

## microRNA 与肿瘤关系的研究

冯琼 雷章 卢宏达

微小 RNA (microRNA, miRNA) 作为一类广泛存在的非蛋白编码的小分子 RNA, 通过转录后水平调节基因的表达而参与调控一系列的生命活动, 包括细胞增殖、凋亡、脂肪代谢、神经元发育、激素分泌, 并在肿瘤血管生成、干细胞分化、浸润及转移等多种生理和病理过程中发挥重要作用。miRNA 成为近几年来生命科学新的研究热点之一, 现就 miRNA 的发现、产生机制、生物学特性及 miRNA 与肿瘤关系的研究进展作一综述。

### 一、miRNA 的简介

1. miRNA 的发现: Lee 和 Wightman、Reinhart 等<sup>[1-3]</sup> 分别于 1993 年、2000 年在秀丽线虫 (*C. Elegans*) 体内发现了可调节线虫生长发育的 *lin-4*、*let-7*, 二者均可调节线虫的生长发育, 但两者的表达时间存在一定的差别。*lin-4* 和 *let-7* 可代表 miRNA 家族的创始成员, *lin-4* 可下调 *lin-14* 的蛋白质, 而 *let-7* 则调节 *lin-41* 的蛋白质。随着对 *lin-4* 和 *let-7* 以及新发现的结构类似小分子 RNA 的不断研究, 发现它们是一种可调节基因表达、生长发育、维持机体正常生理功能的一类重要的小分子 RNA, 并参与人类不同疾病的病理过程, 如畸形、癌症、心血管疾病、神经紊乱、代谢紊乱和病毒引起的疾病, 是生物表观遗传的一部分。

2. miRNA 的命名原则: miRNA 可简写成 miR, 再根据其被克隆的先后顺序加上阿拉伯数字, 如 miR-22, 一般而言, 数字越小, 发现越早; 高度同源的 miRNA 在数字后加上英文小写字母 (a、b、c……), 如 miR-181a、miR-181b、miR-181c; 基因组不同部位但产生同样成熟体序列的 miRNA, 应在序号后添加短线和阿拉伯数字以示区别, 如 miR-34a-1、miR-34a-2; miRNA 前体经过一个发夹环结构, 具有两个臂, 但通常只有一个会被选择成为最终的 miRNA, 那么被降解掉的另外一条臂则以 “\*” 表示; 物种缩写应置于 miRNA 之前, 如 *hsa*、*mmu* 和 *rno* 分别代表人、小鼠和大鼠; 确定命名规则之前发现的 miRNA 应保留原来名字, 如 *lin-4*<sup>[4]</sup>。

3. miRNA 的研究方法: (1) 鉴定 miRNA: 包括小分子 RNA 直接克隆鉴定, miRNA 芯片分析和生物信息学预测的方法。(2) 检测 miRNA 的表达水平: 主要包括芯片技术 (microarray)、RT-PCR (real time RT-PCR、Stem loop RT-PCR)、RNA 印记杂交 (Northern blot)、核糖核酸酶保护实验 (RPA)、磁珠流式检测 (Bead-based flow cytometric assay)、寡核苷酸为基础的原位杂交 (LNA-based ISH)。(3) miRNA 的靶标基因预测软件: 目前主要有 TargetScan、miRanda、PicTar、DIANA-microT、RNAhybrid、RNA22 等<sup>[5]</sup>。

### 二、miRNA 的基因结构和生物特性

1. miRNA 的基因结构: miRNA 是一组非编码蛋白质的短序

列 RNA, 通常的长度为 22 ~ 25 个碱基, 其本身不具有开放阅读框架 (ORF)。成熟的 miRNA 5' 端为磷酸基团, 3' 端为羟基, 且 5' 端第一个碱基对 U 有强烈的倾向性, 对 G 却有抗性。绝大多数 miRNA 以单拷贝、多拷贝或基因簇等形式存在于内含子和 (或) 外显子或基因间隔区, 独立于其他基因进行转录从而调节靶基因的表达, 与此同时, miRNA 还具有高度保守性、时序性及细胞和组织特异性。miRNA 在某些组织或细胞具有特异性的分子标志, 因而被看做是细胞 “定时”、“定向” 分化的 “开关”, 通过不同肿瘤的 miRNA 谱可对肿瘤进行早期诊断及鉴别<sup>[6-8]</sup>。

