

ROS 酪氨酸激酶在胆管癌中表达及靶向治疗应用的研究现状

石万红 邹 浩 张小文

摘 要 ROS1 基因是一种原癌基因,与 UR2 肉瘤病毒的 v - ros 序列同源。ROS1 蛋白是一种酪氨酸激酶受体蛋白,其配体未知。ROS1 融合基因在多种肿瘤中相继被发现。ROS1 融合蛋白作为一种癌蛋白,激活下游的信号转导通路,促进细胞增殖,存活和细胞周期进程,加速了胆管癌发生、发展。ROS 激酶抑制剂越来越多地应用于 ROS 阳性的肿瘤中,ROS 激酶抑制剂 crizotinib 作为一种小分子抑制剂给 ROS 阳性患者带来了希望。虽然部分患者对 crizotinib 存在耐药或激酶结构域发生突变,但是 ROS 激酶抑制剂 foretinib 可作为对 crizotinib 耐药或激酶结构域发生突变的患者另一替代治疗。

关键词 ROS 融合基因 ROS 融合蛋白 胆管癌 ROS 酪氨酸激酶抑制剂

中图分类号 R735.8

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.10.003

胆管癌(cholangiocarcinoma, CCA)是最常见的原发性胆管恶性肿瘤,预后不良。CCA 占有原发性肝胆恶性肿瘤的 10% ~ 25%,占全身肿瘤的 1% 以下,好发于 70 ~ 80 岁人群,男性发生率略高[男性:女性为(1.2 ~ 1.5):1.0]。胆管癌是一种由肝内或肝外胆管树的上皮细胞转化而来的恶性肿瘤,包括肝内胆管癌,门静脉/肝门部胆管癌,远端胆管癌和胆囊癌。其中肝内胆管癌占 10% ~ 20%,肝门部胆管癌占 50%,肝外胆管癌占 30% ~ 40%^[1]。现有治疗对胆管癌患者反应性差,预后不良,确诊时多数已属晚期,中位生存期不足 2 年,5 年生存率为 5% ~ 15%^[2]。由于对胆管癌的病因和发病机制认识不足,使诊断和治疗变得困难。新近文献报道 ROS1 融合基因对胆管癌的进展起着重要作用。综上,迫切需要针对胆管癌的新型靶向治疗策略来提高患者的生存质量和改善预后。

一、ROS1 的概况

UR2 肉瘤病毒具有编码酪氨酸特异性蛋白激酶活性的融合蛋白 p68^{gag-ros}^[3]。UR2 致癌基因 v - ros 携带的激酶结构域与 src 癌基因家族中的激酶结构域同源^[4]。v - ros 基因被认为是来源于鸡的原癌基因 c - ros 的类似物^[5]。人类 c - ros 致癌基因 1

(ROS1)与 UR2 肉瘤病毒的 v - ros 基因序列同源^[6]。ROS1 是一种编码受体酪氨酸蛋白激酶(RTK)的原癌基因,具有酪氨酸激酶结构域的单程跨膜蛋白^[7]。ROS1 蛋白在人体器官组织中广泛表达,特别是在肾脏中表达最高^[8]。已有研究发现 EGFR 或 TRKA 的配体与 ROS1 激酶结构域融合的报道。当用相应的生长因子刺激这些表达融合体的细胞时,观察到下游 PLC γ 、PI $_3$ K/AKT、STAT3、VAV3 和 MAPK/ERK 信号转导通路的激活,这些途径的失调随后刺激细胞增殖,血管生成和存活,从而促进了胆管癌的发生、发展^[9]。

二、ROS1 的结构与功能

在已知的 90 种酪氨酸激酶中,有 58 种是受体型^[10]。ROS1 是 58 种受体酪氨酸激酶之一。实质上,由于 ROS 缺乏确定的配体,使其相关研究进展受阻,导致 ROS 成为最后两个孤儿受体酪氨酸激酶之一。ROS 受体在胚胎发育期间已有表达,但在成年人中表达很少,其生理功能未知。ROS1 与 ALK,RTK 和胰岛素酪氨酸激酶受体蛋白密切相关^[11]。人类 ROS1 基因编码 2347 个氨基酸残基,ROS1 蛋白是最大的酪氨酸激酶受体蛋白。ALK 融合蛋白通过其氨基末端部分诱导二聚化,进一步激活下游信号转导通路。而 ROS1 融合蛋白的氨基末端结构域缺乏诱导二聚化的能力,使得 ROS1 蛋白激酶激活的机制是未知的^[11]。ROS1 融合蛋白激活导致下游信号通路的活化,包括 Ras/Raf/MEK/ERK1/2,磷脂酰肌醇 3 - 激酶(PI $_3$ K)和鸟嘌呤核苷酸转移因子(VAV3)信号

