

肺癌早期诊断及个体化治疗研究

郑秋青^{1,2},毛伟敏^{1,2},张沂平¹,陈明^{1,2},苏丹²,凌志强²,郑智国²,许亚萍^{1,2},张永军²,谢发君^{1,2}

(1.浙江省肿瘤医院,浙江 杭州,310022;

2.浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室,浙江 杭州 310022)

摘要:肺癌是最常见恶性肿瘤之一,目前临床治疗不尽如人意。浙江省肿瘤医院依托浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室,在肺癌的易感性研究、肺癌早期诊断及研究技术、肺癌的个体化治疗方面取得一系列成果。全文就本实验室所取得的研究成果及其潜在临床应用前景作一综述。

关键词:肺癌;早期诊断;个体化治疗

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2013)10-784-05

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2013.10.A004

Research on Early Diagnosis and Individuaized Treatment of Lung Cancer

ZHENG Qiu-qing^{1,2}, MAO Wei-min^{1,2}, ZHANG Yi-ping¹, et al.

(1. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China; 2. Zhejiang Key Laboratory of Diagnosis&Treatment Technology on Thoracic Oncology(Lung and Esophagus), Hangzhou 310022, China)

Abstract: Lung cancer is one of commonest human malignancies. The clinical prognosis is poor. Relied on Zhejiang Key Laboratory of the Diagnosis and Treatment Technology on Thoracic Oncology, Zhejiang Cancer hospital achievements in lung cancer. This review summarizes the recently achievement of our lab and its clinical application prospect.

Key words: lung cancer; early diagnosis; individuaized treatment

肺癌是当今世界上对人类健康与生命危害最大的恶性肿瘤之一,其死亡率高居各类恶性肿瘤首位。在美国,2012年就有226 160例新发病例,死亡160 340例^[1]。在我国,肺癌是第一大肿瘤,超过癌症总死亡率的20%,且发病率及死亡率增长迅速,每年新增肺癌病例达50万~60万。世界卫生组织(WHO)预测,到2025年,中国每年将有超过100万新发肺癌患者。近年来,浙江省城镇中肺癌的发病率及死亡率呈快速上升趋势,均位居恶性肿瘤之首,其中肺癌死亡率上升了148.38%,已居浙江省城镇人口恶性肿瘤死亡原因的第一位。多年来肺癌患者的5年生存率无明显提高,1975~1977年为12.7%,1996~2004年为15.7%,20年间仅提高了3.0%,造成这种状况的主要原因是肺癌早期诊断和治疗方面没有得到根本性改善,形势严峻^[2,3]。

随着现代分子生物学技术的快速发展,以细胞病理学为基础的医学模式正在向分子医学模式转变,科研人员从基因、蛋白质等分子水平研究肿瘤发病机理,以实现肿瘤的早期预防、诊断和个体化治疗^[4]。在2013年美国临床肿瘤学会(ASCO)年会上,无论是医学科学还是癌症教育报告,均贯穿了会议主题——“构建攻克癌症的纽带”,基于肺癌分子生物学的基础研究向临床实践均取得了重大进展。表皮生长因子受体(EGFR)基因突变与相应靶向抑制剂的关系已得到临床研究的证实,并在肺癌分子

收稿日期:2013-07-27

基金项目:浙江省科技计划项目(2008C33015);浙江省自然科学基金项目(Y205317、Y2110004);浙江省医药卫生科学研究基金(200608071、2006A011、2006A015、2010KYA035);浙江省中医药科技计划(2010ZA006、2010ZB006、2008CA113);吴阶平医学基金会(08-ZH-006);浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室专项基金资助

通讯作者:毛伟敏, E-mail:maowm1218@163.com

靶点的治疗研究中取得了很好的成绩,肺癌的临床诊治模式已发生较快的改变。“浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室”肺癌研究组开展的肺癌基础和临床转化应用研究正是在这一大背景下发展的,课题组着重建立肺癌转化型研究平台,围绕肺癌早期诊断、复发、转移和个性化综合治疗等关键问题,开发肿瘤诊断和治疗新技术,建立科学合理的诊断、治疗流程,实现在循证医学指导下的规范化、个体化肺癌综合治疗,提高患者的治愈率和生存质量,有望对肺癌的控制提供行之有效的策略^[5-8]。现对我们在此领域的研究进展及其潜在临床意义进行简要小结,以期促进学术交流。

