二代测序在胰腺癌中的研究进展

杨　秀，郑桐森，张艳桥
（哈尔滨医科大学附属肿瘤医院，黑龙江 哈尔滨 150086）

摘　要：胰腺癌是高度恶性的消化系统肿瘤。由于极差的预后及有限的治疗方法，对胰腺癌分子生物学更进一步的了解及研究，可能会明显提高诊断的精确性及治疗的有效性。二代测序（next-generation sequencing，NGS）是对传统测序一次革命性的改变，具有高通量、高敏感性、高自动化程度等优点。利用二代测序技术，筛选胰腺癌致病基因，研究胰腺癌的发病机制，进而指导胰腺癌的诊断及治疗，有望改进胰腺癌的诊疗现状。近年来，二代测序在胰腺癌的应用中取得巨大进展，该文就二代测序及其在胰腺癌中的研究进展作一综述。

关键词：胰腺癌；二代测序；诊断；治疗；预测
中图分类号：R735.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1004-0242(2017)07-0550-05
doi：10.11735/j.issn.1004-0242.2017.07.A010

Progress of Next-generation Sequencing in Pancreatic Cancer Research

YANG Xiu，ZHENG Tong-sen，ZHANG Yan-qiao
（Affiliated Cancer Hospital of Harbin Medical university，Harbin 150086，China）

Abstract：Pancreatic cancer is a highly malignant tumor of digestive system. Due to the poor prognosis and limited treatment methods，the further understanding and research on molecular biology of pancreatic cancer，may improve the accuracy of diagnosis and the effectiveness of treatment significantly. Next-generation sequencing (NGS) has revolutionized the traditional sequencing process with the characteristic of high throughput，high sensitivity，and high degree of automation. Using NGS technology in screening related genes to research the pathogenesis of pancreatic cancer，is expected to improve the status of diagnosis and treatment of pancreatic cancer. In recent years，the application of NGS in pancreatic cancer has made great progress；this article intends to review these progress.

Key words：pancreatic cancer；next-generation sequencing；diagnosis；treatment；prediction

胰腺癌是恶性程度极高的肿瘤之一，由于其起病隐匿、早期诊断困难，具有高侵袭转移特性，缺乏有效的化疗药物，并且容易对现有药物产生耐药，5年生存率不足5%，预后极差[1]。因此，我们需要寻找更好的诊断及治疗方法。分子靶向治疗是利用肿瘤组织或细胞所具有的特异性结构分子为靶点，使用能与这些靶分子特异性结合的药物，特异性地杀伤肿瘤细胞的治疗，以其低毒副作用和高效率的治疗效果正成为肿瘤治疗的新手段[2]。肿瘤基因组学的研究，可了解导致肿瘤发生发展的基因突变位点，发现具有意义的预测标志物及治疗靶点。然而，传统的测序方法操作繁琐、耗时长、价格昂贵、依赖电泳分离技术，难以进行大规模测序。近年来，通过不断的技术创新以及操作程序优化，二代测序技术（next-generation sequencing，NGS）诞生，并得到突破性进展[3]。NGS对推动胰腺癌的分子生物学的发展起到了重要作用，为胰腺癌分子生物学的研究提供了新的手段。

1　NGS技术原理、方法及特征

目前，主要的测序平台包括Roche/454、Illumi-

收稿日期：2016-11-04；修回日期：2017-01-07
通讯作者：张艳桥，E-mail：yanqiaozhang@126.com

na/Solexa、Life/SOLiD、Ion Torrent、华大基因 CG 平台，并具有各自的优缺点（Table 1）[4]。不同的 NGS 平台，其原理上有所不同，但基本原理都是边合成边测序，即在 DNA 进行 PCR 扩增时，借助一些化学标志物在碱基插入 DNA 链时发出的信号来读取序列信息，信号可以是光信号，也可以是 H^+流信号（Hion fluxes）。

