

· 综述 ·

## 微 RNA 在乳腺癌发生发展中的作用

张雁磊 张吉强

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。近年来,其发病率和死亡率已居女性恶性肿瘤之首<sup>[1]</sup>,严重威胁着广大女性的生命健康。目前,随着分子生物学的深入,学者们期待着可以找到一个新的治疗靶点,以便能从细胞或者基因水平对该病进行诊断、治疗和预防。微 RNA (microRNA, miRNA) 是真核生物中存在的一类长度约 17 ~ 25 个核苷酸的非编码小分子单链 RNA,其可通过与靶 mRNA 的特异碱基配对引起翻译抑制或靶 mRNA 的降解,从而调控基因转录后表达,在细胞增殖分化、胚胎发育、定向造血干细胞分化以及大脑发育等生物活动的调控中发挥着非常重要的作用<sup>[2]</sup>。2002 年,Calin 等<sup>[3]</sup>首次证实 miRNA 异常表达与肿瘤存在着极大的相关性。之后学者们又对此进行了大量的研究,结果均表明多种 miRNA 参与了肿瘤的生长、分化、凋亡、侵袭以及转移等过程<sup>[4]</sup>。本文对近年来学者们在 miRNA 与乳腺癌血管生成、转移以及乳腺癌干细胞方面的相关研究进行简要综述。

### 1 miRNA 在乳腺癌中的表达

研究发现,不论是在哪一种肿瘤中,miRNA 的表达均与正常组织间存在明显差异,且每一种恶性肿瘤都有其特异的 miRNA 表达谱。Calin 等<sup>[3]</sup>最早研究了 186 个 miRNA 的表达谱,结果发现有 98 个 miRNA (52.5%) 位于肿瘤相关的基因组位点或脆性位点,而这些 miRNA 中又有 15 个位于与乳腺癌相关的位点;随后 Iorio 等<sup>[5]</sup>通过对比 10 例正常乳腺组织和 76 例乳腺癌组织的 miRNA 表达谱,发现有 29 种 miRNA 在乳腺癌组织中的表达有显著改变,其中 miR-125b、miR-145、miR-21 以及 miR-155 在乳腺癌组织中的表达水平降低程度最大,并且这些 miRNA 异常表达可能与乳腺癌组织的一些特定的生物学特性如雌激素受体和孕激素受体的表达、肿瘤分期以及血管侵袭等密切相关。Sempere 等<sup>[6]</sup>运用原位杂交技术探究了 miRNA 在 100 例乳腺癌组织样本中的空间表达情况,发现 miR-145 和 miR-205 仅在肌上皮/正常乳腺导管和下叶的基底细胞间隔有表达,且表达较正常组织降低甚至消失;在恶性细胞中,miR-21

表达增多,let-7a 表达却降低;作者还分析了 miRNA 表达与乳腺上皮标记物以及预后指标 ER、PR、HER-2 等的相关性,结果提示 miRNA 表达可能在乳腺癌的早期诊断中有潜在的临床应用价值。最近,Iyevleva 等<sup>[7]</sup>通过检测 80 例双侧乳腺癌患者以及 40 例单侧乳腺癌患者体内若干种可能参与乳腺癌病理过程的 miRNA (miR-21、miR-10b、miR-17-5p、miR-31、miR-155、miR-200c、miR-18a、miR-205 和 miR-27a) 表达,发现双侧乳腺癌患者的 miR-21、miR-10b 及 miR-31 表达明显高于单侧,提示与单侧乳腺癌患者相比,双侧乳腺癌患者的发病及病程进展也许有不同模式的分子事件。

## 2 miRNA 与乳腺癌血管生成

血管生成是肿瘤生长和转移的重要机制之一。调控肿瘤血管生成也是 miRNA 影响肿瘤发生发展的一个重要环节。

内皮细胞是血管内膜的关键成分之一,在肿瘤血管新生中发挥着重要作用。miR-126 已被证实特异性表达于大鼠的血管内皮细胞中。有趣的是,Northern blot 和 Western blot 的结果表明其在乳腺癌组织中表达降低,但细胞内的血管内皮细胞生长因子/磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B [vascular endothelial growth factor/phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, VEGF/PI3K/AKT(PKB)] 信号通路却被激活,将 miR-126 类似物转入 MCF-7 细胞中却可见 VEGF/PI3K/AKT 信号通路活性被显著抑制<sup>[8]</sup>。这些均提示 miR-126 可能通过调节 VEGF/PI3K/AKT 信号通路而在乳腺肿瘤的发生和生长过程中发挥着重要作用。Ma 等<sup>[9]</sup>还证实 miR-9 介导的 E-钙黏蛋白(一种内皮黏着蛋白)表达降低可以激活  $\beta$ -连环蛋白信号通路,而这条信号通路可通过上调 VEGF 表达来促进肿瘤血管生成。此外,乳腺癌细胞中 miR-9 可靶向调节 E-钙黏蛋白,这一过程还被证实可促进乳腺癌组织的上皮向间质转变(epithelial to mesenchymal transition, EMT)<sup>[10]</sup>。

