

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01315

· 专题报道 ·

肾细胞癌进化发育中的关键分子事件

刘岩¹, 谭晓洁^{1*}, 苏彤¹, 杜琰¹, 侯建国², 曹广文¹

1. 第二军医大学热带医学与公共卫生学系流行病学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

[摘要] 癌症的进化发育过程“肿瘤从癌前病变发展到早期原位癌,再到转移性癌的每一步都伴随着体细胞在承受肿瘤微环境的选择压力下的不断突变、亚克隆的筛选”,体现了达尔文进化论的基本观点“遗传变异、自然选择、适者生存”。肿瘤异质性是癌症的重要特征,也是癌症进化发育的具体表现。肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是泌尿系统常见肿瘤,近些年发病率持续增长。由于RCC是少见的对放疗和化疗均不敏感的实体瘤,实施系统靶向治疗是治疗晚期RCC患者的主要手段。本文主要综述了RCC进化发育过程中的重要分子事件,从患者间的个体差异以及肿瘤内部两方面体现了RCC的高度异质性特征。阐明由这些重要分子事件组成的RCC进化发育特征,是挖掘特异性RCC早期诊断标志物以及尽早人群中开展个体化治疗的必经之路。

[关键词] 肾细胞癌;进化;遗传异质性;靶向治疗

[中图分类号] 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)12-1315-05

Key molecular events in renal carcinogenesis

LIU Yan¹, TAN Xiao-jie^{1*}, SU Tong¹, DU Yan¹, HOU Jian-guo², CAO Guang-wen¹

1. Department of Epidemiology, Faculty of Tropical Medicine and Public Health, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Darwin's Theory of Evolution; inherited variation, natural selection and adaption to survive in the environment is vividly manifested by the process of cancer cell evolution. For each step from precancerous lesion to cancer *in situ* and metastasis, cancer cells continuously mutate and subclones are selected by the pressure from tumor microenvironment. Cancer is characterized by heterogeneity, which is also a reflection of cancer cell evolution. Renal cell carcinoma (RCC) is one of the most common tumors in urinary system and the incidence rate of RCC is rising in recent years. Because RCC is not sensitive to radiotherapy or chemotherapy, systemic targeted therapy is the only option for patients with advanced RCC. This paper reviews the significant molecular events during the evolution of RCC, revealing the high heterogeneity of RCC both in different patients and in the tumor itself. Understanding the characteristics of RCC evolution is a must to search specific molecular markers for early diagnosis and for practice of individualized therapy.

[Key words] renal cell carcinoma; evolution; genetic heterogeneity; targeted therapy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(12):1315-1319]

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是我国泌尿系统肿瘤中发病率仅次于膀胱癌的常见恶性肿瘤。近年来,RCC发病率持续增长^[1],男性发病率高于女性,男性50岁、女性55岁以后RCC发病率迅速增加。虽然RCC整体生存情况较好,5年生存率可达70%^[2],但即便RCC患者行根治术后,仍有25%~30%的患者预后不良、发生远处转移。RCC

是少见的对放疗和化疗均不敏感的实体瘤,对以白细胞介素-2和干扰素为基础的免疫治疗应答率只有20%左右。因此实施系统靶向治疗是治疗晚期RCC患者的主要手段。RCC是高度异质性的肿瘤,根据达尔文进化论的基本观点“遗传变异、自然选择、适者生存”,癌细胞在进化发育过程中也存在优胜劣汰的过程:在肿瘤微环境的压力下,具有不同能力的突

[收稿日期] 2014-09-23 **[接受日期]** 2014-10-25

[基金项目] 国家自然科学基金(81101928)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81101928)

[作者简介] 刘岩,助教。E-mail: verayanliuyan@163.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81871061, E-mail: xjtan2013@aliyun.com

