

DOI: 10.13376/j.cblls/2014150

文章编号: 1004-0374(2014)10-1046-05

# microRNA在乙型肝炎病毒感染及相关疾病中的作用

徐静宜, 高建鹏\*

(昆明医科大学附属延安医院, 昆明 650000)

**摘要:** 乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是一种嗜肝性 DNA 病毒, 感染后可导致急性和慢性肝炎, 而慢性感染是导致肝硬化、肝癌和肝衰竭的主要病因。在乙型肝炎病毒复制、转录和相关疾病进程中, microRNA(miRNA) 扮演着重要的角色。乙型肝炎病毒感染肝细胞后能引起细胞内 microRNA 表达谱的改变: 一方面, microRNA 能促进乙型肝炎病毒的转录和诱导宿主细胞向肿瘤细胞转化; 另一方面, microRNA 也能抑制乙型肝炎病毒包装和复制。重要的是, 乙型肝炎病毒的感染能影响宿主血清 microRNA 的表达。因此, 这类特殊的 microRNA 今后可成为乙型肝炎病毒相关疾病诊断的潜在生物标记物。将对乙型肝炎病毒与宿主 microRNA 之间相互作用及其相关生物学效应作一综述。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; miRNA; HBV 复制; HBV 转录; HBV 相关疾病

**中图分类号:** Q522; R44; R512.6 **文献标志码:** A

## Role of microRNAs in hepatitis B virus replication and pathogenesis

XU Jing-Yi, GAO Jian-Peng\*

(Yan'an Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650000, China)

**Abstract:** Hepatitis B virus (HBV) is a small enveloped DNA virus which belongs to the Hepadnaviridae family. It can cause acute and chronic hepatitis, and the chronic infection can lead to a series of liver diseases. microRNA (miRNA) plays an important role in replication of HBV, and pathogenesis of HBV-related diseases. The expression profile of microRNAs in liver cells can be changed under HBV infection. On one hand, microRNA can promote transcription of HBV and induce the transformation from host cells to tumor cells; on the other hand, microRNA can suppress packaging and replication of HBV. More importantly, HBV infection can affect the expression of microRNAs in the host serum. Therefore, such special microRNA will become a potential diagnostic biomarker in the future.

**Key words:** HBV; miRNA; HBV replication; HBV transcription; HBV-related diseases

microRNA(miRNA) 是由一段长度为 70~80 nt 的发夹样结构的单链 RNA 前体剪切后生成。成熟 miRNA 长约 19~23 nt。miRNA 通过与 mRNA 靶向结合后下调相应蛋白的表达水平, 从而实现基因转录后表达调控<sup>[1]</sup>。线虫的 let-7 和 lin-4 是最早发现的 miRNA<sup>[2-3]</sup>。在哺乳动物细胞中, miRNA 通过完全或不完全碱基互补配对与目标 mRNA 3' 非编码区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 的靶点相结合后调节基因的表达<sup>[4]</sup>。miRNA 可参与多种生物学功能, 包括控制细胞分化、生长和凋亡, 同时, 对个体发育、代谢和衰老具有重要作用<sup>[5]</sup>。miRNA 作为一

个功能分子在疾病发生和发展中扮演重要角色, 这些疾病主要包括心血管疾病、自身免疫、代谢病及病毒感染<sup>[6]</sup>。

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是导致严重肝病的主要病原体之一, 全世界范围内慢性乙型肝炎患者约有 3.5 亿人, 每年至少 100 万人死于 HBV 相关性终末期肝病<sup>[7]</sup>。乙型肝炎病毒属嗜肝 DNA 病毒科, 其基因组为一环状部分双链 DNA,

收稿日期: 2014-04-14; 修回日期: 2014-08-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(81360245)

\*通信作者: E-mail: gaojianpengkm@126.com

长约 3 200 bp。基因组包含 4 个开放阅读框, 分别编码表面抗原 (HBsAg)、核心抗原 (HBcAg)、DNA 多聚酶 (DNA polymerase) 和 X 蛋白。HBV 感染进入肝细胞后, 在细胞核内形成闭合环状 DNA (cccDNA), cccDNA 作为转录的模板, 在 RNA 聚合酶作用下, 产生长度分别为 3.5 nt、2.4 nt、2.1 nt 及 0.7 nt 的 RNA 转录物。经转录翻译的蛋白通过在核糖体及高尔基体的加工处理形成成熟的病毒颗粒, 分泌出胞外<sup>[8]</sup>。

miRNA 在 HBV 相关疾病中的异常表达与疾病的发生和发展密切相关<sup>[9-12]</sup>。本文将对 HBV 与宿主 miRNA 之间相互作用、生物学效应及改变作一综述。

