

- in glioma progression and injury response. *J Pathol*, 2013, 230(3): 310-321.
- [19] Bloch O, Crane CA, Kaur R, et al. Gliomas promote immunosuppression through induction of B7-H1 expression in tumor-associated macrophages. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(12): 3165-3175.
- [20] Fonseca AC, Romão L, Amaral RF, et al. Microglial stress inducible protein 1 promotes proliferation and migration in human glioblastoma cells. *Neuroscience*, 2012, 200: 130-141.
- [21] Coniglio SJ, Eugenin E, Dobrenis K, et al. Microglial stimulation of glioblastoma invasion involves epidermal growth factor receptor (EGFR) and colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) signaling. *Mol Med*, 2012, 18: 519-527.
- [22] Yeh WL, Lu DY, Liou HC, et al. A forward loop between glioma and microglia: Glioma-derived extracellular matrix-activated microglia secrete IL-18 to enhance the migration of glioma cells. *J Cell Physiol*, 2012, 227(2): 558-568.
- [23] Ye XZ, Xu SL, Xin YH, et al. Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF- $\beta$ 1 signaling pathway. *J Immunol*, 2012, 189(1): 444-453.
- [24] Nakasone ES, Askautrud HA, Kees T, et al. Imaging tumor-stroma interactions during chemotherapy reveals contributions of the microenvironment to resistance. *Cancer Cell*, 2012, 21(4): 488-503.
- [25] Straussman R, Morikawa T, Shee K, et al. Tumour microenvironment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*, 2012, 487(7408): 500-504.
- [26] Sun Y, Campisi J, Higano C, et al. Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nature medicine*, 2012, 18(9): 1359-1368.
- [27] Sahm F, Oezen I, Opitz CA, et al. The endogenous tryptophan metabolite and NAD<sup>+</sup> precursor quinolinic acid confers resistance of gliomas to oxidative stress. *Cancer Res*, 2013, 73(11): 3225-3234.

## miR-21 与 AP-1 构成的自我调节环路在脑胶质瘤中的研究进展

朱潇鹏, 徐庆福 综述 吕胜青 审校

第三军医大学附属新桥医院神经外科, 重庆 400037

**摘要:** MicroRNA-21 是内源性小分子非编码 RNA, 在转录后水平对基因表达发挥调控作用。miR-21 的表达水平在脑胶质瘤中明显升高, 影响肿瘤细胞的增殖、侵袭。RAS 信号通路激活后, 磷酸化作用使得 AP-1 (activator protein-1, 激活剂蛋白-1) 表达增强, 而活化的 AP-1 又可以诱导 miR-21 的转录。miR-21 可以通过抑制下游靶点最终影响 AP-1 的表达。miR-21 与 AP-1 构成一个自我调节的环路, 对肿瘤的增殖、侵袭进一步产生影响。本文就 miR-21 的生物学特性, 与 AP-1 构成的自我调节环路的内在联系, 以及在脑胶质瘤凋亡、侵袭中的作用等方面进行综述。

**关键词:** miR-21; AP-1; 自我调节环路; 脑胶质瘤

MicroRNAs (miRNAs) 是内源性小分子非编码 RNA (一般 19-24 个核苷酸大小), 通过与蛋白质编码 mRNA 的 3' 非翻译区域 (3' UTR) 靶向性结合, 导致 mRNA 降解或失活, 从而在转录后水平调控编码基因表达和蛋白质翻译过程<sup>[1]</sup>。成熟的 miRNA 具有以下特点: ①在进化过程中呈现高度保守。②miRNA 基因呈簇集性出现, 并且有 50% 左右的 miRNA 基因位于染色体的脆性位点, 这些位

点也是肿瘤患者染色体常见的变异区域。③miRNA 在生物体呈现时间和空间特异性表达。MicroRNA-21 (miR-21) 是普遍存在的致癌基因, 在包括肺癌、前列腺癌、肝癌、胶质瘤在内的许多肿瘤中都呈现高表达<sup>[2,3]</sup>。miR-21 的异常表达影响肿瘤增殖、凋亡、侵袭、转移等多种恶性转化过程<sup>[4,5]</sup>。

脑胶质瘤来源于神经上皮, 是最常见的原发性颅内肿瘤, 约占颅内肿瘤的 40% ~ 50%。该肿瘤

基金项目: 重庆市自然科学基金 (CSTC 2010BB5028); 第三军医大学科研课题 (2011D275、2007D176)

