

肝细胞癌的基因组学和基因靶向治疗的研究进展

王文晶 曹国洪

【摘要】 肝细胞癌(HCC)的发生、发展极其复杂,基因组学的研究为人类了解 HCC 的发生、发展提供帮助,如 HCC 病因相关基因、HCC 特异血清指标甲胎蛋白相关基因、HCC 转移相关基因等研究,部分基因相关研究为 HCC 基因治疗奠定了基础。另外通过构建 HCC 特异基因模型,可寻找 HCC 治疗的新靶点新方法。本文就此作出如下综述。

【关键词】 肝细胞癌 基因组学 基因靶向治疗

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上常见的恶性肿瘤之一。近年来对 HCC 基因组学的研究已取得一定进展,本文总结了 HCC 病因相关基因、HCC 特异血清指标甲胎蛋白(AFP)相关基因、HCC 转移相关基因等研究成果。另外通过构建 HCC 特异基因模型,寻找 HCC 治疗的新靶点新方法。本文就此作出如下综述。

1 HCC 发生、发展的基因组学

1.1 HCC 病因相关基因研究 目前已知 HCC 的发生与病毒感染、致癌物污染以及遗传因素有关。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染在我国 HCC 病因中占主导地位,其次为强致癌剂黄曲霉素 B1(aflatoxin b1, AFB1),另外一些 HCC 患者具有家族聚集性和遗传易感性。总之, HCC 的发生涉及多因素多步骤的癌变过程。早前研究发现 HBV 的 DNA 可整合入人体 HCC 细胞的 DNA 中,经检测发现 HCC 组织中 HBV-DNA 的整合率远高于正常肝组织,且此现象具有高度易变性和随机性^[1]。通过对 81 例 HBV 阳性 HCC 患者行全基因组测序,研究者发现 HBV 阳性者癌组织 86.4% 有 HBV-DNA 的整合,而癌旁组织仅有 30.7%;同时发现在整合位点区域有较多基因拷贝数目变异,其中最主要的 3 个为端粒酶逆转录酶(TERT)、mixed-lineage leukemia (MLL4) gene、细胞周期蛋白 E1 基因(CCNE1)^[2]。HBV-DNA 的整合可引起基因组置换、缺失和反向复制等改变,进而影响细胞周期、分化和凋亡等功能,因此学者发

现动态监测 HBV-DNA 含量变化具有一定意义。如肝动脉栓塞介入治疗(TACE)可影响 HBV-DNA 含量的变化,一些学者对 TACE 治疗前后 HBV-DNA 含量的变化进行研究,认为 TACE 治疗可引起 HBV-DNA 的再活化^[3]。同样致病条件,不同人群所致结果不同,因此 HCC 的发生与个体间基因遗传多态性有关,即易感基因。经统计 HCC 发生的性别差异在 HBV 病例中最为明显,男性更易发展为 HCC。男性 HCC 发病率为 3.7~31.9/10 万例/年,女性为 1.4~10.2/10 万例/年^[4]。HBV 携带者中,较高的雄激素通路活性与男性 HCC 高发率相关。研究发现雄激素受体通过整合 HBV 在 TERT 启动子区的点突变来增强 TERT 效应,被认为是 HBV 相关 HCC 男性高发率的机制,因此雄激素受体可能成为 HCC 治疗的靶点^[5]。

p53 是一种肿瘤抑制基因,正常 p53 为野生型,可监护细胞基因的完整性;p53 突变体不仅丧失抑癌活性,反而具恶性转化功能。HCC 强致癌剂 AFB1 属二氢呋喃杂质的衍生物,研究发现 AFB1 可使部分 p53 发生突变成 p53-R249S,即 p53 第 249 位密码子精氨酸(AGG)置换为丝氨酸(AGT)。在含 p53 突变的 HCC 中, p53-R249S 发生率约为 30%,且在 HCC 高危区的发生率超过 96%^[6]。另有研究提示 HBV 编码的 x 蛋白(HBx)可能具有促进 HCC 增殖作用,同时与 p53-R249S 相互作用促进 HCC 生长^[7]。

