

循环 microRNAs 的外泌形成机制及其对乳腺癌侵袭和转移的影响*

万晓庆^{1,2)} 王学健¹⁾ 王艺斐^{1,2)} 姜雨^{1,2)} 路中^{1,2)}
 史立宏¹⁾ 丁怡^{1)**} 王丽华^{1,2)**}

(¹⁾ 潍坊医学院分子肿瘤学实验室, 潍坊 261053; (²⁾ 潍坊医学院附属医院, 潍坊 261053)

摘要 目前乳腺癌的临床诊疗主要依赖影像学和相对较少的预后/预测指标(如雌激素受体、孕激素受体、HER2等)。这些生物标志物主要是基于原发肿瘤病灶的生物学检测,可用于转移或复发的检测指标很少,尤其是在切除肿瘤原发灶后,复发监测很困难。循环 cell-free microRNAs(circulating cf-miRNAs, 或简称 circulating miRNAs)的发现为改变现有乳腺癌临床诊疗模式提供了可能。Cell-free miRNA 通过外泌体、微囊或转运蛋白的主动外泌机制,可能在循环 miRNA 的形成中起着重要作用。Cell-free miRNA 特别是 circulating miRNA 不仅自身可以作为信号分子影响肿瘤细胞和组织微环境,而且还可以与其他信号通路发生交互通讯来调控肿瘤部位新生血管的形成和肿瘤细胞表型的上皮-间质转换,影响乳腺癌的侵袭和转移。本文综述了循环 miRNA 的特征与分泌机制,特别是乳腺癌相关的循环 miRNA 参与作为一种液体活检生物标志物在乳腺癌诊断、预后评价和疗效评估的临床意义。

关键词 microRNA, cell-free microRNAs, 循环 microRNA, 主动外泌, 乳腺癌, 转移

学科分类号 R73

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0040

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,占女性癌症死亡原因的首位。而且乳腺癌的发病率逐年升高,发病年龄趋向年轻化。乳腺癌的诊断及治疗方案的选择主要依据活体组织病理学检查(活检)——肿瘤诊断的“金标准”。但活体组织病理学检查属于有创性检查,可操作次数有限,且切除原发灶后就无法重检,对肿瘤患者病情的评估主要通过影像学及少数血液肿瘤标志物的检测来进行。然而,这些手段对早期转移的检测效果有限。因此,发现并发展新型检测手段,对检测早期肿瘤的发生和转移、指导个体化治疗、评价生存和预后变得尤为重要。近年来,以循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)、循环 cell-free microRNAs (circulating cf-miRNAs 或简称 circulating miRNAs)和循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 的检测为核心的“血源性液体活检(blood-borne liquid biopsy)”逐渐受到人们重视。尽管循环肿瘤细胞(CTCs)的发

现为乳腺癌的早期诊断、监测提供了可能,但 CTCs 的检测技术要求高,需要从 $10^5 \sim 10^7$ 外周血单核细胞中检测 1 个 CTC^[1]。另有研究表明,上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)与肿瘤的远处转移存在密切关系,EMT 可能促进远处转移的发生。而以 EpCAM 为基础的 CTC 检测分离技术会造成间质型肿瘤细胞的漏检。相比之下,由 cf-miRNAs 主动外泌或释放形成的循环 miRNAs, 不仅可能保持 miRNA 原有功能,而且还可以耐受血液 RNase 的降解,其存在更加稳定,利于检测。鉴于 miRNAs 在细胞活动及其在肿瘤发

* 国家自然科学基金(81472489)和山东省科技发展计划(2014GGB14403)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0536-846212, E-mail: wanglihua@wfmc.edu.cn

收稿日期: 2017-02-07, 接受日期: 2017-03-23

生、发展中的重要性,明确 miRNAs 特别是循环 miRNAs 形成与功能,对于阐明乳腺癌细胞发生侵袭和转移的分子机制具有重要意义.为此,本文在概括 microRNA 的功能及其与信号转导通路关系的基础上,综述了循环 miRNAs 的特征、分泌机制,并对与乳腺癌相关的循环 miRNAs 在作为乳腺癌转移或复发的诊断指标、预后评价和药物疗效评估的生物标志物、或肿瘤潜在治疗靶标的可能性做了进一步的评述.

1 循环 miRNAs 的存在、来源与形成机制

miRNA 属于一种分子进化保守的非编码小 RNAs,包含大约 17~25 个核糖核酸,在细胞核中合成,经过 Drosha 酶复合体加工后,由输出蛋白 5(exportin-5)转运出细胞核,在胞质中进一步经过 Dicer 酶复合体的加工成为成熟的 miRNA^[2-5].目前已发现 1 000 多种 miRNAs,一种 miRNA 可以与数百个甚至上千个 mRNA 互补结合,调控 mRNA 的降解或沉默蛋白质翻译过程^[4,6-7].

miRNA 不仅存在于细胞中,而且还以 cell-free miRNA 的形式存在于血液、泪液、尿液、胸腔积液中^[8-10],其中在血液中以 cell-free miRNA 形式存在的 miRNA 特称为循环 miRNA.

