

肝门胆管癌的基因组学

周 健 综述, 罗 放 审校(重庆医科大学 400016)

【关键词】 肝门胆管癌; 基因组学; 癌基因; 抑癌基因

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.18.060

中图分类号:R735.7

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)18-2021-03

肝门胆管癌是指发生在肝门部的肝外恶性肿瘤,约占肝外胆管癌的 50%~75%。胆管癌的发病较少见,男女发病差异无统计学意义,50 岁以上多见,但国内外胆管肿瘤发病率近年来均有显著上升趋势。基因组学是指研究生物基因组及如何利用基因的一门学问。随着分子生物学技术及基因组学的发展^[1],有资料表明胆管癌的发生及发展伴随有一些基因和遗传学的改变,并且发现与胆管癌相关的肿瘤基因不断增多,常见的癌基因有 K-ras、c-myc、c-erbB-2、c-met、cox-2 和 fhit;抑癌基因有 bcl-2、p53、p16、Rb、DPC4、PTEN 基因、WWOX 基因、ras 及其配体基因等。现将主要基因研究现状作一简要概述。

1 抑癌基因

1.1 p53 基因 p53 基因位于染色体 17p13 上,野生型 p53 基因对细胞生长起负调节作用^[2],在体外实验中可抑制培养的转化细胞的生长及动物肿瘤形成;突变型 p53 对细胞转化和过度增生起促进作用。Wang 等^[3]发现,在胆管癌胆汁超浮游物中 p53 和 K-ras 突变率分别为 50.0% (15/30) 和 56.7% (17/30);在沉积物中两者突变率为 33.3% 和 43.3%,K-ras 和 p53 分子异常的联合检测阳性率为 80.0%;在细胞学诊断阴性的胆管癌中,p53 或 K-ras 突变检测阳性率为 80.0% (12/15)^[4]。张国梁等^[5]对 128 例胆管癌的评估发现,p53 基因产物异常表达在远段胆管癌明显高于近段胆管癌。国内资料显示胆管癌 P53 蛋白阳性表达率为 35.7%~47.6%,未分化胆管癌 P53 蛋白阳性率高于低分化和高分化腺癌;P53 阳性组平均生存期 10.2 个月,阴性组 34 个月。以上结果提示,P53 突变在胆管癌胆汁标本中的特异性是很高的且敏感性也相对较高;p53 蛋白与胆管癌的分化程度有关,可作为判断胆管癌预后的一项指标。

1.2 bcl-2 基因 bcl-2 基因是 1984 年首先在人类非霍奇金 B 淋巴瘤中发现的位于 18q21 染色体片段,其家族中有两类功能相反的基因,已鉴定的至少有 15 个^[6],一类是抑制细胞凋亡的基因,如 bd-2、bcl-xl、bd-w、bfl-1 等;另一类是促进细胞凋亡的基因,如 bax、bak、pok、bcl-xs 等,这两类基因产生的相应蛋白的比例决定了细胞在受到凋亡信号刺激时是否发生凋亡,这种比例的变化部分是由特定的蛋白间竞争性的二聚化作用决定的;其中 bcl-2 的生理功能不同于任何一个已知的癌基因,其表达不诱导细胞增生及转化,而且在缺少一些必要的生长因子条件下仍能保证细胞存活。该基因在许多正常组织都有分布,其相关蛋白主要位于线粒体内膜、核外膜、内质网等上,它必须先相关蛋白定位到线粒体后,才能通过抗氧化剂的作用或抑制氧自由基的产生,抑制细胞凋亡,参与组织自身稳定的调节作用^[7];同时,bcl-2 基因及其相关蛋白可抑制多种因素(如电离辐射、激素及热休克和多种化疗药物)诱导的细胞凋亡。该基因过度表达能防止或延迟由多种抗癌药物诱导的肿瘤细胞凋

亡,因而降低了化疗的疗效,相反,通过反义核酸技术降低细胞内的 bcl-2 基因表达水平可大大增加其对抗癌药物的诱导凋亡的敏感性^[8]。许多实验表明,胆管癌细胞中 bcl-2 表达水平是正常胆管上皮的 15 倍;在胆管癌细胞中有较高的阳性表达率。11 例胆管癌的标本中有 8 例阳性(72.7%),有报道 10 例胆管癌 bcl-2 阳性率竟然为 100%,这种表达与胆管癌组织学分级有关,高、中分化癌的表达明显高于低分化癌;并且研究发现 bd-2 在胆管癌发生过程中与突变型 P53 有关,可能是由于突变型 p53 下调 bcl-2 的表达,p53 基因突变使 DNA 不能有效修复,导致 bcl-2 过度表达,细胞凋亡受抑制,瘤细胞数目增多而形成恶性胆管肿瘤。由此可见,今后对 p53 基因与 bcl-2 基因进行联合检测和干预,在胆管癌的早期发现和基因治疗方面会有相当广泛的应用。

