

临床肿瘤疾病诊疗应用

(下)

王丽萍等◎主编

第六章 胃肿瘤

第六章 胃肿瘤

第一节 胃肿瘤的分子病理学

一、概述

由于当前分子肿瘤学的迅速发展,像其他肿瘤一样,胃肿瘤在分子水平上,如脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)和蛋白质水平等方面的研究已经非常广泛和深入。研究发现,许多基因异常在癌变过程中起着关键作用。虽然详细的机制还不太清楚,原癌基因功能的获得和抑癌基因功能的丢失,被认为是肿瘤产生的两个主要原因。

原癌基因的改变涉及基因扩增、突变和易位等,而抑癌基因的改变通常与基因缺失、突变和甲基化有关。这些基因的改变不仅与肿瘤的发生发展有关,而且在临床中是非常有用的生物标志物,可用于肿瘤诊断、预后和疗效的预测;未来肿瘤的个体化治疗也将取决于个体的基因特征。

90%以上的胃肿瘤为上皮细胞起源的癌,原发性胃淋巴瘤居胃恶性肿瘤的第二位,而间叶性肿瘤和神经内分泌肿瘤则较少见。

基因改变的分布和模式在癌和肉瘤或淋巴瘤中各异。同一种癌可以有多种基因改变,例如胃癌可以出现 E 钙粘附蛋白基因突变、表皮生长因子受体(EGFR)基因扩增和/或多体性及 p53 基因缺失和/或甲基化改变等。相反,单一基因改变也可在不同的癌中看到,如 p53 突变可以发生在乳腺癌、结肠癌、肺癌及胰腺癌等。此外,在癌中基因改变的频率通常较低(一般<50%)。正因为缺少器官特异性和发生频率较低,所以基因改变很少被用于癌的诊断,不过可用于预测肿瘤预后和疗效。例如,伴有 CND1 基因突变的胃癌通常为弥漫型胃癌且预后不良。

与癌不同,软组织肉瘤的基因改变通常更为特异,且发生频率也更高。例如,>95%的滑膜肉瘤有特异的染色体易位 t(X;18)(p11;q11)和独特的 SYT-SSX1 或 SYT-SSX2 融合基因。尽管肉瘤并不像癌那样常见,但与易位相关的融合基因却是诊断软组织肉瘤理想的生物标志物。

与肉瘤一样,淋巴瘤和白血病通常也有一些特殊的染色体易位。例如,套细胞淋巴瘤具有特征性的染色体易位 t(11;14)(q13;q32),该易位导致 IGH-CCND1 基因融合,其频率>90%。该易位为一理想的生物标志物,不仅可用于诊断,而且也可用于预测预后及疗效。

最近的研究表明,癌与肉瘤或淋巴瘤同样存在基因融合。例如与染色体易位或缺失相关的 TMPRSS2 基因融合已被发现在前列腺癌中,并有较高的特异性,其发生频率约为 60%。但目前尚不清楚胃癌是否也有特定的融合基因。

本章将讨论遗传性肿瘤综合征的遗传学改变、散发性胃肿瘤的遗传学改变、临床实验室中常用的分子生物学技术及其未来的发展趋势。

(一)遗传性肿瘤综合征的遗传学改变

胃是常见的多种遗传性肿瘤综合征累及的器官之一。本部分论及的遗传性肿瘤综合征

包括:幼年性息肉病综合征(JPS)、Peutz-Jeghers 综合征(PJS)、遗传性弥漫型胃癌(HDGC)、家族性腺瘤性息肉病(FAP)及遗传性非息肉病性结直肠癌综合征(HNPCC)(表 6-1)。

表 6-1 遗传性肿瘤综合征概览

综合征	发病率	遗传方式	累及基因(染色体定位)	常见的遗传学改变	检测方法
JPS	1/100000~ 1/160000	常染色体 显性遗传	SMAD4(18q21.1)BMPR1A (10q22.3)PTEN(10q23.3)	缺失,插入, 错义及无义突变	DNA 测序,MLPA
PJS	1/29000~ 1/120000	常染色体 显性遗传	STK11/LKB1(19p13.3)	插入,错义突变 和剪切变异	DNA 测序,MLPA
HDGC	约占胃癌 总数的 10%	常染色体 显性遗传	CDH1(16q22.1)	移码突变和错义突变	DNA 测序
FAP	2~3/100000	常染色体 显性遗传	APC(5q21)	移码突变,错义 突变和无义突变, 缺失和复制	蛋白截断,连锁 分析,DNA 测序
HNPCC	占结肠癌的 1%~3%	常染色体 显性遗传	MLH1MSH2,MSH6, PMS2,MSH3	缺失和复制	免疫组化,MSI, MLPA 和 DNA 测序

DNA,核糖核酸;HNPCC,遗传性非息肉病性结直肠癌综合征;MLPA,多重连接依赖探针扩增技术;MSI,微卫星不稳定性

1. 幼年性息肉病综合征 JPS 是一种常染色体显性遗传疾病,息肉常发生于胃或结肠中,发病率为 1/100000~1/160000。发生在婴儿期 JPS 其病变往往累及整个消化道,预后很差。虽然有些 JPS 患者直到 30 岁以后才被诊断出来,但大多数 JPS 患者 20 岁时就有明显症状。常见的症状包括消化道出血、贫血、腹泻和腹痛。临床上符合以下任一条件即可诊断为 JPS:

- (1)结直肠幼年性息肉>5 个。
- (2)上下消化道存在多个幼年性息肉。
- (3)存在任意数量的幼年性息肉并有幼年性息肉病家族史。

JPS 的息肉通常为错构瘤性息肉(幼年性息肉),源于正常存在于该部位中的组织成分的异常集聚 JPS 显示为上皮组织形态正常,间质致密伴炎性浸润,固有层内见充满黏液的囊性腺体。大约 30%的 JPS 患者可伴有上皮的异型增生,其终身恶性肿瘤发生率为 9%~50%不等。有胃息肉的 JPS 患者胃癌的发病率为 21%。早期检测 JPS 基因突变有助于提供更好的息肉治疗方法及对高危个体进行监测。JPS 患者中基因 SMAD4(18q21.1),BMPR1a(10q22.3)和 PTEN(10q23.3)改变的发生率分别为 22%,25%和 5%。

伴有 SMAD4 突变的 JPS 患者通常比伴有 BMPR1A 突变或没有已知基因改变的 JPS 患者更有可能存在上消化道息肉的家族病史。有 SMAD4 或突变的个体其下消化道息肉常常>10 个,且更可能有胃肠道癌家族史。目前一些三级医疗中心或商业实验室已开展 SMAD4 和 BMPR1a 基因改变检测以利于 JPS 患者获得更好的治疗。有报道发现,在同时有遗传性出血性毛细血管扩张症(HHT)伴 JPS 的综合征患者存在 SMAD4 基因特定外显子的突变。对 JPS/HHT 综合征和/或伴已知 SMAD4 突变的家族中,其家庭成员预测性的基因检测以 15 岁前检测为宜,这有助于预防通常发生在儿童期 HHT 潜在的并发症。

2. Peutz-Jeghers 综合征 PJS 是一种伴有皮肤黏膜色素过多沉着和错构瘤样息肉综合

征的常染色体显性遗传疾病。Peutz-Jeghers 错构瘤样息肉最常见于小肠;息肉密度以空肠最大,其次是回肠、胃和大肠。PJS 的相对发病率估计在 $1/29000 \sim 120000$ 之间。PJS 患者从 10 岁左右开始其恶性肿瘤发生的风险增加。据估计,PJS 患者一生总的患癌风险 $>90\%$,至 65 岁时的风险为 50% ;其中患结肠癌、胃癌和小肠癌的风险分别增加了 84 倍、213 倍和 520 倍。

