

肝内胆管癌病理机制表观基因组学研究进展

刘谋泽^{1,2}, 李浩^{1,2,3}, 张伟^{1,2}¹中南大学湘雅医院临床药理研究所, 长沙 410008, 湖南; ²中南大学临床药理研究所, 遗传药理学湖南省重点实验室, 长沙 410078, 湖南; ³湖南省人民医院肝胆医院, 长沙 410002, 湖南

摘要 肝内胆管癌(ICC)是一类高侵袭性的恶性肿瘤,分子机制不明确。其治疗后易复发且化疗不理想,目前尚无可供特异性早期诊断的生物标记物。近年来研究发现特异性的基因突变如 KRAS、EGFR、IDH1 和 IDH2 等,基因甲基化和 miRNA 等表观遗传学改变,IL-6/STAT,酪氨酸激酶受体相关的信号通路异常激活等参与 ICC 的发病和转移,其中许多关键基因成为分子靶向药物治疗靶点。我们就其病理机制表观基因组学研究进展作一综述,旨在为促进发现新的诊断和治疗 ICC 的生物标记物,实施联合分子靶向治疗的策略提供思路。

关键词 肝内胆管癌;表观基因组;病理机制;分子靶向治疗

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-2501(2014)11-1294-05

1 肝内胆管癌概述

肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)也称周围型肝内胆管癌或胆管细胞癌,原发于肝内二级以上胆管黏膜上皮细胞,其发病率大约占原发性肝脏恶性肿瘤的 10%,是仅次于

于肝细胞癌的第二常见的肝癌,也是胆道系统最常见的恶性肿瘤之一^[1]。近几年 ICC 发病率在全球范围内仍呈增长趋势^[2-3]。肝内胆管细胞癌的发病呈现高度地域性分布特点,东亚、东南亚地区为全世界的高发区域^[1]。其中我国胆管癌患病人数占全球胆管癌患者的 55%^[2,4]。在西方国家 ICC 发病率约 1.5/10 万^[1]。ICC 发病风险因素主要有肝硬化,肝胆管结石,乙型和丙型肝炎病毒感染,肝吸虫感染,2 型糖尿病,肥胖和饮酒等。ICC 恶性程度高,具有极强的侵袭和淋巴结转移特性,通常预后非常差,平均 5 年生存率为 30%^[5]。据报道,对于不可行手术切除的患者 5 年生存率 < 5%^[1]。当前手术切除是肝内胆管细胞癌早期最主要的治疗方式,也是唯一可能的治愈方式,其术后复发率也高达 50%^[2,6]。化疗(如顺铂+吉西他滨)通常不理想,以 5-FU 和吉西他滨为主的治疗方式部分缓解率仅为 20%到 30%。ICC 发病的分子机理目前还不清楚,可能包括特异性的基因突变、表观沉默和异常的信号通路激活等。ICC 基因组特征与肝细胞癌具有许多共性,临床上用于鉴别诊断原发性 ICC 和其他(如胆囊癌,胰腺癌以及肝细胞癌)的转移癌依赖于临床经验、影像和病理结果,目前仍然没有明确的可供诊断 ICC 的生物标记物。以往发现许多基因变异如 KRAS、P53、IDH、EGFR、PIK3CA、MET、BRAF 等与 ICC 发病及其预后相关^[7-9]。近几年表观遗传学机制如 DNA 甲基化,miRNA 等在 ICC 中表达异常也引起研究者的普遍关注^[10]。这些表观遗传学标志改变可能参与 ICC 发病机制调节^[1]。结合这些与 ICC 发病机制相关的遗传变异以及表观遗传改变(图 1),进而发展以这些变异为靶点的分子靶向治疗对于疾病进

2014-05-07 收稿 2014-09-05 修回

中南大学中央高校基本科研业务费专项资金(2014zzts325);国家自然科学基金(81273595);国家 863 计划(2012AA02A518)

