

- monocytes/macrophages. *Cancer Sci*, 2008, 99(8):1595 – 1602
- 7 Peng H, Sahara Y, Moats R, *et al*. The activity of zoledronic Acid on neuroblastoma bone metastasis involves inhibition of osteoclasts and tumor cell survival and proliferation. *Cancer Res*, 2007, 67(19): 9346 – 9355
 - 8 Giraudo E, Inoue M, Hanahan D. Anamino – bisphosphonate targets MMP – 9 – expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest*, 2004, 114(5):623 – 633
 - 9 Coscia M, Quaglini E, Iezzi M, *et al*. Zoledronic acid repolarizes tumor – associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. *J Cell Mol Med*, 2009, Oct 10
 - 10 Tsgozis P, Eriksson F, Pisa P. Zoledronic acid modulates antitumoral responses of prostate cancer – tumor associated macrophages. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(10):1451 – 1459
 - 11 Zhang W, Zhu X, Sun H, *et al*. Depletion of tumor – associated macrophages enhances the effect of sorafenib in metastatic liver cancer models by antimetastatic and antiangiogenic effects. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(13):3420 – 3430
 - 12 Pahler J, Tazzyman S, Erez N, *et al*. Plasticity in tumor – promoting inflammation: impairment of macrophage recruitment evokes a compensatory neutrophil response. *Neoplasia*, 2008, 10(4):329 – 340
 - 13 Sica A, Larghi P, Mancino A, *et al*. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol*. 2008, 18(5): 349 – 355
 - 14 Guiducci C, Vicari A, Sangaletti S, *et al*. Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res*, 2005, 65(8):3437 – 3446
 - 15 Zhang C, Xu G, Jia W, *et al*. Can hepatocellular carcinoma be treated by Yondelis through targeting both tumor cells and tumor – associated macrophages. *Hepatogastroenterology*, 2010, 57(97):114 – 116
 - 16 Allavena P, Signorelli M, Chieppa M, *et al*. Anti – inflammatory properties of the novel antitumor agent yondelis (trabectedin): inhibition of macrophage differentiation and cytokine production. *Cancer Res*, 2005, 65(7):2964 – 2971
 - 17 Guruvayoorappan C, Kuttan G. Apoptotic effect of Biophytum sensitivum on B16F – 10 cells and its regulatory effects on nitric oxide and cytokine production on tumor – associated macrophages. *Integr Cancer Ther*, 2007, 6(4):373 – 380
 - 18 Guruvayoorappan C, Kuttan G. Antiangiogenic effect of rutin and its regulatory effect on the production of VEGF, IL – 1 and TNF – alpha in tumor associated macrophages. *J Biol Sci*, 2007, 7(8):1511 – 1519
 - 19 Semenza G. Targeting HIF – 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(10):721 – 732
 - 20 Hou D, Muller A, Sharma M, *et al*. Inhibition of indoleamine 2,3 – dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1 – methyl – tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res*, 2007, 67(2): 792 – 801
 - 21 Salnikov A, Heldin N, Stuhr L, *et al*. Inhibition of carcinoma cell – derived VEGF reduces inflammatory characteristics in xenograft carcinoma. *Int J Cancer*, 2006, 119(12):2795 – 2802
 - 22 Burke B, Sumner S, Maitland N, *et al*. Macrophages in gene therapy: cellular delivery vehicles and in vivo targets. *J Leukoc Biol*, 2002, 72(3):417 – 428
 - 23 Muthana M, Scott SD, Farrow N, *et al*. A novel magnetic approach to enhance the efficacy of cell – based gene therapies. *Gene Ther*, 2008, 15(12):902 – 910
 - 24 De Palma M, Mazziere R, Politi L, *et al*. Tumor – targeted interferon – alpha delivery by Tie2 – expressing monocytes inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Cell*, 2008, 14(4):299 – 311

(收稿:2010 – 09 – 21)

(修回:2011 – 01 – 21)

microRNA 与肿瘤

王卫卫 李兆申 高 军 邹多武

近年来对肿瘤的生物标志进行了大量而广泛的研究,包括基因标志、血清学标志和细胞学标志等,由于这些指标的特异性低和敏感性差等原因,利用这些免疫标志物进行诊断仍有很多缺陷,需要有对肿瘤诊断有更好临床意义的指标。近年来,一类在转录水平上调基因表达的非蛋白编码小分子 RNA (mi-

croRNAs, miRNAs) 的发现,给肿瘤的研究带来了新的启示。miRNAs 与肿瘤的发生发展密切相关,被认为是一组新的致癌基因或抑癌基因^[1-6]。本文就 microRNA 在肿瘤中的作用研究做一综述。

