

腹膜假黏液瘤的基础研究进展

顾依然¹, 杨 华², 陆维祺², 关 森¹, 张 伟³, 史国华¹, 孙正龙¹

(1. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏省医用光学重点实验室, 江苏苏州 215163; 2. 上海公共卫生临床中心/复旦大学附属中山医院南院, 上海 200083; 3. 苏州大学附属第二医院, 江苏 苏州 215000)

摘 要:腹膜假黏液瘤是黏液瘤的一种罕见亚型, 大部分临床病例由阑尾黏液肿瘤在腹腔种植引发。腹膜假黏液瘤的发病机制仍不清楚, 当前的临床治疗手段无法有效避免其复发。全文论述近年来腹膜假黏液瘤的基础研究进展, 主要包括腹膜假黏液瘤动物模型研究、腹膜假黏液瘤中黏液分泌相关信号通路、降解黏液的物理化学方法研究, 以及腹膜假黏液瘤中的基因突变研究等, 以期对腹膜假黏液瘤的临床治疗提供参考。

主题词:腹膜假黏液瘤; 阑尾黏液性肿瘤; 基因突变; 人源性异种移植

中图分类号: R735.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)10-0907-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.10.B011

Advance on the Basic Research of Pseudomyxoma Peritonei

GU Yi-ran¹, YANG Hua², LU Wei-qi², GUAN Miao¹, ZHANG Wei³, SHI Guo-hua¹, SUN Zheng-long¹

(1. Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China; 2. Shanghai Public Health Clinical Center / Zhongshan Hospital(South Branch), Fudan University, Shanghai 200083, China; 3. The Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, China)

Abstract: Pseudomyxoma peritonei (PMP) is a rare subtype of mucinous adenocarcinoma. Most of the clinical PMP cases are caused by appendiceal mucinous neoplasms implantation in the abdominal cavity. The pathogenesis of PMP remains unclear. Current clinical treatments cannot effectively avoid PMP's recurrence. This paper reviews the recent basic research progress of PMP, including the animal models of PMP, the signal pathways involved in mucus secretion of PMP, the physicochemical methods for mucus degradation, and the genetic mutations in PMP, in order to provide valuable references for clinical therapeutic strategies of PMP.

Subject words: pseudomyxoma peritonei; appendiceal mucinous neoplasms; gene mutation; patient-derived xenotransplantation

腹膜假黏液瘤(pseudomyxoma peritonei, PMP)是临床上十分罕见的疾病^[1-3], 其主要临床症状为具备黏液外分泌能力的肿瘤细胞在腹膜、网膜, 以及腹腔表面种植, 并向腹腔内分泌大量胶冻状黏液。PMP的肿瘤细胞主要起源于阑尾, 其次为卵巢和结肠, 偶有

报道起源于胃、胆囊、膀胱、输尿管等器官^[4]。PMP发病隐匿, 多数由于阑尾黏液囊肿破裂, 导致肿瘤细胞在腹腔内种植引发, 其早期症状常与阑尾炎相似, 临床误诊率较高。中晚期 PMP 患者的腹腔内常出现大量弥散状黏液, 以及肿瘤细胞, 难以彻底清除, 极易复发, 患者常因进行性腹胀、腹痛和肠梗阻导致的慢性消耗而死亡。

自从 1884 年被 Werth 医生记录以来, 临床医学界一直致力于制订 PMP 的病理分型标准, 并探索根据不同的病理分型, 提供与之相适应的治疗手段。1995 年, Ronnett 等^[5]根据临床和病理差异提出了一套 PMP 病理分型方案, 将其分成 3 种类型: ①播散性腹膜黏液性腺瘤病 (disseminated peritoneal adenomucinosis,

基金项目: 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所自主科研项目 (Y852123205); 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所医工结合项目 (Y9550201); 上海市公共卫生临床中心科研启动基金 (KY-GW-2017-12)

通信作者: 史国华, 研究员, 博士; 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏省苏州市虎丘区科灵路 88 号 (215163); E-mail: shigh@sibet.ac.cn
孙正龙, 副研究员, 博士; 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏省苏州市虎丘区科灵路 88 号 (215163); E-mail: sunzhil@sibet.ac.cn