组织因子(tissue factor, TF)是调节肿瘤血管生成和转移的一种重要因子,并被证实选择性地表达于具有高侵袭性的乳腺癌细胞如 MDA-MB-231 以及 BT-20 细胞系中。Zhang 等<sup>[11]</sup>的研究发现,向 MCF-7 细胞系中加入 miR-19 抑制物可促进内源性 TF 表达,而 miR-19 过度表达也会下调 MDA-MB-231 细胞中 TF 表达,表明 miR-19 表达与乳腺癌细胞中 TF 表达呈负相关。非编码的 3'未翻译区(3'-untranslational region, 3'-UTR)可以结合并钝化 miRNA,因而在调节 miRNA 的功能中发挥着重要作用。生物信息学的分析结果显示,乳腺癌细胞 TF 转录物的 3'-UTR 中存在 miR-19 等多种 miRNA 的结合位点,提示乳腺癌组织中 TF 的生成可能受多种 miRNA 的调节,进一步的研究也证实 TF

的 3'-UTR 对 MCF-7 细胞的基因表达起负性调节作用<sup>[11]</sup>。这与 miR-19 结合位点丢失对 TF 表达的影响是一致的,提示 miR-19 对 TF 表达的负性调节可能是通过与相应基因的 3'-UTR 区结合实现的<sup>[11]</sup>。以上这些实验结果虽然只是一些相关性分析,但却强烈地提示 miR-19 可能参与了乳腺癌血管生成的调控过程。另外, Jeyapalan 等<sup>[12]</sup>的研究还证实可与白细胞分化抗原分化群 44 (cluster of differentiation 44, CD44) 和细胞分裂周期蛋白 42 (cell division cycle protein 42, CDC42) (CD44 编码的 mRNA) 的 3'-UTR 结合的 miRNA 主要包括 miR-216a、miR-330 和 miR-608。进一步研究显示,人类乳腺癌 MT-1 细胞系中 CD44 的 3'-UTR 可与上述多种 miRNA 交联,参与血管内皮细胞相关活动的调节,并最终促进乳腺癌血管的生成<sup>[12]</sup>。因此,miR-216a、miR-330 以及 miR-608 可能也是乳腺癌血管生成的相关 miRNA。

### 3 miRNA 与乳腺癌的侵袭、转移

肿瘤的侵袭、转移是一个相当复杂的过程,也是导致乳腺癌等恶性肿瘤患者死亡的主要原因之一。乳腺癌细胞具有到达人体任意部位并在那里生长、增殖的潜力,因此,抑制乳腺癌侵袭、转移的发生对于患者的治疗以及预后都具有重要的意义。目前,研究人员已经发现了多个与乳腺癌侵袭、转移相关的 miRNA,它们均可以通过作用于相应的靶点而影响乳腺癌的侵袭、转移。

CD44 基因是一个抑癌基因,其在乳腺癌转移过程中表达明显下降<sup>[13]</sup>。Huang 等<sup>[14]</sup>将一种经 miRNA 文库转导的非转移性人类乳腺癌细胞系置于 Transwell 培养系统中进行培养,结果发现 miR-373 和 miR-520c 可促进这种乳腺癌细胞在体和离体的迁移与侵袭。他们认为这主要是由 miR-373 和 miR-520c 抑制 CD44 表达所致。此外,他们还发现在临床乳腺癌转移的样本中 miR-373 表达显著上调,并与 CD44 表达下调相一致,进一步研究显示这两种 miRNA 可直接与 CD44 的 3'-UTR 结合并抑制其表达,从而促进乳腺癌的转移。原肌球蛋白-1 基因 (tropomyosin-1, TPM1) 也是一个抑癌基因,并与抑制肿瘤转移密切相关<sup>[15]</sup>。Zhu 等<sup>[15]</sup>在研究中证实,抑制 miR-21 表达可以显著降低 MDA-MB-231 (一种转移性乳腺癌细胞) 的侵袭和肺转移,另外他们还检测了 miR-21 直接作用的两个靶点——程序性细胞死亡因子 4 (programmed cell death 4, PDCD4) 和乳腺丝氨酸蛋白酶抑制物 (maspin) (二者均被证实在肿瘤的侵袭和转移中发挥着重要作用) 的表达,结果显示 PDCD4 和 maspin 的高表达与 miR-21 表达的下降呈负相关,并可降低 MDA-MB-231 细胞的侵袭性。这些均提示 miR-21 可能以多种肿瘤转移抑制基因为靶点在乳腺癌的侵袭、转移中发挥着重要作用。miR-10b 是转录因子 Twist1 直接调控的靶