刘谋泽,男,硕士研究生,研究方向:疾病表观基因组学和表观药物基因组学研究。

Tel: 15717415461 E-mail: liumouze0123@126.com

张伟,通信作者,男,博士,教授,博士生导师,研究方向:遗传药理学,分子药理学。

Tel: 0731-84805380-8317 E-mail: yjsd2003@163.com

展期 ICC 肿瘤患者可能具有非常重要的意义。

2 ICC 分子机制

目前对于 ICC 病理机制仍然不是非常清楚。ICC 比较经典的病理模型是:其一,以释放炎症性细胞因子,诱导胆管细胞一氧化氮合酶的生成,促进突变,DNA 修复受损以及上调环氧化酶-2(COX-2)表达等为特征的慢性胆道炎症性反应;其二,以胆汁酸通过激活生长因子促进胆管上皮细胞增生为特征的胆汁淤积症,进而促进肿瘤的发展^[1]。研究发现许多信号通路参与 ICC 的发生发展,包括 IL-6/STAT、生长因子如(EGFR、HGF/MET、VEGF 等),KRAS/MAPKs、Wnt 信号通路等。其中 IL-6/STAT 通路是导致炎症型 ICC 主要的机制之一。此外,IL-6 也参与调节 Let7 家族的 miRNA 以及 EGFR 等转录因子的表达^[1]。HER 家族中的 EGFR、ERBB2 (HER-2/ neu) 调控细胞分化和死亡,从而在 ICC 病理进程中发挥重要作用。EGFR 调控其下游信号通路。这些 EGFR 下游信号通路包括:其一,RAS-RAF-MAPK 信号通路,磷酸化的 EGFR 通过招募鸟苷酸交换因子激活 RAS,继而激活 RAF 和 MAP 通路影响细胞增殖、肿瘤侵袭和转移;其二,PI3K/AKT 通路,它通过激活转录因子如 NF- κ B 从而激活细胞存活和抗凋亡信号;其三,JAK/STAT 通路,它潜在的激活与细胞存活有关的基因转录。EGFR 激活可能导致 PLGG 磷酸化,从而促进 PIP2 水解成 IP3 和甘油二酯(DAG),引发蛋白激酶 C(PPKC)和 CAMK 激活。有报道在 ICC 患者中,10%~32% 都出现 EGFR 家族受体的高表达^[11]。由表皮生长因子受体(EGFR)、RAS/丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)、白介素-6(IL-6)和 MET 导致的单株增生一旦建立,将引发胆管细胞和基质细胞发生一系列由遗传学和表观遗传学机制调控的改变,诱导其无限增生(逆转录酶激活),凋亡逃逸(由 COX-2 和 BCL-2 介导),血管增生(血管内皮生长因子 VEGF 和血管紧张素-2)以及侵袭和转移(基质金属蛋白酶过表达和 E-钙粘蛋白下调)^[1]。其他如 Hedgehog 等信号通路在细胞生存、增生、发育以及自我更新等发挥重要作用,研究发现这些通路可能间接促进 ICC 肿瘤生成,然而其具体机制仍不明确。研究阐明 ICC 发病机制有助于

