

• 综 述 •

肝癌外泌体 miRNAs 研究进展

王秀芹,路其凤 综述,司元全[△]审校

(山东大学附属省立医院临床医学检验部,山东济南 250021)

摘 要:原发性肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,肝细胞癌(HCC)早期缺乏典型症状,一般不易诊断,超过 80% 的 HCC 患者在就诊时已处于中晚期。目前仍缺乏早期诊断 HCC 的生物标志物,且常规治疗方式效果不尽理想。因此,早期 HCC 的诊断迫切需要有效的、无创的、特异的生物标志物。此外,还需更多的治疗 HCC 的生物疗法。越来越多的外泌体 miRNAs 研究为 HCC 诊治提出了新的方向,其与 HCC 的发生、发展密切相关,在 HCC 诊治及预后评估等方面发挥着重要作用。因此,对 HCC 的诊治具有巨大的潜在价值。

关键词:肝肿瘤/诊断; 肝肿瘤/治疗; 预后; 微 RNAs; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.10.023

中图法分类号:R735.7;Q522

文章编号:1673-4130(2019)10-1248-04

文献标识码:A

Research progress of exocrine miRNAs of hepatic carcinoma

WANG Xiuqin, LU Qifeng, SI Yuanquan[△]

(Department of Clinical Laboratory, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan, Shandong 250021, China)

Abstract: Primary hepatic carcinoma is one of the most common malignant tumor, but the hepatocellular carcinoma(HCC) is lack of typical symptom in early stage, and the diagnosis is difficult, so more than 80% patients with HCC are in middle and advanced stage when diagnosis. Biomarkers for early diagnosis of HCC are still lacking, and more biological therapy for HCC is needed. The researches of exocrine miRNAs propose new direction for HCC treatment, the occurrence and development of HCC are closely related with miRNAs, which play an important role in diagnosis and prognosis of HCC, with enormous potential value.

Key words: liver tumor/diagnosis; liver tumor/treatment; prognosis; microRNAs; review

肝细胞癌(HCC)发病率在世界恶性肿瘤中居第 5 位,病死率位居第 3 位。我国 HCC 发病率和病死率分列所有恶性肿瘤的第 4 位和第 3 位,其预后差且复发风险高。目前,HCC 诊断标志物主要是甲胎蛋白(AFP)和异常凝血酶原 II(PIVKA II),前者在妊娠生理情况下或重型肝炎、肝硬化等良性疾病患者血清中也会升高。35%~40% 的原发性 HCC 患者血清 AFP 呈低水平升高,尤其是小 HCC,AFP 水平升高不明显,甚至正常^[1]。PIVKA II 检测结果影响因素较多,如凝血功能异常、肝硬化等均可引起其水平升高,这些因素可能会影响其对原发性肝癌的诊断^[2-3]。肝肿瘤切除术、肝移植、介入放射治疗和化疗栓塞仍是 HCC 治疗的主要选择。但其预后效果不理想。因此,早期 HCC 的诊断迫切需要有效的、灵敏的、特异的生物标志物。另外,HCC 治疗还需更多的、有效的生物疗法。有研究表明,外泌体 miRNAs 在 HCC 的发生、发展中发挥着重要作用,随着大量的相关研究成果的陆续出现,可以预见,外泌体 miRNAs 在 HCC 诊治方面将占有越来越重要的地位。本文总结了近

年来外泌体 miRNAs 与 HCC 之间关系的研究成果,以期更好地了解其在 HCC 诊治方面的功能和应用。

1 外泌体与外泌体 miRNAs 概述

外泌体是直径约为 30~150 nm、密度为 1.13~1.21 g/mL 的小囊泡,包含 RNA、蛋白质、miRNA、DNA 片段等多种成分。可存在于血液、唾液、尿液和母乳等体液中,包括肿瘤细胞在内的几乎所有类型细胞均可产生并释放外泌体^[4]。有研究表明,外泌体参与了细胞间信号传导,有望在多种疾病的早期诊断中发挥作用。

miRNAs 是一类内源性具有调控功能的非编码 RNA,其能与特定的目标信使 RNA(mRNA)的 3'非编码区结合,并在转录后水平引起靶 mRNA 的降解或抑制其翻译,从而对基因进行表达调控。近年来,miRNAs 在恶性肿瘤诊治方面的应用越来越多^[5]。有研究表明,miRNAs 不仅可作为 HCC 诊断和预后评估的敏感生物标志物,且还可用于 HCC 的治疗。外泌体 miRNAs 较单纯 miRNAs 在检测和治疗 HCC 方面更灵敏,且其稳定性较 miRNAs 大得多,因此,其

[△] 通信作者, E-mail: siyuanquan123@163.com。

本文引用格式:王秀芹,路其凤,司元全. 肝癌外泌体 miRNAs 研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(10): 1248-1251.

