

· 综述 ·

先天性胆管扩张症癌变相关基因的研究进展

高贺云 综述 魏明发 审校

先天性胆管扩张症 (congenital biliary dilatation, CBD) 又称为先天性胆总管囊肿 (congenital choledochal cyst, CCC), 是小儿外科最常见的胆道系统发育畸形。本病具有癌变倾向, 需早期手术干预, 如未手术治疗或手术后囊壁保留较多, 后期可发生癌变。Irwin、Ferraris^[1-2] 等于 1944 年首先报道了 CBD 合并恶性病变的病例, 其恶变率为 2.5%~28%, 是正常人群的 25~40 倍, 并且随着年龄的增长而增加^[3]。近年来国内外对 *K-ras* 基因、*p53* 基因、*COX-2*、*MUC1* 基因和 DNA 错配修复基因 (MMR) 等这些与 CBD 癌变相关基因研究较多, 现综述如下。

一、*K-ras* 基因

K-ras 癌基因是由 Kravitz 于 1964 年从 Kirsten 鼠肉瘤病毒基因中分离出来的一种癌基因, 其位于 12 号染色体短臂上 (12p1.1~pter), 由 4 个外显子组成, 分布于约 30 kb 的 DNA 上, 第 4 个外显子有 A、B 两种变异体。其编码产物是 GTP 结合蛋白, 具有 GTP 酶活性, 相对分子量为 21kD, 故称为 P21 蛋白, 定位于细胞膜内表面^[4]。P21 蛋白在细胞增殖分化信号从激活的跨膜受体传递到下游蛋白激酶的过程中起作用, 对细胞的生长、分化、细胞骨架、蛋白质运输和分泌等功能产生调节和影响。*ras* 基因突变通常发生在第 12、13 或 61 密码子, 突变的 *K-ras* 癌基因产物 P21 蛋白降低其自身内源性鸟苷酸三磷酸酶 (GTPase) 的活性, 降低其与 GTPase 活化蛋白 (命名为 *ras-GAP*) 的结合能力, 最终导致 P21 蛋白与 GTP 的持续结合而导致 ERK MAP 激酶通路激活, 引起细胞过度增殖生长^[5]。

K-ras 基因突变对 CBD 癌变的发生起重要作用^[6], CBD 中 *K-ras* 基因突变率为 11.1%~33.3%^[6]。在胆管癌中 *K-ras* 基因突变率高达 33%~80%^[7]。Matsubara 等^[7] 研究了胰胆管合流异常患者癌性和非癌性胆管上皮细胞中 *K-ras* 基因点突变, 发现癌性上皮细胞 *K-ras* 基因点突变率为 80%,

而增生上皮和化生上皮点突变率分别为 58% 和 48%, 其突变部分为第 12 密码子, 突变方式为甘氨酸 (GGT)→天门冬氨酸 (GAT) 或缬氨酸 (VAL), 提示 *K-ras* 基因点突变在胆管癌形成过程中起重要作用^[8]。王小林等^[9] 曾用 PCR-SSCP 法对 30 例 CCC 患儿胆总管囊肿组织标本进行 *K-ras* 基因点突变检测, 发现突变发生在第 12 密码子, 形式为甘氨酸 (GGT)→天门冬氨酸 (GAT), 发生率为 13.3%, 与国外突变率报道一致。*K-ras* 基因突变可能是 CBD 癌变过程中的一个早期信号^[10]。

二、*p53* 基因

p53 肿瘤抑制基因是人类癌症中常见的突变基因之一, 在约 50% 的肿瘤中发生^[11]。*p53* 抑癌基因定位于 17 p13.1, 全长 20 kb, 由 11 个外显子和 10 个内含子组成, 分为野生型和突变型两种。其编码 393 个氨基酸组成的 53 kD 的核内磷酸化蛋白, 具有与 DNA 和蛋白质结合的功能。野生型 *P53* 蛋白极不稳定, 半衰期仅数分钟, 且细胞含量低, 普通免疫组织化学检测到的均为突变型 *P53* 蛋白^[12]。野生型 *P53* 蛋白与下游细胞周期蛋白-细胞周期素依赖性激酶复合物结合, 激活 *P21* 蛋白^[13]。通过 *P21* 蛋白调节使细胞周期无法完成由 G_1 期向 S 期的转变, 使细胞停滞于 G_1 期, 从而对细胞周期进行负性调控, 抑制异常细胞的过度增殖; 突变型 *P53* 蛋白是 *p53* 基因突变的产物, 是一种肿瘤促进因子, 突变型 *P53* 蛋白构型发生改变, 失去对细胞生长的调节作用, 半衰期延长, 在细胞内蓄积呈过度表达。其可与野生型 *P53* 蛋白结合, 改变其构像, 抑制野生型 *P53* 蛋白的基因修复及细胞凋亡作用, 引起细胞无限增殖, 恶性转化^[14]。突变型 *P53* 蛋白还可能对一些癌基因有协同作用, 从而促进细胞恶性转化, 导致肿瘤发生。

