

MicroRNA 在肿瘤诊断、治疗中的应用

魏清筠^{1,2} 朱远源^{1,2} 彭 薇² 王 旻^{1△}

(1 中国药科大学生命科学与技术学院 江苏 南京 210009 2 百奥迈科生物技术有限公司 江苏 南通 226016)

摘要 MicroRNA(miRNA)是真核生物中一类内源性、长约 22 个核苷酸的非编码小分子 RNA,参与基因转录后水平调控。miRNA 的突变或者异常表达,与大多数癌症的发生发展有关,且与某些抗肿瘤药物疗效密切相关。因此,miRNA 在癌症的诊断、预后、治疗和指导肿瘤个体化用药方面具有一定的临床应用潜力,是肿瘤生物治疗领域的一个新亮点。本文即对 miRNA 在诊断和治疗肿瘤方面的应用现状作一综述。

关键词 microRNA 肿瘤 诊断 治疗

中图分类号 Q730.54 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)19-3794-04

Application of MicroRNA in Cancer Diagnosis and Therapy

WEI Qing-yun^{1,2}, ZHU Yuan-yuan^{1,2}, PENG Wei², WANG Min^{1△}

(1 Institute of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing, 210009, China;

2 Biomix Biotechnologies Co., Ltd, Nantong, 226016, China)

ABSTRACT: MicroRNA(miRNA) is a class of endogenous, small, noncoding RNAs, about 22 nucleotides in length, functioning as posttranscriptional gene regulators. miRNA mutation and abnormal expression were found to correlate with the initiation and progression of human cancers and therapeutic effects of some antitumor drugs as well. Hence, miRNA shows potential applications in cancer diagnosis, staging, prognosis and treatment, which make it a highlight in the field of tumor biological therapy. This review provides an overview of the application of miRNA in cancer diagnosis and therapy.

Key words: MicroRNA; Tumor; Diagnosis; Therapy

Chinese Library Classification(CLC): Q730.54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)19-3794-04

MicroRNA(miRNA)是内源性的、非编码的、长约 22 个核苷酸的单链 RNA,以转录后机制调控基因水平。近年来,其研究已经从基础研究迅速上升到临床研究,不仅成为肿瘤、心血管、免疫、炎症等疾病筛查的重要标记分子,而且研究证实 miRNA 参与癌基因激活和抑癌基因失活的调节,逐渐成为诸多癌症发生发展过程中的潜在分子标志,并有望用于癌症的治疗。

1 miRNA 的生物学特征

哺乳动物细胞中,miRNA 基因一般是由聚合酶 转录成初级产物(pri-miRNA),后被 RNase 内切酶 Drosha 识别、切割得到长度为 60-70 nt 茎环结构的中间体(pre-miRNA),接着被转运蛋白 Exportin-5 识别并结合,依赖 Ran-GTP 转运到胞质^[1]。在胞质中,另一种 RNase 内切酶 Dicer 识别 pre-miRNA 末端突出的结构,并剪切为双链,解旋后最终形成成熟的单链 miRNA,随后结合 RISC(RNA induced silencing complex, RNA 介导的沉默复合物)形成复合体。通过与靶 mRNA 的 3'UTR(Untranslated Regions, 非编码区)不完全互补结合来抑制 mRNA (messenger RNA, 信使 RNA)的翻译或是改变 mRNA 的稳定

性来抑制基因表达。最近有研究表明,某些 miRNA 也能结合靶基因的开放阅读框或 5'UTR,而发挥对基因表达的抑制^[2]甚至激活^[3]作用。

2 miRNA 与肿瘤的发生、发展

miRNA 的异常表达是包括肿瘤在内的多种疾病的特征,根据其在肿瘤发生发展过程中的作用可分为:原癌 miRNA (OncomiR)和抑癌 miRNA(TSmiR)(见表 1)。

