

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.02.013

· 临床研究 ·

晚期胆管细胞癌患者相关信号通路及其变异与预后的关系

陶晨洁, 杨光[△], 袁振刚, 曾添美 (上海东方肝胆外科医院 肿瘤科, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 以二代测序技术检测胆管细胞癌患者基因变异状态, 并分析与患者预后的相关性; **方法:** 收集了自2016年6月至2018年6月3年收治的40例确诊胆管细胞癌的患者, 进行全外显子二代基因测序(NGS), 从中筛选出可能的突变(单碱基突变、结构变异、拷贝数变化、基因融合等), 回顾性分析患者一线治疗的疾病控制率(DCR), 无进展生存期(PFS)及总生存期(OS), 分析患者信号通路及其基因变异与预后的关系。 **结果:** 40例晚期单管细胞癌患者中TP53基因突变的患者和未发生突变患者的中位PFS和OS分别为11.0 vs 8.3个月($P=0.332$)和14.3 vs 32.9个月($P=0.041$); 而PI3K基因突变的患者和未发生突变患者的中位PFS和OS分别为8.3 vs 11.0个月($P=0.285$)和14.3 vs 37.0个月($P=0.020$); mTOR通路突变的患者和未发生突变患者的中位PFS和OS分别为6.3 vs 10.3个月($P=0.020$)和15.6 vs 19.6个月($P=0.892$), 通路相关基因发生突变, 对生存均没有显著影响。 **结论:** TP53及PI3K通路激活的胆管细胞癌患者整体预后显著差于未激活的患者, mTOR通路激活及IDH突变对预后及疗效没有显著影响的靶点。

[关键词] 胆管细胞癌; 二代测序; 全外显子

[中图分类号] R730.5; R735.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)02-0220-05

The correlation of the related signaling pathways and prognosis in patients with advanced cholangiocarcinoma

TAO Chenjie, YANG Guang, YUAN Zhengang, ZENG Tianmei (Department of Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai, China)

[Abstract] Objective: To detect the gene mutation in cholangiocarcinoma patients using the next generation sequencing (NGS) technology, and to analyze its correlation to the prognosis of the patients. **Methods:** From June 2016 to June 2018, 40 patients diagnosed with cholangiocarcinoma received NGS examination to screen the possible mutations (single base mutation, structural variation, copy number variation and gene fusion, etc.). The disease control rates (DCR), progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) of the patients, who received the first line therapy, were retrospectively reviewed to analyze the relationship between signaling pathway as well as its genetic variation and the prognosis of cholangiocarcinoma patients. **Results:** The median PFS of patients with and without TP53 mutation was 11.0 and 8.3 months, respectively ($P=0.332$), while OS was 14.3 and 32.9 months, respectively ($P=0.041$). The median PFS of patients with and without PI3K mutations was 8.3 and 11.0 months, respectively ($P=0.285$), while OS was 14.3 and 37.0 months, respectively ($P=0.020$). The median PFS of patients with and without mTOR pathway mutations was 6.3 and 10.3 months, respectively ($P=0.020$), while OS was 15.6 and 19.6 months, respectively ($P=0.892$). There was no significant effect of pathway-related gene mutations on patients' survival. **Conclusion:** The prognosis of cholangiocarcinoma patients with TP53 and PI3K pathway activation had obviously poor prognosis than those without. No significant difference was observed between the patients with and without mTOR pathway activation and IDH mutation.

[Key words] cholangiocarcinoma; the next generation sequencing technology; total exons

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(2): 220-224. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.02.013]

胆管细胞癌(cholangiocarcinoma)是指一类起源于胆道上皮细胞的恶性肿瘤, 根据解剖位置分为肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)、肝门部胆管细胞癌(hilar cholangiocarcinoma, H-CC)及肝外胆管细胞癌(Extrahepatic bile duct carcinoma, EBDC)。胆管细胞癌占有胃肠道恶性肿瘤的3%, 亚洲人发病率最高(3.3/10万)^[1]。目前, R0