细胞 miRNA 的主动外泌机制可能在循环 miRNA 的形成中起着重要作用. Valadi 等^[11]在外泌体(exosome, 50~100 nm)中检测到了 miRNA 的存在,且这些存在于外泌体中的 miRNA 仍保留其功能.细胞内的 miRNA 除通过外泌体分泌出细胞外,还可以由出芽的方式分泌到细胞外,由细胞膜形成的微囊泡(microvesicle),直径较外泌体大(>100 nm),也包含多种 miRNAs^[12]. Zernecke 等^[13]在凋亡小体(apoptotic body)中也发现了 miRNA 的存在.除了上述各种微囊泡途径的外泌方式外,miRNA 还可以通过与高密度脂蛋白(HDL)、RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)的执行元件 argonaute 2 (AGO2)、或 nucleophosmin1(NPM1)结合形成复合体转移到细胞外^[14].此外,一部分 cell-free miRNA 来源于坏死、凋亡、炎症或损伤细胞的被动释放^[15].进一步研究发现, circulating miRNAs 在血液水平和种类上与相应组织的 miRNA(tissue miRNA)不一致,而且 circulating miRNA 还能够避免被血浆中 RNase 降解,在多种物理状态下能够保持其稳定性,提示

cell-free miRNA 被细胞作为功能分子主动分泌的可能性更大一些.尽管 circulating miRNA 可能主要来自于循环系统的细胞,但是从理论上说,几乎所有的细胞都可以释放 miRNA 并进入血液循环,一些组织特异性 miRNA 如肝脏的 miR-122、肌肉的 miR-133a、心脏的 miR-208a 和脑的 miR124 均可在血浆中检测到^[16].

与癌症相关的 circulating miRNA 既可能源于肿瘤组织或细胞,也可以直接来自于循环肿瘤细胞. Mitchell 等^[17]在异种移植前列腺癌的小鼠模型中也发现,前列腺癌相关 circulating miRNA 的水平与对照组之间有明显差异. Chen 等^[18]通过比较正常人群和肿瘤患者的循环 miRNA 谱图,发现健康志愿者的 circulating miRNA 与细胞内 miRNA 谱是一致的;而肺癌患者的 circulating miRNA 谱与血细胞内 miRNA 谱明显不同.因此与癌症相关的 circulating miRNA 可能具有不同的特征. Sieuwerts 等^[19]检测了 50 例转移性乳腺癌病人 CTCs 中的 446 种 miRNA 的表达,发现 28 种 miRNA 可能构成乳腺癌 CTCs 特异的 miRNAs 表达谱,其中 has-miR-183 在 32 例含有 5 个以上 CTC 的患者中表达较高.更有意义的是,进一步通过连锁相关聚类分析方法来比对其中 8 例相应的原发性肿瘤病灶和 CTC 的表达谱,显示 CTC 与原发肿瘤病灶(而不是原发组织来源)的主要表达谱聚类相吻合. Markou 等^[20]分别检测并比较多名乳腺癌患者的肿瘤原发灶和健康志愿者/正常乳腺组织及他们的血浆和 EpCAM⁺CTCs 中 miRNA 的表达,发现 miR-21、miR-146a 在乳腺癌原发灶中表达较对照组高,而 miR-200c、miR-210 的表达较对照组少,但是这 4 种 miRNA 在相应的血浆和 EpCAM⁺CTCs 中的表达均较健康对照组有明显的增多.鉴于 CTC 表型的多样性和检测分离技术的局限性,CTC 的 miRNA 调节机制及与原发肿瘤灶 miRNA 的关系还需要进一步的研究(图 1).

2 与乳腺癌有关联的 circulating miRNAs

MiRNA 在乳腺癌的发生和发展中起双重作用.根据 miRNA 对肿瘤的影响,miRNA 可以分为抑癌 miRNA 和致癌 miRNA.致癌 miRNA 促进肿瘤的发生、发展,通常其表达是上调的.而抑癌 miRNA 则下调致癌基因表达或是阻止与细胞分化、凋亡相关的 miRNA,发挥抑癌作用^[21].例如,

