

## · 综述 ·

## MicroRNA 在乳腺癌中的研究进展

黄关立 郭贵龙 张筱骅

微小 RNA (MicroRNA, miRNA) 是近年来发现的长度约 22 nt 的内源性短链 RNA, 不编码蛋白质, 可通过与编码蛋白质的 mRNA 互补结合, 沉默其表达, 从而起着调控细胞分化、生长、增殖、代谢、凋亡等功能。而肿瘤的发生、发展正是细胞无限增殖和凋亡失控的结果, 因此 miRNA 和肿瘤的关系正成为目前研究的热点。如果 miRNA 的靶基因是癌基因, 那么 miRNA 的表达低于正常水平, 将引起癌基因编码的蛋白增加, 导致肿瘤发生; 反之, 若 miRNA 的靶基因是抑癌基因, 此 miRNA 的表达高于正常水平, 将引起抑癌基因编码的蛋白减少, 亦可导致肿瘤发生。一种 miRNA 可以同时调节多种癌基因或抑癌基因的表达, 因此以 miRNA 作为治疗靶点也许比单一的癌基因或抑癌基因作为治疗靶点更有效。miRNA 的发现及其和肿瘤关系的揭示为寻找乳腺癌新的生物治疗靶点提供了一个极有希望的研究方向。本文就 miRNA 在乳腺癌中的研究作一综述。

### 1 miRNA 的产生及作用机制

成熟 miRNA 长度约为 22 nt, 其基因分布在 Y 染色体以外的人类所有的染色体中<sup>[1]</sup>。编码 miRNAs 的基因由 RNA 聚合酶 II 转录为长的 miRNA 原始转录产物, 并形成发夹形状的茎-环二级结构, 在细胞核内经 RNA 酶 III Droscha 切割加工形成 miRNA 前体 (pre-miRNA)。Pre-miRNA 通过转运蛋白 Exportin-5 转运到细胞质后, 在细胞质中被另外一个 RNA 酶 III Dicer 进一步加工成短双链 miRNA, 然后解链形成成熟的单链 miRNA, 另一条链降解消失。成熟的 miRNA 和 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 组装成复合体 miRISC 而发挥沉默基因的作用。

目前, miRNA 确切的作用机制还不清楚。研究表明 miRNA 能够下调基因的表达, 但还未发现上调基因表达的 miRNA。miRNA 以不同的方式下调基因的表达, 如果 miRNA 和其相应的标靶 mRNA 以完全互补的方式结合在开放

阅读框, mRNA 将发生特异性降解; 如果 miRNA 以部分互补的方式与 mRNA 结合在 mRNA 的 3' 端非翻译区(3' UTR), 则仅仅抑制其翻译, 不影响 mRNA 的稳定性。miRNA 的 5' 端 2 ~ 8 或 1 ~ 7 核苷酸区被称为“种子区”, 对 miRNA 与 3' UTR 的配对非常重要。miRNA 种子区通常和相应的靶序列完全配对, 因此可以用种子区序列预测 miRNA 的靶基因。在大多数情况下, miRNA 种子区和相应靶序列的完全配对是其起调控作用的前提条件。根据生物信息学预测, 一种 miRNA 可作用于多种 mRNA 靶点, 多个 miRNA 也可以作用于一个 mRNA。mRNA 的 3' UTR 可以包含多个 miRNA 的作用位点, 并且和抑制翻译的程度有关, miRNA 结合的位点越多, 抑制的程度就越大。由此形成复杂而又精确的调节网络, 调节着生物体的基因表达及生理功能, 一旦 miRNA 的水平失衡, 将可能导致疾病的发生。

