

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00896

MicroRNAs 与慢性肝脏病变相关性的研究进展

许蜜蝶, 李维卿, 余宏宇*

第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003

[摘要] 近期的研究表明,微小 RNA(microRNA, miRNA)作为重要的转录后基因调控元件,在许多脏器的慢性损伤的发生和发展中起着重要作用。本文就近年来 miRNA 与慢性肝脏损伤的相关研究作一综述。

[关键词] miRNA;慢性脏器损伤;慢性病毒性肝炎;原发性胆汁性肝硬化;肝纤维化

[中图分类号] R 363.14 [文献标志码] A [文章编号] 0258-879X(2010)08-0896-04

MicroRNAs and chronic liver disease: recent progress

XU Mi-die, LI Wei-qing, YU Hong-yu*

Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] Recent studies have indicated that miRNA is an important element that regulates gene expression at the post transcriptional level. MiRNAs play important roles in development and progression of chronic disorders of many organs. This review summarizes the recent researches on the association of miRNA with chronic liver diseases.

[Key words] miRNA; chronic liver disease; chronic viral hepatitis; primary biliary cirrhosis; hepatic fibrosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(8):896-899]

肝脏慢性损伤是消化系统常见病,其发生、发展是多因素、多步骤的复杂过程。寻找肝脏慢性损伤发生、发展的相关基因,了解肝脏慢性损伤的分子遗传学机制从而为肝脏慢性损伤的诊断、治疗提供理论基础是目前的研究热点。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类高度保守的在转录后水平调节基因表达的非编码 RNA^[1]。大量研究表明,miRNA 在部分脏器慢性损伤,特别是肝脏的慢性损伤过程中存在差异性表达,可能与脏器慢性损伤的发生、发展存在相关性。本文就近年来 miRNA 与慢性肝脏损伤的相关研究作一综述。

1 miRNA 与脏器慢性病变

miRNA 是控制转录后基因表达的一种非编码小 RNA^[2-3]。1 个 miRNA 被认为可以调节多个蛋白编码 mRNA,并且在一系列错综复杂的细胞进程,如有丝分裂,免疫功能,细胞增殖、凋亡,组织发育和分化及新陈代谢中具有重要作用^[4-5]。截至 2009 年 12 月,已经在 115 个物种中发现 miRNA 共约 10 481 个,其中人类约 721 个(MiRBase <http://www.mirbase.org/>),这些 miRNA 具有调控人类至少 30% 基因的潜能^[6]。

有些 miRNA 在生物体一些慢性病变过程表达增高或降低,而另一些具有阶段表达特异性。如 miR-122 参与调节慢性肝炎的 HBV 和 HCV 病毒的复制和表达,miR-199a 高表达抑制 HCV 病毒 RNA 复制^[7-8];数种 miRNA 在原发性胆汁性肝硬化病变过程中差异性表达^[9];miR-16 等参与调节

HSC 激活这一肝纤维化的关键环节^[10-11]。近年来有学者的研究表明,有些 miRNA 在慢性心血管疾病等脏器慢性病变的过程中差异性表达^[12-13]。这些研究提示一些 miRNA 可能与这些慢性疾病的发生、发展、预后直接相关,并有望用于疾病的诊断与治疗。

2 miRNA 与肝脏慢性病变

肝脏慢性病变是一个多阶段的复杂过程。病毒感染等各种原因所致慢性肝损伤及伴随炎症反应导致细胞死亡、再生和修复,最终肝脏过早衰老。由于肝脏再生能力的衰竭,在随后的炎症反应中修复过程紊乱,导致了结节性再生的发展,间质扩充,纤维化,最终肝硬化^[14]。目前业已发现一些 miRNAs 在肝脏慢性病变中表达具有差异性(表 1)。

