

• 论 著 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.18.002

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20230426.1753.012\(2023-04-27\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20230426.1753.012(2023-04-27))

CMTM6 基因对肝内胆管癌侵袭转移的影响*

刘承祥,董 严,梁后杰[△]

(陆军军医大学第一附属医院肿瘤科,重庆 400038)

[摘要] **目的** 探讨 CMTM6 基因对肝内胆管癌细胞(ICC)侵袭转移的影响。**方法** 通过慢病毒转染构建敲低含家族成员 6 的趋化因子样奇迹跨膜结构域(CMTM6)基因的 ICC RBE 细胞(RBE-CMTM6-KD)及相应对照细胞(RBE-Con),实时荧光定量 PCR(qPCR)及 Western blot 分别在 RNA 及蛋白层面验证两种细胞 CMTM6 的表达水平,平板克隆形成、Transwell、CCK-8 及划痕实验分别检测两种细胞生长曲线及细胞存活状况,两种细胞构建裸鼠皮下成瘤并模拟肺转移观察 CMTM6 对肿瘤生长及转移能力的影响,免疫组织化学技术检测人 ICC 组织芯片中癌旁组织及不同分化程度 ICC 组织中 CMTM6 的表达强度,并分析 CMTM6 不同表达强度 ICC 患者的预后。**结果** Western blot 结果显示,RBE-CMTM6-KD 中 CMTM6、Snail 蛋白表达水平低于 RBE-Con,β-catenin 表达水平高于 RBE-Con($P<0.05$)。qPCR 结果显示,RBE-CMTM6-KD 中 CMTM6 mRNA 表达水平低于 RBE-Con($P<0.05$)。与 RBE-Con 比较,24、48 h RBE-CMTM6-KD 细胞存活率更低,增殖能力、侵袭迁移能力减弱($P<0.05$)。RBE-KD-CMTM6 构建的裸鼠皮下成瘤最终质量低于 RBE-Con [$(26.4\pm0.7)\text{mg}$ vs. $(173.9\pm12.8)\text{mg}$],差异有统计学意义($P<0.05$)。第 11、14、17、20 天,RBE-CMTM6-KD 构建的裸鼠肿瘤体积小于 RBE-Con($P<0.05$)。第 7、14 天,RBE-KD-CMTM6 构建的裸鼠肺部转移瘤的转移能力低于 RBE-Con($P<0.05$)。CMTM6 在癌旁正常胆管组织中几乎不表达,在 ICC 组织表达水平明显高于癌旁正常胆管组织,且在低分化 ICC 组织中表达水平高于高分化 ICC 组织。与 CMTM6 低表达患者比较,CMTM6 高表达患者 OS 明显缩短($P<0.05$)。**结论** 成功建立了 CMTM6 敲低的 ICC 细胞模型,CMTM6 能促进 ICC 生长并增强侵袭转移能力,CMTM6 高表达水平与 ICC 预后呈负相关。

[关键词] 肝内胆管细胞癌;含家族成员 6 的趋化因子样奇迹跨膜结构域;肿瘤侵袭;肿瘤转移;预后

[中图法分类号] R735.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)18-2726-07

Effect of CMTM6 gene on invasion and metastasis of intrahepatic cholangiocarcinoma *

LIU Chengxiang,DONG Yan,LIANG Houjie[△]

(Department of Oncology,The First Affiliated Hospital of Army Medical University,Chongqing 400038,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of CMTM6 gene on invasion and metastasis of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC). **Methods** ICC RBE cells (RBE-CMTM6-KD) and corresponding control cells (RBE-Con) were constructed by lentivirus transfection to knock down the chemokine-like miracle transmembrane domain (CMTM6) gene containing family member 6. Real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) and Western blot were used to detect the expression of CMTM6 at the RNA and protein levels in both groups. The growth curves and cell survival status of RBE-CMTM6-KD and RBE-Con were detected by plate cloning, Transwell, CCK-8 and scratch tests. The effect of CMTM6 on tumor growth and metastasis was verified by subcutaneous tumor formation and tail vein simulated lung metastasis experiments in nude mice with RBE-CMTM6-KD and RBE-Con. The expression intensity of CMTM6 in human ICC tissue microarray and ICC tissues with different degrees of differentiation was detected by immunohistochemistry. The prognosis of patients with ICC with different expression intensities of CMTM6 was analyzed. **Results** The Western blot showed that

