

LIG4 和 HSPB1 基因多态性与 非小细胞肺癌放疗肿瘤退缩率的相关性

刘丹¹ 郭根燕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 2009年12月至2011年12月中国医科大学附属第一医院对137名有明确病理诊断的非小细胞肺癌患者行胸部病灶三维适形放射治疗,放疗前及放疗20次后测量肿瘤大小,评价放疗肿瘤退缩率,外周血标本酚-氯仿法提取DNA,采用Taqman real-time PCR方法行单核苷酸多态性的基因分型。采用SPSS13.0软件对数据进行t检验和方差分析, $p<0.05$ 时认为有统计学差异。137例患者,平均年龄 60.1 ± 5.33 岁,肿瘤平均退缩率 0.3474 ± 0.191 ,鳞癌87例,腺癌50例,男102例,女35例,I期9例,II期26例,III期70例,IV期32例。实验结果显示,吸烟者(95例)放疗肿瘤退缩率明显高于非吸烟者,分别为 0.3755 ± 0.1775 和 0.2840 ± 0.2068 , $t=2.643$, $p=0.009$ 。LIG4rs1805388的CC、CT和TT基因型放疗肿瘤退缩率分别是 0.3395 ± 0.1802 、 0.342 ± 0.2106 和 0.5038 ± 0.1892 ,经LSD法比较发现,TT基因型放疗肿瘤退缩率明显高于CC基因型, $p=0.041$ 。HSPB1rs2868371 GG、CG和CC基因型放疗肿瘤退缩率分别是 0.3454 ± 0.1932 、 0.3487 ± 0.1998 和 0.3487 ± 0.1652 ,未发现3种基因型之间有统计学差异。吸烟和LIG4rs1805388TT基因型患者放疗肿瘤退缩率明显高于其他患者。

关键词 LIG4, HSPB1, 非小细胞肺癌, 单核苷酸多态性, 放疗

中图分类号 R734.2

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2014.rj.32.060201

肺癌的发病率呈逐年上升趋势,已经成为全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤^[1]。临床工作中发现肺癌患者放疗后肿瘤退缩程度明显不同,主要原因在于肺癌的放射敏感性存在很大的个体差异。DNA是电离辐射的主要靶点,DNA损伤修复能力的强弱是影响放射敏感性的重要因素,与DNA修复功能相关的基因突变、多态性及表观修饰均可使放射敏感性出现差异^[2]。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^[3]。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^[4-5]。热休克蛋白B1(Heat shock protein B1, HSPB1)是热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs)家族中 27×10^3 的小分子热休克蛋白,在DNA修复方面起着重要的作用^[6]。本研究拟探讨HSPB1及LIG4基因单核苷酸多态性与非小细胞肺癌放疗肿瘤退缩率的相关性。

1 材料与方法

1.1 病例与材料

本研究所有对象为北方地区汉族人群,患者之间彼此均无血缘关系。在签署知情同意后,提供外周血标本,同时完成流行病学调查。病例来自2009年12月至2011年12月期间,中国医科大学附属第一医院的137名原发性非小细胞肺癌(Non-small-cell lung cancer, NSCLC)患者,有明确的病理诊断(鳞癌87例,腺癌50例),所有患者行胸部病灶三维适形放射治疗(Three-dimensional conformal radiotherapy, 3D-CRT)且具有肺内可评估病灶者,放疗前及放疗20次后测量肿瘤大小。

红细胞裂解液(3.85 g NH_4Cl +0.42 g NaHCO_3 加双蒸水至500 mL);核悬浮液(75 mmol·L⁻¹ NaCl、

基金资助: 辽宁省科技厅科学计划项目(2011225019)、沈阳市社会发展科技攻关项目(F12-193-9-40)和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,现为中国医科大学肿瘤放疗学博士研究生, 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: 收稿 2014-06-23; 修回 2014-09-06

24 mmol·L⁻¹ pH=8.0, EDTA); TE 缓冲液 (10 mmol·L⁻¹ pH=7.5 Tris-HCl、1 mmol·L⁻¹ 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)。