2. miRNA 合成的生物学过程: miRNA 是由一系列 RNase III 内切酶和转运蛋白等逐步加工完成的。可以简单概括为以下五个步骤: (1) 在细胞核内, 编码 miRNA 的基因在 RNA 聚合酶 II 的作用下发生转录, 形成长度约为几百个核苷酸的初级转录物即初 miRNA (pri-miRNA)。(2) pri-miRNA 在 RNase III 家族酶 Droscha 的作用下, 进一步被剪切为约 60 ~ 70 核苷酸, 具有特异性茎环结构也即发夹样结构的前体 miRNA (pre-miRNA)。(3) pre-miRNA 在 Ran-GTP 依赖的核质/细胞质转运蛋白 Exportin 5 的作用下, 从细胞核内运输到细胞胞质中。(4) 另一个 RNase III 家族酶 Dicer 酶的作用下, pre-miRNA 被加工形成具有双链的 miRNA, 随后双链 miRNA 解链形成长度约为 21 ~ 22 个核苷酸的 miRNA, 即成熟的 miRNA。(5) 成熟 miRNA 与其互补序列结合, 形成特征性的双螺旋结构, 随后双螺旋解旋形成单链 RNA, 其中一条单链 RNA 与 RNA 诱导的基因沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 的糖蛋白结合, 形成 miRNP 即 miRNA 蛋白复合体而发挥作用<sup>[8-10]</sup>。

3. miRNA 形成的新机制: 经研究发现一种由短小的内含子发夹结构形成的 miRNAs (被命名为 “mirtrons”), 它是通过 lariat、debranching 酶产生 miRNA 类前体发夹, 并且在 Exportin-5 发夹端口处融入正常的 miRNA 途径过程中再被 Dicer-1/loqs 处理而形成的<sup>[11]</sup>。

4. miRNA 与 mRNA 的结合与调控: miRISC 形成后, miRNA 通过与靶基因的 3' 端互补配对, 指导 miRISC 对靶基因 miRNA 进行切割或者翻译抑制, 实现转录后调控, 有如下几种机制: (1) Full miRNA: mRNA, miRNA 能够与靶 mRNA 完全地互补, 则 miRNA 可以直接靶向切割 mRNA, 从而特异地降解 mRNA。(2) Seed-Site miRNA: mRNA, miRNA 不能与靶 mRNA 完全互补, 仅在某个位点与 miRNA 互补, 那么 RISC 就不会特异地降解 mRNA, 而只是阻止 mRNA 作为翻译的模板而不能合成蛋白质, 组成 miRISC 配对完全则切割 miRNA, 配对不完全则抑制翻译。(3) Partial miRNA: mRNA 则既可降解 mRNA 又可抑制 mRNA 翻译合成蛋白质<sup>[12]</sup>。(4) 快速脱腺苷酸化则是通过加速脱腺苷酸化的速度, 从而使 mRNAs 上 poly (A) 尾脱去, 导致目标 mRNAs 整个片段降解, 使得基因无法表达, 这是 miRNA 抑制基因表达的新机制。以拟南芥 miRNA 为代表的植物 miRNA 与靶基因配对程度高, 多数是进行 miRNA 切割; 以 *lin-4* 为代表的动物 miRNA 与靶序列的配对性不好, 多数进行 miRNA 的翻译抑制。还有一种是同

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.15.048

基金项目: 国家自然科学基金 (81072921); 国家自然科学基金青年科学基金 (81101550)

作者单位: 430000 武汉市中心医院肿瘤科 (冯琼、雷章、卢宏达); 湖北中医药大学 [冯琼 (在读硕士研究生)、卢宏达]