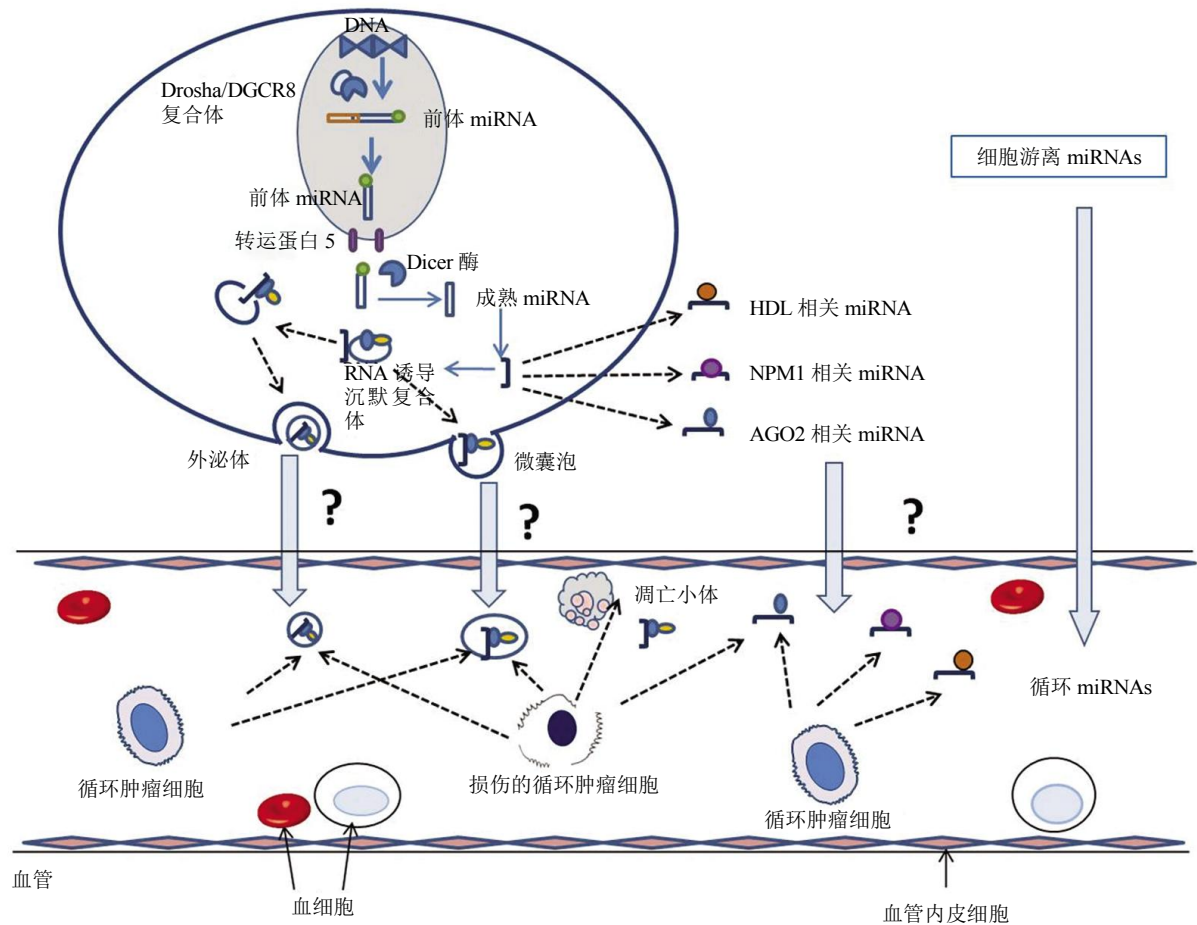


Fig. 1 The excretion mechanisms of cell-free microRNAs and the formation of circulating miRNAs

图 1 Cell-free miRNAs 的外泌与循环 miRNAs 的形成

miR-155 通过抑制 SOCS1 的表达, 提高肿瘤细胞的生长、增殖能力^[22], 在 MCF-7 细胞的体外培养实验中, miR-155 通过作用于 TP53INP1 来促进 MCF-7 细胞的增殖^[23]. MiR-373 和 miR-520c 则作用于 CD44, 增加肿瘤的侵袭和转移能力^[24-25]. miR-244 通过结合于卷曲蛋白 5 (fizzled 5) 下调 Wnt/ β -catenin 通路来抑制乳腺癌细胞增殖和迁移^[26]. miR-10b 在转移性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中的表达较乳腺非转移性细胞系 HMLM 或乳腺非恶性细胞明显升高^[27]. 而且, 将包含 miR-10b 的外泌体与 HMLM 共培养, 发现 HMLM 细胞获得侵袭能力, miR-10b 的靶基因 HOXD10 和 KLF4 表达

下降. 有证据表明, miRNA 的功能取决于它所作用的细胞类型^[21]. 例如, miR-125b、miR-29、miR-146 在不同的细胞类型中, 各自发挥致癌或是抑癌作用是不一致的^[28-32]. Stuckrath 等^[33]发现 miR-130a 和 miR-146a 在 HER2 阳性和 HER2 阴性的乳腺癌患者血浆中的水平明显不同. 基于 cell-free miRNA 在乳腺癌的发生中的作用及 circulating miRNA 在健康人群和乳腺癌患者中的差异, 一些 circulating miRNA 如 miR-155、miR-195、miR-16 等显示具有作为乳腺癌诊断及检测复发和预后的生物标志物的潜能(表 1).

Table 1 Breast cancer-related circulating miRNAs

表 1 乳腺癌相关的 circulating miRNAs

miRNA	水平	细胞类型	作用	文献
miR-155	上调	BC、MBC	诊断	[34]
			预测治疗疗效	[35]
miR-195	上调	BC	诊断	[36]
miR-29a miR-21	上调	BC	诊断、预后 miR-29a(与肿瘤分期相关)	[37]
miR-16 miR-25 miR-222 miRNA-324-3p	上调	高风险 BC	诊断、预后	[38]
let-7 miR-21 miR-202	上调	BC	诊断、预后	[39]
miR-18b miR-103 miR-107 miR-652	上调	TNBC	预测肿瘤复发、总生存期	[40]
miR-210	上调	Residual BC	预测治疗疗效	[41]
miR-27a miR-132 miR-16 miR-107	上调	BC BC ER-neg BC	预测治疗疗效 预测淋巴结转移 抑制细胞迁移和侵袭、预测淋巴结转移	[33]
miR-130a miR-146a		HER2 ⁺ 、N0 BC HER2 ⁺ 、N0 BC	抑制 HER2 ⁺ 细胞凋亡、预测淋巴结转移 抑制 HER2 ⁺ 细胞迁移和侵袭、预测淋巴结转移	
hsa-miR-4270 hsa-miR-1225-5p hsa-miR-188-5p hsa-miR-1202 hsa-miR-4281 hsa-miR-1207-5p hsa-miR-642b-3p hsa-miR-1290 hsa-miR-3141	上调	BC, 尤其是 HER2 ⁺ 、TNBC	诊断	[42]
miR-200a/bc miR-210 miR-215	上调	BC	预测早期转移	[43]
miR-486-5p miR-92a	下调	BC	预测淋巴结转移	[44]

BC: 乳腺癌; MBC: 转移乳腺癌; TNBC: 三阴性乳腺癌.

