

# 人工microRNAs在肿瘤基因治疗中的研究

黄晓明<sup>1</sup> 陈翔<sup>1,2</sup> 贾振宇<sup>1\*</sup><sup>(1</sup>浙江省医学科学院, 杭州 310013; <sup>2</sup>温州医学院检验医学与生命科学学院, 温州 325025)

**摘要** microRNA是一类大小约22个核苷酸的非编码小RNA, 能够整合到RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)中, 介导转录后的基因沉默。microRNA参与调控细胞的生长、分化及凋亡, 与癌症的发生和发展有着密切的联系。该文就microRNA的生物合成及作用机制、microRNA与肿瘤的关系及其在肿瘤基因治疗中的应用研究作一综述。

**关键词** microRNA; 癌症; 基因治疗

## Progress of Artificial MicroRNAs in Cancer Gene Therapy

Huang Xiaoming<sup>1</sup>, Chen Xiang<sup>1,2</sup>, Jia Zhenyu<sup>1\*</sup><sup>(1</sup>Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China; <sup>2</sup>School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325025, China)

**Abstract** microRNA is 22nt non-coding small RNA which can mediate post-transcriptional gene silencing via assembly into RNA-induced silencing complex (RISC). MicroRNAs involve in regulation of cell growth, differentiation, apoptosis and relate to cancer development and progression. The biogenesis, functional mechanisms of microRNA, and its roles playing in tumors and miRNA-based cancer gene therapy are introduced in this review.

**Key words** microRNA; cancer; gene therapy

### 1 引言

随着世界人口的增长及老龄化的加速、环境的恶化及诱发癌症因素的增加, 癌症的发病率正在逐年升高, 癌症已高居发达国家人口死亡原因的第一位, 在发展中国家也已排在第二位<sup>[1]</sup>。2008年, 全世界新增癌症患者12 700 000例, 因癌症而死亡的人数为7 600 000, 常见癌症有肺癌、胃癌、肝癌、食管癌、结直肠癌、乳腺癌和前列腺癌<sup>[2]</sup>。由于恶性肿瘤的无限制生长与浸润、转移, 现今临床采用的常规治疗方法——手术、放疗、化疗无法完全根除或彻底杀灭肿瘤细胞, 因此常出现肿瘤转移或复发; 而且常规化疗的特异性较低, 在杀伤肿瘤细胞的同时也给

正常细胞带来很大的损伤, 尤其损伤在抗肿瘤机制中占重要地位的机体免疫系统, 有较严重的毒副作用, 癌症病人常因不能耐受而被迫停止接受治疗<sup>[3-4]</sup>。肿瘤三大常规治疗方法的局限性迫使人们去寻找新的治疗方法, 肿瘤的生物治疗因其安全、有效、毒副作用低等特点成为继手术治疗、放射治疗、化学治疗之后肿瘤治疗的第四种模式<sup>[3-6]</sup>。常用的生物治疗方法有免疫治疗、基因治疗、抗新生血管生成治疗、溶瘤病毒治疗、干细胞治疗、诱导分化及凋亡、内分泌治疗等。各种肿瘤生物治疗相关研究也早已成为肿瘤研究者关注的热点, 其中肿瘤基因治疗始终是肿瘤生物治疗的主要方向之一<sup>[7-8]</sup>。肿瘤的发生

收稿日期: 2012-12-21 接受日期: 2013-04-01

浙江省自然科学基金重点项目(批准号: LZ12H16003)和浙江省卫生厅医学重点学科建设计划项目(批准号: 11-ZC02)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-81568150, E-mail: zhenyujia@yahoo.com

Received: December 21, 2012 Accepted: April 1, 2013

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LZ12H16003) and Foundation of Key Medical Sciences of Public Health of Zhejiang Province (Grant No.11-ZC02)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-81568150, E-mail: zhenyujia@yahoo.com

网络出版时间: 2013-06-24 16:09

URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130624.1609.002.html

发展涉及众多基因的变化, 包括抑癌基因失活、癌基因异常激活、抗凋亡基因及迁移相关基因过表达、诱导凋亡、分化、死亡基因表达不足或不表达、各种microRNA表达异常等。基因治疗方法之一是抑制肿瘤细胞中过度表达的基因, RNA干扰的发现为基因表达的封闭提供了一个有效的手段。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是基因表达调控中转录后基因沉默的一种重要方式, 普遍存在于多种多细胞生物中。RNAi主要通过细胞中非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA)完成。ncRNA是生物体内不编码蛋白质的一类RNA, 发挥着重要的生物功能。研究发现, 许多ncRNA在生物体内行使着广泛的调节作用, 参与机体的免疫、肿瘤发生发展形成、调节染色体的结构和基因的转录等。根据ncRNA的大小可以将其分类为: (1)21-25个核苷酸的ncRNA, 包括microRNA(miRNA)和小干扰RNA(siRNA); (2)100-200个核苷酸的小RNA(small RNA, sRNA); (3)大于10 000个核苷酸的ncRNA<sup>[9-10]</sup>。miRNA作为一种ncRNA, 是目前生命科学领域里研究的一个热点。第一个miRNA基因*lin-4*发现于1993年<sup>[11]</sup>, 随后在动物、植物、病毒中陆续发现大量不同的miRNA。

## 2 miRNA的生物合成和功能

miRNA是一类大小约为22个核苷酸的RNA分子, 与核酸酶Dicer、Argonaute蛋白、TRBP(TAR RNA-binding protein)蛋白、双链RNA结合蛋白PACT(protein activator of PKR)等形成RNA诱导沉默复合物(RNA-induced silence complex, RISC)。RISC中的miRNA与靶mRNA的3'端非转录区域碱基互补配对, 当miRNA与mRNA完全配对时, RISC中的Argonaute蛋白降解mRNA, 当不完全配对时, 则阻遏mRNA的翻译, 从而诱导转录后的基因沉默<sup>[12]</sup>。目前有研究发现, 在不完全配对的情况下, RISC也可以降解mRNA: 先抑制mRNA翻译, 然后mRNA被募集到P-bodies(RNA processing bodies)被降解。P-bodies不仅能降解mRNA, 还能储存mRNA, 适当的时候再把mRNA释放出来<sup>[13]</sup>。

