

结直肠癌中伊立替康化疗疗效及毒性预测分子标志物

孙志伟 贾军 张晓东*

北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所内科, 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室 (北京 100142)

【摘要】 目的: 分析结直肠癌中伊立替康化疗疗效及毒性预测分子标志物。方法: 收集国内外发表的文献并对伊立替康作用机制、化疗的疗效和不良反应等进行分析。结果与结论: 结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一, 化疗在其综合治疗中发挥着重要的作用。由于肿瘤的异质性以及患者个体的差异性, 不同的患者对于化疗的疗效和不良反应差异很大, 因此寻找化疗药物的潜在分子标志物是很重要的, 可以为患者制定个体化的治疗方案。

【关键词】 结直肠癌; 伊立替康; 分子标志物

【中图分类号】 R735.37

【文献标志码】 A

doi:10.3969/j.issn.1672-3384.2014.02.003

Efficacy and Predictive Molecule Markers Associated Toxicity of Irinotecan for Colorectal Cancer

SUN Zhi-wei, JIA Jun, ZHANG Xiao-dong. Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), The VIP-II Gastrointestinal Cancer Division of Medical Oncology Department, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China

【Abstract】 Objective: To analyze efficacy and predictive molecule markers associated toxicity of irinotecan for colorectal cancer. **Methods:** We collected related articles and analyze mechanism, efficiency, toxicity of chemotherapy associated irinotecan. **Results and Conclusion:** Colorectal cancer is one of the most common malignant disease worldwide. And chemotherapy plays an important role in its comprehensive treatments. Because of the tumor heterogeneities and individual differences of patients, the efficiency and toxicity of chemotherapy varied across individuals. Therefore, identifying potential predictive molecules of certain cytotoxic agents is of much helpful to fertilize individualized treatment for patients.

【Keywords】 Colorectal Cancer; Irinotecan; Molecular markers

结直肠癌是世界第三常见恶性肿瘤, 全球每年有 100 余万新发病例, 其中 20% 的患者在诊断时即出现了远处转移, 对于此类晚期患者, 化疗是主要治疗方法^[1]。近年来, 在氟尿嘧啶的基础上, 一些新型细胞毒类药物如奥沙利铂、伊立替康的加入使结直肠癌的化疗有了很大的进步, 患者中位生存期由 10~12 个月延长至 14~16 个月, 靶向药物的联合应用使患者生存期又有了进一步的延长^[2]。但是, 在药物疗效

及毒副作用方面个体间差异很大, 寻找疗效及毒副作用预测标志物指导患者的个体化治疗成为未来的发展方向。

1 伊立替康的作用机制及其关键酶

伊立替康 (CPT-11) 是一种半合成的可溶性的喜树碱衍生物, 在体内羧酸酯酶的作用下可转化为活性代谢产物 7-乙基-10-羟基喜树碱 (SN-38), 进而通过抑制拓扑异构酶 1 而达

* 通讯作者: 张晓东 E-mail: zhangxd0829@163.com

到干扰 DNA 复制的目的, SN-38 在肝内尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶 1A1 (UGT1A1) 的作用下代谢为无活性产物 SN-38G。

可见, 拓扑异构酶 1 是 CPT-11 的靶酶, 而 UGT1A1 是代谢过程中的关键酶, 它们的基因多态性与 CPT-11 疗效及不良反应密切相关。

2 拓扑异构酶 1 (Topo-1)