3 Circulating miRNA 与乳腺癌的侵袭与转移

Cell-free miRNA 特别是 circulating miRNA, 不仅自身可以作为信号分子影响肿瘤细胞和组织微

环境, 而且还可以与其他信号通路发生交互通讯来调控肿瘤部位新生血管的形成和肿瘤细胞表型的上皮-间质转换, 这些调控可能影响癌变发生、侵袭和转移的速度^[21](图 2).

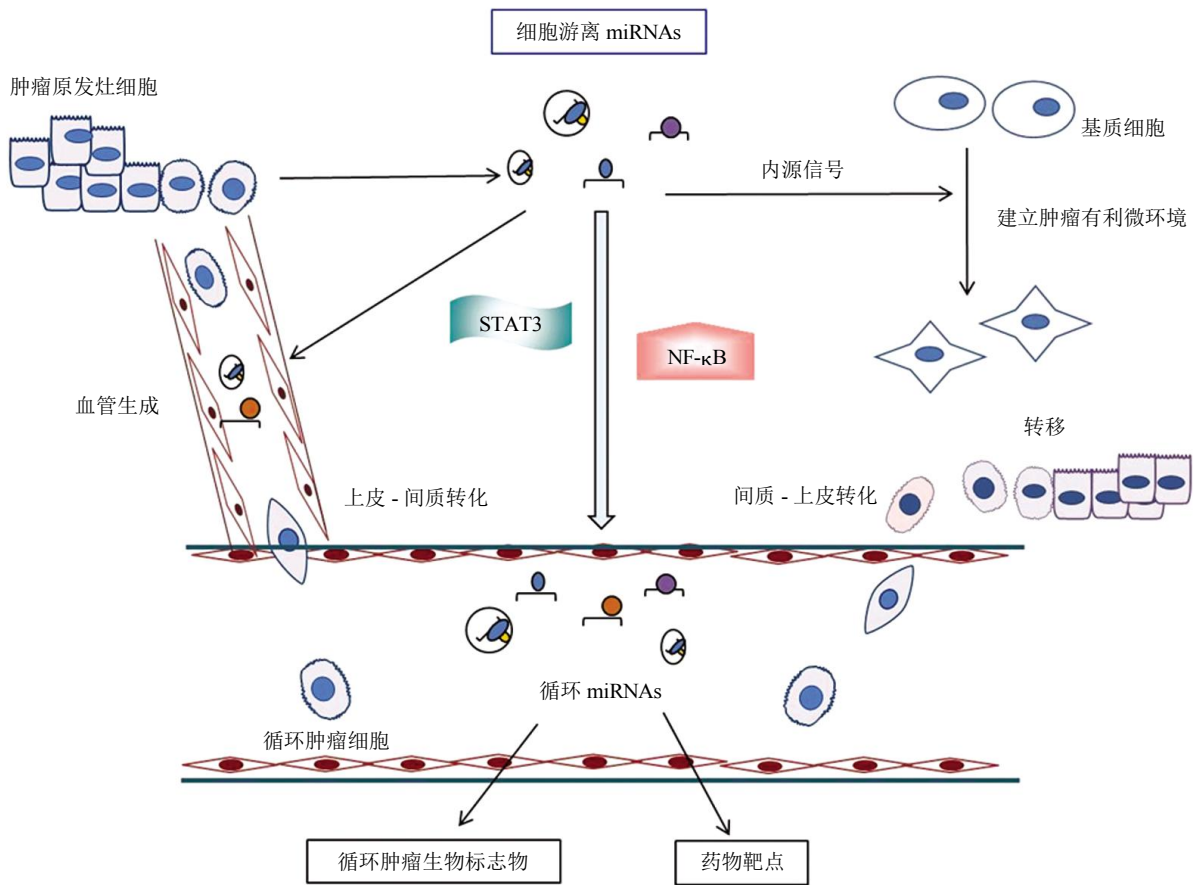


Fig. 2 The hypothetical scheme on circulating miRNAs regulating invasion and metastases of breast cancer

图 2 循环 miRNAs 影响乳腺癌的侵袭与转移的可能机制

3.1 miRNA 自身信号功能影响肿瘤微环境

肿瘤微环境在肿瘤的发生、发展过程起重要的促进作用, 肿瘤细胞不仅通过胞内 miRNA 来调节自身的发展, 还可以通过 cell-free miRNA 与周围非肿瘤细胞进行信息交流. 而且这种细胞间的信息交流是双向的, 以 miRNA 为信号的细胞间交流通路的异常可以为肿瘤生长提供更加合适的微环境^[45]. 乳腺癌细胞可能通过分泌的外泌体 miRNA 来掠夺邻近非肿瘤细胞的营养摄取能力, 尤其是对葡萄糖的摄取, 以利于自身对能量的需求^[46]. 乳腺癌周围非肿瘤细胞也能通过 cell-free miRNA 来影响乳腺癌的状态^[47].

3.2 miRNA 与其他信号转导通路的通讯

miRNA 可以通过参与多种细胞过程影响肿瘤的发展, 包括增殖、分化、新陈代谢、基因组稳定性、凋亡和血管形成^[4, 6], 而且也是唯一在肿瘤细

胞信号通路中起重要作用的非编码 RNAs. miR-200 和 miR-146b 分别作用于由 ZEB1/2、SNAIL1/2、NF κ B、STAT3 等参与的细胞信号通路, 减少乳腺癌的生长、转移, 同时抑制肿瘤细胞的 EMT^[48-52].

