

高通量测序在乳腺癌及妇科恶性肿瘤筛查中的应用进展*

李 敏^{1,2}, 豆小文²综述, 张秀明^{2△}审校1. 安徽理工大学医学院, 安徽淮南 232000; 2. 深圳市罗湖区人民医院
医学检验科, 广东深圳 518001

关键词: 乳腺癌; 妇科恶性肿瘤; 高通量测序; 早期筛查

中图分类号: R73

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)05-0599-03

乳腺癌(BC)及妇科恶性肿瘤(如宫颈癌、输卵管肿瘤、子宫内膜癌和绒毛膜癌等)是遗传和获得性突变、转录偏差和表观遗传因素影响的基因组改变的结果^[1-6]。了解 BC 及妇科恶性肿瘤的基因组和分子基础对发现用于筛查和预防的生物标志物及开发更有效的药物靶点治疗策略至关重要。运用传统的 Sanger 测序技术(即第一代测序技术)分析实体肿瘤的遗传表征仅涉及小且单一的 DNA 片段分析,对于同时进行多个基因的测序是有限、耗时且昂贵的^[7]。高通量测序技术(NGS)又称“下一代”测序技术,允许在一次分析中同时对数千至数百万个 DNA 片段进行测序,从而扩大了所获取的遗传信息数量,减少了分析的时间和成本^[8]。在 BC 及妇科恶性肿瘤中,NGS 的使用在高风险遗传基因的识别等方面产生了重要的作用^[9],本文就 NGS 对 BC 及妇科恶性肿瘤的早期筛查和预防、诊断和治疗策略等方面的影响作一综述。

1 NGS 平台

目前,瑞士罗氏公司的 454 测序仪、美国 Illumina 公司的 Solexa 基因组分析仪和 ABI 公司的 SOLiD 测序仪为 NGS 平台的代表。

1.1 454 测序仪 454 测序仪运用焦磷酸测序方法即结合乳液聚合酶链反应和皮升级焦磷酸为基础方法,依靠生物发光进行基因测序。其原理是在 DNA 聚合酶、荧光素酶、腺苷三磷酸(ATP)硫酸化酶和双磷酸酶的协同作用下,将每一个脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)的聚合与一次荧光信号偶联起来,通过检测荧光信号的有无和强弱,进行实时检测 DNA 序列^[10-11]。454 焦磷酸测序技术不需要进行电泳,也不需要荧光标记的引物或核酸探针,具有灵敏度高、分析速度快和自动化等优点。

1.2 Solexa 基因组分析仪 Solexa 基因组分析仪运用单分子阵列,通过边合成边测序技术检测 DNA 序列。其原理是将已加入接头的 DNA 片段附着到含接头测序芯片表面,经过延伸和桥式扩增后,在芯片上形成了数以亿计的核苷酸片段,每组核苷酸片段是具

有数千份相同模板的单分子簇。通过检测带荧光基团的 4 种特殊 dNTP 加入到引物后释放出的焦磷酸盐信号来确定 DNA 序列^[12-13]。边合成边测序技术可减少因二级结构而造成的片段缺失,具有高通量、高灵敏度、自动化、操作简单等优点。

1.3 SOLiD 测序仪 SOLiD 测序仪运用寡核苷酸连接测序技术进行“双碱基”DNA 测序。其原理是在连接反应体系中,将 5' 端带有 4 种荧光染料(CY5、Texas Red、CY3、6-FAM)的 8 碱基探针混合物与目标 DNA 模板按碱基互补配对原则配对连接,通过发出的荧光信号检测 DNA 序列。另外,8 碱基 DNA 探针的 3' 端第 1、2 位构成的碱基对编码表达荧光染料基因,第 3~5 位是随机碱基,第 6~8 位为可以和任何碱基配对的特殊碱基^[14-15]。在反应过程中,SOLiD 测序仪记录第 1、2 位编码区荧光颜色信息,并用化学法去掉第 6~8 位碱基及荧光基团,依次循环组成原始颜色序列。SOLiD“双碱基”DNA 测序可用于判断检测位点是否为单核苷酸多态性,具有无可匹及的准确性、高通量、系统灵活、操作简单等优点。

