

微小 RNA 与癌关系的研究进展

王继贵

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类广泛存在于动植物和人类体内的非编码小分子 RNA, 成熟的 miRNA 大约由 22 个左右的核苷酸组成。miRNA 以组织特异的方式产生, 在组织型内的改变可同疾病状态有关。miRNA 显示可调节 mRNA 的翻译和降解, 通过靶向控制 mRNA 的表达, miRNA 能控制高度复杂的信号传导途径及其他生物学的途径, 在生长发育、细胞分化、增生、凋亡及肿瘤发生等过程中发挥重要作用^[1]。

最近, 已发现一组新的生物标志物 miRNA, 这些分子显示是细胞型的和疾病特异的, 与当前利用的大多数其他生物标志物不同, miRNA 作为新的诊断和预后标志物, 作为治疗反应的指征, 以及作为新治疗的靶, 有希望对实验医学产生冲击。在癌症时 miRNA 的生物学作用提示同预后和治疗效果有关联, 进一步研究这些作用可以对人类癌症的分类, 诊断和治疗产生一些新的手段。本文拟综述 miRNA 和人类癌症关系研究的一些最新进展。

一、miRNA 概述

miRNA 是一个内源性家族、小分子 (长度大约 22 个核苷酸)、非编码、有功能的 RNA。miRNA 由 RNA 聚合酶 II 或 III 以较长的原始 miRNA 分子转录, 随后在核中它被 RNase III 内切酶 Drosha 和 DGCR8 识别剪切得到由 70 个核苷酸组成的不完全配对的茎-环结构, 叫做“miRNA 前体” (Pre-miRNA)^[2]。这些 miRNA 前体在输出蛋白质 5 (exportin-5) 的帮助下从核转运到胞质。在胞质中, 茎-环结构的环被另一个 RNase III 内切酶 Dicer 剪切, 产生不完全的双体复合物, 构成成熟的 miRNA 系列和一个类似大小的碎片 (miRNA*), 它们来自于 miRNA 前体相对的臂。双股 miRNA 被负载到 RNA 诱导的基因沉默复合体上 (RNA-induced silencing complex, RISC), miRNA* 自双体上分离且降解。

miRNA 通过调节 mRNA 的翻译和降解来调节基

因表达, 它们调节 mRNA 的机制取决于 miRNA 同 mRNA 分子的互补程度。完全的 (或接近完全的) 互补, 被认为是通过 RISC 降解的靶 mRNA; 而不完全的互补, 被认为是通过核蛋白体阻抑翻译的 mRNA^[3]。miRNA 靶的鉴别是困难的, 通过分析 miRNA 种子序列能够鉴别公认特殊 miRNA 的靶^[4]。然而, 如果它们真的影响所提出的 mRNA, 这些 miRNA 需要在体外或体内试验以确定之。

一旦一个序列已经确定是唯一的 miRNA, miRNA 数据库登记处根据现有的指南分配给一个名字^[5]。在此数据库中, 一个种的序列用 3 或 4 个字母表示 (如“hsa”用于人类), miRNA 名称的核心指定为“miR” (表示为一个成熟的序列), 序列之后为分配的唯一鉴别号码。加到 miRs 后的字母标的后缀, 它们相差仅 1 或 2 个碱基 (如 miR-10b), 分配给 miRs 的数字后缀, 它们有相同的序列, 但是来自不同的原始转录, 当成熟的 miRNAs 给予后缀 -5P 或 -3P, 则分别来自于 miRNA 前体的 5' 端或 3' 端。用于这个快速发展的领域。miRNA 数据库登记保持着最新的术语分配,

二、miRNA 检测技术

目前已发展了几个方法检测 miRNAs 和 (或) 检测特殊细胞类型的 miRNA 轮廓, 如微矩阵、小珠矩阵及实时定量 PCR, 可根据研究目的和样本的不同, 选择合适的检测方法。