1.2 调查方法

采用统一制定打印的调查表, 由 2 名培训的调查员对病例进行流行病学调查, 调查内容包括每个研究对象详细的人口学资料、吸烟史、组织类型、临床表现和伴发疾病等。非吸烟者指终生吸烟少于 100 支的个体。所有参与研究的个体外周血标本采集使用枸橼酸钠抗凝试管, 每人采血 2 mL, 在 -20 ℃ 到 -80 ℃ 的冰箱中冻存。肿瘤放射治疗方案采用三维适形治疗, 放疗单次剂量 2 Gy, 5 次/周, 总剂量(Total dose, D_T)达到 40 Gy/20 次/4 周后重新 CT 定位, 观察肿瘤消退情况, 重新制定放疗计划, 单次剂量改为 2.5 Gy, 5 次/周, 共 8 次, 使肿瘤 D_T 达到 60 Gy。肿瘤体积用放射治疗计划系统计算, 放疗前肿瘤体积(V_{pre}), 放疗 40 Gy 后的肿瘤体积(V_{mid})。用下面的公式计算肿瘤体积退缩率(R)。

$$R = \frac{V_{pre} - V_{mid}}{V_{pre}}$$

所有调查资料、临床资料经反复检查、核对和编码后, 用 Excel 软件进行数据录入。

1.3 实验方法

采用酚-氯仿法集中进行基因组 DNA 提取, 提取后测 OD 值确定 DNA 的原始浓度, 再倍比稀释到 30–100 ng·μL⁻¹ 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。基因分型在 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。以 SDS (美国应用生物系统公司) 软件 Allelic Discrimination 程序进行终点分析, 通过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。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 数据比较用 t 检验和方差分析, $p < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 非小细胞肺癌病例的一般特征

137 例患者, 平均年龄 60.1 ± 5.33 岁, 肿瘤平均退缩率为 0.3474 ± 0.1910 , 鳞癌 87 例, 腺癌 50 例, 男 102 例, 女 35 例, I 期 9 例, II 期 26 例, III 期 70 例, IV 期 32 例。吸烟 95 例, 吸烟者放疗肿瘤退缩率明显高于非吸烟者, 分别为 0.3755 ± 0.1775 和 0.2840 ± 0.2068 , $t = 2.643$, $p = 0.009$ 。性别、病理类型及临床分期与放疗肿瘤退缩率无关, 具体见表 1。

表 1 非小细胞肺癌病例的一般特征与放疗肿瘤退缩率关系
Table 1 The relationship between general character and the ratio of tumor-decreased-size

特征	Situation	例数 Case	肿瘤退缩率 Ratio of tumor- decreased-size	<i>t</i>	<i>p</i>
性别	男 Male	102	0.3448±0.1960	-0.27	0.788
Gender	女 Female	35	0.3550±0.1780	-	-
吸烟	是 Yes	95	0.3755±0.1775	2.643	0.009
Smoking	否 No	42	0.2840±0.2068	-	-
病理	鳞癌 Squamous carcinoma	87	0.3643±0.1919	1.368	0.174
Pathology	腺癌 Adenocarcinoma	50	0.3181±0.1876	-	-
临床分期	I	9	0.3850±0.2626	0.404	0.806
Stage	II	26	0.3019±0.1794	-	-
	III	70	0.3423±0.1827	-	-
	IV	32	0.3613±0.1948	-	-

2.2 LIG4 及 HSPB1 基因单核苷酸多态性与非小细胞肺癌放疗肿瘤退缩率的关系

LIG4rs1805388 的 CC、CT 和 TT 基因型放疗肿瘤退缩率分别是 0.3395 ± 0.1802 、 0.342 ± 0.2106 和 0.5038 ± 0.1892 , 经方差分析, $F=2.142$, $p=0.121$, 3 种基因型肿瘤退缩率无统计学意义。

但经 LSD 两两比较发现, TT 基因型肿瘤退缩率明显高于 CC 基因型, $p=0.041$ 。HSPB1rs2868371 GG、CG 和 CC 基因型放疗肿瘤退缩率分别是 0.3454 ± 0.1932 、 0.3487 ± 0.1998 和 0.3487 ± 0.1652 , 经方差分析和 LSD 两两比较, 未发现 3 种基因型之间有统计学差异 (见表 2)。