miRNA, 而 Twist1 也是一个可促进 EMT 和肿瘤转移的分子。目前, miR-10b 与乳腺癌侵袭、转移的相关性已获实验证实。研究人员发现, miR-10b 在转移潜能高的恶性乳腺癌细胞中表达显著增高, 在转移潜能低的乳腺癌细胞中其过度表达也将大幅增强此种乳腺癌细胞的侵袭能力, 而低表达 miR-10b 的乳腺癌细胞在实验中未出现浸润、转移现象, 若同时用反义寡核苷酸阻断 miR-10b 的活性, 乳腺癌细胞的侵袭能力将下降约 10 倍; 另外, 将高表达 miR-10b 的乳腺癌细胞原位接种至免疫缺陷的幼年雌鼠乳房, 6 周后所有接种部位均可见肿瘤形成, 并伴有明显的间质、血管浸润现象, 11 周后实验组小鼠全部出现肿瘤的远处转移现象。这些均提示 miR-10b 表达可以促进乳腺癌的侵袭、转移<sup>[16]</sup>。进一步的研究还揭示了 miR-10b 调控乳腺癌血管生成, 即抑制 miR-10b 靶基因同源异型框 D10(homeobox D10, HOXD10) 的转录并使 Ras 同源基因家族成员 C(Ras homolog gene family member C, RhoC) 表达上调可促进乳腺癌侵袭和转移<sup>[16]</sup>。miR-9 是乳腺癌细胞中高表达的一种 miRNA, 其可以直接靶向 I 型钙黏蛋白(cadherin 1, CDH1) 而发挥作用, 这一过程也被证实将增强乳腺癌细胞的能动性和侵袭性, miR-9 在非转移性乳腺癌细胞中过度表达也可促进小鼠中这类乳腺癌细胞的肺转移<sup>[9]</sup>。最近学者们还发现 miR-221/222<sup>[17]</sup>、miR-17-5p<sup>[18]</sup> 等 miRNA 也参与了乳腺癌的转移和侵袭过程, 而在所有参与这一过程的 miRNA 中, miR-373 和 miR-10b 表现最突出。

研究人员还发现了多种可抑制乳腺癌侵袭和转移的 miRNA, 主要包括 miR-335、miR-206 和 miR-126 等<sup>[19]</sup>。在这些 miRNA 中, miR-126 可抑制乳腺肿瘤细胞的生长和分化; miR-335 可直接靶向调节祖细胞转录因子性别决定区域 Y 框 4[sex determining region Y(SRY)-box4, SOX4] 和细胞外基质成分钙黏蛋白 C 从而诱导细胞形态改变, 最终降低乳腺癌细胞的侵袭和转移能力; 在大多数复发的乳腺癌患者中 miR-126 和 miR-335 也被发现是丢失的<sup>[19]</sup>。相关的临床试验也证实, miR-335 可抑制 ER- $\alpha$  阴性乳腺癌患者的肺转移; miR-335 和 miR-206 过表达还可降低肺转移性 LM2 细胞以及骨转移性 BoM1 细胞迁移<sup>[20]</sup>; 此外, miR-124 可通过靶向一系列与肿瘤转移相关的基因从而抑制乳腺癌的转移<sup>[21]</sup>。

EMT 是肿瘤转移的早期环节。研究证实多种 miRNA 均参与了乳腺癌的 EMT 过程。Gregory 等<sup>[22]</sup>研究发现 miR-200 家族中五位成员(miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141 和 miR-429) 以及 miR-205 的表达在 EMT 的乳腺癌细胞中显著下调, 而仅仅是 miR-200 家族成员表达的增强就已可以阻止转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 诱导的 EMT 过程。进一步的研究表明这两类 miRNA 可共同调节 E-钙黏着糖蛋白转录抑制物[锌指 E-盒结