OncomiR 的靶基因是抑癌基因,其过表达将导致肿瘤发生。在某些组织中或在生长发育的某些阶段,由于 miRNA 基因的启动子持续激活,miRNA 加工的效率增高,或其稳定性提高等原因导致某些 OncomiR 的表达增加,进而抑制其靶基因(抑癌基因)的表达,最终引起肿瘤形成。TSmiR 表达下降或者缺失,也将导致肿瘤形成。当 TSmiR 生物合成的步骤缺陷时,成熟 miRNA 水平下降,间接导致其靶蛋白水平升高。这些异常高表达的蛋白可能导致细胞过度增殖、侵入、凋亡抑制、不能正常分化,最终致使肿瘤的形成。

3 miRNA 作为肿瘤诊断及预后的生物标志物

miRNA 的表达具有显著的组织特异性以及肿瘤发生的阶段特异性,肿瘤在发生发展不同分期阶段具有不同的 miRNA 表达谱,因此 miRNA 在肿瘤的早期诊断、类型鉴别和预后方面具有潜在的应用价值,miRNA 表达谱可能成为临床诊断上一个强有力的工具。

作者简介 魏清筠(1987-)女,硕士研究生,主要研究方向为生物工程。电话:13701475946 E-mail:wei_joseay963@163.com

△通讯作者 王旻 教授,博士生导师。电话:025-83271395,

E-mail: minwang@cpu.edu.cn

(收稿日期 2011-03-16 接受日期:2011-04-10)

3.1 组织 miRNA 表达谱

利用人恶性肿瘤中 miRNA 表达谱鉴定出了许多癌症诊断和预测相关的信号。Lu 等^[5]检测了 334 例样本中 217 种人类 miRNA 的表达谱,成功区别正常细胞和癌细胞,并可对低分化肿瘤进行分类,提示 miRNA 表达谱可望用于癌症诊断、分期和对病人预后的预测。Yanaihara 等^[6]分析肺癌的 miRNA 表达谱发现其中 8 个 miRNA 和肺癌患者的预后密切相关,如高表达的 miR-155 和低表达的 let-7a-2 提示预后较差。

3.2 血清 miRNA 表达谱

相对肿瘤组织而言,外周血血清较易获得和检测,临床应

用便捷,且 miRNA 在血清中可长期稳定存在,因此,血清 miRNA 表达谱有可能成为一种癌症无创诊断的手段。最近已多次报道血清或血浆中游离 miRNA 是有价值的肿瘤监测指标,可用于肿瘤(乳腺癌、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌等)类型的鉴别^[7]。第一个发现的血清 miRNA 标志物是 miR-21^[8]。弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者的血清中 miR-21 水平很高,与不复发存活率的增高密切相关。血浆 miR-92^[9]已被成功用作结直肠癌的分子标志物,可以诊断 ~ 期的结直肠癌,灵敏度可达 89%,特异性达到 70%。

表 1 肿瘤中异常表达的 miRNA^[4]
Table 1 miRNA involved in cancer^[4]

MiRNA	异常表达	功能	癌症	靶基因	实验数据
miR-15a, miR-16-1	下调	TSmiR	慢性淋巴白血病、前列腺癌和垂体腺癌	Bcl-2, Mcl-1	体外过表达诱导白血病和前列腺癌细胞凋亡;小鼠体内沉默导致白血病
let-7a-2	下调	TSmiR	肺癌、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌和胃癌	KARS, CDK6, HMGA2	体外过表达阻滞细胞生长;小鼠体内过表达减少了乳腺癌和肺癌的负荷
miR-34 (a/b/c)	下调	TSmiR	结肠癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌和黑素瘤	CDK4, CCNE2, E2F3	体外过表达导致细胞周期的阻滞、凋亡和抑制细胞增殖
miR-26a	下调	TSmiR	肝癌	CCND2, CCNE2	恢复 miR-26a 水平抑制了 MYC 基因诱导的肝癌
miR-155	上调	OncomiR	肺癌、结肠癌、乳腺癌和淋巴瘤	SHIP1, CEBPB	体内淋巴细胞过表达导致小鼠前 B 淋巴瘤和白血病
miR-17-92	上调	OncomiR	肺癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、骨髓瘤	BIM, PTEN, CDKN1A 联合 MYC	引发淋巴瘤;小鼠淋巴细胞中过表达诱导淋巴增殖和自身免疫
miR-21	上调	OncomiR	胰腺癌、乳腺癌、胃癌、慢性淋巴白血病	PDCD4, PTEN, TPM1	体外沉默后乳腺癌、肺癌和肝癌细胞系的凋亡作用增强
miR-372/ miR373	上调	OncomiR	乳腺癌、睾丸生殖细胞肿瘤	LATS2	体外实验中和 p53 通路;体内过表达刺激癌细胞侵袭

