

非编码 RNA 在胆管恶性肿瘤的研究进展

胡 晟 邹 浩 周 磊 邱岚茜 张小文

摘 要 胆管恶性肿瘤是侵袭性较强的恶性肿瘤,包括胆囊癌和肝胆管癌,预后极差,手术切除仍是主要的治疗方法。然而,即使在根治性手术后,仍有许多患者复发。微 RNA (microRNA, miRNA) 是一种长度为 19 ~ 23 个核苷酸大小的内源性非编码 RNA,在转录水平和转录后调控基因表达。近年来的大量研究表明,miRNA 与胆管恶性肿瘤之间存在密切联系。本综述主要介绍 miRNA 在胆管恶性肿瘤中的作用和重要性。

关键词 miRNA 胆管恶性肿瘤 癌基因 综述文献

中图分类号 R6 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.01.002

胆管恶性肿瘤 (biliary tract cancers, BTCs) 预后较差,其特点是早期侵犯淋巴结和全身转移^[1]。这类疾病包括胆囊癌 (gallbladder cancer, GBC) 和胆管癌 (cholangiocarcinoma, CCA),分为肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, iCCA) 和肝外胆管癌 (extrahepatic cholangiocarcinoma, eCCA)。目前,手术切除仍是治疗 BTCs 的主要方法,辅助性放化疗并不是这些恶性肿瘤的首选。此外,在行根治性手术后许多患者仍会复发,复发或转移性 BTCs 患者的预后通常较差。因此,有必要对 BTCs 潜在生物学标志物进行进一步的研究,以便对 BTCs 行早期诊断、进行综合性治疗及判断患者预后。最近的研究已经将微 RNA (microRNA, miRNA) 描述为某些恶性肿瘤的潜在生物学标志物。然而,miRNA 的表达及其如何对 BTCs 的诊断、预后和治疗产生影响的机制尚未清楚。虽然 miRNA 是一种非编码小 RNA (19 ~ 23 个核苷酸),但其在调控大量重要的生物学功能方面发挥了重要作用,研究 miRNA 有利于 BTCs 的诊断、预后和治疗。miRNA 通过与 mRNA 3' 非编码区 (3'UTRs) 的结合调控并表达特异的靶基因,这些表达对于不同类型的恶性肿瘤的疾病发展起着至关重要的作用,包括肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡、迁移和侵袭。

一、miRNA 的调控机制及其靶向基因

目前有关 miRNA 生物起源和成熟的研究模型表明,该过程首先在细胞核中进行,然后在细胞质中进

行^[2]。miRNA 的生物起源的最关键一步是 miRNA 的前体 pri-miRNA 的形成,通常由 RNA 聚合酶 II 转录生成,其长度一般为几千个核苷酸^[3]。尽管如此, pri-miRNA 通常包含 4 个尿嘧啶,其转录过程将被转录酶 III 终止。由核糖核酸酶 III 催化,促使 pre-miRNA 分裂,形成了由 70 个核苷酸左右组成的前体 miRNA (pre-miRNA)。由于双链 RNA 结合域 (dsRBD) 和狄乔治氏相关蛋白 8 抗体 (DGCR8) 蛋白的作用,所以 pri-miRNA 转化为 pre-miRNA 的过程是高效的。随后, pre-miRNA 通过结合一个称为输出蛋白 5 的核出口因子,将前 miRNA 运输到细胞质中,并在 Dicer 酶的催化下形成成熟的双链 miRNA^[4]。该成熟 miRNA 的功能链主要参与 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 的形成,它通过降解相应的 mRNA 或抑制编码蛋白的合成,对靶基因的表达产生负性作用。通过 miRNA 和 mRNA 的靶向基因 3UTR 近乎完美的碱基互补,转录后的基因可以保持沉默^[5]。