2.1 miRNA 与病毒性肝炎 肝细胞感染 HBV 病毒与乙型肝炎的关系已经很明显。Jin 等^[15]对 miRNA 和 HBV 病毒的相关研究发现,HBV 可能只编码 1 个 miRNA 前体。在探寻此病毒 miRNA(vmiRNA)的靶基因时,他们发现此 miRNA 可编码病毒 mRNA。由此,HBV 被确认通过 miRNA 调节自身基因表达。用 pLMP-miR-122 与 HBV1.3 共转染 HepG2 细胞,结果显示细胞的 HBsAg 和 HBeAg 的表达量均降低^[7]。血清 HBsAg 及 HBeAg 水平与 HBV DNA 效价正相关,可反映病毒在宿主体内的活动程度。在人类肝脏上成功地构建出特异性 miR-122 表达载体对于调节 HBV 基因的复制和表达乃至治疗乙肝极具意义。

[收稿日期] 2010-01-12 [接受日期] 2010-04-25

[作者简介] 许蜜蝶,硕士生. E-mail: xumd27202003@sina.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81886125, E-mail: yuhongyu795@hotmail.com

表 1 miRNA 在各种慢性肝脏病变中的表达
Tab 1 miRNA expression in some chronic liver diseases

Hepatic disease	miRNA	Expression	Target	Possible mechanism	Relate disease	Literature
Hepatitis B	miR-21	-	-	Competitive inhibit endogenous viral miRNA	Myocardial fibrosis, leiomyoma	29
	miR-122	↑	-	Down-regulate the expression of HBs and HBe antigen	Hepatoma, drug-induced liver injury	7
Hepatitis C	miR-122	Ectopic expression	5'-UTR	Promote viral RNA replication	Hepatoma, drug-induced liver injury	16
	miR-199a	↑	HCV-1b, -2a	Inhibit viral RNA replication	Ovarian cancer	8
PBC	miR-122a	↓	-	-	Viral hepatitis	17
	miR-26a	↓	-	-	Rhabdomyosarcoma, neurogliocytoma	
	miR-328	↑	-	-	-	
	miR-299-5p	↑	-	-	Breast carcinoma	
Hepatic fibrosis	miR-150	↑	C-myb	Inhibit HSCs proliferation, reduce the level of SMA and collagen I	Ovarian cancer	21
	miR-194	↑	rac 1		Ovarian cancer	10
	miR-16	↑	cyclin D1	Inhibit HSCs proliferation, promote HSCs apoptosis	CLL, pulmonary carcinoma	
ALD	miR-212	↑	ZO-1 protein	Regulate intestinal permeability	Gastric carcinoma	25
NASH	miR-122	↓	-	Change lipid metabolism	Hepatoma, drug-induced liver injury	24

ALD: Alcoholic liver disease; NASH: Nonalcoholic steatohepatitis; HSCs: Hepatic stellate cells; PBC: Primary biliary cirrhosis; CLL: Chronic lymphocytic leukemia; Expression: With regard to normal cell

miRNA-122 参与调节肝炎 HCV 病毒增殖,其在肝细胞中的沉默可能导致 HCV 病毒 RNA 复制明显减少甚至缺失^[8]。Jopling 等^[16]在 HCV 基因的末端 50 个碱基上发现了可能的 miR-122 结合位点,这证实 miR-122 直接参与 HCV 复制过程,推断 miR-122 可促进病毒 RNA 的复制。Murakami 等^[8]发现 miR-199a 有 1 段基因序列与 HCV 病毒基因上 1 段保守序列相似,其高表达可通过作用于 HCV 病毒的 2 个关键复制子 HCV-1b、-2a 抑制 HCV 病毒的复制。因此 miRNA 可能成为抗 HCV 病毒的新靶点。

2.2 miRNA 与肝纤维化 肝纤维化是多种慢性肝损伤的基本病理过程,是慢性肝病共同病理学基础和发展至肝硬化阶段的必经阶段,肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)激活与增殖是肝纤维化发生、发展的中心环节^[17]。Guo 等^[11]发现 HSC 激活状态与静止状态相比 21 个 miRNA 发生差异性表达,13 个信号通路上调,22 个信号通路下调。为研究 miRNA 表达与通路间的联系对 HSC 基因芯片进行了进一步分析,发现 HSC 和纤维化的肝脏中线粒体通路中抑凋亡蛋白 Bcl-2 和凋亡因子 caspase-9 高度下调,已有研究表明两者分别是 miR-15b/16 和 miR-138 的作用靶点(<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html>)。随后的研究证实,细胞凋亡线粒体途径通过激活 HSC,在肝细胞纤维形成中发挥重要作用,推断作用于 Bcl-2 和 caspase-9 介导的细胞凋亡线粒体途径可能是 miRNA 调节 HSC 激活和肝细胞纤维形成的重要机制。

