

·专家笔谈·

神经母细胞瘤的 GWAS 多中心研究经验及
临床开展过程中的困境

贺 静 夏慧敏

【摘要】 神经母细胞瘤作为一种儿童最常见的颅外实体肿瘤,其多中心研究在国外已取得丰硕成果,与此同时我国神经母细胞瘤的多中心研究也已经完成了初步建立的过程。本文将对神经母细胞瘤多中心研究开展过程中的经验和困境进行介绍,为儿童疾病多中心研究模式的建立提供参考依据。

【关键词】 神经母细胞瘤;多中心研究;经验;困境

【中图分类号】 R726 R181.2 R739.4

Experiences and dilemmas of multi-center studies on neuroblastoma. He Jing, Xia Huimin. Institute of Pediatrics, Municipal Women & Children's Medical Center, Guangzhou 510623, China. Corresponding author: Xia Huimin, Email: xia-huimin@foxmail.com

【Abstract】 Neuroblastoma is one of the most common extracranial solid tumors in children. The multi-center studies on neuroblastoma have been quite productive in developed countries, but are recently launched in China. This article summarizes the experiences and dilemmas of multi-center studies on neuroblastoma for providing references.

【Key words】 Neuroblastoma; Multicenter Studies; Experience; Dilemma

多中心研究是指由一个牵头单位承担主要的研究任务,同时联合多个参与单位的研究者按照同一方案进行多个中心的样本信息收集,并通过后续的数据分析达到预定的研究目标。多中心研究可以在较短的时间内收集到足量的样本,通过扩大样本量增加统计推断的把握度,进而提高结果的可靠性及说服力。众所周知,肿瘤的发生是多基因改变和多因素协同作用的结果,全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)是指在重大疾病基因组数据挖掘与生物标志物筛选领域,通过分析微阵列或基因芯片数据发现基因在患病状态下的异常表达特征,并利用生物统计的方法筛选肿瘤生物标志物,开发肿瘤早期诊断系统。GWAS 不仅能为肿瘤的诊断提供新思路,还可为下一阶段新的分子诊断产品的研发奠定基础。因此,本文将对最常见的颅外实体肿瘤-神经母细胞瘤进行 GWAS 多中

心研究的经验进行总结,并初步分析结合基础研究结果开展临床研究可能面临的困境,为儿童疾病多中心研究模式的建立提供参考依据。

一、神经母细胞瘤基本情况

据不完全统计,神经母细胞瘤患儿数量至少占所有儿童恶性肿瘤的7%。90%的神经母细胞瘤发生于10岁以内儿童,中位发病年龄约为18个月^[1,2]。我国神经母细胞瘤的发病率约 $7.7/10^6$ (其中男性 $7.9/10^6$,女性 $7.6/10^6$),排在所有儿童肿瘤第4位^[3],仅次于中枢神经系统肿瘤($23.8/10^6$)、淋巴瘤($11.0/10^6$)及生殖细胞恶性肿瘤($7.8/10^6$)。神经母细胞瘤患儿的存活率随确诊年龄的增大而降低^[4]。此外,其五年存活率随恶性程度的升高而降低,I期患儿存活率近100%,II期约80%,III期约60%,IV期仅20%左右^[5]。从五年存活率这一指标可以看出,早诊断对于神经母细胞瘤的防治尤为关键。然而与成人肿瘤相比,儿童神经母细胞瘤的发病率很低,单个中心很难收集到足量样本进行临床研究或全基因组关联研究,因此多中心研究成为必然的研究趋势。

二、神经母细胞瘤国外多中心研究

全基因组关联研究采用高覆盖度的芯片技术,

DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2019.01.003

基金项目: 广州市科技计划项目珠江科技新星专项(编号:201710010086)

作者单位: 广州市妇女儿童医疗中心儿科研究所(广东省广州市,510623)

