

领域前沿 · 中国



王慧, 中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所研究员。1999年在天津医科大学/美国伯明翰阿拉巴马大学(UAB)获得医学、理学博士学位(中美联合培养); 1999年至2005年先后在美国UAB大学药理与毒理系、临床药理部从事博士后研究(1999~2001)、讲师(2001~2002)、助理教授及癌症药理学中心实验室副主任(2002~2005); 2005年10月至今任中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所研究员、博士生导师、研究组长, 食品安全研究中心主任(2007-), 国家食品安全风险评估分中心常务副主任(2014-), 中国科学院食品安全重点实验室(筹)主任(2014-), 卫生部食品安全风险评估重点实验室副主任(2012-)。现任国务院食品安全委员会专家委员会委员、第一届食品安全国家标准评审委员会委员、微生物分委员会主任委员, 中国毒理学会第六届理事会理事, 中国抗癌协会肿瘤病因学专业委员会委员, 国家科学技术奖评审专家, 国家食品药品监督管理局保健食品和新药评审专家, 卫生计生委食品安全评审专家, 卫生计生委新食品原料评审专家, 上海市食品安全委员会专家组成员, 上海市第一届食品安全风险评估专家委员会及地方标准评审委员会委员。2006年入选上海市“浦江人才计划”, 2007年入选中国科学院“百人计划”, 2011年获得国家杰出青年科学基金资助, 2011年被评为上海市科技系统三八红旗手, 2012年入选上海市优秀学术带头人, 2013年获得中国青年女科学家奖。

王慧研究员长期致力于肿瘤分子靶点、营养药学、食品安全的基础和应用研究。发现肿瘤人群易感标志物和诊断治疗新靶点, 研究靶点功能及其分子调控和信号转导, 探索以膳食营养素、天然植物活性成份、化学小分子探针等靶向干预和治疗肿瘤的新机制和新方法。已在Nat Genet、Proc Natl Acad Sci USA、Cancer Res、Clin Cancer Res、J Clin Endocrinol Metab等刊物发表研究论文90余篇, 申请专利16项、授权6项, 研究成果得到国际同行认可和高度评价。近期, 我们运用全基因组外显子测序和靶基因深度测序技术首次系统阐述了胆囊癌基因突变图谱(Li *et al.* Nat Genet 2014)。

破译胆囊癌基因突变图谱

李晓光 王 慧*

(中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所, 中国科学院食品安全重点实验室(筹), 上海 200031)

胆囊癌是一种高度恶性的消化道肿瘤, 居消化道肿瘤第5位, 其发病具有典型的地域性、种族和性别差异性, 女性发病率显著高于男性, 男女发病的性别比为1:(3~4)^[1]。胆囊癌与遗传、饮食习惯、生活方式、营养代谢、激素等多种因素有关^[2]。流行病学调查表明,

胆结石是胆囊癌最重要的高危诱发因素, 尤其是伴发胆囊炎的患者; 其他高危因素包括胆囊钙化、胆囊息肉以及致癌物接触。智利是目前全球胆囊癌发病率最高的国家, 其中男性为7.0/10万, 女性为13.4/10万, 这与该国家人口胆结石高发相关^[2-3]。统计显示, 男性高发率集中在韩国和日本, 女性高发于印度、秘鲁、韩国、日本、哥伦比亚和美国^[2]。在我国, 近年来胆囊癌男女发病率和死亡率均呈现明显上升趋势。病

*通讯作者。Tel: 021-54920941, E-mail: huiwang@sibs.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-54920941, E-mail: huiwang@sibs.ac.cn
网络出版时间: 2014-09-02 16:06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20140903.1437.002.html>

人主要以老年女性为主,西北和东北地区发病高于长江以南地区,农村比城市发病率高,其中以陕西省最高^[4]。以上海市为例,最新统计显示男性胆囊癌发病率为5.61/10万,女性为10.03/10万,这一数据均超过世界中等发病水平^[5]。

