

文章编号 1006-8147(2020)05-0450-04

论著

TGF- β /SMAD4 信号通路中基因突变对胰腺癌患者生存的影响

方闯, 田伟军

(天津医科大学总医院普通外科, 天津 300052)

摘要 目的:分析胰腺导管腺癌患者转化生长因子(TGF)- β /SMAD4 信号通路中基因突变的情况及对生存的影响。方法:回顾性分析天津医科大学总医院普通外科 2016 年 7 月—2019 年 9 月共 19 例胰腺导管腺癌患者的临床资料,NGS 检测患者基因突变情况,查询 dbSNP 及 COSMIC 数据库关键基因突变位点的临床意义。结果:19 例胰腺导管腺癌患者中最常见的基因突变是 *KRAS*(84.2%)、*TP53*(68.4%)、*SMAD4*(26.3%)、*CDKN2A*(26.3%)、*CREBBP*(15.8%)、*RNF43*(15.8%)、*BRAF*(15.8%)等。具有 TGF- β /SMAD4 信号通路相关基因突变的患者有 7 例(36.8%),其中 *SMAD4* 基因突变组中位生存时间 5.0 个月,无 *SMAD4* 基因突变组中位生存时间 14.0 个月,差异有统计学意义($P=0.032$)。结论:TGF- β /SMAD4 信号通路中具有 *SMAD4* 基因突变患者的临床预后相较于无基因突变患者的临床预后更差,此通路中具有多个基因突变其预后相对更差。

关键词 胰腺癌;基因突变;生存分析;TGF- β /SMAD4 信号通路

中图分类号 R735.9

文献标志码 A

The effect of mutations in TGF- β /SMAD4 signal pathway on the survival of patients with pancreatic cancer

FANG Chuang, TIAN Wei-jun

(Department of General Surgery, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective: To analyze the status of gene mutations in transforming growth factor(TGF)- β /SMAD4 signal pathway in patients with pancreatic cancer and its effect on survival. **Methods:** The clinical data of 19 patients with pancreatic cancer from July 2016 to September 2019 in the General Hospital of Tianjin Medical University were analyzed retrospectively, the gene mutations were detected by NGS and the clinical significance of querying the key gene mutation sites in dbSNP and COSMIC databases were investigated. **Results:** The most common gene mutations in 19 patients with pancreatic cancer were *KRAS*(84.2%), *TP53*(68.4%), *SMAD4*(26.3%), *CDKN2A*(26.3%), *CREBBP*(15.8%), *RNF43*(15.8%), *BRAF*(15.8%), etc. There were 7(36.8%) patients with the TGF- β /SMAD4 signal pathway-related gene mutations. The median survival time of the *SMAD4* gene mutation group is 5.0 months, and the median survival time in the non-*SMAD4* gene mutation group is 14.0 months, and the difference was statistically significant ($P=0.032$). **Conclusion:** The clinical prognosis of patients with the *SMAD4* gene mutation in TGF- β /SMAD4 signaling pathway is worse than that of patients without gene mutations, and the prognosis of patients with multiple gene mutations in this pathway is relatively worse.

Key words pancreatic cancer; gene mutation; survival analysis; TGF- β /SMAD4 signaling pathway

在近几年中胰腺癌的发病率及死亡率都在持续上升,预计到 2030 年胰腺癌将成为美国第二位肿瘤相关的死因^[1-2]。在中国 2015 年癌症相关死亡人数约有 2 814 000 人,平均超过 7 500 人/年,其中胰腺癌的发病率呈逐年升高的趋势且其成为癌症相关死亡的前 10 位肿瘤^[3]。胰腺癌诊断较为困难,其早期缺乏特定的症状和体征,超过 80% 的患者在确诊时已经是不可切除或有远处转移^[4]。90% 的胰腺癌为导管腺癌,其对现有的放疗和化疗不敏感,从而使得其 5 年生存率小于 8%。转化生长因子(TGF)- β 信号通路在胰腺导管腺癌中具有正向调