通讯作者: 卢宏达, Email: phlonda@163.com

表1 miRNA的作用与常见肿瘤的关系

常见肿瘤	致癌基因(表达上调)	抑癌基因(表达下调)	相关靶基因、靶蛋白
乳腺癌	miR-21, miR-155	miR-125, miR-206, miR-10b	ER $\alpha$ , ErbB, PTEN, TPM1
宫颈癌	miR-21	miR-143, miR-145, miR-127	PDCD4, BCL-6, CDK234
卵巢癌	miR-21	miR-15, miR-16	Bmi-1
肺癌	miR-155, miR-17-92 簇	miR-126, let-7 家族	PTEN, TPM1, Ras, Myc
胃癌	miR-150, miR-21	miR-9, miR-433, miR-451, miR-34	EGR2, RECK, GRB2, RAB34, MIF, P53, CBX7, RBMXL1
肝癌	miR-151	miR-194, miR-199a/b-3p	RhoGDI, N 型钙黏附素, PAK4
恶性淋巴瘤	miR-17-92 簇	miR-143, miR-145	c-Myc, ERK5, E2F1, ICOSL

时具有以上两种作用方式,其代表为 let-7<sup>[8,13-15]</sup>。

### 三、miRNA 在恶性肿瘤中的作用及其发生的机制

肿瘤的形成是由多因素综合作用,导致细胞凋亡异常及其克隆性异常增生而形成的新生物。约 50% 的 miRNA 基因位于肿瘤相关的基因组区域或脆性位点,肿瘤细胞与正常组织细胞 miRNA 表达谱具有明显差异,不同组织来源的肿瘤细胞系中 miRNA 的含量及调节作用各不相同<sup>[16]</sup>。miRNA 可以看做一个细胞功能或细胞程序的调节阀,而不仅仅是一个基因。一个 miRNA 能够调控多种蛋白质的表达,影响多个信号通路的活性,它是基因表达和蛋白翻译过程中的调节分子,在肿瘤的发生发展过程中起到调控的枢纽作用。miRNA 通过形成过程中量和质的改变发挥致癌基因或抑癌基因决然不同的功能,它们保持癌基因和抑癌基因之间的平衡。miRNA 基因高频率地出现在这些与肿瘤密切相关的易变基因组中,提示了 miRNA 在人类肿瘤形成机制中起重要作用,为肿瘤的基因诊断及治疗提供了新的靶点。miRNA 成为肿瘤分子生物学研究领域的新星,近年来国内学者也做出了喜人的研究成果:发现肝癌组织中 miR-151 表达上调,miR-194, miR-199a/b-3p 表达下调使肝癌细胞变得更具有迁移和侵袭能力,激活肿瘤细胞的致癌性<sup>[17]</sup>;发现 miR-345 或许能够成为胃癌患者早期诊断以及预后判断的分子标志物<sup>[18]</sup>,现将 miRNA 作用比较明确和突出的例子列于表 1<sup>[19]</sup>。

1. miRNA 与肿瘤的发生:甲基化、生物起源上的缺陷、变异、转录的异常以及基因组的丢失或扩增等均导致 miRNA 在人类肿瘤中的异常,许多 miRNA 直接表现为一种原癌基因或抑癌基因的作用,致癌与抑癌 miRNA 通过正向或负向调控肿瘤抑制基因、癌基因或控制细胞周期进程、分化或凋亡的基因,直接调控肿瘤细胞的增殖、分化和凋亡,参与肿瘤的形成、发展甚至侵袭转移。

