

肿瘤发病机制与治疗

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000130

结直肠癌循环血游离 miRs 分子诊断标志物研究进展

杨得志¹, 唐石伏², 柳满然²

(1. 广西中医药大学第三附属医院病理科, 柳州 545001; 2. 重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】微小 RNAs (microRNAs, miRs) 是一类非编码小分子单链 RNA, 主要在翻译水平负性调控基因表达。近年来研究发现, 循环血游离 miRs 对结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 具有潜在的诊断作用。CRC 患者具有特异性的循环血游离 miRs 表达谱, 其中, miR-18a、miR-21、miR-29a 和 miR-92a 等 miRs 均具有潜在的 CRC 诊断价值, 而 miR-7 具有潜在的 CRC 早期诊断价值。这些研究结果表明, 循环血游离 miRs 有可能成为新的 CRC 分子诊断标志物。

【关键词】结直肠癌; 循环血游离 miRs; 诊断价值

【中图分类号】R446.11⁺9

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-08-23

Advance of colorectal cancer' molecular diagnostic biomarkers—circulating free miRs

Yang Dezhi¹, Tang Shifu², Liu Manran²

(1. Department of Pathology, the Third Affiliated Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine;

2. Key Laboratory of Diagnostic Medicine Founded by Ministry of Education, Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】MicroRNAs (miRs) are noncoding small RNAs, being single strand in the mature form, which negatively regulate gene expression at the translational level. Recent studies have showed that circulating free miRs will probably play an important role in diagnosing colorectal cancer (CRC). CRC patients have a specific expression profile of circulating free miRs, among which miR-18a, miR-21, miR-29a, and miR-92a have a potential di-

作者介绍: 杨得志, Email: Yangdezhi0214@hotmail.com,

研究方向: 肿瘤细胞分子诊断。

通信作者: 柳满然, Email: mliu-hncq@hotmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81172296)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000130.html>

[36] Malzkorn B, Wolter M, Liesenberg F, et al. Identification and functional characterization of micrnas involved in the malignant progression of gliomas[J]. Brain Pathol, 2010, 20(3): 539-550.

[37] Sand M, Skrygan M, Sand D, et al. Comparative microarray analysis of micrna expression profiles in primary cutaneous malignant melanoma, cutaneous malignant melanoma metastases, and benign melanocytic nevi[J]. Cell Tissue Res, 2013, 351(1): 85-98.

[38] Liu AM, Yao TJ, Wang W, et al. Circulating mir-15b and mir-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study[J]. BMJ open, 2012, 2(2): e000825.

[39] Yip L, Kelly L, Shuai Y, et al. Micrna signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma[J]. Ann Surg Oncology, 2011, 18(7): 2035-2041.

[40] Sorrentino A, Liu CG, Addario A, et al. Role of micrnas in drug-resistant ovarian cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2008, 111(3): 478-486.

[41] Dai Y, Xie CH, Neis JP, et al. Micrna expression profiles of head and neck squamous cell carcinoma with docetaxel-induced multidrug resistance[J]. Head Neck, 2011, 33(6): 786-791.

[42] Cui XY, Guo YJ, Yao HR. [analysis of micrna in drug-resistant

breast cancer cell line mcf-7/adr][J]. Journal of Southern Medical University, 2008, 28(10): 1813-1815.

[43] Xu CZ, Xie J, Jin B, et al. Gene and micrna expression reveals sensitivity to paclitaxel in laryngeal cancer cell line[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(7): 1351-1361.

[44] Zhang X, Huang L, Zhao Y, et al. Downregulation of mir-130a contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells by targeting x-linked inhibitor of apoptosis (xiap) directly[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2013, 45(12): 995-1001.

[45] Yang F, Miao L, Mei Y, et al. Retinoic acid-induced hoxa5 expression is co-regulated by hur and mir-130a[J]. Cell Signal, 2013, 25(6): 1476-1485.

[46] Ma S, Tang KH, Chan YP, et al. Mir-130b promotes cd133(+) liver tumor-initiating cell growth and self-renewal via tumor protein 53-induced nuclear protein 1[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(6): 694-707.