变癌细胞亚克隆被选择出来,由此维持着整个实体瘤的生存、持续扩张、浸润甚至远处播散。这种异质性不仅体现在不同 RCC 个体诊断、治疗、预后间的差异性上,而且体现在每个 RCC 个体实体瘤内部亚克隆表型的差异上。以肿瘤的进化发育理论为基础,探讨 RCC 个体间及个体内的肿瘤异质性,是阐明 RCC 恶性进展机制的关键步骤,是切实开展个体化治疗的必经之路。

1 RCC 患者个体间异质性规律

RCC 患者个体间的异质性规律,即 RCC 的进化发育,贯穿于 RCC 发生发展、转移、转归的各个阶段。

1.1 RCC 发生的分子机制 RCC 是起源于肾皮质的高度异质性肿瘤^[3],主要病理类型有肾透明细胞癌(ccRCC,75%~80%)、乳头状 RCC(10%~15%)等。ccRCC 中 50% 的患者发生 *VHL* 基因突变,近些年来大规模外显子测序技术陆续发现了新的中国人 RCC 发生相关基因,如 *PBRM1*^[4] 和 *BAP1*^[5] 等。乳头状 RCC 主要与 *c-Met* 癌基因突变有关,当 *MET* 基因过度激活可使细胞增殖分化调节紊乱,诱发血管形成和增加细胞运动性,从而促进肿瘤的形成和生长。除了经典的 *VHL*-*HIF* 信号通路变化,主要参与 ccRCC 发病的还包括 *Notch*^[6]、核因子 B (*NF-B*)^[7]、*MAPK*^[8]、*PI3K/Akt*^[9] 等通路的异常活化。在我们的研究中,首次确定了谷胱甘肽 S-转移酶 μ 3(*GSTM3*)、*CYR61*、*SLC15A1*、*AV722783* 为新的 ccRCC 肿瘤抑制基因^[10]。DNA 启动子甲基化造成的基因沉默与 RCC 发生密切相关,我们在 ccRCC 中检测到 *GSTM3* 启动子区 CpG 岛甲基化会降低该基因的表达,并已初步筛选出 ccRCC 中 *GSTM3* 基因启动子区 CpG 岛甲基化位点^[11]。我们还发现 ccRCC 组织中存在 2 种新型的转录因子 19(*TCF19*) 的替换剪接异构体(*TCF19-1*、*TCF19-3*)。通过实时荧光定量 PCR 检测证实这 2 种异构体在癌和癌旁组织中均表达,但 *TCF19-1* 在原发癌组织中表达率高于癌旁组织,而 *TCF19-3* 在癌旁组织中的表达率与原发癌组织相似,提示 *TCF19-1* 的表达可能与 ccRCC 的发生有关^[12]。应用免疫组化分析等方法,我们首次发现 *PTPRD* 基因在 ccRCC 起源的部位即正常肾组织近曲小管肾上皮细胞中表达,而在 ccRCC 肿瘤组织中显著下降^[13]。由此提示 *PTPRD*

基因是 ccRCC 发生的抑癌基因,是潜在的 ccRCC 治疗靶点。上述的这些研究丰富了我们对于 RCC 发病分子机制的认识。此外,我们通过病例-对照研究发现,体质指数 BMI(≥ 25 kg/m²)、高血压病史和肾结石病史是 ccRCC 的主要危险因素;而饮用绿茶(≥ 500 mL/d)则是 ccRCC 的保护因素^[14]。据此建立稳定的 RCC 高危人群队列,如 45 岁以上的高血压患者、尿结石患者等,进行长期的跟踪随访并采取必要的干预措施,可使高危人群预防 RCC 发生获得明显改善。