1.3 p16Ink4A 和 p15Ink4B 基因 两个基因均位于人染色体 9p21 区,均是细胞周期的负反馈调节因素。p16Ink4A 是细胞周期的调控蛋白,它抑制细胞色素 D 和细胞色素依赖的激酶 4 复合物的催化活性,从而阻断细胞由 G1 期进入 S 期,被认为是一个重要的肿瘤抑制基因^[9]。Yoshida 等对 25 例原发性胆管癌进行体细胞突变的检测,通过微卫星分析发现在胆管癌细胞系中 p16Ink4A 和 p15Ink4B 基因纯合子缺失;16/25 (64.0%)的胆管癌存在 p16Ink4A 基因的点突变,在胆囊癌和肝门部胆管癌的突变率分别为 80.0% (8/10) 和 62.5% (5/8);另外在 3 例肝内胆管癌中有 1 例、2 例胆管癌中有 1 例及 2 例壶腹癌中有 1 例显示了 p16Ink4A 突变,而 p15Ink4B 基因没有突变发生。p53 和 ras 基因点突变频率较 p16Ink4A 低得多等结果显示,p16Ink4A 基因突变及活性丧失在胆管癌的发病机制中有重要作用^[10]。

1.4 WWOX 基因 含 WW 域的氧化还原酶基因(WWOX)在多种肿瘤,尤其是消化道肿瘤和激素相关肿瘤中的启动和进展阶段起重要作用,作用机制是以 Tyr33 磷酸化的方式与 P53 协同诱导凋亡,是凋亡途径中的必须分子伴侣^[11]。如基因缺失或 Tyr33 未磷酸化,S 期末修复的 DNA 逃逸细胞周期“检查点”,启动实体细胞突变的进程。顾军等用 Real Time RT-PCR 法定量分析 WWOX mRNA 在胆管癌中的表达,发现正常胆管组织表达量基本恒定,胆管癌组织表达明显降低,说明 WWOX 基因的缺失与分化程度相关。用样本 mRNA 含量比正常均值降低 30% 作为判断基因的表达减低或缺失的标准,发现 14/21 例表达低于正常均值,其中 10 例表达含量减低大于 30%。研究结果证实 WWOX 基因在胆管癌中高频缺失,且缺失发生与组织分级显著相关,证明该基因的改变在胆管癌的分子发病中起一定的作用,可预测肿瘤的侵袭性。

1.5 PTEN 基因 PTEN 是 1997 年发现的一种新的肿瘤抑制基因,定位于 10q23.3 上^[12]。迄今已发现 PTEN 在多种肿

瘤如恶性胶质瘤、前列腺癌、乳腺癌中频繁发生突变^[13]。肿瘤组织中 PTEN 突变导致其磷酸酶活性急剧下降,肿瘤细胞恶性增殖能力增强,其细胞生长的抑制是通过调控 PI3K/AKT 信号途径,在 G1 期阻断细胞周期进程而实现的^[14]。PTEN 突变失活还可以使细胞迁移并抑制细胞凋亡。全晓明等应用免疫组织化学技术检测肝外胆管癌及正常胆管组织中 PTEN 蛋白的表达,结果显示正常胆管组织中 PTEN 蛋白阳性表达率为 90%(9/10),而肝外胆管癌组织中阳性表达率仅为 30%(12/40),两者差异有统计学意义($P<0.05$)。可见,胆管癌组织中存在着较高的 PTEN 蛋白阴性表达率,提示在胆管癌的发生和发展中,PTEN 基因的失活可能起到重要作用。