具有更重要的生物学特性。最近有研究表明,外泌体 miRNAs 参与了 HCC 的增生、凋亡、抑制等,同时,影响其侵袭、转移及预后,诱导免疫耐受及耐药性形成。HCC 外泌体可能通过不同种类 miRNAs 的异常表达间接调控 HCC 的致病机制,是影响 HCC 发病的最重要成分之一^[6]。

2 外泌体 miRNAs 在 HCC 发生、发展中的作用

有研究表明,多种外泌体 miRNAs 介导肿瘤与肿瘤微环境之间的生物信息传递,参与了 HCC 细胞增殖、转移、免疫逃逸等进程。

2.1 外泌体 miRNAs 与 HCC 细胞增殖 miR-122 是一种肝脏特异性抗增殖 miRNA,将人 HCC 细胞 Huh7 和 HepG2(miR-122 缺陷)共培养后,后者吸收培养液中外泌体 miR-122。miR-122 可有效抑制 HepG2 细胞靶 mRNA 的表达,并降低受体 HepG2 细胞的生长和增殖速度。且在 2 种细胞共培养过程中 HepG2 细胞分泌胰岛素样生长因子 1(IGF-1),减少 miR-122 在 Huh7 细胞中的表达。因此,2 种不同的 HCC 细胞之间存在相互影响,且这种相互作用是通过细胞间外泌体介导的 miR-122 转移来实现的^[7]。HCC 患者血清外泌体中的 miR-9-3P 水平明显降低,成纤维细胞生长因子 5(HBGF-5)在细胞增殖中具有重要作用,后者是 miR-9-3P 潜在的靶 mRNA,miR-9-3p 的过表达显著下调了 HBGF-5 在 mRNA 和蛋白水平的表达,进而影响了 HCC 细胞的存活率和增殖^[8]。最近有研究表明,在癌相关成纤维细胞(CAF)衍生的外泌体中 miR-320a 水平显著降低。体内外研究表明,miR-320a 可通过直接与下游靶——PBX3 结合而抑制 HCC 细胞增殖^[9]。miR-142 和 miR-223 存在于巨噬细胞内而 HCC 细胞内没有,有研究表明,HCC 细胞可摄取巨噬细胞所分泌的含 miR-142 和 miR-223 的外泌体,抑制 stathmin-1 和 IGF-1 的表达,进而抑制这些癌细胞的增殖^[10]。

2.2 外泌体 miRNAs 与 HCC 转移 HCC 介导的外泌体 miRNAs 能促进其局部扩散,诱导 HCC 肝内转移或多灶性生长。有研究表明,来自 HCC 细胞的外泌体 miRNAs 可调节转化生长因子 β 活化激酶-1 的表达和相关信号传导,并促进受体细胞的生长和侵袭^[11]。在另一项研究中外泌体 miR-335-5p 在体外抑制 HCC 细胞增殖和侵袭,并在体内诱导 HCC 萎缩^[12]。有研究表明,迁徙能力强的 HCC 细胞系的外泌体携带大量的 miRNAs,可显著提高非运动性细胞的迁移和侵袭能力^[13]。有研究使用丙型肝炎病毒 E2 包膜糖蛋白刺激肥大细胞后发现,刺激后外泌体内共计 19 个差异表达的 miRNAs,其中 miR-490 水平显著提高。后者可增加 HepG2 细胞 miR-490 水平,从而抑制 ERK1/2 通路进而最终抑制 HCC 的转移^[14]。临床资料显示,血清外泌体 miR-1247-3P 水平与 HCC 患者肺转移密切相关^[15]。

2.3 外泌体 miRNAs 与 HCC 肿瘤微环境 肿瘤微环境是指肿瘤的发生、发展与肿瘤细胞所处的内外环境具有密切的关系。肿瘤外泌体是介导局部和远处微环境中肿瘤细胞和基质细胞之间的细胞间通讯的关键介质^[16]。CHEN 等^[17]发现,外泌体 miRNAs 参与了由环境化学物质引起的 HCC 癌变过程中的细胞间信号传导,其中 miR-155 增强炎症反应,其表达水平与白细胞介素-6(IL-6)和 IL-8 呈正相关。CAFs 作为肿瘤微环境的一个重要组成部分,几乎与所有癌症疾病的发展过程相关,而外泌体 miRNAs 的异常调节促进了 CAFs 的产生和激活^[15,18]。最新研究表明,高转移的 HCC 细胞的外泌体 miR-1247-3p 可促进肺转移小窝的形成,从而诱导 CAFs 活化,加速了 HCC 的肺转移^[15]。ZHANG 等^[9]分离出 CAFs 及癌旁相关成纤维细胞(PAFs)发现,miR-320a 在 CAFs 及 HCC 细胞中表达水平较低,而在 PAFs 中表达水平相对较高,提示 CAFs 介导的 HCC 肿瘤进展与其外泌体中抗肿瘤 miR-320a 的缺失相关。

