

文章编号 :1004-0374(2010)01-0089-05

## MicroRNA 与肺癌发生、诊断及治疗

潘琳, 龚朝辉\*, 乐燕萍, 龙香娥

(宁波大学医学院, 宁波 315211)

**摘要:** 微小RNA(miRNAs)是一大类小的非编码RNA,它通过与靶mRNA 3'非翻译区部分互补配对来调节特定基因的表达。近来研究表明,miRNA可作为癌基因或抑癌基因在肺癌发生发展过程中起重要作用。比较癌组织和非癌组织中miRNA表达谱的差异可筛选出部分miRNA分子作为肺癌诊断和预后判断的潜在生物标记。调节具有致癌或抑癌功能的miRNA表达可能成为肺癌治疗新方法,而结合传统放疗化疗及其敏感性miRNA标志也为肺癌治疗研究提供了新的策略。该文对miRNA在肺癌发生与发展、基因诊断和治疗中的作用做一综述。

**关键词:** 微小RNA; 肺癌; 诊断; 治疗

中图分类号: Q522; R730; R734.2 文献标识码: A

## MicroRNAs in lung carcinogenesis, diagnosis and therapy

PAN Lin, GONG Zhao-hui\*, LE Yan-ping, LONG Xiang-e

(School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** MicroRNAs (miRNAs) are a large class of small non-coding RNAs that regulate the expression of specific genes through binding to the partially complementary 3' untranslated regions (3' UTR) of target mRNAs. Recent studies have suggested important roles for miRNAs in oncogenesis and development of lung cancer as oncogenes or tumor suppressor genes. Some selected miRNAs can be used as the potential biomarkers of diagnosis and prognosis in lung cancer by comparing the different expression profiles of lung cancer tissues with corresponding non-cancerous tissues. To regulate the expression of carcinogenic and tumor-suppressive miRNAs is a new method in the treatment of lung cancer. In addition, combining traditional radiotherapy and chemotherapy with sensitive miRNAs will provide a novel strategy for the study of lung cancer therapy. This review focuses on the function of miRNAs in lung carcinogenesis, diagnosis and therapy.

**Key words:** microRNAs; lung cancer; diagnosis; therapy

微小RNA(microRNAs, miRNAs)是近几年来在生物体内发现的一类具有调控功能的非编码RNA,其长度大约为20~25nt,主要功能是参与基因转录后水平的调控。miRNA异常表达与多种肿瘤发生发展关系密切。大量研究显示,miRNA的表达分析具有肿瘤诊断和预后判断的潜在应用价值。

动物尤其是人的miRNA的生物合成过程已经初步得到诠释,即miRNA基因首先在细胞核内合成初级转录产物(pri-miRNA),经Drosha切割后形成前体miRNA(pre-miRNA)<sup>[1]</sup>,转运到胞质中经Dicer进一步切割产生成熟miRNA<sup>[2,3]</sup>,成熟miRNA通过与

靶mRNA的3'端非翻译区(3' UTR)部分互补配对调节基因表达<sup>[4-6]</sup>。

### 1 MiRNA与肺癌发生

研究显示,超过一半的miRNA位于肿瘤相关

收稿日期:2009-07-09;修回日期:2009-09-01  
基金项目:国家自然科学基金(30670447);浙江省高校优秀青年教师资助计划(2007-012);宁波市自然科学基金(2009A610187);宁波大学科研基金(XY0700013)  
\*通讯作者:E-mail: zhgong@yahoo.com;Tel:86-574-87600754

基因组区域或脆性位点、杂合性丢失区和扩增区<sup>[7]</sup>。这表明miRNA可能作为致癌基因或抑癌基因发挥作用,如抑癌性miRNA发生突变时会诱发肿瘤形成。

