

miRNAs在肝细胞肝癌基因治疗中的研究进展

刘昊¹ 黄晓明¹ 王翊^{1,2} 贾振宇^{1*}

(¹浙江省医学科学院, 杭州 310013; ²温州医科大学检验医学与生命科学学院, 温州 325025)

摘要 肝癌是严重威胁人类健康的主要恶性肿瘤之一, 其中70%~85%是肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)。目前, HCC的各种治疗方法的效果均具局限性。HCC发生发展中的各种生物大分子的变化及其机制是探索新的有效治疗方法的基础。近二十年来发现的微小RNA(microRNA或miRNA)在基因表达、蛋白质翻译过程中发挥着重要的调控作用, 其异常表达与肿瘤的发生发展密切相关。与此同时, 基因治疗作为一种新兴的生物治疗手段, 也是目前的研究热点之一。因此, miRNA正被应用于肿瘤的基因治疗研究之中。该文就miRNA的作用机制、miRNA与HCC的关系和miRNA在HCC基因治疗中的应用研究作一综述。

关键词 肝细胞肝癌; 基因治疗; 微小RNA

Progress of miRNAs Research in Hepatocellular Carcinoma Gene Therapy

Liu Hao¹, Huang Xiaoming¹, Wang Jia^{1,2}, Jia Zhenyu^{1*}

(¹Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China;

²School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325025, China)

Abstract Hepatocellular carcinoma (HCC) is by far the most common type of liver cancers, accounting for 70%~85% of cases, with high mortality worldwide. Curative effect of therapeutic treatments for HCC is rather limited. Alteration and relative mechanism of biological macromolecules in HCC development and progress are the basis of novel therapy exploration. microRNAs are small non-coding RNAs, which play important roles in biological processes, such as gene expression and protein translation. Dysregulation of microRNAs is involved in tumor occurrence and progress. Gene therapy has emerged as a new treatment option for various diseases, including cancer. Therefore, microRNAs are investigated as potential targets and promising strategies of HCC gene therapy. In this article, microRNAs were reviewed on their functional mechanism, involvement in HCC and advancement in HCC gene therapy.

Key words hepatocellular carcinoma; genetic therapy; miRNAs

在全世界范围内, 肝癌在男性和女性中的发病率分别居第五位和第七位, 分别是男性的第二大致死性肿瘤和女性的第六大致死性肿瘤。据估计, 2008年, 全世界新发肝癌748 300例, 因肝癌死亡695 900例,

其中半数发生在中国^[1]。近3年(2011~2013年), 肝癌的发生与死亡数呈逐年上升趋势^[2-4]。肝癌的发生大多和前期的慢性肝病相关, 包括慢性肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV或hepatitis C virus, HCV)、酒

收稿日期: 2014-05-27 接受日期: 2014-07-30

浙江省自然科学基金重点项目(批准号: LZ12H16003)和浙江省卫生厅医学重点学科建设计划项目(批准号: 11-ZC02)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88215459, E-mail: zhenyujia@yahoo.com

Received: May 27, 2014 Accepted: July 30, 2014

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LZ12H16003) and the Foundation of Key Medical Sciences of Public Health of Zhejiang Province (Grant No.11-ZC02)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88215459, E-mail: zhenyujia@yahoo.com

网络出版时间: 2014-12-01 10:07 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.12.0185.html>

精性肝硬化、脂肪肝等。原发性肝癌是临床上常见的肝癌,70%~85%的原发性肝癌属于肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[1]。

对于早期HCC患者,手术切除和原位肝移植是最为有效的治疗手段,其中手术切除主要用于肝硬化或非肝硬化但肝功能良好的患者,但其最大的问题是5年复发率高达70%以上;原位肝移植术的5年生存率达到70%,但受严格的手术指征、有限的肝脏供体和高成本的限制,只有极小一部分患者能够承受^[5]。经皮乙醇注射(percutaneous ethanol injection, PEI)和射频消融术(radiofrequency ablation, RFA)也是有效的治疗手段,其中RFA更佳^[6]。对于中晚期HCC患者,肝动脉灌注化疗栓塞术(transarterial chemoembolization, TACE)、放射栓塞术(radioembolization)和口服多激酶抑制剂索拉菲尼(sorafenib)治疗均能取得一定的疗效,但伴有相当严重的不良反应^[7]。因此,研究人员一直在探索新的有效的治疗手段。随着分子生物学和基因工程技术的飞速发展,肿瘤生物治疗方法之一的基因治疗开始受到人们关注。基因治疗是指将治疗性的基因转入病变的细胞,纠正导致疾病的基因或补偿缺陷的基因,以达到治疗效果。基因治疗在抗肿瘤方面的研究主要有:引入肿瘤抑制基因、抑制原癌基因、引入自杀基因、引入干扰肿瘤生长的基因以及激活自身抗肿瘤免疫反应。基因治疗具有目标明确、特异性高、不良反应小等优点,具有广阔的研究前景^[8-12]。