拓扑异构酶 1 (Topo-1) 在 DNA 的复制和转录中起重要作用, 它能在 DNA 超螺旋松解过程中诱导单链断裂, 而 CPT-11 的活性代谢产物 SN-38 可与 Topo-1、DNA 形成复合物, 从而使断裂的 DNA 单链不能重新接合, 最终抑制了 DNA 复制^[3]。很多基础研究表明, Topo-1 的表达与结直肠癌细胞系对 CPT-11 的敏感性呈正相关。但一些小型非随机的临床研究未能证实上述结论。近期一项大型随机临床研究 (FOCUS) 表明 Topo-1 的过表达与患者 CPT-11 疗效好明显相关。Braun 等^[4] 在 1313 例结直肠癌患者中用免疫组织化学法检测了 Topo-1 的表达水平 (低 <10%; 中等 10%~50%; 高 >50%), 其中在 Topo-1 表达水平低的患者中, CPT-11 未使患者无进展生存期 (PFS) 延长 [风险比 (HR) 0.98, 95% CI: 0.78 ~ 1.22], 但 Topo-1 表达水平高者明显从 CPT-11 的治疗中获益 (HR 0.48 ~ 0.70, $P = 0.001$)。

3 羧酸酯酶

羧酸酯酶 (carboxylesterase, CES) 是 CPT-11 转化为活性代谢产物 SN-38 的关键酶, 基础研究证实 CES 活性与 CPT-11 敏感性有关, 其中 CES 活性低的细胞系对 CPT-11 的耐药性较强, 推测这可能是由于 CPT-11 向 SN-38 的转化过程受阻从而导致细胞对 CPT-11 产生了耐药。

CES 主要分布于肝脏中, 其次在中枢神经系统、小肠、胃、结肠等正常组织中的含量也较丰富, 在结肠癌细胞系中也有高水平表达, 因此它有可能在肿瘤细胞系中 CPT-11 向 SN-38 的转化中发挥一定的作用。理论上肿瘤组织中 CES 高表达则 CPT-11 疗效会更好, 但目前尚

无有关肿瘤组织中 CES 表达与 CPT-11 疗效相关性的报道。

CES 基因的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点较多, 但大多数 SNP 并不影响酶的活性或功能, 其中有一种 SNP (IVS10-88) 与 CES2 mRNA 含量降低有关。但关于 CES 基因多态性和 CPT-11 疗效的关系亦不明确, 这些都是将来的研究方向。

4 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶 1A1

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶 1A1 (UGT1A1) 是伊立替康代谢中最主要的同工酶, UGT1A1 基因中位于转录调控区的 SNP 通过影响基因转录水平而影响 UGT1A1 的活性。近年来 UGT1A1 基因多态性与结直肠癌患者中 CPT-11 疗效及不良反应的相关性是消化道肿瘤领域的研究热点之一, 其中研究最多的是 UGT1A1*28 和 UGT1A1*6 与患者不良反应的相关性。

UGT1A1*28 是由于 5' 启动子区域 “TA” 重复数目变异引起的, 野生型 (UGT1A1*1) 包括 6 个 “TA” 重复 (A (TA) 6TAA), 突变型 (UGT1A1*28) 包括 7 个 “TA” 重复 (A (TA) 7TAA), “TA” 数目的改变可引起酶活性及表达发生变化, 其中纯合突变型 TA7/7 较野生型 TA6/6 转录活性明显降低, 使 CPT-11 活性代谢产物 SN-38 显著增加, 灭活的 SN-38G 水平显著降低, 从而致腹泻^[5] 和血液毒性^[5-6] 的发生率增加。但近年来众多的临床研究结果并不完全一致。有的研究显示 UGT1A1*28 可预测患者 3 级以上粒细胞减少, Innocenti 等^[7] 在 66 例接受 CPT-11 治疗的结直肠癌患者发现, TA7/7 型患者出现 4 级粒细胞减少的比例高达 50% (3/6), TA6/7 型为 12.5% (3/24), TA6/6 型为 0% (0/29) ($P=0.001$)。有的显示 UGT1A1*28 可预测患者 3 级以上的腹泻, 而在粒细胞减少方面并无预测价值, Marcuello 等^[8] 在 95 例转移性结直肠癌中发现, TA7/7、TA6/7、TA6/6 这 3 种基因型患者发生 3 级以上腹泻的比例分别为 70% (7/10)、33% (15/45) 和 17% (7/40) ($P=0.005$), 突变型患者发生

