

miRNA与食管癌

孙茗,王立东

(河南省食管癌重点开放实验室,河南 郑州 450052)

关键词: miRNA;肿瘤;癌基因;抑癌基因;食管癌

中图分类号: R735.1 文献标识码: A 文章编号: 1673-5412(2009)03-0272-03

miRNAs(miRNAs)是一个长度为21~25个核苷酸非编码的小RNA大家族,人类基因组编码了超过1000个miRNA^[1],通过干扰mRNA的翻译而下调靶基因的表达。生物信息学数据表明^[2],miRNA几乎参与体内所有的基本的信号传导途径,包括许多重要肿瘤相关基因的表达。有研究显示:miRNA可发挥癌基因或抑癌基因的作用,从而调节人类近1/3的基因表达。研究表明,miRNA表达失调与肿瘤发生密切相关,并已成功利用miRNA对肿瘤进行诊断、分期与生物治疗。而食管癌是世界上最常见的6大恶性肿瘤之一,在我国其死亡率居恶性肿瘤的第4位(17.38/10⁵)。目前,其临床治疗仍以手术、放疗及化疗等综合治疗为主,而在已经对后基因组计划进行研究的今天,已较成功的在分子水平上确认食管癌的致病基因^[3],而如何对其进行基因治疗仍是一大难题。本文就近年有关miRNA的产生、作用机制、与肿瘤的关系、检测方法及其在食管癌的诊断、分期和生物治疗方面的潜在作用做一简要综述。

1 miRNA的研究现状

1.1 miRNA的特点 miRNA作为一种新的基因表达调控因子,与以往各类小RNA及蛋白质酶相比,无论是产生还是作用机制上,都有其独到的特点。绝大多数人类的miRNA位于编码蛋白质或非编码蛋白质mRNA的内含子区域,还有一部分miRNA的基因位于基因组的转录本之间。其合成过程较为复杂,包括5个重要步骤和5个关键的蛋白质酶,RNA转录酶(Pol)完成miRNA的转录;2种RNase——Drasha和Dicer,分别在细胞核内和细胞质中完成miRNA的转化和修饰,并且Drasha在细胞核内作用需

辅助因子Pasha(即DGCR)联合作用;依赖Ran-GTP的转运蛋白Exportin-5将miRNA的前体pre-miRNA由核内转移至胞质中,以及RNA沉默复合体(RISC)中的Argonaute蛋白质家族,在miRNA结合至RISC中发挥重要作用。miRNA基因的突变,易位或丢失,以及生物合成过程中的任一环节的异常都会导致miRNA表达水平的改变。

miRNA双链结构进入RISC后,一条链形成成熟有功能的miRNA并在RISC中行使作用,另一条链被降解。miRNA通过其5'端识别并结合靶mRNA,miRNA5'端的错配会导致miRNA对靶mRNA调节功能丧失。正确配对后,因配对程度不同而采取2种不同的作用机制。miRNA与mRNA完全或近似完全配对时,会引起靶mRNA的降解,从而抑制其翻译,这个过程类似于siRNA介导的基因沉默(RNAi),其结合位点在靶mRNA的开放阅读框,这种机制多见于植物中。另一种机制是通过与靶mRNA的不完全互补来实现,动物中多采用这一方式。在此路径中,miRNA结合到mRNA的3'端非翻译区,以前观点认为不影响mRNA的稳定性,只是在转录后水平上抑制功能蛋白质的合成,但最近研究显示,以miR-125b和let-7为代表的miRNAs亦可在此路径中引起mRNA快速脱腺苷酸化而降解,并不可逆转。是否存在其他机制有待进一步研究。

1.2 miRNA的检测方法 自1993年首次发现miRNA以来,其检测方法日新月异,但大体都可分为4步:靶RNA的标记,DNA-DNA杂交、染色、信号分析。最初的miRNA是随着分离和克隆细胞内小分子RNA而获得的。随后则依靠Northern blot杂交技术来检测miRNA,即用直接克隆法建立一个miRNA的cDNA文库,然后与基因组数据库中BLAST比对,再用Northern印迹法来确认。但这种方法只适合于那些在细胞内常表达,高丰度的miRNA基因,而对于那些丰度低,在特定阶段和特定组织才表达的miRNA则需要另一种方法-生物信息学技术,总结已知的miRNA的特征,用计算机对基因组序列进行搜索,找出表达的miRNA。随后,研究者将目光转到了miRNA的前体而发明了一

基金项目:国家自然科学基金(编号:30025016)

河南省医学创新人才工程项目(编号:200084)

作者简介:孙茗(1983-),硕士,主要从事食管癌和贲门癌变机制和防治的研究。E-mail: auro0911@yahoo.com.cn

通讯作者:王立东(1958-),男,教授,博士生导师,主要从事食管癌和贲门癌变机制和防治研究。E-mail: ldwang@zzu.edu.cn



种新的方法, Schmittgen等^[4]首次用定量 RT-PCR来检测 miRNA 前体, Lee等^[5]用 RT-PCR 检测 miRNA 前体的方法确定在胰管癌中 miR-221、miR-376a和 miR-301 显著高表达。Chen等^[6]则用定量 RT-PCR 检测活性 miRNA 表达谱。