有资料显示 *p53* 基因的突变异常与胆管癌的发生发展存在密切关系。有作者等对 56 例 CBD 患儿手术标本进行免疫组织化学检测, 发现 *P53* 蛋白表达增高, 与正常对照及胆管癌患者有明显差异^[15]。Nagai M^[16] 等发现在胰胆管合流异常不典型增生及

腺瘤样增生部位 P53 蛋白表达较其他部位增强。可能在先天性胆管扩张症患儿,因长期胆汁、胰液反流和慢性炎症的刺激,P53 基因发生突变或等位基因的丢失,P53 蛋白过度表达,参与胆管癌的发生。

三、COX-2

COX-2 基因位于染色体 1q25. 2~25. 3 上,含 10 个外显子和 9 个内含子,约 8.3 kb,由 5' 端 0.8kb 的转录起始点上游区,6 kb 的蛋白质编码区以及 1.5 kb 3' 端非编码区组成,其 mRNA 转录产物为 4.5 kb。环氧合酶是前列腺素生物合成的限速酶,COX-2 是其一种亚型,属诱导型膜结合蛋白,定位于核膜和内质网。正常生理情况下在多数组织中不表达,但可被广泛的血管内外激活物如肿瘤坏死因子、表皮生长因子及各种致癌剂和癌基因等的刺激迅速诱导表达,故又被称为“早期即刻”基因。近年来大量研究表明,COX-2 和 PGE2 信号通路在肿瘤细胞的增殖和存活中起重要作用,而 COX-2 又是前列腺素生物合成过程中的一个重要限速酶,在多种肿瘤组织中异常表达,参与肿瘤的发生和发展。COX-2 作用机制可能有以下几方面:催化 PGs 的合成而介导炎症反应;促进细胞增殖和抑制细胞凋亡;促进肿瘤恶性转化、促进肿瘤新生血管生成等^[17-19]参与肿瘤的发生和发展过程^[17-19]。

研究表明,COX-2 过表达在胆管癌发病过程中起重要作用,且被认为是胆管上皮细胞癌的前期预示因素^[20]。Itatsu 等^[21]对 110 例胆管细胞癌标本进行检测,COX-2 阳性率为 89%,Wu 等^[22]认为 CCC 患者的胆汁能通过 COX-2 和 PGE2 途径促进人胆管癌 QBC939 细胞的增生。Tsuchida^[23]等发现其在胰胆管合流异常的非癌性上皮组织(非典型性增生和发育异常)中也有高表达,有作者^[24]曾对 40 例 CBD 患者胆管组织和 10 例胆囊癌标本进行免疫组织化学检测,结果显示 40 例 CBD 胆管 COX-2 阳性表达率明显升高,黏膜上皮增生者比没有增生者 COX-2 表达强度明显升高,两者比较差异有统计学意义,而黏膜上皮增生者与胆囊癌变者 COX-2 表达强度比较,差异无统计学意义,认为 CBD 患者可能因胰胆管反流引起胆管慢性炎症,COX-2 呈高表达,导致其黏膜细胞内信号传导异常,细胞周期发生改变,凋亡受到抑制,上皮过度增生或化生,从而引起癌变。