1993年, Lee等^[13]在线虫(*C. elegans*)体内首次发现,非编码的小RNA *lin-4*能够与*lin-14*的mRNA的3'非翻译区(3' untranslated region, 3' UTR)互补结合,调控*lin-14*的mRNA的翻译,下调*lin-14*蛋白水平。随后,在线虫以及其他物种中发现了更多具有相同功能的小RNA,并将这类小RNA定义为微小RNA(microRNA, miRNA)^[14-16]。目前,已经在223个物种中发现了35 828种miRNA(The miRBase Sequence Database-Release 21: <http://www.mirbase.org/>)。miRNA能够抑制靶mRNA翻译或引起靶mRNA降解,在调控生物细胞生长、分化、凋亡,胚胎发育和器官形成等过程中起着重要的作用^[17]。miRNA的异常表达会引起细胞周期改变、生长与凋亡失控,与疾病的发生,尤其是肿瘤的发生、迁移和转移密切相关^[17-18]。本文就miRNA的作用机制、miRNA与HCC的关系和miRNA在HCC基因治疗中

的应用做一综述。

1 miRNA的作用机制

miRNA是长度约22个核苷酸的非编码小分子RNA(non-coding RNA, ncRNA),与核酸酶Dicer、Argonaute、TRBP(TAR RNA-binding protein)、双链RNA结合蛋白PACT(protein activator of PKR)等形成RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silence complex, RISC)^[19]。RISC介导miRNA 5'端6~8个碱基的种子序列(seed sequence)通过碱基互补配对结合到靶mRNA的3' UTR。如果完全互补配对,则引起靶mRNA降解;如果部分互补配对,则抑制靶mRNA的翻译。因此,一个miRNA能够同时以多个mRNA为靶点,而一个mRNA也可能被多个miRNA作用^[20]。除此主要作用方式以外,miRNA也能结合5' UTR和编码序列,抑制靶mRNA的翻译;或是结合启动子序列,诱导靶基因的转录;结合靶mRNA的AU富集区,激活蛋白的翻译^[21]。因此,miRNA能够在mRNA和蛋白水平发挥调节作用,从而调控细胞的生长、分化及凋亡等。

2 miRNA与HCC的关系

miRNA与肿瘤的发生、发展的相关研究是肿瘤研究领域的热点之一。随着基因组学的发展,一些高通量的技术如基因芯片、实时定量PCR等可以快速鉴定肿瘤组织与正常组织以及不同类型肿瘤组织之间miRNA的表达差异,建立肿瘤miRNA表达谱,同时为研究miRNA的靶基因提供了线索。研究者对HCC患者的肝癌组织及邻近的非癌组织进行了miRNA表达谱的对比分析,发现许多miRNA在肝癌组织中表达异常(表1)^[22-25]。Wang等^[24]预测了一些表达异常的miRNA的靶基因,发现这些基因大多参与肿瘤发生的过程。miRNA的表达异常或异常程度与肿瘤分化或发展程度相关^[24-25]。病毒性肝炎是HCC主要的前期肝脏疾病之一。研究表明,不同类型病毒感染引发的肝癌中,miRNA表达谱也存在差异,一些miRNA的表达与感染病毒的类型相关,而另一些miRNA的表达则与疾病的发展阶段相关^[26]。除此之外,miRNA的表达异常或异常程度也与酗酒等不良生活方式相关^[27]。Jiang等^[28]对比不同预后的两组HCC患者肝癌组织中miRNA的表达谱,发现19种miRNA表达水平与预后具有良好的相关性。因此,