C-myb 原癌蛋白是一种细胞转录活性相关 DNA 结合蛋白,在纤维化肝组织中,c-myb 表达增多,且主要在 HSC 中表达,表达程度与肝纤维化程度正相关,提示 c-myb 表达与 HSC 激活增殖可能有关^[18]。Rac1 是 Rho GTP 酶的成员之一,通常作为信号转换器或分子开关,以 GTP 结合(激活状态)和 GDP 结合(失活状态)两种构象形式存在并在细胞内不同部位相互转换,具有调节细胞骨架重组,影响细胞形极化,促进细胞运动与迁移,抑制细胞凋亡的作用^[19-20]。Venugopal 等^[21]比较假手术后小鼠和肝硬化小鼠发现,后者体内 miRNA-150 和 miRNA-194 表达水平明显降低,在进一步研究中他们证实这两种 miRNA 的扩增分别导致了 c-myb 和 rac1 的表达减少。结果提示这两种 miRNA 通过抑制 c-myb 和 rac1 的表达抑制 HSC 激活和细胞外基质的产生。

Cyclin D1(CD1)是一种研究较多的细胞周期蛋白。Guo 等^[10]对 HSC 基因芯片进行杂交分析,结果显示 miR-16 的表达与 CD1 的表达负相关。HSC 激活时,miR-16 水平上调,且 pLV-miR-16 处理过的活化 HSC 中出现了细胞周期的终止和凋亡的典型特征。这一发现强调了 miRNA 分子在细胞周期进行中的重要性,证明 miR-16 通过抑制 CD1 表达进而终止细胞分裂。向 HSC 定向转导 miR-16 有望成为肝纤维变性的新型治疗方式。Jiang 等^[22]发现,肝硬化患者中 HBV 和 HCV 携带者的 miRNA 表达存在差异,HBV 携带者 11 种 miRNA (miR-145,-9-2,-138-1, 2,-320,-33,-10a, b,-21,-146 和-220)的表达明显高于 HCV 携带者。这说明慢性肝损伤

的发展过程中 miRNA 的表达高低在病毒种属上有选择性。

这些研究成果提示很多 miRNA 参与了 HSC 的活化网络,且有些能够有效拮抗 HSC 的激活和细胞外基质的产生。进一步的研究对于深入了解肝纤维化机制及利用 c-myc 等原癌基因和细胞凋亡途径抑制肝纤维化的发生发展很有帮助。

2.3 miRNA 与其他肝脏慢性疾病 用 miRNA 芯片分析原发性胆汁性肝硬化内 377 个 miRNA 表达,发现 35 种 miRNA 的表达具有差异性(11 个上调,miR-145 幅度最大;24 个下调)^[9]。实时定量 PCR 进一步验证发现 4 期 PBC 患者细胞相对于对照组 miR-122a 和 miR-26a 下调,miR-328 和 miR-299-5p 高表达。miR-122a 已被证实与病毒性肝炎和非酒精性脂肪肝(NASH)病变过程中 FAS、HMGCR、SREBP-1c 和 SREBP-2 等蛋白水平相关^[23-24],目前针对酒精性肝病中特异性表达 miRNAs 的研究甚少,仅有研究发现 miR-212 水平上升^[25]。