约 $75\% \sim 90\%$ 的 PJS 患者有 STK11(LKB1) 基因胚系突变,该基因系位于染色体 19p13.3 上的抑癌基因,编码丝氨酸/苏氨酸激酶;而 PJS 患者的肿瘤发生通常伴有 STK11 另一等位基因的体细胞突变、缺失或失活。遗传学检测可进一步确诊 PJS 或识别一级亲属中隐性患者;如果已有先验的家族性突变,则在高危亲属中进行分子遗传学检测,通过早期诊断、适当监测并合理治疗可以有效减少发病率和降低死亡率。STK11 全基因测序为目前 PJS 患者遗传检测最为常用的方法之一。

对于 PJS 患者或潜在的 PJS 高危人群而言,青春期后最好每 1~2 年行常规内镜检查 1 次以监测息肉恶性转化。不过尽管推荐使用,但内镜检查的有效性尚未见正式报道。

3. 遗传性弥漫型胃癌 2004 年国际胃癌联盟(International Gastric Cancer Linkage Consortium, IG-CLC)颁布了 HDGC 的临床诊断标准:

- (1) 家族中存在 ≥ 2 例胃癌患者,其中至少 1 例弥漫型胃癌确诊时年龄 <50 岁。
- (2) 家族中存在 ≥ 3 例胃癌患者,确诊时年龄不拘,但至少有 1 例医疗文书明确记载为弥漫型胃癌患者。
- (3) 家族中出现单例弥漫型胃癌患者并确诊年龄 <45 岁。
- (4) 家族中出现单例弥漫型胃癌合并小叶性乳腺癌患者(无需符合其他诊断标准)。
- (5) 家族中既有弥漫型胃癌患者,并有小叶性乳腺癌患者(无需符合其他诊断标准)。
- (6) 家族中既有弥漫型胃癌患者,并有结肠印戒细胞癌患者(无需符合其他诊断标准)。

大约 $10\% \sim 15\%$ 的胃癌患者有家族史。HDGC 是一种常染色体显性遗传病,其外显率高达 80% ,平均发病年龄在 30 岁以后。CDH1 基因的胚系突变(主要是移码突变和错义突变)已被证实与 HDGC 相关。胃癌主要包括弥漫型胃癌(35%)和肠型胃癌(50%)两种组织类型,而 CDH1 突变只存在于弥漫型胃癌中。据 Cisco 等报道,约 $4/5$ 的女性和 $2/3$ 的男性 CDH1 基因突变携带者在 80 岁时将发展为 HDGC。

CDH1 基因位于染色体 16q22.1,所编码的 E 钙粘附蛋白属钙依赖性细胞黏附分子的钙黏附蛋白超家族成员。E 钙黏附蛋白的下调在许多人类上皮源性癌中可观察到,其通过降低上皮细胞间附着力来促进癌细胞的浸润。大约 40% 的 HDGC 家族成员存在 CDH1 基因胚系突变,而因启动子甲基化以及转录和转录后水平调控等相关机制导致的蛋白表达下调则在遗传性和散发性弥漫型胃癌的发生发展中起“二次打击”的作用。携带 CDH1 基因改变的患者也易患小叶性乳腺癌和结肠癌,有 CDH1 基因突变的女性患小叶性乳腺癌的风险为 39% 。

早期胃癌(仅限于黏膜层和黏膜下层)患者 5 年生存率 $>90\%$,而即使行根治性手术的晚期胃癌患者其 5 年生存率也仅为 $10\% \sim 20\%$ 。临床诊断为 HDGC 患者可进一步行 CND1 基因突变检测;在对有 CND1 基因突变患者进行更经常的内镜检查 and 病理活检的同时,对他们的子女和/或亲属亦应进行 CND1 基因携带状态检测,籍以进行适当的临床干预。虽然有作者提议应对携带肿瘤易感 CND1 基因突变的个体进行常规胃癌筛查,但由于对监测体系的效果尚存疑虑,故对肿瘤高危人群应采取怎样的干预措施仍存在争议。

4. 家族性腺瘤性息肉病 FAP 是一种常染色体显性遗传疾病,人群发病率约为 2~3/100000。FAP 患者全结肠的旺炽性息肉病将使得在 16 岁时会有 50% 转变为腺癌,36 岁时恶变为腺癌的患者会高达 95%;而几乎所有未经治疗的 FAP 患者在约 50 岁时都将发生结肠癌,约占全球范围内结肠癌患者的 1%。虽然大多数家族性腺瘤性息肉好发于结肠和直肠,但也可发生在上消化道。和结肠息肉不同,FAP 的胃息肉可分为两种类型:基底腺息肉(占 50%)或腺瘤性息肉(占 10%)。在胃内,FAP 的两型胃息肉恶变为胃癌的风险均较低。

Goodman 等发现在一群患结肠外 FAP 日本患者中,100% 有十二指肠腺瘤和/或息肉,50% 的人有胃窦腺瘤和/或息肉。然而,在北美 FAP 患者中,只有 33% 有十二指肠腺瘤和 2% 有胃腺瘤和/或息肉;该研究同时还发现 FAP 患者中大部分的胃息肉为“基底腺息肉”。人们普遍认为基底腺息肉恶性转化的可能性很低,但实际的恶变率可能更高。Lakshman 等发现在一组 FAP 患者中,64 枚基底腺息肉就有 16 枚(25%)出现异型增生改变;相反,另一项研究报道认为,非 FAP 的基底腺息肉既不会发生异型增生也不会发生癌变。因此,FAP 患者中的基底腺息肉病也可能不是一个完全的良性过程。

FAP 与 APC 基因(5q21)的高度异质性突变有关,包括移码、错义和无义突变。正常的 APC 基因产物作为肿瘤抑制蛋白主要参与细胞周期调控,并通过和连环蛋白相互作用以维持正常水平的细胞凋亡。目前已发现数百种不同的 APC 基因突变。这些突变最常见的结果是 APC 编码蛋白质的早熟性截断。一些典型的息肉病通常有上千枚息肉,这种息肉病与密码子 1250 和 1393 之间的突变有关,其中最常见的是位于第 1309 密码子的一个 5-碱基对缺失;衰减型的 FAP(息肉数量一般<100 枚)与 APC 基因的 5 和 3 末端突变有关;大约 6% 的德裔犹太人存在 APC 基因 1307 位密码子突变(即 I1307K 突变),由此可产生部分 FAP 表型;密码子 1554 和 1556 则为胃息肉的突变热点。除 APC 基因突变外,其他的体细胞突变或表观遗传学改变在癌变过程中也属必须。高达 30% 的 FAPs 与 APC 基因的新生突变有关,因而可无 FAP 家族史。

对 FAP 患者进行基因突变检测是 FAP 处置的标准方法,籍以确诊 FAP 患者、建立家族 FAP 基因型、识别家族成员中高风险的无症状或发病前的突变基因携带者;同时基因突变检测还有利于 FAP 患者的治疗,对高危家族成员的筛查而言,其成本效益也明显优于反复的内镜检查。

APC 基因突变可以通过蛋白质截断分析、连锁分析和/或直接 DNA 测序进行检测。蛋白质截断分析可以检测出大约 80% 的由高度异质性基因突变引起的 APC 编码蛋白的结构性缺陷,但该检测不能显示特定的基因突变,也无法提供藉以判断家庭成员突变基因携带状况的遗传连锁信息。

连锁分析需要受累和非受累的家庭成员的同时参与,该方法可应用于无法通过蛋白质截断分析或直接 DNA 测序来识别的 APC 基因改变。通过家族中 FAP 特定单体性的连锁分析,其识别携带者的准确率高达 95%。

鉴于 APC 基因突变的高度异质性,在进行 DNA 直接测序检测时,PCR 扩增反应需要采用能覆盖大范围的引物。据报道,DNA 测序的灵敏度在 90%~99% 之间。许多患有息肉病而 APC 基因突变检测却呈阴性的患者,可能属于另一种由 MYH 胚系突变所致的常染色体隐性遗传疾病。因此,有必要同时对 MYH 和 APC 进行检测。