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260084);云南省科技厅 - 昆明医科大学联合专项基金资助项目(2015FB056)

作者单位:650100 昆明医科大学第二附属医院肝胆外科

通讯作者:张小文,主任医师,博士生导师,电子信箱:zhangxiaowenlu@163.com

通路的激活,这与肿瘤细胞增殖,存活和细胞周期密切相关^[11]。

三、ROS1 基因融合、易位和重排在胆管癌中的表达

首次用于转染的 DNA 来自人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞。将 DNA 转移至 NIH-3T3 细胞,然后将其植入裸鼠,检测 DNA 介导的基因转移和致癌性^[12]。基因融合最先报道于血液系统疾病,即慢性粒细胞白血病的 BCR-ABL 基因融合^[13]。在人多形胶质母细胞瘤中 ROS 的羧基末端(3'区域)激酶结构域与 FIG 的氨基末端(5'区域)部分融合,导致 FIG-ROS 基因融合。发现在染色体 6q21 上的 240 千碱基的纯合缺失导致了 FIG-ROS 融合基因的形成。FIG-ROS 转录由 7 个外显子和 9 个 ROS 衍生的外显子编码。FIG-ROS 融合基因编码具有酪氨酸激酶活性的融合蛋白,表明 FIG-ROS 可能为致癌基因。FIG-ROS 是染色体 6q21 缺失引起 ROS 融合蛋白的首次报道,也是第 1 个在人星形胶质母细胞瘤中分离的 ROS 融合蛋白^[14]。ROS1 基因融合包括 CD74-ROS1、CCDC6-ROS1、EZR-ROS1、FIG-ROS1、KDEL2-ROS1、LRIG3-ROS1、MSN-ROS1、SDC4-ROS1、SLC34A2-ROS1、TMEM106B-ROS1、TMP3-ROS1 和 TPD52L1-ROS1^[11]。在已知的融合基因中,完全保留了 ROS1 激酶结构域。

研究发现,FIG-363 短发卡 RNA(short hairpin RNA,shRNA)转染 HUCCT1 细胞可明显减少细胞集落形成,而对细胞增殖、凋亡及细胞周期无影响。ROS1-6290 shRNA 单独或联合 FIG-363 shRNA 转染 HUCCT1 细胞均能明显抑制细胞增殖、迁移、侵袭、细胞集落形成和细胞周期进程,同时诱导细胞凋亡,其中联合转染抑制细胞作用更强^[15]。此外,AKT 信号通路参与了 ROS-FIG 介导的 HUCCT1 细胞的生物学过程。研究表明部分肝内胆管细胞癌中存在 FIG-ROS 融合基因,并且具有致癌作用^[15, 16]。在 23 例胆管细胞癌中有 2 例(8.7%)存在 ROS 基因融合,为 FIG-ROS(S)和 FIG-ROS(L),未发现正常组织中存在 ROS 基因融合^[17, 18]。意大利的一份研究中发现,65 例胆管癌患者中有 6 例(9%)为 FIG-ROS1 基因融合阳性,其中包括 2 例胆囊癌和 4 例肝外胆管癌,而肝内胆管癌中未见 FIG-ROS1 基因融合^[19]。此外,100 例胆管癌患者中仅有 1% 表现为 ROS1 易位阳性^[20]。然而,ROS1 基因重排在 102 个肝内胆管癌样品中却没有被发现^[21]。另一项 56 例

中国人胆管癌研究中,80.4% 表达 SERPINA1,没有发现 FIG-ROS、SLC34A2-ROS、CD74-ROS 基因融合,因此认为 ROS 基因融合在中国 CCA 患者中并不常见^[22]。

四、胆管癌 ROS1 融合基因的动物研究

肝内胆管癌的原位同种异体移植小鼠模型包含了人类肝内胆管癌中常见的遗传变异,并且在组织学上类似于人类疾病。通过该模型发现 FIG-ROS 融合基因显著加速了肝内胆管癌的进展,并且其在肿瘤中的失活有效的抑制了肿瘤的进展^[23]。裸鼠的体内试验中,皮下注射表达 FIG-ROS 的 3T3 细胞稳转株可见肿瘤形成。胆管癌中发现的 ROS 融合基因在体内同样具有致癌性,并且对其激酶抑制剂有反应^[17, 24]。通过胆管癌 ROS1 融合基因的动物实验研究,进一步验证了 ROS1 基因融合可能与胆管癌发生、发展相关,可作为胆管癌和其他肿瘤潜在的有效治疗靶点。

