

**专栏导读:** 为了扩大杂志的影响,推动《中国普通外科杂志》的发展、充分利用学术平台为广大普通外科工作者服务,本刊从2015年第1期开始与AME Publishing Company合作共同打造“AME科研时间专栏”。2014年,AME中文平台——“科研时间”的诞生,为广大从事临床和基础研究的科研工作者提供了更多科研交流和学习分享的机会,一经推出得到了广大读者的喜爱,引起了广大临床工作者的不同反响;其学术前沿、科研与临床、医学与人文等内容更是让读者耳目一新。欢迎广大读者关注我们“AME科研时间专栏”,给我们提出宝贵的建议和意见,以便于将这个专栏建设得更好,成为读者喜闻乐见的一个栏目。

胆管细胞癌是一种相对少见的恶性肿瘤,目前其发病率有上升的趋势。因缺乏早期的诊断指标,患者确诊时往往已处于晚期,再加上发病机制不明,缺乏有效的治疗方法,故预后极差。近年来,分子遗传学及表观遗传学的研究发现,许多基因的突变、缺失会直接影响恶性肿瘤的发生、发展,且在其诊断、治疗及预后评估中具有潜在的生物标志物作用。因此,从遗传学的角度来深入研究胆管细胞癌的发生与进展机制,将可能为其诊断与治疗发现新的靶点与策略。Maroni等学者的文章就遗传学在胆管细胞癌中的重要性及研究进展作了较为全面的阐述,也为今后的研究方向提供了信息与思路,值得阅读与参考。



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.001

http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.001

Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(2):151-162.

• AME 科研时间专栏 •

## 遗传学在胆管细胞癌发展中的重要性

Luca Maroni<sup>1,2</sup>, Irene Pierantonelli<sup>1,3</sup>, Jesus M. Banales<sup>4</sup>, Antonio Benedetti<sup>1</sup>, Marco Marzioni<sup>1</sup>

(1. 意大利马尔凯理工大学 胃肠病科, 安科纳; 2. 荷兰泰阿姆斯特丹大学学术医疗中心 泰加特肝肠病研究所, 阿姆斯特丹; 3. 奥地利维也纳医科大学 内科学系 III 胃肠病学与肝脏病学区, 维也纳; 4. 西班牙巴斯克大学 Bionostia 研究所 肝脏病学与胃肠病学系, 圣塞瓦斯蒂安)

### 摘要

胆管细胞癌(CCA)是肝脏一种少见的恶性肿瘤,起源于胆管。在过去的30年里,CCA在世界各地的发病率不断的增高,但其预后依然很差,几乎未改变过。尽管已发现几个危险因子与该肿瘤的发生相关,但这些危险因子中没有一个在大多数患者中得以肯定。由于诊断时多已是晚期以及有限的治疗选择,导致CCA生存率很低。近来对CCA遗传学和表观遗传学上变化的研究结果为重新阐明胆管细胞恶性转化的分子学机制带来了希望。沿着这一方向进一步研究将有助于形成新的诊断、预后和治疗方法。该篇全面概述了CCA的最新进展,描述迄今所报道过发生在CCA中最重要的基因突变和表观遗传学改变。

### 关键词

胆管肿瘤 / 遗传学; 后成说, 遗传

中图分类号: R735.8

胆管细胞癌(CCA)是一种起源于胆管细胞,即胆管内皮细胞的少见恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。在解剖学上,CCA通常分成肝内型和肝外型。肝内型发生在肝实质内,肝外型以胆囊管汇入口处为分界点,又分为肝门周围型(也称为Klatskin瘤)和远端型。根据Bismuth-Corlette分类法可再对肝门周围型CCA进行分类<sup>[1-2]</sup>。

CCA的症状通常没有特异性,且多在病程的较晚阶段才出现症状;因此,肝外型CCA常出现与胆汁淤积相关的症状和体征,如无痛性黄疸、浅色粪便、深色尿和瘙痒症,而肝内型CCA常常是肝脏偶发灶<sup>[3-4]</sup>。

到目前仍未找到CCA的特异性标志物。然而,CA19-9(即糖抗原19-9)和CEA(即癌胚抗原)常可与临床、放射线以及内镜检查结果一起用来帮助诊断<sup>[5-7]</sup>。淤胆血清指标往往会升高,虽然这对CCA并没有特异性。

这种恶性肿瘤的治疗选择很有限。CCA具有较高的耐药性特征,且往往因为确诊较晚,其手术治疗的可能性很小。这些特点导致CCA生存率低:未手术的患者中约50%的人在诊断后3~4个月死于肝功能衰竭,或与胆道进行性梗阻相关的感染并发症<sup>[8]</sup>。另外,肝切除术后5年生存率,肝内型CCA是20%~32%,肝门周围型CCA是30%~42%,远端

型CCA是18%~54%<sup>[9]</sup>。

选择合适的手术方式通常比较复杂, 须根据肿瘤的分期和部位而定。一般来说, 肝内型CCA和肝门周围型CCA肝切除范围的大小须参照组织学类型, 一般行部分肝切除术, 且要求切缘阴性, 这样才能提高生存率。而远端型CCA需行胰十二指肠切除术(也称为Whipple切除术)<sup>[10-12]</sup>。到目前为止, 原位肝移植(OLA)与部分肝切除术相比较, 在提高生存率方面并没有更多优势。然而, 在患者中有选择性的肝移植对提高生存率有令人满意的效果<sup>[11]</sup>。

常用的化疗药一般对CCA无效。已有几个单一疗法和联合化疗的研究, 但到目前仍没有一个化疗方案能证明对CCA有充分疗效<sup>[13]</sup>。

当无法进行手术时, 治疗只能是姑息性的, 主要目的是减轻胆道梗阻和感染, 还有相关的症状<sup>[8]</sup>。

## 1 CCA的流行病学

总的来说, CCA是一种少见的肿瘤, 在世界范围内只占胃肠道肿瘤的3%<sup>[14]</sup>, 但它是仅次于肝细胞癌、第二种常见的原发性肝肿瘤<sup>[15]</sup>。已有几个研究报告, 肝内型CCA的发病率和病死率在全球呈不断上升的趋势, 而肝外型CCA则是轻度下降或保持稳定。特别是在美国, 年龄结构调整后的肝内型CCA发病率呈进行性增加, 从1973年的0.13/10万到1997年的0.67/10万<sup>[16]</sup>, 而1995—1999年间达到0.85/10万<sup>[17]</sup>。相反, 年龄结构调整后的肝外型CCA发病率则在下降, 从1979年的1.08/10万到1998年的0.82/10万。此外, 在英国<sup>[18-19]</sup>和德国<sup>[20]</sup>也发现有类似趋势, 而在意大利, 肝内型CCA和肝外型CCA发病率均在上升<sup>[21]</sup>, 丹麦和法国的发病趋势似乎都在下降<sup>[22-23]</sup>。在过去的几年里, 已有不少研究人员开始调查可能影响以前CCA流行病学研究结果中的一些偏倚<sup>[24-25]</sup>。对复杂多样的CCA组缺乏统一的分类标准, 在许多恶性肿瘤登记档案中, 胆道恶性肿瘤常与其它肝脏肿瘤(如肝细胞癌、胆囊癌)混为一谈, 以及由于诊断已晚期和组织学异质性导致的分类错误, 这些关键问题不仅影响到流行病学的研究, 也影响到对该病种病理生理学的理解<sup>[8, 15]</sup>。

尽管仍有不少争议, 已普遍认为男性患病的人数要稍多些, 不同人种间也可能存在差异<sup>[17, 26]</sup>。而且已确定在东西方国家间发病率有明显的差异<sup>[17]</sup>。