3 外泌体 miRNAs 与 HCC 诊断、预后评估及治疗

HCC 一般不易诊断,大多数 HCC 患者被确诊时已处于中晚期。目前,HCC 常规治疗方式效果不尽理想。因此,早期 HCC 的诊断迫切需要灵敏的、特异的生物标志物。此外,还需更多有效的治疗 HCC 的生物疗法及评估 HCC 患者预后的生物指标。有研究表明,外泌体 miRNAs 正是符合这一要求的理想标志物。

3.1 外泌体 miRNAs 与 HCC 诊断及预后评估 不同外泌体 miRNAs 在 HCC 血清或细胞培养液中表达可上调也可下降。有研究发现,HCC 患者血清外泌体 miR-665 水平明显高于健康受试者。HCC 血清外泌体 miR-665 水平与肿瘤大小、局部浸润、临床分期和生存时间均密切相关,血清外泌体 miR-665 水平越高,患者临床情况越差,表明血清外泌体 miR-665 可能是一种用于 HCC 诊断和判断预后的新的微创性生物标志物^[19]。另外,有研究表明,HCC 患者血清外泌体 miR-21 水平高于乙型肝炎患者和健康对照组,血清外泌体 miR-21 水平与肝硬化或晚期肿瘤的发生密切相关。尽管血清 miR-21 具有类似的结果,但检测灵敏度远低于血清外泌体 miR-21^[20]。另一项研究结果显示,HCC 患者血清外泌体 miR-18a、miR-221、miR-222、miR-224 水平显著高于慢性乙型肝炎(CHB)和肝硬化患者,但血清相关 miRNAs 水平在 HCC 组和对照组之间的差异较小^[21]。表明血清外泌体 miRNAs 与血清循环 miRNAs 水平相比,能更好地用于 HCC 的诊断及预后评估。此外,也有研究表明,HCC 外泌体 miRNAs 表达下降,HCC 患者血清外泌体 miR-101、miR-106b、miR-122、miR-195 较 CHB 和肝硬化患者表达水平显著降低^[21]。另外,HCC 患者血清外泌体中的 miR-9-3P 表达水平明显

低于健康对照组^[8]。另一项研究表明, HCC 患者血清外泌体 miR-638 与肿瘤大小、血管浸润、临床病理分期呈负相关, 外泌体 miR-638 表达降低常提示 HCC 患者预后不良^[22]。肝移植术后复发的 HCC 患者血清外泌体 miR-718 水平较未复发者低, miR-718 丢失与 HCC 预后不良有关^[23]。另一项研究表明, HCC 血清外泌体 miR-125b 表达水平与肿瘤数目和病理分期有关, 低水平 miR-125b HCC 患者常伴较短的复发时间和较低的总生存率。外泌体 miR-125b 可作为评估 HCC 患者预后的准确、有效的指标^[24]。总之, 血清外泌体 miRNAs 可作为判断 HCC 患者预后的新的生物标志物。

