

肝内胆管癌组织中 CircACTN4 mRNA 和 THBS1mRNA 的表达与临床病理特征及预后的关系研究

李顺乐^a, 徐 蒙^a, 李 蓉^b, 赵向菊^a, 柴伟超^c, 贾 鸾^d

(西安交通大学第二附属医院 a. 普通外科; b. 麻醉科; c. 肿瘤科; d. 泌尿外科, 西安 710004)

摘要: 目的 研究肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 中环状核糖核酸辅肌动蛋白 $\alpha 4$ (CircRNAs Actinin $\alpha 4$, Circ ACTN4) 和血小板凝血酶蛋白 1 (platelet thrombin protein 1, THBS1) mRNA 表达与临床病理特征和预后的关系, 为临床诊治提供参考。方法 回顾性分析 2017 年 5 月 ~ 2020 年 6 月西安交通大学第二附属医院诊治的 84 例 ICC 患者; 采用实时荧光定量 PCR 及免疫组织化学检测组织中 CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 和蛋白表达。Pearson 相关分析 ICC 癌组织中 CircACTN4 mRNA 与 THBS1 mRNA 的相关性。Kaplan-Meier 法 (Log-rank 检验) 比较不同 CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 表达 ICC 患者预后差异。COX 回归分析 ICC 患者预后影响因素。受试者工作特征 (ROC) 曲线分析 CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 对 ICC 患者死亡预后的评估价值。结果 ICC 癌组织中 CircACTN4 mRNA (3.14 ± 0.42) 表达高于癌旁组织 (0.76 ± 0.25), 差异具有统计学意义 ($t=44.094, P < 0.001$); ICC 癌组织中 THBS1 mRNA (2.82 ± 0.36) 和蛋白阳性率 (92.86%) 均高于癌旁组织 ($0.81 \pm 0.24, 7.14\%$), 差异具有统计学意义 ($t/\chi^2=42.068, 123.429$, 均 $P < 0.001$)。ICC 癌组织中 CircACTN4 mRNA 与 THBS1 mRNA 表达呈正相关 ($r=0.669, P < 0.001$)。TNM 分期 III 期、低分化程度及有淋巴结转移 ICC 癌组织中 CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 表达高于 TNM 分期 I ~ II 期、高中分化程度及无淋巴结转移癌组织, 差异具有统计学意义 ($\chi^2=7.949, 9.164, 12.207; 23.270, 18.625, 19.828$, 均 $P < 0.001$)。CircACTN4 mRNA 高表达组、THBS1 mRNA 高表达组三年累积生存率分别低于 CircACTN4 mRNA 低表达组 (25.00% vs 56.82%) 和 THBS1 mRNA 低表达组 (19.51% vs 62.79%), 差异具有统计学意义 (Log rank $\chi^2=13.601, 24.310$, 均 $P < 0.001$)。CircACTN4 mRNA (OR=1.839, 95%CI: 1.228~2.753)、THBS1 mRNA (OR=1.744, 95%CI: 1.245~2.443)、淋巴结转移 (OR=1.925, 95%CI: 1.316~2.816)、TNM 分期 (OR=1.613, 95%CI: 1.223~2.126) 及肿瘤分化程度 (OR=1.510, 95%CI: 1.205~1.892) 是影响 ICC 预后的独立因素 (均 $P < 0.01$)。CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 联合检测对 ICC 患者死亡预后的评估曲线下面积为 0.868, 大于单项指标检测 0.812, 0.784, 差异具有统计学意义 ($Z=3.348, 3.847$, 均 $P < 0.001$)。结论 ICC 中 CircACTN4 mRNA 和 THBS1 mRNA 表达升高, 两者与 TNM 分期、分化程度及淋巴结转移相关, 是新的评估 ICC 患者不良预后的肿瘤标志物。

关键词: 肝内胆管癌; 环状核糖核酸辅肌动蛋白 $\alpha 4$; 血小板凝血酶蛋白 1

中图分类号: R735.7; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2024) 03-001-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2024.03.001

Relationship between the Expression of CircACTN4 mRNA and THBS1mRNA in Intrahepatic Cholangiocarcinoma Tissue with Clinicopathological Features and Prognosis

LI Shunle^a, XU Meng^a, LI Rong^b, ZHAO Xiangju^a, CHAI Yichao^c, JIA Luan^d (a. Department of General Surgery; b. Department of Anesthesiology; c. Department of Oncology; d. Department of Urology, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of circular RNA (Circ RNAs) Actinin $\alpha 4$ (ACTN4) and platelet thrombin protein 1 (THBS1) in intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) and their relationship with clinicopathological characteristics and prognosis, and provide reference for clinical diagnosis and treatment. **Method** A retrospective analysis was conducted on 84 ICC patients diagnosed and treated in the Second Affiliated Hospital of Xian Jiaotong University from May 2017 to June 2020. The expressions of CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA and protein were detected by real-time fluorescent quantitative PCR and

基金项目: 陕西省 2021 年重点研发计划 (项目编号: 2021SF-229); 陕西省 2023 年重点研发计划 (项目编号: 2023-YBSF-386); 2023 年陕西省科协青年人才托举计划 (项目编号: 20230301)。

