

MicroRNAs作为大肠癌生物标志物的研究进展

杨建军, 马延磊, 秦环龙

■背景资料

大肠癌(CRC)是临床最常见的恶性肿瘤之一,其发生是一个多因素、多阶段和多基因改变协同作用的过程。近年来研究发现miRNAs在CRC中的表达广泛失调。因此,利用CRC组织和血液中的miRNAs可较准确地诊断大肠癌的存在,并帮助判断CRC临床病理特征及预测疾病复发。而有关miRNAs如何参与肿瘤化疗的研究则为CRC的治疗提供了又一有力工具。

杨建军, 马延磊, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院外科上海市 200233

上海市科委基金资助项目, No. 07DZ19505

作者贡献分布: 本文综述由杨建军与马延磊完成; 秦环龙审校。

通讯作者: 秦环龙, 教授, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院普外科. huanlong_qin@live.cn

电话: 021-64361349 传真: 021-64368920

收稿日期: 2009-12-11 修回日期: 2010-01-12

接受日期: 2010-01-19 在线出版日期: 2010-02-28

MicroRNAs as biomarkers for colorectal cancer: recent advances

Jian-Jun Yang, Yan-Lei Ma, Huan-Long Qin

Jian-Jun Yang, Yan-Lei Ma, Huan-Long Qin, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China
Supported by: the Science and Technology Program of Shanghai City, No. 07DZ19505

Correspondence to: Professor Huan-Long Qin, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China. huanlong_qin@live.cn

Received: 2009-12-11 Revised: 2010-01-12

Accepted: 2010-01-19 Published online: 2010-02-28

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are a class of short non-coding RNAs (19-24 nucleotides in length). They can inhibit protein translation and induce degradation of target mRNAs, and thus play an important role in the regulation of gene expression. Recent studies have identified miRNAs in colorectal cancer (CRC) tissue and blood that may help accurately diagnose the presence of CRC, predict disease recurrence, and evaluate clinical and pathological features of CRC. Overexpression and silencing of specific miRNAs are associated with the development and progression of CRC. The differential expression of miRNAs in CRC tissue and blood offer the prospect for their use in early detection and screening of the disease. In addition, miRNAs may be important targets for gene therapy of CRC. In this paper, we will review the potential role of miRNAs as biomarkers for diagnosis and treatment of CRC.

■同行评议者

杜雅菊, 主任医师, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科; 颜宏利, 教授, 中国人民解放军第二军医大学遗传学教研室

Key Words: MicroRNA; Colorectal cancer; Biomarker

Yang JJ, Ma YL, Qin HL. MicroRNAs as biomarkers for colorectal cancer: recent advances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 568-575

摘要

MicroRNAs(miRNAs)是一种短链(19-24个核苷酸)非编码RNA,可抑制蛋白质翻译或其靶基因mRNAs的降解,因而在基因表达调控中发挥重要作用。最近的研究发现存在于大肠癌(colorectal cancer, CRC)组织和血液中的miRNAs可较准确地诊断大肠癌的存在,并帮助判断CRC临床病理特征及预测疾病复发。特异miRNAs的过表达和沉默与CRC的发生发展相关,且其在CRC组织和血液中的差异表达为早期筛选和诊断CRC提供了应用前景。另外,miRNAs可能成为CRC基因治疗的重要靶点。本文将就miRNAs作为生物标志物在CRC诊治中的潜在作用作一综述。

关键词: miRNAs; 大肠癌; 生物标志物

杨建军, 马延磊, 秦环龙. MicroRNAs作为大肠癌生物标志物的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(6): 568-575
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/568.asp>

0 引言

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是一个多基因、多阶段、长期形成的复杂的病变过程,早期诊断,及时监测肿瘤复发和有效治疗对CRC患者的预后意义重大。近年来已发现许多microRNAs(miRNAs)存在于CRC肿瘤组织和血液中,并在CRC的发病机制中起重要作用。这为提高CRC的早期筛查,早期诊断,治疗效果及准确判断预后提供了一个全新的视角。

1 miRNAs的生物学特征,生物合成及其作用机制

1.1 miRNAs的生物学特征 大量研究发现miRNAs具有许多共同的生物学特征^[1]: (1)具有高度保守性、时序性和组织特异性; (2)以单拷

贝、多拷贝或基因簇等多种形式存在于基因组中(但大多数为基因簇形式), 他们多以顺反子形式转录出前体转录产物, 且位于独立的转录单位中. 人类miRNAs基因分布于除Y之外的所有染色体中, 且绝大部分位于基因间隔区, 也有少数存在于已知基因内含子中; (3)广泛存在于真核生物中, 本身不具有开放阅读框, 是一组不编码蛋白质的短序列RNAs; (4)几乎均为单链结构, 而与其作用相似的成熟siRNA则是双链结构; (5)由核酸酶Dicer作用于前体双链生成含有3'羟基和5'磷酸的核苷酸片段, 这一特点使他与大多数寡核苷酸和功能性RNA的降解片段区别开来. 目前对miRNAs的研究还处于起步阶段, 更多生物学特性的进一步发现, 将有助于加深对miRNAs功能的认识.