五、ROS1 蛋白在胆管癌中的表达

1. ROS1 蛋白在胆管癌中的表达比率:大量的研究证实 ROS1 蛋白在胆管癌中阳性表达。比如在 194 例肝内胆管癌研究中有 72 例(37.1%)肿瘤 ROS1 阳性表达^[21]。类似的研究中,38 例(19.1%)胆管癌患者中观察到 ROS1 蛋白表达,发现 3 例(1.1%)肝内胆管癌存在 ROS1 基因重排^[25]。另一项研究中,18 例(78%)ROS1 表现出高水平酪氨酸激酶磷酸化,高表达 ROS1 酪氨酸激酶活性,比癌旁组织表达高,其中 5 例(22%)低表达或不表达 RTK 活性^[26]。类似的研究中,ROS 在胆管癌组织中高表达(阳性表达率为 50%),而在癌旁组织中低表达(阳性表达率为 3%)^[27]。ROS1、ALK 或 c-MET(RAM)的异常表达与癌症的发生和耐药性有关。研究发现 110 个肝内肿瘤样本中有 18 个肿瘤样本高表达 RAM,92 个肿瘤样本低表达 RAM^[28]。

2. ROS1 蛋白表达与胆管癌的关系:酪氨酸磷酸化蛋白种类分布在胆管癌肿瘤组织和癌旁组织中类似,以酶类、细胞表面受体和细胞骨架蛋白为主,前者分别占 13%、11% 和 8%,后者分别占 16%、11% 和 8%^[26]。ROS 在 HUCCT1 细胞中呈阳性表达,而在 RBE 和 QBC939 细胞中不表达。ROS 蛋白的高表达与肿瘤患者的淋巴结转移、TNM 分期、无病生存率、肿瘤直径、分化程度显著相关,而与性别、年龄、肿瘤部位、总生存期和无复发生存期无关^[15, 16, 21, 25, 27]。然而在一项 80 例肝内胆管癌研究中却发现高表达

RAM 组的患者中位生存期低于低表达 RAM 组^[28]。

六、ROS1 融合蛋白的激活及信号通路

目前研究表明,ROS1 融合蛋白激活的机制尚不十分清楚。大量研究证实融合蛋白通过激活相应配体二聚化,从而导致细胞内结构域酪氨酸残基磷酸化,并激活下游信号转导途径。异常的 ROS1 激酶活性导致激活包括第 10 号染色体丢失的磷酸酶基因 (PTEN),PI₃K - AKT - mTOR,胰岛素受体底物蛋白 1 (IRS - 1)、JAK - STAT3、RAS - MAPK/ERK1/2 和 Src - 同源 2 结构域磷酸酶 1/2 (SHP - 1/2) 的信号转导途径^[11, 17, 21, 29, 30]。此外,AKT 信号转导已被证明可以控制细胞增殖,存活和细胞周期进程。在成纤维细胞或 Ba / F3 细胞中表达 FIG - ROS1、CD74 - ROS1 或 SDC4 - ROS1 融合体导致 ROS1 的自体磷酸化和 SHP - 2、MEK、ERK、STAT3、AKT 和 E - Syt1 的磷酸化。并且这种高度磷酸化导致肿瘤细胞更具侵袭性^[29]。然而 ROS1 抑制剂可以降低 HCC78 细胞中 ROS1、SHP - 2、AKT 和 ERK 磷酸化水平。总的来说,由 ROS1 融合体激活的信号通路似乎主要涉及其他 RTKs 也被激活的共同生长和存活途径。

七、ROS1 抑制剂在胆管癌中的靶向治疗应用

ROS1 基因融合、重排和易位已经在多种肿瘤中检测到,例如成人胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌 (NSCLC)、胆管癌、卵巢癌、胃腺癌、结肠直肠癌、炎性肌成纤维细胞瘤、血管肉瘤和上皮样血管内皮瘤等^[11, 21]。ROS1 激酶结构域的改变,激活并驱动细胞增殖,而肿瘤细胞的生长和存活依赖于活化的激酶,其激酶活性的抑制被认为是有效的抗肿瘤治疗策略。虽然 ROS1 重排、易位、基因融合在胆管癌中很罕见,但是对于那些具有遗传特异性的患者使用 ROS1 抑制剂进行临床试验是很有必要的^[25]。Crizotinib 已于 2016 年获得美国食品和药物管理局 (FDA) 批准用于治疗 ROS1 阳性非小细胞肺癌患者,它是一种多靶向 ALK / MET 激酶抑制剂,表现出良好的治疗效果。Lorlatinib (PF - 06463922) 是孤儿受体酪氨酸激酶 ROS1 的下一代小分子抑制剂,其具有与 ALK 生理学相关的激酶结构域,并且正在进行 I / II 期非小细胞肺癌临床试验研究。此外,ROS1 激酶抑制剂在胆管癌中同样也进行了广泛的研究。

