

analysis; a high-resolution method to detect genome copy number variation[J]. *Genome Res*, 2003, 13(9): 2291-305.

[6] Fordor SP, Read JL. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis[J]. *Science*, 1991, 251(28): 767-773.

[7] Barrett MT, Scheffer A. Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(83): 17765-17770.

[8] Peiffer DA, Le JM. High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping[J]. *Genome Res*, 2006, 16(4): 1136-1148.

[9] Mccarroll SA, Kuruville FG. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(22): 1166-1174.

[10] Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17(8): 182-192.

[11] Nathan RT, Brynn L, Zhong Y, et al. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening is significantly more consistent than FISH[J]. *Molecular Hum Reproduction*, 2010, 16(6): 583-589.

[12] Shen Y, Irons M, Yang H, et al. Development of a focused oligonucleotide-array comparative genomic hybridization chip for clinical diagnosis of genomic imbalance[J]. *Clin Chem*, 2007, 53(21): 2051-2059.

[13] Aradhya S, Cherry AM. Array-based comparative genomic hybridization: clinical contexts of targeted and whole-genome designs[J]. *Genet Med*, 2007, 9(2): 533-539.

[14] Friedman JM, Baross A, Wang H, et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation[J]. *Am J Hum Genet*, 2006, 79(4): 500-513.

[15] Thorland EC, Gonzales PR. Comprehensive validation of array comparative genomic hybridization platforms: How much is enough? [J]. *Genet Med*, 2007, 9(5): 632-641.

[16] Lee C, Lafrate AJ. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders[J]. *Nat Genet*, 2007, 39(5): 48-54.

[17] Christian V, Leo G. Microarray-based maps of copy number variant regions in European and sub-Saharan populations[J]. *PLOS One*, 2010, 5(1): 12.

[18] Bejjani BA, Saleki R. Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance[J]. *Am J Med Genet A*, 2005, 134: 259-267.

[19] Kumar RA, Kara MS, et al. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism[J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(2): 628-638.

[20] Christopher V, Neil T. Comparative genomic hybridization for the diagnosis of melanoma[J]. *Eur J Plast Surg*, 2010, 33(12): 45-48.

(收稿日期: 2011-02-18)

• 综 述 •

miRNA 在消化管癌中的研究进展

孟宪琴 综述, 刘庚勋 审校

(中国人民解放军第一六三医院老干科, 湖南长沙 410003)

关键词: 微 RNAs; 肿瘤; 消化管
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.19.026 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2011)19-2223-03

microRNA(miRNA)是真核生物中一类长度约为 22 个核苷酸的非编码小分子单链 RNA,通过与靶标 mRNA 的 3'-UTR 完全或不完全配对而抑制蛋白质的合成,引起靶 mRNA 降解或介导其翻译抑制,具有调节基因表达活性的功能,参与机体多种生理和病理过程^[1-3]。研究表明,miRNA 基因在人类癌症的发病机制中发挥着重要作用。现就近年来 miRNA 在消化管癌中的研究进展作一综述。

1 miRNA 的生理功能和作用机制

miRNA 是通过 RNA 聚合酶 II 或聚合酶 III 转录合成初级 miRNA(pri-miRNA),随后 pri-miRNA 被 Drosha 及 DGCR8 剪切成具有发夹环结构的前体 miRNA(pre-miRNA),在输出蛋白 5(exportin-5)和 Ran 复合物协助下转运出核,然后在细胞质内被 Dicer/TRBP 剪切成成熟的 miRNA^[4]。成熟的 miRNA 与其他蛋白一起组成 RNA-诱导沉默复合体(RISC),引起靶 miRNA 的降解或者翻译抑制改变靶蛋白的表达水平,从而发挥其生物学作用。

2 miRNA 与肿瘤发生

研究表明,约有 50%已阐明的人类 miRNA 位于与癌症相关的染色体脆性位点(fragile sites)或癌症相关区域,可能对癌症的发展起重要作用^[5]。最近的研究进一步证明 miRNA 与肿瘤的转移和耐药也有密切关系。miRNA 既可以作为抑癌基

