

突变的检测灵敏度,从而为临床合理使用 EGFR-TKI 提供依据,指导临床个性化用药。笔者比较以上所有方法的优缺点后,认为实时荧光定量 PCR 的方法检测 EGFR 突变比较适合临床应用。随着新技术的不断出现与成熟,实时荧光定量 PCR 在临床基因诊断中将会显示出无可比拟的优越性。

参考文献

[1] Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F. Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2009, 28(suppl 1): 32-37.

[2] Buckley AF, Kakar S. Comparison of the Dako EGFR pharmDx kit and Zymed EGFR antibody for assessment of EGFR status in colorectal adenocarcinoma[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2007, 15(3): 305-309.

[3] Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(11): 1160-1174.

[4] Sjöblom T, Jones S, Wood LD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers[J]. *Science*, 2006, 314(5797): 268-274.

[5] 田泽君,郭宁. 人类肿瘤基因组系统性突变分析带来的机遇[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(3): 236-239.

[6] 高云,陈嘉昌,朱振宇,等. EGFR 基因突变及其检测方法的研究进展[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(1): 51-57.

[7] Fan X, Furnari FB, Cavenee WK, et al. Non-isotopic silver-stained SSCP is more sensitive than automated direct sequencing for the detection of PTEN mutations in a mixture of DNA extracted from normal and tumor cells[J]. *Int J Oncol*, 2001, 18(5): 1023-1026.

[8] Marchetti A, Martella C, Felicioni L, et al. EGFR Mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(4): 857-865.

[9] Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA) [J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(6): 778-784.

[10] Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(13): 3915-3921.

[11] 娄加陶,吴传勇,薛剑,等. 基于悬浮点阵技术的新型 EGFR 基因突变检测方法的建立和应用[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2011, 31(3): 284-289.

[12] Johnson BE, Jänne PA. Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(17): 7525-7529.

[13] 黄迎,苏健,陈世良,等. 应用基因扫描方法快速检测 EGFR 基因 19 外显子缺失突变[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(19): 3471-3473.

[14] 蔡丹,叶韵斌,陈强,等. 变性高效液相色谱技术检测非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变的研究[J]. *肿瘤研究与临床*, 2010, 22(9): 595-597.

(收稿日期:2012-12-08)

• 综 述 •

MicroRNA 在肿瘤中的研究进展

苗晋华,杜叶平 综述,武春梅,尹莉莉 审核

(中国人民解放军二六四医院检验科,山西太原 030001)

关键词: miRNA; 肿瘤; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 11. 028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)11-1409-03

MicroRNA(miRNA)是一类长度大约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 小分子,调节基因表达和转录。从 1993 年发现首个 miRNA 起,它的功能特征和作用模式引起了几乎所有生物和生化领域学者的关注。miRNA 参与细胞增殖、分化、转移、凋亡等多种不同的进程。

miRNA 通过缺失、增殖、基因沉默、突变、作用于不同的转录因子等多种复杂机制在肿瘤的发生发展中扮演着至关重要的角色。研究表明,通过基因芯片和一些其他的方法,miRNA 可以将正常组织和癌组织区分开,而一些特异的 miRNA 已被发现与肿瘤的诊断和预后密切相关,在为肿瘤患者制订治疗方案过程中存在很大的潜能^[1]。

1 miRNA 的结构特征

miRNA 的成熟过程可分为 3 个阶段,即 pri-miRNA 的转录、细胞核中生成 pre-miRNA、细胞质中形成成熟 miRNA,成熟的 miRNA 5'端有一磷酸基团,3'端为羟基,这一特点使它与大多数寡核苷酸和功能 RNA 的降解片段区别开来。它是含

