

## · 国外医学报道 ·

# 乳腺癌新辅助化疗基因组标志物的建立： EORTC 10994/BIG 00-01 临床试验的亚组研究

EORTC 10994/BIG 00-01 研究小组曾在体外试验中观察到,基因标志物能够预测常规化疗药物对细胞的生长抑制及毒性效应;随后,该小组检测了新辅助化疗Ⅲ期临床试验中雌激素受体阴性乳腺癌患者体内上述基因的表达,并于 2007 年 11 月 14 日在柳叶刀肿瘤杂志(Lancet Oncology)报道了上述基因标志物的有效性。现将该亚组研究的具体内容介绍如下。

## 1 背景资料

化疗能够提高乳腺癌患者的总生存率,尤其含紫杉类药物的化疗方案较传统治疗方案的优势更为明显,但价格高、毒性大、获益人群相对较少是紫杉类化疗药物的缺陷,因此,有必要明确药物特异性的预测因子。通过新辅助化疗的单组试验,研究人员已经找到相应的基因标志物,大多数标志物均可预测化疗疗效。但是,研究设计的不足限制了其在临床实践中的应用:首先,上述单组试验中的患者均非随机接受化疗方案,因此无法证实基因标志物的药物特异性;其次,许多研究均包含了雌激素受体阳性和阴性的混合人群,而雌激素受体阳性肿瘤的化疗缓解率低。由于雌激素受体状态是乳腺癌基因表达的关键因子,研究混合人群可能导致治疗反应基因与雌激素受体依赖性基因的混杂。因此,该亚组研究旨在证实上述基因标志物预测雌激素受体阴性乳腺癌患者化疗疗效的价值。

## 2 资料和方法

### 2.1 患者的选择及处理

该研究是新辅助化疗前瞻性Ⅲ期试验(EORTC 10994/BIG 00-01)的次要研究终点。EORTC 10994/BIG 00-01 试验对比研究乳腺癌传统蒽环类化疗方案和紫杉类化疗方案的疗效,入组人群为无明显远处转移、肿瘤体积较大、可手术治疗的浸润性乳腺癌患者或局部晚期乳腺癌患者,均于 2005 年 4 月 1 日

在 EORTC 数据中心接受评估,纳入标准为:免疫组化(福尔马林固定的穿刺组织)示雌激素受体阴性,能够按预定方案完成化疗,非 T<sub>4</sub> 肿瘤,可从冰冻活检组织中获得至少 200 ng 的有效 RNA。临床试验符合道德伦理规定,相关的翻译事项由参与研究的各单位完成。患者书面签署临床研究知情同意书。

该亚组研究中,患者先行切除活检或穿刺活检,再随机分为非紫杉类化疗组(FEC:氟尿嘧啶 500 mg/m<sup>2</sup> + 表柔吡星 100 mg/m<sup>2</sup> + 环磷酰胺 500 mg/m<sup>2</sup>, 共 6 疗程)和紫杉类化疗组(TET:多烯紫杉醇 100 mg/m<sup>2</sup>, 3 疗程;表柔吡星 90 mg/m<sup>2</sup> + 多烯紫杉醇 70 mg/m<sup>2</sup>, 3 疗程),并根据化疗效果行保乳手术或乳房切除术。该研究的结果评价指标为病理完全缓解,指化疗后切除标本的肿瘤原发部位无浸润性癌残留,或仅有少量散在的肿瘤细胞,由各研究中心的病理学家分别阅片判定。患者化疗前活检标本的冰凍切片由研究组成员 Véronique Becette 集中评估,剔除肿瘤细胞少于 20% 的标本,提取 RNA 与 Affymetrix X3P 芯片杂交。

## 2.2 统计学分析

芯片数据于 2007 年 1 月 25 日存放至基因表达综合数据库中,编码为 GSE6861。应用 RMA (Robust Multi-array Average) 算法规范 Affymetrix 芯片的 CEL 文件,应用欧氏距离和沃德联结法对 17q 染色体 ERBB2 区域内 TRIP3 到 RAPGEFL 之间的 40 个基因行聚类分析,以推测 ERBB2 扩增子是否存在。基因表达数据向病理完全缓解率的转换由美国 Duke 大学完成。EORTC 临床研究中所用蒽环类药物为表柔吡星,而表柔吡星药物敏感性的数据不完善,因此该亚组研究采用与其相似的阿霉素细胞株指标。将二元回归分析得出的权重应用于表达值并总结、产生 metagene 评分,再通过概率函数将其转化为概率,单药各概率的组合可预测 FEC 和 TET 化疗方案的病理完全缓解率。