由于胆囊癌起病隐匿,往往发现时已经处于疾病晚期,早期诊断困难,根治机会少,目前治疗主要依靠手术,总体预后极差,80%以上的胆囊癌患者生存不足一年,五年生存率仅为5%,总体中位生存时间为8~10个月^[6]。68%~98%的胆囊癌病人伴有胆结石,且胆结石病人患癌率较正常人高2~3倍,结石直径>3 cm比<1 cm的病人患胆囊癌风险高10倍^[7-8]。遗传因素在胆囊癌发病中发挥重要作用,但这方面研究相对较少。多数研究聚焦在单个或者少数基因在胆囊癌中的突变(如*TP53*、*KRAS*、*CDKN2A*等)^[2,9-10]或异常表达(*EGFR/HER2*、*MUC4*等)^[11-14]。目前认为,有两条途径可以诱导胆囊癌的发生,即胆囊结石-慢性胆囊炎-胆囊癌途径和胰胆管合流异常相关胆囊癌发生途径,前者作为胆囊癌发生的主要途径常见于世界各地病人,而后者多见于日本患者。令人遗憾的是,胆囊癌对于临床上标准的细胞毒治疗方案(放疗和化疗)极度不敏感,关于胆囊癌的诊断和治疗目前仍无突破性进展^[2,6]。因此,深入研究胆囊癌发生发展的分子生物学和分子遗传学特征,明确胆囊癌分子分型、寻找早期高敏靶标,对有效预防和治疗胆囊癌极为重要。

新一代测序技术(next generation sequencing)的迅猛发展为疾病研究带来了新的契机。人类全基因组测序成本费用高及数据量庞大等因素限制,催生了全基因组外显子捕获测序技术。与前者相比,外显子测序仅针对人类基因组序列1%外显子区的蛋白编码信息进行研究,其覆盖深度更深,数据更为准确,可用于寻找单基因病或包括癌症在内的复杂疾病的致病基因^[15-16]。利用外显子测序技术对肿瘤进行深入研究,有助于寻找肿瘤相关的癌基因、抑癌基因及相关突变的最佳药物靶点,因而成为肿瘤遗传学致病基因研究最为有效的策略之一^[17]。该技术能够发现外显子区域大部分疾病相关变异,可检测常见基因变异和<5%的低频突变,适合大样本人群研究,通过系统比对揭示这些疾病的遗传致病机理和驱动基因。靶基因深度测序技术是针对感兴趣的特定基因的蛋白编码区域DNA或其他特定区域进

