

ted reproduction; a look at endometrial receptivity[J]. Reprod Biomed Online, 2013, 27(5): 530-538.

[13] Hatasaka H. Clinical management of the uterine factor in infertility[J]. Clin Obstet Gynecol, 2011, 54(4): 696-709.

[14] Falcone T, Parker WH. Surgical management of leiomyomas for fertility or uterine preservation[J]. Obstet Gynecol, 2013, 121(4): 856-868.

[15] Palomba S, Zupi E, Falbo A, et al. A multicenter randomized, controlled study comparing laparoscopic versus mini-laparotomic myomectomy; reproductive outcomes[J]. Fertil Steril, 2007, 88(4): 933-941.

(收稿日期: 2014-09-15 修回日期: 2015-02-21)

• 综述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.15.041

## 微小 RNA 在食管鳞癌化疗耐药性中的研究现状\*

胡智<sup>1</sup>, 刘单<sup>2</sup>综述, 戴天阳<sup>1</sup>审校

(1. 泸州医学院附属医院胸心外科 646000; 2. 泸州医学院 646000)

[关键词] 微小 RNA; 食管鳞癌; 化疗耐药

[中图分类号] R655.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)15-2124-03

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是我国常见的消化道恶性肿瘤之一; 化疗及新辅助化疗是 ESCC 非手术治疗的重要手段, 但后期肿瘤耐药性的产生是临床面临的难题。近年来表观遗传学领域研究显示: 微小 RNA(miRNAs)是非编码单链 RNA, 在肿瘤细胞增殖、转移、凋亡等过程中扮演着重要角色; 通过筛查肿瘤耐药产生过程中 miRNAs 的变化, 寻找相应的靶蛋白及信号通路, 将为逆转耐药性, 增加化疗药物敏感性提供帮助。

### 1 miRNAs 的生物角色

miRNAs 是新发现的一类高度进化、保守、非编码的长度为 19~25 个核苷酸的非编码单链 RNA。相关实验研究认为, miRNAs 在 RNA 诱导沉默复合物作用下与互补 mRNAs 结合, 降解靶 mRNAs 或阻止其转录后翻译。人类基因组中有约 30% 的编码蛋白基因受其调控, miRNAs 在调控发育、分化、增殖及凋亡等基本生命活动中扮演着重要角色。近年来研究认为, miRNAs 调控基因表达存在复杂的组合模式。miRNAs 作为人类基因组中最大的一类调控因子, 参与人类约 1/3 的编码蛋白基因的调控。研究表明, miRNAs 可通过肿瘤细胞的关键调控靶标而发挥基因转录后调控的作用, 影响疾病的发生发展过程。miRNAs 与 ESCC 的关系是在 2008 年由 Guo 等<sup>[1]</sup>首次报道: 他们采用 miRNAs 微阵列技术发现 hsa-miR-25, hsa-miR-424, hsa-miR-151 在 ESCC 手术标本中较癌旁组织明显上调。

### 2 肿瘤化疗耐药

无论是对晚期癌症患者术前诱导缓解还是手术切除后巩固, 肿瘤化疗仍是目前提高 ESCC 患者生存期和生活质量的主要手段, 然而, 肿瘤细胞化疗耐药性的产生是临床上影响患者疗效、预后的障碍<sup>[2-3]</sup>。根据肿瘤的耐药谱可分为原药耐药和多药耐药(multidrug resistance, MDR)。目前更多的是 MDR, 更换化疗方案或采取联合化疗的方案可能收益甚微, 且带来更多的药物不良反应, 最终导致化疗失败。

肿瘤耐药机制包括药物吸收降低或排出增多、药物靶点改

变、细胞修复功能增强及细胞凋亡减弱等, 涉及药物作用各个环节关键基因突变可能导致耐药发生。肿瘤化疗耐药的主要分子机制是: (1) 通过改变控制凋亡相关蛋白质的平衡来降低化疗敏感性, 如 p53 基因的突变、PTEN 基因突变、Bcl-2 基因突变、凋亡配体的表达。(2) 与药物转运相关蛋白表达增强, 如 P-糖蛋白(P-gp), 来源于多药耐药相关蛋白和乳腺癌耐药蛋白。(3) 肿瘤细胞损伤后 DNA 自我修复能力增强, 如 DNA 拓扑异构酶、烷基鸟嘌呤 DNA 烷基转移酶 AGT、核酸切除修复增强以及错配修复缺陷。

