

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.06.001

· 专家论坛 ·

## MicroRNA: 癌症诊治新靶点

单保恩<sup>1</sup>, 刘丽华<sup>2</sup> (1. 河北医科大学第四医院 河北省肿瘤研究所 科研中心, 石家庄 050011; 2. 河北医科大学第四医院 生物治疗科, 石家庄 050011)



**单保恩**, 医学博士、主任医师、教授、博士生导师, 现任河北医科大学第四医院院长、党委副书记, 河北省肿瘤研究所所长, 河北医科大学副校长。享受国务院特殊津贴。全国优秀医院院长, 河北省高端人才, 河北省省管优秀专家, 河北省有突出贡献的中青年专家。国家自然科学基金委员会评审组专家, 科技部国际科技合作重点项目计划评价专家, 教育部博士学位授权点评议专家, 卫生部合理用药专家委员会抗肿瘤药物组专家, 卫生部市与县级医院常见肿瘤规范化诊疗专家委员会委员。中华医学学会肿瘤学分会常委, 中国免疫学会常务理事, 河北省免疫学会理事长。《癌变·畸变·突变》副主编,《食管外科电子杂志》副主编,《中国肿瘤生物治疗杂志》编委,《Cellular Immunology》和《Anti-Cancer Gene Therapy》审稿专家。主要从事肿瘤免疫与生物治疗、中药抗肿瘤治疗研究, 承担多项国家级和省部级科研课题。E-mail: baoshan@hbydsy.com



**刘丽华**, 医学博士、主任医师、教授、硕士生导师, 现任河北医科大学第四医院生物治疗科主任。科技部国际科技合作课题评审专家, 国家自然科学基金同行评议专家。中国免疫学会会员, 河北省生物治疗专业委员会常委, 河北省免疫学会乳腺癌专业委员会及女医师协会理事。荣获第十届河北省青年科技奖, 河北省职业青年创新奖, 河北省杰出青年基金, 河北省三三三人才工程第一层次人才。发表多篇SCI收录论文, 主编学术专著1部, 参编英文学术专著1部。主要从事肿瘤免疫与生物治疗基础研究及临床治疗工作, 在肿瘤生物治疗方面做出大量卓有成效的探索并取得显著成绩, 作为主要完成人获河北省科技进步一等奖2项, 以项目负责人身份承担国家自然科学基金等国家级及省部级课题8项。E-mail: cdlihua@aliyun.com

**[摘要]** MicroRNA (miRNA) 是人类体内重要的转录后调控因子, 参与细胞分化、增殖以及凋亡等多个细胞生物学过程。miRNA 表达谱的变化与肿瘤的发生发展密切相关, miRNA 既可以是癌基因, 也可以是抑癌基因。肿瘤的主要生物学特征均涉及到 miRNA 表达水平的变化, 尤其在肿瘤免疫逃逸中的变化十分复杂。循环 miRNA 是人类血液中一种表达极其稳定的 miRNA, 能够较准确地反映肿瘤的疾病状态, 检测肿瘤患者体内异常的循环 miRNA 表达谱可能成为肿瘤临床诊断和预后判断的一种新手段。miRNA 的检测手段主要包括 Northern blotting、微阵列和 qRT-PCR 等传统方法, 也包括二代测序等新兴技术。miRNA 模拟物以及携带 miRNA 的脂质体等治疗方案已取得一定进展, 但这些方法均有一定局限性使其无法在临床大规模开展应用。在克服当前的这些技术难点之后, miRNA 检测有望进入临床, 帮助建立新的肿瘤诊断和治疗方案。

**[关键词]** microRNA; 循环 miRNA; 肿瘤标志物; 肿瘤诊断; 肿瘤治疗

**[中图分类号]** Q522; R730.2; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)06-0603-07

## MicroRNA: Novel hallmark of cancer

Shan Baoen<sup>1</sup>, Liu Lihua<sup>2</sup> (1. Research Center, Hebei Cancer Institute, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Biotherapy, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

**[Abstract]** MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules of approximately 22 nucleotides in length, en-

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (No. 81201607); 河北省杰出青年基金资助项目 (No. H2014206320)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81201607), and the Foundation for Distinguished Young Scientists of Hebei Province (No. H2014206320)

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20141209.1454.001.html>

dogenuously present in humans, animals, plants, and some viruses, which function as post-transcriptional regulators in numerous biological processes. MiRNAs can be either oncogenic or anti-oncogenic. Aberrant miRNA expression is the hallmarks of cancer and thus miRNA profiling may help monitor tumor growth and progression. Accumulating evidence suggest that circulating miRNAs, stably expressed in human peripheral blood, can accurately reflect the status of cancer, thus having great potential to serve as novel diagnostic and/or prognostic biomarkers for cancer. Conventionally, miRNA detection mainly involves Northern blotting, microarray, qRT-PCR, and lately next-generation sequencing. In recent years, significant improvement has been made in miRNA-based therapeutic strategies including miRNA mimicking and liposome-mediated miRNA delivery. However, some technological difficulties remain, which has restricted the wider application of these strategies in clinics. It is highly anticipated that miRNAs will play more significant roles in cancer diagnose and treatment in clinics when these difficulties are well managed.