表1 HCC中异常表达的miRNAs
Table 1 miRNAs dysregulated in HCC

微小RNA	异常表达	参考文献	微小RNA	异常表达	参考文献
miRNA	Dysregulation	References	miRNA	Dysregulation	References
let-7a	Down	[24,29]	let-7c	Down	[23]
let-7d	Down	[23]	let-7g	Up	[25]
let-7i	Up	[23]	miR-9*	Down	[25]
miR-9	Up	[20,25]		Up	[27]
miR-10a	Up	[25]	miR-15a	Up	[23,25]
miR-10b	Up	[22]		Down	[24]
miR-15b	Down	[23]	miR-17-5p	Up	[23,25]
miR-16	Up	[24-25]	miR-19b	Up	[23]
miR-18	Up	[19,21,23]	miR-20b	Up	[23]
miR-20a	Up	[23]	miR-22	Down	[23]
miR-21	Up	[20-23,27]		Down	[23]
miR-23a	Down	[23]	miR-24	Up	[24]
miR-25	Down	[23]	miR-26a	Down	[26]
	Up	[20,24,27]	miR-28	Down	[23]
miR-27a	Up	[23]	miR-29a	Down	[23]
	Down	[24,27]	miR-29c	Down	[25-26]
miR-29b	Down	[23]	miR-30e	Down	[23]
miR-30d	Down	[23]	miR-34a	Up	[23]
miR-33a	Up	[21]	miR-92a	Up	[23]
miR-34c	Up	[27]	miR-95	Down	[25]
miR-93	Up	[23]	miR-99a	Down	[23]
miR-96	Up	[20,22,27]		Up	[25]
miR-99b	Down	[23]	miR-100	Down	[27]
miR-101	Down	[21]	miR-105	Up	[27]
miR-104	Down	[25]	miR-106b	Up	[23]
miR-106a	Down	[25]		Down	[22-24]
miR-107	Up	[24]	miR-122a	Up	[25]
miR-124a	Down	[24]		Down	[23-24,27]
miR-125a	Down	[19,24,27]	miR-125b	Up	[25]
miR-126*	Down	[22-24,26]	miR-128	Up	[24]
miR-126	Down	[24]	miR-130a	Down	[23]
miR-129	Down	[24]	miR-134	Down	[25]
miR-130b	Up	[21,23-24]		Down	[25]
miR-135a	Up	[21]	miR-137	Up	[20]
miR-139	Down	[20-21,27]	miR-143	Down	[23-24]
miR-141	Down	[27]	miR-147a	Down	[25]
miR-145	Down	[20,24-25,27]	miR-150	Down	[21,27]
miR-148a	Up	[23]	miR-152	Down	[24]
miR-151a	Up	[20]	miR-155	Up	[20]
miR-154	Down	[26]	miR-182	Up	[20,27]
miR-181a	Down	[23]	miR-183	Up	[20,27]
miR-182*	Up	[27]		Down	[24-25]
miR-184	Up	[27]	miR-185	Up	[27]
miR-186	Up	[20]	miR-191	Up	[27]
miR-190a	Up	[27]		Up	[27]
miR-192	Up	[23]	miR-193a	Down	[23]
miR-194	Down	[24]		Down	[25]
miR-195	Down	[19,24,27]	miR-198	Down	[25]
miR-199a	Down	[19,21,24,27]	miR-199a*	Down	[19,21,27]
miR-199b	Down	[21,25,27]	miR-200a	Down	[19,24]
miR-200b	Down	[21,27]	miR-204	Down	[25]
miR-205	Up	[24]	miR-214	Down	[20-21,27]
miR-216	Up	[20,27]	miR-218	Down	[25]
miR-219	Down	[26]	miR-221	Up	[20-21,24]
	Up	[27]	miR-222	Up	[20,22,24,27]
miR-223	Down	[21]	miR-224	Up	[19-23,27]
miR-299	Up	[25]	miR-301	Up	[20-21,27]
miR-302b	Down	[25]	miR-302b*	Down	[25]
miR-302d	Down	[27]		Down	[26]
miR-324-5p	Up	[20,23]	miR-320a	Up	[27]
miR-325	Down	[26]		Down	[25]
miR-331	Up	[27]	miR-330	Up	[27]
miR-337	Up	[23]		Down	[24,26]
miR-342	Down	[27]	miR-338	Down	[23]
miR-370	Up	[25]	miR-365a	Up	[20,27]
miR-375	Down	[22]	miR-374a	Up	[25]
miR-378a	Down	[22]	miR-376c	Down	[23]
miR-451a	Down	[23]	miR-381	Down	[23]
miR-493	Up	[23]	miR-486	Down	[23]
miR-532	Up	[23]	miR-520f	Up	[23]
			miR-574	Up	[23]

miRNA有可能作为指示预后的生物标志物。对同一个miRNA, 如miR-122, 不同的研究发现的表达异常状况并不相同^[23,27,29-30], 可能与样品来源、疾病的发展阶段、检测方法等各种因素的差异有关, 因此, 需要更多研究来证实目前的研究结果。

根据miRNA的作用性质可以将其分为抑癌和致癌两类。肿瘤的发生、发展通常伴随着抑癌类miRNA的表达下调和致癌类miRNA的表达上调。抑癌miRNA通过靶向一些原癌基因的mRNA, 引起mRNA降解或阻遏其翻译, 从而抑制其致癌作用。这类miRNA表达下调, 会导致原癌基因被激活, 进一步导致肿瘤发生。而致癌miRNA的作用则相反。抑制整体miRNA的成熟会促进肿瘤的发生, 因此, miRNA更多地具有抑癌作用^[31]。

研究得较多的抑癌miRNA是miR-122, 一个肝组织特异性miRNA, 在肝癌组织中表达下调。2008年, Lin等^[32]研究发现, miR-122能够以抗凋亡基因*Bcl-w*为靶点, 使其mRNA和蛋白水平下调, 从而促进细胞凋亡。在许多肿瘤中都能检测到细胞周期蛋白基因*Cyclin G1*高表达, 而*Cyclin G1*的高表达会抑制P53的抑癌活性。2009年, Fornari等^[33]研究发现, miR-122能够以*Cyclin G1*为靶点, 下调*Cyclin G1*蛋白水平, 从而解除*Cyclin G1*对P53的负反馈抑制, 达到抑制肿瘤的效果。Wnt/ β -catenin-TCF信号通路在肝癌的发生及发展中发挥重要作用。2012年, Xu等^[34]研究发现, miR-122能够以*Wnt1*为靶点, 下调Wnt1、 β -catenin以及TCF-4蛋白水平, 抑制肿瘤细胞的生长和促进肿瘤细胞凋亡。

