

· 综述 ·

微小 RNA 29 在乳腺癌中的研究进展

范旭龙 吴爱国

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,占女性肿瘤发病率的 23%,严重威胁着广大女性的身体健康。目前,亟需寻找新的特异性靶点或方法以便能更好地从基因或细胞水平对乳腺癌进行预防、诊断和治疗。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类新发现的内源性非蛋白编码的单链小分子 RNA,由约 20~25 个核苷酸组成,广泛存在于真核生物中。miR-29 也属于 miRNA,是 Lagos-Quintana 等^[1]于 2001 年在人 HeLa 细胞中首次发现的。miR-29 表达异常对乳腺癌及多种恶性肿瘤的发生发展会产生重要影响。

miR-29 家族包括 miR-29a、miR-29b 和 miR-29c,其中 miR-29b 又可分为 miR-29b-1 和 miR-29b-2。miR-29a 和 miR-29b-1 基因位于染色体 7q32.3,而 miR-29b-2 和 miR-29c 则位于 1q32.2。miR-29 家族成员具有相同的种子序列,在序列上具有很大相似性,其靶基因有较大范围的重叠^[2]。两种 miR-29b 分子虽然来源不同,但其序列完全相同,在不考虑空间构象的情况下进行研究并不需要将两者区分开来。miR-29a 和 miR-29c 主要在细胞质通过经典的 RNA 诱导沉默复合体 (RNA induced silencing complex, RISC) 机制发挥作用;miR-29b 序列中存在核定位信号,其主要在细胞核通过其他机制调节靶基因的表达。miR-29 的表达主要受转录调控、转录后调控及胞内分布调控^[2]。在负性调控 miR-29 表达的通路中,目前研究最多的是 TGF- β /Smad3 通路^[3],其次是 NF- κ B/YY1 通路^[4];而在上调其表达的机制中,Wnt 信号通路与 miR-29 构成一个正反馈通路相互促进表达。在不同组织细胞的不同时期,miR-29 的表达并不是固定不变的。

1 乳腺癌中 miR-29 的表达

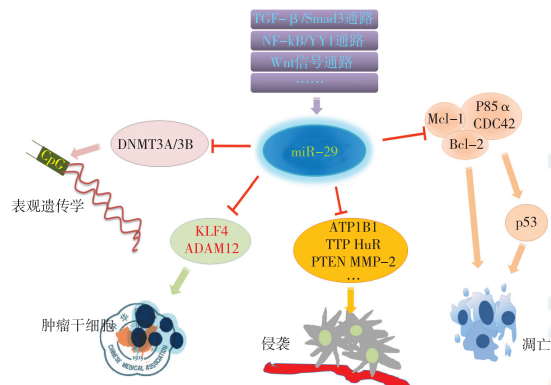
目前,对 miR-29 在恶性肿瘤中表达的研究主

要集中在乳腺癌、肺癌、白血病、黑色素瘤、肝癌等。miR-29 在恶性肿瘤发生过程中常有异常表达,在肿瘤恶性转化过程中具有重要作用,其相关研究提高了研究人员对肿瘤基因表达和细胞活动复杂调控网络的认识。

miR-29 在乳腺癌中的表达同 miR-29 分子类型、乳腺癌表型、激素受体表达、侵袭和转移等相关。同其他类型乳腺癌相比,炎性乳腺癌中 miR-29a 表达显著降低。Van der Auwera 等^[5]在炎性乳腺癌研究中首次发现 miR-29a 及其相关基因在炎性乳腺癌组织中的表达显著下调,而 miR-29a 及其相关基因表达情况与患者生存显著正性相关。miR-29 表达和乳腺癌的激素受体表达情况相关。ER 阳性乳腺癌中,miR-29c 表达显著高于 ER 阴性者;HER-2 阳性的乳腺癌同 HER-2 阴性者相比,miR-29a、miR-29c 显著降低;在侵袭性乳腺癌中,ER 阳性者的 miR-29b 表达显著高于 ER 阴性者^[6]。在乳腺癌出现转移时,miR-29 表达会发生改变。在出现血管侵袭的乳腺癌中,miR-29a 表达显著低于未出现血管侵袭者;在出现腋窝淋巴结转移的乳腺癌组织中,miR-29b 表达显著升高;而在远处转移部位的乳腺癌组织中,miR-29a 表达也显著升高^[6-7]。不同的乳腺癌细胞系中 miR-29 的表达也不相同。在间质表型的 MDA-MB-231 和 MDA-MB-451 乳腺癌细胞系中,miR-29a 表达显著高于上皮表型的 MCF-7 和 T47D,其中,MDA-MB-231 中 miR-29b 的表达也较 MCF-7 升高^[7-8]。在不同类型乳腺癌的不同时期,miR-29 的表达会出现改变,且 miR-29 不同的分子在乳腺癌中的表达也不同。研究发现,在乳腺癌循环肿瘤细胞中 miR-29a 比 miR-29b/c 更稳定,因此不同 miR-29 分子在乳腺癌中的差异性表达对进一步研究具有重要的提示作用^[9]。