### 1.1 Let-7 家族与肺癌

癌基因Ras家族和HMGA2是let-7两个最具代表性的靶点。突变的Ras蛋白内源性鸟苷酸酶(GTPase)活性降低,与GTP酶活化蛋白的结合能力减弱,导致Ras蛋白与GTP结合并促进细胞持续生长。癌基因HMGA2具有改变染色体结构,调节基因表达的能力,在高度分化的成熟细胞和组织中表达很少。在肺癌发生的相关研究中,发现这两个基因的表达明显上调。Kumar等<sup>[8]</sup>发现let-7g能够抑制Ras基因表达,并调节细胞增殖和生长。Let-7g转染LKR13细胞后发现,let-7g表达上调后的细胞密度明显降低。Lee和Dutta<sup>[9]</sup>发现let-7的表达与HMGA2表达负相关,即过表达let-7的细胞中HMGA2的表达下降,细胞增殖受到抑制。破坏HMGA2 3' UTR与let-7结合的靶位点则可促进肿瘤细胞生长。Takamizawa等<sup>[10]</sup>发现let-7表达上调的人肺腺癌细胞株A549生长受到抑制。通过Northern blot分析20个人类肺癌细胞株和2个永久人类正常肺上皮细胞株,正常肺上皮细胞株let-7表达水平与正常肺组织表达水平相近,而肺癌细胞株其let-7表达则明显受到抑制。相关研究亦表明,let-7表达下调的肺癌患者预后差,生存时间短。

### 1.2 MiR-17-92 与肺癌

MiR-17-92位于染色体13q31.3,miR-17-92过量表达和基因扩增在肺癌,尤其是小细胞肺癌发展过程中起十分重要的作用。MiR-17-92在肺癌早期表达升高,随着肺癌的发展表达下降。抑制miR-17-92表达可抑制肺癌细胞增殖并诱导细胞凋亡。Hayashita等<sup>[11]</sup>在19个肺癌细胞株中发现miR-17-92表达上调显著,尤其在小细胞肺癌中。Matsubara等<sup>[12]</sup>通过反义核苷酸技术抑制miR-17-5p和miR-20a的表达,从而诱导因过量表达miR-17-92的肺癌细胞凋亡。

### 1.3 其他 miRNA 与肺癌

甲基转移酶(DNMT)是DNA甲基化的关键酶,肺癌中该酶通常过量表达,患者预后差。Fabbri等<sup>[13]</sup>发现miR-29家族,该家族包括miR-29a、miR-29b、miR-29c,它们与DNMT3-A、B的表达呈负相关。在DNMT3-A、B高表达的肺癌患者中,miR-29家族表达显著下调。研究表明miR-29家族能够直接作用

于DNMT3-A、B的3' UTR的靶位点,抑制肿瘤细胞生长。若外源表达miR-29基因,肺癌细胞DNMT表达重新转化成正常模式,并能诱导肿瘤抑制因子FHIT和WWOX再表达,从而进一步抑制肿瘤生长。

Crk蛋白是一类接头蛋白,参与细胞信号转导、细胞黏附、增殖和迁移。这类蛋白表达上调的肺癌细胞其浸润能力增强。Crawford等<sup>[14]</sup>发现miR-126能作用于Crk的3' UTR。过表达miR-126的细胞中Crk表达下调,肺癌细胞黏附、迁移和浸润能力均下降。MiR-15a和miR-16位于染色体13q14,在细胞周期调节和细胞凋亡中发挥重要作用。Bandi等<sup>[15]</sup>发现在非小细胞肺癌(NSCLC)中,miR-15a和miR-16直接调控cyclinD1、D2以及E1表达。过表达miR-15a和miR-16的肺癌细胞在G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>期形成细胞阻滞,且miRNA引起的细胞周期阻滞依赖于肿瘤抑制基因——Rb的表达。Rb基因缺失的H2009细胞能抵抗miR-15a和miR-16引起的细胞周期阻滞,外源表达Rb基因则重新形成细胞周期阻滞。而在A549细胞中抑制Rb基因表达,则细胞周期阻滞不明显。

另外,肺癌细胞中有大量原癌基因表达,如MET、酪氨酸激酶受体、Pim-1等。Nasser等<sup>[16]</sup>发现miR-1能抑制这些原癌基因表达,影响肺癌细胞增殖、迁移等。MiR-1异位表达的A549细胞能在阿霉素作用下激活caspases-3和caspases-7表达,引起细胞凋亡。目前对肺癌浸润和转移机制了解甚少,Wang等<sup>[17]</sup>证实miR-183能抑制肺癌转移,过量表达miR-183的肺癌细胞转移和浸润能力下降。