在遗传易感性方面,我们的研究首次发现在白种人中与肿瘤易感性相关基因 *CYP1A1m4* 的遗传多态性位点(rs1799814)在中国人中并不存在;同时 *CYP1A1* (rs4646903、rs1048943)、*NAT2* (rs1799929、rs1799930、rs1799931) 及 *GSTM1* (rs1695) 在 ccRCC 组和健康对照组中的多态性分布的差异性没有统计学意义,提示这些代谢酶基因遗传多态性对中国人 RCC 危险因素的贡献率较低^[14],而一组位于 *EPAS1*、*PTPRD* 等基因的 ccRCC 遗传多态性位点(rs1867785、rs7105934、rs4765623、rs7579899、rs2279776) 在判定个体 ccRCC 易感性方面具有重要参考价值^[15]。通过表达谱芯片发现的抑癌基因 *GSTM3* 在癌旁正常组织、原位癌组织、转移癌组织中的表达依次降低^[10],其低表达机制可能与位于其启动子区域的 rs1332018 位点的等位基因 C 有关。病例-对照研究显示,rs1332018 基因型 AC+CC 与 RCC 发生风险相关且有统计学意义,COX 回归分析也证明 rs1332018 基因型 AC+CC 是影响 RCC 患者术后的独立危险因素^[16],由此提示 rs1332018 基因型是贯穿 RCC 发生发展预后的关键事件,在 RCC 的进化发育中起到了关键作用。

1.2 RCC 的早期诊断 早期筛查是实施肿瘤二级预防的主要手段,是争取早期诊断、早期治疗、防止或减缓疾病发展的主要措施。由于 RCC 的起病较为隐匿,没有明显的癌前期病变,患者诊断时已处于疾病的临床期。此时癌细胞累积的突变较多,在环境压力下已通过进化筛选出较为恶性的克隆,因此难以明确 RCC 的早期分子事件,这也是 RCC 至今仍无特异性的早期诊断分子靶标的原因之一。一方面,通过建立稳定的 RCC 高危人群队列,长期跟踪观察人群中 RCC 的发生、发展、预后等情况,对于挖

掘特异性的 RCC 早期诊断标志物可能更加有效,这对于研究验证 RCC 进化发育的关键分子事件也是必不可少的。另一方面,目前国际上针对部分肿瘤没有特异性的诊断标志物的情况,采用富含关键基因的基因表达谱进行预测,可能比单个基因的预测效果要好,灵敏度及特异度均有所提高^[17]。

1.3 RCC 转移、预后的异质性规律 在转移灶中,新的肿瘤微环境给转移灶肿瘤带来新的选择压力,同时又伴随着转移这个过程本身赋予转移肿瘤细胞的选择压力,这为转移灶和原发灶基因型的不同找到了合理的解释。自 1994 年以来,我们教研室先后建立系列中国人 ccRCC 细胞系,包括早期汉族人 ccRCC 细胞株、人高转移性 ccRCC 细胞株、低转移性 ccRCC 细胞株^[7]和肾肉瘤样癌细胞株,及 RCC 原位移植动物模型。高转移性 ccRCC 细胞株的 NF- κ B 通路的激活水平明显较低转移性 ccRCC 细胞株高,提示 NF- κ B 通路引起的炎症反应不仅参与了 RCC 的发生,而且参与了 RCC 的恶性进展。以上研究获得了中国人系列 RCC 细胞株和建立的 RCC 转移模型,为研究中国人 RCC 发生和转移的分子机制、探索我国 RCC 发生和转移分子标志和治疗靶标奠定了物质基础和技术储备。

我们应用 cDNA microarray 方法筛查不同转移潜能原代培养 ccRCC 细胞之间差异表达基因,结合一系列数据挖掘的方法,最终发现一组潜在的与 RCC 转移相关的新基因 *FSTL1*、*AV722783*、*GSTM3*、*SLC15A1*、*DDX17*、*ORC2L* 和 *PKMYT1* 等。以非转移性 ccRCC 组织表达谱为对照,转移性 ccRCC 组织中上调表达的基因有 *PKMYT1* 和 *ORC2L* 等,下调表达的基因有 *FSTL1*、*GSTM3*、*SLC15A1* 和 *AV722783* 等。我们在原位癌与癌旁组织的差异表达分析中,也获得类似的表达趋势。因此这些基因可能与 ccRCC 发生、发展密切相关,是 RCC 进化发育的关键分子事件^[10]。