寻找疾病早期诊断的生物标记物以及药物干预靶点,提高疾病生存率。

3 ICC 表观遗传学研究

3.1 基因甲基化 表观遗传学机制如 DNA 甲基化、组蛋白修饰、非编码 RNA 等参与多种肿瘤发生发展的生物学进程以及抗肿瘤药物化疗疗效个体差异的调节^[12-13],具有重要的生物学意义。已有学者提出通过靶向诱导肿瘤癌基因甲基化达到治疗肿瘤的目的^[14]。基因甲基化调节能影响 ICC 发病和预后。研究报道在 ICC 细胞中出现多种基因启动子区高甲基化(包括某些抑癌基因以及 DNA 修复基因等),如 P16INK4、RASSF1A、APC、SOCS-3、EGFR、hMLH1、MG-MT 等^[1,10]。这些异常的基因甲基化参与 ICC 发病进程的调节。已经发现在炎症性 ICC 中,由于细胞因子信号抑制因子 3(SOCS-3)启动子高甲基化,其表达沉默诱导细胞因子 IL-6 异常高表达,从而激活 JAK/STAT 通路^[1,15]。Dachrut 等发现转录因子 RUNX3(Runt-related transcription factor 3)启动子高甲基化导致的基因表达沉默与肝吸虫 ICC 相关^[16]。近期也发现胰岛素样生长因子 II 信使 RNA-结合蛋白基因(IMP3)在 ICC 中几乎完全去甲基化,而在正常肝组织中,其启动子区 CPG 岛高度甲基化。因此甲基化影响 IMP3 的表达成为 ICC 预后的一个独立预测因子^[17]。

3.2 MiRNA 近年来发现了某些致癌作用的单个 miRNA 如 miR-214 和 miR-21 等在 ICC 的发病和发展中发挥重要作用。有报道 miR-214 能以 Twist 基因为靶点,其表达下调能促进上皮-间质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)促进 ICC 转移^[18]。Chen 等根据 ICC 肿瘤组织和正常组织之间 miRNA 表达的差异寻找出了一个含有 38 个 miRNA 的表达谱,其中包括 mir-320 和 mir-204 等^[19]。该 miRNA 表达谱与 ICC 的生物学和临床表型紧密相关。并不是所有相关的 miRNA 都对 ICC 发病起着促进作用。miR-204 表达上调能抑制 ICC 肿瘤细胞 EMT,发挥抑癌基因的作用^[20]。Iwaki 等发现 miR-376c 在 ICC 中发挥抑癌基因作用。与正常胆管细胞相比,ICC 细胞中编码 miR-376c 表达的基因高甲基化,表达下调。这种 miR-376c 表观沉默调节能

在 ICC 细胞中促进表皮生长因子 EGF 依赖的细胞迁移。结合应用去甲基化试剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷以及组蛋白去乙酰化酶抑制剂处理能上调 miR-376c 的表达^[21]。由于转移是导致 ICC 治疗失败的最主要的因素,因此,在 ICC 中以这些异常的 miRNA 为靶点的治疗可能是非常有前景的抗癌治疗新策略。

3.3 组蛋白修饰 组蛋白由于受到调节甲基化和乙酰化等染色质重塑酶修饰,导致基因表达改变,从而影响疾病发生和化疗敏感性。已有文章综述这些组蛋白修饰能影响多种肿瘤的化疗疗