随着研究的不断深入, 近来发现, miRNA不仅可以介导转录后的基因沉默效应, 还能通过靶向基因的启动子位点来介导转录水平的基因沉默。靶向启动子位点的miRNA, 能够募集Ago-1蛋白并引起组蛋白的甲基化而使染色质异质化, 从而阻遏基

因转录的起始。miRNA还能激活基因的表达, 通过: (1)和基因的启动子AU富集区结合, 提高与转录激活正相关的染色质上组蛋白甲基化程度; (2)和重叠于启动子位点的反义转录链(anti-sense transcription)结合, 通过Ago-2蛋白降解反义转录链, 最终促进正义链的转录<sup>[14]</sup>。

编码miRNA的基因有的在基因组的非编码区, 有的在编码蛋白质基因的内含子和外显子区域, 它们在基因组中成簇排列或分散排列。miRNA通常由RNA聚合酶II或III转录为pri-miRNA(primary-miRNA)。pri-miRNA类似于mRNA, 具有5'端帽子结构和3'端的多聚腺苷酸尾。pri-miRNA在细胞核中经核酸酶Drosha剪切成60-70个核苷酸的茎环结构, 即pre-miRNA(precursor-miRNA), 5'端带有磷酸基团, 3'端有2个核苷酸的突出。Drosha对pri-miRNA进行高效精确的加工通常需要DGCR8(DiGeorge syndrome critical region 8 protein)的协同作用。并非所有pre-miRNA的产生都依赖于Drosha/DGCR8复合体, 在一些生物体中发现内含子可以在细胞核通过RNA的拼接机制生成pre-miRNA。pre-miRNA在蛋白质Exportin5与RanGTP的复合体介导下, 从细胞核被运输至细胞质; 在细胞质中, 在TRBP辅助下, 核酸酶Dicer将pre-miRNA剪切为含21~25个核苷酸的双链RNA, 该双链miRNA中的一条引导链即成熟的miRNA随即整合到RISC中, 形成成熟的RISC复合体; 另一条链则被降解<sup>[15]</sup>。

## 3 miRNA与癌症的关系

miRNA可以调控细胞自我更新、增殖、分化等生物过程, 从而影响生物的生长发育<sup>[9]</sup>。miRNA在人类的各种疾病发生过程中起着重要的作用<sup>[9,18]</sup>。目前, 发现大约3%的人类基因编码miRNA, 但是这些miRNA却调控着人类近30%的蛋白质编码基因。Calin等<sup>[19]</sup>对目前已知的和预测的人类186个miRNA进行研究, 发现半数以上的miRNA定位于染色体上与肿瘤发生相关的区域和脆性位点, 如杂合性缺失区、纯合性缺失区、扩增区、断裂点、靠近癌基因或抑癌基因的部位。在恶性肿瘤和肿瘤细胞株中表达的miRNA与正常组织细胞存在着明显差异<sup>[20-28]</sup>。miRNA表达水平的改变可能是诱发癌症的因素或癌变过程所引起的。根据miRNA的作用性质可以将其划分为抑癌基因和原癌基因。

