呼吸困难,间断吸氧或激素治疗;4 级:呼吸功能不全,持续吸氧或辅助通气;5 级:因放射性肺炎死亡。放射性肺炎诊断时必须排除肺内感染及肺内病变进展且相关症状分级至少较疗前增加 1 级。诊断由两位中高级放射治疗专业医师共同完成。观察终点:≥2 级放射性肺炎。

1.4 主要试剂和仪器

红细胞裂解液(3.85 g NH₄CL+0.42 g NaHCO₃ 加双蒸水至 500 mL);核悬浮液(75 mmol/L NaCl、24 mmol/L pH=8.0 EDTA);TE 缓冲液(10 mmol/L pH=7.5 Tris-HCl、1 mmol/L pH=8.0 EDTA);PCR Taqman 探针及引物(美国应用生物系统公司);Taqman Master Mix(美国应用生物系统公司);Eppendorf BioPhotometer 核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司);低温离心机(德国 Sigma 公司);移液器(法国 Gilson 公司);96 孔板及盖膜(美国应用生物系统公司);ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)。

1.5 DNA 提取和基因分型

所有参与研究的个体均签署了知情同意书。外周血标本采集使用枸橼酸钠抗凝试管,每人采血约 2 mL,于-20℃到-80℃的冰箱中冻存。集中进行基因组 DNA 提取,采用酚-氯仿法,提取后测 OD 值确定 DNA 的原始浓度,再倍比稀释到 30-100 ng/μL 的终浓度备用。采用 Taqman real-time PCR 方法进行单核苷酸多态性的基因分型。分型在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行,扩增条件为 95℃预变性 10 min;92℃变性 30 s,60℃退火以及延伸 1 min;共 47 个循环。应用 SDS(美国应用生物系统公司)软件 Allelic Discrimination 程序进行终点分析,检测不同等位基因所标记的 FAM 和 VIC 荧光强度,判断待测样本的基因型。

1.6 统计分析

利用 SPSS 13.0 软件进行数据整理分析, $p < 0.05$ 时认为有统计学显著性差异。以 χ^2 检验检查比较人口学特征、相关危险因素暴露及 SNPs 基因型在组间分布的差异;以 logistic 回归计算比值比(Odds ratio, OR)及 95%可信区间(Confidence interval, CI)表示相对危险度。

2 结果

2.1 患者一般情况

170 例患者中位年龄 58.8 岁, 男性 131 例, 女性 39 例, 吸烟者 127 例, 非小细胞肺癌(NSCLC)患者 112 例, 小细胞肺癌(SCLC)患者 58 例, 临床分期 I 期 5 例, II 期 12 例, III 期 113 例, IV 期 40 例 (见表 1)。

表 1 患者临床资料统计
Table 1 Patient characteristics

变量 Characteristic	例数 Case	比例 Ratio / %
年龄 Age / year	58.8 (27-77)	—
性别 Gender	—	—
男 Male	131	77.1
女 Female	39	22.9
吸烟 Smoking	—	—
是 Yes	127	74.7
否 No	43	25.3
病理 Histology	—	—
鳞癌 Squamous Cell Carcinoma	54	31.8
腺癌 Adenocarcinoma	40	23.5
其它 Others	18	10.6
小细胞癌 Small cell carcinoma	58	34.1
分期 Stage	—	—
I	5	2.9
II	12	7.1
III	113	66.5
IV	40	23.5
化疗 Chemotherapy	—	—
是 Yes	135	79.4
否 No	35	20.6
化疗类型 Treatment	—	—
同步 CCRT	23	13.5
序贯 SCRT	112	65.9
GTV / cm ²	149.04 (13.12-799.38)	—
V20 / %	38 (3-76)	—

Note: CCRT = Concurrent chemoradiotherapy; SCRT = Sequential chemoradiotherapy; GTV = Gross tumor volume.