肝干细胞(hepatic progenitor cells, HPCs)在正常条件下是静止的,且数量很少,在肝损伤时可复制分化为肝细胞。研究者在肝肿瘤和肿瘤前病变中观察到 HPCs 的活化,认为 HPCs 也是 HCC 的干细胞^[8]。维生素 D 作为一种维持机体钙和磷酸盐稳态的元素,经肝肾的联合活化成为维生素 D₃(VitD₃)。研究发现 AFB1 可通过影

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2020.42.3.2019-145

作者单位:310000 树兰(杭州)医院放射科

通信作者:王文晶, E-mail: 1301698543@qq.com

响丝氨酸/苏氨酸激酶 (AKT) 和 Hippo 信号通路改变 HPCs 样上皮细胞系 WB-344 细胞; VitD₃ 通过激活 AKT 和关闭 Hippo 信号通路, 来抑制 AFB1 诱导 HPCs 的扩增, 同时也验证了 VitD₃ 可作为 HCC 的抗癌剂^[9]。含 PPPDE 肽酶结构域蛋白 1 (PPPDE1) 可编码人体凋亡前表达蛋白, 有研究者发现敲除 PPPDE1 可以显著阻断人 HCC 的克隆生长和致瘤性, 而且 PPPDE1 是 p53 蛋白及其下游凋亡通路的关键调控因子, 对 p53 有负性调节作用^[10]。

HBV 感染、强致癌剂 AFB1 等的相关研究, 证实了 HCC 发生、发展与其密切相关, 从而促使人类采取一定措施来预防, 如 HBV 疫苗的普及、避免含 AFB1 食物的摄入等。

1.2 甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP) 相关基因研究 AFP 是胎儿肝细胞产生的一种特殊蛋白——糖蛋白, 它是胎儿血清的正常成分, 并发现 HCC 细胞能合成 AFP。AFP 作为一种特异血清标志物, 已广泛应用于 HCC 的筛查、临床诊断及预后复发的判断。AFP-L3 (甲胎蛋白异质体) 是 AFP 糖基化侧链修饰后的产物之一, 在 HCC 细胞中特异性高表达^[11]。研究表明 AFP 在 HCC 的细胞增殖和凋亡中发挥重要作用, AFP 含量与 HCC 病灶体积、血管侵袭及分化程度等相关^[12-13]。

miRNA 是基因表达转录后具有调控作用的小分子 RNA, 研究者发现 miR-202 是一类具有抑癌基因特性的 miRNA, 能够靶向介导原癌基因的增殖侵袭过程并抑制其表达, 进而抑制其增殖并诱导其凋亡^[14]。研究显示 HCC 患者血清中 miR-202 的表达量与血清中 AFP、AFP-L3 的含量呈负相关, 这就说明 miR-202 的低表达与 HCC 的发生密切相关^[15]。AFP 作为一种常规肿瘤指标广泛应用于临床, 但经统计实际约 30% 左右的 HCC 患者 AFP 含量为阴性。AFP 阴性 HCC 患者的基因机制如何, 还需学者进一步研究。

1.3 肝癌病理分级的相关基因研究 HCC 的埃德蒙森-施泰纳 (Edmondson-Steiner) 分级为 I~IV 级, 病理分级一般为高、中、低和未分化 HCC, 且 HCC 不同分化程度与预后密切相关。c-myc 是 myc 基因家族的重要成员, c-myc 既是一种可易位基因, 又是一种可使细胞无限增殖、获永生功能促进细胞分裂的基因, c-myc 与多种肿瘤发生、发展有关。研究者发现 HCC 组织中 c-myc 阳性表达率在低分化 HCC 中高于高分化 HCC, 在 HCC 伴淋巴结转移者高于不伴淋巴结转移者^[16]。c-myc 是不可控型 p53 的诱导物, 可引起 p53 表达减少, 从而导致细胞失控增殖。

