

[文章编号] 1007-385X(2006)03-0159-03

· 专家论坛 ·

miRNA 在肿瘤诊断与生物治疗中的潜在应用

Potential application of miRNA on cancer diagnosis and biotherapy

张亮(生物芯片北京国家工程研究中心,博奥生物有限公司,北京 102206)



[作者简介] 张亮,湖南益阳人,现任生物芯片北京国家工程研究中心暨博奥生物有限公司微阵列服务部高级主任,资深研究科学家。1993年在湖南师范大学获生物学学士学位,1996年在中科院武汉病毒研究所获微生物生物化学专业硕士学位,2003年在清华大学生物科学与技术系获生物物理学专业博士学位。长期从事生物芯片技术的研究,与国内外研究单位合作在《Plant Cell》、《Nature Biotechnology》等刊物上发表了多篇与生物芯片技术相关的文章,并主持翻译了生物芯片之父 Mark Schena 编写的《生物芯片分析》一书。申请欧洲与美国专利共2项,中国专利1项。目前参与863课题3项、973课题1项的研究工作。

尽管早在1993年就有科学家发现线虫细胞能产生非编码的miRNA(MicroRNA)并具有调控蛋白翻译的功能^[1-2],但直到21世纪初期,miRNA的重要性才引起广大生物医学工作者的注意^[3-5],并在随后的几年里成为生命科学领域的研究热点^[6-7]。miRNA在2002年和2003年连续两年被《Science》杂志评选为十大科技新闻。研究发现,miRNA表达与动植物的组织器官发育、细胞生长分化和凋亡、脂肪代谢等生命活动过程密切相关;miRNA表达失控将导致重大疾病,例如肿瘤的发生。本文着重介绍miRNA的发生过程,miRNA在肿瘤发生和治疗方面的研究现状,并展望miRNA在肿瘤治疗方面的应用前景,以期引起生物医学工作者对miRNA在肿瘤生物治疗方面潜在应用价值的重视。

1 miRNA 的发生过程

大多数miRNA是由基因间DNA序列编码的,转录方向与相邻的基因往往相反,被认为是与基因表达不同的独立单位。基因组DNA在RNA聚合酶II的作用下产生原始miRNA转录本(primary transcripts, Pri-miRNA)。Pri-miRNA在5'端具有甲基化的鸟嘌呤,而3'端具有多聚腺嘌呤碱基^[8-9]。了解得较多的Pri-miRNA是Pri-23a~27a~24-2,它是一段含有三个miRNA的Pri-miRNA,有2.2 kb长。在这个Pri-miRNA对应的基因组DNA上已经找到一段约600 bp的被RNA聚合酶II识别的启动子序列。关于能触发Pri-miRNA产生的启动子序列尚不清楚。

另外一类miRNA是位于基因的内含子中,并会随着信使RNA(mRNA)转录,包含在mRNA的前体中。这一类miRNA的转录方向是和对应的mRNA转录方向一致的,因此一般认为此类miRNA的表达和对应的mRNA一样,具有组织特异性。

Pri-miRNA在细胞核内被一种称为“Drosha”的RNA内切酶III进行处理。Drosha在细胞核中不对称地对Pri-miRNA的茎环结构附近的碱基进行切割,能产生60~70 nt的miRNA前体,miRNA前体5'端带有磷酸基团,3'端带有突出的2个核苷酸。miRNA前体被Exportin-5蛋白以分解GTP能量的方式运输到细胞质中;一旦miRNA前体被运送到细胞质中,第二种RNA内切酶III,称为Dicer,能识别miRNA前体3'端突出的2个核苷酸,从miRNA前体上切下22个碱基长度的双链RNA,此双链RNA的5'端也带有磷酸基团,3'端带有突出的2个核苷酸;其中一条链容易插入到一个被称为RNA诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)中,从而调节基因的表达。

最近报道^[10],miRNA发生过程中,在细胞核内的Pri-miRNA转变为miRNA前体这一步骤中,除了Drosha这种RNA内切酶III,还有分子量较小(相对分子质量约为600 000)的双链RNA可吸附蛋白——DGCR8的参与;通常把Drosha-DGCR8复合蛋白称为Pri-miRNA的微处理器(microprocessor)。对DGCR8的研究结果显示,DGCR8是由染色体22q11.2的一个基因编码,对miRNA在发育过程中有重要调节作用,提示遗传性疾病DiGeorge综合征与DGCR8基因的突变有关。

miRNA的发生过程可简要归结如图1。目前估计人的基因组编码了超过1 000个miRNA,而在人所有基因中,有超过5 000个受到了miRNA的调控^[11-12]。