## 1 HBV调节宿主microRNA的表达

HBV 感染后可改变宿主相关的 miRNA 的表达, 为进一步形成慢性迁延性感染创造条件。在 HBV 感染对宿主相关 miRNA 的改变中, HBV 编码的 X 蛋白具有重要作用。乙型肝炎病毒 X 蛋白 (hepatitis B virus X protein, HBx) 是 HBV 编码的、相对分子质量为  $17 \times 10^3$  的蛋白质, 为乙肝病毒 x 基因的表达产物。HBx 具有广泛的反式激活功能, 通过直接或间接的蛋白质相互作用参与感染肝细胞的信号转导、细胞凋亡和细胞周期调控。HBx 在促肝癌的形成中也具有重要作用<sup>[13]</sup>。通过 33 例肝癌组织与癌旁正常组织相比较发现, 肝癌组织 miR-205 表达明显下调, miR-205 在体外能够抑制肿瘤的生长, 并且 miR-205 的表达水平与 HBx 呈反向相关性<sup>[14]</sup>, 即 HBx 可通过诱导 miR-205 启动子的甲基化使其表达受抑制, 最终促使肝癌的形成。

此外, HBx 能够下调体外肝癌细胞 miR-16 家族的表达, 此途径是通过 *c-Myc* 基因介导的负性调节 miR-16 家族, 从而促进肝癌细胞的增殖<sup>[15]</sup>。因此, 今后可通过完善相关的体内试验进一步证实以上论点, 从而使 *c-Myc* 与 miR-16 家族成为 HBV 相关疾病的治疗中的一个“新”靶点。

## 2 宿主细胞microRNA调节HBV基因转录和复制

宿主细胞内的 miRNA 能够抑制或促进病毒的复制和转录。乙型肝炎病毒感染肝细胞后能引起宿主细胞内 microRNA 表达谱的改变: 一方面, microRNA 能促进乙型肝炎病毒的转录和诱导宿主细胞向肿瘤细胞转化; 另一方面, microRNA 也能

抑制病毒包装和复制。

### 2.1 microRNA调节HBV转录

HBV 主要是通过 2 个增强子 (增强子 I 和 II) 及 4 个编码区的启动子促进 HBV 的转录。其中 HBV 增强子通过结合 STAT3 和 HNF1/4 促进 HBV 的转录<sup>[16]</sup>。而 C/EBP(CAAT 结合蛋白) 通过激活 HBV 增强子或者与 C 和 S 区的启动子结合, 正调节 HBV 的转录<sup>[17-18]</sup>。另外, miR-155 通过靶向负调节 C/EBP- $\beta$ , 导致 HBV 的转录表达下调<sup>[19]</sup>。miR-1 通过活化转录因子 FXRA 增强 HBcAg 的转录<sup>[16]</sup>。

在性别因素方面, HBV 基因的表达受性激素及其受体的调节。雄激素受体可直接结合 HBV 增强子 I 的相关反应元件, 促进 HBV 的转录<sup>[20]</sup>。此外, 通过对原发性肝癌女性与男性患者的 miRNA 表达进行分析后发现, miR-18a 在女性患者肝组织内表达明显上调<sup>[21]</sup>。经实验证明, miR-18a 是通过结合 mRNA 的 3' 非翻译区导致雌激素受体表达下调, 能正调节 HBV 的转录, 从而促进肝癌细胞的增殖<sup>[21]</sup>。

另一方面, Zhang 等<sup>[22]</sup>证实 miR-199a-3p 和 miR-210 能够显著下调 HBsAg 的表达, 并经实验验证 miR-199a-3p 的结合位点在 HBsAg 的编码区, miR-210 的结合位点在 HBV 前 S1 区。此外, miR-7、miR-196b、miR-433、miR-511 能够靶向负调节 HBV 编码的 DNA 聚合酶及表面抗原的基因; miR-205 靶向负调节 X 区的基因片段的转录, 而 miR-345 靶向负调节前 C 区的基因片段的转录<sup>[23]</sup>。2012 年, Waidmann 等<sup>[24]</sup>研究报道, 血清 miR-122 的表达水平与 HBsAg 显著相关, 它可能作为病毒转录的一个重要指标。

