

中国人 UGT1A1 * 28 的基因多态性以及伊立替康毒性和疗效的关系

马冬¹, 张绪超², 杨冬阳¹, 刘建化¹, 苏健²

(广东省人民医院//广东省医学科学院 1.肿瘤中心肿瘤内科;2.肺癌研究所医学研究中心,广东广州 510080)

摘要:【目的】研究中国肿瘤患者 UGT1A1 的基因多态性与伊立替康的化学治疗在进展期消化道肿瘤患者不良反应的发生率和严重程度之间的关系。【方法】采用 PCR 法扩增目的基因片段,直接测序法分析 UGT1A 基因多态性的方法,检测 2010 年 3 月至 2011 年 3 月在我院住院治疗的 317 例肿瘤患者 UGT1A1 基因多态性的分布情况,并对其中 44 例采用含伊立替康方案化疗的进展期胃肠肿瘤患者,观察并记录化疗中出现的不良反应情况,比较不同基因型患者使用伊立替康后 III 度以上不良反应发生率的差异。【结果】317 例恶性肿瘤患者中 UGT1A1 基因启动子区 TA 序列 6 次重复的纯合野生型 TA6/6 有 250 例(78.9%);基因型为 TA 序列 6 次和 7 次重复的杂合型 TA6/7 有 59 例(18.6%);基因型 TA 序列 7 次重复的纯合突变型 TA7/7 有 8 例(2.5%)。在 44 例采用含伊立替康方案化疗的进展期胃肠肿瘤患者中,TA6/6、TA6/7 和 TA7/7 各基因型发生 III 度以上中性粒细胞减少者分别为 8.6%、12.5%和 100%;发生 III 度以上腹泻者分别为 14.3%、12.5%和 100%。【结论】中国患者 UGT1A1 * 28 多态性频率低, TA7/7 纯合变异型患者应用伊立替康化疗发生 III 度以上中性粒细胞减少和腹泻的风险增加,而 TA6/7 杂合子与 TA6/6 野生型相似,并不增加患者发生 III 度以上中性粒细胞减少和腹泻的风险,对野生型 TA6/6 能否通过筛查,选择合适患者适当增加伊立替康剂量以提高疗效,值得临床进一步深入研究。

关键词: 伊立替康; 不良反应; 疗效; UGT 1A1; 基因多态性

中图分类号:R73-31

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2011)04-0495-05

Association of UGT1A1 * 28 Polymorphism with Toxicity and Efficacy of Irinotecan in Chinese Patients

MA Dong¹, ZHANG Xu-chao², YANG Dong-yang¹, LIU Jian-hua¹, SU Jian²

(1.Department of Oncology, Cancer Center, 2.Medical Research Cancer, Lung Cancer Institute, Guangdong General Hospital// Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080 China)

Abstract: 【Objective】 To observe UGT1A1 * 28 genetic polymorphism and the association with the incidence and severity of adverse reaction of irinotecan chemotherapy in Chinese cancer patients with advanced gastrointestinal carcinoma. 【Methods】 UGT1A1 * 28 genetic polymorphism analysis was performed in 317 patients with cancer from March 2010 to March 2011 in our hospital by amplifying gene fragments using PCR and direct sequencing. Forty-five cases with advanced gastrointestinal cancer treated with irinotecan were observed and recorded the adverse reaction during chemotherapy. The differences of the incidence of grade 3 and 4 adverse reaction were compared in the patients with different genotypes. 【Results】 Of 317 patients of malignant tumor, 250 cases (78.9%) were identified with (TA) 6/ (TA) 6 genotype, 59 cases (18.6%) were genotyped as heterozygote (TA) 6/ (TA) 7, and 8 cases (2.5%) were found as (TA) 7/ (TA) 7 genotype. In 44 cases with advanced gastrointestinal cancer treated with irinotecan, 8.6%, 12.5%, and 100% had grade 3 and 4 neutropenia and 14.3%, 12.5%, and 100% had grade 3 and 4 diarrhea, respectively. 【Conclusion】 The polymorphism of UGT1A1 * 28 in Chinese patients was low. Patients with (TA) 7/ (TA) 7 genotype treated with irinotecan chemotherapy had increased risk of grade 3 and 4 neutropenia and diarrhea than cases with (TA) 6/ (TA) 7 or (TA) 6/ (TA) 6 genotype. Wild type (TA) 6/ (TA) 6 could be passed screening and how to select the right patients with the appropriate dose of irinotecan in order to improve the efficacy were worthy of further study.