1. 微矩阵: miRNA 微矩阵是根据 Watson-Crick 的核酸碱基配对, 微矩阵可同时测定数百个 miRNAs。在玻璃片上打点一套寡核苷酸捕获探针及抽提的 RNA 样品, 其内含有丰富的微小分子 RNA, 使同捕获探针杂交。因为 miRNAs 是短的, 它可能难以在探针的通常熔化温度 (T_m) 交联矩阵, 不会损害敏感度和特异性。用锁定核酸 (LNAs) 已解决这个问题, LNAs 至少含一个 LNA 单体, 其中一个核酸类似物核糖部分的 2' 氧原子和 4' 碳原子被连接的亚甲桥封闭, 每一个组成 LNA 的单体增加核酸双链 $T_m 2 \sim 10^\circ\text{C}$ ^[6]。因此, 调节结合到捕获探针中 LNA 单体的数量, 所有探

针交联一个矩阵的 Tm 都能规范化,不管 miRNA 的长短如何,在微矩阵上已发现许多有关的疾病。

2. 小珠矩阵:如 Luminex - FlexmiR™ 矩阵也可同时定量测定数百个 miRNAs。封闭的核酸 (LNA™; Exqom) 探针被偶合到羧化聚苯乙烯微球上,此微球结合 2 种荧光染料不同的混合物,通过它的唯一颜色使能用流式细胞计鉴别每个微球(可达 100 个)。每个微球同一个 LNA 分子偶合,后者对特殊的 miRNA 是特异的,在密切有关的 miRNA 家族的成员间,这些探针能区分它们。自样本中抽提总 RNA、生物素化,然后同微球杂交,洗涤微球,同链霉亲和素 - 藻红蛋白保温,在 Luminex 分析器上分析,分析器能鉴别荧光微球和测定链霉亲和素 - 藻红蛋白的荧光强度,使操作者能看到存在于样本中的 miRNA,如果用适当的校正材料(如合成的寡核苷酸)制备校正物,此试验也能提供定量结果。

3. 实时定量 PCR:RT - PCR 也可用来检测 miRNAs,miRNAs 的定量通常需要 miRNA 同茎一环引物反转录^[7]。然后,cDNA 被用在实时 PCR 反应中,前向和反向引物及双标记探针 (TaqMan[®]) 被用作扩增和检测 cDNA 靶。探针在 5'端有指示染料,在 3'端有猝灭剂,PCR 时,如果存在有靶序列,探针结合到靶系列上,由于 Taq 聚合酶外核酸酶的作用,使指示染料释放,因为指示剂和猝灭剂已分离,来自指示染料的荧光被检测。原始 RNA 和(或)miRNA 的前体也能用相同的方法定量。然而,这种试验需要调节探针和引物的设计^[7]。

三、miRNA 与人类癌的关系

1. 肝细胞癌时的 miRNA:肝细胞癌(HCC)重要的病原包括病毒感染,代谢异常以及免疫有关的疾病,5 年生存率接近 50% ~ 70%,5 年局部复发率 > 70%^[8]。

Murakami 等^[9]是第一个利用微矩阵技术描绘 HCC 时 miRNA 基因表达的。他们分析了 25 对 HCC 及邻近的非肿瘤组织,以及 9 例慢性肝炎样本中 miRNA 基因表达。这个研究显示:在 HCC 样本中与非肿瘤组织比较:3 个 miRNA 基因(miR - 224、miR - 18 及 Pre - miR - P18)有较高的表达;在 HCC 样本中与邻近的非肿瘤组织样本比较:5 个其他的 miRNA 基因(miR - 199a、miR - 199a^{*}、miR - 200a、miR - 125a、miR - 195)显示有较低的表达。用这 8 个 miRNA, Murakami 等发展了一个总的预测准确度为 97.8% 的检测方法。

最近,在一个更多的研究中,Ladein 等^[10]证实:利用 miRNA 谱区别恶性肝细胞肿瘤和良性肝病,它是基于致癌基因和肿瘤抑制基因的突变及特殊危险因素。这个研究在几个肿瘤亚组中也特征化了 miRNAs。良性及恶性肝细胞肿瘤均显示编码 miR - 224 基因表达增加,而编码 miR - 122a 和 miR - 422b 的这些基因表达则降低。HCC 时 miR - 21、miR - 10b 和 miR - 222 的浓度增加,而良性肿瘤显示编码 miR - 200c 和 miR - 203 基因表达降低。HCC 病例中,同乙醇消耗有关的病例,显示 miR - 126 浓度降低;同肝炎 C 病毒感染有关的病例,显示 miR - 96 上调。这些发现对于我们理解肝脏病理生理和阐明新的治疗方法有重要的意义。