* 基金项目:重庆市英才计划项目(4139Z3395)。 作者简介:刘承祥(1991—),在读硕士研究生,主要从事肿瘤代谢及肿瘤免疫研究。

[△] 通信作者,E-mail:lianghoujie@sina.com。

the expression of CMTM6 and Snail protein in RBE-CMTM6-KD cells was significantly lower than that in RBE-Con cells ($P < 0.05$). The expression of β -catenin protein in RBE-CMTM6-KD cells was significantly higher than that in RBE-Con cells ($P < 0.05$). qPCR results showed that the mRNA expression level of CMTM6 in RBE-CMTM6-KD was lower than that in RBE-Con ($P < 0.05$). Compared with RBE-Con, the survival rate of RBE-CMTM6-KD cells at 24 and 48h was lower, and the proliferation ability, invasion and migration ability were weakened ($P < 0.05$). The final mass of subcutaneous tumor formation in nude mice constructed with RBE-KD-CMTM6 was lower than that of RBE-Con [$(26.4 \pm 0.7) \text{mg}$ vs. $(173.9 \pm 12.8) \text{mg}$], and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). On days 11, 14, 17 and 20, the tumor volume of nude mice constructed by RBE-CMTM6-KD was smaller than that of RBE-Con ($P < 0.05$). On days 7 and 14, the metastasis ability of lung metastases in nude mice constructed by RBE-KD-CMTM6 was lower than that of RBE-Con ($P < 0.05$). CMTM6 was almost not expressed in para-cancerous normal bile duct tissues, and the expression level in ICC tissues was significantly higher than that in para-cancerous normal bile duct tissues, and the expression level in poorly differentiated ICC tissues was higher than that in highly differentiated ICC tissues. Compared with patients with low CMTM6 expression, patients with high CMTM6 expression had significantly shorter OS ($P < 0.05$). **Conclusion** The ICC cell model with CMTM6 knockdown was successfully established. CMTM6 can promote the growth, invasion and metastasis of ICC cells, the expression of high CMTM6 expression was negatively correlated with the prognosis of ICC.

[Key words] intrahepatic cholangiocarcinoma; chemokine-like marvel transmembrane domain containing family member 6; tumor invasiveness; tumor metastasis; prognosis

肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)是一种恶性程度高的上皮来源的肿瘤,具有高度的异质性和侵袭性^[1], ICC 是第二常见的原发肝脏恶性肿瘤,在所有消化道肿瘤中占比约 3%^[2-3]。随着非酒精性脂肪性肝炎和丙型肝炎患病率的增加, ICC 的发病率在全球范围内不断增加,过去 10 年的年均增长率约为 4.4%。ICC 早期被诊断且同时接受治疗性手术的患者 5 年生存率约为 30%,但诊断为晚期疾病的患者可供选择的治疗手段有限,预后不良,5 年生存率仅约 5.7%^[4]。影响 ICC 患者生存率的关键因素是临床发现多在晚期,且局部或远处转移较早^[5-8],同时, ICC 患者通常容易对化疗产生耐药^[9-10]。因此,深入研究影响 ICC 侵袭转移的相关因素,为 ICC 的临床预测及治疗提供新的思路和方向,是当前急需解决的一大难题。

含家族成员 6 的趋化因子样奇迹跨膜结构域(chemokine-like marvel transmembrane domain containing family member 6, CMTM6)参与基因的表观遗传调控和肿瘤发生^[11]。CMTM6 在不同肿瘤当中作用不尽相同,在许多癌症中通过调节肿瘤微环境中的肿瘤细胞、免疫细胞在肿瘤微环境中发挥作用,特别是对程序性死亡-配体 1(programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1)的调节起关键作用^[12]。有研究显示, CMTM6 和 PD-L1 共表达与结直肠癌中活跃的免疫微环境和良好的预后相关^[13],进一步研究发现具有该特征类型的结直肠癌肿瘤微环境中的 M2 型巨噬细胞明显升高^[14]。CMTM6 通过调节 T 细胞活化和

抗肿瘤反应在恶性胶质瘤中发挥重要作用^[15]。在肝细胞癌中, CMTM6 与 PD-L1 共表达与高密度的炎性细胞有关,在体外和体内均可诱导细胞周期阻滞并抑制肝癌细胞的增殖,同时 CMTM6 的高表达是预测肝癌复发的一个重要因素^[12, 16-17]。在胃癌中,高表达的 CMTM6 与预后不良相关, PD-L1 同时高表达则预后更差^[11]。在转移性乳腺癌患者中, CMTM6 阻断剂与 PD-L1 阻断剂的联合使用可提高免疫治疗的应答率^[18]。CMTM6 与 PD-L1 在质膜和循环内切体中共定位,可使 PD-L1 作为溶酶体介导降解的靶点的特点被抑制, CMTM6 耗竭或减少 PD-L1 在体外和体内均可使肿瘤特异性 T 细胞的抑制作用被明显减弱^[19]。既往研究主要聚焦于 CMTM6 在影响结直肠癌、胃癌、乳腺癌、肝细胞癌及非小细胞肺癌等肿瘤的功能作用及机制研究,尚无关于 CMTM6 对 ICC 作用的研究。因此,本研究旨在探讨 CMTM6 促进 ICC 进展中的作用特点, 以为临床治疗 ICC 提供新靶点和新思路, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、组织与实验动物

shRNA(CMTM6 KD)慢病毒和对照慢病毒购自上海吉满生物科技有限公司;人 ICC 组织芯片(155 例,芯片货号:HBDIC122SU01-M-033)购自上海芯超生物科技有限公司;裸鼠(20 只,雄性,6 周龄,15~17 g)购自重庆恩斯维尔生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂

DMEM 培养基、0.25%胰蛋白酶、青-链霉素溶液购自美国 HyClone 公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;Western 及 IP 裂解液、蛋白酶抑制剂、一抗二抗稀释液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、结晶紫染色液购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗人 CMTM6、兔抗人 β -catenin、鼠抗人 Snail 抗体购自英国 Abcam 公司;羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗、GAPDH 抗体及增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)发光液购自美国 Affinity 公司;细胞增殖试剂盒购自美国 GeneCopoeia 公司;PCR 引物、RNA 提取试剂、逆转录试剂盒、逆转录 PCR SYBRGreen 购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染

人 ICC RBE 细胞株复苏于本院肿瘤科实验室,用 DMEM 完全培养基复苏细胞后置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中常规培养,定期观察细胞密度及状态,待细胞达到一定密度且处于对数生长期时,消化、离心、重悬 RBE 细胞,细胞计数后接种于 24 孔板内(1×10^5 个/孔),并加入 0.5 mL DMEM 完全培养基培养 24 h 后按说明书加入慢病毒稀释液,通过慢病毒转染构建敲低 CMTM6 基因的 RBE 细胞(RBE-CMTM6-KD),同时建立 RBE 细胞的对照细胞(RBE-Con),继续培养 48 h 后消化传代,继续培养细胞,嘌呤霉素筛选转染细胞,存活的细胞充分扩增传代,进行 CCK-8 检测、Western blot 实验及实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR)等后续实验。

1.2.2 Western blot 检测蛋白表达

用含有蛋白酶抑制剂的 Western 及 IP 裂解液分别提取处于对数生长期的 RBE-CMTM6-KD 及 RBE-Con 两种细胞总蛋白,冰上充分裂解 30 min;4℃离心 30 min,13 000 r/min,转移上清液至新 EP 管中,按 BCA 试剂盒说明步骤测定总蛋白浓度。30 μ g 蛋白上样,常规电泳、转膜、封闭后 4℃摇床分别孵育 CMTM6、 β -catenin、Snail(均按 1:1 000 配置)兔抗人特异性一抗及 GAPDH 抗体(1:5 000)过夜,次日二抗孵育(羊抗兔,1:10 000),ECL Bio-Rad 成像系统显影,Image J 及 GraphPad Prism7.0 软件半定量统计分析。

1.2.3 定量 PCR 分析

定量 PCR 分析采用 TRIzol 试剂盒,分别提取处于对数生长期的 RBE-CMTM6-KD 及 RBE-Con 总 RNA,超微量分光光度计检测总 RNA 浓度,经逆转录获得总 cDNA,而后上机检测并比较各组细胞 CMTM6 表达水平。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞存活

分别取处于对数生长期的 RBE-CMTM6-KD 及 RBE-Con,按 5 000 个/孔、每种细胞设置 3 个复孔、接种于 96 孔板中,将细胞置于孵箱中培养贴壁后继续于孵箱中培养 48 h,而后行 CCK-8 检测。加入 CCK-8(孵箱中继续孵育 2 h),使用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度(A)值,GraphPad Prism7.0 软件分析计算各组细胞的存活率。

1.2.5 克隆形成及结晶紫染色实验

分别将处于对数生长期的 RBE-CMTM6-KD 及 RBE-Con 各 5 000 个接种于 6 孔板内,每组各设 2 个复孔。37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 14 d,每 3 天进行 1 次换液,定期观察细胞生长及成球情况,丢弃孔板中的旧培养基后用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗 3 遍,加入适量 4%多聚甲醛常温固定 15 min。PBS 洗 3 遍,适量结晶紫染液常温染色 25 min, PBS 洗 3 遍,常温风干后拍照,计算分析集落数目。

1.2.6 侵袭迁移实验

分别将处于对数生长期的 RBE-CMTM6-KD 及 RBE-Con 用胰酶消化、离心后用 DMEM(不含血清)重悬细胞(细胞浓度调整至 5×10^5 个/mL),向 24 孔板下室每孔中加入 600 μ L 的 DMEM 培养基(含 20%胎牛血清),Transwell 小室中加入 100 μ L 细胞悬液,常规培养 24 h。4%多聚甲醛常规固定、结晶紫常规染色,用棉签擦掉上层未迁移的细胞后拍照计数。

1.2.7 划痕实验

在 6 孔板背面划横线(用 maker 笔比着直尺划),而后分别将处于对数生长期的 RBE-CMTM6-KD 及 RBE-Con 消化、离心、重悬计数,将细胞按 5×10^5 个/孔、每种细胞 3 个复孔种植于 6 孔板中,孵箱中常规培养过夜。次日细胞贴壁后用枪头垂直于背后的横线划痕,继续放入孵箱中培养,分别于 0、12、24 h 拍照。