一、microRNA 的特征及生物学功能

miRNA (microRNA, 微小 RNA) 为一类近年新发现的内源性非编码小分子 RNA。miRNA 在进化上高度保守,它由基因组 DNA 编码,在 RNA 聚合酶 II 的作用下被转录。其研究始于 1993 年 Lee 等^[7]首个发现的可时序调控线虫胚胎后期发育的基因 lin – 4。

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院消化内科

通讯作者:李兆申,电子信箱:zhsti@81890.net

它由 19~23 个核苷酸组成,在细胞核中 RNA 核酸酶 Drosha - DGCR 复合体对 microRNA 初转录 pri - microRNA 的基部进行切割,形成 5'末端具有磷酸基,3'末端具有二核苷酸的茎环中间体 - 前体 microRNA (pre - microRNA)。然后与转运蛋白 Exportin - 5 识别结合运输到细胞质。在胞质中 RNA 核酸酶 Dicer 识别 pre - microRNA 双链的 5'末端及 3'末端,在距茎环处进行切割,其中成熟的 microRNA 来源于 pre - microRNA 的一条臂,经过两次切割而成熟 microRNA 通过 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA - induced silencing complex, RISC) 在细胞中发挥作用^[8,9]。

成熟的 microRNA 通过 RISC 与 3'端非翻译区 (3' - UTR) 完全或部分互补结合,导致靶 mRNA 降解或转录后翻译抑制,从而调控靶基因的表达,参与调控个体发育、细胞凋亡、增生及分化等生命活动^[10]。

二、microRNA 的检测是肿瘤诊断的一种稳定、可靠的研究方法

Mitchell 等^[11]从健康志愿者血浆中提取 RNA 后,提取 18~24 个核苷酸大小的 RNA 片段进行反转录建立小 RNA cDNA 文库,其中有 93% 是已知的 miRNA,说明外周血中存在 miRNA。内源性的 miRNAs 是稳定的,在室温下放置 24h 或 8 次冻融后对血浆中 miR - 15b, miR - 16 和 miR - 24 影响甚微,而且血清和血浆中 miRNA 数量差别很小,血浆 miRNA 的稳定性具备了其在血浆中检测的前提条件。外周血 miRNA 的定性检测可以采用 miRNA 芯片技术^[11,12]。进一步的定量检测主要借助于实时荧光 Real Time - PCR 技术。在 Real Time - PCR 反应体系中加入 Taqman 荧光探针,通过检测其反应进程中荧光信号的强度以实时监测反应扩增情况,随后对实验数据进行分析 and 处理,即得到定量数据^[13,14]。这些发现血浆 miRNA 可作为肿瘤的一种诊断方法。

Lu 等^[15]使用一种 bead - based flow cytometric miRNA 表达谱方法对结肠癌、肝癌、胰腺癌和胃癌标本进行分析,发现 miRNA 的表达谱可以很好地鉴别分化不良的肿瘤。这些结果表明 miRNA 表达谱可用于肿瘤的诊断。2006 年,美国俄亥俄州立大学的 Volinia 等^[16]通过分析来自肺部、胸部、胃部、前列腺、结肠和胰腺等处的癌组织标本 540 例,结果发现在这些实体癌肿有 miR - 17 - 5P、miR - 20a、miR - 21、miR - 92、miR - 106a 和 miR - 155 的过量表达。这说明 miRNA 在实体肿瘤的癌症发病中发挥着重要的作用,可用于肿瘤的诊断。

三、miRNA 与肿瘤的研究

Calin 等^[17,18]发现 miRNA 基因频繁地出现在肿瘤相关基因区域或脆性位点上。在肿瘤的基因组中发现了大量的 miRNA 的完全互补片段。miRNA 在不同肿瘤中具有特定的表达模式。miRNA 基因高频率地出现在这些和肿瘤密切相关的易变基因组环境中,提示 miRNA 在肿瘤形成过程中可能扮演着重要的角色。通过对人肺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、甲状腺癌、膀胱癌及胰腺癌等组织中 miRNA 表达谱与正常组织表达谱的对比分析,发现各种肿瘤各自特定的 miRNA 表达水平均发生了变化。Ki - 67 是反映肿瘤增生的标志物,Roldo 等^[19]报道胰腺癌中 miR - 21 的过表达与高的 Ki - 67 分化指数和肝癌转移有着密切关系。他们的结果表明 miRNA 表达的改变与恶性肿瘤的进展有关。这些发现为肿瘤的诊断及预后等研究开辟了一个崭新的局面。

