

论著·临床研究

儿童朗格汉斯细胞组织细胞增生症的 BRAF-V600E 基因突变及临床意义

唐雪¹ 郭霞¹ 孙林雍² 艾媛¹ 杨雪¹ 孙静静¹ 吴剑蓉¹ 高举¹

(1. 四川大学华西第二医院儿科 / 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室, 四川 成都 610041;
2. 四川大学华西医院病理科, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 探讨儿童朗格汉斯细胞组织细胞增生症(LCH)的 BRAF-V600E 基因突变的意义。**方法** 采用实时荧光定量 PCR 技术检测 26 例儿童 LCH 患儿石蜡包埋组织样本中的 BRAF-V600E 基因突变情况, 并回顾性分析 BRAF-V600E 基因突变与临床特征及预后的关系。**结果** 25 例患儿接受正规化疗, 2 年总生存率(OS)及无事件生存率(EFS)分别为 100%、88%。70% (18/26) 的病理标本来自骨组织, BRAF-V600E 基因突变阳性率达 50% (13/26)。BRAF-V600E 基因突变与 LCH 患儿年龄、性别、受累器官、临床分类、早期治疗效果、复发情况以及 2 年 OS 及 EFS 均无相关性 ($P>0.05$), 但与 LCH 的临床分组相关 ($P<0.05$)。**结论** LCH 患儿总体生存率较高, BRAF-V600E 基因突变发生率高, BRAF-V600E 基因突变与 LCH 临床分组相关。

[中国当代儿科杂志, 2018, 20(4): 290-294]

[关键词] 朗格汉斯细胞组织细胞增生症; BRAF-V600E 基因突变; 实时荧光定量 PCR; 儿童

BRAF-V600E mutation and its clinical significance in children with Langerhans cell histiocytosis

TANG Xue, GUO Xia, SUN Lin-Yong, AI Yuan, YANG Xue, SUN Jing-Jing, WU Jian-Rong, GAO Ju. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University/Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China (Gao J, Email: gaoju651220@126.com)

Abstract: Objective To investigate the clinical significance of BRAF-V600E mutation in children with Langerhans cell histiocytosis (LCH). **Methods** Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect BRAF-V600E mutation in paraffin-embedded tissue samples from 26 children with LCH. A retrospective analysis was performed for the association of BRAF-V600E mutation with clinical features and prognosis of children with LCH. **Results** Of the 26 children, 25 received standard chemotherapy, with a 2-year overall survival (OS) rate of 100% and a 2-year event-free survival (EFS) rate of 88%. Of the 26 pathological samples, 18 (70%) came from bone tissue, and the positive rate of BRAF-V600E mutation reached 50% (13/26). The positive rate of BRAF-V600E gene mutation was not associated with age, sex, affected organ, clinical classification, early treatment response, recurrence, and 2-year OS and EFS rates of the children with LCH ($P>0.05$), but it was associated with clinical grouping of LCH ($P<0.05$). **Conclusions** Children with LCH tend to have a high OS rate and a high incidence rate of BRAF-V600E mutation. BRAF-V600E mutation is associated with clinical grouping of LCH. [Chin J Contemp Pediatr, 2018, 20(4): 290-294]

Key words: Langerhans cell histiocytosis; BRAF-V600E mutation; Real-time fluorescence quantitative PCR; Child

[收稿日期] 2017-12-25; [接受日期] 2018-02-26
[基金项目] 四川省科技应用基础研究项目(2015JY0044)。
[作者简介] 唐雪, 女, 硕士, 住院医师。
[通信作者] 高举, 男, 主任医师, 教授。

朗格汉斯细胞组织细胞增生症 (Langerhans cell histiocytosis, LCH) 是病理性朗格汉斯细胞 (Langerhans cell, LC) 异常克隆增生的一类疾病, 好发于儿童, 发病率约 2~5/百万^[1]。LCH 临床症状复杂多样, 轻者表现为皮肤、单个或多个骨损害或不伴尿崩症, 重者可累及多个危险器官 (如肝、脾、肺及造血系统)。LCH 发病机制目前仍不清楚, 是炎症性病变还是肿瘤性病变尚有争议^[2]。2010 年 Badalian-Very 等^[3] 研究显示 50% 以上的 LCH 存在 BRAF-V600E 基因突变, 高度提示 LCH 为克隆性肿瘤性疾病。

