

91 种炎症蛋白与胆道癌发病风险的因果关系

赵亚军¹ 冯立^{2*}

1 内蒙古医科大学 2 北京大学肿瘤医院内蒙古医院

DOI:10.12238/bmtr.v6i5.10088

[摘要] 背景: 胆道恶性肿瘤(BTC)是一种极为恶性的肿瘤,其5年生存率通常低于5%。炎症在BTC的发病机制中扮演重要角色,但目前关于炎症与BTC之间的因果关系研究仍较为匮乏。目的: 本研究旨在通过两样本双向孟德尔随机化分析,评估炎症相关蛋白与BTC之间的潜在因果关系。方法: 我们使用GWAS数据中的遗传变异(SNP)作为工具变量,依据关联性、独立性和排他性假设筛选有效的工具变量。炎症相关蛋白的数据来源于GWAS Catalog(包含14824名欧洲人),而BTC的数据则来自IEU数据库(包括196084名东亚人)。工具变量筛选标准为SNP阈值 $P < 5 \times 10^{-8}$,排除连锁不平衡影响,F统计量 > 10 。分析采用R软件包,包括IVW法、WM法和MR-Egger回归等方法。敏感性分析通过Cochran's Q统计量检验异质性,并使用MR-Egger回归和MR-PRESSO评估水平多效性。结果: 我们发现7种炎症相关蛋白与BTC存在显著的因果关系,其中4种为BTC的危险因素,包括CD40L受体、成纤维细胞生长因子23(FGF23)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)和白介素7(IL-7);另外3种为BTC的保护因素,包括神经生长因子 β (β -NGF)、S100A12蛋白(S100-A12)和 γ 干扰素(INF γ)。结论: 这些发现对于深入理解BTC的发病机制及其预防和治疗策略具有重要指导意义。

[关键词] 孟德尔随机化; 炎症相关蛋白; 胆道恶性肿瘤; GWAS数据; 因果关系

中图分类号: R575.6+1 文献标识码: A

Causal relationship between 91 inflammatory proteins and the risk of biliary tract cancer development

Yajun Zhao¹ Li Feng^{2*}

1 Inner Mongolia Medical University

2 Peking University Cancer Hospital Inner Mongolia Hospital

[Abstract] BACKGROUND: Biliary tract malignancy (BTC) is an extremely malignant tumour with a 5-year survival rate usually below 5%. Inflammation plays an important role in the pathogenesis of BTC, but there is still a paucity of studies on the causal relationship between inflammation and BTC. OBJECTIVE: The aim of this study was to assess the potential causal relationship between inflammation-associated proteins and BTC by two-sample bidirectional Mendelian randomisation analysis. METHODS: We used genetic variants (SNPs) from GWAS data as instrumental variables and screened for valid instrumental variables based on association, independence and exclusivity assumptions. Data on inflammation-related proteins were obtained from the GWAS Catalog (including 14,824 Europeans), while data on BTC were obtained from the IEU database (including 196,084 East Asians). Instrumental variable screening criteria were SNP threshold $P < 5 \times 10^{-8}$, exclusion of effects of linkage disequilibrium, and F-statistic > 10 . Analyses were performed using the R package, which includes the IVW method, the WM method, and MR-Egger regression. Sensitivity analyses tested for heterogeneity by Cochran's Q statistic, and horizontal pleiotropy was assessed using MR-Egger regression and MR-PRESSO. RESULTS: We found a significant causal relationship between seven inflammation-related proteins and BTC, four of which were risk factors for BTC, including CD40L receptor, fibroblast growth factor 23 (FGF23), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), and interleukin 7 (IL-7); and three of which were protective factors for BTC, including nerve growth factor beta (beta-NGF), S100A12 protein (S100-A12) and interferon gamma (INF γ). CONCLUSION: These findings are important guidelines

for a deeper understanding of the pathogenesis of BTC and its prevention and treatment strategies.