以受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线方法评价基因标志物对新辅助化疗疗效的预测价值。重复取样 100 000 例数据,自举法计算 ROC 曲线下面积的 95% 可信区间(confidence interval, CI)。ROC 曲线法的敏感性、特异性、阳性预测值(positive predictive value, PPV)、阴性预测值(negative predictive value, NPV)和总精确性的临界值采用约登指数(敏感性 + 特异性 - 1)判定。病理完全缓解和非病理完全缓解间差异的比较采用 Wilcoxon 秩和检验。临床变量和病理完全缓解的相关性采用 logistic 回归分析和 Fisher 精确检验。患者年龄和基因标志物(取受试人群中位数)的二元评估采用 Fisher

精确检验,连续变量评估采用 logistic 回归分析,为避免回归分析的样本量减少,对肿瘤分级的缺失值予单独分类。

根据不同化疗方案的病理完全缓解率预测值选择治疗方式,建立潜在效益模型。以 FEC 方案的病理完全缓解率预测值减去 TET 方案的预测值得出治疗偏好评分,根据评分选择治疗方案。通过患者的实际病理完全缓解率和各组病例数计算全部患者的病理完全缓解率。

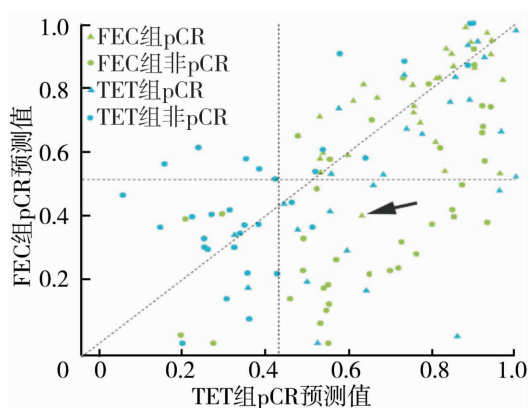
### 3 结果

该亚组研究共纳入患者 125 例,其中 FEC 组 66 例,TET 组 59 例,肿瘤标本均行 Affymetrix X3P 芯片检测。根据对细胞株单药化疗(氟尿嘧啶、环磷酰胺、多烯紫杉醇和表柔吡星等)疗效基因标志物的分析,得到联合用药时的特异性基因组标志物。ROC 曲线分析表明,这些基因组标志物能够准确预测化疗药物的体内疗效( $P < 0.01$ ): FEC 组标志物的预测准确度为 79% (52/66, 95% CI 67 ~ 87),TET 组为 80% (47/59, 95% CI 68 ~ 88);同时,该标志物的特异度也令人满意,未出现假阴性结果。因两组化疗方案均含表柔吡星,所以两组标志物有少量交叉。研究发现 TET 组标志物对 FEC 疗效有较弱的预测性,而 FEC 组标志物对 TET 疗效无预测性,这一现象可能因 TET 疗效主要取决于多烯紫杉醇所致,TET 方案中多烯紫杉醇的预测效应强于表柔吡星。ROC 曲线分析单药化疗的基因标志物也显示,单药标志物仅能预测相关药物的疗效,而不能评估交叉治疗效果。因此,只有建立在个体化病理完全缓解基础之上的药物特异性基因组标志物方能够准确预测新辅助化疗疗效。