2 NGS 在胰腺癌研究中的策略

2.1 基因组测序

2008 年，Jones 首次对 24 例胰腺癌标本的 20 661 个基因进行全基因组测序，发现 1562 种体细胞突变、198 种杂合性缺失、144 种扩增、69 种基因群组改变，其中 31 种基因群组改变参与了 12 种关键细胞信号通路，这为胰腺癌的分子生物学研究奠定了基础[5]。在胰腺癌中，目标捕获基因检测的典型的基因面板约有 300 个基因突变。*KRAS* 基因突变是胰腺癌中最常见的，大约占 90%，也是最早发生突变的。另外 *TP53* 的失活、*CDKN2A*、*SMAD* 基因突变也是目前公认的常见基因突变。其他的基因突变的致病率低于 5%，例如 *PACB2*、*BRCA1/2*、*MSH2/6*、*ATM*、*GNAS*、*RNF4* 等基因突变[6~9]。另外，在一些特殊类型的胰腺癌中，通过 NGS，可检测具有潜在意义的基因突变，并证明与肿瘤的恶性程度、复发、转移及对化疗敏感性的预测有关，指导其治疗[9~12]。基因组测序可获得胰腺癌样本中的基因组的序列信息，从而可以个体或群体化地进行差异性分析，获得具有重要价值的基因信息。

2.2 转录组测序

转录组是某一物种特定细胞或组织在某一状态下几乎所有的转录集合，NGS 能够对整体转录活动进行检测，在分析转录本的结构和表达水平的同时，还能发现未知转录本和稀有转录本。Müller 等[13]综合分析了胰腺癌中长链非编码 RNA（lncRNA），小分子非编码 RNA（sncRNA）和 mRNA 的新的差异性表达，并揭示了 miR-802 在 T 细胞因子 4（T cell factor4，TCF-4）中的 3′UTR 中的潜在结合位点，编码转录因子控制 Wnt 信号基因。SSR 标记即简单重复序列（simple sequence repeat，SSR），通常成为微卫星 DNA，Alisoltani 等[14]第 1 次使用 RNA-seq SSRs 和 sRNA-seq SSRs 测序，揭示了在肿瘤发展过程中 SSR 的显著变化，特别是 GCC/GGC 和 GCG/CGC 的频率相对于正常胰腺组织是明显升高的。通过 NGS 平台对胰腺癌进行转录组测序可以准确地分析基因表达差异、基因结构变异、筛选分子标记等重要问题，为胰腺癌的诊断和治疗提供重要依据。

2.3 表观遗传学测序

表观遗传是指基因组 DNA 序列未发生改变，而基因表达及基因功能的诱导和维持却发生可遗传的变化。表观遗传变化主要包括 DNA 甲基化修饰、组蛋白修饰、非编码 RNA 调控 3 大方面。Thompson 等[15]研究发现，DNA 甲基化水平与胰腺癌患者生存之间有直接相关性，并提示可能将成为临床生物学标志。NGS 的表观遗传学测序为发现胰腺癌新的肿瘤标志物提供了一种更为直接的方法，通过表观遗传学测序会发现更多的生物学标志，可能会提高胰腺癌的早期诊断率。

3 NGS 在胰腺癌中的应用

3.1 寻找突变基因

肿瘤基因组学的主要研究方向是寻找肿瘤相关基因组及遗传序列、筛选及检测肿瘤特异性或相关性表达、寻找可操作的突变基因。Jones 等已通过全基因组测序，对胰腺癌常见的基因突变进行详细解

Table 1 The principles，advantages and disadvantages of the sequencing platforms

Sequencing platform	Sequencing principle	Advantage	Relative limitation
Roche/454	Pyro sequencing	Highest reading length in NGS	Measure the length of the homopolyme inaccurately
Illumina/Solex	Reversible terminator	High throughput，low price，large data	Expensive instrument，high sequencing error rate，high cost of data processing
Life/SOLiD	Connection method	High sequencing accuracy rate，low cost	Long sequencing time，high cost，short sequencing length，difficult data analysis
CG platform	Combinatorial probe-anchor ligation	Low base pairing mistake rate，low price	Short sequencing length