Li 等^[11]鉴别出 69 个 miRNAs 轮廓,它能自肝癌组织中区别出非癌。这些 miRNAs 中有 8 个被选用将来有效的区分良性和恶性肝肿瘤以及区分健康肝组织。在 HCC 时,miR - 125b 显示下调,在 HCC 病人中,miR - 125b 基因过度表达同良好的生存有关, Li 等假定 miR - 125b 的作用机制涉及通过遏制磷酸化,因此灭活 Akt、抑制细胞增生。Akt 是磷脂酰肌醇 3 - 激酶最关键的下游信号介质。

2. 胰腺癌时的 miRNA:胰腺肿瘤 85% 来自于胰导管的上皮质胰导管腺癌(PDAC)^[12]。这个疾病有关的病死率和发病率与胰腺癌总的不良预后相符合,这是由于临床表现晚,它的积极侵袭性和转移潜力以及它对化疗和放疗具有抵抗性。尽管胰腺癌在临床治疗方面的进展,当前尚缺乏基于有效生物标志物的策略用于早期检测胰腺癌或在 PDAC 与良性疾病(如慢性胰腺炎)之间进行鉴别。欲用更敏感的生物标志物检测和准确的鉴别胰腺癌,许多研究者开始描述 miRNA 轮廓,它能够提供早期诊断。在 Szafranska 等^[13]的研究中发现 miR - 196a 和 miR - 217 的产量异常,它可鉴别 PDAC 样本与健康胰腺和慢性胰腺炎样本。虽然胰腺癌早期可手术治疗,但大多数病例发现时已是进展期,此时手术切除已不可能,因为肿瘤已扩散至血管且传播到附近的淋巴结。因此, Szafranska 等^[14]在细针穿刺的样本中,利用 miRNA 基因表达轮廓区分恶性胰腺组织和良性组织,评价了可靠地鉴别胰腺组织疾病状况。在实时 PCR 试验中得到了原阈循环值 miR - 196a 和 miR - 217 之间的差别,可清楚地区分良性和恶性组织,用于冷冻和细针穿刺两类样本。编码 miR - 217 的基因仅在健康腺组织中高表达,而 miR - 196a 仅在 PDAC 样本上边

背景中检测到。因为健康胰腺由约 90% 腺泡细胞组成。这些观察提示 miR-217 主要在腺泡细胞中产生;miR-196a 发现仅在导管癌细胞中产生。

3. 结直肠癌时的 miRNA: 正如人类其他癌时情况那样,在这个类型的肿瘤时,发现 miR-31、miR-96、miR-135b 和 miR-183 上调,转录因子 CHES1 (它涉及在抑制凋亡中)是 miR-96 一个潜在的靶。编码 miR-21 基因的高表达同编码肿瘤抑制蛋白 PDCD4 表达减少相关^[15]。

在结直肠癌时,miR-143 和 miR-145 两者均下调,编码这些 miRNA 的基因均位于 5q23,这些 miRNA 可能来自于相同的原始 miRNA^[16]。miR-126 通过调节磷脂酰肌醇 3-激酶信号促进细胞增生;miR-133b 也下调,它的假定靶之一是 KRAS^[17],KRAS 是 Ras 蛋白家族的一个成员,它调节涉及在细胞增生、分化和生存中的信号途径。

4. 肺癌时的 miRNA: 非小细胞肺癌 (NSCLC) 是全世界肺癌有关死亡的最普通原因。许多研究在分子水平已鉴定出基因突变谱,以及同肺癌发生中生物学过程改变有关基因表达的轮廓^[18]。所得结果表明 miRNA 在癌发生中起着关键作用,通过调节翻译和降解特殊 mRNA,控制细胞过程,也有可能 miRNA 是肺癌的一个有价值的生物标志物。

秀丽小杆线虫发育中起决定性作用的基因,致死-7 基因 (let-7) 是第一个鉴定出的基因,后来表明在人类基因组中有同系物^[19]。在秀丽小杆线虫中,let-7 miRNA 家族负调节 let-60/RAS,Johnnon 等^[20]指出人类 RAS 基因 3' 末端翻译区域含有许多 let-7 互补位置,在肺癌时比在健康组织中 let-7 有关基因的表达式低 50%。另一方面,RAS 蛋白浓度显著较高,提示在人类肺癌时 let-7 同系物的作用机制。miRNA 丧失控制 RAS 表达,导致 RAS 过度产生,有助于人类癌症的形成。