2 癌基因

2.1 ras 基因 ras 基因包括 K-ras、H-ras 和 N-ras,发生在 K-ras 基因第 12 密码子点上的突变,被认为是胆管上皮恶变的主要改变之一,而 2~3 个密码子点同时发生突变和 N-ras 基因上第 12 密码子点突变的情况比较少见,在正常、增生和异型增生的胆管上皮或瘤样增生区域,无 K-ras 点突变;先天性胆管扩张晚期可伴有胆管上皮癌变或异型上皮,用两步 PCR 法和直接测序分析 1 例先天性胆管扩张伴胆管癌和 1 例伴异型胆管上皮,均存在 K-ras 第 1 密码子点突变,而这种点突变多见于从胆总管发生的胆管癌(如肝门区的胆管癌),少见干周边型或肝内胆管癌^[15]。用限制性片段长度多态性分析法发现在 I、II 期肝外胆管癌患者中有点突变者,其死亡率要比没有 K-ras 点突变者高 7.8 倍;对 III、IV 期患者相应的危险比 HR 为 2.9($P<0.01$),可见 K-ras 第 12 密码子点突变可以作为发现胆管癌的一种有效方法,同时也可以作为肝外胆管癌的一个独立的预后指标^[16]。

2.2 c-erbB-2 基因 c-erbB-2 又称 Neu 或 HER-2,该基因位于人染色体 17q21 上,编码一种相对分子质量为 185×10^3 ,具有酪氨酸激酶活性的跨膜糖蛋白,又称 p185,其结构和功能与表皮生长因子受体(EGFR)有高度相似性,突变后在细胞膜上结合特异性配体(如 a. TGF、EGF)而活化,增加和细胞转化有关的酪氨酸激酶的活性在细胞内传递生长信号。检测 p185 可反映 c-erbB-2 基因状态。该基因在健康成人和胎儿的肝细胞、胆管细胞以及增生或异型增生的胆管上皮中不表达,可用于胆管癌高危患者的筛选^[17]。研究表明胆管癌组织中 c-erbB-2 蛋白阳性率为 46.4%(14/30),认为其是胆管组织癌变过程中的一种表现型肿瘤标记物,与病理分型、分级、临床分期和肿瘤进展无关;在 III 期胆管癌中 c-erbB-2 阳性组平均生存期 26 个月,阴性组 20 个月($P>0.05$),推论 c-erbB-2 不能作为胆管癌的预后指标^[18-19]。但是 Wright 等却发现 c-erbB-2 在胆管癌中的异常表达率为 77.0%,其表达与临床分期、病理类型、癌细胞分化及肿瘤部位等相关,其表达越高,提示癌细胞分化程度越低、恶性程度越高、病期晚、预后差,对这一矛盾的结果还需要今后作进一步验证。

2.3 c-myc 基因 c-myc 基因位于人染色体 8q24 上,基因编码的蛋白产物是相对分子质量为 62×10^3 的 p62,半衰期为 20~30 min,正适合一个基因作为细胞增生调控的潜在因子^[20]。c-myc 的表达与细胞增生有关,激活的 c-myc 基因可影响细胞对生长因子的应答^[21]。免疫组织化学方法检测石蜡包埋的胆管癌组织切片发现,抗 c-myc 抗体阳性率为 93.7%(59/63),与胆管癌细胞分化程度定性和定量相关^[22]。建议 c-myc 可作为鉴别胆管癌与胆管非瘤性病变的免疫组织化学标志物。

综上所述,目前研究结果表明,在胆管癌的发生和发展过

程中可能涉及多种基因的改变,而这些基因表达的程度随肿瘤进程有所变化,相互之间亦存在交叉作用。目前肝门胆管癌的治疗主要以手术治疗为主,但是由于肿瘤发现晚、恶性程度高等原因,肝门部胆管癌的预后欠佳,而胆管癌的基因治疗可能为胆管癌的治疗取得新的进展。

3 结 语

目前癌基因及抑癌基因特异性的问题限制了肝门胆管癌的早期诊断及治疗,但随着胆管癌基础研究的不断深入和分子生物学的不断发展,相信在不远的将来,胆管癌的早期诊断及基因治疗将会取得更大的进展。

