

microRNA - 95 与肿瘤发生机制的研究

穆玉玲 张良明 陈 剑

摘 要 microRNAs(miRNAs)是一种高度保守的非编码小RNA(约19~24个核苷酸长度),它通过序列特异性的方式来调节特异基因的表达,可以与mRNAs结合引起mRNAs降解或抑制其表达而在基因转录后水平的调控中发挥作用,这种作用既可见于生理水平也可见于病理状态。miRNAs与肿瘤之间存在密切关系,但是其在常见肿瘤中的功能目前尚未阐明。近年来多项研究证实,存在于肿瘤组织和癌旁组织中的某些特异性miRNAs表达呈现差异性,这种差异表达有可能作为肿瘤早期筛选和评估预后的较好指标而应用于临床。miRNA-95是近年来发现的miRNAs中的一个新成员,目前已经有了一定量的研究资料,本文将就miRNA-95在肿瘤发生机制及在某些肿瘤诊断治疗方面应用的研究做一综述。

关键词 肿瘤 miRNA-95 肿瘤发生机制

中图分类号 R730.231

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.05.005

miRNAs参与细胞生长、分化、凋亡、代谢等几乎所有的生物学过程,这些调控作用在许多疾病如肿瘤生成、心血管疾病、神经系统等疾病中都得到了证实^[1-3]。据不完全统计,miRNAs可调节1/3转录后水平的人类基因,表明miRNAs在生理和病理过程中都有至关重要的作用。越来越多的证据表明,miRNAs在肿瘤发生、发展中发挥重要的作用,并提出了潜在的致癌作用分子机制^[4]。1993年Lee等在线虫中发现Lin-4,这是发现最早的miRNAs,后续又有大量的miRNAs被发现,到目前为止经验证的miRNAs数量已迅速增加,2014年更新的miRBase 21.0版本,又新加入了4000余条miRNAs前体序列及5000余条miRNAs成熟序列,且这些序列大多来自于之前很少或从来没有miRNAs研究报道的物种。miRNA-95是近些年发现的新成员,2002年Mourelatos等^[5]在研究运动神经元存活基因复合物(survival of motor neurons complex)时首次发现,miRNA-95位于4号染色体(基因序列位于8005301~8005381),基因序列具体序列如下:5'-AACACAGUGGGACU-CAAUAAAUGUCUGUUGAAUUGAAAUGCGUACAU-UCAACGGGUAAUUUAUUGAGCACCCACUCUGUG-3'。miRNAs表达与多种癌症相关,大约50%得到注解的miRNAs在基因组上定位于与肿瘤相关的脆性位点(fragile site)。这说明miRNAs在肿瘤发生过程中起

至关重要的作用,这些miRNAs所起的作用类似于抑癌基因和癌基因的功能^[6],有研究人员将miRNAs命名为“oncomirs”。抑癌基因表达下调与CpG岛启动子区甲基化紧密相连,而miRNAs的表达也受到包括启动子区异常甲基化等不同表观遗传机制的调控。Yao等^[7]2013年研究宫颈癌中起抑癌基因作用的miRNAs通过DNA甲基化引起自身沉默的报道中,首次探索了miRNA-95与DNA甲基化的关系,应用MeDIP-qPCR技术,发现与正常宫颈组织对比,宫颈癌组织中miRNA-95明显上调,表明miRNA-95甲基化与宫颈癌的发生存在相关性,但miRNA-95甲基化与其他常见肿瘤的关系仍有待探索。对于miRNA-95的作用靶点也有部分报道,2011年Huang等^[8]的研究直肠癌与miRNA-95的关系实验中预测了5个miRNA-95的可能作用靶点COL4A2、EMP1、ONECUT2、SNX1、UBE4B,最终确定在直肠癌的发生中SNX1是miRNA-95的直接作用靶点。2013年Huang等^[9]研究肿瘤中miRNA-95与抗辐射性的关系实验中,预测了4个可能的作用靶点DICER1、UBE4B、SGP1、PTPN21,结果显示miRNA-95通过直接作用于SGP1调节肿瘤抗辐射性的发生。2014年Chen等^[10]研究非小细胞肺癌中miRNA-95与抗辐射性发生的关系中,确定miRNA-95的直接作用靶点为SNX1。目前已有部分文献报道了miRNA-95与多种常见肿瘤包括消化道肿瘤、呼吸道肿瘤、头颈部肿瘤及生殖系统肿瘤等的发生、发展等存在一定相关性,这些可为miRNA-95在恶性肿瘤的诊断、治疗、判断预后的临床应用方