通过人工沉默非酒精性脂肪肝患者肝细胞中的 miR-122^[24],可以监测到脂肪生成关键基因的蛋白表达,且 FAS、HMGCR、SREBP-1c 和 SREBP-2 蛋白水平在 miR-122 沉默之后几乎同时上升并且 48 h 内达到顶峰。相对于 SREBP1c 和 SREBP2 的蛋白前体水平在 miR-122 沉默之后并无明显改变,成熟蛋白水平在转染后 48 h 内则明显上升,提示 miR-122 可能在 SREBP 成熟的转录后调节上起一定作用。并且,miR-122 沉默之后其靶基因的蛋白水平进行性上升原因可能为 miR-122 对蛋白翻译的抑制作用被去阻遏。miR-122 对靶基因调节机制的进一步研究有助于验证上述推论。

3 miRNA 调控慢性肝病的机制

miRNA 可通过与靶序列不完全互补结合阻抑翻译而不影响 mRNA 的稳定性,或与靶基因 3' 非编码区完全互补结合最后导致 mRNA 的降解,抑制靶基因表达从而发挥调控作用^[26]。Krutzfeldt 等^[27]发现通过向小鼠静脉注射一种新型反义寡核苷酸“antagomirs”,可持久性抑制 miR-122、miR-16 等内源性 miRNA 在体内的表达,且 miR-122 在上调基因的 3' 端非编码区富集,在下调基因的结合位点则出现衰减。对下调基因的功能分析发现其与胆固醇合成基因相关,且血浆中胆固醇含量也下降超过 40%,而应用表达 miR-122 的腺病毒载体(Ad-122)感染小鼠,可显著上调上述相关基因表达。故此推测 miR-122 为体内胆固醇及脂类代谢的关键调节因子。对感染了慢性丙型肝炎的猩猩给予锁核酸修饰的寡核苷酸(SPC3649)干预,其与 miR-122 互补结合可在无病毒抵制和不良反应的同时长效抑制猩猩的 HCV 病毒血症,对其肝脏活组织进行转录子和组织学分析提示细胞内 miR-122 靶 mRNA 的转录受抑,干扰素调节基因下调,HCV 介导的肝脏病变改善^[28]。大多数多细胞生物 miRNA 都是通过靶 mRNA 的 3'-UTR 互补结合从而负性调控蛋白质合成,然而,miR-122 亦可通过直接与病毒 RNA 的 5'-UTR 中的一段高度保守序列互补配对而上调病毒 RNA 水平,且并不影

响病毒翻译及 RNA 稳定性^[29]。miR-122 通过选择结合位点调节 HCV 病毒复制这一非常规模式为 miRNA 研究提供了新视角。有关 miRNA 调控慢性肝病的机制研究的继续深入开展有望为慢性肝病的治疗提供新思路。

4 结 语

miRNA 虽是转录后调控领域的新成员,却具有强大的基因调控能力。目前,miRNA 在肝脏慢性损伤中的生理功能、作用机制、表达特点、临床价值等诸多方面仍有待于进一步研究。肝脏慢性病变的发生和发展往往与多种 miRNA 相关,这些 miRNA 中有的表达上调而有的下调,它们受什么因素的调节以及各种 miRNA 间的相互作用尚不清楚。有的 miRNA 表达具有组织和时间特异性,可以通过调控多个靶基因的表达,调节靶蛋白及相对应的通路调节肝脏慢性病变发展过程,如何利用这些途径对肝脏慢性病变进行靶向治疗也具有重要实际意义。

[参 考 文 献]