收稿日期: 2013-05-30; 修回日期: 2013-08-08

作者简介: 朱潇鹏 (1988-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事脑胶质瘤的相关研究。

通讯作者: 吕胜青 (1971-), 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 医学博士, 主要从事神经系统肿瘤的基础与临床研究。

为浸润性生长、无明显界限,手术难以全切;化疗和放疗对胶质瘤细胞杀伤的特异性低,且会产生中枢神经系统的毒、副作用。脑胶质瘤一直是神经外科领域的难治性疾病,目前对于胶质瘤的治疗仍无突破性进展,且对其发生、发展机制缺乏认识。

## 1 MicroRNA-21 的高表达抑制胶质瘤凋亡、促进细胞侵袭转移

2005年Chan利用microRNA芯片技术首次发现胶质瘤中miR-21异常表达,且与无肿瘤的正常大脑组织相比miR-21的表达水平明显增高<sup>[6]</sup>。在恶性胶质瘤细胞系A172,U87,LN229,LN308中转染LNA-miR21抑制miR-21表达后,肿瘤细胞数目较之前明显减少,而caspases3和caspases7酶的活性显著提高。提示miR-21在脑胶质瘤中发挥着抗细胞凋亡的作用。在乳腺癌MCF-7细胞系和异种移植小鼠模型中也证实了下调miR-21后,肿瘤细胞的生长受到抑制,同时发现miR-21的下调伴随着B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma-2,BCL-2)的表达下调。BCL-2编码的蛋白定位线粒体外膜,是比较公认的抗凋亡基因。基于此作者提出:miR-21可能是通过调控BCL-2而发挥抗细胞凋亡的作用<sup>[7]</sup>。随后很多的文献陆续报道了miR-21调控的基因及其通路下游引起凋亡的变化机制。程序性细胞死亡因子-4(programmed cell death 4,PDCD4)是新近发现的一种细胞凋亡相关基因。研究表明:PDCD4不仅对肿瘤细胞的凋亡起着重要的调节作用,而且通过抑制肿瘤细胞蛋白转录和翻译过程抑制肿瘤增殖<sup>[8]</sup>。在包括胶质瘤等多种肿瘤中均发现miR-21表达升高能降低PDCD4的表达<sup>[9,10]</sup>。另外,通过在PDCD4的3'UTR的全长序列,以及替换突变和缺失突变序列分别插入到PGL-3报告载体的下游,以插入无义序列的PGL-3作为对照,敲低内源性miR-21表达后检测荧光强度,证实了miR-21对PDCD4的直接调控作用<sup>[11]</sup>。PDCD4的3'UTR区228-249nt具有高度的进化保守性,是miR-21作用的靶点<sup>[12]</sup>。miR-21的直接靶点还包括线粒体凋亡通路的重要元件凋亡肽酶激活因子-1(apoptotic peptidase activating factor 1,Apaf1),Fas配体(Fas ligand,Faslg),Ras同系物家族成员B(ras homolog gene family member B,RhoB)等与凋亡密切相关的基因<sup>[13]</sup>。

随着研究的进展发现,miR-21不仅跟肿瘤的增殖凋亡相关。2008年Asangani等<sup>[12]</sup>在结肠直肠

癌中发现:miR-21的上调抑制PDCD4的表达,最终起到了促进肿瘤的侵袭和转移的作用。Gabriely也在脑胶质瘤中证明了miR-21的高表达能增加肿瘤细胞的侵袭力<sup>[14]</sup>。Zhu根据侵袭能力将16例肝癌组织分成2组,结果发现:具有侵袭能力的一组中,组织miR-21表达量明显高于另一组。之后选取4株细胞系,发现随着miR-21的表达量增大,细胞侵袭能力也相应增强<sup>[15]</sup>。说明miR-21的表达量和细胞的侵袭转移密切相关。透明质酸是一种细胞外基质的粘多糖,促进细胞粘附、运动、增殖。Kwak利用透明质酸诱导miR-21表达,放大RAS信号通路的信号幅度和持续时间,发现在缺乏PTEN的胶质瘤细胞系中能促进金属蛋白酶-9(MMP-9)的分泌,从而促进肿瘤细胞的侵袭转移<sup>[16]</sup>。另外有研究认为在胶质瘤中miR-21的高表达是通过作用于直接靶点RECK促进金属蛋白酶-9的分泌,从而使得肿瘤细胞侵袭转移作用增强<sup>[17]</sup>。