通讯作者: 夏慧敏, Email: xia-huimin@foxmail.com

在探究复杂疾病的过程中发挥着重要作用^[6]。迄今为止,基于高加索人种的多中心研究已有至少6篇关于神经母细胞瘤的GWAS报道,并发现了多个与神经母细胞瘤发病风险及预后相关的基因及其区域。第一个关于神经母细胞瘤的GWAS纳入了儿童肿瘤学组(Children's Oncology Group)提供的1 032例神经母细胞瘤患儿及2 043例正常对照进行前期研究,后期纳入了费城儿童医院的394例患儿及1 178例正常对照、儿童癌症组的59例患儿及162例正常对照、英国的244例患儿及785例正常对照进行验证性研究,发现6p22区域*CASC15*基因3个位点的多态性改变与神经母细胞瘤的发病风险显著相关^[7]。后续该团队通过多中心研究的合作模式逐步扩大样本量,先后证实*LMO1*、*HACE1*、*LIN28B*、*RSRC1*及*CPZ*基因与神经母细胞瘤的发病风险显著相关^[8]。按照危险程度分类后发现,*BARD1*基因与高危型神经母细胞瘤发病风险相关^[9];而*DUSP12*、*DDX4*、*IL31RA*及*HSD17B12*基因与低危型神经母细胞瘤发病风险相关^[10]。此外,该团队还发现*TP53*基因的低频变异位点与神经母细胞瘤的发病风险显著相关^[11]。从上述研究的设计环节可以看出,针对分子层面的风险因素分析过程充分利用了不同群体的异质性进行对比和验证。而小儿外科临床研究的过程可以充分利用这种群体间的异质性,结合上述基础研究结果提出病因假设,针对造成不同研究中心间结果产生差异的相关因素进行分析,并结合长期随访及不同群体间的结果对比来进行进一步验证。

三、神经母细胞瘤国内单中心研究

国内第一篇关于神经母细胞瘤的分子流行病学研究发表于2013年^[12],该研究纳入了北京儿童医院的203例患儿以及411例正常对照对*FAS*等3个多态性位点进行研究,并发现*FAS*基因-1377G/A及*FASL*基因-844T/C的多态性改变与神经母细胞瘤的发病风险显著相关。此后,该团队纳入了北京儿童医院的244例神经母细胞瘤患儿及305例正常对照样本对基于高加索人种GWAS研究的显著关联位点及区域进行了验证,并证实21个位点的多态性改变与神经母细胞瘤的发病风险显著相关^[13]。另有研究纳入了北京儿童医院的247例神经母细胞瘤患儿及290例正常对照,对*MYCN*调控相关的16个位点进行研究,发现*TGFBR3L*基因rs11669203 G>C的多态性改变与神经母细胞瘤的发生显著相关^[14]。此外,郑州大学第一附属医院小儿外科医生

也开展了神经母细胞瘤的分子流行病学研究,该研究仅纳入了105例神经母细胞瘤患儿以及145例正常对照,对*GRP78*基因的2个多态性位点进行了探究,发现所纳入2个位点均与神经母细胞瘤的发病风险显著相关^[15]。

广州市妇女儿童医疗中心的研究人员利用单中心样本对基于高加索人种的GWAS结果进行了验证,证实了*CASC15*基因rs6939340 A>G、rs4712653 T>C及rs9295536 C>A这3个位点的多态性改变^[16]; *LMO1*基因rs110419 A>G以及*LIN28B*基因rs221634 A>T与神经母细胞瘤的发病风险显著相关^[17];荟萃分析进一步证实了*CASC15*及*LMO1*基因与神经母细胞瘤发病风险相关^[18]。该团队还证实*XPG*基因rs2094258 C>T的多态性改变可能是通过改变*XPG*基因的表达,进而影响神经母细胞瘤的发病风险来实现的^[19]。此外,利用单中心样本,该团队发现*BARD1*、*XPC*、*TP53*、*HACE1*等基因的多态性改变与神经母细胞瘤的发病风险无显著关联。

四、国内神经母细胞瘤多中心研究的开展情况

广州市妇女儿童医疗中心研究团队利用本院样本以及团队优势逐步开展了国内神经母细胞瘤的多中心研究。第一个神经母细胞瘤国内多中心研究中不仅纳入了广州市妇女儿童医疗中心的256例神经母细胞瘤患儿及531例正常对照,还纳入了郑州大学第一附属医院的118例病人以及281例正常对照,利用这两个中心的样本证实*LMO1*基因rs110419 A>G、rs4758051 G>A及rs10840002 A>G这3个位点的多态性改变与神经母细胞瘤的发病风险相关^[20]。该研究还发现miR-34b/c rs4938723 T>C及miR-218 rs11134527 A>G^[21]、*ERCC1*基因rs2298881 C>A与rs11615G>A及*XPF*基因rs2276466 C>G^[22]、*LMO1*基因超级增强子区域rs2168101 G>T^[23]、*HOTAIR*基因rs12826786 C>T、rs874945 C>T及rs1899663 C>A等位点的多态性改变均与神经母细胞瘤的发病风险显著相关^[24]。利用华东地区3个中心共计313例神经母细胞瘤患儿以及716例正常对照样本对*LMO1*基因的5个多态性位点进行研究,发现其中4个位点的多态性改变与神经母细胞瘤的发病风险相关,该研究结果与基于广州市妇女儿童医疗中心及郑州大学第一附属医院两中心得到的研究结果类似^[25]。