[作者简介] 陶晨洁(1987-), 女, 硕士, 住院医师, 主要从事肝胆肿瘤方面的研究, E-mail: taochenjieabcdef@163.com; 杨光(1991-), 女, 硕士学位, 住院医师, 主要从事恶性肿瘤血栓预防方面的研究, E-mail: 102699291@qq.com。[△]共同第一作者

[通信作者] 曾添美(ZENG Tianmei, corresponding author), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事多发性骨髓瘤、淋巴瘤、肝胆肿瘤方面的研究, E-mail: subrina_8371@163.com

手术切除病灶仍然是最有效的治疗手段,但由于该病大多起病隐匿,诊断时多为晚期,且缺乏有效的抗肿瘤药物,因此晚期胆管细胞癌的预后很差,5年生存率不足5%^[2]。近几十年来,随着基因检测技术的发展,越来越多的肿瘤细胞遗传学改变受到关注,在肺癌、乳腺癌、胃癌及肠癌等肿瘤中,基于驱动基因的靶向治疗更是取得了重大突破,将患者的生存期大大延长。然而,对于胆管细胞癌的分子遗传学特点,虽然国内外许多中心都有总结报道,也发现了一些比例较高的通路改变,如TP53通路、PI3K-AKT通路以及ERBB2通路等^[3],但仍没有证实任何一个基因靶点对于胆管细胞癌具有驱动作用,也没有发现对疗效有预测价值的基因改变,时至今日,没有任何一种靶向药获批用于治疗胆管细胞癌。课题组对东方肝胆外科医院自2015年7月至2018年6月3年间收治的40例确诊为胆管细胞癌的患者,进行了全外显子二代基因测序(NGS),对相关基因改变进行了分析,初步分析了不同信号通路激活与疾病疗效及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

40例患者为经手术或穿刺病理活检明确诊断的晚期胆管细胞癌,患者的具体临床资料见表1。

1.2 主要实验试剂和仪器

组织样品提取DNA所需QIAamp DSP DNA FF-PE组织试剂盒(QIAGEN, USA);血液样本提取所需ctDNA及基因组DNA使用QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit试剂盒(QIAGEN);质控标准的样本使用KAPA Library Prep Kit(Illumina, USA);样本扩增使用荧光定量PCR仪(Stepone plus, Life technology);浓度测定使用Qubit 3.0(Life technology);测序平台使用HiSeqX Ten(Illumina)。

1.3 全外显子二代基因测序技术检测患者的基因变异状况

将肿瘤组织石蜡切片上的组织转移到微量离心管中,从样品中提取DNA,进行脱蜡、蛋白酶消化、过柱纯化等步骤操作。对于外周血样本,在离心分离出血浆和血细胞后,从血浆中分别提取ctDNA及基因组DNA,并进行DNA浓度、质量及片段大小等的质控,对符合质控标准的样本进行文库制备,并用LM-PCR对样本文库进行扩增。扩增后的文库与SeqCap EZ Library进行混合杂交捕获、洗脱、回收,并对以上步骤后纯化的捕获DNA再次用LM-PCR进行扩增,并测定浓度,使用DNA分子片段检测仪2100对文库大小进行质检,最后进行测序。

表1 40例晚期胆管细胞癌患者的临床特征

Tab.1 Clinical characteristics of 40 patients with advanced cholangiocarcinoma

Clinical characteristics	n
Case	40
Male/female	15/25
Median age(t/a)	56.5
Type of tumor	
Intrahepatic cholangiocarcinoma	29
Hilar cholangiocarcinoma	3
Extrahepatic cholangiocarcinoma	8
Tumor metastasis	
Without metastasis	9
Only lymph node metastasis	9
Only distal organ metastasis	10
Simultaneous metastasis	12
Differentiation	
Low	12
Median	25
High	0
Undefined	3
The first-line chemotherapy	
Gemcitabine combined with platinum	21
Gemcitabine combined with fluorouracil	11
Fluorouracil combined with platinum	8
The median course of chemotherapy treatment	5

得到测序结果后,对原始数据进行处理,去除低质量的碱基与序列,校正测序错误。将处理后的序列比对参考基因组,得到匹配位置,评估序列的比对质量,并进行局部拼接以校正可能的比对错误。从比对后的数据中筛选出可能的突变(包含单碱基突变、结构变异、拷贝数变化、基因融合等),计算突变频率和/或拷贝数变化倍数;对比各大数据库进行注释,得到各突变对基因功能、蛋白功能的可能影响及与胆管细胞癌的可能关系。

