

3295-3299.

[27] Naaber P, Stsepelova J, Smidt I, et al. Quantification of clostridium difficile in Antibiotic-Associated-Diarrhea patients[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(10): 3656-3658.

[28] Matsuda K, Tsuji H, Asahara TA, et al. Sensitive quantification of clostridium difficile cells by reverse Transcription-Quantitative PCR targeting rRNA molecules[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(15): 5111-5118.

[29] Squire MM, Carter GP, Mackin KE, et al. Novel molecular type of clostridium difficile in neonatal Pigs, Western Australia[J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(5): 790-792.

[30] Geric B, Carman RJ, Rupnik M, et al. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative Clostridium difficile strains are enterotoxic but do not cause disease in ham-

sters[J]. J Infect Dis, 2006, 193(8): 1143-1140.

[31] 王浦. 华南地区艰难梭菌流行病学研究与新型分子生物学检测技术评估[D]. 广州: 南方医科大学, 2014.

[32] Yong WH, Mattia AR, Ferraro MJ. Comparison of fecal lactoferrin latex agglutination assay and methylene blue microscopy for detection of fecal leukocytes in clostridium difficile-associated disease[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(5): 1360-1361.

[33] Enocksson A, Lundberg J, Weitzberg E, et al. Rectal nitric oxide gas and stool cytokine levels during the course of infectious gastroenteritis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2004, 11(2): 250-254.

(收稿日期: 2016-03-29 修回日期: 2016-05-04)

• 综 述 •

## 长链非编码 RNA 在肝癌中作用机制的研究进展

任 利 综述, 高 建<sup>△</sup> 审校

(重庆医科大学附属第二医院消化内科 400010)

关键词: 肝癌; 长链; 非编码 RNA

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.17.054 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)17-2537-03

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其病死率在恶性肿瘤中居第 2 位,严重威胁了人们的健康及生命<sup>[1]</sup>。目前,外科手术切除、肝移植为早期肝癌的有效治疗方式。近几年,随着手术治疗和药物治疗的发展,肝癌患者的 5 年生存率有所增加。但是因为进展期肝癌缺乏有效的治疗干预手段,而且容易在早期发生血行转移,临床上前来就诊的肝癌患者多数已存在微转移灶。肝癌发生、发展中的许多复杂分子机制仍不清楚。临床上迫切需要有效的分子生物学标志物用于肝癌的诊断、治疗和预后。许多研究者研究发现长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)在肝癌细胞中差异性表达,并与肝癌的发生、发展有密切关系, lncRNA 在肝癌的发病机制和转移复发中扮演着不可或缺的角色<sup>[2-3]</sup>。 lncRNA 是一类转录本长度超过 200 个核苷酸的无编码功能的 RNA 分子,它可以在表观遗传水平、转录和转录后水平调控的基因表达。最初有研究者认为其是 RNA 聚合酶 II 转录的副产物,不具备生物学功能,但目前多项研究发现 lncRNA 参与各种细胞活动<sup>[7-25]</sup>,比如细胞增殖、分化、凋亡和细胞周期,证据显示 lncRNA 在肿瘤的生物学上饰演着重要的角色,从而为诊断治疗肿瘤提供了一种新的方式<sup>[4-5]</sup>。目前关于 lncRNA 分子在肝癌调控机制中的研究还处于起步阶段,目前研究与肝癌相关性较强的 lncRNA 基因有: H19、HOX 转录反义 RNA (HOX transcript antisense RNA, HOTAIR)、肺腺癌转移相关转录子 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)、肝癌高表达基因 (highly up-regulated in liver cancer, HULC) 和母系印记基因 3 (maternal expressed gene 3, MEG3) 等<sup>[6]</sup>。 lncRNA 基因的认识及其在肿瘤发生发展过程中的分子机制,对肝癌的诊断、预防和治疗起着重要作用。

### 1 lncRNA 在肝癌中发挥原癌基因作用

#### 1.1 结肠癌相关转录因子 1 (colon cancer associated tran-

script-1, CCAT1) Deng 等<sup>[7]</sup>在 66 对肝癌组织和正常组织中使用体外细胞增殖和迁移试验的方法,通过实时聚合酶链反应来检测 CCAT1 的表达水平,评估 CCAT1 对肝癌细胞增殖和迁移的影响,研究发现 CCAT1 在肝癌组织中表达上调,且上调水平和肿瘤大小、血管侵犯及血清甲胎蛋白水平相关,研究显示 CCAT1 的高水平表达可能与肝癌患者的预后相关,进一步研究证实 CCAT1 的表达增强可促进肝癌细胞的增殖和转移,而抑制 CCAT1 的表达同时也抑制了肝癌细胞的增殖和转移,故 CCAT1 在肝癌中可能发挥了原癌基因的作用。