作者简介: 李顺乐 (1981-), 男, 博士, 主治医师, 研究方向: 普通外科, 肝胆疾病, E-mail: lishunle4685@126.com。

通讯作者: 徐蒙 (1991-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 普通外科、肝脏病学、肝胆肿瘤, E-mail: Xm19912015@163.com。

immunohistochemistry. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between CircACTN4 mRNA and THBS1 mRNA in ICC cancer tissue. The prognostic differences of ICC patients with different CircACTN4 mRNA and THBS1 mRNA expressions were compared by the Kaplan-Meier method (log rank test). COX regression analysis was performed to identify prognostic factors in ICC patients. The prognostic value of CircACTN4 mRNA and THBS1 mRNA in evaluating the risk of death in ICC patients was assessed by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. **Results** The expression of CircACTN4 mRNA in ICC tissues (3.14 ± 0.42) was higher than that in adjacent tissues (0.76 ± 0.25), with significant difference ($t=44.094$, $P<0.001$). The positive rates of THBS1 mRNA (2.82 ± 0.36) and protein positive rate (92.86%) in ICC tissues were higher than those in adjacent tissues (0.81 ± 0.24 , 7.14%), and the differences were statistically significant ($t/\chi^2=42.068$, 123.429, all $P<0.001$). CircACTN4 mRNA was positively correlated with THBS1 mRNA in ICC cancer tissue ($r=0.669$, $P<0.001$). The expressions of CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA in ICC cancer tissues with TNM stage III, low differentiation, and lymph node metastasis were higher than those in TNM stage I ~ II, high differentiation, and non-lymph node metastasis cancer tissues, and the differences were statistically significant ($\chi^2=7.949$, 9.164, 12.207; 23.270, 18.625, 19.828, all $P<0.001$). The 3-year cumulative survival rates of the high expression group of CircACTN4 mRNA and THBS1 mRNA were lower than those of the low expression group of CircACTN4 mRNA (25.00% vs 56.82%) and THBS1 mRNA (19.51% vs 62.79%), and the differences were statistically significant (Log rank $\chi^2=13.601$, 24.310, all $P<0.001$). CircACTN4 mRNA (OR=1.839, 95%CI: 1.228~2.753), THBS1 mRNA (OR=1.744, 95%CI: 1.245~2.443), lymph node metastasis (OR=1.925, 95%CI: 1.316~2.816), TNM staging (OR=1.613, 95%CI: 1.223~2.126), and tumor differentiation (OR=1.510, 95%CI: 1.205~1.892) were independent factors affecting the prognosis of ICC. The area under the curve of the combination detection of circACTN4 and THBS1 mRNA on the prognosis of death in patients with ICC was 0.868, which was greater than that of the single index (0.812 and 0.784), with significant differences ($Z=3.348$, 3.847, all $P<0.001$). **Conclusion** The expressions of CircACTN4 mRNA and THBS1 mRNA were increased in ICC, and they were associated with TNM stage, differentiation, and lymph node metastasis. These markers may serve as novel indicators to evaluate the poor prognosis of ICC patients.

Keywords: intrahepatic cholangiocarcinoma; circular RNA ACTN4; platelet thrombin protein 1

肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 是最常见的胆道系统恶性肿瘤, 约占胆道恶性肿瘤的 75%^[1]。手术是 ICC 的主要治疗方案, 但 ICC 早期容易出现肝内扩散和淋巴结转移, 手术难以达到 R0 切除, 预后较差^[2]。研究影响 ICC 预后的因素, 对于手术方案的选择, 最大程度保证 R0 切除、减少术后肿瘤局部复发和远处转移发生、延长患者生存期, 具有重要意义。环状 RNA (circ RNAs) 是具有闭合环状结构的非编码 RNA, 能在转录和翻译等多种水平调控基因表达, 参与 ICC 肿瘤的发生发展过程^[3]。CircACTN4 是新的具有促癌作用的环状 RNA^[4]。有研究表明, 乳腺癌中 CircACTN4 的表达上调能够增强癌基因 MYC 的表达, 促进癌症的发生和发展, 是新的预后相关肿瘤标志物^[5]。国内学者报道, CircACTN4 能够促进 ICC 肿瘤细胞 Hippo/Yap 通路的激活, 促进 ICC 的侵袭和转移, 导致肿瘤进展^[4]。血小板凝血酶蛋白 1 (thrombospondin 1, THBS1) 是参与细胞与细胞之间、细胞与基质之间相互作用的多功能糖蛋白, 参与胚胎发育、创伤修复等过程的调控^[6]。研究表明, 结直肠癌中 THBS1 能诱导细胞毒性 T 细胞耗竭, 促进肿瘤细胞的免疫逃逸和转移, 是潜在的肿瘤生物标志物^[7]。目前 ICC 中 CircACTN4, THBS1 的表达及临床意义尚不明确。本研究旨在研究 ICC