1 肺癌易感性研究

1.1 DNA 修复基因及凋亡相关基因多态性与肺癌易感性

尽管吸烟是导致肺癌的主要风险,但并非所有吸烟人群都会罹患肺癌。个体遗传易感性是肺癌形成的一个重要因素,从而决定了个体在肿瘤中的差异性。DNA 修复基因系统在维护吸烟等致癌剂所致的基因突变、减少肺癌的发生几率方面具有重要意义。DNA 修复缺陷可能导致遗传物质的不稳定及癌变的发生,因此 DNA 修复基因的单核苷酸多态性可能与吸烟相关性肺癌的发病风险相关。本课题组 Deng 等^[9]采用病例对照研究方法,调查了 315 非小细胞肺癌患者及 315 名年龄及性别相互匹配的健康人群,该研究分析 *ATM*、*ERCC1*、*APE1*、*iASPP* 等基因多态性在肺癌与健康人群的分布情况,以阐明这些基因在肺癌发病过程中的作用。结果显示 *ERCC1* 基因 T/T 纯合基因型(Asn118Asn)能明显增加肺癌的发病风险(校正 OR=2.44;95%CI:1.13~5.28;P=0.023),特别是对腺癌病理亚型(校正 OR=3.18)和小细胞肺癌(校正 OR=6.08);而 *iASPP*(A67T)基因位点中,携带至少一个 T 等位基因(A/T 或 T/T)型吸烟人群更容易发生肺癌(95%CI:1.07~2.84,P=0.026);*APE1* (Asn148Glu)位点中携带 G 等位基因对肺癌发病具有保护性作用。研究结果显示 *ERCC1* 的 Asn118Asn 位点,*iASPP* 的 A67T 位点及 *APE1* 的 Asn148Glu 位点的可能与肺癌的早期发生及特定肺癌的病理类型相关,检测这些标志物可以用于筛查部分肺癌高危

人群^[9,10]。

在上述研究中,研究团队率先报导了上述基因与各病理亚型的肺癌及吸烟情况等相关性。在临床实际应用过程中,通过检测这些肿瘤标志物,对重度吸烟人群,尤其是高表达这一高发病风险的人群进行劝导戒烟及加强体检等医学干预措施,将有助于肺癌的预防与早期诊断,将患者治疗窗口期提前,改善患者预后。

1.2 非吸烟人群中 *COMT*、*PLCH1* 和 *CYP17A1* 基因多态性与肺癌

尽管吸烟是非小细胞肺癌的高危因素,然而在实际工作中,往往发现有相当部分肺癌患者从未有吸烟史。基因多态性可能是决定肺癌易感性的一个重要因素。本课题组成员研究了 *COMT*、*PLCH1*、*CYP17A1* 等基因的多态性与非吸烟肺癌患者的发病相关性^[11]。研究收集 200 例患者(女性 65 例,男性 135)和 200 名健康对照(女性 76 名,男性 124 名),均为中国汉族人,患者及对照组的平均年龄分别为 57.64 岁(33~77 岁)和 56.66 岁(33~80 岁),确认患者及健康人群均无吸烟史,且两组的性别及年龄均无显著性差异。采用 PCR 及单碱基扩增的方法,扩增反应进行后,对扩增反应产物进行纯化并上样到 384-孔光谱生物芯片进行检测。结果发现 *COMT* rs4680 位点 G 基因型在非小细胞肺癌中与对照相比具有显著性差异(P=0.04),且在腺癌中该差异同样存在(P=0.02)。*PLCH1* rs181696 A 基因型的发现频率在鳞状细胞癌中明显高于对照组(P=0.02)。*COMT* rs4680 位点 G/G 纯合型及 *PLCH1* rs181696 位点 A/A 纯合型与肺腺癌及鳞状细胞癌密切相关(OR 值分别为 0.61 和 2.01)。在该研究中,我们发现 *COMT* rs4680 单核苷酸多态性(SNP)能够显著降低非小细胞肺癌,特别是腺癌的发病风险,这提示该 SNP 位点对肺癌发病具有保护作用。此外,*PLCH1* rs181696 单核苷酸多态性能显著增加鳞状细胞肺癌的发病风险,这提示该位点多态性是鳞状细胞肺癌的一个发病因素。

非吸烟人群的肺癌发病与吸烟型肺癌的分子致癌途径截然不同^[13]。然而,对非吸烟人群的发病风险目前仍无统一认识。上述研究利用 SNP 技术对非吸烟人群上述基因的基因型与发病情况进行了系统研究,证实了汉族人群中上述基因位点在健康人群及

