

# 宫颈癌患者顺铂化疗疗效与RAD51基因多态性的关系

吴小春\*, 吕贤贞, 章亚文(兰溪市妇幼保健院妇产科, 浙江 金华 321100)

中图分类号 R969.1;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)23-3220-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.23.17

**摘要** 目的:探讨宫颈癌患者RAD51基因多态性在肿瘤预后中的作用及其与顺铂化疗疗效的关系。方法:选择193例宫颈癌患者,通过TaqmanTM等位基因分型法进行基因分型,观察患者经过顺铂化疗联合放疗治疗后的效果及生存期。结果:RAD51基因型与患者的平均生存率与疗效显著相关。携带T基因型的患者对药物的反应明显好于GG基因型患者( $P<0.05$ ),同时平均生存率明显升高( $P<0.05$ )。结论:本研究评估了RAD51 G172T基因变异同宫颈癌患者预后和化疗的关系,提示该SNP位点或许可以作为预测宫颈癌患者对铂类辅助化疗临床结果的预测因子。由于RAD51蛋白的过表达与肿瘤对化疗药物的耐受性有关,因此针对RAD51的靶向药物有可能成为新一代抗肿瘤药物的研制方向。

**关键词** 宫颈癌;顺铂;RAD51基因多态性

## Relationship between RAD51 Polymorphism and Therapeutic Efficacy of Cisplatin Chemotherapy in Cervical Cancer Patients

WU Xiao-chun, LYU Xian-zhen, ZHANG Ya-wen (Dept. of Obstetrics and Gynecology, Lanxi Maternal and Child Health Hospital, Zhejiang Jinhua 321100, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To observe the effects of RAD51 gene polymorphism on cancer prognosis and its relationship with therapeutic efficacy of cisplatin chemotherapy in patients with cervical cancer. METHODS: 193 cervical cancer patients were selected and genotyped by TaqmanTM genotyping method. Therapeutic efficacy and survival period were observed in cisplatin chemotherapy combined with radiotherapy. RESULTS: The mean survival rate and therapeutic efficacy was significantly correlated with RAD51 genotype. The patients carrying the T gene had better response to drugs, compared to patients with type GG ( $P<0.05$ ), and the average survival rate significantly increased ( $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: Genetic variation in RAD51 have obvious influence on the prognosis of cervical cancer chemotherapy. Therefore, RAD51 G172T genotypes give effective prognosis information about cervical cancer patients who received cisplatin chemotherapy.

**KEYWORDS** Cervical cancer; Cisplatin; RAD51 polymorphism

宫颈癌是妇女常见的肿瘤。研究证实,手术与放疗对早期、小体积宫颈癌疗效显著,而对于不可手术的宫颈癌患者,放化疗是首选<sup>[1]</sup>。临床上宫颈癌的常用化疗药物主要为顺铂(或者联合5-氟尿嘧啶),可以延长患者的生存期,降低原位晚期宫颈癌患者的复发率,以顺铂为基础的放化疗是治疗原位晚期宫颈癌的标准治疗方法<sup>[2]</sup>。顺铂主要通过DNA单链内两点或双链发生交叉联结,抑制癌细胞的DNA复制过程,使癌细胞大量DNA损伤后发生细胞凋亡。但研究发现在长时间使用后(半年以上)大部分患者都会对顺铂产生抗性,使得疾病复发,其中肿瘤细胞DNA修复能力增强是重要原因<sup>[3]</sup>。

RAD51是细胞有丝分裂与有丝分裂重组所必需的蛋白,在同源双链断裂(Double-strand break, DSB)重组修复中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。RAD51蛋白可以促进链的结合与DNA末端多聚化,使核蛋白互补到缺口同源链末端,介导其转移与退火。RAD51基因位于第15号染色体1区5带,有9个外显子和8个内含子,编码一条339个氨基酸的蛋白质。第1个外显子和第二部分其位于外显子5'非编码区(5'-UTR),调节基因的表达。RAD51是高度多态性,目前已知143个单核苷酸多态性(SNPs)。人类基因5'-UTR的单核苷酸多态性,导致鸟嘌呤(G-T)在172位被取代(RAD51 G172T多态性),已经很明确。这种多态性与基因转录改变有关<sup>[5]</sup>。然而,没有研究报道

RAD51 G172T多态性与宫颈癌的发病相关。因此,本研究的目的是探讨RAD51 G172T多态性与宫颈癌化疗反应的关系,为进一步揭示肿瘤对铂类药物的耐药性机制提供线索。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料来源

