

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.10.012

· 综述 ·

结直肠癌分子分型的研究进展

Advances in molecular subtypes of colorectal cancer

岳源¹综述;李西川¹,张春泽²审阅(1.天津师范大学生命科学学院天津市动植物抗性重点实验室,天津300387;2.天津市人民医院肛肠外科,天津300121)

[摘要] 结直肠癌(CRC)分子分型的方法与研究进展主要从基因组学、转录组学和蛋白质组学3个方面展开。依据基因突变和基因组的细胞遗传学改变进行分型,可以将CRC分为错配修复缺陷导致微卫星不稳定的超突变肿瘤、具有DNA聚合酶epsilon或Delta 1核酸外切酶结构域突变的超突变肿瘤、具有高频率DNA体细胞拷贝数改变的染色体不稳定性肿瘤等。基于肿瘤的上皮间质转化、错配修复基因缺陷导致的微卫星不稳定性及细胞增殖相关的高突变频率,可分为MMR缺陷型上皮亚型(A型)、增殖性上皮亚型(B型)和间充质亚型(C型)。根据基因表达谱的差异分型,可基于临床和组织病理学参数及基因特征、CRC基因表达谱、全基因组mRNA表达亚型、对表皮生长因子受体靶向药物西妥昔单抗的治疗反应、共识分子等进行CRC亚型分类。基于生物标志物研究的蛋白质组学分型,可分为亚型A—E等5种不同蛋白质组学亚型。分子分型有助于CRC个体化和精确化的治疗策略。

[关键词] 结直肠癌;分子分型;肿瘤异质性

[中图分类号] R730.54;R735.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2021)10-1037-04

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的消化道恶性肿瘤。根据世界卫生组织2020年发布的数据,结直肠癌是第三大常见癌症,确诊人数超过1 930 000例,同时也是癌症相关死亡的第二大原因,2020年全球病死830 000例^[1]。CRC是高度异质性疾病,临床上病理相似的肿瘤在治疗反应和患者生存率方面存在显著差异^[2],病理分型对CRC的生物治疗疗效至关重要,而传统的CRC分类不能完全体现肿瘤异质性,不能适应现代肿瘤治疗的需要。

1999年美国国家癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)提出肿瘤分子分型(molecular classification)的概念,即通过综合的分子分析技术,使肿瘤的分类由形态学转向分子特征的分类^[3]。之后,随着分子水平机制的深入研究和测序技术的进步,拓展了肿瘤分子分型方法,从依赖单一或少数标志物检测进入到谱学分型阶段,使得更多的学者们尝试对CRC进行分子分型。但目前CRC分子分型还未形成统一标准,基于此,本文对近年来CRC分子分型的方法与进展从基因组学、转录组学和蛋白质组学3个方面进行综述。

1 依据基因突变和基因组的细胞遗传学改变进行分型

CRC是癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)中检查的众多肿瘤类型之一^[4]。CRC的发生涉及多基因、多阶段,由诸多因素相互作用所致。其主要发生途径为:染色体不稳定途径

(chromosome instability, CIN)、微卫星不稳定途径(microsatellite instability, MSI)、CpG岛甲基化表型途径(CpG island methylator phenotype, CIMP)和锯齿状途径^[5]。

TCGA给出了276个CRC样本中的多组数据,包括外显子组序列、DNA拷贝数、启动子甲基化、信使RNA(mRNA)和微小RNA(microRNA)表达^[6],将大肠癌分子分型分为3类:第1类(约13%)是由于错配修复缺陷(different Mismatch Repair, dMMR)通过启动子高甲基化使肿瘤抑制基因MLH1沉默而导致微卫星不稳定的超突变肿瘤,这种超突变表型是由于dMMR途径未能识别和修复DNA错配或插入/缺

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81872236);国家重点研发计划资助项目(No.2017YFC1700606);天津市科技支撑重点研发计划资助项目(No.19YFZCSY00420);大学生创新创业训练计划资助项目(No.201910065043)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81872236), National Key R&D Program of China (No.2017YFC1700606), the Key Projects of Tianjin Science and Technology Support Plan (No.19YFZCSY00420), and the College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (No.201910065043)

