

文章编号: 1004-0374(2010)03-0262-05

· 评述与综述 ·

MicroRNA 与膀胱癌

王 刚

(浙江杭州市第一人民医院泌尿外科, 杭州 310006)

摘要: MicroRNA (miRNA) 是一类 21~23 个核苷酸长度的单链非编码小分子 RNA, 在转录后水平调节基因表达, 从而实现对组织发生、个体发育及肿瘤发生等生理病理过程的调节作用。膀胱癌是国人泌尿系统中最常见的肿瘤。研究表明, miRNA 参与了膀胱癌的发生、发展, 一些差异表达 miRNA 有望成为膀胱癌诊断、治疗的靶点。该文就 miRNA 在膀胱癌发病机理、诊断、治疗等方面的研究进展作一综述。

关键词: miRNA; 膀胱癌; 发病机理; 诊断; 治疗

中图分类号: Q522; R737.14 **文献标识码:** A

MicroRNA and bladder cancer

WANG Gang

(Division of Urology and Genomics Laboratory, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are 21-23nt regulatory, non-coding RNAs that are thought to control gene expression at the post transcriptional level. It was reported that miRNAs regulate a wide range of biological and pathological processes, including histogenesis, development and tumorigenesis. Bladder cancer is the most common urinary cancer in China. Growing evidences suggested that miRNAs were involved in the processes of bladder cancer carcinogenesis and progression. Some differential expressed miRNAs might serve as potential targets for bladder cancer diagnosis and treatment. This article reviews the current knowledge about the role of miRNAs in bladder cancer carcinogenesis, their potential role in improving diagnosis and therapeutics.

Key words: miRNA; bladder cancer; pathogenesis; diagnosis; treatment

膀胱癌是泌尿系统中最常见的肿瘤, 占全部恶性肿瘤的 1%~2%, 在国内其发病率和死亡率均占泌尿系肿瘤的首位, 且近年有增加的趋势。由于膀胱的解剖特点, 对膀胱癌的局部治疗容易顺利完成, 目前针对膀胱癌的综合治疗已使其 5 年生存率有所提高。但是许多膀胱癌临床患者诊断出时已有远处转移, 导致手术切除率低, 预后差。因此, 早期诊断与治疗可显著提高膀胱癌患者的存活率。对膀胱癌发病分子机理的深入研究将有助于实现这一目标。

微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是新近发现的、高度保守的、非蛋白编码的小 RNA, 在转录后水平抑制靶基因表达。miRNA 调节细胞的分化、增殖及凋亡, 并且在肿瘤的发生、发展中起

重要作用。近来研究表明, miRNA 有望被应用于膀胱癌的早期诊断、恶性程度分级以及指导治疗。此外, miRNA 还可能成为膀胱癌生物治疗的靶点。本文主要针对近来 miRNA 在膀胱癌中研究进展作一综述。

1 MiRNA 的生物学特性

MiRNA 是一类约 21~23 个核苷酸长度的单链非编码小分子 RNA。自 Ambros 研究组于 1993 年在线虫(*Caenorhabditis elegans*)中鉴定到第一个可调节发

收稿日期: 2009-08-24; 修回日期: 2009-09-14

基金项目: 浙江省杭州市科技局重点资助项目(200432959)

通讯作者: Tel: 0571-85331606; E-mail: wanggang451@gmail.com

育相关蛋白 LIN-14 表达的 miRNA *lin-4* 以来^[1], miRNA 被陆续发现在多种生物体内广泛存在, 在细胞活动、组织发生、个体发育及肿瘤发生等过程中发挥作用^[2], 具有重要的理论意义和潜在的实际应用价值。