作者单位:264000 滨州医学院(烟台校区)(穆玉玲、张良明);烟台毓璜顶医院(张良明、陈剑)

通讯作者:张良明,硕士生导师,电子信箱:zhanglmdr@163.com

面的研究提供一定的理论依据。

一、miRNA - 95 与肿瘤发生机制的研究

1. 胰腺癌:2009 年 Zhang 等^[11] 研究胰腺癌中 95 个 miRNAs 的表达谱系。首先利用 QuantiMir System 分析出胰腺癌中 95 个 miRNAs 的表达谱,对前 8 位表达高的 miRNAs (miRNA - 95 排在第 8 位)应用 qRT - PCR 进一步验证,发现此 8 个 miRNAs 的表达在癌组织中的表达较正常胰腺组织均呈高表达趋势,其中 miRNA - 95 在癌组织相比正常组织表达升高的比率和倍数分别为 71% 和 468,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果表明 miRNA - 95 与胰腺癌的发生存在相关性。2012 年 Li 等^[12] 研究应用高剂量甘精胰岛素后胰腺癌组织中 miRNAs 的表达谱系。对胰腺癌细胞系 Sw1990 应用 100IU/L 甘精胰岛素孵育,设置空白对照,应用 miRNAs RT - PCR array 探查实验组及对照组 Sw1990 中 miRNAs 的表达谱系。选取前 3 位 miRNAs (miRNA - 95、miRNA - 134、miRNA - 34c - 3p)。对此 3 个 miRNAs 应用 Stem - loop RT - PCR 技术在胰腺癌细胞系 Sw1990 和 Panc - 1 中进一步验证,发现 miRNA - 95 在两个细胞系中的表达均明显升高,差异有统计学意义。研究者进一步对 miRNA - 95 在 Sw1990 和 Panc - 1 两个细胞系中生长、凋亡、侵袭、迁移能力方面分别做了 CCK8 实验、凋亡实验、基质胶侵袭实验及迁移实验,并设立阴性对照组,结果显示 4 个实验结果差异均有统计学意义,而敲除 miRNA - 95 后得到相反的实验结果。该研究表明 miRNA - 95 与高剂量甘精胰岛素引起胰腺癌发生存在相关性。

2. 大肠癌:2009 年 Arndt 等^[13] 对结直肠癌中的 miRNAs 进行描述,并对其中某些特定 miRNAs 的功能进行了研究。首先应用 MirVana miRNA Bioarrays 对 8 个结直肠癌细胞系、45 个结直肠癌样本(包含不同的分期)、4 个正常结直肠组织描述了 miRNAs 谱系,对在癌组织与正常组织中表达有差异的 37 个 miRNAs 应用 qRT - PCR 进行进一步测定,发现 miRNA - 95 在早期(Ⅰ期、Ⅱ期)结直肠癌组织中的表达较正常组织呈上调趋势,差异有统计学意义,首次描述了 miRNA - 95 与结直肠癌发生存在相关性。