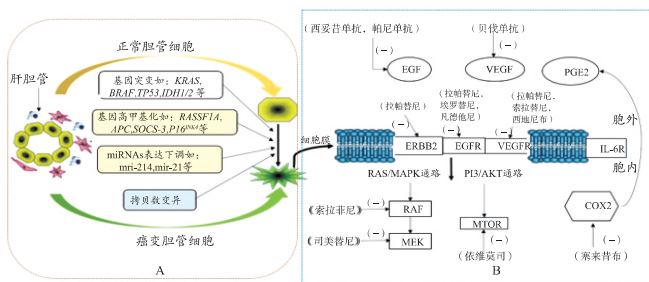


图1 肝内胆管癌分子机制与分子靶向治疗

4 ICC 分子靶向治疗

ICC 表观遗传学研究转化为临床应用具有重要意义。作为转化医学的重要组成部分,以基因组学和表观基因组学为指导的肿瘤分子靶向个体化治疗近年来越来越受到重视。

对于进展期 ICC 患者,目前仍没有一致认同的标准的化疗方案。临床上常规治疗药物如 5-FU,顺铂,吉西他滨等联合化疗能获得一定疗效^[24-25],但化疗预后仍然不理想。据文献报道近年来开展了一系列的 II 期临床研究发现许多靶向治疗药物联合常规化疗作为 ICC 一线用药能显著提高患者 OS 和无进展生存率(PFS)和^[1,26-27]。这些靶向治疗药物主要以 EGFR、VEGFR、PDGFR、BRAF、MEK、mTOR 等为作用靶点^[1]。抗-EGFR 靶点药物,如埃罗替尼,吉非替尼和西妥昔单抗等,它们能抑制 ICC 肿瘤细胞增殖。其他如阻断 ERBB1 和 ERBB2 受体的拉帕替尼,EGFR、VEGFR2 和 RET 激酶拮抗剂凡德他尼等,体内试验证明它们能显著抑制 ICC 生长^[28]。结合 ICC 信号通路,我们发现不同的靶向治疗药物通过作用不同的靶点发挥治疗作用(图 1)。然而临床研究发现这些靶向治疗药物治疗仍然存在问题。这些靶点基因在不同肿瘤患者中由于基因

效^[22]。在肝癌中,有研究报道,用组蛋白去乙酰化酶抑制剂丙戊酸结合吉西他滨处理人肝胆管细胞系 HuCCT1,其增殖效应降低了 23%,显著大于吉西他滨或丙戊酸单用抗癌效应($P < 0.01$)^[23]。然而截至当前,在 ICC 中有关影响其发病和转移以及化疗疗效的组蛋白修饰表观遗传学研究还鲜有报道。这些组蛋白修饰可能引起广泛的基因表达谱差异导致 ICC 易转移以及广泛的化疗耐药,这些未知的机制仍值得我们进行探索。

突变个体差异,药物疗效存在差异^[29-31]。有研究推荐在进展期胆管癌患者中实施个体化分子靶向治疗应当分析 EGFR 和 KRAS 等靶基因突变情况^[32]。除遗传变异,其他因素如 DNA 甲基化、miRNA 等直接调节靶向药物作用的靶点基因表达或者通过作用于某些关键调控基因,即调控靶向药物作用靶基因表达最重要的基因,从而可能直接或间接影响分子靶向治疗疗效。

目前表观机制对靶向治疗耐药机制的作用研究尚属初步阶段。靶向治疗用于 ICC 治疗其作用有限,治疗耐药和 ICC 疾病本身易发生转移等成为限制分子靶向治疗应用的主要因素。然而,靶向治疗结合常规治疗是实现个体化治疗的重要手段之一,对某些难治性恶性肿瘤包括 ICC 等具有非常重要的意义。寻找更为有效的靶向治疗药物,尽可能减少耐药,将依赖于我们更全面的理解 ICC 发病机制,阐明其发病信号通路及其关键基因遗传变异和表观遗传调控网络。

5 总结和展望

ICC 作为一种罕见的恶性肿瘤,由于其发病和转移的分子机制并不明确,临床上始终未能制定有效的化疗方案。寻找 ICC 特异的发病早期生物标志物将促进手术治疗患者生存和预后。对于不可行手术切除的进展期患者,寻找有效的治疗方案仍面临挑战。近年来研究发现了许多信号通路,其中也证实了许多关键基因参与 ICC 疾病发生和进展。药物基因组学研究发现这些关键基因由于遗传变异差异影响治疗和预后。针对这些关键基因已经发现许多靶向治疗药物用于实体瘤的治疗,然而是否对 ICC 治疗有效仍需确证。近

年来兴起的表观遗传学研究也提示不仅基因遗传变异,DNA 甲基化以及 miRNA 等也是导致 ICC 发病的重要机制。组蛋白修饰的影响由于技术水平限制研究较少,仍需要大量的研究工作进行阐明。这些表观分子标志物可能应用于 ICC 早期诊断,并有望成为药物干预的新靶点。充分理解这些表观机制的作用并结合药物基因组学研究成果指导分子靶向药物用于 ICC 治疗的个体化给药具有重要意义。未来研究将进一步阐明 ICC 发病和转移的分子机制,明确各类遗传变异和表观遗传机制的作用,寻找用于疾病诊断的分子标记物和治疗的新靶点,在临床上确证靶向治疗结合常规化疗用于一线治疗的治疗疗效。随着技术手段的进步以及成本的降低,二代测序等技术手段已经逐步在临床用于测定遗传变异。血液样本 DNA 甲基化和循环 miRNA 检测等也有望广泛普及。这将有助于进一步研究和理解 ICC 的发病机制,指导我们制定新的有效的治疗策略。