细胞内的 miRNAs 由独立的基因编码, 是机体遗传信息的组成部分^[3]。miRNA 由 RNA 聚合酶 II 转录成 miRNA 初级转录体 (Pri-miRNA), 随后在核内被切割形成 miRNA 前体 (Pre-miRNA), 然后被转运至胞浆中加工形成成熟的 miRNA。成熟的 miRNA 以碱基互补配对的形式与靶 mRNA 结合, 通过诱导 mRNA 的切割降解、抑制翻译或其他形式的调节机制抑制靶基因的表达, 实现在转录后水平对基因表达的调控作用^[3]。

据分析, 人体内大约有 1 000 多种 miRNA, 约占人类基因组预测基因数的 1%~5%, 它们调节着大部分蛋白编码的基因和一部分非蛋白编码的基因。目前证据表明, 每个 miRNA 可调控多个位点, 每个 miRNA 可以调节数百到数千个目标基因的表达, 因此估计有 1/3 到 1/2 的蛋白质编码基因的表达受到 miRNA 的调节^[4]。同时一个目标基因也可受多个 miRNA 调节, miRNA 与其靶基因间从而形成一个复杂的调节网络, 实现对细胞及个体生命活动的调控。

2 MiRNA 在肿瘤中的作用

Calin 等^[5]于 2002 年报道在 68% 慢性淋巴细胞性白血病患者中 miR15 和 miR16 缺失或表达显著降低, 分析发现 miR15 和 miR16 在基因组中位于肿瘤中经常缺失的 13q14, 从而首次证明了 miRNA 异常与肿瘤密切相关。随着检测 miRNA 表达的高通量技术的不断发展以及与功能学分析相结合, 越来越多的 miRNA 被证实在肿瘤的发生发展中起着重要的作用。miRNA 在肿瘤中的深入研究将为肿瘤发病机理研究、诊断及治疗提供新的思路。

随着检测 miRNA 表达的高通量技术的不断发展, 研究者发现许多肿瘤组织/细胞中单个 miRNA 或 miRNA 表达谱发生显著改变, 大部分 miRNA 表达缺失或降低, 另外一些表达则升高。引起肿瘤中 miRNA 表达水平改变的原因可归纳为以下几类: (1) 染色体异常。Calin 等^[6]通过对 186 个 miRNAs 进行基因组定位分析显示, 98 个 miRNA 基因 (52.5%) 位于肿瘤相关的基因组区或脆性位点, 这些染色体片

段经常发生缺失、扩增、易位, 从而可能导致位于这些位点的 miRNA 表达异常; Zhang 等^[7]研究发现, 肿瘤组织中 miRNA 基因拷贝数异常, 且 miRNA 基因拷贝数改变与 miRNA 表达异常相关, 从而证实以上推测; 此外, miRNA 基因或附近 DNA 上的突变或单核苷酸多态性 (SNP) 也可影响 miRNA 的加工成熟, 从而影响其表达, 如 miR-15a/16-1 转录前体突变影响其表达^[8]。(2) 表观遗传修饰异常。除染色体异常外, miRNA 的表达还受表观遗传调控。研究表明, 基因组中 miRNA 基因多与 CpG 岛相邻; 正常细胞与增生细胞 miRNA 甲基化修饰存在显著差异^[9]; miRNA-127 在肿瘤细胞中低表达, DNA 甲基化抑制剂 5-杂氮-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-CdR) 及组蛋白去乙酰酶抑制剂 4 苯丁酸 (PBA) 处理可使其表达升高^[10]。以上实验均表明, 表观修饰异常在肿瘤组织 miRNA 差异表达中发挥重要作用。(3) miRNA 加工过程中关键蛋白的表达异常。如肺癌中 Dicer 表达水平的下调导致 miRNA 表达异常^[11]。