2. miRNA 与肿瘤干细胞(CSC)的关系:CSC 具有极强的致瘤与自我更新、多向分化能力,以及高度的耐药性。miRNA 通过调节蛋白及相关基因、调节信号转导通路,在肿瘤的恶性增殖、侵袭转移、复发过程中发挥重要作用。如 let-7 可负调控下游靶基因 H-RAS 而抑制 CSC 的自我更新;miRNA-199b-5p 通过作用于 Notch 信号通路而调控 CSC 的自我更新能力;miRNA-135a/b 过表达会导致自我更新基因的活化及远期肿瘤发生;miR-302 能同时抑制细胞周期蛋白 E-CDK2 和细胞周期蛋白 D-CDK4/6 通路并加强 G1 期阻滞通路,导致多潜能干细胞致瘤性降低<sup>[20-21]</sup>。

3. miRNA 与肿瘤相关的信号转导:正常情况下调控细胞生长、分化的信号转导通路如 Wnt、Notch、Hedgehog、PI3K/AKT、RAS 等在肿瘤发展过程中往往会发生紊乱和异常。经研究证实,miRNA 可以通过与信号蛋白直接或间接作用影响的肿瘤发

生,如 let-7 可负调节小 G 蛋白介导的胞内信号转导途径 RAS 信号转导通路而抑制生长;miR-146 通过特有的负反馈调节环下调 IL-1 受体依赖性激酶 1 和 TNF 受体相关因子 6 的蛋白水平控制 Toll 样受体和细胞因子的信号转导;miR-19 的过度表达使 PTEN 蛋白的表达下调,而 PTEN 对 PI3K/AKT 途径有负调节作用,从而为 PI3K/Akt 信号通路的激活提供了一种转化机制;miR-17-5p 和 miR-20a 能负调节 c-myc 转录靶点之一 E2F1;miR-61 经过一个正反馈环使 lin-12 的活性最大化并持续激活 Notch 信号通路;miR-34 则通过与 p53 网络协调激活众多转录靶点来抑制异常的细胞增殖;miR-125a/miR-125b 过表达可抑制 Erb B2/B3 信号通路,导致细胞迁徙和侵袭力的下降<sup>[22-23]</sup>。

4. MicroRNA 与肿瘤血管生成:肿瘤血管生成是指肿瘤细胞通过分泌促血管生成因子激活静息状态的内皮细胞,使之增殖、迁移至肿瘤附近,并形成毛细血管网包绕。内皮细胞是肿瘤血管生成重要的效应细胞,Dicer 或 Drosha 的沉默都能显著抑制血管内皮细胞的增殖和其管状形成。miRNA 可作为控制内皮细胞功能的血管调节靶点,揭开了靶向抗血管生成治疗癌症的新篇章。血管生成相关 miRNAs 通过调控靶基因对血管生成的影响见表 2<sup>[24-25]</sup>。

表2 血管生成相关 miRNAs

血管生成	相关 miRNA	靶基因
抑制	miR-221, miR-222	c-kit, eNOS
	miR-15, miR-16, miR-20a, miR-20b	VEGFA
	miR-155	AngII I 型受体
促进	miR-130a	GAX, HOXA5
	miR-7f, miR-27b	未鉴定
	miR-17-92 家族	TSP-1, CTGF
	miR-378	Sufu, Fus-1b
	miR-126	SPRED1, PIK3R2

注:根据参考文献<sup>[24-25]</sup>重绘

5. miRNA 和肿瘤转移的关系:miRNA 在肿瘤转移过程的多个环节起作用,通过调节上皮间质转化(EMT)、相关靶基因、信号通路等方式促进或抑制多种恶性肿瘤的转移,miRNA 有望成为多种恶性肿瘤诊断和转移预后的分子标志。如:miR-155、miRNA-200 家族(如 miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 和 miR-429)和 miR-205 通过作用于 RhoA 或影响 E-钙黏素转录受体 ZEB1 和 ZEB2 的表达水平,调节 TGF- $\beta$  途径影响 EMT(上皮细胞间质转型);miR-146a/b 通过 IL-1 和 Toll 样受体信号途径

负向调节 NF-kappaB 活性,抑制靶因子 IL-8、IL-6 和 MMP-9 的表达,降低肿瘤细胞转移率。miR-21 对神经胶质瘤、食管鳞癌、胆管癌、乳腺癌、肝细胞肝癌、结直肠癌、前列腺癌的转移均有促进作用;而 miR-34a 对葡萄膜黑色素瘤、肝癌的转移则有抑制作用<sup>[26-27]</sup>。

