

• 综述 •

MicroRNA 与乳腺癌的相关研究进展

毛启新 综述 张瑾 审校

MicroRNA (miRNA)是真核生物中一类长度约为 22 个核苷酸的参与基因转录后水平调控的非编码小分子单链 RNA,能与靶 mRNA 特异的碱基配对引起靶 mRNA 的降解或翻译抑制,从而对基因进行转录后的表达调控^[1]。目前普遍认为 miRNA 参与的基因调控是遗传程序中最基本的一步,调控着细胞分化、生长、凋亡、代谢等功能^[2]。近年来的研究表明,多种 miRNA 参与了癌细胞重要的生物程序的调控,间接地起着促癌基因和抑癌基因的功能,在肿瘤的发生和发展中起了至关重要的作用^[3]。本文就 miRNA 在乳腺癌中的研究进展作一综述。

1 乳腺癌特异的 miRNA 表达谱

直到目前,所有关于恶性肿瘤 miRNA 表达图谱的研究都显示,每一种恶性肿瘤,无论是造血系统肿瘤还是实体瘤的 miRNA 表达都与其来源的正常组织存在着显著的差异,此外,不同类型的恶性肿瘤,其 miRNA 表达图谱也截然不同^[4]。研究人员发现在所研究的 186 个 miRNA 中约有 50% 的 miRNA 集中于基因组的脆性位点区,其中有 15 个 miRNA 位于与人类乳腺癌发生相关的 10 个断裂点区^[5]。研究人员利用实时荧光定量(RT-PCR)技术分析 32 个常用细胞株的 222 个前体 miRNA(Pre-miRNA)的表达谱^[6],其中包括 5 个乳腺癌细胞株(T47D, SKBR3, MDA361, MCF7 和 MDA231),结果表明在上皮来源的乳腺癌、肺癌和结直肠癌的癌细胞中,let-7f-1 的表达增加了 7 倍。Iorio 等^[7]利用微阵列及 RNA 印迹技术(Northern blot)等实验方法分析了 10 例正常乳腺组织和 76 例乳腺癌组织的 miRNA 表达谱,发现其中有 29 种 miRNA 的表达有显著改变,这些 miRNA 的表达可能与乳腺癌一些特定的生物学特性如雌激素受体、孕激素受体、肿瘤分期、血管侵袭及增殖指数有关。Si 等^[8]发现 miR-145 和 miR-21 在乳腺正常组织和乳腺癌中的表达不同,能够区分正常组织与癌组织。

2 与乳腺癌相关的抑癌基因和癌基因 miRNA

2.1 抑癌基因 miRNA

研究证实 miR-143 和 miR-145 在结肠癌中明显下调,其中 miR-145 的下

调在乳腺癌和乳腺癌细胞系中也是非常常见的,提示其可能起着抑癌基因的作用^[9-10]。宋尔卫等^[11]使用 miRNA 芯片分析及 Northern blot、RT-PCR 等技术证明了 let-7 在乳腺癌中低表达,在人乳腺癌中 let-7 负调控 ras,上调 let-7 的表达导致 ras 表达下降,而减少 let-7 的表达,会导致 ras 蛋白明显增加。最近有研究发现了 let-7 的新靶点-高迁移率族蛋白 A2(hmga-2)^[12]。hmga-2 在多种肿瘤中过表达,具有癌基因的特性。异常表达的 let-7miRNA 与 hmga-2 mRNA 转录本 3'端结合,抑制 hmga-2 在胞质中的表达。然而,染色体断裂导致的 hmga-2 mRNA 转录本 3'端变短,或抑制 let-7 结合,都会导致 hmga2 过表达和肿瘤发生^[13]。Mattie 等^[14]发现 miR-125b 在乳腺癌中表达下调,miR-125b 及其同源体 miR-125a 在 HER-2 阳性的人类乳腺癌中表达明显下调,提示其可能参与了 HER-2 基因的调控。