3.2 外泌体 miRNAs 与 HCC 治疗 外泌体 miRNAs 相关研究为癌症治疗提供了新的方向, 作为一种有效的抗 HCC 的免疫治疗方式, 理论上减少了潜在的不良反应。脂肪源性间充质干细胞 (AMSC) 可稳定产生外泌体, 后者表现出有效的免疫活性^[25]。miR-122 是影响肝脏发育和代谢功能的关键因素, 其缺失与 HCC 密切相关^[26]。将表达 miR-122 质粒转染至 AMSC, 收集 AMSC 产生的外泌体 (122-EXO) 并加入到受体 HCC 细胞 (HepG2) 中。结果显示, miR-122 转染的 AMSC 能有效产生富含 miR-122 的外泌体, 通过改变 HCC 细胞中 miR-122 靶基因的表达而使癌细胞对化疗药物敏感。此外, 瘤内注射 122-EXO 可显著提高索拉非尼在体内对 HCC 的抗肿瘤作用^[27]。正如前文所述, 星状细胞衍生的外泌体 miRNA (如 miR-335-5p) 可在体内递送诱导 HCC 萎缩; CAF 衍生的外泌体中 miR-320a 抑制 HCC 进展。这均为 HCC 提供了新的治疗方案^[9,12]。治疗 HCC, 除直接将抑制肿瘤外泌体 miRNAs 转移至 HCC 细胞外, 还可用外泌体 miRNAs 调节肿瘤微环境。具体而言, CAFs、免疫细胞或肿瘤内皮细胞均可由外泌体 miRNAs 调控。T 淋巴细胞衍生的外泌体 miRNAs (主要是 miR-92a) 可在抗原呈递细胞中发挥功能, 促进免疫应答^[28]。调节性 T 淋巴细胞将外泌体 miRNAs 转移至辅助性 T 淋巴细胞, 其中外泌体 Let-7d 有助于抑制和预防全身性疾病^[29]。因此, 外泌体 miRNAs 可作为 HCC 的潜在免疫治疗方式。

4 面临的问题

如前文所述, 外泌体 miRNAs 在 HCC 诊疗及预后评估方面均具有重要的应用价值, 但也存在一些问题。首先是外泌体提纯问题: 当前外泌体提纯方法 (试剂) 多种多样, 提取的数量和质量效果均存在差异, 目前公认的分选方法依然是超速离心法, 但该方法耗时长且缺乏较统一的标准。此外, 用于分离外泌体的试剂非常昂贵。因此, 建立低成本且节省时间的分离和纯化方法是非常必要的。

其次在外泌体 miRNAs 用于 HCC 诊断及预后评估方面: 对同一种外泌体 miRNA 不同的研究有不同

的结论。一方面是由于研究中所包含的研究对象数量不够; 另一方面是研究对象之间的个体差异较大, 导致后续的生物信息学检测结果也可能发生变化。因此, 在分析 HCC 外泌体 miRNAs 的差异表达时研究者必须考虑各种因素, 如年龄、性别、病毒感染和疾病的所处阶段。以后应检测更多的包括 HCC 各阶段的样本来提高血清外泌体 miRNAs 测定结果的可靠性, 使其真正成为 HCC 诊断及预后评估的稳定、准确的生物标志物。

最后在其用于 HCC 治疗方面: 正如前文所述, 外泌体 miRNAs 介导的 HCC 治疗首先应保证足够数量和优质质量的外泌体; 此外, 将所期望的 miRNAs 结合到外泌体中仍是一个挑战。除将表达过量 miRNAs 的质粒转染至供体细胞外^[27], 也可通过电穿孔方式实现将 miRNAs 转至外泌体中^[30]; 另一个有待解决的关键问题是如何提高受体细胞摄取包含所需 miRNAs 外泌体的能力。相关研究表明, 在转染液泡分选蛋白 4A (Vps4A) 过表达质粒的 SMMC-7721 细胞中, 6 种抑制肿瘤 miRNAs 显著上调, Vps4A 增强了 HCC 细胞中外泌体对肿瘤抑制 miRNAs 的摄取^[31]。总之, 外泌体 miRNAs 用于 HCC 治疗前景广阔, 但临床应用尚有待于进一步研究。

综上所述, 外泌体 miRNAs 不仅有助于 HCC 的早期诊断和预后评价, 还可作为一种新的治疗模式。但目前对外泌体 miRNAs 的相关研究仍处于探索阶段, 为更全面地弄清外泌体 miRNAs 与 HCC 的关系尚需更深层次的研究。随着外泌体 miRNAs 研究的不断深入, 其在 HCC 的诊治及预后评估中将会发挥越来越重要的作用。

参考文献

- [1] AFSHAR M, FLETCHER P, BARDOLI A D, et al. Non-secretion of AFP and neutrophil lymphocyte ratio as predictors for survival in hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib: a large UK cohort[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(24): 16988-16995.
- [2] DAUTI F, HJALTALIN JONSSON M, HILLARP A, et al. Perioperative changes in PIVKA-II[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2015, 75(7): 562-567.
- [3] HIRAOKA A, ISHIMARU Y, KAWASAKI H, et al. Tumor markers AFP, AFP-L3, and DCP in hepatocellular carcinoma refractory to transcatheter arterial chemoembolization[J]. *Oncology*, 2015, 89(3): 167-174.
- [4] RAPOSO G, STOORVOGEL W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends[J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(4): 373-383.
- [5] HUANG J Y, ZHANG K, CHEN D Q, et al. MicroRNA-451: epithelial-mesenchymal transition inhibitor and prognostic biomarker of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(21): 18613-18630.