[Key words] Mendelian randomisation; inflammation-related proteins; biliary malignancies; GWAS data; causality

1 背景

胆道恶性肿瘤(Biliary Tract Cancer, BTC)是一种高度恶性的肿瘤,主要包括胆囊癌和肝内外胆管癌两大类。尽管其发病率较低,但BTC的预后极差,5年生存率通常不足5%,此外,全球范围内BTC的发病率呈上升趋势,以亚洲国家更为显著。目前,BTC的主要治疗方法包括手术切除、化疗和放疗等^[1]。然而多数BTC患者在确诊时已处晚期,无手术机会,加之放化疗的疗效有限,因此,早期筛查和早期诊断对改善预后方面至关重要。这种严峻的预后形势使得BTC在早期诊断、获得有效治疗成为临床和科研的重大挑战。

研究表明^[2],慢性炎症是BTC发展的主要驱动因素之一。慢性胆管炎、胆囊炎和其他胆道相关的炎症性疾病可通过多种机制促进胆道癌的发生。这些机制包括^[3]炎症细胞的激活、细胞因子的释放、氧化应激以及局部微环境的改变等。炎症细胞通过分泌各种细胞因子和生物活性分子改变肿瘤微环境,促进癌细胞的增殖和分化。此外,炎症细胞的持续存在还能通过影响局部免疫环境来提升癌细胞的抗药性^[4]。例如,肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)和其他炎症细胞能够分泌促炎因子,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)等,这些因子不仅促进癌细胞的增殖,还可能促进血管生成和肿瘤转移^[5]。

在研究致病因素及疾病风险时,随机对照试验(RCT)具有较高的参考意义,但由于临床因素限制,RCT难以广泛开展。孟德尔随机化^[6](Mendelian Randomization, MR)是一种利用遗传变异作为工具变量来评估暴露因素与疾病之间因果关系的统计方法,可在一定程度上模拟RCT的效果。近年来孟德尔随机化已被广泛应用于医学研究,包括心血管疾病、糖尿病、癌症等领域。我们的研究旨在通过孟德尔随机化分析,揭示炎症相关蛋白在BTC中的潜在作用机制,以期从遗传角度识别与BTC发病风险显著相关的生物标志物,为BTC的风险因素提供新见解。

2 材料与方法

2.1 研究设计

本研究以91个炎症相关蛋白(Inflammation-related proteins)为暴露,以胆道恶性肿瘤(BTC)为结局,采用两样本双向孟德尔随机化分析评估炎症相关蛋白与胆道恶性肿瘤之间潜在的因果关系。我们以遗传变异即核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)作为工具变量,并遵循三个核心假设来筛选有效工具变量^[7]:①关联性假设:工具变量需与暴露因素强相关;②独立性假设:工具变量应与任何干扰暴露因素与结局变量关系的混杂因素独立;③排他性假设:工具变量对结局变量的影响应仅通过暴露因素,而无其他干扰路径。孟德尔随机化分析使用R v4.4.1软件进行。

2.2 炎症相关蛋白的GWAS数据来源

炎症相关蛋白的全基因组关联研究(Genome-wide association study, GWAS)数据从GWAS catalog中 (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/downloads>) 公开获取,数据涵盖14824名欧洲人,包括91个炎症相关蛋白(GWAS ID: GCST90274758至GCST90274848)^[8]。

2.3 胆道恶性肿瘤的GWAS数据来源

胆道恶性肿瘤的GWAS数据来源于IEU数据库(<https://gwas.mrcieu.ac.uk/datasets/bbj-a-92/>),数据包括196084名东亚人(339例患者和195745例健康人群),涵盖8885064个SNP。所有数据均来自公开研究和数据库,且已获得伦理批准和知情同意,无需额外伦理审查。

2.4 工具变量筛选

选择工具变量时设置了严格参数,SNP阈值设置为 5×10^{-8} ,选择 $P < 5 \times 10^{-8}$ 的SNP作为工具变量;设置参数为 $r^2 = 0.001$ 、 $kb = 10000$ 去除因连锁不平衡产生的混杂因素;保留F统计量 > 10 的工具变量,以避免弱工具变量的影响。