因此, 克服甚至逆转 ESCC 的多药耐药是亟须解决的难题之一, 为此, 近年来许多科学家试图从遗传学及表观遗传学的分子途径寻求突破。在所有病例中寻找更好的方法来界定耐药, 是为克服 ESCC 耐药提供可行方案的关键步骤<sup>[3]</sup>。

### 3 miRNAs 与肿瘤化疗耐药

大量实验和临床研究表明, 肿瘤耐药细胞中存在 miRNA 表达异常, 其异常往往导致肿瘤耐药。miRNAs 为一类高度保守的非编码 RNAs, 通过对各环节关键基因表达的调控进而调节食管癌细胞对化疗药物的敏感性, 但其涉及过程十分复杂: 肿瘤细胞 miRNAs 突变或表达异常, 导致 miRNAs 对靶基因如药物转运相关基因、细胞损伤后自我修复能力相关基因、细胞凋亡相关基因及肿瘤上皮间质化相关基因等表达的异常调控, 导致肿瘤细胞化疗耐药产生。同时, 根据这些 miRNAs 表达情况可预测肿瘤患者对药物的反应<sup>[4]</sup>。

**3.1 miRNAs 基因多态性与 ESCC 耐药** miRNA 基因多态性包括影响 miRNAs 正常功能的各种基因多态性。在人类基因组中导致 miRNAs 功能增强或减弱的各种突变可分为影响 miRNAs 生物合成的基因突变、miRNAs 靶基因的突变以及影响 miRNAs 基因正常的表观遗传学调节。Wu 等<sup>[5]</sup>通过对 5 个基因位点单核苷酸基因多态性(miR-146a rs2910164, miR-196a2 rs11614913, miR-100 rs1834306, miR-125a rs12976445 和 miR-26a1 rs7372209)进行分析, 发现 miR-146a rs2910164 与血液毒性有关, miR-196a2 rs11614913 和 miR-125a rs12976445 与生

\* 基金项目: 泸州市科技局科技创新苗子项目[2013-R-51(9/18)]。临床研究。

作者简介: 胡智(1985—), 硕士, 住院医师, 主要从事胸部肿瘤基础及

存率有关,miRNAs 基因多态性可预测以铂类为基础的 ESCC 化疗药物的疗效。

**3.2 miRNAs 异常表达与 ESCC 耐药** Hummel 等<sup>[6]</sup>在研究新辅助化疗(neoadjuvant chemotherapy, NACT)与食管癌细胞 miRNAs 的表达关系时发现,选用顺铂(cisplatin, CDDP)和 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-flu)对 ESCC 处理 24 h 或 72 h 之后,抽取 RNA 作基因芯片研究发现:ESCC 在短期或长期暴露后表达 miRNAs 呈现类似的变化,13 个 miRNAs 在作用 24、72 h 后(miR-199a-5p, miR-302f, miR-320a, miR-342-3p, miR-425, miR-455-3p, miR-486-3p, miR-519c-5p, miR-548d-5p, miR-617, miR-758, miR-766, miR-1286)的表达均上调。miRNAs 网络预测功能显示:miRNAs 的靶分子通路与化疗后生存时间密切相关,涉及细胞增殖、凋亡过程, DNA 复制、重组和修复过程以及药物代谢的过程。

**3.2.1 miRNAs 过表达与 ESCC 耐药** 为了确定 miRNAs 在食管癌中的表达与患者化疗耐药机制之间的关系, Hamano 等<sup>[7]</sup>收集接受术前化疗的食管癌手术患者的标本,选取几种被认为是参与调节干细胞功能的 miRNAs(let-7a、let-7g、miR-21、miR-134、miR-145、miR-155、miR-200c、miR-203 和 miR-296),并分别进行实时逆转录 PCR 检测,结果显示:在顺铂耐药的 ESCC 中,miR-200c 表达显著增加,通过转染抑制 miR-200c 细胞,其对顺铂敏感性和细胞凋亡率明显增加;而敲除 miR-200c 表达将会使蛋白磷酸酶 2A 的一个亚基(PPP2R1B)含量上升,后者会导致 Akt 信号通路的激活。