2 NGS 筛查 BC 及妇科恶性肿瘤

目前,NGS 在 BC 及妇科恶性肿瘤的临床筛查方面应用较少,但其在发现药物治疗新靶点及耐药的分子机制方面具有重大意义,是临床研究的热点之一。

2.1 NGS 在 BC 中的应用 BC 病理组织形态较为复杂,分型分类众多。根据基因表达谱,BC 可分为腔型 A 型、腔型 B 型、人表皮生长因子受体 2(HER2)阳性型、基底细胞样型、未能分类型^[16-18];按免疫组化结果可分为雌激素受体(ER)/孕激素受体(PR)阳性、HER2 阳性和三阴性 BC(ER、PR、HER2 均阴性),大致对应的基因表达谱分型为:腔型 A 型和 B 型、HER2 阳性型、基底细胞样型。因此,可利用 NGS 对不同分型的 BC 患者进行基因测序,协助临床医生实现疾病的早筛、及时调整治疗方案。HAN 等^[19]研究表明,NGS 可检测包括乳腺癌 1 号基因(BRCA1)启动子区域缺失以及单核苷酸变异和小的

* 基金项目:广东省深圳市医学重点学科建设经费项目(SZJK054);广东省深圳市医疗卫生三名工程项目(SZSM201601062)。

△ 通信作者,E-mail:zxm0760@163.com。

本文引用格式:李敏,豆小文,张秀明.高通量测序在乳腺癌及妇科恶性肿瘤筛查中的应用进展[J].检验医学与临床,2022,19(5):599-

插入、缺失在内的大多数基因重排,并通过仔细评估患者的病史、RNA 测序和基因表达,证明了启动子区域缺失的重要性。BRCA1 启动子区域的缺失显著,可将其纳入遗传性乳腺癌-卵巢癌综合征患者的遗传筛查。NASSAR 等^[20]利用 NGS 检测 BC 体细胞基因突变,结果表明,除之前已报道的 TP53、PIK3CA、PTEN 等常见基因外,还发现了 KRAS、STK11、APC、JAK3 等其他基因的突变。可见,NGS 是评估 BC 癌基因和抑癌基因突变状态的一个非常有用的工具。

2.2 NGS 在宫颈癌中的应用 宫颈癌是发病率最高的妇科恶性肿瘤,其早期筛查以高危型人乳头瘤病毒(HPV)检测联合液基薄层细胞学检测(TCT)为主^[21-23]。携带高危型 HPV 但不罹患宫颈癌的女性也并非少数。对于宫颈癌患者来说,NGS 可获得其免疫治疗标志物信息;对于高危型 HPV 携带者来说,可预测病毒是否会持续感染、是否会进一步发展为宫颈癌。FERTEY 等^[24]利用 NGS 检测高危型 HPV16 L1 基因组中胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤位点(CpG)5962 的甲基化水平,证明该位点的甲基化可能是 HPV 持续感染的预测标志物,且特异性 CpG 的甲基化与高危病毒载量之间存在相关性。有研究利用 NGS 观察到显著的 APOBEC 基因突变模式,并证实了 SHKBP1、ERBB3、CASP8、HLA-A 和 TGFBR2 是宫颈癌新的显著突变基因^[2];在所有 HPV18 阳性患者和 76% 的 HPV16 阳性患者中发现 HPV 整合,可能与结构畸变和靶基因表达水平增高有关。上述有关甲基化检测以及 HPV 整合位点分析的研究有望对高危型 HPV 进一步分型,并揭示了宫颈癌新的潜在治疗靶点。

2.3 NGS 在卵巢癌中的应用 卵巢癌是病死率极高的一种疾病,在疾病早期患者通常无明显症状,在出现临床症状时病情往往已处于晚期阶段。约 70% 的卵巢癌为卵巢高级别浆液性腺癌,此类卵巢癌很少原发于卵巢,而大部分发源于输卵管^[25-27]。目前虽采用糖类抗原 125 检测联合盆腔超声对散发的卵巢癌进行筛查,但无法实现早期诊断。对于家族性的卵巢癌,通过基因检测可使患者在尚未发病时就预防性切除卵巢^[20]。此外,ZHENG 等^[28]运用 NGS 在化疗敏感和不敏感卵巢癌患者中鉴定出 249 个差异表达基因,这些与化疗敏感性相关的关键基因表达水平可以作为预测治疗结果和改善预后的靶点。

2.4 NGS 在子宫内膜癌中的应用 子宫内膜癌的筛查及诊断方法有血清学检测、影像学检查、组织病理学检测等,但高危子宫内膜癌患者多合并有肥胖,增加了活检的难度^[29-31]。随着分子生物学技术的发展,组织病理学检测与基因检测相结合的方式有望实现子宫内膜癌的临床早期筛查,并发现基因突变的子宫内膜癌患者。WILSON 等^[32]研究发现 ARID1A、PIK3CA 两种基因同时突变与子宫内膜癌的发生直接相关。SANGTANI 等^[33]收集从子宫内膜癌患者使用过的阴道卫生棉条上脱落的 DNA,采用低覆盖全基因组测序评估拷贝数、焦磷酸测序测量启动子甲