影响 RCC 预后的最主要因素是病理分期,但同一分期患者间的预后仍存在较大的差异,因此需要建立完善的预后预测模型。通过研究基因进化的差异可引入新的分子标志,进一步提高预测模型的预测效能。我们在筛查 RCC 中染色体 3p、9p、14q 的微卫星不稳定(MSI)及杂合性缺失(LOH)中发现,D9S168 位点的 MSI 及 LOH 与 RCC 患者预后不良

有关。D9S168 的微卫星改变普遍存在于高分期肿瘤中,存在 D9S168 微卫星改变的患者预后较差,其中 D9S168 位点 LOH 患者的预后更差,COX 回归分析结果证实 D9S168 是与肿瘤死亡相关的独立危险因素^[12]。其机制可能是由于 D9S168 位于抑癌基因 *PTPRD* 内,它的多态性影响了 *PTPRD* 的表达,进而显著影响患者预后^[13]。

1.4 RCC 的免疫治疗 由于 RCC 对化疗和放疗均不敏感,对于晚期 RCC 患者,免疫治疗方法被寄予了希望,如细胞因子白介素-2 和干扰素 α 是目前临床上治疗 RCC 的主要生物免疫制剂。此外还有自体细胞免疫疗法,该方法是从患者体内提取部分免疫细胞,体外进行培养、诱导、激活,再把这些抗肿瘤细胞回输到患者体内杀灭肿瘤细胞。尽管免疫疗法暂时对一部分 RCC 患者有治疗效果,但部分 RCC 细胞克隆已经进化到具备逃避免疫监测的能力,最终导致免疫治疗失败。RCC 细胞这种逃避免疫治疗的过程,实质上反映了肿瘤细胞进化发育的过程是:只有适应来自肿瘤微环境免疫压力的亚克隆才能不被淘汰,这些亚克隆增殖扩张最终导致患者对免疫疗法的逃逸免疫。在 Seliger 的综述中从三个方面归纳解释了免疫逃逸的机制:(1)改变肿瘤细胞自身,从而使得肿瘤细胞不被免疫系统识别,例如下调肿瘤细胞表面的主要组织相容性复合物 I 类抗原(MHC I),使得细胞毒性 T 细胞不能识别肿瘤,从而减轻免疫细胞对肿瘤的杀伤作用。(2)改变肿瘤微环境,例如改变环境中的细胞因子种类和数量,可促进肿瘤细胞的免疫逃逸和继续生长。(3)破坏肿瘤微环境中的免疫细胞的功能,降低周围环境的免疫压力^[18]。肿瘤细胞还可以诱导能够抑制免疫反应的细胞如 Tregs 的增殖。与正常人群相比,RCC 患者外周血中 Treg 较高^[18]。为了探索免疫治疗抗肿瘤机制,我们采用 Whiteside 方法从临床 ccRCC 组织中成功分离到浸润性淋巴细胞(TIL),体外联合白介素-2 培养,结果表明白介素-2 激活的 TIL 具有杀伤肿瘤活性,且对自体肿瘤细胞的杀伤活性更强^[19-20]。以白介素-2 为基础的免疫治疗对 ccRCC 的杀伤活性主要由 T 淋巴细胞介导。TIL 在肿瘤原位长期受 ccRCC 相关抗原致敏,是活化型 TIL 对 ccRCC 造成特异性杀伤能力的重要原因之一。TIL 抗肿瘤能力与自分泌免疫调节细胞因子能力相关且