[ **Key words** ] microRNA; circulating miRNA; tumor biomarker; tumor diagnosis; tumor therapy

[ Chin J Cancer Biother, 2014, 21(6): 603-609 ]

MicroRNA(miRNA)是一种内源性表达的单链非编码RNA,是人类体内极其重要的转录后调控因子,长度大多为19~23 bp<sup>[1]</sup>。成熟的miRNA是由较长的初级转录物经过一系列核酸酶的剪切加工产生后被释放至胞质,经历一系列催化作用后成熟并整合进入RNA诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC),随后与靶mRNA的3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)结合,下调其所编码的蛋白的表达水平<sup>[2,3]</sup>。尽管多数miRNA位于细胞质内,仍有一部分miRNA位于细胞核内并在DNA水平直接调控转录过程,比如miRNA-373与E钙黏连蛋白启动子结合后可上调其表达水平<sup>[4]</sup>。miRNA介导的基因调控是人类体内的一种基本转录后调控途径,能够调控超过50%的细胞基因,参与调控包括分化、增殖以及凋亡在内的多个细胞生物学过程。因此,miRNA表达的失调与多种疾病有关,其中也包括肿瘤。miRNA表达谱的变化与肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移、浸润、转移密切相关,miRNA在反映肿瘤疾病进展及预后方面具有重要的临床应用价值,有可能成为癌症治疗的新靶点<sup>[5]</sup>。

## 1 miRNA在肿瘤中的生物学作用

miRNA表达谱异常广泛存在于多种肿瘤中,不同类型的肿瘤呈现的miRNA异常表达谱具有一定的相似性<sup>[6]</sup>。比如,miRNA-126、miRNA-143和miRNA-145在超过80%的肿瘤患者中呈低表达状态,而miRNA-21在80%的肿瘤患者中呈过表达状态<sup>[7]</sup>。肿瘤miRNA的异常表达谱主要有以下三个特征:(1)肿瘤细胞的miRNA表达谱与其相同类型组织的正常细胞有着很大差异<sup>[8]</sup>,表明在肿瘤进展中miRNA具有一定的生物学功能<sup>[6]</sup>。在肿瘤中,表达水平发生变化往往不局限于某个miRNA,而是同

时发生在多个miRNA中,表明肿瘤发生发展与整个miRNA基因组都密切相关<sup>[9]</sup>。(2)相同组织来源的肿瘤miRNA表达谱发生的改变也具有一定的相似性,这表明miRNA检测可能成为诊断肿瘤的一种新手段<sup>[10]</sup>。(3)某些miRNA在许多肿瘤中都呈表达失调的状态,表明这些miRNA可能参与了肿瘤的某些基础信号通路<sup>[1]</sup>。

由于被调控的mRNA在肿瘤中的作用各不相同,miRNA也可以被分为癌基因和抑癌基因,前者如miRNA-155、miRNA-17~92、miRNA-372、miRNA-373等,后者如let-7、miRNA-15a、miRNA-16-1、miRNA-34s等<sup>[5]</sup>。但是某些miRNA在不同类型肿瘤中起到的作用不完全相同,既可发挥致癌作用,也可以发挥抑癌作用。比如miRNA-221在肝癌中主要调控抑癌基因*PTEN*,其大多呈过表达状态,有利于肝癌的进展<sup>[11]</sup>;而在胃癌中miRNA-221往往呈低表达状态,上调癌基因*c-KIT*和*ETV1*的表达水平,促进胃癌进展<sup>[12]</sup>。

肿瘤具有十大生物学特征,分别为持续的增殖信号、逃避生长抑制信号、抵抗细胞凋亡、无限的复制能力、诱导血管生成、激活侵袭和转移、异常的能量代谢、基因不稳定性、突变、肿瘤促进的炎症以及免疫逃逸<sup>[13]</sup>,这些生物学行为不同程度地涉及miRNA的调控,主要包括以下机制:(1)*RAS*和高迁移率蛋白(high mobility group A2, *HMG A2*)基因的激活将能够使肿瘤拥有自给自足的生长信号,摆脱外来生长因子的依赖性,这两种基因均受到let-7的抑制。已有研究表明在肿瘤中let-7呈低表达水平,使肿瘤更易进展<sup>[14-15]</sup>。(2)*E2F*是一类细胞周期以及DNA合成的调控因子,*E2F*表达失调将使细胞的生长失去控制。作为*E2F*家族最重要的一员,*E2F1*基因受到miRNA-20a、miRNA-17-5a、miRNA-93、miRNA-106b的调控,以上miRNA表达水平降低使其调控的*E2F1*基因

