

• 讲座 •

微小 RNAs 在乳腺癌中的应用价值

朱安婕 袁芃

乳腺癌是目前女性最常见的恶性肿瘤,2012 年全球共有 170 万乳腺癌新增病例,且乳腺癌的发病率和死亡率持续上升^[1]。肿瘤标志物在乳腺癌的早期诊断、个体化治疗、预后及疗效预测等方面发挥重要作用。目前常见的肿瘤标志物包括蛋白酶类、肿瘤特异性抗原、代谢产物等。然而,这些标志物特异性并不高,特别是在肿瘤早期筛查、良恶性肿瘤的区分和低度恶性肿瘤的诊断方面特异性较低^[2]。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类调控基因表达的非编码小分子 RNA,参与多种生物学信号通路的调节,组织或循环中 miRNA 的异常表达与乳腺癌密切相关。循环 miRNA 作为非侵袭性、实时监测的新型肿瘤标志物,在乳腺癌领域得到了广泛研究,可以作为分析肿瘤转移、预后判断、疗效评价和个体化治疗的有利依据。本文介绍 miRNA 与乳腺癌的相关性,并针对循环 miRNA 在乳腺癌的诊断、预后以及疗效评价方面的应用价值作一综述。

1 miRNA 概述

miRNA 是一类具有调控功能的内源性非编码小分子单链 RNA,其大小长约 17~25 个核苷酸,可在转录后水平通过与靶 mRNA 3'端的非翻译区(untranslated region, UTR)的完全或不完全碱基配对,引起靶 mRNA 的转录抑制及降解,对 mRNA 的表达进行调控。miRNA 是基因调控的一个不可或缺的层面,它可调控包括细胞分化、增生、细胞凋亡等细胞基本生命过程,并且参与肿瘤、心血管疾病等多种疾病的发生发展^[3]。

2 miRNA 与乳腺癌

近年来,细胞系、组织标本研究显示:miRNA 在乳腺癌中的作用包括促进/抑制肿瘤形成、促进肿瘤转移、对化疗效果的影响等。miRNA 在乳腺

癌中的表达为上调或下调,分别扮演癌基因或抑癌基因的角色,促进或抑制乳腺癌的发生、发展,也可对乳腺癌化疗耐药起到调控作用。

2.1 癌基因和抑癌基因

miRNA-21 在乳腺癌细胞侵袭和转移中扮演着癌基因的作用。miRNA-21 可通过抑制 PTEN 基因、程序性细胞死亡因子 4(programmed cell death protein 4, PDCD4)、原肌球蛋白-1(tropomyosin-1, TPM1)、乳腺丝氨酸蛋白酶抑制剂(maspain)等抑癌基因来促进肿瘤的发生和进展。Qian 等^[4]在对 344 例原发性乳腺癌患者的研究中发现,高水平 miRNA-21 与 DFS 缩短有关。同样作为癌基因的 miRNA 还有 miRNA-155、miRNA-27a、miRNA-17-5p 等。

miRNA 也可在乳腺癌中表达下调,表现为抑癌基因发挥作用,其表达减少与肿瘤发展和生长相关。Let-7 最早在线虫中被发现,Let-7 家族包括 let-7a、let-7b、let-7c、let-7d、let-7e、let-7f、let-7g、let-7i、miRNA-98 和 miRNA-202。Yu 等^[5]研究了 let-7 对乳腺肿瘤起始细胞(breast tumor-initiating cells, BT-IC)和非乳腺肿瘤起始细胞(non breast tumor-initiating cells, non-BT-IC)的自我更新、分化及致瘤性的影响,let-7 家族在 BT-IC 中明显减少,并且其含量随细胞分化程度增加而升高。Let-7 过表达可减少肿瘤扩散,在体外可减少 BT-IC 肿瘤干细胞的形成,同时在 NOD/SCID 小鼠中可减少肿瘤形成和转移。此外,miRNA-200 家族(miRNA-200a、miRNA-200b、miRNA-200c、miRNA-141 和 miRNA-429)、miRNA-205、miRNA-125a^[6]和 miRNA-145 等也被证实是乳腺癌抑癌基因。

2.2 转移驱动性

最先被证实的具有乳腺癌转移驱动性的 miRNA 是 miRNA-10。miRNA-10 家族包括 miRNA-10a 和 miRNA-10b,可调控 HOX 基因的转录,从而在癌症进展过程中发挥重要作用。Ma 等^[7]发现 miRNA-10b 在转移性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中高度表达,并且通过调控靶基因 HOXD10 致肿瘤

