



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2021.01.022

http://www.lcnkz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2021.01.022

外泌体源性的微小 RNA 在肝癌中的研究进展

赵琛 张允历 徐岷

[摘要] 肝癌是常见的恶性消化道肿瘤,外泌体是由各种体液分泌的膜性囊泡,其中包含有脂质、核酸、微小 RNA、长链非编码 RNA 等多种物质。外泌体包裹下的 miRNA 拥有更好的生物稳定性。研究发现肿瘤细胞较正常细胞能分泌更多的外泌体,肿瘤细胞来源的外泌体中 miRNA 在肿瘤的进展、转移、耐药等多个方面起重要作用。本文阐述了外泌体源性的 miRNA 在肝癌的增殖迁移、免疫逃逸及产生耐药等方面的可能机制,并对外泌体源性的 miRNA 在临床上的应用进行展望。

[关键词] 外泌体; 微小 RNA; 肝癌; 生物标记物

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A

肝癌是常见的恶性消化道肿瘤,包括肝细胞癌(HCC)、肝

内胆管上皮细胞癌、肝母细胞瘤及纤维板层癌。其中,HCC 占肝癌的 90% 以上,具有早期不易发现、进展快等特点。尽管目前在肝癌预防、筛查、诊断和治疗技术方面取得了一定进展,使我国肝癌发病率和死亡率下降^[1],但肝癌仍是全球第 6 位、我国第 3 位常见的癌症^[2],严重威胁我国人民的生命和健康。血

6 基金项目:江苏省重点研发计划社会发展资助项目(BE2018689)

作者单位:212001 江苏镇江,江苏大学附属医院消化科

通讯作者:徐岷,E-mail:peterxu1974@163.com

[4] Scheinberg P, Young NS. How I treat acquired aplastic anemia [J]. Blood, 2012, 120(6):1185-1196.

[5] Kosaka Y, Yagasaki H, Sano K, et al. Prospective multicenter trial comparing repeated immunosuppressive therapy with stem-cell transplantation from an alternative donor as second-line treatment for children with severe and very severe aplastic anemia [J]. Blood, 2008, 111(3):1054-1059.

[6] Xu LP, Wang SQ, Wu DP, et al. Haplo-identical transplantation for acquired severe aplastic anaemia in a multicentre prospective study [J]. Brit J Haematol, 2016, 175(2):265-274.

[7] Prem S, Atenafu EG, Al Shaibani Z, et al. Low rates of acute and chronic GVHD with ATG and PTCy in matched and mismatched unrelated donor peripheral blood stem cell transplants [J]. Eur J Haematol, 2019, 102(6):486-493.

[8] DeZern AE, Zahurak M, Symons H, et al. Alternative Donor Transplantation with High-Dose Post-Transplantation Cyclophosphamide for Refractory Severe Aplastic Anemia [J]. Biol Blood Marrow Tr, 2017, 23(3):498-504.

[9] Peffault De Latour R, Chevret S, Jubert C, et al. Unrelated cord blood transplantation in patients with idiopathic refractory severe aplastic anemia: a nationwide phase 2 study [J]. Blood, 2018, 132(7):750-754.

[10] Yoshimi A, Kojima S, Taniguchi S, et al. Unrelated Cord Blood Transplantation for Severe Aplastic Anemia [J]. Biol Blood Marrow Tr, 2008, 14(9):1057-1063.

[11] Giacoppo S, Bramanti P, Mazzon E. The transplantation of mesenchymal stem cells derived from unconventional sources: an innovative approach to multiple sclerosis therapy [J]. Arch Immunol Ther Ex, 2017, 65(5):363-379.

[12] Pang Y, Xiao HW, Zhang H, et al. Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Expanded In Vitro for Treatment of Aplastic Anemia: A Multicenter Phase II Trial [J]. Stem Cell Transl Med, 2017, 6(7):1569-1575.

[13] Wang ZK, Yu HJ, CAO FL et al. Donor-derived marrow mesenchymal stromal cell co-transplantation following a haploidentical hematopoietic stem cell transplantation trail to treat severe aplastic anemia in children [J]. Ann Hematol, 2019, 98(2):473-479.

[14] Hitchcock IS, Kaushansky K. Thrombopoietin from beginning to end [J]. Brit J Haematol, 2014, 165(2):259-268.

[15] Alvarado LJ, Huntsman HD, Cheng H, et al. Eltrombopag maintains human hematopoietic stem and progenitor cells under inflammatory conditions mediated by IFN- γ [J]. Blood, 2019, 133(19):2043-2055.