对于一个典型的 FAP 家族来讲,通常建议儿童在 ≥ 10 岁开始进行基因突变检测,10~12

岁后可开始行内镜筛查。

5. Lynch 综合征(HNPCC) HNPCC,也被称为林奇综合征(Lynch syndrome),是一种常染色体显性遗传综合征,结肠癌患者中 HNPCC 发生率为 1%~2%。HNPCC 患者对多种恶性肿瘤易感,患结直肠癌(CRC)的终生风险高达 80%,子宫内膜癌的风险为 20%~60%、而胃癌风险为 11%~19%。HNPCC 患者的肿瘤易感性与任何错配修复(mismatch repair, MMR)基因的突变相关,这种突变能增加 DNA 的微卫星不稳定性(MSI)。约 90%源自有胚系突变的 HNPCC 患者的肿瘤和 10%~15%散发性癌患者中都可以检测到 MMR 的遗传学异常。迄今已发现,至少有 5 个错配修复相关基因的突变可以导致 HNPCC,其中 MLH1 和 MSH2 基因突变占 90%,MSH6 基因突变为 7%~10%;而 PMS2 基因突变出现的机率较低(<5%),PMS1 基因突变则鲜有报道。MSH6 基因和 PMS2 基因的突变往往会弱化 HNPCC 并推迟癌症的发病年龄。

与 HNPCC 相关的胃癌主要是肠型胃癌,且很少与幽门螺杆菌感染有关。发病年龄<60 岁的胃癌患者需注意鉴别是否与 HNPCC 有关。由 HNPCC 引起的 CRC 患者的预后比散发性结直肠癌患者的预后要好。

鉴于确认 MMR 相关的遗传学改变在诊断、筛查和 HNPCC 预防方面有着重要的临床意义,因而阿姆斯特丹临床标准 II (Amsterdam Clinical Criteria II)被广为应用以决定是否有必要对患者进行分子检测:

(1)≥3 个家族成员患有与 HNPCC 有关的癌症,其中至少 1 个家族成员必须是其他 2 个成员的一级亲属。

(2)连续两代受累。

(3)≥1 个 CRCs 患者确诊时年龄<50 岁。

然而,高达 39%有 HNPCC 基因突变的患者家族史无法符合阿姆斯特丹标准。通过 PCR 检测 MSI 和/或免疫组化法(IHC)检测异常 MMR 蛋白,可以对 HNPCC 做出初步的分子诊断。虽然肿瘤标本中存在 MSI 并不一定表明存在特定的基因缺陷,且也都不能藉 MSI 和 IHC 以区分散发性和 HNPCC 相关肿瘤;但可资 IHC 确定缺失的具体 MMR 蛋白,为后续基因突变分析靶标的选定提供依据。

对 MSH1、MSH2 和 MSH6 基因进行全面的突变分析被推荐用于 HNPCC 的分子诊断,其他方面的临床应用还包括筛查和前植入诊断,但不提倡用于产前和未满 18 岁个体的分子诊断。识别携带者有助于提高结直肠镜对早期 CRC 患者的检出率,从而预防>60% CRC 的发生和降低 60%的死亡率。对 MMR 突变基因携带者的常规监测包括对 20~25 岁的患者每 1~2 年进行一次结肠镜检查、或者在家族中最年轻发病个体发病年龄的前 10 年开始行每 1~2 年一次结肠镜检查,二者相比取其先。

MMR 相关基因的遗传学分析有两种方法,一种是完全的 DNA 直接测序法检测相关基因的未知突变,而对有家族史且受累基因突变的患者则可行 MLH1、MSH2 或 MSH6 基因特定突变的检测。然而在与 HNPCC 关系密切的胃癌中,MSI、MMR 蛋白表达以及基因突变的检测技术及其临床应用还不像其在结直肠癌中那么完善。目前已有一种关于胃癌 MSI 检测的标准方法被推荐,但是否能付诸实施仍然未知。此外,HNPCC 家族中相对较低的胃癌发病率使人们对使用内镜监测的成本效益也心存疑虑。

6. 其他胃部罕见的遗传性肿瘤综合征 虽然不常见,但是胃癌也可能只是其他一些遗传

性肿瘤综合征的部分病症,例如 Li-Fraumeni 综合征、Cowden 综合征、家族性乳腺癌和 MEN-1 等,这些综合征分别与 p53 基因、PTEN 基因、基因和 MEN-1 基因的遗传学异常有关。

(二)散发性胃肿瘤的基因改变

1. 胃肠道间质瘤 胃肠道间质瘤(GIST)是胃肠道最常见的间叶性肿瘤,这种肿瘤起源于 Cajal 间质细胞或其前体细胞。GIST 最常见的发生部位为胃(60%~70%),也见于小肠(20%~30%)、结肠直肠和食管(共约<10%)。通过免疫组化法检测 GISTs 的特征性分子标志物 CD117(c-kit 蛋白)的表达,大约 95%的 GIST 病例可获得诊断。GISTs 中表达 CD117 的细胞通常形态学为梭形细胞或上皮样细胞,CD117 的表达也被作为是否可以使用酪氨酸激酶抑制剂(TKI)(如伊马替尼)来治疗 GIST 的判断标准。免疫组化发现 GISTs 也表达 CD34 和巢蛋白,但特异性相对较低。CD117 弱阳性或阴性表达的 GISTs 通常有 PDGFRA 基因异常,而且形态学上一般表现为上皮样细胞型(图 6-1,6-2)。

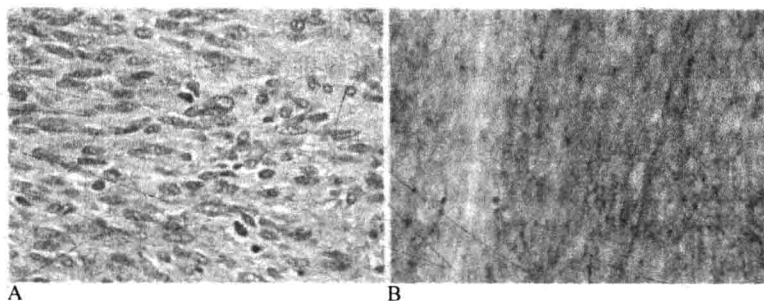


图 6-1 A. 胃肠道间质瘤(病例 1)。形态学上显示梭形细胞。B. 胃肠道间质瘤(病例 1)免疫组化 CD117 染色显示瘤细胞胞浆阳性

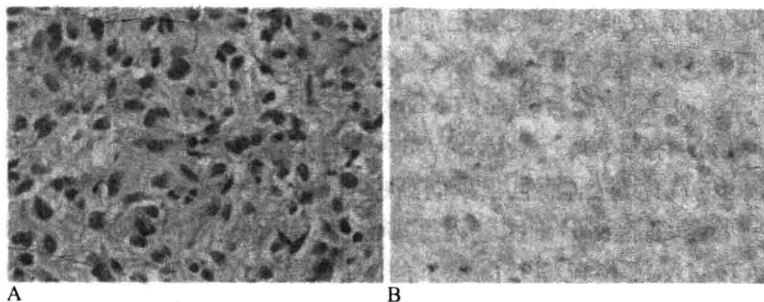


图 6-2 A. 胃肠道间质瘤(病例 2)。形态学上显示上皮样细胞。

B. 胃肠道间质瘤(病例 2)免疫组化 CD117 染色显示弱阳性表达。该例存在 PDGFRA 基因第 18 外显子(D824)突变

虽然在 GISTs 中发现了各种基因改变,但是 KIT 和 PDGFRA 基因突变才是最重要和最具临床意义的。KIT 和 PDGFRA 基因都位于染色体 4q12,而且编码高度同源受体酪氨酸激酶蛋白。KIT 突变和 PDGFRA 突变通常二者仅居其一,突变引起酪氨酸激酶受体的持续性激活导致细胞的生长增殖和存活能力增强。大约 80%的 GISTs 患者能检测到 KIT 突变:66%在外显子 11,13%在外显子 9,1.2%在外显子 13 和 0.6%在外显子 17。大约 8%的 GISTs 患者存在突变:5.6%在外显子 18,1.5%在外显子 12 和 0.3%在外显子 14。KIT 和 PDGFRA 的基因改变包括框内缺失突变、点突变、复制和插入。任何 KIT 和/或 PDGFRA 的突变都与高风险/恶性 GISTs 密切相关。