此外,miR-29 表达对乳腺癌预后判断也有一定的意义。调查显示,miR-29c 表达升高提示乳腺癌患者预后通常较好^[10]。当然,由于缺乏系统

的临床资料的支持,miR-29 在乳腺癌中的表达及其预测预后的意义并不明确。目前,关于 miR-29 在乳腺癌发生发展过程中的作用的研究范围较广,主要涉及 miR-29 自身多态性、靶基因筛选、促癌或抑癌作用、乳腺癌侵袭和转移等,另外在肿瘤干细胞调节、凋亡、表观遗传学调控中也具有重要作用(图 1)。



miR-29 通过调控其靶基因的表达实现对乳腺癌侵袭、肿瘤干细胞调控、凋亡和表观遗传学等方面的调控

图 1 miR-29 的调控机制

2 miR-29 与乳腺癌侵袭

miRNA 表达异常是转移性肿瘤的特点之一,那些直接作用于肿瘤迁移相关基因而影响肿瘤的迁移和侵袭能力的 miRNAs 被称为 metastamirs。miR-29 也被认为是一种 metastamir,可以影响乳腺癌细胞的侵袭性从而参与到乳腺癌转移过程^[11]。

上皮-间质转化是目前研究较多的一个特异性过程,在此过程中上皮表型细胞通过特定程序转化为间质表型细胞,并获得远处转移播散能力。EMT 被认为是良性肿瘤向侵袭性肿瘤和(或)转移瘤进展的必须过程。多种 miRNAs 包括 miR-29 在 EMT 和肿瘤转移中起着重要的调节作用。miR-29 参与诱导 EMT 发生和上皮细胞极性调节进而促进乳腺癌侵袭和转移,这种作用可能与孕激素和孕激素反应性基因相关。ATP1B1 (Na^+/K^+ transporting, beta1 polypeptide) 是 miR-29 的靶分子,可以参与到细胞间黏附和上皮细胞极化过程,并抑制细胞活动从而抑制乳腺癌增殖、侵袭和转移。Cochrane 等^[12]发现 PR 可以快速降低乳腺癌细胞内 miR-29 的表达,从而降低 miR-29 对 ATP1B1 表达的抑制,进而改变乳腺癌细胞的间质表型而恢复对乳腺癌细胞的抑制。

在乳腺癌的发生过程中 RNA 结合蛋白激活现象很常见,目前研究较多的 RNA 结合蛋白有锌指蛋白 36(tristetraprolin, TTP) 和类胚胎致死性异常视觉基因(embryonic lethal abnormal vision *Drosophila*-like 1, ELAVL1, 又称 HuR)。TTP 可以促进在 3'端非翻译区内富含腺嘌呤尿嘧啶核苷酸的 mRNA 降解,而 HuR 的作用则相反。在侵袭性乳腺癌组织和高侵袭性乳腺癌细胞系中,miR-29a 表达显著增强而 TTP 表达则相反。Gebeshuber 等^[8]首次在鼠乳腺上皮 EpRas 细胞中发现 miR-29a 可以通过抑制 TTP 而改变上皮细胞极性,进而导致其肺转移增加。进一步研究发现,miR-29a 可以通过降低 TTP 而提高 HuR 的表达,引起肿瘤侵袭相关分子尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)、基质金属蛋白酶-1(MMP-1)和 MMP-13 表达增加和乳腺癌细胞侵袭性增强^[13]。

第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因(PTEN)是一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,不仅能诱导细胞凋亡和抑制有丝分裂,而且能够调节细胞黏附和参与肿瘤血管生成。PTEN 缺失可以导致 3、4、5-三磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate, PIP3)水平升高进而激活磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol, 3-Kinase, PI3K)通路而促进细胞生长和转移。抑制 miR-29b 可以提高 PTEN 的表达,促进乳腺癌细胞凋亡,侵袭和迁移降低^[7]。在乳腺癌 MCF-7 细胞中 miR-29b 通过降低补体 C1q 肿瘤坏死因子相关蛋白 6(C1q and tumor necrosis factor related protein 6, C1qTNF6)、酸性富含胱氨酸分泌蛋白(secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC)和 IV 型胶原 $\alpha 2$ 链(collagen type IV alpha 2, COL4A2)等基因的表达致其侵袭性增强^[14]。