转移和侵袭。阻断 miRNA-10b 能够使 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力下降 90% 以上。因此, miRNA-10b 可以作为乳腺癌进展和转移的标志物。此外, miRNA-21、miRNA-155、miRNA-373 等也被证实与促进乳腺癌转移有关。

2.3 耐药机制

乳腺癌治疗面临的主要障碍之一就是化疗药物的耐药。对乳腺癌耐药株和敏感株的研究已证实了多种 miRNA 在乳腺癌化疗耐药中发挥调控作用。参与乳腺癌耐药的关键靶基因包括表达产物为 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 的多药耐药基因 1 (multidrug resistance 1, MDR1)、多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance-associated protein, MRPs)、乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistant protein, BCRP) 等。大量证据表明 miRNA 可靶向调控这些基因继而调控耐药。miRNA-415^[8] 和 miRNA-298^[9] 分别在多柔比星耐药和敏感 MCF-7、MDA-MB-231 细胞株中直接调控 MDR1 基因从而下调 P-gp 的合成, 继而增加多柔比星的细胞毒性。miRNA-326^[10]、miRNA-7 和 miRNA-345 等可通过调控 MRP1 基因继而调控乳腺癌耐药。

3 循环 miRNA 与乳腺癌

3.1 肿瘤循环 miRNA

miRNA 存在于多种体液中, 包括血浆、血清、尿液、唾液等。miRNA 在循环中高度稳定, 与 argonaute (AGO) 蛋白或高密度脂蛋白结合, 可耐受核糖核酸酶的活性、极端的 pH 环境和温度, 作为一种新型的、非侵袭性生物标志物获得了广泛关注^[3]。研究者们相继在前列腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌等患者中发现循环 miRNA 表达存在特异性变化。Mitchell 等^[3] 将人前列腺癌细胞接种到 NOD/SCID 免疫缺陷小鼠体内, 在小鼠血浆中检测到了源自人肿瘤细胞的 miRNA, 表明源自肿瘤的 miRNA 能够进入血液循环。随后选择了 miRNA-100、miRNA-125b、miRNA-141、miRNA-143、miRNA-205 和 miRNA-296 作为人前列腺癌候选标志物进行了深入研究, 对 25 例转移性前列腺癌和 25 名健康对照的血清进行检测, 结果显示 miRNA-141 在前列腺癌患者血浆中含量明显高于对照组, 并且与前列腺特异性抗原 (prostate-specific antigen, PSA) 的水平有一定相关性, 表明 miRNA-141 可以成为检测前列腺癌的循环标志物。

循环 miRNA 的来源尚不完全清楚: 肿瘤相关的 miRNA 可能是肿瘤细胞坏死和溶解时释放主

动分泌入血的, 或者存在于由肿瘤细胞分泌的外泌体 (exosome) 中, 继而释放入血^[3]。循环 miRNA 作为肿瘤标志物具有非侵袭性、高度稳定、灵敏度高等优点。但由于循环 miRNA 表达量相对较低, 需要开发灵敏度高、操作简便、成本低廉的检测方法。目前已经发展了多种有效的 miRNA 检测方法。其中, 实时定量 PCR (quantitative real-time PCR) 可以很精确地定量分析 miRNA 的表达, 是循环 miRNA 定量检测最常用的有效方法。

循环 miRNA 在癌症的诊断、预后、疗效预测等方面扮演着重要角色: 作为诊断标志物, 可检测无症状高危人群、识别早期肿瘤、鉴别良恶性疾病; 作为预后评价标志物, 可预测临床结局、无进展生存期 (progression-free survival, PFS) 和 OS、监测疾病复发; 作为疗效预测标志物, 可检测对治疗的敏感性以及耐药性等。

