文章编号:1000-5404(2014)23-2363-04

论著

预测索拉菲尼治疗晚期原发性肝细胞癌疗效的分子标志物的研究

赵 鹏[1],陈 东[2],陈 伟[2],殷晓煜[2], 梁力建[2] (563003 贵州 遵义,遵义医学院附属第一医院肝胆外科[1];510080 广州,中山大学附属第一医院肝胆外科[2])

[摘要] **目的** 探寻可能预测索拉菲尼治疗晚期原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)疗效的分子标志物。**方法** 回顾性分析应用索拉菲尼治疗的54例晚期HCC患者临床资料,将索拉菲尼治疗前病理组织切片分别以抗体VEGFR、pERK、pS6K、PTEN进行免疫组组织化学染色(IHC),根据各抗体染色结果的不同分为高表达组和低表达组,结合索拉菲尼治疗后的疾病进展时间(time to progression, TTP)进行对比分析,得到可能预测索拉菲尼治疗HCC疗效的分子标志物。**结果** VEGFR、pERK高表达组较低表达组的TTP明显延长($P<0.05$),PS6K两组之间的TTP无显著差异($P>0.05$),PTEN几乎无阳性表达。**结论** 索拉菲尼治疗的肝癌组织中VEGFR、pERK高表达患者能够获得较长的TTP,VEGFR、pERK可能作为预测索拉菲尼治疗晚期HCC疗效的分子标志物。

[关键词] 索拉菲尼;原发性肝细胞癌;标志物;VEGFR;pERK
[中图法分类号] R735.7; R969; R979.19 [文献标志码] A

Candidate molecular markers for predicting sorafenib efficacy in treating advanced hepatocellular carcinoma

Zhao Peng[1], Chen Dong[2], Chen Wei[2], Yin Xiaoyu[2], Liang Lijian[2] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563003; [2]Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong Province, 510080, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the candidate molecular markers for predicting the efficacy of sorafenib in treatment of advanced hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Clinical data of 54 patients with identified advanced HCC and receiving sorafenib treatment who hospitalized in the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University from December 2008 to October 2011 were collected and analyzed in this study. Their liver tissue sections from the paraffin-embedded liver tumor biopsies before sorafenib treatment were analyzed with immunohistochemical staining (IHC) for phosphorylated extracellular signal regulated kinase (pERK), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), p70 S6 kinase (Ps6k) and phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN). According to the results of IHC, the patients were divided into high- and low-expression subgroups, and then analyzed with the time to progression (TTP) of the cohort in order to investigate the molecular markers for predicting the efficacy of sorafenib. **Results** The TTP was significantly longer in the patients with higher expression of VEGFR and pERK than those with lower expression ($P<0.05$). But there was no difference in the TTP between the patients with high and low expression of Ps6k ($P>0.05$). No positive expression of PTEN was seen in the cohort. **Conclusion** In the treatment of advanced HCC, sorafenib will cause longer TTP in the patients with high expression levels of VEGFR and pERK. VEGFR and pERK maybe the candidates as molecular markers for sorafenib in treating advanced HCC.

[**Key words**] sorafenib; hepatocellular carcinoma; marker; vascular endothelial growth factor receptor; phosphorylated extracellular signal regulated kinase

Supported by the Starting Project for Doctorial Program of Natural Science Foundation of Guangdong Province (10451008901004816) and the CSCO-Bayer Schering Foundation for Young Scholars in Hepatocarcinoma (Y-2009-002, Y-B2010-032, Y-B2012-017). Corresponding author Liang Lijian, E-mail: lianglj@medmail.com.cn

[基金项目] 广东省自然科学基金博士启动项目(10451008901004816);希思科-拜耳先灵青年肝癌研究基金(Y-2009-002,Y-B2010-032,Y-B2012-017)
[通信作者] 梁力建,电话:(020)87755766-8096,E-mail:Dr_lianglj@163.net
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1606.015.html (2014-11-06)