研究得较多的致癌miRNA是miR-221, 其在70%伴有肝硬化的HCC组织中表达上调。2008年, Fornari等^[35]研究发现, miR-221能够下调细胞周期抑制蛋白CDKN1C/p57和CDKN1B/p27的水平, 调控细胞周期。Bcl-2修饰因子(Bcl-2 modifying factor, BMF)与脱离细胞外基质的细胞失巢凋亡(Anoikis)相关, 是一个促凋亡因子, 在平衡促凋亡和抗凋亡信号网络中起重要作用。2009年, Gramantieri等^[36]研究发现, miR-221能够抑制*Bmf*表达水平, 使非贴壁细胞的凋亡受阻。金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)能够抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)的活性, 从而抑制细胞侵袭和转移。2009年, Garofalo等^[37]研究发现, 在HCC组织中miR-221和miR-222能够抑制

*PTEN*和*TIMP3*的表达, 诱导对临床试验阶段的抗癌药物肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)的耐受性, 促进细胞的增殖、迁移和侵袭。

miRNA可以直接或间接调控重要的功能基因, 如与凋亡、转移相关的基因, 使细胞发生异常改变; 也可以调控信号通路中的一个或多个基因, 从而影响整个信号通路的功能。由于miRNA调控的多样性, 导致整个miRNA调控网络的复杂性。miRNA表达差异还与HCC患者对抗癌药物的耐受性相关, 可能是miRNA调控的基因与药物作用的靶点存在关联。因此, miRNA还能为个体化用药提供线索。

3 miRNA在治疗HCC中的应用

由于miRNA的致癌或抑癌作用, 以miRNA为基础的基因治疗引发了研究者的兴趣。目前, 应用miRNA治疗HCC有三种策略。一是采用miRNA拮抗剂(miRNA antagonist)抑制致癌miRNA的作用。miRNA拮抗剂是一类能与内源miRNA互补结合的核酸分子, 阻断内源miRNA被RISC加工, 或导致内源miRNA的降解。miRNA拮抗剂有Anti-miRs、locked-nucleic acids(LNA)和antagomiRs等。miRNA特异性小分子抑制剂正在研究之中, 以抑制miRNA功能。二是增强细胞内源性抑癌miRNA的表达水平, 抑制其靶标原癌基因的表达。常用的方法有: 将人工合成的模拟内源性抑癌miRNA序列的miRNA Mimics直接导入细胞内, 或者将携带抑癌miRNA基因的表达载体导入细胞内等^[38]。由于肿瘤细胞中大部分的miRNA都是下调的^[39], 因此, 后一种策略的应用较为广泛。三是使用以肿瘤恶性表型相关基因为靶点的人工miRNA(artificial microRNA, amiRNA)表达载体^[19,40]。

基因治疗需要考虑的要素是选择高效、安全以及靶向性特异的载体。目前70%以上的基因治疗研究采用病毒载体, 主要有腺病毒、腺相关病毒、单纯疱疹病毒、逆转录病毒、慢病毒、痘病毒等^[41]。病毒载体显著的优点是其传递遗传物质的高效性和易于制备、纯化以用于体内研究, 但由于存在着病毒与细胞遗传物质发生重组而诱发癌症及引起机体的免疫应答等风险, 在人体中的应用尚受限制^[42]。由于病毒载体的安全性仍存争议, 携带的DNA量难以满足临床应用的需要, 因此, 促进了非病毒载体研究的发展。最简单的就是裸

DNA(Naked DNA), 它可以直接注射进入靶组织表达^[43]。纳米颗粒(Nanoparticle)是一种新近发展起来的载体, 最早的是纳米脂质体。纳米颗粒能够提高药物的生物利用率和负载容量、降低给药频率和剂量, 实现特定组织或细胞的给药, 避免损伤正常细胞, 更为安全, 可持续给药, 能穿透上皮和内皮屏障, 同时携带几种不同药物^[44]。转座子(Transposon)系统, 如Sleeping Beauty(SB)和piggyBac(PB)等, 安全、有效、具有高活性, 适用于采用各种人干细胞进行的间接体内疗法^[45]。目前已有一些HCC基因治疗方案进入临床试验阶段, 如携带*p53*的重组腺病毒载体、编码单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus thymidine kinase, *HSV-TK*)基因的一代腺病毒载体等联合传统疗法能够提高晚期HCC患者的生存率^[46-48]。但尚未有基于miRNA的HCC临床基因治疗方案报导。miRNA的异常表达与疾病密切相关, 基于miRNA的基因治疗就是纠正miRNA的异常表达。通常只需纠正单个miRNA的异常表达就能取得有效的治疗效果^[49]。

