

MicroRNA表观遗传作用及其与肝癌发生发展的研究进展

胡静, 黄赞松, 周喜汉, 胡高裕, 覃月秋, 尹毅霞

胡静, 黄赞松, 广西医科大学研究生学院 广西壮族自治区南宁市 530021

黄赞松, 周喜汉, 胡高裕, 覃月秋, 尹毅霞, 右江民族医学院消化疾病研究所附属医院消化内科 广西壮族自治区百色市 533000

胡静, 主治医师, 主要从事肝癌的基础与临床研究。

广西自然科学基金资助项目, Nos. 桂财教2014GXNS-FAA118143, 桂科自0542119

广西高校优秀人才基金资助项目, No. 桂教人20077029

广西卫生厅课题基金重点基金资助项目, No. 桂卫重200887

作者贡献分布: 本文综述由胡静完成; 黄赞松选题设计、修改及审校; 周喜汉、胡高裕、覃月秋及尹毅霞文献检索与资料筛选。

通讯作者: 黄赞松, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 533000, 广西壮族自治区百色市城东路98号, 右江民族医学院消化疾病研究所附属医院消化内科。1019846481@qq.com

电话: 0776-2846532

收稿日期: 2014-08-03 修回日期: 2014-08-21

接受日期: 2014-09-03 在线出版日期: 2014-10-18

Epigenetic effects of microRNAs and development of hepatocellular carcinoma

Jing Hu, Zan-Song Huang, Xi-Han Zhou, Gao-Yu Hu, Yue-Qiu Qin, Yi-Xia Yin

Jing Hu, Zan-Song Huang, Graduate College, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Zan-Song Huang, Xi-Han Zhou, Gao-Yu Hu, Yue-Qiu Qin, Yi-Xia Yin, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Institute of Digestive Disease, Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nos. 2014GXNSFAA118143 and 0542119; the Higher Talent Fund of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 20077029; the Key Project of Foundation of Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 200887

Correspondence to: Zan-Song Huang, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Institute of Digestive Disease, Youjiang Medical College for Nationalities, 98 Chengxiang Road, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. 1019846481@qq.com

Received: 2014-08-03 Revised: 2014-08-21

Accepted: 2014-09-03 Published online: 2014-10-18

Abstract

Epigenetic changes are heritable changes of gene activity which do not depend on DNA sequence variation. MicroRNAs (miRNAs) are a group of endogenous small RNAs that are about 20 to 25 nucleotides in length. It has been found that

miRNAs play an important role in the development of hepatocellular carcinoma (HCC). The interaction between miRNAs and the epigenetic machinery may contribute to the pathogenesis of HCC. Elucidation of roles of miRNAs in HCC has great significance in early diagnosis of HCC and development of targeted drugs for this malignancy. In this paper, we discuss the relationship between epigenetic effects of miRNAs and the development of HCC.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: MicroRNA; Hepatic carcinoma; Epigenetic; Treatment

Hu J, Huang ZS, Zhou XH, Hu GY, Qin YQ, Yin YX. Epigenetic effects of microRNAs and development of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(29): 4437-4444 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/4437.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i29.4437>

摘要

表观遗传是指不依赖DNA序列变化的基因活性可遗传性改变。MicroRNA(miRNA)是一类内生的长度约为20-25个核苷酸的小RNA。目前研究证实miRNA对于肝癌的发生发展起着重要作用,同时随着对表观遗传的不断深入研究,认识到了miRNA与表观遗传相互作用下引起肝癌发生发展的机制,这对肝癌早期诊断以及靶向药物的开发有重要意义。本文对miRNA表观遗传作用及其与肝癌的研究历史与现状进行综述介绍。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 微小RNA; 肝癌; 表观遗传; 治疗

核心提示: MicroRNAs(miRNAs)参与肝癌发病机制中的多个环节,其中包括通过DNA甲基化修饰调控miRNA基因的表达、通过组蛋白修饰调控miRNA基因的表达、miRNA参与构成表观遗传调控网络以及承担着类似于癌基因或抑癌基因的生物效应。

背景资料

肝细胞癌起病隐匿,临床上多数患者确诊时已是中晚期,目前治疗手段有限,治疗效果不佳,在全球范围内是一种常见导致死亡的恶性肿瘤。MicroRNAs(miRNAs)是一类新型基因调节剂,近年来成为医学科学研究领域的一个热点,通过对其表观遗传学的研究,可以进一步为肝癌的早期诊断以及靶向治疗肝癌药物研发提供理论依据。

同行评议者

秦建民, 主任医师, 上海中医药大学附属普陀医院普外科

研究前沿

关于miRNA对肝癌的早期诊断及靶向药物的开发与应用已取得较大进展。虽然已经证实了miRNA对于肝癌的发生、发展、早期诊断、治疗以及预后的判断上关系密切,但是这些miRNA在肝癌的整个发病过程中的具体作用依然没有完全清楚。

胡静, 黄赞松, 周喜汉, 胡高裕, 覃月秋, 尹毅霞. MicroRNA表观遗传作用及其与肝癌发生发展的研究进展. 世界华人消化杂志 2014; 22(29): 4437-4444 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/4437.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i29.4437>

0 引言

现代分子生物学已证实恶性肿瘤的发生是由于细胞调控程序发生紊乱的结果。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)在全球范围内是一种常见导致死亡的恶性肿瘤, 在一些地区占癌症相关死因的首位^[1], HCC在我国发病率很高, 其死亡率在消化系统恶性肿瘤中居第2位, 据流行病学统计, HCC发病率在城市居民中仅次于肺癌, 农村仅次于胃癌^[2-4]。发病原因与病毒性肝炎关系密切, 另外肝硬化、进食含有黄曲霉素的食物以及接触某些化学致癌物等其他因素也与HCC的发病有关, 但其确切的发病机制目前尚未完全清楚^[5,6]。