读[5]。一项美国的研究通过对 109 例胰腺癌患者进行全外显子测序,描述了胰腺癌相关的基因多样性,发现胰腺癌发生相关病因事件与肿瘤突变谱具有明显的相关性。基因拷贝数变异 (copy number variation,CNV)会靶向多个肿瘤抑制和(或)致癌基因位点,但只有原癌基因的扩增与胰腺癌恶性程度和腺体亚型相关,与此同时还发现了一些崭新的与预后和药物敏感性相关的基因突变。同时,在超过 90% 的病例中都可观察到 *KRAS* 突变但编码 Q61 密码子的基因与患者存活率增加具有特异性关联。癌基因 *BRAF* 突变与 *KRAS* 互相排斥,并且与维罗非尼治疗胰腺癌模型的敏感性相关。研究人员还观察到 Wnt 信号通路,染色质重塑,Hedgehog 通路,DNA 修复和细胞周期进程中的相关基因都会发生高频率突变[16]。胰腺癌的发病机制存在个体差异,而这种差异会反映在其突变谱上。因此需要对大量的胰腺癌样本进行测序以找到更多与胰腺癌发病及进展相关的基因突变。

3.2 胰腺癌的早期诊断

3.2.1 基于 NGS 的基因组学诊断

肿瘤的基因突变、基因组的结构和数量改变与胰腺癌的发生发展密切相关。有研究表明 *KRAS*、*GNAS*、*RNF4* 基因在胰腺癌癌前病变即胰腺导管内乳头状腺瘤(IPMNs)中检测出,并证明与其恶性生长相关联,有助于胰腺癌的早期诊断[9,17]。且有研究发现 *GNAS* 与胰管扩张有显著相关,表明其在黏液分泌过程中可能有一定的作用[18]。嗜酸细胞亚型是 IPMNs 中的一种特殊类型,通过基因测序未发现 *KRAS* 和 *GNAS* 突变,但发现 *ARHGAP26*、*ASXL1*、*EPHA8* 和 *ERBB4* 基因特殊基因突变,对其进一步的分析,可能发现胰腺导管内肿瘤形成的新的机制[19]。Yu 等[20]开发了一种新的 NGS 即数字 NGS,对胰腺癌、IPMNs 及对照组个体的胰液进行 DNA 测序,发现胰液 DNA 突变浓度,特别是 *TP53* 和 *SMAD4* 的突变具有明显差异,对监测的 4 例胰腺癌患者随访的 18 个月内,有 2 例在尚未出现影像学变化时已在胰液中发现 *SMAD4* 或 *TP53* 突变,表明胰液 NGS 的 DNA 测序可有助于胰腺癌筛查及早诊。Amato 等[21]对 10 例肠型 IPMNs 中,从胰腺切除标本中获取囊肿液,对比手术切除的 51 例各级别导管内肿瘤,发现 *TP53* 基因突变仅于高级别瘤变,可能成为提示发育不良或高侵袭性的标志物。

3.2.2 基于 NGS 的转录组学诊断

miRNA 在细胞分化、生物发育及疾病发生发展过程中发挥巨大作用,利用 NGS 研究 miRNA 和疾病之间的关系可能成为疾病诊断的新的生物学标记。Vila-Navarro 等[22]第 1 个使用 NGS 探讨 miRNA 在胰腺导管腺癌及其癌前病变 IPMN 中的表达分析。通过对比正常组织中 miRNA 表达的区别,在胰腺癌及 IPMNs 中有很大数量的 miRNAs 表达失控。联合细针穿刺活检技术,使 miRNA 检测可成为胰腺癌早期诊断方法。另一项研究分别对胰腺黏液囊性肿瘤、IPMNs 及胰腺癌的囊肿液进行 NGS 测序,发现在胰腺腺癌中 15 种高表达 miRNA,预测 miRNA-155、miRNA-138、miRNA-195、miRNA-204、miRNA-216a、miRNA-217、miRNA-218 可能成为胰腺癌高敏感性、高特异性的生物标志物[23]。Wang 等[24]应用 NGS 筛选胰腺癌外周血单个核细胞差异表达的 miRNA,继而通过 RT–PCR 进行大样本验证,结果显示 miR-27a-3p 有较高的胰腺癌诊断效能,有可能成为潜在的胰腺癌诊断标志物。将胰腺及胰周良性疾病作为对照组,与 CA19-9 联合诊断模型可提高胰腺癌诊断效能,因此可能具有一定的临床应用价值。但是,目前需要解决包括数据规范化和细胞污染等技术问题,仍需进一步了解 miRNA 进入循环的机制,阐明循环 miRNA 的生物学意义。由于 miRNA 参与各种肿瘤的进展,血清、胰液、囊肿液中的 miRNA 谱可被认为是最好的潜在生物标志物。

