

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00561

MicroRNAs 与肝癌

叶 萍, 于凤海*

第二军医大学东方肝胆外科医院消化内科, 上海 200438

[摘要] MicroRNAs (miRNAs)是广泛存在的非编码小RNA,通过干预mRNA翻译的方式负向调控基因的表达,具有肿瘤抑制基因和癌基因的双重作用,其在肿瘤发生中所发挥的作用补充、丰富了肿瘤的发生机制。肝癌严重威胁人类健康,但其发病机制尚未完全清楚。miRNAs对肝癌的发生、分化及其治疗策略均有影响,本文就近年来miRNA与肝癌诊治的相关研究作一综述。

[关键词] 微小RNA;肿瘤抑制基因;癌基因;肝肿瘤

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)05-0561-04

MicroRNAs and liver cancer: recent progress

YE Ping, YU Feng-hai*

Department of Gastroenterology, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[ABSTRACT] MicroRNA (miRNA) is a small non-coding RNA that contains 21 to 23 nucleotides and can down-regulate gene expression by translational repression. Recent studies found that some miRNAs might function both as oncogenes and tumor suppressors; its role in the tumorigenesis may complement and enrich the mechanisms of tumorigenesis. Liver cancer is a great threat to human health, whose pathogenesis is still not completely understood. MiRNAs can influence the tumorigenesis, differentiation and treatment of liver cancer. Here we summarizes the related progression in research of miRNA and liver cancer.

[KEY WORDS] microRNA; suppressor tumor genes; oncogenes; liver neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(5): 561-564]

正常细胞生长、增殖、发育、分化和死亡是一个高度有序的过程,而肿瘤的形成正是这一高度有序过程紊乱所造成的。许多调节因子通过开启或关闭与细胞增殖和分化有关的基因造成细胞增殖失控或不适当存活引起肿瘤的形成。肝癌是严重威胁人类健康的疾病,病死率在恶性肿瘤中居第3位。其发病原因可能是乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)引起的肝炎、肝硬化以及黄曲霉素、化学致癌物等其他因素,发病机制尚未完全清楚。

MicroRNAs(miRNAs)是一类新型基因调节剂,近年来成为生命科学研究领域的一个新的热点。miRNA是广泛存在的非编码小RNA,以干扰mRNA翻译的方式负向调控基因的表达。研究^[1-2]发现miRNA调节人类1/3的基因,参与生命过程一系列的重要进程,包括早期发育以及细胞增殖、分化、凋亡、死亡和脂肪代谢。miRNA还可能具有癌基因和抑癌基因的作用,表现为不同类型的肿瘤有其特异的miRNA表达谱。多种miRNA与肿瘤的发生、分化程度及预后等密切相关。本文就miRNA与肝癌的相关性作一综述。

1 miRNA 简介

miRNA是一种单链的小分子RNA,具有3个明显特

征:广泛存在于真核生物中,是一组不编码蛋白质的短序列RNA,它本身不具有开放阅读框架(ORF);成熟miRNA的通常的长度为21~25 nt;成熟miRNA的5'端有一磷酸基团,3'端为羟基,这一特点使它与大多数寡核苷酸和功能RNA的降解片段区别开来。miRNA基因不是随机排列的,其中有一些是成簇分布,而且簇生排列的基因常协同表达。哺乳动物为数众多的miRNA起源于少数几个miRNA基因,空间、时相特异性是miRNA表达模式的主要特点,而组织或细胞特异的miRNA较少^[3]。

miRNA主要通过抑制其靶基因来发挥调控作用,其作用模式一种是与靶标基因3'非翻译区不完全互补结合,进而抑制翻译而不影响mRNA的稳定性(不改变mRNA丰度);另一种是与靶标基因3'非翻译区完全互补结合,作用方式和功能与siRNA非常类似,最后导致靶mRNA的降解。Bartel等^[4]将这些miRNA比作微型电阻,根据miRNA与靶基因互补的程度执行从切割(100%抑制)到微弱抑制的不同程度的抑制作用。