尽管 miRNA 的生物起源已越来越确定,但其潜在的调控机制仍然不太清楚^[6]。大量的研究证据表明,miRNA 表达的调控机制包括转录解控、表观遗传学改变、突变、DNA 复制异常以及 miRNA 在其生物起源中存在的缺陷,这些机制可能与人类癌症中 miRNA 的解控机制密切相关^[7]。此外,研究的重点是 miRNA 表达的表观遗传学改变和甲基化和组蛋白修饰对 miRNA 的表达,这两者都是表观遗传基因调控的标志^[8]。例如,在胆管癌 (cholangiocarcinoma, CCA) 细胞中,miR-370 作为一种抑癌基因可抑制原癌基因的致敏蛋白激酶 8 (MAP3K8)^[9]。此外,白介素-6 (IL-6) 过表达 CCA 通过 DNA 超甲基化降低

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81760430)

作者单位:650101 昆明医科大学第二附属医院肝胆胰外科 (胡晟、邹浩、张小文),分子临床医学研究院 (周磊),微创介入科 (邱岚茜)

通讯作者:张小文,电子信箱:zhangxiaowenlu@hotmail.com

miR-370 表达,同时恢复 MAP3K8 表达,这有助于肿瘤细胞生长,促进 CCA 的进展。另一项研究表明,miR-370 的免疫球蛋白-二甲基甲酰胺(IG-DMR)表达反应了 IL-6 在人类 CCA 诱导的高甲基化调控^[10]。

据报道,几种转录因子通过与 miRNA 的调控区域结合,促进 miRNA 的转录进而促进 miRNA 的表达。例如,螺旋-环-螺旋型亮氨酸的转录因子(c-Myc)的表达增加,可以直接结合 miR-17 的调控区域来促进 miRNA 的表达^[11]。miRNA 的上调可能是由于扩增、转录因子的失调和 CpG 岛在人类癌症特异性 miRNA 基因启动子区域的脱甲基作用。此外,单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNPs)普遍存在于 miRNA 基因中,可以调节 miRNA 的数量使其具有多种功能,这可能与肿瘤的发生和发展有密切关系^[12]。

miRNA 可以作为肿瘤致癌基因或抑癌基因,这在很大程度上取决于其靶基因的作用。一个 miRNA 可以调节许多不同的靶 mRNA,相反地,几个不同的 miRNA 可以对一个目标 mRNA 进行联合调控。因此,miRNA 及其靶向基因将形成复杂的调控网络。在癌症中上调的 miRNA 可作为肿瘤致癌基因,通过抑制抑癌基因的表达和抑制参与细胞增殖或凋亡的基因来促进癌症的发生,而下调的 miRNA 可作为肿瘤抑癌基因从而抑制癌症的发生。最近,越来越多的研究者对癌症潜在的基因变异进行了深入研究,例如癌基因和抑癌基因在人类 BTCs 发病机制中的作用^[13]。

二、miRNA 在胆管恶性肿瘤中的作用及临床意义

根据目标 mRNA 的作用,大量解控的 miRNA 被归类为原癌基因 miRNA 和抑癌基因 miRNA。在 BTCs 中,研究较为透彻的 miRNA 是 hsa-miR-21,它通常被认为是一种原癌基因 miRNA,因为它的过表达与肿瘤细胞的侵袭和转移有关^[14]。Liu 等^[15]观察到 hsa-miR-21 在过表达后可显著促进肿瘤细胞迁移、侵袭并能够将其转化为 CCA 细胞系(QBC939 和 RBE)。此外,在 hsa-miR-21 过表达后可表现出 E-cadherin 表达减少、N-cadherin 和波形蛋白表达增加。因此,hsa-miR-21 可诱导 CCA 的上皮细胞间质化(EMT)。在这一过程中,上皮细胞失去了细胞极性和细胞黏附功能,这可能是由于 E-cadherin 表达的减少,使得细胞可以迁移和侵袭周围组织;E-cadherin 表达减少或缺失在肿瘤的侵袭和转移过程中起着关键的作用。