节肿瘤生长的作用,SMAD4 蛋白作为此信号通路中关键的分子,在此通路功能中具有较为重要的作用。

随着生物技术的进步和基因高通量检测的发展,DNA 微阵列技术和二代检测技术的应用使得个体化基因检测成为了可能。研究证实胰腺癌包含多基因和多靶点的突变,这使得胰腺癌患者之间存在较大的异质性,相同的化疗方案在不同患者间的整体收益相差较大。本研究进行了胰腺导管腺癌患者基因突变的 NGS 测序,并同时回顾性总结了其临床资料,分析了 TGF- β /SMAD4 信号通路上关键位点基因突变的情况,探究了 *SMAD4* 基因突变对患者生存的影响,以期为一部分胰腺导管腺癌患者的临

作者简介 方闯(1993-),男,硕士在读,研究方向:普外科;通信作者:田伟军,E-mail: jonathontian@163.com。

床预后提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料 回顾性分析 2016 年 7 月 1 日-2019 年 9 月 1 日天津医科大学总医院收治,术后病理确诊为胰腺导管腺癌的患者 19 例,随访资料完整,最后回访截止日期为 2019 年 9 月 1 日。患者临床获取病理时记为生存起始时间,主要及次要终点事件分别为患者死亡与随访结束。收集患者的临床特征、血液学检查、肿瘤分期及存活时间等。

1.2 方法 手术中留取胰腺肿瘤患者新鲜肿瘤组织样本 2 份,将其分别浸泡于 10%中性福尔马林溶液中。第一份先行病理诊断,待病理诊断结果返回后,将病理诊断为胰腺导管腺癌的患者第二份肿瘤组织样本行基因检测。收集医院病理回报为胰腺导管腺癌的患者基因突变情况和随访的临床数据。访问 dbSNP 及 COSMIC 数据库,对 TGF-β/SMAD4 信号通路上的基因突变的情况及临床意义进行总结。

1.3 统计学处理 本组数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,取 α=0.05 为检验水准。采用 Kaplan-Meier 生存分析法和对数秩和检验分析,率的比较采用 χ² 检验,单因素分析采用 Log-Rank 检验。

2 结果

2.1 一般临床特征 19 例胰腺导管腺癌患者的一般临床资料如表 1 所示。

2.2 基因检测结果 利用 NGS 技术对 19 例胰腺导管腺癌患者的组织标本进行 360 个基因的测序,结果显示:19 例患者中共出现 63 个基因突变和 115 个变异位点。19 例胰腺导管腺癌患者的基因突

表 1 胰腺导管腺癌患者的临床资料

Tab 1 Clinical characteristics of patients with pancreatic cancer

临床特点	n(%)	临床特点	n(%)
性别		AJCC 分期	
男	11(57.9)	I 期	3(15.8)
女	8(42.1)	II 期	1(5.3)
年龄		III 期	2(10.5)
≤60	3(15.8)	IV 期	13(68.4)
>60	16(84.2)	术前白蛋白	
吸烟史		低蛋白血症	5(26.3)
是	7(36.8)	正常	14(73.7)
否	12(63.2)	术前体重下降	
糖尿病史		体重下降	11(57.9)
是	4(21.1)	体重正常	8(42.1)
否	15(78.9)	术前黄疸	
初始症状		术前有黄疸	8(42.1)
上腹部疼痛	11(57.9)	术前无黄疸	11(57.9)
黄疸	3(15.8)	术前 CA199	
消瘦	1(5.2)	高	15(78.9)
查体发现	4(21.1)	低	4(21.1)
肿瘤位置		术前空腹血糖	
胰头及胰颈	10(52.6)	高	10(52.6)
胰体尾	9(47.4)	低	9(47.4)
		是否行根治性手术	
		否	11(57.9)
		是	8(42.1)

变检测结果如图 1 所示:最常见的突变基因是 KRAS(84.2%)、TP53(68.4%)、SMAD4(26.3%)、CD-KN2A(26.3%)、CREBBP(15.8%)、RNF43(15.8%)、BRAF(15.8%)等。

19 例胰腺导管腺癌患者中具有 TGF-β/SMAD4 信号通路(SMAD4/SMAD3/TGFBR1/TGFBR2)相关基因突变的患者有 7 例(36.8%),5 例患者具有 SMAD4 基因突变(2 例为内含子位点的突变),其中