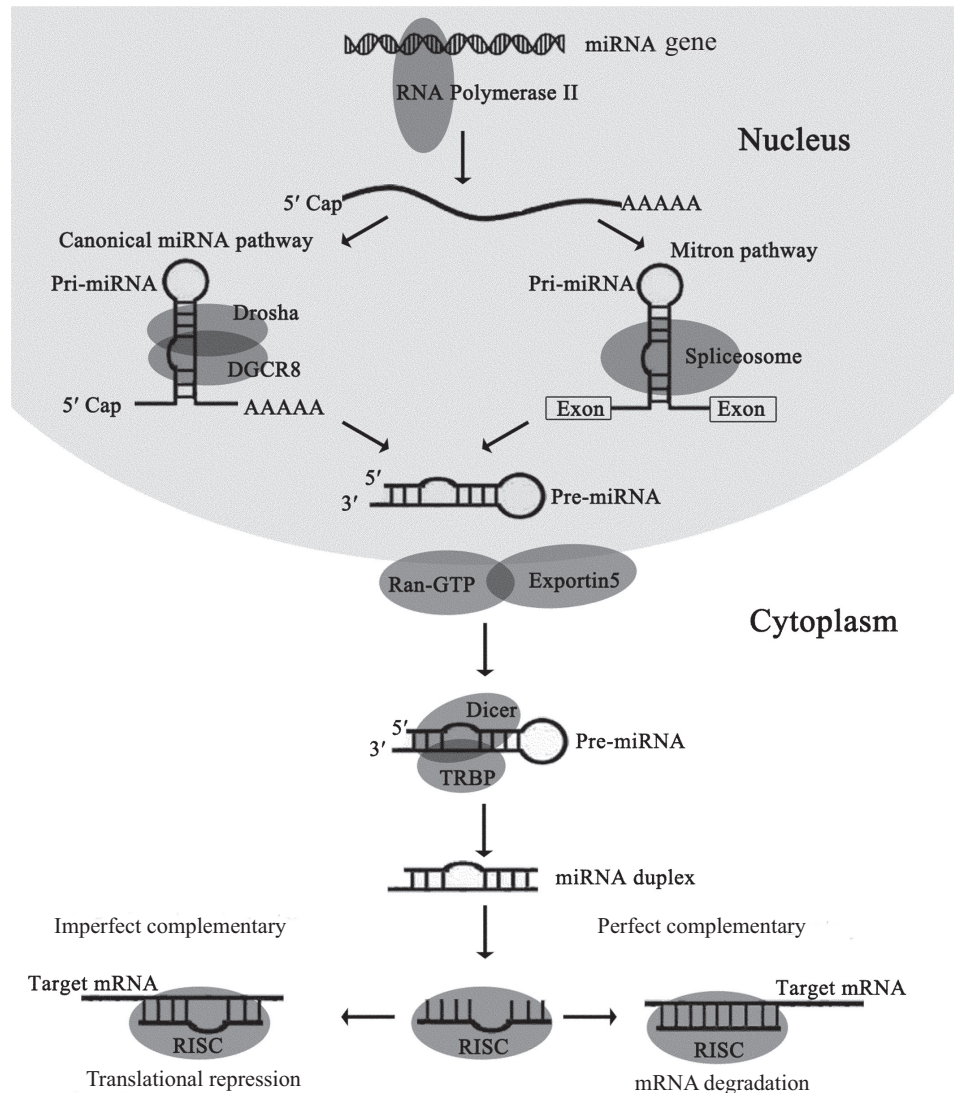


图1 miRNA的生物合成和作用机制(根据参考文献[16-17]修改)

Fig.1 The biogenesis and mechanism of miRNA(modified from references [16-17])

#### 4 基于miRNA的肿瘤基因治疗

恶性肿瘤细胞中表达异常的miRNA成为肿瘤基因治疗的新靶点。目前常用的miRNA基因治疗方法有以下几种<sup>[29]</sup>: (1)anti-microRNA oligonucleotides(AMOs)。AMOs可与内源性miRNAs互补配对结合,抑制miRNAs的功能,但是抑制效率不高,所以可对AMOs进行一些化学修饰,以提高其抑制效率及稳定性,比如: 2'-甲基化、2'-O-甲基化修饰、共轭偶联胆固醇; (2)反义锁定核苷酸(locked-nucleic-acid antisense oligonucleotides, LNAs)是一种特殊的双环状核苷酸衍生物,与DNA或RNA间的杂交亲和力强,具有良好的稳定性,而且水溶性高,细胞毒性低; (3)miRNA海绵(miRNA sponges)。microRNA sponges是人工合成的含有多个内源性miRNA结合

位点的mRNA,通过与内源性miRNA结合,可以有效抑制基因家族中亲缘关系接近的miRNA; (4)miRNA屏障技术(miR-masking)合成能够严密结合于靶mRNA上miRNA结合位点处基因序列的特异性反义寡核苷酸序列,与靶mRNA形成二倍体以屏障靶mRNA与内源性miRNA结合; (5)miRNA mimic是化学合成的模拟内源性的成熟双链miRNA的小RNA,能增强内源性miRNA的功能; (6)构建表达miRNA的病毒载体,常用的病毒载体有腺病毒、慢病毒和逆转录病毒; (7)miRNA小分子抑制剂,如偶氮苯作为一种特异性的miRNA抑制剂,可以有效抑制Hela、MCF-7细胞中高表达的miR-21。

根据miRNA对基因表达抑制的原理,人工合成的miRNA逐渐广泛应用于恶性肿瘤的基因治疗

的实验研究。目前, 已有一些研究通过合成人工miRNA抑制恶性肿瘤细胞中高表达的蛋白质的合成。

#### 4.1 肺癌

肺癌有39种miRNA表达增强、33种miRNA下降<sup>[25]</sup>。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)能够诱导肿瘤血管新生, 为肿瘤细胞的转移提供基质。2009年, Liu等<sup>[30]</sup>报道, miR-126可以抑制VEGF的表达。他们构建表达miR-126的慢病毒表达载体LV-miR-126并感染肺癌细胞A549、Y-90和SPC-A1后, 细胞生长分别被抑制了41.3%、29.1%和26.1%, 停滞于G<sub>1</sub>期的细胞分别增加了23.64%、16%和8.7%; 将分别感染了LV-miR-126与空载体的A549分别注射到裸鼠前肢腋下, 25天后感染了LV-miR-126的细胞形成的肿瘤小22.4%。2010年, Incoronato等<sup>[31]</sup>报道, miR-212可以诱导凋亡抑制因子糖尿病/星形胶质细胞富含的磷脂蛋白15(phosphoprotein enriched in diabetes/phosphoprotein enriched in astrocytes, PED/PEA-15)的mRNA降解。用miRNA-212 mimics转染非小细胞肺癌细胞Calu-1, 48 h后加入10 ng/mL的肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL), 24 h后凋亡细胞增加了大约3倍。2010年, Chen等<sup>[32]</sup>构建的表达miR-145的慢病毒载体能够抑制非小细胞肺癌细胞A549和H23中其靶基因原癌基因*c-Myc*的表达, 使细胞停滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 细胞生长均被抑制60%左右, 集落形成数量则分别降低了大约50%和15%。PI3K-Akt信号通路能够诱导细胞增殖和肿瘤形成。2012年, Yang等<sup>[33]</sup>用miR-126表达载体pE-Mir126分别转染非小细胞肺癌细胞A549和SK-MES-1后, *PI3KR2*的表达受到抑制, 细胞的生长分别被抑制了大约53.06%和52.08%, 侵袭能力分别下降了大约36%和36.73%。将转染了pE-Mir126的A549和SK-MES-1细胞分别注射到裸鼠皮下, 35天后, 肿瘤的体积分别减少了大约46.67%和47.22%, 肿瘤的重量则分别降低了大约46.81%和37.93%。

#### 4.2 乳腺癌

乳腺癌中有17种miRNA表达增强、113种miRNA表达下降<sup>[26]</sup>。人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, *HER2*)和*HER3*属于*HER*原癌基因家族。2007年, Scott等<sup>[34]</sup>报道, miR-