1.2 INK4 位点反义非编码 RNA (antisense non-coding RNA in the INK4 locus, ANRIL) ANRIL 在肝癌中表达上调,高表达的 ANRIL 与肝脏的肿瘤直径和巴塞罗那分期 (Barcelona Clinic Liver Cancer, BCLC) 有关。 Huang 等<sup>[8]</sup>在肝癌细胞中发现抑制 ANRIL 的表达可能影响细胞在体内体外的增殖、迁移以及诱导细胞的凋亡。通过进行生物信息学分析,发现转录因子 KLF2 在肝癌细胞中表达下调,而降低肝癌细胞中 ANRIL 的表达可以上调 KLF2 的信使核苷酸和蛋白水平,过表达的 KLF2 抑制肝癌细胞的增殖和促进肝癌细胞的凋亡, ANRIL 可以通过表观遗传沉默 KLF2 在体内外调节细胞生长。进一步研究发现 ANRIL 启动子区域有 13 个 SP1 的结合位点,提示 SP1 可能在肝癌细胞中调控 ANRIL 的转录,染色质免疫沉淀反应 (芯片) 的测定表明 SP1 可以直接结合 ANRIL 的启动子区域从而沉默 ANRIL 的转录。此外,过表达的 SP1 可以上调 ANRIL 的表达水平,而降低 SP1 可降低 ANRIL 在肝癌细胞中的表达, ANRIL 的下降可诱导细胞凋亡,影响肝癌细胞的迁移和侵袭能力,研究表明 ANRIL 可能在肝癌的增殖和凋亡中起到重要作用。

1.3 BRAF 激活的长链非编码 RNA (BRAF-activated noncoding RNA, BANCR) BANCR 位于第 9 号染色体,是基因编码

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: 982213482@qq.com.

长度为 639 bp 的 lncRNA,最初是在黑色素瘤细胞中发现的,近来随着研究的深入,BANCR 促进肿瘤增殖和转移的影响,已在胃癌、结直肠癌、黑色素瘤等多种癌症中得到证实,而 Zhou 等<sup>[9]</sup>的研究发现,BANCR 在肝癌组织比在正常组织中高表达( $P < 0.001$ ),且表达水平和肿瘤的分级( $P = 0.007$ )、肿瘤大小( $P = 0.003$ )、静脉浸润( $P = 0.001$ )和 TMN 分期( $P = 0.002$ )密切相关,而与患者的年龄、性别、AFP 水平和肿瘤的数量关系不大,高水平的 BANCR 与肿瘤的进展和预后不良相关,同时在临床研究中高水平的 BANCR 会降低患者的总体生存率,多变量的 COX 风险回归分析证实高表达的 BANCR 是肝癌预后不良的一个独立指标。研究还表明 BANCR 下调会影响肝癌细胞的增殖,促进细胞的凋亡,降低细胞的侵袭和转移,同时诱导 Vimentin 蛋白的低表达和 E-cadherin 蛋白的高表达,从而参与肝癌的恶性发展过程。故 BANCR 可能不仅仅是一个新型的预后指标,也是一个潜在的疾病治疗靶点<sup>[10]</sup>。

**1.4 表皮生长因子受体-AS1 (epithelial growth factor receptor-AS1, EGFR-AS1)** 已有研究证明表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 的表达和激活是在生长激素受体 (The growth hormone receptor, GHR) 途径的严格控制下进行的, Qi 等<sup>[11]</sup>的研究证实 GHR 通过调节 EGFR-AS1 而调节 EGFR 的表达,而 EGFR 和 EGFR-AS1 在肝癌组织中高表达,在体外试验中发现在肝癌组织中 EGFR-AS1 的表达明显高于其配对的癌旁肝组织,且高水平的 EGFR-AS1 有门静脉血栓和淋巴结转移的高风险存在,同时也和临床特征及病人预后不良相关。此外高表达的 EGFR-AS1 明显提高肝细胞入侵和扩散能力,同时影响细胞周期而促进肝癌的发展<sup>[11]</sup>。研究最终发现,EGFR-AS1 提高肝癌侵袭的机制可能跟它的高表达而引起细胞低凋亡有关。