行捕获,富集后进行高通量超深度测序的一种基因组分析方法。该方法通过目标区域测序可以对候选位点或候选基因进行验证,也可以用于药物敏感性筛查和药靶基因的发现。

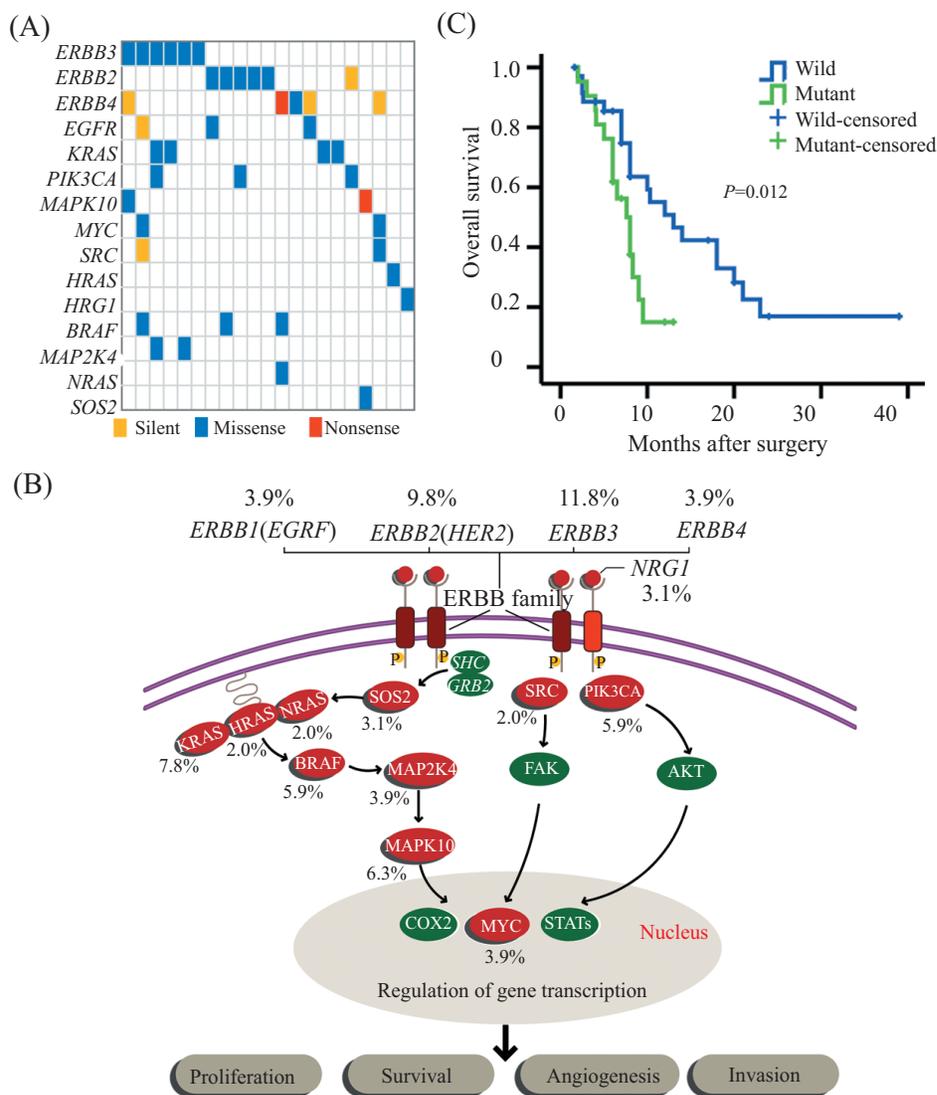
目前,系统阐述与胆囊癌相关的体细胞突变图谱的研究尚属空白,利用先进的全基因组外显子测序结合靶基因深度测序技术,系统研究胆囊癌和正常细胞之间的基因谱系差异,就有可能发现与胆囊癌发生密切相关的基因变异类型,为发现有关驱动胆囊癌发生及生长的分子途径和潜在的药物靶标提供重要线索。研究中,我们选择了57对原发胆囊癌患者,并收集每例患者术后的癌及癌旁组织,并对患者进行定期跟踪随访。首先,我们使用Illumina公司的Solexa系统对32对样本进行全基因组外显子组测序(whole-exome sequencing),平均测序深度为50x。通过严格筛选标准过滤,共获得了1 450个体细胞单核苷酸变异(single-nucleotide variations, SNV)和34个体细胞插入或缺失突变,这些变异均导致蛋白编码序列的改变。具体发现如下:

(1)胆囊癌的体细胞突变以APOBEC突变类型为主。有报道表明,根据基因组核苷酸突变的模式可以推测细胞突变发生的机制。APOBEC嘧啶脱氨酶是一种能将胞嘧啶转化为尿嘧啶的酶,这种改变主要发生于TCN三核苷酸元件上,APOBEC突变类型常发生于癌症基因组中,如HER2阳性的乳腺癌、肺癌、膀胱癌等^[18-19]。我们发现,41.6%的胆囊癌的体细胞单核苷酸突变以C>T/G>A为主,且主要发生在TCN,尤其是TCA这种APOBEC作用元件上,这一结果提示,APOBEC介导的突变模式在胆囊癌发病过程中可能发挥一定作用。

(2)揭示ERBB家族基因为胆囊癌新型驱动基因。我们在这些肿瘤样本中发现了包括*TP53*、*CS*、*ERBB3*、*ERBB2*等在内的23个基因存在3个或3个以上的体细胞突变。众多研究已证实,肿瘤相关基因(cancer-related genes)在绝大多数肿瘤的发生发展过程中发挥了重要作用。为了进一步探究上述胆囊癌突变基因及其他已报道的肿瘤相关基因在胆囊癌中的遗传变异情况,我们采用了靶基因超深度测序技术(ultra-deep targeted gene sequencing),在51对胆囊癌样本中对283个靶基因进行了深度测序,平均测序深度为367x。这283个靶基因筛选标准如下:在32对胆囊癌中发现的胆囊癌高频突变基因(如*TP53*、*CS*、