1998年, Fire等^[50]采用与靶基因具有同源序列的双链RNA(double-strand RNA, dsRNA)有效沉默了靶基因, 这种技术称为RNA干扰(RNA interference, RNAi)。2001年, Elbashir等^[51]首次使用dsRNA经剪切后产生的21~22个核苷酸的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)在哺乳动物细胞中实现了RNAi。现在, RNAi技术已经成为基因治疗的主要手段之一。天然miRNA的作用机制是一种内源性的RNAi, 基于天然miRNA的基因治疗是利用天然内源性的RNAi来抑制靶基因表达。人工miRNA借用天然miRNA的前体(microRNA precursor, pre-miRNA)结构, 将其天然核心序列替换为作用于靶基因的序列, 以特异性干扰靶基因表达。人工miRNA对靶基因的沉默效应比短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)更强; 且miRNA是由聚合酶II启动子调控, 能够实现组织特异性或可调控性表达; 最重要的是安全性高, 毒性低, 不干扰细胞内源性RNAi, 脱靶效应低^[52-55]。

从2008年迄今, 各项采用miRNA的HCC基因治疗的实验室研究取得了一定的体内外抑瘤效果, 为后期的临床试验以及最终用于HCC患者的安全有效的方法打下了基础。

3.1 基于天然miRNA的HCC基因治疗

3.1.1 转染miRNA mimics 2010年, Xiong等^[56]发

现, 用miR-29a/b/c mimics转染HepG2细胞72 h后, 增加了细胞对缺氧、血清饥饿和阿霉素等化疗药物诱导的凋亡敏感性, 凋亡率大约是对照的2倍。将转染了miR-29b mimics的HepG2细胞注射到雌性BALB/c裸鼠皮下, 第10 d的成瘤率下降了75%, 4周后肿瘤体积减少了大约95%。2011年, Hou等^[57]用miR-199a/b-3p mimics转染4株miR-199a/b-3p低表达的肝癌细胞Hep3B、SMMC-7721、Huh7和HepG2后, 能够恢复miR-199a/b-3p的表达。转染72 h后, Hep3B细胞存活率下降了大约15%~30%, 凋亡细胞数增加了大约85%~185%; G₁期细胞数增加了大约10%、G₂期细胞数减少了大约55%。随后他们通过皮下移植人HCC组织构建人HCC裸鼠模型SMMC-LTNM, 将经胆固醇修饰的miR-199a/b-3p mimics注射到该裸鼠的肿瘤组织中, 72 h后检测到miR-199a/b-3p表达量上升至人正常组织的大约1.4倍、肿瘤体积减少了大约50%、血清甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)水平下降了大约45%, 观察到明显的肿瘤组织坏死。

3.1.2 转染携带miRNA基因的质粒 采用组织特异性的启动子, 可以使目的基因只在特定组织表达而其他组织则不表达。2011年, Chen等^[58]构建了人甲胎蛋白(human AFP, hAFP)和人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)双重启动子调控的以雌激素受体 α (estrogen receptor α , *ER α*)为靶点的miR-26a表达载体AFP-hTERT-miRNA26a(pATM), 该载体可以在肝癌细胞中有效地特异性表达miR-26a。在裸鼠皮下接种转染了pATM的Huh-7细胞, 5周后肿瘤体积减少了将近75%; 将20 μ g的pATM与脂质体混合后, 注射到SMMC-LTNM裸鼠的肿瘤组织中, 每周2次, 持续2周, 4周后肿瘤体积减少了大约60%。2012年, Xia等^[59]构建了以果蝇*Zeste*基因增强子的人类同源物2(enhancer of *Zeste* homolog 2, *EZH2*)为靶点的miR-214表达载体pLL3.7-Pre-214, 转染肝癌细胞HLE和SK-HEP-1, 72 h后细胞生长分别减慢大约30%和25%, 侵袭细胞数均减少了大约50%, SK-HEP-1的集落形成数量减少了大约50%; 将稳定表达miR-214的SK-HEP-1细胞皮下注射到BALB/c裸鼠中, 8周后观察到肿瘤体积减少了大约70%。

3.1.3 感染携带miRNA基因的病毒载体 2009年, Kota等^[49]利用自身互补型腺相关病毒scAAV8构建了以细胞周期蛋白*Cyclin D2*和*Cyclin E2*为靶点的