3 级以上粒细胞减少的比例高于野生型患者, 但两者差异无统计学意义。而另有学者却认为 *UGT1A1*28* 与患者粒细胞减少和腹泻均无明显相关^[9]。为此, 有学者进行一项荟萃分析以明确 *UGT1A1*28* 与 CPT-11 毒性反应的相关性^[10], 并把 CPT-11 的剂量纳入了分析。结果表明, 当 CPT-11 为大剂量 (200~350mg·m⁻², 每 3 周 1 次) 或中剂量 (180mg·m⁻², 每 2 周 1 次) 时, TA7/7 基因型明显比 TA6/7、TA6/6 基因型发生 3 级以上粒细胞减少的风险高。如 CPT-11 剂量为 100mg·m⁻² (每周 1 次) 时, TA7/7 基因型发生 3 级以上粒细胞减少的风险比 TA6/7、TA6/6 基因型仅高 1.28 倍 (*OR* 1.28, 95% *CI*:0.42~3.91; *P*=0.63), 但 CPT-11 剂量为 250mg·m⁻² (每 3 周 1 次) 时, 两者风险却相差 8.07 倍 (*OR* 8.07, 95% *CI*:3.23~20.2; *P*<0.001)。同时此项荟萃分析还发现, *UGT1A1*28* 与 3 级以上腹泻的发生并不相关 (*P*>0.05), 且与 CPT-11 的剂量亦无明显相关 (*P*=0.04)。因此, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 推荐, 对于 *UGT1A1*28* TA7/7 基因型患者 CPT-11 起始剂量应减少 15% ~ 20%, 因为这类患者发生 3 级以上粒细胞减少的可能性较高。

需要注意的是, *UGT1A1*28* 的突变频率因地理区域不同而有差异, 在非洲裔美国人种中发生频率最高 (38%~45%), 高加索人种其次 (29%~39%), 亚洲人最低 (2%~14%)。中国人 *UGT1A1*28* 多态性频率明显低于欧美人群, 是否可作为伊立替康毒性预测指标目前尚无定论。但也有些相关研究, 如一项台湾的研究表明, *UGT1A1*28* 多态性与 3 级以上白细胞和 (或) 中性粒细胞减少明显相关^[11]。

关于 *UGT1A1*28* 与伊立替康化疗疗效的相关性目前国际上尚无统一的结论, 有学者认为 TA7/7 基因型患者疗效优于野生型患者。Toffoli 等^[12] 对 250 例行伊立替康 / 氟尿嘧啶 / 亚叶酸钙化疗的转移性结直肠癌患者进行了一项多中心回顾性研究, 分析了 *UGT1A1*28* 多态性和客观缓解率 (ORR) 及总生存期 (OS) 的关系, 结果发现 TA7/7 基因型患者的 ORR 明显高

于 TA6/6 基因型 (*OR* 0.32, 95% *CI*: 0.12~0.86), 这可用 TA7/7 基因型与 TA6/6 相比葡萄糖醛化率较低而胆指数 (CPT-11 的药物曲线下面积 × SN-38 与 SN-38G 药物曲线下面积的比值) 较高来解释, TA7/7 基因型因失活 SN-38 的能力弱, 故有效药物浓度高, 而使疗效提高。但有学者持相反意见, 认为野生型患者疗效优于突变型患者^[13], 或 *UGT1A1*28* 多态性与治疗有效率无相关性^[14-15]。总之, 目前研究重点仍是 *UGT1A1*28* 多态性与化疗不良反应的关系, 与化疗疗效的关系研究得相对较少。