相似的,miRNA 的异常表达同样能诱导 EMT 并增强 GBC 细胞的迁移能力。Bao 等^[16]报道 hsa-miR-101 过表达可抑制 GBC 细胞的增殖、迁移和侵袭,诱导 E-cadherin 和 β -catenin 的表达增加,并导致波形蛋白表达减少。此外,研究者发现 hsa-miR-101 的下调与肿瘤直径、侵袭、淋巴结转移、TNM 分期以及 GBC 患者的生存率低有关。这些结果表明,hsa-miR-101 在 GBC 中发挥了抑癌基因作用,减弱了 EMT 和细胞转移。

越来越多的研究表明 hsa-miR-146b-5p 具有重要的抑癌作用^[17]。与邻近的非肿瘤组织相比,GBC 组织的 hsa-miR-146b-5p 基因表达明显下调。此外,SGC-996 GBC 细胞系中 hsa-miR-146b-5p 的过表达可抑制细胞的生长、加速细胞凋亡、抑制 G1 期细胞生长。然而,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)作为一种结合表皮生长因子(可诱导细胞增殖)的细胞表皮蛋白,其过量表达可逆转 hsa-miR-146b-5p 抑制细胞增殖的能力。此外,hsa-miR-146b-5p 的表达水平与肿瘤的直径和肿瘤的进展有显著的相关性^[18]。

最近的研究已经将 hsa-miR-135a-5p 描述为具有抑癌作用的一类基因^[19]。在 GBC 中,Zhou 等^[20]发现,与邻近的非肿瘤胆囊组织相比,hsa-miR-135a-5p 在肿瘤组织中的表达明显下调,特别是在Ⅲ级和Ⅳ级肿瘤中。hsa-miR-135a-5p 抑制 GBC 细胞在 G₁/S 期的增殖和复制能力,这些研究提示 hsa-miR-135a-5p 可能抑制 GBC 细胞的增殖。

三、miRNAs 作为胆管恶性肿瘤的生物学标志物

在 CCA 患者血清中 miRNA-106a 表达明显降低,与良性胆管疾病(benign biliary tract disease, BBD)和健康人群相比差异明显,miRNA-106a 下调与肿瘤淋巴结转移和患者预后不佳密切相关。值得注意的是,miRNA-106a 的血清表达水平逐渐下降,在健康个体中表达最高,在 BBD 患者中表达中等,在 CCA 患者中表达最低。

Meng 等^[21]描述了一种可作为胆管癌生物学标志物的 miRNA,他们发现 miR-21 和 miR-200b 与吉西他滨的敏感度或耐药性有关。目前已有各种文献报道了循环 miRNA 在 BTCs 中诊断和预后潜在的临床价值,大多数 miRNA 在 CCA 中表达,而在 GBC 和壶腹腺癌中表达较少。Li 等^[22]分析了 GBC 患者循环 miRNA 的表达,发现 miR-21、miR-187 和 miR-202 上调;相比之下,在 GBC 患者和健康对照

组($P < 0.05$)之间,miR-143和miR-335下调($P < 0.05$),在组织和血液样本中出现一致的表达。此外,3种miRNA(miR-187、miR-143、miR-202)和淋巴转移的差异表达之间存在显著的关系,miR-21的过表达更与TNM分期的进程密切相关,这意味着临床医师可以联合利用CA19-9和miR-21来鉴别诊断BTCs和健康人群。术后循环miR-21表达下降。此外,miR-21在人的CCA组织和细胞系中均呈过度表达,其敏感度和特异性分别为95%和100%,足以区分CCA与正常组织^[23]。