SHARP(sorafenib hepatocellular carcinoma assessment randomised protocol trial)研究与Oriental研究表明,索拉菲尼能够延长晚期HCC患者的总体生存期,该药目前已成为治疗晚期原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)的一线用药,但其治疗有效率(DCR,疾病控制率)仅约为43%[1-2]。应用索拉菲尼的治疗费用昂贵,如经治疗后无效,既造成了资源的浪费,也破坏了患者尝试其他治疗措施的机会,所以如果能够有预测索拉菲尼治疗疗效的分子标志物,在用药前预测疗效,选择性地针对不同患者给药,对于提高疗效有重大意义。索拉菲尼是一种多靶点激酶抑制剂,作用靶点为VEGFR、PDGFR、C-KIT、RET、FLT-3和RAF[3-5],和其作用有关的信号转导通路包括MAPK、PI3K/Akt/mTOR、WNT/β-catenin,已有研究提示,索拉菲尼治疗HCC组织中pERK高表达的患者可获得较长的TTP[6]。本研究针对4种与索拉菲尼作用相关的分子为研究对象,通过检测它们在治疗前HCC病理组织中的表达情况,结合临床资料进行分析,探索可能预测索拉菲尼治疗HCC疗效的分子标志物,为其临床给药选择合适的患者作指导。

1 资料与方法

1.1 一般资料及纳入标准

选择2008年12月至2011年10月期间,中山大学附属第一医院肝胆外科应用索拉菲尼治疗的54例HCC患者,男性46例(85.2%),女性8例(14.8%),中位年龄为48.7(21~77)岁,平均随访时间17.65(2~33.3)个月,慢性乙型肝炎病毒感染是主要病因。ECOG体能评分0分者37例(68.5%),1分者17例(31.5%)。Child-Pugh分级A级者42例(77.8%),B级者12例(22.2%)。12例(22.2%)有门静脉侵犯,6例(11.1%)有淋巴结转移,26例(53.8%)出现远处转移。BCLC(巴塞罗那临床肝癌分期,2010)分期B期者为18例(33.3%),C期者36例(66.7%)。中位AFP(甲胎蛋白)浓度为7134(1.7~58 344)μg/L,天冬氨酸转氨酶中位浓度为88(17~278)U/L。有35例曾经接受过肝切除手术治疗,其中22例在术后接受过介入治疗,5例单纯接受介入治疗,3例接受过肝移植手术(1例移植术后接受过介入治疗),3例接受综合治疗(肝切除+介入治疗+化疗),8例未接受过任何治疗。所有病例均通过组织病理学诊断。

纳入观察的病例需同时满足以下条件:不适合手术治疗,Child-Pugh评分A或B级;ECOG评分在1分以上;预计生存时间>12周;外周血液检查中性粒细胞计数≥3×10^9/L,血小板计数≥60×10^9/L,血红蛋白≥85 g/L,总胆红素≤3.0 mg/dL。

1.2 治疗方法

应用药物为德国拜尔医疗保健公司生产的甲基磺酸索拉菲尼片剂(商品名称多吉美),采用统一的连续口服给药方式,400 mg/次,2次/d,服药前禁食2 h。在连续服药过程中,如患者出现疾病进展或不能耐受的药物毒性反应时停止给药。其中有8例因为药物不良反应曾做索拉菲尼减量或短时间停药处理,减量处理为200 mg/次,2次/d或400 mg/次,1次/d,停药时间一般5~7 d,症状缓解后恢复统一给药方式。