中 CircACTN4, THBS1 表达与临床特征的关系及预后意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象 回顾性分析 2017 年 5 月 ~ 2020 年 6 月西安交通大学第二附属医院诊治的 84 例 ICC 患者。纳入标准: ①患者均接受胆管癌根治术, 术后病理确诊为 ICC; ②临床病理资料、随访资料完整; ③根治术前患者无化疗、免疫治疗史; ④患者已签署知情同意书。排除标准: ①患者有其他恶性肿瘤病史; ②预计术后生存时间 < 3 个月; ③并发自身免疫疾病、心肝肾等功能不全; ④围手术期死亡; ⑤并发肝细胞癌、转移性癌等其他病理类型; ⑥手术切缘阳性。84 例 ICC 患者中, 男性 41 例, 女性 43 例; 年龄 39 ~ 79 (66.47 ± 7.89) 岁; 肿瘤分化程度: 高中分化程度 54 例, 低分化程度 30 例; 肿瘤直径: $\leq 5\text{cm}$ 者 32 例, $> 5\text{cm}$ 者 52 例; 淋巴结转移: 有 38 例, 无 46 例; 肝硬化: 有 35 例, 无 49 例; 脉管浸润: 有 22 例, 无 62 例; TNM 分期: I ~ II 期 49 例, III 期 35 例。本研究通过医院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 分光光度计 (型号 Narodrop2000, 美国赛默飞公司), 实时荧光定量 PCR 仪器 (型号 ABI7500, 美国 ABI 公司), 引物由上海生工公司设计合成, 免疫组织化学染色试剂盒 (货号 SP-

9002, 北京中杉金桥公司), 兔单克隆 THBS1 抗体(货号 ab267388, 美国 Abcam 公司), 显微镜(型号 DX31, 日本奥林巴斯公司)。

1.3 方法

1.3.1 CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 检测: 采用实时荧光定量 PCR 检测 ICC 癌组织和癌旁组织中 CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 表达。取 ICC 癌组织和癌旁组织约 50mg, 按照 Trizol 法裂解提取组织总 RNA, $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}=0.8 \sim 2.0$ 之间。逆转录后进行实时荧光定量 PCR 反应。CircACTN4 正向引物: 5'-AGACTCCGCATCGCAAAGG-3', 反向引物: 5'-TCACCACGTTGTTGTCAAGGG-3'; THBS1 正向引物: 5'-GCCATCCGCACTAACTACATT-3', 反向引物: 5'-TCCGTTGTGATAGCATAGGGG-3'; 内参 GAPDH 正向引物: 5'-TGCTATCACAACGGAGTTCAGT-3', 反向引物: 5'-GCAGGACACCTTTTTCAGATG-3'。反应程序: 94℃ 5min, 94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 30s, 35 个循环。反应体系: 96 孔板中的每孔 2×SYBR Green PCR Master Mix 10μl, cDNA 2μl, 无酶水 7μl, 引物 1μl。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法表示 CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 的相对表达量。以 CircACTN4 mRNA 平均值 3.14 将 ICC 患者分为 CircACTN4 mRNA 高表达组 ($n=40$) 和低表达组 ($n=44$), 以 THBS1 mRNA 平均值 2.82 将 ICC 患者分为 THBS1 mRNA 高表达组 ($n=41$) 和低表达组 ($n=43$)。

1.3.2 免疫组织化学法检测 THBS1 蛋白: 将术中获取的 ICC 癌组织和癌旁组织置于 10g/dl 中性甲醛中固定过夜, 石蜡包埋切片后, 60℃ 烘烤 2h, 按照常规免疫组织化学染色试剂盒步骤进行。对免疫组织化学法染色结果进行评分(为染色强度评分和染色面积评分乘积): < 2 分为阴性, ≥ 2 分为阳性; 染色强度分为 3 分(深棕色), 2 分(棕黄色), 1 分(浅黄色)及 0 分(蓝色)。染色面积评分: 染色面积 $\leq 25\%$ 为 0 分, $25\% \sim 50\%$ 为 1 分, $\geq 50\%$ 为 2 分。

1.3.3 随访方法: 所有 ICC 患者术后均进行随访。术后 3~6 个月门诊随访 1 次。随访内容包括患者生存情况、病史、查体及胸腹 CT 或 MRI 等影像学检查。随访截止至 2023 年 7 月 1 日。随访终点为患者死亡或到达随访终止时间。

1.4 统计学分析 本研究数据采用 SPSS 21.0 软件分析。计数资料用率进行描述, 组间用卡方检验比较。计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 通过 Student t 检验法进行比较。相关性分析采用 Pearson 相关分析。Kaplan-Meier 曲线和 Log-rank 检验分析 CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 表达曲线的差异。

单因素 COX 回归模型中 $P < 0.05$ 的因素纳入多因素分析模型。受试者工作特征曲线分析 CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 对 ICC 患者死亡预后的评估价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ICC 癌与癌旁组织中 CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 表达比较 ICC 癌组织中 CircACTN4 mRNA (3.14 ± 0.42), THBS1 mRNA (2.82 ± 0.36) 表达分别高于癌旁组织 (0.76 ± 0.25 , 0.81 ± 0.24), 差异具有统计学意义 ($t=44.094$, 42.068 , 均 $P < 0.001$)。ICC 癌组织中 CircACTN4 mRNA 与 THBS1 mRNA 表达呈正相关 ($r=0.669$, $P < 0.001$), 见图 1。