1.4 肝癌转移相关基因研究 整合素 $\alpha v \beta 3$ 是整合素家族中的重要成员, 作为内皮细胞与细胞外基质的桥梁, 通过调节内皮细胞的黏附、迁移、增殖、凋亡等功能, 在肿瘤血管生成过程中发挥重要作用。转化生长因子- $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) 是参与肿瘤增值、侵袭转移的重要生物因子, 在 HCC 增殖和转移中转化肿瘤细胞的生长因子, 与 HCC 的进展有关。

研究者揭示 HCC 的转移与骨桥蛋白 (OPN) 高表达有关, OPN 通过与整合素 $\alpha v \beta 3$ 或 CD44 结合, 参与细胞黏附、信号传导及运动等生物学过程; OPN 在伴转移的 HCC 组织中呈显著高表达, 通过阻断 OPN 的表达可延缓 HCC 的转移^[17]。经 OPN 和 TGF $\beta 1$ 基因干扰的高转移潜能 HCC 的肺转移能力有明显下降, 且后者下降更加明显, 研究表明 HCC 转移潜能的下降与 OPN 和 TGF $\beta 1$ 表达减少有关, 此研究成果为 HCC 转移和预后的基因预测奠定了基础^[18]。亦有研究者发现 HCC 组织和细胞系中母系表达基因 2 (MEG2) 表达降低, MEG2 通过抑制 AKT 磷酸化从而抑制 HCC 的生长和转移, 且 MEG2 表达的下调预示 HCC 患者的总生存率和无病生存率降低^[19]。HCC 的生长、转移和复发都离不开新生血管的形成, 载脂蛋白 A-I 结合蛋白 (apoA-I binding protein, AIBP) 可促进清除内皮细胞中的胆固醇, 此过程可干扰血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR-2) 的功能, 进而抑制血管生成^[20]。HCC 易发生肝内和肝外转移, 如果能掌握 HCC 转移机制, 就能为 HCC 治疗新靶点、为新型药物开发奠定基础, 从而控制 HCC 复发、延长患者无病生存时间。

1.5 肝癌其他相关基因研究 HCC 的形成过程极其复杂, 包括染色体不稳定性、癌基因表达激活、抑癌基因沉默和 DNA 修复系统失活等。DNA 甲基化是指胞嘧啶和鸟嘌呤二核苷酸中的胞嘧啶第 5 位碳原子被甲基化, 是重要的表观遗传学改变。通过检测转移抑制基因 p15、SYK、TIMP-3、E-cadherin、RASSAF1 和肿瘤相关基因 p53、RB1、WT1、p14、p16 启动子区在肝癌、癌旁和正常肝组织的甲基化情况, 研究者发现 HCC 组织有多个基因存在甲基化, 且 HCC 组织甲基化水平较癌旁组织高^[21]。

另外影响细胞增殖、侵袭的一些基因也与 HCC 的发生、发展相关。亮氨酸拉链 EF-hand 结构域跨膜蛋白 1 (LETM1) 和叉头框蛋白 Q1 (FOXQ1) 是与 HCC 细胞增殖密切相关的两类基因。LETM1 编码产物是一类线粒体内膜结合蛋白, 其高表达可引起线粒体糖酵解增加、腺苷三磷酸 (ATP) 生成增多, 引起磷脂酰肌醇三激酶 (PI3K)/AKT 信号通路处于持续激活的状态, PI3K/

AKT 是介导细胞增殖的信号通路,与多种细胞的异常增殖相关^[22]。FOXQ1 是叉头框转录因子家族的一员,涉及胚胎发育、糖类和脂类代谢、细胞周期调控等过程;其突变与肿瘤发生有关。FOXQ1 可靶向下游 cyclinD1、c-myc 的启动子区域并启动基因的转录过程^[23]。