为进一步验证 miRNA - 95 在大肠癌发生中的作用机制,2011 年 Huang 等^[8] 研究 miR - 95 与结直肠癌的关系。应用 microarray analysis 发现 miRNA - 95 在结直肠癌组织中表达呈上调趋势。进而扩大样本量($n = 87$),应用 qRT - PCR 技术研究,结果显示

miRNA - 95 在结直肠癌组织中表达较癌旁组织呈上调趋势($42/87, P = 0.000$),差异有统计学意义。同时进行了细胞增殖实验,结果显示不论在有机体内及体外,miRNA - 95 均能促进结直肠癌细胞的增殖。实验表明 miRNA - 95 与结直肠癌的发生存在相关性。

3. 乳腺癌:2012 年刘雅恬等^[14] 研究 miRNA - 95 在乳腺癌中的表达及其临床意义,选取乳腺浸润性导管癌组织标本 48 例,包括腋淋巴结转移 22 例和无腋淋巴结转移 26 例;TNM 分期:Ⅰ期 16 例,Ⅱ期 24 例,Ⅲ期 8 例。应用 RT - PCR 分析技术,发现 miRNA - 95 在 48 例乳腺癌组织中表达呈显著上调趋势,在乳腺癌 TNM Ⅰ期中的表达量低于其在Ⅱ、Ⅲ期中表达量,差异有统计学意义,而与患者年龄、月经情况及腋淋巴结转移无关。研究结果表明 miRNA - 95 可能参与了乳腺癌的发病过程,并且可以促进乳腺癌的发展,但其具体机制仍需进一步研究。

4. 子宫颈癌:2013 年 Yao 等^[7] 研究 miRNAs 甲基化与子宫颈癌的关系。首先应用 miRNA microarray analysis 描述了子宫颈癌细胞系(C33A、Hela、CaSki、SiHa)中的 miRNAs 谱系,选取在 3 个细胞系中表达较对照组均呈表达上调的 6 个 miRNAs (miRNA - 432、miRNA - 1286、miRNA - 641、miRNA - 1290、miRNA - 1287、miRNA - 95)进一步进行研究。利用 qRT - PCR 技术,应用已证实受甲基化调节的 let - 7a 作为对照,对子宫颈癌细胞系用 HPV 感染后应用 5 - AZA 治疗(5 - AZA 用于脱甲基化),实验结果显示与对照组相比 miRNA - 95 呈明显上调趋势。进一步对 miRNA - 95 甲基化在子宫颈癌组织中的变化,应用 MeDIP - qPCR 检测,发现子宫颈癌组织中 miRNA - 95 的表达量较正常组织明显升高。以上研究表明 miRNA - 95 甲基化与子宫颈癌的发生存在相关性。

5. 子宫内膜癌:谭志琴等^[15] 研究 miRNA - 95 在子宫内膜癌组织的表达及临床意义。选取 66 例子宫内膜癌样本及相应的癌旁组织,应用原位杂交及 qRT - PCR 技术,检测子宫内膜癌组织及癌旁组织中 miRNA - 95 的表达水平,分析 miRNA - 95 的表达与子宫内膜癌临床病理参数之间的关系,并分析 miRNA - 95 表达与患者预后的关系。结果表明 miRNA - 95 与子宫内膜癌的发生、临床分期及淋巴结转移等密切相关。