BRAF 基因第 15 号外显子 1799 位碱基点突变 (T 置换为 A) 使编码的缬氨酸被谷氨酸替代 (即 V600E), 为最常见的 BRAF 基因突变类型, 见于 80%~90% 的 LCH 病例, 该突变导致 BRAF 信号通路持续活化, 使下游 MEK 蛋白激酶和细胞外信号调节激酶 ERK (又称为 MAPK) 磷酸化活化, 进而促进肿瘤发生发展^[4]。尽管大量研究显示 LCH 存在 BRAF-V600E 高频突变, 但该突变与 LCH 发病机制、临床表现及预后等方面的关系仍未完全明确。本研究采用实时荧光定量 PCR 方法检测 26 例儿童 LCH 原发病灶中 BRAF-V600E 基因突变情况, 回顾性分析 BRAF-V600E 基因突变与 LCH 患儿临床特征、化疗反应及预后的相关性, 探讨 BRAF-V600E 基因突变在儿童 LCH 危险度分层和预后评估方面的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

以 2013 年 11 月至 2017 年 7 月四川大学华西第二医院收治的经病理确诊且进行了 BRAF-V600E 基因突变检测的 26 例初诊 LCH 患儿为研究对象。其中男性 14 例、女性 12 例, 男女之比为 1.17:1。中位发病年龄为 27.5 个月 (4~169 个月), 其中 <1 岁 4 例, 1~5 岁 14 例, >5 岁的 8 例。所有病例的组织病理标本送检四川大学华西医院病理科, 进行组织病理学检查和相关免疫组织化学染色检查 (包括 Langerin、CD1a 及 S-100 等)。

本研究通过四川大学华西第二医院的医学伦

理委员会批准。

1.2 BRAF-V600E 基因突变检测

使用石蜡包埋组织 DNA 提取试剂盒 (QIAGEN 公司产品, Cat NO.56404) 提取病理组织的 DNA。采用 AmoyDx-BRAF 基因突变试剂盒 (SFDA) 进行实时荧光定量 PCR 扩增检测 BRAF-V600E 基因突变, 每次 PCR 反应中加入阳性质控品和阴性对照共同进行分析。

如样本突变信号 (FAM 信号) 呈典型 S 型扩增曲线且 Ct 值 <28, 判断该样本 BRAF-V600E 基因突变阳性; 如样本 FAM 信号无典型 S 型扩增或 Ct 值 \geq 28, 判断 BRAF-V600E 基因突变阴性; 如样本 FAM 信号呈不典型 S 型扩增且 Ct 值接近 28, 判断 BRAF-V600E 基因突变可疑阳性。

1.3 LCH 的诊断、临床分类及临床分组

根据 2009 年国际组织细胞协会制定的《朗格汉斯细胞组织细胞增生症评估与治疗指南》^[5] 进行诊断、临床分类及临床分组。所有患儿均符合 LCH 病理学确诊标准, 即在光镜检查基础上, 以下 3 项 \geq 1 项阳性: ① Langerin (CD207) 阳性; ② CD1a 抗原 (T6) 阳性; ③ 电镜检查发现病变细胞中存在典型 Birbeck 颗粒。按照累及器官系统的数目对 LCH 进行临床分类, 包括单系统 LCH (SS-LCH): 仅累及一个器官系统 (包括单病灶和多病灶), 以及多系统 LCH (MS-LCH): \geq 两个器官系统受累, 伴或不伴“危险器官” (血液系统、肝脏、脾脏、肺) 受累。LCH 临床分组依据病变累及器官的类型及数目, 共分 3 组, Group-1: 多系统疾病, 并累及一个或多个危险器官; Group-2: 多系统疾病, 但未累及危险器官, 初始 6 周诱导化疗有效; Group-3: 单系统多灶性骨骼病变 (\geq 2 个骨骼病灶) 和局部特殊部位病变 (如中枢神经系统病变伴颅内软组织侵入、椎骨病变伴椎管内软组织侵入等)。