1.2 miRNAs的生物合成和作用机制 miRNA在体内的形成最初始于RNA聚合酶的转录, 其产物为Pri-miRNA(primary miRNA)的前体分子. Pri-miRNA在核糖核酸酶Drosha的作用下, 剪切为具有茎环结构的约70个核苷酸长度的miRNA前体(Pre-miRNA). Pre-miRNA在Ran-GTP依赖的核质转运蛋白Exportin-5的作用下从核内运输到胞质中. 在Dicer酶的作用下, miRNAs前体被剪切成21-25个核苷酸长度的单链miRNA, 并结合到RNA诱导的基因沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)中, 形成非对称RISC复合物. 该复合物与靶mRNA相结合来发挥其基因调控作用^[2-4].

目前miRNAs确切的作用机制还不是很清楚. 研究表明miRNAs以不同方式下调基因表达, 若miRNAs与其靶mRNAs在开放阅读框中以完全互补的方式结合, mRNAs将发生特异性降解; 若miRNAs在mRNAs的3'端非翻译区(3'UTR)以部分互补的方式与mRNAs结合, 则仅抑制其翻译而不影响mRNAs稳定性^[5]. 通常一种miRNA可与多种mRNAs靶点相作用, 多种miRNAs也可以与一种mRNA相作用. mRNAs的3'UTR包含多个miRNAs的作用位点, 且和抑制翻译的程度有关, miRNAs结合的位点越多, 抑制的程度就越大. 由此形成复杂而又精确的调节网络, 调控着生物体的基因表达和生理功能, 一旦miRNAs的表达水平失调, 可导致包括肿瘤在内的多种疾病发生.

2 miRNAs在CRC细胞生长、凋亡、侵袭和转移中的作用

目前的研究证实miRNAs在肿瘤的发生发展中

发挥着非常重要的调节作用, 约半数miRNAs的上游基因位于染色体上与肿瘤相关的区域中. 根据miRNAs在肿瘤发病中作用的不同, 有人提出了“癌miRNAs(OncomiRs)与抑癌miRNAs(tumor suppressing)”的观点^[6-8], 即miRNAs在肿瘤的发生与发展过程中既可扮演癌基因也可扮演抑癌基因的角色. 在肿瘤组织中表达上调的miRNAs可能起到癌基因的作用, 表达下调的miRNAs可能起到抑癌基因的作用. 在CRC中也常存在特定miRNAs的过表达或表达沉默, 这些miRNAs表达的失调常与CRC肿瘤细胞生长、凋亡、侵袭和转移相关联.

最近, Borralho等^[9]在结肠癌细胞系HCT116中瞬时过表达miR-143导致细胞活力减少约60%, 而使用G418抗生素筛选的miR-143过表达细胞系暴露于5-氟尿嘧啶(5-FU)后, miR-143表达的增加与细胞活力减少及细胞凋亡增加相关联. 研究还证实以上改变与核碎裂及caspase-3、-8和-9活性的增加有关. 另外, miR-143可导致细胞外调节蛋白激酶5, NF- κ B和Bcl-2蛋白的表达下调, 而当暴露于5-FU后其表达下调更加明显. 这提示miR-143可能作为抑癌基因参与调节细胞生长, 细胞凋亡和某些化疗反应关键蛋白, 并增加结肠癌细胞系对5-FU的敏感性. Chen等^[10]也发现在转染了miR-143的结肠癌细胞系LoVo中, KRAS(miR-143的作用靶点)的表达显著降低, 而转染miR-143特异性抑制剂则增加LoVo细胞系中KRAS蛋白的表达水平. 使用miR-143抑制剂处理过的LoVo细胞系表现出更强的增殖能力. 这说明miR-143可通过抑制KRAS的翻译来抑制CRC细胞系生长. Guo等^[11]则报道了miR-126的缺失可促进结肠癌细胞系的生长.

miRNAs对调节细胞分化和维持干细胞可塑性状态极为重要. Monzo等^[12]评估了miRNAs在人类胚胎结肠组织, CRC及与其相匹配的正常结肠组织中的表达水平. 结果发现miR-17-92簇与其靶点E2F1在结肠组织生长及癌变中显示了相似的表达形式, 并均可促进细胞增殖. 提示miRNAs在胚胎发育和结肠上皮肿瘤转化中起重要作用.