6. 头颈部肿瘤:Nurul - Syakima 等^[16] 研究头颈

部肿瘤组织中 miRNAs 表达情况,并确定这些 miRNAs 的假定的作用靶点和作用途径。选取 9 例经确诊的头颈部肿瘤组织样本,应用 miRNA microarray analysis 确定头颈部肿瘤组织中的 miRNAs 谱系,与正常头颈部组织对比,有 10 个 miRNAs 的表达呈上调趋势,2 个 miRNAs 的表达呈下调趋势,miRNA - 95 呈表达下调。进一步应用 qRT - PCR 技术对以上结果做验证,结果显示 miRNA - 95 在肿瘤组织中表达下调,差异有统计学意义 ($P = 0.006$),此结果表明 miRNA - 95 在头颈部肿瘤组织中的发生发挥抑癌基因的作用。Chen 等研究发现抑制头颈部肿瘤细胞系 (HeLa 细胞) 中的 miRNA - 95 后会抑制肿瘤细胞的生长,与以上实验结果矛盾。但这两个相反的结果可以证明 miR - 95 在头颈部肿瘤的发生中发挥 oncomir 的作用。Skalsky 等选取 6 个恶性胶质细胞瘤样本及 3 个正常脑组织样本,通过高通量测序技术 (high - throughput sequencing) 共测定了 400 个细胞的 pre - miRNAs,经过数据聚类发现 20 个 miRNAs 和 miRNA star strands 在肿瘤组织和正常组织中的表达存在明显差异,miRNA - 95 在肿瘤组织中的表达较正常组织呈明显下调趋势,说明 miRNA - 95 在恶性胶质细胞瘤的发生中其抑癌基因的作用。

二、miRNA - 95 在肿瘤的诊断、治疗方面的进展

1. miRNA - 95 与肿瘤诊断:(1)多形性成胶质细胞瘤:Li 等研究多形性成胶质细胞瘤 (GBM) 的磁共振成像特点与 miRNAs 表达之间的关系。选取 49 个已确诊的 GBM 患者的肿瘤组织,应用 microarray analysis 技术分析 GBM 肿瘤组织中 miRNAs 谱系,结果显示多个 miRNAs 的表达与 MRI 成像特点之间存在相关性,其中 miRNA - 95 与 tumor enhanced/T2 比值存在相关性,该研究可为某些特定 miRNAs 在 GBM 诊断方面带来一定的指导作用。

2. miRNA - 95 与肿瘤治疗:(1)乳腺癌和前列腺癌:Huang 等^[9]研究肿瘤抗辐射性与 miRNA - 95 之间的关系,选取人前列腺肿瘤细胞系 PC3、DU145 和人乳腺癌细胞系 MDA - MB - 231,对 PC3 细胞系进行抗辐射传代培养,并对第 2 代细胞系进行高通量测序 (IR),发现 miRNA - 95 表达呈上调趋势。应用 qRT - PCR 技术分析进一步验证,发现 miRNA - 95 在抗辐射传代培养的第 2 代细胞系中较对照组呈表达上调,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。为研究 miRNA - 95 在诱导抗辐射作用的下游靶点,联合应用 in silico prediction 和微阵列分析,预测了 4 个 miRNA -