随着芯片技术的发展, miRNA 表达谱芯片问世。Liu等^[7]首次报道了用 1 个含有 200 多个寡聚核苷酸的微排列芯片来检测 miRNA 序列, 随后, miRNA 芯片技术成为分析肿瘤特异性的 miRNA 表达水平的最常用的高通量技术。Calin等^[8]用金银芯片技术首次证实了 miRNA miR-15a 与 miR-16-1 在慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 的类似癌基因作用。He 等证实 miR-17-92 基因簇在诸多淋巴瘤中高表达, 并与癌基因 c-myc 有协同作用^[9-10]。Volinia等^[11]发现 miR-21 在 6 种实体瘤中高表达。

2005 年, Lu 等^[12]发明了 1 种具有高度特异性磁珠流式细胞技术, 系统地分析了 334 种淋巴瘤和实体瘤中 miRNA 的表达谱, 并开创性认为 miRNA 水平可用于肿瘤的诊断和分期。Vinther 等^[13]则发明 1 种稳定同位素标记核酸细胞培养 (SLAC) 研究了稀拉细胞中的 504 个 miRNAs, 其中 12 种 miRNAs 显示出被 miR-1 抑制, 从而在蛋白质水平证实了 miR-1 的抑癌功能。

Lawrie 等^[14]报道 miRNAs 在淋巴瘤患者血清中检测到峰值。Mitchell 等^[15]使用 qRT-PCR 技术在前列腺癌患者血清中检测到 miR-141, 进一步证明了 miRNA 可作为检测肿瘤类型的循环系统分子标志。增加了 miRNA 表达谱作为临床诊断指标的可能性。

2 miRNA 与食管癌

食管癌变是多种因素综合作用, 多基因变化先后积累或叠加形成的。研究证实, 其发生与 Rb、p53 等抑癌基因失活, 以及环境等多因素使原癌基因 H-ras、c-myc 和 hsl-1 等激活有关, 最近又在食管鳞状细胞癌中发现了一种新的癌基因 GAEC1^[16]。而 miRNA 作为继蛋白质之后又一高效的基因表达调控因子, 并已证实多种肿瘤的发生发展中有重要作用。

Guo 等^[17]通过 miRNA 芯片技术首次探测到了冰冻食管癌组织中的 miRNA 表达情况, 结果显示: 46 种 miRNA 在食管癌组织中的表达明显区别于癌旁正常组织, 至少 7 种一组可以区分恶性病变和正常食管癌组织, 3 种 (hsa-miR-25、hsa-miR-424、hsa-miR-151) 在癌组织中明显高于正常组织, 4 种 (hsa-miR-100、hsa-miR-99a、hsa-miR-29c、mmu-miR-140) 在癌组织中则低于正常组织。hsa-miR-335、hsa-miR-181d、hsa-miR-25、hsa-miR-7 and hsa-miR-495 与食管癌的大

体分型有关, hsa-miR-25 和 hsa-miR-130b 与肿瘤的分化程度有关。通过单因素分析和多因素分析, hsa-miR-103/107 的高表达提示食管癌生存率不佳。研究未发现 miRNA 的表达与抽烟、喝酒等食管癌发病的危险因素有关。miRNA 的表达与年龄也无明确关联。这些结果均表明 miRNA 表达谱分析在食管癌诊断和预后起到很重要的作用, 而且将来很可能只使用如 RT-PCR 等经济方便的手段就可以实现。

Feber 等^[18]研究发现: miR-194、miR-192 和 miR-200c 在食管腺癌中表达较食管鳞癌显著增高。miR-21、miR-205、miR-203 和 miR-93 则在肿瘤和正常组织中表达有显著差异。他们认为: Barrett's 食管与食管腺癌不同的 miRNA 表达谱可完善增生性病变的分子分类、Barrett's 食管和 DYS 生物学认识以及促进特异性标志的发现。miRNA 表达谱可在组织学上鉴别食管肿瘤组织, 并可区分正常组织和肿瘤。还可提示 BE 患者病情的转归, 作为 BE 患者早期治疗、高危预警的指标。

研究发现, 同一个 miRNA 在对某一基因调控时, 可通过参与不同的信号路径, 或同一信号路径的不同环节来完成, 即在不同种类的肿瘤中对靶基因的调节方式有很大差异, 这种高度的特异性有利于基因治疗。同时, 肿瘤治疗失败的最大原因在于其转移性, 而之前的研究尚未探讨 miRNA 在此过程中的作用。食管癌的特殊生理位置, 使其转移后果更严重。有研究表明, 在食管肿瘤的转移中有重要基因参与。当食管癌确诊时, 往往已经转移。