2 miRNA 与肿瘤发生的关系

由于miRNA对基因表达或者蛋白翻译具有重要的调控作用,因此miRNA和肿瘤的发生有密切的联系。研究^[13]表明,miRNA的表达水平在许多肿瘤中发生改变,它们可能起到原癌基因和抑癌基因的作用。

miRNA 芯片技术日益成熟且有通量高、操作简便等优势,2004 年起广泛地用于 miRNA 表达水平的检测,此前的检测多依靠 Northern Blot 杂交技术。第一个证实 miRNA 与肿瘤相关的研究^[14-16]是在慢性淋巴细胞白血病(CLL)中, CLL 病人的基因组 DNA 在染色体 13q14 区域常常发生缺失,而一组 miRNA, miR-15a ~ miR-16 族正好位于这个区域。在 50% ~ 60% 的 CLL 患者中, miR-15 和 miR-16 表达下调或缺失,可以推测它们可能扮演肿瘤抑制基因的角色。Yanaihara 等^[17]利用 miRNA 芯片技术通过比较 104 例肺癌组织和对应的非癌组织,发现有 43 个 miRNA 是在癌组织和非癌组织中显著差异表达的,并且其中 8 个 miRNA 的表达情况是和肿瘤患者的预后密切相关的。Michael 等^[18]发现 miR-143 和 miR-145 在结肠癌形成期和癌旁组织中表达水平下降。He 等^[19]发现, miR-17-92 族在许多恶性淋巴瘤中出现高表达,且在小鼠模型中能促进 c-myc 基因表达。Iorio 等^[20]研究了乳腺癌中 miRNA 表达谱,发现正常乳腺组织和乳腺癌组织中 miRNA 的表达不同,可以通过检测 miR-125b、miR-145、miR-21 和 miR-155 的表达区分出正常组织和癌组织。

合起来可以更好地了解 mRNA 和 miRNA 整体的表达情况,以及 miRNA 在特定的生命活动中对靶 mRNA 的调控作用。Lim 等^[21]采用基因表达谱芯片研究了 miRNA 表达对 mRNA 表达的影响,发现 miRNA 可以下调其靶 mRNA 的表达水平。He 等^[22]结合 miRNA 和基因表达谱芯片技术,发现在甲状腺瘤中,高表达的 miRNA 导致他们的靶基因 mRNA 表达水平下调。Lu 等^[23]发现含有 200 多个 miRNA 探针的 miRNA 磁珠芯片得到的信息就能准确地对肿瘤进行分型,并且精确度超过了含有 1.6 万个基因的表达谱芯片,此研究开创性地提出了 miRNA 可用于肿瘤的诊断和分类。在最近发表的文献中,Volinia 等^[24]利用 miRNA 芯片对 6 种实体瘤中表达共同上调的 miRNA 进行了筛选,尝试寻找能对肿瘤发生进程进行预测的 miRNA,以期作为新的肿瘤分子标记物。

3 miRNA 在肿瘤生物治疗中的潜在应用

若 miRNA 的靶基因是癌基因,此 miRNA 的表达低于正常水平,也意味着它对癌基因的抑制作用减小,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,也意味着它对抑癌基因的抑制作用增加,引起抑癌基因编码的蛋白减少,也会导致肿瘤发生。从这种意义上理解,一些 miRNA 可能是潜在的癌基因或者抑癌基因,通过寻找具有癌基因和抑癌基因性质的 miRNA,可以为肿瘤的诊断和生物治疗提供新的靶标。

从基因表达应用于肿瘤诊断和治疗的发展历史来看,比较成功的例子是荷兰肿瘤研究所 van de Vijver 博士及其同事们的工作^[25-26],他们先用全基因表达谱对具有临床记录 5 年以上的大量乳腺癌组织样品进行分析,从中筛选出 70 个基因对乳腺癌的愈后归属作出精确的判断(灵敏度达到 93%,特异性达到 53%)。此研究成果已经应用于临床检测,为乳腺癌患者的临床治疗提供依据。在基因水平上对肿瘤进行生物治疗,思路集中在先找到和肿瘤发生具有密切关系的基因,即肿瘤分子标记物,然后通过药物治疗、RNAi 干扰、反义 RNA 导入等基因治疗方法,使失常的基因表达或者蛋白水平回复到正常水平。但在基因水平,与肿瘤相关的编码基因目前知道的已超过 2 000 个,寻找作为肿瘤生物治疗特异而高效的靶基因还相对困难。由于 miRNA 是基因表达和蛋白翻译过程中的调节分子,在肿瘤的发生过程中起到调控的枢纽作用,因此已经有专家预测,把 miRNA 作为肿瘤生物治疗的靶分子将比编码基因作为靶分子更加有效^[27]。基于以上认识,国际上一些研究机构正在积极寻找能作为肿瘤生物治疗