NF κ B、STAT3 等信号通路在乳腺癌的增殖、侵袭、存活、耐药中起重要作用^[53-55]. Michael 等^[51]发现, 在正常生理条件下的乳腺细胞中 miR-146b 可以由活化的 STAT3 独立调控, 活化的 STAT3 直接作用于 miR-146b 的启动子上调其表达, 但在乳腺癌细胞中 miR-146b 基因的甲基化使单纯 STAT3 激活不能引起 miR-146b 的上调. 进一步研究发现, 不论是在非恶性乳腺细胞还是恶性乳腺癌细胞中 miR-146b 均可下调 NF κ B 激活因子 TRAF6 和 IRAK1 的表达, 抑制 NF κ B 的活性, 使得下游的多种基因表达受到抑制, 包括 IL-6 的编码基因. 揭示在正常生理条件下的乳腺细胞中 NF κ B/IL-6/

STAT3/miR-146b 之间存在负反馈调节机制,但在乳腺癌细胞中该反馈机制遭到部分破坏,miR-146b DNA 的甲基化使得自身表达量减少,STAT3 持续处于活化状态,因此激活的下游基因在细胞增殖、侵袭、EMT 等行为中发挥重要作用。

3.3 miRNA 调节肿瘤部位新生血管形成

在肿瘤的原发部位——病灶的生长一方面依赖肿瘤细胞的增殖,另一方面新生血管形成为肿瘤细胞的生长提供足够的营养和能量。Zhuang 等^[56]研究发现,由肿瘤细胞分泌的 miR-9 可以促进内皮细胞的迁移以及血管形成。他们将肿瘤细胞与相应的来自正常组织的内皮细胞共培养,发现微囊泡中含有 miRNAs,还进一步发现 miR-9 作为生长因子促进了内皮细胞的迁移,在内皮细胞中过表达 miR-9 会引起 SOCS5 水平的下降,导致 JAK-STAT 通路的激活,从而促进细胞的迁移。Kosaka 等^[57]发现外泌体 miR-210 由转移性乳腺癌细胞分泌,通过 nSMase2 依赖的分泌机制分泌出细胞,能加强内皮细胞的血管生成活动。转移性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 分泌的 miR-210 明显多于非转移性乳腺癌细胞 MCF-7 以及正常乳腺上皮细胞 MCF-10A。将含有 miR-210 的外泌体与脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 共培养,发现 HUVECs 的血管形成和转移能力均提高。

3.4 miRNA 参与上皮-间质表型转换

近年来,EMT 被认为是上皮来源的原发瘤发生转移过程的早期步骤。研究发现多种 miRNAs 参与了肿瘤细胞 EMT 的过程,如乳腺癌中的 miR-10b、miR-21 和 miR-200 家族^[58-63]。miR-105 由高度转移性乳腺癌细胞分泌,经由外泌体作用于内皮细胞,抑制其靶基因 ZO-1 的表达,而 ZO-1 的下调会引起单层内皮细胞紧密连接性和屏障结构的破坏,增加肿瘤细胞的转移^[64]。但是,在 SUM-159 细胞中过表达 miR-146b 则能明显抑制细胞的侵袭和迁移能力,同时上调 E-cadherin、Desmoplakin,下调 vimentin、cadherin-11 和 slug,使细胞形态学由间质型向上皮型转变,其作用机制尚需要进一步实验来证实^[51]。

4 Circulating miRNA 作为肿瘤标志物的特异性

作为一种生物标志物,无论是细胞、分子或是基因成分,都必须是可以测量的,而且能够反映人体的生物学状态、疾病的发生过程或是药物作用的

疗效^[65]。MiRNA 可以通过 qRT-PCR 或是 microarray 检测,而且 circulating miRNA 在血液中能够保持自身结构的稳定。Chen 等^[18]分析了来自 7 名健康中国人(22~25 周岁)外周血中的 14 种随机挑选的 miRNA 水平,发现这些 miRNA 在血液中的表达水平是一致的。Giladl 等^[66]发现在 2 名没有血缘联系的男性,其各自外周血中 18 种高水平表达的 miRNA 之间高度一致。进一步对不同疾病的患者血清进行 circulating miRNA 检测分析,发现不同的疾病如肿瘤患者的血清 circulating miRNA 谱具有一定特异性^[18]。临床研究也证实某些 circulating miRNAs 在转移性乳腺癌和非转移性乳腺癌患者中的水平是不同的。Stuckrath 等^[33]报道发生淋巴结转移的乳腺癌病人血浆 miR-16、miR-107、miR-130a、miR-146a 的水平要比未发生淋巴结转移的患者低,提示这些 circulating miRNA 可能作为潜在的肿瘤转移标志物,用于监测乳腺癌的发生和转移。

5 Circulating miRNA 与乳腺癌药物的疗效评价

在不同生理病理条件下 circulating miRNA 的水平变化较大。乳腺癌治疗过程中,无论是有效控制肿瘤发展,还是癌症进一步恶化, circulating miRNA 也随之变化,因此可以用于评价患者的治疗效果。而且相对于影像学检测和普通血液学分析, circulating miRNA 的变化可能更早。Jung 等^[41]发现, circulating miR-210 可能与乳腺癌患者赫赛汀治疗敏感性有关,在接受以赫赛汀为基础的新辅助化疗后,29 名患者中有 18 人达到病理完全缓解 (pathologic complete response, pCR),而 11 人仍有残留病灶,而且具有残留病灶的患者血浆 circulating miR-210 的水平较高。在体外实验中,赫赛汀耐药型 BT-474 细胞 miR-210 的相对表达水平较野生型 BT-474 细胞明显增高。Sun 等^[35]检测了乳腺癌患者化疗前后血浆 circulating miR-155 水平,发现化疗后 circulating miR-155 明显下降,且下降后的水平与健康人相近,而同时检测血液的其他肿瘤标志物 CA15-3、CEA、TPS,则没有发现这种趋势。