4 miRNA 为靶标的治疗策略

越来越多的研究表明 miRNA 与大多数癌症的发生发展,以及某些抗肿瘤药物疗效密切相关,因此以 miRNA 为靶标治疗的目的是逆转疾病状态下异常表达的 miRNA,调控 miRNA 的表达水平和/或活性(见图 1)^[10],修正靶基因的调控紊乱现象。针对肿瘤中异常高表达的 OncomiR,设计小分子药物降低 miRNA 表达水平而发挥抑制肿瘤的作用;对于肿瘤中低表达的 TsmiR,模拟或增加 TsmiR 表达恢复组织中 miRNA 的正常含量及功能。

4.1 下调 OncomiR 水平

4.1.1 反义 miRNA 寡核苷酸 反义 miRNA 寡(脱氧)核苷酸(anti-miRNA oligonucleotides AMO,图 1 ①)是一种单链的 17-22 个核苷酸组成的序列^[11],通过碱基配对原则与目的 miRNA 相结合,竞争性拮抗 miRNA 与靶 mRNA 的相互作用,从而特异性抑制 miRNA 的功能。因未修饰的反义寡聚核苷酸链不稳定,在体内近乎无效,故 AMO 常伴有化学修饰,例如 2'-O-

甲基化^[12]、2'-O- 甲氧乙基化及锁核酸(locked nucleic acid, LNA)^[13]等,这些修饰的 AMO 均能有效的失活 miRNA。其中 LNA 是指核糖环的 2'- 氧和 4'- 碳通过亚甲基连接形成刚性结构的 RNA,它具有高稳定性、与靶标特异性结合的高亲和力以及体内低毒性的优势而尤为引人关注。

miR-21 在多种人类肿瘤中过表达,常作为 OncomiR 的代表性分子。抑制 miR-21 的 2'-O- 甲基化 AMO 转染乳腺癌 MCF-7 细胞^[14]后接种裸鼠,成瘤大小较对照组缩小了一半。神经胶质瘤细胞转染 LNA-antimiR-21(与 miR-21 互补的 LNA 修饰的 AMO)^[15]后,移植入裸鼠颅内,第四天与对照组相比肿瘤大小明显缩小。Stoffel 等^[16]研究人员将与胆固醇偶联的 AMO 注射进小鼠静脉后,随血液循环进入全身,降低了体内多种器官的 miRNA 表达水平。注射后第三天在小鼠体内检测不到靶向 miRNA,且在数周内都未检测到,说明修饰的 AMO 能较长时间内有效降低靶 miRNA 的水平,这种修饰的 AMO 有可能成为一种前景诱人的治疗药物。然而 AMO 抑制子如何下调 miRNA 活性的作用机制目前还不确定,可能通过与 pri- 或