[16] Kim M, Park SH, Opella SJ, et al. NMR Structural Studies of Interactions of a Small, Nonpeptidyl Tpo Mimic with the Thrombopoietin Receptor Extracellular Juxtamembrane and Transmembrane Domains [J]. J Biol Chem, 2007, 282(19):14253-14261.

[17] Olnes MJ, Scheinberg P, Calvo KR, et al. Eltrombopag and Improved Hematopoiesis in Refractory Aplastic Anemia [J]. N Engl J Med, 2012, 367(1):11-19.

[18] Hong Y, Li X, Wan B, et al. Efficacy and Safety of Eltrombopag for Aplastic Anemia: A Systematic Review and Meta-analysis [J]. Clin Drug Investig, 2019, 39(2):141-156.

[19] Tomiyama Y, Jang JH, Lee J, et al. Efficacy and Safety of Romiplostim in Patients with Acquired Aplastic Anemia Ineligible or Refractory to Immunosuppressive Therapy: Interim Analysis of Phase 2/3 Clinical Trial [J]. Blood, 2018, 132(Supple 1):1306.

[20] Zhao L, Sicre De Fontbrune F, Contejean A, et al. Nationwide survey in France on the use of romiplostim in patients with refractory severe aplastic anemia [J]. Bone Marrow Transpl, 2019, 54(7):1161-1163.

[21] Patel BJ, Barot SV, Przychodzen BP, et al. Impact of Eltrombopag on Clonal Evolution in Refractory Aplastic Anemia [J]. Blood, 2018, 132(Supplement 1):3869.

[22] Scheinberg P, Nunez O, Weinstein B, et al. Activity of alemtuzumab monotherapy in treatment-naive, relapsed, and refractory severe acquired aplastic anemia [J]. Blood, 2012, 119(2):345-354.

[23] Clé DV, Atta EH, Dias DSP, et al. Repeat course of rabbit antithymocyte globulin as salvage following initial therapy with rabbit antithymocyte globulin in acquired aplastic anemia [J]. Haematologica, 2015, 100(9):e345-e347.

[24] 张慧敏, 李晓云, 张少飞, 等. 雄激素对再生障碍性贫血患者端粒酶活性的影响 [J]. 临床内科杂志, 2019, 36(7):447-450.

[25] Chuhjo T, Yamazaki H, Omine M, et al. Danazol therapy for aplastic anemia refractory to immunosuppressive therapy [J]. Am J Hematol, 2008, 83(5):387-389.

[26] He G, Zhang X, Wu D, et al. Relapse of aplastic anemia responsive to sirolimus combined with cyclosporine [J]. Pediatr Blood Cancer, 2011, 56(7):1133-1135.

(收稿日期:2020-02-04)

(本文编辑:余晓曼)

清甲胎蛋白(AFP)是目前临床上常见的诊断肝癌的标记物之一,但特异性却不高。因此,寻找更加灵敏且特异的生物标志物用于肝癌的早期诊断,对于提高肝癌患者的生存率尤为重要。

外泌体是由各种体液分泌的直径为 40~100 nm 级别的膜性囊泡^[3],富含蛋白质、RNA 及核酸等物质。其中来源于恶性肿瘤的外泌体(TDEs)更被认为直接参与了肿瘤的增殖、转移、耐药及免疫逃逸^[4]。研究发现在某些特定疾病的患者循环中微小 RNA(miRNA)的表达可发生特征性的变化,外泌体包裹下的 miRNA 拥有更好的生物稳定性,从而使研究外泌体源性的 miRNA 较循环中的 miRNA 有着更好的前景。肿瘤细胞较正常细胞可分泌更多的外泌体,使得外泌体有可能成为早期诊断肝癌或肝癌转移的标志物,因此,充分了解外泌体促进肝癌进展的机制,对肝癌的早期诊断和预后具有重要意义。

一、外泌体和 miRNA

1. 外泌体结构和功能:外泌体作为一类细胞外囊泡(EVs),最早是由 Harding 和 Johnstone 等提出。外泌体多指在正常或病理状态下,由各种细胞分泌的直径约 40~100 nm 的膜性囊泡,其中含有大量的生物活性成分,如蛋白质、脂质、信使 RNA(mRNA)、长链非编码 RNA(lncRNA)和 miRNA。许多细胞都可以分泌外泌体,如 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、树突状细胞、肿瘤细胞、间充质干细胞等^[5]。外泌体具有脂质双分子层的结构特征,能够有效保护其内容物的活性,方便其在细胞间穿梭以促进细胞间的通讯。外泌体可以与特定的受体结合,通过释放囊泡内容物的方式进行信息传递,在细胞与其微环境之间的细胞间通信中起关键作用^[6]。正是通过这种方式,外泌体可参与包括细胞通讯、肿瘤增殖迁移、血管生成在内的多种生理和病理过程。