1.2.8 裸鼠成瘤

10 只裸鼠分为两组,将 RBE-CMTM6-KD 及 RBE-Con 两种细胞用 PBS 重悬,于裸鼠的右大腿外侧进行瘤细胞皮下注射(每只按 1×10^6 个细胞注射),定期监测肿瘤生长情况。测量肿瘤的 3 个垂直直径并使用公式估计肿瘤体积[$V = \pi/6 \times \text{长度}(\text{mm}) \times \text{宽度}(\text{mm}) \times \text{高度}(\text{mm})$]。最大单个肿瘤体积达到 2 000 mm³ 前处死裸鼠,解剖取出瘤体,拍照、称量、测量瘤体大小并做好记录。

1.2.9 裸鼠肺转移实验

10 只裸鼠分为两组,将 RBE-CMTM6-KD 及 RBE-Con 两种细胞(3×10^6 个)分别混于 300 μ L PBS 中,通过尾静脉将瘤细胞悬液注射到裸鼠体内,活体成像技术定期监测裸鼠肺部肿瘤的生长情况(分别与第 7、

14 天进行活体成像),后处死裸鼠,解剖并拍照。

1.2.10 免疫组织化学染色

组织芯片放置于 60℃ 烤箱(处理 8 h),常规步骤进行脱蜡、水化、3% 过氧化氢封闭、乙二胺四乙酸抗原修复、血清封闭,一抗 4℃ (稀释 CMTM6 至工作浓度,1:100)孵育过夜,根据免疫组织化学试剂盒说明书完成二抗孵育及剩余染色步骤后脱水、风干、中性树脂封片、拍照采图。

参照免疫组织化学相关评判标准及本抗原特异性膜表达的特点对染色结果进行判定(半定量法),细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性结果(细胞膜非颗粒状棕黄色及细胞膜以外的着色视为非特异性着色)。染色强度计分方法:棕褐色、棕黄色、浅黄色、无阳性着色分别计 3、2、1、0 分;阳性细胞数比例计分标准:细颗粒状棕黄色着色(真阳性)细胞数百分比<5%,0 分;5%~<26%,1 分;26%~<51%,2 分;51%~75%,3 分;>75%,4 分。染色强度得分与阳性细胞百分比得分相乘,0~7 分判定为蛋白低表达,>7 分判定为蛋白高表达。

1.2.11 CMTM6 表达在 ICC 患者中的预后分析

使用 155 例 ICC 组织芯片,采用染色强度计分

法,根据 ICC 组织标本中的肿瘤区域 CMTM6 的染色强度分为 CMTM6 高表达组($n=89$)和 CMTM6 低表达组($n=66$)。利用 Kaplan-Meier 法对两组进行生存分析,采用 log-rank 检验比较两组总生存(overall survival,OS)情况。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism7.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 t 检验或方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

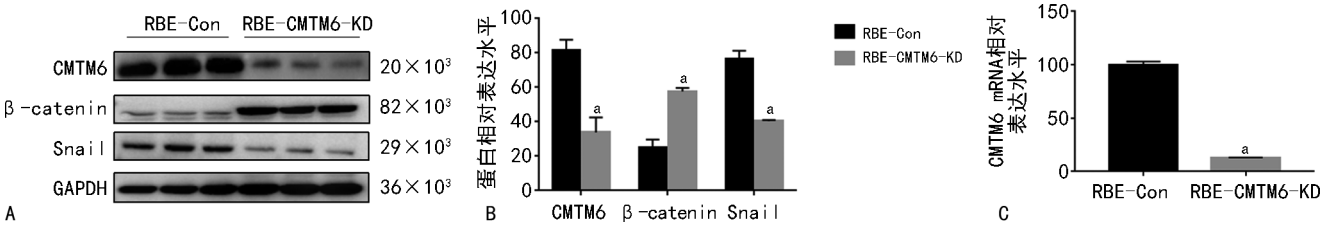
2 结果

2.1 RBE-CMTM6-KD 及 RBE-Con 模型的建立和鉴定

Western blot 结果显示,RBE-CMTM6-KD 中 CMTM6、Snail 蛋白表达水平低于 RBE-Con, β -catenin 表达水平高于 RBE-Con($P<0.05$)。qPCR 结果显示,RBE-CMTM6-KD 中 CMTM6 mRNA 表达水平低于 RBE-Con($P<0.05$),见图 1。

