

文章编号:1005-6947(2008)04-0385-03

· 文献综述 ·

胃癌腹膜转移的基础研究及其应用的新进展

王荣朝¹, 张岩松¹综述 XU Ning²审校

(1. 苏州大学附属第三医院 胃肠外科, 江苏 常州 213003; 2. Department of Clinical Chemistry Institute of Laboratory Medicine, University Hospital of Lund. S-221 85 Lund, Sweden)

摘要:腹膜转移在胃癌转移和复发中较为常见。近年来国内外对胃癌腹膜转移进行了大量的基础研究。笔者就胃癌腹膜高转移细胞系的建立、癌细胞的异质性、癌细胞与腹膜的相互关系及其临床应用等方面综述。
[中国普通外科杂志, 2008, 17(4): 385-387]

关键词: 胃肿瘤; 腹膜转移; 综述文献

中图分类号: R 735.2

文献标识码: A

约25%的胃癌患者在术前或术中即被诊断有腹膜转移,从而失去手术根治机会。对进展期胃癌即使实施了根治手术,术后也有40%~60%的患者发生腹膜转移。最终导致顽固性癌性腹水、肠道梗阻、恶液质,成为胃癌死亡的主要原因。如何有效预防、早期诊断和及时治疗腹膜转移是胃癌治疗领域的研究热点^[1]。尽管胃癌腹膜种植转移的机制目前尚未阐明,但“种子-土壤”学说比较认可。癌细胞通过多种途径脱落于腹腔内,形成所谓“种子”。当腹腔内存在具有生物活性的脱落癌细胞时,腹膜的形态即发生相应变化,加上由于手术剥离等机械性创伤,使腹膜间皮下组织裸露,即形成所谓的“土壤”。两者间的相互作用和其他细胞及化学因子共同促使腹膜转移的发生^[2]。随着分子生物学技术的发展,国内外学者围绕着种子和土壤的有关因素进行了大量基因水平的基础研究。笔者检索了近3年的文献共100余篇,其中有关基础研究占一

半。主要涉及胃癌腹膜高转移细胞系的建立、癌细胞的异质性、癌细胞与腹膜的相互关系及其临床应用。

1 胃癌腹膜高转移细胞系的建立

转移性瘤细胞系是肿瘤转移实验的最基本材料。因此,建立合适的,尤其是具有某些特点的转移性瘤细胞系是各有关实验室的重要工作之一。肿瘤细胞的体外培养建株难度大,成功率较低,对这方面专门描述的文献较少^[3]。Bai等^[4]利用人胃癌细胞系(GC9811)在裸小鼠体内反复接种建立一株具有腹膜高转移潜能的胃癌细胞系(GC9811-P)。用0.02%的EDTA和0.125%的胰蛋白酶联合消化对数生长期的GC9811细胞,用无血清的RPMI-1640培养液洗涤3次,制备成 1×10^7 细胞悬液,接种于裸鼠腹腔,3周后,裸鼠出现全身衰竭,此时收集其腹膜瘤结节行体外培养2~3代后,收集细胞再行裸鼠腹腔接种,用同样的方法重复4次,得到高转移细胞系GC9811-P₄。然后采用有限稀释法,在96孔板中将GC9811-P₄细胞稀释成每孔含0.5~1.0个细胞,次日在倒置显微镜下观察并挑选只含一个细胞的孔,待细胞增殖接近面积的1/3时,移至24孔板中扩大培养,得到胃癌腹膜高转移细胞株GC9811-P。后者细胞增殖指数增加,腹腔接种潜伏

期短、成瘤快,生长曲线属于无限细胞系曲线,细胞倍增时间较短。透视图显示含丰富的微绒毛、较多的线粒体,胞浆内有丰富的核糖体,可见核分裂相。体内外实验结果证实,GC9811-P较母本细胞系GC9811-P₄的体外侵袭能力强,腹膜转移率高。Yanagihara等^[5]用类似的方法建立了腹膜高转移潜能的胃癌细胞系44A₃, 58A₃1和58A₃9。此模型模拟了临床上胃癌细胞脱落入腹腔后的过程,为探究人胃癌腹膜转移机制及阻断其转移,提供了理想的细胞模型和裸鼠体内转移模型。

2 癌细胞的异质性 (tumor heterogeneity)

