

胆囊癌相关基础研究进展

宋虎伟 慎浩鑫 陈晨 王林 耿智敏

【提要】 胆囊癌是胆道系统最常见的恶性肿瘤。其发现和患者就诊一般较晚,手术切除率低,疗效较差。加强胆囊癌基础研究以期改善胆囊癌的诊断和治疗非常必要。本文从胆囊癌发生、发展相关基因,胆囊癌淋巴转移机制,胆囊癌肿瘤微环境三个方面就近年来胆囊癌相关基础研究进展作一综述。

【关键词】 胆囊癌; 基因; 淋巴转移; 肿瘤微环境

Gallbladder cancer: a comprehensive review on basic research Song Huwei, Shen Haoxin, Chen Chen, Wang Lin, Geng Zhimin. Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, College of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710006, China

Corresponding author: Geng Zhimin, Email: gengzhimin@mail.xjtu.edu.cn

【Abstract】 Gallbladder cancer (GBC) is the most common malignancy of the biliary tract. Most patients are diagnosed at the advanced stage, missing the optimal chance for curative surgery, thus leading to the fact that GBC is usually associated with poor prognosis. It is very crucial to strengthen the basic research on GBC, which may further improve the diagnosis and treatment. The research updates on the related genes in the initiation and progression, molecular mechanism of lymphatic metastasis, and tumor microenvironment of GBC in recent years were reviewed in this paper.

【Key words】 Gallbladder cancer; Gene; Lymphatic metastasis; Tumor microenvironment

胆囊癌是最常见的胆道恶性肿瘤,其发病率在消化道肿瘤中居第 5 位。目前手术切除仍是治疗胆囊癌唯一有效的手段。但由于胆囊癌早期无特异性临床表现,患者确诊时多已至晚期,仅有 10% 的患者有手术机会^[1]。手术疗效也不甚理想,术后 5 年生存率不到 5%^[2]。近年来,我国胆囊癌发病率有所上升^[3]。因此,加强胆囊癌基础研究以期改善胆囊癌的诊断和治疗非常必要。本文就近年来胆囊癌相关基础研究进展作一综述。

一、胆囊癌发生、发展相关基因

1. ErbB 基因: ErbB 基因家族是编码人表皮生长因子受体(human epidermal-growth-factor receptor, HER)的癌基因,

包括 EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 和 HER4/ErbB4 这 4 个成员。它们对细胞的增殖、分化和转移等具有重要的调控作用。ErbBs 基因突变在许多肿瘤的发生发展中起着重要作用。最近 Li 等^[4]运用全基因组外显子测序和靶基因深度测序技术研究中,发现 ErbB 信号通路突变在胆囊癌患者中较为显著(约占 36.8%),且与患者的不良预后相关(ErbB 突变组与无突变组相比,中位生存时间分别是 8 月和 13 月)。进一步研究证实了 ErbB 家族蛋白增强了胆囊癌细胞生长和浸润能力,提示 ErbB 信号通路在胆囊癌发生发展中发挥重要功能。最新关于吉西他滨加奥沙利铂与二者联合西妥昔单抗(EGFR 靶向抑制剂)比较的 II 期临床试验发现,后者没有改善胆囊癌的预后^[5]。在索拉非尼加埃罗替尼(EGFR 靶向抑制剂)的 II 期临床试验,治疗结果也不尽人意^[6]。但吉西他滨加奥沙利铂联合帕尼单抗(EGFR 靶向抑制剂)的 II 期临床试验则取得了令人鼓舞的结果^[7]。最新的这些临床试验所纳入的胆囊癌都是小样本,需要大样本的临床研究进一步评估 EGFR 靶向抑制剂在胆囊癌靶向治疗中的作用。

2. Bmi-1: Bmi-1 (B-cell specific moloney leukemia virus integration site 1) 是多梳基因家族成员中的重要原癌基因。其环指结构域和螺旋-转角-螺旋结构域在刺激细胞增殖、抑制蛋白表达方面具有重要作用。Bmi-1 基因在肿瘤形成中的作用已成为肿瘤基因的研究热点,现已证实其在多种肿瘤中的致瘤作用。魏东等^[8]用 RNA 干扰技术沉默胆囊癌细胞 Bmi-1 的表达,能有效抑制胆囊癌细胞增殖,使细胞周期阻滞于 G0/G1 期。Bmi-1 有望作为胆囊癌基因治疗的一个新的潜在靶点。