将肿瘤中低表达的 miRNA 转染至肿瘤细胞中表达, 或者利用化学合成 miRNA 互补链抑制肿瘤中高表达的 miRNA 的表达均可在体内外抑制肿瘤生长、迁移等活性, 表明这些差异表达的 miRNA 在肿瘤发生发展过程中起至关重要的作用, 这些 miRNAs 所起的作用类似于抑癌基因和癌基因的功能, 有研究人员将它们命名为“oncomirs”。作为抑癌基因的 miRNA 是通过抑制癌基因表达实现的, 作为癌基因的 miRNA 则是通过抑制抑癌基因实现的, 这些“oncomirs”为肿瘤治疗提供了新的靶点。

3 膀胱癌中差异表达的 miRNA 及在膀胱癌发生发展中的作用

近年来, miRNA 高通量检测手段, 尤其是 miRNA 芯片技术迅速发展。许多研究者将 miRNA 芯片技术用于筛选膀胱癌组织差异表达的 miRNA, 以期揭示 miRNA 在膀胱癌中的作用, 从而指导膀胱癌的诊断和治疗。至今为止, 高通量技术筛选并经 qPCR 验证的膀胱癌组织差异表达的 miRNA 总结见表 1。一些 miRNA 在膀胱癌中差异表达存在普遍性, 如许多研究均表明, miR-145 在膀胱癌中高表达。值得指出的是, 膀胱癌患者 miRNA 表达也存在个体差异, Wang 等^[12]对 7 例膀胱癌患者的癌组织与对应正常膀胱组织 miRNA 表达情况进行分析发现, 一例低分化癌症患者癌组织的 miRNA 表达变化

与另外六例患者显著不同, 该患者膀胱癌组织中下调的 miRNA 比其他患者少, 而且特定的表达上调的 miRNA 也与其他患者不同。

为明确上述筛选到的膀胱癌差异表达的 miRNA 在肿瘤生长中作用, 可以利用转基因的方法将其转染至肿瘤细胞内表达, 利用体内外的方法检测其对肿瘤细胞的促进或抑制效应, 从而明确这些 miRNA 发挥癌基因或抑癌基因的功能。在此基础上, 进一步筛选 miRNA 的靶基因, 可明确 miRNA 发挥作用的分子机理。总结已明确功能的膀胱癌组织差异表达 miRNA 见表 2。由表 2 可以看出, 目前深入研究的都是膀胱癌中低表达的 miRNA, 即作为抑癌基因的 miRNA, 膀胱癌中高表达的 miRNA 作为癌基因的功能需建立合适的方法进一步证实; 此外, 目前功能实验都是体外实验, 动物体内实验研究将得到

更令人信服的结果。

4 MiRNA 作为生物标记物用于膀胱癌的诊断与分级

通过以上对膀胱癌组织与正常组织的 miRNA 表达谱对比分析得到的差异表达的 miRNA 有望成为膀胱癌诊断的生物标记, 提高膀胱癌的诊断率。由于血液、尿液为临床常用检测标本, 易于获得, 因此进一步探索血液、尿液中 miRNA 的检测方法, 并比较膀胱癌患者与正常人血液、尿液中 miRNA 表达差异, 将可能建立临床膀胱癌诊断可行的方法。Hanke 等^[13]通过建立尿液 miRNA 收集方法, 并利用定量 PCR 对尿液 miRNA 差异表达进行分析, 发现在膀胱癌患者和正常人尿液中 microRNA-126: microRNA-152 的比值存在显著差异, 这将可能用