四、MUC1

人 MUC1 基因定位于染色体 1q21,含有 7 个外显子。MUC1 基因的一个重要特征是其多态性,即

其第 2 个外显子中含有多个连续重复可变序列(VNTRs),不同人的 VNTRs 数量从 20~125 个不等,每个 VNTR 含有 60 个碱基,富含 GC^[25]。其编码产物 MUC1 蛋白是一种高分子量的糖基化蛋白,分子量 >400 kD,由肽核心和糖链组成,其中糖链约占其重量的 50%~90%,多以 O 型糖苷键与肽核心连接。正常情况下 MUC1 主要表达于多种组织器官中上皮细胞近管腔或腺腔面,呈顶端表达,极性分布^[26]。早期研究表明,MUC1 的主要功能是保持管腔结构的开放,防止微生物入侵及保持细胞局部微环境的正常。但近期对 MUC1 的深入研究,发现 MUC1 是一种多功能跨膜糖蛋白分子,在上皮更新与分化,维持上皮完整性,释放活性分子、参与信号转导和癌的发生、侵袭与转移等都起着重要作用^[27-29]。

1969 年 Babbitt^[30]首先提出胰胆管合流异常是 CBD 形成的原因。相关研究发现,伴 PBM 的 CBD 胆道癌变率明显增高,且发病平均年龄比无 PBM 者低 10~15 岁。Yamato 等^[31]研究表明,在合并胆管合流异常的 CBD 患者胆囊上皮细胞中,粘蛋白核心蛋白 MUC1 持续表达,细胞增殖活性增加。Park 等^[32]检测 85 例胆管上皮细胞癌(34 例肝内胆管上皮细胞癌和 51 例肝外胆管上皮细胞癌),结果显示 MUC1 阳性率 65.8%,认为其阳性表达与胆管上皮细胞癌的发生、发展有关。MUC1 在肿瘤中的作用可能与其胞内段的 SXXXXXSSL 构象(X 代表任何氨基酸残基)有关,该段可与胞内的 β -连环蛋白(β -catenin)结合,而 β -连环蛋白可以调控多种与细胞增殖分化相关基因的表达,提示 MUC1 可能通过 β -连环蛋白进行信号转导,从而调节肿瘤细胞增殖及分化^[33-34];同时 Li 等^[33]报道 MUC1 具有 EGFR 样作用,当 MUC1 与 EGF 结合后,MUC1 的胞内段发生磷酸化,从而活化 cSrc 及 MAPK 信号通路,继而影响肿瘤细胞的增殖及分化。

五、hMLH1 和 hMSH2 基因

近年来研究发现,DNA 错配修复基因(mismatch repair gene,MMR)在细胞 DNA 复制过程中保持基因组的稳定性、精确性上起重要作用,MMR 的突变及功能异常可造成 DNA 频发复制错误并不断积累,从而使细胞基因组微卫星 DNA 序列发生改变,引起 DNA 的微卫星不稳定性(MSI),进而增加细胞自发突变频率,在肿瘤早期发生和生长调节起重要作用^[35]。到目前为止,已从人体细胞中分离克隆到 9 种 MMR,其中 hMLH1 和 hMSH2 基因是错配修复基

因中最为重要的 2 个, *hMSH2* 基因位于人类染色体 2p12 p22, 其基因组 DNA 全长约 73 kb (不包括启动子), 含 16 个外显子。cDNA 全长 3111 bp, 含 2 727 bp 的开放阅读框架, 翻译后编码一种由 909 个氨基酸序列组成的蛋白质; *hMLH1* 定位于 3p21, 基因全长 2484 bp, 含 2 268 bp 的开放阅读框架, 编码 756 个氨基酸组成的蛋白质。生理情况下, *hMLH1* 和 *hMSH2* 可识别和切除错配位点, 预防自发突变的堆积, 并保证 DNA 复制的完整性和稳定性^[36]。在肿瘤组织中, *hMLH1* 和 *hMSH2* 基因的突变及杂合子丢失 (LOH), 使得相应的编码蛋白表达水平降低或缺如, 细胞在增殖过程中的掺入与缺失不能修复, 导致微卫星不稳定, 随机突变率增高, 涉及细胞生长、分化、凋亡及癌转移的癌相关基因突变不能及时纠正, 从而引起肿瘤的发生。