MicroRNAs(miRNAs)是一类新型基因调节剂, 近年来成为医学科学研究领域的一个热点。其生理学机制复杂, 目前主要认为是通过促进靶miRNA的降解或抑制其翻译过程而发挥调控作用, 在细胞中具有广泛的生物学效应, 参与细胞生长、增殖、分化以及死亡等诸多过程^[7]。人类基因组计划的研究发现人类具有3万多组基因, 其中近1/3的基因受到miRNAs的调节, 这些基因大多参与生命调节的重要过程, 参与细胞发育、信号转导等诸多环节。近期发现, miRNAs可能具有癌基因和抑癌基因的作用^[8,9], 表现为不同类型的肿瘤有其特异的miRNA表达谱。多个miRNA与肿瘤的发生、分化程度、耐药性及预后等密切相关。多种miRNA分子定位于癌基因染色体的变异区内, 其在功能上承担着类似于癌基因或抑癌基因的功能, 直接或间接影响癌变的进程。研究miRNA与肝癌形成、表观遗传生物特征关系为肝癌的早期诊断、疗效观察和预后判断奠定理论基础。本文对miRNA表观遗传作用及其与肝癌的发生发展历史与研究现状进行综述介绍。

1 miRNAs简介

miRNA是一种广泛存在于真核生物、大小约为20-25个核苷酸的内源性单链小分子RNA^[10]。研究^[8,9]发现miRNA调节人类1/3的基因, 成熟的miRNA生物学效应是降解或是阻遏靶mRNA的

翻译, 进而参与生命过程许多的重要进程。如上所述, miRNA具有双向调控功能, 在肿瘤的发生发展的基因层面上则同样具有促进或者抑制作用。即miRNA实际上在生命活动中至少承担了癌基因或抑癌基因这两种功能。

1.1 miRNAs的发现 1993年Lee等^[11]在线虫体内发现了一种miRNA: lin-4。2000年Reinhart等^[12]发现了第二种miRNA: let-7。自从第一种miRNA的发现, 仅仅在过去的30年内, 已经发现超过1.5万种miRNA, 其中与人类相关的就有1千余种。

1.2 miRNAs生成机制与生物学特性 miRNA的生成机制是通过转录过程。转录起始, 在一种RNA聚合酶(目前已经证实这种聚合酶是RNA聚合酶II)作用下, 生成一种不成熟的miRNA, 生物学上称之为初始miRNA(pri-miRNA)。这种初始miRNA有几个特征: (1)具有双链结构; (2)RNA链两端具有一些特殊结构, 比如在细胞分子两端分别具有帽子结构、polyA尾; (3)在空间结构上形成特殊的二级结构-茎-环结构, 这种结构很类似于转运RNA(tRNA)。随后在核糖核酸酶III参与下, 对细胞核中的pri-miRNA进行进一步加工, 形成一种前体miRNA(pre-miRNA)。最终pre-miRNA在解旋酶作用下, 原来双链的RNA最终成为单链, 形成成熟的miRNA。

研究^[13]认为, miRNA的生物学机制主要集中在以下几点: (1)不具有可读框, 即不编码蛋白质; (2)化学结构上, 5'端有一磷酸基团, 3'端为羟基; (3)保守性, 在不同物质之间miRNA具有高度的保守性; (4)时序性, 即在不同组织、不同发育阶段, miRNA的表达水平具有显著差异, 这一点在临床一些领域具有很大的价值; (5)组织特异性; (6)基因簇生性。

1.3 miRNAs与表观遗传调控 表观遗传调控, 是指不依赖DNA序列变化的基因活性可遗传性改变^[14]。miRNA与表观遗传调控之间主要存在两种方式: (1)表观遗传学的经典调控机制(DNA甲基化和组蛋白修饰)可以直接或间接的对miRNA的表达过程进行调控; (2)某些 miRNA分子可以反过来影响DNA甲基化水平或改变组蛋白修饰等途径进而影响表观遗传过程^[15]。

1.3.1 表观遗传机制调控miRNA表达: (1)通过DNA甲基化修饰调控miRNA基因的表达。DNA的低甲基化一般引起相关miRNA的基因高度表达, 反之则引起其低表达。这一规律目前在临床上也有诸多报道, 主要体现在相关miRNA的基

因表达程度与肿瘤发生相关的两种信号转导途径: DNA高度甲基化→miRNA基因表达下调→癌基因表达上调→诱导肿瘤发生; 反之则抑癌基因表达上调, 抑制肿瘤发生^[16]; (2)通过组蛋白修饰调控miRNA基因的表达. 组蛋白在生物体内与DNA结合成染色质. 染色质分子一般情况下处于高度螺旋化状态, DNA在这种情况下是无法进行转录过程以及随后的翻译过程, 而组蛋白乙酰化后, 分子结构在空间上会改变很大, 主要体现在分子结构的疏松化, 有利于相关基因的转录顺利进行.