3. k-ras 基因: k-ras 是一种原癌基因,长约 35 kb,位于 12 号染色体,是 RAS 基因家族成员之一,编码 K-ras 蛋白。其与肿瘤的发生、增值、迁移、扩散以及血管生成均有关系。k-ras 基因突变率在胆囊癌患者中较高且与预后相关,尤其是 II、III 期胆囊癌患者^[9]。肿瘤细胞 PI3K/AKT 信号通路的活化对脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)的抑制非常敏感,而 k-ras 基因突变的肿瘤细胞在 FAS 抑制情况下仍能促进肿瘤细胞的增殖。最新有研究者发现,抑制 AKT 和 ERK 信号通路可以使 k-ras 基因突变的肿瘤细胞对 FAS 的抑制敏感^[10]。众所周知,k-ras 基因突变的肿瘤治疗困难,而该研究的发现为这类肿瘤患者带来希望,相关的胆囊癌或将从中受益。

4. HDGF: HDGF (hepatoma-derived growth factor) 是一种肝素结合的生长因子,具有广泛的生物学功能,包括促进有丝分裂和血管新生等,其在促进肿瘤细胞增殖,血管新生,侵袭,转移中具有重要的作用。HDGF 高表达与多种肿瘤患者

DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2015.08.017
基金项目:陕西省自然科学基金(2014JM4177),陕西省国际合作科技攻关项目(2014KW23-01)
作者单位:710061 西安,西安交通大学医学院第一附属医院肝胆外科
通信作者:耿智敏,电子信箱:gengzhimin@mail.xjtu.edu.cn

预后差相关。Li 等^[11]研究发现, HDGF 蛋白在胆囊癌细胞核中表达(63.6%)明显高于正常细胞(26.7%),而在细胞质中差异不大。此外,该研究组采用慢病毒介导的小干扰 RNA 转染至 GBC-SD 和 SGC996 胆囊癌细胞株中,从而沉默 HDGF 基因的表达,发现其细胞增殖、侵袭、转移能力下降。同时,胆囊癌细胞核 HDGF 高表达者预后相对较差。上述研究结果在 Feng 等^[12]对 40 例胆囊癌与慢性结石患者对照研究中得到证实。HDGF 将有可能成为胆囊癌治疗的潜在靶点。

5. DLC-1; DLC-1 (deleted in liver cancer 1, 肝癌缺失基因 1) 是近年来发现的一种重要的抑癌基因,位于人染色体 8p21.3-22 区。DLC-1 基因在肿瘤的发生、发展过程中常发生表达抑制、缺失或甲基化修饰改变。目前研究发现其在多种肿瘤的发生、发展过程中发挥了重要的作用。Qin 等^[13]发现,胆囊癌组织和胆囊癌细胞系中普遍存在 DLC1 蛋白下调,而修复 DLC1 的表达后可以减少肿瘤细胞增殖、转移,并降低这些细胞在体内实验中的成瘤能力。此外,恢复 DLC1 表达可以通过促进 Fas L/FADD、Bax 以及抑制 bcl-2 的表达来诱发外源性、内源性细胞凋亡。这表明 DLC1 异常表达在胆囊癌增殖、侵袭中发挥重要作用,有望成为胆囊癌治疗新的靶点。

6. FOX 转录因子家族:叉头框(forkhead box, FOX)蛋白家族是一类 DNA 结合区具有翼状螺旋结构的转录因子。其参与许多生物学行为,包括新陈代谢,细胞分化、增殖和细胞凋亡等,目前已有 19 个亚族^[14]。PI3K-Akt/PKB、TGF β -Smad 和 MAP Kinase 等多条信号通路都可以影响 FOX 蛋白的磷酸化水平,从而调节其活性。Qin 等^[15]研究发现,FOXLI 蛋白在胆囊癌细胞及细胞系中下调显著。其高表达与预后较好相关,而低表达则与高 TNM 分期及低分化相关。FOXLI 在 NOZ 细胞系中过表达明显抑制了细胞增殖、迁移和侵袭及裸鼠中的成瘤性。FOXLI 过表达可能破坏了线粒体跨膜电位,从而引起线粒体介导的细胞凋亡。而 Tao 等^[16]应用 RNA 干扰技术下调 FOXM1 显著抑制了胆囊癌细胞活性,细胞迁移、侵袭能力。两项研究说明了 FOX 蛋白家族在胆囊癌发生、发展中作用复杂,需要更深入的研究,以发掘其在胆囊癌靶向治疗中的可能性。