3.2.3 基于 NGS 的表观遗传学诊断

DNA 甲基化修饰是表观遗传学变化的主要方面。已有研究证实 DNA 甲基化水平与胰腺癌患者生存之间有直接相关性,并提示可能将成为临床生物学标志[16]。Kisiel 等[25]发现多个新型的甲基化标志物,尤其是 CD1D,在胰腺癌病例与对照组中有明显的差异,具有较高的敏感性及特异性[25]。DNA 甲基化一般发生在肿瘤进展的早期,导致关键基因的功能缺失或增强。在不久的将来,表观遗传变化和表观遗传筛查策略可能会成为具有潜力的诊断和预测标志物。

3.3 对胰腺癌高危人群的筛查

胰腺癌筛查主要针对的是高风险人群,其中最主要的风险是基因遗传因素。通过 NGS 对家族性胰

腺癌全基因组和外显子测序，发现 *PACB2*、*BRCA1/2*、*MSH2/6*、*ATM* 是胰腺癌的遗传易感基因。另外有研究表明，*PACB2*、*BRCA2*、*ATM* 突变的肿瘤患者对多聚 ADP 核糖多聚酶(PARP)抑制剂或铂类药物敏感，其可作为潜在的治疗靶点，遗传学失活的 *ATM* 或对放射损伤敏感[26]。*NBN* 基因是 DNA 双键断裂修复中最重要的一个参与者，Borecka 等[27]研究发现其 c.657del5 突变是新型的胰腺癌易感基因，显著增加胰腺癌患病风险。然而，考虑到高风险人群的遗传异质性和尚未完善的胰腺癌基因谱，临床上应用基因组测序方法筛查高风险人群依然不可行也不切实际。

4 胰腺癌的治疗选择

Yu 等[28]将潜在可操作基因分为 3 种类型：携带获得性功能突变的癌基因、功能丢失的抑癌基因、胰腺癌组织较癌旁组织过表达的某些调节基因，并以将 RNA 干扰技术、基因治疗和小分子抑制剂成功应用于针对胰十二指肠同源框因子(PDX-1)的研究为例，表示正在寻求一个可操作的基因组平台，将胰腺癌可操作基因与有效的辅助靶向治疗相匹配，实现精准治疗。目前，大量关于胰腺癌的靶向治疗药物正在临床试验中，如以血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor，VEGF)和表皮生长因子(epidermal growth factor，EGF)为靶点的靶向抗癌药，以及针对肿瘤环境下的免疫系统的肿瘤疫苗等[29]。NGS 可以发现胰腺癌中更多潜在可能的治疗靶点。Tan 等[30]应用高通量测序方法，对应用过重组人内皮抑素或者吉西他滨治疗的胰腺癌患者，筛选发生改变的 miRNAs，这两种治疗方法均可减少 miRNA-19a 的表达水平，表明 miRNA-19a 是胰腺癌潜在的治疗靶点。另外，NGS 可以鉴别新生肿物为原发或复发性肿瘤，指导个体选择最佳治疗方案[31]。随着 NGS 的应用及更多靶向治疗药物的研发，可以发现胰腺癌中更多的可操控靶点及针对某些靶点的有效治疗药物。

总之，NGS 目前可用于手术切除组织、细针穿刺活检组织及各种液体组织中[32~34]，可更大范围地应用于胰腺癌诊断及治疗的临床实践中。NGS 可高通量大规模地检测胰腺癌在 DNA、RNA 及表观遗传水平的变化，为胰腺癌发病机制的研究及有效诊疗标志物的筛查提供了一种强大的新型平台。目前，胰腺癌仍缺乏明确靶向治疗方法，NGS 方法可为新型药物的研发及个体化治疗奠定良好的基础，推动和加速基础研究向临床实践的转变，以取得最大的临床获益。

参考文献：

[1] Siegel RL，Miller KD，Jemal A. Cancer statistics CA [J]. Cancer J Clin，2015，65(1)：5–29.