**1.5 核仁小 RNA 宿主基因 3 (small nucleolar RNA host gene 3, SNHG3)** Zhang 等<sup>[12]</sup>的研究通过定量实时聚合酶链式反应研究 2 个独立的 HCC 队列研究,数据来自于 The Cancer Genome Atlas (TCGA) 和 Oncomine 数据库 ( $P < 0.0001$ ,  $P = 0.0325$ )。原位杂交试验结果显示 144 对 HCC 标本中, SNHG3 的表达跟肿瘤直径 ( $P = 0.003$ ), 门静脉血栓 ( $P = 0.014$ ) 和复发 ( $P = 0.038$ ), SNHG3 的高水平表达跟总体生存率 OS ( $P < 0.0001$ ), 无复发生存率 RFS ( $P = 0.006$ ) 和无病生存率 (DFS;  $P < 0.0001$ ) 显著相关,更值得注意的是,多变量分析表明 SNHG3 的表达是肝癌患者的一个独立预后因素,所以,高表达的 SNHG3 与肝癌患者的恶性状态和不良预后相关。

## 2 lncRNA 在肝癌中发挥抑癌基因作用

### 2.1 生长抑制特异基因 5 (growth arrest-specific 5, GAS5)

GAS5 是一个孤立于 cDNA 消减库的非编码蛋白基因,包含核仁小分子 RNA 基因 (small nucleolar RNAs, snoRNAs) 序列。人类的 GAS5 编码基因在 snoRNA 内含子区域的 10 个 C/D 盒发挥生物学功能。成熟的 GAS5 lncRNA (12 个衍生外显子序列) 竞争性地与糖皮质激素受体的 DNA 功能区域结合,阻止其与相应的染色体结合,从而抑制糖皮质激素受体介导的代谢基因的转录<sup>[13]</sup>。Hu 等<sup>[14]</sup>的研究表明 GAS5 和 miR-21 有个互补的区域,可以直接调控 miR-21。而 miR-21 可以靶向作用于大量的蛋白编码基因,比如 PDCD4 和 PTEN,此项研究证明 PDCD4 和 PTEN 在肝癌中的水平低于匹配的正常组织,表明 PDCD4 和 PTEN 在肝癌中的表达下调,肿瘤直径大于 3 cm 的肝癌 GAS5 的表达更低,miR-21 的表达水平更高,GAS5 和 miR-21 的表达水平的相关性在临床中跟肿瘤直径、临床分

级密切相关。高水平的 GAS5 和低水平的 miR-21 肝癌患者有更高的总体生存率,高表达的 miR-21 很大程度地消除了 GAS5 抑制作用,而 GAS5 的高表达抑制肝癌细胞的转移和侵袭。

**2.2 母本印迹表达基因 3 (maternally expressed gene 3, MEG3)** MEG3 是表达在人类染色体 14q32. MEG3 的母系印迹基因,编码一段长度为 1 600 nt 的长链非编码 RNA<sup>[15]</sup>,与正常的肝细胞系比较,MEG3 在 4 种肝癌细胞系 (HepG2、Huh-7、PLC-PRF/5、Hep-3B) 中表达下调。RNA 原位杂交显示正常肝组织中胞浆内 MEG3 杂交信号强烈,而在肝癌组织中杂交信号微弱或缺失,而在肝癌细胞系中表达 MEG3 时可抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡,由此可见,MEG3 是肝癌的抑制因素<sup>[16]</sup>。MEG3 启动子区域的甲基化减少了它在肝癌细胞中的表达,Zamani 等<sup>[17]</sup>研究 DNC 在肝癌中的表观遗传效应发现,MEG3 在肝癌中甲基化而在正常组织中没有甲基化,将肝癌细胞暴露于去甲基化药物 DNC 后发现 MEG3 恢复表达,证明 MEG3 基因功能区域的 DNA 甲基化与其在肝癌中的表达缺失有关。