95 靶基因: DICER1、UBE4B、SGPPI、PTPN21,应用 qRT - PCR 技术,确定 SGPPI 为 miRNA - 95 的直接作用靶点,通过作用于该靶基因诱导抗辐射性的发生,与临床上应用 Fingolimod (FTY720) 进行治疗得出的结果一致。体内试验同样证实 miRNA - 95 可以促进肿瘤的生长并能够对辐射治疗产生抗性。与对照组相比前列腺癌与乳腺癌细胞系中 miRNA - 95 的表达均呈上调趋势,该研究结果表明 miRNA - 95 或许可以作为肿瘤细胞进行抗辐射治疗的参考指标。(2)肝癌:Xiao 等^[17]研究了 miRNA - 95 在鸭胆子素 D (Brucein D, BD) 治疗肝细胞癌中的作用机制。以肝癌的细胞系 (HEK293T、Bel7404、HepG2、Hep3B、Huh7、PLC、MIHA) 作为研究对象,分别给予 Brucein D 孵育,并进行细胞生存能力及凋亡实验,发现 Brucein D 可以抑制癌细胞的生长并促进其凋亡。对于应用 Brucein D 的细胞系,进行 miRNA 微阵列分析,结果显示 39 个 miRNAs 的表达水平发生了明显改善,其中 25 个 miRNAs 表达呈上调趋势,14 个呈下调趋势 (包括 miRNA - 95),它们均被认为是 Brucein D 潜在的下游作用靶点。进一步对 miRNA - 95 进行 qRT - PCR 分析,结果显示 miRNA - 95 在应用 Brucein D 的细胞系与对照组相比表达呈下调趋势,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),表明 Brucein D 以 miRNA - 95 作为直接靶点来抑制肝癌细胞的生长。研究者进一步研究 miRNA - 95 可能的下游作用靶点,应用 TargetScan 和 PicTar 软件预测了 6 个 miRNA - 95 的下游作用靶点: CUGBP2、GNAI2、NR4A2、OAZ2、SELS、SHOX2,通过 qRT - PCR 分析分析发现 CUGBP2 为 miRNA - 95 的作用靶点。该研究表明 BD 作为肝细胞肝癌的抗肿瘤药物是通过调节 miRNA - 95 的表达来发挥其治疗作用。(3)肺癌:Chen 等^[10]对 miRNA - 95 与非小细胞肺癌化疗耐药之间的关系进行研究,并深入探索 miRNA - 95 下游作用靶点。选取人非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞系、正常人支气管上皮细胞系和 20 对人 NSCLC 组织及相邻的癌旁组织。首先应用定量 RT - PCR 及 Western blot 两种方法,结果显示 NSCLC 细胞系及肿瘤组织样本中 miRNA - 95 的表达较对照组均呈上调趋势。其次制作了动物模型,在裸鼠体内进行细胞增殖实验及肿瘤形成实验,结果显示实验组小鼠肿瘤组织体积重量较对照组明显增大,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外,进行了细胞凋亡实验,观察 NSCLC 细胞中 miRNA - 95 表达与化学治疗 (应用吉非替尼) 及放射

治疗之间关系,结果显示 miRNA - 95 上调会降低 NSCLC 细胞对化疗药物的敏感度,同时会增加对放射治疗的抵抗性。通过细胞转染实验,发现 SNX1 是 miRNA - 95 的直接作用靶点,当 SNX1 上调时会抑制 miRNA - 95 对 NSCLC 细胞的作用。该研究结果表明非小细胞肺癌放化疗耐药与 miRNA - 95 表达有关。

三、展 望

miRNAs 在生命过程中起着重要的调控作用,随着分子检测技术的不断进步,研究者们利用实时定量 PCR、miRNAs 基因芯片、测序等检测方法分析人类不同恶性肿瘤的 miRNAs 基因表达谱,已证实在多数肿瘤中特异 miRNAs 的表达与正常组织中存在差异性,同时发现来源于不同组织的肿瘤组织中 miRNAs 的表达水平是不同的,在肿瘤组织中呈表达水平上调或下调,从而发挥癌基因或抑癌基因作用。miRNA - 95 的研究也是应用同样的实验方法,证实不同组织来源的肿瘤组织中呈不同的表达,如在大肠癌、胰腺癌、乳腺癌、子宫内膜癌、肺癌中呈表达上调,在肝癌、头颈癌、恶性胶质细胞瘤中呈表达下调。miRNAs 不仅调控肿瘤的发生、发展,而且还可以作为肿瘤的生物标志物,有研究发现外周血中存在大量稳定的 miRNAs,同样在不同肿瘤来源的外周血中 miRNAs 存在异常表达,所以 miRNAs 有望作为筛查恶性肿瘤的生物学标志物,且有较高的敏感度和特异性。因此,miRNA - 95 也可以在血清学研究方面进行进一步的探索研究,这对于肿瘤的早期诊断有重要意义。