[2] Dobbelstein M，Moll U. Targeting tumour-supportive cellular machineries in anticancer drug development [J]. Nat Rev Drug Discov，2014，13(3)：179–196.

[3] Catenacci DV. Next-generation clinical trials：novel strategies to address the challenge of tumor molecular heterogeneity[J]. Mol Oncol，2015，9(5)：967–996.

[4] Shao XY，Xu WW. Advances in next generation sequencing(NGS) technology and their application in cancer research [J]. Journal of Molecular Diagnostics and Therapy，2016，8(5)：289–296. [邵向阳，徐伟文. 下一代测序(NGS)技术的发展及在肿瘤研究的应用 [J]. 分子诊断治疗杂志，2016，8(5)：289–296.]

[5] Jones S，Zhang X，Parsons DW，et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses[J]. Science，2008，321(5897)：1801–1806.

[6] Underhill ML，Germansky KA，Yurgelun MB. Advances in hereditary colorectal and pancreatic cancers[J]. Clin Ther，2016，38(7)：1600–1621.

[7] Bakker JL，de Winter JP. A role for ATM in hereditary pancreatic cancer[J]. Cancer Discov，2012，2(1)：14–15.

[8] Humphris J，Chang DK，Biankin AV. Inherited susceptibility to pancreatic cancer in the era of next-generation sequencing[J]. Gastroenterology，2015，148(3)：496–498.

[9] Lee JH，Kim Y，Choi JW，et al. KRAS，GNAS，and RNF43 mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas：a meta-analysis[J]. Springerplus，2016，5(1)：1172.

[10] Padhi P，Narula A，Balog A，et al.Christou. Use of molecular studies for treatment of metastatic pleomorphic large cell pancreatic cancers—a novel strategy[J]. J Gastrointest Oncol，2016，7(2)：E17–E21.

[11] Furukawa T，Sakamoto H，Takeuchi S，et al. Whole exome sequencing reveals recurrent mutations in BRCA2 and FAT genes in acinar cell carcinomas of the pancreas[J/OL]. http：//www.nature.com/articles/srep08829，2015–03–06.

[12] Kubota Y，Kawakami H，Natsuizaka M，et al. CTNNB1 mutational analysis of solid-pseudopapillary neoplasms of

the pancreas using endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration and next-generation deep sequencing[J]. J Gastroenterol,2015,50(2):203–210.

[13] Muller S,Raulefs S,Bruns P,et al. Next-generation sequencing reveals novel differentially regulated mRNAs, lncRNAs,miRNAs,sdRNAs and a piRNA in pancreatic cancer [J/OL]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25910082,2015–04–25.

[14] Alisoltani A,Fallahi H,Shiran B,et al. RNA-seq SSRs and small RNA-seq SSRs:new approaches in cancer biomarker discovery[J]. Gene,2015,560(1):34–43.

[15] Thompson MJ,Rubbi L,Dawson DW,et al. Pancreatic cancer patient survival correlates with DNA methylation of pancreas development genes [J/OL]. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0128814,2015–06–03.

[16] Witkiewicz AK,McMillan EA,Balaji U,et al. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets [J/OL]. http://www.nature.com/articles/ncomms7744,2015–04–09.

[17] Sakamoto H,Kuboki Y,Hatori T,et al. Clinicopathological significance of somatic RNF43 mutation and aberrant expression of ring finger protein 43 in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas [J]. Mod Pathol,2015,28(2):261–267.

[18] Takano S,Fukasawa M,Maekawa S,et al. Deep sequencing of cancer-related genes revealed GNAS mutations to be associated with intraductal papillary mucinous neoplasms and its main pancreatic duct dilation[J/OL]. http://journals.plos.org/plosone/article?id =10.1371/journal.pone.0098718,2014–06–04.