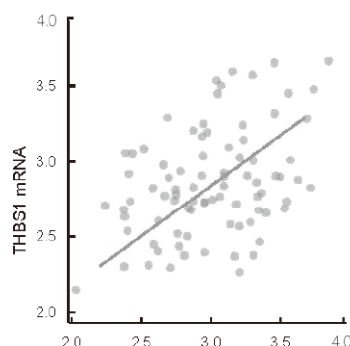


图1 ICC 癌组织中 CircACTN4 mRNA 与 THBS1 mRNA 表达相关性

2.2 ICC 癌与癌旁组织中 THBS1 蛋白表达比较 见图 2。THBS1 棕褐色染色位于细胞质和细胞膜。ICC 癌组织中 THBS1 蛋白阳性率为 92.86% (78/84), 高于癌旁组织 7.14% (6/84), 差异具有统计学意义 ($\chi^2=123.429$, $P < 0.001$)。

2.3 CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 表达与 ICC 临床因素的关系 见表 1。TNM 分期 III 期、低分化程度及有淋巴结转移 ICC 癌组织中 CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 表达高于 TNM 分期 I~II 期、高中分化程度及无淋巴结转移癌组织, 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.001$)。

2.3 癌组织中 CircACTN4 mRNA 与 THBS1 mRNA 表达对 ICC 患者生存预后的影响 见图 3。84 例 ICC 患者均获得随访, 无失访, 死亡 49 例, 三年总生存率为 41.67% (35/84)。CircACTN4 mRNA 高、低表达组三年总生存率分别为 25.00% (10/40), 56.82% (25/44), THBS1 mRNA 高、低表达组三年总生存率分别为 19.51% (8/41), 62.79% (27/43)。CircACTN4 mRNA 高表达组、THBS1 mRNA 高表达组三年累积生存率低于 CircACTN4 mRNA 低表达组、THBS1 mRNA 低表达组, 差异具有统计学意义 (Log rank $\chi^2=13.601$, 24.310 , 均 $P < 0.001$)。

2.4 ICC 患者预后影响因素分析 见表 2, 3。

以 ICC 患者生存预后为因变量（1=死亡，0=生存），以肿瘤分化程度、淋巴结转移、TNM 分期、CircACTN4 mRNA 和 THBS1 mRNA 为自变量，

进行多因素 COX 分析。结果显示，淋巴结转移、TNM 分期、肿瘤分化程度，CircACTN4 mRNA 及 THBS1 mRNA 是影响 ICC 患者预后的独立因素。

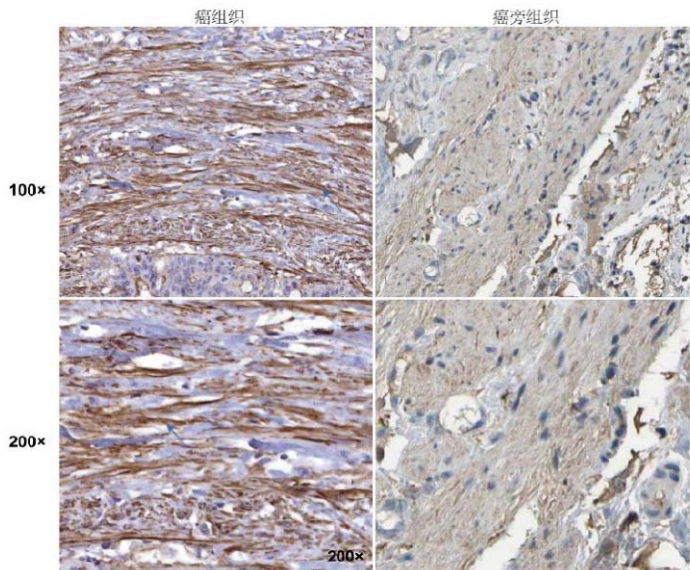


图 2 ICC 癌与癌旁组织中 THBS1 蛋白表达（免疫组化）

表 1 不同 ICC 临床因素癌组织中 CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 表达差异 ($\bar{x} \pm s$)