有统计学意义。TIL 分泌免疫调节细胞因子是活化型 TIL 的标志之一。白介素-2 和干扰素 β 只有在肿瘤-免疫微环境中才明显提高 TIL 抗肿瘤活性。

2 RCC 个体内异质性规律

近期,英国伦敦癌症研究所的 Gerlinger 博士及其研究小组,采用多点外显子深度测序的方法探索 RCC 患者的基因架构及肿瘤进化轨迹^[21-22],结果发现,随着分析的活检组织数目的增加,肿瘤内异质性的程度也随之增强。同一 RCC 患者体内,不同区域(原发灶组织,转移灶组织)、不同时间点(化疗前、化疗后)肿瘤的突变谱均显著不同。以上结果充分证实了实体瘤内部高度异质性,同时也说明肿瘤在环境压力下不断进化。

由于许多突变在同一患者不同区域的肿瘤组织样本中并不普遍存在,即在同一患者体内不同区域的肿瘤组织其突变情况是不同的,提示在进行靶向治疗时,需要进行多位点采样分析。该小组绘制的分枝状肿瘤进化模式图强调了针对那些普遍存在系统树主干上的变异进行靶向治疗的重要性,例如 *VHL*、*PBRM1* 和 *SETD2* 这些与 RCC 发生发展重要相关的体细胞基因即位于染色体 3p 上,靶向针对进化树主干上的关键变异事件有可能降低个体间治疗效果的差异,从而提高 RCC 临床治疗效果的普遍性。由此可见,将癌症进化的观念引入到 RCC 的靶向治疗上,有可能将靶向治疗推向一个新的高度,即直接遵循肿瘤的进化适应轨迹,从而设计干扰以减慢或负向调控癌症进化,最终预防或延缓癌症患者的死亡,达到使致死的癌症转变为慢性疾病的目的。

3 结 语

由于基因的不稳定性赋予肿瘤干细胞的遗传变异,为肿瘤细胞选择免疫逃逸提供了基础,因此,尽管在癌症治疗方面已经取得了较大的进展,但如何有效地控制或消除一些晚期或已转移的恶性肿瘤,仍是人类面临的一大挑战。阐明癌症多样化克隆的动态变化和选择的分子机制是理解肿瘤进展和治疗反应异同的关键,在指导癌症靶向治疗和个体化治疗、降低病死率方面具有实际意义。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] King S C, Pollack L A, Li J, King J B, Master V A. Continued increase in incidence of renal cell carcinoma, especially in young patients and high grade disease; United States 2001 to 2010 [J]. *J Urol*, 2014, 191: 1665-1670.
- [2] 韩雪, 黄辰曦, 赵佳, 谭晓洁, 侯建国, 张宏伟, 等. 2002-2012年上海市杨浦区社区人群肾细胞癌发病和生存情况分析[J]. *第二军医大学学报*, 2014, 35: 8-13.
Han X, Huang C X, Zhao J, Tan X J, Hou J G, Zhang H W, et al. Incidence and survival analysis of renal cell carcinoma patients among permanent residents in Yangpu district of Shanghai during 2002-2012 [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2014, 35: 8-13
- [3] Thoenes W, Storkel S, Rumpelt H J. Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics [J]. *Pathol Res Pract*, 1986, 181: 125-143.
- [4] Xu X, Hou Y, Yin X, Bao L, Tang A, Song L, et al. Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor [J]. *Cell*, 2012, 148: 886-895.
- [5] Pena-Llopis S, Vega-Rubin-de-Celis S, Liao A, Leng N, Pavia-Jimenez A, Wang S, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma [J]. *Nat Genet*, 2012, 44: 751-759.
- [6] Sjolund J, Johansson M, Manna S, Norin C, Pietras A, Beckman S, et al. Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118: 217-228.
- [7] Tan X, He S, Han Y, Yu Y, Xiao J, Xu D, et al. Establishment and characterization of clear cell renal cell carcinoma cell lines with different metastatic potential from Chinese patients [J]. *Cancer Cell Int*, 2013, 13: 20.
- [8] Huang D, Ding Y, Luo W M, Bender S, Qian C N, Kort E, et al. Inhibition of MAPK kinase signaling pathways suppressed renal cell carcinoma growth and angiogenesis *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 81-88.
- [9] Sourbier C, Lindner V, Lang H, Agouni A, Schordan E, Danilin S, et al. The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy [J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 5130-5142.
- [10] Tan X, Zhai Y, Chang W, Hou J, He S, Lin L, et al.