合同源异形盒-1 ( zinc-finger E-box binding homeobox-1, ZEB1 ) 和 ZEB2 ] 的表达。ZEB1 和 ZEB2 均为参与 EMT 和肿瘤转移的重要分子,而抑制这两种 miRNA 表达也被证实可显著降低依赖 ZEB1 和 ZEB2 下调的 EMT 过程<sup>[22]</sup>。ZEB1 可直接抑制 miR-141 和 miR-200c( 均对乳腺癌细胞分化起激活作用) 转录,而 EMT 激活物即 TGF- $\beta$  和 ZEB1 又是可被其下调的突出靶点<sup>[23]</sup>。上述结果提示;ZEB1 可能触发了一个由多种 miRNA 介导的可促进 EMT 以及肿瘤细胞侵袭的前馈环路;在外界环境的影响下,这个环路可能会转变或诱导上皮的分化,最终导致肿瘤的异质性。

#### 4 miRNA 与乳腺癌干细胞

恶性肿瘤中,有一小部分细胞具有干细胞或祖细胞的特性,称肿瘤启动细胞( tumor-initiating cell, T-IC ),其所占的比例虽不大,但成瘤性却极强,被认为是恶性肿瘤成瘤、发展、转移以及治疗后复发的根源所在。自 Al-Hajj 等<sup>[24]</sup>于 2003 年首次分离并鉴定出了乳腺癌干细胞( breast tumor-initiating cell, BT-IC ) 后,BT-IC 便引起了研究人员极大的关注并迅速成为研究的重点和热点之一。

通过对比,研究人员共发现了 37 种 BT-IC 与其他非致瘤细胞区别表达的 miRNA,其中 miR-200c-141、miR-200b-200a-429 以及 miR-183-96-182 是在 BT-IC 中低表达但对其自我更新过程发挥调节作用的关键 miRNA<sup>[25]</sup>。除了前述的 ZEB1 和 ZEB2,miR-200c 还可靶向干细胞自我更新的调节因子 BMI1 从而抑制正常乳腺组织的外生性生长,并减弱 BT-IC 的致瘤性<sup>[26]</sup>;另外,miR-183 和 miR-203 也被证实可联合抑制 B 淋巴细胞瘤莫洛尼小鼠白血病病毒插入区域 1 ( B lymphoma Mo-MLV insertion region 1, BMI1 ) 的表达<sup>[25]</sup>。通过比较乳腺癌细胞系中自我更新和分化的细胞以及一期乳腺癌中 BT-IC 和非 BT-IC 细胞中 miRNA 的表达情况,研究人员发现 BT-IC 中 let-7 表达显著下降但在其分化过程中却又呈上升趋势; let-7 表达增加也同时伴随着致癌基因高迁移率族蛋白 A ( high mobility group AT-hook 2, HMGA2 ) 和哈维鼠肉瘤病毒致癌基因同系物 ( Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog, H-RAS ) 表达降低,其中 H-RAS 基因沉默将降低其自我更新能力但对于干细胞的分化没有影响,而 HMGA2 基因沉默可增强干细胞的分化却对其自我更新没有影响。综合以上结果,他们认为 let-7 可通过使多个靶基因沉默从而导致 BT-IC 的多种干细胞特性改变<sup>[27]</sup>。这就意味着,肿瘤若低表达 let-7 就会伴随 H-RAS 和 HMGA2 的高表达,而这将导致肿瘤的不良预后;相反,高表达 let-7 的肿瘤转移的可能性会相对较小。最近 Yu 等<sup>[28]</sup>还证实 BT-IC 中 miR-34c 表达的降低可以促进 BT-IC 的自我更新以及 EMT 过程。

## 5 结语

在过去的几年里,学者们已经在 miRNA 与乳腺癌发生发展的相关性方面进行了大量的研究,也取得了较大的进展,而这既为研究乳腺癌的发生发展机制提供了新的方向,也为诊断、治疗和预防此类疾病带来了新的靶点。比如,是否可以通过检测或定向改变患者体内某些 miRNA 的表达水平从而达到早期诊断和靶向治疗乳腺癌的目的,是否可将体内某些 miRNA 功能或者表达水平的改变作为乳腺癌等恶性肿瘤的生物学标记,以便对此类患者进行早期的辅助诊断和病程进展检测等等。但是,目前还有很多问题仍不清楚,如各种 miRNA 作用的靶点分别是什么,有哪些体内外因素可对 miRNA 的表达和功能进行调节,针对 miRNA 的恶性肿瘤靶向治疗策略是否存在社会伦理问题,是否会对人体造成损伤等等。这些都可能成为学者们未来面临的巨大挑战。