6 Circulating miRNA 与肿瘤靶向治疗

在肿瘤治疗方面,目前正在研制通过抑制或是模仿 miRNA 寡核苷酸为基础的靶向治疗方式^[67]。

通过人工合成 mRNA 上的多 miRNA 结合位点来结合相应 miRNA, 抑制其相关功能, 该 mRNA 被称为“miRNA 海绵”。这种方法在 SUM-149 上皮乳腺癌细胞异种移植荷瘤鼠模型中得到验证^[68]。在小鼠模型中采用的人工合成 mRNA 上具有 miR-9 的特异性结合位点, 抑制了 miR-9, 从而降低了乳腺癌肺转移的发生。利用抑癌 miRNA 作为肿瘤治疗的药物, 经由特殊载体进入人体, 识别肿瘤细胞, 并释放抑癌 miRNA, 发挥其抑制肿瘤作用。因此, circulating miRNA 可以作为新型的肿瘤治疗的靶标。

7 问题与展望

Circulating miRNA 因其在体液中的稳定性、可检测性, 以及在健康人和乳腺癌患者之间, 甚至不同类型乳腺癌患者间表现的差异性, 成为新型乳腺癌生物标志物提供了有力条件。Leidner 等^[69]在 2013 年通过高通量测序的方法与之前的 15 个乳腺癌循环 miRNA 检测研究进行对比, 以相对于对照组的上调或下调趋势为基准, 发现其中仅 6 种 circulating miRNAs 在 2 个独立研究中保持一致。另一方面, 肿瘤细胞对 circulating miRNA 总量的贡献也需要进一步的评价^[70-71]。并且, 外界环境、年龄、性别等非病理性因素都可能引起 circulating miRNA 的差异。因此, 循环 miRNA 作为新型生物标志物用于乳腺癌的诊断和检测, 还需要进一步优化及标准化其检测方法, 并通过大样本量的流行病学数据分析, 建立统一的检测评估标准。

尽管存在上述不同程度的局限性, 基于 circulating miRNA 在肿瘤细胞基因表达调控中的重要作用, 揭示对 circulating miRNA 功能的研究, 对更好地了解乳腺癌的发生、发展和转移及开发 miRNA 靶向治疗等领域将发挥重要作用。并且, 临床研究发现的 circulating miRNA 在乳腺癌患者不同病理类型、不同疾病进程和治疗前后的差异也表明了其成为乳腺癌诊断、预后和疗效评估的新型生物标志物的可能性。

参 考 文 献

- [1] Forte V A, Barrak D K, Elhodaky M, *et al.* The potential for liquid biopsies in the precision medical treatment of breast cancer. *Cancer Bio Med*, 2016, **13**(1): 19-40
- [2] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001, **294**(5543): 853-858
- [3] Wang J, Zhang K Y, Liu S M, *et al.* Tumor-associated circulating microRNAs as biomarkers of cancer. *Molecules*, 2014, **19** (2): 1912-1938
- [4] Lin S, Gregory R I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2015, **15**(6): 321-333
- [5] Olive V, Minella A C, He L. Outside the coding genome, mammalian microRNAs confer structural and functional complexity. *Sci Signal*, 2015, **8**(368): re2
- [6] Carthew R W, Sontheimer E J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009, **136**(4): 642-655
- [7] Yoruker E E, Aydoğan F, Gezer U, *et al.* Analysis of circulating microRNAs during adjuvant chemotherapy in patients with luminal A breast cancer. *Mol Clin Oncol*, 2015, **3**(4): 954-958
- [8] Savelyeva A V, Kuligina E V, Bariakin D N. Variety of RNAs in peripheral blood cells, plasma, and plasma fractions. *BioMed Research International*, 2017, 2017: 7404912
- [9] Yeri A, Courtright A, Reiman R. Total extracellular small RNA profiles from plasma, saliva, and urine of healthy subjects. *Sci Rep*, 2017, **17**(7): 44061
- [10] Weber J A, Baxter D H, Zhang S, *et al.* The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 2010, **56**(11): 1733-1741
- [11] Valadi H, Ekström K, Bossios A, *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007, **9**(6): 654-659
- [12] Hunter M P, Ismail N, Zhang X, *et al.* Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*, 2008, **3**(11): e3694
- [13] Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, *et al.* Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*, 2009, **2**(100): ra81
- [14] Cheng G. Circulating miRNAs: roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, **81**: 75-93
- [15] Singh Rajbir, Ramasubramanian Brinda, Kanji Suman, *et al.* Circulating microRNAs in cancer: Hope or hype?. *Cancer Letters*, 2016, **381**: 113-121
- [16] Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci*, 2012, **37**(11): 460-465
- [17] Mitchell P S, Parkin R K, Kroh E M, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(30): 10513-10518.
- [18] 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. *Cell Res*, 2008, **18**(10): 997-1006
- [19] Sieuwerts A M, Moster B, Bolt-de Vries J, *et al.* mRNA and microRNA expression profiles in circulating tumor cells and primary tumors of metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2011, **17**(11): 3600-3618
- [20] Markou A, Zavridou M, Sourvinou I, *et al.* Direct comparison of metastasis-related miRNAs expression levels in circulating tumor cells, corresponding plasma, and primary tumors of breast cancer patients. *Clin Chem*, 2016, **62**(7): 1002-1011
- [21] Ortiz-Quintero Blanca. Cell-free microRNAs in blood and other