类别		<i>n</i>	CircACTN4 mRNA	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	THBS1 mRNA	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄（岁）	< 60	40	3.08 ± 0.45	1.186	0.239	2.75 ± 0.38	1.655	0.102
	≥ 60	44	3.19 ± 0.40			2.88 ± 0.34		
性别	男	41	3.20 ± 0.45	1.279	0.205	2.88 ± 0.38	1.547	0.126
	女	43	3.08 ± 0.41			2.76 ± 0.33		
肿瘤分化程度	高中分化	54	2.84 ± 0.50	7.949	< 0.001	2.12 ± 0.39	23.270	< 0.001
	低分化	30	3.68 ± 0.39			4.08 ± 0.33		
肿瘤直径（cm）	≤ 5	32	3.08 ± 0.40	1.031	0.306	2.75 ± 0.40	1.324	0.189
	> 5	52	3.18 ± 0.45			2.86 ± 0.35		
淋巴结转移	有	38	3.61 ± 0.46	9.164	< 0.001	3.63 ± 0.34	18.625	< 0.001
	无	46	2.75 ± 0.40			2.15 ± 0.38		
肝硬化	有	39	3.20 ± 0.47	1.172	0.245	2.90 ± 0.40	1.908	0.060
	无	45	3.09 ± 0.39			2.75 ± 0.32		
脉管浸润	有	22	3.24 ± 0.45	1.365	0.176	2.93 ± 0.37	1.702	0.093
	无	62	3.10 ± 0.40			2.78 ± 0.35		
TNM 分期	I ~ II	49	2.64 ± 0.49	12.207	< 0.001	2.16 ± 0.32	19.828	< 0.001
	III	35	3.84 ± 0.37			3.74 ± 0.41		

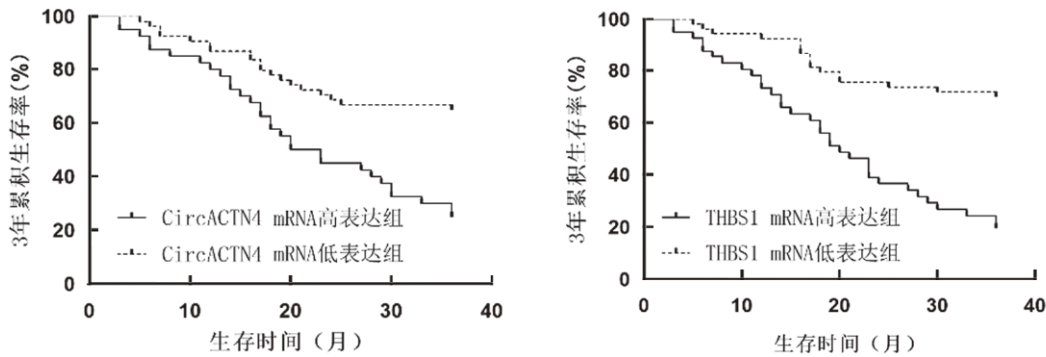


图 3 K-M 曲线分析 CircACTN4 mRNA 与 THBS1mRNA 表达对 ICC 患者生存预后的影响

表 2 单因素 COX 回归分析

类别	赋值	β	SE	Wald χ^2	P	OR	95%CI
年龄	≥ 60 岁 vs <60 岁	0.142	0.115	1.525	0.345	1.153	0.920 ~ 1.444
性别	男 vs 女	0.186	0.170	1.197	0.533	1.204	0.863 ~ 1.681
肿瘤直径	>5cm vs ≤ 5 cm	0.260	0.188	0.913	0.291	1.297	0.897 ~ 1.875
肝硬化	有 vs 无	0.246	0.209	1.385	0.344	1.279	0.849 ~ 1.926
脉管浸润	有 vs 无	0.232	0.174	1.778	0.332	1.261	0.897 ~ 1.774
肿瘤分化程度	低分化 vs 高中分化	0.373	0.252	2.191	0.261	1.452	0.867 ~ 2.380
淋巴结转移	有 vs 无	0.473	0.162	8.525	< 0.001	1.605	1.168 ~ 2.205
TNM 分期	Ⅲ期 vs Ⅰ ~ Ⅱ期	0.568	0.183	9.634	< 0.001	1.765	1.233 ~ 2.526
CircACTN4 mRNA	高表达 vs 低表达	0.620	0.176	12.410	< 0.001	1.859	1.317 ~ 2.625
THBS1 mRNA	高表达 vs 低表达	0.474	0.141	11.301	< 0.001	1.606	1.219 ~ 2.118

表 3 多因素 COX 回归分析

类别	β	SE	Wald χ^2	P	OR	95%CI
淋巴结转移	0.655	0.194	11.399	< 0.001	1.925	1.316 ~ 2.816
TNM 分期	0.478	0.141	11.493	< 0.001	1.613	1.223 ~ 2.126
肿瘤分化程度	0.412	0.115	12.835	< 0.001	1.510	1.205 ~ 1.892
CircACTN4 mRNA	0.609	0.206	8.740	< 0.001	1.839	1.228 ~ 2.753
THBS1 mRNA	0.556	0.172	10.449	< 0.001	1.744	1.245 ~ 2.443

2.5 CircACTN4 mRNA 及 THBS1 mRNA 对 ICC 患者预后的评估价值 见表 4，图 4。CircACTN4 mRNA，THBS1 mRNA 联合检测对 ICC 患者死亡预后的评估曲线下面积为 0.868，大于单项指标 0.812，0.784，差异具有统计学意义（ $Z=3.348$ ，3.847，均 $P < 0.001$ ）。