## 3 lncRNA 在肝癌的临床应用

**3.1 与肝癌转移及预后相关的 lncRNA** HOTAIR 是研究最多的 lncRNA 之一,多项研究表明肿瘤细胞中高表达的 HOTAIR 能抑制抑癌基因的表达,促进肿瘤的复发,而下调 HOTAIR 表达则降低肿瘤细胞的转移侵袭能力<sup>[18]</sup>,一项 HOTAIR 在肝癌患者中研究表明 HOTAIR 的过表达会增加淋巴结转移的风险,过表达的 HOTAIR 是肝癌患者肝移植术后的独立预后因素且缩短患者无复发生存率 (recurrence-free survival, RFS)<sup>[19]</sup>。Li 等<sup>[20]</sup>研究也发现 ZFAS1 可以通过结合 miR-150 而废除他的肿瘤抑制作用,而 miR-150 通过抑制 ZEB1 和基质金属蛋白酶 MMP14 和 MMP16 阻遏肝癌细胞的侵袭。

**3.2 与肝癌的预后相关的 lncRNA** Zhang 等<sup>[21]</sup>在研究中发现过表达的 HULC 促进肝癌的增殖,且呈正相关。更有研究证明 HULC 可在肝癌患者血浆中被检测出,表明 HULC 可作为肝癌辅助诊断和预后的新型生物学标志物。

**3.3 与 HBV 感染相关的 lncRNA** Xie 等<sup>[22]</sup>研究 HULC 在乙肝表面抗原阳性和阴性的肝癌患者中的表达,在表面抗原阳性的肝癌患者 HULC 的表达明显高于表面抗原阴性的患者,且差异有统计学意义。

**3.4 与肝癌进展相关的 lncRNA** Yang 等<sup>[23]</sup>在 244 例肝癌患者中通过 COX 多变量分析显示 H19 为肝癌患者无病生存率 (disease-free survival, DFS) 的风险因素 ( $HR = 1.071$ , 95%  $CI: 1.01 \sim 1.137$ ,  $P = 0.022$ ), Logistic 回归分析表明 H19 与血管浸润显著相关, H19 和 MEG3 均被认为是高 AFP 水平的危险因素 ( $OR = 1.45$ , 95%  $CI: 1.277 \sim 1.646$ ,  $P < 0.001$  和  $OR = 1.613$ , 95%  $CI: 1.100 \sim 2.365$ ,  $P = 0.014$ )。

**3.5 与肝癌耐药相关的 lncRNA** 获得性耐药是肿瘤化疗中遇到的主要阻碍之一。有研究表明, H19 在肝癌细胞中通过转染反义 H19 寡核苷酸诱导 MDR1 (multi-drug resistance 1) 基因启动子的去甲基化,抑制 MDR1 和其产物 P 糖蛋白的表达,增强细胞阿霉素的累积水平和敏化阿霉素的细胞毒性,而过表达的 MDR1 基因和他的产物 P 糖蛋白可降低阿霉素的累积水平<sup>[24]</sup>。H19 基因在肝癌细胞中可通过调控 MDR1 启动子的去甲基化诱导 P 糖蛋白表达和 MDR1 相关性耐药。

## 4 总结和展望

lncRNA 在细胞的发育、分化、增殖以及细胞凋亡等过程

发挥着不可忽视的作用,肿瘤新的相关性 lncRNA 的发现以及分子机制的阐明,将在肿瘤的诊断和治疗方面提供新的思路和途径。然而目前对 lncRNA 的认识仅处于初步阶段,缺乏对 lncRNA 的系统性管理如命名方法、lncRNA 的定义、生物学特性、对靶基因的调控以及与其他生物分子如微小 RNA(miRNA)的相互的调控关系等。而且,由于 lncRNA 结构的多样性和非编码蛋白的特殊性,以及现今实验技术的局限性,研究者只能从基因调控的大体水平来预测其功能,而在肿瘤的转移和浸润过程中具体的生物学机制和功能尚不能明确。因此,这就需要研究人员更多、更深入透彻地从分子的分级结构方面寻找突破点<sup>[25]</sup>,从而认识 lncRNA 在细胞过程中的作用机制。相信在不久的将来,一些与肝癌相关的 lncRNA 可能成为肝癌的诊断和预后的生物学标志和治疗靶点。