**3.2.2 miRNAs 低表达与 ESCC 耐药** miRNAs 并非都是一致性影响化疗耐药, Hummel 等<sup>[4]</sup>培育了对 CDDP、5-flu 耐药的 ESCC 发现:70%的细胞株 miR-148a 上调显著增加 CDDP 敏感性,表现为:CDDP 作用后细胞活力减少 22.6%±7.9%至 50.5%±10.6%, 5-flu 作用后细胞活力减少 6.0%±0.8%至 15.0%±4.1%,上述过程可能与 CDC25B、Bcl-2 相关。但 5-flu 耐药 ESCC 细胞株暴露于 5-flu 没有相应的作用。Mayne 等<sup>[8]</sup>认为,术前对食管癌患者的诱导放化疗所取得的临床效果的差异性,与患者体内 miRNAs 的表达差异有关,他通过对大量临床样本的筛查,发现 miR-135b、miR-145 在癌组织中的表达减少,提高了诱导放化疗后无瘤生存期。

**3.3 miRNA 调控 ESCC 耐药的分子机制**

**3.3.1 miRNAs 调控细胞凋亡相关基因表达** (1)p53 基因是重要的抑癌基因,化疗使肿瘤细胞 DNA 损伤,其损伤过程将启动 p53 基因促使细胞进入 G<sub>1</sub> 期,进而抑制其生长并诱导凋亡;若 p53 基因表达异常会影响该凋亡过程,使细胞对化疗不敏感。Yuan 等<sup>[9]</sup>认为:睾丸特异性基因 10(testis specific 10, TSGA10)具有与 miR-577 相同的结合位点,miR-577/TSGA10 轴将影响 ESCC 的 G<sub>1</sub>-S 期过渡,miR-577/TSGA10 轴激活总是伴随着 p53 通路或 RB 通路失活。(2)PTEN 基因亦具有强大的抑癌作用,通过抑制 PI3K-Akt 信号通路的激活介导细胞凋亡。Li 等<sup>[10]</sup>证实:敲除 miR-21 显著增加 PTEN 蛋白的表达,增强 ESCC 在化疗中的细胞敏感性。(3)肿瘤坏死因子凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)广泛存在于食管癌中,同时也存在于正常细胞,为了提高 TRAIL 作用的特异性,Zhou 等<sup>[11]</sup>利用由腺病毒组装的 miR-143、miR-122 应答元件(Ad-TRAIL-143-122)去限制在 ESCC 中 TRAIL 表达的调控,提高了化疗的疗效。

**3.3.2 miRNAs 调控药物外排作用相关的蛋白** P-gP 是一种相对分子质量为 170×10<sup>3</sup> 的跨膜糖蛋白(P170),具备能量依赖性“药泵”功能:P-gP 能将细胞内药物泵出细胞外,减低了细胞内的药物浓度使细胞产生耐药性。Zhou 等<sup>[12]</sup>对 104 例食管癌及癌旁组织进行实时定量 PCR 分析,发现在 ESCC 中 miR-483 和 miR-214 的表达明显上调,与总体生存期呈负相关;术后化疗临床观察显示:二者的高表达可能预测化疗效果不佳。miR-483 和 miR-214 下调可以赋予 P-gP 相关药物对食管癌细胞的敏感性,将增加细胞内个阿霉素(ADR)积累和减少 ADR 释放指数,表明 miR-483 和 miR-214 可能直接或间接影响细胞内药物的泵出。另外,下调 miR-296<sup>[13]</sup>、miR-27a<sup>[14]</sup>可以增加 ADR 的细胞浓度,同时促进 ADR 介导的 ESCC 凋亡;另外还可以明显减少 P-gP、Bcl-2 的表达以及 MDR1 的转录。