表 1 膀胱癌组织差异表达的 miRNA

膀胱癌样本及数目	对照样本及数目	膀胱癌中低表达的 miRNA	膀胱癌中高表达的 miRNA	参考文献
7 例膀胱癌患者的癌组织	7 例膀胱癌患者对应的正常膀胱组织	miR-26a、miR-29c、miR-30c、miR-30e-5p	无	[12]
9 例膀胱移行上皮癌患者癌组织混合物	9 例膀胱移行上皮癌患者对应正常膀胱组织混合物	miR-1、miR-101、miR-143、miR-145、miR-29c	miR-182、miR-183、miR-203、miR-224、miR-196a	[14]
膀胱癌细胞系 T24、SW780、HT1376、RT4 和 J82	永生型膀胱细胞系 HCV29 和 HU609	miR-455-5p、miR-143、miR-145、miR-126、miR-26a*、miR-125b、miR-498、miR-489、miR-503、miR-29a、miR-302b、miR-29c	miR-519e*、miR-193a-3p、miR-21、miR-20a、miR-198、miR-510、miR-184、miR-492	[15]
30 例 Ta 期、49 例 T1 期及 27 例 T2-T4 期膀胱癌患者的癌组织	11 例正常人膀胱组织			
104 例膀胱癌组织	31 例正常膀胱上皮组织	miR-145、miR-30a-3p、miR-133a、miR-133b、miR-195、miR-125b、miR-199a*	无	[16]
26 例膀胱癌患者的癌组织	26 例膀胱癌患者的癌旁正常膀胱组织	miRNA-143、miRNA-145、miRNA-125b、miRNA-199b	无	[17]
25 例膀胱上皮细胞癌组织	2 例正常人膀胱组织		无 miR-223、miR-26b、miR-221、miR-103-1、miR-185、miR-23b、miR-203、miR-17-5p、miR-23a、miR-205	[18]

表 2 初步明确功能的膀胱癌组织差异表达 miRNA

功能	miRNA 名称	功能实验	靶基因	参考文献
抑癌基因	miR-101	细胞增殖实验及克隆形成实验	组蛋白甲基转移酶 <i>EZH2</i> 基因	[14]
抑癌基因	miR-129	细胞增殖实验	<i>SOX4</i> 、 <i>GALNT1</i> 等一系列基因	[15]
抑癌基因	miR-30-3p、miR-133a、miR-199a*	细胞增殖实验	<i>Keratin7 (KRT7)</i> 基因	[16]
抑癌基因	miRNA-143	细胞增殖实验	<i>Ras</i> 基因	[17]

于膀胱癌的无创性诊断。

有研究表明,膀胱癌发展的不同阶段以及不同类型膀胱癌间均有自己特有的 miRNA 表达谱,因此 miRNA 可以用于指导膀胱癌恶性程度的分级及分型。Veerla 等^[19]通过对 34 例分级分别为 Ta、T1、T2-T3 的膀胱癌组织的 miRNA 谱进行比较,发现不同分级的膀胱癌均有自己特异的 miRNA 表达谱;肌层浸润型膀胱癌与非肌层浸润型膀胱癌存在 51 个 miRNA 差异表达,在肌层浸润型膀胱癌中 miR-222 和 miR-125b 显著升高,提示 miR-222 和 miR-125b 可用于指导膀胱癌是否具有肌层浸润的区分。Neely 等^[20]对 28 例浅表性膀胱癌和 25 例侵袭性膀胱癌组织 miRNA 表达谱进行分析发现,侵袭性膀胱癌组织 miR-21: miR-205 比值显著高于浅表性膀胱癌组织,表明 miR-21: miR-205 比值可用于区分膀胱癌是否具有侵袭性。

5 MiRNA 作为膀胱癌治疗的新的靶点

MiRNA 在肿瘤中的异常表达以及异常表达的 miRNA 靶基因的鉴定为我们提供新的肿瘤治疗靶标。目前认为可以通过以下几种方法调节 miRNA 表达,从而可能起到治疗肿瘤的作用:(1)利用药物抑制作为癌基因的 miRNA 的表达;(2)通过转染作为癌基因的 miRNA 互补链(又称为抗-miRNA 寡核苷酸链, anti-miRNA oligonucleotides, AMOs),抑制癌基因 miRNA 的效应;(3)促进作为抑癌基因的 miRNA 的表达;(4)由于 miRNA 表达受表观修饰的调控,因此可以利用改变染色质修饰的药物调节 miRNA 表达。