参考文献

- [1] Tan G, Yilmaz A, De Young BR, et al. Immunohistochemical analysis of biliary tract lesions[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2004, 12(3): 193-197.
- [2] 石运明, 卞永生, 王文斌, 等. 胆管癌组织端粒酶活性的表达及其意义[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 29(9): 860.
- [3] Wang Y, Yamaguchi Y, Watanabe H, et al. Usefulness of p53 gene mutations in the supernatant of bile for diagnosis of biliary tract carcinoma: comparison with K-ras mutation[J]. J Gastroenterol, 2002, 37(10): 831-839.
- [4] Nunez MI, Rosen DG, Ludes-Meyers JH, et al. WWOX protein expression varies among ovarian carcinoma histotypes and correlates with less favorable outcome[J]. BMC Cancer, 2005, 5: 64.
- [5] 张国梁, 迟宝荣, 任旭. 胆管癌的 K-ras 和 p53 基因的研究进展[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2006, 32(1): 168-171.
- [6] Palakodeti A, Han Y, Jiang Y, et al. The role of late/slow replication of the FRA16D in common fragile site induction[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2004, 39(1): 71-76.
- [7] Chen HC, Chu RY, Hsu PN, et al. Loss of E-Cadherin expression correlates with poor differentiation and invasion into adjacent organs in gastric adenocarcinomas [J]. Cancer Lett, 2003, 201(1): 97-106.
- [8] Yamaguchi K, Nakano K, Nagai E, et al. Ki-ras mutations in codon 12 and p53 mutations (biomarkers) and cytology in bile in patients with hepatobiliary pancreatic carcinoma [J]. Hepatogastroenterology, 2005, 52(63): 713-718.
- [9] Yang B, House MG, Guo M, et al. Promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Mod Pathol, 2005, 18(3): 412-420.
- [10] 谷化平, 尚培中, 周翠玲. 胆管癌中 PTEN 和 P16 抑癌基因蛋白的表达及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(2): 101-103.
- [11] Sasaki S, Kitagawa Y, Sekido Y, et al. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions in human cancer [J]. Oncogene, 2003, 22(24): 3792-3798.
- [12] Cong WM, Bakker A, Swalsky PA, et al. Multiple genetic alterations involved in the tumorigenesis of human cholangiocarcinoma: a molecular genetic and clinicopathological study[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2001, 127(3): 187-192.
- [13] Ramon Parsons, Human cancer, PTEN and the PT-3 ki-

nase pathway[J]. *Seminars Cell Develop Biol*, 2004, 15 (2):171-176.

[14] Vickers SM, Jhala NC, Ahn EY, et al. Tamoxifen (TMX)/Fas induced growth inhibition of human cholangiocarcinoma (HCC) by gamma interferon (IFN-gamma)[J]. *Ann Surg*, 2002, 235(6):872-878.

[15] Ahn EY, Pan G, Vickers SM, et al. IFN-gamma upregulates apoptosis-related molecules and enhances Fas-mediated apoptosis in human cholangiocarcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2002, 100(4):445-451.

[16] Zalcenstein A, Stambolsky P, Weisz L, et al. Mutant p53 gain of function: repression of CD95 (Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants[J]. *Oncogene*, 2003, 36(22):5667-5676.

[17] Kokkonen TS, Augustin MT, Makinen JM, et al. High endothelial venules of the lymph nodes express Fas ligand[J]. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52(5):693-699.

[18] Nakazawa K, Dobashi Y, Suzuki S, et al. Amplification and overexpression of c-erbB-2, epidermal growth factor

receptor, and c-met in biliary tract cancers[J]. *J Pathol*, 2005, 206(3):356-365.

[19] Ueki T, Hsing AW, Gao YT, et al. Alterations of p16 and prognosis in biliary tract cancers from a population-based study in China[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10:1717-1725.

[20] Liu XF, Zhu SG, Zhang H, et al. The methylation status of the I' MS1/ASC gene in cholangiocarcinoma and its clinical significance[K]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2006, 5:449-453.

[21] Koga Y, Kitajima Y, Miyoshi A, et al. Tumor progression through epigenetic gene silencing of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in human biliary tract cancers[J]. *Ann Surg Oncol*, 2005, 12:354-363.

[22] Olivier M, Eeles R, Hollstein M, et al. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users[J]. *Hum Mutat*, 2002, 19:607-14.

(收稿日期:2010-04-18)

microRNA 和白血病

孙长江 综述, 王建新 审校(江苏省南通大学附属医院检验科 226001)

【关键词】 白血病; 基因调控; microRNA; 特异性表达; 诊断; 治疗
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.18.061
中图分类号:R733.71 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2010)18-2023-04

microRNA, 是一类具有 21~25 nt(少数小于 20 nt)的长度很短的非编码单链小分子 RNA。其前体(pre-miRNA)是一段具有茎环结构的长度为 70~90 nt 的单链小分子 RNA。成熟的单链 miRNA 与某些蛋白质结合形成 miRNA 诱导的基因沉默复合物(miRISC), 能够调控某些 mRNA 的稳定性或翻译效率, 抑制靶基因的转录后表达水平^[1]。miRNA 广泛地在动物、植物和人体组织细胞内特异性表达, 具有多种生物学功能。如调节组织细胞的生长、分化、衰老和细胞凋亡^[2-4]。近年发现其在多种肿瘤如肺癌、甲状腺癌和白血病的发生过程中发挥了重要的作用^[4-6]。深入研究其分子生物学特性, 对于探索人体组织细胞内基因调控和生长信号传递方式的特性具有重要意义, 有利于多种相关肿瘤的早期诊断、病情监测、预后判断和临床治疗方法的改进。本文通过对 miRNA 在人体组织细胞内的定位特点、基因表达特性和调控机制方面的介绍, 对 microRNA 在白血病发生发展过程中的作用作一个简要的回顾。