2 miRNA 与肝癌

Sempere等^[5]应用Northern印迹杂交技术对当时已知

[收稿日期] 2008-01-23 **[接受日期]** 2008-03-25

[作者简介] 叶 萍,硕士生. E-mail: xappleeye@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070777, E-mail: panda1979hh@sina.com

的119种 miRNA 进行研究,发现在小鼠和人肝脏中均表达的有:miR-122a、-152、-194、-199 和-215,其中有些还在肺和肾脏中表达,只有 miR-122a 是肝脏特异表达的,而且表达量较高。Babak 等^[6]的 miRNA 芯片研究发现肝脏特异表达的 miRNA 有 miR-122a、-16、-150、-92 和-145 等。Landgraf 等^[7]的研究则认为肝脏表达的 miRNA 有 40 多种,其中特异性较高的有 miR-126、-424/322、-135b、-122、-425、-93、-96 和-374b 等。其中,肝特异性的 miR-122 在受精卵置入小鼠后 12.5 d 即可检测到其表达,在胚胎形成的第 17 日,小鼠肝脏 miR-122 达到其峰值的一半,表达水平在出生前接近达到峰值,平均每个细胞有 50 000 个拷贝,出生后缓慢地升高,提示 miR-122 参与调节肝脏的分化,可能参与了调节肝脏发育。

氨基酰转运蛋白(CAT-1)基因是 miR-122 作用的靶基因之一,各组织中 CAT-1 基因及蛋白均有表达,但其在成体肝脏中的表达很低。在小鼠肝脏发育中,CAT-1 的表达水平与 miR-122 呈负相关。CAT-1 mRNA 中有 8 个 miR-122 的潜在作用位点,其中 6 个位于 3'非编码区,3 个能够与 CAT-1 上的一段 400 bp 核苷酸序列结合,协同并有效降低 mRNA 表达以及抑制蛋白合成。应用 miR-122 的反义寡聚核苷酸后,肝脏功能受损,胆固醇合成降低,提示 miR-122 在维持正常肝脏功能上起着重要作用^[8]。

3 miRNA 与慢性肝炎、肝硬化

HBV 导致的肝脏慢性疾病与肝癌的发生发展有着比较明确的联系。HBV 亚基因组 DNA 与宿主 DNA 在不同位置随机整合增加了遗传不稳定性,但其在肝癌形成中的确切作用还不清楚。同时,绝大多数整合还保留了 HBV 编码的 HBxAg 的 ORF。多数整合发生在脆性位点附近或者其他的癌相关区域。整合相关的遗传不稳定性改变了癌基因、抑癌基因和 miRNA 的表达,这些对于肿瘤形成可能有着重要的作用。特定的整合或许是肝癌形成的限速步骤,对于诊断预后以及治疗都有重要的意义^[9]。

抑制或阻断肝细胞中的 miR-122(通过修饰反义核苷酸)可引起丙型肝炎 RNA 复制子的数目骤减 80%。在两个 miR-122 可能的结合位点(位于病毒 RNA 基因组非编码区)上引入突变,结果表明 3'非编码区的突变对于病毒增殖无影响,而 5'非编码区突变会导致病毒无法增殖。这些结果说明 miRNA 对肝炎 C 型病毒增殖作用重大,而且 miRNA 与 mRNA 靶点之间的相互作用可以逆转。通过研究复制缺陷 RNA 表明,miR-122 并没有直接作用于 mRNA 翻译区或者影响 RNA 的稳定性,miR-122 与氨基酰转运蛋白 CAT-1 mRNA 的 3'端结合从而导致蛋白表达的下降。特定的 miRNA 能够通过正、负两个方面调控目的 mRNA^[10-11]。miR-122 可能促进了病毒 RNA 的复制,而灭活 miRNA 可能导致丙肝病毒的减少,因此 miR-122 可能成为抗病毒治疗的新靶点。Murakami 等^[12]比较了慢性乙肝、丙肝、肝硬化、肝癌以及癌旁组织 miRNA 表达的差异,发现乙肝、丙肝患者 miR-