- [6] LI S, YAO J, XIE M, et al. Exosomal miRNAs in hepatocellular carcinoma development and clinical responses[J]. J Hematol Oncol, 2018, 11(1): 54.
- [7] BASU S, BHATTACHARYYA S N. Insulin-like growth factor-1 prevents miR-122 production in neighbouring cells to curtail its intercellular transfer to ensure proliferation of human hepatoma cells[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(11): 7170-7185.
- [8] TANG J, LI Y, LIU K, et al. Exosomal miR-9-3p suppresses HBGF-5 expression and is a functional biomarker in hepatocellular carcinoma[J]. Minerva Med, 2018, 109(1): 15-23.
- [9] ZHANG Z, LI X, SUN W, et al. Loss of exosomal miR-320a from cancer-associated fibroblasts contributes to HCC proliferation and metastasis[J]. Cancer Lett, 2017, 397: 33-42.
- [10] AUCHER A, RUDNICKA D, DAVIS D M. MicroRNAs transfer from human macrophages to hepato-carcinoma cells and inhibit proliferation[J]. J Immunol, 2013, 191(12): 6250-6260.
- [11] KOGURE T, LIN W L, YAN I K, et al. Intercellular Nanovesicle-Mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth[J]. Hepatology, 2011, 54(4): 1237-1248.
- [12] WANG F, LI L, PIONTEK K, et al. Exosome miR-335 as a novel therapeutic strategy in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2018, 67(3): 940-954.
- [13] HE M, QIN H, POON T C, et al. Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs[J]. Carcinogenesis, 2015, 36(9): 1008-1018.
- [14] XIONG L, ZHEN S, YU Q, et al. HCV-E2 inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by stimulating mast cells to secrete exosomal shuttle microRNAs[J]. Oncol Lett, 2017, 14(2): 2141-2146.
- [15] FANG T, LV H, LV G, et al. Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 191.
- [16] TURLEY S J C V, ASTARITA J L. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment[J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(11): 669-682.
- [17] CHEN C, LUO F, LIU X L, et al. NF-kappa B-regulated exosomal miR-155 promotes the inflammation associated with arsenite carcinogenesis[J]. Cancer Lett, 2017, 388: 21-33.
- [18] GASCARD P, TLSTY T D. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy[J]. Genes Dev, 2016, 30(9): 1002-1019.
- [19] QU Z, WU J, WU J, et al. Exosomal miR-665 as a novel minimally invasive biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis and prognosis[J]. Oncotarget, 2017, 8(46): 80666-80678.
- [20] WANG H, HOU L, LI A, et al. Expression of serum exosomal microRNA-21 in human hepatocellular carcinoma[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 864894.
- [21] SOHN W, KIM J, KANG S H, et al. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. Exp Mol Med, 2015, 47: e184.
- [22] SHI M, JIANG Y, YANG L, et al. Decreased levels of serum exosomal miR-638 predict poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(6): 4711-4716.
- [23] SUGIMACHI K, MATSUMURA T, HIRATA H, et al. Identification of a bona fide microRNA biomarker in serum exosomes that predicts hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation[J]. Br J Cancer, 2015, 112(3): 532-538.
- [24] LIU W, HU J, ZHOU K, et al. Serum exosomal miR-125b is a novel prognostic marker for hepatocellular carcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 3843-3851.
- [25] YEO R W, LAI R C, ZHANG B, et al. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65(3): 336-341.
- [26] TSAI W C, HSU S D, HSU C S, et al. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis[J]. J Clin Invest, 2012, 122(8): 2884-2897.
- [27] LOU G, SONG X, YANG FA, et al. Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma[J]. J Hematol Oncol, 2015, 8: 122.
- [28] MITTELBRUNN M, GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ C, VILLARROYA-BELTRI C, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells[J]. Nat Commun, 2011, 2: 282.
- [29] OKOYE I S, COOMES S M, PELLY V S, et al. MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells[J]. Immunity, 2014, 41(1): 89-103.
- [30] ALVAREZ-ERVITI L, SEOW Y, YIN H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(4): 341-345.
- [31] WEI J X, LV L H, WAN Y L, et al. Vps4A functions as a tumor suppressor by regulating the secretion and uptake of exosomal MicroRNAs in human hepatoma cells[J]. Hepatology, 2015, 61(4): 1284-1294.

(收稿日期: 2018-10-21 修回日期: 2019-02-11)