杨华为共同第一作者

收稿日期: 2019-12-10; 修回日期: 2020-05-12

DPAM), 其典型特征为大量的黏液性腹水, 仅有少量组织学上温和黏液上皮细胞。②腹膜黏液癌病(peritoneal mucinous carcinomatosis, PMCA), 其典型特征为更加丰富的黏液上皮细胞, 具备细胞癌的结构和细胞学特征。③中间类型(peritoneal mucinous carcinomatosis with intermediate features, PMCA-I), 具有介于 DPAM 和 PMCA 之间的组织学特征。统计分析表明: 该病理分型方法中的 PMCA 术后生存率较 DPAM 和 PMCA-I 更低, 但 DPAM 与 PMCA-I 的术后生存率差异不显著^[6]。2012 年, 国际腹膜癌专家组织(PSOGI)根据大量临床统计结果, 将 PMP 细分为 4 种类型^[7]: ①黏液, 无上皮细胞, 病理特征为无细胞性黏液; ②PMP 伴低级别组织学特征, 病理特征为大量细胞外黏液, 仅含有少量增生的黏液上皮细胞, 细胞无明显异形性, 几乎没有细胞非典型或者分裂的情形; ③PMP 伴高级别组织学特征, 病理特征为更加丰富的黏液上皮细胞, 细胞具有癌的结构特征和细胞学特点, 具备浸润性; ④PMP 伴印戒细胞, 病理特征为腹膜高级别黏液癌伴印戒细胞。上述病理分型为无细胞黏液和 PMP 伴低级别组织学特征的肿瘤, 恶性程度较低, 不发生腹腔外转移; 病理分型为 PMP 伴高级别组织学特征和 PMP 伴印戒细胞的肿瘤, 恶性程度较高, 具有侵袭性, 易发生腹腔外转移。当前, PMP 的主要治疗方法为肿瘤细胞减灭术(cytoreductive surgery, CRS)辅以腹腔热灌注化疗(hyperthermic intraperitoneal chemotherapy, HIPEC)^[8-10]。关于 PMP 的治疗效果, Chua 等^[11]统计了 2298 例接受 CRS 联合 HIPEC 治疗患者的数据, 结果显示: 总体中位生存时间为 196 个月, 中位无进展生存时间为 98 个月; 10 年、5 年生存率分别为 59% 和 63%。表明 PMP 患者生存期的主要决定因素为病理分型, 另外手术能否完全减瘤、是否进行 HIPEC 也是影响患者预后的因素。

以 CRS 联合 HIPEC 为代表疗法的出现, 标志着近年来 PMP 临床治疗取得了一定的进展。然而, PMP 独特的生物学行为和未知的致病机制仍然限制了其临床治疗疗效, 患者仍然面临巨大的疾病复发风险。这些因素促使研究者关注 PMP 并开展基础病理研究。截至目前, 有关 PMP 的动物模型、黏液、基因突变特征等研究已经逐步开展。本文检索了近年来 PMP 基础研究的文献, 就其研究进展做一综述。

1 PMP 的人源性移植瘤模型研究

人源性移植瘤模型(patient-derived xenograft, PDX)是通过将患者的肿瘤组织接种于免疫缺陷鼠体内而建立的新一代肿瘤模型。这种肿瘤模型最大程度地保留了原代肿瘤细胞的组织学和遗传学特征, 并维持了患者的肿瘤异质性。PDX 经数次传代后, 仍可保留与亲代相似的组织病理学和免疫组织化学表型, 同时基因检测与原代肿瘤相一致, 有利于开展肿瘤的基础研究。

Flatmark 等^[12]开展了 PMP 的 PDX 模型研究, 其选定病理类型为 PMCA-I 的 2 例不同患者来源的 PMP 肿瘤组织, 分别对免疫缺陷裸鼠进行皮下肿瘤种植和腹腔肿瘤种植。结果表明: 2 例患者的 PMP 肿瘤组织均实现了腹腔肿瘤种植, 但只有 1 例皮下肿瘤种植成功。裸鼠腹腔种植瘤保持了原患者肿瘤的性质, 包括保持黏液分泌、仅在腹腔内生长、表达 CEA、CK20、CK7、Ki-67 等标志蛋白。相对于 PMCA-I 类型, DPAM 类型含有的肿瘤细胞数量更少, 因此 DPAM 类型的 PMP 异体种植难度更大, 但仍有成功案例。Chua 等^[13]将病理分型为 DPAM 的肿瘤组织移植到先天免疫缺陷的大鼠腹腔内, 90 天后所有大鼠都表现出了 PMP 症状, 免疫组化显示大鼠体内继发肿瘤的病理分型仍为 DPAM 类型。Dohan 等^[14]针对 18 例不同患者来源的 PMP 肿瘤构建 PDX 模型, 共有 8 例构建成功。8 例中有 7 例病理分型为 PMCA, 1 例为 DPAM, 且移植瘤的病理分型与供体来源一致。张海红等^[15]成功分离培养了 PMP 肿瘤细胞, 并用培养细胞成功构建裸鼠腹腔移植瘤模型。Lin 等^[16]利用病理分型为 PMCA 的肿瘤组织, 成功构建了可继代的裸鼠皮下移植瘤模型, 并以裸鼠继代肿瘤为基础, 又成功构建了腹腔种植模型, 且多次传代后肿瘤的病理分型始终保持一致。