在肺癌发生中,染色体 3P 杂合体丧失 (loss of heterozygosity, LOH) 是最常见的遗传事件之一,Weiss 等^[21]指出编码 miR-128b 基因 (位于染色体 3P) 丧失同上皮生长因子受体 (EGFR) 靶向抑制反应相关。miR-128b LOH 可认为是相当于丧失肿瘤抑制基因,因为它使 EGFR 产量增加。Weiss 等最初指出 miR-128b 在 NSCLS 细胞系中是 EGFR 的调节器,确定 miR-128b 直接调节 EGFR^[21]。在肿瘤样本中,miR-128b LOH 是常见的,在吉非替尼 (gefitinib) 治疗后,这种 LOH 同临床反应和生存期显著

相关。Yu 等^[22]鉴别出 5 个 miRNA (let-7a、miR-221、miR-137、miR-372、miR-182) 的特征,它们能预测 NSCLC 病人的治疗后果,这 5 个 miRNA 有高危得分的病人,复发率增加,生存时间缩短。

5. 乳腺癌时的 miRNA: 在妇女因癌有关的死亡原因中,乳腺癌占第 2 位。在乳腺癌时,miR-155 上调,提示它可能起致癌基因的作用^[23]。miR-373 和 miR-520c 上调,通过抑制 CD44 表达,促进转移。在乳腺癌病人中,CD44 同源异构体表达增加,CD44 同总的生存期有关^[24]。因此,在 CD44 表达和 miR-373 及 miR-520c 浓度之间呈反比关系。Ma 等^[23]指出编码 miR-10b 的基因表达增加,通过转录因子 Twist1 使它上调,miR-10b 生产过剩,体内可使肿瘤侵袭。在乳腺癌时也发现 miR-21 上调,这种上调可引起 2 个重要的靶下调: 即程序细胞死亡 4 (PDCD4) 和原肌球蛋白 1 (TPM1)^[25]。PDCD4 是一种肿瘤抑制基因,通过抑制真核生物启动因子 4 把翻译作为目标;TPM1 是蛋白质原肌球蛋白家族的一个成员,它同肌动蛋白有关,用作稳定微丝^[26]。

miR-17-5P,就是通常所说的 miR-91,已发现在乳腺癌时下调,它是由位于染色体 13q31 的基因编码,与 miR-20a 一道,miR-17-5P 也负调节 CCND1 (细胞周期蛋白 D1) 基因^[27]。已观察到病人 miR-335 和 miR-126 浓度低者至转移复发的时间较短,miR-335 下调,通过上调细胞外基质蛋白肌糖蛋白 C 及转录因子 SOX4 促进转移,miR-126 的作用似乎是肿瘤抑制,这个 miRNA 的浓度降低,促进细胞增生^[28]。

6. 前列腺癌时的 miRNA: 前列腺癌 (CaP) 是最常见的恶性肿瘤,其发病率之高,进展之快的机制尚不清楚。在 CaP 细胞系、异种移植物和临床标本中已发现某些异常产生的 miRNA,在 CaP 的发病机制中,这些 miRNA 可能起着关键性的作用^[29]。

Porkka 等^[30]自编码 miRNA 的 319 个基因表达轮廓中鉴别出 51 个特殊的 miRNA,在 CaP 病人中同健康组比较,这些 miRNA 表达上调或下调。在所有被检查的 CaP 标本中,这些 miRNA 有 22 个是下调,有 15 个仅在激素难治的癌中下调;同样,该研究显示:在所有 CaP 中有 8 个 miRNA 上调,仅有 6 个在激素难治的癌中上调。Ozen 等^[31]也评价了 CaP 时 miRNA 的表达,证实 miRNA 基因表达轮廓同疾病过程相一致,在这个研究中,下调的 miRNA 已知有靶 mRNA,包括 RAS、E2F3、BCL-2 以及 MCL-1。