1.3.2 miRNA参与构成表观遗传调控网络: 细胞可以通过表观遗传机制调控miRNA的表达, 而反过来, miRNA也可以参与调控表观遗传, 即miRNA参与构成表观遗传调控网络. (1)miRNA影响DNA分子的甲基化. miRNA-29b可通过直接作用于DNMT3a和DNMT3b或间接作用于DNMT1, 抑制DNMTs表达, 引起细胞DNA的整体低甲基化, 低甲基化的DNA分子则按照表观遗传机制, 影响miRNA的基因表达, 另外miRNA表达水平变化不仅可间接影响细胞中DNA甲基化水平, 部分miRNA还直接参与维持细胞中DNA甲基化^[13]; (2)miRNA影响组蛋白乙酰化. miRNA影响组蛋白乙酰化的过程, 主要是通过组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)的参与来实现的. 例如, Tuddenham等^[17]在小鼠模型中发现, 其软骨组织中表达的miRNA-140, 可以对HDAC进行调节, 进而影响了多种癌基因或抑癌基因等肿瘤相关基因的表达过程.

1.3.3 表观遗传药物与外源性miRNA在肿瘤治疗领域的应用: 表观遗传药物的开发是根据表观遗传学机制为依据, 其药物机制是改变DNA分子的甲基化和/或组蛋白的乙酰化状态. (1)DNA甲基化转移酶抑制剂(DNA methyltransferase inhibitors, DNMTis). 近年发现, DNA分子低甲基化不仅存在于肿瘤组织的DNA分子中, 而且在肿瘤形成过程中, 癌基因、抑癌基及其他肿瘤相关基因也有不同程度的这种现象. DNMTis可以不同程度纠正这种异常, 目前在临床研究热点的DNMTis是Zebularine, 由于该药物在体内的稳定性较好, 而且, 与同类其他药物相比, 该药经人体吸收后, 其生物利用度较高; (2)组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACi)肿瘤的本质是在基因层面发生了改变而

出现的无限增殖, 如果组蛋白乙酰化状态的过程一旦出现异常, 那么这种情况与肿瘤的发生有很大的关联. HDACi对于肿瘤细胞中的这种异常乙酰化状态可以进行一定修复, 进而诱导肿瘤细胞的分裂在细胞周期某个阶段停滞, 甚至直接进入细胞凋亡程序, 使肿瘤细胞死亡或者逆转其恶性程度^[18]; (3)外源性miRNA. 在肿瘤发生过程中, 出现某些miRNA低表达或不表达和/或某些miRNA高度表达现象, 而研究已经证实这种现象可以诱发肿瘤形成, 因此外源性导入miRNA和/或采用某种手段下调或抑制相应miRNA表达, 成为治疗肿瘤的一个新思路^[19]. 外源性miRNA对于肿瘤的治疗就是利用以上原理, 由于各种原因所致的miRNA表达水平改变而最终促进或引起肿瘤形成以及miRNA在肿瘤发展和侵袭转移的作用, 通过外源性途径补充miRNA, 可以纠正miRNA低表达或不表达的状态, 恢复体内正常的miRNA水平, 抑制肿瘤细胞形成及增殖等过程.

2 miRNAs在肝癌发生发展中的临床意义

2.1 miRNA与肝癌的发生发展

2.1.1 促进肝癌的发生: 恶性肿瘤(包括肝细胞癌)的发病机制总的来说有两点: 癌基因的激活和/或抑癌基因的沉默或缺失. 而研究证实, 多种miRNA参与恶性肿瘤的形成, 在其发病机制中, 承担着类似于癌基因或抑癌基因的生物学效应. (1)癌基因miRNA表达上调: miRNA-221与miRNA-222是目前研究较多的两种癌基因miRNA, 近年, 二者在肝癌研究领域受到极大关注. 研究发现miR-221的高表达可刺激肿瘤细胞生长, 而miR-221的靶基因为DNA损伤诱导转录子4(DNA-damage-inducible transcript 4, DDIT4), DDIT4是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路的调节因子, 即miR-221作用于DDIT4, 而由于miR-221高度表达, 异常的DDIT4分子则干扰了正常的mTOR通路过程, 最终促进肝癌细胞生长^[20]. 在研究中, 有时是不能直接证实某种miRNA与肝癌发生的直接机制, 但是通过各种实验室检查和临床资料, 可以判断这种miRNA在HCC细胞中表达过度, 即与肝癌发生有正相关联系, 则证实这种miRNA就是癌基因miRNA. 在Murakami等^[21]利用芯片技术分析发现, 肝癌组织和肝脏周边的正常肝脏组织的miRNA谱存在很大差异, 其中在HCC患者中表达明显上调的有3种:

相关报道
肝癌发生的遗传学和表观遗传学机制研究结果提示, 肝癌发生是一个多基因、多途径的复杂多阶段过程, 由遗传学和表观遗传学改变引起的原癌基因的活化和抑癌基因的灭活, 是肝癌发生的核心生物学过程. 国内外已有研究发现miRNA与肝癌的发生发展相关.

创新盘点

近期研究发现,多种miRNA分子定位于癌基因染色体的变异区内,其在功能上承担着类似于癌基因或抑癌基因的功能,直接或间接影响癌变的进程。研究miRNA与肝癌形成、表观遗传生物特征关系为肝癌的早期诊断、疗效观察和预后判断奠定理论基础。该文通过综述miRNA表观遗传作用及其与肝癌的发生发展的概况及前沿,重点涉及miRNA与肝癌的发生发展机制以及表观遗传领域。