125a和miR125b均可以抑制*HER2*和*HER3*的mRNA和蛋白表达水平。他们构建miR-125a或miR125b的逆转录病毒表达载体并感染乳腺癌细胞SKBR3, 细胞的迁移能力下降了大约60%或50%, 细胞的侵袭能力下降了大约75%或65%。2012年, Tang等<sup>[35]</sup>报道miR-125b能够抑制肿瘤抑制基因*STARD13*(StAR-related lipid transfer domain containing 13, 又名*DLC2*)的表达。用miR-125b mimics转染miR-125b低表达的乳腺癌细胞MCF-7后, 细胞在体内外的侵袭和转移能力均增强。用miR-125b抑制剂处理miR-125b高表达的乳腺癌细胞MDA-MB-231, 细胞在体内外的侵袭和转移能力则受到抑制。因此, miR-125b究竟是一个原癌基因还是抑癌基因, 如何采用miR-125b进行基因治疗, 还有待进一步研究。细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)与趋化因子受体CXCR4[chemokine(C-X-C motif) receptor 4]结合能够诱导乳腺癌细胞的定向转移。2007年, Liang等<sup>[36]</sup>构建了靶向CXCR4的人工miRNA表达载体, 转染乳腺癌细胞MDA-MB-231后, 细胞迁移数量下降了大约75%, 侵袭的细胞数量下降了85%; 通过尾静脉注射转染了靶向CXCR4的人工miRNA表达载体的乳腺癌细胞MDA-MB-231到小鼠体内, 与注射转染无靶向的阴性对照RNA双链的MDA-MB-231相比, 30天后肺转移率下降了大约89%。

#### 4.3 消化道肿瘤

4.3.1 结直肠癌 结直肠癌有37种miRNA表达增强、13种miRNA表达下降<sup>[22]</sup>。2011年, Liu等<sup>[37]</sup>将能够抑制促大肠癌细胞生长和转移的细胞分裂周期蛋白42(cell division cycle 42, Cdc42)的mRNA和蛋白表达的miR-137转染结直肠癌细胞SW1116和LoVo, 细胞生长分别被抑制了33%和31%左右, 停滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞分别升高了7.73%和6.87%, 处于S期的细胞分别下降了9.36%和5.8%, 细胞的迁移能力分别下降了80%和75%左右。结肠癌相关转移基因1(metastasis-associated in colon cancer 1, *MACC1*)是结肠癌形成和增殖相关基因, miR-143可以抑制*MACC1*的mRNA和蛋白表达水平。2012年, Zhang等<sup>[38]</sup>用miR-143 mimics和靶向*MACC1*的siRNA同时转染结直肠癌细胞SW620, 可以增强抑制细胞生长、迁移和侵袭能力, 其中, 细胞生长被抑制了30%左右, 细胞的侵袭和迁移能力均下降50%左右。无齿蛋白同系物(denticless protein homolog,

DTL)可以诱导P53泛素化而被降解,导致细胞凋亡被抑制。miR-30a-5p可以引起DTL的mRNA降解,从而抑制其蛋白的表达水平。2012年,Baraniskin等<sup>[39]</sup>构建了表达miR-30a-5p的慢病毒载体pLKO.1-pure-miR-30a-5p并感染结直肠癌细胞HCT116和SW480,细胞凋亡分别上升了大约80%和90%,早期凋亡的HCT116细胞增加了11.1%,停滞于G<sub>1</sub>期的细胞增加了20.46%。

**4.3.2 胃癌** 胃癌有21种miRNA表达增强、31种miRNA表达下降<sup>[27]</sup>。2006年,Li等<sup>[40]</sup>构建了基于小鼠miR-155天然结构的靶向肿瘤转移相关基因肝再生磷酸酶-3(phosphatase of regenerating liver-3, PRL-3)的人工miRNA表达载体pCMV-PRL3miRNA-1249-A2,并用以转染胃癌细胞SGC7901后,能够诱导PRL-3的mRNA降解,侵袭的细胞总数下降了71.43%左右,迁移的细胞数下降了75.96%左右;将转染了pCMV-PRL3miRNA-1249-A2的SGC7901细胞注射到BALB/c裸鼠腹腔,21天后观察到,与注射转染了空载体细胞SGC7901的裸鼠相比,腹腔表面转移的结节总数下降了大约66%。2008年,Xia等<sup>[41]</sup>报道,miR-15b和miR-16能够抑制Bcl2蛋白的表达。分别将miR-15b mimics和miR-16 mimics转染胃癌多药耐药细胞株SGC7901/VCR,能够使经化疗药物长春新碱处理的细胞凋亡水平分别提高大约1.9倍和1.8倍。肝肠钙黏蛋白(liver-intestine cadherin, LI-cadherin, 又名CDH17)在胃黏膜的异常表达可导致胃黏膜肠上皮化生和异形增生。2010年,Zhang等<sup>[42]</sup>用构建的表达靶向CDH17的人工miRNA的慢病毒载体lenti-CDH17-miR-B感染胃癌细胞BGC823后,能够诱导CDH17的mRNA降解,细胞的运动和迁移率均下降了64%左右,细胞生长被抑制35%左右。2012年,Xia等<sup>[43]</sup>研究报道,miR-124可以抑制具有致癌作用的鞘氨醇激酶1(sphingosine kinase 1, SPHK1)的mRNA翻译。用构建的表达miR-124的逆转录病毒载体分别感染胃癌细胞MGC803和SGC7901后,细胞的生长均被抑制了大约46%,集落形成数量分别减少了大约59%和52%;将感染后能够稳定表达miR-124的SGC7901细胞注射到裸鼠皮下,30天后观察到其形成的肿瘤体积和重量比感染病毒空载体的细胞分别减少了大约68%和75%。