2.2 癌基因 miRNA

bic/miR-155 是最早发现的具有促癌活性的 miRNA。在人类各种肿瘤中都发现了 bic/miR-155 的高表达^[15],包括 B 细胞淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、结肠癌和甲状腺癌。bic/miR-155 促进肿瘤增殖的机制还不清楚。血管紧张素 miR-155 可能直接下调 myc 基因的一个或多个抑制因子(如 Mad1、Mxi1、Rox/Mnt 等)的表达,从而增强 myc 基因的活性,促进细胞增殖,致细胞癌变。在 65%的 B 细胞淋巴瘤细胞样品中 miR-17-92 的前体分子表达增加;这些 miRNA 在其他类型的肿瘤中也发现高表达,包括乳腺癌、结肠癌、胰腺癌和前列腺癌;miR-17 基因簇中的 miRNA 可以协同地行使癌基因的功能^[16-17],这可能是由于其靶基因在 c-myc 过表达条件下激活了凋亡因子。Croce 等^[18]发现 miR-21 在乳腺癌等多种肿瘤中过表达,但是 miR-21 如何调控肿瘤的生长仍不清楚。Zhu 等^[19]的最新研究发现 miR-21 的作用靶点可能是肿瘤抑制基因原肌球蛋白 1 Tumor suppressor tropomyosin 1(TPM1),在 TPM1 变异体 V1 和 V5 的 3'非翻译区(UTR)含有 miR-21 的结合位点。

3 miRNA 对乳腺癌细胞生物程序的调控

3.1 调控细胞增殖的 miRNA

miRNA 与肿瘤细胞增殖关系的研究始于 2005 年。Yu 等^[20]采用反义 miRNA 库,在 HeLa 和 A549 两个肿瘤细胞株中筛选与其增殖相关的 miRNA,结果发现了 19 种不同的 miRNA 都能促进细胞增殖。其中典型的例子是 let-7 家族中的 miRNA。宋尔卫等^[11]通过低剂量化疗的压力,在免疫缺陷小鼠传代乳腺癌 SKBR3 细胞中筛选出的第 3 代细胞(SK-3rd)在体外悬浮培养的时候球囊形成率明显增高,从原来 SKBR3 的 0.3%上升到 16%左右,说明 SK-3rd 具有较强的生长能力。再通过 miRNA 表达谱的分析,证实 SK-3rd 细胞 let-7 家族成员的表达都丧失或显著下降。应用携带 let-7 前体

miRNA 的曼病毒载体感染 SK-3rd 细胞,能显著降低其球囊形成率。可见, let-7 表达下调可以促进癌细胞的生长^[21]。

3.2 调控细胞凋亡的 miRNA

Si 等^[8]用抗 miR-21 的寡核苷酸转染乳腺癌 MCF-7 细胞,细胞生长受到抑制,同时伴有增殖的降低和凋亡的增加,用 RT-PCR 方法检测这些用 miR-21 寡核苷酸处理过的乳腺癌细胞,结果发现 Bcl-2 mRNA 明显减少。这说明抗凋亡蛋白 bcl-2 基因是 miR-21 调控肿瘤生长的一个靶点。最近, Frankel 等^[22]在乳腺癌细胞株中发现 miR-21 的另外一个靶基因:程序性细胞死亡 4 (programmed cell death 4, PDCD4)。PDCD4 是近年来发现的一种新的抑癌基因,在乳腺癌中的作用机制还不清楚。已有研究表明 PDCD4 在介导乳腺癌细胞的凋亡中发挥重要的作用^[23]。另有研究证明 miRNA 参与了复杂的细胞生长与死亡调控的例子是 miR-17-92 家族,发现在携带 c-myc 基因的小鼠中转导表达 miR-17-92 族的逆转录病毒,能大大的加速肿瘤的发生,此外,转导 miR-17-92 族的肿瘤细胞增殖指数更高,凋亡减少,而对照组的肿瘤细胞凋亡率明显高^[16]。这些结果说明了 c-myc 基因与 miR-17-92 族的 miRNA 分子协同促进癌细胞生长,减少凋亡。

3.3 调控细胞黏附的 miRNA

肿瘤的转移与细胞之间黏附连接相关的分子上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)表达和功能的丧失有关。肿瘤细胞 E-cadherin 的表达下调,可导致细胞从上皮型转化为肌上皮型,导致恶性表型增高。目前发现 E-cadherin 和 β -catenin 基因的 3'UTR 均含有 miRNA 的结合位点, E-cadherin 的结合位点是 miR-9, β -catenin 则是 miR-139 和 miR-200a。E-cadherin 的 miR-9 结合位点可能更有意义,因为多种肿瘤,包括乳腺癌和肺癌都有 miR-9 的高表达。