表达水平提高,使其能够抵抗抑制肿瘤细胞生长的信号<sup>[16-17]</sup>。Xie 等<sup>[18]</sup>发现,调控增殖和凋亡的转录因子 FOXO1 在霍奇金淋巴瘤中的低表达状态与 miRNA-96、miRNA-182 和 miRNA-183 密切相关。Razumilava 等<sup>[19]</sup>发现胆管癌细胞系中表达上调的 miRNA-25 能够降低肿瘤细胞对 TRAIL 诱导凋亡的敏感性,在下调 miRNA-25 的表达水平后,肿瘤细胞凋亡率显著提升。在多种肿瘤中呈低表达水平的 miRNA-34a 则能够通过调控多个基因参与肿瘤细胞的凋亡,如下调 MYCN 基因和 Bcl-2 基因的表达水平<sup>[20]</sup>。(3)在 DNA 复制过程中,miRNA-29 和 miRNA-30 表达水平上调,抑制癌基因 MYBL2 的表达进而防止 DNA 过多复制<sup>[21]</sup>。miRNA-372 和 miRNA-373 能够保护 RAS 基因和野生型 TP53 基因,并下调 P53 介导的细胞周期蛋白依赖性的激酶抑制活性,使肿瘤细胞具有近乎无限的复制潜能<sup>[22]</sup>。(4)低氧环境与肿瘤血管生成关系十分密切,在 miRNA 方面主要是通过低氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 来激活 miRNA-27a 和 miRNA-210<sup>[23]</sup>。miR-27a 能够限制锌指基因 ZBTB10 的表达,而上调特异性蛋白转录因子的表达,提高 VEGF 和 VEGFR 的表达水平<sup>[24]</sup>;而 miRNA-210 能够直接调节酪氨酸激酶受体配体肝配蛋白 A,促进血管上皮细胞生长和迁移<sup>[25]</sup>。(5)HOXD10 是一种维持正常上皮细胞分化形态的调控因子,当受到异常表达的 miRNA-10b 的下调时,正常上皮细胞的分化程度降低,易恶变为肿瘤细胞<sup>[26]</sup>。(6)miRNA-23a、miRNA-378-star、miRNA-143 等参与调节肿瘤细胞的谷氨酸和葡萄糖代谢途径,使其拥有充足的生长能量<sup>[27-29]</sup>。

miRNA 在肿瘤免疫逃逸中的作用则更加复杂,涉及到多种细胞上的不同通路。STAT3 通路是肿瘤微环境内介导免疫抑制的关键通路,受到 miRNA-124 的负性调控。通过对比肿瘤组织和正常组织,能够发现 miRNA-124 往往呈低表达水平,在上调 miRNA-124 以后 STAT3 通路的活性显著降低,进而恢复 T 细胞的抗肿瘤杀伤能力<sup>[30]</sup>。miRNA-21 和 miRNA-29a 能够直接刺激 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR),随后触发 TLR 介导的具有促转移作用的炎症反应,有利于肿瘤的生长和转移<sup>[31]</sup>。此外,过表达的 miRNA-17~92 能够促进 CD4<sup>+</sup> T 细胞的凋亡<sup>[32]</sup>,而 miRNA-222 和 miRNA-339 能够通过下调细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 的表达来减弱细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 对肿瘤细胞的杀伤作用<sup>[33]</sup>。miRNA-17-5p、miRNA-20a 能够下调 NKG2D 配体的表达,减弱 NK 细胞对肿瘤细胞的细胞毒效

应<sup>[34-35]</sup>。可见,肿瘤的发生发展过程涉及到 miRNA 表达谱的变化较复杂,探究这些变化有利于进一步理解肿瘤的生物特点并制定相应的治疗策略。