### 2.2 microRNA调节HBV复制

miRNA 除可调节 HBV 转录外, 对 HBV 复制也有重要影响。在 HBV 感染及相关疾病中研究最“热”的 miRNA 是 miR-122。miR-122 在正常肝脏中呈高表达, 并且在肝脏中参与脂质代谢、肝脏发育、分化和恶性肿瘤的转化<sup>[25]</sup>。miR-122 的过表达能抑制 HBV 的复制, 正常表达的 miR-122 可调控血红素氧合酶-1(HO-1) 表达下调。血红素氧合酶-1 在 HBV 中的主要作用是能够降低 HBV 核心蛋白的稳定性和降低 HBV cccDNA 水平, miR-122 介导 HO-1 表达下调从而负面影响 miR-122 对 HBV 抑制的调节<sup>[26]</sup>。因此, miR-122 在 HBV 复制中既起抑制作用也可促进病毒包装<sup>[26]</sup>。也有学者发现 miR-

122 在 HBV 慢性感染患者中表达明显下调, 而作为 miR-122 靶基因的 Cyclin G1 在慢性感染患者体

内呈高表达。因此, miR-122 可负性调节 Cyclin G1 的表达, 从而抑制 HBV 的复制<sup>[27]</sup>(表 1)。

表1 miRNA对HBV复制的影响

miRNA	miRNA表达	靶基因	HBV复制	参考文献
miR-122	下调	CyclinG1↑	HBV↑	[27]
miR-1	上调	HDAC4↓	HBV↑	[16]
miR-152	下调	DMNT1↑	HBV↓	[28]
miR-501	上调	HBXIP↓	HBV↑	[29]
miR-141	上调	PPARA↓	HBV↓	[30]
miR-181a	上调	E2F5↓	HBV↑	[9]
miR-138	下调	CCND3↑	HBV↓	[31]
miR-17-92	上调	c-myc(介导)	HBV↓	[32]

注: HBV ↑: 促进HBV复制; HBV ↓: 抑制HBV复制; 靶基因 ↑: miRNA上调靶基因表达; 靶基因 ↓: miRNA下调靶基因表达。

首先, DNA 甲基化在宿主基因沉默及抑制 HBV cccDNA 转录中也具有重要作用<sup>[16]</sup>。在肝癌患者肝组织中, miR-152 与 DNA 甲基转移酶 1 (DMNT1) 的表达情况呈反向相关, 即 miR-152 在肝癌患者肝组织中表达下调, 而 DNA 甲基转移酶 1 (DMNT1) 表达上调。经过实验证明, miR-152 的靶点为 DNA 甲基转移酶 1(DMNT1), 它在 miR-152 表达下调时使病毒 DNA 甲基化及宿主中相关基因沉默, 从而降低 HBV 基因的复制<sup>[28]</sup>。表 1 中列出了通过调节宿主靶基因表达从而调控 HBV 复制的 miRNA。

其次, miRNA 也能通过调节 HBV 相关的因子或其他与之相关的分子而影响其复制。miR-501 通过调节 HBXIP(HBx 相关的肿瘤蛋白) 的表达, 促进 HBV 复制<sup>[29]</sup>。miR-141 通过下调 PPARA(HBV 前基因组 RNA 合成和病毒复制所需的关键肝富集转录因子) 而降低 HBV 启动子活性, 从而抑制 HBV 的复制<sup>[30]</sup>。miR-181a 可负性调节 E2F5(转录因子), 促进 HBV 的复制<sup>[9]</sup>。在肝癌细胞中, miR-138 表达下调诱导 CCND3(细胞周期蛋白 D3) 表达上调, 使细胞周期停滞<sup>[31]</sup>。miR-1 可以通过激活法尼酯 X 受体 (farnesoid X receptor  $\alpha$ , FXRA) 和下调 HDAC4 (组蛋白脱乙酰酶 4), 从而促进 HBV 复制, 上调 HBV 转录水平及相关抗原的表达和分泌<sup>[16]</sup>。

最后, 癌基因也可通过 miRNA 调节 HBV 的复制, c-myc 介导的 miRNA-17-92 的过表达能够抑制肝癌细胞中 HBV 的复制(表 1)<sup>[32]</sup>。宿主通过调节 HBV 相关的细胞因子或者相关基因影响 HBV 的