因下调原癌基因活性;也可作为癌基因下调抑癌基因活性;还可以调节肿瘤相关基因的表达。其自身突变、缺失、易位及相互调控异常等,还可导致相关基因异常表达^[6]。作为原癌基因起作用的 miRNA 主要有 miR-17-92、miR-18、miR-372、miR-373、miR-221、miR-222、miR-155 和 miR-21 等,其可能的机制是通过取消 P53 介导的 CDK 抑制作用,或者直接抑制基因 LATS2 促进肿瘤细胞的增殖和发生。有抑癌基因作用的 miRNA 主要有 miR-15a、miRNA-16-1、miR-143、miR-145、miR-147 和 miRNA let-7 家族等,其可能的机制是这些基因的缺失导致 bcl-2 的过表达,使受损细胞不能凋亡,导致肿瘤的形成。

另一个重要的抑癌基因 PTEN,可抑制 PT3K-Akt 信号通路的激活,介导细胞凋亡。已证明 miRNA 可通过调控 PI3K2A、KtARF-P53 和 MAPK 等通路中的 Ras、C-myc、E2F1、PTEN 和 FoxO 等蛋白影响肿瘤细胞的增殖、凋亡和细胞周期。miR-19 下调 PTEN 的表达,并通过 PIP23、PKB/AKT 及其下游靶信号对细胞的增殖和存活进行调控,miR-214 靶向 PTEN,导致 PTEN 蛋白低表达,AKT 通路过度激活而促进细胞增殖。最新研究发现 let-7 通过与 Ras、HMGA2 和 C-myc3、UTR 结合,负调控靶基因的表达,抑制肿瘤的发生和发展^[7]。

肿瘤的迁移和侵袭与上皮间质转化(EMT)紧密相关,对 EMT 的研究主要涉及多条途经(如 TGF- β 、Wnt、Notch)、多种蛋白质受体(如 HGFR、EFGR、FGFR)和多个转录因子(如 ZEB1、ZEB2、TWIST)。miR-21 可能作用于基因 pten,进而调解黏附点激酶磷酸化及基质金属蛋白酶 MMP-2、-9 的表达,影响肿瘤转移^[8]。Kong 等^[9]认为 miR-155 可能通过作用于 RhoA 来参与调节 TGF- β 诱导 EMT 的发生,并进一步促进肿瘤转移。miR-200 家族和 miR-205 在 TGF- β 诱导 EMT 发生过程中的调节作用则可能通过影响 E-钙黏素转录受体 ZEB1 和 ZEB2 的表达水平来实现^[10]。抑制这些 miRNA 的表达能使 ZEB1 和 ZEB2 表达上调,使 EMT 得以顺利进行。Gebershuber 等^[11]研究发现,miR-29a 的过表达抑制 TTP 的表达而导致 EMT 的发生并促进肿瘤的转移。miR-10b 通过抑制 HOXD10 直接激活转移前基因 rhoc,增加转移可能^[12]。miR-335 的缺失导致 SOX4、TNC 的激活,促进肿瘤转移。miR-373 和 miR-520c 可能通过调节 CD44 基因,调解肿瘤的转移^[13]。当 miRNA 功能的缺失或获得可导致肿瘤耐药相关通路中基因的表达水平发生改变,从而打破原有平衡,导致耐药现象。研究显示,与药物敏感性相关的 miRNA 包括 let-7、miRNA-130a、miR-214、miR-27a、miR451、miR-221/222、miR-199、miR15b/16、miR34 和 miR-328 等,其中多数与细胞凋亡相关^[14]。抗凋亡基因 miR-15a 和 miR-16-1 在多种肿瘤中过量表达,当这两个基因缺失或下调时,将导致 bcl-2 表达升高,可能是通过与 bcl-2 的 3'-UTR 的结构作用抑制其靶基因凋亡,从而发挥其肿瘤抑制作用和造成肿瘤的多药耐药^[15]。