2.5 孟德尔随机化分析

我们使用R包“TwoSampleMR”和“MendelianRandomization”,应用IVW法、WM、MR-Egger回归、简单模型和加权模型等方法进行分析。IVW法的结果作为主要依据。效应值的显著性由P值表示, $P < 0.05$ 为显著;暴露与结局之间的相关性用比值比(OR)及95%置信区间(95%CI)表示。OR > 1 表示暴露是结局的危险因素,OR < 1 则表示保护因素。

2.6 敏感性分析

使用Cochran's Q统计量进行异质性检验,当 $P < 0.05$ 时认为工具变量中存在异质性,采用随机效应模型代替固定效应模型,当 $P > 0.05$ 则依旧采用固定效应模型。使用MR-Egger回归和MR-PRESSO进行水平多效性检验评估因果关系的稳健性,当MR-Egger截距项 $P < 0.05$ 时,提示存在水平多效性,需要重新选择工具变量;当MR-PRESSO剔除某一SNP后 $P < 0.05$,则提示存在水平多效性。

3 结果

3.1 工具变量的筛选

我们严格按照工具变量筛选流程进行操作。最终从91个炎症相关蛋白中筛选出903个SNPs,所有这些SNP的F统计量均大于10,范围从21.74到236.84。这些符合筛选标准的工具变量为后续分析提供了可靠的基础。

3.2 炎症相关蛋白与胆道恶性肿瘤之间的因果关系

双样本孟德尔随机化分析揭示了91个炎症相关蛋白与胆道恶性肿瘤(BTC)之间的因果关系。结果显示,有7个炎症相关蛋白与BTC存在显著的因果关系($P < 0.05$)。这些蛋白中:有4个是胆道恶性肿瘤的危险因素,这些蛋白的暴露会增加BTC的发生风险,包括:CD40L受体、成纤维细胞生长因子23(FGF23)、胶质细胞

源性神经营养因子(GDNF)和白介素7(IL-7);其余3个胆道恶性肿瘤的保护因素,这些蛋白的暴露会降低BTC的发生风险,包括:神经生长因子 β (β -NGF),S100A12蛋白(S100-A12 protein)和 γ 干扰素(INF γ)。见图1。

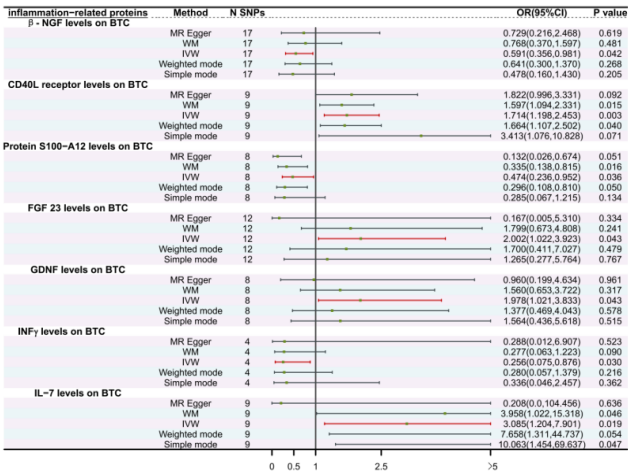


图1 孟德尔随机化分析结果森林图

3. 3敏感性分析

为了验证分析结果的稳健性,我们进行了敏感性分析,包括异质性检验和水平多效性检验。Cochran's Q统计量和MR-Egger回归分析的P值均>0.05,表明结果的稳健性良好,工具变量未通过暴露以外的途径对结局产生影响。MR-PRESSO的结果也支持这一结论,即在剔除某一SNP后,结果依然稳定,未发现水平多效性问题。具体见表1。