肿瘤患者的分布频率,阐明了各基因多态性与肺癌及其亚型之间的关系,对非吸烟人群肺癌发病风险的筛查具有一定指导意义。

2 肺癌早期诊断研究及相关研究技术

2.1 低分子蛋白质及小分子多肽与肺癌早期诊断

课题组的研究成员取肺癌患者及年龄、性别匹配的健康志愿者对照组的血清标本进行实验,应用 SELDI-TOF-MS 技术及 WCX2 磁珠检测各血清标本构建血清蛋白指纹图谱,应用 Biomarker Wizard 和 SPSS 13.0 软件分析数据并建立诊断模型,并评价各诊断模型对肺癌的诊断价值。自主建立了 MALDI-TOF 联合纳米磁珠研究血清多肽谱的定量技术体系,初步筛选出对非小细胞肺癌具有较好诊断价值的差异蛋白峰 3268,2768,3403,7763,5928,9498 (m/z)等,并建立了相应的诊断模型,鉴定了 7763 和 5928 差异蛋白峰^[14]。这一研究与 CT 引导下应用同轴技术经皮肺内小结节穿刺活检、痰细胞学检测等技术相结合在浙江省肿瘤医院及国内多家三甲医院使用,对提高早期肺癌的诊断具有一定指导意义^[14,15]。

2.2 一种在允许转录背景差异下寻找差异表达基因统计学框架方法确认

基因和蛋白的表达模式决定了包括正常和恶性细胞在内的所有细胞的生物学行为。普遍认为,基因的异常表达是细胞增殖、凋亡缺陷、局部侵袭和转移等各种细胞恶性表型的基础。mRNA 分子表达谱技术可进行更早期和更准确的诊断检测,可以作为传统病理诊断和分型的辅助工具,也可用于评估预后,并可指导化疗、放疗、手术以及常规或靶向药物等治疗方式的选择。此外,分子表达谱还可丰富分子生物学所获得的信息,可以更好地解释肺癌的发生,推断各种有关肺癌的假说从而进行更深入的基础实验研究。然而,由于转录背景差异的实际存在,不同的实验室之间、不同实验批次会产生大量不同的实验数据,如何在海量信息中把握并确定在恶性肿瘤细胞中稳定表达差异基因或信号通路,是亟需解决的一个问题。

为了解决这一技术课题,本研究组建立了从血清或血浆中提取 miRNA 的简便方法,并获得国家发

明专利授权(ZL 2010 1 0253904.7)。提出采用新的统计学框架方法,在允许转录背景存在差异的情况下,确认肿瘤表达差异基因^[16]。这一理念的提出,可以有效地解决生物芯片信息量大,各研究背景基因差异大无法进行有效地寻找肿瘤发病重复性相关基因及其介导的信号通路异常等问题,从而实际工作中,可在冗杂的研究中更有效地寻找并确定肿瘤治疗靶标,提高了各不同实验室研究的可比性和研究效率。申请团队创新性提出采用新的统计学框架方法,在允许转录背景存在差异的情况下,确认肿瘤表达的稳定差异基因。

3 肺癌的个体化治疗

3.1 血浆纤维蛋白原作为可手术的非小细胞肺癌术后的预后指标

早期肺癌的首选治疗方式是手术,一般认为肿瘤细胞的分化程度、原发灶的大小及肿瘤脉管浸润是非小细胞肺癌的不良预后因素。目前,针对早期肺癌,尤其是 I B 期以下肺癌术后辅助治疗仍存在争议。很多学者已经利用生物芯片技术聚类分析试图对早期肺癌患者的预后进行预测,然而,生物芯片技术的重复性差、实验设备价格昂贵等因素限制了其临床实际应用^[17,18]。确立简单、有效的预后指标对临床实际工作具有重要意义。

我们的研究团队研究^[19]显示可手术的非小细胞肺癌患者血浆中过表达纤维蛋白原患者其临床预后不良,其对临床实践中 I a 期及 I b 期患者的术后治疗方案选择具有重要提示意义。在高表达纤维蛋白原的早期肺癌患者中,术后辅助化疗显得尤为必要;同样,对于正常表达纤维蛋白原的肿瘤患者,其采用的后续治疗方式更倾向于密切随访。通过这一方法的确立,可以指导临床医师有的放矢,既可使部分预后不良的早期患者及时得到必要的术后巩固治疗,也可使正常表达纤维蛋白原的预后良好患者避免遭受化疗的痛苦及治疗相关风险,节约了医疗资源。