1. miRNA 与淋巴瘤:miRNA 与肿瘤的关系最早是通过血液系统疾病的研究发现的,淋巴瘤起源于淋巴结和淋巴组织,其发生大多与免疫应答过程中淋巴细胞增生分化产生的某种免疫细胞恶变有关,是免疫系统的恶性肿瘤,但其病因及发病机制不完全清楚。进来研究发现,miR - 155 是由人 BIC 基因编码的 miRNA,在霍奇金淋巴瘤和 Burkitt 淋巴瘤中均高表达。在 Burkitt 淋巴瘤中,miR - 155 前体 RNA 出现 10~30 倍的蓄积现象,但是在非霍奇金淋巴瘤中几乎没有发现它的表达^[20]。应用 Taqman 探针法进行实时荧光定量 - PCR, Lawrie 等^[21]定量检测了 60 例弥漫型大 B 细胞淋巴瘤患者外周血中的 miR - 155、miR - 21 和 miR - 210,其表达量均高于正常对照组外周血中的表达量,与弥漫型大 B 细胞淋巴瘤密切相关。而表达差异最大的 miR - 21 可能与淋巴瘤的复发及患者生存率有关。

2. miRNA 与乳腺癌:乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。全球每年约有 120 万新发乳腺癌病例,50 万死亡病例。近年来,我国乳腺癌的发病率呈逐年上升趋势,然而,乳腺癌发生发展是多种异常基因共同作用的结果,其分子机制至今仍不清楚。Iorio 等^[22]采用生物芯片技术分析 10 例正常乳腺组织和 76 例乳腺癌组织的 miRNA 表达谱,发现乳腺癌中有 29 种 miRNA 的表达有显著改变,其中 miR - 10b, miR - 125b 和 miR - 145 在癌组织中低表达,miR - 155 和 miR - 21 的表达量显著上调,这些 miRNA 的表达和特异的乳腺癌生物病理学特征有关,如分期、

增生指数、雌激素和孕激素受体表达水平和血管浸润。他们认为 miR - 155 可能通过抑制 *madl*、*mxll*、*rox/mnt* 等基因的表达,促进 *myc* 基因的活性。因此 miR - 155 表达量的提高可增强 *myc* 基因的活性,从而促进细胞增生。另外, Frankel^[23] 研究发现,在乳腺癌细胞 MCF - 7 中 tumor suppressor protein Programmed Cell Death 4 (PDCD4) 是 miR - 21 的一个重要靶点,此外, miR - 21 与 P53 肿瘤抑制蛋白有密切的联系。

3. miRNA 与卵巢癌:卵巢癌亦是女性最常见的恶性肿瘤之一,大多数卵巢癌患者被诊断时都已处于肿瘤进展期,患者病死率高,因此寻找可以在高危人群中筛选、帮助早期诊断卵巢癌患者的肿瘤标志物一直是研究的热点。Resniko 等^[24] 利用 miRNA 芯片技术证实了卵巢癌患者和健康人血清中 miRNA 的表达差异,并在其中选取了差异最大的 21 个 miRNA 进行实时荧光定量 - PCR 定量检测,结果发现其中的 miR - 21、miR - 29a、miR - 92、miR - 93、miR - 126、miR - 127、miR - 155 和 miR - 99b 等 8 个 miRNA 的表达差异具有统计学意义。同时试验得出 CA - 125 正常的卵巢癌患者血清中的 miR - 21、miR - 92、miR - 93 表达量增加,由此提示外周血 miRNA 检测可用于卵巢癌的诊断,并提出其临床价值可能优于 CA - 125。