表1 敏感性分析结果

暴露	结局	异质性检验(P值)	水平多效性检验(P值)	
		Cochran's Q	MR-Egger回归	MR-PRESSO
β -NGF	BTC	0.383	0.711	0.428
CD40L受体	BTC	0.255	0.786	0.465
S100A12蛋白	BTC	0.413	0.14	0.439
FGF23	BTC	0.172	0.18	0.21
GDNF	BTC	0.932	0.36	0.934
INF?	BTC	0.87	0.943	0.922
IL-7	BTC	0.198	0.416	0.232

4 讨论

4. 1危险因素

4. 1. 1 CD40L受体

CD40L受体(CD40 Ligand)是一种关键的免疫调节因子,主要通过CD40结合,激活下游信号通路,调节免疫细胞的活化和

增殖^{[9][10]}。这一过程形成了促炎微环境,可能促进癌细胞的增殖和转移。在胆道恶性肿瘤(BTC)中,CD40L受体的过度表达可能增强局部免疫抑制,从而增加BTC的发病风险。

4. 1. 2成纤维细胞生长因子23(FGF23)

FGF23主要由骨组织产生,在维持磷和维生素D的代谢中起重要作用^[11]。近年来的研究表明,FGF23在一些癌症中异常表达,与肿瘤进展和预后不良相关^{[12][13][14]}。在BTC中,FGF23水平升高可能通过影响骨代谢和细胞增殖,促进肿瘤的发生和进展^[15]。

4. 1. 3胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)

GDNF最初被认为在神经系统中发挥保护作用,但在多种癌症中也显示出重要的作用^{[16][17]}。GDNF通过激活多个信号通路,促进肿瘤细胞的增殖和迁移。在BTC中,GDNF的过度表达可能通过抑制凋亡和促进细胞增殖,增加癌症风险。

4. 1. 4白介素7(IL-7)

IL-7是一种关键的免疫调节因子,对T细胞和B细胞的发育和存活至关重要^{[18][19]}。研究表明,IL-7在实体瘤中的过表达与肿瘤侵袭性和不良预后相关^{[20][21]}。在BTC中,IL-7的升高可能通过增强局部炎症和免疫反应,促进肿瘤发生。

4. 2保护因素

4. 2. 1神经生长因子 β (β -NGF)

β -NGF在神经系统中主要参与神经细胞的发育和维持^[22]。尽管一些研究表明 β -NGF的增加与肿瘤恶性进展相关^{[23][24]}。在BTC中, β -NGF可能通过调节免疫系统和神经系统的相互作用,发挥保护作用,从而降低发病风险^{[25][26]}。

4. 2. 2 S100A12蛋白(S100-A12 protein)

S100A12是一种钙结合蛋白,参与炎症和免疫反应^[27]。在BTC中,S100A12可能通过调节炎症反应和免疫功能,抑制肿瘤细胞的增殖,从而减少癌症发生风险^{[28][29]}。

4. 2. 3 γ 干扰素(INF γ)

INF γ 是由T细胞和NK细胞产生的关键免疫调节因子^[30]。研究表明,INF γ 具有抑制肿瘤生长的作用,在BTC中,高水平的INF γ 可能通过增强免疫系统对肿瘤细胞的识别和清除,降低癌症风险^{[31][32][33]}。

综上所述,本研究通过双样本孟德尔随机化分析揭示了CD40L受体、FGF23、GDNF和IL-7与BTC发病风险的显著相关性,这些因素被确定为BTC的危险因素。具体而言,CD40L受体、FGF23、GDNF和IL-7的升高可能通过促进肿瘤细胞的增殖和抑制凋亡,增加BTC的风险。而 β -NGF、S100A12蛋白和INF γ 被发现是BTC的保护因素,它们的升高可能通过调节免疫反应和炎症状态,降低BTC的发病风险。这些发现对理解BTC的发病机制具有重要意义,并为未来的预防和治疗策略提供了新的靶点。针对这些炎症相关蛋白的干预可能为BTC的早期诊断和治疗提供新的方向。然而,由于本研究的局限性,未来的研究应重点验证这些因子在BTC中的具体作用机制,并评估它们作为生物标志物和治疗靶点的实际有效性。