7. 端粒酶:端粒酶是一种核蛋白逆转录酶,由 RNA 模板和逆转录酶催化亚基组成,后者由端粒酶反转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)基因编码。端粒酶在保持端粒稳定、基因组完整、细胞长期的活性和潜在的继续增殖能力等方面有重要作用。它的活化是细胞永生化和肿瘤形成的关键步骤。恶性肿瘤细胞内端粒酶活性升高^[17]。其中端粒酶逆转录酶(TERT)转录水平上调是端粒酶激活的关键步骤。Qu 等^[18]在对 154 例胆囊癌组织样本进行 DNA 测序等研究发现胆囊癌组织中 TERT 启动子只发生低频突变。而在之前一项研究中发现,端粒酶阳性表达率会随着胆囊上皮异型增生程度的增加而增加^[19]。这说明端粒酶在胆囊癌的发生和发展过程中起重要的作用。

二、胆囊癌淋巴转移研究

淋巴转移在胆囊癌早期即发生,是胆囊癌转移的主要途径,对胆囊癌的治疗方式及患者预后具有重要意义。因此,

探索胆囊癌淋巴转移机制,研究针对淋巴转移治疗对胆囊癌治疗显得尤为重要。

1. 血管内皮生长因子(VEGF)C 和 D 及其受体:VEGF-C 和 VEGF-D 是 VEGF 家族重要的成员,与多种恶性肿瘤的淋巴管生成及淋巴转移密切相关。VEGF-C 和 VEGF-D 通过增加胆囊癌周淋巴管的密度促进肿瘤细胞的淋巴转移,是胆囊癌微淋巴管生成的重要调节因子^[20]。TNF- α 能够通过 NF- κ B 与 VEGF-C 启动子的结合上调胆囊癌中 VEGF-C 表达从而促进胆囊癌淋巴管新生^[21]。于裸鼠皮下种植用慢病毒转染沉默了 VEGF-D 的 GBC-NOZ 细胞,发现抑制了肿瘤生长及淋巴管新生,原位种植也得出相同的结论^[22]。VEGF 的生物学效应是通过存在于血管内皮细胞表面的特异性受体(VEGFR)介导而实现的。VEGFR 按其结构与功能的不同分为 VEGFR-1、VEGFR-2 和 VEGFR-3。最近 Chen 等^[23]发现两种多肽抑制 VEGFR-3 激酶活性及 VEGF-C 介导的肿瘤细胞侵袭能力,而且可以抵抗 VEGF-C 相关的药物抵抗和成瘤性,这项研究表明多肽类有可能在 VEGFR-3 靶向治疗中发挥作用。索拉菲尼是一种多分子靶向药物,其治疗靶点包括 VEGFR-2/3、PDGFR- β 、RAF 激酶等。其单药或联合吉西他滨和铂类治疗胆囊癌已进入 II 期临床试验^[24-25],而进一步研究 VEGFR 靶向药物也需大样本的临床研究。

2. D2-40; D2-40 是一种高选择性淋巴管内皮标记物,现已广泛运用于多种肿瘤淋巴转移研究。肿瘤细胞淋巴转移是通过原有淋巴管还是通过肿瘤新生淋巴管转移一直是个争议。张斌斌等^[26]以 D2-40 单克隆抗体应用组织微阵列、免疫组织化学技术检测了胆囊癌、癌旁组织和正常胆囊中微淋巴管密度的表达情况,发现癌周的微淋巴管密度明显高于癌中心和正常组织。提示癌周边区淋巴管的新生对胆囊癌淋巴转移可能具有重要作用。

