

· 临床探讨 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.13.035

直肠癌化疗对 5-氟尿嘧啶耐药者二氢嘧啶脱氢酶基因表达水平及突变的影响*

赵雪晴¹, 李全², 钱世宁², 李鹏飞^{2△}

(1. 江苏省南京市妇幼保健医院 210029; 2. 江苏省中医院, 南京 210029)

摘要:目的 研究直肠癌化疗对 5-氟尿嘧啶敏感及耐药外周血单个核细胞二氢嘧啶脱氢酶基因表达量及突变的影响, 探讨该基因表达量及突变与化疗药物耐药的相关性。方法 收集 50 例进展期使用 5-氟尿嘧啶化疗的直肠癌患者外周血, 其中化疗敏感患者 22 例, 化疗耐药患者 28 例, 实时定量 PCR 及测序法分别检测所有患者外周血中二氢嘧啶脱氢酶基因表达量及突变(A74G、T85C、A1627G、T1896C、IVS14+1G>A、14G1A、G2194A)情况。结果 化疗敏感组二氢嘧啶脱氢酶基因的表达水平较化疗耐药组低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 但检测 28 例化疗耐药患者二氢嘧啶脱氢酶基因暂未发现突变。结论 二氢嘧啶脱氢酶的表达程度与化疗敏感性相关, 试验暂未发现二氢嘧啶脱氢酶基因突变病例。

关键词:二氢嘧啶脱氢酶; 5-氟尿嘧啶; 化疗; 直肠癌**中图分类号:**R735.3+7**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2018)13-1980-03

抗癌药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)是肿瘤患者化疗药物中普遍使用的。但是, 5-FU 在患者身上的疗效及毒性有显著差异, 尤其是在毒性方面不同个体差异较大, 严重情况会出现致死性的腹泻、骨髓抑制等^[1-2]。机体内的 5-FU 有 80%~85% 经过肝脏的二氢嘧啶脱氢酶(DPD)代谢成为无活性成分排出体外^[2]。研究表明 5-FU 的不良反应与其代谢和清除的限速酶 DPD 活性密切相关^[3]。随着分子诊断技术的迅速发展, 对参与 5-FU 分解代谢的 DPD 编码基因的重要位点进行测序, 找出能够指导临床化疗的关键突变, 为 5-FU 个体化用药提供科学依据。本研究拟检测使用 5-FU 化疗的患者外周血单个核细胞 DPD 基因表达水平及突变情况, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 2 月至 2016 年 6 月在江苏省中医院肿瘤科住院的 50 例直肠癌患者, 经病理证实为结直肠癌, 治疗均使用 5-FU, 其中化疗敏感组 22 例, 男 14 例、女 8 例, 中位年龄 63.2 岁; 化疗耐药组 28 例, 男 18 例、女 10 例, 中位年龄 62.1 岁。两组患者的年龄和性别等一般资料比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。所有受试者均签署临床试验知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞分离 按照说明书采用 Ficoll 分离液分离所有患者外周血单个核细胞。

1.2.2 实时定量 PCR 检测 DPD mRNA 的表达 采

用 Trizol 法提取总 RNA, 使用 Eppendorf 核酸蛋白检测仪测定 RNA 水平, 随后反转录成 cDNA。mRNA 反转录反应体系(20 μ L): 5 \times PrimescriptTM 缓冲液 4 μ L, PrimescriptTM RT Enzyme Mix I 1 μ L, Oligo dT Primer 1 μ L, Random 6 mers 4 μ L, RNase Free H₂O 10 μ L。反转录反应条件: 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 5 min。使用 TaKaRa 公司荧光定量检测试剂盒, 按照试剂说明书进行实时定量 PCR。PCR 反应体系(20 μ L): 2 \times SYBR green 染料 10 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 模板 cDNA 1 μ L, RNase Free H₂O 7 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 扩增 40 个循环; 在延伸步骤中采集荧光信号。DPD 上游引物(5'-3'): AGG ACG CAA GGA GGG TTT G, 下游引物(5'-3'): GTC CGC CGA GTC CTT ACT GA。使用美国 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪进行扩增。结果分析用 SDS software version 2.0, 分析条件设置: 根据分析后图像调节 Baseline 的 start 值、stop 值及 Threshold 的 value 值, 在 analysis 菜单下选择 analyze 自动分析结果。 β -actin 作为内参, 采用相对定量法($2^{-\Delta\Delta CT}$)计算 DPD mRNA 的相对表达量。