GIST 的突变类型可能与不同的临床病理特征以及对 TKI 治疗反应不同有关。有 PDGFRA 突变的 GISTs 常见于胃并呈上皮样组织形态。一般说来, KIT 外显子 11 突变的患者相对于外显子 9 突变或野生型的患者生存期更长, 对 TKI 治疗亦更敏感。相反, 外显子 17 突变和 PDGFRA 外显子 18 突变则对 TKI 治疗耐受。

KIT 和 PDGFRA 基因及其表达产物的分子分析已经应用于 GIST 的临床治疗和诊断中。尽管用免疫染色法检测 CD117 的表达 GIST 极具诊断价值, 但大约 5% 的 GISTs CD117 表达阴性, 这部分病例的诊断面临挑战。研究表明, 大多数 CD117 阴性的 GISTs 通常 PDGFRA 表达为阳性, 这有助于 CD117 阴性 GIST 的诊断。KIT 和 PDGFRA 基因突变的检测通常并不用于诊断, 但可用于预测患者的预后以及对 TKIs 治疗的反应。对于 KIT 和 PDGFRA 突变检测可采用直接 DNA 测序方法。

2. 胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤 原发性胃淋巴瘤定义为源于胃及其毗邻淋巴组织的淋巴瘤。大多数胃淋巴瘤为高级别 B 细胞淋巴瘤, 其中一些是从 MALT 这类低级别淋巴瘤发展而来的。虽然各种各样的淋巴瘤, 如弥漫大 B 细胞淋巴瘤、Burkitt 淋巴瘤和 T 细胞淋巴瘤均可作为胃原发或继发, 但是 B 细胞 MALT 这类低级别淋巴瘤几乎都来源于胃, 并且已在分子水平上得到充分研究。

在 MALT 淋巴瘤, 已确定存在的染色体易位包括 $t(11;18)(q21;q21)$ 、 $t(1;14)(p22;q32)$ 、 $t(14;18)(p32;q21)$ 和 $t(3;14)(p14.1;q32)$, 它们分别导致 API2-MALT1、BCL10-IGH、IGH-MALT1 和 IGH-FOXP1 基因融合。其中, 染色体易位 $t(11;18)(q21;q21)$ 和 $t(1;14)(p22;q32)$ 仅见于 MALT 淋巴瘤, 分别存在于 22% 和 4% 的 MALT 病例中。API2-MALT1、BCL10-IGH、IGH-MALT1 基因融合可导致 NF- κ B 结构性激活, 这可能是 MALT 淋巴瘤发生的最常见信号通路。

在 70%~90% 的低级别 MALT 淋巴瘤和 25%~35% 的高级别淋巴瘤中可以见到 Hp 感染。在临床上, 根除 Hp 感染能导致 60%~80% 胃 MALT 淋巴瘤完全缓解。然而, 有 API2-MALT1 或 BCL10-IGH 融合基因的 MALT 淋巴瘤几乎与 Hp 感染无关, 因此对 Hp 根治治疗反应欠佳。此外, 伴有 APG-MALT1 的 MALT 淋巴瘤通常表现为一种低级别的组织学形态并呈现稳定的临床过程, 而且很少向高级别淋巴瘤发展。

采用 PCR 进行 T 细胞和 B 细胞基因重排检测可以确定淋巴瘤单克隆起源, 但无法区别淋巴瘤亚型。鉴于 MALT 淋巴瘤基因重排的频率很低, PCR 法不适用于该类淋巴瘤的诊断。然而, 因 API-MALT1 和 BCL10-IGH 基因融合与 MALT 淋巴瘤的 Hp 根治治疗耐受相关, 因此检测有助于此类淋巴瘤治疗方案的确定。基因融合可以采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)、荧光原位杂交 (FISH) 或者 Southern 印迹来检测。新鲜组织和石蜡组织都可以用于 RT-PCR 和 FISH, 而 Southern 印迹检测只能使用新鲜组织, 该方法需要 DNA 量大而且耗时, 因而不大适用于临床检测。

3. 散发性胃癌 在散发性胃癌中也已检测到多种基因改变, 涉及的基因包括 Tp53、E-钙粘附蛋白 (CDH1)、c-erbB-2、DCC 和 c-met, MSI 和染色体片段的缺失或获得 (3p, 4, 5q, 6q, 9p, 17p)。肠型和弥漫型胃癌呈现出不同的基因改变; 肠型胃癌以高 MSI、Tp53 突变和 APC 缺失为特征, 而弥漫型胃癌则多表现为高 CDH1 突变和 c-met 表达。其中一些基因突变可能与环境因素有关, 如幽门螺杆菌感染和硝酸盐高摄入。

虽然前面提到的一些遗传学改变与胃癌发生有关, 但它们几乎也都可以其他器官的肿

瘤中发现,如乳腺癌中也有 Tp53、c-erb-2 和 CDH1 异常。此外,这些遗传学改变的发生频率较低,通常<50%。因此,就诊断目的而言,这些遗传学改变因其特异性和敏感性不足还不甚理想,而作为临床上肿瘤预后和对治疗反应的预测性标记分子也有待进一步的研究。常见的散发性胃肿瘤的遗传学改变总结于表 6-2。

表 6-2 常见的散发性胃肿瘤的遗传学改变概览

肿瘤	发病率	涉及基因	常见的遗传学改变	检测方法
胃癌	人群发病率约 60/100000	p53, CDH1, c-erbB-2, c-met, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, MSH3, 染色体片段 3p, 4, 5q, 6q, 9p, 17p 的缺失或获得	点突变, 缺失, 复制, 插入和获得	PCR, DNA 测序和 FISH
胃肠道间质瘤(GIST)	约占胃恶性肿瘤的 2.2%	KIT(4q12)、PDGFRA(4q12)	基因缺失, 点突变、重复和插入	免疫组化检测 c-Kit 和 PDGFAR 蛋白表达, DNA 测序检测和 PDG-FRA 基因异常
MALT 淋巴瘤	约占胃恶性肿瘤的 8%	基因融合: API2-MALT1, IGH-BCL10, IGH-MALT1 和 IGF-FOXP1	t(11;18)(q21;q21), t(1;14)(p22;q32), t(14;18)(q32;q21) 和 t(3;14)(p14.1;q32)	RT-PCR, DNA 测序和 FISH

4. 临床实验室常用的分子生物学技术 肿瘤中常见的遗传学改变包括基因缺失、突变、染色体易位和基因扩增等。PCR 可以用来检测基因重排、突变、缺失和染色体易位,而 FISH 可以用于检测基因缺失、染色体易位和基因扩增。其他先进技术,如 DNA/RNA 微阵列、比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)和蛋白质组学,虽然有很大的临床应用潜力,但离常规应用尚有距离。

5. 聚合酶链反应 常规 PCR 可以用来检测 B 或 T 细胞的基因重排、点突变和缺失;RT-PCR 技术可用于检测染色体易位引起的基因融合。Real-time PCR 是一个封闭的系统,可以像其他 PCRs 一样发挥作用,但效率更高而污染机会更少。多重连接依赖探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)技术是一种 PCR 的变异形式,仅利用一对引物即可实现多个靶序列的扩增。每个探针由两个寡核苷酸组成,它们分别识别 DNA 上的邻近序列。其中一个含有正向引物可识别的序列,另一个则含有反向引物识别的序列。只有当两个寡核苷酸探针均与各自的靶序列结合时,它们才能被连接成一个完整的探针。把探针分成两部分的优点是可以确保只有正确连接的寡核苷酸探针才能被扩增。PCR 产物可以用于 DNA 直接测序以识别点突变、小缺失和插入。