【关键词】 微 RNA; 乳腺肿瘤

【中图法分类号】 R737.9 【文献标志码】 A

## 参考文献

- [1] Downs-Holmes C, Silverman P. Breast cancer: Overview & updates [J]. Nurse Pract, 2011, 36(12):20-26.
- [2] Liu J, Zheng M, Tang YL, et al. Micrnas, an active and versatile group in cancers [J]. Int J Oral Sci, 2011,3(4): 165-175.
- [3] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes mir15 and mir16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2002,99(24):15 524-15 529.
- [4] Andorfer CA, Necela BM, Thompson EA, et al. Microrna signatures: Clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer [J]. Trends Mol Med,2011,17(6):313-319.
- [5] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. Microrna gene expression deregulation in human breast cancer [J]. Cancer Res, 2005,65(16):7065-7070.
- [6] Sempere LF, Christensen M, Silahatoglu A, et al. Altered microrna expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer [J]. Cancer Res,2007,67(24):11 612-11 620.
- [7] Iyevleva AG, Kuligina ES, Mitiushkina NV, et al. High level of mir-21, mir-10b, and mir-31 expression in bilateral vs. Unilateral breast carcinomas [J]. Breast Cancer Res Treat,2012,131(3):1049-1059.
- [8] Zhu N, Zhang D, Xie H, et al. Endothelial-specific intron-derived mir-126 is down-regulated in human breast cancer and targets both vegfa and pik3r2 [J]. Mol Cell Biochem,2011,351(1/2):157-164.
- [9] Ma L, Young J, Prabhala H, et al. Mir-9, a myc/mycn-activated microrna, regulates e-cadherin and cancer metastasis [J]. Nat Cell Biol,2010,12(3):247-256.
- [10] Khew-Goodall Y, Goodall GJ. Myc-modulated mir-9 makes more metastases [J]. Nat Cell Biol,2010,12(3):209-211.
- [11] Zhang X, Yu H, Lou JR, et al. Microrna-19 (mir-19) regulates tissue factor expression in breast cancer cells [J]. J Biol Chem,2011,286(2):1429-1435.
- [12] Jeyapalan Z, Deng Z, Shatseva T, et al. Expression of cd44 3'-untranslated region regulates endogenous microrna functions in tumorigenesis and angiogenesis [J]. Nucleic Acids Res,2011,39(8):3026-3041.
- [13] Yu Z,Baserga R, Chen L, et al. Microrna, cell cycle, and human breast cancer [J]. Am J Pathol,2010,176(3):1058-1064.
- [14] Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, et al. The micrnas mir-373 and mir-520c promote tumour invasion and metastasis [J]. Nat Cell Biol,2008,10(2):202-210.
- [15] 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.



- [16] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer [J]. Nature, 2007, 449(7163):682-688.
- [17] Shah MY, Calin GA. Micrnas mir-221 and mir-222: A new level of regulation in aggressive breast cancer [J]. Genome Med, 2011, 3(8):56.
- [18] Li H, Bian C, Liao L, et al. Mir-17-5p promotes human breast cancer cell migration and invasion through suppression of hbp1 [J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 126(3):565-575.
- [19] Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, et al. Endogenous human micrnas that suppress breast cancer metastasis [J]. Nature, 2008, 451(7175):147-152.
- [20] Zhang S, Kim K, Jin UH, et al. Aryl hydrocarbon receptor agonists induce microRNA-335 expression and inhibit lung metastasis of estrogen receptor negative breast cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2011, 11(1):108-118.
- [21] Lv XB, Jiao Y, Qing Y, et al. Mir-124 suppresses multiple steps of breast cancer metastasis by targeting a cohort of pro-metastatic genes *in vitro* [J]. Chin J Cancer, 2011, 30(12):821-830.
- [22] Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The mir-200 family and mir-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting zeb1 and sip1 [J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(5):593-601.
- [23] 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):582-589.
- [24] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(7):3983-3988.
- [25] Greene SB, Herschkowitz JI, Rosen JM. Small players with big roles: Micrnas as targets to inhibit breast cancer progression [J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(9):1059-1073.
- [26] Shimono Y, Zabala M, Cho RW, et al. Downregulation of mirna-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells [J]. Cell, 2009, 138(3):592-603.
- [27] Yu F, Yao H, Zhu P, et al. Let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells [J]. Cell, 2007, 131(6):1109-1123.
- [28] Yu F, Jiao Y, Zhu Y, et al. Mir-34c down-regulation via DNA methylation promotes self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in breast tumor-initiating cells [J]. J Biol Chem, 2012, 287(1):465-473.

(收稿日期:2012-02-14)

(本文编辑:罗承丽)

张雁磊, 张吉强. 微 RNA 在乳腺癌发生发展中的作用 [J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2012, 6(6):668-674.