3.2 循环 miRNA 用于乳腺癌的早期诊断

近年来, 乳腺癌循环 miRNA 作为早期诊断乳腺癌的新型标志物, 已取得了一定的研究成果。Zhu 等^[11] 首次报道了血清 miRNA-155 水平在乳腺癌患者与健康女性间的区别, 并证实 PR 阳性患者血清中的 miRNA-155 表达比 PR 阴性患者高。Mar-Aguilar 等^[12] 分析了 61 例原发性乳腺癌患者和 10 例健康对照者血清中的 miRNA-10b、miRNA-21、miRNA-125b、miRNA-145、miRNA-155、miRNA-191 和 miRNA-382 水平, 其结果显示, 相较于对照组, 上述 miRNA 在乳腺癌患者的血清中明显升高; 并且 miRNA-145、miRNA-155 和 miRNA-382 的联用对于乳腺癌检测有更高的特异性。

此外, 随着对乳腺组织中异常表达的 miRNA 研究的深入, 以及 miRNA 在肿瘤发生过程中作用的认识, 越来越多的 miRNA 如 miRNA-21、miRNA-92a、miRNA-10b、miRNA-125b、miRNA-155、miRNA-191、miRNA-382、miRNA-30a 等加入了乳腺癌早期诊断的队伍。

3.3 循环 miRNA 诊断转移性乳腺癌

Roth 等^[13] 检测了 89 例乳腺癌患者血清中 miRNA-10b、miRNA-34a、miRNA-141 和 miRNA-155 的浓度, 其中原发癌 (M0) 59 例、转移癌 (M1) 30 例和健康对照 29 例, 原发癌组及转移癌组患者血清 miRNA-155 明显高于健康对照组; miRNA-10b、miRNA-34a、miRNA-155 水平的改变与患者乳腺癌显性转移明显相关, 提示 miRNA 与乳腺癌转移有明显相关性。Madhavan 等^[14] 证实血清

miRNA-141、miRNA-200a、miRNA-200b、miRNA-200c、miRNA-203、miRNA-210、miRNA-375、miRNA-801 可用于区分转移性乳腺癌患者。以上研究表明,miRNA 可以作为区别转移性乳腺癌与原发性乳腺癌或健康对照组的新型循环肿瘤标志物。

3.4 循环 miRNA 对转移性乳腺癌的预后评价

循环 miRNA 对于转移性乳腺癌预后评价的价值也在部分研究中得到了证实。Madhavan 等^[14]将 miRNA 和循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)做了对比,检测了 269 例转移性乳腺癌患者(其中 61 例为 CTC 阳性、72 例为 CTC 阴性、60 例为低 CTC 患者)和对照组(76 例健康对照)的血浆标本。结果表明,不管可否检测到 CTC,循环血浆中 miRNA-141、miRNA-200a、miRNA-200b、miRNA-200c、miRNA-203、miRNA-210、miRNA-375、miRNA-801 水平均可用以区别转移性乳腺癌患者,其中 miRNA-200b 还可作为区分 CTC 阳性或者阴性的最佳标志物。联合这些循环 miRNA 或者单以 miRNA-200b 作为预测 PFS 和 OS 的标志物,与 CTC 作为标志物的效果相当,甚至更优,但所得出的结论还需更大的样本量以及更长时间的随访来证实。Chen 等^[15]假设在转移性淋巴结组织中水平升高的 miRNA-10b 和 miRNA-373 两种 miRNA 可以在血清中检测到,并且可以直接评估乳腺癌患者的淋巴结情况。检测了 35 例有淋巴结转移的乳腺导管癌患者(N 期)、25 例无淋巴结转移的乳腺导管癌患者(N0 期)和 10 例健康志愿者。结果证实,有淋巴结转移的乳腺导管癌患者比无淋巴结转移的乳腺导管癌患者和健康志愿者血清中 miRNA-10b 和 miRNA-373 水平明显升高。二者联合的敏感性为 72%,特异性为 94.3%。综上所述,可以认为循环 miRNA-10b 和 miRNA-373 可以作为预测乳腺癌患者淋巴结情况的潜在标志物。

3.5 循环 miRNA 对乳腺癌的疗效评价

除了具有诊断和评价预后的价值外,循环 miRNA 与乳腺癌治疗效果以及耐药也有一定相关性。Wang 等^[16]研究认为在浸润性导管癌中血清 miRNA-125b 的高表达与化疗耐药有关;化疗前 miRNA-125b 高表达的患者,其手术病理标本中增殖细胞所占的百分比也较高。在体外实验中,miRNA-125b 过表达明显抑制抗肿瘤药物活性,并且可增加耐药性。Sun 等^[17]检测了 29 例非转移性乳腺癌患者在手术和辅助治疗后的血清