与之前单中心研究相比,多中心合作前后文章的质量、数量、数据认可度等方面都有了一定程度的提高,文章投稿周期以及难度在一定程度上有所

降低。从上述多中心研究的开展过程中我们总结出以下几条经验:①所有研究者要基于共同的研究目标,通过合作首先达到扩大样本量的目的,进而通过 GWAS 研究及后续的临床研究寻找潜在的分子标志物。②以专业的分子医学和数据分析平台为研究基础,通过相关行业的科研人员带动临床医生。③长期和短期目标有机结合。长期目标固然重要,但如果短期内能够获得一定的研究成果,既可以满足临床医生晋升晋级的需要,也可以为后续的基金申请尽早奠定成果基础,其意义同样不容忽视。

五、神经母细胞瘤多中心研究的困境

虽然神经母细胞瘤的多中心研究在基础研究方面已具雏形,但具体落实到临床工作中,仍存在一些困难,主要体现在以下方面:①医疗机构之间的壁垒:为保护病人隐私及病例信息的科研价值,很多医院不愿意将自己的样本外送,但医院本身又缺少相应的科研人员及条件来开展相关研究;②合作意愿不够强烈:相比基础研究,开展临床层面的多中心研究门槛更高、难度更大,因此许多合作单位认为该项工作的开展存在较大的障碍,具体的工作未能得到有效落实;③样本及信息的规范化问题:早期由于设计方案不够成熟,导致样本信息缺失严重、随访信息缺乏的现象较为普遍;④临床研究结果的质量问题:对研究者而言,开展高质量临床研究的真正难点不在物质方面,更多的难点在人力方面。因为研究者要花费大量时间精力学习多中心研究开展过程中涉及的多学科知识,只有跨过这个门槛,临床研究的结果才具备起码的规范性。

总之,我国神经母细胞瘤的多中心研究已经初步开展起来,但还有待进一步开展深层次合作,以期对神经母细胞瘤的早期诊断以及预后研究提供重要支撑及依据。

参考文献

- 1 London WB, Castleberry RP, Matthay KK, et al. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(27): 6459-6465. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.571.
- 2 Matthay KK, Maris JM, Schleiermacher G, et al. Neuroblastoma [J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, (2): 16078. DOI: 10.1038/nrdp.2016.78.
- 3 Bao PP, Li K, Wu CX, et al. Recent incidences and trends of childhood malignant solid tumors in Shanghai, 2002-2010 [J]. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2013, 51(4): 288-294. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2013.04.010.
- 4 Laverdiere C, Liu Q, Yasui Y, et al. Long-term outcomes in survivors of neuroblastoma: a report from the Childhood Cancer Survivor Study [J]. J Natl Cancer Inst, 2009, 101(16): 1131-1140. DOI: 10.1093/jnci/djp230.
- 5 Dong KR, Li K, Gao JC, et al. Treatment results of neuroblastoma with a standardization protocol [J]. Chin J Pediatr Surg, 2008, 29(8): 452-455. DOI: 10.1038/nature15540.
- 6 Stadler ZK, Thom P, Robson ME, et al. Genome-wide association studies of cancer [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(27): 4255-4267. DOI: 10.1200/JCO.2009.25.7816.
- 7 Maris JM, Mosse YP, Bradfield JP, et al. Chromosome 6p22 locus associated with clinically aggressive neuroblastoma [J]. N Engl J Med, 2008, 358(24): 2585-2593. DOI: 10.1056/NEJMoa0708698.
- 8 McDaniel LD, Conkrite KL, Chang X, et al. Common variants upstream of MLF1 at 3q25 and within CPZ at 4p16 associated with neuroblastoma [J]. PLoS Genet, 2017, 13(5): e1006787. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006787.
- 9 Capasso M, Devoto M, Hou C, et al. Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma [J]. Nat Genet, 2009, 41(6): 718-723. DOI: 10.1038/ng.374.
- 10 Nguyen le B, Diskin SJ, Capasso M, et al. Phenotype restricted genome-wide association study using a gene-centric approach identifies three low-risk neuroblastoma susceptibility loci [J]. PLoS Genet, 2011, 7(3): e1002026. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002026.
- 11 Diskin SJ, Capasso M, Diamond M, et al. Rare variants in TP53 and susceptibility to neuroblastoma [J]. J Natl Cancer Inst, 2014, 106(4): dju047. DOI: 10.1093/jnci/dju047.
- 12 Han W, Zhou Y, Zhong R, et al. Functional polymorphisms in FAS/FASL system increase the risk of neuroblastoma in Chinese population [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71656. DOI: 10.1371/journal.pone.0071656.
- 13 Lu J, Chu P, Wang H, et al. Candidate Gene Association Analysis of Neuroblastoma in Chinese Children Strengthens the Role of LMO1 [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0127856. DOI: 10.1371/journal.pone.0127856.
- 14 Jin Y, Wang H, Han W, et al. Single nucleotide polymorphism rs11669203 in TGFBR3L is associated with the risk of neuroblastoma in a Chinese population [J]. Tumour Biol, 2016, 37(3): 3739-3747. DOI: 10.1007/s13277-015-4192-6.
- 15 Zhang J, Wang J, Liu Q, et al. Polymorphisms of glucose-regulated protein 78 and clinical relevance of neuroblastoma