胃癌侵犯浆膜后,癌细胞可脱落入腹腔,且多具有较高的生物活性,是术后腹膜种植转移的主要原因。这些“优良”的种子,即腹腔游离癌细胞,往往是在多基因的协同作用下,生长分化出具有侵袭性的细胞亚群,才具备向远处浸润、转移的能力。Yanagihara等^[5]应用cDNA微阵列技术检测上述胃癌腹膜转移的细胞系的基因表达,发现在44A₃细胞中高表达的基因有MMP-1, Cathepsin L, nm23;在58A₃1和58A₃9细胞中高表达的基因有Cathepsin L, 内皮生长因子受体(EGFR), 肝细胞生长因子(HGF)及血管内皮生长因子(VEGF), dysadherin, CD44及Integrin

收稿日期: 2007-10-15;

修订日期: 2008-03-14。

作者简介: 王荣朝,男,苏州大学附属第三医院主任医师,主要从事胃肠道肿瘤方面的研究。

通讯作者: 张岩松 E-mail: feng-li7305@163.com

β4。Mori 等^[6]应用基因微阵列在 12 个胃癌细胞系中筛选腹膜转移相关基因,在细胞学证实腹腔转移的早期病例的腹腔冲洗液中以逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)验证,最后筛选出 5 个基因即 CK20, FABP1, MUC2, TFF1 和 TFF2;以巢式 RT-PCR 在 99 例微转移病例的腹腔冲洗液中检测以上 5 个基因,显示 91% ~ 100% 的特异性。新发现的胃癌腹膜转移因子能否在临床上起到较灵敏准确的诊断和预测作用,还有待临床验证。近年来新发现的基因也被引入胃癌领域进行研究,特别是在传导通路中的关键基因。Sakakura 等^[7]比较正常胃黏膜组织、胃癌原发灶和腹膜转移灶 Runx3 mRNA 的表达,发现胃癌原发灶和腹膜转移灶 Runx3 表达明显下调,以腹膜转移灶变化更为显著($P < 0.01$)。利用转染外源性 Runx3 胃癌细胞系 KATO-III 注入 BALB/c 裸鼠腹腔建立胃癌腹膜转移模型,结果转染组腹腔内极少有转移结节形成,所有动物存活超过 35 周,而对照组动物腹腔内有大量明显的转移结节形成,且均在 50 d 内死亡。因此认为 Runx3 基因的失表达与胃癌的腹膜转移发生有关,它可能通过其下游的信号转导因子、凋亡调节因子和粘附分子发挥作用^[8]。PRL-3 属于 PRL 家族,是新的一类蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)。Lee 等^[9]将人胃癌细胞株 SGC-7901 的 PRL-3 基因敲除后再种植入裸鼠的腹腔中,发现其腹膜转移的作用明显受抑制^[10]。PGP9.5 是泛素羧基末端羧化酶家族中的一员。其产物可引起细胞内某些活性蛋白的去泛素化增加,促进未分化的体细胞无序生长和繁殖,影响由泛素介导的泛素蛋白酶水解通路。Yamashita 等^[11]发现在弥漫型胃癌细胞中有 78% 发生 PGP9.5 甲基化,还有另 9 种基因同时甲基化如 FLJ21079, 锌指蛋白(zinc fringer protein RINZF), 甘氨酸脱氢酶(glycine dehydrogenase), LIM-6, nebulin, syntrophin $\alpha 1$, 载脂蛋白 E (apolipoprotein E), 根蛋白(radixin), FLJ21128。但它们是否在同一条传导通路上还有待研究。