miR-26a的腺相关病毒载体 scAAV8.miR-26a.eGFP, 将其通过尾静脉注射至小鼠体内, 恢复miR-26a的正常表达。在10例注射该病毒的小鼠中, 平均肝脏肿瘤负荷下降了大约65%, 其中2例转导效率低, 抑制效应不佳, 其他8例的肿瘤均被抑制, 有些甚至肉眼未能观察到肿瘤生长, 并且没有引起可见的正常肝细胞或其他正常组织细胞的死亡。研究发现, miR-26a抑瘤效应与其抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡密切相关。2010年, Liang等^[60]构建了表达以致癌基因 *LIN28B* 为靶点的 miR-125b 的慢病毒载体 lenti-miR-125b, 用其感染肝癌细胞 HepG2 和 Huh7 细胞 4 d 后, 细胞生长分别减慢了大约 20% 和 40%; 将稳定表达 miR-125b 的 Huh7 细胞注射到裸鼠皮下, 4 周后, 检测到肿瘤重量减少大约 65%。2011 年, Hou 等^[57]将表达以磷酸化酶基因 *PAK4* 为靶点的 miR-199a/b-3p 的腺相关病毒载体 AAV8-miR-199a/b-3p 通过尾静脉注射到 SMMC-LTNM 裸鼠体内, 一周 2 次, 持续 3 周, 4 周后, 肿瘤体积减少了大约 50%、AFP 水平下降了大约 45%; 并且通过尾静脉注射 AAV8-miR-199a/b-3p 到正常裸鼠体内, 2 个月 after 在肝脏中 miR-199a/b-3p 的表达水平仍然较高, 而且未引起不良反应。2012 年, Bi 等^[61]将表达以 *MMP11* 和血管内皮因子 A (vascular endothelial growth factor A, *VEGF-A*) 为靶点的 miR-125a 的慢病毒载体感染 HepG2 和 HCC-LM3, 4 d 后细胞生长减慢了大约 45%, 集落形成数量减少了大约 70%, 迁移的细胞数减少了大约 60%~70%, 侵袭的细胞数减少了大约 70%~80%; 将稳定表达 miR-125a 的 HepG2 或 HCC-LM3 细胞注射到裸鼠皮下, 4 周后检测到肿瘤重量减少了大约 60%; 此外, 注射稳定表达 miR-125a 的 HCC-LM3 细胞的裸鼠肺部和肝脏的转移灶数量分别减少了 75% 和 67%。2012 年, Hsu 等^[62]将构建的腺相关病毒载体 scAAV8.miR-122.eGFP 通过尾静脉注射至小鼠体内, 肝脏中的 miR-122 表达水平恢复到正常水平, 3 周后, 检测到肝脏肿瘤负荷减少了 32.3%。进一步研究发现, miR-122 抑制肿瘤的效应与抑制肿瘤细胞增殖有关, 而与细胞凋亡无关。

3.1.4 其他

近来研究发现, 在刺激作用下, 某些细胞表面脱落的微泡 (microvesicle, MV) 不同于细胞外泌体 (Exosome), 能介导膜交换和邻近细胞间蛋白和 RNA 的传递, 是细胞迅速适应不同环境所必需的。MV 在介导血小板、巨噬细胞和嗜中性粒细胞间相互协调凝血功能、释放细胞因子以产生炎症反应

和癌细胞扩散以导致肿瘤转移过程中, 发挥着重要的生理或病理作用^[63]。MV 介导的遗传信息的交流能够维持干细胞的可塑性, 诱导其向有益的细胞表型分化。MV 介导的特异性的 miRNA 和致病蛋白的传递在肿瘤发生和神经退行性疾病的发展中扮演重要角色^[64]。利用 MV 的特性, 可以将治疗性 miRNA 通过 MV 运送到肿瘤组织中发挥治疗作用。2012 年, Fonsato 等^[65]发现, 将成人肝干细胞 (human adult liver stem cell, HLSC) 分泌的微泡 (MV-HLSC) 与 HepG2 细胞一起孵育, 能够抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡。用高于生理浓度的 RNase 降解 MV-HLSC 中的 RNA 后, 其对肝癌细胞生长和凋亡的抑制作用明显减弱。进一步研究表明, 这是 MV-HLSC 携带的 miRNA 在发挥着重要作用。将 HepG2 细胞注射到 SCID 小鼠皮下成瘤后, 每周瘤内注射 100 μ g MVs, 持续 3 周, 肿瘤重量减轻了大约 70%。

3.2 基于人工 miRNA 的 HCC 基因治疗

骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 是一种非胶原、富含唾液酸的糖化磷酸蛋白, 在正常组织重建和恶性肿瘤发生、侵袭和转移中发挥重要作用。2008 年, Sun 等^[66]构建了 3 个以 OPN 为靶点的人工 miRNA 慢病毒载体 Lenti.OPNi-1、Lenti.OPNi-2、Lenti.OPNi-3 和无功能的对照载体 Lenti.OPNi-3M, 分别感染 HCC-LM3 细胞, 72 h 后 OPN 蛋白水平分别下降了 62%、78%、95% 和 9%; Lenti.OPNi-3 感染组 HCC-LM3 和 MHCC97 细胞生长减慢了大约 85% 和 70%; Lenti.OPNi-2、Lenti.OPNi-3 感染组 HCC-LM3 和 MHCC97 侵袭细胞数均减少了大约 70%。将感染了 Lenti.OPNi-2、Lenti.OPNi-3 的 HCC-LM3 细胞注射到裸鼠皮下, 6 周后, Lenti.OPNi-3 感染组的裸鼠中只有 50% 能检测到肿瘤, 而在其他组别的裸鼠都检测到较大块肿瘤 (>3 500 mm³); Lenti.OPNi-2 感染组和 Lenti.OPNi-3 感染组相对于 Lenti.OPNi-3M 感染组裸鼠肿瘤的肺部转移发生率分别为 66.7% 和 50%, 且肺部转移灶的数量减少了大约 91%。2011 年, Xiangji 等^[67]构建了以乙肝病毒表面抗原 (HBV surface antigen, HBsAg) 为靶点的人工 miRNA 的慢病毒表达载体 LVshHBS。用 LVshHBS 感染 HBV 稳定表达的肝癌细胞 HepG2.2.15, 能显著抑制 HBsAg 的 mRNA 和蛋白水平, 培养液中的 HBsAg 蛋白减少了 70%; 用感染了 LVshHBS 的 HepG2.2.15 细胞注射 BALB/c 裸鼠, 肿瘤生长明显减慢。