4. miRNA 与前列腺癌:随着我国人均寿命的不断增长,前列腺癌的发病率迅速增长,并且起病隐匿难以诊断,尽管目前提出了多种理论解释前列腺癌的发生和发展,但是这种疾病的确切发生机制仍不清楚。有研究显示某些 miRNA 可能是前列腺癌特异性的标志物,并且可根据 miRNA 表达谱的不同将前列腺增生和前列腺癌区分开来^[25]。Mitchell 等^[26] 应用 miRNA 芯片筛选出与前列腺癌发生可能相关的候选 miRNA,包括 miR - 100、miR - 125b、miR - 141、miR - 143、miR - 205 和 miR - 296 等,之后进一步进行 Taqman 实时荧光定量 - PCR 检测,提出了可以选择表达差异最大的 miR - 141 作为前列腺癌肿瘤标志物的假设。

5. miRNA 与胃癌:胃癌是我国病死率极高的消化道肿瘤之一,主要与其难以早期发现有关,因此寻找早期诊治的靶点和方法一直是胃癌研究的热点。有研究各取胃癌术前和术后病人外周血 2ml,利用 ficoll 分离液获得单核细胞,利用 Trizol 抽提 RNA 然后反转录及 Real - time PCR 对标本中 miR - 106b 和 miR - 17 进行定量,得出结果 miR - 106b 和 miR - 17

与正常对照组比较都有不同程度升高,对术前和术后的 miR - 17 的量与正常组比较,术后的量的差异小于术前,ROC 曲线下 miR - 106b 和 miR - 17 AUC 值分别为 0.684 ($P = 0.0066$) 和 0.743 ($P = 0.0001$),总的结论是来自胃癌组外周血 miR - 106b 和 miR - 17 比正常组有显著升高可以作为其诊断的潜在标志物^[27]。另有文献报道通过测定血浆中 microRNA 的浓度来判定 microRNA 对疾病诊断和监测的价值。利用 microarray 分析比较胃肿瘤组织来源的 microRNA 和对应血浆来源的 microRNA,对血浆中 microRNAs (miR - 17 - 5p, miR - 21, miR - 106a, miR - 106b 和 let - 7a) 测定,在所有的血浆样本中 microRNA 是稳定可测的,且在量的表达上与大部分肿瘤组织 microRNA 图谱表达的情况一致^[28]。

6. microRNA 与胰腺癌:胰腺癌是一种病死率极高的消化系肿瘤,与其难以早期发现有关。对 miRNA 的研究发现肿瘤细胞与正常组织来源细胞间 miRNA 表达谱具有明显差异,恶性肿瘤 miRNA 表达谱可以提示其组织来源,同时证明 miRNA 表达谱有助于人类肿瘤的组织分型。在胰腺癌的 miRNA 图谱存在着类似的现象,Bloomston 等^[29] 用 miRNA 微列法研究了胰腺癌、正常组织及慢性胰腺炎的 miRNAs 表达模式,发现有 21 个 miRNAs 高表达,4 个低表达,由此能将约 90% 的胰腺癌组织从正常胰腺组织中区分出来;有 14 个高表达和 8 个低表达的 miRNAs 可成功地将胰腺癌组织从慢性胰腺炎组织中区分出来,其精确率约 93%;一个有 6 个 miRNAs 的亚群,在生存期较长的患者和 24 个月内死亡的患者中表达不同;另外,miR - 196a - 2 高表达预示预后很差,这些研究为胰腺癌的研究提供了一个平台。

2007 年, Lee 等采用实时 PCR 定量分析胰腺癌、胰腺良性肿瘤、慢性胰腺炎、正常胰腺组织标本和 9 种胰腺癌细胞株的 200 种 pre - miRNA 表达和分布情况,结果发现 100 种 pre - miRNA 散乱分布于胰腺癌和结缔组织之中,其中包括 miR - 155、miR - 21、miR - 221、miR - 222 等其他肿瘤有表达的 miRNA,也有先前其他肿瘤未报道的 miR - 376a、miR - 301;原位 PCR 进一步显示前 3 位表达的 miRNA (miR - 221、miR - 376a、miR - 301) 在胰腺癌细胞中表达,正常胰腺腺泡、间质及导管上皮细胞不表达,表明与胰腺癌的发生发展密切相关^[30]。Gironella 等^[31] 认为 miR - 155 的作用靶点是 TP53INP1 (tumor protein - 53 induced nuclear protein 1),在胰腺导管癌中过度表