6. miRNA 与肿瘤耐药的关系(表 3):许多 miRNA 的表达水平与肿瘤细胞耐药性的产生有着密切的关系。miRNA 的多态性(miRSNP)、突变、异常表达会导致 miRNA 功能丧失或增强,从而导致蛋白水平的表达改变,如果影响到药物吸收、代谢、分布通道上的基因表达及靶向参与临床功能将可能导致持续耐药。正常情况下,miRNA 及靶蛋白的水平维持正常状态;miRNA 的基因发生突变时无法与靶 mRNA 正常配对,靶蛋白高水平表达;miRNA 过表达时靶蛋白低表达,若此类靶蛋白参与细胞对药物的反应,如药物靶点、药物转运体、细胞凋亡及修复等相关蛋白,将导致药物敏感度的改变,如 miR-221 和 miR-222 对抗雌激素的药物耐药及下调 P27kip1 抑制肿瘤坏死因子相关诱导配体介导的细胞凋亡信号通路<sup>[28-30]</sup>。

表 3 miRNA 突变或异常表达致肿瘤细胞耐药

突变	异常表达	相关靶基因
miR-519c	miR-328	BCRP/ABCG2
	miR-21、miR-15b、miR-16	BCL2
	let-7	CASP3
miR-24		DHFR
miR-214		PTEN
	miR-221、miR-222	p27kip1

#### 四、miRNA 在癌症治疗中的前景

外科手术疗法、放射疗法、化学疗法、中医药疗法、肿瘤生物疗法是当前癌症治疗的五大手段。随着对 miRNA 功能及作用机制的深入研究,针对 miRNA 功能的定向干预可特异性影响肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡,这为肿瘤的药物治疗和分子靶向疗法提供新的着眼点。对于具有致癌作用的 miRNA,可以采用基因敲除(knock-out)的方法抑制或下调其表达水平,如采用反义寡核苷酸(AMOs)、miRNA 海绵、miRNA 屏障、miRNA 小分子抑制剂等;而对于具有抑癌作用的 miRNA,可以采用基因敲入(knock-in)的方法,将人工合成的 miRNA 前体或成熟 miRNA 转染至目的细胞并增加其表达水平,如以病毒载体为基础的 miRNA 补充方法或 miRNA 模拟物(miRNA mimics)。miRNA 作为新兴的肿瘤分子标记物在未来肿瘤临床诊断和靶向治疗中将会有非常好的应用前景<sup>[16]</sup>。

#### 五、miRNA 研究中亟待解决的问题

miRNA 的研究尚处于理论阶段,其表达调控和作用机制仍未被完全阐明,并不能广泛地用于临床实践。如何准确地预测 miRNA 及其靶基因? miRNA 与靶基因相互作用过程中所参与的其他基因和酶类有哪些变化? miRNA 复杂有序加工过程中的精密调控因素有哪些? miRNA 又是如何选择沉默的机制或通路的呢?如何根据肿瘤特异性 miRNA 表达谱确定临床分期?如何加快开展基因治疗及新药研发?如何确保 miRNA 介导的靶向治疗的特异性及高效性?随着生物信息学和 miRNA 基因芯片技术的推广应用,我们有理由相信,在不久的将来,以 miRNA 为基础的新型抗癌疗法必将为人类攻克肿瘤这一难题带来希望