1.3 评价方法及标准

在服用索拉菲尼前记录患者详细临床资料,服药后每6周作为1个周期进行观察,内容包括一般情况、检测血液常规、生化指标、AFP浓度、胸部正侧位X线片和上腹部CT检查。根据WHO实体瘤的疗效评估标准(response evaluation criteria in solid tumor, RECIST)进行疗效评估,根据CT测量的肿块总径值(SLD)计算出可测量病灶的缩小比例=(基线SLD-12周SLD)/基线SLD。治疗效果可以分为:(1)完全缓解(complete response,CR):所有目标病灶消失;(2)部分缓解(partial response,PR):基线病灶长径总和缩小≥30%;(3)进展(progress disease, PD):基线病灶长径总和增加≥20%或出现新病灶;(4)稳定(stable disease, SD):基线病灶长径总和有缩小但未达PR或有增加但未达PD。按照美国癌症研究所常见毒性反应标准3.0版(Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0,NCI-CTC)对用药过程中出现的不良反应进行评价和分级。CT复查疗效评估由固定的放射科和肝胆胰腺外科医师各1名进行。

1.4 免疫组织化学染色结果判断

54例病理切片分别以抗体pERK、VEGFR、pS6K、pten做免疫组化染色,表达以细胞核和(或)细胞质中出现清晰黄色颗粒为阳性判定标准。在高倍显微镜(10×20)下观察细胞着色情况,每张切片随机选取5个不同视野,每个视野观察100个细胞,评估免疫组化染色结果。根据Choi等[7]的报道,观察染色强度(阴性为0分,浅黄色为1分,浅棕色为2分,棕黄色为3分)和染色细胞数量(0分为阴性,1分为染色细胞数目≤10%,2分为染色细胞数目>10%并≤33%,3分为染色细胞数目>33%并≤66%,4分为染色细胞数目>66%),两者积分相加得到表达强度(Maximum staining intensity, MSI),0分记为-,1~2分为+,3~5分为++,6~7分为+++,以MSI-和+记为低表达,MSI++和+++记为高表达。

1.5 统计学分析

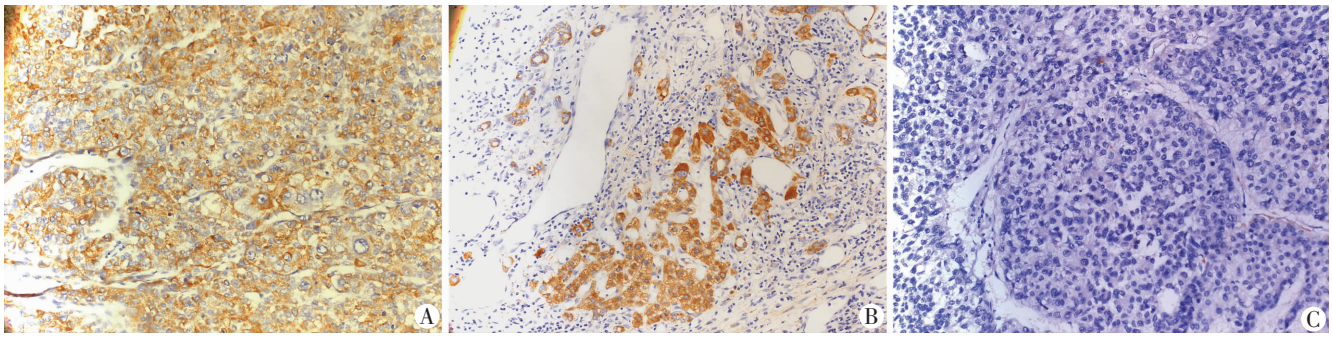
数据采用SPSS 13.0软件分析,免疫组织化学结果评分后结合临床资料的疾病进展时间(time to progress, TTP)应用Kaplan-Meier方法计算生存率,将各种变量因素对TTP的影响采用Log-rank分析,其中PTEN评分均在+以下,未纳入统计。

2 结果

镜下观察显示,pERK和PS6K阳性染色颗粒大部分位于细胞质,VEGFR阳性染色则位于细胞膜,PTEN基本无阳性染色(图1~3)。通过统计分析可以看出,pERK、VEGFR高表达组(评分≥3分)较低表达组(评分<3分)TTP时间显著延长($P<0.05$);PS6K表达不同的两组间TTP无显著差异($P>0.05$);由于PTEN几乎无阳性表达而未纳入统计(表1,图4、5)。