有茎环结构的 miRNA 前体,经过 Dicer 加工之后的一类非编码的小 RNA 分子。在细胞核内,编码 miRNA 的 DNA 转录成含约 1 000 个碱基的发夹样结构的 pri-miRNA。Pri-miRNA 在细胞核内经 RNase III Drosha 加工释放发夹中间体——前体 miRNA(pre-miRNA)。Pre-miRNA 经过 Ran-GTP 依赖的转运蛋白 exportin 5 的作用,从细胞核转运至细胞质中,pre-miRNA 通过胞浆 RNase III Dicer 进行第二次加工,pre-miRNA 被剪切成 19~25 个核苷酸序列的双链 miRNA^[2-3]。

2 miRNA 的功能

miRNA 在细胞的生长和发育的调节过程中起着多种作用,miRNA 在细胞周期循环、细胞分化及凋亡的基因调控中起到重要的作用。有研究表明,在人类基因组中超过 1000 多个 miRNA 调节着大约 60% 的基因编码蛋白^[4-5]。miRNA 在发挥作用之前,需要同细胞内一些协同因子结合形成蛋白质-RNA 复合物(miRNP),在 miRNP 的作用下指导其识别同源 mRNA。成熟的 miRNA 主要通过两种途径调节靶 mRNA 的

表达。miRNA 与靶 mRNA 的 3' 端的非编码片段(3'-UTR) 配对, 阻断该基因的翻译过程, 从而调节基因表达^[6]。另一种作用方式是, 当 miRNA 与 mRNA 完全互补配对时, 引起目的 mRNA 在互补区的特异性断裂, 从而导致基因沉默, 这种作用方式与 siRNA 类似, 二者均通过 RISC 的方式降解靶 mRNA, 本质区别在于作用位点上, miRNA 作用于固定的靶基因, 有特定的作用位点, 一般在靶基因 3'-UTR 区, 而 siRNA 由于是随机产生或者人工设计的, 作用位点可以设计或改变, 可作用于 mRNA 的任何部位^[7]。

miRNA 以何种方式与目的基因作用和 miRNA 与目的基因的配对程度有关。miRNA 与目的基因配对不完全时, miRNA 就以抑制目的基因的表达方式作用; miRNA 与目的基因某段序列配对完全时, 就可能引起目的基因在互补区断裂而导致基因沉默。

对 miRNA 作用机制的不断深入研究在理论上丰富对基因调控的认识; miRNA 应该具有潜在的多种调节基因表达方式, 这还有待于实验技术的进步和科研工作者进一步研究。

3 miRNA 与肿瘤

3.1 miRNA 在结肠直肠癌中的研究 结肠直肠癌的发生是多因素、多阶段、多基因改变的作用过程, 癌基因和抑癌基因的表达失调是结肠直肠癌发生的分子基础。近来研究发现, miRNA 广泛参与结肠直肠癌的信号通路, 在肿瘤生成过程中起着重要的调控作用。

Sarver 等^[8]研究 39 种 miRNA 在结肠癌组织与正常结肠组织的表达情况, 发现结肠癌组织的 miRNA 表达情况与正常结肠组织相比均有显著差异, 其中有 17 种 miRNA 与正常结肠组织相比, 其结肠癌组织出现高表达的情况, 以 miR-96, miR-182, miR-182b 和 miR-183 最为显著, 而另外 22 种 miRNA 在结肠癌组织中出现低表达的情况, 有 miR-133a, miR-1, miR-30a-3p, miR-30a-5p, miR-20b 和 miR-363 等。

Lin 等^[9]分析 81 例结肠癌组织和其相对应的癌旁正常组织中 miR-195 的表达情况, 发现 miR-195 在癌组织中呈现低表达的情况; 同时发现 miR-195 可抑制细胞株 HT29 和 LoVo 生长活力, 诱导凋亡。进一步分析其机制发现 miR-195 可直接作用于一种重要的抗凋亡基因 Bcl-2 而抑制肿瘤的发生发展。Zhang 等^[10]发现 miR-143 可通过靶向调节 MACC1 来抑制结肠癌细胞 SW620 的侵袭和迁移。