[作者简介] 岳源(1997—),女,硕士生,主要从事肿瘤细胞生物学的基础研究,E-mail:2110170055@stu.tjnu.edu.cn

[通信作者] 李西川(LI Xichuan, corresponding author),教授,博士生导师,主要从事肿瘤细胞生物学的基础研究,E-mail:xichuanli@tjnu.edu.cn;张春泽(ZHANG Chunze, co-corresponding author),主任医师,硕士生导师,主要从事结直肠癌的诊疗与发病机制研究,E-mail:chunze.zhang@nankai.edu.cn

失而导致的,其中80%~90%的散发性高变异性癌症具有(或类似)BRAF^{V600E}突变;第2类(约3%)超突变肿瘤具有DNA聚合酶epsilon或Delta 1(POLE或POLD1)核酸外切酶结构域(校对)突变(exonuclease domain mutations, EDM),这种超突变表型是由于功能异常的酶在DNA复制过程中引入了错误的核苷酸导致的;第3类(约84%)染色体不稳定性肿瘤具有高频率的DNA体细胞拷贝数改变(SCNA),低突变率(<8 Mb),微卫星稳定性(microsatellite stable, MSS)和通常由抑癌基因APC突变引起的Wnt信号通路异常。

随后,ROEPMAN等^[7]对来自188个I—IV期CRC患者的全基因组数据进行无监督分类,基于肿瘤的3个生物学特征——上皮-间质转化、错配修复基因缺陷导致的微卫星不稳定性 and 细胞增殖相关的高突变频率,揭示了3种固有的CRC分子亚型:MMR缺陷型上皮亚型(A型)、增殖性上皮亚型(B型)和间充质亚型(C型)。A型肿瘤(约22%)是上皮样的,经常发生BRAF突变和缺陷的DNA错配修复系统,患者预后良好。B型肿瘤(约62%)表现出强烈的上皮表型,其患者几乎是MSS、BRAF野生型和错配修复基因完整(proficient mismatch repair, pMMR),患者预后相对较差,但他们从辅助化疗中获益最为显著。C型肿瘤(约16%)是间充质基因表达表型,经历了上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)并显示出dMMR特征,患者预后较差,并且没有从辅助治疗中获益。同时,LAI等^[8]提出了一种称为协调免疫应答簇(the co-ordinate immune response cluster, CIRC)的免疫标记,并通过这种方法确定了4个患者组。A组患者表现出强烈的CIRC表达,并且微卫星不稳定性-高(MSI-H)和POLE突变较为丰富。相反,B、C、D组CIRC表达较低,但RAS突变更为丰富。RAS突变对肿瘤的免疫有显著影响,预示相对较差的免疫浸润和低抑制性分子表达。ZHANG等^[9]根据细胞周期相关基因鉴定了2种分子亚型,分别命名为“C1”和“C2”。C1中PIK3CA、RYR2和FBXW7的突变更频繁,患者临床特征和预后相对较差;C2中SYNE1、PCLO和MUC16的突变更频繁。

虽然上述分子特征为CRC的发生和发展提供了实质性的见解,但以突变为中心的分类策略与患者接受特定治疗干预的预后无关。因此,需要一种更系统、更公正的方法来克服基于突变分类的局限性,以便更好地对CRC患者进行分型。

2 根据基因表达谱的差异分型

过去十年中出现的新证据表明,肿瘤内异质性最好在转录组水平上捕获,因为它提供了疾病过程

更全面的分子图谱,癌症亚型的范式逐渐从以突变为中心的方法转变为基于转录组的方法^[10]。

2.1 基于临床和组织病理学参数以及基因特征分型

BUDINSKA等^[11]对1113个CRC基因表达谱的CRC异质性进行了分析,鉴定了CRC基因表达亚型,包括表面隐窝样(亚型A)、下隐窝样(亚型B)、CIMP-H样(亚型C)、间质样(亚型D)和混合样(亚型E)。

SCHLICKER等^[12]根据全基因组mRNA表达亚型与药理学数据的细胞系匹配,揭示了5种CRC亚型:亚型1以EMT相关通路激活为特征,其中亚型1.1中上调的基因与钙信号、MAPK和TGF- β 通路有关,亚型1.2具有免疫系统相关通路上调的特征,亚型1.3具有高表达转运蛋白基因的间充质;亚型2以上皮相关基因上调为特征,其中亚型2.1具有上调的免疫系统相关基因和应激反应基因,亚型2.2以细胞周期和氨基酸合成上调为特征。