**3.3.3 miRNAs 调控细胞损伤后自我修复能力相关基因表达** 聚腺苷酸二磷酸核糖基聚合酶 1[poly(ADP-ribose) polymerase-1, PARP1]是存在于食管上皮的基因,在外界损伤刺激下,PARP1 易被受损的 DNA 激活,进而引起细胞炎性反应甚至凋亡。Seki<sup>[15]</sup>认为在 ESCC 中 miR-141 通过 YAP1(DNA 损伤修复的重要基因)表达调控顺铂化疗耐药性;Imanaka 等<sup>[16]</sup>通过实验证明:miR-141 在顺铂耐药 ESCC 株中高表达,它通过调控 YAP1 3'-非编码区降低其表达从而调节顺铂耐药性。

**3.3.4 miRNAs 调控肿瘤上皮间质化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关基因表达** EMT 在胚胎发育、创伤修复与组织再生、上皮来源肿瘤转移与侵袭过程和耐药中均发挥着重要作用。Zhang 等<sup>[17]</sup>在 EC9706 细胞株中发现:上调的 miR-21 可以促进 EMT 依赖因子——转化生长因子 β(transforming growth factor beta, TGF-β)表达。Yokobori 等<sup>[18]</sup>将 TE-8 种植到小鼠上发现,miR-150 可以通过降解 EMT 诱导因子 ZEB1 降低其致瘤性。

**3.4 miRNAs 预测 ESCC 对药物的疗效** 无论是术前辅助还是术后化疗,早期患者对抗肿瘤药物的敏感性高,但是随着治疗时间的延长患者对抗肿瘤药物产生了耐受性。因而寻找可预测的生物标志物辅助临床实验方案,以达到在筛选食管癌患者进行确切、对症的药物治疗;近年来研究发现,miRNAs 在食管癌的侵袭、分化、术后生存期等方面扮演了重要角色<sup>[19]</sup>。Tanaka 等<sup>[20]</sup>认为:miR-200c 水平预测化疗反应和行食管癌 NACT 患者的预后,miR-200c 的高表达与无进展生存期缩短有关,多变量分析确定 miR200c 表达水平是接受 NACT 食管癌患者最有价值的预后因子。Odenthal 等<sup>[21]</sup>对患者接受 NACT 后进行手术切除和病理学评价,同时从治疗前 ESCC 组织中和相应的手术标本中分离 miRNAs,通过对 NACT 前后 768 个 miRNAs 分析发现:接受 NACT 后 miR-192、miR-194 和 miR-622 明显下调,更重要的是接受 NACT 之前 miR-192 和 miR-194 与联合治疗后的病理评价相关,可作为参照指标。Motoori 等<sup>[22]</sup>选取 25 例铂类为基础的 ESCC NACT 患者,利用寡核苷酸微阵列探针对其内镜活检标本进行综合基因表达谱(comprehensive gene expression profiling, GEP)基因采样,然后利用 CT 扫描患者肿瘤区变化,肿瘤区面积通过 NACT 后减少大于 50%为有效,反之小于或等于 50%为无效。Motoori 等构建了包含 199 个基因的基因表达谱用于预测、筛选

食管癌 NACT 对象,其准确率达到了 82%。Sugimura 等<sup>[23]</sup>认为可以将 let7 用来预测以顺铂为基础的化疗效果指标,同时 let7 通过调控 IL-6/STAT3 通路调节顺铂药物敏感性。