NA 的表达水平无统计学差异。12 例慢性肝炎患者中表达上调的 miRNA 有 miR-182、-224、-156 和 pre-miR-199b,14 例肝纤维化表达上调的有 miR-28、-342、-126、-199a、-145b、-434、-368 和 pre-miR-372。

4 miRNA 与肝癌

随着研究的深入,越来越多的证据显示 miRNA 与肿瘤的发生密切相关。Calin 等^[13]发现 186 种 miRNA 中有 36 种(约占 19%)位于染色体上异常缺失、扩增或转位的脆性区。Volinia 等^[14]通过分析 540 例取自肺、胸部、胃、前列腺、结肠和胰腺等处的肿瘤样品,发现这些实体瘤有着不同的 miRNA 表达谱,说明 miRNAs 在实体瘤的发病过程中发挥着重要的作用。而且,有些 miRNA 在细胞调控中扮演着“双刃剑”的作用,如 miR-21 在乳腺癌样本中表达水平明显下调^[15],而在神经胶质瘤中表达水平明显上调^[16],提示 miR-21 等 miRNA 的组织特异性和时相性对于肿瘤的形成具有重要的作用。

4.1 miRNA 与肝癌发生 与肝癌有关的癌基因和抑癌基因很多,其中 c-Myc 激活与肝癌的发生直接相关,灭活 c-Myc 能逆转肝癌的发生^[17]。miRNAs 也可以起到肿瘤抑制基因和癌基因的作用,其在肿瘤发生中的作用补充、丰富了肿瘤的发生机制。

p53 是一种研究比较多的抑癌基因,He 等^[18]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 和-34c)的表达与 p53 的表达正相关。DNA 损伤时,野生型细胞的 miR-34 水平上调,而 p53 缺失的细胞中 miR-34 表达无变化。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^{WAF1/CIP1},说明 miR-34 是 p53 的直接靶标。这一发现强调了 miRNA 分子在促进 p53 信号转导中的重要性,证明 p53 直接诱导 miRNA 分子的表达,这些 miRNA 分子通过抑制许多靶基因的表达进而延缓细胞生长。miRNA 参与了 p53 的肿瘤抑制网络,能够有效拮抗肿瘤细胞的生长。这些研究对于更好地了解肿瘤阻碍机制以及如何更好利用 p53 杀死癌细胞很有帮助。

PTEN 也是肿瘤抑制基因,其突变型在多种肿瘤中表达升高。它所编码的磷酸酯酶在正常情况下能够抑制磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI-3K)信号转导通路所介导的生长促进作用,而 PI-3K 激酶信号转导通路是多种肿瘤维持生存所必须的调控通路。Meng 等^[19]分析了正常肝细胞和肝癌细胞中的 197 种 miRNA 分子的表达,结果显示肝癌组织中 miR-21 的浓度比正常肝细胞高出 9 倍。更重要的是,肝细胞中 miR-21 的上调能导致 PTEN 蛋白表达下调,证实 miR-21 的目的分子可能是 PTEN。高浓度的 miR-21 会抑制 PTEN 基因的翻译,而这种基因的抑制则触发了细胞增殖、转移和浸润等恶性生物学行为,提示 miR-21 在肝癌发生中的始动效应。