3.2 非小细胞肺癌中 DNA 修复基因多态性与放化疗敏感性

放化疗是非小细胞肺癌局部晚期的标准治疗方案,临床实践显示患者间的预后具有明显的个体差异性。放化疗的主要抗癌效应是通过破坏肿瘤细胞

的基因结构,从而导致肿瘤细胞凋亡坏死。DNA 修复基因能够修复突变或破坏的 DNA,从而维护基因组的稳定性。本研究团队以晚期不能手术治疗的、接受过放化疗治疗、有可测量病灶的非小细胞肺癌患者为研究对象,采用 TaqMan-MGB 探针,等位基因特异性实时荧光定量 PCR 法,检测患者外周血中 DNA 修复相关基因单核苷酸多态性(SNP),分析这些基因的 SNP 与放化疗疗效及总生存的关系^[20]。该研究收集了 315 对非小细胞肺癌患者和正常人抗凝外周血,提取有核细胞 DNA,采用 TaqMan 探针基因分型技术共检测了 5 个基因 6 个位点,它们分别是 *ERCC1* (Asn118Asn)、*XRCC1* (Arg194Trp)、Arg399Gln、*APE1* (Asn148Glu)、*ATM*(A60G)和 *iASPP*(A67T)。其中,230 例晚期非小细胞肺癌患者(临床分期ⅢA~Ⅳ)临床资料完整。研究发现 *ERCC1* 和 *iASPP* 基因的单核苷酸多态性与非小细胞肺癌化疗疗效或联合放化疗疗效密切相关;DNA 修复或凋亡相关基因的遗传变异可能影响非小细胞肺癌化疗或放疗疗效。该研究的完成为从基因水平预测放疗敏感性提供了新的方法和思路。非小细胞肺癌患者在治疗前先检测这些 DNA 修复相关基因的基因型,预测疗效可指导临床治疗方案的选择,例如对放射预测不敏感的患者,可以从放射物理学技术,如放射增敏剂的使用、与化疗药物同步治疗等角度来提高放疗敏感性,有效提高非小细胞肺癌局部控制率;对铂类药物不敏感的患者,可以考虑改用非铂类药物等。

3.3 GNAS1 单核苷酸作为晚期非小细胞肺癌姑息性化疗敏感及预后指标

晚期非小细胞肺癌预后不佳,以铂类为基础双药化疗方案是其标准治疗方案之一。在临床上,患者治疗疗效及预后存在显著性个体差异。本研究团队发现:参与凋亡信号转导的蛋白分子 *GNAS1* 基因的多态性可能是引起治疗及预后差异的原因之一。该研究收集 131 例化疗前晚期患者外周血白细胞 DNA,采用限制性内切片多态性分析(RFLP)方法对患者 *GNAS1* 基因型及其临床预后进行分析。CC、CT 及 TT 基因型频率分别为 25.2%、47.4% 和 26.7%。TT 基因型患者的总生存期及无进展生存期明显优于 CT 或 CC 基因型患者。在多因素回归分析中,*GNAS1* T393C 在校正了临床病理因素后,可作为

独立的预后因素($P<0.05$)。

4 小结及展望

浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室以丰富的临床资源和重点实验室建立的基因组、蛋白质组和生物芯片等技术平台为基础,以现代生物技术与临床研究相结合为手段,通过建立肺癌临床标本库和资料库以及临床试验网络,研究开发出针对肺癌的易感人群筛选、临床前期发现、早期病例诊断及指导个体化治疗相关的特异性分子标志物,已获得多项拥有自主知识产权的发明专利,并研发了一系列用于评估放化疗敏感性的诊断试剂盒。通过建立肺癌的分子分型标准,研究制定了可用于指导临床实践的规范化、个性化和综合治疗的关键技术与方案。通过“肺癌早期诊断及个体化治疗”系列项目的实施,使浙江省逐步实现肺癌防治从疾病晚期推移至早期乃至疾病发生之前的转移,业已实现肺癌分子分型或个体化治疗方面有某些“点”上突破,在浙江省乃至国内起到示范和带动作用;以标准化临床资源库的建设为主要内容,实现现代生物技术与临床相结合的“面”上的系统部署,开创了浙江省分子医学新时代;显著提升浙江省肺癌临床诊疗的技术水平,为实现浙江省肺癌控制目标奠定了坚实的基础。

参考文献:

- [1] Siegel R,Naishadham D,Jemal A. Cancer statistics,2013 [J]. CA Cancer J Clin,2013,63(1):11-30.
- [2] Peng M,Yang Z,Zhang H,et al. GT198 splice variants display dominant-negative activities and are induced by inactivating mutations[J]. Genes Cancer,2013,4(1-2):26-38.
- [3] Mao WM,Shu Y,Chen WY.The trend on morbidity and mortality of lung cancer during recent 30 years in Zhejiang province[J].China Cancer,2002,11(4):216-217. [毛伟敏,舒跃,陈万源. 浙江省肺癌发病与死亡近 30 年变化趋势[J].中国肿瘤,2002,11(4):216-217.]
- [4] Li BQ,You J,Chen L,et al. Identification of lung-cancer-related genes with the shortest path approach in a protein-protein interaction network[J]. Biomed Res Int,2013,2013:267375.
- [5] Mao WM. Treatment and strategy for non-small-cell lung cancer in elder patients [J].Journal of Chinese Oncology,