## 2 RAS/MEK/ERK信号通路与AP-1

Ras蛋白是一类小分子的三磷酸鸟苷(GTP)酶蛋白,分子量为21KD,与Rho、Arf、Sara、Ran、Rab等亚型同属于Ras蛋白超家族成员<sup>[18]</sup>。Ras蛋白参与了细胞增殖分化,是有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)信号转导通路的主要调节分子。MEK(MAPKK)蛋白包括MEK1和MEK2蛋白,这些蛋白都含有一个催化激酶的结构域,它们的激活是依赖磷酸化和去磷酸化完成的<sup>[19]</sup>。ERK属于MAPK家族,有ERK1/2(P44/P42)亚型,是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,能磷酸化含有丝氨酸/苏氨酸结构的底物。RAS/MEK/ERK信号通路是一条可广泛激活的有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)通路,其激活能引起蛋白激酶级联反应,将细胞外信号传递入细胞内,参与细胞的增殖、分化、生存和凋亡等生理过程<sup>[19]</sup>。在细胞外信号下,生长因子等与细胞表面相应的受体结合后,Ras和GTP结合,Ras被激活<sup>[20]</sup>。然后Ras-GTP募集Raf激酶,Raf被磷酸化后激活又可催化MEK1和MEK2,MEK蛋白激活后特异性催化ERK的磷酸化而引起ERK激活<sup>[21]</sup>。磷酸化的ERK入核,启动c-jun、c-fos、c-myc等转录因子的转录,从而提高细胞增殖组织细胞凋亡<sup>[20]</sup>。哺乳动物中激活蛋白1(activator protein 1,AP-1)主要由JUN和FOS两大家族组成。亚家族单位以二聚体形式结合DNA靶

序列参与细胞增殖、凋亡、侵袭以及血管形成。

### 3 miR-21 和 AP-1 构成自我调节环路(见图 1)

RAS 通路激活后,miR-21 的表达上调,利用 A-FOS(一种 c-FOS 的衍生物,AP-1 的抑制子)抑制 AP-1 的表达后发现: Ras 通路激活的情况下 miR-21 的表达明显下降,说明 ras 致癌蛋白的激活可以通过活化 AP-1 从而调节 miR-21 的表达。进一步研究表明: pri-miR-21 的 5'-侧翼调控区域存在 AP-1 靶点,并通过荧光素酶报告确定了 AP-1 在 miR-21 的作用位点<sup>[21]</sup>。在 FRTL-5/ER-RAS 细胞系中,ras 激活后的 48~74 小时 miR-21 的积累量达到最高,72 小时 PDCD4 的活性几乎全部被抑制。激活 ras 信号通路,同时抑制 AP-1 的活性时,之前对 PDCD4 的抑制作用差不多完全解除。PDCD4 作为 miR-21 的直接靶点,受到 miR-21 的负性调控,Ras 通路激活,活化的 AP-1 通过诱导 miR-21 转录从而调节 PDCD4 的表达。PDCD4 一方面可以诱导凋亡,另一方面又通过一系列过程最终抑制 AP-1 的活性<sup>[22]</sup>。Yang 研究发现 PDCD4 通过干扰 c-Jun and c-Fos 的反式激活可以抑制 AP-1 的活性<sup>[23]</sup>。而 PDCD4 对 c-jun 的抑制是通过抑制 MAP4K1 经 MAP2K1→TAK1→MKK4→JNK 信号通路激活 JNK 发挥作用。PDCD4 敲除后,β-catenin/Tcf 激活,c-Myc 表达上调,而在 MAP4K1 的启动子-536bp 存在 c-Myc 的结合位点,免疫共沉淀也证实了这个位点<sup>[24]</sup>。另外有研究发现:胶质瘤细胞系 u251 中 β-catenin/Tcf 激活可以诱导信号转导和转录活化因子 3(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)的表达。STAT3 能与 miR-21 的启动序列直接结合,使其表达上调<sup>[17]</sup>。Hatley 在研究非小细胞肺癌中发现了 miR-21 的 11 个直接靶点: Spry1, Spry2, Btg2, Map2k3, PDCD4, Apaf1, Faslg, RhoB, bcl7a, RECK, Smad7, ski, Nf1B。其中 Spry1, Spry2, Btg2, and Pdc4 受到 miR-21 的负性调节,同时对 Ras/MEK/ERK 通路产生抑制作用。RAS 通路激活后 miR-21 的表达上调从而对 Spry1, Spry2, Btg2, and Pdc4 的表达抑制,而 Spry1, Spry2, Btg2, and Pdc4 表达的抑制进一步激活 Ras 通路使得 miR-21 的表达上调。而 Apaf1, Faslg, Pdc4, and RhoB 促进凋亡<sup>[13]</sup>。Spry1, Spry2, Btg2 对 Ras 信号通路的抑制作用之前的文献也有相关的报道。