ERBB3、*ERBB2*等)、根据COSMIC数据库统计得到的肿瘤高频突变基因以及与肿瘤药物敏感性相关基因、其他消化系统肿瘤高频突变基因。经过严格筛选和矫正,我们在51对样本中发现了271个体细胞非同义突变,其中统计数据显示,*TP53*、*KRAS*和*ERBB3*突变最为显著(FDR<0.05,通过MutSigCV软件计算)。*TP53*作为最为重要的抑癌基因,其在胆囊癌病人中的突变频率为47.1%,这一数据与之前研究报道胆囊癌*TP53*的突变频率在50%以上相类似^[2,20-21]。有研究显示,在胆囊癌中存在*KRAS* 12或13位密码子的激活

型突变^[21]。与之相类似,我们的研究发现,在胆囊癌病人中存在7.8% *KRAS*突变,其均发生在为12或13位密码子上,该突变能够导致*KRAS*组成型激活,进而促进肿瘤细胞的生长和增殖。有趣的是,我们首次在胆囊癌组织中发现人表皮生长因子受体家族基因(epidermal growth factor receptor family)在胆囊癌中存在高频突变(*ERBB3*, 11.8%; *ERBB2*, 9.8%; *EGFR*, 3.9%; *ERBB4*, 3.9%),且这些基因在胆囊癌病人中存在突变互斥(mutual exclusion)现象(图1A和图1B)。研究已证实,ERBB受体酪氨酸激酶参与了多种肿瘤



A: 在57个胆囊癌病人中21个病人肿瘤组织中携带有ERBB信号通路基因的突变,且ERBB家族基因在病人中存在突变互斥现象; B: 胆囊癌中ERBB信号通路中关键基因及其突变频率; C: ERBB信号通路携带突变病人(n=21)总体生存期显著低于不存在突变病人(n=36)。

A: shown are the mutation status of genes of the ERBB pathway in the 21 gallbladder carcinoma (GBC) that carry at least 1 non-silent mutation. Mutations in the ERBB family are mutually exclusive; B: the key genes of the ERBB signaling pathway with mutation frequencies in GBC are shown; C: cases with mutations in the ERBB pathway (n=21) demonstrate worse overall survival than cases without mutations in the ERBB signaling pathway (n=36).

图1 胆囊癌ERBB信号通路的体细胞突变

Fig.1 Somatic mutations of the ERBB signaling pathway in GBC

发生发展过程,尤其是EGFR和ERBB2的过表达或激活现象存在于多种上皮性肿瘤中。有研究报道,在33%~64%的胆囊癌组织中存在*ERBB2*基因扩增或过度表达现象^[22-23]。此外,在小鼠转基因模型中,胆囊上皮组织特异性过度表达ERBB2可以导致小鼠胆囊癌的发生^[24]。而有关ERBB家族基因高频突变尚属首次,这一结果提示,ERBB信号通路的异常激活参与了胆囊癌的发生发展过程。需要指出的是,我们发现在ERBB家族基因中*ERBB3*突变频率最高,此前在胆囊癌中尚未发现该基因的遗传变异、过度表达或激活现象。ERBB3是ERBB家族的一个特殊的成员,该蛋白只能通过其胞外端与同家族其他受体(通常为ERBB2)结合形成异源二聚体才能激活胞内下游信号通路。研究中我们发现,5/6的*ERBB3*突变位点集中于其胞外端,其中4/5的突变发生在104密码子(V104)上,提示V104为胆囊癌组织中*ERBB3*基因的突变热点。我们进一步通过RNA干扰和点突变过表达技术评估了野生型和突变型ERBB3和ERBB2蛋白在细胞生长和侵袭转移过程中的作用,证实了ERBB2和ERBB3蛋白赋予了胆囊癌细胞生长和浸润能力,而来源于肿瘤病人的相应突变体能够进一步促进这一效果,这一结果提示,ERBB受体酪氨酸激酶在胆囊癌的发病和恶性进展中发挥重要功能,可能作为胆囊癌发生的重要驱动基因。