有研究使用基于共识的无监督聚类,分析了1290个CRC肿瘤的基因表达谱,再与80名患者对表皮生长因子受体靶向药物西妥昔单抗的治疗反应数据相关联,定义了6种临床相关的CRC亚型^[13]。在这些亚型中,丝蛋白A表达模式对西妥昔单抗无效,但基于cMET亚型,有人提出受体酪氨酸激酶抑制剂具有潜在疗效^[13]。

有研究使用涉及1100多名结肠癌患者的无监督分类策略,可以识别3种主要的不同分子亚型(colon cancer subtypes, CCS)^[14],其中CCS1对应CIN亚型,CCS2对应MSI亚型,而CCS3在很大程度上是微卫星稳定的,并且包含相对更多的CpG岛甲基化子表型阳性癌,无法根据特征突变进行鉴定。

有研究通过基因表达谱的无监督分析揭示了结肠癌的6种亚型:C1(21%)、C2(19%)、C3(13%)、C4(10%)、C5(27%)和C6(10%)^[15]。该研究假设这些亚型是通过不同的生物学途径产生的,C2、C3、C4和C6的CRC可能来自锯齿状瘤形成途径,而C1和C5癌症亚型主要通过常规腺瘤发展。

另一项研究应用分级聚类方法确定了具有生物学和临床不同行为的4种肿瘤亚型:基质成分、核 β -连环蛋白、黏液组织学、微卫星不稳定性 and BRAF突变^[16]。

2.2 共识分子亚型

上述早期的分类都将失配修复缺陷型肿瘤确定为独特的亚型,除此之外,它们之间存在很大差异,没有获得一致的分类方案。为了解决这些矛盾,2015年国际结直肠癌分型协作组(the CRC subtyping consortium, CRCSC)在分析了18个不同的CRC基因表达数据集后^[17],建立了4种CRC分子特

征共识分型(consensus molecular subgroups, CMS),将CRC分为具有不同肿瘤生物学的4种亚型:CMS1(错配修复缺陷/免疫型)、CMS2(规范型)、CMS3(代谢型)和CMS4(间质型)。目前认为CMS分型是最具说服力的结直肠癌分型法,并有众多学者在此基础上进行CRC靶向治疗研究^[18]。

CMS1以免疫细胞浸润肿瘤微环境为主要特征,特点是MSI、CIMP高突变、BRAF突变、免疫浸润和复发后生存较差。常见的弥漫性浸润免疫细胞主要为Th1细胞、细胞毒T细胞和NK细胞等,且CTLA4、PD1、PDL1等免疫检测点分子高表达,具有高免疫原性,因此此类患者总生存和无进展生存较好,也是免疫检测点药物治疗的适宜人群^[19]。

CMS2符合经典的CRC“腺瘤-腺癌”模型,特点是SCNA高和Wnt信号通路和MYC信号通路激活。Wnt信号通路对胚胎发育过程起重要作用,可维持肠干细胞的分化和稳态^[20],Wnt信号通路的突变或异常激活与消化系统肿瘤的发生密切相关。与其他亚型相比,CMS2患者在复发后具有更高的生存率。

CMS3是4种结直肠癌分子亚型中唯一存在KRAS基因高频突变的亚型,特点是混合MSI状态、SCNA低、CIMP低、KRAS突变和代谢失调。在通路水平上,此型最突出的特征是代谢重编程,包括激活谷氨酰胺分解和脂质生成^[21]。KRAS基因是《NCCN结直肠癌临床实践指南》中少有的对治疗有指导意义的基因,在临床实践中,KRAS基因突变预示着预后较差以及靶向药物西妥昔单抗治疗无效^[22]。

CMS4的特点是SCNA高、基质浸润、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)激活、血管生成、患者无复发生存率和总生存率较差。与其他亚型相比,CMS4中gremlin1(GREM1)表达更显著,GREM1与肿瘤微环境中与癌症相关的成纤维细胞水平相关^[23],因此其组织学特征是强烈的促纤维增生性反应^[24]。

在所有CRC病例中有13%无法分类,导致第5亚型没有明确的分子特征。

CMS分类系统为目前研究者对CRC的致癌作用、癌症进展和耐药性的理解提供了参考,但是CMS分类有一些局限性。在目前的临床实践中,突变状态是选择化疗药物的一个重要因素,然而CMS是基于肿瘤中的基因表达而开发的,与突变状态无关^[25]。这限制了CMS分型更广泛的使用。