Plieskatt等^[24]对iCCA肿瘤组织中的miRNA表达水平进行了综合分析,发现8个miRNA(miR-483-5p、miR-505-3p、miR-874、miR-885-5p、miR-320b、miR-92b-3p、miR-1275和miR-1307-3p)的表达仅在iCCA患者血浆样本中检测出,而未在对照组血浆中检测出。此外,肿瘤组织中异常的miRNA表达与在血浆中观察到的不相符,其中有15个高度管制的miRNA仅在肿瘤组织样本中检测到。故血浆中的这个表达谱可以作为早期诊断iCCA的生物学标志物。Wang等^[25]研究了miRNA在肿瘤组织和对照血浆样本中的表达,发现miR-150表达显著,在ICC血浆患者中上调,在肿瘤组织中观察到在组织中下调的相反结果。miR-150表达水平与患者年龄、性别和肿瘤分期比较,差异无统计学意义。

Huang等发现miR-224在血清中明显上调,与健康对照组相比CCA患者肿瘤组织中miR-224也有明显地上调。此外,以miR-224干预人类CCA细胞系可增强细胞生长、侵袭性和迁移能力。Kojima等研究了大量的BTCs和胃肠道肿瘤病例,他们发现,66个miRNA在测试队列中比较差异有统计学意义,其中30个miRNA被上调,36个miRNA在BTCs中下调。在BTCs和健康组的比较中,miR-125a-3p和miR-6893-5p的表达表现出最小的 P 值。同时,Que等对壶腹癌(ampullary carcinoma, AC)中部分循环miRNA的表达进行了评价,选取了与胰腺腺癌(pancreatic adenocarcinoma, PA)相关的4个miRNA(miR-17-5p、miR-21、miR-155和miR-196a),以评价血清体外miRNA水平。PA患者与AC患者的miR-21和miR-17-5p的表达水平比较,差异无统计学意义,此外这些miRNA在AC中的表达往往高于健康对照组。根据这些结果,所选的miRNA对胰腺癌和BTCs比较,差异均无统计学意义。

Cheng等的另一项研究发现,与BBD患者或健

康对照组相比,CCA患者的循环miR-106a下调。此外,CCA患者血清miR-21表达水平高于BBD对照组。利用血清miR-106a的曲线面积(area under the curve, AUC)从健康对照组区分CCA患者为0.89;该标记的敏感度和特异性分别为81.6%和85.0%。这一结果的敏感度和特异性比血清CA19-9要高。与此同时,血清样本中miR-106a的下调与CCA患者的淋巴结转移和预后不佳有关。

四、展 望

miRNA具有巨大的科学和临床意义,目前越来越清楚地认识到这种非编码RNA是导致恶性肿瘤的一个主要因素。miRNA不仅提示了作为BTCs新的治疗靶点,并且利于我们更多地了解导致BTCs细胞癌变的病理过程。miRNA通过直接转录抑制已知的肿瘤抑制基因,直接促进肿瘤细胞的增殖和侵袭性,是一种强有力的致癌基因。miRNA不仅能在细胞增殖、分化和凋亡等方面发挥重要的作用,而且还能作为癌基因、肿瘤抑制物、新生物学标志物在诊断和预后中发挥作用,以及在BTCs中作为化疗耐药的增强剂。此外,miR-21、miR-187、miR-143和miR-202的表达与肿瘤进展和淋巴转移之间存在显著的关系。综上所述,这些研究反映出miRNA可作为临床应用的潜在生物学标志物,用于BTCs的早期诊断及判断其预后。因此利用miRNA作为早期诊断性生物学标志物可能是改善BTCs患者预后的一个有效手段。然而,迄今为止很少有研究明确指出在miRNA在BTCs患者中的意义。故目前仍需要更多研究数据来确定哪些miRNA可作为BTCs的潜在治疗靶点或诊断和预后生物学标志物,所以进一步研究循环miRNA在BTCs患者中的意义仍是以后科研及临床的迫切需求。