(3)ERBB信号通路突变与胆囊癌病人临床预后显著相关。我们进一步对胆囊癌突变基因进行了信号通路富集分析,发现ERBB信号通路在众多细胞信号转导通路中是突变最为显著的一个($FDR=9.2 \times 10^{-14}$)。研究发现,36.8%(21/57)的病人存在该信号通路基因的体细胞非沉默突变(non-silent somatic mutations)。在15个ERBB信号通路相关基因(*ERBB3*、*ERBB2*、*ERBB4*、*EGFR*、*KRAS*、*NRAS*、*HRAS*、*PIK3CA*、*BRAF*、*MAP2K4*、*MAPK10*、*SRC*、*MYC*、*NRG1*和*SOS2*)中,共发现了37个非沉默突变(图1A和图1B)。结合病人的临床病理特征和预后信息,我们发现,携带ERBB信号通路基因突变病人的术后总体生存期(overall survival)显著小于无ERBB信号通路突变病人(图1C)($P=0.012$,中位生存期分别为8个月和13个月)。通过多变量cox比例风险模型多重校正后,结果显示,肿瘤组织中携带ERBB信号通路突变的病人相对于未携带突变病人的死亡风险增加10倍($HR=10.4$, $P=0.001$),提示ERBB信号通路突变与胆囊癌病人临

床预后显著相关。

该研究揭示了胆囊癌相关的体细胞突变图谱和关键的致癌基因突变和信号通路,加深了我们对于胆囊癌发生发展的了解,为胆囊癌病人临床诊断和个体化治疗提供新指标和新靶点。由于ERBB受体及下游相关信号通路在多种肿瘤中异常激活,因此成为较为理想的抗癌药物靶标,多种ERBB受体或信号通路的靶向药物已进入临床使用或处于临床试验阶段^[25]。目前,有两大类ERBB抑制剂正在临床使用:一类是针对EGFR或ERBB2胞外端的人源化抗体,包括西妥昔单抗(Cetuximab)、曲妥珠单抗/赫赛汀(Trastuzumab/Herceptin)、帕妥珠单抗(Pertuzumab)等;另一类是针对受体酪氨酸激酶的小分子抑制剂,包括吉非替尼/易瑞沙(Gefitinib)、拉帕替尼(Lapatinib)、厄洛替尼(Erlotinib)等^[25]。后续研究需要在分子、细胞、动物和临床水平评估携带ERBB不同变异的胆囊癌细胞对于单独使用ERBB靶向药物或联合传统化疗药物使用的敏感性和治疗效果,进一步确定对于ERBB靶向治疗的敏感人群和相关标记物。同时需要尽快组织我国胆道疾病多中心、大样本、随机双盲、循证医学的研究,进而确定ERBB家族基因在中国人群胆囊癌病人中的表达、基因扩增或突变情况,通过开展深入的ERBB靶向临床干预试验明确疗效,为病人提供更好的诊治方案。

参考文献 (References)

- 1 Lazcano-Ponce EC, Miquel JF, Munoz N, Herrero R, Ferrecio C, Wistuba II, *et al.* Epidemiology and molecular pathology of gallbladder cancer. *CA Cancer J Clin* 2001; 51(6): 349-64.
- 2 Wistuba II, Gazdar AF. Gallbladder cancer: Lessons from a rare tumour. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(9): 695-706.
- 3 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127(12): 2893-917.
- 4 邹声泉. 胆囊癌发生发展机制的研究现状. 中国实用外科杂志 (Zou Shengquan. Research status of gallbladder carcinoma sicken mechanism. *Chinese Journal of Practical Surgery*) 2011; 31(3): 192-4.
- 5 张明迪, 龚伟, 郑莹, 张勇, 周迪, 吴春晓, 等. 上海市胆囊癌流行状况和趋势分析. 中国实用外科杂志 (Zhang Mingdi, Gong Wei, Zheng Ying, Zhang Yong, Zhou Di, Wu Chunxiao, *et al.* Prevalence and temporal trend of gallbladder cancer in Shanghai. *Chinese Journal of Practical Surgery*) 2013; 33(8): 691-4.
- 6 Misra S, Chaturvedi A, Misra NC, Sharma ID. Carcinoma of the gallbladder. *Lancet Oncol* 2003; 4(3): 167-76.
- 7 Maram ES, Ludwig J, Kurland LT, Brian DD. Carcinoma of the gallbladder and extrahepatic biliary ducts in Rochester, Minnesota, 1935-1971. *Am J Epidemiol* 1979; 109(2): 152-7.