以 PDX 模型为基础, Dohan 等^[14]采用微血管造影技术和多普勒超声法, 发现 PMP 肿瘤内部存在血流供应, 并证明了抗血管生成药物贝伐单抗能够减缓 PMP 的生长速度, 显著延长 PDX 小鼠的寿命。Flatmark 等^[17]以 PMP 的 PDX 模型为基础, 测试了新型抗毒素 MOC31PE 单独腹腔给药, 以及与丝裂霉素或者奥沙利铂联合给药对 PMP 的治疗效果, 结果表明 MOC31PE 单独用药, 以及与丝裂霉素联用均

有良好的杀灭 PMP 肿瘤细胞的效果。Dilly 和 Choudry 等^[18-20]以 PMP 的 PDX 模型为基础,发现长期服用抗炎药物地塞米松能够有效抑制模型鼠腹腔内的 PMP 肿瘤生长。Lin 等^[16]以 PMP 的 PDX 模型为基础,测试了 5-fluorouracil 对 PMP 的治疗效果,结果显示 5-fluorouracil 能够有效抑制 PMP 肿瘤细胞的增殖,并降低 Ki-67 的阳性率。这些研究表明,不同病理分型的 PMP 均可成功构建 PDX 模型,且 PDX 模型在 PMP 基础病理研究、药物筛查等方面具备应用前景。

2 PMP 黏液相关研究

不同病理分型的 PMP 具备共同的病理特征:即肿瘤细胞大量分泌黏液。过量的黏液积累会挤压腹腔内正常器官,导致患者出现肠梗阻等症状,造成患者死亡。黏液也给治疗带来了巨大困难,如:黏液积聚导致腹腔粘连,增加手术难度;黏液包裹肿瘤细胞,导致化疗耐药。黏液的主要组分为黏蛋白,人黏蛋白基因家族包括 22 个基因,主要分为非分泌型黏蛋白和分泌型黏蛋白两大类,其中分泌型黏蛋白又可以细分为两类,包括易形成胶冻样结构的黏蛋白(MUC2、MUC5AC、MUC5B、MUC6、MUC19)和不形成胶冻样结构的黏蛋白(MUC7、MUC8、MUC9)^[21-22]。易形成胶冻状结构的黏蛋白 MUC2、MUC5AC、MUC5B、MUC6 的基因聚集成簇,分布于 11 号染色体的 p15 臂上,被认为源自同一基因祖先,可能具有相似的转录调节机制^[23]。PMP 黏液的主要成分为 MUC2 和 MUC5AC,也有 MUC5B 和 MUC6^[24-25]。虽然主要成分相似,但 PMP 黏液具有多样化的物理形态,如液态黏液和半固态黏液等,其中半固态黏液无法引流,常与组织发生粘连,给临床手术带来了极大的困难。当前,临床上主要采用开腹手术的方式清除 PMP 患者腹腔黏液,如能减少黏液分泌,或使黏液液化、便于引流,就能够避免开腹手术,以及提高疗效,使患者获益。

2.1 黏液分泌信号通路

针对调控黏液分泌的信号通路中的关键调节因子,设计并开发相应药物,抑制黏液分泌,是当前 PMP 黏液研究的主要方向之一。MUC2 是 PMP 黏液组分中的主要黏蛋白之一^[24]。MUC2 基因的启动子