3 基于生物标志物研究的蛋白质组学分型

CRC在蛋白质组学水平上也是异质性的。蛋白质组学技术的最新进展是通过评估基因及其编码蛋

白在癌性和非癌性周围组织和体液中的表达谱,促进了目前研究者对CRC发病机制的分子理解。近年来,寻找蛋白质生物标志物变得越来越重要,通过鉴定CRC发展的特征蛋白质可以找到潜在的生物标志物,这将有助于CRC的早期检测。

2014年,临床蛋白质组学肿瘤分析联盟(Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium, CPTAC)^[26]确定的5种不同蛋白质组学亚型:亚型A—E。其中,亚型B和C均显示出与TCGA MSI/CIMP亚型的显著重叠。此外,亚型B和亚型C与DE SOUSA等^[14]的CCS2和CCS3亚型有显著重叠。

随后,WANG等^[27]在CPTAC的基础上进行了全面的综合蛋白质基因组学分析,发现这些蛋白质组学亚型可以在CRC细胞系蛋白质组中重现,并且与基因组和转录组学谱相比,可以更好地预测药物敏感性。

各种蛋白质组学研究已经被用于分析参与代谢、蛋白质折叠和信号通路的蛋白质,以回答CRC的各种生物学问题。然而,虽然已经描述了大量蛋白质组学生物标志物,但它们通常没有在医疗实践中实施^[28]。这与生物标志物经常相互作用有关,因此需要加强综合分子分析^[29]。

4 展 望

近年来,结直肠癌分子分型的研究取得了一定成效,有力补充了结直肠癌的临床病理分类^[30]。大多数已发表的关于CRC分子亚型的研究都是基于单组学数据的无监督分类,尤其是对于转录组数据。然而,CRC分子异质性在遗传和表观遗传水平上都存在,仅在转录组水平上可能无法完全捕获,需要有效整合多组学数据进行分类。但是,目前CRC分型系统受技术方法、数据分析甚至是高昂的费用的限制,未能大范围应用于临床,因此可能在相当长的一段时间内仍需以严格的解剖学和病理学分期诊断指导临床决策。未来,相信随着对结直肠癌分子癌变基础的进一步解析,结直肠癌的传统诊疗模式会被改变,从而为患者提供个性化治疗方案。

[参 考 文 献]

- [1] SUNG H, FERLAY, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] BAE J M, KIM J H, KANG G H. Molecular subtypes of colorectal cancer and their clinicopathologic features, with an emphasis on the serrated neoplasia pathway[J]. Arch Pathol Lab Med, 2016, 140(5): 406-412. DOI: 10.5858/arpa.2015-0310-RA.