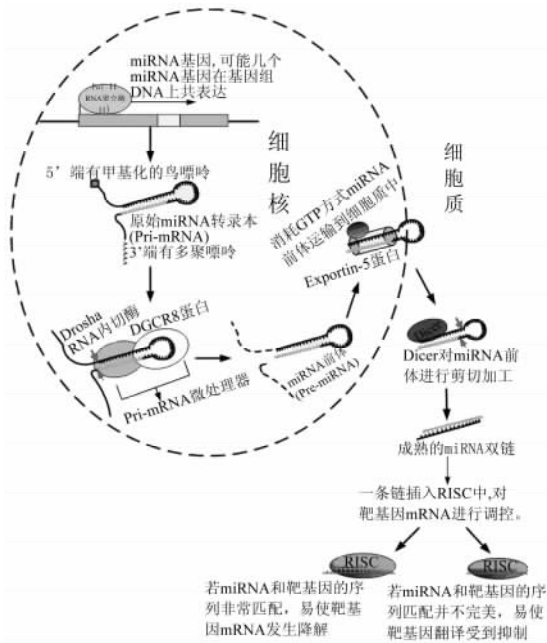


图 1 miRNA 的发生过程

miRNA 在生物的进化选择过程中被作为基因表达的调节分子,而对应于人 2 ~ 3 万个基因中,只有很少部分的编码基因起着对其他基因的调控作用,因此 miRNA 表达情况提供的是丰富的基因调控信息。基因表达谱芯片和 miRNA 表达谱芯片都是从整体上研究 mRNA 和 miRNA 表达水平的有力工具,所以把两者结

的靶 miRNA。例如,美国 Thomas Jefferson 大学 Croce 实验室发现 miR15 和 miR16 在慢性淋巴细胞白血病和前列腺癌的诊断和治疗中具有潜在的应用价值^[28]。在笔者实验室,也利用 miRNA 芯片技术,发现只需要数个 miRNA 就能将某种肿瘤的癌组织样品和正常组织样品相区分,特异性超过 80%(资料未发表)。

由于肿瘤发生的复杂性,人类在攻克恶性肿瘤方面取得的进展并不明显。miRNA 将成为肿瘤生物治疗领域的一个新亮点,将会有越来越多的研究机构通过研究 miRNA 的功能来寻找能作为肿瘤生物治疗的靶 miRNA。中国有着丰富的生物样本资源,一些国家科研单位也建立了比较完善的高通量 miRNA 芯片平台,如果临床医院和基础研究机构能联合起来,致力于 miRNA 在肿瘤发生过程中的功能研究,miRNA 在肿瘤诊断和生物治疗的实际应用方面将取得丰硕成果。

[关键词] miRNA;肿瘤;诊断;生物治疗

[中图分类号] Q786; R730 [文献标识码] A

[参考文献]

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [2] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 855-862.
- [3] Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 2001, 294(5543): 862-864.
- [4] Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 2001, 294(5543): 858-862.
- [5] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. *Science*, 2001, 294(5543): 853-858.
- [6] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [7] Croce CM, Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division [J]. *Cell*, 2005, 122(1): 6-7.
- [8] Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II [J]. *EMBO J*, 2004, 23(20): 4051-4060.
- [9] Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs [J]. *RNA*, 2004, 10(12): 1957-1966.
- [10] Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs [J]. *Nature*, 2004, 432(7014): 235-240.
- [11] Bentwich I, Avniel A, Karov Y, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs [J]. *Nat Genet*, 2005, 37(7): 766-770.
- [12] Berezikov E, Guryev V, van de BJ, et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes [J].

Cell, 2005, 120(1): 21-24.

- [13] Caldas C, Brenton JD. Sizing up miRNAs as cancer genes [J]. *Nat Med*, 2005, 11(3): 712-714.
- [14] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 2999-3004.
- [15] 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 USA*, 2002, 99(24): 15524-15529.
- [16] Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(32): 11755-11760.
- [17] 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.
- [18] Michael MZ, O' Connor SM, Holst Pellekaan NG, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia [J]. *Mol Cancer Res*, 2003, 1(12): 882-891.
- [19] He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene [J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 828-833.
- [20] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16): 7065-7070.
- [21] Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs [J]. *Nature*, 2005, 433(7027): 769-773.
- [22] He H, Jazdzewski K, Li W, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(52): 19075-19080.
- [23] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834-838.
- [24] 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 USA*, 2006; 103(13): 2257-2261.
- [25] van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(25): 1999-2009.
- [26] van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer [J]. *Nature*, 2002, 415(6871): 530-536.
- [27] Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(17): 1768-1771.
- [28] Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia [J]. *N Engl J Med*. 2005, 353(17): 1793-1801.

[收稿日期] 2006-05-12

[修回日期] 2006-05-29

[本文编辑] 韩丹