#### 4 总 结

近年来随着研究的深入,越来越多的 miRNAs 及其相关通路在 ESCC 化疗中的作用得到揭示,然而,以 miRNAs 为基础调控化疗效用还有不足之处,需要解决如:如何筛选特异性的 miRNAs 并构建 miRNAs 载体;如何减少载体植入后的排异及毒性反应等问题。另外,耐药性涉及多种因素,而 miRNAs 作为上游调控位点具备多靶位综合调控,如何与化疗药物联合,针对不同耐药途径中主要通路及相关基因、蛋白的表达来增强药物的敏感性,从而实现对临床个体化治疗策略,有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Guo Y, Chen Z, Zhang L, et al. Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(1): 26-33.
- [2] Ma J, Dong C, Ji C. MicroRNA and drug resistance[J]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17(8): 523-531.
- [3] Majumder S, Jacob ST. Emerging role of microRNAs in drug-resistant breast cancer[J]. *Gene Expr*, 2011, 15(3): 141-151.
- [4] Hummel R, Watson DI, Smith C, et al. Mir-148a improves response to chemotherapy in sensitive and resistant oesophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma cells [J]. *J Gastrointest Surg*, 2011, 15(3): 429-438.
- [5] Wu C, Li M, Hu C, et al. Prognostic role of microRNA polymorphisms in patients with advanced esophageal squamous cell carcinoma receiving platinum-based chemotherapy[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014, 73(2): 335-341.
- [6] Hummel R, Wang T, Watson DI, et al. Chemotherapy-induced modification of microRNA expression in esophageal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(4): 1011-1017.
- [7] Hamano R, Miyata H, Yamasaki M, et al. Overexpression of miR-200c induces chemoresistance in esophageal cancers mediated through activation of the Akt signaling pathway[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(9): 3029-3038.
- [8] Mayne GC, Hussey DJ, Watson DI. Can miRNA profiling allow us to determine which patients with esophageal cancer will respond to chemoradio therapy[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2013, 13(3): 271-273.
- [9] Yuan X, He J, Sun F, et al. Effects and interactions of MiR-577 and TSGA10 in regulating esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(12): 2651-2667.
- [10] Li P, Mao WM, Zheng ZG, et al. Down-regulation of PTEN expression modulated by dysregulated miR-21 contributes to the progression of esophageal cancer[J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(12): 3483-3493.
- [11] Zhou K, Yan Y, Zhao S. Esophageal cancer-selective expression of TRAIL mediated by MREs of miR-143 and miR-122[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6): 5787-5795.
- [12] Zhou Y, Hong L. Prediction value of miR-483 and miR-214 in prognosis and multidrug resistance of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2013, 17(6): 470-474.
- [13] Hong L, Han Y, Zhang H, et al. The prognostic and chemotherapeutic value of miR-296 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Ann Surg*, 2010, 251(6): 1056-1063.
- [14] Zhang H, Li M, Han Y, et al. Down-regulation of miR-27a might reverse multidrug resistance of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(9): 2545-2551.
- [15] Seki N. A commentary on MicroRNA-141 confers resistance to cisplatin-induced apoptosis by targeting YAP1 in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Hum Genet*, 2011, 56(5): 339-340.
- [16] Imanaka Y, Tsuchiya S, Sato F, et al. MicroRNA-141 confers resistance to cisplatin-induced apoptosis by targeting YAP1 in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Hum Genet*, 2011, 56(4): 270-276.
- [17] Zhang Y, Pan T, Zhong X, et al. Nicotine upregulates microRNA-21 and promotes TGF- $\beta$ -dependent epithelial-mesenchymal transition of esophageal cancer cells [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(7): 7063-7072.
- [18] Yokobori T, Suzuki S, Tanaka N, et al. MiR-150 is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma via targeting the EMT inducer ZEB1 [J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(1): 48-54.
- [19] Mayne GC, Hussey DJ, Watson DI. MicroRNAs and esophageal cancer—implications for pathogenesis and therapy[J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(7): 1211-1226.
- [20] Tanaka K, Miyata H, Yamasaki M, et al. Circulating miR-200c levels significantly predict response to chemotherapy and prognosis of patients undergoing neoadjuvant chemotherapy for esophageal cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2013 Dec, 20 Suppl 3: S607-S615.
- [21] Odenthal M, Bollschweiler E, Grimminger PP, et al. MicroRNA profiling in locally advanced esophageal cancer indicates a high potential of miR-192 in prediction of multimodality therapy response[J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(10): 2454-2463.
- [22] Motoori M, Takemasa I, Yamasaki M, et al. Prediction of the response to chemotherapy in advanced esophageal cancer by gene expression profiling of biopsy samples[J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(5): 1113-1120.
- [23] Sugimura K, Miyata H, Tanaka K, et al. Let-7 expression is a significant determinant of response to chemotherapy through the regulation of IL-6/STAT3 pathway in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(18): 5144-5153.