东亚和东南亚发病率较高, 其中泰国最高, 男性33.4/10万, 女性12.3/10万, 在这个国家内就存在着显著差别<sup>[27-28]</sup>。在以上这些地区, 已证实肝吸虫感染和CCA的发生之间有明显相关性<sup>[28]</sup>。

几个危险因子以及它们和CCA发生的相关性, 如原发性硬化性胆管炎(PSC), 肝血吸虫感染, 肝内胆管结石, 或胆道畸形已获得广泛研究<sup>[4]</sup>, 但大部分患者并没有这些特征。另外, 其它一些危险因子, 如基因多态性和生活方式也可能起了促进作用<sup>[26, 29-30]</sup>, 这些都还有待于进一步的研究。

## 2 癌的遗传学改变

癌变被认为是一个细胞恶性转变的多级段过程<sup>[31]</sup>。大部分基因突变是体细胞突变, 常常是零星发生; 遗传性癌情况则相反, 是由于遗传自父母的突变基因所致, 这类癌比较少见<sup>[32-33]</sup>。高达90%的体细胞性突变占主导, 仅10%的肿瘤需要双等位基因突变诱导肿瘤生成<sup>[33]</sup>。突变通过改变单个核苷酸而靶向作用于基因组即所谓的“点突变”或单核苷酸多态性(SNP), 或通过改变多个核苷酸, 导致基因缺失、插入、移位或扩增<sup>[34]</sup>。虽然突变可以是偶发事件或为遗传事件, 但靶基因可分为: (1) 致癌基因; (2) 抑癌基因; (3) 稳定基因<sup>[35-36]</sup>。

癌基因突变后, 继续参与生理条件下细胞内信号通路, 导致基因异常活化和细胞增殖失控<sup>[37]</sup>。

致癌基因相关产物包括一大类蛋白, 如转录因子, 生长因子及它们的受体, 信号传感器和凋亡调节器<sup>[35, 37]</sup>。转录因子通过下调或上调转录来调节参与信号通路的基因表达。例如, 在淋巴瘤中检测到Fos/Jun/API突变就是霍奇金淋巴瘤<sup>[38]</sup>。

ERBB受体和c-MET均属于生长因子受体; 特殊配基与其结合通过酪氨酸激酶自体磷酸化启动细胞内瀑布样反应, 从而导致细胞增殖, 凋亡减少, 癌细胞活力增加, 并调节细胞分化<sup>[39-42]</sup>。ERBB受体在多种肿瘤中有过度表达, 因此用药物来抑制酪氨酸激酶活性治疗这些肿瘤是合理的<sup>[40, 43]</sup>。在信号传感器中, K-ras基因突变可在多种肿瘤中检测到, 如结肠癌胰腺癌和黑色素瘤<sup>[44]</sup>。最后, 致癌基因能修改一些抗凋亡分子活性, 如Bcl-2; 异常激活与过度增殖可能相关, 如弥漫性大B细胞淋巴瘤<sup>[45]</sup>。

抑癌基因(TSG)通常为隐性基因; 根据所

谓的“二次打击假说”，两个等位基因均需要进行突变，才能诱导肿瘤生成<sup>[46]</sup>。许多人类的恶性肿瘤，如眼癌和家庭性腺瘤样息肉病（FAP）均与TSG不活跃有关<sup>[47]</sup>。在这方面，p53是细胞周期一个重要的调节器，可以防止因DNA损害而阻碍细胞周期，导致细胞凋亡<sup>[46,48]</sup>。

另外，有一类基因称之为“稳定基因”，包括错配修复基因（MMR），核苷酸切除修复基因（NER）和碱基切除修复基因（BER）。这些基因的作用是纠正在正常DNA复制过程中产生或诱导突变中产生的碱基错配。DNA复制过程中MMR改变可导致错误发生；滑脱股的错配突变可导致DNA区域的长度不一，这种情况下促发的基因突变称为微卫星不稳定<sup>[49-50]</sup>。

MMR组基因，如MLH1、MSH2、MSH6和PMS2，它们的突变易形成遗传性非息肉病性结直肠癌（HNPCC）<sup>[51]</sup>。

### 3 癌的表现遗传学改变

近10年的研究强调了人类的癌在基因表达方面还隐藏着一些其它遗传异常表现，即不是由基因组的任一区域的突变所致，也称为表现遗传改变<sup>[52]</sup>。研究最多的发生在癌中的表现遗传改变有DNA甲基化和组蛋白修饰，广义上还包括非编码RNA。

构成基因组的碱基甲基化在多种生理过程中起关键作用，如胚胎发育<sup>[53]</sup>，基因印记<sup>[54]</sup>，女性X染色体的失活<sup>[55]</sup>，以及预防DNA在置换过程中的序列不稳定<sup>[56]</sup>。

在哺乳动物中，当基因组中的一个碱基团添加到正好位于一个鸟嘌呤前面的胞嘧啶中时，DNA甲基化就产生了（也称之为CpG点，即胞嘧啶-磷酸键-鸟嘌呤）。CpG点并非随意分布在基因组中。在许多基因的5'端可以发现有许多CpG延伸段，命名为CpG岛，其对应着基因的启动区域<sup>[57]</sup>。在正常情况下，这些区域一般不被甲基化，但在很多肿瘤中，TSG基因有过度甲基化<sup>[52,58-59]</sup>。过度甲基化启动的结果是基因转录不活跃，或下调，因此，表现遗传改变是以类似于基因突变的方式来影响肿瘤形成过程的。在癌中发现的过度甲基化的TSG基因有很多，且在不断的增多；比较熟知的具代表性的有肾癌中的VHL<sup>[60]</sup>，多种癌中的p16INK4a<sup>[61]</sup>，结直肠癌中的hMLH1<sup>[61]</sup>。虽然在很多癌中CpG岛的过度甲基化是作为一个大事件出现

的，但许多肿瘤中均存在CpG点的过度甲基化<sup>[62]</sup>。

发生在癌中的另一种表现遗传改变是组蛋白修饰<sup>[63]</sup>。组蛋白是一种碱性蛋白质，充当着DNA在被称为核小体结构处缠绕的脚手架<sup>[64]</sup>。后经转录修正，如乙酰化、甲基化、磷酸化，是调控组蛋白生物学特性较为普遍的事件。在这种环境里，影响组蛋白功能最突出的修饰是通过赖氨酸残基的组蛋白乙酰转移酶（HAT）的乙酰化和通过组蛋白去乙酰转移酶（HDAC）的去除乙酰化，保持这两个过程中的平衡或多或少调节了基因的表达。的确，通过HDAC移除乙酰基团可致核染色质固缩，并抑制了相关基因的转录，而HAT则可能是通过使RNA聚合酶和转录因子相结合，以更有利DNA构成来促成基因转录的<sup>[65-66]</sup>。

非编码RNA（ncRNA）是一组内生转录RNA分子，不被翻译成蛋白质。ncRNA家族中成员众多，可再分为两大亚组：小ncRNA和长链ncRNA<sup>[67]</sup>。在本稿中，笔者仅突出微小RNA（可参阅Esteller等和Knowling等<sup>[68-69]</sup>对ncRNA的综述）。

微小RNA是短RNA序列（19-25个核苷酸），参与许多生物学过程，如胚胎发育，增生，分化和细胞凋亡<sup>[70]</sup>。微小RNA在基因组内编码，转录成前体副本，再经过一系列紧密调控过程后进入RNA诱导沉默复合体（RISC）。RISC通过微小RNA部分匹配或完全与靶向mRNA3'非翻译区域结合，调控mRNA翻译过程，下调或阻断靶mRNA的翻译<sup>[71]</sup>。微小RNA与癌的许多方面均有关联，从肿瘤的发生和进展到对治疗的应答，以及新的治疗方法的发现<sup>[72]</sup>。