[47] Yeung ML, Yasunaga J, Benmasser Y, et al. Roles for micrnas, mir-93 and mir-130b, and tumor protein 53-induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human t-cell lymphotropic virus 1[J]. Cancer Res, 2008, 68(21): 8976-8985.

(责任编辑: 冉明会)

agnostic value for CRC respectively. Moreover, miR-7 may distinguish patients of CRC at early stage from healthy individuals. These significant findings suggest that circulating free miRs are potential molecular diagnostic biomarkers of CRC.

【Key words】colorectal cancer; circulating free miRs; diagnostic value

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的重大恶性肿瘤。世界卫生组织最新统计,全球范围内 CRC 新发病例数和死亡病例数分别占癌症发病率和死亡率第 3 位和第 4 位^[1]; 占我国常见癌症发病率和死亡率第 5 位(WHO GOLOB-CAN 2008)且其发病率在逐渐上升,是危害国人健康的主要恶性肿瘤之一^[2]。高效、安全和方便的早期诊断能有效降低 CRC 死亡率。大便隐血实验(fecal occult blood test, FOBT)和结肠镜检查是国内外临床筛查 CRC 的“一线”和“二线”方法,但均有一定局限性。近年来研究表明,循环血游离微小 RNAs (microRNAs, miRs)是一种具有应用前景的 CRC 分子诊断标志物,有可能极大地提高 CRC 筛查效率。现综述其研究进展如下。

1 CRC 传统检测方法的优缺点

早期诊断在改善 CRC 预后等方面具有重要意义。CRC 患者 5 年生存率取决于其临床病理分期^[3], Dukes' A 期和 D 期的 CRC 患者 5 年生存率分别为 90% 和 15%^[4]。由于 CRC 发展的隐秘性,高效的 CRC 筛查方法是改善 CRC 早期诊断和预后的重要手段。因此,实现 CRC 的“早期发现、早期诊断、早期治疗”,可有效减轻 CRC 的疾病负担。

目前临床上 CRC 筛查的主要手段及优缺点如下:(1) FOBT 法简单快速,成本低,安全,应用广^[5];但灵敏度(67%)较低,漏诊率高^[6]。(2)癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、糖链抗原 19-9(carbohydrate antigen 199, CA199)和癌抗原 242(cancer antigen 242, CA242)等 CRC 肿瘤标志物检测,方便、成本低、安全,主要用于 CRC 辅助诊断、疗效评价和复发判断;但灵敏度和特异度均较低^[7]。(3)结肠镜检查是 CRC 早期诊断的重要手段,直观、精确、可靠;但费用高、侵入性强、并发症风险较大,病人依从性低,漏诊率高^[8],需要经验丰富的肠镜专家等。故以上方法均不能实现对 CRC 的高灵敏、高特异筛查。

2 CRC 循环血游离 miRs 分子诊断标志物研究现状

最近研究表明,血液中游离 miRs 对 CRC 的诊断具有潜在的应用价值,有望成为 CRC 的分子诊断标志物。

2.1 miRs 来源、生成机制和生物学功能

miRs 是一类长约 19~25 个核苷酸,人类基因组内存在近 2 000 个 miRs 基因,约占基因组的 3%,调控基因组内 1/3 左右基因的表达^[9]。miRs 基因一般位于基因组非编码区和结构基因内含子区,在 RNA 聚合酶 II 作用下转录生成初级 miRs (pri-miRs),在核内被 Drosha 酶加工成前体 miRs (pre-miRs),由转运蛋白 Exportin-5 转运到胞浆,经 Dicer 酶加工成成熟 miRs,主要在翻译水平负调控基因表达。miRs 与肿瘤病理过程密切相关^[10],起抑癌或促癌作用^[11]。

2.2 组织 miRs 表达谱与 CRC 诊断

Schetter 等^[12]采用 miRs 芯片检测证实,CRC 癌组织和癌旁黏膜组织中 miRs 表达谱存在明显差异,其中 miR-20a/21/106a/181b/203 等 5 个 miRs 在 CRC 组织中高表达。miRs 生物学功能研究表明,miRs 表达异常升高或降低与肿瘤细胞启动、增殖失控和转移等 CRC 形成过程密切相关^[13]。例如,miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 和 miR-429 等抑癌基因表达下调,上调其靶蛋白 ZEB1 表达,引起上皮间充质转变(epithelial mesenchymal transition, EMT),促进肿瘤转移^[14]。这些研究提示 miRs 可能是新型的 CRC 分子诊断标志物。