基化水平,通过 NGS 确定了 19 个与子宫内膜癌相关的基因突变,其灵敏度为 92%,特异度为 86%,为子宫内膜癌非侵袭性且精确的检测方法提供了依据。

2.5 NGS 在绒毛膜癌中的应用 相较于上述 3 种常见的妇科恶性肿瘤,绒毛膜癌发病率虽较低,但其预后不良,易通过血行转移至其他组织器官,导致患者死亡。并且其诊断方法仅为影像学检查、病理组织学检测等,无法实现早期无创筛查,因此,针对绒毛膜癌的基于 NGS 的基因突变研究逐渐开展起来。高达 20% 的完全性葡萄胎可发展为妊娠滋养细胞癌,其中就包括绒毛膜癌。目前尚无成熟的生物标志物能够预测妊娠滋养细胞癌的发展,LIN 等^[34]运用 NGS 检测绒毛膜癌细胞系(JEG-3 和 JAR)和正常胎盘细胞系(3A-subE)的微小 RNA(miRNA),检测结果显示 JEG-3 和 JAR 中 miR-181b-5p 和 miR-181d-5p 均有明显改变,并且均表达 BCL2 蛋白,提示 miR-181 家族成员和 BCL2 蛋白可能是预测妊娠滋养细胞癌变风险的生物标志物。

3 小 结

随着精准医疗的发展,女性恶性肿瘤的早期筛查成为临床亟待解决的问题之一。相对于传统的组织病理学检测、血清学检测、影像学检查等手段,NGS 有着较高的灵敏度和准确性。目前,NGS 检测的 DNA 标本可以来自子宫腔脱落细胞、宫颈管细胞涂片甚至是外周血等,以循环肿瘤 DNA 和甲基化的检测为发展方向,NGS 可实现 BC、宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌等女性恶性肿瘤的无创早筛。

参考文献

- [1] DEMICHELE A, YEE D, ESSERMAN L. Mechanisms of resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(23): 2287-2289.
- [2] TCGA. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer [J]. *Nature*, 2017, 543(7645): 378-384.
- [3] KANDOTH C, SCHULTZ N, CHERNIACK A D, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma [J]. *Nature*, 2013, 497(7447): 67-73.
- [4] GONZALEZ-MARTIN A, POTHURI B, VERGOTE I, et al. Niraparib in patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(25): 2391-2402.
- [5] PAGE D B, BEAR H, PRABHAKARAN S, et al. Two may be better than one: PD-1/PD-L1 blockade combination approaches in metastatic breast cancer [J]. *NPJ Breast Cancer*, 2019, 5(1): 34.
- [6] RAY-COQUARD I, PAUTIER P, PIGNATA S, et al. Olaparib plus bevacizumab as first-line maintenance in ovarian cancer [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(25): 2416-2428.
- [7] SANGER F, NICKLEN S, COULSON A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977, 74(12): 5463-5467.
- [8] MARDIS E R. Next-generation DNA sequencing methods

