

· 讲座 ·

微 RNA-34a 与乳腺癌相关信号通路

解永松 贾淞淦 李连宏

据卫生部疾病预防控制中心发布的乳腺癌发病数据显示:全国肿瘤登记地区乳腺癌发病率位居女性恶性肿瘤的第 1 位^[1]。近 20 年来,全球乳腺癌病死率呈现出下降趋势,一方面是因为乳腺癌筛查工作的开展,使早期病例的比例增加,另一方面是乳腺癌综合治疗的开展,提高了疗效。随着微 RNA-34a(miR-34a)在乳腺癌中的相对特异性表达被越来越多的学者认识,其作用机制也成为近年的研究热点,而信号通路在其中占有重要地位^[2]。本文就 miR-34a 与乳腺癌及其干细胞的相关信号通路展开综述。

1 miR-34a 的生物学特征

miR-34 是一类序列高度保守的 miRNA,包括 miR-34a、miR-34b 和 miR-34c。不同动物之间 miRNA 的同源性较高。在人体内,miR-34a 基因位于 1p36,包括 22 个核苷酸,含有两个外显子,两个外显子之间相隔约 30 kb 的内含子;区别于 miR-34b 和 miR-34c 的共同转录表达,miR-34a 单独转录表达。miR-34a 的功能主要有促进细胞凋亡, G₁ 期阻滞,促进细胞衰老,抑制肿瘤细胞迁移。研究证实:对比正常乳腺细胞和癌旁正常组织,在乳腺癌细胞系及乳腺癌样本中都观察到了 miR-34a 水平下调^[3-5]。

2 miR-34a 与乳腺癌细胞受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)信号通路

酪氨酸激酶是一类能催化 ATP 上 γ -磷酸转移到底物蛋白酪氨酸残基上的激酶,在细胞生长、增殖、分化、凋亡等一系列生理过程中发挥重要调节作用。RTK 有表皮生长因子受体、胰岛素受体、血管内皮细胞生长因子受体等种类,其中与乳腺癌关系最为密切的是表皮生长因子受体。生长因子与相应受体结合后激活受体胞内段的酪氨酸激酶,引发一系列细胞内信号转导。RTK 信号通路又包括 ras/丝裂原蛋白活化蛋白激酶(mitogen-

activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/Akt、c-Jun-N 端激酶(JNK)/AP-1 等若干分支信号通路。

2.1 PI3K/Akt 信号通路

细胞因子激活 PI3K 后,活化下游靶点 Akt 从细胞膜释放到胞质,发挥生物学效应。PI3K/Akt 信号通路不仅与肿瘤细胞的生长、增殖有关,而且与其对化疗的反应性有关,抑制 PI3K/Akt 信号通路可以增强乳腺癌细胞对于化疗的敏感性。miR-34a 对 PI3K/Akt 信号通路的影响主要在于降低 Akt 的磷酸化水平。miR-34a 能作用于受体酪氨酸激酶(AXL)的 3'UTR,而 AXL 的主要作用是参与乳腺癌细胞的侵袭转移。从表型上看,miR-34a 靶击 AXL 减少了 Akt 的磷酸化,损害了癌细胞的移动性,但是不对细胞生存造成明显的影响^[6]。无论是细胞系还是肿瘤样本中都观察到了 miR-34a 对 AXL 的影响^[6]。

2.2 JNK/AP-1 信号通路

JNK 是 MAPK 信号通路之一。核转录因子活化蛋白 1(activated protein 1, AP-1)是位于 JNK 下游介导促进细胞凋亡的关键信号分子,能促进血管内皮生长因子的表达,促进肿瘤细胞生长侵袭。Fos 相关抗原 1(Fos-related antigen 1, Fra-1)是 miR-34a 在此信号通路中的靶点,是活化 AP-1 的关键蛋白,miR-34a 过度表达导致 Fra-1 的表达受到抑制。Yang 等^[7]研究发现 miR-34a 直接结合于 Fra-1 的 3'UTR,在 mRNA 水平和蛋白水平均抑制 Fra-1 表达,从而抑制乳腺癌侵袭和转移。