*UGT1A1*6* 是在 211 位点的单核苷酸多态性, 211G>A, 在亚洲人中发生频率较高, 尤其是中国和日本人群, 而在高加索和非洲裔美国人中罕见。肠癌中关于 *UGT1A1*6* 多态性与 CPT-11 化疗不良反应相关性的研究少见, 但有很多关于在其他恶性肿瘤中两者相关性的报道^[16-17]。如 Onoue 等^[16] 检测了 135 例日本恶性肿瘤患者, 观察到 *UGT1A1*6* A/A 型发生 3 级以上粒细胞减少的风险明显增高 (*OR* 7.78, 95% *CI*:1.36~44.51)。Takano 等^[17] 发现日本宫颈癌或卵巢癌中 *UGT1A1*6* A/A、A/G 基因型与 G/G 基因型相比, 3 级以上粒细胞减少、血小板减少和腹泻的发生率均显著增高。在肠癌中关于 *UGT1A1*6* 多态性与 CPT-11 化疗疗效相关性的研究也较少, 有个别在其他肿瘤中的报道, 如 Han 等^[18] 研究显示, 在应用 CPT-11 联合顺铂化疗的 81 例进展期非小细胞肺癌患者中, *UGT1A1*6* A/A 型比 A/G、G/G 型的客观缓解率低 (*P*=0.038)。

由此看来, *UGT1A1*6* 也可能与 CPT-11 不良反应与疗效相关, 故亚洲人群中除了检测 *UGT1A1*28* 外, 还应检测 *UGT1A1*6*。

5 ABC 转运蛋白

ABC 转运蛋白的本质是跨膜蛋白, 包括 A,B,C,D,E,F,G 7 个家族, 共 49 个成员。它们在机体广泛分布, 能在 ATP 水解提供能量的情况下把相应的底物从细胞膜的一侧转运到另一侧, 在体内各种物质的转运中发挥了重要的作

用。此外在肿瘤中也存在 ABC 转运蛋白，它们能够将不同种类化疗药物泵出胞外，产生耐药性。其中 ABC 超家族中的两大成员 MDR1、ABCG2 被认为与伊立替康及 SN-38 的转运关系最为密切^[19-20]。

ABCG2 属于 ABC 家族中的半转运子，主要定位于细胞膜，基因有多种单核苷酸多态性，其中最常见的多态性位点是 C421A、G34A 以及 C376T。基础研究表明，这些基因多态性可能与细胞系中蛋白表达水平、蛋白活性及对 CPT-11 的敏感性相关，如 Morisaki 等^[21]发现，C421A 的细胞系对 SN-38 的耐药性有一定程度降低，分析这可能是由于蛋白表达水平降低，对药物泵出能力减弱，胞内药物浓度增加所致。根据这种机制，ABCG2 基因多态性便有可能影响人体内 CPT-11 的药代学及药物的疗效。但 de Jong 等^[22]对 84 个欧洲患者进行 DNA 测序后发现 ABCG2 基因 C421A 对伊立替康药动学参数并无明显影响，且尚无关于临床上 ABCG2 基因多态性与 CPT-11 疗效相关性的报道。

与 ABCG2 基因相似，MDR1 基因多态性也可改变蛋白的表达或活性，进而引起耐药^[23]。现已知 MDR1 基因有 50 余种单核苷酸多态性，其中 1236C>T、2677G>T/A 和 3435C>T 具有重要的功能意义。Han 等^[24]在一项肺癌的研究中表明 2677TT、3435TT 与 AUC_{SN-38G} 和 CL_{SN-38G} 相关，2677TT/3435TT 携带者比 2677GG/3435CC 携带者的 AUC_{SN-38G} 明显降低，这意味着 2677TT 和 3435TT 的转运活性明显增高。由此可推测携带 2677TT/3435TT 的患者临床化疗疗效会比野生型患者差。但目前对结直肠癌领域尚未见类似研究报道。

6 微卫星不稳定性

一些基础研究表明，微卫星不稳定性与伊立替康为基础的治疗敏感性相关，如 Vilar 等^[25]发现在结直肠癌细胞系中微卫星高度不稳定（MSI-H）者对 CPT-11 的敏感性较微卫星稳定（MSS）者明显提高。一些临床研究也得出了相同的结论。Fallik 等^[26]对 72 例转移性结直