- body fluids, as cancer biomarkers. *Cell Prolif*, 2016, **49**(3): 281–303
- [22] Jiang S, Zhang H W, Lu M H, *et al.* MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res*, 2010, **70**(8): 3119–27
- [23] Zhang C M, Zhao J, Deng H Y. MiR-155 promotes proliferation of human breast cancer MCF-7 cells through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *J Biomed Sci*, 2013, **20**: 79
- [24] Huang G Q, Gumireddy K, Schrier M, *et al.* The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol*, 2008, **10**(2): 202–210
- [25] Yan G R, Xu S H, Tan Z L, *et al.* Global identification of miR-373-regulated genes in breast cancer by quantitative proteomics. *Proteomics*, 2011, **11**(5): 912–920
- [26] Liu F, Liu Y, Shen J L, *et al.* MicroRNA-224 inhibits proliferation and migration of breast cancer cells by down-regulating fizzled 5 expression. *Oncotarget*, 2016, **7**(31): 49130–49142
- [27] Singh R, Pochampally R, Watabe K, *et al.* Exosome-mediated transfer of miR-10b promotes cell invasion in breast cancer. *Mol Cancer*, 2014, **13**: 256
- [28] Le M T, Teh C, Shyh-Chang N, *et al.* MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev*, 2009, **23**: 862–876
- [29] Zhang Y, Yan L X, Wu Q N, *et al.* miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer. *Cancer Res*, 2011, **71**(10): 3552–3562
- [30] Boldin M P, Taganov K D, Rao D S, *et al.* miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med*, 2011, **208**(6): 1189–1201
- [31] Garcia A I, Buisson M, Bertrand P, *et al.* Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO Mol Med*, 2011, **3**(5): 279–290
- [32] Pekarsky Y, Croce C M. Is miR-29 an oncogene or tumor suppressor in CLL?. *Oncotarget*, 2010, **1**(3): 224–227
- [33] Stückrath I, Rack B, Janni W, *et al.* Aberrant plasma levels of circulating miR-16, miR-107, miR-130a and miR-146a are associated with lymph node metastasis and receptor status of breast cancer patients. *Oncotarget*, 2015, **6**(15): 13387–13401
- [34] Roth Q, Rack B, Muller V, *et al.* Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2010, **12**(6): R90
- [35] Sun Y, Wang M, Lin G, *et al.* Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. *PLoS One*, 2012, **7**(10): e47003
- [36] Bockhom J, Prat A, Chang Y F, *et al.* Differentiation and loss of malignant character of spontaneous pulmonary metastases in patient-derived breast cancer models. *Cancer Res*, 2014, **74**(24): 7406–7417
- [37] Yan L X, Wu Q N, Zhang Y, *et al.* Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, *in vitro* migration and *in vivo* tumor growth. *Breast Cancer Res*, 2011, **13**(1): R2
- [38] Zhu M, Yi M, Kim C H, *et al.* Integrated miRNA and mRNA expression profiling of mouse mammary tumor models identifies miRNA signatures associated with mammary tumor lineage. *Genome Biol*, 2011, **12**(8): R77
- [39] Joosse S A, Muller V, Steinbach B, *et al.* Circulating cell-free cancer-testis MAGE-A RNA, BORIS RNA let-7b and miR-202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases. *Br J Cancer*, 2014, **111**(5): 909–917
- [40] Kleivi Sahlberg K, Bottai G, Naume B, *et al.* A serum microRNA signature predicts tumor relapse and survival in triple-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2015, **21**(5): 1207–1214
- [41] Jung E J, Santarpia L, Kim J, *et al.* Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. *Cancer*, 2012, **118**(10): 2603–2614
- [42] Hamam Rimi, Ali Arwa M, Alsaleh Khalid A, *et al.* MicroRNA expression profiling on individual breast cancer patients identifies novel panel of circulating microRNA for early detection. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 25997
- [43] Madhavan D, Peng C, Wallwiener M, *et al.* Circulating miRNAs with prognostic value in metastatic breast cancer and for early detection of metastasis. *Carcinogenesis*, 2016, **37**(5): 461–470
- [44] Si H, Sun X, Chen Y, *et al.* Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, **139**(2): 223–229
- [45] Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med*, 2013, **91**(4): 431–437
- [46] Rottiers V, Naar A M. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, **213**(5): 239–250
- [47] Zhao L, Sun Y, Hou Y, *et al.* MiRNA expression analysis of cancer-associated fibroblasts and normal fibroblasts in breast cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, **44**(11): 2051–2059
- [48] Zhang H F, Xu L Y, Li E. A family of pleiotropically acting microRNAs in cancer progression, miR-200: potential cancer therapeutic targets. *Curr Pharm Des*, 2014, **20**(11): 1896–903
- [49] Roy S S, Gonugunta V K, Bandyopadhyay A, *et al.* Significance of PELP1/HDAC2/miR-200 regulatory network in EMT and metastasis of breast cancer. *Oncogene*, 2014, **33**(28): 3707–3716
- [50] Castilla M Á, Dřaz-Martín J, Sarrió D, *et al.* MicroRNA-200 family modulation in distinct breast cancer phenotypes. *PLoS One*, 2012, **7**(10): e47709
- [51] Xiang M, Birkbak N J, Vafaizadeh V, *et al.* STAT3 induction of miR-146b forms a feedback loop to inhibit the NF-κB to IL-6 signaling axis and STAT3-driven cancer phenotypes. *Sci Signal*, 2014, **7**(310): ra11
- [52] Bhaumik D, Scott G K, Schokrpur S, *et al.* Expression of microRNA-146 suppresses NF-κB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene*, 2008, **27**(42): 5643–5647
- [53] Bombonati A, Sgroi D C. The molecular pathology of breast cancer progression. *J Pathol*, 2011, **223**(2): 308–318
- [54] Chen L, Bourguignon L Y. Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Jun signaling and miRNA21 expression leading to Bcl-2