1.2.3 测序法检测 DPD 突变 检测化疗耐药组 28 例患者外周血单个核细胞中 DPD 突变情况。

1.2.3.1 DNA 制备 加入 600 μ L 核裂解缓冲液重新悬浮细胞。加入 40 μ L 10% SDS, 混匀。再加入 10 μ L 20 mg/mL 的 Proteinase K, 5 μ L 10 mg/mL

* 基金项目: 江苏省中医院院级青年项目(Y15006); 江苏省中医院高峰学术人才培养工程(y2018rc38)。

△ 通信作者, E-mail: lipengfei0504@126.com。

的 RNase A, 混匀, 50 °C 水浴过夜。加入 200 μL 5.3 mol/L 的 NaCl 溶液, 混匀, 13 000 r/min 4 °C 条件下离心 30 min。转移上清液到另一管中, 加一倍体积 4 °C 预冷的异丙醇, 充分混匀。可见絮状 DNA 析出。13 000 r/min 4 °C 条件下离心 15 min, 弃上清液。用 75% 的乙醇洗涤沉淀 2 次, 弃上清液, 室温晾干。加入适量 TE 溶液溶解沉淀, -20 °C 长期保存备用。

1.2.3.2 PCR 及测序 采用中山达安有限公司 DPD 点突变检测试剂盒。以影响 DPD 活性较大的点突变为靶区域, 设计特异性引物, 采用 PCR 体外扩增法结合测序技术, 检测对 DPD 活性影响较大的 A74G、T85C、A1627G、T1896C、IVS14 + 1G > A、14G1A、G2194A 点突变。PCR 反应体系如下: Big-Dye 1.5 μL , Primer 5 pmol, DNA 40~80 ng, H₂O 至 10 μL 。采用 ABI 7500 实时定量 PCR 仪。反应条件如下: 96 °C 2 min, 96 °C 30 s, 55 °C 40 s, 35 个循环; 72 °C 50 min, 72 °C 8 min, 4 °C 保存。PCR 反应产物的纯化: 每个样品加入 31 μL 乙酸铵 (30 μL 95% 乙醇, 1 μL 醋酸铵), 充分振荡混匀; 15 °C, 4 000 r/min 离心 45 min; 将样品倒置, 下面垫上吸水纸, 放入离心机倒甩, 转速不要超过 300 r/min; 每个样品再加入 50 μL 75% 乙醇; 15 °C, 4 000 r/min, 离心 25 min; 将样品倒置, 下面垫上吸水纸, 放入离心机倒甩, 转速不要超过 300 r/min; 避光晾干 (约 30 min), 每个样品加入 3 μL 上样缓冲液。

1.3 统计学处理 所有检测数据均采用 SPSS 19.0 统计软件分析处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组 DPD 基因表达水平 实时定量 PCR 结果表明, 所有患者外周血单个核细胞中均可检测到 DPD mRNA 的表达。化疗耐药组 DPD mRNA 相对表达水平为 0.093 ± 0.020 , 化疗敏感组 DPD mRNA 相对表达水平为 0.058 ± 0.010 , 化疗敏感组 DPD mRNA 水平明显低于化疗耐药组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 DPD 基因突变情况 5-FU 治疗敏感及耐药患者外周血单个核细胞中均未检测到 DPD 突变位点。

3 讨 论

5-FU 是一种治疗癌症的嘧啶类似物的药物, 是用于治疗直肠癌的有效方案^[4-6]。但有研究表明, DPD 的活性可能会导致 5-FU 的药理性质变异^[7-8]。DPD 是 5-FU 分解、代谢和清除的限速酶, DPD 活性降低或缺乏与 5-FU 的降解速度下降呈正相关, 因此在治疗使用 5-FU 引发严重的不良反应时, DPD 活性越低对 5-FU 的不良反应程度越高^[9]。