抑癌基因表达下调与CpG岛启动子区甲基化紧密相关, 而miRNAs的表达也受到包括启动子区异常甲基化或组蛋白修饰等不同表观遗传机制的调控. hsa-miR-342的表达通常与其宿主基因EVL一致, 且EVL上游的CpG岛甲基化导致hsa-miR-342表达沉默. 进一步研究发现在86%

■研究前沿

利用miRNAs表达谱筛选并鉴定CRC的诊断标志物, 是当前CRC研究中的热点. 而以癌基因或抑癌基因身份参与CRC发病的miRNAs数量众多, 这就为随后的验证工作设置了较大障碍, 如何在大量的候选标志物中找到真正有效的诊断标志物, 还需研究者们进一步深入探究.

■相关报道

Huang等使用实时RT-PCR检测晚期大肠肿瘤(包括癌和晚期腺瘤)患者及健康对照组患者血清中12个miRNAs的表达水平,发现血清miR-29a和miR-92a对晚期肿瘤具有重要的诊断价值。

的大肠腺癌和67%的大肠腺瘤中存在EVL/hsa-miR-342位点的甲基化,提示EVL/hsa-miR-342的甲基化是CRC发生的早期事件。此外,CRC患者癌旁正常黏膜甲基化出现频率为56%,而在非CRC患者的正常黏膜中仅为12%。hsa-miR-342在CRC细胞系HT-29中的重组可诱导凋亡,提示他可作为促凋亡的抑癌基因起作用^[13,14]。位于CpG岛的miRNAs(hsa-miR-9, hsa-miR-124, hsa-miR-129, hsa-miR-137和hsa-miR-149)在CRC组织标本中表达下调。其中hsa-miR-9-1, hsa-miR-129-2和hsa-miR-137的CpG岛甲基化常仅存在于CRC细胞系和原发性CRC肿瘤中^[15]。Toyota等^[16]研究发现miR-34b和miR-34c在CRC中发生表观沉默,即miR-34b/c表达下调与邻近的CpG岛超甲基化相关。miR-34b/c CpG岛甲基化常存在于CRC细胞系(9/9, 100%)和原位CRC肿瘤(101/111, 90%)中,而不存在于正常结肠黏膜中。提示miR-34b/c是CRC中新的抑癌基因,且miR-34b/c CpG岛是CRC中表观沉默的重要靶点。

Schimanski等^[17]利用瞬时转染miR-196a的大肠癌细胞系SW480做体外不同功能和体内肺转移模型分析,发现miR-196a以剂量依赖和基因特异的形式抑制其靶点HoxA7, HoxB8, HoxC8和HoxD8表达。高表达水平的miR-196a不仅可活化AKT信号通路,还可促进癌细胞分离,迁移,侵袭并增强化疗敏感性,但不影响细胞增殖和凋亡。此外,miR-196a可增加CRC的肺转移。提示miR-196a在CRC中可作为癌基因而起作用。Asangani等^[18]将miR-21转染结肠癌细胞系Colo206f可显著抑制包含抑癌基因Pdc4-3'-UTR的荧光素酶报告基因,而转染抗miR-21的结肠癌细胞系RKO中的Pdc4蛋白表达增加且侵袭性降低。此外,这些细胞的血管内渗和肺转移均减少。相反,miR-21在Colo206f中的过表达显著减少Pdc4蛋白的表达并增加细胞侵袭性,而Pdc4 mRNA的表达未发生改变^[19]。提示miR-21可在转录后水平下调Pdc4并刺激CRC的侵袭,血管内渗和转移。另外,Hu等^[20]发现miR-141可通过调节Smad相互作用蛋白1的表达水平来抑制CRC细胞迁移和侵袭。

3 miRNAs在CRC组织中的表达

最近,许多基于CRC组织中miRNAs表达谱的研究试图明确其在CRC发生发展中的作用^[21-27](表1)。Diosdado等^[26]使用实时RT-PCR测定55个CRC和10个健康对照者组织中miR-17-92簇的