- [J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008, 9(1): 387-402.
- [9] LIU J, KONSTANTINOPOULOS P A, MATULONIS U A. Genomic testing and precision medicine- what does this mean for gynecologic oncology[J]. Gynecol Oncol, 2016, 140(1): 3-5.
- [10] MARGULIES M, EGHOLM M, ALTMANET W E, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors[J]. Nature, 2005, 437(7057): 376-380.
- [11] LEE C Y, YEN H Y, ZHONG A W, et al. Resolving misalignment interference for NGS-based clinical diagnostics[J]. Hum Genet, 2021, 140(3): 477-492.
- [12] LIU L, LI Y H, LI S L, et al. Comparison of next-generation sequencing systems[J]. J Biomed Biotechnol, 2012: 251364.
- [13] SCHMID B, HILDEBRANDT A. Deep learning in next-generation sequencing[J]. Drug Discov Today, 2021, 26(1): 173-180.
- [14] MARDIS E R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics[J]. Trends Genetics, 2008, 24(3): 133-141.
- [15] BEG S, BAREJA R, OHARA K, et al. Integration of whole-exome and anchored PCR-based next generation sequencing significantly increases detection of actionable alterations in precision oncology[J]. Transl Oncol, 2021, 14(1): 100944.
- [16] KAWAJI H, KUBO M, YAMASHITA N, et al. Comprehensive molecular profiling broadens treatment options for breast cancer patients[J]. Cancer Med, 2021, 10(2): 529-539.
- [17] SERVETTO A, NAPOLITANO F, ANGELIS C D, et al. A review of the use of next generation sequencing methodologies to identify biomarkers of resistance to CDK4/6 inhibitors in ER+/HER2- breast cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2020, 157: 103191.
- [18] PREOBRAZHENSKAYA E V, SHLEYKINA A U, GO RUSTOVICH O A, et al. Frequency and molecular characteristics of PALB2-associated cancers in Russian patients[J]. Int J Cancer, 2021, 148(1): 203-210.
- [19] HAN E, YOO J, CHAE H, et al. Detection of BRCA1/2 large genomic rearrangement including BRCA1 promoter-region deletions using next-generation sequencing[J]. Clin Chim Acta, 2020, 505: 49-54.
- [20] NASSAR A, ABOUELHODA M, MANSOUR O, et al. Targeted next generation sequencing identifies somatic mutations in a cohort of Egyptian breast cancer patients[J]. J Adv Res, 2020, 24: 149-157.
- [21] KAMAL M, LAMEIRAS S, DELOGER M, et al. Human papilloma virus (HPV) integration signature in cervical cancer; identification of MACROD2 gene as HPV hot spot integration site[J]. Br J Cancer, 2021, 124(4): 777-785.
- [22] SEN P, GHOSAL S, HAZRA R, et al. Transcriptomic analyses of gene expression by CRISPR knockout of miR-214 in cervical cancer cells[J]. Genomics, 2020, 112(2): 1490-1499.
- [23] LATSUZBAIA A, WIENECKE-BALDACCHINO A, TAPP J, et al. Characterization and diversity of 243 complete human papillomavirus genomes in cervical swabs using next generation sequencing[J]. Viruses, 2020, 12(12): 1437.
- [24] FERTEY J, HAGMANN J, RUSCHEWEYH H J, et al. Methylation of CpG 5962 in L1 of the human papilloma-virus 16 genome as a potential predictive marker for viral persistence: a prospective large cohort study using cervical swab samples[J]. Cancer Med, 2020, 9(3): 1058-1068.
- [25] LEPKES L, KAYALI M, BLUMCKE B, et al. Performance of in silico prediction tools for the detection of germline copy number variations in cancer predisposition genes in 4 208 female index patients with familial breast and ovarian cancer[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(1): 118.
- [26] HEINZE K, HOLZER M, UNGELENK M, et al. RUNX3 transcript variants have distinct roles in ovarian carcinoma and differently influence platinum sensitivity and angiogenesis[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(3): 476.
- [27] BOUSSIOS S, MIKROPOULOS C, SAMARTZIS E, et al. Wise management of ovarian cancer: on the cutting edge[J]. J Pers Med, 2020, 10(2): 41.
- [28] ZHENG H, ZHANG M Q, MA S, et al. Identification of the key genes associated with chemotherapy sensitivity in ovarian cancer patients[J]. Cancer Med, 2020, 9(14): 5200-5209.
- [29] HENSLEY M L, CHAVAN S S, SOLIT D B, et al. Genomic landscape of uterine sarcomas defined through prospective clinical sequencing[J]. Clin Cancer Res, 2020, 26(14): 3881-3888.
- [30] MAYO-DE-LAS-CASAS C, VELASCO A, SANCHEZ D, et al. Detection of somatic mutations in peritoneal lavages and plasma of endometrial cancer patients; a proof-of-concept study[J]. Int J Cancer, 2020, 147(1): 277-284.
- [31] RYAN AJ N, DAVISON N J, PAYNE K, et al. A micro-costing study of screening for lynch syndrome-associated pathogenic variants in an unselected endometrial cancer population; cheap as NGS chips[J]. Front Oncol, 2019, 9: 61.
- [32] WILSON M R, RESKE J J, HOLLADAY J, et al. ARID1A and PI3-Kinase pathway mutations in the endometrium drive epithelial transdifferentiation and collective invasion[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3554.
- [33] SANGTANI A, WANG C, WEAVER A, et al. Combining copy number, methylation markers, and mutations as a panel for endometrial cancer detection via intravaginal tampon collection[J]. Gynecologic Oncology, 2020, 156(2): 387-392.
- [34] LIN L H, MAESTÁ I, ST LAURENT J D, et al. Distinct microRNA profiles for complete hydatidiform moles at risk of malignant progression[J]. Am J Obstet Gynecol, 2020, 224(4): 372. e1-372. e30.