表 2 LIG4 和 HSPB1 基因单核苷酸多态性与非小细胞肺癌放疗肿瘤退缩率的相关性
Table 2 The relationship among genetic single nucleotide polymorphisms of LIG4 and HSPB1 and the ratio of tumor-decreased-size

基因型 Genotype	例数 Case	肿瘤缩小率 The ratio of tumor decreased size	F	p
LIG4rs1805388				
CC	93	0.3395 ± 0.1802	2.142	0.121
CT	38	0.342 ± 0.2106	—	—
TT**	6	0.5038 ± 0.1892	—	—
HSPB1rs2868371				
GG	54	0.3454 ± 0.1932	0.005	0.995
CG	62	0.3487 ± 0.1998	—	—
CC	21	0.3487 ± 0.1652	—	—

注: **, LIG4rs1805388TT 与 CC 基因型相比较, $p=0.041$ 。

Note: **, LIG4rs1805388TT genotype compared with CC genotype, $p=0.041$.

3 讨论

吸烟是肺癌的主要危险因素, 其中男性的归因风险为 80%, 女性的归因风险为 45%^[7]。非小细胞肺癌中鳞状细胞癌与吸烟状况密切相关^[8]。放射生物学研究发现鳞状细胞癌的放射敏感性高于腺癌细胞。我们的研究得出吸烟者放疗肿瘤退缩率明显高于非吸烟者, $p=0.009$, 有统计学意义。目前还未见吸烟与非小细胞肺癌放疗肿瘤退缩率相关的其他报道, 我们的研究结果有待大样本实验进一步验证。

非同源末端链接(Non-homologous end joining, NHEJ)修复是哺乳动物细胞中 DNA 双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)修复的主要途径。DNA 连接酶 IV 及 X-射线修复交叉互补基因均为 NHEJ 修复通路中的重要基因^[9], 影响着肿瘤细胞 DNA 损伤后的修复能力及肿瘤细胞对放疗的敏感性^[10]。NHEJ 修复主要是通过 DNA 依赖蛋白激酶(DNA dependent protein kinase, DNAPK) 和 XRCC4-LIG4 连接复合体共同完成的^[11]。既往的研究^[12-13]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。

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]。我们的研究显示 LIG4rs1805388 的 CC、CT 和 TT 基因型放疗肿瘤退缩率分别是 0.3395 ± 0.1802 、 0.342 ± 0.2106 和 0.5038 ± 0.1892 , 两两比较发现, TT 基因型肿瘤退缩率明显高于 CC 基因型。从我们的实验数据可推论出携带 LIG4rs1805388TT 基因型非小细胞肺癌患者放疗后肿瘤退缩率高, 提示对放疗敏感。但这仍需要大量的实验研究去验证。

热休克蛋白 B1, 又称热休克蛋白 27, 是小分子热休克蛋白(sHSP)亚家族的重要一员。Hsp27 蛋白可以通过多种途径影响肿瘤的发生和发展, 包括维持细胞骨架的正常结构而保证细胞正常生长和存活、调节机体内谷胱甘肽水平进而提高细胞对氧化应激的敏感度^[15-16]、抑制内源性和外源性细胞凋亡通路、参与 DNA 损伤的修复等。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]。Zhang 等^[19]研究显示鼻咽癌细胞中 HSPB1 表达上调, 增强鼻咽癌细胞对放射线抵抗力。Guo 等^[20]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。我们研究结果显示 HSPB1rs2868371 基

因的单核苷酸多态性与非小细胞肺癌放疗肿瘤退缩率无关。目前针对基因的单核苷酸多态性的研究中,来自不同民族、不同地区的研究对象可能得到不同、甚至矛盾的结果,这可能与遗传因素的地域性和种族性有关,还有可能是与样本含量较小有关,HSPB1rs2868371 位点纯合突变率较低,小样本结果不能达到应有的统计效能。所以 HSPB1rs2868371 单核苷酸多态性与非小细胞肺癌放疗肿瘤退缩率的关系还有待于进一步研究。