### 4 CCA 的基因改变

导致胆管癌形成的具体机制仍不清楚。然而，慢性炎症，不完全的胆汁流障碍（即胆汁淤积）和胆道损伤已被认为是胆道恶性转变的主要特征<sup>[1,13]</sup>。

慢性炎症诱导胆管细胞和炎症细胞分泌促炎因子<sup>[73]</sup>。白细胞介素6（IL-6）和其它一些介质，如内毒素和肿瘤坏死因子 $\alpha$ （TNF- $\alpha$ ），是炎症过程中产生的重要细胞因子<sup>[74]</sup>。IL-6能激活多种不同通路，致细胞有丝分裂和细胞存活<sup>[75]</sup>。IL-6也能诱导氧化氮合酶（iNOS）表达，进而增加氧化氮产物，造成DNA损害<sup>[76-77]</sup>。另外，这样的炎症环节也能导致环氧合酶2（COX-2）活化，此酶参与



前列腺素的分泌。胆汁酸和胆汁中的其它成分与COX-2过度表达相关,引起细胞增殖,抗凋亡和血管生成<sup>[78]</sup>。

迄今为止,已发现许多基因与胆管细胞癌的发生相关(表1)<sup>[88]</sup>。但是与CCA肿瘤形成相关的具体机制仍在调查研究中。在生长因子受体族中,已有报道c-MET基因突变常常发生在胆管癌中,与高度浸润和预后差有关<sup>[84,89-90]</sup>。另一方面,在其它肿瘤,如乳房癌、肺癌和结肠癌,常能检测到ERBB2和EGFR基因获得性突变<sup>[91]</sup>。EGFR过度表达与人胆管细胞癌恶化相关,因为这种突变在胆囊和胆道肿瘤中均能检测到,但在生理情况下就检测不到<sup>[82,92]</sup>。类似于EGFR,CCA中也报道过ERBB2过度表达<sup>[83,93]</sup>。ERBB2和COX-2同时表达提示可能是由ERBB2诱导了前列腺素分泌,其有很强的致有丝分裂作用<sup>[94]</sup>。而且,用ERBB2/neu致癌基因转染鼠细胞,可以出现与人CCA相似的特征,这个事实提示ERBB2基因突变和肿瘤进展有相关性<sup>[95]</sup>。在预后方面,EGFR突变与生存率低和CCA肿瘤进展相关,而ERBB2在肿瘤早期阶段就提示有过度表达<sup>[96-97]</sup>。EGFR和它的突变对CCA发展的重要性提示使用酪氨酸激酶抑制剂(TKi)可成作为有发展前途的治疗策略,类似于目前用于晚期肿瘤的治疗策略<sup>[43,76]</sup>。然而,TKi治疗仅在某些CCA患者中有中等度疗效<sup>[98]</sup>。

表1 CCA中最常发生变异的基因

Table 1 Genes most frequently altered in CCA

基因	变异	细胞效应	文献
RAS/BRAF	超活化	Ras/Raf/Mek/Erk 通路活化	[80-81]
EGFR/ERBB2	超活化	MAPK, PI3K/Akt, mTOR, STAT 活化	[82-83]
c-MET	超活化	MAPK, PI3K/Akt, mTOR, STAT 活化	[84]
p53	抑制	细胞周期控制与凋亡丧失	[85]
SMAD4	抑制	TGF- $\beta$ 下游靶点抑制	[86]
APC	抑制	$\beta$ -catenin 堆积	[87]

Ras和Raf基因是致癌基因,且是MAPK通路的成员。Ras基因突变与肝内型和肝外型CCA均有关。已有报道,Ras基因有频繁的(即G/A在密码子12处转换)或不太频繁的(即GGT/GAT和CCA/CAC分别在密码子12th和61st处转换)点突变<sup>[80,99-100]</sup>。另外,Raf同种型Braf基因突变,与Ras基因共同突变有助于CCA的发展。在人HCC中并没有发现有

Braf基因表达。最常见突变处是在外显子15,导致T/A的改变<sup>[81]</sup>。

除了致癌基因外,TSG基因也参与了CCA的形成和进展。例如P53参与保护抗异常增生,包括细胞周期阻滞和凋亡<sup>[101]</sup>。在人的恶性肿瘤中,P53不活跃是最常见的突变之一,最常发生在TSG类基因中<sup>[102]</sup>。在CCA中,P53突变已众所周知,已有许多研究来测定确切的发生率和突变的类型<sup>[85,103]</sup>,因此,根据Khan等<sup>[104]</sup>的综述,P53异常表达既可以通过免疫组化,又可以通过序列研究来测定。P53突变是以过渡的形式(G:C/A:T),或较少以转换的形式(G-T)存在,主要发生在外显子5、6、7、8<sup>[105]</sup>。

SMAD4是另一种TSG,它调节转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )信号传递<sup>[106]</sup>。SMAD4/TGF- $\beta$ 信号转换路径也反向调节上皮细胞的生长<sup>[107]</sup>。SMAD4的活性消失是胃肠道肿瘤最常见的特征,起源于靠近胰腺的远端胆总管的CCA也能观察到这种现象,值得注意的是,胰腺也常有这样的突变发生<sup>[86,108-109]</sup>。

腺瘤状息肉肉病Coli(APC)是调控不同种细胞内通路的另一种TSG<sup>[110]</sup>。灭活的典型机制是以一个等位基因的突变为特征,随着失去杂合性(LOH),继而基因完全灭活。最初是在结直肠癌中观察到APC突变,目前也发现它与人类许多其它恶性肿瘤相关<sup>[111]</sup>。在CCA细胞中,APC突变很频繁,这可能是癌病变形早期阶段的原因<sup>[87]</sup>。

在等位基因的缺失中,8p22缺失发生在肝内型CCA中,并且可能与肿瘤进展有关<sup>[112]</sup>。

## 5 CCA的表观遗传变化

表观遗传变化在CCA病理生理中的作用正越来越引起人们的兴趣<sup>[113-115]</sup>。虽然目前对此了解还很少,但近年来的技术进步,对挖掘新的诊断、预后和治疗方案的渴望,使得未来的进一步研究得以保证。本篇中,我们将综述发生在CCA中重要和最相关联的表观遗传变化。

### 5.1 DNA超甲基化

DNA甲基化可能是研究最多的发生在CCA中的表观遗传改变。DNA超甲基化中的表观遗传沉默的主要目标有TSG(包括那些涉及细胞周期调节和诱导凋亡的)、稳定基因和参与炎症过程及细胞黏附的基因(表2)。

表2 CCA中最常见的甲基化基因

Table 2 Most frequently methylated genes in CCA

靶基因	功能	甲基化频率 (%)	文献
p16INK4a	细胞周期控制	17~83	[116-124]
p14ARF	细胞周期控制	24~40.2	[105, 118-119, 125]
p15INK4b	细胞周期控制	50	[119]
p73	细胞周期控制	36	[119]
RASSF1A	细胞周期控制	27~69	[119, 121, 126]
RUNX3	凋亡	56.8	[121]
DAPK	凋亡	3~32	[117, 119-121]
SEMA3B	凋亡	100	[127]
TMS1/ASC	凋亡	36.1	[128]
hMLH1	DNA 错配修复	8~46	[119-121, 129-130]
MGMT	DNA 修复	0~46	[116-117, 119-120]
SOCS-3	细胞因子调控	88	[131]
E-cadherin	细胞黏附	21.5~43	[117, 119-121]