跨膜蛋白 3(IFITM3)是与 HCC 细胞侵袭相关的基因,IFITM3 属于干扰素诱导基因 ISG,可以被干扰素和病毒诱导表达。IFITM3 编码产物是一类跨膜蛋白,可通过酪氨酸激酶(JAK)/STAT3 信号通路增加基质金属蛋白酶 9(MMP-9)的表达,通过 MMP-9 水解胶原蛋白和层粘连蛋白的功能造成胞外基质降解,促进细胞侵袭^[24]。

多种基因相关研究为解开 HCC 的发生、发展打开了大门,通过人类的逐步认识及持续研究,HCC 基因靶向治疗相关研究也取得较快的发展。

2 HCC 基因靶向治疗相关研究

实验常规细胞试剂:正常肝细胞株 L02,AFP 阳性人肝癌细胞株 HepG2 和 Hep3B,AFP 阴性人肝癌细胞株 SMMC7721,AFP 阴性的人宫颈癌 HeLa 细胞。基因载体 pcDNA3.1-AFP-AIBP-yCD/TK、p[HRE]AFP-Luc。

研究者通过构建 AFP 启动子驱动的双自杀基因(CD,TK)+AIBP 基因过表达载体 pcDNA3.1-AFP-AIBP-yCD/TK,并分别转染 Hep3B 和 SMMC7721,转染后 Hep3B 细胞生长得到明显抑制,但 SMMC7721 细胞生长不受影响;且 AIBP 表达在 HCC 细胞中下调,推测 AIBP 高表达可能抑制 HCC 新血管生成^[25]。由此 AIBP 有望成为 HCC 抗血管生成的潜在靶点。

Survivin 是凋亡蛋白抑制因子家族成员,特点是在正常组织沉默,而仅在各类肿瘤中有所表达,同样在肝癌组织中 Survivin 呈高表达^[26]。研究者通过 AFP siRNA 转染 HepG2 细胞,结果显示 AFP 表达下调,证明沉默 AFP 基因进而抑制 Survivin 表达、促进细胞凋亡^[27]。通过构建 pAFP-p53-EGFP 重组质粒,并转染 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 细胞,研究者发现 HepG2 细胞 p53 蛋白表达量明显高于 SMMC7721 和 HeLa 细胞,证明 p53 的表达具有细胞相对专一性,pAFP-P53-EGFP 载体可专一性的作用于 AFP 阳性肝癌细胞,引起 HCC 细胞周期阻滞和凋亡^[28]。

研究者构建靶向 HCC 自杀基因 p[HRE]AFP-HSVTK 和肿瘤细胞成像基因载体 p[HRE]AFP-Luc,并将磁性纳米颗粒四氧化三铁-聚乙烯亚胺(Fe_3O_4 @PEI)作为基因治疗载体和磁流体热疗的介质,结果显示 Fe_3O_4 @PEI 介导的体内靶向基因治疗和磁流体热疗的联合治疗能

对肿瘤细胞产生特异高效的协同杀伤作用^[29]。 Fe_3O_4 @PEI 即能在交变磁场中可控升温,同时又能作为基因载体对肿瘤进行基因治疗^[30]。

HCC 的发生、发展极其复杂,HBV 感染、强致癌剂 AFB1 等病因研究已取得一定成果,AFP 相关基因、HCC 转移相关基因等多种基因也进入人们视野,但这仅仅是冰山一角。相信随着 HCC 基因组学的开展和深入,将会给 HCC 研究带来根本性变化,通过构建与 HCC 发生、发展、转移复发和预后相关的指标体系分子分型,为临床治疗方案的选择提供依据,研究 HCC 治疗新靶点为新型药物开发奠定基础,为 HCC 的临床治疗及预防开拓新前景。