3 腹膜相关的因素

包括腹腔游离癌细胞(FCC)在腹膜的种植,土壤的微环境-肿瘤血管的生长,以及土壤的气候环境-机体的免疫状态等等。

3.1 与腹膜细胞外基质相关的基因表达

临床实践已发现,腹腔内存在脱落癌细胞不一定均引起腹膜种植;而癌细胞能否与腹膜黏附是发生腹膜转移的先决条件。细胞黏附分子是细胞膜上的糖蛋白,介导细胞间及细胞与细胞外基质的选择性黏附,在腹膜转移中发挥重要作用。基质金属蛋白酶 MMPs 是近年来最受注目的一类蛋白水解酶,对其结构、功能及在多种肿瘤中的表达已有深入研究。目前倾向于金属蛋白酶抑制剂 TIMP 及其临床应用方面的研究。Miyagi 等^[12]将 TIMP-1 基因通过腺病毒转染至高腹膜转移的胃癌细胞株 MKN-45P 中,发现这些细胞接种裸鼠腹腔后并不形成腹膜转移。说明 TIMP-1 可以抑制胃癌的腹膜转移。Yoshikawa 等^[13]用酶联免疫方法检测 86 例胃癌手术标本,发现 TIMP-1 蛋白阳性占 31 例,该作者经过 5 年随访证实 TIMP-1 为独立的预后因子。Wang 等^[14]检测胃癌患者血液中 TIMP-1 蛋白,经过统计分析确定以 348.8ng/mL 为临界值。TIMP-1 阳性与否与肿瘤类型、有无淋巴转移无关,而与腹膜转移密切相关。

黏附分子表达异常有利于癌细胞的脱落和黏附于腹膜,在腹膜转移中有许多黏附分子参与其中。近年研究表明,上皮细胞间的黏附依赖于上皮钙黏附素(E-cadherin)系统。钙黏附素为单链跨膜糖蛋白,其在细胞外的氨基末端与相邻细胞的 E-cadherin 氨基末端在 Ca^{2+} 存在下形成“拉链样”结构,使细胞之间紧密连接。LI-钙黏附素是最近被定义为钙黏附素家族的一种蛋白质。但 Dong^[15]用 PCR 方法检测 74 例胃癌组织中的 LI-钙黏附素,发现其与腹膜转移无关,推测可能是胃癌转移的早期事件。而钙黏附素细胞内的羧基末端则通过连环素(catenin)间接地附着

于细胞骨架。 β -catenin 在上述黏附系统的构成和功能调节中起着重要作用。它不但连接 E-cadherin 形成 E-cadherin- β -catenin 功能复合体,成为 E-cadherin 黏附系统中的重要环节,而且也是 Wnt 途径信号传导过程中的关键环节,可改变细胞黏附复合物的活性,促进癌细胞的发生、发展、侵袭和转移^[16]。TC1 首先在甲状腺癌中被发现,其产物为 106 个氨基酸的蛋白质。近年来发现 TC1 是 Wnt 通路中的调控基因。Kim B^[17]发现 TC1 与 Wnt 通路中的相关基因 cyclin D1, MMP7, MMP14, CD44, C-Met 和 LAMC2 同时在胃癌细胞中表达,并首次证实 MMP14 是 LAMC 的酶激活剂。

3.2 与土壤的微环境-肿瘤血管的关系

肿瘤转移最终能否形成还取决于肿瘤细胞在继发部位是否能获得充足的血供。抗肿瘤血管生成剂在抑制肿瘤生长和转移中的作用正倍受关注,有些已进入临床试用阶段。SU6668 是一种新型血管生成抑制剂,可阻断 VEGF,血小板衍生生长因子(PDGF)等受体,从而阻断血管生成因子的合成和释放并拮抗其作用,能有效抑制肿瘤血管生成。Jiang 等^[18]利用原位种植人胃癌的裸鼠腹膜转移模型。移植后第 7 天开始,分别自腹腔注射生理盐水(对照组)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、SU6668 制剂、联合 5-FU 和 SU6668 制剂,每组各鼠给药,每日 1 次,共 6 周。发现 SU6668 组和 5-FU 加 SU6668 组胃癌生长和腹膜转移受到明显抑制。

3.3 机体的免疫状态与肿瘤的转移、预后有着密切的关系

肿瘤的腹膜转移可能与机体对肿瘤的免疫反应不强有密切关系。因此,免疫基因治疗腹膜转移成为关注的热点。共刺激分子 CD80 是 CD28 的配基,后者是诱导细胞免疫的重要分子。许多肿瘤包括胃癌 CD80 表达下降,导致免疫逃逸。CD80 联合白细胞介素 2 可刺激单核细胞的杀伤作用。Kosaka^[19]用 CD80 白细胞介素 2 联合基因转染有腹膜转移的动物,其生存时间为 46 d,而