在参与细胞周期调节的基因组中, p16INK4a超甲基化可能最具特征性。p16INK4a也称为细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂2A (CDKN2A), 它与细胞周期蛋白依赖激酶4结合, 抑制了它与细胞周期蛋白D<sub>2</sub>相互作用的能力, 从而阻止了细胞进入细胞周期S期<sup>[132]</sup>。p16INK4a启动子超甲基化导致了细胞增殖和肿瘤形成。p16INK4a启动子中超甲基化的比率在不同的研究中从17%到83%不等<sup>[116-121]</sup>。有意思的是, p16INK4a超甲基化超甲基化不仅在PSC相关的CCA中较常见<sup>[122]</sup>, 而且与临床预后差也相关<sup>[117]</sup>。更有人认为p16INK4a超甲基化是CCA进展过程中的早期事件。的确, 在肝脏导管内乳头状瘤和起源于肝内胆管结石的CCA中发现有p16INK4a表达下调<sup>[123-124]</sup>。

与p16INK4a有密切联系的是p14ARF, 是位于染色体9p21区域的同组基因的β副本。在正常细胞中, p14ARF阻止细胞周期由G<sub>1</sub>到G<sub>2</sub>的进程, 以及通过间接激活P53而抑制异常细胞的增殖<sup>[133-134]</sup>。在不同的研究中, CCA中报道的甲基化频率从24%到40.2%, 在肝血吸虫相关的CCA中记录最高<sup>[105, 118-119, 125]</sup>。有趣的是, 近来有报道p14ARF甲基化, DAPK, 和/或ASC, 还有P53突变, 与肿瘤的分化差以及预后差相关<sup>[105]</sup>。

在同一个染色体9p21区域, 与p16INK4a毗邻处有p15INK4b序列, 它被认为是TGF-ββ介导的细胞周期阻滞的一个效应器<sup>[135]</sup>。有报道<sup>[119]</sup>称, 在72例CCA中p15INK4b启动子超甲基化达50%。另外在CCA中也发现P73启动子有36%甲基化。P73是P53族中的一员, 也能诱导细胞周期阻滞和细胞

凋亡<sup>[136]</sup>。

RASSF1A是一个参与细胞周期管理的基因, 它在CCA中被表观遗传性失活。这种TSG也显示可以通过细胞周期蛋白D<sub>1</sub>的积累来阻止细胞周期前进<sup>[137]</sup>和细胞有丝分裂的进展<sup>[138]</sup>。有高达69%的患者发生RASSF1A启动子超甲基化<sup>[126]</sup>, 值得注意的是, 与肝内型CCA相比, 肝外型CCA中报道有更高的发生率(分别是83%和47%)<sup>[120]</sup>。

TSG的子类包括那些参与促进细胞凋亡, 即程序化的细胞死亡的基因。在多种不同的研究中发现这些基因中有一些是在启动子区域超甲基化。发育不全相关的转录因子3 (RUNX3) 是一种参与细胞生长调控和TGF-β诱导凋亡活动的TSG<sup>[139]</sup>。高达56.8%的胆道癌中发现有RUNX3启动子超甲基化<sup>[121]</sup>。同一研究发现, RUNX3启动子甲基化更常见于老年患者, 且和无甲基化的患者相比, 其与生存率低相关。从正常标本到胆道上皮内瘤形成到最终CCA, RUNX3启动子甲基化是逐渐增多的<sup>[140]</sup>。另外, 对RUNX3、CCND2、CDH13、GRIN2B, 和TWIST1启动子甲基化的检测分析显示, 肝外型CCA发生的甲基化比对照组更有意义<sup>[141]</sup>。

TSG子类中的第2位是死亡相关的蛋白激酶(DAPK)。DAPK是干扰素-γ诱导程序化细胞死亡一个促凋亡介质。胆管癌中DAPK启动子超甲基化频率从3%到32%<sup>[117, 119-121]</sup>。而且, DAPK甲基化可能与预后差和低生存率相关<sup>[105, 119, 121, 142]</sup>。CCA中发现有超甲基化的其它一些促凋亡基因有semaphorin 3B (SEMA3B) 和含有一个CARD (TMS1/ASC) 甲基化介导安静/凋亡斑点蛋白的靶子。有研究发现, 在15个CCA组织标本中SEMA3B超甲基化为100%<sup>[127]</sup>, 而TMS1/ASC有36%甲基化<sup>[128]</sup>。

参加DNA修补的酶由一组稳定基因组成。这些基因功能缺失型突变导致突变积聚和染色体不稳定<sup>[143]</sup>。参与细胞错配修复的基因对于细胞保护很重要, 可以防止细胞复制过程中可能发生的错误。DNA错配修复机制中的缺陷与微卫星不稳定有关<sup>[144-145]</sup>, 并在多种肿瘤中得以证实<sup>[146-147]</sup>。人mutL同族体1 (hMLH1) 是一个DNA错配修补基因, 位于3p21.3核心。bMLH1启动子甲基化频次在不同研究中报道不一, 在胆道管内乳头状瘤中是0<sup>[129]</sup>, 而在包括有胆囊肿瘤在内的一个37例胆道癌病人的队列研究中是46%<sup>[120]</sup>。有意思的是, 在胶质二氧化钽诱导的肝内型CCA中有报道微卫

星不稳定的发生率很高(62.5%),提示bMLH1启动子超甲基化可能是这种现象的原因之一<sup>[148]</sup>。而且,有报道<sup>[130]</sup>称,在肝吸虫相关的CCA病例中有44.6%有同样的表观遗传过程,并与差分化类型明显相关。

参与DNA修补的另一种酶是O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(MGMT)。MGMT启动子甲基化频次在不同的CCA报告中不一,从33%~49%<sup>[119-120]</sup>到选择性CCA患者组的0<sup>[116-117]</sup>。但有意思的是,免疫组化染色发现无MGMT与肝外型CCA预后差相关<sup>[149]</sup>。

如前所述,慢性胆道感染易形成CCA<sup>[110,150]</sup>。本文中,已发现IL-6在炎症过程中是上调表达的,它是CCA过程中一个重要的生长和生存细胞因子<sup>[75]</sup>,是通过促进髓细胞性白血病1(MLC1)抗凋亡蛋白经STAT-3磷酸化后表达的<sup>[151]</sup>。在生理情况下,IL-6诱导细胞因子信号3(SOCS-3)抑制因子的表达,进而又通过传统的反馈环抑制IL-6信号<sup>[152]</sup>。有趣的是,在部分CCA患者中SOCS-3启动因子实验性超甲基化与持久的IL-6/STAT-3信号存在和MLC1高表达有关<sup>[131]</sup>。这些数据提示治疗方法中可以使用去甲基化药来逆转这个过程。

CCA中,细胞黏附蛋白因其基因启动子的超甲基化也受到表观遗传沉默的影响。因此,已有认为钙黏蛋白(重要的细胞黏附蛋白)的表达和功能改变参与了从上皮细胞到间叶细胞的转变过程(EMT)<sup>[153]</sup>,进而导致肿瘤进展和转移<sup>[154-155]</sup>。CCA中E(上皮)-钙黏蛋白启动子超甲基化率在21.5%~43%之间<sup>[117,119-121]</sup>。关于这点,据报道,启动子甲基化和蛋白表达减少之间的相关性可通过免疫组化来评估<sup>[117]</sup>。

## 5.2 组蛋白修改

迄今,关于组蛋白修改在CCA中作用的证据有限。然而,渴望找到新的治疗途径的愿望足以让人们在未来数年里做进一步的研究努力<sup>[156]</sup>。目前,不同的人CCA细胞的试验性潜伏期与HDAC抑制因子(即MS-275, trichostatin A, NVP-LAQ824和NVPLBH589)一致,因此可以用剂量依赖方式来阻滞细胞生长和减低生存率<sup>[157-159]</sup>。而且,传统的细胞抑制剂组合,如吉西他滨或阿霉素,或新的药,如sorafenib或bortezomib,和MS-275,通过减少凋亡和缩短细胞周期阻滞<sup>[157,159]</sup>,可产生额外的或协同的生长抑制作用<sup>[157]</sup>。重要的是,HDAC抑制剂在体内潜在治疗作用的