- 8 Trevino F, Carter O. Gallstone size and the risk of gallbladder cancer. *JAMA* 1984; 251(23): 3080-1.
- 9 Srivastava K, Srivastava A, Sharma KL, Mittal B. Candidate gene studies in gallbladder cancer: A systematic review and meta-analysis. *Mutat Res* 2011; 728(1/2): 67-79.
- 10 Maurya SK, Tewari M, Mishra RR, Shukla HS. Genetic aberrations in gallbladder cancer. *Surg Oncol* 2012; 21(1): 37-43.
- 11 Nakazawa K, Dobashi Y, Suzuki S, Fujii H, Takeda Y, Ooi A. Amplification and overexpression of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, and c-met in biliary tract cancers. *J Pathol* 2005; 206(3): 356-65.
- 12 Harder J, Waiz O, Otto F, Geissler M, Olschewski M, Weinhold B, *et al.* EGFR and HER2 expression in advanced biliary tract cancer. *World J Gastroenterol* 2009; 15(36): 4511-7.
- 13 Leone F, Cavalloni G, Pignochino Y, Sarotto I, Ferraris R, Piacibello W, *et al.* Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in bile duct and gallbladder carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12(6): 1680-5.
- 14 Miyahara N, Shoda J, Ishige K, Kawamoto T, Ueda T, Taki R, *et al.* MUC4 interacts with ErbB2 in human gallbladder carcinoma: Potential pathobiological implications. *Eur J Cancer* 2008; 44(7): 1048-56.
- 15 Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, *et al.* Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 2011; 12(11): 745-55.
- 16 Veltman JA, Brunner HG. *De novo* mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet* 2012; 13(8): 565-75.
- 17 International Cancer Genome Consortium, Hudson TJ, Anderson W, Artez A, Barker AD, Bell C, *et al.* International network of cancer genome projects. *Nature* 2010; 464(7291): 993-8.
- 18 Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013; 500(7463): 415-21.
- 19 Roberts SA, Lawrence MS, Klimczak LJ, Grimm SA, Fargo D, Stojanov P, *et al.* An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nat Genet* 2013; 45(9): 970-6.
- 20 Fujii K, Yokozaki H, Yasui W, Kuniyasu H, Hirata M, Kajiyama G, *et al.* High frequency of p53 gene mutation in adenocarcinomas of the gallbladder. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5(6): 461-6.
- 21 Hanada K, Itoh M, Fujii K, Tsuchida A, Oishi H, Kajiyama G. K-ras and p53 mutations in stage I gallbladder carcinoma with an anomalous junction of the pancreaticobiliary duct. *Cancer* 1996; 77(3): 452-8.
- 22 Suzuki T, Takano Y, Kakita A, Okudaira M. An immunohistochemical and molecular biological study of c-erbB-2 amplification and prognostic relevance in gallbladder cancer. *Pathol Res Pract* 1993; 189(3): 283-92.
- 23 Kim YW, Huh SH, Park YK, Yoon TY, Lee SM, Hong SH. Expression of the c-erbB-2 and p53 protein in gallbladder carcinomas. *Oncol Rep* 2001; 8(5): 1127-32.
- 24 Kiguchi K, Carbajal S, Chan K, Beltran L, Ruffino L, Shen J, *et al.* Constitutive expression of ErbB-2 in gallbladder epithelium results in development of adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61(19): 6971-6.
- 25 Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(5): 341-54.