综上所述,miRNA 是一种小分子的 RNA,含大约 22 个核苷酸,由于它对基因表达的调控具有特异性和高效性,在人类癌症时可显示上调或下调。因此,寻找特定的 miRNA 作为癌症诊断的指标、治疗的手段或靶点,已成为肿瘤细胞生物学研究的一个热门课题。由于多学科共同努力,已有了一个良好的开端,目前已发现了一组 miRNA,相信在不久的将来,miRNAs 作为新的诊断和预后标志物,作为治疗反应的指征以及作为新的治疗靶点,将会造福于人类,攻克癌症。

参考文献

- Wang Y, Stricker HM, GouD, *et al.* MicroRNA: Past and Present [J]. *Front Biosci*, 2007, 12(1):2316 – 2329
- Lee Y, Han J, Yeom KH, *et al.* Drosha in primary microRNA processing[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2006, 71(1):51 – 57
- Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple – turnover RNA: enzyme complex. *Science*, 2002, 297(5589):2056 – 2060
- Bentwich I. Prediction and Validation of microRNAs and their targets [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(26):5904 – 5910
- Griffiths – Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, *et al.* miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(Database issue):D140 – D144
- Valoczi A, Hornyik C, Varga N, *et al.* Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNS – modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(22):e175
- Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, *et al.* Real – time PCR quantification of precursor mature microRNA[J]. *Methods*, 2008, 44(1):31 – 38
- Bruix J, Sherman M. American Association for the Study of Liver Diseases practice guideline. Management of hepatocellular Carcinoma [J]. *Hepatology*, 2005, 42(5):1208 – 1236
- Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, *et al.* Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non – tumorous tissues[J]. *Oncogene*, 2006, 25(17):2537 – 2545
- Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, *et al.* MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology*, 2008, 47(6):1955 – 1963
- Li W, Xie L, He X, *et al.* Diagnostic and prognostic implications of microRNA in human hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(7):1616 – 1622
- Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, *et al.* Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(15):2213 – 2236
- Szafranska AE, Davison TS, John J, *et al.* MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and nonneoplastic processes pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Oncogene*, 2007, 26(30):4442 – 4452
- Szafranska AE, Doleshal M, Edmunds HS, *et al.* Analysis of microRNAs in pancreatic fine – needle aspirates can classify benign and malignant tissues[J]. *Clin Chem*, 2008, 54(10):1716 – 1724
- Nagel R, le Sage C, Diosdado B, *et al.* Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR – 135 family in colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(14):5795 – 5802
- Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. MicroRNA – 143 and – 145 in colon cancer[J]. *DNA Cell Biol*, 2007, 26(5):311 – 320
- Guo C, Sah JF, Beard L, *et al.* The noncoding RNA, miR – 126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3 – kinase signaling and is frequently lost in colon cancers [J]. *Genes chromosomes Cancer*, 2008, 47(11):939 – 946
- Meyerson M, Carbone D. Genomic and proteomic profiling of lung cancers: lung cancer classification in the age of targeted therapy[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(14):3219 – 3226
- Roush S, Slack FJ. The let – 7 family of microRNA[J]. *Trends Cell Biol*, 2008, 18(10):505 – 516
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, *et al.* RAS is regulated by the let – 7 microRNA family[J]. *Cell*, 2005, 120(5):635 – 647
- Weiss GJ, Bemis LT, Nakajima E, *et al.* EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines [J]. *Ann Oncol*, 2008, 19(6):1053 – 1059
- Yu SL, Chen HY, Chang GC, *et al.* MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(1):48 – 57
- Ma L, Teruya – Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA – 10b in breast cancer [J]. *Nature*, 2007, 449(7163):682 – 688
- Huang Q, Gumireddy K, Sonrier M, *et al.* The microRNAs miR – 373 and miR – 520c promote tumour invasion and metastasis [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(2):202 – 210
- 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[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(2):1026 – 1033
- Schmid T, Jansen AP, Baker AR, *et al.* Translation inhibitor pdc4 is targeted for degradation during tumor promotion [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(5):1254 – 1260
- Yu Z, Wang C, Wang M, *et al.* A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation [J]. *J Cell Bio*, 2008, 182(3):509 – 517
- Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, *et al.* Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis[J]. *Nature*, 2008, 451(7175):147 – 152
- Shi XB, Tepper CG, White RW. MicroRNA and prostate cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(5):1456 – 1465
- Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, *et al.* MicroRNA expression profiling in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(13):6130 – 6135
- Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, *et al.* Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene*, 2008, 27(12):1788 – 1793

(收稿:2010 – 07 – 23)