近年来, miRNA 与结直肠癌等肿瘤发生的研究取得较大进展, 为结直肠癌的基因诊断、治疗提供了新靶点。目前绝大多数的研究仅仅关注于 miRNA 调控 mRNA 的功能, 而 miRNA 自身的表达与功能又受哪些因素调控, miRNA 是否可以通过正负反馈调控自身的表达, miRNA 是否可以调控其他 miRNA 等各种类型的非编码 RNA 从而间接调控某些基因的表达等方面的研究还很少涉及。

3.2 miRNA 在乳腺癌中的研究 WHO 资料显示全球每年约 120 万妇女发生乳腺癌。近年来国内乳腺癌的发病率呈逐年上升的趋势, 目前已位居女性恶性肿瘤病死率之首, 严重危害广大女性的健康。Wang 等^[11]发现 miR-203 可能具有潜在的抑制肿瘤作用, 首先将 miR-203 转染到乳腺癌 TNBC 细胞株中, 后采用荧光定量 PCR 的方法检测 miR-203 在 TNBC 细胞株的表达情况, 发现 miR-203 可上调 BIRC5 和 LASP1 基因的表达进而抑制乳腺癌 TNBC 细胞的增殖和迁移。Hanna 等^[12]采用组织芯片的方法分析 473 例乳腺癌样本中 miR-21,

miR-92a, miR-34a, 和 miR-221 的表达情况, 发现 miR-221 可作为评价乳腺癌的生物标记物。Tanic 等^[13]研究发现, miR-30c 通过抑制 KARS 信号通路, 进而抑制乳腺癌细胞的生长。Nilsson 等^[14]采用原位杂交的方法, 分析 144 例侵袭性乳腺癌样本, 发现 miR-92 相对于正常乳腺样本表达下调, 同时发现在乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 中, 抑制 miR-92 的表达可在很大程度上促进细胞的增殖和迁移能力。在乳腺癌细胞株 MCF-7 和 MDA-MB-231 中, miR-125b 可靶向调节 STARD13 诱导细胞转移^[15]。

miR-27, miR-155, miR-21, miR-221, miR-125b 等均被认为是促癌基因, miR-92, miR-203, miR-20b, miR-195, miR-1et7a, miR-125 等则被认为是抑癌基因, 这些 miRNA 均通过调节多种不同的抑癌基因或癌基因来促进或抑制乳腺癌的发生发展。随着对 miRNA 在乳腺癌中研究的深入, miRNA 的发现及乳腺癌相关靶基因的确定, 相信在不久的将来, 以 miRNA 为靶点治疗乳腺癌会应用于临床中, 为乳腺癌的治疗提供一个更有效的手段。

3.3 miRNA 在胃癌中的研究 众多研究者探究 miRNA 在胃癌发生发展进程中的作用, 认为 miRNA 为研究肿瘤发生机制, 肿瘤诊断和治疗提供了一个新的有力依据。

Su 等^[16]采用 AFFX 表达芯片寻找胃癌中可能发生异常表达的 miRNA, 结果发现相对于正常胃组织胃癌组织有 14 种 miRNA 表达下调, 2 种 miRNA 表达上调, 其中 miR-574-3p 的低表达情况较为突出, 在 miR-574-3p 转染的 SGC7901 胃癌细胞株中细胞增殖、侵袭、迁移均受到不同程度的抑制。同时发现 Cullin2 是 miR-574-3p 的靶因子。

Wang 等^[17]证明 miR-625 通过直接作用于靶因子 ILK 抑制胃癌的侵袭和转移。Li 等^[18]采用 Western blot 和实时定量 PCR 方法证实 miR-495 和 miR-551a 作为肿瘤抑制基因, 通过直接下调靶因子 PRL-3 抑制胃癌的侵袭和转移。Chen 等^[19]发现 miR-181b 在胃癌组织中的表达水平相对于癌旁正常组织有所下降, 而过表达的 miR-181b 可抑制细胞增殖及细胞集落形成, 进一步研究发现 miR-181b 可通过与靶因子 CREB1 的 3' 端非编码区结合进而下调 CREB1 的表达。Zhang 等^[20]发现 miR-181a 在胃癌组织中表达上调, 同时在 SGC-7901 胃癌细胞株中 miR-181a 可促进细胞增殖、集落形成、迁移、抑制细胞凋亡, 可直接抑制靶因子 KLF6 的表达。Zhao 等^[21]发现, miR-7 在高度转移的胃癌细胞株和组织中的表达显著降低, 同时发现 miR-7 具有通过靶向调节胰岛素样生长因子 1 受体(IGF-1R) 抵抗胃癌转移的能力。