此外,在肿瘤转移过程中癌细胞与细胞外间质的黏附作用起着重要作用,这种黏附功能是由肿瘤细胞表面的整合素分子介导的。肿瘤细胞某些整合素基因的表达受到 miRNA 的调控。例如整合素 $\beta 3$ (ITGB3) 有 let-7/miR-98 和 miR-125 的结合位点, let-7 在肺癌和其他多种肿瘤中的表达都下调^[7], 而 miR-125 在乳腺癌中表达下调。此外,多种整合素基因都受到 miRNA 调控, 这些 miRNA 分子下调, 可导致整合素分子过表达, 通过与细胞外间质的相互作用, 参与肿瘤的发生和转移。

4 miRNA 与乳腺癌干细胞

恶性肿瘤细胞中有一小部分“癌干细胞”,虽然所占的比例不大,但成瘤能力特别强,被认为是恶性肿瘤成瘤、发展、转移和治疗后复发的根源。宋尔卫等^[11]发现在乳腺癌启动细胞(breast tumour-initiating cells, BT-IC)中 let-7 miRNA 的表达显著低于非 BT-IC,纠正 BT-IC 中 let-7 的表达,不仅减少乳腺癌启动细胞

的自我复制、增殖潜能,诱导它们向成熟肿瘤细胞方向分化,并能削弱它们在荷瘤鼠中成瘤和转移能力。但是,单纯应用小发夹 RNA(shRNA)把 ras 基因的表达下调至与 let-7 作用相当的水平,只能部分达到 let-7 所起的抑制自我复制、增殖潜能和成瘤能力,而对 BT-IC 的分化作用没有任何影响,说明 let-7 miRNA 与 ras shRNA 比较,具有更广泛的抗癌机制,可能通过多条分子信号通路起作用,更适合用于抗肿瘤治疗。

5 miRNA 在乳腺癌诊断和治疗方面的应用

5.1 miRNA 检测与乳腺癌的早期诊断和预后判断

通过比较正常组织和肿瘤样品中 miRNA 的表达谱,发现 217 个 miRNA 中的 129 个表达水平在肿瘤中下降,miRNA 可能与细胞进入分化程度更高的阶段有关,肿瘤和正常组织中 miRNA 表达谱之间的差异代表了这些细胞的分化水平的差异^[4]。在乳腺癌研究中发现了 29 种差异表达的 miRNA,它们在乳腺癌中的表达显著下调^[7]。Van de Vijver 等^[24]利用基因表达谱对具有临床纪录 5 年以上的大量乳腺癌组织样品进行分析,从中筛选出 70 个基因对乳腺癌的预后作出精确的判断(灵敏度达 93%,特异性达 53%),其中有 15 个 miRNA 可以准确的对乳腺癌组织进行检测。除此之外还发现,miRNA 的表达与乳腺癌的特定组织类型有一定的关系,比如 ER 丰度、肿瘤分期、血管浸润和增殖特性等。乳腺癌中若 let-7a 水平较低,则预示着预后较差,易发生淋巴转移而且增殖度较高^[25]。

Iorio 等^[7]研究发现,乳腺癌的表达图谱可以预测疾病的预后。对 76 例乳腺癌样品的分析表明,乳腺癌组织中 miR-125b 和 miR-145 降低,miR-21 和 miR-155 升高,而且发现,这些 miRNA 表达的变化与浸润性乳腺癌的生物病理特征密切相关,包括 ER、PR 的表达、肿瘤的分期、血管浸润和增殖指数等。

5.2 miRNA 在乳腺癌治疗中的潜在应用

miRNA 是调节真核生物基因表达和细胞增殖的天然的反义寡核苷酸链^[26],而且已经发现吉西他滨治疗会引起 miRNA 表达图谱的变化,体外实验中某些 miRNA 的修饰会增加乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性。引入与具有癌基因特性的 miRNA 互补的抗 miRNA 寡核苷酸可能有效地降低肿瘤中 miRNA 的表达,延缓肿瘤的生长;经常的或者持续的 2'-O-甲基化或者锁核酸(LNA)等修饰的反义寡聚核苷酸给药可使 miRNA 失活;将与胆固醇偶联的反义 microRNA 寡核苷酸 AMOs 注射小鼠后,可以在不同器官有效地抑制 miRNA 活性;相反,利用病毒或者脂质体的表达系统可以瞬时引入大量 miRNA,提高那些具有抑癌基因作用的 miRNA,如 let-7 家族,可以治疗乳腺癌、肺癌肿瘤。