本研究发现吸烟者和 LIG4rs180538TT 基因型非小细胞肺癌患者放疗肿瘤退缩率高于其他患者,为临床提高非小细胞肺癌治疗疗效提供理论依据。

参考文献

- Curado M P, Edwards B, Shin H R. Cancer incidence in five continents [J]. Lyon: IARC Press, 2007, 418-799.
- Parliament M B, Murray D. Single nucleotide polymorphisms of DNA repairs genes as predictors of radioresponse [J]. Seminars Radiation Oncology, 2010, 20(4): 232-240.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Rom W N, Hay J G, Lee T C. Molecular and genetic aspects of lung cancer. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2000, 161(4): 1355-1367.
- De Stefani E, Boffetta P, Ronco A L, *et al.* Squamous and small cell carcinomas of the lung: similarities and differences concerning the role of tobacco smoking [J]. Lung Cancer, 2005, 47: 1-8.
- Ohnishi T, Mori E, Takahashi A. DNA double — strandbreaks: their production, recognition, and repair in eukaryotes [J]. Mutation Research, 2009, 669(1/2): 8-12.
- Wood R D, Mitchell M, Sgouros J, *et al.* Human DNA repair genes [J]. Science, 2001, 291: 1284-1289.
- Hefferina M L, Tomkinson A E. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining [J]. DNA Repair, 2005, 4: 639-648.
- 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.
- 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.
- Chistiakov D A, Voronova N V, Chistiakov A P. Ligase IV syndrome [J]. European Journal of Medical Genetics, 2009, 52(6): 373-378.
- Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, *et al.* Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death [J]. The Embo Journal, 1996, 15(11): 2695-2706.
- Arrigo A P, Viot S, Chaufour S, *et al.* Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels [J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7(3-4): 414-422.
- 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: 2661-2667.
- Wang G, Klostergaard J, Khodadadian M, *et al.* Murine cells transfected with human Hsp27 cDNA resist TNF-induced cytotoxicity [J]. J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 1996, 19(1): 9-20.
- Zhang B, Qu J Q, Xiao L, *et al.* Identification of heat shock protein 27 as a radioresistance-related protein in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Cancer Research Clinical Oncology, 2012, 138(12): 2117-2125.
- Guo H, Bai Y, Xu P, *et al.* Functional promoter-127G>C variant of HSBP1 predicts lung cancer risk and survival [J]. Journal of Clinical Oncology, 2010, 28(11): 1928-1935.

Relationship between genetic single-nucleotide polymorphisms of LIG4 and HSPB1 and the ratio of tumor-decreased-size by radiotherapy in non-small cell lung cancer

LIU Dan¹ GUO Genyan¹ 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 137 pathologically proved non-small cell lung cell patients were treated with thoracic three-dimensional conformal radiotherapy from the First Affiliated Hospital of China Medical University district between December 2009 and December 2011. The tumor was measured in pre-radiotherapy and radiotherapy 20 times to estimate the ratio of tumor decreased size. DNA was 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 SPSS13.0. $p < 0.05$ was confirmed statistically significant. T-test and analysis of variance were used to compare the data. Among the 137 patients, the average age was 60.1 ± 5.33 ; the average ratio of tumor decreased size was 0.3474 ± 0.191 ; squamous carcinoma were 87 cases; adenocarcinoma were 50 cases; male were 102 cases, while female were 35 cases; I stage were 9 cases, II stage were 26 cases, III stage were 70 cases, and IV stage were 32 cases; Smoking patient were 95 cases. The ratio of tumor-decreased-size of smoking patient was higher than that of no-smoking, respective 0.3755 ± 0.1775 and 0.2840 ± 0.2068 , $t = 2.643$, $p = 0.009$. The ratio of tumor decreased size of LIG4rs1805388CC, CT and TT genotype were 0.3395 ± 0.1802 , 0.342 ± 0.2106 and 0.5038 ± 0.1892 , respectively. The ratio of tumor-decreased-size of LIG4rs1805388TT genotype was higher than that of CC genotype through LSD method. There was no relationship between genetic single-nucleotide polymorphisms of HSPB1 and the ratio of tumor-decreased-size by radiotherapy in non-small cell lung cancer. The ratio of tumor-decreased-size by radiotherapy of smoking and LIG4rs180538TT genotype was higher than that of other patients.

KEYWORDS LIG4, HSPB1, Non-small cell lung cancer, Single-nucleotide polymorphisms, Radiotherapy

CLC R734.2