目前已有针对 miRNA 的膀胱癌治疗的探索性研究报告。如前所述, Saito 等^[10]研究发现, miR-127 位于 CpG 岛内,在膀胱癌细胞系 T24 中低表达, DNA 甲基化抑制剂 5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)及组蛋白去乙酰酶抑制剂 4 苯丁酸(PBA)处理可使其表达升高,并使其靶基因 BCL6 表达降低。Saito 等^[21]发现膀胱癌组织中 miR-126 表达显著降低, 5-Aza-CdR 及 PBA 处理可引起包括膀胱癌细胞系 T24 在内的多种肿瘤细胞 miR-126 附近 CpG 岛 DNA 甲基化降低,从而引起 miR-126 表达的升高。这些探索性研究为针对 miRNA 的膀胱癌治疗提供线索。

6 总结与展望

随着对 miRNA 癌基因和抑癌基因功能研究的不断深入,为肿瘤的基础与临床研究提供崭新的平

台。但总体来看, miRNA 在膀胱癌中的研究还处于起步阶段: miRNA 在膀胱癌发生发展中的作用及分子机制有待深入研究,包括通过功能学试验明确 miRNA 在肿瘤发生发展中具体作用、miRNA 的靶蛋白或靶基因的确定等;将 miRNA 用于膀胱癌临床诊断、分期及指导治疗方面也处于摸索阶段,最重要的是明确膀胱癌中特异表达的 miRNA 或 miRNA 谱,标本收集及检测的方法也有待建立。我们相信,上述问题的解决,不仅有利于我们对肿瘤发生发展机制的了解,还为膀胱癌的诊断、治疗和预后提供有力工具。

[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*. *Cell*, 1993, 75 (5): 843-54
- [2] Osada H, Takahashi T. MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2007, 28 (1): 2-12
- [3] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116 (2): 281-97
- [4] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, 120 (1): 15-20
- [5] 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (24): 15524-9
- [6] 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
- [7] Zhang L, Huang J, Yang N, et al. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (24): 9136-41
- [8] Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2005, 353 (17): 1793-801
- [9] Weber B, Stresmann C, Brueckner B, et al. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*, 2007, 6 (9): 1001-5
- [10] Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*, 2006, 9 (6): 435-43
- [11] Karube Y, Tanaka H, Osada H, et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*, 2005, 96 (2): 111-5
- [12] Wang G, Zhang H, He H, et al. Up-regulation of microRNA in bladder tumor tissue is not common. *Int Urol Nephrol*, 2009, [Epub ahead of print]
- [13] Hanke M, Hoefig K, Merz H, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126

- and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol*, 2009, [Epub ahead of print]
- [14] Friedman JM, Liang G, Liu CC, et al. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer Res*, 2009, 69 (6): 2623-9
- [15] Dyrskjot L, Ostenfeld MS, Bramsen JB, et al. Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death *in vitro*. *Cancer Res*, 2009, 69 (11): 4851-60
- [16] Ichimi T, Enokida H, Okuno Y, et al. Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer. *Int J Cancer*, 2009, 125 (2): 345-52
- [17] Lin T, Dong W, Huang J, et al. MicroRNA-143 as a tumor suppressor for bladder cancer. *J Urol*, 2009, 181 (3): 1372-80
- [18] Gottardo F, Liu CG, Ferracin M, et al. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol*, 2007, 25 (5): 387-92
- [19] Veerla S, Lindgren D, Kvist A, et al. MiRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31. *Int J Cancer*, 2009, 124 (9): 2236-42
- [20] Neely LA, Rieger-Christ KM, Neto BS, et al. A microRNA expression ratio defining the invasive phenotype in bladder tumors. *Urol Oncol*, 2009, [Epub ahead of print]
- [21] Saito Y, Friedman JM, Chihara Y, et al. Epigenetic therapy upregulates the tumor suppressor microRNA-126 and its host gene EGFL7 in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379 (3): 726-31