miRNA-18、pre-miR-18、miR-224。miRNA-224作为一种癌基因miRNA,其表达上调与肝癌的发生有重要关系。Ji等^[22]发现,从 α -甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)阳性肝癌样本中分离出来的上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM/CD326)阳性肝癌干细胞(hepatic cancer stem cell, HepCSC)内所有的4个miR-181家族成员表达都上调。目前有研究认为miR-9亦属于癌基因miRNA,其对肝癌发病的分子机制是通过对抗凋亡基因*Bcl-2*的影响进而导致肝癌发生。实验研究已经证实,miR-9对*Bcl-2*的影响机制主要是通过影响该基因的一个碱基,进而影响转录后的产物,最终导致肝癌发生。另外肝癌的发生过程中*c-myc*癌基因表达非常活跃,能够使肝癌细胞分裂活跃,导致其无限增殖的恶性状态,简单的说是一种能够促进细胞分裂的基因。当然也正是这种特性使得*c-myc*基因激活后,能够促进肝细胞无限增殖分化,最终导致肝癌的发生。基础研究已经证实, *c-myc*与miRNA在功能上有一定的协调作用,相关miRNA可以去除*c-myc*的凋亡途径,使得*c-myc*基因产物的过度表达,结果使得HCC的发生; (1)抑癌基因miRNA表达下调: 针对于*p53*基因与肝癌发生的研究是目前研究的一个热点, He等^[23]将野生型和突变型*p53*的小鼠胚胎成纤维细胞的miRNA表达谱进行对比,结果显示3种miRNA(miR-34a、-34b、-34c)的表达与*p53*表达正相关, 癌基因介导的内源性*p53*的活化, 诱导miR-34表达的动力学曲线早于*p21*野生型*p53*活化片段1/细胞周期蛋白依赖性激酶影响蛋白1(wild-type *p53* activation fragment 1/Cyclin-dependent kinase protein 1, WAF1/CIP1), 说明miR-34是*p53*的直接靶标。该项试验也直接证实了miRNA在肝癌的形成过程中的重要作用。对大量的病例以及病理标本进行分析的过程中, 发现了在肝癌的早期阶段miR-122等基因表达下调, 但是未能解释其在肝癌发生机制中的作用。日本的Ura等^[24]应用RT-PCR对12例乙型肝炎相关性HCC和14例丙型肝炎相关性HCC肝组织中的188个miRNAs研究后发现, 有31个miRNAs与HCC有关, 其中有17个在HCC中低表达, 其中主要的miRNA有miR-122、miR-223等, 主要是通过上调肿瘤相关途径如细胞周期、黏附、蛋白质的转录和翻译。miR-122是一种肝脏特异性的miRNA, 在HCC中表达通常是下调, miR-122可以抑制抗凋

亡基因*Bcl-w*的表达, 降低肝癌细胞存活率, 激发细胞凋亡^[24]。黄赞松等^[25]研究发现苦参素可以提高miR-122的表达, 作用于肝癌细胞后, 可以观察到肝癌细胞的miR-122高表达, 进而抑制肝癌细胞的增殖过程。Let-7家族是人类发现的第二种miRNA, Let-7家族并非仅仅包括Let-7, 还有miR-48、miR-84和miR-241。虽然Let-7家族众多, 但是目前对其抑癌基因作用研究得比较多的则是Let-7c, 公方晓等^[26]发现Let-7c通过抑制Cyclin D1及mRNA的表达, 使停留在G₁期的细胞比例增加, 从而抑制HCCLM3肝癌细胞的发生。而当Let-7c表达下调, 则肝癌的发生显著增高。

2.1.2 促进肝癌的发展: 针对于miRNA与肝癌的发展关系, 体现在3个过程: 促进细胞增殖、抑制细胞的凋亡、促进细胞的迁移或侵袭。(1) miRNA促进肝癌细胞的增殖: 早在2005年就已经有研究证实了miRNA与肝癌的增殖存在正相关, Cheng等^[27]分析Hela和A549两个肿瘤细胞株中miRNA表达谱, 结果发现与促进肝癌增殖相关的miRNA有19种。实验研究发现, miR-122、miR-195等miRNA可以结合到Cyclin/CDK复合物上, 以至于复合物的功能发生抑制, 失去或降低了原先对细胞周期的中止功能, 结果导致细胞增殖的失控; (2)miRNA抑制细胞的凋亡: 细胞凋亡的过程是细胞程序性死亡的过程, 是细胞死亡的生理形式, 旨在维持内环境稳定。2003年Xu等^[28]在研究中发现, miR-14的靶基因是*dicer*, 其编码的蛋白调控细胞凋亡和脂质代谢, miR-14功能缺失会导致大量细胞凋亡。研究^[29]表明, 抑制凋亡的miRNA常在肝癌中高表达, 如miR-21、miR-93、miR-106b和miR-221等, 这些miRNA高表达, 将促进肿瘤发生、发展并影响治疗与预后。另外, 相关文献[13]报道在肝癌细胞中miR-101、miR-122、miR-1、miR-29、miR-15b、let-7和miR-26表达下调, 结果导致生存蛋白水平的提高; (3)miRNA与肝癌的浸润转移: 迄今已有研究发现miRNA参与肝癌的转移, 有学者^[30]通过对241例肝癌患者组织miRNA表达谱的研究, 发现肝癌转移显著与20个miRNA相关。其中miR-219-1、miR-2117和miR-338表达上调, 而miR-34a、miR-30c1和miR-148a表达下调。Zhu等^[31]的研究明确了miR-21在肝癌转移和侵犯的作用并确定了其基本的作用机制。miR-21与

凋亡相关, 也能作用于 $PTEN$ 基因, 可介导癌细胞的侵袭, 影响下游基因的表达, 从而促进癌细胞的侵袭和转移. $miR-211$ 和 $miR-222$ 能作用于 $PTEN$ 抑癌基因, 最终调控肝癌细胞TRAIL耐药及转移. $ADAM10$ 和 $ADAM17$ (解聚素和MMP家族成员)能被 $miR-122$ 所调控而抑制癌细胞肝内转移途径. I型胶原 $\alpha 2$ 可被经典的let-7调控而抑制癌细胞的转移. 另外, 某些 $miRNA$ 可以影响信号转导途径的某些过程, 甚至直接作用于癌基因本身, 调控其表达程度, 进而抑制肝癌细胞的侵袭和转移, 如 $miR-1$ 、 $miR-34a$ 、 $miR-23b$ 、 $miR-199a-3p$ 及 $miR-101$ 等^[32-34].