1.4 患者的一线化疗方案

40例患者确诊后均给予晚期一线治疗,根据患者年龄、体能状态评分,21例患者接受了吉西他滨联合奥沙利铂或顺铂(Gemox/GP)治疗,其中吉西他滨按1 g/m²,第1天及第8天静滴,奥沙利铂按130 mg/m²,第1天静滴,或顺铂25 mg/m²第1天及第8天配置静滴,21 d为一个治疗周期。11例患者给予吉西他滨联合氟尿嘧啶的GS方案,其中吉西他滨按1 g/m²,第1天及第8天静滴,氟尿嘧啶采用口服替吉奥胶囊40~60 mg/m²,第1天至第14天。8例因初始血象不适合吉西他滨治疗的患者接受了氟尿嘧啶联合奥沙

利铂(Sox)的治疗,其中氟尿嘧啶采用口服替吉奥胶囊 40~60 mg/m²,第1天至第14天,奥沙利铂按 130 mg/m²,第1天静滴,21 d为1个治疗周期。40例患者的中位治疗疗程数为5个(3~8个)。

1.5 疗效判定

疗效判定依据RECIST1.1标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors RECIST Version 1.1)。本研究为回顾性,主要分析患者一线治疗的疾病控制率(disease control rate, DCR),无进展生存期(progression-free survival, PFS)及总生存期(overall survival, OS)。

1.6 统计学处理

使用SPSS17.0统计软件。当样本呈正态分布时,均值取平均数±标准差;当样本呈非正态分布时,均数取中位数。均值比较采用两个独立样本 t 检验,率的比较采用卡方检验,生存分析采用Kaplan-Meier法。 $P<0.05$ 为差异均有显著性。

2 结果

2.1 晚期胆管细胞癌患者的基因变异及其信号通路

活化情况

二代测序结果显示,40例晚期胆管细胞癌患者中,TP53基因的突变比例在所有基因突变中的比例最高,为57.5%(23/40);其次为RAS突变,为22.5%(9/40);MET以及ERBB2的扩增和突变率位居第三,均为17.5%(7/40)。胆道肿瘤中常见的活化通路,如TP53通路及PI3K通路在本组患者中活化比例同样较高,分别为57.5%(23/30)和57.5%(23/40);而mTOR通路活化比例较文献报道的低,为15%(6/40)。由于本组患者中胆管细胞癌类型以肝内胆管细胞癌(高达72.5%)为主,故在肝内胆管细胞癌中常见的IDH通路活化比例也较高,为22.5%(9/40)。

2.2 疗效

40例患者随访至2018年10月30日,中位随访时间为11.5个月。40例患者治疗后仅有9名患者(22.5%)对一线治疗没有响应,疾病持续进展(PD);26名患者(65%)为疾病稳定(SD);5名患者(12.5%)为部分缓解(PR)。本组患者的DCR高达77.5%。患者中位PFS为10.1个月,中位OS为19.6个月(图1)。