区域受到众多蛋白因子调控^[23]。肿瘤过度生长造成的低氧环境能够诱导低氧应答因子 HIF-1 α 的表达,而 HIF-1 α 能够调控众多基因表达,促使肿瘤细胞适应低氧环境^[26]。低氧条件下,HIF-1 α 与黏蛋白基因的启动子区域结合,诱导黏蛋白的表达^[27]。细胞实验和动物实验研究均表明:HIF-1 α 的特异性抑制剂 BAY87-2243 具有良好的抑制 PMP 细胞 MUC2 表达,以及抑制肿瘤生长的效果^[20]。MAPK 信号途径的信号分子 NF- κ B 和 AP1 均能够直接与 MUC2 的启动子区域结合,其上游关键调节蛋白 MEK1/2 的抑制剂 RDEA119 能显著抑制 PMP 移植瘤中 MUC2 mRNA 和蛋白的表达^[28]。长期喂食 READ119 能够有效抑制 PDX 小鼠体内的 PMP 移植瘤生长^[29]。COX-2 能够激活 EP4/cAMP/PKA/CREB 信号通路,该通路中的 CREB 能够与 MUC2 启动子区域结合,调控 MUC2 表达^[18]。COX-2 的特异性抑制剂 Celecoxib 在 5~20 μ mol 浓度范围内时,能以剂量依赖的方式抑制 PMP 移植瘤中 MUC2 表达;当其浓度>20 μ mol 时,能够有效降低 PMP 肿瘤细胞活性,并诱导细胞凋亡。长期口服 Celecoxib 能够有效抑制 PDX 小鼠体内的肿瘤生长^[18]。

2.2 黏液溶解

开发药物溶解黏液、使黏液液化便于引流是 PMP 黏液研究的另一主要方向。 H_2O_2 作为氧化剂,能够氧化二硫键,从而破坏相邻分子间的连接^[30]。通过对胃肠表面的黏液降解研究发现, H_2O_2 还能直接降解糖苷键^[31]。加入低浓度的抗坏血酸可使 H_2O_2 对胃肠表面黏液的降解速度提升 250 倍^[32]。Pillai 等^[33]研究了 H_2O_2 和抗坏血酸单独,以及联合使用对 PMP 黏液的降解作用,结果发现:等浓度的 H_2O_2 (0.2%) 和抗坏血酸 (0.2%) 联合使用,在 pH 为 4.5 的条件下,具备最佳黏液降解能力。菠萝蛋白酶是源自菠萝的一系列巯基水解酶的总称,其具备优秀的糖蛋白降解能力,在临床上已经成熟应用于消水肿、水肿等^[34]。氮乙酰半胱氨酸是一种含巯基的化合物,其所含巯基能够破坏蛋白分子间的二硫键,从而降低黏蛋白的粘滞性,常用于粘稠痰液为特征的呼吸系统疾病^[35]。菠萝蛋白酶和氮乙酰半胱氨酸单独,以及联合使用均对 PMP 黏液有溶解作用,其中 300 μ g/ml 的菠萝蛋白酶与 250mmol 的氮乙酰半胱氨酸组合,不仅对实验动物无毒副作用,还具备最佳的腹腔黏液溶解效

果^[36]。PMP黏液天然存在不同的物理硬度,可分为3类:软黏液组织(硬度指数 ≤ 0.6)、中间硬黏液组织($0.6 < \text{硬度指数} < 1.2$)、硬黏液组织(硬度指数 ≥ 1.2)。研究表明,300 $\mu\text{g/ml}$ 的菠萝蛋白酶与250mmol的氮乙酰半胱氨酸组合能够溶解小鼠腹腔内100%的软黏液组织、50%的中间硬度黏液组织和28.67%的硬黏液组织^[37]。半胱胺是一种还原性氨基硫醇,能够破坏二硫键,临床上常用来治疗胱氨酸病^[38]。研究表明,相较于300 $\mu\text{g/ml}$ 菠萝蛋白酶和250mmol氮乙酰半胱氨酸的组合,200 $\mu\text{g/ml}$ 菠萝蛋白酶加200mmol半胱胺的组合对PMP黏液的溶解效率更高^[39]。对于1g硬黏液组织,前者3h的溶解效率为 $36.33\% \pm 3.27\%$,后者溶解效率则高达 $82.5\% \pm 2.74\%$ 。此外,碳酸氢盐^[40]、葡萄糖^[41]、硫酸葡聚糖^[42]、透明质酸酶^[43]等试剂也被尝试用于PMP黏液溶解。然而截至目前,上述所有药物在PMP黏液溶解方面的基础研究尚不充分,还无法应用于临床治疗。

3 PMP的基因突变

肿瘤的发生是环境因素和遗传因素共同作用的结果,其病理进程涉及各种基因突变。近年来,新型基因测序技术日趋成熟,能够实现对基因组、转录组和表观遗传组等进行全面而快速的测序,为研究肿瘤基因突变提供了有效、便捷的工具。先进的测序技术应用于PMP基础研究,揭示了PMP独特的基因突变特征。