3 miRNA 与消化道癌

3.1 miRNA 与食管癌 食管癌的发生是多种因素综合作用、多基因变化先后积累或叠加形成的。其发生与 P53、Rb 等抑癌基因失活和原癌基因 H-ras、C-myc 及 hsl-1 等活性有关,miRNA 已被证实发生在食管癌的发生、发展中有重要作用。Guo 等^[16]研究结果显示,有 46 种 miRNA 的表达明显区别于癌旁正常组织,其中 has-miR-25、hsa-miR-424 和 hsa-miR-151 在癌组织中明显高于正常组织;has-miR-100、hsa-miR-99a、hsa-miR-29c 和 mmu-miR-140 在癌组织中则低于正常组织。Has-miR-335、hsa-miR181d、hsa-miR-25、hsa-miR7 和 hsa-miR-495 与食管癌的大体分型有关,也与分化程度相关,通过单因素分析,has-miR-103/107 的高表达提示食管癌的生存率不佳。Ferber 等^[17]研究发现,miR-194、miR-192 和 miR-200c 在食管腺癌中表达较鳞癌显著提高。mir-21、miR-205、miR-203c 和 miR-93 在肿瘤和正常组织中表达有显著差异,miR-21 对食管鳞癌的转移有促进作用。miRNA 表达谱可在组织学上鉴别食管肿瘤组织,并可区分正常组织和肿瘤,还可提示患者病情的转归,可作为患者的早期治疗、高危预警的指标。

肿瘤治疗失败的最大原因在于肿瘤的转移,因食管癌的特殊生理位置,使其转移后果更严重。研究表明,miRNA 在不同种类的肿瘤中对靶基因的调节方式有很大差异,这种高度的特异性有利于基因治疗。目前,常用 RNAi 方法治疗食管癌,通过内源性或外源性的双链 RNA(ds-RNA)导入细胞,经核酸酶 III(如 Dicer)剪切成 siRNA,与特异性的核酸内切酶、核酸外切酶、解旋酶等形成 RISC 引起同源的 miRNA 降解,从而抑制相应的基因表达。在肿瘤组织中 miRNA 发挥癌基因的作用,则通过使异常 miRNA 沉默导致抑癌基因表达恢复正常,通过干扰癌基因的表达而达到治疗目的。还可通过人工合成与 Dicer 类似药物下调具有抑癌基因作用的 miRNA,反义寡核苷酸技

术以及病毒载体向癌变细胞内引入有抑癌作用的 miRNA 等方法。miRNA 在食管癌治疗中具有潜在的作用。

3.2 miRNA 与胃癌 胃癌是消化系统中常见的恶性肿瘤,与 p53、p16、p27 和 pnet 等基因的突变或缺失密切相关。研究发现,miRNA 在胃癌的发生、发展过程中可能发挥癌基因或抑癌基因的作用。在胃癌中表达升高的 miRNA 有 miR-21、miR-191、miR-223、miR-21-1、miR-107、miR-92-2、miR-214、miR-25 和 miR-221 等。在正常组织与实体瘤中的差异性表达证实,miRNA 以显性或隐性的癌基因形式支持肿瘤的功能,广泛参与肿瘤的发病机制。Chan 等^[18]用 PCR 对 37 例胃癌患者的肿瘤组织与正常组织的 miR-21 表达水平进行检测比较,结果发现 92% 的胃癌样本中 miR-21 过表达,miR-21 可作为胃癌诊断的一个有效标志物。Kim 等^[19]发现 miR106b~miR-93~miR-25 和 miR-221~miR-222 家族在胃癌组织中高表达。其中 miR-25 作用于细胞周期蛋白(Cyclin)依赖型激酶抑制剂 P57,miR-106b 和 miR93 作用于 P21,miR-221 和 miR-222 作用于 P21/P27;过表达这些 miRNA 可激活 CDK2,导致 G₁/S 期比例上升。另一研究发现,miR-106b~miR-25 序列位于 mcm7 基因序列的第 13 内含子,转录因子 E2F1 调节 mcm7 表达,后来的研究进一步证实 E2F1 也增强 miR-106b-25 表达,同时 miR-106b-25 又抑制 E2F1 表达,由此发现 E2F1 的一个负反馈机制,在肿瘤中表达下调的 miRNA 可致周期停滞。这些 miRNA 的上调损害 TGF-beta 肿瘤的抑制通路,干扰 p21 和 bcl-2 的表达。表明 miR-106b-25 亚群参与 E2F1 的转录后调节,可能在胃癌 TGF-beta 抵抗的发生中起着重要作用。Li 等^[20]用基于鼠类 miR-155 序列的人造 miRNA 有效地使靶基因 PRL-3 在 SCC7901 胃癌细胞中表达,从而使 miRNA 和蛋白水平产生沉默。在此后的体外实验中发现,人造 miRNA 能显著减少 SCC7901 细胞的侵袭和迁移。在体内实验中,降低 PRL-3 能有效抑制裸鼠胃癌腹膜转移,并改善预后。因此推断,人造 miRNA 可以减少 PRL-3 的表达,PRL-3 可能是胃癌腹膜转移治疗的一个潜在靶点。Motoyana 等研究证实,胃癌高迁移率组 let-7 家族的高表达与侵袭性有关,且是一个独立的预后因子。同时,Xia 等^[21]发现 miRNA 在多药耐药性(MDR)胃癌细胞系 SGC7901/VCR 中的表达与其在亲代 SCC7901 细胞系中的表达不一致,其中 miR-15b 和 miR-16 表达下调,体外药物敏感试验显示,miR-15b 和 miR-16 的过表达可使 SGC7901/VCR 细胞对抗癌药物敏感,而反义寡核苷酸类抑制它们则使 SGC7901 细胞产生 MDR。SGC7901/VCR 细胞中 miR-15b 和 miR-16 表达的下调和 Bcl-2 蛋白的上调同时发生。增强 miR-15b 和 miR-16 的表达可以降低 SCC7901/VCR 细胞中 Bcl-2 蛋白的水平,并减少基于 Bcl-2 3'-端非翻译区域的指示器的荧光活性。已证实 MDR 的胃癌细胞系 SGC-7901/VCK 中 miR15b/16 低表达,无法将靶基因 bcl-2 的表达维持在低水平是耐药机制之一。