上述结果表明 miR-29 可以影响靶基因的表达而促进乳腺癌侵袭和转移,但目前也有研究表明事实上并非完全如此。miR-29b 可以抑制 MMP-2 的表达,促进细胞外基质重塑和细胞外基质结合生长因子的释放,从而抑制血管内皮细胞内血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)信号通路,抑制肿瘤血管形成,降低血管侵袭和远处转移^[15]。在 luminal 亚型乳腺癌中,miR-29b 缺失可以导致侵袭性增加和间质表型的出现,转录因子 GATA3 通过诱导 miR-29b 表达而促进细胞分化、抑制肿瘤转移及改变肿瘤微环境^[15]。GATA3-

miR-29b 抑制肿瘤转移和调节肿瘤微环境的作用提示,miR-29 可能会成为抑制乳腺癌转移的突破口^[16]。而另一项研究发现 miR-29a 可以通过抑制 SPARC 而降低整合素 $\beta 4$ 介导的乳腺癌细胞的侵袭性^[17]。

miR-29 表达的改变可以通过影响其靶基因表达而改变乳腺癌的侵袭性。但是,由于 miR-29 靶基因繁多,且相关研究少,以致 miR-29 在乳腺癌侵袭性调控中的作用的相关研究出现了相悖的结果。因此,对 miR-29 与乳腺癌侵袭性关系的全面研究就显得尤为重要。

3 miR-29 与乳腺癌干细胞

乳腺癌干细胞(BCSCs)被认为是存在于乳腺癌细胞中的一群特殊细胞,具有自我更新、多向分化、高成瘤性、高侵袭性等特点,并且对放化疗引起的凋亡具有抵抗性,不易被常规治疗手段根除,易导致乳腺癌复发。通常认为,miRNA 在胚胎干细胞特性的维持和肿瘤干细胞表型的维持中起到重要作用。Cittelly 等^[9]发现孕激素可快速下调乳腺癌细胞尤其是 CD44⁺亚群细胞中 miR-29 的表达,进而上调 Krüppel 样因子 4(KLF4)而增加 CK5⁺CD44⁺细胞比例,并导致其干细胞特征更明显。KLF4 是典型的 KLF 因子,可直接激活端粒酶和参与转录过程,并可激活 Notch 通路,对于分化细胞再次转化为多潜能干细胞和乳腺癌干细胞特征维持是必需的。在激素反应性乳腺癌中,孕激素可以通过下调 miR-29 和上调 KLF4 提高乳腺癌细胞中干细胞样细胞的比例。对该机制的阐明有助于加深对 PR 和 miR-29 在提高干细胞样细胞比例促进激素反应性乳腺癌进展方面的认识。需要注意的是,只有抑制 miR-29a 才可以增加 CD44⁺CK5⁺细胞比例,且在乳腺癌循环肿瘤细胞中 miR-29a 比 miR-29b/c 更稳定,这提示在乳腺癌干细胞研究中 miR-29a 的作用可能具有更重要的意义。

解整合素-金属蛋白酶 12(ADAM12)是一种乳腺癌相关基因,在乳腺癌干细胞中 ADAM12 表达显著上调而 miR-29 表达下降。miR-29 作为一种中间分子负责将 Notch 信号通路和 ADAM12 联系在一起。在 MCF-7 细胞中,Notch 通路通过抑制 miR-29a 的作用而上调 ADAM12 表达^[18]。由于 Notch 信号通路可以维持乳腺癌干细胞表型及

ADAM12 和 miR-29 在乳腺癌干细胞中的异常表达,使得未来研究乳腺癌干细胞时需要考虑到 miR-29、ADAM12 和 Notch 通路。

因此,miR-29 可能通过影响重要信号通路并调控多个关键分子的表达而参与到乳腺癌干细胞的产生和维持,明确 miR-29 在此过程的作用有助于加深对乳腺癌干细胞理论的认识。

4 miR-29 与乳腺癌凋亡

凋亡是一种由内源性多基因控制的、主动的程序化细胞死亡过程。正常乳腺组织细胞增殖和凋亡总是处于平衡状态,乳腺癌的发生既有细胞增殖失控,也有凋亡减少。miR-29 可能通过调控抗凋亡蛋白 Mcl-1 和 Bcl-2 的表达影响凋亡过程。miR-29b 是抗凋亡蛋白 Mcl-1 表达水平和细胞凋亡的内源性调节分子,可以降低细胞内 Mcl-1 蛋白水平,并且使肿瘤细胞对肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)的细胞毒性更敏感。过表达 miR-29 可以降低 Mcl-1 和 Bcl-2 的表达进而导致线粒体膜电势降低和细胞色素 C 释放到胞质内而促进肿瘤细胞凋亡发生^[19]。