肠癌进行了回顾性分析，发现在 7 例 MSI-H 的患者中，有 4 例对伊立替康疗效好，而 65 例微卫星低度不稳定（MSI-L）或 MSS 的患者中仅有 7 例疗效好。

虽然这些研究病例数太少，不足以成为指导临床实践的证据，但至少对将来的研究有些启示作用，CPT-11 在体内发挥作用的具体机制是否与微卫星不稳定性有何关联呢？同时基础研究和临床研究结果的一致性也为下一步加大样本量研究提供了依据。

7 展望

个体化治疗是肿瘤治疗的发展方向，而从分子生物学的角度寻找简单、安全、有效、特异的标志物以指导每个患者的治疗选择是个体化治疗的重要途径。结直肠癌中常用的每种化疗药物在作用机制、代谢途径、耐药机制上发挥重要作用的分子、蛋白质等均有可能成为疗效及不良反应预测标志物。

目前除了 UGT1A1 基因多态性结论较为肯定外，有关其他因素的研究大多仍存在争议，均在继续研究中，并未在临床上常规检测。首先，这些研究大多为回顾性分析，且多基于非随机对照研究或小规模的研究，故可信度大大降低，其预测价值需在大样本量、随机、对照的前瞻性研究中进一步加以证实；其次，不同的研究中入组条件、化疗方案、观察指标的检查方法、评价标准及取材部位等不同，使相互之间比较非常困难；另外，有些分子标志物虽然有统计学意义，但也许应用到临床上意义并不大，故也未能推广检测。

总之，目前关于分子预测标志物的研究多为某种分子对特定一种药物疗效或毒副反应的预测性，而在临床上大多采用 FOLFOX、FOLFIRI 方案等联合化疗，探索联合化疗方案预测分子的研究却很少，是否可以联合化疗方案中每种药物可能的预测分子统一分析它们与方案疗效的相关性，这也是未来的研究方向之一。即使针对特定的某一种药物，在研究时也不应仅限于分析某一种分子或基因的多态性，