3.3 miRNA 与结直肠癌 肠癌的发生、发展是一个多步骤的渐进过程,与抑癌基因的失活癌基因的活化、参与 DNA 错配修复的基因功能失活或突变以及异常的 DNA 甲基化和 PD-CD4 抑制因子等因素密切相关。新近研究证实,miRNA 在结直肠癌的发生、发展和转移中起着重要作用。通过对结肠癌细胞系 HCT116 和缺乏 DNA 甲基化酶 dnmt1 和 dnmt3B 的双基因敲除结肠癌细胞系 DKO 的研究发现,在 HCT116 细胞系中低表达的 18 种 miRNA,在 DKO 细胞系中表达上调 3 倍。在 HCT116 细胞系中有 5 种 miRNA 包埋在 CPG 岛中,并且被甲

基化。在这些 miRNA 中,miR-124a 在正常结肠组织未被甲基化,而在大多数结肠癌中被甲基化。将 miR-124a 沉默后,具有致瘤功能的 miR-124a 靶标 CDK6(cyclin-dependent kinase6)的表达可被上调。CDK6 的活化导致 RB 肿瘤抑制蛋白的磷酸化,并随之失活。Asangani 等^[22]利用荧光素酶报告基因的方法,证明 miR-21 抑制其靶标 PDCD4 的表达,在结直肠癌细胞系 Colo206f 中观察到 miR-21 和 PDCD4 蛋白表达的负相关性,表明作为致癌性的 miR-21 在结直肠癌细胞的侵袭、转移方面同样发挥着重要的作用。PDCD4 调节 P21、Cdk4 和 JNK/C-Jun/AP-1 等分子,能抑制佛波酯(TPA)诱导的致瘤性转化,与 eIF4A 和 eIF4G 相互作用进而抑制基因转录,在编程性细胞死亡过程中为了适应不同的诱导物,PDCD4 蛋白表达上调,在癌细胞中 PDCD4 通过 Sp1/Sp3 的启动子序列抑制与侵袭相关的尿激酶受体基因的表达。Bandres 等^[23]用实时定量 PCR 检测 16 个结肠癌细胞系与 12 对临床的肿瘤组织/正常组织的对比样本中。出现 156 个的表达,鉴定出在结肠癌中细胞系在样本中有 13 个异常表达。已知结直肠癌细胞株中低表达的 miR-34a 与 P53 的缺失有关,野生型 P53 通过结合 miR-34a 启动因子序列来增强其表达。最近几个不同的实验室研究得到了几乎相同的结论,miR-34 家族成员 miR-34a 和 miR-34b/c 是 P53 的直接作用靶标,可诱导细胞周期阻滞、凋亡及衰老。丁倩等^[24]将抗 P-糖蛋白的 miRNA 转入直肠癌细胞中,用 RNAi 技术敲除了使肿瘤细胞多药耐药的 MDR 蛋白基因,结果增加了肿瘤细胞对细胞毒药物的敏感性。Volinia 等^[25]报道 miR-21 在结肠癌中与其正常来源细胞相比,表达水平皆上调,而结直肠癌 miR-92 升高,可能作为新的非侵入性肿瘤标志物协助诊断。因此,抑制 miR-21 的表达有可能提供一种新的癌症治疗方法。