miRNA-155 水平。结果显示手术后有 90% (26 例) miRNA-155 水平下降,其中 79% (23 例) 表现为疾病稳定(stable disease, SD)或者缓解,而未检测到 CA15-3、CEA 等水平降低,提示 miRNA-155 比已有的循环肿瘤标志物对疾病的预测更加灵敏、准确。Wu 等^[18]检测了 42 名接受了新辅助化疗和手术的 II-III 期局部晚期乳腺癌或炎性乳腺癌患者,发现低 miRNA-375 水平和高 miRNA-122 水平与疾病复发明显相关,在 HER-2 阳性患者中与新辅助化疗抗药相关,并且 miRNA-122 水平的升高可特异性预测 II ~ III 期乳腺癌患者的转移复发。

以上研究提示循环 miRNA 不仅可作为诊断转移性乳腺癌的新型肿瘤标志物,其在评价预后以及疗效方面的作用亦不容小觑。但笔者认为现有研究大多存在样本量小、随访时间短、样本要求不同等缺陷,可能影响研究结论,因此尚需大规模有统一样本要求的研究加以验证。

4 结语

不同 miRNA 在乳腺癌肿瘤组织中可表达为上调或者下调,揭示了乳腺癌发生发展与 miRNA 表达之间存在着密切关联,其对基因的调控可能对疾病的发生、发展、转移和耐药产生重要影响。循环 miRNA 可作为乳腺癌早期诊断、预后评价及疗效预测的新型肿瘤标志物,但现有的循环 miRNA 研究均存在样本量小、随访时间短等不足,仍需进行较大规模前瞻性随机对照研究,并且应建立标准化样本制备程序,同时优化及统一检测方法等以提高检测的特异性。虽然乳腺癌循环 miRNA 的研究正处在初级阶段,但有理由相信循环 miRNA 可作为乳腺癌诊断、预后评估、疗效评价以及耐药预测的新型非侵入型生物标志物,在不久的将来投入临床应用。

【关键词】 乳腺肿瘤; 微 RNA

【中图法分类号】 R737.9

【文献标志码】 A

参 考 文 献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer [EB/OL]. [2014-02-14]. <http://globocan.iarc.fr>.
- [2] Hanash SM, Baik CS, Kallioniemi O. Emerging molecular biomarkers--blood-based strategies to detect and monitor cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2011, 8(3):142-150.
- [3] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection

- [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(30):10513-10518.
- [4] Qian B, Katsaros D, Lu L, et al. High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF-beta1 [J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 117(1):131-140.
- [5] 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.
- [6] Guo X, Wu Y, Hartley RS. MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer [J]. RNA Biol, 2009, 6(5):575-583.
- [7] 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.
- [8] Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(7):2152-2159.
- [9] Bao L, Hazari S, Mehra S, et al. Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298 [J]. Am J Pathol, 2012, 180(6):2490-2503.
- [10] Liang Z, Wu H, Xia J, et al. Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1 [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(6):814-824.
- [11] Zhu W, Qin W, Atasoy U, et al. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects [J]. BMC Res Notes, 2009, 2:89.
- [12] Mar-Aguilar F, Mendoza-Ramírez JA, Malagón-Santiago I, et al. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers [J]. Dis Markers, 2013, 34(3):163-169.
- [13] Roth C, Rack B, Müller V, et al. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer [J]. Breast Cancer Res, 2010, 12(6):R90.
- [14] Madhavan D, Zucknick M, Wallwiener M, et al. Circulating miRNAs as surrogate markers for circulating tumor cells and prognostic markers in metastatic breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(21):5972-5982.
- [15] Chen W, Cai F, Zhang B, et al. The level of circulating miRNA-10b and miRNA-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer: potential biomarkers [J]. Tumour Biol, 2013, 34(1):455-462.
- [16] Wang H, Tan G, Dong L, et al. Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer [J]. PLoS One, 2012, 7(4):e34210.
- [17] Sun Y, Wang M, Lin G, et al. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer [J]. PLoS One, 2012, 7(10):e47003.
- [18] Wu X, Somlo G, Yu Y, et al. De novo sequencing of circulating miRNAs identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer [J]. J Transl Med, 2012, 10:42.

(收稿日期:2014-04-22)

(本文编辑:刘军兰)

朱安婕,袁芃.微小 RNAs 在乳腺癌中的应用价值[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2014,8(3):211-214.

中华医学会