## 2 循环 miRNA 在肿瘤中的意义

在血液中的一类具有类激素样作用的 miRNA,能够调控受体细胞的靶 mRNA 表达,这类 miRNA 被称为循环 miRNA<sup>[36]</sup>。循环 miRNA 多位于微泡的膜结构,如外体、微粒和凋亡小体中,因而能够抵抗 RNA 酶引起的降解,另外 miRNA 的理化性质亦十分稳定,无论在非常高或非常低的 pH 环境里,还是经煮沸或反复冻融,循环 miRNA 仍可保持稳定<sup>[1,37-38]</sup>。循环 miRNA 极高的稳定性使其能够在细胞间转移,以便在受体细胞内发挥调控作用,这是肿瘤细胞影响邻近正常细胞生物学行为的一个重要途径<sup>[39]</sup>。肿瘤患者体内的循环 miRNA 谱往往呈异常表达状态,比如弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者血液中 miRNA-155、miRNA-210 和 mRNA-21 的表达水平显著增高<sup>[40]</sup>,卵巢癌患者血清中 miRNA-21、mRNA-92 和 mRNA-93 的表达水平显著增高<sup>[41]</sup>。在某些类型的肿瘤中,循环 miRNA 的表达水平与其疾病状态密切相关,比如在结肠癌中,过表达 miRNA-141 的患者 TNM 分期较高,并且更易发生肝转移<sup>[42]</sup>,而过表达 miRNA-221 的患者更易发生淋巴结转移以及肿瘤复发<sup>[43]</sup>。在经过治疗后,肿瘤患者体内循环 miRNA 异常的表达水平则会发生一定的变化,比如结肠癌患者血清中 miRNA-17-3p 和 miRNA-92 术后较术前明显降低<sup>[44]</sup>,乳腺癌患者血清中 miRNA-195 的水平较治疗前降低<sup>[45]</sup>,肝癌患者血清中增高的 miRNA-500 表达水平在手术后即可恢复至正常<sup>[46]</sup>。同时,循环 miRNA 表达水平还能够反映肿瘤患者的预后情况,在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中,低表达 let-7 的患者生存时间较高表达者更短<sup>[47]</sup>,而高表达 miRNA-17a 的患者生存时间较低表达者更短<sup>[48]</sup>。循环 miRNA 表达水平还能够帮助患者选择较敏感的治疗方法,比如激素敏感型乳腺癌患者血清中 miRNA-155 表达水平显著高于非激素敏感型患者<sup>[49]</sup>,低表达 miRNA-34、miRNA-17 和 let-7a 的患者分别对 5-氟尿嘧啶、多柔比星和环磷酰胺更加敏感<sup>[50]</sup>。

外体释放 miRNA 是循环 miRNA 的主要产生方式之一。巨噬细胞内的外体能够通过释放 miRNA-223 来促进乳腺癌细胞的侵袭<sup>[51]</sup>。在体外实验中发现,在由白血病细胞系制造的低氧环境下产生的外体能够释放 miRNA-210 以及其他具有促血管生

成作用的 miRNA<sup>[52]</sup>。另一种循环 miRNA 的主要产生方式为由细胞直接分泌。由单核细胞分泌的 miRNA-150 和肿瘤细胞分泌的 miRNA-9 均能够增强上皮细胞的血管生成和迁移能力<sup>[37,53-54]</sup>。已有一些研究发现外体释放的 miRNA 与肿瘤细胞释放的 miRNA 表达水平具有一定的相关性, 比如在卵巢癌患者中发现外体释放的 miRNA 与肿瘤细胞释放的 miRNA 有 8 种(分别为 miRNA-21、miRNA-141、miRNA-200a、miRNA-200b、miRNA-200c、miRNA-203、miRNA-205 和 miRNA-214)表达水平同时升高<sup>[55]</sup>。另外某些循环 miRNA 的表达水平与循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)数量也有一定的关系, Zhou 等<sup>[56]</sup>观察到胃癌患者体内 miRNA-17 和 miRNA-106a 的表达水平与循环胃癌细胞数量成显著正相关。综上所述, 循环 miRNA 的变化能够较准确地反映肿瘤患者的疾病状态, 并且稳定性较高、样本容易获得, 循环 miRNA 具备成为肿瘤标志物的条件<sup>[57]</sup>。准确地检测循环 miRNA 将为诊断疾病、选择治疗方案和判断预后提供一定的帮助。

### 3 miRNA 检测及肿瘤诊断

检测并定量 miRNA 的表达水平有利于全面观察 miRNA 表达谱并研究其与靶基因的关系。由于 miRNA 有以下几个特点: 表达量极低、序列较类似、并非始终与靶 mRNA 完全配对, 理想的 miRNA 检测方法应兼具高敏感性和特异性, 同时廉价且低样本消耗以便于在临床应用。经过数十年的研究, 目前已经确立了较完善的 miRNA 检测方法。传统的检测方法主要包括 Northern blotting、微阵列和 qRT-PCR, 新兴的检测方法则主要为二代测序。但这些方法基本仍停留在实验阶段, 尚无法在临床上大规模使用。

#### 3.1 定量反转录聚合酶链反应

定量反转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, qRT-PCR)是目前检测并定量 miRNA 的最常用方法, 凭借其高敏感度能够精确定量低表达的 miRNA。但是 qRT-PCR 难以检测出单个核苷酸的差异, 导致其检测 miRNA 的特异性较差, 并且其检测效率受到很多因素的影响, 比如样本处理及保存方法、提取的 RNA 纯度等, 均限制了其在临床上的应用<sup>[58]</sup>。一些学者已着手通过研发新技术来改良检测 miRNA 的 qRT-PCR 技术。目前, 在提高 miRNA 扩增效率以及信号检测方面已经取得了较大进展, 前者主要通过使用生物荧光酶标记法<sup>[59]</sup>、滚环扩增(rolling-circle amplification, RCA)<sup>[60]</sup>以及等温扩增<sup>[61]</sup>等方法实现, 后者则通过

联合使用自组装蛋白平台与全内角反射荧光显微镜(total internal reflection fluorescence microscope, TIRFM)这两种检测方法以提高检测的灵敏度。