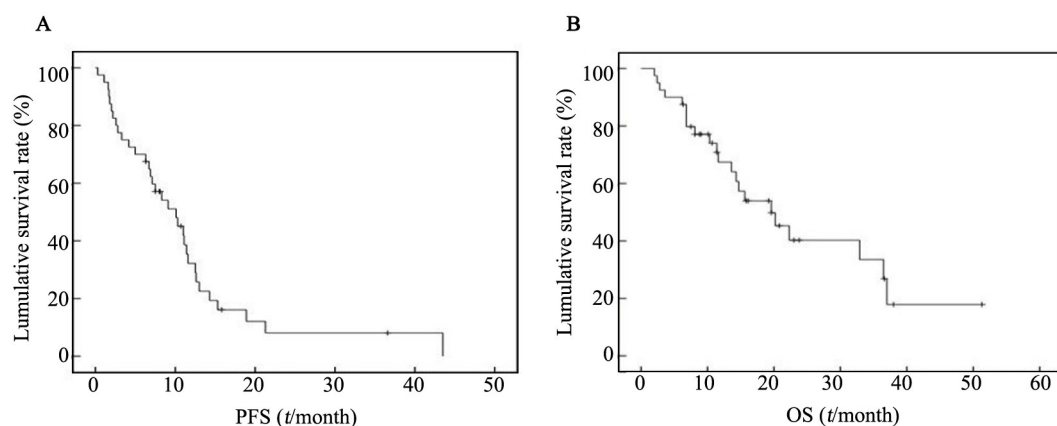


图1 晚期胆管细胞癌患者治疗后PFS(A)和OS(B)分析

Fig.1 Analysis of PFS (A) and OS (B) in patients with advanced cholangiocarcinoma after treatment

2.3 不同基因及其信号通路激活对患者生存的影响

40例患者中二代基因测序显示,TP53、PI3K及mTOR信号通路相关基因突变对患者的PFS均没有显著影响,三条通路相关基因突变与未突变的患者的PFS分别为11.0 vs 8.3个月(TP53, $P=0.332$)(图2A),8.3 vs 11.0个月(PI3K, $P=0.285$)(图2B),6.3 vs 10.3个月(mTOR, $P=0.124$)(图2C)。TP53突变的患者和未发生突变患者的中位OS分别为14.3 vs 32.9个月($P=0.041$)(如图3A);而PI3K通路突变的患者和未发生突变患者的中位OS分别为14.3 vs 37.0个月($P=0.020$)(如图3B)。提示伴有TP53或PI3K通路活化的胆管细胞癌患者,预后较差。mTOR通路突

变的患者和未发生突变患者的中位OS分别为15.6 vs 19.6个月($P=0.892$)(如图3C),而mTOR通路相关基因发生突变对生存没有显著影响。

3 讨论

本课题通过二代测序技术获得晚期胆管细胞癌患者基因信息中,TP53突变率最高,为53%,略高于其他文献报道的3%~45%^[4-6]。检测提示,TP53基因发生突变的主要位点是外显子5~8的失活突变,最终导致抑癌基因TP53的表达缺失。由于本组患者中72.5%为肝内胆管细胞癌患者,因此常见于肝内胆管细胞癌的IDH突变在本研究中比例较高,且9例突变

确实均见于肝内胆管细胞癌患者中, 突变比例为31% (9/29), 与文献报道基本一致。

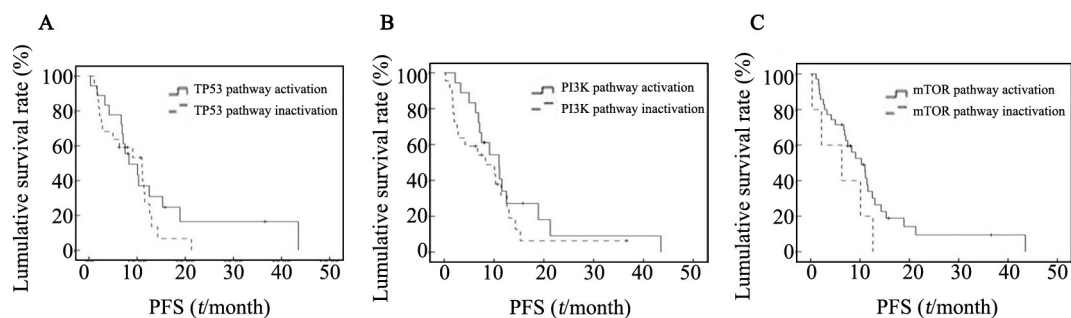


图2 TP53(A)、PI3K(B)、mTOR(C)信号通路激活后 PFS 分析

Fig.2 Analysis of PFS in patients with TP53(A), PI3K(B) and mTOR(C) pathway activation