## 2 miRNA 与疾病的关系

1993 年, Lee 等<sup>[2]</sup>在线虫 *C. elegan* 中发现了第 1 个时序性调控胚胎后期发育的基因 *lin-4*。*lin-4* 基因并非编码蛋白质。它的转录产物中有一个长度为 22 nt 的 RNA。当时命名这种 microRNA 为小分子时序 RNA(stRNAs)。这种转录产物在幼虫的 I 1 后期表达, 与 *lin-14* 和 *lin-28* 的 mRNA 3' UTR 序列互补, 短暂下调 *lin-14*、*lin-28* 蛋白质的表达水平, 使线虫由 I 1 期向 I 2 期转化, 当时并未引起重视。直到 2000 年, Reinhart 等<sup>[3]</sup>在线虫 *C. elegan* 中发现第 2 个时序性调控基因 *let-7*。迄今为止, 人类中已经鉴定出 500 多种 miRNA, 占人类已知基因的 3% 左右<sup>[4]</sup>。这些 miRNA 调节着大约 30% 人类的基因<sup>[5]</sup>。这些靶基因的产物包括: 转录因子、分泌蛋白、受体、转运蛋白等。研究表明 miRNA 的表达失调, 可能引起大量相关基因的表达异常, 导致细胞功能的紊乱。

如: *mir-1* 是一种在骨骼肌和心肌中特异性表达的 miRNA, 能够通过抑制靶基因 *hand2* 的翻译, 进而调控心肌的分化和心脏的发育<sup>[6]</sup>, *mir-1* 失调可能和先天性心脏病有关; *mir-375* 是一种胰岛特异性的 miRNA, 通过下调靶基因 *Mtpn* 的表达, 参与调控胰岛素的分泌, 抑制 *mir-375* 能够增加葡萄糖刺激引起的胰岛素分泌, 是治疗糖尿病的一个潜在靶点<sup>[7]</sup>。另外, 超过 50% 的 miRNA 基因位于染色体的脆性位点。在恶性肿瘤中这些脆性位点常发生缺失、扩增、重排等, 提示 miRNA 的表达失调在肿瘤的发病机制中可能起着重要的作用。

早期 miRNA 和肿瘤有关的证据来自对慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 的研究。2002 年, Calin 等<sup>[8]</sup> 发现定位于染色体 13q14 的 mir-15a 和 mir-16a 基因, 在 B 细胞慢性淋巴细胞白血病 (B-CLL) 中通常缺失, 两者表达在大部分 CLL 中发生缺失或下调。mir-15a 和 mir-16-1 能够沉默抗凋亡因子 Bcl-2 的表达, 提示两者可使 Bcl-2 表达上调, 起着抗凋亡的作用<sup>[9]</sup>。随着高通量芯片检测技术和高灵敏度 real-time RT-PCR 技术的应用, 学者们发现 miRNA 水平和肿瘤的临床病理特征及肿瘤的预后密切相关, 在肿瘤的发生、发展过程中起着关键的调控作用。

### 3 miRNA 在乳腺癌中的研究进展

#### 3.1 乳腺癌 miRNA 表达谱的临床价值

微阵列芯片技术的应用使高通量检测组织中 miRNA 的表达谱成为可能。2005 年 Iorio 等<sup>[10]</sup> 应用微阵列芯片首次从乳腺癌组织、乳腺癌细胞株中筛选出在肿瘤中异常表达的 miRNA 谱, 发现有 29 条 miRNA 在肿瘤中表达失调, 其中 12 条表达下调, 改变最明显的分别是 mir-125b、mir-145、mir-21 和 mir-155。同时发现其中一些 miRNA 的表达失调和乳腺癌的临床病理特征, 如 ER、PR 受体的状况, 肿瘤的大小, 脉管有无侵犯, 增殖指数等显著相关; 另外 15 条 miRNA 的表达几乎 100% 能区分正常组织和癌组织。Mattie 等<sup>[11]</sup> 用 miRNA 微阵列芯片检测了 20 个乳腺癌活检标本的表达谱, 发现用 miRNA 表达谱能够区别 HER-2 + / ER -, HER-2 + / ER + 和 HER-2 - / ER + 临床表型的乳腺癌, 同样也能区分 HER-2 + 和 HER-2 -, ER + 和 ER - 的乳腺癌。这些表型不同的乳腺癌, 其预后和治疗方案均不相同。一项更为深入的研究<sup>[12]</sup> 表明: miRNA 表达谱可以区分乳腺癌的 5 个分子亚型, 即 luminal A、luminal B、HER-2 阳性、基底样和正常乳腺样; 分子亚型和乳腺癌的预后和治疗反应密切相关。Tavazoie 等<sup>[13]</sup> 用微阵列芯片筛选了多个具有高度转移特性的乳腺癌 MDA-MB-231 衍生细胞株, 发现一系列 miRNA 的异常表达与乳腺癌的远处转移密切相关, 其中 mir-335 与 mir-126 对抑制肿瘤转移发挥着关键性作用; 上述两种 miRNA 表达缺失的乳腺癌患者无转移生存率低。以上研究表明 miRNA 的表达特征对乳腺癌预后判断和治疗方案的选择有重要价值。