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116: 281-297.
- [2] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 431: 350-355.
- [3] Nilsen T W. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells[J]. *Trends Genet*, 2007, 23: 243-249.
- [4] Alvarez-Garcia I, Miska E A. MicroRNA functions in animal development and human disease[J]. *Development (Cambridge, England)*, 2005, 132: 4653-4662.
- [5] Faber J, Gregory R I, Armstrong S A. Linking miRNA regulation to BCR-ABL expression; the next dimension[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13: 467-469.
- [6] Lewis B P, Shih I H, Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Burge C B. Prediction of mammalian microRNA targets[J]. *Cell*, 2003, 115: 787-798.
- [7] 黄增红, 刘长梅. 人肝脏特异性 miR-122 表达载体的构建及鉴定[J]. *生物工程学报*, 2009, 25: 587-590.
- [8] Murakami Y, Aly H H, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K. Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a[J]. *J Hepatol*, 2009, 50: 453-460.
- [9] Padgett K A, Lan R Y, Leung P C, Lleo A, Dawson K, Pfeiff J, et al. Primary biliary cirrhosis is associated with altered hepatic microRNA expression[J]. *J Autoimmun*, 2009, 32: 246-253.
- [10] Guo C J, Pan Q, Jiang B, Chen G Y, Li D G. Effects of upregulated expression of microRNA-16 on biological properties of culture-activated hepatic stellate cells[J]. *Apoptosis*, 2009, 14: 1331-1340.
- [11] Guo C J, Pan Q, Cheng T, Jiang B, Chen G Y, Li D G. Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways[J]. *FEBS J*, 2009, 276: 5163-5176.
- [12] Ikeda S, Kong S W, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen P D, et al. Altered microRNA expression in human heart disease[J]. *Physiol Genomics*, 2007, 31: 367-373.

- [13] Bloomston M, Frankel W L, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan J P, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis[J]. *JAMA*, 2007, 297:1901-1908.
- [14] Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler T A, Nagorney D M, Brackett D J, et al. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14:419-427.
- [15] Jin W B, Wu F L, Kong D, Guo A G. HBV-encoded microRNA candidate and its target[J]. *Comput Biol Chem*, 2007, 31:124-126.
- [16] Jopling C L, Yi M, Lancaster A M, Lemon S M, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liverspecific MicroRNA[J]. *Science*, 2005, 309:1577-1581.
- [17] Li D, Friedman S L. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cell: new insights and prospects for therapy[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1999, 14:618-633.
- [18] Kitada T, Seki S, Nakatani K, Kawada N, Kuroki T, Monna T. Hepatic expression of c-myc in chronic human liver disease[J]. *Hepatology*, 1996, 26:1506-1512.
- [19] Etienne M S, Hall A. Rho GTPases in cell biology[J]. *Nature*, 2002, 420:629-635.
- [20] Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way[J]. *Dev Biol*, 2004, 265:23-32.
- [21] Venugopal S K, Jiang J, Kim T H, Li Y, Wang S S, Torok N J, et al. Liver fibrosis causes down-regulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells and their over-expression causes decreased stellate cell activation[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, 298:101-106.
- [22] Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler T A, Nagorney D M, Brackett D J, et al. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14:419-427.
- [23] Visone R, Petrocca F, Croce C M. Micro-RNAs in gastrointestinal and liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2008, 135:1866-1869.
- [24] Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos M J, Mirshahi F, Maher J W, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic microRNA expression[J]. *Hepatology*, 2008, 48:1810-1820.
- [25] Tang Y, Banan A, Forsyth C B, Fields J Z, Lau C K, Zhang L J, et al. Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2008, 32:355-364.
- [26] Kerr T A, Davidson N O. Therapeutic RNA manipulation in liver disease[J]. *Hepatology*, 2010, 51:1055-1061.
- [27] Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev K G, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs' [J]. *Nature*, 2005, 438:685-689.
- [28] Lanford R E, Hildebrandt-Eriksen E S, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk M E, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection[J]. *Science*, 2010, 327:198-201.
- [29] Jopling C L. Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122 [J]. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36:1220-1223.

[本文编辑] 贾泽军

• 书 讯 •

《常用针灸腧穴速记手册》已出版

该书由王珑、吴仁培主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-81060-997-5,32开,定价:10.00元。

该书以十四经脉为序,详细地讲解了经脉的循行、病候、主治及功效;针对每一个腧穴,结合临床应用,设置了便于记忆的穴性歌赋、简便取穴、刺法灸法、效穴验穴等内容,旨在帮助中医学生及其他学习中医者掌握针灸的学习要点,提高学习针灸的效率,从容应对各种考试。

该书适合不同层次的中医、针灸师随身参考,也可供对中医针灸感兴趣的读者阅读。

该书由第二军医大学出版社出版发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>