2.3 其他 RTK 成员介导的信号通路

LMTK3(lemur tyrosine kinase 3)是酪氨酸激酶家族的重要成员。miR-34a 通过直接靶向作用于 LMTK3 来抑制 MCF-7 细胞增殖。MCF-7 细胞系是 ER α 阳性的细胞系,雌二醇治疗后 MCF-7 细胞中的 miR-34a 水平显著下调。因为 LMTK3 是 ER α 的重要调节剂,miR-34a 的过度表达使 LMTK3 在基因和蛋白水平下降,ER α 受抑制从而使 MCF-7 细胞增殖减少^[8]。

3 miR-34a 与乳腺癌干细胞的相关信号通路

正常干细胞的自我更新和分化能力受到信号

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2014.05.012

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81272430)

作者单位:116044 辽宁省大连医科大学七年制临床医学(解永松、贾淞淦);辽宁省肿瘤干细胞重点实验室(李连宏)

通信作者:李连宏, Email: lilianhong@dlmedu.edu.cn

通路的严格调控。目前研究者认为,乳腺癌干细胞是在细胞周期中处于静止状态且具有自我更新能力的一类细胞,能分化为腺泡上皮细胞、导管上皮细胞和肌上皮细胞。化疗药物无法有效消灭肿瘤中的乳腺癌干细胞,从而无法有效抑制乳腺癌复发和转移。乳腺癌干细胞相关信号通路有 Notch 信号通路、Wnt 信号通路和 Hedgehog 信号通路等。

3.1 Notch 信号通路

Notch 信号通路由配体、受体、结合蛋白三部分组成。哺乳动物中,Notch 配体有 5 种:Delta-like-1、Delta-like-3、Delta-like-4、Jagged 1、Jagged 2。Notch 受体有 4 种:Notch 1、Notch 2、Notch 3、Notch 4。在此通路中,配体与受体相结合后,无需第二信使和蛋白激酶的参与,激活的 Notch 受体可直接接收邻近细胞的信号并传到细胞核,与转录调节因子结合而激活靶基因。虽然多种 Notch 配体受体的共同存在增加了此通路的复杂性,但是这种直接从胞膜到胞核的信号传递方式增加了此通路的特异性。Notch 信号通路失调使乳腺癌干细胞终止分化而维持在增殖状态^[9-10]。miR-34a 对于此通路的影响主要体现在通过结合 Notch 1 的 3' UTR 来抑制 Notch 1 基因的表达。3' UTR 是 mRNA 上从编码区的终止密码子延伸至多聚 A 尾的末端。miRNA 多结合此区实现 mRNA 降解或者抑制翻译起始。Li 等^[11]通过荧光素酶实验发现 miR-34a 能抑制 Notch 1 的 3'UTR 的荧光素酶活性,促进乳腺癌 MCF-7 细胞的凋亡,增加 MCF-7 细胞对多柔比星的敏感性。

3.2 Wnt 信号通路

经典的 Wnt 信号通路被激活,导致靶基因过度表达,调节细胞生长分化过程,是促进肿瘤发生的重要途径。正常情况下,细胞质中的 β -连环蛋白与膜蛋白结合或者被降解;而当 Wnt 信号通路激活时, β -连环蛋白不能被降解,在细胞核中聚集,启动相关基因的转录。Wnt 信号通路有维持乳腺癌干细胞自我更新而抑制其分化的作用^[12]。miR-34a 能与 Wnt 信号通路中的关键因素 β -连环蛋白基因的 3'UTR 结合,减少 β -连环蛋白的表达。miR-34a 能抑制 β -连环蛋白-T 细胞因子(β -catenin-T cell factor)和淋巴增强因子(lymphoid enhancer factor)复合物的转录活性。这样的作用正是通过结合 Wnt 信号通路中一系列保守序列靶点如 β -连环蛋白的 3'UTR 来实现的^[13]。

4 miR-34a/p53 反馈环路的作用

miR-34 与 p53 之间的关系是学者们研究的热点。miR-34 与 p53 形成的正反馈网络如下:在

各种导致 DNA 损伤的因素作用下,p53 活化,促进 miR-34 表达,从而抑制 B 细胞淋巴瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、周期蛋白依赖性激酶-6(cyclin-dependent kinase-6, CDK6)、细胞周期蛋白 E2(cyclin E2)等的表达,促进细胞凋亡、细胞衰老和细胞周期停滞。而 miR-34 进一步抑制组蛋白去乙酰化酶沉默信息调节因子-1(silent information regulator, SIRT1)的表达,使更多 p53 因乙酰化而活化,这样就形成了 miR-34/p53/SIRT1 反馈环路^[14]。