- [3] NIH. Director's challenge: toward a molecular classification of tumors [J/OL]. 1999 [2021-06-23]. <http://grants.nih.gov/grants/guide/rfa-files/RFA-CA-98-027.html>.
- [4] PANKAJ A, RAVINDRA K, GAGANDEEP K G. The clinical relevance of gene expression based prognostic signatures in colorectal cancer[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1875(2):188513. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188513.
- [5] 陈慧. 结直肠癌发生机制研究进展[J]. *胃肠病学*, 2013, 18(3): 188-190. DOI: 10.3969/j.issn.1008-7125.2013.03.016.
- [6] Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer[J]. *Nature*, 2012, 487: 330-337. DOI: 10.1038/nature11252.
- [7] ROEPMAN P, SCHLICKER A, TABERNEO J, et al. Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(3): 552-562. DOI: 10.1002/ijc.28387.
- [8] LAL N, BEGGS A D, WILLCOX B E, et al. An immunogenomic stratification of colorectal cancer: Implications for development of targeted immunotherapy[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2015, 4(3): e976052 [2021-04-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25949894/>. DOI: 10.4161/2162402X.2014.976052.
- [9] ZHANG Z, JI M, LI J, et al. Molecular classification based on prognostic and cell cycle-associated genes in patients with colon cancer[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 636591. DOI: 10.3389/fonc.2021.636591.
- [10] WANG W, KANDIMALLA R, HUANG H, et al. Molecular subtyping of colorectal cancer: Recent progress, new challenges and emerging opportunities[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 55: 37-52. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.05.002.
- [11] BUDINSKA E, POPOVICI V, TEJPAR S, et al. Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer[J]. *J Pathol*, 2013, 31: 63-76. DOI: 10.1002/path.4212.
- [12] SCHLICKER A, BERAN G, CHRESTA C M, et al. Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines[J]. *BMC Med Genom*, 2012, 5: 66. DOI: 10.1186/1755-8794-5-66.
- [13] SADANANDAM A, LYSSIIOTIS C A, HOMICKSKO K, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy[J]. *Med*, 2013, 19: 619-625. DOI: 10.1038/nm.3175.
- [14] DE SOUSA E MELO F, WANG X, JANSEN M, et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions[J]. *Nat Med*, 2013, 19:614-618. DOI: 10.1038/nm.3174.
- [15] MARISA L, DE REYNIES A, DUVAL A, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: Characterization, validation, and prognostic value[J/OL]. *PLoS Med*, 2013, 10: e1001453 [2021-04-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23700391/>. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001453.
- [16] PEREZ-VILLAMIL B, ROMERA-LOPEZ A, HERNANDEZ-PRIETO S, et al. Colon cancer molecular subtypes identified by expression profiling and associated to stroma, mucinous type and different clinical behavior[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 260. DOI: 10.1186/1471-2407-12-260.
- [17] GUINNEY J, DIENSTMANN R, WANG X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer[J]. *Nat Med*, 2015, 21: 1350-1356. DOI: 10.1038/nm.3967.
- [18] 潘伟瑜, 姚俊霞, 侯英勇. 结直肠癌分子分型及分子标志物的研究进展[J]. *中国临床医学*, 2019, 26(1):111-116. DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20180455.
- [19] 孙玉琳, 赵晓航. 结直肠癌的分子分型及精准医学时代展望[J]. *中华结直肠疾病电子杂志*, 2018, 7(5):412-419. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-3224.2018.05.003.
- [20] PINTO D, CLEVERS H. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 306(2): 357-363. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.02.022
- [21] DIENSTMANN R, VERMEULEN L, GUINNEY J, et al. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17: 79-92. DOI: 10.1038/nrc.2016.126.
- [22] 闫兆鹏, 苏琪. 结直肠癌分子亚型共识简介及各亚型特征分析[J]. *医学综述*, 2019, 25(14):2726-2730. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2019.14.005.
- [23] DUTTON L R, HOARE O P, MCCORRY A M B, et al. Fibroblast-derived Gremlin1 localises to epithelial cells at the base of the intestinal crypt[J]. *Oncotarget*, 2019, 10(45): 4630-4639. DOI: 10.18632/oncotarget.27050.
- [24] QIAN Y Q, DAZA J, ITZEL T, et al. Prognostic cancer gene expression signatures: current status and challenges[J]. *Cells*, 2021, 10(3): 648. DOI: 10.3390/cells10030648.
- [25] SAWAYAMA H, MIYAMOTO Y, OGAWA K, et al. Investigation of colorectal cancer in accordance with consensus molecular subtype classification[J]. *Ann Gastroenterol Surg*, 2020, 4(5): 528-539. DOI: 10.1002/ags3.12362.
- [26] ZHANG B, WANG J, WANG X, et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer[J]. *Nature*, 2014, 513: 382-387. DOI: 10.1038/nature13438.
- [27] WANG J, MOURADOV D, WANG X, et al. Colorectal cancer cell line proteomes are representative of primary tumors and predict drug sensitivity[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(4): 1082-1095. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.06.008.
- [28] MISCHAK H, IOANNIDIS J P, ARGILES A, et al. Implementation of proteomic biomarkers: making it work[J]. *Eur J Clin Invest*, 2012, 42(9): 1027-1036. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2012.02674.x.
- [29] SVEEN A, KOPETZ S, LOTHE R A. Biomarker-guided therapy for colorectal cancer: strength in complexity[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(1): 11-32. DOI: 10.1038/s41571-019-0241-1.
- [30] 周钊, 牛洪欣. 结直肠癌分子分型及其临床意义[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(6): 430-436. DOI: 10.3969/j.issn.1674-6929.2017.06.014.

[收稿日期] 2021-02-09

[修回日期] 2021-07-08

[本文编辑] 韩丹