4 结论与展望

miRNA作为一种非编码RNA,在调控基因表达中起着重要的作用。HCC是由多种异常因素综合引起的恶性疾病,miRNA在HCC的发生发展中起着重要作用。目前的研究着重于miRNA的调控作用,但是其在HCC的发生发展中发生变化的作用机制研究则甚少。对于miRNA异常表达的调控机制的研究将能帮助人们更好地理解HCC发生发展的分子机制、提供新的治疗思路和方法。利用miRNA的特性进行的基因治疗已引起了科研工作者的广泛兴趣,基于miRNA的基因治疗有望成为治疗HCC的一种新的有效手段。目前,利用miRNA治疗HCC的研究仍处于实验阶段,虽然已经有了一些细胞体外和动物体内研究成果,但尚无临床实例。同时,基因治疗也存在着一些问题,诸如载体的传递效率、能否持久稳定表达、安全性等。因此,如何选择高效、安全的载体是利用miRNA治疗HCC需要考虑的首要问题。MV和Exosome是天然的细胞间各种信号分子交流的载体^[64],将可能作为输送治疗性天然或人工miRNA的载体,是未来研究的一个方向。随着生物医学技术的发展、研究经验的积累,基于miRNA的HCC基因治疗可望进入临床试验阶段,并最终用于治疗HCC患者。

参考文献 (References)