#### 4.4 肝癌

肝癌有44种miRNA表达增强、30种miRNA表

达下降<sup>[23]</sup>。细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)和周期蛋白依赖性激6(cyclin-dependent kinase 6, CDK6)是细胞周期G<sub>1</sub>/S转变的关键蛋白,其表达水平的上调会促进细胞的增殖。2009年,Xu等<sup>[44]</sup>研究发现,miR-195可以抑制Cyclin D1、CDK6和E2F转录因子3(E2F transcription factor 3, E2F3)的mRNA翻译。将分别转染了miR-195 mimics与无靶向的阴性对照RNA双链的肝癌细胞MHCC-97L分别注射到BALB/c裸鼠皮下,4周后观察到转染miR-195 mimics的肝癌细胞形成的肿瘤体积减小了大约60%,将转染了miR-195 mimics的结肠癌细胞HCT-116注射到裸鼠皮下则没有形成瘤体;转染了miR-195 mimics的MHCC-97L和HCT-116细胞停滞于G<sub>1</sub>期的细胞分别增加了大约25%和18%。细胞周期蛋白D3(Cyclin D3)的过表达可能引起细胞周期的失调,诱导肿瘤的发生。2012年,Wang等<sup>[45]</sup>报道,miR-138能够抑制Cyclin D3蛋白的表达。他们用miR-138 mimics转染肝癌细胞HepG2和Huh7,细胞的生长分别被抑制了17%和25%左右,停滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞分别增加了大约10%和4%,停滞于S期的细胞则均减少了大约7.5%;将分别转染了miR-138 mimics与无靶向的阴性对照RNA双链的HepG2分别注射到雄性BALB/c裸鼠皮下,5周后测量肿瘤体积,miR-138 mimics的抑瘤率大约为30%。

#### 4.5 前列腺癌

雄性激素依赖性前列腺癌有57种miRNA表达增强、42种miRNA下降;雄性激素非依赖性前列腺癌有9种miRNA表达增强、22种miRNA下降<sup>[21]</sup>。Bcl2/腺病毒E1B 19-kDa相互作用蛋白3(Bcl2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3, BNIP3)能够抑制细胞凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)的转录。2010年,Chen等<sup>[46]</sup>用构建的表达miR-145的腺病毒载体pAdeasy-miR145感染前列腺癌细胞PC-3和DU145,可以抑制BINP3的mRNA翻译,使得AIF的表达上调,从而诱导细胞凋亡。pAdeasy-miR145感染PC-3和DU145后,细胞生长分别被抑制了40%和50%左右,细胞凋亡比例分别升高了2.6倍和1.6倍。果蝇zeste基因增强子的人类同源物2(enhancer of zeste homolog 2, Ezh2)属于原癌基因,是一种可以促进前列腺癌细胞生长和转移的组蛋白甲基转移酶基因。2010年,Cao等<sup>[47]</sup>报道,用miR-101 mimics转染前列腺癌细胞DU145、LNCap和PC-3,可以抑制

Ezh2蛋白表达, DU145和LNCap细胞生长分别被抑制了45%和35%左右, DU145和PC-3细胞的侵袭能力分别下降了大约92%和55%, LNCap细胞的迁移能力下降了大约40%。

#### 4.6 白血病

慢性淋巴细胞白血病有35种miRNA表达增强、15种miRNA下降, 急性淋巴细胞白血病有47种miRNA表达增强、7种miRNA下降<sup>[20]</sup>。B细胞淋巴瘤/白血病2(B-cell lymphoma/leukemia 2, *Bcl2*)是一种抵抗凋亡的蛋白质。2005年, Cimmino等<sup>[48]</sup>报道, 人工构建的表达miR-15a/miR-16-1的质粒能够抑制慢性髓细胞白血病细胞MEG-01中*Bcl2*的翻译, 使其蛋白水平下降大约93%, 从而激活APAF-1-caspase9-PARP信号通路, 诱导细胞凋亡, 使凋亡细胞数上升了2倍多。14-3-30属于抗凋亡蛋白家族, 2012年, Scheibner等<sup>[49]</sup>报道miR-27a能够抑制14-3-30蛋白的表达水平。用表达miR-27a的慢病毒载体感染慢性髓细胞白血病细胞K562后, 细胞的集落形成速率下降了大约2~6倍。FMS样酪氨酸激酶3(*fms-like tyrosine kinase 3, FLT3*)和MYB与白血病的形成密切相关, miR-150能够抑制FLT3和MYB的表达。2012年, Jiang等<sup>[50]</sup>用miR-150表达载体分别转染急性单核白血病细胞MOMOMAC-6、急性T细胞白血病细胞JURKAT和单核细胞白血病细胞U937后, 细胞凋亡分别提高了大约36.36%、14.28%和14.28%。2012年, Li等<sup>[51]</sup>报道在t(8;21)急性髓性白血病(*acute myeloid leukemia, AML*)中, miR-193a可以抑制*AML1/ETO*、*DNMT3a*、*HDAC3*、*KIT*、*CCND1*、*MDM2*基因的表达。用表达miR-193a的慢病毒载体感染*AML1/ETO*阳性的AML细胞SKNO-1后, 停滞于G<sub>1</sub>期的细胞提高了15.3%, S期的细胞则下降了13.8%。在小鼠的皮下接种SKNO-1细胞成瘤, 瘤内注射miR-193a mimics, 14天后, 肿瘤的重量减少了大约83.04%。原癌基因*PBX3*和*MEIS1*在混合谱系白血病(*mixed lineage leukemia, MLL*)基因重排的AML中过表达。2012年, Jiang等<sup>[52]</sup>报道miR-495能够抑制*PBX3*和*MEIS1*的表达, 用表达miR-495的慢病毒载体感染急性单核细胞白血病细胞MOMOMAC-6和单核细胞白血病细胞THP-1后, 细胞生长分别被抑制了大约31.25%和35.71%, 细胞凋亡分别提高了大约30.76%和23.07%。miR-495不仅能抑制MLL-AF9诱导的小鼠骨髓祖代细胞的集落形成能力, 而且还能促进其分化。

#### 4.7 甲状腺癌

由滤泡上皮细胞衍生而来的甲状腺癌有36种miRNA表达增强、15种miRNA下降<sup>[24]</sup>。2012年, Esposito等<sup>[53]</sup>报道, miR-25和miR-30d能够抑制未分化甲状腺癌中高表达的*Ezh2*蛋白。将miR-25或miR-30d表达载体分别转染甲状腺癌细胞FRO、8505c和ACT-1, 转染了miR-25的FRO和8505c细胞形成的集落数分别减少了大约35%和50%, 转染了miR-30d的FRO和8505c细胞形成的集落数则分别减少了大约54%和68%; 转染了miR-25的ACT-1和8505c细胞的迁移数量分别下降了大约54%和37%, 转染了miR-30d的ACT-1和8505c细胞的迁移数量分别下降了大约62%和57%。