2.2 miRNA与肝癌的早期诊断 肝癌起病隐匿, 早期症状不明显, 临床资料显示超过半数的HCC患者在首次诊疗时已经进入中晚期阶段. 目前临床上常用的肝癌诊断标志物包括AFP、血清谷氨酰转肽酶、胰岛素生长因子、转化生长因子等^[35], 近年来研究发现高尔基体蛋白73(GP73)诊断肝癌有较高的特异性(97.4%)和敏感性(74.6%)^[36], 但是这些诊断标志物的敏感度和特异度并不十分理想, 如AFP在妊娠妇女、急慢性肝炎、生殖腺肿瘤和胃肠道肿瘤等人群中也可能升高. 对于肝癌来说, 非特异性表达异常的 $miRNA$ 具有辅助提示是否为恶性肿瘤的作用, 例如, Jopling等^[37]发现241例肝肿瘤中 $miR-224$ 、 $miR-122a$ 、 $miR-422b$ 在肝的良恶性肿瘤中均下调, 而 $miR-200c$ 、 $miR-203$ 仅在良性肿瘤中下调, $miR-21$ 、 $miR-222$ 、 $miR-10b$ 在肝癌中上调. 肝特异性表达异常的 $miRNA$, 则对发生来源不清的肿瘤或转移癌的来源等具有提示意义^[38]. Zhou等^[39]在肝癌患者血浆中选择了由7个 $miRNAs$ 组成的早期肝癌诊断分子标志物, 被认为是迄今为止最佳的肝癌诊断新方法, 对于2 cm以下的肝癌诊断正确率高达90%, 对AFP阴性的肝癌患者诊断正确率达到88%, 优于传统的AFP, 利于连续动态检测和人群的大规模筛查. Li等^[40]通过比较80例正常人和85例肝癌患者, 发现有6个 $miRNA$ 表达上出现明显异常, 其中采用 $miR-25$ 、 $miR-375$ 和let-7f这3个 $miRNA$ 作为标志物, 可以准确地区分正常人和肝癌患者, 而单用 $miR-375$ 预测肝癌的特异性和敏感性分别为96%、100%.

2.3 miRNA与肝癌免疫

2.3.1 miRNA在机体对肿瘤的固有免疫中的调节作用: 现代免疫学认为, 固有免疫是机体在长

期的种系发育与进化过程中逐渐形成的一种天然免疫防御功能, 是宿主抵御病原微生物入侵的第一道防线^[41]. 研究表明, 当人体接受了某种刺激后, $miRNA$ 的表达水平发生了改变, 进而影响固有免疫过程, 因此有人推测 $miRNA$ 可能是固有免疫应答反应的早期反应的组成部分. 固有免疫主要是由固有免疫屏障、固有免疫细胞以及固有免疫分子组成. 固有免疫细胞是由自然杀伤细胞(NK细胞)、巨噬细胞以及粒细胞等组成.

NK细胞是人体固有免疫反应中一种具有强大杀伤作用的非特异性免疫细胞, 能够识别人体内“非己”的肿瘤细胞, 并将其杀灭. 在对肿瘤的固有免疫反应中, $miRNA$ 就是通过调节NK细胞进而影响固有免疫反应. Bezman等^[42]在实验室中通过使 $miRNA$ 合成的关键酶缺失的方法, 使NK细胞的活化、生物学功能都发生了显著降低, 进而证实了 $miRNA$ 在调节NK细胞的生物学功能方面的作用.

巨噬细胞是一种抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC), 在固有免疫反应中, 不仅可以发挥其作为APC的功能, 更重要的是巨噬细胞也具有强大的杀伤功能, 过去对于 $miRNA$ 对巨噬细胞的调节作用以及调节机制还没有能够给予证据支持. 根据研究^[43], 通过Western blot分析指出 $miRNA$ 在巨噬细胞发挥正常生物学功能方面起着关键作用, 同时采用阵列技术指出了包括Let-7a、 $miR-16$ 、 $miR-23a$ 、 $miR-30b$ 、 $miR-103$ 、 $miR-146b$ 、 $miR-212$ 以及 $miR-378$ 等 $miRNA$ 在巨噬细胞的肿瘤免疫方面起着重要作用.

2.3.2 miRNA在对HCC的适应性免疫的调节作用: 适应性免疫应答与固有免疫应答在很多方面具有差异, 适应性免疫应答反应是后天建立的, 而且这种免疫具有针对性, 一般是在受到“异物”的刺激后才产生的一种免疫应答.

B细胞介导的体液免疫, 一般过程是由外源性或内源性抗原刺激了B细胞, 进而效应B细胞分泌抗体, 抗体识别并作用于肿瘤细胞, 最终实现其对肿瘤的免疫功能. 因此 $miRNA$ 对体液免疫的影响, 需要通过B细胞完成. 研究^[44]发现, $miR-150$ 在淋巴结和脾脏形成成熟T和B细胞过程中的表达水平较高, 尤其在造血干细胞中 $miR-150$ 是高表达的, 反之, $miR-150$ 的表达水平较低, B细胞的成熟过程受到影响, 那么体

应用要点
 $miRNA$ 及其表观遗传作用对于肝癌的发生、发展机制、早期诊断、治疗以及预后的判断上关系密切, 在肝癌靶向治疗药物的开发方面提供了重要的理论支持.