#### 3.2 Northern blotting

Northern blotting 是最早用来系统地检测 miRNA 表达谱的检测方法, 被广泛用于检测包括原始 miRNA 和成熟 miRNA 在内的各类 miRNA<sup>[62]</sup>。尽管 Northern blotting 无法对 miRNA 的表达水平进行定量分析, 但是凭借其能够定位 miRNA 在组织和细胞上的表达位点的优势, 它目前仍然被看作定性检测 miRNA 的金标准<sup>[63-64]</sup>。探针标记是 Northern blotting 检测过程中的关键步骤, 目前最常用的方法为<sup>32</sup>P 放射性核素标记法, 然而这种方法敏感度、稳定性、检测速度均较差, 昂贵且不安全, 因此探针标记法仍需改进。地高辛(digoxigenin, DIG)标记系统是一种新的标记法, 与传统的<sup>32</sup>P 标记法相比, DIG 标记系统有明显的优势: 敏感性及检测效率高、保存时间长、安全性好<sup>[65]</sup>。另外 Northern blotting 探针设计方法也有所改进, 锁核酸(locked nucleic acids, LNA)寡核苷酸探针正在逐渐取代传统的 DNA 探针, 使检测效率提高了至少 10 倍<sup>[66]</sup>。

#### 3.3 miRNA 微阵列

miRNA 微阵列是目前最常用、最有效的检测大型 miRNA 谱的方法<sup>[67]</sup>。微阵列也是较常用的检测循环 miRNA 的方法之一, 能够分析整体的 miRNA 表达谱并帮助筛选可能的肿瘤标志物<sup>[68]</sup>。miRNA 微阵列的敏感度及检测速度显著高于 qRT-PCR, 检测结果更加便于数据分析, 而且当与 qRT-PCR 联合使用时, 得出的结果极其准确<sup>[69]</sup>。但 miRNA 微阵列较 qRT-PCR 更为昂贵, 在实验室中往往仅被用于发现及筛选 miRNA<sup>[69]</sup>。最近有学者<sup>[70]</sup>探索性地将累积杂交技术引入 miRNA 微阵列, 这项技术使 miRNA 微阵列在整体 RNA 小于 100 ng 时仍能有效分析, 并对序列类似的 miRNA 有较高的识别能力。

#### 3.4 二代测序

二代测序用于检测 miRNA 时具有高敏感性、高特异性、高检测效率的优点, 适用于大规模检测 miRNA 表达谱以及重新鉴定 miRNA 与靶 mRNA 的相关性<sup>[71]</sup>。目前已有一些学者应用二代测序技术来检测胃癌<sup>[72]</sup>、肝癌<sup>[73]</sup>、肾癌<sup>[74]</sup>等多种肿瘤中的 miRNA, 发现该方法能够提高肿瘤的诊断率并更精确地判断预后。但二代测序的检测结果相当庞大复杂, 需要有经验的生物信息学家和统计学家共同分析才能有效地利用。并且当检测单个 miRNA 序列时, 二代测序的成本极高。这些缺点使二代测序技

术目前尚不适合作为临床诊断工具,而仅仅能作为一种实验研究工具<sup>[71]</sup>。

#### 4 miRNA 与肿瘤治疗

近年来已经有一些基于 miRNA 研究的新的肿瘤治疗手段。目前取得较大进展的是利用 miRNA 模拟物治疗肿瘤。miRNA 模拟物分子是一种与内源性 miRNA 完全相同的双链 RNA 序列,能够由纳米颗粒携带进入细胞并得以表达。由于纳米颗粒能够覆盖在识别肿瘤特异性抗原的抗体上,因此 miRNA 将能够靶向性地进入肿瘤细胞发挥效应。Tivnan 等<sup>[75]</sup>将携带有 miRNA-34a 的纳米颗粒覆盖于成神经细胞瘤特异性的抗双唾液酸神经节苷脂 GD2 抗体上,成功地抑制了小鼠成神经细胞瘤的进展。MRX34 是 miRNA-34 的脂质体模拟物,临床前实验已经证实,给肝癌小鼠静脉注射 MRX34 能够抑制肿瘤进展并显著延长生存时间;MRX34 凭借其高有效率和安全性,已经进入 I 期临床试验用于治疗转移性肝癌<sup>[76]</sup>。另一种有望在临床应用取得较大突破的方案为脂质体。Wu 等<sup>[77]</sup>使用阳离子脂质体携带 miRNA-29b 进入 NSCLC 细胞后,逆转 miRNA-29b 的低表达状态,进而抑制其调控的癌基因周期蛋白依赖性激酶 6 (cyclin-dependent kinase 6, CDK6) 表达,最终抑制了约 60% 的肿瘤细胞生长。另外抑制过表达的 miRNA 也是一种有临床应用前景的肿瘤治疗方案,这种治疗主要通过反义寡核苷酸(也被称作反 miRNA)实现。反 miRNA 主要由以下成分组成:LNA、miRNA 拮抗剂和 miRNA 海绵等<sup>[78]</sup>。目前已有多项相关研究进入临床试验阶段,比如抑制 miRNA-122 的表达以减弱 HCV 病毒的 RNA 活性,最终降低了肝癌的发病率<sup>[78]</sup>。联合应用 miRNA 和小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 有望协同治疗肿瘤。在一项卵巢癌研究中,在 siRNA 介导下沉默了癌基因 *EphA2* 的表达后,肿瘤生长受到抑制;在联合使用 miRNA-520d-3p 时,*EphA2* 的表达能够受到进一步的抑制<sup>[79]</sup>。但这些治疗手段均依赖于对 miRNA 序列的精确测定,以及对整个基因组内在调控途径的了解,这些难点使得 miRNA 目前仍难以进入临床应用。