5 总结

本研究通过双样本孟德尔随机化方法, 识别了7种炎症相关蛋白与胆道恶性肿瘤(BTC)发病风险之间的因果关系。结果显示, CD40L受体、FGF23、GDNF和IL-7被确定为BTC的危险因素, 其高水平暴露与胆道恶性肿瘤发生风险的增加相关; 而 β -NGF、S100A12和INF γ 被识别为BTC的保护因素, 其高水平暴露则与胆道恶性肿瘤风险的降低相关。这些发现深化了我们对BTC发病机制的理解, 并为未来的预防和治疗策略提供了新的靶点。

尽管如此, 本研究也存在一定的局限性, 包括样本量有限和方法上的一些约束。未来的研究应扩大样本规模, 采用更精确的研究设计, 以验证这些因果关系的稳健性。此外, 还需探索这些炎症相关蛋白在BTC防治中的实际应用, 旨在为临床管理提供更具针对性的指导。进一步的研究可以集中于验证这些标志物的生物学机制, 并评估它们作为治疗靶点的潜力。

[参考文献]

- [1] Valle JW, Kelley RK, Nervi B, et al. Biliary tract cancer[J]. *Lancet*, 2021, 397(10272): 428–444.
- [2] Rizvi S, Gores GJ. Molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma[J]. *Digestive Diseases*, 2014, 32(5): 564–569.
- [3] Leone V, Ali A, Weber A, et al. Liver Inflammation and Hepatobiliary Cancers[J]. *Trends in Cancer*, 2021, 7(7): 606–623.
- [4] Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, et al. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment[J]. *Journal of Immunology Research*, 2014, 2014: 149185.
- [5] Li Y, Zhang J, Ma H. Chronic inflammation and gallbladder cancer[J]. *Cancer Letters*, 2014, 345(2): 242–248.
- [6] Burgess S, Davey Smith G, Davies NM, et al. Guidelines for performing Mendelian randomization investigations: update for summer 2023[J]. *Wellcome Open Research*, 2023, 4: 186.
- [7] Qiu S, Zheng K, Hu Y, et al. Genetic correlation, causal relationship, and shared loci between vitamin D and COVID-19: A genome-wide cross-trait analysis[J]. *Journal of Medical Virology*, 2023, 95(5): e28780.
- [8] Zhao JH, Stacey D, Eriksson N, et al. Genetics of circulating inflammatory proteins identifies drivers of immune-mediated disease risk and therapeutic targets[J]. *Nature Immunology*, 2023, 24(9): 1540–1551.
- [9] Sadeghi F, Vogt A, Mohr RU, et al. Induction of cytotoxic effector cells towards cholangiocellular, pancreatic, and colorectal tumor cells by activation of the immune checkpoint CD40/CD40L on dendritic cells[J]. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2021, 70(5): 1451–1464.
- [10] Tang T, Cheng X, Truong B, et al. Molecular basis and therapeutic implications of CD40/CD40L immune checkpoint[J]. *Pharmacological Therapeutics*, 2021, 219: 107709.
- [11] Ma C, Fu Q, Diggs LP, et al. Platelets control liver tumor growth through P2Y12-dependent CD40L release in NAFLD[J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(9): 986–998.e5.
- [12] Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2004, 19(3): 429–435.
- [13] Ewendt F, Feger M, Föller M. Role of Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) and α -Klotho in Cancer[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 8: 601006.
- [14] Al-Hassani H, Al-Nimr C, Cooke H, et al. FGF23 Expression Is a Promising Immunohistochemical Diagnostic Marker for Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma of Bone (UPSb)[J]. *Genes*, 2024, 15(2): 242.
- [15] Cotant CL, Rao PS. Elevated fibroblast growth factor 23 in a patient with metastatic prostate cancer and hypophosphatemia[J]. *American Journal of Kidney Diseases*, 2007, 50(6): 1033–1036.
- [16] Katoh M. FGFR inhibitors: Effects on cancer cells, tumor microenvironment and whole-body homeostasis (Review)[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2016, 38(1): 3–15.
- [17] Fielder GC, Yang TW, Razdan M, et al. The GDNF Family: A Role in Cancer?[J]. *Neoplasia*, 2018, 20(1): 99–117.
- [18] Whiteley AE, Ma D, Wang L, et al. Breast cancer exploits neural signaling pathways for bone-to-meninges metastasis[J]. *Science*, 2024, 384(6702): eadh5548.
- [19] Gao J, Zhao L, Wan YY, Zhu B. Mechanism of Action of IL-7 and Its Potential Applications and Limitations in Cancer Immunotherapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(5): 10267–10280.
- [20] Mengus C, LeMagen C, Trella E, et al. Elevated levels of circulating IL-7 and IL-15 in patients with early stage prostate cancer[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2011, 9: 162.
- [21] Roato I, Caldo D, Godio L, et al. Bone invading NSCLC cells produce IL-7: mice model and human histologic data[J]. *BMCCancer*, 2010, 10: 12.
- [22] Krzystek-Korpacka M, Zawadzki M, Neubauer K, et al. Elevated systemic interleukin-7 in patients with colorectal cancer and individuals at high risk of cancer: association with lymph node involvement and tumor location in the right colon[J]. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2017, 66(2): 171–179.
- [23] Bradshaw AR, Pundavela J, Biarc J, et al. NGF and ProNGF: Regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling[J]. *Advances in Biological Regulation*, 2015, 58: 16–27.
- [24] 王馥丽, 刘文兴, 曹立瀛, 等. 神经生长因子NGF及其受体TrkA、p75NTR在胆管中下段癌中的表达及其与神经浸润关系的研究