6. FISH FISH 是一种基于形态学的简便而可靠的检测技术,可用于基因缺失、染色体易位和基因扩增的检测。与 PCR 技术类似,FISH 检测只需要少量无污染或交叉污染的组织(<200 个细胞)。FISH 探针已被成功用于检测与染色体易位有关的基因分裂改变,但该方法本身需要一个比较长的孵育时间,所以耗时相对较长,且不能用于点突变的检测。

随着分子生物学技术的不断改进(包括 DNA/RNA 微阵列、CGH、蛋白质组学和 DNA 测序等技术),许多新的与肿瘤相关的遗传学改变相继被发现,其中一些已被应用于临床肿瘤诊断、预后和治疗反应的预测。虽然染色体易位引起的肿瘤特异性基因融合通常见于肉瘤和淋巴瘤,但最近通过采用更为先进的分子生物学技术,发现 60%的前列腺癌组织中含有 TM-

PRSS2 与 ETS 转录因子家族融合基因,而在相应的正常前列腺组织中则不存在。

医学科学家已经首先证明,基因融合也见于上皮源性癌中,因此同样可以推测也可能存在于包括胃癌在内的其他类型的癌中。此外,随着近年来分子生物学技术(包括 DNA/RNA 微阵列、PCR 和 FISH 等)成本的急剧下降,肿瘤分子诊断学有望在未来几年中得到更迅速的发展,无疑这将极大地提升未来临床医生对胃癌的综合诊治水平。

二、胃癌的表观遗传学异常

(一)概述

表观遗传学(epigenetics)是指与 DNA 序列改变无关的机制所引起的基因表型(表现)或基因表达的改变。肿瘤细胞 DNA 甲基化会出现三种异常变化:(1)DNA 甲基转移酶的活性或表达增加;(2)全基因组水平的低甲基化;(3)肿瘤相关区域启动子基因 CpG 岛新的甲基化。低甲基化即基因中 5-甲基胞嘧啶含量的减少,与肿瘤的发生发展密切相关。CpG 序列中胞嘧啶甲基化是迄今已知唯一可使人类肿瘤中抑癌基因静默的 DNA 修饰,它和基因突变和等位基因缺失一样都是基因沉默的一种有效机制。研究发现多种基因如 von Hippel-Lindau(VHL),人类 mutL 同源基因 1(hMLH1)和 p16 等抑癌基因都存在因 CpG 甲基化而失活的现象。虽然关于 DNA 甲基化在进化上的生物学意义尚未完全明确,但目前占主导的一种假说认为 DNA 甲基化主要目的在于沉默和抑制病毒和 DNA 重复序列的不良生物学效应。正常生理条件下,如衰老、X 染色体失活和印迹等也可看到因 CpG 岛中的胞嘧啶甲基化导致转录抑制,从而引起相应蛋白的表达缺失。CpG 岛通常指富含胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸长约 500~2000 个碱基的 DNA 区域,这些区域可见于约人类半数基因 5'区。由 CpG 岛甲基化引起抑癌基因的表观遗传沉默是目前公认的肿瘤发生最重要机制之一,也被认为在癌变的早期阶段就开始发挥作用。CpG 岛甲基化所引起的基因沉默部分由组蛋白乙酰化或甲基化状态改变所介导,因组蛋白去乙酰化引起染色体失活所导致的抑癌基因转录抑制也可能在肿瘤发生的早期起重要作用。

胃癌发病率虽然有所下降,但仍是一个主要的医学难题,是全球癌症相关性死亡第二大常见的原因。胃癌发生在很大程度上取决于环境而非遗传因素,世界卫生组织(WHO)明确地将 Hp 感染界定为胃癌的 I 型致癌因素,这对人们认识和了解胃癌的病因学具有里程碑式的意义。胃癌的发生发展历经一系列各具特征的形态学改变,由最初的胃炎到早期的癌前病变再到肠上皮化生和异型增生,并最终进展至腺癌。胃黏膜的最早期改变即涉及 DNA 高甲基化等表观遗传改变所致的基因失活。本章主要介绍与胃癌发生发展密切相关的表观遗传改变和环境危险因素。

(二)胃癌和非肿瘤黏膜中抑癌基因的 CpG 岛甲基化

研究发现,含一些抑癌基因在内的许多基因在非肿瘤黏膜、癌前病变和胃癌中存在甲基化现象这些基因包括结肠腺瘤性息肉病(APC)基因、Cox-2 基因、死亡相关的蛋白激酶基因、谷胱甘肽硫转移酶 p1 基因、E 钙黏附蛋白基因、hMLH1 基因、O⁶ 甲基化鸟嘌呤甲基转移酶基因、p14 基因、p16 基因、RAS 相关家族 1A 基因、血小板反应蛋白 1 基因和金属蛋白酶 3 组织抑制子基因等。研究还表明,这些基因的甲基化在胃癌多步骤的进展过程中存在与 DNA 甲基转移酶 1 的表达持续增加密切相关的累积现象。

CpG 岛是否发生甲基化取决于所涉及的基因、患者年龄、潜在的炎症情况以及肿瘤或非

肿瘤病灶的位置和组织学形态。除胃癌外,类似与年龄相关和肿瘤特异性的基因甲基化模式也可在其他上皮源性恶性肿瘤中观察到。有些基因,如死亡相关蛋白激酶等,在非肿瘤黏膜、癌前病变和侵袭性癌中甲基化的发生率相似;而其他基因如 E 钙黏附蛋白(E-Cadherin)、p16 和 hMLH1 等抑癌基因,其甲基化的发生率会随着疾病进展(从正常黏膜逐步进展为浸润性癌)逐渐增高。某些基因,如 E-cadherin 基因和 p16,在胃癌患者中其甲基化发生率高于非肿瘤患者,而甲基化程度在非肿瘤黏膜中会随患者年龄的增加而增加;相比之下,其他基因,如 hMLH1 等,在非肿瘤黏膜中其甲基化状态则不会随年龄的增加而明显改变。

(三)胃的 E-cadherin 基因甲基化

在胃癌发生发展过程中起至关重要作用的众多基因中,E-cadherin 作为一种介导细胞间粘附的跨膜糖蛋白,人们对其编码基因的研究还是较为清楚的。研究发现半数以上胃癌存在 E 钙黏附蛋白基因甲基化,其中尤以弥漫型胃癌更为常见。在胃癌患者中,存在肠上皮化生及浸润性癌的患者,其 E-cadherin 的表达因基因甲基化而明显降低,提示 E-cadherin 表达缺失导致的细胞之间粘附功能丧失可能是胃癌发生的早期分子事件。胃癌患者的非肿瘤性胃黏膜也存在 E-cadherin 基因甲基化。

有趣的是,有 1/3 单纯消化不良患者胃黏膜中(无肠上皮化生)存在 E-cadherin 基因甲基化并与幽门螺杆菌(Hp)感染相关。目前已发现约一半 Hp 感染患者胃黏膜(没有肠上皮化生)中存在 E-cadherin 基因甲基化,当 Hp 感染得到根治后,至少有 2/3 的患者甲基化得以逆转。相反,其他基因的甲基化并不会因 Hp 消除而得到逆转。由此推测,Hp 感染可以诱导 E-cadherin 基因的表现遗传发生可逆性的改变。