表达水平及48个肿瘤组织中c-Myc mRNA的表达水平。结果发现除了miR-17-92簇中的miR-18a外,其余5个(miR-17, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1和miR-92a-1)均在CRC肿瘤组织中表达增加(相比于正常组织)。c-Myc和miR-17-92簇的表达显著正相关,提示c-Myc转录活性可影响miR-17-92簇的表达,从而间接促进CRC发展。Arndt等^[21]利用MirVana miRNA Bioarrays检测8个CRC细胞系模型,45个不同分期的CRC组织及其相匹配的正常结肠组织中的miRNAs表达谱。结果从中鉴定了37个差异表达的miRNAs,其中一些miRNAs表达改变(包括miR-133a表达缺失和miR-224表达增加)与CRC进展相关联。此外,还有11个差异表达miRNAs共存于CRC和正常结肠组织及CRC细胞系中。使用基因组富集分析鉴定与信号通路相关的差异表达miRNAs,并分析转移和非转移性同源细胞系的基因表达,发现参与细胞周期和神经调节蛋白通路的miR-145靶点在转移性细胞系中显著下调。这提示在不同阶段的CRC中,表达变化的miRNAs可作为CRC潜在的诊断和预后标志物。Ng等^[25]研究发现,miR-143在87.5%(35/40)的CRC组织中表达下调。恢复结肠癌细胞系中miR-143的表达水平可减少肿瘤细胞生长和软琼脂集落形成,并下调其靶点DNA甲基转移酶3A(DNA methyltransferase 3A, DNMT3A) mRNA和蛋白表达水平,提示miR-143在CRC中可通过调节DNMT3A来抑制肿瘤发生发展。Yamamichi等^[27]对39个CRC和34个大肠息肉组织标本鉴定发现,miR-21在CRC中的表达水平高于正常结肠黏膜,且其高表达也见于肿瘤相关间质成纤维细胞中。据此推测肿瘤分泌的细胞因子可诱导miR-21的表达。miR-21与其靶点PDCD4(肿瘤抑制蛋白)的表达负性相关。虽然miR-21表达上调常见于癌前腺瘤中,但其在腺瘤中的表达水平远高于非致瘤性息肉。在癌前腺瘤到晚期癌期间,miR-21的表达频率和程度显著增加。Motoyama等^[28]使用包含455个人类miRNAs探针的微阵列及实时RT-PCR测定CRC和癌旁正常组织中的miRNAs表达谱,发现共有21个miRNAs在CRC组织中过表达,其中miR-31, miR-183, miR-17-5p, miR-18a, miR-20a和miR-92在CRC组织中的表达水平高于癌旁正常组织($P<0.05$)。而miR-143和miR-145在CRC组织中的表达水平远远低于癌旁正常组织($P<0.05$)。Ba等^[29]在15对配对结肠癌

表 1 microRNA在CRC组织及癌旁正常组织中的差异表达

microRNA	表达水平(CRC中)	染色体定位	参考文献
miR-18a	上调	13q31.3	[21,23,10]
miR-29b	上调	1q32.2或7q32.3	[21,24,12]
miR-93	上调	7q22.1	[21,22,10]
miR-25	上调	7q22.1	[21,12,10]
miR-182	上调	7q32.2	[21,24,12]
miR-96	上调	1q32.2或7q32.2	[21,24,12]
miR-183	上调	7q32.2	[21,24,12]
miR-29a	上调	7q32.3	[21,24,12]
miR-135a	上调	3p21.1或12q23.1	[22,24,12]
miR-221	上调	Xp11.3	[23,12,10]
miR-200b	上调	1p36.33	[24,12,10]
miR-200c	上调	12p13.31	[24,12,10]
miR-155	上调	21q21.3	[24,12,10]
miR-19a	上调	13q31.3	[21,23,24,10]
miR-20a	上调	13q31.3	[21,22,3,10]
miR-17-5p	上调	13q31.3	[21,22,12,10]
miR-106b	上调	7q22.1	[21,22,23,10]
miR-31	上调	9p21.3	[21,24,12,10]
miR-224	上调	Xq28	[21,23,24,12]
miR-222	上调	Xp11	[22,23,12,10]
miR-210	上调	11p15.5	[21,24,12,10]
miR-223	上调	Xq22	[22,23,12,10]
miR-17-3p	上调	13q31.3	[23,24,12,10]
miR-203	上调	14q32.33	[21,22,24,12,10]
miR-21	上调	17q23	[21,22,24,12,10]
miR-34a	上调	1p36.22	[21,22,24,12,10]
miR-181b	上调	1q31.1或9q33.3	[21,22,24,12,10]
miR-95	上调	4p16.1	[21,22,23,24,12]
miR-92	上调	13q31.3或Xq26.2	[22,23,24,12,10]
miR-106a	上调	Xq26.2	[21,22,23,24,12,10]
miR-143	下调	5q32-33	[21,25,10]
miR-30c	下调	1p34.2或6q13	[21,24,12]
miR-1	下调	18q12.3或20q13.33	[21,22,10]
miR-195	下调	17p13	[21,12,10]
miR-204	下调	9q21.12	[24,12,25]
miR-214	下调	1q23	[24,12,10]
miR-137	下调	1p21.3	[24,12,25]
miR-149	下调	2q37.3	[24,12,10]
miR-100	下调	11q24.1	[24,12,10]
miR-26a	下调	3p22.2或12q14.1	[12,25,10]
miR-125b	下调	11q24.1或21q21.1	[12,25,10]
miR-30a-3p	下调	6q13	[21,22,24,12]
miR-125a	下调	19q13.41	[21,12,25,10]
miR-133a	下调	18q11.或20q13.33	[21,24,12,25]
miR-139	下调	11q13.4	[21,24,12,10]
miR-145	下调	5q32	[24,12,25,10]