表 4 CircACTN4 mRNA mRNA 及 THBS1 mRNA 对 ICC 患者预后的评估价值

项目	曲线下面积 (95%CI)	约登指数	最佳截断值	敏感度	特异度
CircACTN4 mRNA	0.812(0.781 ~ 0.843)	0.530	3.73	0.726	0.804
THBS1 mRNA	0.784(0.741 ~ 0.826)	0.510	3.64	0.709	0.801
两项联合	0.868(0.837 ~ 0.909)	0.581	-	0.826	0.755

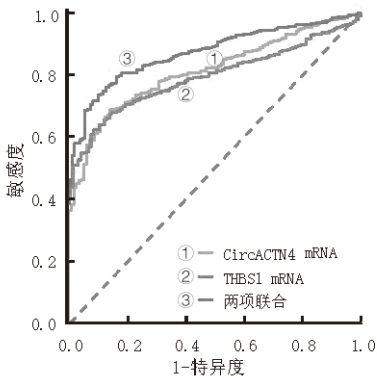


图 4 ROC 曲线分析 CircACTN4 mRNA 及 THBS1 mRNA 对 ICC 患者预后的评估价值

3 讨论

ICC 是肝内起源于二级及以上胆管分支的胆管癌。ICC 解剖位置隐匿，患者早期临床表现不明显，确诊时多为中晚期^[8]。目前 ICC 的治疗以手术为主，但 ICC 患者术后容易出现肿瘤复发转移，患者生存预后较差，五年生存率仅 20% ~ 40%^[9]。由于 ICC 肿瘤异质性，传统的临床病理特征如肿瘤直径、淋

巴结转移、肿瘤 TNM 分期等因素难以准确评估 ICC 患者的生存预后^[10]。深入研究 ICC 疾病机制，寻找 ICC 患者预后相关肿瘤标志物、对于指导临床诊治，改善预后意义重大。

CircACTN4 是无 5' 末端帽子和 3' 末端多聚腺苷酸尾的环状 RNA 分子，能够作为分子支架结合微小 RNA，促进癌细胞周期相关蛋白周期素 D1 等的表达，导致肿瘤细胞过度增殖^[11]。本研究中，ICC 中 CircACTN4 表达升高，与不良临床病理特征有关，提示 CircACTN4 参与 ICC 的肿瘤发生发展。ICC 中 CircACTN4 的表达上调受转录因子的表达调控。研究表明，乳腺癌等肿瘤中上游转录因子 2 表达升高，其能够结合 CircACTN4 启动子区域促进 CircACTN4 的转录和合成，激活人远端上游元件结合蛋白 1，促进肿瘤细胞的过度增殖^[4-5]。此外，CircACTN4 能够进入细胞核，竞争性结合上游元件结合蛋白 1，阻止上游元件结合蛋白 1 和聚尿苷酸结合剪接因子 60 结合，从而激活原癌基因 MYC 的转录，促进癌细胞的恶性进展^[4]。尚有研究发现，ICC 肿瘤细胞中 CircACTN4 能够作为分子支架吸收结合微小 RNA-

424-5p, 上调 Yes 相关蛋白 1 的表达, 激活 Hippo 信号通路, 促进肿瘤细胞增殖和转移^[9]。本研究, CircACTN4 是影响 ICC 患者预后的独立危险因素, 提示 CircACTN4 mRNA 是 ICC 的潜在预后标志物。分析其原因, CircACTN4 的表达促进肿瘤侵袭和转移, 增加肿瘤术后复发转移风险, 导致 ICC 患者不良预后。WANG 等^[5]报道, CircACTN4 能够募集 Y 盒结合蛋白 1, 促进 Wnt 受体卷曲蛋白 7 的转录, 增强 Yes 相关蛋白 1 和 β -连环蛋白之间的相互作用, 激活 Wnt 信号通路并促进上皮间质转化的发生, 导致 ICC 肿瘤细胞的侵袭和转移。此外, CircACTN4 对 Hippo 信号通路和 Wnt 信号通路的激活效应能够增强肿瘤细胞对化疗及靶向治疗的耐药性, 降低术后辅助化疗的有效性, 导致患者不良生存预后^[12]。因此, ICC 中 CircACTN4 的表达升高促进 ICC 的肿瘤发生发展, 是新的评估 ICC 患者生存预后的肿瘤标志物。