另外,miR-29 还能通过影响抑癌基因 p53 的功能而调控凋亡过程。p53 在 MCF-7 细胞中的表达显著高于 MDA-MB-231 细胞;增强 miR-29 表达后,MCF-7 细胞发生凋亡的数目明显多于 MDA-MB-231 细胞。Park 等^[20]发现 miR-29 可以作用在 p85 α 和细胞分裂周期蛋白 42(CDC42)上而降低 P53 蛋白的水解并促进凋亡增加,同时通过影响其上游分子及下游分子调节 p53 信号通路。p85 α 蛋白为 PI3K 的调节亚基,其在维持细胞生存和凋亡中具有重要意义。CDC42 蛋白又称细胞分裂周期蛋白 42,属于 GTP 酶 Rho 家族,受到 miR-29 的负性调节。CDC42 水平提高可以降低 miR-29 介导的依赖 p53 的凋亡的发生。此外,p53 通过其 DNA 结合结构域与 Drosha 复合体相互作用促进 pri-miRNA 向 pre-miRNA 转化和 miRNA 成熟以应对细胞内 DNA 损伤。DNA 结合结构域突变会影响 P53 与 Drosha 复合体的相互作用,进而影响 miRNAs 合成而降低肿瘤细胞对外界刺激的反应性^[21]。因此,miR-29 可能通过一种 p53 依赖性的方式并需要抗凋亡蛋白的参与来诱导乳腺癌凋亡的发生。

5 miR-29 与乳腺癌表观遗传学

miR-29 参与表观遗传学调控首先是在肺癌研究中发现的。Fabbri 等^[22]发现 miR-29 通过抑制 DNA 甲基转移酶 3A/3B 表达使肺癌细胞 DNA 异常甲基化恢复正常,使甲基化沉默的抑癌基因如脆性组氨酸三联体基因(FHIT)等重新激活,从而达到抑制肿瘤的目的。miR-29 对 DNMT3A/3B 的抑制作用在黑色素瘤^[23]和肝癌^[24]中也有发现。有学者将可以调节细胞表观遗传学特征而调控基因组表达的 miRNA 称为 epi-RNA^[25]。miR-29 也属于 epi-RNA。

在乳腺癌中同时存在肿瘤相关基因高甲基化与普遍性低甲基化的现象,但两者在乳腺癌发生过程中哪一个占主导地位尚不清楚。一方面,在人类实体肿瘤中,乳腺癌最常出现广泛低甲基化,并且随着恶性程度增加而渐进性增加。据文献报道有超过 50% 的病例发现癌组织中 5-甲基胞嘧啶的含量低于正常组织,重复序列低甲基化会导致染色体不稳进而激活癌基因;另一方面,基因高甲基化尤其是抑癌基因启动子区 CpG 岛内的高甲基化可以显著抑制乳腺癌抑癌基因的表达^[26-27]。因此,在乳腺癌中 miR-29 作为一种 epi-RNA 通过抑制 DNMT3A/3B 的功能来降低基因甲基化,其结果好坏并不易判断。值得注意的是,关于 miR-29 在其他表观遗传学调控方面如乙酰化与去乙酰化等的研究还不太深入,需要进一步探索。

6 结语

近年来,对乳腺癌中 miR-29 研究取得了较大进展,尤其是在乳腺癌侵袭、肿瘤干细胞调控、凋亡和表观遗传学等方面,完善了乳腺癌发生发展的机制研究,为基于 miR-29 的基因诊断和治疗提供了依据和支持。目前,miR-29 属于抑癌基因还是癌基因的争论仍然存在,miR-2 表达的组织特异性、靶基因的广泛性及乳腺癌调控的复杂性使得这种争议会继续存在。因此,全面研究 miR-29 在乳腺癌中的表达及其同乳腺癌预后的关系,系统探索不同 miR-29 分子在不同乳腺癌类型不同时期的作用是未来研究的重点。随着研究的进展,miR-29 在乳腺癌中的作用会更加明确,从而为乳腺癌基础研究和临床诊治提供更有力的支持。