#### 4.8 鼻咽癌

鼻咽癌中有8种miRNA表达增强、33种miRNA表达下降<sup>[28]</sup>。2012年, Lu等<sup>[54]</sup>报道miR-26a能够抑制*Ezh2*的mRNA翻译。转染了miR-26a mimics的鼻咽癌细胞C666-1和HNE-1的生长分别被抑制了大约42%和46%, 感染表达miR-26a的慢病毒载体LV-miR26a后, C666-1和HNE-1细胞形成的集落数量分别减少大约52%和55%; 将分别感染了LV-miR26a和空载体的C666-1细胞分别注射到雌性BALB/c裸鼠皮下, 2周后观察到感染LV-miR26a的细胞形成的肿瘤体积小了大约65%, 重量少了大约73%。

### 5 调控人工miRNA的肿瘤特异性启动子

目前, 基于人工miRNA的基因治疗研究的常用启动子有: 巨细胞病毒早期(*cytomegalovirus immediately-early, CMV-IE*)启动子, H1启动子和U6启动子。肿瘤基因治疗的两大关键因素是基因的特异靶向性和安全性。肿瘤特异性启动子是指在肿瘤细胞有特异性的转录活性而在正常细胞无转录活性或是极低转录活性的启动子。肿瘤特异性启动子可以在表达其活化所需的转录因子的肿瘤细胞中调控基因的表达, 因此, 可以利用这一特性实现肿瘤基因治疗的特异靶向性。2011年, Chen等<sup>[55]</sup>构建了受肝癌细胞特异性的甲胎蛋白(*alpha fetoprotein, AFP*)启动子和肿瘤特异性的人端粒酶逆转录酶(*human telomerase reverse transcriptase, hTERT*)启动子共同调控的miR-26a表达载体pATM, 将转染了pATM与空载体的肝癌细胞Huh-7分别注射到裸鼠皮下, 5周后观察到转染了pATM的细胞形

成的肿瘤体积小了大约75%;建立裸鼠移植性肝癌细胞(SMMC-LTNM)模型,注射20  $\mu\text{g}$  pATM与脂质体形成的混合物于瘤体中,每周2次,4周后观察到肿瘤体积减小了大约70%。

## 6 人工miRNA传递系统

目前,常用的人工miRNA传递系统主要包括脂质体、病毒载体(主要为腺病毒、逆转录病毒和慢病毒)、纳米粒子。除了单一载体,还有多种载体的联合使用。例如,2010年,Chen等<sup>[56]</sup>报道,用靶向肿瘤的单链抗体片段(single-chain antibody fragment, scFv)修饰的脂质体-多聚阳离子透明质酸(LDH)纳米粒子的传递系统携带miR-34a,通过静脉注射到小鼠黑色素瘤B16F10移植模型中,能够抑制肺转移癌组织中凋亡抑制蛋白survivin的表达,使肿瘤负荷减少50%,而且不会引起C57BL/6小鼠血液中炎症因子IL-6、IL-12和IFN- $\gamma$ 的显著改变。2011年,Ibrahim等<sup>[57]</sup>报道,聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)介导miR-145转染结肠癌细胞LS174T后,能够使miR-145的表达水平升高10倍,细胞的生长被抑制了大约60%,流式细胞术检测显示早期和晚期凋亡的细胞均升高2倍以上。将LS174T细胞注射到裸鼠皮下,再注射10  $\mu\text{g}$  PEI与miR-145的混合物,每周3次,23天后实验结束时,肿瘤的生长下降了近50%。2012年,Pan等<sup>[58]</sup>研究报道,从噬菌体MS2发展来的类病毒颗粒(virus-like particles, VLP)介导miR-146a感染宫颈癌细胞HeLa、肝癌细胞HepG2和Huh-7、外周血单核细胞PBMCs后,实时荧光定量PCR检测显示miR-146a的表达水平分别升高了大约8.8倍、16.5倍、14倍和21倍。用不同剂量(100~500 nmol/L)的MS2-miR146a VLP分别感染细胞,miR-146a的表达水平可上调0.92~14.76倍,且在最高感染剂量(500 nmol/L)下细胞的存活率仍有90%。将MS2-miR146a VLP经尾静脉注射到C57BL/6小鼠体内,药代动力学分析显示小鼠血浆、肺、脾脏和肾中的MS2-146a VLP分别升高2.28倍、1.94倍、2.07倍和2.23倍,在血浆中的半衰期为43小时。白介素1受体相关激酶1(interleukin-1 receptor-associated kinase 1, *IRAK1*)是miR-146a的靶基因,感染MS2-miR146a VLP的HeLa细胞中IRAK1蛋白表达水平受到明显抑制,尾静脉注射了MS2-miR146a VLP的小鼠的脾脏外周血单核细胞中IRAK1蛋白表

达亦受到明显抑制。

## 7 问题与展望

目前,基于miRNAs的基因治疗仍面临一些问题。miRNA与靶mRNA之间的作用依靠的是序列间的碱基互补配对,且miRNA可以调控与之不完全配对的靶基因的表达,因此,一个miRNA可以调控多个靶基因的表达,可能产生脱靶效应。miR-masking能够有效减少脱靶效应,但是合成的寡核苷酸序列与靶基因必须具有较高的特异性。

如何开发高效的miRNA的传递系统也是研究的另一个重点。脂质体的传递效率相对较低且会产生炎症反应。病毒载体感染效率高,但病毒蛋白会引起机体免疫效应。利用纳米粒子作为传递系统可以减少炎症反应,不过传递效率相对较低且疗效短。因此,针对于不同类型的肿瘤应采用不同的传递系统。更合适的传递系统仍需进一步的研究。