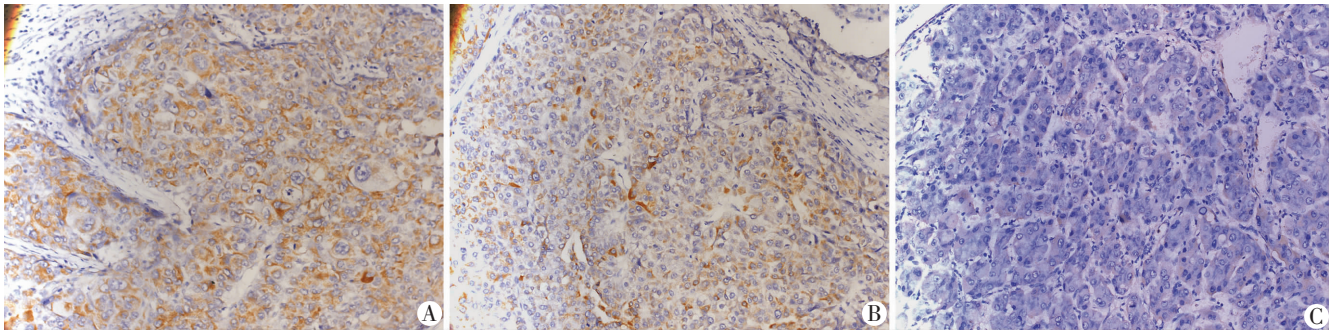
表1 Kaplan-Meier分析各抗体在HCC组织中表达程度与TTP的关系

评分	例数	中位TTP(月)	95% *CI*	*P*
pERK				
≥3	22	5.1	3.34-6.66	
<3	32	2.5	1.33-3.67	0.03
VEGFR				
≥3	29	5.1	3.49-6.52	
<3	25	2.4	2.15-2.73	0.04
pS6K				
≥3	16	2.5	1.39-3.61	
<3	38	3.5	1.97-5.03	0.17



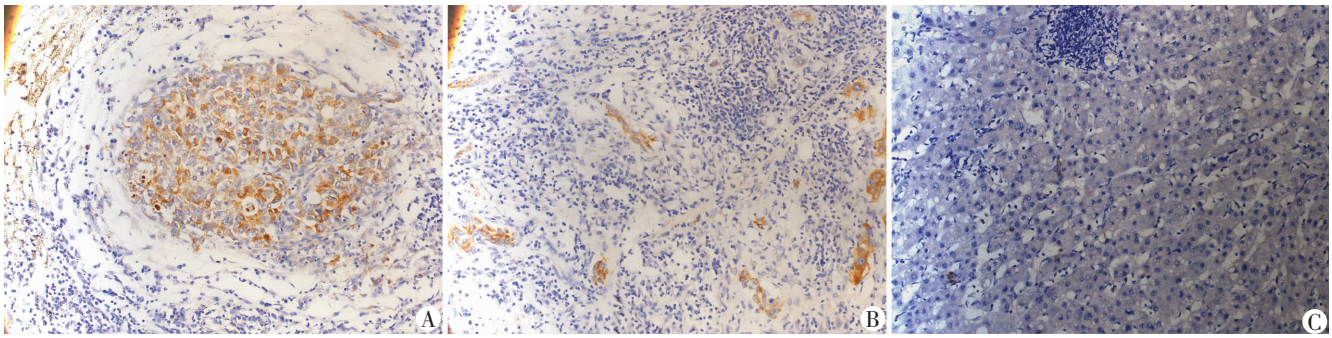
A:MSI = + + +(病例 TTP 为 9.6 个月);B:MSI = + +(病例 TTP 为 5 个月);C:MSI = −(病例 TTP 为 1.1 个月)

图 1　pERK 在 TTP 不同 HCC 组织中的表达　(S-P ×200)