Key words: Irinotecan; adverse reaction; efficacy; UGT 1A1; genetic polymorphism

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(4): 495-499, 546]

收稿日期: 2011-04-15

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B090300277)

作者简介: 马冬, 副主任医师、副教授, 研究方向: 消化系统恶性肿瘤多学科综合治疗的基础和临床研究, E-mail: dr_madong@yahoo.com.cn
电话: 13332888281

伊立替康(Irinotecan)是目前广泛应用于临床的拓扑异构酶 I 抑制剂,尤其在胃肠癌和小细胞肺癌已成为常用的化疗药物之一。在国外报道伊立替康引起的 3~4 度迟发性腹泻和粒细胞减少发生率较高,甚至可导致患者死亡^[1],但随着伊立替康在我国的广泛应用,发现对中国患者引起严重迟发性腹泻的比例明显少于欧美国家。近年有不少研究证实 UGT1A1(尿苷二磷酸葡萄糖苷酸转移酶 1A1)是将伊立替康的活性产物 7-乙基-10-羧基喜树碱(SN38)转变为糖基化 SN-38(SN-38G),使其在体内失活的主要代谢酶,UGT1A 酶的功能及其基因多态性(SNP)与伊立替康的毒性有着密切关系^[2-3],同时也可能与伊立替康的疗效存在一定关系^[4]。另一方面的研究显示 UGT1A1 基因多态性的分布在不同人种存在差异^[5],可能导致伊立替康在不同人种的毒性反应和疗效反应存在差异。为了进一步明确中国人 UGT1A1 基因多态性的分布情况、了解伊立替康在中国患者迟发性腹泻发生率偏低的原因,以及其它严重不良反应和伊立替康疗效与 UGT1A1 基因多态性的关系,探讨检测 UGT1A1 基因多态性对指导个体化治疗的临床意义,我们对 317 例肿瘤患者的 UGT1A1 基因多态性进行检测,并对采用伊立替康化疗的患者情况进行分析。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2010 年 3 月至 2011 年 3 月期间,收集在我科住院治疗的 317 例恶性肿瘤患者的外周血样标本,并进行 UGT1A1 * 28 基因多态性的检测,其中有 44 例的胃癌、结直肠癌患者接受含伊立替康方案的化疗,其中可评价药物不良反应 44 例;可评价疗效 32 例,在可评价疗效的病例中一线治疗 13 例;二线治疗 19 例。上述纳入的病例均为连续病例。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 提取和 PCR 反应和序列分析 收集肺癌、胃癌及结直肠癌等恶性肿瘤患者在治疗前的外周抗凝血 2 mL,根据外周血 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)操作手册,分批次统一提取基因组 DNA,PCR 扩增 UGT1A1 基因的相应片段,正反向引物分别为 F: CTCCCTGCAACC

TTTGTGGACTGA,R:ACAACGAGGCGTCAGGTGCTA。每个 25 μ L 的 PCR 反应 (polymerase chain reaction,聚合酶链式反应)包括 5 ng 模板 DNA,10 \times buffer,1 mmol/L dNTPs,Taq plus 酶(大连 Takara 公司)和 12.5 μ mol/L 正向和反向引物各 0.5 μ L。PCR 反应条件为:初始变性 94 $^{\circ}$ C 5 min;变性 94 $^{\circ}$ C 30 s,退火 30 s,延伸 68 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物采用 BigDye Terminator V 3.1 标记并纯化后在 ABI-3730 测序仪上进行双向测序,测序结果用 Chromas 2.31 软件显示,人工校读分析 UGT1A1 上游启动子序列 A (TA)_nTAA 中的 TA 重复序列。

1.2.2 药物毒性的评价标准 依据美国国立癌症研究所 NCI(National Cancer Institute)提出的药物毒性评价标准(NCI-CTC)3.0 对中性粒细胞减少、迟发性腹泻和胆红素升高进行评价。

1.2.3 疗效评价标准 采用美国国立癌症研究所的 RECIST 标准(response evaluation criteria in solid tumors)进行疗效评价。

1.2.4 统计学方法 应用 SPSS 13.0 软件对所有数据进行统计学分析,率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher's 精确概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UGT1A1 的基因多态性的测序结果分析