Exosomes广泛存在于血浆、尿液、羊水和唾液中,研究发现,由小鼠和人的肥大细胞分泌的exosomes含有miRNA。因而,在2012年,有研究提出可能可以用exosomes作为携带人工miRNA的介质,而且exosomes是机体自身所产生,不被机体免疫排斥,并有可能发展为临床个性化用药和治疗方式之一<sup>[59]</sup>。

目前,miRNAs已经成为肿瘤研究的一个热点,虽然仍处于基础性实验研究阶段,但因其具有十分重要且良好的临床应用前景,在不久的将来可能会有miRNAs药物问世,给癌症患者带来新的希望。

## 参考文献 (References)

- Mathers C, Fat DM, Boerma J. The global burden of disease: 2004 update: World Health Organization, 2008.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127(12): 2893-917.
- 张勤. 肿瘤的生物治疗进展. 药学服务与研究(Zhang Qin. Progress in biotherapy of tumor. *Pharm Care Res*) 2010; 10(4): 247-51.
- 曹前, 吴家廉. 肿瘤的生物治疗. 重庆医科大学学报(Cao Qian, Wu Jialian. *Journal of Chongqing Medical University*) 2002; 27(2): 238-40.
- 《中国肿瘤》编辑部. 点评肿瘤生物治疗研究专题. 中国肿瘤(China Cancer Editorial Office. Commentary on monograph of research progress in cancer biotherapy editorial board of China cancer. *China Cancer*) 2011; 20(2): 80-1.
- 郝希山. 生物治疗—肿瘤治疗的新希望. 中国医药生物技术

- (Hao Xishan. *Chin Med Biotechnol* 2008; 3(6): 401.
- 7 Cross D, Burmester JK. Gene therapy for cancer treatment: Past, present and future. *Clin Med Res* 2006; 4(3): 218-27.
- 8 Watts JK, Corey DR. Silencing disease genes in the laboratory and the clinic. *J Pathol* 2012; 226(2): 365-79.
- 9 杨琳, 柯杨. 非编码RNA—功能基因组研究的新热点. 北京大学学报(医学版)[Yang Lin, Ke Yang. Noncoding RNA, a new focus of functional genomic study. *Journal of Peking University(Health Sciences)*] 2006; 38(4): 444-6.
- 10 Costa FF. Non-coding RNAs: Lost in translation? *Gene* 2007; 386(1/2): 1-10.
- 11 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.
- 12 Rana TM. Illuminating the silence: Understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(1): 23-36.
- 13 Chan SP, Slack FJ. microRNA-mediated silencing inside P-bodies. *RNA Biol* 2006; 3(3): 97-100.
- 14 Turner AM, Morris KV. Controlling transcription with noncoding RNAs in mammalian cells. *Biotechniques* 2010; 48(6): ix-xvi.
- 15 Liu X, Fortin K, Mourelatos Z. MicroRNAs: Biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol* 2008; 18(1): 113-21.
- 16 Reddy SD, Gajula RP, Pakala SB, Kumar R. MicroRNAs and cancer therapy: the next wave or here to stay? *Cancer Biol Ther* 2010; 9(7): 479-82.
- 17 Farazi TA, Spitzer JJ, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol* 2011; 223(2): 102-15.
- 18 Meltzer PS. Cancer genomics: Small RNAs with big impacts. *Nature* 2005; 435(7043): 745-6.
- 19 Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, *et al.* MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(32): 11755-60.
- 20 Zanette DL, Rivadavia F, Molfetta GA, Barbuzano FG, Proto-Siqueira R, Silva-Jr WA, *et al.* miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40(11): 1435-40.
- 21 Seveli S, Uzumcu A, Solak M, Ittmann M, Ozen M. The function of microRNAs, small but potent molecules, in human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2010; 13(3): 208-17.
- 22 Manne U, Shanmugam C, Bovell L, Katkooi VR, Bumpers HL. miRNAs as biomarkers for management of patients with colorectal cancer. *Biomark Med* 2010; 4(5): 761-70.
- 23 Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PB, *et al.* MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. *Clin Cancer Res* 2010; 16(3): 867-75.
- 24 Pallante P, Visone R, Croce CM, Fusco A. Deregulation of microRNA expression in follicular-cell-derived human thyroid carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17(1): F91-104.
- 25 Vosa U, Voeder T, Kolde R, Fischer K, Valk K, Tonisson N, *et al.* Identification of miR-374a as a prognostic marker for survival in patients with early-stage nonsmall cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50(10): 812-22.
- 26 Romero-Cordoba S, Rodriguez-Cuevas S, Rebollar-Vega R, Quintanar-Jurado V, Maffuz-Aziz A, Jimenez-Sanchez G, *et al.* Identification and pathway analysis of microRNAs with no previous involvement in breast cancer. *PLoS One* 2012; 7(3): e31904.
- 27 Link A, Kupcinskas J, Wex T, Malfertheiner P. Macro-role of microRNA in gastric cancer. *Dig Dis* 2012; 30(3): 255-67.
- 28 Liu N, Chen NY, Cui RX, Li WF, Li Y, Wei RR, *et al.* Prognostic value of a microRNA signature in nasopharyngeal carcinoma: A microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 2012; 13(6): 633-41.
- 29 Budhu A, Ji J, Wang XW. The clinical potential of microRNAs. *J Hematol Oncol* 2010; 3: 37.
- 30 Liu B, Peng XC, Zheng XL, Wang J, Qin YW. MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Lung Cancer* 2009; 66(2): 169-75.
- 31 Incoronato M, Garofalo M, Urso L, Romano G, Quintavalle C, Zanca C, *et al.* miR-212 increases tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in non-small cell lung cancer by targeting the antiapoptotic protein PED. *Cancer Res* 2010; 70(9): 3638-46.
- 32 Chen Z, Zeng H, Guo Y, Liu P, Pan H, Deng A, *et al.* miRNA-145 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting c-Myc. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 151.
- 33 Yang J, Lan H, Huang X, Liu B, Tong Y. MicroRNA-126 inhibits tumor cell growth and its expression level correlates with poor survival in non-small cell lung cancer patients. *PLoS One* 2012; 7(8): e42978.
- 34 Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem* 2007; 282(2): 1479-86.
- 35 Tang F, Zhang R, He Y, Zou M, Guo L, Xi T. MicroRNA-125b induces metastasis by targeting STARD13 in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. *PLoS One* 2012; 7(5): e35435.
- 36 Liang Z, Wu H, Reddy S, Zhu A, Wang S, Blevins D, *et al.* Blockade of invasion and metastasis of breast cancer cells via targeting CXCR4 with an artificial microRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363(3): 542-6.
- 37 Liu M, Lang N, Qiu M, Xu F, Li Q, Tang Q, *et al.* miR-137 targets Cdc42 expression, induces cell cycle G1 arrest and inhibits invasion in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2011; 128(6): 1269-79.
- 38 Zhang Y, Wang Z, Chen M, Peng L, Wang X, Ma Q, *et al.* MicroRNA-143 targets MACC1 to inhibit cell invasion and migration in colorectal cancer. *Mol Cancer* 2012; 11: 23.
- 39 Baraniskin A, Birkenkamp-Demtroder K, Maghnoouj A, Zollner H, Munding J, Klein-Scory S, *et al.* MiR-30a-5p suppresses tumor growth in colon carcinoma by targeting DTL. *Carcinogenesis* 2012; 33(4): 732-9.
- 40 Li Z, Zhan W, Wang Z, Zhu B, He Y, Peng J, *et al.* Inhibition of PRL-3 gene expression in gastric cancer cell line SGC7901 via microRNA suppressed reduces peritoneal metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348(1): 229-37.
- 41 Xia L, Zhang D, Du R, Pan Y, Zhao L, Sun S, *et al.* miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. *Int J Cancer* 2008; 123(2): 372-9.
- 42 Zhang J, Liu QS, Dong WG. Blockade of proliferation and migration of gastric cancer via targeting CDH17 with an artificial