A:MSI = + + +(病例 TTP 为 11 个月);B:MSI = +(病例 TTP 为 4.6 个月);C:MSI = −(病例 TTP 为 1 个月)

图 2　VEGFR 在 TTP 不同 HCC 组织中的表达　(S-P ×200)



A:MSI = + + +(病例 TTP 为 5.5 个月);B:MSI = + +(病例 TTP 为 3.2 个月);C:MSI = −(病例 TTP 为 0.8 个月)

图 3　PS6K 在 TTP 不同 HCC 组织中的表达　(S-P ×200)

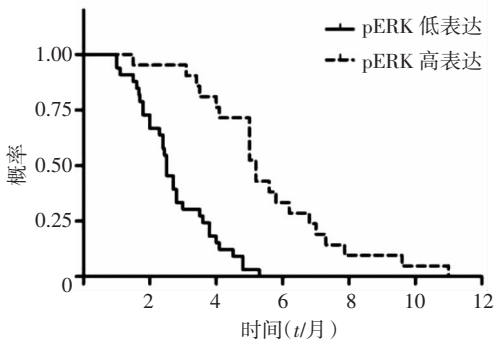


图 4　pERK 免疫组化染色 MSI 不同 HCC 患者的 TTP

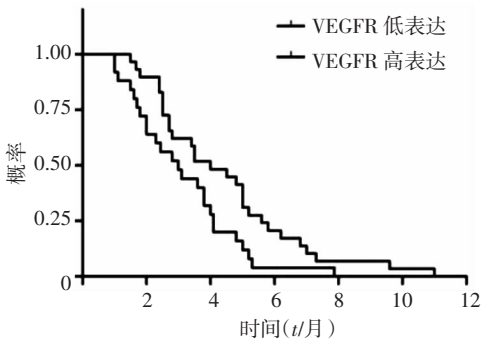


图 5　VEGFR 免疫组化染色 MSI 不同 HCC 患者的 TTP

3 讨论

索拉菲尼是目前世界范围内唯一认可的对晚期HCC患者治疗有效的分子靶向药物,但其治疗成本昂贵,总有效率不到50%,这构成了对其用药的不利影响,很多科研机构都在探索可能预测其疗效的标志物。pERK是MAPK(RAF/MEK/ERK)信号转导通路下游的一个关键分子,在一项索拉菲尼治疗HCC的Ⅱ期临床实验中,对用药前采集的33例HCC肿瘤组织进行免疫组织化学染色,结果提示肿瘤细胞pERK染色强阳性者TTP较弱阳性者明显延长,HCC患者肿瘤组织中pERK高表达者用索拉菲尼治疗可以有更长的TTP[6]。Zhang等[8]的一项研究中,用SMMC-7721,MHCC97-L,MHCC97-H和HCCLM6四种细胞株作为研究对象,发现索拉菲尼对4种细胞株ERK的磷酸化均有明显抑制作用且呈剂量依赖性,而且基础ERK表达程度不同其抑制效果亦明显不同;如果先用ERK阻滞剂U0126作用MHCC97H细胞株,则细胞株对索拉菲尼抑制生长的敏感性明显下降,应用U0126前后的IC_{50}值分别(17.31±1.62)、(10.81±1.24)μmol/L($P=0.028\ 1$),说明pERK可能成为索拉菲尼治疗HCC疗效进行预测的分子标志物。本研究中,在对54例HCC患者肝癌组织进行免疫组织化学分析后,其中pERK高表达组较低表达组TTP明显延长,提示pERK可能作为索拉菲尼治疗HCC疗效的分子标志物,这个结论与以上两实验结论相同。众所周知,VEGFR是索拉菲尼作用的一个靶点,本研究中VEGFR在肝癌组织中高表达者在索拉菲尼治疗后显著获益较长TTP,这为寻找预测索拉菲尼治疗HCC疗效的标志物提供了新思路。综上,本研究结果显示,如果HCC患者肝癌组织中VEGFR、pERK高表达,在接受索拉菲尼治疗后会获得较长的TTP,VEGFR、pERK可能作为预测索拉菲尼治疗HCC治疗疗效的候选分子标志物,VEGFR、pERK低表达者可能不适合选择索拉菲尼治疗,而及时选择其他治疗措施,这为晚期HCC患者是否选择索拉菲尼治疗提供了个体化方案。