初步证据已有报道。将组蛋白去乙酰激酶抑制剂NVPLBH589用于皮下产生CCA瘤的裸鼠,可显著减小肿块的大小,也可使吉西他滨增效<sup>[159]</sup>。而且,HDAC1的过度表达与恶性习性和肝内型CCA预后差相关<sup>[160]</sup>。

## 5.3 微小RNA

在近几年里,微小RNA在CCA生物学中已显示出明显的作用(表3)。以前的报道重点是在不同的CCA细胞株中表达的研究,并阐明了,至少部分阐明控制它们生物学和功能的机制。一些微小RNA(如miR-141, miR-200b, miR-21, miR-29b)在CCA细胞株中已有报道或上调或下调<sup>[161,163]</sup>,并发现它们的靶基因与细胞增殖和凋亡相关。

表3 与CCA发生发展相关的微小RNAs

Table 3 MicroRNAs involved in CCA development and progression

微小RNA	靶基因	功能	CCA中改变	文献
miR-141	CLOCK	生物节律	升高	[161]
miR-200b	PTPN12	肿瘤抑制因子	升高	[161]
miR-21	PTEN	肿瘤抑制因子	升高	[161-162]
miR-29b	Mcl-1	凋亡抑制基因	降低	[163]
Let-7a	NF2	炎症负调控因子	升高	[164]
miR-370	MAP3K8	癌基因	降低	[165]
miR-148a	DNMT-1	甲基转移酶	降低	[166]
miR-152	DNMT-1	甲基转移酶	降低	[166]
miR-124	SMYD3	细胞迁移、侵袭	降低	[167]
miR-26a	GSK-3b	丝/苏氨酸激酶	升高	[168]
miR-214	Twist	癌基因	降低	[169]

首次比较人肝内型CCA和正常胆管细胞株的微小RNA分布谱是基于克隆方法学,并且确定了有8个微小RNA在癌细胞株中有显著下调(即miR-22, miR-125a, miR-127, miR-199a, miR-199\*, miR-214, miR-376a和miR-424)<sup>[170]</sup>。另外,在启动子超甲基化,炎症信号和微小RNA表达之间有复杂的相互作用。因此,已证实IL-6在人CCA细胞株中过度表达可以增加微小RNAlet-7a的水平,反之再通过增加STAT-3的磷酸化作用有助于IL-6的生存效应<sup>[164]</sup>。进而,这个细胞因子增加了DNA甲基转移酶1(DNMT-1)表达,外源性抑制了miR-370的转录,导致MAP3K8-依赖细胞的生长<sup>[165]</sup>。而且,IL-6可能直接调节miR-148a和miR-152的表达,反之又调节了DNMT-1和TSG的表达<sup>[166]</sup>。

最近有报道,在微小RNA表观遗传调节和丙型肝炎核心蛋白之间有着值得关注的相互影响<sup>[167]</sup>。作



者们证明miR-124(是HCV相关的肝内型CCA的特征)被HCV核心蛋白经过DNMT-1上调后的表观遗传沉默而在体内被诱导。

SMYD3经鉴别是miR-124的一个潜在靶向基因,其参与了miR-124介导的CCA细胞的转移和浸润。

已在人体组织样本中调查研究了微小RNA的作用。使用激光显微切割技术比较27例肝内型CCA, 10例正常胆管细胞样本, 及正常肝组织中基因组内微小RNA表达谱, 结果显示有38个微小RNA在正常样本和肿瘤样本间存在表达差异<sup>[171]</sup>。

CCA中发现有miR-21和miR-26a明显的过表达。而检测到miR-21表达敏感性为95%, 特异性为100%<sup>[162]</sup>, CCA样本中miR-26a的表达率为90.5%, 而对照组中仅33.3%<sup>[168]</sup>。另外, miR-26a通过直接靶向作用在糖原合酶激酶3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ , 正常是调节 $\beta$ 连环蛋白下调的)水平上, 体内体外均已证实能促进CCA生长。随后 $\beta$ 连环蛋白的积聚又刺激了参与肿瘤生长的多种不同基因的转录, 如c-myc, cyclinD1, 和过氧化物酶增生激活受体 $\delta$ <sup>[168]</sup>。

另一方面, 也有提到微小RNA在调节肝内型CCA转移中起重要作用。的确, 已发生转移与未转移的肝内型CCA相比, 发现有miR-214表达的下调<sup>[169]</sup>。作者们证明了在miR-214水平和Twist(这是一个E钙黏蛋白转录的重要抑制因子)之间有着间接关联, 提示miR214在调节肿瘤的上皮-间叶细胞转换中的潜在作用。

## 6 结 论

CCA是一致命性疾病, 在全球范围内发病率逐渐增高。虽然对该病的发病机理和临床特征的认识已有了明显提高, 但CCA仍对临床医生是一个重大挑战。确诊时大多已是晚期, 因此使得内科和外科治疗效果均差。成功管理不同的癌症一般根据: 识别患者的分类和设定监控方案的结果。在这方面, 例如结肠癌, 为患者的子孙确定特定的内镜监控可识别家族性遗传性易患因素, 提高早期诊断率和生存率。在未来的数年内, 识别有高危CCA形成的潜在患者是对平移研究的下一个挑战。特别是识别遗传学和表观遗传改变在CCA发生、进展和转移所起的主要作用, 可能为管理CCA打开一个新纪元, 也可能为这个恶性病魔的治疗找到一个潜在策略。

志谢: 本研究得到了MIUR 授予给Marzioni 博士 PRIN 2009-prot. 2009X84L84\_003资金和Ministero della Salute授予给Marzioni博士GR-2010-2306996资金的支持。

## 参考文献

- [1] Lazaridis KN, Gores GJ. Cholangiocarcinoma[J]. Gastroenterology, 2005, 128(6):1655-1667.
- [2] Cardinale V, Semeraro R, Torrice A, et al. Intra-hepatic and extra-hepatic cholangiocarcinoma: New insight into epidemiology and risk factors[J]. World J Gastrointest Oncol, 2010, 2(11):407-416.
- [3] Mosconi S, Beretta GD, Labianca R, et al. Cholangiocarcinoma[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2009, 69(3):259-270.
- [4] Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, et al. Cholangiocarcinoma[J]. Lancet, 2005, 366(9493):1303-1314.
- [5] Patel AH, Harnois DM, Klee GG, et al. The utility of CA 19-9 in the diagnoses of cholangiocarcinoma in patients without primary sclerosing cholangitis[J]. Am J Gastroenterol, 2000, 95(1):204-207.
- [6] Gores GJ. Early detection and treatment of cholangiocarcinoma[J]. Liver Transpl, 2000, 6(6 Suppl 2):S30-34.
- [7] Nehls O, Gregor M, Klump B. Serum and bile markers for cholangiocarcinoma[J]. Semin Liver Dis, 2004, 24(2):139-154.
- [8] Patel T. Cholangiocarcinoma--controversies and challenges[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 8(4):189-200.
- [9] Murakami Y, Uemura K, Sudo T, et al. Prognostic factors after surgical resection for intrahepatic, hilar, and distal cholangiocarcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(3):651-658.
- [10] Akamatsu N, Sugawara Y, Hashimoto D. Surgical strategy for bile duct cancer: Advances and current limitations[J]. World J Clin Oncol, 2011, 2(2):94-107.
- [11] Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update[J]. Gut, 2012, 61(12):1657-1669.
- [12] Yoshida T, Matsumoto T, Sasaki A, et al. Prognostic factors after pancreatoduodenectomy with extended lymphadenectomy for distal bile duct cancer[J]. Arch Surg, 2002, 137(1):69-73.
- [13] Gatto M, Alvaro D. New insights on cholangiocarcinoma[J]. World J Gastrointest Oncol, 2010, 2(3):136-145.
- [14] Vauthey JN, Blumgart LH. Recent advances in the management of cholangiocarcinomas[J]. Semin Liver Dis, 1994, 14(2):109-114.
- [15] Khan SA, Toledano MB, Taylor-Robinson SD. Epidemiology, risk factors, and pathogenesis of cholangiocarcinoma[J]. HPB (Oxford), 2008, 10(2):77-82.
- [16] Patel T. Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States[J]. Hepatology, 2001,