pre-miRNA 相互作用阻断了 miRNA 生物合成过程,也可能与成熟 miRNA 紧密结合干扰其在 RISC 复合物中发挥作用。

4.1.2 其他新型抑制子 "miRNA 海绵体" (microRNAs sponges)、miRNA 屏蔽技术 (miRNA-masking antisense oligodeoxynucleotides) 以及其他小分子化合物等也是有效的 miRNA 抑制子。miRNA 海绵体(图 1 ②)是一条化学合成的单链 RNA^[17],通过互补结合多个 miRNA,阻滞内源 miRNA 与其靶 mRNA 的相互作用。其抑制效果可与 2'-O- 甲基化或 LNA 修饰的 AMO 媲美,而且一个七聚体的海绵体能够有效的抑制多个 miRNA。miRNA 屏蔽 DNA(图 1 ③)是一段与 miRNA 序列完全相同的 DNA 序列,结合靶 mRNA 形成二聚体的亲和力高于 miRNA,因此靶 mRNA 与屏蔽 DNA 优先结合,封闭了 miRNA 的结合位点,抑制了 miRNA 与靶 mRNA 的结合。在大鼠体内利用屏蔽 DNA 与心脏起搏通道编码基因 HCN2 及 HCN4 的 mRNA 互补^[18],解除了 miR-1 和 miR-133 对该基因表达的抑制作用,恢复了 HCN2 及 HCN4 加快心率的作用。某些小分子药物(图 1 ④)可能通过信号通路而调控 miRNA 编码基因的转录因子^[19],调控 miRNA 的表达、成熟及降解过程。

4.2 上调 TsmiR 水平

针对某些癌症中异常低表达的 miRNA,可采用替代疗法 (Replacement)恢复肿瘤细胞中 TsmiR 水平而重新激活细胞内通路达到治疗效果。目前替代疗法包括基因治疗手段和转染 miRNA 模拟物。基因治疗方法的原理是,利用质粒或病毒载体表达发卡结构的 pre-miRNA(图 1 ⑤),经 Dicer 切割后可长期稳定的表达成熟 miRNA。miRNA 模拟物(miRNA mimics)(图 1 ⑥)的使用较为广泛,商品化的 miRNA 模拟物是化学合成并经修饰(2'-O- 甲基化硫代磷脂修饰)的双链小 RNA,它能模拟内源性的活性 miRNA 分子,靶向特定 mRNA 发挥作用。通过脂质体或纳米粒聚合物进行体外转染或体内全身给药,均获得显著疗效。

有研究发现,非小细胞肺癌患者的术后预后差与 Dicer1 表达缺失有关^[20],说明异常的 miRNA 生物合成过程(图 1 ⑦)也与肿瘤发生有关,其机制可能是,参与 miRNA 生物合成过程的酶异常表达降低了肿瘤细胞中成熟 TsmiR 的水平。恢复这些关键酶的表达和活性,随之提高 TsmiR 生物合成效率,有可能成为未来肿瘤治疗的另一突破口。

5 miRNA 在肿瘤治疗中的应用

5.1 miRNA 药物研发现状

miRNA 药物受到众多生物医药公司的广泛关注,原因在于其拥有网络型的基因调控方式和组织特异性的靶向作用等优势。首先,miRNA 与靶 mRNA 不完全匹配而抑制翻译,可有效调控基因调控网络中多个靶基因。其次,miRNA 表达的肿瘤组织特异性将有效降低 miRNA 对正常组织、器官的副作用。已有数家公司相继加入 miRNA 药物研发。

Rosetta 公司是第一批 miRNA 研发公司,主要致力于 miRNA 相关的抗肿瘤药物研发。2010 年 10 月 Rosetta 报道^[21]抑制 miR-191 是一种治疗肝癌的有效方法。将原位移植肝癌细胞的小鼠分为实验组和对照组,腹腔内分别注射 miR-191 抑制物(ASO-MOE-191)和 AMO 阴性对照。两天给药一次,持续 40