参考文献

- [1] Sia D, Tovar V, Moeini A, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis and rationale for molecular therapies[J]. *Oncogene*, 2013, 32(41): 4861-4870.
- [2] 崔云甫,李惠声.肝内胆管癌的诊治进展[J]. *国际外科学杂志*, 2012, 39(5): 292-295.
- [3] Witjes CD, Karim-Kos HE, Visser O, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma in a low endemic area: rising incidence and improved survival[J]. *HPB (Oxford)*, 2012, 14(11): 777-781.
- [4] 黄志强.肝胆管外科的发展方向[J]. *外科理论与实践*, 2011, 16(4): 329-331.
- [5] Mavros MN, Economopoulos KP, Alexiou VG, et al. Treatment and Prognosis for Patients With Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Systematic Review and Meta-analysis[J]. *JAMA Surg*, 2014.
- [6] Poultsides GA, Zhu AX, Choti MA, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Surg Clin North Am*, 2010, 90(4): 817-837.
- [7] O'Dell MR, Huang JL, Whitney-Miller CL, et al. Kras(G12D) and p53 mutation cause primary intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(6): 1557-1567.
- [8] Hsu M, Sasaki M, Igarashi S, et al. KRAS and GNAS mutations and p53 overexpression in biliary intraepithelial neoplasia and intrahepatic cholangiocarcinomas[J]. *Cancer*, 2013, 119(9): 1669-1674.
- [9] Voss JS, Holtegaard LM, Kerr SE, et al. Molecular profiling of cholangiocarcinoma shows potential for targeted therapy treatment decisions [J]. *Hum Pathol*, 2013, 44(7): 1216-1222.
- [10] Stutes M, Tran S, DeMorrow S. Genetic and epigenetic changes associated with cholangiocarcinoma: from DNA methylation to microRNAs[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(48): 6465-6469.
- [11] Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, et al. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(2): 418-425.
- [12] Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy[J]. *Cell*, 2012, 150(1): 12-27.
- [13] 刘谋泽,何发忠,张伟.抗肿瘤药物的表观遗传学研究进展[J]. *药学学报*, 2013, 161(11): 1629-1636.
- [14] 马爱妮,王永祥,周向军.靶向诱导 DNA 甲基化与肿瘤治疗研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2009, 14(3): 241-244.
- [15] Isomoto H, Mott JL, Kobayashi S, et al. Sustained IL-6/STAT-3 signaling in cholangiocarcinoma cells due to SOCS-3 epigenetic silencing[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(1): 384-396.
- [16] Dachrut S, Bantaisong S, Sripan M, et al. DNA copy-number loss on 1p36.1 harboring RUNX3 with promoter hypermethylation and associated loss of RUNX3 expression in liver fluke-associated intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2009, 10(4): 575-582.
- [17] Gao Y, Yang M, Jiang Z, et al. IMP3 expression is associated with poor outcome and epigenetic deregulation in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2014, 45(6): 1184-1191.
- [18] Li B, Han Q, Zhu Y, et al. Down-regulation of miR-214 contributes to intrahepatic cholangiocarcinoma metastasis by targeting Twist [J]. *FEBS J*, 2012, 279(13): 2393-2398.
- [19] Chen L, Yan HX, Yang W, et al. The role of microRNA expression pattern in human intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *J Hepatol*, 2009, 50(2): 358-369.
- [20] Qiu YH, Wei YP, Shen NJ, et al. miR-204 inhibits epithelial to mesenchymal transition by targeting slug in intrahepatic cholangiocarcinoma cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(5): 1331-1341.
- [21] Iwaki J, Kikuchi K, Mizuguchi Y, et al. MiR-376c down-regulation accelerates EGF-dependent migration by targeting GRB2 in the HuCCT1 human intrahepatic cholangiocarcinoma cell line [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69496.