■创新盘点

本文综述了miRNAs的生物学特征及作用机制,并重点介绍了其在CRC细胞生长、凋亡、侵袭和转移中的作用,在CRC组织及外周血中的表达,以及与CRC的临床病理特征、预后及复发、化疗反应性的关系,其他文献并未系统总结近年来miRNAs在CRC中的表达及明确其重要的临床意义。

和正常癌旁组织中筛选鉴定出200多个miRNAs,其中有132个同时表达于结肠癌和癌旁正常组织,而结肠癌组织中有47个miRNAs表达下调。

miRNAs在CRC中的差异表达,提示其与结肠癌的发生发展紧密联系,有可能成为诊断CRC的有希望的生物标志物。

■应用要点

特异miRNAs的过表达和沉默与CRC的发生发展相关,且其在CRC组织和血液中的差异表达为早期筛选和诊断CRC提供了应用前景,同时开辟了CRC治疗的新途径与新思路。

4 miRNAs与CRC临床病理特征之间的关系

近年来研究发现,miRNA的表达水平除了在肿瘤与正常组织之间的差别之外,在不同的肿瘤类型,肿瘤分期及其他临床相关变量下均有不同的特征。Wang等^[30]应用实时RT-PCR检测并分析了miR-31, miR-143和miR-145在98个原发性CRC及配对癌旁组织标本中的表达及其与临床病理特征之间的关系。结果显示miR-31在CRC中的表达水平高于正常结肠黏膜($P = 0.001$),且其表达与晚期TNM分期($P = 0.026$)和更深的肿瘤浸润程度正相关($P = 0.024$)。miR-145在结肠癌($P = 0.001$)和直肠癌($P = 0.012$)中表达均下调,而miR-143仅在结肠癌中表达下调($P = 0.023$)。除了miR-145的表达与肿瘤部位相关外($P = 0.03$),miR-143和miR-145与其他临床病理特征之间无关联($P > 0.05$)。Díaz等^[31]发现miR-17-5p和miR-106a的表达改变与CRC患者预后生存相关联。miR-106a表达下调预示了更短的无病生存期(disease-free survival, DFS)和总存活数(overall survival, OS)(分别为 $P = 0.03$ 和 $P = 0.04$)。在CRC早期阶段,miR-17-5p与DFS相关联。miR-17-5p和miR-106a的表达水平与其共同靶点E2F1的表达负相关(分别为 $P = 0.04$ 和 $P = 0.03$),而miR-126与其宿主基因EGFL7的表达无相关性。miR-106a的表达失调提示其可作为独立于肿瘤分期的DFS和OS标志物。Slaby等^[32]的研究则发现,肿瘤组织中(相比于癌旁正常组织)miR-21($P = 0.0001$)和miR-31($P = 0.0006$)表达上调,miR-143($P = 0.011$)和miR-145($P = 0.003$)表达下调。高表达的miR-21与CRC患者淋巴结阳性率($P = 0.025$)及远处转移($P = 0.009$)相关,且其表达水平与CRC临床分期相关($P = 0.032$)。而低表达的miR-143($P = 0.006$)和miR-145($P = 0.003$)常存在于最大直径 >50 mm的肿瘤中。另外,以上miRNAs与血清CEA的表达水平不相关。另有研究发现 miR-31的表达水平与CRC肿瘤分期相关^[23], hsa-miR-9-1的甲基化状态与淋巴结转移相关^[15],而miR-18a过表达的CRC患者比其低表达患者的临床预后更差($P = 0.07$)^[28]。

目前,40岁以下患者早发CRC的原因仍不清楚。最近,Yantiss等^[33]评估了24个 <40 岁的CRC患者(实验组)和45个 ≥ 40 岁的CRC患者(对照组)组织中miR-21, miR-20a, miR-183, miR-192, miR-145, miR-106a, miR-181b和miR-203的表达水平,发现miR-21, miR-20a, miR-145, miR-181b和miR-203的表达水平显著增加。提示miRNAs