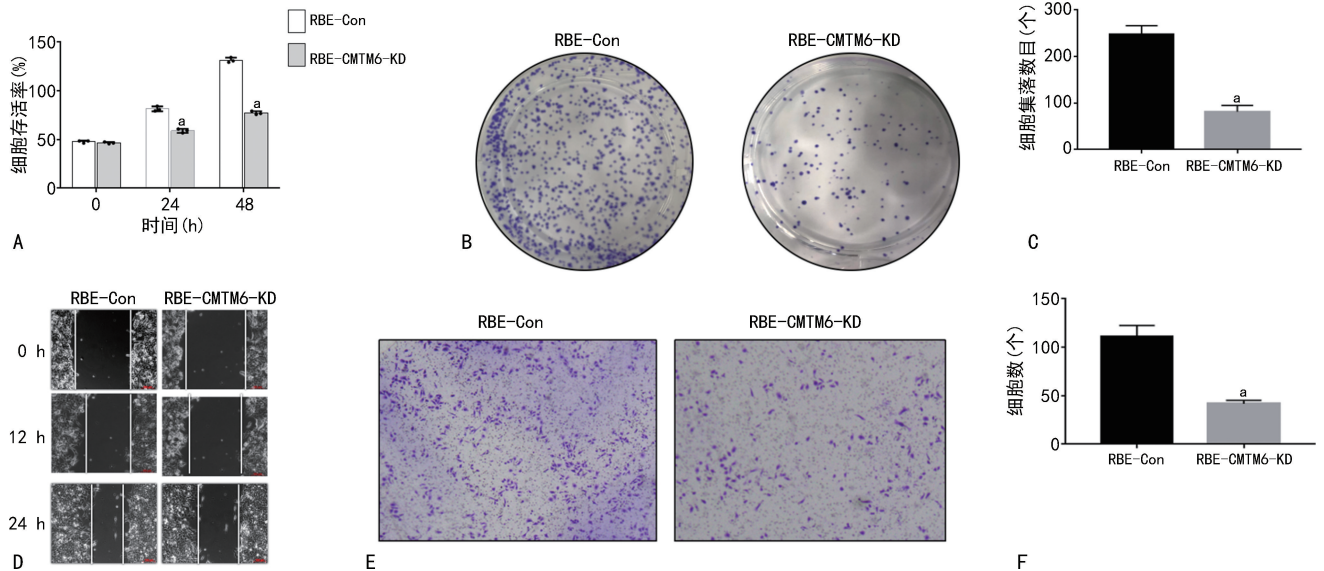
2.2 细胞存活、增殖、侵袭迁移实验

与 RBE-Con 比较,24、48 h RBE-CMTM6-KD 细胞存活率更低,增殖能力、侵袭迁移能力减弱($P<0.05$),见图 2。



A: Western blot 检测两种细胞蛋白的表达情况;B:两种细胞蛋白表达水平比较;C:两种细胞 CMTM6 mRNA 表达水平比较;^a: $P<0.05$,与 RBE-Con 比较。

图 1 RBE-CMTM6-KD 及 RBE-Con 模型的建立和鉴定



A:两种细胞存活率比较;B、C:平板克隆形成及结晶紫染色实验检测两种细胞 14 d 的生长情况;D:划痕实验检测两种细胞生长增殖能力;E、F:侵袭迁移实验检测两种细胞侵袭迁移能力;^a: $P<0.05$,与 RBE-Con 比较。