- expression and chemoresistance in breast cancer cells. *Mol Cancer*, 2014, **13**: 52
- [55] Ahmad A, Aboukameel A, Kong D, *et al.* Phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor mediates epithelial-mesenchymal transition regulated by miR-200 in breast cancer cells. *Cancer Res*, 2011, **71**(9): 3400–3409
- [56] Zhuang G, Wu X, Jiang Z, *et al.* Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO J*, 2012, **31**(17): 3513–3523
- [57] Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, *et al.* Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem*, 2013, **288** (15): 10849–10859
- [58] Ceppi P, Peter M E. MicroRNAs regulate both epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells. *Oncogene*, 2014, **33**(3): 269–278
- [59] Lamouille S, Subramanyam D, Billelo R, *et al.* Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol*, 2013, **25**(2): 200–207
- [60] Han X, Yan S, Weijie Z, *et al.* Critical role of miR-10b in transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Cancer Gene Ther*, 2014, **21**(2): 60–67
- [61] Han M, Liu M, Wang Y, *et al.* Antagonism of miR-21 reverses epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype through AKT/ERK1/2 inactivation by targeting PTEN. *PLoS One*, 2012, **7**(6): e39520
- [62] Gregory P A, Bert A G, Paterson E L, *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Biology*, 2008, **10** (5): 593–601
- [63] Rhodes L V, Martin E C, Segar H C, *et al.* Dual regulation by microRNA-200b-3p and microRNA-200b-5p in the inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, 2015, **6**(18): 16638–16652
- [64] Zhou W, Fong M Y, Min Y, *et al.* Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell*, 2014, **25**(4): 501–515
- [65] Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual frame-work. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, **69**(3): 89–95
- [66] Gilad S, Meiri E, Yogev Y, *et al.* Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE*, 2008, **3**(9): e3148
- [67] Bertoli Gloria, Cava Claudia, Castiglioni Isabella. MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*, 2015, **5** (10): 1122–1143
- [68] Ma L, Young, Prabhala H, *et al.* miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol*, 2010, **12**(3): 247–256
- [69] Leidner R S, Li L, Thompson C L. Dampening enthusiasm for circulating microRNA in breast cancer. *PLoS One*, 2013, **8** (3): e57841
- [70] Kenneth W, Witwer. Circulating microRNA biomarker studies: pitfalls and potential solutions. *Clinical Chemistry*, 2015, **61** (1): 56–63
- [71] Pritchard C C, Kroh E, Wood B, *et al.* Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res*, 2012, **5**(3): 492–497

The Active Excretion Mechanism of Circulating microRNAs and Their Effects on Invasion and Metastases of Breast Cancer*

WAN Xiao-Qing^{1,2}, WANG Xue-Jian¹, WANG Yi-Fei^{1,2}, JIANG Yu^{1,2},
LU Zhong^{1,2}, SHI Li-Hong¹, DING Yi¹** , WANG Li-Hua^{1,2}**

¹Laboratory of Molecular Oncology, Weifang Medical College, Weifang 261053, China;

²Affiliated Hospital, Weifang Medical College, Weifang 261053, China)

Abstract The current clinical diagnosis and treatment of breast cancer relies on imaging and several prognostic/predictive biomarkers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2. Since these biomarkers are mainly derived from primary tumor tissues, they are limited to be applied for monitoring metastases and recurrence, especially after the removal of primary lesion. The discovery of circulating cell-free microRNAs (circulating cf-miRNAs, also called circulating miRNAs) may offer the opportunity to improve the clinical cure patterns of breast cancer. The mechanism of active excretion of cell-free miRNAs *via* exosomes, microvesicles and other transporters may play an important role in the formation of circulating miRNAs. Cell-free miRNAs, especially circulating miRNAs, not only act as endogenous signaling molecules to influence behaviors of tumor cells and their microenvironment, but also regulate invasion and metastases of breast cancer cells by communication with other signaling pathways to regulate tumor angiogenesis and epithelial-to-mesenchymal phenotypic transition of cancer cells. This article reviews the molecular mechanism of active excretion of circulating miRNAs and the clinical potential of breast cancer-related circulating miRNAs as liquid biopsy biomarkers in diagnosis, prognosis and response evaluation of breast cancer.

Key words microRNAs, cell-free miRNAs, circulating miRNAs, active excretion, breast cancer, metastases

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0040

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81472489) and Shandong Province Science and Technology Development Plan Item (2014GGB14403).

**Corresponding author.

Tel: 86-536-8462126, E-mail: wanglihua@wfmc.edu.cn

Received: February 7, 2017 Accepted: March 23, 2017