2. miRNA:miRNA 是一类长度约为 19~25 个核苷酸的内源性非编码小 RNA。miRNA 可通过直接诱导 mRNA 降解,也可通过与靶基因 mRNA 的 3'-非翻译区(3'-UTR)中的互补碱基结合来抑制翻译,从而反向调节基因表达^[7-8]。miRNA 可通过上述机制调节肿瘤细胞的分化、增殖和迁移。miRNA 已被证实可在多种肿瘤中的表达高于正常组织。与正常细胞相比,肿瘤细胞除了分泌更多的外泌体外,其分泌的外泌体中 miRNA 含量也比正常细胞分泌的多。Kogure 等^[9]提取了肝癌细胞株 Hep3B 衍生的外泌体,共检测出 134 种不同类型 miRNA,其中 55 种 miRNA 表达量较其供体细胞上升 4 倍,25 种 miRNA 含量上升 166 倍,最重要的是有 11 种 miRNA 仅在外泌体中表达。

二、外泌体源性的 miRNA 在肝癌发生、发展中的作用

细胞间的通讯在肝癌的发生中起重要作用。除了已有的自分泌和旁分泌等通讯方式外,外泌体为细胞信号之间的通信提供了一种独特方式。在大多数的外泌体中,特异性 miRNA 与肝癌的发生发展有关^[10]。相关研究结果证实,与正常肝组织比较,miR-21、miR-96 和 miR-151 在肝癌组织中的表达水平增加^[11]。相比之下,miR-122a 和 miR-199a 的表达水平在肝癌组

织中则降低^[12]。

1. 外泌体源性的 miRNA 通过影响微环境促进肝癌的增殖、迁移:1889 年 Paget 在癌症的背景下提出了“种子-土壤”假说来说明肿瘤微环境的重要性^[13]。TDEs 在肿瘤与其微环境中的作用尤为突出。进一步的研究发现,外泌体可通过免疫逃逸、代谢重组等方式创造一个有利于恶性肿瘤发展的前微环境。肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)是一种特殊类型的成纤维细胞,是肿瘤微环境的重要组成部分^[14],通过多种机制促进肿瘤细胞的生长和侵袭。Zhou 等^[15]提取了 3 种不同的肝癌细胞株(97H、LM3 及 LO2)的外泌体,对后者进行 miRNA 测序,发现其 miR-21、miR-27、miR-126 水平均显著增高,miR-21 的表达水平升高最为显著。将提取后的外泌体与肝星状细胞株(LX-2)共培养后,发现 LX-2 激活成高表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的肿瘤相关成纤维细胞。进一步实验研究发现,miR-21 可通过下调其靶基因 PTEN,激活 PDK1/Akt 通路,促进 LX-2 向 CAFs 转化,进而促进肝癌细胞增殖、迁移和侵袭。此外 Fang 等^[16]研究证明肝癌细胞衍生的外泌体中 miR-1247-3p 通过下调靶基因 B4GALT3 激活核因子(NF)- κ B 信号通路,活化 CAFs 促进肝癌的肺转移。以上研究结果均表明外泌体源性的特异 miRNA 可以通过影响靶基因,促进 CAFs 的活化,进而促进肝癌的发生发展。

2. 外泌体源性的 miRNA 促进肝癌的免疫逃逸:肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)也是肿瘤微环境中的一类重要细胞,主要分为 TAMs-M1 型和 TAMs-M2 型,其中 M2 型可促进肿瘤进展。肝癌衍生的外泌体可通过激活 NF- κ B 信号通路和诱导促炎症因子来重建巨噬细胞,导致 TAMs-M2 活化,使肝癌逃避免疫应答^[17]。Yin 等^[18]研究发现肝癌细胞分泌的外泌体可将 miR-146a-5p 转运至巨噬细胞,通过改变细胞因子来减弱巨噬细胞的抗原呈递作用,并促进巨噬细胞向 TAMs-M2 型转化,造成 T 细胞死亡。进一步研究发现,SAL4-STAT 3 可协同调控 miR-146a-5p 的表达,过表达的 miR-146a-5p 可通过促进 TAMs-M2 型的激活进而促进肝癌的免疫逃逸。