图 2 细胞存活、增殖、侵袭迁移实验

2.3 两种细胞构建的裸鼠皮下成瘤能力及转移能力比较

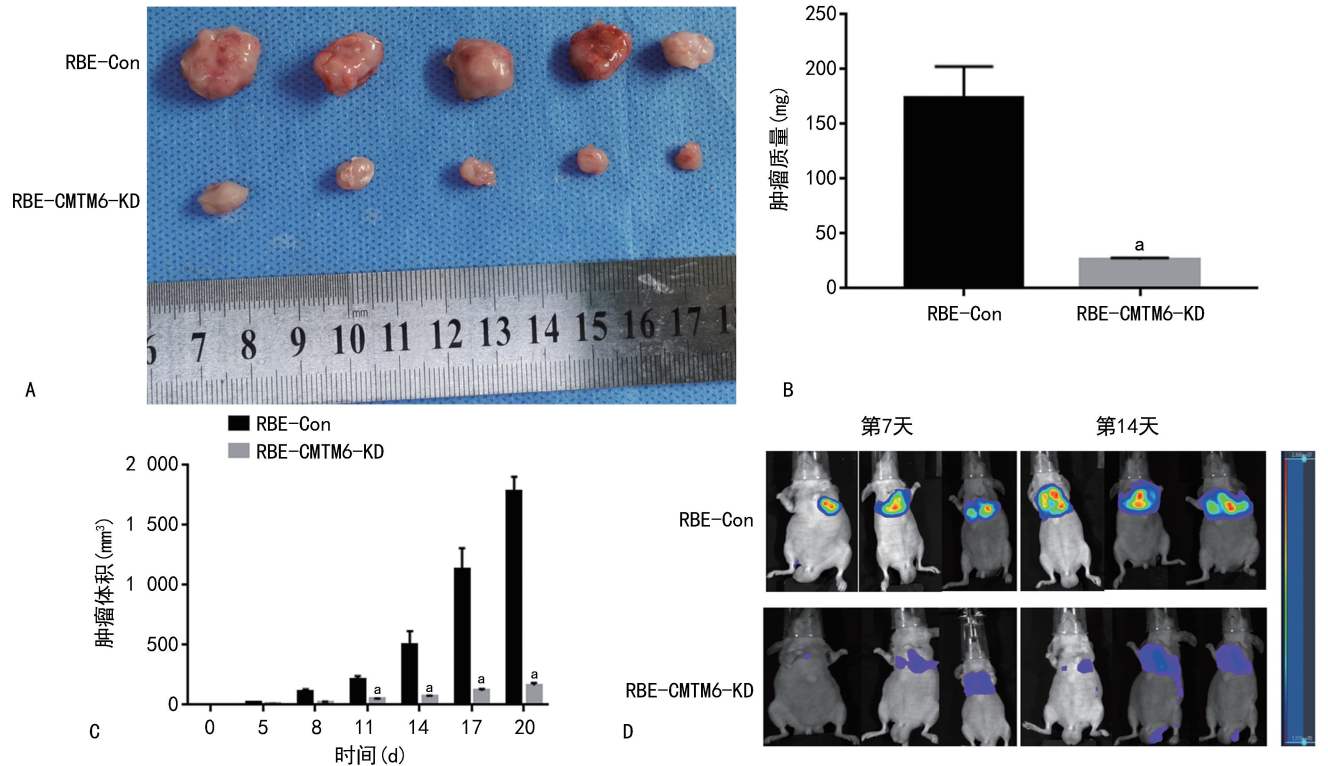
RBE-CMTM6-KD 构建的裸鼠皮下成瘤的最终质量低于 RBE-Con $[(26.4 \pm 0.7) \text{ mg vs. } (173.9 \pm 12.8) \text{ mg}]$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。第 11、14、17、20 天, RBE-CMTM6-KD 构建的裸鼠肿瘤体积小于 RBE-Con ($P < 0.05$)。第 7、14 天, RBE-KD-CMTM6 构建的裸鼠肺部转移瘤的转移能力低于 RBE-Con ($P < 0.05$), 见图 3。

2.4 人 ICC 组织内 CMTM6 的表达

CMTM6 在癌旁正常胆管组织中几乎不表达, 而在 ICC 组织中的表达水平高于癌旁正常胆管组织, 且低分化 ICC 组织中的表达水平高于高分化 ICC 组织, 见图 4。