应用 Fisher 精确检验和单变量 logistic 回归分析验证患者临床病理特征(如确诊年龄、淋巴结状态、肿瘤大小、组织学分级、ERBB2 状态等)与肿瘤病理完全缓解之间的相关性,结果表明仅肿瘤大小与化疗疗效相关,而 TET 组中肿瘤大小与疗效的相关性尚处于临界状态( $P = 0.03$ ,经 Bonferroni 校正后将无意义)。肿瘤体积是乳腺癌的一个标准预后因子,体积较大的肿瘤难于治疗。同样的统计学方法则显示,FEC 组和 TET 组的基因标志物与化疗疗效密切相关(经 Bonferroni 校正后其相关性仍具有统计学意义)。由于单变量分析未得到能够预测化疗疗效的临床病理因子,多变量检验中基因标志物的意义则显得尤为突出。

图 1 显示 FEC 和 TET 两组治疗方案的病理完全缓解率预测值。其中,右

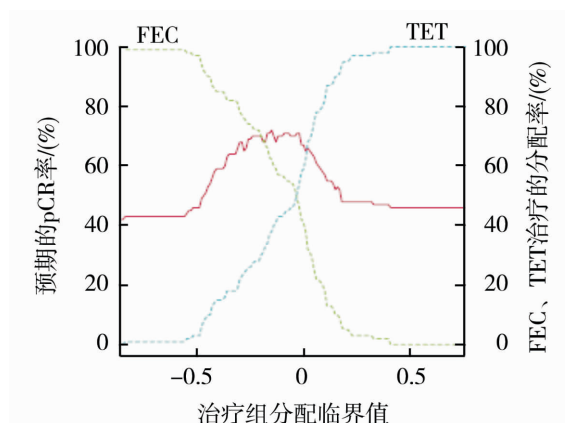
上象限代表化疗效果明显的患者(▲),对紫杉醇有较强副反应者可接受传统 FEC 治疗;相反,左下象限为化疗效果欠佳患者(●),这些患者应选择新的治疗药物;右下象限为对 TET 化疗敏感而对 FEC 不敏感的患者(绿●);左上象限为对 FEC 敏感而对 TET 不敏感者(蓝●)。在治疗分配模型中,对角线表示治疗偏好评分为零,这是确定治疗方案的临界值和基础:对角线以上的患者,即评分高于临界值者应接受 FEC 治疗;而对角线以下者(评分低于临界值)应接受 TET 治疗;恰处于对角线者(评分为零)表明两种方案疗效相当,由于现有数据均源自不同细胞株,这一情况基本不会出现。此外,对角线以上绿▲/绿●的比率表示 FEC 治疗的病理完全缓解率,对角线以下蓝▲/蓝●的比率则表示 TET 治疗的病理完全缓解率,两者结合即可得到全部患者的病理完全缓解率。移动对角线位置相当于改变治疗方案的分配临界值,临界值降低可能导致有更多患者接受 FEC 治疗,反之,则有更多患者接受 TET 治疗。如图中箭头所示点的治疗偏好评分为  $0.4 - 0.6 = -0.2$ ,因此该患者纳入 TET 组;而如果将治疗偏好评分的临界值降低至  $-0.3$ ,则意味着该点位于临界值之上,该患者应接受 FEC 治疗。一般说来,治疗偏好评分越低,患者接受 TET 治疗的可能性越大;反之,患者接受 FEC 治疗的可能性就越大。总之,对角线移位可能至少导致两种情况发生:第一,由于药物副作用而使接受某种方案治疗的患者减少;第二,预测两组化疗方案病理完全缓解率的标志物完全相互独立,且不可能精确匹配。



pCR:病理完全缓解率;每个点代表一个患者;水平和垂直的虚线为衡量标准;当点在对角线之上,选择 FEC 治疗,对角线之下,选择 TET 治疗;箭头所示的算法为预测的 FEC 治疗病理完全缓解率减去 TET 治疗病理完全缓解率。

图 1 FEC 和 TET 治疗预测的病理完全缓解率

该亚组研究中的病理完全缓解率预测值随治疗分配临界值的变化而变化(图 2 红线所示)。当治疗分配临界值处于中央区时,病理完全缓解率预测值为 65%~70%,远高于临床试验中 FEC 和 TET 的病理完全缓解率(分别为 42% 和 46%)。图中红色曲线的峰值位于零点左侧,说明该研究发现的基因组标志物更倾向于 FEC 方案治疗。这些药物特异性基因组标志物的临床应用可能改善新辅助化疗效果,降低紫杉类药物副作用的发生几率。