过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)的激活能够促进肝细胞增生和肝癌形成,其中可能有 miRNA 的效应。Shah 等^[20]发现 PPAR alpha 表达小鼠模型能够抑制肝细胞增生和肿瘤形成,let-7C 在肝肿瘤形成中起着关键性的作用,应用 PPAR alpha 激动剂会导致 let-7C 表达减少。Let-7C 与 c-Myc 基因的 3'-UTR 结合而直接作用于 c-Myc。经由 let-7C 途径 PPAR alpha 介导的 c-Myc 表达导致原癌基因 miR-17-92 簇的高表达,而 PPAR alpha 缺陷的裸鼠无此变化。Let-7C 的高表达使得 c-Myc 和 miR-17-92 簇表达减少,从而抑制 Hepa-1 细胞的生长。另外,O'Donnell 等^[21]应用微阵列(microarray)技术在 c-Myc 基因高表达的肿瘤细胞中发现 miR-17-5p、-18、-19、-20、-92 和-106 均有特异性高水平表达,其可能机制是 c-Myc 通过激活位于 13 号、7 号和 X 染色体上的 3 个 miRNA 基因簇内编码基因的转录,上调上述 miRNA 表达;其中 miR-17-5p 与-20 能够抑制 E2F1 表达,阻止细胞由 G₁ 期进入 S 期,诱导肝癌形成。

总之,miRNA 与原癌基因相互作用是肿瘤形成的机制之一,其作用方式的发现为癌基因促进肿瘤发生提供了全新的思路,在分子水平上对肿瘤的发生机制提供了新的见解。

4.2 miRNA 与肝癌分化 Murakami 等^[12]将肝癌及癌旁组织比较后发现肝癌中 miRNA 表达上调的有: miR-18、pre-miR-18 和 miR-224, 表达下调的有: miR-199a、-195、-125a 和-200a。另外,miR-199a 的表达水平在正常肝组织中较高、在慢性肝炎中较低、在肝纤维化中较高、肝癌组织中较低,且 miR-199a 的表达水平与分化程度正相关,可以作为原发性肝细胞癌的诊断指标。Gramantieri 等^[22]比较了肝癌与肝硬化表达的差异,发现肝脏特异性的 miR-122a 在 70% 的 HCC 和所有的肝癌细胞系中表达是下降的。miRNA 的表达下降必然导致其调控蛋白的表达上升。他们认为 miR-122a 调控的靶分子是细胞周期蛋白 G₁, 两者的表达水平存在负相关。

Kutay 等^[23]给予 Fisher 小鼠缺乏甲基的食物(FMD)36 周后,其肝脏出现癌前病变;喂食 54 周后,肝脏出现癌变。与正常肝相比,癌组织中有 9 种 miRNA (miR-101b-2、-130、-130a、-172a-2、-219-1、-23a、-23b、-24 和-328-1) 的表达升高,3 种 miRNA(miR-122、-123、-215) 的表达降低。在小鼠肝癌移植模型、50% 人肝癌样本(10/20)、人和小鼠肝癌细胞系中,miR-130、-23 表达水平升高,miR-122 的表达水平降低;在 FMD 诱导的小鼠肝癌中 c-Myc 的表达亦升高。

4.3 miRNA 与肝癌治疗 miRNA 相关的治疗思路主要是引入(knock-in)抑癌基因性 miRNA 或者敲除(knock-out)癌基因性 miRNA。Krützfeldt 等^[24]将经过修饰的反义 RNA (antagomirs)注入小鼠体内,发现体内肝脏等多种组织的 miR-16、-122、-192 和-194 的表达显著下调。若能引入与具有癌基因特性 miRNA 互补的合成反义寡聚核苷酸(抗 miRNA 寡聚核苷酸, AMOs),将可有效地灭活肿瘤中的 miRNAs,延缓其生长。相反,利用病毒或者脂质体的表达系统可以瞬时引入过表达那些具有肿瘤抑制作用的 miRNAs,也