miR-34a 在此反馈环路中的作用在于下调 SIRT1 和 ZNF281 蛋白等中间蛋白的水平。Li 等^[15]在体外实验引入靶向 miR-34a 表达质粒,诱导 miR-34a 在乳腺癌细胞中的大量持续表达,通过下调 E2F3、CD44 和 SIRT1 等蛋白的水平,明显抑制乳腺癌 MDA-MB-231 和 SK-Br-3 细胞的生长侵袭和转移。体内实验证实 miR-34a 能抑制肿瘤生长和延长生存期,在肿瘤样本中也观察到了 miR-34a 的水平下调^[16]。Li 等^[16]还发现 miR-34a 通过下调蛋白 Bcl-2 和 SIRT1 抑制乳腺癌细胞增殖和转移。miR-34a 在此反馈环路中的另一个靶点是 ZNF281。p53 促进 miR-34a 表达后,miR-34a 直接下调 ZNF281 的 mRNA 和蛋白水平,而 ZNF281 的作用是诱导乳腺癌细胞上皮间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等侵袭行为^[17]。EMT 机制认为原位癌细胞能够从上皮型转变为侵袭性更强的间质型,待完成癌细胞转移后再转化为上皮型。

5 结语

综上所述,miR-34a 通过参与乳腺癌及其干细胞的相关信号通路,表现出其抑癌基因的作用。而如何将 miR-34a 带入体内发挥安全有效的作用是有待攻破的难题。目前有报道借助端胶原作为载体携带 miR-34a 进入小鼠体内抑制结肠癌细胞生长^[18],但是还没有借助端胶原作为载体携带 miR-34 来抑制乳腺癌细胞生长的体内试验。端胶原是非病毒载体,而利用慢病毒载体携带 miR-34 的体内试验已有报道,慢病毒介导下的 miR-34a 过度表达抑制了 MCF-7 细胞系的增殖、S 期细胞率和肿瘤形成^[15]。遗憾的是,不管是非病毒载体还是病毒载体,目前的技术都尚未成熟。因此,希望未来开发安全、易于制备、高效表达治疗基因的载体进入乳腺肿瘤内部发挥疗效。

miRNA 的甲基化和组蛋白修饰是导致癌细胞中 miRNA 表达下降的表现遗传学机制,多种恶性肿瘤包括乳腺癌中检测到了 miR-34a 的 CpG 失活^[19-20]。因此,一方面,可以检测 miR-34a 的 CpG

甲基化水平作为肿瘤诊断标志物;另一方面,下调 miR-34a 的甲基化水平对于乳腺癌的治疗具有重要意义^[21-22]。还有,组蛋白去乙酰化酶抑制剂可通过提高基因特定区域组蛋白乙酰化水平,调控细胞凋亡及分化相关蛋白的表达和稳定性,这正在成为抗肿瘤药物发展的新方向。比如 SIRT1 去乙酰化酶抑制剂不仅能抑制乳腺癌细胞增殖,还表现出克服多重耐药的可能^[23]。尽管 miR-34a 与乳腺癌细胞耐药性的研究较少,但是 Li 等^[11]发现 miR-34a 过度表达能增加 MCF-7 细胞系对多柔比星的敏感性。而 Kastl 等^[24]揭示了低表达的 miR-34a 促进 MCF-7 耐药细胞对多西紫杉醇的敏感性,过表达的 miR-34a 使 MCF-7 多西紫杉醇敏感细胞产生耐药,这可能因为 miR-34a 是 G₁ 期阻滞而多西紫杉醇是 G₂ 期阻滞。因此,笔者期待更多的学者对 miR-34a 与乳腺癌细胞耐药性进行研究。毫无疑问,miR-34a 在乳腺癌相关信号通路中扮演的角色与作用的进一步明确,将为乳腺癌的诊断、治疗及预后提供更加特异的思路与方法。