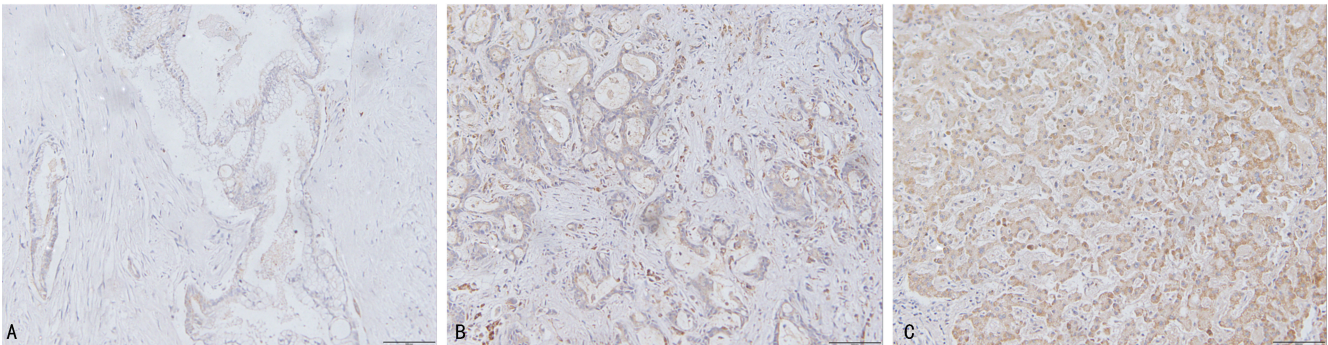
2.5 不同 CMTM6 表达强度的 ICC 患者间的生存分析

与 CMTM6 低表达组比较, CMTM6 高表达组 OS 时间明显缩短 ($P < 0.05$), 见图 5。



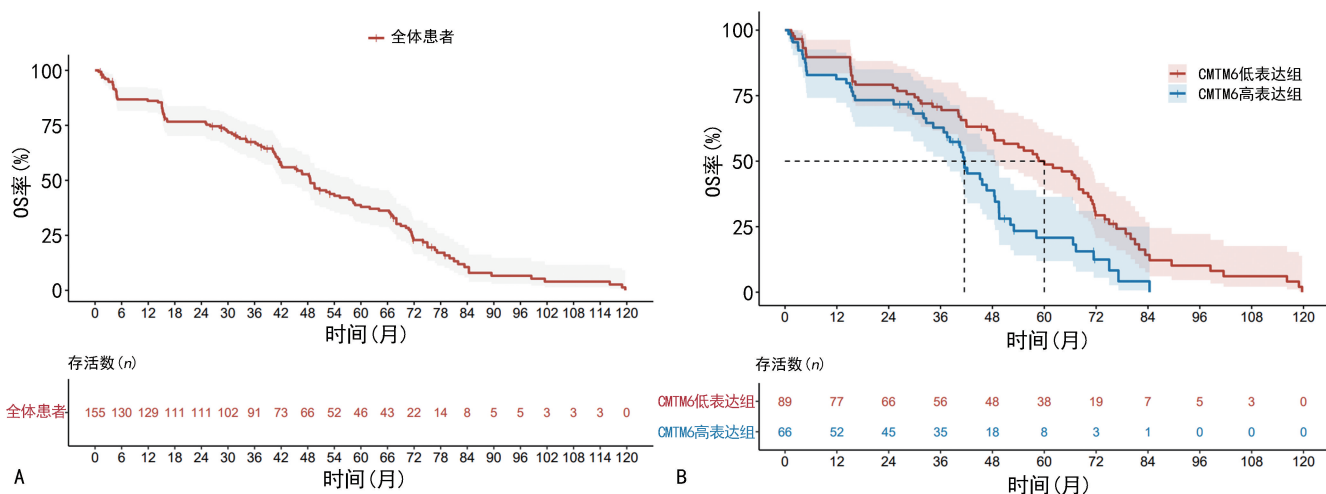
A: 两种成瘤裸鼠分离的肿瘤大体标本; B: 两种成瘤裸鼠分离的肿瘤质量比较; C: 两种成瘤裸鼠分离的肿瘤体积随时间变化的情况 ($\bar{x} \pm s, n = 5$); D: 两种成瘤裸鼠肺部转移模型中通过活体成像检测在第 7、14 天的生长情况; ^a: $P < 0.05$, 与 RBE-Con 比较。

图 3 两种细胞构建的裸鼠皮下成瘤能力及转移能力比较



A: 癌旁组织中正常胆管腺体; B: 高分化 ICC 组织; C: 低分化 ICC 组织; 光学显微镜下评分法结果显示, A 得分 $1 \times 0 = 0$ (分), B 得分 $2 \times 2 = 4$ (分), C 得分 $3 \times 3 = 9$ (分)。

图 4 CMTM6 在癌旁组织、不同分化程度 ICC 组织中的表达情况 (免疫组织化学染色, $200 \times$)



A: 全体 ICC 患者的 OS 曲线分析; B: CMTM6 高低表达组的 OS 曲线分析。

图 5 不同 CMTM6 表达强度的 ICC 患者间的生存分析

3 讨 论

本研究采用慢病毒转染方法构建 CMTM6 敲低的 RBE 细胞株 (RBE-CMTM6-KD) 及对照细胞 (RBE-Con), Western blot 及 qPCR 实验证实了细胞模型构建成功。同时, 对临床病例进行随访, 由于病例较为久远, 无瘤生存期、复发情况等数据未获得完整信息, 但 OS 取得了相对完整的随访数据。

本研究结果显示, 在细胞实验中, 与 RBE-Con 比较, RBE-CMTM6-KD 生长速度、成球能力、侵袭迁移能力减弱 ($P < 0.05$); 在动物体内实验中, 与 RBE-Con 比较, RBE-CMTM6-KD 的致瘤性及转移能力也明显减弱 ($P < 0.05$)。此外, 人 ICC 组织免疫组织化学染色及生存分析结果提示, CMTM6 高表达水平较低表达水平的 OS 明显缩短 ($P < 0.05$)。这些结果与既往关于 CMTM6 在多数其他癌种中的研究结果一致, 但 CMTM6 对于促进 ICC 侵袭转移能力的具体作用机制还不明确。相关研究表明, CMTM6 通过与 NRP1 相互作用促进口腔鳞状细胞癌细胞增殖和侵袭^[20]; CMTM6 通过与肝癌细胞中的 Vimentin 相互作用并稳定 Vimentin 来促进迁移、侵袭和上皮细胞-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[21]。在其他多种肿瘤的研究中, 通过对癌组织及癌旁组织的生物信息数据分析, 结果显示 CMTM6 与 PD-L1 存在高度的共表达关系, 细胞免疫荧光显示 CMTM6 与 PD-L1 在肿瘤细胞的多个部位共定位。利用肿瘤组织标本在蛋白及 mRNA 层面也证实了 CMTM6 与 PD-L1 表达的相关性^[7,12,22]。同时, PD-L1 高表达使肿瘤细胞处于免疫逃逸状态, 与不良预后密切相关。结合本研究结果, 笔者认为, 在 ICC 中, CMTM6 可能通过与 PD-L1 的共表达, 进一步降低肿瘤细胞对于免疫微环境的反应性, 从而促使 ICC 进展。