PS6K和PTEN是PI3K/Akt/mTOR信号转导通路的下游因子,PS6K在肝癌发病时其磷酸化程度会有一定程度的升高,本研究中有部分肝癌组织中PS6K染色呈高表达,但通过分析与TPP的关系发现无统计学意义,提示该分子不能够用来预测索拉菲尼的治疗疗效;PTEN在染色中几乎无阳性表达,其原因可能是由于它在PI3K/Akt/mTOR信号转导通路中为抑癌基因,而在肿瘤发病过程中抑癌基因的表达往往会受到抑制有关。

在其他相关的临床应用研究中,Child-Pugh肝功能分级可能会成为索拉菲尼治疗HCC疗效的标志物[9-11],还有研究提出[12],ECOG PS可能对指导索拉菲尼用药有帮助,另有报道AST、okuda stage、AFP可能作为预测索拉菲尼治疗HCC效果的独立因素[9,12-13]。本研究是一个单中心研究,HCC病理组织样本数量有限,另外,除了VEGFR、pERK、pS6K、PTEN之外,与索拉菲尼作用有关的分子还有很多,建议将来的研究可多中心合作以增大样本量,使统计数据更具说服力,还可增加信号转导通路中的其他分子及结合临床因素综合进行研究。

参考文献:

[1] Llovet J M, Ricci S, Mazzaferro V, *et al*. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2008, 359(4): 378-390.

[2] Cheng A L, Kang Y K, Chen Z, *et al*. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase Ⅲ randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(1): 25-34.

[3] Wilhelm S M, Carter C, Tang L, *et al*. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis[J]. Cancer Res, 2004, 64(19): 7099-7109.

[4] Wilhelm S M, Adnane L, Newell P, *et al*. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(10): 3129-3140.

[5] Liu L, Cao Y, Chen C, *et al*. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5[J]. Cancer Res, 2006, 66(24): 11851-11858.

[6] Abou-Alfa G K, Schwartz L, Ricci S, *et al*. Phase Ⅱ study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(26): 4293-4300.

[7] Choi M S, Shim Y H, Hwa J Y, *et al*. Expression of DNA methyltransferases in multistep hepatocarcinogenesis[J]. Hum Pathol, 2003, 34(1): 11-17.

[8] Zhang Z, Zhou X, Shen H, *et al*. Phosphorylated ERK is a potential predictor of sensitivity to sorafenib when treating hepatocellular carcinoma: evidence from an *in vitro* study[J]. BMC Med, 2009, 7: 41.

[9] Pinter M, Sieghart W, Hucke F, *et al*. Prognostic factors in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2011, 34(8): 949-959.

[10] Worns M A, Weinmann A, Pfingst K, *et al*. Safety and efficacy of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma in consideration of concomitant stage of liver cirrhosis[J]. J Clin Gastroenterol, 2009, 43(5): 489-495.

[11] Kim J E, Ryoo B Y, Ryu M H, *et al*. Sorafenib for hepatocellular carcinoma according to Child-Pugh class of liver function[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2011, 68(5): 1285-1290.

[12] Baek K K, Kim J H, Uhm J E, *et al*. Prognostic factors in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib: a retrospective comparison with previously known prognostic models[J]. Oncology, 2011, 80(3/4): 167-174.

[13] Shim J H, Park J W, Choi J I, *et al*. Practical efficacy of sorafenib monotherapy for advanced hepatocellular carcinoma patients in a Hepatitis B virus-endemic area[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(4): 617-625.

(**收稿**:2014-06-09;**修回**:2014-09-23)

(编辑 邓强庭)