【关键词】 乳腺肿瘤; 微小 RNA; miR-29

【中图法分类号】 R737.9 【文献标志码】 A

参考文献

- [1] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. Science, 2001, 294(5543):853-858.
- [2] Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, et al. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury[J]. Physiol Genomics, 2012, 44(4):237-244.
- [3] Luna C, Li G, Qiu J, et al. Cross-talk between miR-29 and transforming growth factor-betas in trabecular meshwork cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(6):3567-3572.
- [4] Wang H, Garzon R, Sun H, et al. NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma[J]. Cancer Cell, 2008, 14(5):369-381.
- [5] Van der Auwera I, Limame R, van Dam P, et al. Integrated miRNA and mRNA expression profiling of the inflammatory breast cancer subtype[J]. Br J Cancer, 2010, 103(4):532-541.
- [6] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(16):7065-7070.
- [7] Wang C, Bian Z, Wei D, et al. miR-29b regulates migration of human breast cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 352(1-2):197-207.
- [8] Gebeshuber CA, Zatloukal K, Martinez J. miR-29a suppresses tristetrapirolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis[J]. EMBO Rep, 2009, 10(4):400-405.
- [9] Cittelly DM, Finlay-Schultz J, Howe EN, et al. Progesterone suppression of miR-29 potentiates dedifferentiation of breast cancer cells via KLF4[J]. Oncogene, 2012, 32(20):2555-2564.
- [10] Buffa FM, Camps C, Winchester L, et al. microRNA-associated progression pathways and potential therapeutic targets identified by integrated mRNA and microRNA expression profiling in breast cancer[J]. Cancer Res, 2011, 71(17):5635-5645.
- [11] White NM, Fatoohi E, Metias M, et al. Metastamirs: a stepping stone towards improved cancer management[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2011, 8(2):75-84.
- [12] Cochrane DR, Jacobsen BM, Connaghan KD, et al. Progesterone regulated miRNAs that mediate progesterone receptor action in breast cancer[J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 355(1):15-24.
- [13] Al-Ahmadi W, Al-Ghamdi M, Al-Souhibani N, et al. miR-29a inhibition normalizes HuR over-expression and aberrant AU-rich mRNA stability in invasive cancer[J]. J Pathol, 2013, 230(1):28-38.
- [14] Wang C, Gao C, Zhuang JL, et al. A combined approach identifies three mRNAs that are down-regulated by microRNA-29b and promote invasion ability in the breast cancer cell line MCF-7[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(12):2127-2136.
- [15] Fang JH, Zhou HC, Zeng C, et al. MicroRNA-29b suppresses tumor angiogenesis, invasion, and metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 expression[J]. Hepatology, 2011,

- 54(5):1729-1740.
- [16] Chou J, Lin JH, Brenot A, et al. GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(2):201-213.
- [17] Gerson KD, Shearstone JR, Maddula VS, et al. Integrin beta4 regulates SPARC protein to promote invasion[J]. J Biol Chem, 2012, 287(13):9835-9844.
- [18] Li H, Solomon E, Duhachek Muggy S, et al. Metalloprotease-disintegrin ADAM12 expression is regulated by Notch signaling via microRNA-29[J]. J Biol Chem, 2011, 286(24):21500-21510.
- [19] Xiong Y, Fang JH, Yun JP, et al. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2010, 51(3):836-845.
- [20] Park SY, Lee JH, Ha M, et al. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42[J]. Nat Struct Mol Biol, 2009, 16(1):23-29.
- [21] Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, et al. Modulation of microRNA processing by p53[J]. Nature, 2009, 460(7254):529-533.
- [22] Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(40):15805-15810.
- [23] Nguyen T, Kuo C, Nicholl MB, et al. Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma[J]. Epigenetics, 2011, 6(3):388-394.
- [24] Braconi C, Kogure T, Valeri N, et al. microRNA-29 can regulate expression of the long non-coding RNA gene MEG3 in hepatocellular cancer[J]. Oncogene, 2011, 30(47):4750-4756.
- [25] Kojima K, Takata A, Vadnais C, et al. MicroRNA122 is a key regulator of α -fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma[J]. Nat Commun, 2011, 2:338.
- [26] Ehrlich M. DNA methylation in cancer; too much, but also too little[J]. Oncogene, 2002, 21(35):5400-5413.
- [27] Liu WR, Shi YH, Peng YF, et al. Epigenetics of hepatocellular carcinoma: a new horizon[J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(13):2349-2360.

(收稿日期:2013-07-19)

(本文编辑:刘军兰)

范旭龙,吴爱国.微小 RNA 29 在乳腺癌中的研究进展[J/CD].中华乳腺病杂志:电子版,2013,7(5):355-359.