3. 外泌体 miRNA 和肝癌化疗耐药:HCC 患者对 5-氟尿嘧啶(5-Fu)和阿霉素等常规化疗药物易产生耐药性。在肝癌衍生的外泌体中,miR-122 的表达量显著低于正常肝脏组织中的外泌体,miR-122 可通过下调多药耐药基因(MDR1)、谷胱甘肽 S 转移酶 π 等^[19]相关耐药基因来增强肝癌细胞的化疗敏感性。Fu 等^[20]对耐药细胞株(bel/5-Fu)进行实时定量 PCR 分析,结果发现 miR-32-5p、miR-21-5p、miR-19a-3p、miR-92a-3p 和 miR-486-5p 在 bel/5-Fu 均呈高表达,其中 miR-32-5p 的表达最明显。进一步研究发现,bel/5-Fu 通过外泌体将 miR-32-5p 转运到敏感细胞,并激活 PI3k/Akt 通路,通过调节血管生成和 EMT 诱导肝癌的多重耐药。Raji 等^[21]的研究结果表明,miR-106a/b 在顺铂耐药的肝癌中高表达,miR-106a/b 通过靶向调节 SIRT1 的表达影响 HeLa 细胞对顺铂的化学敏感性。

三、外泌体源性的 miRNA 在肝癌中的应用

外泌体中富含脂质,对外泌体的结构和内容物起保护作用

用,使内在的 miRNA 表达稳定。此外,外泌体 miRNA 的表达水平在一定程度上可反映出细胞的状态,使外泌体中的 miRNA 具有作为潜在的早期诊断标志物、评估预后及治疗的价值。

1. 外泌体 miRNA 可作为肝癌诊断的血清标记物:Jun 等^[22]对正常人、慢性乙型肝炎和肝癌患者血清外泌体 miR-21 和总循环 miR-21 的表达水平进行比较分析后发现,肝癌组患者血清外泌体中 miR-21 水平明显高于慢性乙型肝炎组(2.12 倍)和健康组(5.57 倍)。此外,肝癌患者中总循环 miR-21 表达量虽也升高,但不如血清外泌体中 miR-21 表达升高明显;且外泌体中 miR-21 表达水平升高,与慢性肝硬化和肝癌的 TNM 分期呈正相关^[23],这一观察结果表明,血清外泌体中某些 miRNA,如 miR-21 可作为一种潜在的生物标记物,用于肝癌的早期检测和筛选。

2. 外泌体 miRNA 与肝癌的治疗:外泌体作为运输载体可运送特异性的小 RNA 分子,通过控制肿瘤生长实现治疗作用,开始受到广泛关注。外泌体作为运输载体较传统的运输载体具有独特优势:外泌体的双层膜结构和特异的表面蛋白可轻松进入靶细胞中,作为一种高效的载体发挥作用;外泌体还可由自身细胞分泌,不易引起免疫反应。间充质干细胞具有分泌大量外泌体的功能,Lou 等^[24]用脂肪源性间充质干细胞(AMSC)转染 miR-122,收集 AMSC 衍生的外泌体加入受体肝癌细胞中,结果显示,miR-122 转染的 AMSC 能有效产生富含 miR-122 的外泌体,通过改变肝癌细胞中 miR-122 靶基因的表达使癌细胞对化疗药物敏感。此外,在动物模型体内注射 miR-122 外泌体可显著提高索拉非尼的抗肿瘤效果。上述研究结果均表明外泌体作为一种独特的载体,在肝癌的发生发展中起重要作用,为临床上肝癌的诊断与治疗提供了一种新的思路。

3. 外泌体 miRNA 与肝癌的预后评估:Shi 等^[25]收集了 126 例 HCC 患者及 21 例健康受试者的血清,从中提取外泌体并检测 miR-638 表达情况,发现 HCC 组受试者外泌体 miR-638 水平显著降低,降低程度与肝癌大小和 TNM 分期呈负相关。进一步分析表明,血清 miR-638 水平降低的肝癌患者 3 年和 5 年生存率较低。另有研究结果指出,血清外泌体中 miR-718 可通过调节 HOXB8 的表达抑制肿瘤细胞分化。此外,在肝癌患者肝移植治疗后,复发与未复发的肝癌患者血清外泌体中 miRNA-718 表达水平也存在差异,肝癌复发的患者血清外泌体中 miRNA-718 呈低表达,未复发的患者血清外泌体中 miRNA-718 呈高表达,进一步说明 miRNA-718 的低表达与肝癌预后不良密切相关^[26]。以上研究结果均表明,血清外泌体中 miRNA 在肝癌中可作为新的标记物用于评估预后情况。