越来越多的研究表明,组织 miRs 表达谱具有潜在的 CRC 诊断价值(表 1)。首先,组织 miRs 表达谱能有效区分 CRC 组织与正常结肠黏膜组织。Lu 等^[15]采用基于荧光微球的 miRs 表达谱分析技术,发现 miR-21 等 31 种 miRs 表达上调,miR-34b 等 16 种 miRs 表达下调。与 mRNA 表达数据相比,组织 miRs 表达谱不仅能检测 CRC 组织来源,而且还能判断 CRC 组织分化程度。这提示,组织 miRs 表达谱具有潜在的 CRC 诊断价值。最近,Ma 等^[16]证实 CRC 组织中异常高表达的 miR-106a 和下调表达的 miR-30a-3p/133a/145/125a

表 1 CRC 组织中失调的 miRs
Tab.1 Dysregulated miRs in CRC tissues

失调的 miRs	表达改变 ^a	临床相关	参考文献
47 miRs	↑: miR-21 等 31 种 miRs; ↓: miR-34b 等 16 种 miRs	判别 CRC 组织来源和分化程度	[15]
8 miRs	↑ ^b : miR-191/032/025/092-1/092-2/092-3; ↓ ^b : miR-223/155	区分微卫星稳定和 unstable CRC	[19]
5 miRs	↑: miR-20a/21/106a/181b/203; ↑: miR-106	潜在的 CRC 诊断作用	[12]
5 miRs	↓: miR-30a-3p/145/125a/133a	潜在的 CRC 诊断价值	[16]
3 miR	↑: miR-375/424/92a	鉴别诊断 CRC 和高级上皮腺瘤	[17]
3 miRs	↑: miR-193a-3p/23a/338-5p	鉴别诊断 CRC	[18]
5 miRs	↑: miR-423-5p/210/720/320a/378	潜在的 CRC 早期诊断标志物	[19]

注: a, 除非特别注明, CRC 组织中 miRs 的表达改变是相对于正常结肠组织, $P < 0.05$; b, 与微卫星稳定 CRC 组织相比; ↑ 和 ↓ 分别表示表达上调和下调

表 2 CRC 患者循环血中失调游离 miRs
Tab.2 Dysregulated circulating free miRs in CRC patients

dysregulated miRs	表达改变 ^a	诊断价值 (AUC ^b)	参考文献
miR-29a			
miR-92a	↑	单独检测:0.84 联合检测:0.88	[26-28]
miR-221	↑	0.61	[29]
miR-21	↑	诊断 CRC 和结直肠癌的 AUC 分别为 0.81 和 0.92	[30-31]
miR-601	↑		
miR-760	↓		
miR-409-3p		联合检测:0.79	[32]
miR-7	↑		
miR-93		联合检测 Dukes' A 期 CRC:0.89	[33]
miR-18a	↑	0.80	[27-28]
miR-19a	↑	0.75	[28]
miR-19b	↑	0.80	[28]
miR-15b	↑	0.70	[28]
miR-335	↑	0.74	[28]

注:a,相对于健康人的, $P<0.05$; ↑和↓分别表示表达上调和下调;b,未特别说明,数值为 miR(s)对CRC的诊断价值

很可能是CRC诊断的良好标志物。Wang小组^[17]、Yong小组^[18]分别发现miR-375/424/92a、miR-193a-3p、miR-23a和miR-338-5p在CRC组织中异常高表达,应用这些miRs联合检测CRC,其ROC曲线下面积(the areas under the ROC curve, AUC)值分别为0.92和0.89。其次,组织miRs表达谱可区分不同CRC亚型。Lanza等^[19]利用与CRC有关的14种miRs表达芯片,能区分微卫星稳定型和不稳定型的CRC,其诊断符合率为92%。再次,组织miRs表达谱具有潜在的早期CRC诊断价值。有2项研究报道,临床早期和晚期CRC癌组织中的miRs表达谱没有差异^[20-21],即早期CRC癌变组织中包含有晚期CRC组织中检测到的异常miRs。综上,组织miRs表达谱具有潜在的CRC诊断价值。然而,上述CRC的miRs表达谱均建立在CRC癌组织基础上,具有有创性、技术复杂、耗费大等缺陷,故难以广泛应用于临床。