三、重视胆囊癌肿瘤微环境研究

肿瘤微环境是肿瘤细胞赖以生存的复杂环境。由炎症细胞、内皮细胞、周细胞、肿瘤相关成纤维细胞等间质细胞及细胞外基质组成,在肿瘤的发生、发展过程中起重要的作用。传统的肿瘤靶向治疗以研究肿瘤细胞自身为基础。近年来对肿瘤微环境在肿瘤中重要作用的不断认识,使得肿瘤微环境成为肿瘤治疗新的靶点。间质纤维化反应是许多实体肿瘤的特征之一,而肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAF)是肿瘤间质细胞里最主要的成分,通过分泌多种细胞因子及生长因子促进肿瘤的侵袭、转移、血管新生、淋巴管新生^[27-28]。D2-40 表达阳性的 CAF 与多种肿瘤预后差相关^[29]。去除 CAF 在研究肝癌的小鼠模型发现抑制了肿瘤细胞的生长与转移^[30],而在另一个研究胰腺癌的小鼠模型却发现,去除 CAF 导致了免疫抑制并加速了肿瘤细胞的扩散以及减少生存时间^[31]。尽管去除 CAF 存在争议,但靶向 CAF 为肿瘤综合治疗提供了新思路^[32]。肝内胆管癌、胰腺癌、胃癌等实体肿瘤的 CAF 已在体外培养并做进一步的研究。胆囊癌也有明显的间质纤维化反应,但目前没有胆囊癌 CAF 的研究报道。因此,加强胆囊癌 CAF 的研究很有必要。肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophage, TAM)是肿瘤微环境里又一重要的成员,在肿瘤进程中也发挥重要作用^[33]。研究发现胆囊腺癌组织中均有一定数量的

TAM 浸润,明显高于慢性胆囊炎浸润数量,提示 TAM 与胆囊腺癌的进程密切相关^[34],但仍需进一步的研究。总之,目前对胆囊癌肿瘤微环境的研究还不够重视,我们应该加大这方面的研究,以期对胆囊癌治疗提供新的靶点。

四、展望

近几年胆囊癌发病率有所上升,但无较为理想的治疗手段。为此,国内外学者开展了越来越多关于胆囊癌发生、发展相关基因和蛋白分子及其机制的基础研究。研究发现了许多胆囊癌治疗的“靶点”,并已有相关药物进入临床试验。虽然试验结果并不令人满意^[35],但我们相信,随着分子生物学技术的发展以及研究的深入,胆囊癌治疗将会迎来新的曙光。