## 2 MiRNA 与肺癌诊断、预后和治疗

### 2.1 MiRNA与早期诊断

基因诊断是从分子水平上检测与肿瘤相关的基因序列或其表达情况的改变,从而在早期发现肿瘤的一种诊断方法。由于miRNA在不同肿瘤中有其特定的表达模式,这为肿瘤诊断开拓了一条新思路。通过对人肺癌组织与正常组织miRNA表达谱的对比分析发现,特定miRNA表达水平均发生了变化。Lebanony等<sup>[18]</sup>发现miR-205在肺鳞癌诊断中具有很高的敏感性(96%)和特异性(90%),可作为肺鳞癌诊断的生物标记。Raponi等<sup>[19]</sup>应用交叉验证分析,证实miR-146b在诊断肺鳞癌时显示出很高精确性。Rabinowits等<sup>[20]</sup>比较27例肺腺癌患者和9例正常人之间miRNA浓度,发现两者之间差异显著,可作

为肺腺癌诊断依据。但由于同一 miRNA 可能在多种肿瘤中有相似表达,利用单一 miRNA 检测诊断肿瘤可能存在误差,利用多个 miRNA 检测可提高肿瘤诊断的正确率。Yu 等<sup>[21]</sup>利用 RT-PCR 分析 112 例 NSCLC 患者 miR-221、let-7a、miR-137、miR-372 和 miR-182 的表达情况,经统计分析后发现可以利用上述 miRNA 综合表达情况对患者进行诊断。越来越多的实验证据显示,miRNA 在肿瘤诊断中有较高的敏感性和特异性,可作为肿瘤早期诊断潜在生物标记。

## 2.2 MiRNA与预后

通过分析 miRNA 的表达情况,同样可用于肺癌患者的预后判断。Markou 等<sup>[22]</sup>用 RT-PCR 技术分析 48 例肺癌患者 miR-21 和 miR-205 的表达情况与预后之间的关系,发现 miR-21 过量表达与患者的生存时间呈负相关,miR-21 表达上调可以作为 NSCLC 患者生存时间的一个负面信号。Yanaiharu 等<sup>[23]</sup>利用 miRNA 芯片分析发现肺癌组织和正常肺组织之间分子信号存在差异,高表达 miR-155 和低表达 let-7a-2 的肺癌患者预后差,生存率低。单核苷酸多态性 (SNP) 广泛存在于基因组的研究中,这其中也包括大量 miRNA SNPs。Hu 等<sup>[24]</sup>研究证实 miRNA SNP 与 NSCLC 患者预后密切相关。他们通过分析 663 例 NSCLC 患者 SNP 发现,带有 miR-196a2 rs11614913 CC 位点的患者中位生存期明显小于 TT/TC 患者,在 I/II 期肺癌患者中差异更加显著。多元比例风险回归分析同时显示,带有 miR-196a2 rs11614913 CC 和 miR-149 rs2292832 TT 位点的患者预后差,死亡率显著高于其他基因型患者。除了 miRNA SNPs 会影响 miRNA 与靶位点之间相互作用外,研究显示 mRNA 3' UTR 的 SNP 也会影响其与对应 miRNA 之间的结合,从而改变蛋白表达量,增加或减少肺癌危险性。Chin 等<sup>[25]</sup>分析了 K-RAS 的 3' UTR 与 let-7 作用位点 LCS 发现,LCS6 SNP 能使肺癌危险性增加 2.3 倍。上述发现均提示我们 miRNA 在肿瘤预后判断中有潜在应用价值。

## 2.3 MiRNA与肺癌治疗

大量研究表明 miRNA 可作为抑癌基因或癌基因在肺癌发生发展过程中起作用。因此,针对前者可导入相应外源 miRNA,针对后者可采用多种方法下调或抑制相应 miRNA 表达。如将特异双链 RNA (dsRNA) 分子导入细胞内,经 Dicer 酶作用后,形成与 miRNA 相似的作用,从而起到抑制肿瘤生长甚