从以下测序峰图中可判读 UGT1A1 基因启动子区 A(TA)_nTAA 中 TA 重复次数,可见三种基因型(TA 7/7、TA 6/7 和 TA 6/6)。TA7 即为 UGT1A1 * 28,TA6 即为 UGT1A1 * 1(图 1)。

2.2 UGT1A1 * 28 的基因多态性的分布情况

本组全部 317 例患者 UGT1A1 多态性分布情况:TA6/6 野生基因型 250 例(78.9%);TA6/7 杂合基因型 59 例(18.6%),TA7/7 纯合基因型 8 例(2.5%)。44 例接受含伊立替康方案化疗的胃肠肿瘤患者 UGT1A1 多态性分布情况:TA6/6 野生基因型 35 例(79.5%);TA6/7 杂合基因型 8 例(18.2%),TA7/7 纯合基因型 1 例(2.52%)。44 例接受伊立替康治疗的胃肠肿瘤患者与总体 317 例患者各基因型的比例相似($P = 0.992$;表 1)。

2.3 伊立替康方案组各基因型药物不良反应

全组 44 例胃肠肿瘤患者,其中胃癌 9 例,结

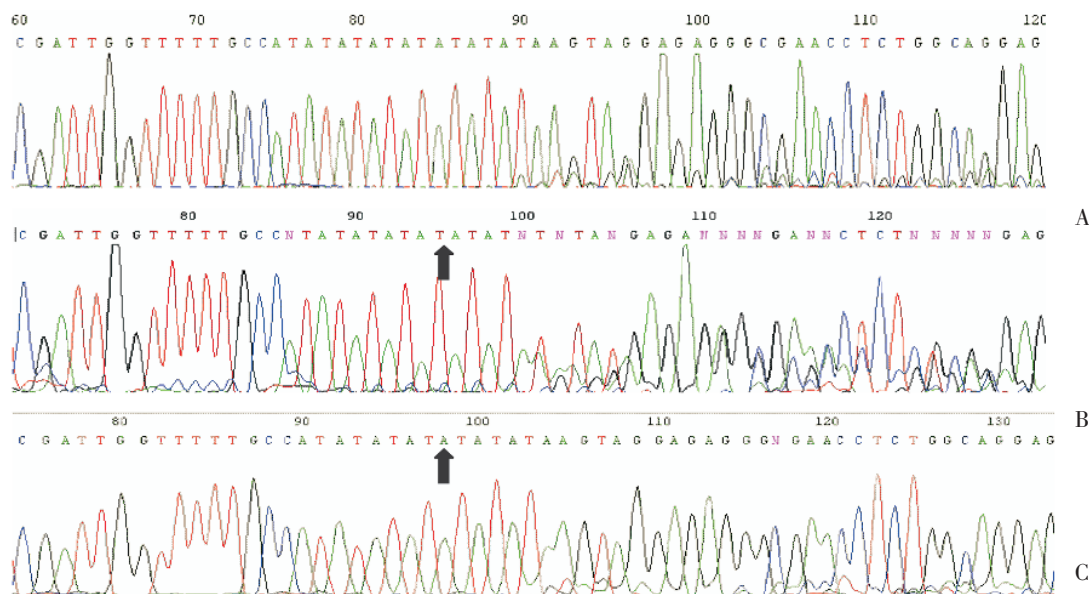


图1 TA 7/7、TA 6/7 和 TA 6/6 三种基因型的代表性测序图

Fig.1 Representative sequence diagram of TA 7/7, TA 6/7, and TA 6/6 genotypes

A: TA7/7 homozygous genotype; B: TA6/7 heterozygote; C: TA6/6 wild-type

表1 317 例肿瘤患者及 44 例接受治疗患者的 UGT1A1 基因型分布情况

Table 1 UGT1A1 genotype distribution of 317 cancer patients and 44 cases treated with irinotecan n(%)

n	TA6/6	TA6/7	TA7/7
All 317 cases	250(78.9)	59(18.6)	8(2.5)
44 cases treated with irinotecan	35(79.5)	8(18.2)	1(2.3)

Genotype distribution in 44 cases treated with irinotecan is the same as all 317 cases, $\chi^2 = 0.016, P = 0.992$