- [22] Liu MZ, McLeod HL, He FZ, et al. Epigenetic perspectives on cancer chemotherapy response [J]. *Pharmacogenomics*, 2014, 15(5): 699-715.
- [23] Iwahashi S, Shimada M, Utsunomiya T, et al. Histone deacetylase inhibitor enhances the anti-tumor effect of gemcitabine: a special reference to gene-expression microarray analysis [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(5): 1057-1062.
- [24] Valle J, Wasan H, Palmer DH, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(14): 1273-1281.
- [25] Woo SM, Lee WJ, Kim JH, et al. Gemcitabine plus cisplatin versus capecitabine plus cisplatin as first-line chemotherapy for advanced biliary tract cancer: a retrospective cohort study [J]. *Chemotherapy*, 2013, 59(3): 232-238.
- [26] Zhu AX, Meyerhardt JA, Blaszkowsky LS, et al. Efficacy and safety of gemcitabine, oxaliplatin, and bevacizumab in advanced biliary-tract cancers and correlation of changes in 18-fluorodeoxyglucose PET with clinical outcome: a phase 2 study [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(1): 48-54.
- [27] Gruenberger B, Schueller J, Heubrandtner U, et al. Cetuximab, gemcitabine, and oxaliplatin in patients with unresectable advanced or metastatic biliary tract cancer: a phase 2 study [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(12): 1142-1148.
- [28] Yoshikawa D, Ojima H, Kokubu A, et al. Vandetanib (ZD6474), an inhibitor of VEGFR and EGFR signalling, as a novel molecular-targeted therapy against cholangiocarcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(8): 1257-1266.
- [29] Nathanson DA, Gini B, Mottahedeh J, et al. Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA [J]. *Science*, 2014, 343(6166): 72-76.
- [30] Nakadate Y, Kodera Y, Kitamura Y, et al. KRAS mutation confers resistance to antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against human colorectal cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(9): 2146-2155.
- [31] Gridelli C, Peters S, Sgambato A, et al. ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC [J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(2): 300-306.
- [32] Chang YT, Chang MC, Huang KW, et al. Clinicopathological and prognostic significances of EGFR, KRAS and BRAF mutations in biliary tract carcinomas in Taiwan [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29(5): 1119-1125.

Epigenomic research progress on pathological mechanisms of intrahepatic cholangiocarcinoma

LIU Mou-ze^{1,2}, LI Hao^{1,2,3}, ZHANG Wei^{1,2}

¹Department of Clinical Pharmacology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan, China; ²Institute of Clinical Pharmacology, Central South University; Hunan Key Laboratory of Pharmacogenetics, Changsha 410078, Hunan, China; ³Department of Hepato-biliary Surgery, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410002, Hunan, China

ABSTRACT Intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) is an aggressive malignancy with its molecular mechanism poor understood. It is prone to postoperative relapse and the response of chemotherapy on it is always disappointing. There is no available specific biomarkers for its early diagnosis. Recently, researchers have found that some genetic mutations, such as KRAS, EGFR, IDH1 and IDH2, gene methylation, miRNA and other epigenetic changes, abnormal activation of IL-6/STAT, tyrosine kinase receptors related signaling pathways are involved in ICC pathogenesis. Some of the key

genes in it are becoming targets for molecular therapy. We are here to make a review on epigenomic research progress of ICC pathological mechanisms with the aim to promoting discovery of new biomarkers for its diagnosis and treatment, and to providing ideals for new strategy of medication in combination with molecular target drugs.

KEY WORDS intrahepatic cholangiocarcinoma; epigenomic; pathological mechanism; molecular target therapy

本文编辑:李娟