(四)慢性炎症所致甲基化与胃癌发生

有慢性炎症状态的患者其 CpG 岛的甲基化水平常增高,而这种增高常与肿瘤的发生相关。胃的 Hp 和 EB 病毒感染与非肿瘤黏膜的甲基化程度增加密切相关,并且研究也表明,在受感染的胃非肿瘤性黏膜中 CpG 岛甲基化程度增加可能是胃癌发生的前兆。由此可知,这种基因和癌前病变依赖的 DNA 甲基化可能是胃癌和炎症状态下胃癌癌前病变发生的主要分子事件之一,因而对胃炎患者发生胃癌具有一定的预示作用。

Hp 感染同样会导致正常胃黏膜和癌前病变中除 E-cadherin 基因以外的其他一些基因或位点的甲基化。研究发现,受 Hp 感染的健康志愿者胃黏膜或无 Hp 感染的胃癌患者的癌旁黏膜中有 8 个 CpG 位点的甲基化水平显著高于无 Hp 感染的健康志愿者。进一步分析发现,有 Hp 感染的胃癌患者其非肿瘤性黏膜的 DNA 甲基化模式与 Hp 感染的正常个体存在较大的差异;不过,上述 8 个位点中只有其中 1 个位点的甲基化模式在正常人和胃癌患者中有明显差异。一项群体研究显示,受 Hp 感染的浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生、异常增生患者中 p16 甲基化水平,除异常增生为不确定外,其余高于存在类似样病变但没有 Hp 感染的患者。同样,Hp 感染是胃癌患者非瘤性黏膜中甲基化的一个独立危险因素。另有研究显示,Hp 感染与 E-cadherin 基因、大肠腺瘤样息肉病(APC)基因、Cox-2、p16 和 hMLH1 等基因的启动子甲基化相关;如果说在 Hp 诱发胃炎过程中 E-cadherin 基因甲基化是较早期的分子事件的话,hMLH1 基因甲基化通常在较晚期发生并伴随肠化生。更重要的是,Hp 的根除治疗可有效降低基因甲基化水平,并延缓甚或逆转 Hp 感染所致的胃的癌变。

虽然迄今 Hp 感染的患者出现 E-cadherin 和其他基因甲基化的具体机制尚不明,但有研究显示,炎症因子可能是重要的 DNA 甲基化介导因子。如存在 Hp 感染和白细胞介素

—1 β 基因多态性的胃癌患者因体内细胞因子含量增加,导致包括 E—cadherin 基因在内的 4 个基因的甲基化率明显增高。进一步研究显示,当白细胞介素—1 β 或白细胞介素—1 β 联合 Hp 共同刺激可诱导胃癌细胞 E—cadherin 基因的甲基化,而上述现象可被白细胞介素—1 β 的特异抑制剂所逆转。类似的研究也表明, Hp 或脂多糖可刺激巨噬细胞产生一氧化氮,并进一步诱导胃细胞系 RUNX3 基因甲基化,而一氧化氮抑制剂能逆转上述基因甲基化。

目前全球大约有 10% 的胃癌与 EB 病毒感染相关,且年轻患者(<60 岁)、男性、白种人和西班牙裔患者中 EB 病毒感染发生率更高。EB 病毒相关性胃癌好发于胃贲门或胃体,组织学上表现为以瘤内和瘤周淋巴细胞浸润为特征的“淋巴上皮样”癌。此外,大多数 EB 病毒相关性胃癌中 CpG 岛甲基化的发生率较高。

(五)胃癌中的 CpG 岛甲基化表型

与结直肠癌类似,大约有 30%~50% 的胃癌存在以多基因或多位点甲基化为特征的 CpG 岛甲基化表型(CpG—*island* methylator phenotype, CIMP),称之 CIMP 高表型。其中包括 p16 和基因及肿瘤特异性 CpG 岛(MINT1、MINT2、MINT12、NIMT25 和 MINT31),这些基因和位点在结直肠癌中都被发现有重新甲基化现象。研究发现胃癌的癌前病变中也存在 CIMP 高表型,即约有 15% 的肠上皮化生和 50% 伴或不伴胃癌的胃黏膜异型增生或腺瘤患者中存在 CIMP 高表型。据此推测 CIMP 高表型可能是胃癌发生的早期事件之一。有研究显示,胃癌中 CIMP 高表型与肿瘤分期越晚相关;但另有研究却发现,CIMP 高表型同肿瘤好发于近端胃、类型为弥漫型癌和胃癌分期较早相关。

大约 30% 的胃癌患者存在以微卫星标记的 30%~40% 的等位基因变化为特点的高微卫星不稳定性表型,通常由甲基化诱导的 hMLH1 沉默所引起,尤其在 CIMP 高表型胃癌中常见 AMLH1 基因启动子的甲基化。这些肿瘤大多包含有简单重复序列的改变,而这些序列包含于大量与细胞生长增殖、凋亡或 DNA 错配修复相关的靶基因内,如转化生长因子 β II 型受体基因、Bcl—2 相关 X 基因(Bax)、hMSH3 和 E2F—4 基因等。不过研究发现 hMLH1 启动子甲基化存在于伴微卫星不稳定性高表型胃癌的非肿瘤性癌旁上皮中。由于多原发胃癌中也存在微卫星不稳定性高表型,因此这种甲基化的缺陷也会增加患同时性的或异时性肿瘤的风险。

(六)甲基化与胃癌预后

同其他肿瘤相似,研究发现 CpG 岛甲基化和 CIMP 同胃癌的预后存在相关性。胃癌术后患者中,存在 MINT31 位点甲基化患者较无该位点甲基化患者的预后为好;同样,CIMP 高表型的预后好于 CIMP 低表型或 CIMP 缺失患者;但 MINT31 甲基化及 CIMP 高表型均不是与胃癌患者生存相关的独立预后因素。不过另有研究显示,胃癌患者癌旁黏膜中的原钙黏附蛋白—10 基因的甲基化却是预后不良的独立因素。

(七)组蛋白乙酰化

DNA 甲基化系通过改变染色质状态来影响基因表达,而直到最近其分子机制方得以揭示。一项极具影响意义的研究发现,密集型 DNA 甲基化通过招募包含组蛋白去乙酰化酶和其他一些染色质修饰因子在内的蛋白复合体致局部组蛋白发生去乙酰化;该蛋白质复合体通过甲基结合蛋白介导靶向至高甲基化的启动子区。业已阐明,DNA 从非甲基化到甲基化经历的一系列分子事件可导致组蛋白序贯修饰,包括去乙酰化、甲基化及与染色质调节蛋白如 HP1 等的结合,最终导致基因沉默。

研究表明,组蛋白去乙酰化和组蛋白 H3 和 H4 中一些赖氨酸残基的甲基化所导致的染色质失活与一些抑癌基因如 p21WAF1/CIP1 的转录抑制密切相关。染色质免疫共沉淀法检测发现,>50%的胃癌组织样品中可观察到 p21WAF1/CIP1 启动子区中的组蛋白 H3 和 H4 低乙酰化;采用抗乙酰化组蛋白抗体对胃癌组织标本进行免疫组化分析可以总体了解肿瘤的乙酰化状态。约 70%的胃癌组织中乙酰化组蛋白 H4 表达水平低于癌旁黏膜,提示胃癌组织中普遍存在组蛋白低乙酰化。此外,乙酰化组蛋白 H4 的低表达还与肿瘤进展至晚期、肿瘤深部浸润和淋巴结转移存在良好的相关性。事实上,一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素 A 已被证实可显著诱导胃癌细胞系的生长停滞和细胞凋亡,并抑制其侵袭。另有研究则显示,组蛋白 H3 的第 9 位赖氨酸(H3K9)三甲基化和肿瘤分期以及复发呈正相关,且高水平的 H3K9 三甲基化是胃癌患者存活的独立预后因素。