对早发CRC的发生发展起促进作用。

5 miRNAs在CRC患者外周循环血中的表达

因miRNAs存在于体液(尤其是血清),所以有可能成为有用的临床标志物。最近的研究显示肿瘤源性miRNAs可以非常稳定地存在于人类血清中(因受内源性核糖核酸酶的保护),且其表达水平足以供临床检测使用^[34]。Huang等^[35]使用实时RT-PCR检测晚期大肠肿瘤(包括癌和晚期腺瘤)患者及健康对照组患者血清中12个miRNAs的表达水平,发现血清miR-29a和miR-92a对晚期肿瘤具有重要的诊断价值。两者在鉴别CRC和正常对照组时分别具有0.844和0.838的接受者操作特征曲线下面积(area under receiver operating characteristic curve, AUC)。更重要的是,这两个miRNAs在鉴别晚期腺瘤和正常对照组时也分别具有0.749和0.769的AUC。联合使用这两个miRNAs的受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)鉴别CRC和晚期腺瘤时,AUC分别为0.883和0.773,且分别具有83.0%和73.0%的敏感性及84.7%和79.7%的特异性。这些数据提示血清miR-29a和miR-92a作为新的无创性生物标志物,在早期诊断CRC时具有巨大的潜力。Ng等^[24]发现CRC和健康对照组中有5个差异表达miRNAs(miR-135b, miR-95, miR-17-3p, miR-92, miR-222)在血清和组织中表达均上调,进一步验证发现miR-17-3p和miR-92在25个CRC患者和20个健康对照者血清中表达显著增加($P < 0.0005$),而在10个术后CRC患者血清中他们的表达显著降低($P < 0.05$)。另外,利用miR-92的不同表达水平可区分CRC患者与胃癌患者,炎性肠病患者和正常受试者,miR-92的AUC为88.5%。在临界值为240时,miR-92鉴别诊断CRC和对照组的敏感性和特异性分别为89%和70%。提示miR-92在CRC患者血清中显著增高,有可能成为CRC筛查诊断的生物标志物。Chajut等^[36]利用定量RT-PCR检测10个健康对照者和10个CRC患者血清中350多个miRNAs的表达水平,发现一些miRNAs在CRC患者和健康对照者血清中的表达水平显著不同。进一步对其中22个miRNAs在大样本人群(共118个CRC患者和健康对照者)中检测,结果提示循环血miRNAs有可能成为诊断CRC的有希望的标志物。

血浆和血清miRNAs的表达水平显著相关,提示他们均可用来研究miRNAs在外周血中的表达。现已在健康受试者血中鉴定出超过100个

miRNAs, 这个表达谱明显不同于含有肿瘤特异性miRNAs的CRC患者. Chen等^[37]发现相比于健康对照组, 有69种miRNAs仅存在于CRC患者血清中. 进一步鉴定发现14个仅存在于CRC(而非其他癌症组, 如肺癌等)患者血清中的miRNAs独特表达谱. 对产妇血清中胎盘miRNAs的检测发现其表达水平随着胎龄的增加而增加, 提示miRNAs可作为不同生理和病理环境中的生物标志物^[38]. 肿瘤特异性miRNAs的重叠性和差异性表达表明单个miRNA诊断CRC的敏感性较低, 若能针对年龄相匹配的正常人、有早期病变的患者(如腺瘤)及不同阶段CRC患者建立一组外周循环血中miRNAs的差异表达谱, 即有望实现对早期病变和不同阶段CRC的准确诊断与评估.

6 miRNAs对CRC预后及复发的影响

最近对miRNAs的研究显示, 一些miRNAs与CRC无复发生存率相关, 因此可作为CRC的预后及预测其复发的生物标志物. Schepeler等^[39]在10个正常黏膜组织和49个II期结肠癌组织中鉴定出315个差异表达的miRNAs, 其中miR-145在肿瘤组织中表达最低. 另外, 37个高表达miR-320或miR-498的II期结肠肿瘤患者(中位生存期为75 mo)的无进展生存期显著不同于低表达miR-320或miR-498的患者. 对肿瘤进行年龄, 性别, 肿瘤分期, 分化和组织分级的分层分析发现, 这两个miRNAs是无复发生存率的独立预测因子. 联合17个miRNAs表达谱对31个CRC复发进行预测, 其结果为准确性81%, 特异性83%及敏感性77%. Xi等^[40]在24个CRC组织及其配对正常结肠黏膜标本中, 评估了10个miRNAs在CRC患者中的潜在的预后诊断价值, 发现肿瘤组织中的hsa-miR-15b, hsa-miR-181b, hsa-miR-191和hsa-miR-200c显著过表达(分别为 $P = 0.0278$, $P = 0.0002$, $P = 0.0264$ 和 $P = 0.0017$). Kaplan-Meier生存分析显示hsa-miR-200c与患者的生存显著相关($P = 0.0122$). 相对于9个低表达hsa-miR-200c的患者(中位生存期为38 mo), 高表达hsa-miR-200c的患者(中位生存期为26 mo)的生存时间更短. 序列分析显示hsa-miR-181b和hsa-miR-200c的表达与抑癌基因p53的突变状态显著相关(分别为 $P = 0.0098$ 和 $P = 0.0322$). 提示hsa-miR-200c可能是CRC的一个预后因素. Schetter等^[22]分析了84个结肠腺癌组织及其配对癌旁正常组织中的miRNAs表达谱, 并在113个CRC患者中评估了miRNAs与肿瘤状况, TNM分期, 生存预后及

对辅助化疗的反应. 结果鉴定了37个差异表达的miRNAs, 随后对miR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b和miR-203的验证发现, 他们均在肿瘤中过表达($P < 0.001$). miR-21的高表达存在于腺瘤($P = 0.006$)和较晚的TNM分期中. 原位杂交显示miR-21在结肠癌细胞中高表达, 且与较差的生存率和治疗结果相关, 而与TNM分期无关. 此研究提示miRNAs的表达谱在结肠腺癌中广泛改变, 而高表达的miR-21与较差的生存率和治疗结果相关.