3.1 K-RAS基因突变

K-RAS基因突变是PMP中常见的基因突变之一,不同研究组的研究结果显示,PMP患者肿瘤组织中的K-RAS基因突变频率在62%~100%,且在不同病理分型的PMP中,K-RAS突变频率无明显差异^[44-48]。PMP中K-RAS的主要突变位点为12号密码子和13号密码子,罕见突变位点为146号密码子,主要氨基酸突变形式为G12A/V/D/C/S、G13D、A146T等,且均为功能激活突变^[48]。K-RAS编码的具有GDP酶活性的RAS蛋白,是EGFR依赖的RAS-RAF-MAPK信号通路中的关键信号分子。RAS蛋白是细胞内的信号转换器,可以在活性状态(RAS-GTP)和非活性状态(RAS-GDP)之间转换。当细胞外的配体与跨膜受体EGFR结合后,激活

EGFR胞内区,并通过生长因子受体结合蛋白2(Grb2)和鸟嘌呤核苷酸转换因子(GEFs),将信号传递细胞膜内表面RAS蛋白,使RAS蛋白发生构象变化,转变成有活性的GAS-GTP模式,进而激活RAS-RAF-MAPK信号通路。该信号通路可以将EGFR刺激信号转移至细胞核内,控制基因转录,调控细胞的增殖和凋亡^[49]。K-RAS激活突变会导致细胞摆脱正常的EGFR信号通路调控,诱导细胞无限增殖、发生癌变。尽管K-RAS基因在PMP中突变频率较高,但与其与肿瘤预后的相关性仍有争议。已有研究中,既有支持K-RAS突变与PMP预后无关者^[44],也有提示K-RAS突变是PMP预后较差的正相关因素^[50]。统计样本量较小可能是出现相反结论的主要原因。

3.2 GNAS基因突变

GNAS基因突变也是PMP的常见突变之一,其突变频率仅次于K-RAS基因。已有研究表明,PMP中GNAS突变频率在25%~100%,平均突变频率为55.8%^[45-48]。GNAS突变频率在不同病理分型的PMP中无明显差异,但GNAS突变是PMP患者术后无进展生存期较差的正相关因素^[51]。PMP中GNAS的突变位点主要为201号密码子,主要氨基酸突变形式为R201S/C/H。GNAS基因编码小G蛋白的 α 亚基。小G蛋白能够接受细胞膜上七层跨膜受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)传递的信号,改变自身结构,并激活腺苷酸环化酶^[52]。GNAS基因的201号密码子突变导致腺苷酸环化酶组成型激活,以及细胞内cAMP含量上升。研究表明,细胞内cAMP水平的升高能够激活PKA通路,诱导多种肿瘤细胞的黏液分泌^[53]。Nishikawa等^[54]在结肠癌细胞系HT29中引入GNAS基因的R201H突变,诱导细胞分泌的MUC2和MUC5AC增加。这些研究结果均表明,GNAS突变与PMP黏液分泌密切相关。

3.3 其他PMP相关的低频突变基因

TP53基因是人体的主要抑癌基因之一。肿瘤组织中P53蛋白表达量的高低与PMP预后直接相关。P53表达量高预示预后效果差;反之,则预示预后效果较好^[55]。TP53基因突变是PMP的低频基因突变之一,文献报道TP53基因的突变频率分别为16.7%^[45]、10%^[48]、5.2%^[55],其突变位点主要包括R175H、P250L、G266R、R273C、N239D。此外,TP53突变主要存在于PMCA中,

且在 PMCA 和 DAPM 中存在显著性突变频率差异。

TGF- β 信号通路在众多类型肿瘤中均出现失调。研究表明,PMP 中的 TGF- β 信号通路也受到干扰。该信号通路中的 *SMAD4*、*SMAD2*、*SMAD3*、*TGFBR1*、*TGFBR2*、*LTBP1*、*THBS1*、*PPP2R1B*、*ACVR1B* 基因在 PMP 肿瘤中均出现低频次突变^[45,48,50,55]。值得一提的是,已有研究发现 TGF- β 信号通路成员携带的基因突变均为功能缺失突变,且在 PMCA 中出现的突变频率更高。

PI3K-AKT 信号通路参与调解众多重要的细胞生理活动,包括凋亡、增殖、迁移、糖代谢等。该信号通路中的重要成员 *PIK3CA* 和 *AKT* 在 PMCA 中也会发生基因突变^[45,48,50]。