(八)临床应用

胃癌组织及其癌前病变中存在表观遗传学改变,这使得基于甲基化的评估方法有望应用于胃癌预防、风险评估、早期诊断、预后判断、治疗靶点的识别及疗效评估等方面。就早期诊断而言,DNA 甲基化已被认为可能是预示疾病活动一个很好的早期生物标记;具体到胃癌,可通过对非肿瘤性黏膜、胃灌洗物或血清等进行甲基化检测以评估胃癌发生风险或进行胃癌的早期诊断。诚然,上述方法虽已得到认可,但其敏感性与特异性仍有待进一步的深入研究。

当然,表观遗传研究最激动人心之处还在于靶向表观遗传改变很可能可作为胃恶性肿瘤治疗的新措施,因而具有实际临床意义。研究已经发现,DNA 甲基转移酶抑制剂可重新激活体外试验中不同胃肠道(GI)恶性肿瘤细胞中的基因表达,组蛋白去乙酰化抑制剂可进一步增强这种效果。5-氮杂脱氧胞苷就是一个极强的 DNA 甲基化抑制剂,体内研究也发现其对血液系统恶性肿瘤具有令人振奋的疗效。

对胃恶性肿瘤进行表观遗传改变的研究已为我们打开了一扇极具吸引力的窗口,透过它,使我们有望对肿瘤的病因学和分子发病机制有更全面深入的了解。表观遗传改变与遗传改变并行或在同一通路中协同以驱动肿瘤的克隆选择这一概念在肿瘤流行病学和临床上均具有深远意义,靶向表观遗传改变也必将为未来胃癌的治疗带来广阔的前景。

三、胃腺癌的分子生物标志

(一)概述

胃癌是一种发病率和死亡率都很高的全球性疾病,在癌症相关死亡原因中居第二位,据估计全球每年有将近 700000 人死于胃癌。不过,不同国家的发病率大相径庭。Lauren 分类是目前应用最广泛的胃癌组织学分类方法,1965 年 Lauren 将胃癌分为肠型和弥漫型两种亚型,其中肠型与幽门螺杆菌(Hp)感染密切相关,常发生于慢性胃炎、胃腺体萎缩和肠上皮化生的基础上。而弥漫型腺癌则相反,通常呈现弥漫性胃壁增厚,而表现为非肿块特征。

虽然胃癌在美国和西欧国家中的发病率有所下降,但在发展中国家中仍较为常见。传统上胃癌的预后很差,主要是在确诊时已属晚期,5 年生存率不足 5%。不过很早期的胃癌是可以治愈的,手术治疗后 5 年生存率可达 90%~95%。因此,寻找确认胃癌早期阶段的分子标志物具有重要的临床意义。最近的研究显示,许多因素与胃肿瘤的发展有关,如遗传学与环境因素(如 Hp 感染、饮食和吸烟)、易感病变,等等。进一步研究证实,贲门腺癌和 Barrett 相关性食管腺癌也存在类似的背景、时间趋势、分子模式及生物学行为模式。本章重点介绍非

贲门性/远端胃癌的分子遗传学及其潜在的分子诊断标志。

(二)胃腺癌的分子模型

处于高发病率区域的肠型胃癌,以老年患者(>65岁)居多,多由胃黏膜异型增生和肠上皮化生等癌前病变发展而来。而弥漫型胃癌的发病率相对恒定,以年轻患者居多,通常为多灶性,肿瘤既没有明确的癌前病变,也很少与肠上皮化生相关。最近研究发现,大量的基因改变参与了胃癌的发生与发展。即肠型和弥漫型胃腺癌(GAC)的发生涉及多种遗传学信号通路改变。1992年,Correa提出了肠型GAC发生的多步骤、多因素模型的假说,涉及由慢性胃炎,胃黏膜萎缩,肠上皮化生,异型增生,并最终发展为GAC的过程。许多分子异常已经被确认,如微卫星不稳定性(MSI)、肿瘤抑制基因失活、癌基因激活及端粒酶重激活等。基于从预防性胃切除标本上的发现,Carneiro等提出了E钙粘附蛋白基因(CDH1)突变携带者的弥漫型GAC发生模型,包含非萎缩性胃炎,原位印戒细胞癌、印戒细胞癌派杰样播散及浸润GAC组织学改变。据认为,在第2个CDH1等位基因被多因素灭活前,CDH1基因突变携带者的胃黏膜组织学都可以是正常的。

(三)有前景的癌前病变评估标志物

通常情况下肠型GAC的发生都有慢性胃炎的背景。从萎缩性胃炎、肠上皮化生,异型增生到GAC的过程都与持续存在的慢性炎症有关。研究发现,肠上皮化生中几种伴p16基因甲基化的基因异常改变同胃癌前病变中Hp感染存在相关性。Murata-Kamiya等发现,与对照组相比,Hp感染的胃黏膜中E-cadherin表达下降。另外,由CDH1和CaGA相互作用诱导产生的 β -连环蛋白在细胞质和细胞核内的积累,与肠上皮化生的发生有一定关系。Zavros等人发现,Hp诱导Sonic hedgehog(Shh)的下调表达可引起胃腺体结构的破坏,并通过上调肠相关基因,如CDX2、MUC2、villin等,获得更多的肠表型。在小鼠模型中,胃的肠上皮化生可由Cdx2异位表达诱导产生。Wang等研究发现Shh的过表达与癌前病变和癌密切相关,Shh表达与肿瘤临床分期、肿瘤的直接浸润和肿瘤细胞的分化有关。这些研究证实,Shh表达参与了胃癌的发生。肠上皮化生和癌前病变的遗传学与表观遗传学改变可以作为评估GAC风险和潜在临床恶性进展潜能的替代性标志物。

(四)MSI、高甲基化和靶基因

MSI指因DNA错配修复(MMR)缺陷引起DNA复制时出现一些简单重复的微卫星序列异常。MMR蛋白包括MutS蛋白(hMSH2、hMSH3和hMSH6)和MutL蛋白(hMLH1、hPMS1、hPMS2和hMLH3)两大类。肿瘤以微卫星标志物检查中存在30%MSI为界限分为高MSI(MSI-H)和低MSI(MSI-L)。而任何基因位点均未出现不稳定性被认为属于稳定(MMS)。研究发现不论是家族性GAC,还是散发性GAC都存在MSI,GAC患者MSI发生率大约为20%~30%。MSI发生在慢性胃炎阶段,通常在GAC确诊前几年即已经存在。因此,MSI分析是判断癌发生风险的一个有价值、有前景的标志物。

结肠癌的MSI分析显示,MSI-H的肿瘤同hMLH1的失活密切相关。虽然已认识到全基因组低甲基化和选择性DNA序列的高甲基化是人类癌症的特征标志,但最近的研究发现,基因启动子高甲基化的发生是沿着慢性胃炎—肠上皮化生—腺瘤—GAC的变化通路的。基因启动子甲基化伴hMLH1表达丢失是胃腺瘤,早期胃癌,乃至晚期胃癌中发生MSI的基本机制。Baek等采用免疫组化染色,发现约87%~88%MSI阳性的胃腺瘤和GAC存在hMLH1表达缺失或低表达,并且所有这些肿瘤均存在hMLH1基因启动子的甲基化。据Car-

valho 等报告,在散发性 GAC 中,大约 30% 的 COX2 和 hMLH1 基因启动子以及大约 50%~60% 的 CDH1 和 MGMT 基因启动子可检出高甲基化。这些结果表明,由高甲基化引起不同基因启动子失活在 GAC 的发生中发挥了重要作用。MSI-H 的 GAC 与肿瘤位于胃窦部、肠型分化、患者相对年龄偏大以及预后较好有关。在一项关于 GAC 的大型系列研究中,约有 16% 的病例可检测到 MSI,并且与较长期存活有关。因此,MSI 分析可作为临床预后判断的指标。