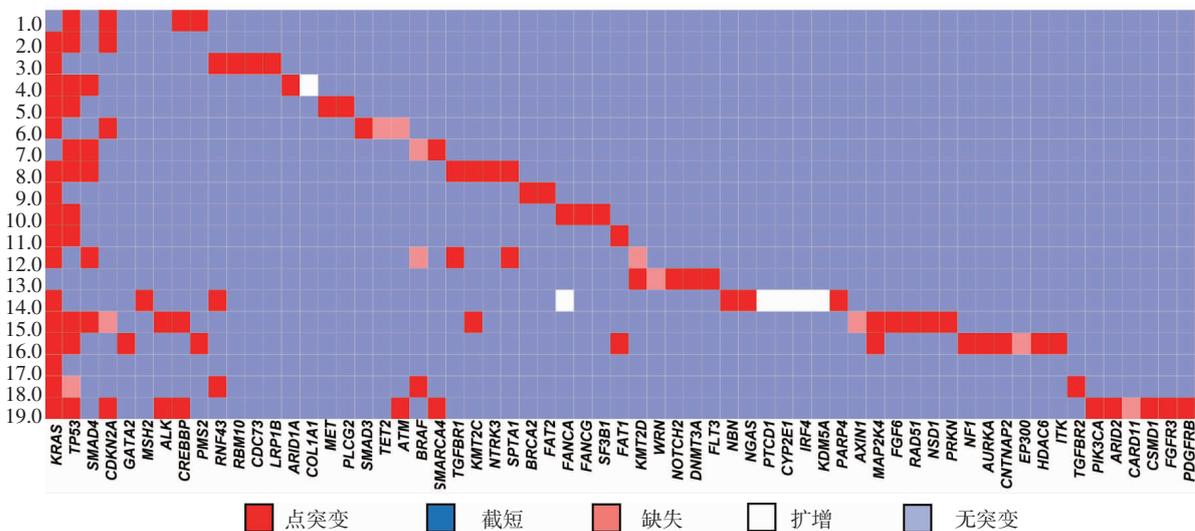


图 1 19 例患者 63 个基因的 115 个位点的突变热图
Fig 1 Mutant heat maps of 115 loci in 63 genes of 19 patients

SMAD4 基因突变患者中有 2 例患者同时具有 *TGF- β 1* 基因的突变;1 例患者具有 *SMAD3* 基因突变,

1 例患者具有 *TGFBR2* 基因突变,详见表 2,其余患者未检测到此通路相关的基因突变。

表 2 TGF- β /SMAD4 信号通路中各基因突变情况

Tab 2 Gene mutations in TGF- β /SMAD4 signaling pathway

基因	突变基因位置	DNA 突变	蛋白突变	dbSNP	突变丰度(%)	突变类型	临床意义
<i>SMAD4</i>	Exon9	c.1051G>T	p.D351Y	Rs1210 446538	18.74	错义突变	未知
<i>SMAD4</i>	Exon11	c.1324C>T	p.Q442*	COSV61 684132	36.43	无义突变	致病
<i>SMAD4</i>	Intron6	c.788_2A>T	—	—	46.30	剪切突变	未知
<i>SMAD4</i>	Exon9	c.1082G>A	p.R361H	Rs3777 67347	8.44	错义突变	致病,可能致病
<i>SMAD4</i>	Intron2	c.250-2A>G	—	—	15.96	剪切突变	未知
<i>SMAD3</i>	Exon2	c.238C>T	p.R80W	Rs7507 07381	14.06	错义突变	不确定
<i>TGFBR1</i>	Exon4	c.722C>T	p.S241L	Rs1118 54391	45.13	错义突变	致病,可能致病
<i>TGFBR1</i>	Exon6	c.1013A>T	p.N338I	Rs8632 23821	8.03	错义突变	不确定
<i>TGFBR2</i>	Exon3	c.305G>T	p.C102F	COSV55 445094	19.06	错义突变	可能致病

19 例胰腺导管腺癌患者中,此信号通路中基因突变的类型包括错义突变(6 例)、剪切突变(2 例)和无义突变(1 例),各基因突变丰度在 8.03%~46.30%且各不相同。各基因突变位点的临床意义包括致病与潜在致病。

2.3 生存分析 19 例患者随访截至 2019 年 9 月 1 日,死亡 10 例(52.6%),存活 9 例(47.4%)。中位总生存期(median overall survival, mOS)为 14.0 个月(95% CI:3.4~24.6)。将具有 *SMAD4* 基因突变的患者记为 *SMAD4* 基因突变组,无 *SMAD4* 基因突变患者记为无 *SMAD4* 基因突变组,其他各基因突变的生存分析依次进行。