2.3 循环血游离 miRs 对 CRC 的诊断价值

最近发现,循环血中癌细胞来源游离miRs有望成为CRC分子诊断标志物。血液中游离miRs主要由血细胞和全身各部位组织细胞以微小囊泡为载体主动分泌至循环血,具有稳定、耐受RNA酶作用和反复冻融等特点。Mitchell等^[22]首先发现:人循环血液存在游离成熟的miRs,且血清和血浆中的miRs种类和丰度没有明显差异;在前列腺癌移植瘤模型中,细胞株(22Rv1)来源的miR-629*和miR-660存在于小鼠血浆中,并且血浆中这2种miRs的含量与肿瘤大小成正相关。Pigati等^[23]发现在小鼠乳腺癌移植瘤模型中,MCF-7细胞能将细胞内miR-451等miRs释放入小鼠外周血中,miR-451的这种选择性释放机制具有癌细胞种类特异性。Taylor等^[24]采用EPCAM磁珠分选技术从卵巢癌患者血清中分离到肿瘤细胞胞吐体,并检测到存在患者肿瘤细胞的miRs。Chen等^[25]从CRC患者血清中检出69种CRC特异的miRs,如miR-134/146a/221/222/23a。

鉴于CRC患者循环血中游离miRs与CRC组织细胞高

度一致,临床上CRC患者循环血游离miRs具有潜在的诊断价值(表2)。

循环血中游离miR-29a和miR-92a首先被发现具有潜在的CRC诊断作用。CRC患者血液中游离miR-29a和miR-92a含量均升高,检测CRC的AUC均为0.84^[26]。随后多项研究发现,血液中高水平的游离miR-21/18a/221/19a/19b等miRs对CRC的AUC值在0.61~0.80之间,说明这些miRs均是潜在的CRC分子诊断标志物^[27-31]。循环血中多个游离miRs并联检测能提高对CRC的诊断价值,如miR-29a和miR-92a^[26]。且用于联检的miRs数目越多,对CRC诊断越准确。令人兴奋的是,游离miRs还可能具有潜在的早期CRC诊断价值。Wang等^[32]发现miR-7/93/409-3p联合诊断Dukes'A期CRC的AUC为0.90。血液中下调的游离miRs也同样具有潜在的CRC诊断价值,如Wang等^[33]发现CRC患者血液中游离miR601/760下调,诊断CRC和结直肠上皮内进展期腺瘤的AUC分别为0.79和0.68。但低表达的miRs不利于检测,特异高表达的游离miRs被优先作为评价CRC的分子诊断标志物,以提高检测的灵敏度和特异度^[34]。但需要指出的是,CRC循环血游离miRs分子诊断标志物研究的样本数量有限、缺乏CRC亚型和病理特征与游离miRs相关性研究,因此,深入评价循环血游离miRs对CRC的诊断尤其是早期诊断价值极为必要^[25,28]。

3 结束语

临床上,CRC早期检测仍然是个难题。FOBT方法虽然简便、便宜、快速,但其灵敏度很低;结肠镜筛查法灵敏度和特异度均很高,但由于其侵入性,人群的依从性很低。循环血游离miRs是一种新发现的CRC分子诊断标志物,稳定性好,易获得,检测方法成熟简单,具有潜在的应用价值,