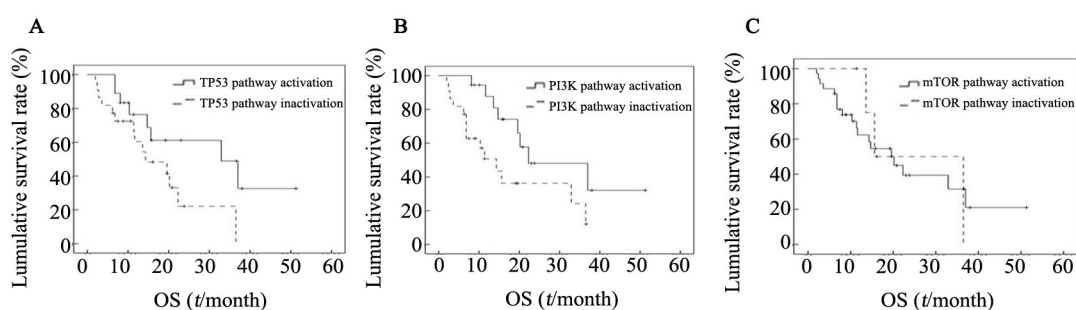


图3 TP53(A)、PI3K(B)、mTOR(C)信号通路激活后 OS 分析

Fig.3 Analysis of OS in patients with TP53(A), PI3K(B) and mTOR(C) pathway activation

40 例患者一线均接受两药联合治疗方案, 80% (32/40) 一线接受了吉西他滨为基础的联合化疗, 仅 8 例患者因存在吉西他滨相对禁忌征而采用了氟尿嘧啶联合铂类的联合化疗, 总的 DCR 与英国的 ABC02 研究相仿^[7], 为 77.5% vs 81.4%, 本组患者的中位生存时间为 19.6 个月, 高于文献报道的 11.7 个月, 提示中国的晚期胆管细胞癌患者对以吉西他滨或氟尿嘧啶为基础的晚期一线联合化疗有效率较高, 耐受性也良好。

与 RAS 状态作为结肠癌的预后及疗效预测因子不同, 目前, 胆管细胞癌在基因水平尚没有广泛认可的预后及疗效预测指标。国内学者^[8]曾对 103 例肝内胆管细胞癌患者进行基因测序, 发现突变率最高的 8 个基因分别为 TP53、KRAS、IDH1、PTEN、ARID1A、EPPK1、ECE2 和 FYN。在对患者的生存分析中, 发现 TP53 突变的患者预后要差于 TP53 未突变的患者。考虑到单基因状态可能对胆管细胞癌的预后没有预测意义, 因此, 本研究中, 将患者常见的基因突变按活化的信号通路分类, 分为 TP53 通路、PI3K 通路及 mTOR 通路, 并将通路是否激活作为分层因子对生存影响进行分析, 结果显示, TP53 通路未激活的患者总生存时间较激活的患者显著延长 18.6 个月, 而 PI3K 通路未激活的患者总生存时间较激活的患者显著延

长 8 个月, 而 mTOR 及 IDH 通路激活的患者生存时间却没有显示差异, 这极有可能与本组病例数较少有关, 因此还需要进一步扩大患者样本量后再进行分析。

尽管探索各类靶向药物治疗胆管细胞癌的临床研究层出不穷, 然而至今仍然没有任何一种靶向药物在临床研究中显示能显著延长胆管细胞癌患者的生存而获批。Her-2 的扩增可在 5%~20% 的晚期胆管细胞癌患者中出现, 然而, 靶向 Her2 的药物——拉帕替尼, 仅仅使晚期胆管细胞癌患者获得了 1.9 个月的 PFS, 这个单臂 II 期临床研究最终惨淡收场^[9]。同一时期, 舒尼替尼治疗晚期胆管细胞癌的 II 期临床研究也因不足 2 个月的疾病进展时间 (time to progression, TTP) 而失败告终^[10]。靶向 EGFR 的治疗在肠癌, 肺癌中都获得了极好的疗效, 然而无论是使用 EGFR-TKI 单药还是 EGFR-TKI 联合索拉菲尼, 均不能使晚期胆管细胞癌患者生存获益, 中位 PFS 仅 2~4 个月^[11-12]。即使是抗 EGFR 的单抗——西妥昔单抗, 也没能在胆管细胞癌中重现其在肠癌中的良好疗效。BINGO^[13] 研究结果显示: 一线方案中加入西妥昔单抗, 并不能增加 GP/GEMOX 的疗效, 也不能改善患者的生存。哺乳动物雷帕霉素靶点 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 抑制剂依维莫司单药用于晚期胆管细胞