#### 5 结 语

miRNA 是近年来肿瘤学的研究热点之一。随着分子生物学的进展,miRNA 的检测方法得以改进,与肿瘤有关的 miRNA 不断被发现,其与靶 mRNA 的相关性也日益得到明确。miRNA 是重要的

转录后调控因子,miRNA 表达谱的变化是肿瘤发生发展过程中的重要因素。检测肿瘤患者体内的 miRNA 有助于肿瘤诊断、选择治疗方案以及判断预后,因此 miRNA 有可能成为新兴的肿瘤标志物。凭借其高度稳定性,循环 miRNA 的检测对于肿瘤患者有着更加重要的意义。由于 miRNA 以调控靶基因的方式参与了肿瘤的主要生物学行为,基于 miRNA 研究的新治疗方案在未来有美好的应用前景。由于 miRNA 在肿瘤的免疫逃逸中发挥了复杂且重要的作用,通过调控 miRNA 的表达水平来增强免疫细胞对肿瘤细胞的识别与杀伤能力将成为一种极具可行性的免疫治疗方法。miRNA 的临床应用均以高效率、高敏感性且廉价的检测方法为前提,但目前 miRNA 的检测方法均有一定的限制性,使其无法在临床上大规模应用,在克服这些难题后,miRNA 检测及治疗将有望顺利进入临床成为新的治疗靶点,为广大肿瘤患者带来福音。

#### [参 考 文 献]

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, et al. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian p-bodies [J]. Nat Cell Biol, 2005, 7(7): 719-723.
- [3] Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation [J]. Science, 2007, 318(5858): 1931-1934.
- [4] Place RF, Li LC, Pookot D, et al. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(5): 1608-1613.
- [5] Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: The implications for cancer research [J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(6): 389-402.
- [6] Li C, Feng Y, Coukos G, et al. Therapeutic microRNA strategies in human cancer [J]. Aaps J, 2009, 11(4): 747-757.
- [7] Yin JQ, Zhao RC, Morris KV. Profiling microRNA expression with microarrays [J]. Trends Biotechnol, 2008, 26(2): 70-76.
- [8] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. Nature, 2005, 435(7043): 834-838.
- [9] Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer [J]. Annu Rev Pathol, 2009, 4: 199-227.
- [10] 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.
- [11] Qin J, Luo M. MicroRNA-221 promotes colorectal cancer cell invasion and metastasis by targeting reck [J]. FEBS Lett, 2014, 588(1): 99-104.
- [12] Gits CM, van Kuijk PF, Jonkers MB, et al. Mir-17-92 and mir-221/222 cluster members target kit and etv1 in human gastrointesti-