4 小结与展望

近年来开展的 PMP 基础科研主要集中在疾病动物模型建立、黏液研究和基因突变研究 3 个方面。构建疾病的动物模型有助于模拟人体内 PMP 的真实状况,开展肿瘤生长机制,以及药物筛选研究。鉴于 PMP 分泌大量黏液的表型,开展抑制黏液分泌,以及溶解黏液的研究有助于缓解患者因黏液在腹腔积聚造成的肠梗阻等症状,并能够提高治疗效果。检测 PMP 细胞的基因突变情况,有助于详细了解 PMP 的发病机制,并根据基因突变情况开发靶向药物,为 PMP 的精准诊疗奠定基础。已开展的基础研究初步揭开了 PMP 疾病的面纱,为 PMP 的临床治疗带来了希望,但仍应看到 PMP 基础研究面临的困难,包括:PMP 属于罕见病,研究材料来源困难。鉴于 PMP 自身的生物学特性,其肿瘤细胞分离培养困难、细胞生长缓慢、实验周期长;药物开发面对的市场小;公众甚至普通医生对 PMP 的危害性认识不足等。

上述不利因素导致 PMP 基础研究与其他发病率较高的肿瘤相比仍十分薄弱。未来在加强 PMP 基础研究的同时,有必要向公众普及 PMP 的危害性,呼吁政府及社会往这一领域投入更多的支持,从而改善 PMP 患者的生活质量。

参考文献:

[1] Smeenk RM,van Velthuisen ML,Verwaal VJ,et al. Appen-

diceal neoplasms and pseudomyxoma peritonei;a population based study[J]. Eur J Surg Oncol,2008,34(2):196-201.

[2] Lord AC,Shihab O,Chandrakumaran K,et al. Recurrence and outcome after complete tumour removal and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in 512 patients with pseudomyxoma peritonei from perforated appendiceal mucinous tumours[J]. Eur J Surg Oncol,2015,41(3):396-399.

[3] Carr NJ,Jenny F,Ilesley IC,et al. Pathology and prognosis in pseudomyxoma peritonei;a review of 274 cases [J]. J Clin Pathol,2012,65(10):919-923.

[4] Mittal R,Chandramohan A,Moran B. Pseudomyxoma peritonei;natural history and treatment[J]. Int J Hyperther,2017,33(5):511-519.

[5] Ronnett BM,Zahn CM,Kurman RJ,et al. Disseminated peritoneal adenomucinosis and peritoneal mucinous carcinomatosis. a clinicopathologic analysis of 109 cases with emphasis on distinguishing pathologic features,site of origin,prognosis,and relationship to "pseudomyxoma peritonei"[J]. Am J Surg Pathol,1995,19(12):1390-1408.

[6] Bradley RF,Stewart 4th JH,Russell GB,et al. Pseudomyxoma peritonei of appendiceal origin;a clinicopathologic analysis of 101 patients uniformly treated at a single institution,with literature review[J]. Am J Surg Pathol,2006,30(5):551-559.

[7] Carr NJ,Thomas DC,Mohamed F,et al. A consensus for classification and pathologic reporting of pseudomyxoma peritonei and associated appendiceal neoplasia:the results of the Peritoneal Surface Oncology Group International (PSOGI) modified delphi process[J]. Am J Surg Pathol,2016,40(1):14-26.

[8] Faris JE,Ryan DP. Controversy and consensus on the management of patients with pseudomyxoma peritonei[J]. Curr Treat Options Oncol,2013,14(3):365-373.

[9] Mohamed F,Cecil T,Moran B,et al. A new standard of care for the management of peritoneal surface malignancy [J]. Curr Oncol,2011,18(2):e84-e96.

[10] Benson 3rd AB,Bekaii-Saab T,Chan E,et al. Metastatic colon cancer,version 3.2013:featured updates to the NCCN Guidelines [J]. J Natl Compr Canc Netw,2013,11(2):141-152.

[11] Chua TC,Moran BJ,Sugarbaker PH,et al. Early- and long-term outcome data of patients with pseudomyxoma peritonei from appendiceal origin treated by a strategy of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy[J]. J Clin Oncol,2012,30(20):2449-2456.