2.2 患者一般情况、治疗因素与放射性肺炎的相关性

170 例接受胸部放疗的未手术的肺癌患者中, 33 例发生 2 级以上的放射性肺炎(19.4%)。其中 2 级 21 例, 3 级 9 例, 4 级 1 例, 5 级 2 例。男性 26 例(78.8%), 女性 7 例(21.2%)。临床计数参数数据无丢失, 临床计量参数 DVH 参数中肿瘤靶体积(GTV)有 28 例缺失, V20 有 37 例缺失。统计分析时将所有缺失数据排除。本研究单因素分析中各项计数和计量参数均与放射性肺炎的发生无显著关联 ($p>0.05$) (见表 2 和表 3)。

表 2 临床计数资料单因素分析
Table 2 Univariate analysis of count data for risk of grade ≥ 2 RP

参数 Parameter	分类 Variable	例数 Case	放射肺炎数 RP Case	p
性别 Gender	男 Male	131	26	0.792
	女 Female	39	7	
吸烟 Smoking	是 Yes	127	22	0.237
	否 No	43	11	
病理 Histology	NSCLC	112	25	0.183
	SCLC	58	8	
分期 Stage	I	5	0	0.245
	II	12	4	
	III	113	24	
	IV	40	5	
治疗 Treatment	单独放疗 RT alone	35	6	0.67
	同步放化疗 CCRT	23	6	
	序贯放化疗 SCRT	112	21	

Note: RP = radiation pneumonitis; NSCLC = non-small cell lung cancer; SCLC = non-small cell lung cancer; SCRT = Sequential chemoradiotherapy; CCRT = concurrent chemoradiotherapy; RT = radiotherapy.

表 3 计量资料单因素分析
Table 3 Univariate analysis of measurement data for risk of grade ≥ 2 RP

参数 Parameter	例数 Case	中位值 Median	范围 Range	p
年龄 Age / year	170	58.00	27-77	0.705
V20 / %	170	39.00	3-76	0.225
GTV / cm ³	170	106.03	13.12-799.38	0.336

2.3 SNP 与放射性肺损伤的关系

LIG4rs1805388 和 HSPB1rs2868371 位点的基因型分布频率在未发生放射性肺炎组和发生放射性肺

炎组间无明显差异($p>0.05$)。单因素分析显示 LIG4rs1805388 和 HSPB1rs2868371 位点多态性与放射性肺损伤发生风险无关($p>0.05$)(见表 4)。

表 4 各基因型与放射性肺损伤的关系
Table 4 Correlation between LIG4 and HSPB1 Genotypes and RP

基因型 Genotype	发生 RP 组 RP / %	未发生 RP 组 Non-RP / %	OR(95%CI)	<i>p</i>
LIG4rs1805388	—	—	—	—
CC	27(81.8)	93(67.9)	1.00	—
CT	6(18.2)	33(24.1)	0.626(0.237–1.651)	0.344
TT	0(0)	11(8)	NC	NC
CT+TT	6(18.2)	44(32.1)	0.47(0.181–1.22)	0.47
HSPB1rs2868371	—	—	—	—
GG	14(42.4)	54(39.4)	1.00	—
GC	14(42.4)	63(46)	0.857(0.376–1.956)	0.714
CC	5(15.2)	20(14.6)	0.964(0.308–3.023)	0.95
GC+CC	19(57.6)	83(60.6)	0.883(0.409–1.908)	0.752

3 讨论

电离辐射引起的 DNA 双链断裂损伤修复有同源重组(Homology recombination, HR)和非同源末端连接(Non-homology end joining, NHEJ)2 条修复途径。在哺乳动物细胞中主要通过激活非同源末端连接(NHEJ)通路修复断裂的 DNA 双链^[10]。NHEJ 修复主要是通过 XRCC4-LIG4 连接复合体和 DNA 依赖蛋白激酶共同完成^[11]。既往研究显示 XRCC4-LIG4 连接复合体功能丧失严重影响 DNA 断裂双链的再连接,增强放射敏感性^[12-13]。DNA 连接酶 4 综合症是一种罕见的先天性疾病,因 LIG4 基因突变导致患者对放射线极度敏感^[14]。一项以白种人为主的研究显示 195 例非小细胞肺癌患者接受放疗后有 36 例发生 3 级放射性肺炎, LIG4rs1805388T 等位基因增加 3 级及以上放射性肺炎发生风险^[9]。YIN 等^[15]发现 XRCC1rs25487 位点 A 等位基因降低 2 级及以上放射性肺炎发生风险,而 APEX1rs1130409 位点 G 等位基因增加放射性肺炎风险。本研究未发现 LIG4rs1805388 单核苷酸多态性与放射性肺炎有相关性。