综上所述, 高表达 CMTM6 明显促进 ICC 的发生、发展, 同时, CMTM6 可能通过与 PD-L1 的共表达作用降低了肿瘤细胞对于免疫微环境的反应性, 从而促使 ICC 进展。由于客观条件限制, 部分机制还未详尽验证, 未来将重点验证 CMTM6 在 ICC 中与肿瘤微环境的作用特点及与 PD-L1 的关联性, 以期在现有表型的基础上进一步挖掘出 CMTM6 在 ICC 中作用的分子机制, 为 ICC 的临床治疗提供新思路。

参考文献

- [1] LIU Z, WENG S, XU H, et al. Computational recognition and clinical verification of TGF- β -derived miRNA signature with potential implications in prognosis and immunotherapy of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Front Oncol, 2021, 11: 757919.
- [2] CASADIO M, CARDINALE V, KLÜMPEN H J, et al. Setup of multidisciplinary team discussions for patients with cholangiocarcinoma: current practice and recommendations from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA)[J]. ESMO Open, 2022, 7(1): 100377.
- [3] CHEN W Q, SONG J J, LIU S Y, et al. USP9X promotes apoptosis in cholangiocarcinoma by modulation expression of KIF1B β via deubiquitinating EGLN3[J]. J Biomed Sci, 2021, 28(1): 44.
- [4] MCGRATH N A, FU J, GU S Z, et al. Targeting cancer stem cells in cholangiocarcinoma (review)[J]. Int J Oncol, 2020, 57(2): 397-408.
- [5] ZHOU Y, XU L, WANG L, et al. Sequentially

- targeting and intervening mutual Polo-like Kinase 1 on CAFs and tumor cells by dual targeting nano-platform for cholangiocarcinoma treatment[J]. *Theranostics*, 2022, 12(8): 3911-3927.
- [6] BRINDLEY P J, BACHINI M, IIYAS S I, et al. Cholangiocarcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 65.
- [7] HUANG X, TANG T Y, ZHANG G, et al. Identification of tumor antigens and immune subtypes of cholangiocarcinoma for mRNA vaccine development[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 50.
- [8] SHEN X, SHEN X. A potential role for aspirin in the prevention and treatment of cholangiocarcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2021, 148(6): 1323-1330.
- [9] MALACRIDA A, RIGOLIO R, CELIO L, et al. In vitro evaluation of rigosertib antitumoral and radiosensitizing effects against human cholangiocarcinoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8230.
- [10] DU J, LAN T, LIAO H, et al. CircNFIB inhibits tumor growth and metastasis through suppressing MEK1/ERK signaling in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 18.
- [11] ZHANG C, ZHAO S, WANG X. Co-expression of CMTM6 and PD-L1: a novel prognostic indicator of gastric cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 78.
- [12] MURANUSHI R, ARAKI K, YOKOBORI T, et al. High membrane expression of CMTM6 in hepatocellular carcinoma is associated with tumor recurrence[J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(8): 3314-3323.
- [13] ZHAO Y, ZHANG M, PU H, et al. Prognostic implications of pan-cancer CMTM6 expression and its relationship with the immune microenvironment[J]. *Front Oncol*, 2021, 10: 585961.
- [14] PENG Q H, WANG C H, CHEN H M, et al. CMTM6 and PD-L1 coexpression is associated with an active immune microenvironment and a favorable prognosis in colorectal cancer[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(2): e001638.
- [15] WU X, LAN X, HU W, et al. CMTM6 expression in M2 macrophages is a potential predictor of PD-1/PD-L1 inhibitor response in colorectal cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2021, 70(11): 3235-3248.
- [16] LIU L L, ZHANG S W, CHAO X, et al. Coexpression of CMTM6 and PD-L1 as a predictor of poor prognosis in macrotrabecular-massive hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2021, 70(2): 417-429.
- [17] GUAN X, ZHANG C, ZHAO J, et al. CMTM6 overexpression is associated with molecular and clinical characteristics of malignancy and predicts poor prognosis in gliomas[J]. *EBioMedicine*, 2018, 35: 233-243.
- [18] XIAO M, HASMIM M, LEQUEUX A, et al. Epithelial to mesenchymal transition regulates surface PD-L1 via CMTM6 and CMTM7 induction in breast cancer[J]. *Cancers*, 2021, 13: 1165.
- [19] BERR M L, SPARBIER C E, CHAN Y C, et al. CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity[J]. *Nature*, 2017, 549(7670): 101-105.
- [20] ZHENG Y, WANG C, SONG A, et al. CMTM6 promotes cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma by interacting with NRP1[J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(6): 1691-1709.
- [21] HUANG X, XIANG L, WANG B, et al. CMTM6 promotes migration, invasion, and EMT by interacting with and stabilizing vimentin in hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 120.
- [22] KOH Y W, HAN J H, HAAM S, et al. Increased CMTM6 can predict the clinical response to PD-1 inhibitors in non-small cell lung cancer patients[J]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(10): e1629261.

(收稿日期: 2022-12-22 修回日期: 2023-05-29)

(编辑: 袁皓伟)