达的 miR - 155 减少 TP53INP1 的表达,而使肿瘤进展失控。上述研究既可作为胰腺癌诊断的生物标记,也为胰腺癌的肿瘤形成研究提供了新线索。

四、结语及展望

虽然目前用 miRNA 作为疾病诊断标志的文献很少,但并不能否认有着可能性,已有研究表明 miRNA 在肿瘤的病理生理中有着重要作用,一些 miRNA 直接通过控制细胞的分化和凋亡而与肿瘤的发展有关,另一些 miRNA 通过靶向作用于癌基因或抑癌基因而与肿瘤有关。对于 miRNA 来说,修复或抑制它在肿瘤中的表达就有可能重建整个生理活动的网络体系。利用 miRNA 开发肿瘤诊断及抗肿瘤治疗的潜在价值与应用前景,就如同一块尚待开发的宝藏,利用 miRNA 进行生物治疗还有很长的路要走,仍需要科研工作者为之努力。

参考文献

- Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS*, 2007, 115: 1090 - 1106
- Giannakakis A, Coukos G, Hatzigeorgiou A, *et al.* miRNA genetic alterations in human cancers. *Expert Opin Biol Ther*, 2007, (7): 1375 - 1386
- He L, Thomson JM, Hemann MT, *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005, 435: 828 - 833
- Hagan JP, Croce CM. MicroRNAs in carcinogenesis. *Cytogenet Genome Res*, 2007, 118: 252 - 259
- Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: MicroRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene* 2006, 25: 6188 - 6196
- Stahlhut Espinosa CE, Slack FJ. The role of microRNAs in cancer. *Yace J Biol Med*, 2006, 79: 131 - 140
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin - 4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin - 4*. *Cell*, 1993, 75(5): 843 - 854
- Lau PW, MacRae IJ. The molecular machines that mediate microRNA maturation. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(1): 54 - 60
- Ying SY, Lin SL. Intron - mediated RNA interference and microRNA biogenesis. *Methods Mol Biol*, 2009, 487: 387 - 413
- Chua JH, Armugam A, Jeyaseelan K. MicroRNAs: biogenesis, function and applications. *Curr Opin Mol Ther*, 2009, 11(2): 189 - 199
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood - based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30): 10513 - 10518
- Resnik KE, Alder H, Hagan JP, *et al.* The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel realtime PCR platform. *Gynecol Onco*, 2009, 112(1): 55 - 59
- Lao K, Xu NL, Sun Ya, *et al.* Real time PCR profiling of 330 human microRNAs. *Biotechnol J*, 2007, 2(1): 33 - 35
- Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, *et al.* Real - time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*, 2008, 44(1): 31 - 38

- Lu J, Getz G, Miska EA, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancer. *Nature*, 2005, 435: 834 - 838
- Volinias, Calin GA, Liu CG, *et al.* A microRNA signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(7): 2257 - 2261
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, *et al.* Frequent deletions and down - regulation of micro - RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 15524 - 15529
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 2999 - 3004
- Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, *et al.* MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol*, 2006, 24: 4677 - 4684
- Kluiver J, Haralambieva E, Jongd DE, *et al.* Lack of BIC and microRNA miR - 155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2006, 45: 147 - 153
- Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, *et al.* Detection of elevated levels of tumour - associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B - cell lymphoma. *Br J Haematol*, 2008, 141(5): 672 - 675
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, *et al.* MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005, 65: 7065 - 7070
- Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, *et al.* Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR - 21 in breast cancer cells. *Biol Chem*, 2008, 283(2): 1026 - 1033
- Resnik KE, Alder H, Hagan JP, *et al.* The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel realtime PCR platform. *Gynecol Onco*, 2009, 112(1): 55 - 59
- Porkka K P, Pfeifer M J, Waltering K K, *et al.* MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res*, 2007, 67(13): 6130 - 6135
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood - based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(30): 10513 - 10518
- Zhou H, Gou JM, Lou YR, *et al.* Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using microRNA as a marker. *J Mol Med*, 2010, 88(7): 709 - 717
- Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, *et al.* Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer*, 2010, 102(7): 1174 - 1179
- Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, *et al.* MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA*, 2007, 297: 1901 - 1908
- Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, *et al.* Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 2007, 120(5): 1046 - 1054
- Gironella M, Seux M, Xie MJ, *et al.* Tumor protein 53 - induced nuclear protein1 expression is repressed by miR - 155 and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 4(410): 16170 - 16175 (收稿: 2010 - 08 - 29)