[19] Basturk O,Tan M,Bhanot U,et al. The oncocytic subtype is genetically distinct from other pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasm subtypes [J]. Mod Pathol,2016,29(9):1058–1069.

[20] Yu J,Sadakari Y,Shindo K,et al. Digital next-generation sequencing identifies low-abundance mutations in pancreatic juice samples collected from the duodenum of patients with pancreatic cancer and intraductal papillary mucinous neoplasms [J/OL]. http://gut.bmj.com/content/early/2016/07/18/gutjnl-2015-311166.long,2016–07–18.

[21] Amato E,Molin MD,Mafficini A,et al. Targeted next-generation sequencing of cancer genes dissects the molecular profiles of intraductal papillary neoplasms of the pancreas [J]. J Pathol,2014,233(3):217–227.

[22] Vila-Navarro E,Vila-Casadesus M,Moreira L,et al. MicroRNAs for detection of pancreatic neoplasia:biomarker discovery by next-generation sequencing and validation in 2 independent cohorts [J/OL]. http://journals.lww.com/annalsofsurgery/pages/articleviewer.aspx?year =9000&issue =00000&article=96596&type=abstract,2016–05–26.

[23] Wang J,Paris PL,Chen J,et al. Next generation sequencing of pancreatic cyst fluid microRNAs from low grade-benign and high grade-invasive lesions [J]. Cancer Lett,2015,356(2 Pt B):404–409.

[24] Wang WS,Liu LX,Li GP,et al.Combined serum CA19-9 and miR-27a-3p in peripheral blood mononuclear cells to diagnose pancreatic cancer [J]. Cancer Prev Res (Phila),2013,6(4):331–338.

[25] Kisiel JB,Raimondo M,Taylor WR,et al. New DNA methylation markers for pancreatic cancer:discovery,tissue validation,and pilot testing in pancreatic juice[J]. Clin Cancer Res,2015,21(19):4473–4481.

[26] Takai E,Yachida S,Shimizu K,et al. Germline mutations in Japanese familial pancreatic cancer patients [J/OL]. http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page =article&op =view&path [] = 12490&pubmed-linkout=1,2016–10–06 .

[27] Borecka M,Zemankova P,Lhota F,et al. The c.657del5 variant in the NBN gene predisposes to pancreatic cancer [J]. Gene,2016,587(2):169–172.

[28] Yu J,Liu SH,Sanchez R,et al.Brunicardi,Pancreatic cancer actionable genes in precision medicine and personalized surgery [J/OL]. http://www.thesurgeon.net/article/S1479–666X(16)30021–X/abstract,2016–06–28.

[29] Zhou JJ,Lu XL.Advances in biological targeted drugs in pancreatic cancer[J]. Tumor,2016,36(2):220–230. [周晶晶,陆新良. 胰腺癌生物靶向药物的研究进展[J]. 肿瘤,2016,36(2):220–230.]

[30] Tan Y,Yin H,Zhang H,et al. Sp1-driven up-regulation of miR-19a decreases RHOB and promotes pancreatic cancer [J]. Oncotarget,2015,6(19):17391–17403.

[31] Sibinga Mulder BG,Mieog JS,Handgraaf HJ,et al. Targeted next-generation sequencing of FNA-derived DNA in pancreatic cancer [J/OL]. http://jcp.bmj.com/content/early/2016/09/26/jclinpath-2016-203928.long,2016–09–26.

[32] Gleeson FC,Kerr SE,Kipp BR,et al. Targeted next generation sequencing of endoscopic ultrasound acquired cytology from ampullary and pancreatic adenocarcinoma has the potential to aid patient stratification for optimal therapy selection[J]. Oncotarget,2016,7(34):54526–54536.

[33] Zill OA,Greene C,Sebisanovic D,et al. Cell-free DNA next-generation sequencing in pancreatobiliary carcinomas [J]. Cancer Discov,2015,5(10):1040–1048.

[34] San Lucas FA,Allenson K,Bernard V,et al. Minimally invasive genomic and transcriptomic profiling of visceral cancers by next-generation sequencing of circulating exosomes[J]. Ann Oncol,2016,27(4):635–641.