- nal stromal tumours [ J ]. *Br J Cancer*, 2013, 109( 6 ): 1625-1635.
- [ 13 ] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation [ J ]. *Cell*, 2011, 144( 5 ): 646-674.
- [ 14 ] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. Ras is regulated by the let-7 microRNA family [ J ]. *Cell*, 2005, 120( 5 ): 635-647.
- [ 15 ] Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation [ J ]. *Science*, 2007, 315( 5818 ): 1576-1579.
- [ 16 ] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, et al. C-myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression [ J ]. *Nature*, 2005, 435( 7043 ): 839-843.
- [ 17 ] Petrocca F, Visone R, Onelli MR, et al. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer [ J ]. *Cancer Cell*, 2008, 13( 3 ): 272-286.
- [ 18 ] Xie L, Ushmorov A, Leithauser F, et al. Foxo1 is a tumor suppressor in classical hodgkin lymphoma [ J ]. *Blood*, 2012, 119( 15 ): 3503-3511.
- [ 19 ] Razumilava N, Bronk SF, Smoot RL, et al. MiR-25 targets TNF-related apoptosis inducing ligand ( TRAIL ) death receptor-4 and promotes apoptosis resistance in cholangiocarcinoma [ J ]. *Hepatology*, 2012, 55( 2 ): 465-475.
- [ 20 ] Wei JS, Song YK, Durinck S, et al. The MYCN oncogene is a direct target of miR-34a [ J ]. *Oncogene*, 2008, 27( 39 ): 5204-5213.
- [ 21 ] Martinez I, Cazalla D, Almstead LL, et al. MiR-29 and miR-30 regulate B-MYB expression during cellular senescence [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108( 2 ): 522-527.
- [ 22 ] 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.
- [ 23 ] Kulshreshtha R, Davuluri RV, Calin GA, et al. A microRNA component of the hypoxic response [ J ]. *Cell Death Differ*, 2008, 15( 4 ): 667-671.
- [ 24 ] Mertens-Talcott SU, Chintharlapalli S, Li X, et al. The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells [ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 22 ): 11001-11011.
- [ 25 ] Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3 [ J ]. *J Biol Chem*, 2008, 283( 23 ): 15878-15883.
- [ 26 ] 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.
- [ 27 ] Gao P, Tchernyshov I, Chang TC, et al. C-myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism [ J ]. *Nature*, 2009, 458( 7239 ): 762-765.
- [ 28 ] Eichner LJ, Pery MC, Dufour CR, et al. MiR-378\* mediates metabolic shift in breast cancer cells via the PGC-1β/ERRα transcriptional pathway [ J ]. *Cell Metab*, 2010, 12( 4 ): 352-361.
- [ 29 ] Fang R, Xiao T, Fang Z, et al. MicroRNA-143 ( miR-143 ) regulates cancer glycolysis via targeting hexokinase 2 gene [ J ]. *J Biol Chem*, 2012, 287( 27 ): 23227-23235.
- [ 30 ] Wei J, Wang F, Kong LY, et al. MiR-124 inhibits STAT3 signaling to enhance T cell-mediated immune clearance of glioma [ J ]. *Cancer Res*, 2013, 73( 13 ): 3913-3926.
- [ 31 ] Fabbri M, Paone A, Calore F, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109( 31 ): E2110-E2116.
- [ 32 ] Molitoris JK, McColl KS, Distelhorst CW. Glucocorticoid-mediated repression of the oncogenic microRNA cluster miR-17 ~92 contributes to the induction of Bim and initiation of apoptosis [ J ]. *Mol Endocrinol*, 2011, 25( 3 ): 409-420.
- [ 33 ] Ueda R, Kohanbash G, Sasaki K, et al. Dicer-regulated microRNAs 222 and 339 promote resistance of cancer cells to cytotoxic T-lymphocytes by down-regulation of ICAM-1 [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106( 26 ): 10746-10751.
- [ 34 ] Lu Y, Thomson JM, Wong HY, et al. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells [ J ]. *Dev Biol*, 2007, 310( 2 ): 442-453.
- [ 35 ] Wu Q, Yang Z, Wang F, et al. MiR-19b/20a/92a regulates the self-renewal and proliferation of gastric cancer stem cells [ J ]. *J Cell Sci*, 2013, 126( Pt 18 ): 4220-4229.
- [ 36 ] Wang K, Zhang S, Marzolf B, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106( 11 ): 4402-4407.
- [ 37 ] Zhang Y, Liu D, Chen X, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration [ J ]. *Mol Cell*, 2010, 39( 1 ): 133-144.
- [ 38 ] Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers [ J ]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10( 12 ): 1470-1476.
- [ 39 ] Hu G, Drescher KM, Chen XM. Exosomal miRNAs: Biological properties and therapeutic potential [ J ]. *Front Genet*, 2012, 3: 56.
- [ 40 ] 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.
- [ 41 ] Resnick KE, Alder H, Hagan JP, et al. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform [ J ]. *Gynecol Oncol*, 2009, 112( 1 ): 55-59.
- [ 42 ] Cheng H, Zhang L, Cogdell DE, et al. Circulating plasma miR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis [ J ]. *PLoS ONE*, 2011, 6( 3 ): e17745.
- [ 43 ] Toiyama Y, Hur K, Tanaka K, et al. Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer [ J ]. *Ann Surg*, 2014, 259( 4 ): 735-743.
- [ 44 ] 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.
- [ 45 ] Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, et al. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer [ J ].