由于 ROS1 激酶结构域与 ALK 具有 49% 的氨基酸序列同源性,因此,ALK 激酶抑制剂同样可以应用于 ROS1 阳性的肿瘤治疗。ALK 激酶抑制剂 TAE684 对融合基因 FIG - ROS (S)、FIG - ROS (L)

呈剂量依赖性抑制,并能抑制 STAT3、AKT、ERK 和 SHP - 2 的磷酸化,从而抑制细胞增殖,促进细胞死亡。ROS1 - 6290 和 FIG - 363 片段可能成为携带 ROS - FIG 融合蛋白的肝内胆管癌患者有效治疗靶标,对这两种基因的联合抑制可能是靶向治疗肝内胆管癌的有效途径^[15, 16]。在随机 II 期试验中用吉西他滨联合奥沙利铂 (GEMOX) 治疗胆管癌患者,有或没有西妥昔单抗。与单独用 GEMOX 治疗比较,低表达 RAM 患者用西妥昔单抗联合 GEMOX 治疗显著改善了疾病控制率,无进展中位生存期以及轻度延长了中位生存期^[28]。研究发现三取代基于吡唑的 ROS1 抑制剂,显示出良好的半抑制浓度值 (IC₅₀)。其中 16 种化合物中,化合物 9a 发挥了比 crizotinib 5 倍的效力,并表现出高度选择性和生物学活性。目前,AKT 抑制剂 MK2206 正在研究对中晚期难治性胆管癌的治疗效果。

研究发现 crizotinib 是比 foretinib 更有效的 ROS1 抑制剂。尽管 crizotinib 在 ROS1 重排的非小细胞肺癌患者中已经表现出良好的治疗效果。但是最新的临床证据表明,由于 ROS1 的激酶结构域发生点突变,患者可能会对 crizotinib 产生耐药,比如 ROS1^{G2032R} 突变体对 crizotinib 存在临床耐药性。因此需要其他有效的 ROS1 抑制剂来进行治疗性干预。最近报道 foretinib 表现出良好的敏感性和安全性,并且对 crizotinib 耐药和激酶结构域的突变体也很敏感。因此,对于 crizotinib 产生耐药或 ROS 激酶发生突变的肿瘤患者,foretinib 可作为另一种治疗选择。

综上所述,虽然 ROS1 基因被发现由来已久,但是最近 ROS1 融合基因在多种肿瘤中相继报道,使得人们将视线聚焦于 ROS 激酶抑制剂在 ROS 阳性肿瘤上的应用。ROS1 融合基因在胆管癌中表达虽然罕见,但是对于 ROS1 阳性的患者应用 ROS 激酶抑制剂具有良好的治疗效果。ROS 基因融合在体内体外都进行了大量的实验研究,认为 ROS 激酶可以成为胆管癌治疗靶标和分子诊断标志物。因此在胆管癌患者中广泛筛选激活的 ROS 激酶是有必要的^[17]。此外,ROS1 表达在多变量分析中是一个很好的无病生存的独立预测因子^[21]。但高表达 RAM 仍然是独立的不良预后因素,风险比为 2.01^[28]。最新临床证据表明,由于 ROS1 激酶存在点突变,使得部分患者对 crizotinib 产生耐药。然而,研究发现 foretinib 可作为对于 crizotinib 耐药或 ROS 激酶突变的肿瘤患者的另一种替代治疗。