的曙光。

#### 参 考 文 献

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75:843-854.
- [2] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993, 75:855-862.
- [3] Reinhart BJ, Slack F, Basson M. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403:901-906.
- [4] 周凡, 庄诗美. microRNA 与肿瘤. *生命科学*, 2008, 20:207-212.
- [5] 赵娟芳, 李锋. miRNA 表达检测方法的研究进展. *农垦医学*, 2011, 33:76-79.
- [6] 李海明. miRNA——一种新的调控基因表达的小分子 RNA. *中国癌症杂志*, 2006, 16:675-678.
- [7] 张自强, 刘玉梅, 邓雯, 等. miRNA 与干细胞的生物学行为. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15:1875-1878.
- [8] 秦彤, 苗向阳. microRNA 及其应用研究进展. *生物技术通讯*, 2011, 22:98-102.
- [9] 连艳玲, 何东仪. microRNAs 对免疫系统作用的研究进展. *上海预防医学杂志*, 2011, 23:308-310.
- [10] 赵爱华, 曾泉, 李亚里. microRNA 与肿瘤. *四川医学*, 2011, 32:955-957.
- [11] 王奇宇, 王明蓉, 罗洁. miRNA 及其在医药领域应用的研究进展. *中国抗生素杂志*, 2011, 36:813-820.
- [12] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, 120:15-20.
- [13] Ladomery MR, Maddocks DG, Wilson ID. MicroRNAs: their discovery, biogenesis, function and potential use as biomarkers in non-invasive prenatal diagnostics *Int J Mol Epidemiol Genet*, 2011, 30:253-260.
- [14] Ebert MS, Sharp PA. Sharp Emerging Roles for Natural MicroRNA Sponges. *Curr Biol*, 2010, 20:R858-861.
- [15] 邱悦, 邱雪杉. miRNA 的研究进展. *研究进展*, 2010, 17:14-16.
- [16] 程娜, 王凯慧, 孙树汉. microRNA 在人类癌症治疗中的应用前景. *分子诊断与治疗杂志*, 2010, 2:413-415.
- [17] 谭胜, 朱涛. miRNA 在调控恶性肿瘤细胞的恶性进展中的作用研究. 合肥:中国科学技术大学, 2011.
- [18] 李博, 郭婉薇, 王伟福, 等. miR-345 在胃癌中的表达特点及其临床意义[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2011, 5:7220-7225.
- [19] 程文, 高建平, 张征宇. 微小 RNA 与肿瘤相关性研究. *医学研究生学报*, 2011, 24:203-205.
- [20] 宓林, 于晓峰, 邹健. 微小 RNA 对肿瘤干细胞的调控机制. *国际消化病杂志*, 2011, 31:163-165.
- [21] 潘运宝, 杨惠玲. miRNA 与肿瘤干细胞的研究进展. *国际内科学杂志*, 2009, 36:548-550.
- [22] 吴易阳, 李岭. MicroRNA 与肿瘤相关的信号转导通路. *遗传*, 2007, 29:1419-1428.
- [23] 张超, 谢书阳. 微 RNA 在肿瘤发病相关信号通路中的作用. *生命的化学*, 2010, 30:751-755.
- [24] 方坚鸿, 熊玉娟, 庄诗美. MicroRNA 与肿瘤血管生成. *中国科学 C 辑:生命科学*, 2009, 39:58-63.
- [25] 甘自立, 胡意. MiRNAs 与肿瘤血管形成. *实验与检验医学*, 2011, 29:505-508.
- [26] 谢乐, 姜汉国. miRNA 和肿瘤转移的研究进展. *医学综述*, 2009, 15:1505-1508.
- [27] 赵文芳, 贾永. 肿瘤细胞侵袭转移机制的研究现状. *健康必读*, 2011(6):171-173.
- [28] 马维娜, 王世明, 原永芳. miRNA 与肿瘤耐药关系的研究进展. *医学综述*, 2011, 17:3401-3404.

- [29] 莫益俊,赵健.微小RNA与肿瘤耐药.肿瘤学临床研究,2011,23:283-286.
- [30] 武雪梅,肖华胜.miRNA与肿瘤细胞耐药的关系.中国科学C辑:生命科学,2009,39:813-820.

(收稿日期:2012-03-12)

(本文编辑:马超)

冯琼,雷章,卢宏达.microRNA与肿瘤关系的研究[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2012,6(15):4390-4393.