1.4 治疗方案及疾病状态评定标准

患儿化疗参照 LCH- III 诊疗方案^[6]。其中 Group-1 总疗程为 12 个月; Group-2 总疗程为 6~12 个月; Group-3 总疗程为 6 个月, 所有患儿诱导化疗的疗程和后续化疗的调整依据疗效反应评定结果, 评定标准见表 1^[5]。

表1 朗格汉斯细胞组织细胞增生症治疗反应评定标准

治疗反应	评定标准
改善	
完全消失	无疾病证据,所有症状和体征消失
消退	症状和体征消退,无新损害出现
中等	
混合性	某部位病灶消退,另一部位出现新发病灶
稳定	症状和体征持续存在,无新损害出现
恶化	
进展	症状和体征有进展,或有新损害出现

所有患儿均于化疗第6周、12周、25周、停药前,以及化疗结束1年内的每6个月、化疗结束1年后每年进行疾病状态评定。疾病状态评定参照2009版《朗格汉斯细胞组织细胞增生症评估与治疗指南》,具体见表2^[5]。

表2 朗格汉斯细胞组织细胞增生症疾病状态评定标准

疾病状态	评定标准
非活动性疾病	无疾病证据,所有症状及体征消失
活动性疾病	
疾病消退	症状体征减少,无新发病灶
疾病稳定	症状体征持续存在,但无新发病灶
疾病进展	症状体征进展,和或出现新发病灶

1.5 随访

所有患儿随访至2017年12月1日,中位随访时间19个月(5~50个月)。总生存期为确诊至随访终点或任何原因所致死亡的时间。无事件生存时间定义为确诊之日至事件(指复发、死亡及疾病进展)发生的时间。

1.6 统计学分析

采用SPSS 22.0统计学软件进行数据处理。非正态分布计量资料以中位数(范围)表示;计数资料采用率表示,两样本率的比较采用Fisher确切概率法;Kaplan-Meier方法计算患儿的2年总生存率(overall survival, OS)和2年无事件生存率

(event-free survival, EFS);生存率的组间比较采用log-rank检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗结果与随访情况

26例确诊后23例接受正规化疗;2例术后未化疗,复发后接受规范化疗;1例单系统非特殊部位单病灶患儿仅手术完全切除病灶,目前为非活动性疾病状态。至随访终点,26例患儿均存活,其中3例复发(术后未化疗的2例复发,1例于化疗结束后2次复发);11例已完成化疗停药,14例处于维持化疗阶段,1例术后观察随访。患儿2年OS为100%,2年EFS为88%。

2.2 BRAF-V600E 基因突变情况

患儿的病理标本取自骨组织的18例,余8例来自淋巴结(3例)、皮肤(2例)、椎管内软组织(1例)、硬脑膜(1例)、乳突(1例),其中13例(50%)存在BRAF-V600E基因突变,11例BRAF-V600E基因突变阴性,2例BRAF-V600E基因突变可疑阳性。13例BRAF-V600E基因突变阳性病理标本中8例来自骨组织,2例来自皮肤,2例来自淋巴结,1例来自椎管内软组织。

2.3 BRAF-V600E 基因突变与儿童LCH临床特征关系分析

26例患儿中病变累及骨骼(23例,88%)、肺(7例,27%)、皮肤(5例,19%)、血液系统(5例,19%)、肝脏(3例,12%)、淋巴结(3例,12%)、脾脏(3例,12%)、中枢神经系统(2例,8%)及乳突(1例,4%)。26例患儿中SS-LCH 17例,MS-LCH 9例;7例为Group-1,2例为Group-2,17例为Group-3。

BRAF-V600E基因突变阳性与LCH临床分组相关($P=0.007$),与患儿年龄、性别、受累器官、临床分类、早期治疗效果及复发均无相关性($P>0.05$)。见表3。