至诱导肿瘤细胞凋亡的作用。要使 miRNA 在体内持续高表达,则可将构建编码相应 miRNA 的 DNA 质粒转入细胞内,使其所携带的 miRNA 基因在细胞内表达。该方法转染效率较低,采用腺病毒或逆转录病毒作载体进行转染可提高转染效率,但病毒基因组会增加人类细胞感染病毒的潜在风险。除在细胞内诱导相关抑癌性 miRNA 表达外,还可采用反义 miRNA 技术抑制细胞内致癌性 miRNA 表达。Fei 等<sup>[26]</sup>采用反义 miRNA 研究其对 A549 细胞生长抑制情况,发现转染了 AMO-miR-21、AMO-miR-16 和 AMO-miR-181a 的 A549 细胞生长均受到抑制。Matsubara 等<sup>[12]</sup>利用特异反义寡核苷酸抑制 miR-17-5p 和 miR-20a 表达,引起转染肺癌细胞凋亡。

放疗是肿瘤治疗常用方法,但目前射线对基因表达改变机制尚不明确,限制了放疗在肿瘤治疗中的应用。Weidhaas 等<sup>[27]</sup>用微阵列技术和 RT-PCR 分析多种肺癌细胞放疗前后 let-7 家族表达情况,发现放疗前后肺癌细胞 let-7 家族表达发生显著改变。其中,let-7a 和 let-7b 在放疗 8 h 后明显下调,let-7g 在放疗 24 h 后显著上调。过表达 let-7a 和 let-7b 的肺癌细胞对辐射敏感性增强,细胞生长减慢。Let-7b 表达下调的肺癌细胞具有辐射防护作用。Let-7g 与 let-7a 和 let-7b 的作用相反,let-7g 表达下调细胞放射敏化,过表达的细胞具有辐射防护作用。而 Shin 等<sup>[28]</sup>比较电离辐射后 A549 细胞 miRNA 表达量,发现辐射前后 miRNA 表达发生变化。上述结果表明 miRNA 可能是放射敏感的潜在生物标记,人们可以通过改变肿瘤细胞中相关 miRNA 的表达量,增加肿瘤细胞对射线的敏感性,减少辐射量,增强对正常组织的保护。

化疗是肿瘤治疗中另一种常用方法,除了杀伤肿瘤细胞外,对正常组织也存在相当的杀伤作用,副作用极大。寻找化学药物敏感基因,增强肿瘤细胞对化学药物的敏感性,减少化学药物用量,降低化学药物对正常组织的损害已渐成为肿瘤研究的热点。Weiss 等<sup>[29]</sup>发现 miR-128b 杂合性丢失的肺癌细胞对表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR-TKI) 吉非替尼十分敏感,而 miR-128b 未丢失的肺癌细胞 H520 对吉非替尼敏感性不强。同时,临床病理研究证实,miR-128b 杂合性丢失的肺癌患者经吉非替尼治疗后,中位生存期为 23.4 个月,明显高于 miR-128b 未丢失患者的 10.5 个月。组蛋白去乙酰化抑制剂 (SAHA) 作为抗癌药物在临床上使用,研

究显示, NSCLC 患者对其具有明显抗药性。Lee 等<sup>[30]</sup> 分析比较 SAHA 处理前后 A549 细胞 miRNA 的表达差异, 发现经不同浓度 SAHA 处理后, 共有 64 个 miRNA 表达发生了变化(大于 2 倍)。这些研究成果为筛选药物敏感基因提供了新的研究方向, 同时开展调控相关 miRNA 表达与传统放化疗相结合的综合治疗, 将为肺癌治疗开辟新的治疗方向。

### 3 存在的问题与展望

大量研究表明, miRNA 的表达量变化与肿瘤发生和发展关系密切。利用微阵列技术可以发现癌组织和非癌组织之间 miRNA 表达量不同, 但目前还没有一种判断机制来明确定义两者之间的界限, 也没有一个标准来确切衡量癌症患者预后评估, 因此利用 miRNA 作为肿瘤诊断和预后判断尚存在缺陷。目前较为常用的检测 miRNA 靶基因的生物信息学方法也存在假阳性的情况。虽然 miRNA 在癌组织中和非癌组织中表达有差异, 利用相关技术来调节相应致癌性或抑癌性 miRNA 的表达可消除或部分消除这种表达差异带来的不利影响; 但如何提高 miRNA 基因治疗过程中的靶向性, 减少副反应, 增强 miRNA 的作用效率以及合理评价其安全性都是今后研究的重点和难点所在。