- 33(6):1353-1357.
- [17] Shaib Y, El-Serag HB. The epidemiology of cholangiocarcinoma[J]. *Semin Liver Dis*, 2004, 24(2):115-125.
- [18] Taylor-Robinson SD, Toledano MB, Arora S, et al. Increase in mortality rates from intrahepatic cholangiocarcinoma in England and Wales 1968-1998[J]. *Gut*, 2001, 48(6):816-820.
- [19] West J, Wood H, Logan RF, et al. Trends in the incidence of primary liver and biliary tract cancers in England and Wales 1971-2001[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(11):1751-1758.
- [20] von Hahn T, Ciesek S, Wegener G, et al. Epidemiological trends in incidence and mortality of hepatobiliary cancers in Germany[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2011, 46(9):1092-1098.
- [21] Alvaro D, Crocetti E, Ferretti S, et al. Descriptive epidemiology of cholangiocarcinoma in Italy[J]. *Dig Liver Dis*, 2010, 42(7):490-495.
- [22] Jepsen P, Vilstrup H, Tarone RE, et al. Incidence rates of intra- and extrahepatic cholangiocarcinomas in Denmark from 1978 through 2002[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(11):895-897.
- [23] Lepage C, Cottet V, Chauvenet M, et al. Trends in the incidence and management of biliary tract cancer: a French population-based study[J]. *J Hepatol*, 2011, 54(2):306-310.
- [24] Welzel TM, McGlynn KA, Hsing AW, et al. Impact of classification of hilar cholangiocarcinomas (Klatskin tumors) on the incidence of intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98(12):873-875.
- [25] Khan SA, Emadossadaty S, Ladep NG, et al. Rising trends in cholangiocarcinoma: is the ICD classification system misleading us?[J]. *J Hepatol*, 2012, 56(4):848-854.
- [26] McLean L, Patel T. Racial and ethnic variations in the epidemiology of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States[J]. *Liver Int*, 2006, 26(9):1047-1053.
- [27] Sripa B, Pairojkul C. Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2008, 24(3):349-356.
- [28] Sripa B, Kaewkes S, Sithithaworn P, et al. Liver fluke induces cholangiocarcinoma[J]. *PLoS Med*, 2007, 4(7):e201.
- [29] Songserm N, Promthet S, Sithithaworn P, et al. MTHFR polymorphisms and *Opisthorchis viverrini* infection: a relationship with increased susceptibility to cholangiocarcinoma in Thailand[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(5):1341-1345.
- [30] Honjo S, Srivatanakul P, Sriplung H, et al. Genetic and environmental determinants of risk for cholangiocarcinoma via *Opisthorchis viverrini* in a densely infested area in Nakhon Phanom, northeast Thailand[J]. *Int J Cancer*, 2005, 117(5):854-860.
- [31] Yuspa SH. Overview of carcinogenesis: past, present and future[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(3):341-344.
- [32] Russo A, Zanna I, Tubiolo C, et al. Hereditary common cancers: molecular and clinical genetics[J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(6C):4841-4851.
- [33] Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome[J]. *Nature*, 2009, 458(7239):719-724.
- [34] Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control[J]. *Nat Med*, 2004, 10(8):789-799.
- [35] Croce CM. Molecular origins of cancer: Oncogenes and cancer[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(5):502-511.
- [36] Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(3):379-385.
- [37] Wallis YL, Macdonald F. Demystified ... oncogenes[J]. *Mol Pathol*, 1999, 52(2):55-63.
- [38] Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, et al. Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B[J]. *EMBO J*, 2002, 21(15):4104-4113.
- [39] Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(2):127-137.
- [40] Liu X, Newton RC, Scherle PA. Developing c-MET pathway inhibitors for cancer therapy: progress and challenges[J]. *Trends Mol Med*, 2010, 16(1):37-45.
- [41] Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(2):177-184.
- [42] Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 59(2 Suppl):21-26.
- [43] Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(5):341-354.
- [44] Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review[J]. *Cancer Res*, 1989, 49(17):4682-4689.
- [45] Schuetz JM, Johnson NA, Morin RD, et al. BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Leukemia*, 2012, 26(6):1383-1390.
- [46] Sherr CJ. Principles of tumor suppression[J]. *Cell*, 2004, 116(2):235-246.
- [47] Hodgson S. Mechanisms of inherited cancer susceptibility[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 9(1):1-4.
- [48] Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011:978312. doi: 10.1155/2011/978312.
- [49] Preston BD, Albertson TM, Herr AJ. DNA replication fidelity and cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2010, 20(5):281-293.
- [50] Shah SN, Hile SE, Eckert KA. Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2):431-435.
- [51] Hassen S, Ali N, Chowdhury P. Molecular signaling mechanisms of apoptosis in hereditary non-polyposis colorectal cancer[J]. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2012, 3(3):71-79.
- [52] Esteller M. Epigenetics in cancer[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(11):1148-1159.
- [53] Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA



- methyltransferase gene results in embryonic lethality[J]. *Cell*, 1992, 69(6):915-926.
- [54] Feinberg AP, Cui H, Ohlsson R. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms[J]. *Semin Cancer Biol*, 2002, 12(5):389-398.
- [55] Reik W, Lewis A. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals[J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(5):403-410.
- [56] Bestor TH. Transposons reanimated in mice[J]. *Cell*, 2005, 122(3):322-325.
- [57] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(1):6-21.
- [58] Bird A. The essentials of DNA methylation[J]. *Cell*, 1992, 70(1):5-8.
- [59] Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics[J]. *Trends Genet*, 2000, 16(4):168-174.
- [60] Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(21):9700-9704.
- [61] Herman JG, Merlo A, Mao L, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(20):4525-4530.
- [62] Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts[J]. *Nature*, 1983, 301(5895):89-92.
- [63] Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(2):107-116.
- [64] Felsenfeld G. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism[J]. *Nature*, 1992, 355(6357):219-224.
- [65] Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases[J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70:81-120.
- [66] Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, et al. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 983:84-100.
- [67] Brosnan CA, Voinnet O. The long and the short of noncoding RNAs[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(3):416-425.
- [68] Esteller M. Non-coding RNAs in human disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(12):861-874.
- [69] Knowling S, Morris KV. Non-coding RNA and antisense RNA. Nature's trash or treasure?[J]. *Biochimie*, 2011, 93(11):1922-1927.
- [70] Manikandan J, Aarthi JJ, Kumar SD, et al. Oncomirs: the potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer[J]. *Bioinformatics*, 2008, 2(8):330-334.
- [71] He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7):522-531.
- [72] Hummel R, Hussey DJ, Haier J. MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types[J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(2):298-311.
- [73] Gores GJ. Cholangiocarcinoma: current concepts and insights[J]. *Hepatology*, 2003, 37(5):961-969.
- [74] Wehbe H, Henson R, Meng F, et al. Interleukin-6 contributes to growth in cholangiocarcinoma cells by aberrant promoter methylation and gene expression[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(21):10517-10524.
- [75] Johnson C, Han Y, Hughart N, et al. Interleukin-6 and its receptor, key players in hepatobiliary inflammation and cancer[J]. *Transl Gastrointest Cancer*, 2012, 1(1):58-70.
- [76] Sirica AE. Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy[J]. *Hepatology*, 2005, 41(1):5-15.
- [77] Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, et al. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(1):184-190.
- [78] Jaiswal M, LaRusso NF, Shapiro RA, et al. Nitric oxide-mediated inhibition of DNA repair potentiates oxidative DNA damage in cholangiocytes[J]. *Gastroenterology*, 2001, 120(1):190-199.
- [79] Nzeako UC, Guicciardi ME, Yoon JH, et al. COX-2 inhibits Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells[J]. *Hepatology*, 2002, 35(3):552-559.
- [80] 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.
- [81] Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, et al. Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma[J]. *Gut*, 2003, 52(5):706-712.
- [82] Leone F, Cavalloni G, Pignochino Y, et al. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in bile duct and gallbladder carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(6):1680-1685.
- [83] Kiguchi K, Carbajal S, Chan K, et al. Constitutive expression of ErbB-2 in gallbladder epithelium results in development of adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(19):6971-6976.
- [84] Socoteanu MP, Mott F, Alpini G, et al. c-Met targeted therapy of cholangiocarcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(19):2990-2994.
- [85] Arora DS, Ramsdale J, Lodge JP, et al. p53 but not bcl-2 is expressed by most cholangiocarcinomas: a study of 28 cases[J]. *Histopathology*, 1999, 34(6):497-501.
- [86] Kang YK, Kim WH, Jang JJ. Expression of G1-S modulators (p53, p16, p27, cyclin D1, Rb) and Smad4/Dpc4 in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2002, 33(9):877-883.
- [87] 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.
- [88] Hassid VJ, Orlando FA, Awad ZT, et al. Genetic and molecular abnormalities in cholangiocarcinogenesis[J]. *Anticancer Res*, 2009,