外泌体作为一种新的细胞间的传递介质,参与了多种生理病理过程。本文综述外泌体在肝癌发生发展中的作用,并对其在肝癌的临床应用前景进行展望。然而,目前外泌体在肝癌发生发展中的具体作用机制尚未明确,阻碍了其在肝癌诊断和治疗中的应用。此外,尽管外泌体作为临床诊断肝癌的标记物具有前景,但由于现阶段血清外泌体提取、纯化、鉴定等步骤的繁琐及困难,距离应用于临床还需要一段时间,未来的研究应集中在改进提取、纯化外泌体的方法,争取实现其在临床中的早期应用。

参 考 文 献

- [1] Zheng R, Qu C, Zhang S, et al. Liver cancer incidence and mortality in China: Temporal trends and projections to 2030 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2018, 30(6): 571-579.
- [2] 徐颖颖, 王吉耀. 乙型肝炎、肝硬化与肝癌 [J]. *临床内科杂志*, 2009, 26(11): 728-730.
- [3] Chen BY, Sung CW, Chen C, et al. Advances in exosomes technology [J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 493: 14-19.
- [4] Whiteside TL. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression [J]. *Adv Clin Chem*, 2016, 74: 103-141.
- [5] Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, et al. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study [J]. *Bioscience*, 2015, 65(8): 783-797.
- [6] Ramachandran S, Palanisamy V. Horizontal transfer of RNAs: exosomes as mediators of intercellular communication [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2012, 3(2): 286-293.
- [7] Bott A, Erdem N, Lerrer S, et al. miRNA-1246 induces pro-inflammatory responses in mesenchymal stem/stromal cells by regulating PKA and PP2A [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(27): 43897-43914.
- [8] Van Peer G, Mets E, Claeys S, et al. A high-throughput 3' UTR reporter screening identifies microRNA interactomes of cancer genes [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0194017.
- [9] Kogure T, Lin WL, Yan IK, et al. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth [J]. *Hepatology*, 2011, 54(4): 1237-1248.
- [10] 王焱, 唐博. miRNA 与肝癌密切关系的研究进展 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(94): 27-30.
- [11] 周卫, 赵林静, 高建芝. miRNAs 在原发性肝癌中的表达及临床意义分析 [J]. *中国医药导刊*, 2018, 20(2): 97-101.
- [12] Dhungel B, Ramlogan-Steel CA, Steel JC. Synergistic and independent action of endogenous microRNAs 122a and 199a for post-transcriptional liver detargeting of gene vectors [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 15539.
- [13] Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889 [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1989, 8(2): 98-101.
- [14] Fiori ME, Di Franco S, Villanova L, et al. Cancer-associated fibroblasts as abettors of tumor progression at the crossroads of EMT and therapy resistance [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 70.
- [15] Zhou Y, Ren H, Dai B, et al. Hepatocellular carcinoma-derived exosomal miRNA-21 contributes to tumor progression by converting hepatocyte stellate cells to cancer-associated fibroblasts [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 324.
- [16] 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.
- [17] Choi J, Gyamfi J, Jang H, et al. The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology [J]. *Histol Histopathol*, 2018, 33(2): 133-145.
- [18] Yin C, Han Q, Xu D, et al. SALL4-mediated upregulation of exosomal miR-146a-5p drives T-cell exhaustion by M2 tumor-associated macrophages in HCC [J]. *Oncimmunology*, 2019, 8(7): 1601479.
- [19] Pan JH, Zhou H, Zhao XX, et al. Role of exosomes and exosomal microRNAs in hepatocellular carcinoma; Potential in diagnosis and antitumor treatments (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(4): 1809-1816.
- [20] Fu X, Liu M, Qu S, et al. Exosomal microRNA-32-5p induces multidrug resistance in hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 52.
- [21] Raji GR, Sruthi TV, Edatt L, et al. Horizontal transfer of miR-106a/b from cisplatin resistant hepatocarcinoma cells can alter the sensitivity of cervical cancer cells to cisplatin [J]. *Cell Signal*, 2017, 10(38): 146-158.
- [22] Jun L, Yang G, Zhisu L. The utility of serum exosomal microRNAs in hepatocellular carcinoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 1221-1227.
- [23] Wang H, Hou L, Li A, et al. Expression of serum exosomal microRNA-21 in human hepatocellular carcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 864-894.
- [24] Lou G, Song X, Yang F, et al. Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma [J]. *J Hematol Oncol*, 2015, 29(8): 122.
- [25] 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.
- [26] 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.

(收稿日期: 2019-10-15)

(本文编辑: 余晓曼)