名词解释

MicroRNA: 是一种广泛存在于真核生物、大小约为20-25个核苷酸的内源性单链小分子RNA;
表观遗传: 是指不依赖DNA序列变化的基因活性可遗传性改变。

液免疫反应的整个过程也必然受到很大程度的影响。

T细胞介导的细胞免疫, 在肿瘤免疫反应中具有重要意义。细胞免疫中一方面T细胞可以直接攻击肝癌等肿瘤细胞, 另一方面T细胞还可以分泌诸多淋巴因子, 辅助免疫反应。通过对miRNA调控T细胞受体信号的研究, 证实了miR-181a对于影响T细胞受体信号强度非常重要, 另外miR-17-92是CD4T细胞对抗原反应中的一个重要成员, 结合很多专家的研究证实了miRNA在介导T细胞功能方面的重要作用^[45]。

2.4 miRNA与肝癌治疗

2.4.1 miRNA抗肝癌作用: 随着miRNA与免疫以及表观遗传等方面的研究逐渐展开, 医学界也开始着重研究miRNA抗肿瘤(包括肝细胞癌)的作用。miRNA对于肝癌发生的关系目前认为主要是由于miRNA影响了基因在转录后的一系列过程。鉴于这个理论, 有人提出了通过miRNA进行基因的靶向治疗, 进而能够抑制肝癌增殖。有研究显示, 转染了miR-195的肝癌细胞集落形成减少, 体外单克隆生长能力减弱, 体内成瘤能力也减弱。

2.4.2 miRNA增加肝癌细胞对药物敏感性: 研究^[46]发现在大多数肝癌患者的癌细胞中miR-519d处于高表达状态, 与miR-519d低水平的细胞对比可以发现, miR-519d具有促进细胞分裂的作用, 由于抗癌药物大多数作用于细胞的分裂期, 因此miR-519d相当于可以增强肝癌细胞对药物敏感性。HCC的癌细胞中常常可以观测到miR-122表达水平较低, 而miR-122是可以作用于细胞周期蛋白G1(Cyclin G1)。当miR-122作用于Cyclin G1后, 细胞周期则刚刚停滞于细胞分裂期的G₁期, 只有少数癌细胞可以达到细胞分裂期G₂期以及M期, 同时抑癌基因p53表达上调, 这些因素都导致了癌细胞处于对药物敏感性最强的时期。阿霉素(adriamycin, ADM)是常见的抗肿瘤药物, 其分子与肝癌细胞的DNA可以发生嵌合, 导致有丝分裂的间期癌细胞DNA合成受阻。miR-199a通过某种途径可以增加机体对阿霉素的敏感性, 而这种途径目前已经得到证实: mTOR沉默可以增加肝癌细胞对ADM敏感性, 转染miR-199a-3p可以抑制mTOR表达, 同样可以增加肝癌细胞对ADM的敏感性^[47]。

2.4.3 miRNA促进肝癌细胞凋亡: 抗凋亡基因*Bcl-w*的作用是转录并翻译出抗凋亡相关的蛋

白, 增强细胞活性, miR-122则可以作用于*Bcl-w*基因, 并同时激活Caspase3, 依据这个理论, 认为如果采用某种手段特异性的抑制了miR-122的表达, 则可以促进肝癌细胞发生凋亡。另有研究发现增加miR-122的表达可以促进肝癌细胞凋亡^[4,48]。Chen等^[49]研究发现紫杉醇通过上调肝癌HepG2细胞miR-512-3P表达和下调抗凋亡蛋白c-FLIP的表达而促进细胞凋亡。

2.4.4 miRNA与三氧化二砷有协同作用: Meng等^[50]发现三氧化二砷作用肝癌细胞后microRNA表达谱发生改变, 其中miR-29可以明显抑制肿瘤细胞的生长, 与三氧化二砷有协同作用, miR-29通过一系列机制最终使p53上调, 而p53是重要的肿瘤抑制因子。通过转染miR-29可以减少三氧化二砷用量, 降低不良反应的同时也能提高药物的疗效。

上述研究证实了miRNA具有广泛的抗肝肿瘤作用, 可为肝癌的治疗提供新的思路和方法。

2.5 miRNA与肝癌的预后与复发 肝癌的预后与复发与miRNA相关。有研究^[51]发现肝癌根治术后复发风险相关的microRNA有7个, 其中miR-34c和miR-361的表达提示肝癌根治术后复发概率较大, 而microRNA-15b是肝癌根治术后预后良好的指标。Sato等^[52]通过研究表明miR-100、miR-99a、miR-99b、miR-125b等指标常常提示肝癌的复发的可能性较低。在肝癌组织中检测到的miRNAs在预测早期复发要优于非肝癌组织, 非肝癌组织中检测到的miRNAs在预测晚期复发更佳。

3 结论

肝癌在目前而言仍是世界性的重大难题, 严重危害人类的健康, 迄今治疗效果不理想^[53]。近年来对miRNA的研究发现其在机体内参与信号传递、生理病理以及各种生命活动中具有重要作用, 已经成为医学、生命科学等领域研究的热点。目前, 在实验室以及临床领域, 关于miRNA对肝癌的早期诊断以及靶向药物的开发与应用已取得较大进展。虽然目前的研究已经证实了miRNA对于肝癌的发生、发展、早期诊断、治疗以及预后的判断上关系密切, 但是这些miRNA在肝癌的整个发病过程中的具体作用依然还没有彻底了解。另外, miRNA的抗肝癌作用在理论上已经得到证实, 但是迄今在应用于肝细胞癌治疗上仍然存在很多需要解决的问题。

几乎所有的miRNA的靶分子或者靶基因都不是单纯的一个靶点, 而如果用于整体试验单纯某个miRNA应用于人体后, 在整体条件下, miRNA必然会作用于非特异性靶点, 其结果就是出现很多在单一模型下尚未出现的不良反应. 进一步对miRNA参与的肝癌发生发展机制进行研究, 进而阐明其作用机制, 为诊断、预防、治疗提供更多的新的思路, 使肝癌的治疗取得进一步的改进.