直肠癌 35 例。一线化疗 17 例, 二线化疗 27 例。44 例患者总体出现 3~4 度严重不良反应的情况: 3~4 度中性粒细胞减少 5 例(11.4%); 3~4 度迟发性腹泻 7 例(15.9%), 其中 1 例基因型为纯合 TA7/7 患者出现严重胆红素升高 (>正常高值 5 倍), 野生型 TA6/6 和杂合 TA6/7 均未见严重胆红素升高病例。因 TA7/7 基因型仅有 1 例患者, 故未纳入统计分析(表 2)。

2.4 UGT1A1 的基因多态性与疗效的关系

32 例可评价疗效的患者 UGT1A1 的基因多态性与疗效的关系见表 3。

3 讨论

拓扑异构酶 I 抑制剂伊立替康是广泛应用于

表2 44 例采用含伊立替康方案的胃肠肿瘤各基因型药物不良反应情况

Table 2 Adverse drug reactions of all genotypes in 44 cases with advanced gastrointestinal cancer treated with irinotecan n(%)

Genotype	Grade 1-2 neutropenia	Grade 3-4 neutropenia	Grade 1-2 diarrhea	Grade 3-4 diarrhea
	TA6/6 cases	4(11.4)	3(8.6)	12(34.3)
TA6/7 cases	2(25.0)	1(12.5)	4(50.0)	1(12.5)
TA7/7 cases	0(0)	1(100)	0(0)	1(100)

Fisher's exact test, TA6/6 vs TA6/7, between grade 1-2 and grade 3-4 neutropenia, $P = 0.408$; between grade 1-2 and grade 3-4 diarrhea, $P = 0.760$

表3 32 例可评价疗效的胃肠肿瘤各基因型的疗效情况

Table 3 Efficacy of all genotypes in 32 cases with evaluated gastrointestinal cancer n(%)

Genotype	CR	PR	SD	PD
TA6/6 cases	1(4.3)	5(21.7)	10(43.5)	7(30.4)
TA6/7 cases	0	3(37.5)	3(37.5)	2(25)
TA7/7 cases	0	0	0	1(100)

Fisher's exact test, TA6/6 vs TA6/7, responsive rate (CR+PR) is not found to be significant, $P = 0.883$

晚期结直肠癌治疗的抗癌药物, 其相关的毒性反应包括早发性和迟发性腹泻、脱水和重度中性粒细胞减少^[2]。一项用于晚期结直肠癌一线治疗的 III 期随机对照研究发现其剂量限制性毒性发生率

高,3~4度的迟发性腹泻和粒细胞减少在 FOLFIRI 方案发生率分别为 44.4%和 28.8%,远高于对照组 LV5FU2 单药方案的 25.6%和 2.4%^[1]。目前已知 UGT1A1 是伊立替康代谢最主要的同工酶,UGT1A1 基因的多态性影响尿苷二磷酸葡萄糖苷酸转移酶 1A1 的活性,其中变异型 UGT1A1 * 28 的启动子 TATA 盒区域包含 7 个 TA 重复序列,该变异型与 UGT1A1 表达下降有关,位于转录调控区的 SNP 通过影响基因转录水平来影响酶活性,UGT1A1 * 28 可使转录活性下降 18%~30%,甚至在 UGT1A1 * 28 纯合基因型 TA7/7 较野生型 TA6/6 减少 70%的转录活性,从而减少了 UGT1A1 的表达,使伊立替康的活性代谢产物 SN38 显著增加和灭活的 SN-38G 水平降低,导致严重腹泻和/或中性粒细胞严重缺乏的风险显著增加^[2-3,6]。提示检测 UGT1A1 基因的多态性可用于临床预测伊立替康相关的严重毒性反应的发生,目前对 UGT1A1 基因多态性的分布情况及其基因多态性与伊立替康化疗的毒性反应和疗效反应关系的研究尤为引人关注。