- microRNA. *Med Oncol* 2011; 28(2): 494-501.
- 43 Xia J, Wu Z, Yu C, He W, Zheng H, He Y, *et al.* miR-124 inhibits cell proliferation in gastric cancer through down-regulation of SPHK1. *J Pathol* 2012; 227(4): 470-80.
- 44 Xu T, Zhu Y, Xiong Y, Ge YY, Yun JP, Zhuang SM. MicroRNA-195 suppresses tumorigenicity and regulates G<sub>1</sub>/S transition of human hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 2009; 50(1): 113-21.
- 45 Wang W, Zhao LJ, Tan YX, Ren H, Qi ZT. MiR-138 induces cell cycle arrest by targeting cyclin D3 in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2012; 33(5): 1113-20.
- 46 Chen X, Gong J, Zeng H, Chen N, Huang R, Huang Y, *et al.* MicroRNA145 targets BNIP3 and suppresses prostate cancer progression. *Cancer Res* 2010; 70(7): 2728-38.
- 47 Cao P, Deng Z, Wan M, Huang W, Cramer SD, Xu J, *et al.* MicroRNA-101 negatively regulates Ezh2 and its expression is modulated by androgen receptor and HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$ . *Mol Cancer* 2010; 9: 108.
- 48 Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(39): 13944-9.
- 49 Scheibner KA, Teaboldt B, Hauer MC, Chen X, Cherukuri S, Guo Y, *et al.* MiR-27a functions as a tumor suppressor in acute leukemia by regulating 14-3-3 $\theta$ . *PLoS One* 2012; 7(12): e50895.
- 50 Jiang X, Huang H, Li Z, Li Y, Wang X, Gurbuxani S, *et al.* Blockade of miR-150 maturation by MLL-fusion/MYC/LIN-28 is required for MLL-associated leukemia. *Cancer Cell* 2012; 22(4): 524-35.
- 51 Li Y, Gao L, Luo X, Wang L, Gao X, Wang W, *et al.* Epigenetic silencing of microRNA-193a contributes to leukemogenesis in t(8;21) acute myeloid leukemia by activating the PTEN/PI3K signal pathway. *Blood* 2013; 121(3): 499-509.
- 52 Jiang X, Huang H, Li Z, He C, Li Y, Chen P, *et al.* MiR-495 is a tumor-suppressor microRNA down-regulated in MLL-rearranged leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(47): 19397-402.
- 53 Esposito F, Tornincasa M, Pallante P, Federico A, Borbone E, Pierantoni GM, *et al.* Down-regulation of the miR-25 and miR-30d contributes to the development of anaplastic thyroid carcinoma targeting the polycomb protein EZH2. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(5): E710-8.
- 54 Lu J, He ML, Wang L, Chen Y, Liu X, Dong Q, *et al.* MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2. *Cancer Res* 2011; 71(1): 225-33.
- 55 Chen L, Zheng J, Zhang Y, Yang L, Wang J, Ni J, *et al.* Tumor-specific expression of microRNA-26a suppresses human hepatocellular carcinoma growth via cyclin-dependent and -independent pathways. *Mol Ther* 2011; 19(8): 1521-8.
- 56 Chen Y, Zhu X, Zhang X, Liu B, Huang L. Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy. *Mol Ther* 2010; 18(9): 1650-6.
- 57 Ibrahim AF, Weirauch U, Thomas M, Grunweller A, Hartmann RK, Aigner A. MicroRNA replacement therapy for miR-145 and miR-33a is efficacious in a model of colon carcinoma. *Cancer Res* 2011; 71(15): 5214-24.
- 58 Pan Y, Zhang Y, Jia T, Zhang K, Li J, Wang L. Development of a microRNA delivery system based on bacteriophage MS2 virus-like particles. *FEBS J* 2012; 279(7): 1198-208.
- 59 Ajit SK. Circulating microRNAs as biomarkers, therapeutic targets, and signaling molecules. *Sensors* 2012; 12(3): 3359-69.