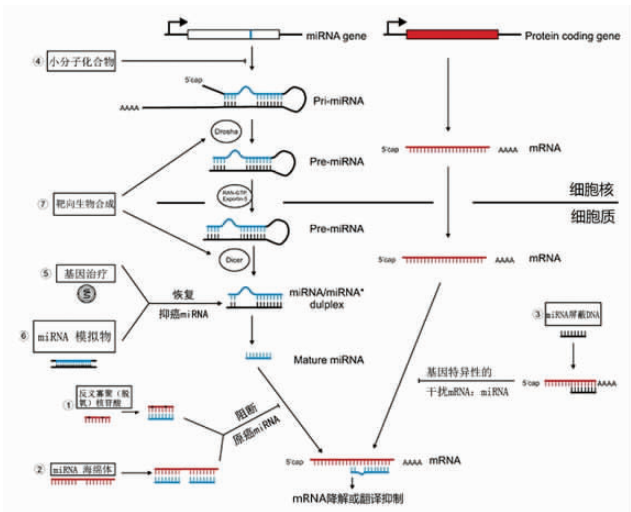


图 1 miRNA 治疗策略示意图[10]

Fig. 1 Schematic diagram of miRNA therapeutic strategies
①AMO,反义寡聚(脱氧)核苷酸;②miRNA 海绵体;③miRNA 屏蔽 DNA;④其他小分子化合物;⑤采用病毒传输系统的基因治疗;⑥ miRNA 模拟物;⑦靶向 miRNA 生物合成。
① AMO,Anti-miRNA oligonucleotides; ② miRNA sponges; ③ miRNA mask DNA; ④ small molecule inhibitor; ⑤ gene therapy using virus delivery; ⑥ miRNA mimic; ⑦ targeting miRNA biogenesis

天后发现实验组的移植瘤肿块明显缩小,并检测到内源性 miR-191 的含量以及增殖标志 Ki67 均显著下降。实验还利用荧光素酶报告载体系统证明,miR-191 抑制物通过上调 SOX4 等基因导致 TGF-β 及 MAPK 信号通路的阻滞而发挥作用。

美国 Mirna Therapeutics 公司 2010 年发表了有关 TsmiR 的替代疗法治疗非小细胞肺癌的临床前实验数据^[22]。将脂质纳米粒与 miR-34a 模拟物(miR-Rx34)的制剂 100 μg,分别经尾静脉和瘤内注射入荷瘤小鼠,均能有效抑制肿瘤生长及诱导肿瘤凋亡,另外发现尾静脉注射后瘤块更小。进一步的研究说明,全身给药仅需极少剂量(20 μg)即可达到治疗效果,且不会引起机体免疫应答。实验还证明肿瘤组织内 miR-34 的蓄积,直接下调了靶基因 c-Met、Bcl-2 和 CDK4 的蛋白水平。

目前,miRNA 类药物也有进入临床的范例^[23],由丹麦制药公司 Santaris Pharma 研发的 miravirsin (一种靶向抑制 miR-122 的 LNA 化合物)于 2008 年进入 I 期临床实验治疗丙型肝炎病毒感染患者,并于 2010 年 9 月推入了 II 期临床试验。这是世界上首个在人体中试验的 microRNA 药物,证实了 miRNA 药物用于临床的可能性。不难想象,相关抗肿瘤 miRNA 类药物在临床上的使用亦日益临近。

5.2 miRNA 与传统药物联用

越来越多的证据表明肿瘤细胞对抗肿瘤药物的敏感性也受 miRNA 的影响。2009 年中山医院研究人员^[24]发现干扰素辅助治疗不能改变 miR-26 高表达的患者的预后,但 miR-26 表达水平低的人使用干扰素后 5 年生存率由 30 %左右提高到 65 %左右。Meng 等^[25]研究胆管癌细胞株发现降低 miR-21 水平将增强吉西他滨的抗肿瘤作用。转染 miR-21 前体增加 miR-21 的水平,可显著降低吉西他滨的药效,而转染 anti-miR-21 抑制

miR-21 的表达,则显著增加了药物的药效。以上研究表明,将抗肿瘤的 miRNA 疗法与传统化疗有效的结合,可望提高治疗效率,改善预后情况,同时降低化疗药物的不良反应。