#### 3.2 乳腺癌中已明确靶基因及功能的 miRNA

mir-21 在结肠癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、乳腺癌等多种实体肿瘤中表

达上调<sup>[14]</sup>,提示其对肿瘤的作用可能具有普遍性。Zhu 等<sup>[15]</sup>在乳腺癌细胞株 MCF-7 中发现抑癌基因 Tropomyosin 1 (TPM1) 是 mir-21 的靶基因之一。细胞中导入表达 mir-21 的质粒或反义寡核苷酸,可以分别下调和上调 TPM1 蛋白表达的水平,TPM1 mRNA 的水平并不受影响,表明其为翻译水平的调控。最近, Frankel 等<sup>[16]</sup>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(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着重要的作用<sup>[17]</sup>。以上研究提示 mir-21 在乳腺肿瘤的发生、发展过程中通过下调多种抑癌基因而发挥作用。

Mir-206 在乳腺癌中的表达水平和 ER 的表达成负相关<sup>[10]</sup>。ER 的调控比较复杂,包括蛋白质的磷酸化、乙酰化、SUMO 化修饰、多泛素化修饰等。2000 年 Kenealy 等<sup>[18]</sup>发现 ER- $\alpha$  受体 mRNA 3'UTR 的一些区域,能和某种调控元件结合,抑制 ER- $\alpha$  受体的表达。Adams 等<sup>[19]</sup>不久前分析了 ER- $\alpha$  受体的 mRNA 3'UTR,发现有两个 mir-206 结合位点,并证实 mir-206 能与这些位点结合并降解 mRNA,导致 ER- $\alpha$  受体的 mRNA 和 ER- $\alpha$  受体下调;同时发现雌二醇(E2)或特异性 ER- $\alpha$  激动剂 PPT 也能明显下调 miRNA-206 的水平。这些研究表明, mir-206、雌激素、ER- $\alpha$  之间可能存在着反馈调节机制。此外他们还发现 mir-1、let-7d 也能调控 ER- $\alpha$  mRNA 的表达水平,提示不同的 miRNA 可以调控同一个靶基因。mir-206 可能在乳腺癌恶性转化及其转化过程中 ER 受体表达缺失导致非雌激素依赖性生长中起调控作用,但具体功能仍有待于进一步研究。

Ma 等<sup>[20]</sup>研究发现 mir-10b 在转移性乳腺癌细胞株中的表达明显升高,如在高转移能力的 MDA-MB-231 细胞株中 mir-10b 表达比非转移性乳腺癌细胞株 MCF-7 高 50 倍以上,推测 mir-10b 在癌细胞的转移过程中可能起着促进作用。同时,这项研究还确定 mir-10b 的靶标为 HoxD10 基因。Hox 家族作为一类特殊的转录调节因子,其表达的蛋白不仅控制胚胎细胞的发育和分化,而且在成人组织的增殖、分化过程中也发挥着主控作用<sup>[21]</sup>,其中 HoxD10 基因的表达能够抑制乳腺癌的转移侵袭能力<sup>[22]</sup>。这项研究证实 mir-10b 正是阻遏 HoxD10 基因 mRNA 的翻译而起着促进乳腺癌细胞转移的作用。肿瘤治疗失败的最大原因在于其转移性, mir-10b 这一功能的发现为临床上治疗转移性乳腺癌提供了一个潜在的治疗靶点。