表3 BRAF-V600E 基因突变阳性情况与儿童 LCH 临床特征的相关性 [例(%)]

组别	例数	阳性	P 值	组别	例数	阳性	P 值
性别				年龄			
男	12	6(50)	0.500	≤ 1 岁	5	3(60)	0.585
女	12	7(58)		>1 岁	19	10(53)	
骨骼受累				皮肤受累			
有	21	11(52)	0.565	有	5	3(60)	0.585
无	3	2(67)		无	19	10(53)	
肺部受累				血液系统受累			
有	7	3(43)	0.605	有	5	3(60)	0.585
无	17	8(47)		无	19	10(53)	
肝脏受累				脾脏受累			
有	3	2(67)	0.565	有	3	2(67)	0.565
无	21	11(52)		无	21	11(52)	
临床分类				化疗 6 周后评估			
SS-LCH	15	7(47)	0.300	非进展	21	12(57)	0.435
MS-LCH	9	6(67)		疾病进展	3	1(33)	
临床分组				有无复发			
Group-1	7	5(71)		有	3	1(33)	0.435
Group-2	2	1(50)	0.007	无	21	12(57)	
Group-3	15	7(47)					

注: [LCH] 朗格汉斯细胞组织细胞增生症; [SS-LCH] 单系统 LCH; [MS-LCH] 多系统 LCH。

2.4 LCH 患儿 BRAF-V600E 突变与预后分析

截至随访终点, 26 例 LCH 患儿均存活, 其中 BRAF-V600E 阳性组患儿复发 1 例 (8%), BRAF-V600E 突变阴性组复发 2 例 (18%)。BRAF-V600E 突变阳性与阴性组患儿的 2 年 OS 均为 100%; 而 BRAF-V600E 突变阳性组患儿 2 年 EFS (90%) 稍高于 BRAF-V600E 突变阴性组 (86%), 但差异无统计学意义 ($P=0.900$)。

3 讨论

LCH 发病机制仍未完全阐明。近年大量研究显示, 约 50% 以上 LCH 病例存在 BRAF-V600E 基因突变。而 BRAF-V600E 基因突变阴性的 LCH 病例中, 仍有 33%~50% 患者存在 MAP2K1 基因突变^[7-8]。此外, 少部分 LCH 病例中存在 MAPK 信号通路的其他相关基因突变 (如 ARAF 和 ERBB3)^[9]。因此目前认为, LCH 是由于 MAPK 信号通路相关基因突变所致的髓系克隆增殖性肿瘤。

关于 LCH 患者 BRAF-V600E 阳性率, 各研究中心的结果存在一定差异, 这可能与样本选择、样本量及检测方法不同有关。北京儿童医院张莉等^[10]

采用二代基因测序方法检测了 80 例儿童 LCH 病理标本及血浆中 BRAF-V600E 基因突变情况, 显示病理标本 BRAF-V600E 突变阳性率为 68%, 血浆标本 BRAF-V600E 阳性率为 59%。本研究采用实时荧光定量 PCR 方法检测, LCH 病理组织中 BRAF-V600E 突变阳性率为 50%, 略低于文献报道, 而且 2 例为可疑阳性, 因而对于 BRAF-V600E 突变可疑阳性病例可采用基因测序明确是否存在 BRAF-V600E 基因突变。

多项前瞻性临床试验表明, 累及肝、脾、肺及造血系统的 LCH 患儿的死亡率显著升高, 其中化疗 12 周后疾病仍进展者预后更差^[6]。目前对 BRAF-V600E 基因突变能否作为儿童 LCH 危险度和预后预测的指标仍存在争议。国内外大多数研究未发现 BRAF-V600E 突变与儿童 LCH 临床危险度及预后相关^[3,10-11]。但 Héritier 等^[12]对 315 例儿童 LCH 进行 BRAF-V600E 基因突变检测, 发现多系统高危组患儿 BRAF-V600E 基因突变阳性率显著高于多系统低危组和单系统组, 且 BRAF-V600E 基因突变阳性患儿对长春花碱及糖皮质激素更易产生耐药并显示更高的再活化率。Berres 等^[13]也发现 BRAF-V600E 基因突变阳性的 LCH 患儿更易