而应同时考虑将几种相关的分子标志物进行联合分析, 甚至采用高通量分子技术检测基因差异, 以此提高成功率。

人们期待, 随着一些大型前瞻性的临床试验结果的出现, 会有越来越多的预测标志物被应用到临床工作中, 实现结直肠癌患者的真正个体化治疗。

【参考文献】

- [1] Poultsides GA, Servais EL, Saltz LB, et al. Outcome of primary tumor in patients with synchronous stage IV colorectal cancer receiving combination chemotherapy without surgery as initial treatment[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(20): 3379-3384.
- [2] Kohne, CH, Lenz HJ. Chemotherapy with targeted agents for the treatment of metastatic colorectal cancer[J]. Oncologist, 2009, 14(5):478-488.
- [3] Fujiwara Y, Minami H. An overview of the recent progress in irinotecan pharmacogenetics[J]. Pharmacogenomics, 2010, 11(3): 391-406.
- [4] Braun MS, Richman SD, Quirke P, et al. Predictive biomarkers of chemotherapy efficacy in colorectal cancer: results from the UK MRC FOCUS trial[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(16): 2690-2698.
- [5] Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P, et al. *UGT1A1**28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters [J]. J Natl Cancer Inst, 2007, 99 (17): 1290-1295.
- [6] Shulman K, Cohen I, Barnett-Griness O, et al. Clinical implications of *UGT1A1* * 28 genotype testing in colorectal cancer patients [J]. Cancer, 2011, 117(14): 3156-3162.
- [7] Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, et al. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(8): 1382-1388.
- [8] Marcuello E, Altes A, Menoyo A, et al. UGT1 A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colon cancer [J]. Br J Cancer, 2004, 91(4): 678-682.
- [9] Schulz C, Heinemann V, Schalhorn A, et al. UGT1A1 gene polymorphism: impact on toxicity and efficacy of irinotecan based regimens in metastatic colorectal cancer [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15 (40): 5058-5066.
- [10] Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P, et al. *UGT1A1**28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters[J]. J Natl Cancer Inst, 2007, 99(17): 1290-1295.
- [11] Liu CY, Chen PM, Chiou TJ, et al. *UGT1A1**28 polymorphism predicts irinotecan induced severe toxicities without affecting treatment outcome and survival in patients with metastatic colorectal carcinoma [J]. Cancer, 2008, 112(9): 1932-1940.
- [12] Toffoli G, Cecchin E, Corona G, et al. The role of *UGT1A1**28 polymorphism in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(19): 3061-3068.
- [13] Shulman K, Cohen I, Barnett-Griness O, et al. Clinical implications of *UGT1A1**28 genotype testing in colorectal cancer patients[J]. Cancer, 2011, 117(14): 3156-3162.
- [14] Schulz C, Heinemann V, Schalhorn A, et al. UGT1A1 gene polymorphism: Impact on toxicity and efficacy of irinotecan-based regimens in metastatic colorectal cancer [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15 (40): 5058-5066.
- [15] Sugiyama T, Hirose T, Kusumoto S, et al. The *UGT1A1* *28 Genotype and the Toxicity of Low-Dose Irinotecan in patients with Advanced Lung Cancer [J]. Oncol Res, 2010, 18(7): 337-242.
- [16] Onoue M, Terada T, Kobayashi M, et al. *UGT1A1**6 polymorphism is most predictive of severe neutropenia induced by irinotecan in Japanese cancer patients [J]. Int J Clin Oncol, 2009, 14(2): 136-142.
- [17] Takano M, Kato M, Yoshikawa T, et al. Clinical significance of UDP-glucuronosyltransferase *1A1**6 for toxicities of combination chemotherapy with irinotecan and cisplatin in gynecologic cancers: a prospective multi-institutional study [J]. Oncology, 2009, 76(5): 315-321.
- [18] Han JY, Lim HS, Shin ES, et al. Influence of the organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) polymorphisms on irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome of patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2008, 59(1): 69-75.
- [19] Smith NF, Figg WD, Sparreboom A. Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport: an update [J]. Toxicol In Vitro, 2006, 20(2): 163-175.
- [20] de Jong FA, de Jonge MJ, Verweij J, et al. Role of pharmacogenetics in irinotecan therapy [J]. Cancer Lett, 2006, 234(1): 90-106.
- [21] Morisaki K, Robey RW, Ozveqy-Laczka C, et al. Single nucleotide polymorphisms modify the transporter activity of ABCG2 [J]. Cancer Chemoth Pharmacol. 2005, 56(2): 161-172.
- [22] de Jong FA, Marsh S, Mathijssen RH, et al. Ethnic differences in allele frequency and assessment of influence on irinotecan disposition [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(17): 5889-5894.
- [23] Wang J, Tang JH, Zhao JH. Genotype polymorphisms of taxane-related metabolizing enzymes and drug-transporters with chemotherapy reaction for breast cancer [J]. J Mol Diagn Ther, 2010, 2(1): 63-67.
- [24] Han JY, Lim HS, Yoo YK, et al. Associations of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 Polymorphisms With Irinotecan-Pharmacokinetics and Clinical Outcome in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer [J]. Cancer, 2007, 110(1): 138-147.
- [25] Vilar E, Scaltriti M, Balmana J, et al. Microsatellite instability due to hMLH1 deficiency is associated with increased cytotoxicity to irinotecan in human colorectal cancer cell lines[J]. Br J Cancer, 2008, 99(10): 1607-1612.
- [26] Fallik D, Borrini F, Boige V, et al. Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer[J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5738-5744.