有望对 CRC 早期诊断产生深刻影响。

参 考 文 献

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893–2917.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 中国癌症预防与控制规划纲要 2004–2010[J]. *中国肿瘤*, 2004, 13(2): 65–68.
- [3] Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: molecular basis of colorectal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(25): 2449–2460.
- [4] Aslam MI, Taylor K, Pringle JH, et al. MicroRNAs are novel biomarkers of colorectal cancer[J]. *Br J Surg*, 2009, 96(7): 702–710.
- [5] 李世荣. 大肠癌早期诊断的基本策略[J]. *中华消化杂志*, 2006, 28(8): 570–572.
- [6] Teoh ML, Puvan R, Cheah PY, et al. Colorectal cancer screening: yield of faecal occult blood testing[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010, 11(1): 153–156.
- [7] Sun Z, Fu X, Zhang L, et al. A protein chip system for parallel analysis of multi-tumor markers and its application in cancer detection[J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(2C): 1159–1165.
- [8] 姜泊. 大肠癌早期诊断与治疗存在的几个问题与对策[J]. *中华消化内镜杂志*, 2006, 23(2): 152–154.
- [9] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215–233.
- [10] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(4): 259–269.
- [11] Wu W, Sun M, Zou GM, et al. MicroRNA and cancer: Current status and prospective[J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(5): 953–960.
- [12] Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma[J]. *JAMA*, 2008, 299(4): 425–436.
- [13] Liu M, Chen H. The role of microRNAs in colorectal cancer[J]. *J Genet Genomics*, 2010, 37(6): 347–358.
- [14] Burk U, Schubert J, Wellner U, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells[J]. *EMBO Rep*, 2008, 9(6): 582–589.
- [15] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834–838.
- [16] Ma Y, Zhang P, Yang J, et al. Candidate microRNA biomarkers in human colorectal cancer: systematic review profiling studies and experimental validation[J]. *Int J Cancer*, 2011, 130(9): 2077–2087.
- [17] Wang S, Wang L, Bayaxi N, et al. A microRNA panel to discriminate carcinomas from high-grade intraepithelial neoplasms in colonoscopy biopsy tissue[J]. *Gut*, 2013, 62(2): 280–289.
- [18] Yong FL, Law CW, Wang CW. Potentiality of a triple microRNA classifier: miR-193a-3p, miR-23a and miR-338-5p for early detection of colorectal cancer[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 280.
- [19] Lanza G, Ferracin M, Gafa R, et al. mRNA/microRNA gene expression profile in microsatellite unstable colorectal cancer[J]. *Mol Cancer*, 2007, 6: 54.
- [20] Hofslø E, Sjørsen W, Prestvik WS, et al. Identification of serum microRNA profiles in colon cancer[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(8): 1712–1719.
- [21] Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, et al. Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer[J]. *Int J Oncol*, 2009, 34(4): 1069–1075.
- [22] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30): 10513–10518.
- [23] Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, et al. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13515.
- [24] 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.
- [25] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. *Cell Res*, 2008, 18(10): 997–1006.
- [26] Huang Z, Huang D, Ni S, et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(1): 118–126.
- [27] Vega AB, Pericay C, Moya I, et al. microRNA expression profile in stage III colorectal cancer: circulating miR-18a and miR-29a as promising biomarkers[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(1): 320–326.
- [28] Giraldez MD, Lozano JJ, Ramirez G, et al. Circulating microRNAs as biomarkers of colorectal cancer: results from a genome-wide profiling and validation study[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2013, 11(6): 681–688.
- [29] Pu XX, Huang GL, Guo HQ, et al. Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(10): 1674–1680.
- [30] Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, et al. Plasma miR-21: a potential diagnostic marker of colorectal cancer[J]. *Ann Surg*, 2012, 256(3): 544–551.
- [31] Toiyama Y, Takahashi M, Hur K, et al. Serum miR-21 as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105(12): 849–859.
- [32] Wang Q, Huang Z, Ni S, et al. Plasma miR-601 and miR-760 are novel biomarkers for the early detection of colorectal cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44398.
- [33] Wang S, Xiang J, Li Z, et al. A plasma microRNA panel for early detection of colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2013. doi: 10.1002/ijc.28136 [Epub ahead of time].
- [34] 陈熹, 张峻峰, 曾科, 等. 血清 microRNA——一种非侵入性的肿瘤标志物[J]. *生命科学*, 2010, 22(7): 649–654.

(责任编辑: 冉明会)