有报道在亚洲人、高加索人和非洲人种之间 UGT1A1 存在明显的人种差异^[5],进一步明确 UGT1A1 基因多态性在中国人的分布情况,对后续的研究有深远的意义。根据国外文献报道,白种人 UGT1A1 * 28 多态性的频率较高,UGT1A1 * 28 纯合变异基因型 TA7/7 占 10%~15%,UGT1A1 * 28 杂合基因型 TA6/7 占 35%~50%,而 TA6/6 野生型只占 40%~50%^[2,7-8]。在国内对 UGT1A1 多态性只有少数的报道且纳入的样本量相对较小^[9]。本文纳入了 317 例中国患者是目前在国内报道的样本量最大的研究结果,得出的基因多态性在中国人的分布情况与另一个在国外发表的 539 例汉族人 UGT1A1 * 28 基因多态性分布研究的结果^[10]相吻合。综合这些研究结果,在中国人 UGT1A1 * 28 基因多态性的分布情况大致是:野生型 TA6/6 占 70%~85%;UGT1A1 * 28 杂合基因型 TA6/7 占 15%~25%;纯合基因型 TA7/7 占 0~5%,由此可见中国人大部分的基因型是野生型的 TA6/6,而 UGT1A1 * 28 纯合子基因型 TA7/7 非常少见,不超过 5%。本研究结果证实了 UGT1A1 基因多态性存在明显的人种差异,野生基因型 TA6/6 在中国人超过 70%占大部分,UGT1A1 * 28 多态性发生频率低,尤其纯合基因型 TA7/7 不足 5%

更是远低于高加索人,从而进一步解释中国患者对伊立替康的毒性反应明显与国外报道的结果存在差异的原因。

药代动力学研究显示,与 UGT1A1 * 28 纯合基因型 TA7/7 和 UGT1A1 * 28 杂合基因型 TA6/7 的患者相比,UGT1A1 野生型 TA6/6 有较低的 SN-38 葡萄糖苷酸化率,而 TA 7/7 比 TA6/7 和 TA6/6 有更高的 SN-38 AUC^[6],推论 UGT1A1 * 28 纯合子使用伊立替康的严重毒性反应发生率可能更高。多个临床研究结果也证实了 UGT1A1 * 28 的纯合子较野生型的 UGT1A1 表达减少而导致严重腹泻^[3,7,11]和血液毒性^[2,4,6,11]的发生率增加。因此美国 FDA 于 2005 年要求在伊立替康的药品标签上增加与药物遗传学相关的信息,将 UGT1A1 酶活性异常患者(如 Gilbert 综合征)应用伊立替康有发生严重骨髓抑制的风险写进药品说明书,推荐检测 UGT1A1 * 28 等位基因,对 UGT1A1 * 28 纯合子患者使用伊立替康时应降低起始剂量。对于 UGT1A1 * 28 纯合子 TA7/7 占 10%~15%的欧美患者,通过基因筛查可以预测并预防减少伊立替康毒性的发生,但对 35%~50%的杂合子 TA6/7 基因检测的意义并不确切,杂合子 TA6/7 对伊立替康的毒性反应各家报道的结果并不一致,有认为与 3~4 度腹泻有关与血液毒性无关^[2,7];也有认为与腹泻和血液毒性均无相关^[8]。中国人 UGT1A * 28 基因多态性的发生频率明显低于欧美人群,是否基因检测可以作为伊立替康毒性预测指标目前尚无定论。本文 44 例使用含伊立替康方案化疗的胃肠肿瘤患者中,各基因型的分布与总体 317 例患者相似。仅有的 1 例 UGT1A1 * 28 纯合子 TA7/7 同时发生了包括 3~4 度的腹泻、粒细胞减少和胆红素升高的严重毒性反应(3~4 度粒细胞减少与腹泻发生率均为 100%,由于例数关系不进行统计学处理),而野生型 TA6/6 和 UGT1A1 * 28 杂合子 TA6/7 发生的 3~4 度粒细胞减少(发生率分别为 8.6%和 12.5%)和 3~4 度腹泻(发生率分别为 14.3%和 12.5%)均明显低于纯合子 TA7/7,且两组血液毒性和非血液毒性的发生率均接近,统计学没有显著差异($P>0.05$),提示对中国患者应用伊立替康时 UGT1A1 * 28 纯合子发生严重的粒细胞减少、腹泻和胆红素升高的风险较大,而 UGT1A1 * 28 杂合子严重毒性反应的发生率明显低于纯合子,3~4 度腹泻和粒细胞减少的发生率

与野生型并无差异,但目前还缺少更多对中国患者这方面的数据。同时我们注意到 TA7/7 纯合子患者出现严重胆红素升高的现象,可能的原因是 UGT1A1 不仅是伊立替康的代谢酶,同时也将其他底物如胆红素通过葡萄糖醛酸化转化为可溶性更高的形式,UGT1A1 的缺乏可导致未结合胆红素积聚引起相关症状。近来已经有文献报道 UGT1A1 * 28 基因变异的患者使用伊立替康可导致胆红素升高^[12],这也是值得临床关注的问题。综合本研究结果我们认为虽然可以通过筛查 UGT1A1 * 28 纯合基因型 TA7/7 来预测可能出现的伊立替康严重血液和非血液毒性反应,但对野生型 TA6/6 和杂合基因型 TA6/7 伊立替康的严重毒性反应发生率远低于 TA7/7,故并不具备预测意义,由于中国患者纯合基因型 TA7/7 非常少见,因此,临床上无需广泛应用 UGT1A1 多态性检测来预测伊立替康毒性。