红线代表病理完全缓解率随分配到不同治疗组患者数量的变化趋势。

图 2 治疗分配模式图

## 4 讨论

该亚组研究是关于乳腺癌化疗疗效基因组标志物的首次大规模多中心性随机Ⅲ期临床试验,其结果表明,建立在细胞株基础上的基因标志物同样能够预测体内化疗效果。研究人员将开展长期随访以明确药物特异性基因组标志物能否判断预后,其结果可能与既往研究报道一致,即获得病理完全缓解率的患者往往生存期较长。

该亚组研究存在两处不足,其一是采用阿霉素的相关数据替代表柔吡星数据,但二者均为蒽环类药物且活性相似,可能不会对结果造成重大影响;其二是采用不同 Affymetrix 芯片来源的细胞株数据计算基因权重。基因权重含有个体探针动态范围的信息,因此芯片改变必然会导致试验结果的信息缺失,尤其可能影响 ROC 曲线的敏感性、特异性等指标的临界值判定;而 ROC 曲线下面积不需要预设临界值,这一指标可弥补上述缺陷。值得欣慰的是,该研究中曲线下面积的相关数据均表明基因组标志物能够准确预测单药或多药化疗疗效,但是,应用 U133A 芯片重复试验或采用表柔吡星标志物仍可能提高预

测准确度。基因组标志物在临床推广应用的障碍在于冰冻活检组织的保存。目前, Affymetrix X3P 芯片已完成技术改进, 可用于石蜡包埋组织的分析, 同样, 其试验流程亦需修正; 此外, Gianni 等建立的 PCR 技术也可用于基因组标志物的检测。

病理完全缓解的定义尚未完全统一, 最严格的界定是化疗后乳腺和腋窝标本中浸润性癌成分完全消失。但这一标准要求对全部病理切片实行集中阅片或分散阅片标准化, 故此难以在多中心、多组群研究中采用。该亚组研究的目的是验证细胞株来源的化疗敏感性标志物可否应用于临床, 因此将病理完全缓解定义为化疗后肿瘤原发部位无浸润性癌残留, 或仅有少量散在的肿瘤细胞, 此时即可证明肿瘤对化疗药物敏感。但是, 由于肿瘤干细胞是复发的决定因素, 化疗杀灭大量肿瘤细胞并不能保证患者长期生存。因此, 需要通过大规模辅助研究, 了解生存期延长患者的药物特异性标志物, 探讨这些标志物的临床意义。目前, 该亚组研究仅分析了雌激素受体阴性乳腺癌的基因组标志物, 需进一步明确上述标志物在雌激素受体阳性乳腺癌中的作用。

治疗分配模型(图 1, 2)显示, 应用药物特异性基因组标志物指导治疗可能将新辅助化疗的病理完全缓解率从 44% 提高至约 70%, 若此结果被前瞻性 III 期临床试验证实, 则可能为目前的乳腺癌治疗模式带来重大变革。该研究的缺陷在于其仅适用于雌激素受体阴性乳腺癌患者, 而雌激素受体阴性乳腺癌尚包含两种完全不同的基因表达谱(Stanford 分类标准: ERBB2 型和基底样型), 上述标志物对这两类肿瘤均有预测性, 但由于 ERBB2 型肿瘤数量较少, 不能排除基因组标志物在两类肿瘤中的表达存在一定差异。

目前, 针对新老化疗药物的联合应用已开展了大量研究, 试验中选择对现有化疗药物耐药的患者作为研究对象可能缩小研究规模、夸大试验结果。EORTC 亚组研究中药物特异性基因组标志物的 NPV 均大于 90%, 有助于早期筛选出 FEC 或 TET 治疗耐药的乳腺癌患者。在此基础上, 开展针对耐药患者的试验研究将为新药临床应用提供重要的指导意义。

(王姝姝 编译 范林军 审校)

(收稿日期: 2008-03-20)

(本文编辑: 周艳)

王姝姝. 乳腺癌新辅助化疗基因组标志物的建立: EORTC 10994/BIG 00-01 临床试验的亚组研究[J/CD]. 中华乳腺癌杂志: 电子版, 2008, 2(3): 369-374.