3 参考文献

- [1] Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, et al. Impact of hepatitis B virus (HBV) X gene integration in liver tissue on hepatocellular carcinoma development in serologic-ally HBV-negative chronic hepatitis C patients[J]. *Journal of Hepatology*, 2008, 48(1): 43-50. DOI: 10.1016/j.jhep.2007.08.016.
- [2] Sung WK, Zheng HC, Li SY, et al. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma[J]. *Nature Genetics*, 2012, 44(7):765-769. DOI:10.1038/ng.2295.
- [3] Shao W, Zhang F, Cong N, et al. The hepatitis B virus reactivation after transcatheter arterial chemoembolization in Chinese hepatocellular carcinoma patients with low serum hepatitis B virus DNA level[J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2015, 11:1367-1370.
- [4] Chang IC, Huang SF, Chen PJ, et al. The hepatitis viral status in patients with hepatocellular carcinoma: a study of 3843 patients from Taiwan Liver Cancer Network[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(15):e3284.
- [5] Chiao LL, Chen YL, You YL, et al. Androgen Receptor Enhances Hepatic Telomerase Reverse Transcriptase Gene Transcription After Hepatitis B Virus Integration or Point Mutation in Promoter Region[J]. *Hepatology*, 2019, 69(2): 498-512. DOI 10.1002/hep.30201.
- [6] Qi LN, Bai T, Chen ZS, et al. The p53 mutation spectrum in hepatocellular carcinoma from Guangxi, China: role of chronic hepatitis B virus infection and aflatoxin B1 exposure[J]. *Liver International*, 2015, (35):999-1009.DOI: 10.1111/liv.12460.
- [7] Kew MC. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2011, (26):144-152.
- [8] Durnez A, Verslype C, Nevens F, et al. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology*, 2006, 49(2): 138-151. DOI:10.1111/j.1365-2559.2006.02468.
- [9] Wang J, Chen Y, Mo PL, et al. $1\alpha, 25\text{-Dihydroxyvitamin D}_3$ inhibits aflatoxin B1-induced proliferation and dedifferentiation of