癌,虽然DCR达到41.7%,但中位PFS仍然没有显著突破,仅为3.2个月^[14]。结果显示,TP53突变及PI3K通路激活的患者对一线治疗的疗效没有显著影响,但总体预后较差,总生存期显著短于TP53及PI3K通路相关基因未突变的患者。而mTOR通路无论是否有相关基因突变,一线治疗的疗效及总体预后均无显著差异,这对开发治疗晚期胆管细胞癌的靶向药物有一定的指导作用。今后的研究将进一步扩大胆道肿瘤患者的样本量来进一步验证,以期能发现胆道肿瘤患者潜在的治疗靶点,带来胆道肿瘤靶向治疗的突破。

[参考文献]

- [1] RIZVI S, GORES G J. Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2013, 145(6): 1215-1229. DOI:10.1053/j.gastro.2013.10.013.
- [2] WAKAI T, SHIRAI Y, MORODA T, et al. Impact of ductal resection margin status on long-term survival in patients undergoing resection for extra hepatic cholangiocarcinoma[J]. *CANCER-AM CANCER SOC*, 2005, 103:1210-1216. DOI:10.1002/cncr.20906.
- [3] ZHU A X, BORGER D R, KIM Y, et al. Genomic profiling of intrahepatic cholangiocarcinoma: refining prognosis and identifying therapeutic targets[J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21: 3827-3834. DOI: 10.1245/s10434-014-3828-x.
- [4] ANDERSEN J B. Molecular pathogenesis of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2015, 22: 101-113. DOI: 10.1002/jhbp.155.
- [5] CHURI C R, SHROFF R, WANG Y, et al. Mutation profiling in cholangiocarcinoma: prognostic and therapeutic implications[J]. *PLoS One*, 2014, 9:e115383. DOI: 10.1371/journal.pone.0115383.
- [6] ROSS J S, WANG K, GAY L, AL-ROHIL R, et al. New routes to targeted therapy of intrahepatic cholangiocarcinomas revealed by next-generation sequencing[J]. *Oncologist*, 2014, 19: 235-242. DOI: 10.1634/theoncologist.2013-0352.
- [7] VALLE J, WASAN H, PALMER D H, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(14): 1273-1281. DOI: 10.1056/NEJMoa0908721.
- [8] ZOU S, LI J, ZHOU H, et al. Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5696. DOI: 10.1038/ncomms6696.
- [9] PECK J, WEI L, ZALUPSKI M, et al. HER2/neu may not be an interesting target in biliary cancers: results of an early phase II study with lapatinib[J]. *Oncology*, 2012, 82: 175-179. DOI: 10.1093/annonc/mdt203.
- [10] YI J H, THONGPRASERT S, LEE J, et al. A phase II study of sunitinib as a second-line treatment in advanced biliary tract carcinoma: a multicentre, multinational study[J]. *Eur J Cancer*, 2012, 48(2): 196-201. DOI: 10.1016/j.ejca.2011.11.017.
- [11] LEE J, PARK S H, CHANG H M, et al. Gemcitabine and oxaliplatin with or without erlotinib in advanced biliary-tract cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13: 181-188. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70301-1.
- [12] EL-KHOUEIRY A B, RANKIN C, SIEGEL A B, et al. S0941: a phase 2 SWOG study of sorafenib and erlotinib in patients with advanced gallbladder carcinoma or cholangiocarcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2014, 110: 882-887. DOI: 10.1038/bjc.2013.801.
- [13] MALKA D, CERVERA P, FOULON S, et al. Gemcitabine and oxaliplatin with or without cetuximab in advanced biliary- tract cancer (BINGO): a randomised, open-label, non-comparative phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 2014, 15: 819-828. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70212-8.
- [14] BUZZONI R, PUSCEDDU S, BAJETTA E, et al. Activity and safety of RAD001 (everolimus) in patients affected by biliary tract cancer progressing after prior chemotherapy: a phase II ITMO study[J]. *Ann Oncol*, 2014, 25: 1597-1603. DOI: 10.1093/annonc/mdu175.

[收稿日期] 2018-10-17

[修回日期] 2018-12-14

[本文编辑] 韩丹