- 2005,11(1):1-4.[毛伟敏.老年非小细胞肺癌治疗中的问题及对策[J].肿瘤学杂志,2005,11(1):1-4.]
- [6] Lu BZ,Mao WM,Wang CL,et al.Review of traditional Chinese medicine treating radiation pneumonitis [J].Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine,2013,31(3):533-535.[芦柏震,毛伟敏,王春雷,等.放射性肺炎的中医药防治研究进展 [J]. 中华中医药学刊,2013,31(3):533-535.]
- [7] Lu BZ,Mao WM,Hou GL,et al. Progress in the research on middle-advanced stages lung cancer [J].Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine,2012,30(9):1980-1982.[芦柏震,毛伟敏,侯桂兰,等.中晚期肺癌治疗的研究进展 [J]. 中华中医药学刊,2012,30(9):1980-1982.]
- [8] Zhou LF,Mao WM,Lu BZ,et al. Clinical effect observation of Qingfei Mixture combined with chemotherapy of GP regimen in treating elderly patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine,2012,27(9):2475-2477. [周俐斐,毛伟敏,芦柏震,等.清肺合剂联合化疗治疗老年晚期非小细胞肺癌临床疗效观察 [J]. 中华中医药学刊,2012,27(9):2475-2477.]
- [9] Deng Q,Sheng L,Su D,et al. Genetic polymorphisms in ATM,ERCC1,APE1 and iASPP genes and lung cancer risk in a population of southeast China [J].Med Oncol,2011,28(3):667-672.
- [10] Eckert MA,Vu PQ,Zhang K,et al. Novel molecular and nanosensors for in vivo sensing[J]. Theranostics,2013,3(8):583-594.
- [11] Zhang Y,Hua S,Zhang A,et al. Association between polymorphisms in COMT,PLCH1,and CYP17A1,and non-small-cell lung cancer risk in Chinese nonsmokers[J]. Clin Lung Cancer,2013,14(1):45-49.
- [12] Ren S,Chen X,Kuang P,et al. Association of EGFR mutation or ALK rearrangement with expression of DNA repair and synthesis genes in never-smoker women with pulmonary adenocarcinoma[J]. Cancer,2012,118(22):5588-5594.
- [13] Kim HR,Lim SM,Kim HJ,et al. The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma [J]. Ann Oncol,2013,24(9):2364-2370.
- [14] Zheng ZG,Yu HQ,Ling ZQ,et al. Comprehensive profiling of the low molecular weight proteins and peptides in weak cation exchange beads human serum retentate [J]. Protein Pept Lett,2011,18(5):498-506.
- [15] Xu HM,Mao WM. A comparison of applications with three cytopathological methods for sputum [J].China Cancer,2011,20(1):71-73. [徐海苗,毛伟敏.痰液细胞病理学三种不同检查方法的应用比较[J].中国肿瘤,2011,20(1):71-73]
- [16] Ling ZQ,Wang Y,Mukaiisho K,et al. Novel statistical framework to identify differentially expressed genes allowing transcriptomic background differences[J]. Bioinformatics,2010,26:1431-1436.
- [17] Botling J,Edlund K,Lohr M,et al. Biomarker discovery in non-small cell lung cancer: integrating gene expression profiling,meta-analysis,and tissue microarray validation[J]. Clin Cancer Res,2013,19:194-204.
- [18] Yao J,Zhao Q,Yuan Y,et al. Identification of common prognostic gene expression signatures with biological meanings from microarray gene expression datasets [J]. PLoS One,2012,7:e45894.
- [19] Sheng L,Luo M,Sun X,et al. Serum fibrinogen is an independent prognostic factor in operable nonsmall cell lung cancer [J]. Int J Cancer,2013,
- [20] Su D,Ma S,Liu P,et al. Genetic polymorphisms and treatment response in advanced non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer,2007,56(2):281-288.
- [21] Xie FJ,Zhao P,Kou JY,et al.The T393C polymorphism of GNAS1 as a predictor for chemotherapy sensitivity and survival in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gemcitabine plus platinum[J]. Cancer Chemother Pharmacol,2012,69(6):1443-1448.