7 miRNAs与CRC化疗的关系

化疗药物是CRC治疗的主要方法之一, 因此近来有关miRNAs如何参与CRC化疗反应的研究成为人们关注的热点. Tazawa等^[41]在CRC细胞系HCT116和PKO中, 观察到miR-34a有抑制肿瘤细胞增殖的作用. 使用阿霉素处理HCT116细胞系后, miR-34a的表达水平显著升高且呈时间依赖性, 即随着处理时间的延长其表达水平逐渐升高. 推测阿霉素可能是通过调节miR-34a的表达发挥抗癌作用. Nakagawa等^[42]在 α -mangostin(一种夹氧杂蒽酮)处理的大肠癌细胞系DLD-1中发现, miR-143表达上调, 而ERK5蛋白(可促进细胞生长增殖, 并受miR-143负性调节)表达下调, 表明 α -mangostin的抗癌作用可能通过上调miR-143表达水平来实现. 许多针对5-FU及卡培他滨与miRNAs的研究^[9,43-45]表明, 5-FU及卡培他滨可使CRC细胞系中诸多miRNAs表达失调, 推测这可能与他们作用于CRC细胞的不同靶点有关, 而miRNAs则是这些化疗药物发挥抗肿瘤作用的中间分子. 最近, Song等^[46]的研究部分阐明了miR-140参与肿瘤细胞耐药性的机制, 即miR-140通过对组蛋白脱乙酰基酶4的抑制介导了细胞周期G₁和G₂期的阻滞, 从而降低肿瘤细胞的增殖. 因此, miR-140可能是一个能够克服肿瘤细胞耐药性的治疗靶点, 针对他的进一步研究有可能为CRC治疗提供新的策略.

8 结论

miRNAs在CRC组织和血液中的表达谱表明其有可能作为CRC筛查、诊断和预测复发的生物标志物. 此外, 化疗药物能够影响CRC细胞中miRNAs表达水平, 提示miRNAs有可能成为CRC基因治疗的靶点. 但目前研究尚处于起始阶段, 除需继续寻找新的与CRC相关的miRNAs外, 原已发现的各种miRNAs的功能也有待进一

■同行评价

本文选题较好, 内容丰富, 参考文献引用合理, 可读性较好.

步深入研究. 总之, miRNAs在CRC发病机制中的研究为CRC诊治提供了新的途径与思路.