4 结 语

miRNA 的发现是 RNA 研究领域的重要突破,它的变化与肿瘤的密切关系已得到研究者的共识,由 miRNA 所介导的 RNA 干扰研究正迅速地基础研究过渡到临床的应用研究。通过检测血清、血浆或者石蜡包埋样本中的 miRNA,可以预测肿瘤的生物行为和治疗反应。尽管 miRNA 应用于基因诊断、治疗的尝试才刚刚开始,但已显示出巨大的应用潜力。随着对这种特殊分子的深入了解,miRNA 的表达谱及遗传表达模式可望成为新的生物学标志,将会有助于实现肿瘤的早期诊断、来源分型及预后判断。

参考文献

- [1] Bartel DP. microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. Dev Biol, 2007, 302(1): 1-12.
- [3] Esquela KA, Slack FJ. Oncomir-microRNAs with a role in cancer [J]. Nat Rev cancer, 2006, 6(4): 259-269.
- [4] He L, Hannon G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation [J]. Nat Rev Genet, 2002, 297(61): 522-531.
- [5] Kumar MS, Lu J, Mercer KL, et al. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis [J]. Nat Genet, 2007, 39(5): 573-677.
- [6] Gregy RL, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer [J]. Cancer Res, 2005, 65(9): 3509.
- [7] 张强,李明远. 癌症新策略——Let-7 microRNA 家族 [J]. 西部医

- 学, 2009, 21(7): 1210-1212.
- [8] Zhu S, Wu H, Wu F, et al. MicroRNA-21 targets tumor Suppressor genes in invasion and metastasis [J]. Cell Res, 2008, 18(3): 350-359.
- [9] Kong W, Yang H, He L, et al. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(22): 6773-6784.
- [10] Burk U, Schubert J, Wellner U, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells [J]. EMBO Rep, 2008, 9(6): 521-522.
- [11] Gebeshuber CA, Zetouk K, Martinez J. Mir-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis [J]. EMBO Rep, 2009, 10(4): 400-405.
- [12] Negrini M, Calin GA. Breast cancer metastasis: a microRNA story [J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(2): 203.
- [13] Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, et al. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumor invasion and metastasis [J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(2): 202-210.
- [14] Bussing I, Slack FJ, Grosshans H. Let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer [J]. Trends Mol Med, 2008, 14(3): 400-409.
- [15] 曹慧慧. 微小 RNA 与肿瘤相关性的研究进展 [J]. 生命科学仪器, 2009, 7(10): 7-9.
- [16] Guo Y, Chen Z, Zhang L, et al. Distinctive micRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Res, 2008, 68(1): 26-34.
- [17] Feber A, Xi L, Lukertich JD, et al. MicroRNA expression profiles of esophageal cancer [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008, 135(2): 255-260.
- [18] Chan SH, Wew A, Li AF. MiR-21 microRNA expression in human gastric carcinomas and its clinical association [J]. Cell Res, 2008, 28(2): 907-911.
- [19] Kim YK, Yu J, Han TS, et al. functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(5): 1672-1681.
- [20] Li N, Fu H, Tie Y, et al. MiRNA-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells [J]. Cancer Lett, 2009, 275(1): 44-53.
- [21] Xia L, Zhang D, Du R, et al. miR15b and miR-16 modulate multi-drug resistance by targeting Bcl-2 in human gastric [J]. Int J Cancer, 2008, 123(29): 372-379.
- [22] Asangani S, Rasheed SA, Nikolova DA, et al. MicroRNA-21 post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer [J]. Oncogene, 2008, 27(15): 2128-2136.
- [23] Banders E, Cubedo E, Agirre X, et al. Identification by real-time PCR of 13 mature miRNA biorectal cancer and non-tumoral tissues [J]. Mplular Cancer, 2006, 5(4): 29.
- [24] 丁倩, 钟雪云, 陈运贤. miRNA 在肿瘤研究中的应用 [J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(6): 1204-1206.
- [25] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumor defines cancer targets [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(7): 2257-2261.