6 结语

miRNA 的研究是目前分子生物学研究中发展最快的领域,在 miRNA 的基础研究方面已取得了丰硕的成果,初步阐明了 miRNA 在细胞凋亡、增殖、细胞周期及细胞发育中的调控作用,并发现 miRNA 与多种肿瘤的发生发展有着密切的关系。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,科学家们已经开始设想以 miRNA 为靶点治疗乳腺癌。相信在不久的将来,以乳腺癌相关的 miRNA 为靶点的生物靶向治疗会应用于临床中,为乳腺癌的治疗提供一个更有效的手段。

参考文献

- [1] Thomson J M, Newman M, Parker J S, *et al.* Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev*, 2006, 20:2202—2207.
- [2] Wang H, Mendell J T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer*, 2006, 94:776—780.
- [3] Zhang B, Pan X, Cobb G P, *et al.* MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 2007, 302:1—12.
- [4] Lu J, Getz G, Miska E A, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005, 435:834—838.
- [5] Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101:2999—3004.
- [6] Jiang J, Lee E J, Gusev Y, *et al.* Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33:5394—5403.
- [7] Iorio M V, Ferracin M, Liu C G, *et al.* MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005, 65:7065—7070.
- [8] Si M L, Zhu S, Wu H, *et al.* miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*, 2007, 26:2799—2803.
- [9] Michael M Z, van Holst Pellekaan N G, Young G P, *et al.* Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*, 2003, 1:882—891.
- [10] Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol Rep*, 2006, 16:845—850.
- [11] 宋尔卫. 小分子 RNA 的基础研究与临床应用. 北京:北京科学技术出版社, 2007:115—120.
- [12] Rogalla P, Drechsler K, Kazmierczak B, *et al.* Expression of HMGI-C, a member of the high mobility group protein family, in a subset of breast cancers: relationship to histologic grade. *Mol Carcinog*, 1997, 19:153—156.
- [13] Lee Y S, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev*, 2007, 21:1025—1030.
- [14] Mattie M D, Benz C C, Bowers J, *et al.* Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer*, 2006, 5:24.
- [15] Liang Z, Wu H, Reddy S, *et al.* Blockade of invasion and metastasis of breast cancer cells via targeting CXCR4 with an artificial microRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363:542—546.
- [16] He L, Thomson J M, Hermann M T, *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005, 435:828—833.
- [17] Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, *et al.* A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*, 2005, 65:9628—9632.
- [18] Croce C M, Calin G A. miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell*, 2005, 122:6—7.
- [19] Zhu S, Si M L, Wu H, *et al.* MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*, 2007, 282:14328—14336.
- [20] Yu F, Yao H, Zhu P, *et al.* let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, 2007, 131:1109—1123.
- [21] Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29:903—906.
- [22] Frankel L B, Christoffersen N R, Jacobsen A, *et al.* Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2008, 283:1026—1033.

- [23] Afonja O, Juste D, Das S, *et al.* Induction of PDCD4 tumor suppressor gene expression by RAR agonists, antiestrogen and HER-2/neu antagonist in breast cancer cells: evidence for a role in apoptosis. *Oncogene*, 2004,23:8135—8145.
- [24] van de Vijver, He Y D, van't Veer L J, *et al.* A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*, 2002,347:1999—2009.
- [25] 黄关立,郭贵龙,张筱骅. MicroRNA 在乳腺癌中的研究进展. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2008,2:301—307.
- [26] Hammond S M. MicroRNA therapeutics: a new niche for antisense nucleic acids. *Trends Mol Med*, 2006, 12:99—101.

(收稿日期:2008-05-13)

(本文编辑:梁燕)

毛启新. MicroRNA 与乳腺癌的相关研究进展[J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2009,3(6):670—675.