mir-125b 在乳腺癌中表达下调<sup>[10]</sup>, 提示其可能起着抑癌作用。Mattie 等<sup>[11]</sup>还发现: mir-125b 及其同源体 mir-125a 在乳腺癌中的表达水平和乳腺癌的 HER-2 基因表达有关; 在 HER-2 阳性的人类乳腺癌中其表达明显下调, 提示其可能参与了 HER-2 基因的调控。Scott 等<sup>[23]</sup>研究发现 HER-2 和 HER-3 mRNA 的 3'UTR 均具有与 mir-125a、mir-125b 结合的区域。在 HER-2 基因扩增和过表达的人类乳腺癌细胞株 SKBR3 中, 过表达 mir-125a 或 mir-125b 均可导致 HER-2 基因 mRNA 和蛋白表达水平的下调, 进而下调 ERK1/2 和 AKT 信号蛋白, 减弱 SKBR3 细胞的锚定生长能力以及迁移和侵袭力。令人感兴趣的是 mir-125a 或 mir-125b 可同时调节 Her-3 的表达。HER 家族的 4 个成员 (HER-1、HER-2、HER-3、HER-4) 之间只有形成同源或异源二聚体才能和配体稳定结合。HER-3 与 HER-2 结合形成的异源二聚体具有最强的促细胞分裂能力, 被认为与人类上皮组织肿瘤的关联性最大。研究提示 mir-125a 或 mir-125b 可同步调节 HER-2 和 HER-3 的表达, 对 HER-2 发挥最大的调控作用。

在人类基因中存在 12 个由 let-7 家族编码的同源 miRNA, 相互间差 1~2 个碱基, 大部分具有相似的功能。多数研究提示 let-7 具有抑癌作用, 目前已确认的靶基因有 Ras、c-myc、HMGA2<sup>[24-26]</sup>, 三者均为原癌基因。Let-7 在乳腺癌中的研究也取得了突破性进展。乳腺癌干细胞被认为是乳腺癌发生、发展、转移、治疗耐受和复发的根源。Yu 等<sup>[27]</sup>发现 let-7 在乳腺癌的干细胞中低表达, 对乳腺癌干细胞起重要的调控作用, 通过调控其靶基因 Ras 影响干细胞的自我更新能力, 调控 HMGA2 的表达影响干细胞的分化能力。研究表明 let-7 能通过调控多个靶基因而影响干细胞的功能。

### 3.3 miRNA 在乳腺癌中潜在的治疗作用

miRNA 不仅具有诊断价值, 由于它可通过下调一系列的癌基因或抑癌基因, 起着抑癌或致癌的作用, 因此将具有抑癌作用的 miRNA 或者致癌 miRNA 的反义寡核苷酸, 通过病毒或脂质体表达系统导入肿瘤细胞中有望达到治疗目的。Si 等<sup>[28]</sup>将 mir-21 反义寡核苷酸转染至乳腺癌细胞株 MCF-7, 导致其生长抑制; 将其接种到大鼠体内, 观察 4 周, 与对照组相比, 肿瘤生长明显受到抑制, 细胞凋亡增加, 增殖指数降低。通过病毒载体将 let-7 导入乳腺癌干细胞后, 其在体外和体内的自我更新能力、成瘤能力和转移能力均显著下降<sup>[27]</sup>。将转染 mir-10b 的非侵袭性乳腺癌细胞接种到大鼠体内, 形成肿瘤的侵袭性和转移性明显高于对照组<sup>[20]</sup>, 提示抑制 mir-10b 的表达也可抑制肿瘤的侵袭

和转移能力。以上实验表明恢复或沉默肿瘤相关的 miRNA 技术,在乳腺癌的治疗领域中将会有潜在的应用前景。与 miRNA 功能相似的 siRNA 相关药物已经进入临床试验阶段,但 miRNA 是内源性的短链 RNA,因此理论上针对 miRNA 的治疗将比 siRNA 具有更高的安全性。