- ma; Risk and prognosis [J]. J Cancer Res Ther, 2016, 12 (3): 1178-1183. DOI: 10.4103/0973-1482.193119.
- 16 He J, Zhang R, Zou Y, et al. Evaluation of GWAS-identified SNPs at 6p22 with neuroblastoma susceptibility in a Chinese population [J]. Tumour Biol, 2016, 37 (2): 1635-1639. DOI: 10.1007/s13277-015-3936-7.
 - 17 He J, Zhong W, Zeng J, et al. LMO1 gene polymorphisms contribute to decreased neuroblastoma susceptibility in a Southern Chinese population [J]. Oncotarget, 2016, 7 (16): 22770-22778. DOI: 10.18632/oncotarget.8178.
 - 18 He J, Zou Y, Wang T, et al. Genetic Variations of GWAS-Identified Genes and Neuroblastoma Susceptibility: a Replication Study in Southern Chinese Children [J]. Transl Oncol, 2017, 10 (6): 936-941. DOI: 10.1016/j.tranon.2017.09.008.
 - 19 He J, Wang F, Zhu J, et al. Association of potentially functional variants in the XPG gene with neuroblastoma risk in a Chinese population [J]. J Cell Mol Med, 2016, 20 (8): 1481-1490. DOI: 10.1111/jcmm.12836.
 - 20 Zhang J, Lin H, Wang J, et al. LMO1 polymorphisms reduce neuroblastoma risk in Chinese children; a two-center case-control study [J]. Oncotarget, 2017, 8 (39): 65620-65626. DOI: 10.18632/oncotarget.20018.
 - 21 He J, Zou Y, Liu X, et al. Association of Common Genetic Variants in Pre-microRNAs and Neuroblastoma Susceptibility: A Two-Center Study in Chinese Children [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2018, 11: 1-8. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.01.003.
 - 22 Zhuo ZJ, Liu W, Zhang J, et al. Functional Polymorphisms at ERCC1/XPF Genes Confer Neuroblastoma Risk in Chinese Children [J]. EBioMedicine, 2018, 30: 113-119. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.03.003.
 - 23 He J, Zhang X, Zhang J, et al. LMO1 super-enhancer polymorphism rs2168101 G > T correlates with decreased neuroblastoma risk in Chinese children [J]. J Cancer, 2018, 9 (9): 1592-1597. DOI: 10.7150/jca.24326.
 - 24 Yang X, He J, Chang Y, et al. HOTAIR gene polymorphisms contribute to increased neuroblastoma susceptibility in Chinese children [J]. Cancer, 2018, 124 (12): 2599-2606. DOI: 10.1002/encr.31353.
 - 25 Zhu J, Han F, Tang Y, et al. LMO1 Gene Polymorphisms Reduce Neuroblastoma Risk in Eastern Chinese Children: A Three-Center Case-Control Study [J]. Front Oncol, 2018, 8: 468. DOI: 10.3389/fonc.2018.00468.

(收稿日期: 2018-12-09)

本文引用格式: 贺静, 夏慧敏. 神经母细胞瘤的 GWAS 多中心研究经验及临床开展过程中的困境 [J]. 临床小儿外科杂志, 2019, 18 (1): 9-12. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2019.01.003.

Citing this article as: He J, Xia HM. Experiences and dilemmas of multi-center studies on neuroblastoma [J]. J Clin Ped Sur, 2019, 18 (1): 9-12. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2019.01.003.

更正声明

经作者胡嘉健确定, 其刊登于本刊 2018 年第 17 卷第 11 期第 879-880 页的论文“炎性肌纤维母细胞瘤继发回回结型肠套叠 1 例”, 基金项目编码 2017-XY-30 应为 2018-XY-41, 基金项目名称“中国儿童肿瘤治疗规范化建设的研究”应为“加强基层医生队伍建设-完善我国儿童肿瘤专业人才培养体系研究”, 特此声明。

经作者段星星确定, 其刊登于本刊 2018 年第 17 卷第 11 期第 821-825 页的论文“超声剪切波弹性成像技术对胆道闭锁筛查与诊断的临床价值分析”, 文中图题 2 应对应图片 4, 图题 3 应对应图片 2, 图题 4 应对应图片 3, 现予以更正, 正文中涉及图片顺序的内容均以此为标准, 特此声明。