众多研究表明 DPD 表达水平与 5-FU 的化疗疗效密切相关, DPD 表达水平越高, 化疗效果越差^[10]。本研究发现采用 5-FU 化疗的患者中化疗敏感组 DPD mRNA 表达水平较化疗耐药组低且差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 因此临床上在化疗前对 DPD 水平进行测量, 可减少和避免不良反应的存在, 更利于临床进行个体化治疗。

同时有研究表明个体 DPD 活性差异与 DPD 基因某些位点的遗传多态性相关^[11]。有学者对 1 例化疗后出现严重 5-FU 毒性致死女性的 DPD23 个外显子进行测序, 结果发现 1 个新的 DPD 基因位点 T464A 等位基因发生频率约为 0.2%^[12]。同时有学者验证 15 种已知的 DPD 基因序列, 新发现 3 种: G1218A、C3067T 和 G1236A, 但发生频率很低^[13]。临床和实验研究已经表明 DPD 活性下降与 DPD 基因多态性相关^[14]。国内目前对此研究较少, 因控制 DPD 多态性活性的分子机制较为复杂, 许多化疗后出现严重毒性者并未检测到 DPD 基因突变^[15]。本次试验选取几个已报道的突变位点进行检测, 对 5-FU 耐药的患者检测也暂未发现 DPD 基因突变现象。通过实时定量 PCR 进行扩增及测序, 测定 DPD 基因位点突变情况。本研究发现 5-FU 治疗敏感及耐药患者均未检测到突变, 与国内学者报道的结果相同^[16-18]。

总的来说, DPD 的基因表达水平与化疗敏感性相关。相信随着人们对 DPD 研究的深入, 新的 DPD 突变位点的发现将有助于预测 5-FU 应用者的毒性风险和疗效, 可能成为指导临床个体化治疗的重要参考指标。

参考文献

- [1] AL-KHATEEB M, AWIDI A, AL-HADIDI K, et al. Low incidence of the DPD IVS14 + 1G > A polymorphism in Jordanian breast and colorectal cancer patients[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18 (6): 1651-1654.
- [2] 张铤, 孙步彤, 卢振霞. 二氢嘧啶脱氢酶基因单核苷酸多态性与结直肠癌患者 5-FU 化疗毒副作用的关系[J]. 吉林大学学报, 2011, 37(4): 707-711.
- [3] 姜超, 孙正, 许哲, 等. 5-FU 相关代谢酶表达与胃癌化疗敏感性的关系[J]. 南京医科大学学报, 2011, 12(31): 1815-1819.
- [4] HOLMA R, KORPELA R, SAIRANEN U, et al. Colonic methane production modifies gastrointestinal toxicity associated with adjuvant 5-fluorouracil chemotherapy for colorectal cancer[J]. J Clin Gastroenterol, 2013, 47(1): 45-51.
- [5] LI J, HOU N I, FARIED A, et al. Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model[J]. Eur J Cancer, 2010,

46(10):1900-1909.

[6] MILANO G. Highlight on DPYD gene polymorphisms and treatment by capecitabine [J]. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 2016, 76(245): S30-S34.

[7] LUNENBURG C A, HENRICKS L M, GUCHELAAR H J, et al. Prospective DPYD genotyping to reduce the risk of fluoropyrimidine -induced severe toxicity: Ready for prime time [J]. Eur J Cancer, 2016, 54: 40-48.

[8] 苏洋, 张俊, 朱正纲, 等. 氟尿嘧啶类药物的疗效预测标志物的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(2): 170-176.

[9] ZHAO H Y, ZHAO Y Y, GUO Y, et al. Clinical significance of the thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, and thymidine phosphorylase mRNA expressions in hepatocellular carcinoma patients receiving 5-fluorouracil-based transarterial chemoembolization treatment[J]. Onco Targets Ther, 2013, 6(3): 811-818.

[10] TECZA K, PAMULA-PILAT J, LANUSZEWSKA J, et al. Genetic polymorphisms and response to 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer patients [J]. Oncotarget, 2016, 7(41): 66790-66793.