- hepatic progenitor cells by regulating PI3K/Akt and Hippo pathways[J]. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2018(183), 228–237. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2018.08.002.
- [10] Xie XW, Wang XY, Liao WJ, et al. PPPDE1 promotes hepatocellular carcinoma development by negatively regulate p53 and apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2019, 24:135–144.
- [11] Park SJ, Jang JY, Jeong SW, et al. Usefulness of AFP, AFP–L3, and PIVKA–II, and their combinations in diagnosing hepatocellular carcinoma[J]. *Medicine*, 2017, 96 (11) :5811. DOI:10.1097/MD.0000000000005811.
- [12] Li M, Li H, Li C, et al. Alpha fetoprotein is a novel protein–binding partner for caspase–3 and blocks the apoptotic signaling pathway human hepatoma cells[J]. *International Journal of Cancer*, 2009, 124(12):2845–2854. DOI:10.1002/ijc.24272.
- [13] Liu C, Xiao GQ, Yan LN, et al. Value of a–fetoprotein in association with clinicopathological features of hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2013,19(11) : 1811–1819.
- [14] Meng X, chen X, Lu P, et al. MiR–202 promotes cell apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma by targeting HSF2 [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(2):215–223.
- [15] 卢振,王瑜芬,田爱霞.肝癌患者血清中 MiR–202 表达量与肿瘤标志物含量、癌基因表达量的相关性研究[J]. *海南医学院学报*, 2018, 24 (7):793–796. DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20180410.001.
- [16] 施公胜,孙超,韩新华,等. ras p21\ C – myc \ C – erbB – 2 和 AFP 在 2– 乙酰氨基苄(2–FAA)诱发大鼠肝癌变的表达[J]. *中华肝病杂志*, 2001, 9(2):98–99.
- [17] Ye QH, Qin LX, Forgues M, et al. Predicting hepatitis B virus–positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning[J]. *Nature Medicine*, 2003,9(4): 416–423. DOI:10.1038/nm843.
- [18] 黄楚恒,李天然,黄晓斌,等. 转移相关基因于抗对肝癌转移潜能的影响[J]. *东南国防医药*, 2016, 18(3):225–229. DOI:10.3969/j.issn.1672–271X.2016.03.001.
- [19] Ying DJ, Ruan Y, Zhou XH. MEG2 inhibits the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting AKT pathway[J]. *Gene*, 2019,687:1–8. DOI: 10.1016/j.gene.2018.11.003.
- [20] Fang L, Choi SH, Baek JS, et al. Control of angiogenesis by AIBP–mediated Cholesterol efflux[J]. *Nature*, 2013, 498(7452): 118–122. DOI:10.1038/nature121666.
- [21] 程越,张长松,郭献灵,等. 肝细胞癌多基因甲基化研究[J]. *分子影像学杂志*, 2016, 39 (1):33–36. DOI:10.3969/j.issn.1674–4500.2016.01.11.
- [22] Zhao L, Li C, Liu F, et al. A blockade of PD–L1 produced anti tumor and antimetastatic effects in an orthotopic mouse pancreatic cancer model via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 12(10):2115–2126.
- [23] Huang W, Chen Z, Shang X, et al. Sox12, a direct target of FOXQ1, promotes hepatocellular carcinoma metastasis through up–regulating Twist1 and FGF19[J]. *Hepatology*, 2015, 61 (6): 1920–1933. DOI: 10.1002/hep.27756.
- [24] Li ZC, Takino T, Endo Y, et al. Activation of MMP–9 by membrane type–1 MMP/ MMP–2 axis stimulates tumor metastasis[J]. *Cancer Science*, 2017, 108(3):347–353. DOI:10.1111/cas.13134.
- [25] 黄云,王志明,陶一明,等.AIBP 在肝癌细胞中的表达及意义与含 AIBP 基因及 AFP 启动子驱动的双自杀基因表达载体构建[J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(9):1173–1178. DOI:10.7659/j.issn.1005–6947.2013.09.014.
- [26] Yang Y, Zhu J, Gou H. Clinical significance of Cox–2, Survivin and Bcl–2 expression in hepatocellular carcinoma (HCC) [J]. *Med Oncol*, 2011, 28(3): 796–803.
- [27] 方念,方紫凌,张慧卿,等. 沉默 AFP 基因可抑制肝癌 HepG2 细胞 Survivin mRNA 的表达[J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 40(24):1528–1530. DOI:10.3969/j.issn.1000–8179.20131261.
- [28] 张焕铃,王俊霞,红煜,等. 含 AFP 基因调控序列的 pAFP–P53–EGFP 质粒诱导 AFP 阳性肝癌细胞凋亡[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(3):297–301. DOI: 10.3872 / j.issn.1007–385x.2010.03.010.
- [29] 袁晨燕,安艳丽,王玲. 磁性纳米颗粒 Fe₃O₄@PEI 介导靶向自杀基因联合磁流体热疗对肝癌移植瘤的抑制作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(9):913–919. DOI:10.3872/j.issn.1007–385x.2018.09.011.
- [30] EL–Boubbou K. Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: preparation, conjugation and delivery[J]. *Future Medicine*, 2018,13(8):929–952.

(收稿日期:2019–01–11)

(本文编辑:俞骏文)

(上接第 297 页)

overweight patients with colon carcinoma: A cross–sectional and prospective study[J]. *Mol Clin Oncol*, 2017, 6(1):75–78. DOI:10.3892/mco.2016.1087.

- [33] Cao D, Luo Y, Qin S, et al. Metalloproteinase–1 (MPS–1) medi–

ates the promotion effect of leptin on colorectal cancer through activation of JNK/c–JUN signaling pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(9):655. DOI:10.1038/s41419–019–1911–8.

(收稿日期:2019–09–13)

(本文编辑:陈丹)