目前, 最常用的治疗方法就是 RNAi, RNAi 是一种强有力的基因沉默工具, 由内源或外源性的双链 RNA (dsRNA) 导入细胞, 经核酸酶如 Dicer 剪切成 siRNA, 与特异性的核酸内切酶、核酸外切酶、解旋酶等形成 RISC 引起同源的 mRNA 降解, 从而抑制相应的基因表达。在肿瘤组织中, 如 miRNA 是发挥癌基因的作用, 则通过使异常 miRNA 沉默使抑癌基因表达恢复正常, 如 miRNA 相当于抑癌基因, 则通过干扰癌基因的表达而达到治疗目的。此外, 还可使用药物治疗, 在非小细胞肺癌中以及小鼠胚胎干细胞研究中发现^[19-20], Dicer 水平明显降低, 使具有抑癌基因作用的 miRNA 表达下调。我们可通过人工合成的 Dicer 类似物对其进行治疗。还有反义核酸技术, 能有效灭活有致病性的靶 miRNA。用病毒载体向癌变细胞内引入有抑癌作用的 miRNA 等方法。由此可见, miRNA 在食管癌治疗中具有潜在的作用。但是, 目前国内尚无此方面的报道。

3 miRNA 与其他肿瘤

在对头颈部鳞状细胞癌的研究中发现, 在癌细胞

中 HMGA2 的表达与细胞对拓扑异构酶抑制物的化学敏感性相关,并受到 miR-98 的抑制性调节,进而提示 miR-98 的抑癌功能^[21]。这也说明一个 mRNA 可有多个 miRNA 调节。

另外,在肺癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌和女性生殖系统肿瘤组织中检测到 miRNA 表达谱均与癌旁正常组织有显著差异^[11,22]。新近研究显示,miR-21 通过直接下调抑癌基因 topomysin 1 (TPM1) 而发挥作用^[23]。Voorhoeve 等^[24]在睾丸干细胞肿瘤的研究中发现,miR-372 和 miR-373 有癌基因的作用,具体机制尚待研究。

综上所述,我们认为在今后的研究中需要注意以下几个方面的问题:首先,确定食管癌发生发展过程中特异性的 miRNA 的靶基因,及其调控机制,为进一步诊断和治疗打下基础。其次,探讨 miRNA 在食管癌的转移中是否有作用,程度如何,能否指导治疗。结合食管癌的发病及转移特点建立相应的基因治疗模式,并从实验室逐渐向临床应用过渡,最终建立起方便、快捷、低成本的 miRNA 检测和治疗手段。真正实现食管癌的早期诊断、早期治疗,降低死亡率。

参考文献:

- [1] Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, et al Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units[J]. *Genome Res*, 2004, 14(10A): 1902 - 1910.
- [2] Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease[J]. *Development*, 2005, 132(21): 4653 - 4662.
- [3] Bonde P, Sui G, Dhara S, et al Cytogenetic characterization and gene expression profiling in the rat reflux-induced esophageal tumor model[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 133(3): 763 - 769.
- [4] Schmittgen TD, Jiang J, Liu Q, et al A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(4): e43.
- [5] Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, et al Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer[J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(5): 1046 - 1054.
- [6] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al Realtime quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(21): e183.
- [7] Liu CG, Calin GA, Melbon B, et al An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(26): 9740 - 9744.
- [8] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(24): 15524 - 15529.
- [9] He L, Thomson JM, Hemann MT, et al A microRNA polycistron as a potential human oncogene[J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 828 - 833.
- [10] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, et al c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression[J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 839 - 843.
- [11] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(7): 2257 - 2261.
- [12] Lu J, Getz G, Miska EA, et al MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834 - 838.
- [13] Vinther J, Hedegaard MM, Gardner PP, et al Identification of miRNA targets with stable isotope labeling by amino acids in cell culture[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(16): e107.
- [14] Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al Detection of elevated levels of tumor-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Br J Haematol*, 2008, 141(5): 672 - 675.
- [15] 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.
- [16] Law FB, Chen YW, Wong KY, et al Identification of a novel tumor transforming gene GAEC1 at 7q22 which encodes a nuclear protein and is frequently amplified and overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2007, 26(40): 5877 - 5888.
- [17] Guo Y, Chen Z, Zhang L, et al Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(1): 26 - 34.
- [18] Feber A, Xi L, Luketich JD, et al MicroRNA expression profiles of esophageal cancer[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, 135(2): 255 - 260.
- [19] Hammond SM. MicroRNA therapeutics: a new niche for antisense nucleic acids[J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12(3): 99 - 101.
- [20] Schmitter D, Filkowski J, Sewer A, et al Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(17): 4801 - 4815.
- [21] Hebert C, Norris K, Scheper MA, et al High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2007, 6: 5.
- [22] Adams BD, Fumeaux H, White BA. The microribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines[J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(5): 1132 - 1147.
- [23] Zhu S, SiML, Wu H, et al MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene topomysin 1 (TPM1) [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(19): 14328 - 14336.
- [24] Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, et al A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors[J]. *Cell*, 2006, 124(6): 1169 - 1181.

(收稿日期: 2009 - 02 - 17)