参考文献

- 1 Yoo KH, Kim NK, Kwon WI, *et al.* Genomic alterations in biliary tract cancer using targeted sequencing [J]. *Translat Oncol*, 2016, 9(3): 173-178
- 2 Chen Y, Liu D, Liu P, *et al.* Identification of biomarkers of intrahepatic cholangiocarcinoma via integrated analysis of mRNA and miRNA microarray data [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(3): 1051-1056
- 3 Li Z, Shen J, Chan MT, *et al.* The role of microRNAs in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(1): 177-184
- 4 Tekcham DS, Tiwari PK. Non-coding RNAs as emerging molecular targets of gallbladder cancer [J]. *Gene*, 2016, 588(1): 79-85
- 5 Esparza-Baquer A, Labiano I, Bujanda L, *et al.* MicroRNAs in cholangiopathies: Potential diagnostic and therapeutic tools [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2016, 40(1): 15-27

(下转第10页)

- 14 Petrache Voicu SN, Dinu D, Sima C, *et al.* Silica nanoparticles induce oxidative stress and autophagy but not apoptosis in the MRC – 5 cell line [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12):29398 – 29416
- 15 张力. 单组分纳米材料在癌症诊断和细胞自噬介导的癌症治疗中的应用研究 [D]. 合肥:中国科学技术大学, 2013
- 16 Lin J, Huang Z, Wu H, *et al.* Inhibition of autophagy enhances the anticancer activity of silver nanoparticles [J]. *Autophagy*, 2014, 10(11):2006 – 2020
- 17 Polyak K, Haviv I, Campbell IG. Co – evolution of tumor cells and their microenvironment [J]. *Trends Genet*, 2009, 25(1):30 – 38
- 18 Song M, Liu T, Shi C, *et al.* Bioconjugated manganese dioxide nanoparticles enhance chemotherapy response by priming tumor – associated macrophages toward M1 – like phenotype and attenuating tumor hypoxia [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(1):633 – 647
- 19 Miao L, Wang Y, Lin CM, *et al.* Nanoparticle modulation of the tumor microenvironment enhances therapeutic efficacy of cisplatin [J]. *J Control Release*, 2015, 217:27 – 41
- 20 He C, Jiang S, Jin H, *et al.* Mitochondrial electron transport chain identified as a novel molecular target of SPIO nanoparticles mediated cancer – specific cytotoxicity [J]. *Biomaterials*, 2016, 83:102 – 114
- 21 Baharara J, Namvar F, Mousavi M, *et al.* Anti – angiogenesis effect of biogenic silver nanoparticles synthesized Using Saliva officinalis on chickchorioalantoic membrane (CAM) [J]. *Molecules*, 2014, 19(9):13498 – 13508
- 22 Pan Y, Wu Q, Qin L, *et al.* Gold nanoparticles inhibit VEGF165 – induced migration and tube formation of endothelial cells via the Akt pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:1 – 11
- 23 Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, BarathManiKanth S, *et al.* Gold nanoparticles inhibit vascular endothelial growth factor – induced angiogenesis and vascular permeability via Src dependent pathway in retinal endothelial cells [J]. *Angiogenesis*, 2011, 14(1):29 – 45
- 24 Yao MY, Ma L, Li LH, *et al.* A new modality for cancer treatment – nanoparticle mediated microwave induced photodynamic therapy [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2016, 12(10):1835 – 1851
- 25 Long D, Niu M, Tan L, *et al.* Ball – in – ball ZrO2 nanostructure for simultaneous CT imaging and highly efficient synergic microwave ablation and tri – stimuli – responsive chemotherapy of tumors [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(25):8834 – 8847

(收稿日期:2018 – 04 – 02)

(修回日期:2018 – 04 – 24)

(上接第 6 页)