选自2010—2014年在我院妇产科就诊并经病理检查确诊为宫颈癌的患者,共193人,放疗同时联合化疗,化疗方案:顺铂(齐鲁制药有限公司,批号:H37021362) 20 mg/m<sup>2</sup>联合氟尿嘧啶[华润三九(北京)药业有限公司,批号:H11021805]600 mg/m<sup>2</sup>,连续1~5 d,给药方式为静脉滴注。通过查询患者病历,总结患者临床病理特征(表1)。根据美国癌症联合会与国际妇产科联盟TNM分期系统对患者进行分期,根据巴塞罗那分级系统对患者进行组织病理学分级。采用QIAmp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN)从全血中提取DNA。本试验通过我院医学伦理委员会批准,所有患者或家属均签署了知情同意书。

### 1.2 对RAD51 G172T多态性基因分型

用TaqmanTM等位基因分型法进行基因分型,引物与探针序列如下,前向引物:5'-CGAGTAGAGAA-GTGGAGCGTAGC-3';反向引物:5'-CCGCGCTCCGACTTCA-3',T等位基因探针:5'-FAM-CGTGCCACICCCGCGGG-3',G等位基因探针:5'-VIC-CGTGCC-ACgCCCgCGGG-3'。所有等位基因区别聚合酶链反应(PCR)均是6 μl体系,包含:2.5 μl TaqMan × 2

\* 主治医师。研究方向:产科学。电话:0579-88905569。E-mail: wuxchlx@163.com

表1 患者临床病理特征

项目	特征	患者数量	构成比, %
年龄, 岁	49.2 ± 11.21	193	100
口服避孕药	是	79	40.93
	否	78	40.41
	无信息	36	18.66
吸烟情况	不吸烟	128	66.32
	吸烟或以前吸	26	13.47
	无信息	39	20.21
组织类型	鳞癌	153	79.27
	腺癌	25	12.95
	腺鳞癌	7	3.62
	其他	8	4.16
淋巴转移	是	9	4.66
	否	184	95.34
对治疗的反应	完全缓解	142	73.56
	部分缓解	32	16.58
	稳定	10	5.18
	进展	6	3.11
	无信息	3	1.55
复发	是	36	18.65
	否	157	81.35
分期	I	18	9.33
	II	134	69.43
	III	37	19.17
	IV	4	2.07

Universal PCR Master Mix, 0.125 μl 无菌 H<sub>2</sub>O × 40, 1 μl 基因组 DNA。实时定量 PCR 检测, 按以下程序扩增 DNA: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 45 个循环。ABI 7300 实时定量 PCR 系统与序列检测系统软件进行检测与分析。所有循环中加入非模板对照, 并对 10% 的样品重复检测, 以进行质控。

### 1.3 统计学方法

用 SPSS 17.0 软件进行相关统计分析, 采用  $\chi^2$  检验分析两组间差异。Kaplan-Meier 乘积极限估计法评估生存率与平均生存表。Log Rank (Mantel-Cox) 检验分析生存曲线, 统计检验生存分布的相等性。生存区间定义为: 诊断与死亡或患者最后一次临床检查的时间间隔。运用 Cox 回归模型调整 RAD51 基因作为预测因子的混杂因素。

## 2 结果

### 2.1 患者基因型与临床特征的相关性

用 Taqman<sup>TM</sup> 等位基因分型法分析了 RAD51 G172T 多态性的基因型。其 GG、GT、TT 型出现的频率分别为 32%、43%、25%。患者临床病理分期特征与基因型差异无统计学意义 (肿瘤分期 I/II 和 III/IV 期,  $P=0.250$ ), 在对治疗反应上有明显差别, 其中携带 T 基因患者对药物的反应明显好于 GG 型患者 [部分或完全缓解 ( $P=0.04$ )、复发 (有或无,  $P=0.01$ )], 详见表 2。

### 2.2 不同基因型的总生存率

采用 Kaplan-Meier 与 Log Rank 检验不同基因型的总生存率。详见图 1。由图 1 可见, 由于基因型不同, 患者总生存率有差异有统计学意义。携带 T 基因型等位基因的患者平均生存率高于其他患者 (102.3 个月 vs. 86.4 个月,  $P=0.020$ )。因此, TT/GT 基因型的个体, 总生存时间更长, 携带 T 基因型患者预后更好。通过多因素 Cox 回归模型, 发现当把肿瘤分期、年龄、淋巴结转移作为协变量 [HR=0.373, CI: 0.181 - 0.770 ( $P=$

0.008) (图 2)], 同 GG 基因型患者相比, 携带 T 型基因者患者总生存时间增加。

表 2 宫颈癌患者不同临床病理特征与 RAD51 G172T 基因遗传多态性频率关系 [例 (%)]