利用基因多态性来指导个体化治疗是目前研究的热点。对于 UGT1A1 能否预测伊立替康疗效,因为本文纳入了二线治疗患者因此无法准确评价。但从现有结果分析,近期的疗效在 TA6/6 和 TA6/7 两组接近,而 1 例 TA7/7 纯合子患者在接受伊立替康化疗后由于严重不良反应而中断治疗,停药后短期内死亡,与该纯合子 TA7/7 患者由于严重的粒细胞减少和腹泻、胆红素升高等毒性反应影响了后续的治疗和加速病情进展有关。据国外报道,野生型 TA6/6 患者使用伊立替康有生存获益,而纯合子 TA7/7 患者的中位生存明显低于其他基因型,其原因是严重不良反应导致减量或治疗中断,使生存期缩短^[4]。但也有研究^[13-14]持相反看法,认为 UGT1A1 * 28 的多态性并不影响治疗的反应率和中位生存,不过这些研究均基于采用中、低剂量伊立替康化疗得出的结论,目前尚不能通过单独检测 UGT1A 基因多态性来预测判断疗效。但与纯合基因型 TA7/7 相反,野生基因型 TA6/6,由于具有较高的 UGT1A1 活性加速了 SN-38 的葡萄糖苷酸化而灭活,常规剂量虽然毒性反应发生率低但却可能由于剂量过低而影响疗效,能否通过增加剂量来增加疗效? II 期临床研究显示大约 40% 的患者可以耐受更高的伊立替康剂量达到 500 ~ 700 mg/m² ^[15],但这部分患者是否属于 TA6/6 野生基因型,TA6/6 患者是否有更高的耐受剂量目前尚未清楚。另外,有研究指出香烟和酒精可以诱导 UGT1A1 的活性,对吸烟和饮酒的野

生型 TA6/6 患者可能对伊立替康耐药,导致治疗失败的风险增加^[16-17]。因此能否通过 UGT1A1 * 28 多态性的检测筛查,选择 TA6/6 野生基因型且有耐药可能的患者,提高伊立替康的剂量以增加疗效;或对伊立替康常规剂量出现严重毒性反应的 TA7/7 纯合子,如何调节剂量以减轻毒性反应而不影响疗效,是值得进一步研究探讨的问题。

综上所述:在中国人 UGT1A1 * 28 基因多态性低,野生型 TA6/6 占大多数,对伊立替康的严重毒性反应发生率低;纯合基因型 TA7/7 患者在中国患者少见,该基因型与较高的伊立替康严重毒性反应有密切关系;杂合基因型 TA6/7 严重毒性反应发生率低与野生型无明显差异,对中国患者进行基因检测以预测伊立替康毒性和疗效并不适合在临床的广泛应用。对野生型 TA6/6 能否通过筛查,选择合适患者(如对伊立替康疗效未达 PR 但无严重毒性反应者)适当增加伊立替康剂量以提高疗效,值得临床进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial [J]. *Lancet*, 2000, 355 (9209): 1041-1047.
- [2] 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.
- [3] Massacesi C, Terrazzino S, Marcucci F, et al. Uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A1 promoter polymorphism predicts the risk of gastrointestinal toxicity and fatigue induced by irinotecan-based chemotherapy [J]. *Cancer*, 2006, 106(5): 1007-1016.
- [4] Shulman K, Cohen I, Barnett-Griness O, et al. Clinical implications of UGT1A1 * 28 genotype testing in colorectal cancer patients [J/OL]. *Cancer*, (2011-02-01). doi: 10.1002/encr.25735.
- [5] Kaniwa N, Kurose K, Jinno H, et al. Racial variability in haplotype frequencies of UGT1A1 and glucuronidation activity of a novel single nucleotide polymorphism 686C>T (P229L) found in an African-American [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(3): 458-465.
- [6] Iyer L, Das S, Janisch L, et al. UGT1A1 * 28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition

(下转第 546 页 to page 546)