THBS1 是一种钙结合糖蛋白, 能与生长因子、细胞外基质结合, 参与细胞迁移和血管生成^[13]。研究表明, THBS1 通过促进结直肠癌肿瘤细胞发生上皮-间质转化, 促进肿瘤细胞肝转移的发生^[9]。本研究中, ICC 癌组织中 THBS1 表达升高, 提示 THBS1 可能参与了 ICC 的肿瘤发生。ICC 中 THBS1 的表达受乳酸代谢产物的调控。研究表明, ICC 癌症细胞中高糖酵解活性导致肿瘤微环境中的乳酸堆积, 乳酸能够上调 THBS1 的表达, 上调上皮-间充质转化相关基因的表达, 促进肿瘤细胞迁移和侵袭^[15]。此外, ICC 中 Hippo 通路的过度激活能够促进 Yes 相关蛋白的去磷酸化激活, Yes 相关蛋白进入细胞核结合 THBS1 基因启动子, 促进 THBS1 的表达, 进而促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[5,10]。本研究中, THBS1 表达与 TNM 分期、分化程度及淋巴结转移有关, 提示 THBS1 参与促进 ICC 的肿瘤进展。分析其机制, THBS1 能够通过抑制 CD47 依赖的先天免疫细胞和适应性免疫细胞的活性, 抑制机体抗肿瘤免疫反应, 导致肿瘤免疫逃逸的发生, 引起肿瘤恶性增殖和转移^[17]。尚有研究表明, THBS1 能够通过诱导色素上皮衍生因子的分泌, 促进体外淋巴管的形态发生和活力, 促进肿瘤细胞的淋巴结转移^[18]。本研究中, THBS1 mRNA 高表达 ICC 患者生存预后较差, 表明 THBS1 mRNA 表达有助于评估 ICC 患者的生存预后。分析其原因, THBS1 的表达升高促进肿瘤相关巨噬细胞的浸润, 促进肿瘤免疫逃逸、降低机体抗肿瘤免疫能力。容易造成术后肿瘤复发和转移, 导致患者不良生存预后^[19]。另外, THBS1 的表达还能够通过活化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路, 降低 ICC 患者辅助化疗治疗

的敏感性, 增加肿瘤术后复发风险, 缩短患者术后生存期^[20]。

本研究中, ICC 癌组织中 CircACTN4 mRNA 与 THBS1 mRNA 表达呈正相关, 提示两者在 ICC 中可能存在相互作用的关系。研究表明, CircACTN4 可与人远端上游元件结合蛋白 1 结合, 协同激活癌基因 MYC 的转录, 促进肿瘤进展^[12]。另有研究证实, 人远端上游元件结合蛋白 1 的过表达通过上调 THBS1 的表达, 激活转化生长因子- β /Smad 通路, 促进肿瘤细胞上皮-间质转化, 增强肝癌细胞的增殖、侵袭和转移^[21]。但 ICC 中 CircACTN4 与 THBS1 之间的相互作用关系有待今后进行深入的实验研究。本研究中, 淋巴结转移、TNM 分期、肿瘤分化程度是影响 ICC 患者预后的独立因素。ICC 主要通过淋巴回流的方式向肝外淋巴结转移至肝外脏器直接浸润, 进而增加患者 ICC 根治术后复发的风险^[22]。另外, 对于肿瘤低分化程度、TNM 分期 III 期的 ICC 患者, 肿瘤恶性程度高, 肿瘤负荷大, 肿瘤容易侵犯周围组织及血管、淋巴管等, 增加 ICC 患者复发转移风险, 导致患者不良生存预后^[23]。

综上所述, ICC 癌组织中 CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 和 THBS1 蛋白表达升高, CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 表达与 ICC 不良临床病理特征相关, 均参与 ICC 肿瘤的恶性进展。CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 高表达是影响 ICC 患者不良生存预后的独立因素, 临床医生可根据 CircACTN4 mRNA, THBS1 mRNA 的表达水平评估 ICC 患者的生存预后, 对于高危患者予以积极治疗和随访, 以改善 ICC 患者临床预后。但本研究的局限在于未能对 CircACTN4 与 THBS1 在促进 ICC 肿瘤进展的分子机制进行研究, 两者能否成为新的 ICC 治疗靶点有待今后深入研究。

参考文献:

- [1] MORIS D, PALTA M, KIM C, et al. Advances in the treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma: An overview of the current and future therapeutic landscape for clinicians[J]. CA-A Cancer Journal for Clinicians, 2023, 73(2): 198-222.
- [2] 毛俊, 沈秀芬, 马润, 等. 基于 TCGA 和 GEO 数据库建立了肝内胆管癌的预后风险模型及验证分析[J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(3): 40-46, 64. MAO Jun, SHEN Xiufen, MA Run, et al. Establishment and verification of prognostic risk model of intrahepatic cholangiocarcinoma based on TCGA and GEO database[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(3): 40-46, 64.
- [3] XU Yi, LENG Kaiming, YAO Yue, et al. A circular RNA, cholangiocarcinoma-associated circular RNA 1, contributes to cholangiocarcinoma progression,