Tab 2 Relationship of different clinical pathological characteristics of cervical cancer patients with RAD51 G172T gene polymorphism [case (%)]

项目	特征	GG (n=62)	T 携带者 (n=131)	P <sup>a</sup>
治疗反应	未缓解 <sup>b</sup>	28 (45.1)	31 (23)	0.04
	部分或者完全缓解	43 (40.3)	99 (58.1)	
复发	是	15 (22.5)	21 (7.6)	0.01
	无	46 (45.2)	111 (60)	
分期	I / II	45 (23.3)	107 (55.4)	0.25
	III / IV	16 (8.3)	25 (13.0)	

注: <sup>a</sup>:  $\chi^2$  检验; <sup>b</sup>: 局部+持续+进展+无反应

Note: a. t-test; b. local+continous+progressioev+no response

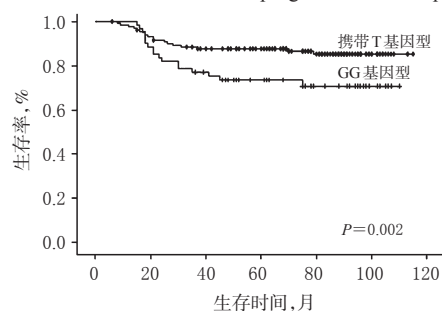


图 1 Kaplan-Meier 与 Log Rank 检验根据 RAD51 G172T 基因型分析宫颈癌患者总生存率

Fig 1 Overall survival by Kaplan-Meier and Log Rank Test of cervical cancer patients according to RAD51 G172T genotypes

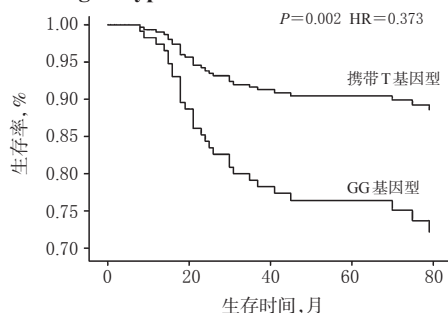


图 2 Cox 回归根据 RAD51 G172T 基因遗传多态性分析总生存率

Fig 2 Overall survival by Cox regression according to RAD51 G172T gene polymorphism

## 3 讨论

### 3.1 基因多态性与 DNA 修复

研究表明, 基因遗传多态性形成的不同 DNA 修复基因, 可以造成 DNA 修复能力的不同, 并影响顺铂的疗效及患者的生存期<sup>[6]</sup>。同时, 单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 还能影响细胞功能改变的基因, 包括编码药物代谢酶、转录因子、离子通道、药物受体、细胞周期蛋白。目前已经证明, DNA 修复因子基因与患者生存期、药物反应、药物毒性有关, 这些也与化疗药物的敏感性有关。所以, DNA 修复因子基因的多态性可以作为影响患者自我修复能力与化疗药物

有效性的候选决定因素之一<sup>[7]</sup>。

### 3.2 RAD51 基因的多态性

基因组的稳定遗传需要多条信号通路协同作用,包括细胞周期检验点、DNA复制、DNA修复与重组、细胞程序性死亡。RAD51蛋白是同源重组与DNA DSB修复必不可少的因子,它可以快速结合到两条单链缺口处,并在双链重组时发挥作用。RAD51常常在172位(RAD51 G172T多态性,rs1801321)发生鸟嘌呤-胸腺嘧啶(G-T)替换<sup>[8]</sup>,本研究也确认该处为基因的多态性位点,其GG、GT、TT型出现的频率分别为0.32、0.43、0.25。UTR区域的多态性在细胞增殖、分化、肿瘤抑制、转移抑制相关的基因中发挥重要作用。因此,5'-UTR区域RAD51 G172T的多态性,在蛋白质表达与稳定性方面发挥重要作用,并改变RAD51蛋白的功能。所以推论,RAD51基因的多态性可能通过反义寡核苷酸或小分子下调RAD51的表达,从而影响顺铂的疗效。