放射性肺损伤发病机制与特发性间质性肺疾病相似,受个体遗传因素及炎症因子表型影响。临床上分为早期的急性放射性肺炎和后期的放射性肺纤

维化。从分子水平上看,放射线引起 DNA 双链断裂,促发细胞因子和生长因子产生,最终引起缺氧,慢性氧化应激及不可逆损伤^[16]。研究显示 HSPB1 通过下调炎症反应,增强细胞对放射线抵抗力^[17-18]。Guo 等^[19]研究显示 HSPB11271C 等位基因可通过下调 HSP27 表达降低 DNA 修复能力,增加肺癌细胞对放化疗的敏感性。PANG 等^[8]一项以白种人作为主要研究对象的研究显示热休克蛋白 B1 (HSPB1) rs2868371 位点的单核苷酸多态性与发生放射性肺炎的风险相关,携带 CC 基因型出现 3 级以上放射性肺炎风险明显高于其他基因型(GG/GC)。Lopez Guerra 等^[20]发现 HSPB1 rs2868371 位点的 CG/GG 基因型可降低放射性食管炎发生风险。我们的研究未发现 HSPB1rs2868371 位点的单核苷酸多态性与放射性肺炎相关。

本研究中 HSPB1rs2868371 位点及 LIG4rs1805388 位点的基因多态性均未发现与放射性肺炎的发生风险相关,与既往的报道不一致。分析原因有以下两点: 1) 基因多态性存在种族差异,同一位点基因型在不同种族人群中分布频率也不相同; 2) 本研究对象样本量少: 本研究中发生 3 级及以上放射性肺炎仅 12 例, YIN 等^[9]的研究中发生 3 级及以上放射性肺炎 36 例。以上 2 个方面原因可能引起结果的不同,今后我们应扩大样本进行进一步的研究。