### 4 自我调节环路在胶质瘤研究中的展望

关于 miR-21 与 AP-1 形成的自我调节环路在

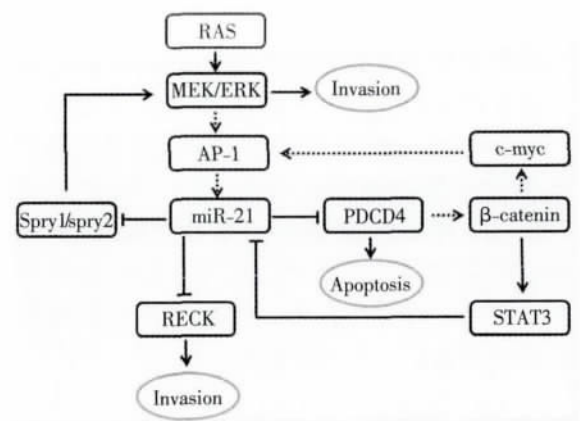


图 1 miR-21 与 AP-1 构成的自我调节环路线路图

非小细胞癌,肝细胞癌,人胚肺成纤维上皮细胞中都有研究,但是目前在胶质瘤中相关的研究较少。2011 年 Kwak 在缺少 PTEN 的胶质瘤研究中发现,miR-21 的高表达 Spry2(miR-21 的直接靶点)最终影响了胶质瘤的侵袭性<sup>[16]</sup>。进一步的研究表明:利用亚硝酸盐诱导人胚肺成纤维上皮细胞的 miR-21 上调,激活 miR-21-Spry1-ERK/NF-κB 和 miR-21-Pdc4-JNK/c-Jun,两条自我调节的环路<sup>[25]</sup>。胶质瘤的研究中同样存在 ERK 的磷酸化,ERK 可以使 c-jun 磷酸化。胶质瘤中是否也激活了 miR-21/AP-1 这条自我调节环路,存在 PDCD4 以及 SPRY2 的持续激活有待于将来研究的进一步证实。另外有研究表明:miR-21 的表达水平和胶质瘤的等级关系密切。Lei 利用 qRT-PCR 验证了 93 列不同级别的胶质瘤组织中 miR-21 的表达水平后发现:高级别胶质瘤(WHOIII-IV)中 miR-21 的表达明显高于低级别胶质瘤(WHOI-II)<sup>[17]</sup>。有意思的是在胶质瘤的研究中,miR-21 的高表达造成 SPRY2 的低表达和细胞的侵袭转移密切相关,SPRY2 蛋白水平在 WHOI-IV 的胶质瘤的组织中下降了 79.7%;在缺乏 PTEN 的情况下 HA 通过诱导 miR-21 在胶质瘤中表达上调,从而抑制 SPRY2 的表达,使得 RAS/MAPK 信号的通路的振幅扩大、持续时间延长从而促进 MMP-9 的分泌,细胞的侵袭性增强<sup>[16]</sup>。两个自我调节环路存在许多相同的节点,是否存在序贯激活的过程,通过 miR-21 构成的自我调节的环路,让信号通路的作用持续,同时让信号呈现持续放大的效果。它对胶质瘤的恶性进展发挥了多大的作用,抑制这条环路会不会抑制肿瘤的恶性进展,让胶质瘤的级别阻滞在某一期,还需要进一步研究。miR-21 还存在着许多的直接靶点,同时也存

在多个因子直接影响 miR-21 的表达,是否会构成新的环路影响胶质瘤的进展。而这些环路在胶质瘤中所起的作用还知之甚少,有待进一步的研究。

综上所述,miR-21 的表达和 Ras 信号通路所构成的调节环路与肿瘤的增殖、凋亡、侵袭密切相关。但目前对 miR-21 的认识非常有限,对其在转录调控机制、靶基因、及其对靶基因的作用机制还不很清楚,miR-21 在调控的自我调节环路中发挥的作用有待进一步的探索。