### 3.3 RAD51 G172T 基因与顺铂治疗的相关性

使肿瘤细胞的DNA对顺铂更敏感,这是化疗药物治疗的一种策略。研究已证实,RAD51 G172T多态性与乳腺癌、上皮性卵巢癌、头颈鳞状细胞癌的化疗效果相关<sup>[9]</sup>。在本研究中发现,对于两组病理分型相近的患者,携带T基因型的患者对药物的反应明显好于GG基因型患者,而且RAD51基因的改变与宫颈癌患者总生存期相关。携带T等位基因的患者,化疗后总生存期约为102个月,而GG基因型患者为86个月,我们推测原因为:RAD51的等位基因变异使RAD51启动子活性降低,因此携带RAD51 G172T基因型的个体DSB修复能力减弱,同其他基因型患者相比,对化疗药物更敏感。可见,RAD51 G172T基因型对宫颈癌患者疗效有促进作用。RAD51 G172T多态性对化疗反应的正向作用还提示该多态性与RAD51的表达降低有关,可以使肿瘤细胞损伤修复的能力降低,对大部分化疗药物敏感升高,因此提高了化疗药物的有效性,患者预后更好。因此,RAD51 G172T基因型或许可以作为宫颈癌患者顺铂化疗联合放疗的预后预测因子。尽管目前已知一些同5'-UTR相互作用的调控原件<sup>[10]</sup>,但RAD51 G172T多态性的功能还不清楚,仍需要继续研究相关的功能<sup>[11]</sup>。

### 3.4 本研究的局限性

本研究具有一定的局限性。临床病例所用的化疗方案是顺铂(或者联合5-氟尿嘧啶),因而5-氟尿嘧啶也可能与RAD51 G172T基因具有相关性。下一步研究需要明确5-氟尿嘧啶是否与RAD51 G172T基因具有相关性。

### 3.5 本研究的意义

同源重组是修复细胞DNA的重要过程,RAD51蛋白是一种同源重组过程中的重要蛋白,其蛋白水平及功能的改变不仅可以影响肿瘤的发生与发展,而且其过表达还可以影响肿瘤对放化疗的敏感性,如何判断RAD51蛋白的量还需进一步探索。本研究评估了RAD51 G172T基因变异与宫颈癌患者预后和化疗的关系,提示该SNP位点或许可以作为预测宫颈癌患者对铂类辅助化疗临床结果的预测因子<sup>[12]</sup>。药物基因组学图谱可以用于预测患者对化疗是否有效,是否能够耐受。另外,由于RAD51蛋白的过表达与肿瘤对化疗药物的耐受性有关,因此针对RAD51的靶向药物有可能成为新一代抗肿瘤药物的研制方向<sup>[13]</sup>。

### 参考文献

- [1] Nogueira A, Catarino R, Faustino I, et al. Role of the RAD51 G172T polymorphism in the clinical outcome of cervical cancer patients under concomitant chemoradiotherapy[J]. *Gene*, 2012, 504(2):279.
- [2] van Huis-Tanja LH, Kwekel DM, Lu X, et al. Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) C118T SNP does not affect cellular response to oxaliplatin[J]. *Mutat Res*, 2014, 759(1):37.
- [3] Synowiec E. Association between DNA damage, DNA repair genes variability and clinical characteristics in breast cancer patients[J]. *Mutat Res*, 2008, 648 (1/2):65.
- [4] Zhang L, Ruan Z, Hong Q, et al. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and risk of cervical cancer: A case-control study[J]. *Oncol Lett*, 2012, 3(2):351.
- [5] Hasselbach L, Haase S, Fischer D, et al. Characterisation of the promoter region of the human DNA-repair gene Rad51[J]. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 2005, 26(6):589.
- [6] Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy[J]. *Nat. Rev. Cancer*, 2007, 7 (8):573.
- [7] Hine CM, Seluanov A, Gorbunova V. Use of the Rad51 promoter for targeted anti-cancer therapy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(52):20810.
- [8] Johnson N, Johnson SF, Yao W, et al. Stabilization of mutant BRCA1 protein confers PARP inhibitor and platinum resistance[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(42):17041.
- [9] Bindra RS, Schaffer PJ, Meng A, et al. Down-regulation of Rad51 and decreased homologous recombination in hypoxic cancer cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(19):8504.
- [10] Mukhopadhyay A, Plummer ER, Elattar A, et al. Clinicopathological features of homologous recombination-deficient epithelial ovarian cancers: sensitivity to PARP inhibitors, platinum, and survival[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(22):5675.
- [11] Erčulj N, Kovač V, Hmeljak J, et al. DNA repair polymorphisms and treatment outcomes of patients with malignant mesothelioma treated with gemcitabine-platinum combination chemotherapy[J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(10):1609.
- [12] Nogueira A, Catarino R, Faustino I, et al. Role of the RAD51 G172T polymorphism in the clinical outcome of cervical cancer patients under concomitant chemoradiotherapy[J]. *Gene*, 2012, 504(2):279.
- [13] Nogueira A, Catarino R, Coelho A, et al. Influence of DNA repair RAD51 gene variants in overall survival of non-small cell lung cancer patients treated with first line chemotherapy[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 66(3):501.

(收稿日期:2015-02-26 修回日期:2015-06-29)

(编辑:李 劲)