出现治疗失败和复发。本研究也发现 BRAF-V600E 基因突变阳性情况与 LCH 临床分组相关;但与生存率无明显相关,可能与样本量偏小及随访时间短有关。

综上,本研究中一半的儿童 LCH 存在 BRAF-V600E 基因突变,提示部分 LCH 患儿的组织细胞呈克隆性生长,但 BRAF-V600E 基因突变与儿童 LCH 临床特征和预后关系仍不清楚,需进行更多前瞻性临床试验以明确。而 BRAF-V600E 基因突变的检出为靶向药物的临床应用提供了依据,部分临床试验^[14-15]已证实 BRAF 抑制剂威罗菲尼成功挽救部分难治性 LCH 患者。因而深入研究 BRAF-V600E 基因突变将有助于认识儿童 LCH 的发病机制并改善其预后。

[参 考 文 献]

- [1] Guyot-Goubin A, Donadieu J, Barkaoui M, et al. Descriptive epidemiology of childhood Langerhans cell histiocytosis in France, 2000-2004[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2008, 51(1): 71-75.
- [2] Badalian-Very G, Vergilio JA, Fleming M, et al. Pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis[J]. *Annu Rev Pathol*, 2013, 8: 1-20.
- [3] Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, et al. Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis[J]. *Blood*, 2010, 116(11): 1919-1923.
- [4] Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer[J]. *Nature*, 2002, 417(6892): 949-954.
- [5] 吴升华. 郎格罕细胞组织细胞增生症评估与治疗指南介绍[J]. *中华儿科杂志*, 2012, 20(2): 155-158.
- [6] Gardner H, Minkov M, Grois N, et al. Therapy prolongation improves outcome in multisystem Langerhans cell histiocytosis[J]. *Blood*, 2013, 121(25): 5006-5014.
- [7] Brown NA, Furtado LV, Betz BL, et al. High prevalence of somatic MAP2K1 mutations in BRAF V600E-negative Langerhans cell histiocytosis[J]. *Blood*, 2014, 124(10): 1655-1658.
- [8] Chakraborty R, Hampton OA, Shen X, et al. Mutually exclusive recurrent somatic mutations in MAP2K1 and BRAF support a central role for ERK activation in LCH pathogenesis[J]. *Blood*, 2014, 124(19): 3007-3015.
- [9] Nelson DS, Quispel W, Badalian-Very G, et al. Somatic activating ARAF mutations in Langerhans cell histiocytosis[J]. *Blood*, 2014, 123(20): 3152-3155.
- [10] 张莉, 廉红云, 马宏浩, 等. BRAF 基因 V600E 突变在儿童朗格罕细胞组织细胞增生症中的临床意义[J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2017, 22(4): 190-193.
- [11] Sahm F, Capper D, Preusser M, et al. BRAF-V600E mutant protein is expressed in cells of variable maturation in Langerhans cell histiocytosis[J]. *Blood*, 2012, 120(12): e28-e34.
- [12] Héritier SS, Emile JF, Barkaoui MA, et al. BRAF mutation correlates with high-risk Langerhans cell histiocytosis and increased resistance to first-line therapy[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(25): 3023-3030.
- [13] Berres ML, Lim KP, Peters T, et al. BRAF-V600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups[J]. *J Exp Med*, 2014, 211(4): 669-683.
- [14] Haroche J, Cohen-Aubart F, Emile JF, et al. Dramatic efficacy of vemurafenib in both multisystemic and refractory Erdheim-Chester disease and Langerhans cell histiocytosis harboring the BRAF V600E mutation[J]. *Blood*, 2013, 121(9): 1495-1500.
- [15] Héritier S, Hélias-Rodzewicz Z, Lapillonne H, et al. Circulating cell-free BRAF-V600E as a biomarker in children with Langerhans cell histiocytosis[J]. *Br J Haematol*, 2017, 178(3): 457-467.

(本文编辑: 俞燕)