[11] GONZÁLEZ-PERERA I, GUTIÉRREZ-NICOLÁS F, NAZCO-CASARIEGO G J, et al. 5-fluorouracil toxicity in the treatment of colon cancer associated with the genetic polymorphism 2846 A>G (rs67376798)[J]. J Oncol Pharm Pract, 2017, 23(5): 396-398.

[12] 徐雅莉, 孙强, 周易冬, 等. 二氢嘧啶脱氢酶编码基因 DPYD* 5 及 * 9A 突变频率的研究[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2009, 16(6): 499-502.

[13] LEE A M, SHI Q, PAVEY E, et al. DPYD variants as predictors of 5-fluorouracil toxicity in adjuvant colon cancer treatment (NCCTG N0147) [J]. J Natl Cancer Inst, 2014, 106(12): 456-461.

[14] 王勇, 徐曦, 王慧, 等. 结直肠癌患者 DPYD 基因多态性与 5-FU 毒性反应相关的 Meta 分析[J]. 山东医药, 2014, 54(41): 18-21.

[15] FALVELLA F S, CHELI S, MARTINETTI A, et al. DPD and UGT1A1 deficiency in colorectal cancer patients receiving triplet chemotherapy with fluoropyrimidines, oxaliplatin and irinotecan[J]. Br J Clin Pharmacol, 2015, 80(3): 581-588.

[16] 吴月琴, 白文启, 李灵敏, 等. 结直肠癌中 5-氟尿嘧啶代谢酶的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2015, 31(6): 619-623.

[17] 蔡讯, 方珏敏, 薛鹏, 等. 二氢嘧啶脱氢酶基因 IVS14+1 多态性联合氟尿嘧啶血药浓度检测在预测及减少结直肠癌氟尿嘧啶为基础化疗不良反应中的作用[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(2): 130-136.

[18] 王志鹏, 张凤, 高守红, 等. 卡培他滨个体化治疗结直肠癌研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(9): 885-891.

(收稿日期:2018-01-21 修回日期:2018-05-11)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.13.036

慢性疾病轨迹模式护理在白血病患者中的应用效果

李先梅¹, 张友山¹, 李敏¹, 蔡晓美^{2△}

(湖北省荆州市第一人民医院:1. 血液科;2. 消化内科 434000)

摘要:目的 探讨慢性疾病轨迹模式护理在白血病患者中的护理效果。方法 收集来该院就诊的白血病患者 84 例为研究对象,分为研究组和对照组,两组患者均给予常规护理,研究组患者在此基础上给予慢性疾病轨迹模式护理,对两组患者并发症的发生率及护理效果进行比较。结果 干预后研究组患者的 SDS 和 SAS 评分明显低于对照组 ($P < 0.05$),而研究组患者的 SF-36 及 TASHP 评分均明显高于对照组 ($P < 0.05$);研究组患者及家属对白血病相关知识的总掌握率和对白血病护理的满意度均明显高于对照组 ($P < 0.05$);干预期间研究组患者各种并发症的发生率均明显低于对照组 ($P < 0.05$)。结论 慢性疾病轨迹模式护理能明显减轻白血病患者焦虑、抑郁情绪,提高患者对治疗的依从性和对护理的满意度,降低患者的并发症及提高患者的生活质量,在白血病患者中的效果显著。

关键词:慢性疾病轨迹模式护理; 白血病; 焦虑; 抑郁

中图分类号: R733.7; R473.73

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)13-1982-03

白血病是人类造血干细胞恶性克隆性的一种疾病,是由于白血病细胞的失控性增殖、分化障碍和凋亡受阻等原因所导致的白血病细胞在骨髓中增殖并累及周围的组织与器官^[1]。近年来,白血病的发病率

随着人们生活环境及生活方式的改变有明显的上升趋势^[2]。有研究结果显示在我国白血病患者人群很庞大,其发病率在恶性肿瘤中居第 6 位,白血病患者最常见的临床表现有出血、贫血、发热及感染^[3]。慢

△ 通信作者, E-mail: hubeili1234@163.com.