Limpaiboon 等^[37]对 65 例胆管上皮癌 *hMLH1* 蛋白超甲基化进行检测, 其中 29 例阳性, 阳性率 (44.6%), 包括杂合子丢失 (LOH) 和微卫星不稳定性 (MSI), 结果表明, DNA 错配修复基因 *MMR* 在胆管上皮细胞癌中起重要作用。Peltomaki 等^[38]研究表明: DNA 错配修复基因突变或启动子超甲基化后使得修复基因功能异常或基因沉默, DNA 复制差错, 细胞突变, 并通过对多种基因调控的影响, 诱导其他相关癌基因或抑癌基因继发性突变, 最终导致肿瘤的发生和转移。亦有相关报道^[39]在胆总管囊肿中微卫星不稳定性检出率达 69.6%, 同时伴 *hMSH2* 和 *hMLH1* 等位基因杂合性缺失率明显提高以及 *TGF2 β2*, *IGF2* 受体基因突变率, 提示微卫星的不稳定性在 CBD 癌变中有一定的作用^[40]。

综上所述, CBD 的癌变可能是在胆胰反流及炎症刺激等多因素的作用下, 胆道黏膜发生破坏-修复-破坏, 在此过程中, 相关基因发生突变失活或异常表达, 从而导致胆管上皮细胞癌变。虽然其癌变相关基因的研究取得了较大进展, 但仍不能完全解释其癌变的具体分子机制。临床上部分病例未能检测到上述基因的突变或异常表达, 提示 CBD 癌变可能有其它未知基因的作用。随着对 CBD 癌变机制研究的进一步深入, 其发病机制将会更明确, 并可为将来基因治疗提供多个候选基因。

参考文献

- 1 Irwin ST, Morison JE. Congenital cyst of the common bile duct containing stones and undergoing cancerous change [J]. Br J Surg, 1944; 2:319.
- 2 Ferraris LV, Navarro A, Malbran JE, et al. Dilatation congenital del hepatocoleoco y adenocarcinoma [J]. Bol Soc Cir Cordoba, 1944, 5:21.
- 3 demonstrating cholangiocarcinoma associated with congenital biliary dilatation [J]. J Pediatr Surg, 2006, 41(1): e15-9.
- 4 Patek CE, Arends MJ, Rose L, et al. The pro-apoptotic K-Ras 4A proto-oncoprotein does not affect tumorigenesis in the ApcMin/+ mouse small intestine [J]. BMC Gastroenterology, 2008, 8:24.
- 5 Briggs CD, Neal CP, et al. Prognostic molecular markers in cholangiocarcinoma: a systematic review [J]. Eur J Cancer, 2009, 45(1):33-47.
- 6 Nagai M, Watanabe M, Iwase T, et al. Clinical and genetic analysis of noncancerous and cancerous biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction [J]. World J Surg, 2002, 26(1):91-98.
- 7 Matsubara T, Sakurai Y, Sasayama Y, et al. K-ras point mutations in cancerous and noncancerous biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction [J]. Cancer, 1996, 77(8):1752-1757.
- 8 Shimotake T, Aoi S, et al. DPC-4 (Smad-4) and K-ras gene mutations in biliary tract epithelium in children with anomalous pancreaticobiliary ductal union [J]. J Pediatr Surg, 2003, 38(5):694-697.
- 9 王小林, 魏明发, 史慧芬, 等. 先天性胆管扩张症 K-ras 基因突变分析 [J]. 中华小儿外科杂志, 2003, 24:412-414.
- 10 Funabiki T, Matsubara T, et al. Pancreaticobiliary maljunction and carcinogenesis to biliary and pancreatic malignancy [J]. Langenbecks Arch Surg, 2009, 394:159-169.
- 11 Moreno M, Pimentel F, Gazdar AF, et al. TP53 abnormalities are frequent and early events in the sequential pathogenesis of gallbladder carcinoma [J]. Ann Hepatol, 2005, 4: 192-199.
- 12 Xiao-Fang Liu, Hao Zhang, et al. Correlation of p53 gene mutation and expression of P53 protein in cholangiocarcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(29): 4706-4709.
- 13 S-Y Choi, W, B Kim. Expression and Clinical Significance of Cell Cycle Regulatory Proteins in Gallbladder and Extrahepatic Bile Duct Cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2009, 16: 23-34.
- 14 Feng Z, Hu W, Rajagopal G, et al. The tumor suppressor p53: cancer and aging [J]. Cell Cycle, 2008, 7(7):842-847.
- 15 董倩, 杨波, 江布先. PCNA 与 P53 蛋白在先天性胆管扩张症患者胆管中的表达及意义 [J]. 山东医药, 2003, 43(21):3-5.