复制, 对这些机制的理解有助于今后疾病的诊断和治疗。

### 3 慢性HBV感染对宿主microRNA的影响

HBV 慢性感染改变了肝细胞和整个机体的动态平衡, 并最终促进了肝硬化和肝癌的发生。HBV 慢性感染导致 miRNA 在宿主血清和肝细胞中的表达谱发生变化。

#### 3.1 HBV对宿主血清中microRNA表达的影响

由于 HBV 对宿主血清 miRNA 的影响具有特异性, 因此, 特异性表达的 miRNA 对 HBV 相关疾病的诊断至关重要。为了证实 miR-210 与肝炎的重要性, Song 等<sup>[33]</sup> 通过建立小鼠肝炎模型证实血清中 miR-210 的升高与肝炎的严重程度相关, 并比较了 90 例慢性乙肝不同阶段的患者与 30 例正常者发现, 血清中 miR-210 的水平与肝炎的严重程度, 以及血清丙氨酸转移酶 (ALT)、天冬氨酸转移酶 (AST)、总胆红素 (TB) 明显相关。因此, 慢性 HBV 感染可导致肝脏和血清中 miR-210 表达明显升高。血清及肝脏 miR-210 的表达水平可作为慢性乙肝的诊断标志物<sup>[33]</sup>。此外, 血清中 miR-17-5p 在肝癌患者术后较术前明显表达下调, 经 Kaplan-Meier 曲线分析显示, 血清中 miR-17-5p 高表达的肝癌患者的寿命明显缩短<sup>[34]</sup>。从而证明了 miR-17-5p 在血清中的表达水平与肝癌的发展相关。

在肝癌和肝硬化患者的血清中, miR-164a、miR-224、miR-574-3p、miR-125b-5p 和 miR-885-5p 表达上调, 其中 miR-885-5p 表达特异性较高<sup>[11-12]</sup>。

而 miR-125b-5p 随着肝炎、肝硬化及肝癌疾病不同程度的发展, 其表达也显著上调<sup>[11]</sup>。因此, 这些表达特异性的 miRNA 可作为检测肝病的潜在标志物。

### 3.2 HBV对宿主组织中microRNA表达的影响

比较肝癌与非恶性肿瘤患者 miRNA 的表达变化发现, 其中 miR-21、miR-224、miR-34a、miR-221/222、miR-106a、miR-203 在肝癌组织中表达明显上调, 而 miR-139、miR-422b、miR-145 和 miR-199b 表达下调<sup>[10,36]</sup>。另外, miR-602 在 HBV 慢性感染及肝癌患者肝细胞中显著表达上调<sup>[16]</sup>。动态表达分析显示, miR-602 的表达水平随着疾病进展呈逐渐上升趋势, 并且在肝癌阶段表达最高。miR-602 主要通过抑制 RASSF1A (Ras-association domain family 1A gene) 的表达, 从而调节肝细胞的异性增生, 导致一系列肝病的发生和发展。

关于 miR-122 在肝癌发生中的作用, Huang 和 He<sup>[37]</sup> 认为在肝癌中 HBV 能通过肝富集转录因子 HNF1A、HNF3A 和 HNF3B 使 miR-122 表达下调。通过调节 Cyclin G1 影响 p53 蛋白的稳定性和转录活性, 从而阻滞肝癌细胞的 G2/M 期, 降低肝癌细胞的侵袭能力<sup>[38]</sup>。

## 4 展望

miRNA 是调控基因表达的关键分子, HBV 是引起一系列肝病的常见病原体, miRNA 与 HBV 感染之间的相互联系也渐渐明了。miRNA 在 HBV 相关疾病中的特异性表达改变是研究这些疾病发病机制的重要切入点。今后通过阻断特异性表达的 miRNA 相关的细胞信号或细胞因子, 从而调节 miRNA 的表达, 抑制 HBV 的复制和转录, 也可通过对 miRNA 深度测序和功能验证使 miRNA 作为潜在疾病诊断和治疗的“新”靶点。