- 29(4):1151-1156.
- [89] Terada T, Nakanuma Y, Sirica AE. Immunohistochemical demonstration of MET overexpression in human intrahepatic cholangiocarcinoma and in hepatolithiasis[J]. *Hum Pathol*, 1998, 29(2):175-180.
- [90] Miyamoto M, Ojima H, Iwasaki M, et al. Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(1):131-138.
- [91] Wosikowski K, Schuurhuis D, Johnson K, et al. Identification of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 pathway inhibitors by correlation with gene expression patterns[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89(20):1505-1515.
- [92] Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, et al. Expression and clinical significance of the erbB family in intrahepatic cholangiocellular carcinoma[J]. *Pathol Res Pract*, 2001, 197(2):95-100.
- [93] Ukita Y, Kato M, Terada T. Gene amplification and mRNA and protein overexpression of c-erbB-2 (HER-2/neu) in human intrahepatic cholangiocarcinoma as detected by fluorescence in situ hybridization, in situ hybridization, and immunohistochemistry[J]. *J Hepatol*, 2002, 36(6):780-785.
- [94] Sirica AE, Lai GH, Endo K, et al. Cyclooxygenase-2 and ERBB-2 in cholangiocarcinoma: potential therapeutic targets[J]. *Semin Liver Dis*, 2002, 22(3):303-313.
- [95] Lai GH, Zhang Z, Shen XN, et al. erbB-2/neu transformed rat cholangiocytes recapitulate key cellular and molecular features of human bile duct cancer[J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(6):2047-2057.
- [96] 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.
- [97] Harder J, Waiz O, Otto F, et al. EGFR and HER2 expression in advanced biliary tract cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(36):4511-4517.
- [98] Andersen JB, Spee B, Blechacz BR, et al. Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(4):1021-1031.
- [99] Levi S, Urbano-Ispizua A, Gill R, et al. Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique[J]. *Cancer Res*, 1991, 51(13):3497-3502.
- [100] Ohashi K, Tstsumi M, Nakajima Y, et al. Ki-ras point mutations and proliferation activity in biliary tract carcinomas[J]. *Br J Cancer*, 1996, 74(6):930-935.
- [101] Jin S, Levine AJ. The p53 functional circuit[J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 23):4139-4140.
- [102] Freed-Pastor WA, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins[J]. *Genes Dev*, 2012 26(12):1268-1286.
- [103] Washington K, Gottfried MR. Expression of p53 in adenocarcinoma of the gallbladder and bile ducts[J]. *Liver*, 1996, 16(2):99-104.
- [104] Khan SA, Thomas HC, Toledano MB, et al. p53 Mutations in human cholangiocarcinoma: a review[J]. *Liver Int*, 2005, 25(4):704-716.
- [105] Xiaofang L, Kun T, Shaoping Y, et al. Correlation between promoter methylation of p14(ARF), TMS1/ASC, and DAPK, and p53 mutation with prognosis in cholangiocarcinoma[J]. *World J Surg Oncol*, 2012 10:5. doi: 10.1186/1477-7819-10-5.
- [106] Heldin CH, Moustakas A. Role of Smads in TGFbeta signaling[J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(1):21-36.
- [107] Miyaki M, Kuroki T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306(4):799-804.
- [108] Argani P, Shaukat A, Kaushal M, et al. Differing rates of loss of DPC4 expression and of p53 overexpression among carcinomas of the proximal and distal bile ducts[J]. *Cancer*, 2001, 91(7):1332-1341.
- [109] Rijken AM, Hu J, Perlman EJ, et al. Genomic alterations in distal bile duct carcinoma by comparative genomic hybridization and karyotype analysis[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999, 26(3):185-191.
- [110] Polakis P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1332(3):F127-147.
- [111] Ichihashi N, Kitajima Y. Loss of heterozygosity of adenomatous polyposis coli gene in cutaneous tumors as determined by using polymerase chain reaction and paraffin section preparations[J]. *J Dermatol Sci*, 2000, 22(2):102-106.
- [112] Kawaki J, Miyazaki M, Ito H, et al. Allelic loss in human intrahepatic cholangiocarcinoma: correlation between chromosome 8p22 and tumor progression[J]. *Int J Cancer*, 2000, 88(2):228-231.
- [113] Andersen JB, Thorgeirsson SS. Genetic profiling of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2012, 28(3):266-272.
- [114] Isomoto H. Epigenetic alterations associated with cholangiocarcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(2):227-232.
- [115] Sandhu DS, Shire AM, Roberts LR. Epigenetic DNA hypermethylation in cholangiocarcinoma: potential roles in pathogenesis, diagnosis and identification of treatment targets[J]. *Liver Int*, 2008, 28(1):12-27.
- [116] Kim BH, Cho NY, Choi M, et al. Methylation profiles of multiple CpG island loci in extrahepatic cholangiocarcinoma versus those of intrahepatic cholangiocarcinomas[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2007, 131(6):923-930.
- [117] Lee S, Kim WH, Jung HY, et al. Aberrant CpG island methylation of multiple genes in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(3):1015-1022.
- [118] Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, et al. Genetic and epigenetic alterations of the INK4a-ARF pathway in cholangiocarcinoma[J]. *J*