## 参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Gao Y, Chen G, Zeng Y, et al. Invasion and metastasis-related long noncoding RNA expression profiles in hepatocellular carcinoma[J]. Tumour Biol, 2015, 36(10): 7409-7422.
- [3] Liu YR, Tang RX, Huang WT, et al. Long noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma: Novel insights into their mechanism [J]. World J Hepatol, 2015, 7(28): 2781-2791.
- [4] Li T, Mo X, Fu L, et al. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs on gastric Cancer[J]. Oncotarget, 2016, 1859(1): 16-22.
- [5] Li X, Wu Z, Fu X, et al. Long noncoding RNAs: insights from biological features and functions to diseases[J]. Med Res Rev, 2013, 33(3): 517-553.
- [6] 连娇燕, 虞必光. 非编码 RNA 与肝细胞肝癌发生发展的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(3): 396-403.
- [7] Deng L, Yang SB, Xu FF, et al. Long noncoding RNA CCAT1 promotes hepatocellular carcinoma progression by functioning as let-7 sponge[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2015, 34(1): 18.
- [8] Huang MD, Chen WM, Qi FZ, et al. Long non-coding RNA ANRIL is upregulated in hepatocellular carcinoma and regulates cell apoptosis by epigenetic silencing of KLF2[J]. J Hematol Oncol, 2015, 8(1): 50.
- [9] Zhou T, Gao Y. Increased expression of LncRNA BANCR and its prognostic significance in human hepatocellular carcinoma[J]. World J Surg Oncol, 2016, 14(1): 8.
- [10] Wang HL, Zhang JP, Li DY, et al. Clinical significance of BANCR expression in hepatocellular carcinoma[J]. World Journal of Surgical Oncology, 2016, 14(1): 8.
- [11] Qi HL, Li CS, Qian CW, et al. The long noncoding RNA, EGFR-AS1, a target of GHR, increases the expression of EGFR in hepatocellular carcinoma[J]. Tumor Biol, 2016, 37(1): 1079-1089.
- [12] Zhang T, Cao CH, Wu DH, et al. SNHG3 correlates with malignant status and poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Tumor Biol, 2016, 37(2): 2379-2385.
- [13] Kino T, Hurt DE, Ichijo T, et al. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor[J]. Sci Signal, 2010, 3(107): ra8.
- [14] Hu L, Ye H, Huang G, et al. Long noncoding RNA GAS5 suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via miR-21 [J]. Tumour Biol, 2016, 37(2): 2691-2702.
- [15] Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor [J]. J Mol Endocrinol, 2012, 48(3): R45-R53.
- [16] Braconi C, Kogure T, Valeri N, et al. microRNA-29 can regulate expression of the long non-coding RNA gene MEG3 in hepatocellular Cancer [J]. Oncogene, 2011, 30(47): 4750-4756.
- [17] Zamani M, Sadeghizadeh M, Behmanesh M, et al. Dendrosomal curcumin increases expression of the long non-coding RNA gene MEG3 via up-regulation of epi-miRs in hepatocellular Cancer [J]. Phytomedicine, 2015, 22(10): 961-967.
- [18] Zhang J, Zhang P, Wang L, et al. Long non-coding RNA HOTAIR in carcinogenesis and metastasis [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014, 46(1): 1-5.
- [19] Geng YJ, Xie SL, Li Q, et al. Large intervening non-coding RNA HOTAIR is associated with hepatocellular carcinoma progression [J]. J Int Med Res, 2011, 39(6): 2119-2128.
- [20] Li T, Xie J, Shen C, et al. Amplification of long noncoding RNA ZFAS1 promotes metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res, 2015, 75(15): 3181-3191.
- [21] Zhang Y, Li Z, Zhang Y, et al. Molecular mechanism of HEIH and HULC in the proliferation and invasion of hepatoma cells [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(8): 12956-12962.
- [22] Xie H, Ma H, Zhou D. Plasma HULC as a promising novel biomarker for the detection of hepatocellular carcinoma [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 136106.
- [23] Yang Z, Lu Y, Xu Q, et al. HULC and H19 played different roles in overall and disease-free survival from hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy: a preliminary analysis from gene expression omnibus [J]. Dis Markers, 2015, 2015: 191029.
- [24] Tsang WP, Kwok TT. Riboregulator H19 induction of MDR1-associated drug resistance in human hepatocellular carcinoma cells [J]. Oncogene, 2007, 26(33): 4877-4881.
- [25] Sanbonmatsu KY. Towards structural classification of long non-coding RNAs [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1859(1): 41-45.