### [参 考 文 献]

- [1] Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, 431(7006): 350-5
- [2] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403(6772): 901-6
- [3] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 1993, 75(5): 843-54
- [4] Zhang ZZ, Liu X, Wang DQ, et al. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma at the miRNA level. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(28): 3353-8
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136(2): 215-33
- [6] Winter J, Jung S, Keller S, et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(3): 228-34
- [7] Dienstag JL. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*, 2008, 359(14): 1486-500
- [8] Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(3): 215-29
- [9] Zou C, Li Y, Cao Y, et al. Up-regulated microRNA-181a induces carcinogenesis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting E2F5. *BMC Cancer*, 2014, 14: 97
- [10] Li T, Yin J, Yuan L, et al. Downregulation of microRNA-139 is associated with hepatocellular carcinoma risk and short-term survival. *Oncol Rep*, 2014, 31(4): 1699-706
- [11] Giray BG, Emekdas G, Tezcan S, et al. Profiles of serum microRNAs; miR-125b-5p and miR223-3p serve as novel biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(7): 4513-9
- [12] Gui J, Tian Y, Wen X, et al. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies. *Clin Sci:Lond*, 2011, 120(5): 183-93
- [13] Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, et al. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol Biol: Paris*, 2010, 58(4): 267-72
- [14] Zhang T, Zhang J, Cui M, et al. Hepatitis B virus X protein inhibits tumor suppressor miR-205 through inducing hypermethylation of miR-205 promoter to enhance carcinogenesis. *Neoplasia*, 2013, 15(11): 1982-91
- [15] Wu G, Yu F, Xiao Z, et al. Hepatitis B virus X protein downregulates expression of the miR-16 family in malignant hepatocytes *in vitro*. *Br J Cancer*, 2011, 105(1): 1146-53
- [16] Liu WH, Yeh SH, Chen PJ. Role of microRNAs in hepatitis B virus replication and pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1809(11-12): 678-85
- [17] Bock CT, Kubicka S, Manns MP, et al. Two control elements in the hepatitis B virus S-promoter are important for full promoter activity mediated by CCAAT-binding factor. *Hepatology*, 1999, 29(4): 1236-47
- [18] Lopez-Cabrera M, Letovsky J, Hu KQ, et al. Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pre-genomic promoter: transactivation and repression by CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(13): 5069-73
- [19] Wang B, Majumder S, Nuovo G, et al. Role of microRNA-155 at early stages of hepatocarcinogenesis induced by choline-deficient and amino acid-defined diet in C57BL/6 mice. *Hepatology*, 2009, 50(4): 1152-61
- [20] Wang SH, Yeh SH, Lin WH, et al. Identification of androgen response elements in the enhancer I of hepatitis B virus: a mechanism for sex disparity in chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2009, 50(5): 1392-402
- [21] Liu WH, Yeh SH, Lu CC, et al. MicroRNA-18a prevents estrogen receptor- $\alpha$  expression, promoting proliferation of

- hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology*, 2009, 136(2): 683-93
- [22] Zhang GL, Li YX, Zheng SQ, et al. Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. *Antiviral Res*, 2010, 88(2): 169-75
- [23] Wu FL, Jin WB, Li JH, et al. Targets for human encoded microRNAs in HBV genes. *Virus Genes*, 2011, 42(2): 157-61
- [24] Waidmann O, Bihrer V, Pleli T, et al. Serum microRNA-122 levels in different groups of patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat*, 2012, 19(2): e58-e65
- [25] Thirion M, Ochiya T. Roles of microRNAs in the hepatitis B virus infection and related diseases. *Viruses*, 2013, 5(11): 2690-703
- [26] Qiu L, Fan H, Jin W, et al. miR-122-induced down-regulation of HO-1 negatively affects miR-122-mediated suppression of HBV. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(4): 771-7
- [27] Wang S, Qiu L, Yan X, et al. Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G<sub>1</sub>-modulated P53 activity. *Hepatology*, 2012, 55(3): 730-41
- [28] Huang J, Wang Y, Guo Y, et al. Down-regulated microRNA-152 induces aberrant DNA methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting DNA methyltransferase 1. *Hepatology*, 2010, 52(1): 60-70
- [29] Jin J, Tang S, Xia L, et al. MicroRNA-501 promotes HBV replication by targeting HBXIP. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(4): 1228-33
- [30] Hu W, Wang X, Ding X, et al. MicroRNA-141 represses HBV replication by targeting PPARA. *PLoS One*, 2012, 7(3): e34165
- [31] Wang W, Zhao LJ, Tan YX, et al. MiR-138 induces cell cycle arrest by targeting cyclin D3 in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 2012, 33(5): 1113-20
- [32] Jung YJ, Kim JW, Park SJ, et al. c-Myc-mediated overexpression of miR-17-92 suppresses replication of hepatitis B virus in human hepatoma cells. *J Med Virol*, 2013, 85(6): 969-78
- [33] Song G, Jia H, Xu H, et al. Studying the association of microRNA-210 level with chronic hepatitis B progression. *J Viral Hepat*, 2014, 21(4): 272-80
- [34] Zheng J, Dong P, Gao S, et al. High expression of serum miR-17-5p associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 2013, 60(123): 549-52
- [35] Wei YF, Cui GY, Ye P, et al. MicroRNAs may solve the mystery of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(30): 4867-76
- [36] Chen XM. MicroRNA signatures in liver diseases. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(14): 1665-72
- [37] Huang S, He X. The role of microRNAs in liver cancer progression. *Br J Cancer*, 2011, 104(2): 235-40
- [38] Fornari F, Gramantieri L, Giovannini C, et al. MiR-122/cyclin G1 interaction modulates p53 activity and affects doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res*, 2009, 69(14): 5761-7