- 16 Nagai M, Watanabe D, Iwase T, et al. Clinical and genetic analysis of noncancerous and cancerous biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction [J]. *World J Surg*, 2002, 26 (1):91-98.
- 17 Harris RE, Beebe-Donk J, Doss H, et al. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade (review) [J]. *Oncol Rep*, 2005, 13:559-583.
- 18 Wang W, Bergh A, Damber JE. Cyclooxygenase-2 expression correlates with local chronic inflammation and tumor neovascularization in human prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11 (9):3250-3256.
- 19 Tjiu JW, Liao YH, Lin SJ, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression in human basal cell carcinoma cell line increases antiapoptosis, angiogenesis, and tumorigenesis [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126 (5): 1143-1151.
- 20 Schmitz KJ, Lang H, Wohlschlaeger J, et al. Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for overall survival in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Virchows Arch*, 2007, 450:135-141.
- 21 Itatsu K, Sasaki M, Yamaguchi J. Cyclooxygenase-2 is involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in cholangiocarcinoma induced by tumor necrosis factor- α [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174:829-841.
- 22 Wu GS, Zou SQ, Luo XW, et al. Proliferative activity of bile from congenital choledochal cyst patients [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9 (1):184-187.
- 23 Tsuchida A, Nagakawa Y, Kasuya K, et al. Immunohistochemical analysis of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in pancreaticobiliary maljunction [J]. *Oncol Rep*, 2003, 10:339-343.
- 24 王小林, 魏明发. 先天性胆管扩张症胆囊黏膜上皮环氧化酶-2 表达研究 [J]. *临床外科杂志*, 2006, 14 (12): 801-802.
- 25 Niv Y. MUC1 and colorectal cancer pathophysiology considerations [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14 (14): 2139-41.
- 26 Mahanta S, Fessler SP, Park J, et al. A minimal fragment of MUC1 mediates growth of cancer cells [J]. *PLoS ONE*, 2008, 3 (4):2054.
- 27 Taylor-Papadimitriou J, Burchell JM, Plunkett T, et al. MUC1 and the immunobiology of cancer [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2002, 7 (2):209-221.
- 28 McAuley JL, Linden SK, Png CW, et al. MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117: 2313-2324.
- 29 Tsutsumida H, Swanson BJ, Singh PK, et al. RNA interference suppression of MUC1 reduces the growth rate and metastatic phenotype of human pancreatic cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 2976-2987.
- 30 Hasumi A, Matsui H, Sugioka A, et al. Precancerous conditions of biliary tract cancer in patients with pancreaticobiliary maljunction: reappraisal of nationwide survey in Japan [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2000, 7 (6): 551-5.
- 31 Yamoto T, Kurumaya H, Ohama K, et al. Frequent expression of mucin coreprotein MUC1 in non-neoplastic gallbladder mucosa from patients with pancreaticobiliary maljunction [J]. *Liver*, 1999, 19 (4): 281-287.
- 32 Park SY, Roh SJ, Kim YN. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 in cholangiocarcinoma: prognostic impact [J]. *Oncol Rep*, 2009, 22 (3):649-657.
- 33 Li Y, Bharti A, Chen D, et al. Interaction of glycogen synthase kinase 3 β with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and β -catenin [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18 (12):7216-24.
- 34 Ren J, Li Y, Kufe D. Protein kinase C δ regulates function of the DF3/MUC1 carcinoma antigen in β -catenin signaling [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (20):17616-22.
- 35 Kitajima Y, Miyazaki K, Matsukura S, et al. Loss of expression of DNA repair enzymes MGMT, hMLH1, and hMSH2 during tumor progression in gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2003, 6:86-95.
- 36 Charames GS, Bapat B. Genomic instability and cancer [J]. *Curr Mol Med*, 2003, 3 (7): 589-596.
- 37 Limpaboon T, Khaenam P, Chinnasri P. Promoter hypermethylation is a major event of hMLH1 gene inactivation in liver fluke related cholangiocarcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2005, 217 (2):213-219.
- 38 Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: A common etiologic factor for colon cancer [J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10 (7):735-40.
- 39 Nagai M, Watanabe M, Iwase T, et al. Clinical and genetic analysis of noncancerous and cancerous biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction [J]. *World J Surg*, 2002, 26 (1):91-98.
- 40 贾友鹏, 巩鹏, 王忠裕. TNF- α 及其受体 I 在胆管癌和先天性胆总管囊性扩张症中的表达及其意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16 (2):180-182.