参考文献

- 1 Curado M P, Edwards B, Shin H R. Cancer incidence in five continents [M]. Lyon: IARC Press, 2007: 418-799.
- 2 Barriger R B, Fakiris A J, Hanna N, *et al.* Dose-volume analysis of radiation pneumonitis in nonsmall-cell lung cancer patients treated with concurrent cisplatin and etoposide with or without consolidation docetaxel [J]. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2010, **78**(5): 1381-1386.
- 3 Werner-Wasik M, Paulus R, Curran W J Jr, *et al.* Acute esophagitis and late lung toxicity in concurrent chemoradiotherapy trials in patients with locally advanced non-small-cell lung cancer: analysis of the radiation therapy oncology group (RTOG) database [J]. Clinical Lung Cancer, 2011, **12**(4): 245-251.
- 4 Roddam P L, Rollinson S, O'Driscoll M, *et al.* Genetic variants of NHEJ DNA ligase IV can affect the risk of developing multiple myeloma, a tumour characterized by aberrant class switch recombination [J]. Journal of Medical Genetics, 2002, **39**(12): 900-905.
- 5 Ahnesorg P, Smith P, Jackson S P. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining [J]. Cell, 2006, **124**(4): 301-313.
- 6 Sakata K, Someya M, Matsumoto Y, *et al.* Ability to repair DNA double-strand breaks related to cancer susceptibility and radiosensitivity [J]. Radiation Medicine, 2007, **25**(9): 433-438.
- 7 Garrido C, Brunet M, Didelot C, *et al.* Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties [J]. Cell Cycle, 2006, **5**(22): 2592-2601.
- 8 PANG Qingsong, WEI Qing, XU Ting, *et al.* Functional promoter variant rs2868371 of hspb1 is associated with risk of radiation pneumonitis after chemoradiation for non-small cell lung cancer [J]. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2013, **85**(5): 1332-1339.
- 9 YIN Ming, LIAO Zhongxing, LIU Zhensheng, *et al.* Genetic variants of the non-homologous end joining gene lig4 and severe radiation pneumonitis in non-small cell lung cancer patients treated with definitive radiotherapy [J]. Cancer, 2012, **118**(2): 528-535.
- 10 Lieber M R, Ma Y, Pannieke U, *et al.* Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003, **4**(9): 712-720.
- 11 Hefferina M L, Tomkinson A E. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining [J]. DNA Repair, 2005, **4**(6): 639-648.
- 12 Ayene I S, Ford L P, Koch C J. Ku protein targeting by Ku70 small interfering RNA enhances human cancer cell response to topoisomerase II inhibitor and gamma radiation [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2005, **4**(4): 529-536.
- 13 Bertolini L R, Bertolini M, Anderson G B, *et al.* Transient depletion of Ku70 and Xrcc4 by RNAi as a means to manipulate the non-homologous end-joining pathway [J]. Journal of Biotechnology, 2007, **128**(2): 246-257.
- 14 Chistiakov D A, Voronova N V, Chistiakov A P. Ligase IV syndrome [J]. European Journal of Medical Genetics, 2009, **52**(6): 373-378.
- 15 YIN Ming, LIAO Zhongxing, LIU Zhensheng, *et al.* Functional polymorphisms of base excision repair genes XRCC1 and APEX1 predict risk of radiation pneumonitis in patients with non-small cell lung cancer treated with definitive radiation therapy [J]. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2011, **81**(3): 67-73.
- 16 Gross T J, Hunninghake G W. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. New England Journal of Medicine, 2001, **345**(7): 517-525.
- 17 Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, *et al.* HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs [J]. Cancer Research, 1997, **57**(13): 2661-2667.
- 18 Wang G, Klostergaard J, Khodadadian M, *et al.* Murine cells transfected with human Hsp27 cDNA resist TNF-induced cytotoxicity [J]. Journal Immunotherapy Emphasis Tumor Immunol, 1996, **19**(1): 9-20.
- 19 Guo H, Bai Y, Xu P, *et al.* Functional promoter -127G>C variant of HSPB1 predicts lung cancer risk and survival [J]. Journal of Clinical Oncology, 2010, **28**(11): 1928-1935.
- 20 Lopez Guerra J L, Wei Q, Yuan X, *et al.* Functional promoter rs2868371 variant of HSPB1 associates with radiation-induced esophageal toxicity in patients with non-small-cell lung cancer treated with radio (chemo) therapy [J]. Radiotherapy Oncology, 2011, **101**(2): 271-277.

Relationship between genetic single-nucleotide polymorphisms of LIG4 and HSPB1 and the radiation-induced lung injury in lung cancer patients

LIU Dan¹ SUN Chengying¹ ZHAO Yuxia¹ BAI Lu²

¹(Department of Radiation Oncology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, China)

²(Department of Radiation Oncology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

ABSTRACT A total of 170 lung cancer patients, who diagnosed with inoperable lung cancer and received radiotherapy, were included in the present study. DNA were extracted by phenol-chloroform method from blood samples. Genetic single-nucleotide polymorphisms were divided by Taqman real-time PCR. All statistical analyses were performed with statistical product and service solutions v13.0. $p < 0.05$ was confirmed statistically significant. We used χ^2 analysis to compare the differences in demographic characteristics, exposure to risk factors and SNPs genotypes between the two cases. Crude odds ratios(ORs) with 95% confidence intervals (95%CI) were calculated by Logistic regression analysis. Among the 170 patients, 112 suffered from non small cell lung cancer, 58 small cell lung cancer, 33 radiation-induced lung injury (≥ 2 grade). 2 grade were 21 cases, 3 grade were 9 cases, 4 grade were 1 case, 5 grade were 2 cases. Male were 26 cases (78.8%), female were 7 cases(21.2%). There was no significant association among general characteristic, treatment and the radiation-induced lung injury. There was no obvious relationship between genetic single-nucleotide polymorphisms of LIG4 and HSPB1 and the radiation-induced lung injury in lung cancer patients.

KEYWORDS Lung cancer, Single-nucleotide polymorphisms, Radiation-induced lung injury, LIG4, HSPB1

CLC R734.2