由于基因的不稳定性,有 MSI 的肿瘤病例中存在成百上千的基因突变。研究发现在 GAC 中,大约有 70% 的 II 型转化生长因子 β -受体(TGF β R II)基因,25% 的胰岛素生长因子受体 II(IGFIR)基因以及 30% 的 BAX 基因发生了突变。TGF- β 家族成员参与细胞增殖、分化、迁移和凋亡的调节。TGF- β 发挥功能是在 TGF- β 以隐性蛋白复合体形式分泌到细胞外基质之后,TGF- β 信号最初通过 TGF- β 配体同 TGF β R II 相结合。TGF β R II 一旦与 TGF- β 结合会还原并磷酸化 I 型 TGF- β 受体(TGF β R I),从而激活了 TGF β R I 蛋白激酶。

高频率的 TGF β R II 基因突变提示,在胃癌发生过程中,TGF β R II 基因突变的发生早于 IGF II R、BAX 和 TCF-4 等基因,且与肠型 GAC 相关。TGF- β 丝氨酸/苏氨酸激酶受体有两种类型: I 型和 II 型,两型激酶受体都是下游信号转导所必须的。II 型受体的突变能阻断信号转导通路,从而促进细胞生长。在一项研究中,有 38% 的 MSI-H 腺瘤可检出 TGF β R II 的移码突变,但尚未检出 hMSH6 和 IGF II R 移码突变。Kim 等报道,那些与癌共存的 MSI 阳性腺瘤 TGF β R II 基因突变率较单纯胃腺瘤更高,表明存在 TGF β R II 基因突变的胃腺瘤更有可能转变为癌。

IGF II R 是一种多功能蛋白,在溶酶体酶运输、内吞和 TGF- β 的激活中都有重要作用。大约 30% MSI 的胃肿瘤中可检出 IGF II R 的多聚鸟苷酸-8 的突变,与低频率的淋巴结转移和浆膜浸润明显相关。这些发现提示 IGF II R 突变有望成为 GAC 的一种预后标志物。

(五)抑癌基因失活

约有 60% 的肠型胃癌和 25% 的胃腺瘤存在 APC 基因突变和/或杂合性缺失(LOH),不过上述异常很少见于弥漫型 GAC。同样 β 连环蛋白突变仅见于肠型胃癌而非弥漫型胃癌。Abraham 等报道,91% 的肠型胃腺瘤至少可检测到一种基因异常,如 APC 突变、MSI-H 或 K-ras 突变。其中 APC 突变中的终止码突变和移码突变在胃腺瘤中占 46%,5q 等位基因缺失占 33%。此外,67% 的胃腺瘤/异型增生伴 MSI-L 表型的病例可检测到 APC 基因突变,而伴 MSI-H 表型的病例均未检测到 APC 基因突变。这些数据表明,MSI-H 和 MSI-L 肿瘤可能有不同的分子通路。

肿瘤蛋白 53 基因(p53)是人类肿瘤发生中突变率最高的抑癌基因,在诱导细胞生长停滞或凋亡过程中发挥着至关重要的作用。可想而知,p53 的功能性变化,生物功能也随之发生变化,并可能影响由正常组织发展为恶性肿瘤的各个阶段。有研究发现,38% 的肠上皮化生、58% 的异型增生和 67% 的 GAC 中可检测到 p53 基因改变。Lee 等进行的一项研究显示,74% 的单纯异型增生、77% 的腺瘤和 45% 的 GAC 中存在 APC 突变。在这些病例中,71% 的突变发生在外显子 5~8,形成 G:C 到 A:T 易位。这些资料表明,p53 基因突变是胃癌发生过程中的早期事件。

(六)原癌基因激活

1. KRAS 和 BRAF 突变 K-ras 和 B-raf 均为 MAPK-ERK 通路中的成员,参与介导多种调节细胞生长、分化和程序性细胞死亡的细胞信号反应。K-ras 基因突变会导致基因的失活,引起细胞生长失控。部分人类恶性肿瘤包括肺癌、结肠癌和前列腺癌常可检测到 K-ras 基因突变,而胃癌中 K-ras 基因突变报道甚少。Hunt 等研究发现,在 14% 的萎缩性胃炎活检标本中可检测到 K-ras 突变。不过 K-ras 基因突变对癌前病变或恶性肿瘤的发展没有任何预测价值。另外,在 <10% 胃腺瘤、单纯异型增生和癌中可检测到 K-ras 基因突变。

与 K-ras 一样,B-raf 是丝氨酸/苏氨酸激酶的 RAF 家族成员,因此,B-raf 的激活也可促进细胞增殖。不过 BRAF 突变与 KRAS 突变呈负相关。与 KRAS 截然不同,BRAF 突变不发生在 MSI-H 的 GAC 中,并且罕见于 MSS GAC 中。一项研究显示,在 124 例 MSS GAC 中仅发现 1 例(0.8%)存在 BRAF V600E 突变。这些发现表明,GAC 发生过程中存在 KRAS 突变,而非 BRAF 突变。

2. PIK3CA 磷脂酰肌醇激酶 3(PI3K)/AKt 信号通路在细胞生长、增殖和存活的调控中发挥着重要作用,并参与了人类肿瘤的发生。PI3Ks 由异源性 p85 调节亚单位和几个 p110 催化亚单位构成。在几个催化亚单位的异构体中,只有 α 型异构体被证实在其基因(PIK3CA)中存在原癌基因的突变或扩增。4%~25% 的 GAC 和 19.2% 的 MSI 中可见 PIK3CA 基因突变,而在 MSS 中则罕见。另外,不论是早期还是晚期胃癌标本均可发现 PIK3CA 突变,进一步说明其在 GAC 的发生、发展过程中起重要作用。据报道 36.4% 的 GAC 有 PIK3CA 基因组的扩增,与 PIK3CA 转录表达增加和 phosphor-AKT 升高密切相关。因此 PIK3CA 有可能成为肿瘤早期诊断和监测肿瘤进展有希望的分子标志,同时也可能成为 p110 α 亚单位特异性抑制剂潜在的治疗靶点。

(七)端粒酶重激活

端粒酶是一种特殊的逆转录酶,通过 TTAGGG 的重复维持端粒长度。端粒酶的主要成分包括人类端粒酶 RNA(hTR 或 TERC)、端粒酶相关蛋白 1 及催化亚单位(hTERT)。以 TERC 为模板,hTERT 能添加 6 个核苷酸的重复序列 TTAGGG 到染色体的 3' 尾端,从而使端粒延长。研究发现,85%~90% 的恶性肿瘤中存在端粒酶表达,但正常的体细胞中缺乏端粒酶表达。此外,hTERT 核表达与结肠癌、肺癌、胃癌和尿路上皮癌的预后存在相关性。hTERT 诱导的 Mac-2 结合蛋白(Mac-2BP)在胃癌患者血清中的含量明显升高,并且与肿瘤远处转移($p=0.05$)和高分期($P=0.04$)有关,表明 hTERT 诱导的 Mac-2BP 可能成为判断转移性胃癌恶性进展的一个有效标志。

(八)E 钙粘附蛋白,第二次撞击失活和 EGFR 激活

CDH1 基因位于染色体 16q22.1 上,编码钙依赖性跨膜细胞粘附蛋白。该细胞粘附蛋白通过连环蛋白与细胞骨架肌动蛋白纤维相互作用来调节细胞内信号转导,并经 Wnt 信号通路促进肿瘤生长。E-cadherin 是由胞外结构域中 5 个钙粘附蛋白重复序列(EC1-EC5)、1 个跨膜结构域和 1 个结合了 p120 连环蛋白和 β 连环蛋白的胞内结构域组成。胞内结构域中含有一个对 β 连环蛋白结合,乃至影响 E-cadherin 功能至关重要的高磷酸化部位。而 E-cadherin 功能或表达的缺失势必引起肿瘤的进展和转移。据估计,大约 30%~40% 遗传性弥漫型胃癌(hereditary diffuse gastric cancer,HDGC)家族成员存在 E-cadherin 胚系突变,且