【关键词】 乳腺肿瘤; 干细胞; 信号通路; 微 RNAs

【中图分类号】 R737.9

【文献标志码】 A

参 考 文 献

- [1] 全国肿瘤防治研究办公室,全国肿瘤登记中心,卫生部疾病预防控制局. 中国肿瘤死亡报告——全国第三次死因回顾抽样调查[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:120-131.
- [2] Wang R, Ma J, Wu Q, et al. Functional role of miR-34 family in human cancer[J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(10): 1185-1191.
- [3] Peurala H, Greco D, Heikkinen T, et al. MiR-34a expression has an effect for lower risk of metastasis and associates with expression patterns predicting clinical outcome in breast cancer[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e26122.
- [4] Javeri A, Ghaffarpour M, Taha MF, et al. Downregulation of miR-34a in breast tumors is not associated with either p53 mutations or promoter hypermethylation while it correlates with metastasis[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 413.
- [5] Cannell IG, Bushell M. Regulation of Myc by miR-34c: A mechanism to prevent genomic instability? [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(14): 2726-2730.
- [6] Mackiewicz M, Huppi K, Pitt JJ, et al. Identification of the receptor tyrosine kinase AXL in breast cancer as a target for the human miR-34a microRNA [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 130(2): 663-679.
- [7] Yang S, Li Y, Gao J, et al. MicroRNA-34 suppresses breast cancer invasion and metastasis by directly targeting Fra-1 [J]. *Oncogene*, 2013, 32(36): 4294-4303.
- [8] Zhao G, Guo J, Li D, et al. MicroRNA-34a suppresses cell proliferation by targeting LMTK3 in human breast cancer mcf-7 cell line[J]. *DNA Cell Biol*, 2013, 32(12): 699-707.
- [9] Wang Z, Li Y, Banerjee S, et al. Emerging role of Notch in stem cells and cancer[J]. *Cancer Lett*, 2009, 279(1): 8-12.
- [10] McGowan PM, Simeone C, Ribot EJ, et al. Notch1 inhibition alters the CD44hi/CD24lo population and reduces the formation of brain metastases from breast cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(7): 834-844.
- [11] Li XJ, Ji MH, Zhong SL, et al. MicroRNA-34a modulates chemosensitivity of breast cancer cells to adriamycin by target Notch1[J]. *Arch Med Res*, 2012, 43(7): 514-521.
- [12] Koval AV, Vlasov P, Shchikova P, et al. Anti-leprosy drug clofazimine inhibits growth of triple-negative breast cancer cells via inhibition of canonical Wnt signaling [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 87(4): 571-578.
- [13] Kim NH, Kim HS, Kim NG, et al. p53 and microRNA-34 are suppressors of canonical Wnt signaling[J]. *Sci Signal*, 2011, 4(197): ra71.
- [14] Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis[J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(2): 193-199.
- [15] Li L, Xie X, Luo J, et al. Targeted expression of miR-34a using the T-VISA system suppresses breast cancer cell growth and invasion[J]. *Mol Ther*, 2012, 20(12): 2326-2334.
- [16] Li L, Yuan L, Luo J, et al. MiR-34a inhibits proliferation and migration of breast cancer through down-regulation of Bcl-2 and SIRT1[J]. *Clin Exp Med*, 2013, 13(2): 109-117.
- [17] Hahn S, Jackstadt R, Siemens H, et al. SNAIL and miR-34a feed-forward regulation of ZNF281/ZBP99 promotes epithelial-mesenchymal transition [J]. *EMBO J*, 2013, 32(23): 3079-3095.
- [18] Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, et al. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(39): 15 472-15 477.
- [19] Vogt M, Munding J, Grüner M, et al. Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas [J]. *Virchows Arch*, 2011, 458(3): 313-322.
- [20] Wong KY, Yu L, Chim CS. DNA methylation of tumor suppressor miRNA genes: a lesson from the miR-34 family[J]. *Epigenomics*, 2011, 3(1): 83-92.
- [21] Eichelser C, Flesch-Janys D, Chang-Claude J, et al. Deregulated serum concentrations of circulating cell-free microRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in human breast cancer development and progression [J]. *Clin Chem*, 2013, 59(10): 1489-1496.
- [22] Tahara H, Kay MA, Yasui W, et al. MicroRNAs in cancer: the 22nd Hiroshima Cancer Seminar/the 4th Japanese Association for RNA Interference Joint International Symposium [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2013, 43(5): 579-582.
- [23] Kuo SJ, Lin HY, Chien SY, et al. SIRT1 suppresses breast cancer growth through downregulation of the Bcl-2 protein [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(1): 125-130.
- [24] Kastl L, Brown I, Schofield AC. MiRNA-34a is associated with docetaxel resistance in human breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 131(2): 445-454.

(收稿日期:2014-04-24)

(本文编辑:刘军兰)