4 参考文献

- 1 Bosch FX, Ribes J, Cléries R, Díaz M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2005; 9: 191-211, v [PMID: 15831268 DOI: 10.1016/j.cld.2004.12.009]
- 2 Chen WQ, Zheng RS, Zhang SW. Liver cancer incidence and mortality in China, 2009. *Chin J Cancer* 2013; 32: 162-169 [PMID: 23489585 DOI: 10.5732/cjc.013.10027]
- 3 叶胜龙. 2013年肝癌领域新进展. *中华肝脏病杂志* 2014; 22: 2-4
- 4 黄赞松, 仇仪英. 中医药治疗原发性肝癌的研究现状. *时珍国医国药* 2012; 23: 2851-2853
- 5 覃月秋, 黄赞松. 幽门螺杆菌感染与原发性肝癌相关性研究. *中国医药科学* 2011; 1: 47-49
- 6 黄赞松, 仇仪英, 周喜汉. 原发性肝癌现代医学治疗的研究进展. *医学综述* 2012; 18: 4169-4172
- 7 邓志华, 黄赞松. microRNA与消化系统肿瘤. *生物医学工程与临床* 2011; 15: 493-497
- 8 Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res* 2006; 66: 7390-7394 [PMID: 16885332 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0800]
- 9 Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007; 302: 1-12 [PMID: 16989803 DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.08.028]
- 10 何雷, 苏松, 夏先明. MicroRNA与肝癌发生发展关系研究进展. *西南军医* 2014; 16: 56-59
- 11 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-854 [PMID: 8252621 DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y]
- 12 Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901-906 [PMID: 10706289 DOI: 10.1038/35002607]
- 13 高社干, 冯笑山, 刘刚主编. 整合miRNA肿瘤学基础. 北京: 科学出版社, 2013: 2-3, 199-200
- 14 Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429: 457-463 [PMID: 15164071 DOI: 10.1038/nature02625]
- 15 封冰, 陈龙邦. 微小RNA与表观遗传调控: 肿瘤治疗新策略. *医学研究生学报* 2011; 24: 92-95
- 16 郭俊明, 肖丙秀, 钟久昌. 肿瘤相关微小RNA基因表达的表观遗传调控机制. *中国细胞生物学学报* 2010; 32: 321-325
- 17 Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, Waters J, Hajihosseini MK, Clark I, Dalmay T. The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS Lett* 2006; 580: 4214-4217 [PMID: 16828749 DOI: 10.1016/j.febslet.2006.06.080]
- 18 崔芳芳, 邹检平. 肿瘤治疗的新型药物研究. *河南大学学报(医学版)* 2011; 30: 200-205
- 19 王丹妮, 张莉萍. 微小RNA在肝细胞肝癌发生发展中的作用及其在治疗中应用的研究进展. *中国生物制品学杂志* 2011; 24: 1239-1243
- 20 马锦, 雷小勇. 微小RNA与肝癌发生发展的研究进展. *国际病理科学与临床杂志* 2013; 33: 339-404
- 21 Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2006; 25: 2537-2545 [PMID: 16331254 DOI: 10.1038/sj.onc.1209283]
- 22 Ji J, Yamashita T, Wang XW. Wnt/beta-catenin signaling activates microRNA-181 expression in hepatocellular carcinoma. *Cell Biosci* 2011; 1: 4 [PMID: 21711587 DOI: 10.1186/2045-3701-1-4]
- 23 He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007; 447: 1130-1134 [PMID: 17554337 DOI: 10.1038/nature05939]
- 24 Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49: 1098-1112 [PMID: 19173277 DOI: 10.1002/hep.22749]
- 25 黄赞松, 向发良, 周喜汉, 黄衍强, 邓志华, 仇仪英. 苦参素对肝癌细胞HepG2细胞增殖和MicroRNA-122、MicroRNA-21表达的影响. *中国老年学杂志* 2014; 11: 3079-3081
- 26 公方晓, 夏景林, 杨毕伟, 徐晓晶, 吴伟忠. let-7c对HCCLM3细胞增殖的影响. *中华肝脏病杂志* 2011; 19: 853-856
- 27 Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 1290-1297 [PMID: 15741182 DOI: 10.1093/nar/gki200]
- 28 Xu P, Vernoooy SY, Guo M, Hay BA. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol* 2003; 13: 790-795 [PMID: 12725740 DOI: 10.1016/S0960-9822(03)00250-1]
- 29 何明明. 消化系常见肿瘤miRNA与细胞凋亡调控. *中国医药指南* 2007; 21: 214-216
- 30 Budhu A, Jia HL, Forgues M, Liu CG, Goldstein D, Lam A, Zanetti KA, Ye QH, Qin LX, Croce CM, Tang ZY, Wang XW. Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47: 897-907 [PMID: 18176954 DOI: 10.1002/hep.22160]
- 31 Zhu Q, Wang Z, Hu Y, Li J, Li X, Zhou L, Huang Y. miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2012; 27: 1660-1668 [PMID: 22322403 DOI: 10.3892/or.2012.1682]
- 32 Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Nanganke A, Taccioli C, Pichiorri F, Alder H, Secchiero P, Gasparini P, Gonelli A, Costinean S,

同行评价

该文通过论述miRNA表观遗传作用在肝癌发生、发展与早期诊断中生物学作用, 对于全面深入了解miRNA在肝癌早期诊断以及靶向治疗肝癌药物研发中具有重要意义.