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64(1): 9-29.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 63(1): 11-30.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62(1): 10-29.
- Du Y, Su T, Ding Y, Cao G. Effects of antiviral therapy on the recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection or liver transplantation. *Hepat Mon* 2012; 12(10 HCC): e6031.
- Salhab M, Canelo R. An overview of evidence-based management of hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *J Cancer Res Ther* 2011; 7(4): 463-75.
- Lencioni R, Chen XP, Dagher L, Venook AP. Treatment of intermediate/advanced hepatocellular carcinoma in the clinic: How can outcomes be improved? *Oncologist* 2010; 15 Suppl 4: 42-52.
- Yuan Z, Syrkin G, Adem A, Geha R, Pastoriza J, Vrikshajanani C, et al. Blockade of inhibitors of apoptosis (IAPs) in combination with tumor-targeted delivery of tumor necrosis factor-alpha leads to synergistic antitumor activity. *Cancer Gene Ther* 2013; 20(1): 46-56.
- Shen J, Sun H, Xu P, Yin Q, Zhang Z, Wang S, et al. Simultaneous inhibition of metastasis and growth of breast cancer by co-delivery of twist shRNA and paclitaxel using pluronic P85-PEI/TPGS complex nanoparticles. *Biomaterials* 2013; 34(5): 1581-90.
- Chen Y, Wang G, Kong D, Zhang Z, Yang K, Liu R, et al. Double-targeted and double-enhanced suicide gene therapy mediated by generation 5 polyamidoamine dendrimers for prostate cancer. *Mol Carcinog* 2013; 52(3): 237-46.
- Chang Y, Li Y, Hu J, Guo J, Xu D, Xie H, et al. Adenovirus vector-mediated expression of TMEM166 inhibits human cancer cell growth by autophagy and apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett* 2013; 328(1): 126-34.
- Lemay CG, Rintoul JL, Kus A, Paterson JM, Garcia V, Falls TJ, et al. Harnessing oncolytic virus-mediated antitumor immunity in an infected cell vaccine. *Mol Ther* 2012; 20(9): 1791-9.
- 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(5): 843-54.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294(5543): 853-8.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294(5543): 858-62.
- Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294(5543): 862-4.
- Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005; 132(21): 4653-62.
- Iorio MV, Croce CM. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis* 2012; 33(6): 1126-33.
- 黄晓明, 陈翔, 贾振宇. 人工microRNAs在肿瘤基因治疗中的研究. *中国细胞生物学学报* (Huang Xiaoming, Chen Xiang, Jia Zhenyu. Progress of artificial microRNAs in cancer gene therapy. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(7): 1018-26.
- Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: Processing, maturation, target recognition and regulatory functions. *Mol Cell Pharmacol* 2011; 3(3): 83-92.
- Kunej T, Godnic I, Horvat S, Zorc M, Calin GA. Cross talk between microRNA and coding cancer genes. *Cancer J* 2012; 18(3): 223-31.
- Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PB, et al. MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. *Clin Cancer Res* 2010; 16(3): 867-75.
- Huang XH, Wang Q, Chen JS, Fu XH, Chen XL, Chen LZ, et al. Bead-based microarray analysis of microRNA expression in hepatocellular carcinoma: miR-338 is downregulated. *Hepatol Res* 2009; 39(8): 786-94.
- Wang Y, Lee AT, Ma JZ, Wang J, Ren J, Yang Y, et al. Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target. *J Biol Chem* 2008; 283(19): 13205-15.
- 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. *Oncogene* 2006; 25(17): 2537-45.
- 26 Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, *et al.* Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49(4): 1098-112.
- 27 Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, *et al.* MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor sUpSuppressor gene mutations. *Hepatology* 2008; 47(6): 1955-63.
- 28 Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler TA, Nagorney DM, Brackett DJ, *et al.* Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res* 2008; 14(2): 419-27.
- 29 Connolly E, Melegari M, Landgraf P, Tchikvskaya T, Tennant BC, Slagle BL, *et al.* Elevated expression of the miR-17-92 polycistron and miR-21 in hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype. *Am J Pathol* 2008; 173(3): 856-64.
- 30 Varnholt H, Drebbler U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, *et al.* MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47(4): 1223-32.
- 31 Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007; 39(5): 673-7.
- 32 Lin CJ, Gong HY, Tseng HC, Wang WL, Wu JL. miR-122 targets an anti-apoptotic gene, Bcl-w, in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 375(3): 315-20.
- 33 Fornari F, Gramantieri L, Giovannini C, Veronese A, Ferracin M, Sabbioni S, *et al.* MiR-122/cyclin G1 interaction modulates p53 activity and affects doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res* 2009; 69(14): 5761-7.
- 34 Xu J, Zhu X, Wu L, Yang R, Yang Z, Wang Q, *et al.* MicroRNA-122 sUpSuppresses cell proliferation and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma by directly targeting Wnt/beta-catenin pathway. *Liver Int* 2012; 32(5): 752-60.
- 35 Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, Calin GA, *et al.* MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2008; 27(43): 5651-61.
- 36 Gramantieri L, Fornari F, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, Calin GA, *et al.* MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality. *Clin Cancer Res* 2009; 15(16): 5073-81.
- 37 Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Ngankey A, *et al.* miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell* 2009; 16(6): 498-509.
- 38 Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res* 2010; 70(18): 7027-30.
- 39 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435(7043): 834-8.
- 40 Liu X, Fang H, Chen H, Jiang X, Fang D, Wang Y, *et al.* An artificial miRNA against HPSE sUpSuppresses melanoma invasion properties, correlating with a down-regulation of chemokines and MAPK phosphorylation. *PLoS One* 2012; 7(6): e38659.
- 41 Vannucci L, Lai M, ChiUppesi F, Ceccherini-Nelli L, Pistello M. Viral vectors: A look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol* 2013; 36(1): 1-22.
- 42 Yoshimura N, Kato R, Chancellor MB, Nelson JB, Glorioso JC. Gene therapy as future treatment of erectile dysfunction. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10(9): 1305-14.
- 43 Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012-an update. *J Gene Med* 2013; 15(2): 65-77.
- 44 Miele E, Spinelli GP, Miele E, Di Fabrizio E, Ferretti E, Tomao S, *et al.* Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: Challenges for cancer therapy. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 3637-57.
- 45 Di Matteo M, Belay E, Chuah MK, Vandendriessche T. Recent developments in transposon-mediated gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12(7): 841-58.
- 46 Guan YS, Liu Y, He Q, Li X, Yang L, Hu Y, *et al.* p53 gene therapy in combination with transcatheter arterial chemoembolization for HCC: One-year follow-up. *World J Gastroenterol* 2011; 17(16): 2143-9.
- 47 Yang ZX, Wang D, Wang G, Zhang QH, Liu JM, Peng P, *et al.* Clinical study of recombinant adenovirus-p53 combined with fractionated stereotactic radiotherapy for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136(4): 625-30.
- 48 Sangro B, Mazzolini G, Ruiz M, Ruiz J, Quiroga J, Herrero I, *et al.* A phase I clinical trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2010; 17(12): 837-43.
- 49 Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, *et al.* Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 2009; 137(6): 1005-17.
- 50 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391(6669): 806-11.
- 51 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411(6836): 494-8.
- 52 Maczuga P, Koornneef A, Borel F, Petry H, van Deventer S, Ritsema T, *et al.* Optimization and comparison of knockdown efficacy between polymerase II expressed shRNA and artificial miRNA targeting luciferase and apolipoprotein B100. *BMC Biotechnol* 2012; 12: 42.
- 53 Boudreau RL, Martins I, Davidson BL. Artificial microRNAs as siRNA shuttles: Improved safety as compared to shRNAs *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther* 2009; 17(1): 169-75.
- 54 McBride JL, Boudreau RL, Harper SQ, Staber PD, Monteys AM, Martins I, *et al.* Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: Implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(15): 5868-73.
- 55 Boden D, Pusch O, Silbermann R, Lee F, Tucker L, Ramratnam B. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(3): 1154-8.