目前对于 miRNA 的研究大多局限于其对靶 mRNA 的调控, 对 miRNA 自身调控机制的研究甚少, miRNA 自身调控对肿瘤发生和发展的影响机制尚不明确。本研究室近来对 miRNA 在 NSCLC 发生发展中的自身调控机制以及预后中的价值分析进行了研究, 取得了初步进展。作为一类新型的标志分子, miRNA 在肺癌发生发展以及治疗和预后中的作用分析也将是今后研究的热点。

#### [参考文献]

- [1] Lee Y, Ahn C, Han JJ, et al. The nuclear Rnase Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003, 425(4): 415-9
- [2] Lund E, Guttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 2004, 303(2): 95-8
- [3] Lee Y, Jeon K, Lee JT, et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, 2002, 21(4): 4663-70
- [4] Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, et al. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analysis of RNAi. *Science*, 2001, 293(5532): 1146-50
- [5] Meltzer PS. Cancer genomics: small RNAs with big impacts. *Nature*, 2005, 435(7043): 745-6
- [6] Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, 2004, 304(5670): 594-6
- [7] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 2999-3004
- [8] Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, et al. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(10): 3903-8
- [9] Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev*, 2007, 21(9): 1025-30
- [10] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3753-6
- [11] Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*, 2005, 65(21): 9628-32
- [12] Matsubara H, Takeuchi T, Nishikawa E, et al. Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92. *Oncogene*, 2007, 26(41): 6099-105
- [13] Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(40): 15805-10
- [14] Crawford M, Brawner E, Batte K, et al. MicroRNA-126 inhibits invasion in non-small cell lung carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373(4): 607-12
- [15] Bandi N, Zbinden S, Gugger M, et al. *miR-15a* and *miR-16* are implicated in cell cycle regulation in Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 2009, 69(1): 5553-9
- [16] Nasser MW, Datta J, Nuovo G, et al. Down-regulation of micro-RNA-1(miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J Biol Chem*, 2008, 283(48): 33394-405
- [17] Wang G, Mao W, Zheng S. MicroRNA-183 regulates Ezrin expression in lung cancer cells. *FEBS Lett*, 2008, 582(25-26): 3663-8
- [18] Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, et al. Diagnostic assay based on has-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol*, 2009, 27(12): 2030-7
- [19] Raponi M, Dosssey L, Jatko T, et al. MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer. *Cancer Res*, 2009, 69(14): 5776-83
- [20] Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, et al. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer*, 2009, 10(1): 42-6
- [21] Yu SL, Chen HY, Chang GC, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell*, 2008, 13(1): 48-57
- [22] Markou A, Tsaroucha EG, Kaklamanis L, et al. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205

- overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clin Chem*, 2008, 54(10): 1696-704
- [23] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 2006, 9(3): 189-98
- [24] Hu Z, Chen J, Tian T, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest*, 2008, 118(7): 2600-8
- [25] Chin LJ, Ratner E, Leng S, et al. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res*, 2008, 68(20): 8535-40
- [26] Fei J, Lan F, Guo M, et al. Inhibitory effects of anti-miRNA oligonucleotides(AMOs) on A549 cell growth. *J Drug Target*, 2008, 16(9): 688-93
- [27] Weidhaas JB, Babar I, Nallur SM, et al. MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res*, 2007, 67(23): 11111-6
- [28] Shin S, Cha HJ, Lee EM, et al. Alteration of miRNA profiles by ionizing radiation in A549 human non-small cell lung cancer cells. *Int J Oncol*, 2009, 35(1): 81-6
- [29] Weiss GJ, Bemis LT, Nakajima E, et al. EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. *Ann Oncol*, 2008, 19(6): 1053-9
- [30] Lee EM, Shin S, Cha HJ, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid(SAHA) changes miRNA expression profiles in A549 human non-small cell lung cancer cells. *Int J Mol Med*, 2009, 24(1): 45-50