miRNA 表达失调影响着胃癌的发生、发展、转移、侵袭、耐药等, 深入研究胃癌中 miRNA 表达情况, 预测并明确 miRNA 与靶基因的相关作用机制, 对胃癌的诊治有重大意义。

3.4 miRNA 在前列腺癌中的研究 前列腺癌的诊断预后主要依赖于组织病理学和血清 PSA 的检测, 但是二者均不能在早期真实反映肿瘤形成的潜在能力。在肿瘤形成过程中, miR-21 的高表达情况占到 91.7%, 其通过调节众多靶因子 PTEN、PDCD4、RECK 等广泛参与细胞的增殖、凋亡和肿瘤的侵袭。RECK 是 miR-21 的一个靶向调节因子, 在前列腺癌细胞中, 转染 pre-miR-21 可降低 RECK mRNA 的表达水平, 进而增加 MMP-9 的表达水平, 促进细胞增殖和侵袭能力^[22]。Liu 等^[23]发现, 抑制 miR-21 的表达水平可导致 RECK 表达上升, 而 RECK 可作为一种肿瘤抑制基因通过调节 MMP-2、MMP-9 和

MT1-MMP 来抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭。

Nadiminty 等^[24]采用 qRT-PCR 和原位杂交技术分别检测前列腺癌细胞株和前列腺癌组织样本 miR-let-7c 的表达情况,均发现 miR-let-7c 呈现低表达状态,在转染 miR-let-7c 质粒的前列腺癌细胞中出现细胞增殖抑制,凋亡加速。miR-16 可通过靶向调节 bcl-2 基因调控前列腺癌细胞凋亡,也可通过作用于靶因子 CDK6 和 cyclinD 参与细胞周期的调控^[25]。

目前已经发现大量与前列腺癌发生密切相关的 miRNA,如 miR-15、miR-16-1、miR-145、miR-221、miR-32、miR-135b、miR-194、miR-203、miR-128a 等。在几种已知的 miRNA 中,let-7 家族通过调节肿瘤干细胞在前列腺癌的复发及发展中起到重要作用。然而,let-7 家族促进前列腺癌侵袭性的机制还未可知。该领域的研究进展很大程度上取决于 miRNA 作用靶因子的准确预测和通路的完整阐明。

3.5 其他肿瘤 miRNA 研究涉及领域非常广泛,包括白血病及垂体瘤(miR-15、miR-15a、miR-16、miR-16-1)、肺癌及淋巴瘤(miR-17-5p、miR-17-92、miR-20a)、脑瘤和神经系统肿瘤(miR-9)、甲状腺癌(miR-221、miR-222)、胰腺癌(miR-34a、miR-103、miR-107、miR-155)等,还需更多科研工作者进一步研究,进而指导临床治疗。

4 小 结

miRNA 在细胞分化,生物发育及疾病发生发展过程中发挥巨大作用,引起研究人员越来越多的关注。随着 miRNA 作用机理的深入研究,以及最新高通量的技术手段如 miRNA 芯片等在研究 miRNA 和疾病之间关系的应用,将会使人们对于高等真核生物基因表达调控网络的理解提高到新水平。可以预见在不久的将来 miRNA 会成为疾病诊断的新的生物学标记,研究者可以进一步利用 miRNA 相关作用机制进行新药研发。