- Acunzo M, Condorelli G, Croce CM. miR-221& amp; 222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 down-regulation. *Cancer Cell* 2009; 16: 498-509 [PMID: 19962668 DOI: 10.1016/j.ccr.2009.10.014]
- 33 Tsai WC, Hsu PW, Lai TC, Chau GY, Lin CW, Chen CM, Lin CD, Liao YL, Wang JL, Chau YP, Hsu MT, Hsiao M, Huang HD, Tsou AP. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49: 1571-1582 [PMID: 19296470 DOI: 10.1002/hep.22806]
- 34 Ji J, Zhao L, Budhu A, Forgues M, Jia HL, Qin LX, Ye QH, Yu J, Shi X, Tang ZY, Wang XW. Let-7g targets collagen type I alpha2 and inhibits cell migration in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2010; 52: 690-697 [PMID: 20338660 DOI: 10.1016/j.jhep.2009.12.025]
- 35 闰玮, 田亚平. 原发性肝癌分子诊断标志物的研究进展. 军医进修学校学报 2010; 31: 292-293
- 36 毛一雷, 徐海峰. 原发性肝细胞癌的早期诊断. 中华内科杂志 2014; 53: 508-510
- 37 Jopling CL, Norman KL, Sarnow P. Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006; 71: 369-376 [PMID: 17381319 DOI: 10.1101/sqb.2006.71.022]
- 38 刘明洋, 关键. microRNA对肝癌诊断和治疗的潜在意义. 癌症进展 2011; 6: 692-695
- 39 Zhou J, Yu L, Gao X, Hu J, Wang J, Dai Z, Wang JF, Zhang Z, Lu S, Huang X, Wang Z, Qiu S, Wang X, Yang G, Sun H, Tang Z, Wu Y, Zhu H, Fan J. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2011; 29: 4781-4788 [PMID: 22105822 DOI: 10.1200/JCO.2011.38.2697]
- 40 Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, Chen X, Liu FY, Zhang JF, Shen HB, Zhang CY, Zen K. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma. *Cancer Res* 2010; 70: 9798-9807 [PMID: 21098710 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-100]
- 41 侯召华, 张建, 田志刚. MicroRNA调控固有免疫应答的分子机制. 生物化学与生物物理进展 2008; 35: 1131-1136
- 42 Bezman NA, Cedars E, Steiner DF, Brelloch R, Hesslein DG, Lanier LL. Distinct requirements of microRNAs in NK cell activation, survival, and function. *J Immunol* 2010; 185: 3835-3846 [PMID: 20805417 DOI: 10.4049/jimmunol.1000980]
- 43 Luers AJ, Loudig OD, Berman JW. MicroRNAs are expressed and processed by human primary macrophages. *Cell Immunol* 2010; 263: 1-8 [PMID: 20403586 DOI: 10.1016/j.cellimm.2010.03.011]
- 44 Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 7080-7085 [PMID: 17438277 DOI: 10.1073/pnas.0702409104]
- 45 刘磊, 刘臣海, 黄强. MicroRNA与肿瘤免疫关系的研究进展. 中国肿瘤临床 2012; 39: 52-55
- 46 漆仲春, 李华, 李东, 张涛. MicroRNA在原发性肝癌中的研究进展. 肿瘤预防与治疗 2012; 25: 389-393
- 47 李熙烨, 刘俊, 李小溪, 翁思思. miR-199a在肝癌中相关研究进展. 中华临床医师杂志(电子版) 2011; 24: 7354-7356
- 48 Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM, Dejean A. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 264-269 [PMID: 20018759 DOI: 10.1073/pnas.0907904107]
- 49 Chen F, Zhu HH, Zhou LF, Wu SS, Wang J, Chen Z. Inhibition of c-FLIP expression by miR-512-3p contributes to taxol-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep* 2010; 23: 1457-1462 [PMID: 20372864 DOI: 10.3892/or_00000784]
- 50 Meng XZ, Zheng TS, Chen X, Wang JB, Zhang WH, Pan SH, Jiang HC, Liu LX. microRNA expression alteration after arsenic trioxide treatment in HepG-2 cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26: 186-193 [PMID: 21175813 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06317.x]
- 51 胡炎军, 朱求实, 李盛. 一项肝细胞癌循证治疗概况的Meta分析. 中华普通外科学文献(电子版) 2012; 6: 439-446
- 52 Sato F, Hatano E, Kitamura K, Myomoto A, Fujiwara T, Takizawa S, Tsuchiya S, Tsujimoto G, Uemoto S, Shimizu K. MicroRNA profile predicts recurrence after resection in patients with hepatocellular carcinoma within the Milan Criteria. *PLoS One* 2011; 6: e16435 [PMID: 21298008 DOI: 10.1371/journal.pone.0016435]
- 53 李焱, 程朋. 中晚期肝癌临床治疗进展. 临床肝胆病杂志 2014; 30: 233-236

编辑 郭鹏 电编 都珍珍