#### 参 考 文 献

- [1] Makeyev EV, Maniatis T. Multilevel regulation of gene expression by microRNAs. *Science*, 2008, 319 ( 5871 ): 1789-1790.
- [2] Alder H, Taccioli C, Chen H, et al. Dysregulation of miR-31 and miR-21 induced by zinc deficiency promotes esophageal cancer. *Carcinogenesis*, 2012, 33( 9 ): 1736-1744.
- [3] Lee JH, Voortman J, Dingemans AM, et al. MicroRNA expression and clinical outcome of small cell lung cancer. *PLoS One*, 2011, 6( 6 ): e21300.
- [4] Grunder E, D' Ambrosio R, Fiaschetti G, et al. MicroRNA-21 suppression impedes medulloblastoma cell migration. *Eur J Cancer*, 2011, 47( 16 ): 2479-2490.
- [5] Schramedei K, Morbt N, Pfeifer G, et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and SMARCA4. *Oncogene*, 2011, 30( 26 ): 2975-2985.
- [6] Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 2005, 65( 14 ): 6029-6033.
- [7] Si ML, Zhu S, Wu H, et al. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*, 2007, 26( 19 ): 2799-2803.
- [8] Lankat-Buttgereit B, Rüdiger Göke. The tumoursuppressor Pdc4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *BiolCell*, 2009, 101( 6 ): 309-317.
- [9] Fischer N, Göke F, Splittstößer V, et al. Expression of programmed cell death protein 4 ( PDCD4 ) and miR-21 in urothelial carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417( 1 ): 29-34.
- [10] Cao Z, Yoon JH, Nam SW, et al. PDCD4 expression inversely correlated with miR-21 levels in gastric cancers. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138( 4 ): 611-619.
- [11] Lu Z, Liu M, Stribinskis V, et al. MicroRNA-21 promotes celltransformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene*, 2008, 27( 31 ): 4373-4379.
- [12] Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, et al. MicroRNA-21( miR-21 ) post-transcriptionally downregulates tumor suppressorPdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 2008, 27( 15 ): 2128-2136.
- [13] Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, et al. Modulation of K-Ras-dependent lungtumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell*, 2010, 18( 3 ): 282-293.
- [14] Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, et al. MicroRNA 21 promotes glioma invasionby targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol*, 2008, 28( 17 ): 5369-5380.
- [15] Zhu Q, Wang Z, Hu Y, et al. miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*, 2012, 27( 5 ): 1660-1668.
- [16] Kwak HJ, Kim YJ, Chun KR, et al. Downregulation of Spry2 by miR-21 triggers malignancy in human gliomas. *Oncogene*, 2011, 30( 21 ): 2433-2442.
- [17] Han L, Yue X, Zhou X, et al. MicroRNA-21 Expression is regulated by  $\beta$ -catenin /STAT3 Pathwayand Promotes Glioma Cell Invasion by Direct Targeting RECK. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 18( 7 ): 573-583.
- [18] Goldfinger LE. Choose your own path: specificity in Ras GTPase signaling. *Mol Biosyst*, 2008, 4( 4 ): 293-299.
- [19] Shaul YD, Seger R. The MEK /ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773( 8 ): 1213-1226.
- [20] McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf /MEK /ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773( 8 ): 1263-1284.
- [21] Talotta F, Cimmino A, Matarazzo MR, et al. An autoregulatory loop mediated by miR-21 and PDCD4 controls the AP-1 activity in RAS transformation. *Oncogene*, 2009, 28( 1 ): 73-84.
- [22] Hwang SK, Jin H, Kwon JT, et al. Aerosol-deliveredprogrammed cell death 4 enhanced apoptosis, controlled cell cycle and suppressed AP-1 activity in the lungs of AP-1 luciferase reporter mice. *Gene Ther*, 2007, 14( 18 ): 1353-1361.
- [23] Yang HS, Jansen AP, Komar AA, et al. The transformation suppressor Pdc4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol Cell Biol*, 2003, 23( 1 ): 26-37.
- [24] Wang Q, Zhang Y, Yang HS. Pdc4 knockdown up-regulates MAP4K1 expression and activation of AP-1 dependent transcription through c-Myc. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823( 10 ): 1807-1814.
- [25] Shen L, Ling M, Li Y, et al. Feedback Regulations of miR-21 and MAPKs via Pdc4and Spry1 Are Involved in Arsenite-Induced CellMalignant Transformation. *PLoS One*, 2013, 8( 3 ): e57652.