参考文献

- [1] Sarkar FH, Li Y, Wang Z, et al. Implication of microRNAs in drug resistance for designing novel cancer therapy[J]. Drug Resist Updat, 2010, 13(3): 57-66.
- [2] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(7006): 350-355.
- [3] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [4] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. Genome Res, 2009, 19(1): 92-105.
- [5] Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals[J]. Mol Cell, 2010, 38(3): 323-332.
- [6] Hammond SM, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells[J]. Nature, 2000, 404(6775): 293-296.
- [7] Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex[J]. Science, 2002, 297(5589): 2056-2060.
- [8] Sarver AL, French AJ, Borralho PM, et al. Human colon cancer profiles show differential microRNA expression depending on mismatch repair status and are characteristic of undifferentiated proliferative states[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 401.
- [9] Lin L, Chen L, Xu Y, et al. microRNA-195 promotes apoptosis

and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 400(2): 236-240.

- [10] Zhang Y, Wang Z, Chen M, et al. MicroRNA-143 targets MACC1 to inhibit cell invasion and migration in colorectal cancer[J]. Mol Cancer, 2012, 11: 23.
- [11] Wang C, Zheng X, Shen C, et al. MicroRNA-203 suppresses cell proliferation and migration by targeting BIRC5 and LASP1 in human triple-negative breast cancer cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2012, 31(1): 58.
- [12] Hanna JA, Wimberly H, Kumar S, et al. Quantitative analysis of microRNAs in tissue microarrays by in situ hybridization[J]. Biotechniques, 2012, 52(4): 235-245.
- [13] Tanic M, Yanowsky K, Rodriguez-Antona C, et al. Deregulated miRNAs in hereditary breast cancer revealed a role for miR-30c in regulating KRAS oncogene[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38847.
- [14] Nilsson S, Möller C, Jirstrom K, et al. Downregulation of miR-92a is associated with aggressive breast cancer features and increased tumour macrophage infiltration [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e36051.
- [15] Tang F, Zhang R, He Y, et al. MicroRNA-125b induces metastasis by targeting STARD13 in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e35435.
- [16] Su Y, Ni Z, Wang G, et al. Aberrant expression of microRNAs in gastric cancer and biological significance of miR-574-3p[J]. Int Immunopharmacol, 2012, 13(4): 468-475.
- [17] Wang M, Li C, Nie H, et al. Down-regulated miR-625 suppresses invasion and metastasis of gastric cancer by targeting ILK[J]. FEBS Lett, 2012, 586(16): 2382-2388.
- [18] Li Z, Cao Y, Jie Z, et al. miR-495 and miR-551a inhibit the migration and invasion of human gastric cancer cells by directly interacting with PRL-3[J]. Cancer Lett, 2012, 323(1): 41-47.
- [19] Chen L, Yang Q, Kong WQ, et al. MicroRNA-181b targets cAMP responsive element binding protein 1 in gastric adenocarcinomas[J]. IUBMB Life, 2012, 64(7): 628-635.
- [20] Zhang X, Nie Y, Du Y, et al. MicroRNA-181a promotes gastric cancer by negatively regulating tumor suppressor KLF6 [J]. Tumour Biol, 2012, 33(5): 1589-1597.
- [21] Zhao X, Dou W, He L, et al. MicroRNA-7 functions as an anti-metastatic microRNA in gastric cancer by targeting insulin-like growth factor-1 receptor[J]. Oncogene, 2013, 33(11): 1363-1372.
- [22] Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, et al. miR-21 may acts as an oncomir by targeting RECK, a matrix metalloproteinase regulator, in prostate cancer[J]. BMC Urol, 2012, 12(1): 14.
- [23] Liu C, Yu J, Yu S, et al. MicroRNA-21 acts as an oncomir through multiple targets in human hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2010, 53(1): 98-107.
- [24] Nadiminty N, Tummala R, Lou W, et al. MicroRNA let-7c is downregulated in prostate cancer and suppresses prostate cancer growth[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32832.
- [25] Linsley PS, Schelter J, Burchard J, et al. Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(6): 2240-2252.