参考文献

- Valle JW, Borbath I, Khan SA, *et al.* Biliary cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(suppl 5):v28-v37
- Najran P, Lamarca A, Mullan D, *et al.* Update on treatment options for advanced bile duct tumours: radioembolisation for advanced cholangiocarcinoma[J]. *Curr Oncol Rep*, 2017, 19(7):50
- Feldman RA, Wang LH, Hanafusa H, *et al.* Avian sarcoma virus UR2 encodes a transforming protein which is associated with a unique protein kinase activity[J]. *J Virol*, 1982, 42(1):228-236
- Neckameyer WS, Wang LH. Nucleotide sequence of avian sarcoma virus UR2 and comparison of its transforming gene with other members of the tyrosine protein kinase oncogene family[J]. *J Virol*, 1985, 53(3):879-884
- Shibuya M, Hanafusa H, Balduzzi PC. Cellular sequences related to three new oncogenes of avian sarcoma virus (fps, yes, and ros) and their expression in normal and transformed cells[J]. *J Virol*, 1982, 42(1):143-152
- Matsushime H, Wang LH, Shibuya M. Human c-ros-1 gene homologous to the v-ros sequence of UR2 sarcoma virus encodes for a transmembrane receptorlike molecule[J]. *Mol Cell Biol*, 1986, 6(8):3000-3004
- Acquaviva J, Wong R, Charest A. The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1795(1):37-52
- Rinkunas VM, Crosby KE, Li D, *et al.* Analysis of receptor tyrosine kinase ROS1-positive tumors in non-small cell lung cancer: identification of a FIG-ROS1 fusion[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(16):4449-4457
- Nguyen KT, Zong CS, Uttamsingh S, *et al.* The role of phosphatidylinositol 3-kinase, rho family GTPases, and STAT3 in Ros-induced cell transformation[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(13):11107-11115
- Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome[J]. *Oncogene*, 2000, 19(49):5548-5557
- Roskoski Roskoski Jr. ROS1 protein-tyrosine kinase inhibitors in the treatment of ROS1 fusion protein-driven non-small cell lung cancers[J]. *Pharmacol Res*, 2017, 121:202-212
- Fasano O, Birnbaum D, Edlund L, *et al.* New human transforming genes detected by a tumorigenicity assay[J]. *Mol Cell Biol*, 1984, 4(9):1695-1705
- Xu DQ, Galibert F. Restriction fragment length polymorphism caused by a deletion within the human c-abl gene (ABL)[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83(10):3447-3450
- Charest A, Lane K, McMahon K, *et al.* Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21)[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2003, 37(1):58-71
- 朱垒, 黄飞舟, 聂晚频, 等. FIG-ROS 融合基因在肝内胆管细胞癌中表达及其意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(2):199-205
- Deng G, Hu C, Zhu L, *et al.* Downregulation of ROS-FIG inhibits cell proliferation, colony formation, cell cycle progression, migration and invasion, while inducing apoptosis in intrahepatic cholangiocarcinoma cells[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(3):661-668
- Gu TL, Deng X, Huang F, *et al.* Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1):e15640
- 董阳, 王以巧, 邓侠兴, 等. 胆管细胞癌 ROS 酪氨酸激酶基因融合的初步研究[J]. *外科理论与实践*, 2012, 17(6):645-648
- Peraldo Neia C, Cavalloni G, Balsamo A, *et al.* Screening for the FIG-ROS1 fusion in biliary tract carcinomas by nested PCR[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014, 53(12):1033-1040
- Graham RP, Barr Fritcher EG, Pestova E, *et al.* Fibroblast growth factor receptor 2 translocations in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2014, 45(8):1630-1638
- Lee KH, Lee KB, Kim TY, *et al.* Clinical and pathological significance of ROS1 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15:721
- Liu P, Wu Y, Sun L, *et al.* ROS kinase fusions are not common in Chinese patients with cholangiocarcinoma[J]. *Nan Fang Yi Ke Daxue Xuebao*, 2013, 33(4):474-478
- Saborowski A, Saborowski M, Davare MA, *et al.* Mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma validates FIG-ROS as a potent fusion oncogene and therapeutic target[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(48):19513-19518
- 王新景, 刘学谦, 金佳斌, 等. 胆管癌 ROS 融合基因的致瘤性研究[J]. *外科理论与实践*, 2014, 19(2):123-126
- Lim SM, Yoo JE, Lim KH, *et al.* Rare incidence of ROS1 rearrangement in cholangiocarcinoma[J]. *Cancer Res Treat*, 2017, 49(1):185-192
- 邓侠兴, 詹茜, 王以巧, 等. 胆管细胞癌酪氨酸激酶激活及其磷酸化酶分布[J]. *外科理论与实践*, 2011, 16(6):548-552
- 吴晓波. ROS 酪氨酸激酶在胆管癌中的表达[D]. 长沙:中南大学, 2014
- Chiang NJ, Hsu C, Chen JS, *et al.* Expression levels of ROS1/ALK/c-MET and therapeutic efficacy of cetuximab plus chemotherapy in advanced biliary tract cancer[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:25369
- Jun HJ, Johnson H, Bronson RT, *et al.* The oncogenic lung cancer fusion kinase CD74-ROS activates a novel invasiveness pathway through E-Syt1 phosphorylation[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(15):3764-3774
- Chong DQ, Zhu AX. The landscape of targeted therapies for cholangiocarcinoma: current status and emerging targets[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29):46750-46767

(收稿日期:2017-12-01)

(修回日期:2018-01-03)