在肿瘤的治疗方面,现有研究发现 miRNA - 95 有多个作用靶基因,其中已经证实的有 SGPP1、SNX1,miRNA - 95 可通过作用于该靶点诱导肿瘤放化疗耐药的发生;BD 作为肝细胞肝癌的抗肿瘤药物,是通过作用于 miRNA - 95 后者再作用于其下游靶点 CUGBP2 而发挥 BD 的抗肿瘤作用,这些研究可以为 miRNA - 95 在肿瘤的治疗方面的应用提供依据,但已知 miRNA - 95 存在多个作用靶点,其他作用靶点及其发挥的功能仍待继续研究探索。对于 miRNA - 95 在肿瘤发生和发展中的分子生物学机制方面目前基本属于空白,相信随着研究的逐渐深入,会对 miRNA - 95 在分子生物学方面有更深刻的认识与了解,从而为在肿瘤诊断与治疗中发挥更大的作用奠定基础。此外,深入研究 miRNA - 95 的作用机制,有望为肿瘤的靶向治疗开辟新的前景。

参考文献

1 Bhagavathi S, Czader M. MicroRNAs in benign and malignant hema-

- topoiesis [J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2010, 134(9):1276 - 1281
- 2 Xin M, Olson EN, Bassel - Duby R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2013,14(8):529 - 541
- 3 Takahashi RU, Miyazaki H, Ochiya T. The role of microRNAs in the regulation of cancer stem cells [J]. Frontiers in Genetics, 2014,4(10):295 - 306
- 4 Bandyopadhyay S, Mitra R, Maulik U, et al. Development of the human cancer microRNA network [J]. Silence, 2010,1(1):6 - 20
- 5 Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, et al. miRNPs: A novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs [J]. Genes & Development, 2002,16(6):720 - 728
- 6 Huang J, Zhang SY, Gao YM, et al. MicroRNAs as oncogenes or tumour suppressors in oesophageal cancer: potential biomarkers and therapeutic targets[J]. Cell Proliferation, 2014,47(4):277 - 286
- 7 Yao T, Rao Q, Liu L, et al. Exploration of tumor - suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in cervical cancer [J]. Virology Journal, 2013,10(1):175 - 182
- 8 Huang Z, Huang S, Wang Q, et al. MicroRNA - 95 promotes cell proliferation and targets sorting nexin 1 in human colorectal carcinoma [J]. Cancer Research, 2011,71(7):2582 - 2589
- 9 Huang X, Taeb S, Jahangiri S, et al. MiRNA - 95 mediates radioresistance in tumors by targeting the sphingolipid phosphatase SGPP1 [J]. Cancer Research, 2013,73(23):6972 - 6986
- 10 Chen XH, Chen SM, Hang WJ, et al. MiR - 95 induces proliferation and chemo - or radioresistance through directly targeting sorting nexin1 (SNX1) in non - small cell lung cancer[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2014, 68(5):589 - 595
- 11 Zhang Y, Li M, Wang H, et al. Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real - time PCR analysis [J]. World Journal of Surgery, 2009,33(4):698 - 709
- 12 Li WG, Yuan YZ, Qiao MM, et al. High dose glargine alters the expression profiles of microRNAs in pancreatic cancer cells [J]. World Journal of Gastroenterology, 2012,18(21):2630 - 2639
- 13 Arndt GM, Dossey L, Cullen LM, et al. Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR - 145 in metastatic colorectal cancer[J]. BMC Cancer,2009,9(1):374 - 391
- 14 刘雅恬,何侠. MiR - 95 在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. 江苏医药,2012,38(20):2448 - 2449
- 15 谭志琴,刘伏香,龙丹,等. miR - 95 在子宫内膜癌组织的表达及临床意义[J]. 现代妇产科进展, 2011,20(11):860 - 867
- 16 Nurul - Syakima AM, Yoke - Kqueen C, Sabariah AR, et al. Differential microRNA expression and identification of putative miRNA targets and pathways in head and neck cancers [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2011,28(3):327 - 336
- 17 Xiao Z, Ching Chow S, Han Li C, et al. Role of microRNA - 95 in the anticancer activity of Brucein D in hepatocellular carcinoma [J]. European Journal of Pharmacology, 2014,728(10):141 - 150

(收稿日期:2014 - 10 - 14)

(修回日期:2014 - 11 - 13)