参 考 文 献

- [1] Zhu AX, Hong TS, Hezel AF, et al. Current management of gallbladder carcinoma[J]. *Oncologist*, 2010,15(2):168-181.
- [2] Mastoraki A, Papanikolaou IS, Konstandidou I, et al. Facing the challenge of treating gallbladder carcinoma[J]. *Hepatogastroenterology*, 2010,57(98):215-219.
- [3] 张明迪, 龚伟, 郑莹, 等. 上海市胆囊癌流行状况和趋势分析[J]. *中国实用外科杂志*, 2013,33(8):691-694.
- [4] Li M, Zhang Z, Li X, et al. Whole-exome and targeted gene sequencing of gallbladder carcinoma identifies recurrent mutations in the ErbB pathway[J]. *Nat Genet*, 2014,46(8):872-876.
- [5] Malka D, Cervera P, Foulon S, et al. Gemcitabine and oxaliplatin with or without cetuximab in advanced biliary-tract cancer (BINGO): a randomised, open-label, non-comparative phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2014,15(8):819-828.
- [6] El-Khoueiry AB, Rankin C, Siegel AB, et al. S0941: a phase 2 SWOG study of sorafenib and erlotinib in patients with advanced gallbladder carcinoma or cholangiocarcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2014,110(4):882-887.
- [7] Hezel AF, Noel MS, Allen JN, et al. Phase II study of gemcitabine, oxaliplatin in combination with panitumumab in KRAS wild-type unresectable or metastatic biliary tract and gallbladder cancer[J]. *Br J Cancer*, 2014,111(3):430-436.
- [8] 魏东, 邹浩, 王琳, 等. 靶向 miRNA 干扰 Bmi-1 表达对人胆囊癌增殖效应的影响[J]. *实用医学杂志*, 2014,30(5):697-702.
- [9] Kazmi HR, Chandra A, Nigam J, et al. Prognostic significance of K-ras codon 12 mutation in patients with resected gallbladder cancer[J]. *Dig Surg*, 2013,30(3):233-239.
- [10] Yellen P, Foster DA. Inhibition of fatty acid synthase induces pro-survival Akt and ERK signaling in K-Ras-driven cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2014,353(2):258-263.
- [11] Li M, Shen J, Wu X, et al. Downregulated expression of hepatoma-derived growth factor (HDGF) reduces gallbladder cancer cell proliferation and invasion[J]. *Med Oncol*, 2013,30(2):587.
- [12] Tao F, Ye MF, Sun AJ, et al. Prognostic significance of nuclear hepatoma-derived growth factor expression in gallbladder cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2014,20(28):9564-9569.
- [13] Qin Y, Chu B, Gong W, et al. Inhibitory effects of deleted in liver cancer 1 gene on gallbladder cancer growth through induction of cell cycle arrest and apoptosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014,29(5):964-972.
- [14] Lam EW, Brosens JJ, Gomes AR, et al. Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013,13(7):482-495.
- [15] Qin Y, Gong W, Zhang M, et al. Forkhead box L1 is frequently downregulated in gallbladder cancer and inhibits cell growth through apoptosis induction by mitochondrial dysfunction[J]. *PLoS One*, 2014,9(7):e102084.
- [16] Tao J, Xu XS, Song YZ, et al. Down-regulation of FoxM1 inhibits viability and invasion of gallbladder carcinoma cells, partially dependent on induction of cellular senescence[J]. *World J Gastroenterol*, 2014,20(28):9497-9505.
- [17] Vinagre J, Almeida A, Populo H, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers[J]. *Nat Commun*, 2013,4:2185.
- [18] Qu Y, Shi L, Wang D, et al. Low frequency of TERT promoter mutations in a large cohort of gallbladder and gastric cancers[J]. *Int J Cancer*, 2014,134(12):2993-2994.
- [19] Luzar B, Poljak M, Cor A, et al. Expression of human telomerase catalytic protein in gallbladder carcinogenesis[J]. *J Clin Pathol*, 2005,58(8):820-825.
- [20] 蒋雷, 陈燕凌, 余菲菲, 等. 胆囊癌组织中血管内皮细胞因子 C 和 D 的表达及淋巴管和血管生成的关系[J]. *中华肿瘤杂志*, 2010,32(3):190-195.
- [21] Du Q, Jiang L, Wang X, et al. Tumor necrosis factor-alpha promotes the lymphangiogenesis of gallbladder carcinoma through nuclear factor-kappaB-mediated upregulation of vascular endothelial growth factor-C[J]. *Cancer Sci*, 2014,105(10):1261-1271.
- [22] Lin W, Jiang L, Chen Y, et al. Vascular endothelial growth factor-D promotes growth, lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in gallbladder cancer[J]. *Cancer Lett*, 2012,314(2):127-136.
- [23] Chang YW, Su CM, Su YH, et al. Novel peptides suppress VEGFR-3 activity and antagonize VEGFR-3-mediated oncogenic effects[J]. *Oncotarget*, 2014,5(11):3823-3835.
- [24] El-Khoueiry AB, Rankin CJ, Ben-Josef E, et al. SWOG 0514: a phase II study of sorafenib in patients with unresectable or metastatic gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma[J]. *Invest New Drugs*, 2012,30(4):1646-1651.
- [25] Lee JK, Capanu M, O'Reilly EM, et al. A phase II study of gemcitabine and cisplatin plus sorafenib in patients with advanced biliary adenocarcinomas[J]. *Br J Cancer*, 2013,109(4):915-919.
- [26] 张斌斌, 陈义钢, 丁厚中. 胆囊癌组织中微淋巴管密度的检测意义[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2014,24(2):169-171.
- [27] Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression[J]. *Semi Cell Dev Biol*, 2010,21(1):19-25.
- [28] Zhang Y, Tang H, Cai J, et al. Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion[J]. *Cancer Lett*, 2011,303(1):47-55.
- [29] Pula B, Witkiewicz W, Dziegiel P, et al. Significance of podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts: a comprehensive review[J]. *Int J Oncol*, 2013,42(6):1849-1857.
- [30] Mertens JC, Fingas CD, Christensen JD, et al. Therapeutic effects of deleting cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2013,73(2):897-907.
- [31] Ozdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival[J]. *Cancer Cell*, 2014,25(6):719-734.
- [32] Meng W, Wu Y, He X, et al. A systems biology approach identifies effective tumor-stroma common targets for oral squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2014,74(8):2306-2315.
- [33] Giesiewicz M, Tang J, Yu JL, et al. Targeted delivery of proapoptotic peptides to tumor-associated macrophages improves survival[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013,110(40):15919-15924.
- [34] 蔡春琳, 周力学, 曾亮, 等. 趋化因子 MCP-1、MIP-1 α 的表达与 TAM 计数在胆囊癌中的临床病理意义[J]. *现代生物医学进展*, 2014,14(19):3706-3710.
- [35] 包万员, 余刚, 朱峰. 胆道系统肿瘤的化疗现状与进展[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2014,20(10):758-761.

(收稿日期:2015-04-07)