患者突变基因特征与其生存的关系显示,*SMAD4* 基因突变组中位生存时间 5.0 个月,无 *SMAD4* 基因突变组中位生存时间 14.0 个月,差异有统计学意义($\chi^2=4.583, P=0.032$),见图 2。其他生存分析显示以 *KRAS* 基因突变分组、*TP53* 基因突变分组及 *CDKN2A* 基因突变分组所得的生存分析均无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

胰腺导管腺癌是致死性较高的疾病,在过去几十年里其临床治疗均未取得实质性进展,一线标准化疗方案中吉西他滨联合白蛋白紫杉醇 OS 为 8.5 个月, FOLIRNOX 方案的 OS 为 10.2 个月^[5-6]。近期研究表明胰腺导管腺癌基因突变具有复杂性,一方面,在胰腺导管腺癌的发生、发展中具有高频的突变基

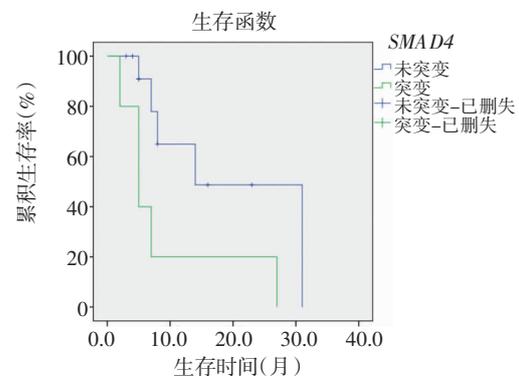


图 2 *SMAD4* 基因突变组与无 *SMAD4* 基因突变组生存分析

Fig 2 Survival analysis of *SMAD4* mutant group and no *SMAD4* mutant group

因,例如 *KRAS*、*TP53* 等,另一方面,它具有大量的中低频突变基因,例如 *SMAD4*、*ATM*、*FANCG* 等^[7-9]。胰腺导管腺癌中 *KRAS* 基因突变频率为 70%~95%,*TP53* 基因突变为 75%,*SMAD4* 基因突变为 50%^[10-12],大致与本研究中各基因突变频率相近。针对 *KRAS*、*TP53*、*CDKN2A* 等高频突变基因的研究,其临床治疗应用收益甚微^[13-15]。因此,能否通过研究及治疗具有 *SMAD4* 基因突变的患者来提高胰腺导管腺癌的整体生存率成为了未来胰腺导管腺癌治疗的可能方向之一。

TGF- β /SMAD4 信号通路在肿瘤组织中起到了一个复杂的双向作用。在肿瘤早期,TGF- β /SMAD4 信号通路负向调节肿瘤生长,而在肿瘤进展期或晚期,则正向调节肿瘤生长。胰腺导管腺癌 *SMAD4* 基

因变异使得 *SMAD4* 蛋白活性减低,必然导致 TGF- β 信号通路遭到破坏,从而失去对肿瘤细胞增殖的抑制作用。本研究中具有 *SMAD4* 基因突变的患者相较于 *SMAD4* 基因未突变的患者具有更差的生存预后,这也进一步说明 *SMAD4* 基因突变具有促进胰腺导管腺癌进展的作用。*SMAD4* 蛋白是介导 TGF- β 信号从细胞浆进入到细胞核的关键分子^[16]。在胰腺导管腺癌中,*SMAD4* 基因缺失可以使得 *KRAS* 诱导的癌症过程加速^[17],并且 *SMAD4* 蛋白随着胰腺癌分化程度的降低而减少^[18]。*SMAD4* 蛋白表达的减少预示着胰腺导管腺癌患者更差的预后^[19]。而有研究表明 *SMAD4* 蛋白表达缺失的可切除胰腺导管腺癌患者相对于 *SMAD4* 蛋白正常表达的可切除胰腺导管腺癌患者行术后辅助治疗后,前者具有更高的局部和远处转移率,而生存率却没有统计学差异^[20],此可能为 *SMAD4* 蛋白是基因转入与翻译后的产物,其受到多种途径的调节。本研究为胰腺导管腺癌患者基因层面与生存分析的结果,可为胰腺导管腺癌提供临床预后评估指标,为新的靶向治疗提供参考靶点。