1 microRNAs 基因的定位特点

1.1 microRNAs 基因在染色体上的定位特点 人组织中的 miRNAs 基因在染色体上并不是随机分布的。它们或 2 个 3 个形成一个 miRNA 簇, 或分散存在形成单个 miRNA。这些 miRNA 基因常定位于癌基因区(OGRs)、基因的断裂脆点区(FRAs)、杂合性缺失区(LOH)及最小扩增区部位或其附近区域(见图 1)。FRAs 是姊妹染色体交换、易位、删除、扩增和质粒 DNA 整合作用及肿瘤相关病毒(如 HPV)的优先选择位点, 由于该区本身 DNA 倾向不稳定易于断裂, 因而常常导致某些关键基因与 miRNAs 基因相互作用, 这可能是导致肿瘤发生的一个重要原因。如 miR-142s 基因存在于 t(8,17)易位

的断裂脆点附近, t(8,17)易位导致该 miRNA 启动子与 MYC 基因互相靠近, 引起 MYC 过表达进而易于引起恶性 B 细胞白血病的发生^[7]。再如 miR-15 和 miR-16 定位于 13q14, 这是一个公认的 OGRs, 在有一半多的 B 细胞慢性淋巴细胞白血病中这个区基因表达有删除或表达下调现象。这两种 miRNAs 在白血病细胞中不表达或低表达, 导致无法有效抑制抗凋亡因子 BCL2 的表达, 进而使白血病细胞不易通过凋亡机制实现肿瘤消亡^[4,8]。miRNAs 的这些定位特点显示了 miRNAs 基因可能与肿瘤发生有关。再者, 人 miRNAs 基因常常定位于与癌症相关的脆点区, 也显示了 miRNAs 可能具有癌基因或抑癌基因的功能。

Chromosome	Location (defining markers)	Size, Mb	miR	Hystotype	Known OG/TS
3p21.1-21.2-D	ARP-DRR1	7	let-7g/miR-135-1	Lung, breast cancer	—
3p21.3(A209-D)	GOLGA4-VILL	0.75	miR-26a	Epithelial cancer	—
3p23-21.31(MDR2-D)	D3S1768-D3S1767	12.32	miR-138-1	Nasopharyngeal cancer	—
5q32-D	ADR82-ATX1	2.92	miR-145/miR-143	Myelodysplastic syndrome	—
9q22.3-D	D9S280-D9S1809	1.46	miR-24-1/miR-23b; let-7a-1/let-7f-1/let-7d	Urothelial cancer	PTC, FAMCC
9q33-D	D9S1825-D9S158	0.4	miR-123	NSCLC	—
11q23-q24-D	D11S927-D11S1347	1.994	miR-34a-1/miR-34a-2	Breast, lung cancer	PPP2R1B
11q23-q24-D	D11S1345-D11S1328	1.725	miR-125b-1/let-7a-2/miR-100	Breast, lung, ovary, cervix cancer	—
13q14.3-D	D13S272-D13S25	0.54	miR-15a/miR-16a	B-CLL	—
13q32-33-A	s5G15303-s5G31624	7.15	miR-17/miR-18/miR-19a/miR-20/miR-19b-1/miR-92-1	Follicular lymphoma	—
17p13.3-D	D17S1866-D17S1574	1.809	miR-22; miR-132; miR-212	HCC	—
17p13.3-D	ENOS-TP53	2.275	miR-195	Lung cancer	TP53
17q22-q28(17)	miR-142s/c-MYC	0.55	miR-142s; miR-142as	Prothymocytic leukemia	c-MYC
17q23-A	CLTC-PPM1D	0.97	miR-21	Neuroblastoma	—
20q13-A	FLJ33887-ZNF217	0.55	miR-297-3	Colon cancer	—
21q11.1-D	D21S1911-ANA	2.84	miR-99a/let-7c/miR-125b	Lung cancer	—

图 1 在最小删除区, 最小扩增区和断点区内与癌症相关的一些 miRs 事例

1.2 miRNAs 基因在基因组上的定位特点 以前研究显示 miRNAs 大约占人体全部基因的 1%~5%, 每个 miRNA 能够