- induces angiogenesis, and disrupts vascular endothelial barriers[J]. *Hepatology*, 2021, 73(4): 1419-1435.
- [4] 陈秦俊杰. 环状RNA ACTN4促进肝内胆管癌进展的机制研究[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2021.
CHEN Qinjunjie. CircRNA ACTN4 facilitates the progression of intrahepatic cholangiocarcinoma and its molecular mechanisms [D]. Shanghai: PLA Naval Medical University, 2021.
- [5] WANG Xiaosong, XING Lei, YANG Rui, et al. The circACTN4 interacts with FUBP1 to promote tumorigenesis and progression of breast cancer by regulating the expression of proto-oncogene MYC[J]. *Molecular Cancer*, 2021, 20(1): 91.
- [6] SHEN Jie, CAO Beibei, WANG Yatao, et al. Hippo component YAP promotes focal adhesion and tumour aggressiveness via transcriptionally activating THBS1/FAK signalling in breast cancer[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2018, 37(1): 175.
- [7] OMATSU M, NAKANISHI Y, IWANE K, et al. THBS1-producing tumor-infiltrating monocyte-like cells contribute to immunosuppression and metastasis in colorectal cancer[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 5534.
- [8] 朱兴书, 陈鹏飞, 张萌帆, 等. ^{125}I 腔内照射联合仑伐替尼治疗进展期肝外胆管癌的效果和安全性分析[J]. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(10): 2406-2412.
ZHU Xingshu, CHEN Pengfei, ZHANG Mengfan, et al. Efficacy and safety of ^{125}I intraluminal irradiation combined with lenvatinib in treatment of progressive extrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Journal of Clinical Hepatology*, 2023, 39(10): 2406-2412.
- [9] GOETZE T O, BECHSTEIN W O, BANKSTAHL U S, et al. Neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine plus cisplatin followed by radical liver resection versus immediate radical liver resection alone with or without adjuvant chemotherapy in incidentally detected gallbladder carcinoma after simple cholecystectomy or in front of radical resection of BTC (ICC/ECC) - a phase III study of the German registry of incidental gallbladder carcinoma platform (GR)- the AIO/CALGP/ ACO- GAIN-trial [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 122.
- [10] DONG Liangqing, LU Dayun, CHEN Ran, et al. Proteogenomic characterization identifies clinically relevant subgroups of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(1): 70-87, e15.
- [11] 欧小强, 陈俊霞. 环状RNA circACTN4促进乳腺癌细胞增殖、侵袭和转移的研究[J]. *陆军军医大学学报*, 2022, 44(7): 639-647.
OU Xiaoqiang, CHEN Junxia. Circular RNA circACTN4 promotes proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells [J]. *Journal of Army Medical University*, 2022, 44(7): 639-647.
- [12] WANG Jinghan, YU Hongming, DONG Wei, et al. N6-methyladenosine-mediated up-regulation of FZD10 regulates liver cancer stem cells' properties and lenvatinib resistance through WNT/ β -catenin and hippo signaling pathways [J]. *Gastroenterology*, 2023, 164(6): 990-1005.
- [13] LIAO Fengchun, LIAO Ziqi, ZHANG Tao, et al. ECFC-derived exosomal THBS1 mediates angiogenesis and osteogenesis in distraction osteogenesis via the PI3K/AKT/ERK pathway[J]. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2022, 37: 12-22.
- [14] LIU Xiangyuan, XU Dongsheng, LIU Zhuang, et al. THBS1 facilitates colorectal liver metastasis through enhancing epithelial-mesenchymal transition[J]. *Clinical & Translational Oncology*, 2020, 22(10): 1730-1740.
- [15] THAMRONGWARANGGOON U, KURIBAYASHI K, ARAKI H, et al. Lactic acidosis induces metabolic and phenotypic reprogramming in cholangiocarcinoma cells via the upregulation of thrombospondin-1[J]. *Cancer Science*, 2023, 114(4): 1541-1555.
- [16] ZHANG Yi, XU Hongwei, CUI Guofei, et al. β -catenin sustains and is required for YES-associated protein oncogenic activity in cholangiocarcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2022, 163(2): 481-494.
- [17] KAUR S, BRONSON S M, PAL-NATH D, et al. Functions of thrombospondin-1 in the tumor microenvironment[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(9): 4570.
- [18] CARPINO G, CARDINALE V, DI GIAMBERARDINO A, et al. Thrombospondin 1 and 2 along with PEDF inhibit angiogenesis and promote lymphangiogenesis in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Journal of Hepatology*, 2021, 75(6): 1377-1386.
- [19] ZHANG Xiuyuan, HUANG Tingting, LI Yiming, et al. Upregulation of THBS1 is related to immunity and chemotherapy resistance in gastric cancer[J]. *International Journal of General Medicine*, 2021, 14: 4945-4957.
- [20] LEE S M, HAN Y, CHO K H. Deep learning untangles the resistance mechanism of p53 reactivator in lung cancer cells[J]. *iScience*, 2023, 26(12): 108377.
- [21] FU Peiyao, HU Bo, MA Xiaolu, et al. Far upstream element-binding protein 1 facilitates hepatocellular carcinoma invasion and metastasis[J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(7): 950-960.
- [22] 施学兵, 李炜, 李志臻, 等. 肝内胆管细胞癌淋巴结转移危险因素分析及风险预测[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2022, 28(5): 333-336.
SHI Xuebing, LI Wei, LI Zhizhen, et al. Risk factors in predicting lymph node metastases in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery*, 2022, 28(5): 333-336.
- [23] 李鹏, 齐瑞兆, 余灵祥, 等. 肝内胆管细胞癌切除术后复发与生存时间的影响因素分析[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2022, 28(4): 270-274.
LI Peng, QI Ruizhao, YU Lingxiang, et al. Factors influencing recurrence and survival after resection of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery*, 2022, 28(4): 270-274.

收稿日期: 2023-11-12

修回日期: 2024-01-04