[12] Flatmark K,Reed W,Halvorsen T,et al. Pseudomyxoma

- peritonei—two novel orthotopic mouse models portray the PMCA-I histopathologic subtype[J]. BMC Cancer, 2007, 7: 116.
- [13] Chua TC, Akther J, Yao P, et al. In vivo model of pseudomyxoma peritonei for novel candidate drug discovery[J]. Anticancer Res, 2009, 29(10): 4051–4055.
- [14] Dohan A, Lousquy R, Eveno C, et al. Orthotopic animal model of pseudomyxoma peritonei; an in vivo model to test anti-angiogenic drug effects[J]. Am J Path, 2014, 184(7): 1920–1929.
- [15] Zhang HH, Zhang BH, Wang YN. Culture and characterization of human pseudomyxoma peritonei cells[J]. Basic & Clinical Medicine, 2017, 37(7): 1010–1014. [张海红, 张保华, 王亚南. 人腹膜假黏液瘤原代细胞培养及鉴定[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(7): 1010–1014].
- [16] Lin YL, Zhang J, Yan FC, et al. Establishment of patient-derived xenograft model of peritoneal mucinous carcinomatosis with signet ring cells and in vivo study on the efficacy and toxicity of intraperitoneal injection of 5-fluorouracil[J]. Cancer Med, 2020, 9(3): 1104–1114.
- [17] Flatmark K, Guldvik IJ, Svensson H, et al. Immunotoxin targeting EpCAM effectively inhibits peritoneal tumor growth in experimental models of mucinous peritoneal surface malignancies[J]. Int J Cancer, 2013, 133(6): 1497–1506.
- [18] Dilly AK, Honick BD, Lee YJ, et al. Targeting G-protein coupled receptor-related signaling pathway in a murine xenograft model of appendiceal pseudomyxoma peritonei [J]. Oncotarget, 2017, 8(63): 106888–106900.
- [19] Choudry HA, Mavanur A, O'Malley ME, et al. Chronic anti-inflammatory drug therapy inhibits gel-forming mucin production in a murine xenograft model of human pseudomyxoma peritonei [J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19(5): 1402–1409.
- [20] Dilly AK, Lee YJ, Zeh HJ, et al. Targeting hypoxia-mediated mucin 2 production as a therapeutic strategy for mucinous tumors[J]. Transl Res, 2016, 169: 19–30, e1.
- [21] Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(12): 874–885.
- [22] Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface [J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(1): 45–60.
- [23] Desseyn JL, Aubert JP, Porchet N, et al. Evolution of the large secreted gel-forming mucins[J]. Mol Biol Evol, 2000, 17(8): 1175–1184.
- [24] O'Connell JT, Tomlinson JS, Roberts AA, et al. Pseudomyxoma peritonei is a disease of MUC2-expressing goblet cells[J]. Am J Pathol, 2002, 161(2): 551–564.
- [25] Semino-Mora C, Liu H, Mcavoy T, et al. Pseudomyxoma peritonei: is disease progression related to microbial agents? a study of bacteria, MUC2 and MUC5AC expression in disseminated peritoneal adenomucinosis and peritoneal mucinous carcinomatosis [J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15(5): 1414–1423.
- [26] Poon E, Harris AL, Ashcroft M. Targeting the hypoxia-inducible factor(HIF) pathway in cancer[J]. Expert Rev Mol Med, 2009, 11: e26.
- [27] Zhou X, Tu J, Li Q, et al. Hypoxia induces mucin expression and secretion in human bronchial epithelial cells[J]. Transl Res, 2012, 160(6): 419–427.
- [28] Li JD, Feng W, Gallup M, et al. Activation of NF-kappaB via a Src-dependent Ras-MAPK-p90rsk pathway is required for pseudomonas aeruginosa-induced mucin overproduction in epithelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(10): 5718–5723.
- [29] Dilly AK, Song XX, Zeh HJ, et al. Mitogen-activated protein kinase inhibition reduces mucin 2 production and mucinous tumor growth[J]. Transl Res, 2015, 166(4): 344–354.
- [30] Mantle M. Effects of hydrogen-peroxide, mild trypsin digestion and partial reduction on rat intestinal mucin and its disulfide-bound 118-kda glycoprotein [J]. Biochem J, 1991, 274 (Pt 3): 679–685.
- [31] Cooper B, Creeth JM, Donald AS. Studies of the limited degradation of mucus glycoproteins—the mechanism of the peroxide reaction[J]. Biochem J, 1985, 228(3): 615–626.
- [32] Robertson WV, Ropes MW, Bauer W. The degradation of mucins and polysaccharides by ascorbic acid and hydrogen peroxide[J]. Biochem J, 1941, 35 (8–9): 903–908.
- [33] Pillai K, Akhter J, Chua TC, et al. Mucolysis by ascorbic acid and hydrogen peroxide on compact mucin secreted in pseudomyxoma peritonei[J]. J Surg Res, 2012, 174(2): e69–e73.
- [34] Maurer HR. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use[J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(9): 1234–1245.
- [35] Turner J, Jones CE. Regulation of mucin expression in respiratory diseases[J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(Pt 4): 877–881.
- [36] Pillai K, Akhter J, Chua TC, et al. A formulation for in situ lysis of mucin secreted in pseudomyxoma peritonei [J]. Int J Cancer, 2014, 134(2): 478–486.
- [37] Akhter J, Pillai K, Chua TC, et al. Efficacy of a novel mucolytic agent on pseudomyxoma peritonei mucin, with potential for treatment through peritoneal catheters [J]. Am J