- Ann Surg, 2010, 251(3): 499-505.
- [ 46 ] Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, et al. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma [ J ]. *Biomarkers*, 2009, 14(7): 529-538.
- [ 47 ] Heegaard NH, Schetter AJ, Welsh JA, et al. Circulating microRNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer [ J ]. *Int J Cancer*, 2012, 130(6): 1378-1386.
- [ 48 ] Rodriguez M, Silva J, Lopez-Alfonso A, et al. Different exosome cargo from plasma/bronchoalveolar lavage in non-small-cell lung cancer [ J ]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014, 53(9): 713-724.
- [ 49 ] Zhu W, Qin W, Atasoy U, et al. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects [ J ]. *BMC Res Notes*, 2009, 2: 89.
- [ 50 ] Blower PE, Verducci JS, Lin S, et al. MicroRNA expression profiles for the NCI-60 cancer cell panel [ J ]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(5): 1483-1491.
- [ 51 ] Yang M, Chen J, Su F, et al. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells [ J ]. *Mol Cancer*, 2011, 10: 117.
- [ 52 ] Tadokoro H, Umezu T, Ohyashiki K, et al. Exosomes derived from hypoxic leukemia cells enhance tube formation in endothelial cells [ J ]. *J Biol Chem*, 2013, 288(48): 34343-34351.
- [ 53 ] Li J, Zhang Y, Liu Y, et al. Microvesicle-mediated transfer of microRNA-150 from monocytes to endothelial cells promotes angiogenesis [ J ]. *J Biol Chem*, 2013, 288(32): 23586-23596.
- [ 54 ] Zhuang G, Wu X, Jiang Z, et al. Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the jak-stat pathway [ J ]. *Embo J*, 2012, 31(17): 3513-3523.
- [ 55 ] Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer [ J ]. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(1): 13-21.
- [ 56 ] Zhou H, Guo JM, Lou YR, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using microRNA as a marker [ J ]. *J Mol Med (Berl)*, 2010, 88(7): 709-717.
- [ 57 ] Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: A new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis [ J ]. *Cancer Sci*, 2010, 101(10): 2087-2092.
- [ 58 ] Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available [ J ]. *Methods*, 2010, 50(4): 244-249.
- [ 59 ] Cissell KA, Rahimi Y, Shrestha S, et al. Bioluminescence-based detection of microRNA, mir21 in breast cancer cells [ J ]. *Anal Chem*, 2008, 80(7): 2319-2325.
- [ 60 ] Cheng Y, Zhang X, Li Z, et al. Highly sensitive determination of microRNA using target-primed and branched rolling-circle amplification [ J ]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48(18): 3268-3272.
- [ 61 ] Van Ness J, Van Ness LK, Galas DJ. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(8): 4504-4509.
- [ 62 ] 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.
- [ 63 ] Wark AW, Lee HJ, Com RM. Multiplexed detection methods for profiling microRNA expression in biological samples [ J ]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47(4): 644-652.
- [ 64 ] Dangwal S, Bang C, Thum T. Novel techniques and targets in cardiovascular microRNA research [ J ]. *Cardiovasc Res*, 2012, 93(4): 545-554.
- [ 65 ] Wu W, Gong P, Li J, et al. Simple and nonradioactive detection of microRNAs using digoxigenin (dig)-labeled probes with high sensitivity [ J ]. *RNA*, 2014, 20(4): 580-584.
- [ 66 ] Valoczi A, Hornyik C, Varga N, et al. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes [ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(22): e175.
- [ 67 ] Li W, Ruan K. MicroRNA detection by microarray [ J ]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 394(4): 1117-1124.
- [ 68 ] Tzimagiorgis G, Michailidou EZ, Kritis A, et al. Recovering circulating extracellular or cell-free RNA from bodily fluids [ J ]. *Cancer Epidemiol*, 2011, 35(6): 580-589.
- [ 69 ] Liu CG, Calin GA, Volinia S, et al. MicroRNA expression profiling using microarrays [ J ]. *Nat Protoc*, 2008, 3(4): 563-578.
- [ 70 ] Duan D, Zheng KX, Shen Y, et al. Label-free high-throughput microRNA expression profiling from total RNA [ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(22): e154.
- [ 71 ] Berindan-Neagoe I, Monroig Pdel C, Pasculli B, et al. MicroRNAome genome: A treasure for cancer diagnosis and therapy [ J ]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(5): 311-336.
- [ 72 ] Liu HS, Xiao HS. MicroRNAs as potential biomarkers for gastric cancer [ J ]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(34): 12007-12017.
- [ 73 ] Murakami Y, Tanahashi T, Okada R, et al. Comparison of hepatocellular carcinoma miRNA expression profiling as evaluated by next generation sequencing and microarray [ J ]. *PLoS ONE*, 2014, 9(9): e106314.
- [ 74 ] Muller S, Nowak K. Exploring the miRNA-mRNA regulatory network in clear cell renal cell carcinomas by next-generation sequencing expression profiles [ J ]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 948408.
- [ 75 ] Tivnan A, Orr WS, Gubala V, et al. Inhibition of neuroblastoma tumor growth by targeted delivery of microRNA-34a using anti-dsialoganglioside GD2 coated nanoparticles [ J ]. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e38129.
- [ 76 ] Bader AG. MiR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic [ J ]. *Front Genet*, 2012, 3: 120.
- [ 77 ] Wu Y, Crawford M, Mao Y, et al. Therapeutic delivery of microRNA-29b by cationic lipoplexes for lung cancer [ J ]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, 2: e84.
- [ 78 ] Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA [ J ]. *N Engl J Med*, 2013, 368(18): 1685-1694.
- [ 79 ] Nishimura M, Jung EJ, Shah MY, et al. Therapeutic synergy between microRNA and siRNA in ovarian cancer treatment [ J ]. *Cancer Discov*, 2013, 3(11): 1302-1315.

[ 收稿日期 ] 2014 - 11 - 20 [ 修回日期 ] 2014 - 12 - 30

[ 本文编辑 ] 黄静怡