5 例 *SMAD4* 基因突变的患者中存在 2 例 TGF-*BR1* 基因突变的患者,他们分别仅存活 2 个月及 5 个月,前者 TGF*BR1*^{S241L} 基因突变丰度较高(45.13%),后者 TGF*BR1*^{N338I} 基因突变丰度较低(8.03%)。同时具有 2 个 TGF- β /SMAD4 信号通路中关键基因突变的患者临床预后比此通路中单基因突变患者的生存较差,且生存时间与基因突变丰度有一定关系。

本研究仅为单中心胰腺导管腺癌患者的临床及基因突变的分析及报道,通过临床资料汇总,对高频突变基因及 TGF- β /SMAD4 信号通路上基因突变做了初步分析,有待进一步行多中心、大样本、RNA 及蛋白表达层面的验证。

TGF- β /SMAD4 信号通路中具有 *SMAD4* 基因突变患者的临床预后相较于无基因突变患者的临床预后更差。此通路中具有 *SMAD4* 基因突变的患者同时发生 TGF*BR1* 基因突变的生存时间较短且其基因突变丰度较高。本研究为胰腺导管腺癌患者的临床预后提供参考,为胰腺导管腺癌靶向治疗提供新的参考靶点。

参考文献:

- [1] Saad A M, Turk T, Al-Husseini M J, et al. Trends in pancreatic adenocarcinoma incidence and mortality in the united states in the last four decades; a seer-based study [J]. BMC Cancer, 2018,18(1):688
- [2] Rahib L, Smith B D, Aizenberg R, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States [J]. Cancer Res, 2014, 74(11):2931
- [3] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. Ca A Cancer J Clin, 2016,66(2):115
- [4] Howlader N, Noone A M, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review 1975–2009(vintage 2009 populations)[C]. USA: Surveillance Research Program of the National Cancer Institute, 2012
- [5] Conroy T, Paillet B, Francois E, et al. Irinotecan plus oxaliplatin and leucovorin–modulated fluorouracil in advanced pancreatic cancer—a groupe tumeurs digestives of the federation nationale des centres de lutte contre le cancer study [J]. J Clin Oncol, 2004,23(6):1228
- [6] Von Hoff D D, Ervin T, Arena F P, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab–paclitaxel plus gemcitabine[J]. N Engl J Med, 2013,369(18):1691
- [7] Jones S, Zhang X, Parsons D W, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses[J]. Science, 2008,321(5897):1801
- [8] Waddell N, Pajic M, Patch A, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer[J]. Nature, 2015,518(7540):495
- [9] Dreyer S B, Chang D K, Bailey P, et al. Pancreatic cancer genomes: implications for clinical management and therapeutic development [J]. Clin Cancer Res, 2017,23(7):1638
- [10] Bournet B, Buscail C, Muscari F, et al. Targeting kras for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: hopes and realities[J]. Eur J Cancer, 2016,54(1):75
- [11] Fang Y, Yao Q, Chen Z, et al. Genetic and molecular alterations in pancreatic cancer implications for personalized medicine [J]. Med Sci Monit, 2013,19(1):916
- [12] Zhao M, Mishra L, Deng C. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer [J]. Int J of Biol Sci, 2018,14(2):111
- [13] Cox A D, Fesik S W, Kimmelman A C, et al. Drugging the undruggable ras: mission possible? [J]. Nat Rev Drug Discov, 2014,13(11):828
- [14] Khoo K H, Verma C S, Lane D P. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(3):217
- [15] Schutte M, Hruban R H, Geradts J, et al. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas[J]. Cancer Res,1997,57(15):3126
- [16] 程时丹. SMAD4 与消化系统肿瘤[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2006, 15(3):323
- [17] Kojima K, Vickers S M, Adsay N V, et al. Inactivation of smad4 accelerates krasG12D-mediated pancreatic neoplasia[J]. Cancer Res, 2007,67(17):8121
- [18] Hua Z, Zhang Y C, Hu X M, et al. Loss of DPC4 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2003,9(12):2764
- [19] Fullerton P T, Creighton C J, Matzuk M M. Insights into SMAD4 loss in pancreatic cancer from inducible restoration of TGF- β signaling[J]. Mol Endocrinol, 2015,29(10):1440
- [20] Herman J M, Jabbour S K, Lin S H, et al. Smad4 loss correlates with higher rates of local and distant failure in pancreatic adenocarcinoma patients receiving adjuvant chemoradiation[J]. Pancreas, 2018, 47(2):208