- Cancer Res, 2014, 4(5):495–507.
- [38] Besouw M, van Den Heuvel L, van Eijnden R, et al. Increased human dermal microvascular endothelial cell survival induced by cysteamine [J]. *J Inher Metab Dis*, 2013, 36(6):1073–1077.
- [39] Pillai K, Akhter J, Morris DL. Assessment of a novel mucolytic solution for dissolving mucus in pseudomyxoma peritonei: an ex vivo and in vitro study [J]. *Pleura Peritoneum*, 2017, 2(2):111–117.
- [40] Shirasawa Y, Orita H, Ishida K, et al. Critical alkalosis following intraperitoneal irrigation with sodium bicarbonate in a patient with pseudomyxoma peritonei [J]. *J Anesth*, 2008, 22(3):278–281.
- [41] Green N, Gancedo H, Smith R, et al. Pseudomyxoma peritonei—nonoperative management and biochemical findings—case report [J]. *Cancer*, 1975, 36(5):1834–1837.
- [42] Beller FK, Zimmerman RE, Nienhaus H. Biochemical identification of the mucus of pseudomyxoma peritonei as the basis for mucolytic treatment [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1986, 155(5):970–973.
- [43] Snyder TE, Vandivort MR. Mucinous cystadenocarcinoma of the appendix with pseudomyxoma peritonei presenting as total uterine prolapse. a case report [J]. *J Reprod Med*, 1992, 37(1):103–106.
- [44] Shetty S, Thomas P, Ramanan B, et al. Kras mutations and p53 overexpression in pseudomyxoma peritonei: association with phenotype and prognosis [J]. *J Surg Res*, 2013, 180(1):97–103.
- [45] Noguchi R, Yano H, Gohda Y, et al. Molecular profiles of high-grade and low-grade pseudomyxoma peritonei [J]. *Cancer Medicine*, 2015, 4(12):1809–1816.
- [46] Sio TT, Mansfield AS, Grotz TE, et al. Concurrent MCL1 and JUN amplification in pseudomyxoma peritonei: a comprehensive genetic profiling and survival analysis [J]. *J Hum Genet*, 2014, 59(3):124–128.
- [47] Nishikawa G, Sekine S, Ogawa R, et al. Frequent GNAS mutations in low-grade appendiceal mucinous neoplasms [J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(4):951–958.
- [48] Alakus H, Babicky ML, Ghosh P, et al. Genome-wide mutational landscape of mucinous carcinomatosis peritonei of appendiceal origin [J]. *Genome Medicine*, 2014, 6(5):43.
- [49] McCormick F. K-Ras protein as a drug target [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(3):253–258.
- [50] Pietrantonio F, Perrone F, Mennitto A, et al. Toward the molecular dissection of peritoneal pseudomyxoma [J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(11):2097–2103.
- [51] Pietrantonio F, Berenato R, Maggi C, et al. GNAS mutations as prognostic biomarker in patients with relapsed peritoneal pseudomyxoma receiving metronomic capecitabine and bevacizumab: a clinical and translational study [J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1):125.
- [52] Lyons J, Landis CA, Harsh G, et al. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors [J]. *Science*, 1990, 249(4969):655–659.
- [53] Song KS, Choi YH, Kim JM, et al. Suppression of prostaglandin E2-induced MUC5AC overproduction by RGS4 in the airway [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 296(4):L684–L692.
- [54] Nishikawa G, Sekine S, Ogawa R, et al. Frequent GNAS mutations in low-grade appendiceal mucinous neoplasms [J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(4):951–958.
- [55] Saarinen L, Nummela P, Thiel A, et al. Multiple components of PKA and TGF-beta pathways are mutated in pseudomyxoma peritonei [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4):e0174898.