- Global analysis of metastasis-associated gene expression in primary cultures from clinical specimens of clear-cell renal-cell carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123: 1080-1088.
- [11] 武 旗,侯建国,杜稳斌,常文军,翟羽佳,林丽萍,等. 肾透明细胞癌中谷胱甘肽 S-转移酶 M3 基因的表达及其启动子区 CpG 岛的甲基化水平[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29: 1273-1278.
- Wu Q, Hou J G, Du W B, Chang W J, Zhai Y J, Lin L P, et al. Expression of glutathione S-transferase M3 in clear cell renal cell carcinoma and its promoter CpG methylation[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2008, 29: 1273-1278.
- [12] 钱 涛,林丽萍,常文军,曹廷虎,徐兴兴,杨印辉,等. 肾透明细胞癌组织中转录因子 19 基因选择性剪接异构体的类型和表达特点[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31: 706-710.
- Qian T, Lin L P, Chang W J, Cao T H, Xu X X, Yang Y H, et al. Types of alternative splice variants of transcription factor 19 and their expression patterns in clear cell renal cell carcinoma tissues[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2010, 31: 706-710.
- [13] Li X, Tan X, Yu Y, Chen H, Chang W, Hou J, et al. D9S168 microsatellite alteration predicts a poor prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma and correlates with the down-regulation of protein tyrosine phosphatase receptor delta[J]. *Cancer*, 2011, 117: 4201-4211.
- [14] Wang G, Hou J, Ma L, Xie J, Yin J, Xu D, et al. Risk factor for clear cell renal cell carcinoma in Chinese population: a case-control study [J]. *Cancer Epidemiol*, 2012, 36: 177-182.
- [15] Du Y, Su T, Tan X, Li X, Xie J, Wang G, et al. Polymorphism in protein tyrosine phosphatase receptor delta is associated with the risk of clear cell renal cell carcinoma [J]. *Gene*, 2013, 512: 64-69.
- [16] Tan X, Wang Y, Han Y, Chang W, Su T, Hou J, et al. Genetic variation in the GSTM3 promoter confer risk and prognosis of renal cell carcinoma by reducing gene expression[J]. *Br J Cancer*, 2013, 109: 3105-3115.
- [17] Borisov N M, Terekhanova N V, Aliper A M, Venkova L S, Smirnov P Y, Roumiantsev S, et al. Signaling pathway activation profiles make better markers of cancer than expression of individual genes [J]. *Oncotarget*, 2014, 5: 10198-10205.
- [18] Seliger B. Immune escape mechanisms of renal cell carcinoma[J]. *Eur Urol Suppl*, 2007, 6: 616-622.
- [19] 侯建国,曹广文,李光辉,钱松溪,夏广彬,廖国强,等. 联合应用 TIL 和 IL-2 治疗 RCC[J]. 中华泌尿外科杂志, 1996, 17: 279-281.
- [20] 侯建国,曹广文,李光辉,钱松溪,杨文国,吴宗娣,等. 肾细胞癌浸润淋巴细胞的杀伤肿瘤活性测定及表型分析[J]. 中华泌尿外科杂志, 1996, 17: 73-76.
- [21] Gerlinger M, Rowan A J, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366: 883-892.
- [22] Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan A J, Salm M P, Varela I, et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing[J]. *Nat Genet*, 2014, 46: 225-233.

[本文编辑] 尹 茶