可以用于治疗某些特定的肿瘤。

5 结 语

随着功能基因组学研究的深入,基因表达调控已经逐渐从单个基因点、线性的调控拓展到立体层面上多基因、基因簇乃至整个基因组的调控网络,针对 mRNA 的调控机制日益受到重视,其中对于 miRNA 的功能机制研究发展十分迅速。近年来研究人员在 miRNA 与肝癌等肿瘤发生领域的研究取得了较大进展,提出了 Oncomirs 这一新方向,完善和丰富了肿瘤发生的分子生物学与遗传学机制;同时,肝癌特异性相关 miRNA 的发现为肝癌基因治疗提供了新靶点,miRNA 分子药物亦处于研制当中。尽管 miRNA 在肝癌等肿瘤学领域的研究取得了一些进展,但仅是冰山一角,仍需进一步的深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Calin G A, Croce C M. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 7390-7394.
- [2] Zhang B, Pan X, Cobb G P, Anderson T A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. *Dev Biol*, 2007, 302: 1-12.
- [3] Randall G, Panis M, Cooper J D, Tellinghuisen T L, Sukhodolets K E, Pfeffer S, et al. Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 12884-12889.
- [4] Bartel D P, Chen C Z. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs[J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5: 396-400.
- [5] Sempere L F, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation[J]. *Genome Biol*, 2004, 5: R13.
- [6] Babak T, Zhang W, Morris Q, Blencowe B J, Hughes T R. Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference[J]. *RNA*, 2004, 10: 1813-1819.
- [7] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing[J]. *Cell*, 2007, 129: 1401-1414.
- [8] Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia M A, et al. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from her mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1[J]. *RNA Biol*, 2004, 1: 106-113.
- [9] Feitelson M A, Lee J. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis[J]. *Cancer Lett*, 2007, 252: 157-170.
- [10] Jopling C L, Norman K L, Sarnow P. Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2006, 71: 369-376.
- [11] Jopling C L, Yi M, Lancaster A M, Lemon S M, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-spe-

- cific MicroRNA[J]. *Science*, 2005, 309:1577-1581.
- [12] Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues[J]. *Oncogene*, 2006, 25:2537-2545.
- [13] Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101:2999-3004.
- [14] Volinia S, Calin G A, Liu C G, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:2257-2261.
- [15] Iorio M V, Ferracin M, Liu C G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2005, 65:7065-7070.
- [16] Chan J A, Krichevsky A M, Kosik K S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells[J]. *Cancer Res*, 2005, 65:6029-6033.
- [17] Shachaf C M, Kopelman A M, Arvanitis C, Karlsson A, Beer S, Mandl S, et al. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer[J]. *Nature*, 2004, 431:1112-1117.
- [18] He L, He X, Lim L P, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network[J]. *Nature*, 2007, 447:1130-1134.
- [19] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob S T, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer[J]. *Gastroenterology*, 2007, 133:647-658.
- [20] Shah Y M, Morimura K, Yang Q, Tanabe T, Takagi M, Gonzalez F J. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates a microRNA-mediated signaling cascade responsible for hepatocellular proliferation[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27:4238-4247.
- [21] O'Donnell K A, Wentzel E A, Zeller K I, Dang C V, Mendell J T. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression[J]. *Nature*, 2005, 435:839-843.
- [22] Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu C G, et al. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2007, 67:6092-6099.
- [23] Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, et al. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 99:671-678.
- [24] Krützfeldt 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.

[本文编辑] 贾泽军

• 书 讯 •

《实用社区康复指南》已出版

本书由成鹏编著,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-8106-0792-6,303页,16开,定价:40.00元。

本指南以实现残疾人的全面康复为宗旨,简明介绍开展社区康复工作所必备的理论知识及实践技能。其中包括社区康复的概念、管理、培训及实施;残疾与康复的基本概念;残疾的预防;现代康复治疗手段,如运动疗法、作业疗法、物理疗法、特殊教育、职业康复、心理康复、社会康复、矫形器及生活自助具的使用等。对常见残疾,如偏瘫、截瘫、脑瘫、智力低下、小儿麻痹后遗症、视力残疾、聋、哑、精神残疾的预防和社区康复,以及残疾儿童和老年人的社区康复都作了通俗、全面的介绍。本指南既适合社区康复资源中心的专业人员的理论学习,又适合管理人员、基层康复员、残疾人及其家庭成员使用,也可作为现代康复医学的入门读物。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大新华书店均有销售。

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>