#### 4 结语

由于对乳腺癌的认识发生改变,其治疗模式也发生了变化。尽管局部的手术范围日趋保守,化疗、放疗、内分泌治疗及生物治疗等综合治疗的有效性使得乳腺癌的长期生存率不断提高,生活质量也不断改善,但总生存率仍然不理想。生物分子靶向治疗是一项十分有希望的治疗手段。寻找新的治疗靶点,正是目前研究的热点。miRNA 的发现及其乳腺癌相关靶基因的确定,初步揭示了其在乳腺癌发生和发展中的调控作用,为寻找乳腺癌生物治疗的新靶标提供了很有希望的方向。如上所述的,一种 miRNA 有多个相关的靶基因,如果以这些 miRNA 为治疗靶点,其效率可能远比针对单一的靶基因高。目前 miRNA 在乳腺癌的研究刚刚起步,对其功能及其靶基因的认识还不清楚。随着对 miRNA 研究的不断深入,miRNA 的干扰技术有可能成为治疗乳腺癌的一种新的手段。

【关键词】 MicroRNA; 乳腺癌

【中图法分类号】 R737.9 【文献标识码】 A

#### 参考文献

- [1] Lagos Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001, 294: 853 - 858.
- [2] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75: 843 - 854.
- [3] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, *et al.* The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403: 901 - 906.
- [4] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116: 281 - 297.
- [5] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, 120: 15 - 20.
- [6] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets *Hand2* during cardiogenesis. *Nature*, 2005, 436: 214 - 220.
- [7] Poy M N, Eliasson L, Krutzfeldt J, *et al.* A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*, 2004, 432: 226 - 230.
- [8] Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *mir15* and *mir16*

- at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99:15 524 – 15 529.
- [9] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, *et al.* Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 2006, 9:189 – 198.
- [10] Iorio M V, Ferracin M, Liu C G, *et al.* MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005, 65:7065 – 7070.
- [11] 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.
- [12] Blenkinson C, Goldstein L D, Thorne N P, *et al.* MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*, 2007, 8:R214.
- [13] Tavazoie S F, Alarcon C, Oskarsson T, *et al.* Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*, 2008, 451:147 – 152.
- [14] Volinia S, Calin GA, Liu C G, *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103:2257 – 2261.
- [15] Zhu S, Si M L, Wu H, *et al.* MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*, 2007, 282:14 328 – 14 336.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Kenealy M R, Flouriot G, Sonntag-Buck V, *et al.* The 3'-untranslated region of the human estrogen receptor alpha gene mediates rapid messenger ribonucleic acid turnover. *Endocrinology*, 2000, 141:2805 – 2813.
- [19] Adams B D, Furneaux H, White B A. The micro-ribonucleic acid (miRNA) mir-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ER alpha) and represses ER alpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Mol Endocrinol*, 2007, 21:1132 – 1147.
- [20] Ma L, Teruya Feldstein J, Weinberg R A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 2007, 449:682 – 688.
- [21] Cillo C, Cantile M, Faiella A, *et al.* Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol*, 2001, 188:161 – 169.
- [22] Carrio M, Arderiu G, Myers C, *et al.* Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model. *Cancer Res*, 2005, 65:7177 – 7185.
- [23] Scott G K, Goga A, Bhaumik D, *et al.* Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of microRNA mir-125a or mir-125b. *J Biol Chem*, 2007, 282:1479 – 1486.
- [24] Koscianska E, Baev V, Skreka K, *et al.* Prediction and preliminary validation of oncogene regulation by miRNAs. *BMC Mol Biol*, 2007, 8:79.
- [25] Lee Y S, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev*, 2007, 21:1025 – 1030.
- [26] Johnson S M, Grosshans H, Shingara J, *et al.* RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 2005, 120:635 – 647.
- [27] Yu F, Yao H, Zhu P, *et al.* let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, 2007, 131:1109 – 1123.
- [28] Si M L, Zhu S, Wu H, *et al.* mir-21-mediated tumor growth. *Oncogene*, 2007, 26:2799 – 2803.

(收稿日期:2008-03-05)

(本文编辑:陈莉)