研究[J].中国煤炭工业医学杂志,2020,23(01):74-78.

[25]Nico B, Mangieri D, Benagiano V, et al. Nerve growth factor as an angiogenic factor[J]. Microvascular Research, 2008,75(2):135-141.

[26]孟令新,丁兆军,陈希平,等.神经生长因子促进MIAPaCa-2人胰腺癌细胞的增殖[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2010,17(1):88-92.

[27]Funk S, Mark R, Bayo P, et al. High S100A8 and S100A12 protein expression is a favorable prognostic factor for survival of oropharyngeal squamous cell carcinoma[J]. International Journal of Cancer, 2015,136(9):2037-2046.

[28]Mints M, Landin D, Näsman A, et al. Tumour inflammation signature and expression of S100A12 and HLA class I improve survival in HPV-negative hypopharyngeal cancer[J]. Scientific Reports, 2021,11(1):1782.

[29]He L, Xiao X, Yang X, et al. STING signaling in tumorigenesis and cancer therapy: A friend or foe?[J]. Cancer Letters, 2017, 402:203-212.

[30]Alspach E, Lussier DM, Schreiber R D. Interferon γ and

Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2019,11(3):a028480.

[31]Yamashita N, Long M, Fushimi A, et al. MUC1-C integrates activation of the IFN- γ pathway with suppression of the tumor immune microenvironment in triple-negative breast cancer[J]. Journal for Immunotherapy of Cancer, 2021,9(1):e002115.

[32]Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, et al. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion [J]. Frontiers in Immunology, 2018,9:847.

[33]Li FL, Gu LH, Tong YL, et al. INHBA promotes tumor growth and induces resistance to PD-L1 blockade by suppressing IFN- γ signaling[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2024.

作者简介：

赵亚军(1988--),男,汉族,山西运城人,硕士,研究方向：胃肠肿瘤方向。

*通讯作者：

冯立(1979--),男,汉族,河北蔚县人,研究生,主任医师,研究方向：胃肠肿瘤方向。