9 参考文献

- 杜秋丽. miRNA及其功能研究. 生物学通报 2004; 39: 13-15
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051-4060
- Lin SL, Chang D, Wu DY, Ying SY. A novel RNA splicing-mediated gene silencing mechanism potential for genome evolution. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 754-760
- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 2004; 305: 1434-1437
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297
- Manikandan J, Aarthi JJ, Kumar SD, Pushparaj PN. Oncomirs: The potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer. *Bioinformation* 2008; 2: 330-334
- Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer* 2007; 6: 60
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-269
- Borralho PM, Kren BT, Castro RE, Moreira da Silva IB, Steer CJ, Rodrigues CM. MicroRNA-143 reduces viability and increases sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 human colorectal cancer cells. *FEBS J* 2009 Oct 16. [Epub ahead of print]
- Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, Cai X, Wang K, Wang G, Ba Y, Zhu L, Wang J, Yang R, Zhang Y, Ren Z, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene* 2009; 28: 1385-1392
- Guo C, Sah JF, Beard L, Willson JK, Markowitz SD, Guda K. The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 939-946
- Monzo M, Navarro A, Bandres E, Artells R, Moreno I, Gel B, Ibeas R, Moreno J, Martinez F, Diaz T, Martinez A, Balagué O, Garcia-Foncillas J. Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. *Cell Res* 2008; 18: 823-833
- Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* 2007; 16 Spec No 1: R50-R59
- Grady WM, Parkin RK, Mitchell PS, Lee JH, Kim YH, Tsuchiya KD, Washington MK, Paraskeva C, Willson JK, Kaz AM, Kroh EM, Allen A, Fritz BR, Markowitz SD, Tewari M. Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. *Oncogene* 2008; 27: 3880-3888
- Bandres E, Agirre X, Bitarte N, Ramirez N, Zarate R, Roman-Gomez J, Prosper F, Garcia-Foncillas J. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2009; 125: 2737-2743
- Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 4123-4132
- Schimanski CC, Frerichs K, Rahman F, Berger M, Lang H, Galle PR, Moehler M, Gockel I. High miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2089-2096
- Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008; 27: 2128-2136
- Allgayer H. Pdc4, a colon cancer prognostic that is regulated by a microRNA. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009 Oct 15. [Epub ahead of print]
- Hu M, Xia M, Chen X, Lin Z, Xu Y, Ma Y, Su L. MicroRNA-141 Regulates Smad Interacting Protein 1 (SIP1) and Inhibits Migration and Invasion of Colorectal Cancer Cells. *Dig Dis Sci* 2009 Oct 15. [Epub ahead of print]
- Arndt GM, Dossey L, Cullen LM, Lai A, Druker R, Eisbacher M, Zhang C, Tran N, Fan H, Retzlaff K, Bittner A, Raponi M. Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009; 9: 374
- Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008; 299: 425-436
- Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zárate R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzó M, García-Foncillas J. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* 2006; 5: 29
- Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, Poon TC, Ng SS, Sung JJ. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 2009; 58: 1375-1381
- Ng EK, Tsang WP, Ng SS, Jin HC, Yu J, Li JJ, Röcken C, Ebert MP, Kwok TT, Sung JJ. MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 699-706
- Diosdado B, van de Wiel MA, Terhaar Sive Droste JS, Mongera S, Postma C, Meijerink WJ, Carvalho B, Meijer GA. MiR-17-92 cluster is associated with 13q gain and c-myc expression during colorectal adenoma to adenocarcinoma progression. *Br J Cancer* 2009; 101: 707-714
- Yamamichi N, Shimomura R, Inada K, Sakurai K, Haraguchi T, Ozaki Y, Fujita S, Mizutani T, Furukawa C, Fujishiro M, Ichinose M, Shioyama K, Tsutsumi Y, Omata M, Iba H. Locked nucleic acid in situ hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4009-4016
- Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, Tanaka F, Mimori K, Uetake H, Sugihara K, Mori M. Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. *Int J Oncol* 2009; 34: 1069-1075
- Ba Y, Cai X, Chen X, Yin Y, Zhang Y, Zhang CY. [Down-regulative expression of microRNAs cluster in human colon tumorigenesis] *Zhonghua Yixue*

- Zazhi 2008; 88: 1683-1686
- 30 Wang CJ, Zhou ZG, Wang L, Yang L, Zhou B, Gu J, Chen HY, Sun XF. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer. *Dis Markers* 2009; 26: 27-34
- 31 Díaz R, Silva J, García JM, Lorenzo Y, García V, Peña C, Rodríguez R, Muñoz C, García F, Bonilla F, Domínguez G. Deregulated expression of miR-106a predicts survival in human colon cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 794-802
- 32 Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology* 2007; 72: 397-402
- 33 Yantiss RK, Goodarzi M, Zhou XK, Rennert H, Pirog EC, Banner BF, Chen YT. Clinical, pathologic, and molecular features of early-onset colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 572-582
- 34 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10513-10518
- 35 Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2009 Oct 28. [Epub ahead of print]
- 36 Chajut A, Benjamin S, Gilad S, Goren Y, Dan H, Zion O, Kushnir M, Kundel Y, Niv Y, Brenner B. Circulating microRNAs as potential blood-based biomarkers for detection of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: e15040
- 37 Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18: 997-1006
- 38 Tang X, Tang G, Ozcan S. Role of microRNAs in diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1779: 697-701
- 39 Schepeler T, Reinert JT, Ostenfeld MS, Christensen LL, Silahtaroglu AN, Dyrskjot L, Wiuf C, Sørensen FJ, Kruhøffer M, Laurberg S, Kauppinen S, Ørntoft TF, Andersen CL. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 6416-6424
- 40 Xi Y, Formentini A, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Kornmann M, Ju J. Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark Insights* 2006; 2: 113-121
- 41 Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15472-15477
- 42 Nakagawa Y, Iinuma M, Naoe T, Nozawa Y, Akao Y. Characterized mechanism of alpha-mangostin-induced cell death: caspase-independent apoptosis with release of endonuclease-G from mitochondria and increased miR-143 expression in human colorectal cancer DLD-1 cells. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 5620-5628
- 43 Rossi L, Bonmassar E, Faraoni I. Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil in vitro. *Pharmacol Res* 2007; 56: 248-253
- 44 Svoboda M, Izakovicova Holla L, Seif R, Vrtkova I, Kocakova I, Tichy B, Dvorak J. Micro-RNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer. *Int J Oncol* 2008; 33: 541-547
- 45 Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006; 130: 2113-2129
- 46 Song B, Wang Y, Xi Y, Kudo K, Bruheim S, Botchkina GI, Gavin E, Wan Y, Formentini A, Kornmann M, Fodstad O, Ju J. Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene* 2009; 28: 4065-4074

编辑 李军亮 电编 何基才