单用 CD80 组为 37 d, 单用白细胞介素 2 组为 39 d, 对照组为 29 d。

4 存在问题及展望

尽管目前国内外大量实验与临床研究表明, 进展期胃癌腹膜转移早期预测的分子标志物候选者众多, 但迄今尚未找到一种公认的进展期胃癌腹膜转移早期预测的分子标志物, 临床上更是如此, 故仅能做辅助诊断参考指标之一。因此, 在筛选胃癌腹膜转移早期预测的分子标志物方面, 应加强基础和临床研究的联系, 着眼于高起点, 鼓励原创性研究, 加强多中心合作, 使基础研究的新成果能尽快过渡到临床应用, 以提高临床诊断水平, 指导胃癌亚临床转移的合理防治^[2]。但同时应注意基因治疗潜在的风险: 反转录病毒载体可将外源基因插入宿主基因组, 如果插入不当可能会破坏另一个基因表达或激活其他基因; 另外, 在实验操作时有可能将辅助病毒污染重组病毒, 造成病毒在宿主体内大量扩增^[20]。

参考文献:

[1] Yonemura Y, Banou E, Kawamura T, *et al.* Quantitative prognostic indicators of peritoneal dissemination of gastric cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2006, 32(6):602-606.

[2] 戴冬秋. 胃癌腹膜转移研究之策略[J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(9):1049-1051.

[3] 高进, 章静波. 癌的侵袭与转移基础与临床[M]. 北京: 科学出版社, 2003. 66-67.

[4] Bai FH, Guo X, Yang L, *et al.* Establishment and characterization of a high metastatic potential in the peritoneum for human gastric cancer by orthotopic tumor cell implantation[J]. *Dig Dis Sci*, 2007, 52(6):1571-1578.

[5] Yanagihara K, Takigahira M, Tana-

ka H, *et al.* Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhous stomach cancer[J]. *Cancer Sci*, 2005, 96(6):323-332.

[6] Mori K, Aoyagi K, Ueda T, *et al.* Highly specific marker genes for detecting minimal gastric cancer cells in cytology negative peritoneal washings[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(4):931-937.

[7] Sakakura C, Hasegawa K, Miyagawa K, *et al.* Possible involvement of RUNX3 silencing in the peritoneal metastases of gastric cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(18):6479-6488.

[8] Matter WF, Estridge T, Zhang C, *et al.* Role of PRL-3, a human muscle-specific tyrosine phosphatase, in angiotensin-II signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 283(5):1061-1068.

[9] Lee YM, Lee JY, Kim MJ, *et al.* Hypomethylation of the protein gene product 9.5 promoter region in gallbladder cancer and its relationship with clinicopathological features[J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(11):1205-1209.

[10] Maudelker DL, Yamashita K, Tokumaru Y, *et al.* PGP9.5 promoter methylation is an independent prognostic factor for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(11):4936-4938.

[11] Yamashita K, Park HL, Kim MS, *et al.* PGP9.5 methylation in diffuse-type gastric cancer[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(7):3921-3927.

[12] Miyagi M, Aoyagi K, Kato S, *et al.* The TIMP-1 gene transferred through adenovirus mediation shows a suppressive effect on peritoneal me-

tastases from gastric cancer[J]. *Int J Clin*, 2007, 12(1):17-24.

[13] Yoshikawa T, Tsuburaya A, Kobayashi O, *et al.* Protein levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in tumor extracts as a marker for prognosis and recurrence in patients with gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2006, 9(2):106-113.

[14] Wang CS, Wu TL, Tsao KC, *et al.* Serum TIMP-1 in gastric cancer patients: a potential prognostic biomarker[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2006, 36(1):23-30.

[15] Dong W, Yu O, Xu Y. Altered expression of a Li-cadherin in gastric cancer and intestinal metaplasia[J]. *Dig Dis Sci*, 2007, 52(2):536-542.

[16] Wong NA, Dignatelli M. Beta-catenin in colorectal carcinogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(2):389-401.

[17] Kim B, Koo H, Yang S, *et al.* TC1 (C8orf4) correlates with Wnt/beta-catenin target genes and aggressive biological behavior in gastric cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(11 Pt 1):3541-3548.

[18] Jiang XT, Tao HQ, Zou SC. Effect of angiogenesis inhibitor SU6668 on the growth and metastasis of gastric cancer in SCID mice[J]. *Chinese Journal Of Gastrointestinal Surgery*, 2006, 9(4):335-337.

[19] Kosaka K, Yashiro M, Sakate Y, *et al.* Synergistic antitumor effect of interleukin-2 addition with CD80 immunogene therapy for peritoneal metastasis of gastric carcinoma[J]. *Dig Dis Sci*, 2007, 3:125-131.

[20] 李正荣, 詹文华. 胃癌腹膜转移的治疗进展[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2006, 9(5):464-466.