- 6 Liu XF, Tang K, Sui LL, *et al.* Cholangiocarcinoma: present status and molecular aspects of diagnosis [J]. *Oncol Res*, 2014, 22(4):177 – 183
- 7 Wang N, Xia S, Chen K, *et al.* Genetic alteration regulated by microRNAs in biliary tract cancers [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2015, 96(2):262 – 273
- 8 Li Z, Yu X, Shen J, *et al.* MicroRNA expression and its implications for diagnosis and therapy of gallbladder cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(16):13914 – 13921
- 9 Piontek K, Selaru FM. MicroRNAs in the biology and diagnosis of cholangiocarcinoma [J]. *Semin Liver Dis*, 2015, 35(1):55 – 62
- 10 Nakaoka T, Saito Y, Saito H. Aberrant DNA methylation as a biomarker and a therapeutic target of cholangiocarcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6):1111 – 1121
- 11 Ma MZ, Zhang Y, Weng MZ, *et al.* Long noncoding RNA GCASPC, a target of miR – 17 – 3p, negatively regulates pyruvate carboxylase – dependent cell proliferation in gallbladder cancer [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(18):5361 – 5371
- 12 Kazmi HR, Chandra A, Kumar S, *et al.* A let – 7 microRNA binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with increased risk and reduced survival for gallbladder cancer in North Indian population [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(12):2577 – 2583
- 13 Rizvi S, Gores GJ. Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2013, 145(6):1215 – 1229
- 14 Liu CH, Huang Q, Jin ZY, *et al.* miR – 21 and KLF4 jointly augment epithelialmesenchymal transition via the Akt/ERK1/2 pathway [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(4):1109 – 1115
- 15 Liu Z, Jin ZY, Liu CH, *et al.* MicroRNA – 21 regulates biological behavior by inducing EMT in human cholangiocarcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5):4684 – 4694
- 16 Bao RF, Shu YJ, Hu YP, *et al.* miR – 101 targeting ZFX suppresses tumor proliferation and metastasis by regulating the MAPK/Erk and Smad pathways in gallbladder carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(16):22339 – 22354
- 17 Wu PY, Zhang XD, Zhu J, *et al.* Low expression of microRNA – 146b – 5p and microRNA – 320d predicts poor outcome of large B – cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone [J]. *Human Pathol*, 2014, 45(8):1664 – 1673
- 18 Cai J, Xu L, Cai Z, *et al.* MicroRNA – 146b – 5p inhibits the growth of gallbladder carcinoma by targeting epidermal growth factor receptor [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1):1549 – 1555
- 19 Lin KY, Ye H, Han BW, *et al.* Genome – wide screen identified let – 7c/miR – 99a/miR – 125b regulating tumor progression and stem – like properties in cholangiocarcinoma [J]. *Oncogene*, 2016, 35(26):3376 – 3386
- 20 Zhou H, Guo W, Zhao Y, *et al.* MicroRNA – 135a acts as a putative tumor suppressor by directly targeting very low density lipoprotein receptor in human gallbladder cancer [J]. *Cancer Sci*, 2014, 105(8):956 – 965
- 21 Meng F, Henson R, Lang M, *et al.* Involvement of human micro – RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines [J]. *Gastroenterol*, 2006, 130(7):2113 – 2129
- 22 Li G, Pu Y. MicroRNA signatures in total peripheral blood of gallbladder cancer patients [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(9):6985 – 6990
- 23 Silakit R, Loilome W, Yongvanit P, *et al.* Urinary microRNA – 192 and microRNA – 21 as potential indicators for liver fluke – associated cholangiocarcinoma risk group [J]. *Parasitol Int*, 2017, 66(4):479 – 485
- 24 Plieskatt J, Rinaldi G, Feng Y, *et al.* A microRNA profile associated with opisthorchis viverrini – induced cholangiocarcinoma in tissue and plasma [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15:309 – 324
- 25 Wang S, Yin J, Li T, *et al.* Upregulated circulating miR – 150 is associated with the risk of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(2):819 – 825

(收稿日期:2018 – 03 – 27)

(修回日期:2018 – 04 – 12)