- Pathol, 2002, 197(5):624-631.
- [119] 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.
- [120] 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(5):354-363.
- [121] Tozawa T, Tamura G, Honda T, et al. Promoter hypermethylation of DAP-kinase is associated with poor survival in primary biliary tract carcinoma patients[J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(9):736-740.
- [122] Ahrendt SA, Eisenberger CF, Yip L, et al. Chromosome 9p21 loss and p16 inactivation in primary sclerosing cholangitis-associated cholangiocarcinoma[J]. *J Surg Res*, 1999, 84(1):88-93.
- [123] Ishikawa A, Sasaki M, Sato Y, et al. Frequent p16ink4a inactivation is an early and frequent event of intraductal papillary neoplasm of the liver arising in hepatolithiasis[J]. *Hum Pathol*, 2004, 35(12):1505-1514.
- [124] Sasaki M, Yamaguchi J, Itatsu K, et al. Over-expression of polycomb group protein EZH2 relates to decreased expression of p16 INK4a in cholangiocarcinogenesis in hepatolithiasis[J]. *J Pathol*, 2008, 215(2):175-183.
- [125] Chinnasri P, Pairojkul C, Jearanaikoon P, et al. Preferentially different mechanisms of inactivation of 9p21 gene cluster in liver fluke-related cholangiocarcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2009, 40(6):817-826.
- [126] Wong N, Li L, Tsang K, et al. Frequent loss of chromosome 3p and hypermethylation of RASSF1A in cholangiocarcinoma[J]. *J Hepatol*, 2002, 37(5):633-639.
- [127] Tischoff I, Markwarth A, Witzigmann H, et al. Allele loss and epigenetic inactivation of 3p21.3 in malignant liver tumors[J]. *Int J Cancer*, 2005, 115(5):684-689.
- [128] Liu XF, Zhu SG, Zhang H, et al. The methylation status of the TMS1/ASC gene in cholangiocarcinoma and its clinical significance[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2006, 5(3):449-453.
- [129] Abraham SC, Lee JH, Boitnott JK, et al. Microsatellite instability in intraductal papillary neoplasms of the biliary tract[J]. *Mod Pathol*, 2002, 15(12):1309-1317.
- [130] Limpaiiboon T, Khaenam P, Chinnasri P, et al. Promoter hypermethylation is a major event of hMLH1 gene inactivation in liver fluke related cholangiocarcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2005, 217(2):213-219.
- [131] 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.
- [132] Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4[J]. *Nature*, 1993, 366(6456):704-707.
- [133] Silva J, Silva JM, Dominguez G, et al. Concomitant expression of p16INK4a and p14ARF in primary breast cancer and analysis of inactivation mechanisms[J]. *J Pathol*, 2003, 199(3):289-297.
- [134] Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways[J]. *Cell*, 1998, 92(6):725-734.
- [135] Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest[J]. *Nature*, 1994, 371(6494):257-261.
- [136] Maas AM, Bretz AC, Mack E, et al. Targeting p73 in cancer[J]. *Cancer Lett*, 2013, 332(2):229-236.
- [137] Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, et al. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(12):4309-4318.
- [138] Song MS, Song SJ, Ayad NG, et al. The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex[J]. *Nature Cell Biol*, 2004, 6(2):129-137.
- [139] Bae SC, Choi JK. Tumor suppressor activity of RUNX3[J]. *Oncogene*, 2004, 23(24):4336-4340.
- [140] Kim BH, Cho NY, Shin SH, et al. CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in premalignant lesion of extrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Virchows Archiv*, 2009, 455(4):343-351.
- [141] Shin SH, Lee K, Kim BH, et al. Bile-based detection of extrahepatic cholangiocarcinoma with quantitative DNA methylation markers and its high sensitivity[J]. *J Mol Diagn*, 2012, 14(3):256-263.
- [142] Liu XF, Kong FM, Xu Z, et al. Promoter hypermethylation of death-associated protein kinase gene in cholangiocarcinoma[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6(4):407-411.
- [143] Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy[J]. *Nature*, 2012, 481(7381):287-294.
- [144] Fleisher AS, Esteller M, Tamura G, et al. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia[J]. *Oncogene*, 2001, 20(3):329-335.
- [145] Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, et al. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(21):4836-4840.
- [146] Herman JG, Umar A, Polyak K, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(12):6870-6875.
- [147] Esteller M, Levine R, Baylin SB, et al. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas[J]. *Oncogene*, 1998, 17(18):2413-2417.
- [148] Liu D, Momoi H, Li L, et al. Microsatellite instability in thorotrast-



- induced human intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2002, 102(4):366-371.
- [149] Kohya N, Miyazaki K, Matsukura S, et al. Deficient expression of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase combined with mismatch-repair proteins hMLH1 and hMSH2 is related to poor prognosis in human biliary tract carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2002, 9(4):371-379.
- [150] Berthiaume EP, Wands J. The molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma[J]. *Semin Liver Dis*, 2004, 24(2):127-137.
- [151] Isomoto H, Kobayashi S, Werneburg NW, et al. Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells[J]. *Hepatology*, 2005, 42(6):1329-1338.
- [152] Croker BA, Krebs DL, Zhang JG, et al. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(6):540-545.
- [153] Chua HL, Bhat-Nakshatri P, Clare SE, et al. NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2[J]. *Oncogene*, 2007, 26(5):711-724.
- [154] Stemmler MP. Cadherins in development and cancer[J]. *Mol Biosyst*, 2008, 4(8):835-850.
- [155] Makrilia N, Kollias A, Manolopoulos L, et al. Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer[J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(10):1023-1037.
- [156] Kouraklis G, Theocharis S. Histone deacetylase inhibitors: a novel target of anticancer therapy[J]. *Oncol Rep*, 2006, 15(2):489-494.
- [157] Baradari V, Hopfner M, Huether A, et al. Histone deacetylase inhibitor MS-275 alone or combined with bortezomib or sorafenib exhibits strong antiproliferative action in human cholangiocarcinoma cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(33):4458-4466.
- [158] Xu LN, Wang X, Zou SQ. Effect of histone deacetylase inhibitor on proliferation of biliary tract cancer cell lines[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(16):2578-2581.
- [159] Bluethner T, Niederhagen M, Caca K, et al. Inhibition of histone deacetylase for the treatment of biliary tract cancer: a new effective pharmacological approach[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(35):4761-4770.
- [160] Morine Y, Shimada M, Iwahashi S, et al. Role of histone deacetylase expression in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Surgery*, 2012, 151(3):412-419.
- [161] Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(7):2113-2129.
- [162] Selaru FM, Olaru AV, Kan T, et al. MicroRNA-21 is overexpressed in human cholangiocarcinoma and regulates programmed cell death 4 and tissue inhibitor of metalloproteinase 3[J]. *Hepatology*, 2009, 49(5):1595-1601.
- [163] Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, et al. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis[J]. *Oncogene*, 2007, 26(42):6133-6140.
- [164] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. The MicroRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent STAT-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(11):8256-8264.
- [165] Meng F, Wehbe-Janek H, Henson R, et al. Epigenetic regulation of microRNA-370 by interleukin-6 in malignant human cholangiocytes[J]. *Oncogene*, 2008, 27(3):378-386.
- [166] Braconi C, Huang N, Patel T. MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes[J]. *Hepatology*, 2010, 51(3):881-890.
- [167] Zeng B, Li Z, Chen R, et al. Epigenetic regulation of miR-124 by Hepatitis C Virus core protein promotes migration and invasion of intrahepatic cholangiocarcinoma cells by targeting SMYD3[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(19):3271-3278.
- [168] Zhang J, Han C, Wu T. MicroRNA-26a promotes cholangiocarcinoma growth by activating  $\beta$ -catenin[J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(1):246-256.
- [169] 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.
- [170] Kawahigashi Y, Mishima T, Mizuguchi Y, et al. MicroRNA profiling of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines reveals biliary epithelial cell-specific microRNAs[J]. *J Nippon Med Sch*, 2009, 76(4):188-197.
- [171] 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.

(译者: 史肖华, 审校: 王强凤)

[该文原载于 *Ann Transl Med*, 2012, 1(3):28.]

本文引用格式: Maroni L, Pierantonelli I, Banales JM, 等. 遗传学在胆管细胞癌发展中的重要性[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(2):151-162. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.001

**Cite this article as:** Maroni L, Pierantonelli I, Banales JM, et al. The significance of genetics for cholangiocarcinoma development[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(2):151-162. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.001