6 结论与展望

由此可见,miRNA 作为人类疾病的生物标志物、决定因素和治疗靶点有较好的应用前景。然而,miRNA 和反义 miRNA 药物正处于临床前研究阶段,目前面临与其他核酸治疗药物类似的难题,miRNA 药物稳定性差,传输系统靶向病灶的效率较低并且易引起机体的毒性反应等。因此,研发高效低毒的传输系统和体内半衰期更长和效率更高的优良 miRNA 模拟物和抑制物,是基础研究走向临床应用道路上的重要一步。相信随着对 miRNA 的深入研究,miRNA 作为靶标应用于肿瘤的临床治疗,将为人类攻克肿瘤带来新的曙光。随着 miRNA 表达谱的建立,其与基因图谱的完美结合,将有助于临床个体化用药的实现和指导。

参考文献(References)

- [1] Gregory RI, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(9): 3509-3512
- [2] Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5'UTR as in the 3'UTR[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 9667-9672
- [3] Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation [J]. Mol Cell, 2008, 30(4): 460-471
- [4] Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges [J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9 (10): 775-789
- [5] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435(7043): 834-838
- [6] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis [J]. Cancer Cell, 2006, 9(3): 189-198
- [7] Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer [J]. Curr Opin Pharmacol, 2010, 10 (5): 543-550
- [8] Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. Br J Haematol, 2008, 141(5): 672-675
- [9] Ng EK, Chong WW, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening[J]. Gut, 2009, 58(10): 1375-1381
- [10] Li C, Feng Y, Coukos G, et al. Therapeutic microRNA strategies in human cancer[J]. AAPS J, 2009, 11(4): 747-757
- [11] Weiler J, Hunziker J, Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease[J]? Gene Ther, 2006, 13(6): 496-502
- [12] Yang ZY, Vilkaitis G, Yu B, et al. Approaches for studying MicroRNA and small interfering RNA methylation in vitro and in vivo [J]. Methods Enzymol, 2007, 427: 139-154
- [13] Ørom UA, Kauppinen S, Lund AH. LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function[J]. Gene, 2006, 10 (372): 137-141
- [14] Si ML, Zhu S, Wu H, et al. miR-21-mediated tumor growth[J]. Oncogene, 2007, 26(19): 2799-2803
- [15] Corsten MF, Miranda R, Kasmieh R, et al. MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas[J]. Cancer Res, 2007, 67(19): 8994-9000
- [16] Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'[J]. Nature, 2005, 438(7068): 685-689
- [17] Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells [J]. Nat Methods, 2007, 4(9): 721-726
- [18] Xiao J, Yang B, Lin H, et al. Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 [J]. J Cell Physiol, 2007, 212(2): 285-292
- [19] Gumireddy K, Young DD, Xiong X, et al. Small-molecule inhibitors of microRNA miR-21 function [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2008, 47 (39): 7482-7484
- [20] Karube Y, Tanaka H, Osada H, et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients [J]. Cancer Sci, 2005, 96(2): 111-115
- [21] Elyakim E, Sitbon E, Faerman A, et al. hsa-miR-191 is a candidate oncogene target for hepatocellular carcinoma therapy[J]. Cancer Res, 2010, 70(20): 8077-8087
- [22] Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, et al. Development of a Lung Cancer Therapeutic Based on the Tumor Suppressor MicroRNA-34 [J]. Cancer Res, 2010, 70(14): 5923-5930
- [23] Seto AG. The road toward microRNA therapeutics [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(8): 1298-1305
- [24] Ji J, Shi J, Budhu A, et al. MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer [J]. N Engl J Med, 2009, 361(5): 1437-1447
- [25] Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines[J]. Gastroenterology, 2006, 130(7): 2113-2129