

miRNA-21—治疗神经胶质瘤的新靶标?

袁洁 综述 费智敏 审校

上海中医药大学附属曙光医院神经外科,上海 200120

摘要:神经胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤,多年来以手术为主,结合放化疗等综合治疗,然而临床疗效仍不乐观。有半数以上的小 RNA (Micro RNA, miRNA) 定位于癌基因相关区域,其中 miRNA-21 的表达与神经胶质瘤的发生发展密切相关。本文就近年来国内外对 miRNA-21 与神经胶质瘤相关性的研究进行综述,探讨其作为诊治神经胶质瘤新靶标的可能性。

关键词:神经胶质瘤;基因治疗;miRNA-21

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2018.02.026

神经胶质瘤是来源于神经上皮的肿瘤,约占全部颅内肿瘤的 40% ~ 50%,肿瘤类型包括星形细胞瘤、少突胶质瘤、室管膜瘤等,手术结合放化疗等综合治疗疗效不佳,其中星形细胞瘤 IV 级即胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 的中位生存期仅为 14.6 个月,仅有 5% ~ 10% 的患者生存期可达到两年^[1]。总体而言,神经胶质瘤具有高发病率、高复发率和高病死率的特点。

基因靶向治疗是一种新兴的治疗方法,其中 miRNA、长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 等非编码 RNA 为治疗靶点的治疗已成为肿瘤的研究热点。miRNA 是一类长约 18 ~ 27 个核糖核苷酸的非编码小 RNA,其在多种真核细胞中广泛存在,参与翻译抑制、mRNA 的降解和脱腺苷等多种细胞内基因靶向沉默过程。研究表明^[2]: miRNA 能够调节癌基因和肿瘤细胞的抑制因子及其介导的信号转导通道。基因组中的遗传和表观遗传变化或区域的扩增或缺失也都有可能导致 miRNA 水平的失调。其中 miRNA-21 表达水平与神经胶质瘤的侵袭、迁移和治疗有着密不可分的联系,因此,探索 miRNA-21 与神经胶质瘤相关的作用机理,对神经胶质瘤未来的诊治和预后判断具有一定的启示作用。本文从 miRNA-21 在神经胶质瘤细胞中的表达情况、miRNA-21 在神经胶质瘤发生发展过程中的调控机制以及 miRNA-21 的表达神经胶质瘤诊断、治疗和预后中的意义方面进行阐述,为神经胶质瘤新型治疗工具的开发提供新思路。

1 miRNA-21 在神经胶质瘤细胞中的表达

研究证实,多种 miRNA 在神经胶质瘤中表达异常^[3,4],通过调控血管发生、抗肿瘤因子、细胞周期和细胞凋亡影响神经胶质瘤的分级和预后^[5]。也有人认为,miRNA 可能与胶质瘤干细胞的性质相关,从而影响肿瘤的发生与发展^[6]。在这些稳定改变的 miRNA 中,miRNA-21 表达的显著升高是神经胶质瘤的共同特征^[7]。Chan 等^[7]通过实验表明,在高度恶性的脑肿瘤中,miRNA-21 是 GBM 中强烈过表达的特征性 miRNA。神经胶质瘤病理分级与 miRNA-21 表达水平存在正相关。Gabriely 等^[8]在研究神经胶质瘤细胞侵袭性时发现,miRNA-21 通过抑制抗肿瘤基因 RECK 和活化基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 促进胶质瘤细胞的侵袭和迁移。与低级别神经胶质瘤患者相比,高级别神经胶质瘤患者体内的 miRNA-21 水平均显著升高^[9]。此外,在神经胶质瘤中,miRNA-21 的表达水平与患者的疾病状态和临床预后有关^[10]。

2 miRNA-21 在神经胶质瘤中的调控机制

Zhang 等^[11]证实,miRNA-21 的表达由表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 通过 β -连环蛋白和激活蛋白-1 (activator protein 1, AP-1) 的活化调节,促进肿瘤细胞的增生。他们还表明,奈米妥珠单抗和 miRNA-21 抑制剂的组合治疗优于单一药物治疗。也就是说,miRNA-21 与 EGFR 在癌细胞的进程中存在反馈调节的环路。TGF- β /Smad3 通路中 Smad2/3 基因表达的下调能

收稿日期:2017-11-27;修回日期:2018-03-26

作者简介:袁洁(1993-),女,硕士在读,住院医师,研究方向:胶质瘤和脑血管疾病研究。

通信作者:费智敏(1968-),男,硕士学位,主任医师,研究方向:颅脑肿瘤和脑血管疾病研究。

促进细胞的增殖。Qu 等^[12]在 Meta 分析基础上进行实验,发现使用 TGF- β I 型受体激酶的抑制剂 (Galunisertib) 靶向 TGF- β /Smad3 信号传导,可以减弱 miRNA-21 从神经胶质瘤细胞的分泌。Pölajeva 等^[13]发现 miRNA-21 与转录因子 Sox2 和血小板衍生因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 的表达在神经胶质瘤中呈正相关。同时,miRNA-21 通过靶向 p53, TGF- β 和线粒体凋亡途径的信号通路,而抑制抗肿瘤因子 RECK, TGFBR, DAXX, PDCD4, p63, JMY, TOPORS, hnRNPk 和 TP53BP2 的翻译。Luo 等^[14]建立 miRNA-21 敲低和过表达细胞系,确定了 miRNA-21 表达的增加显著促进胶质瘤细胞的迁移和侵袭,这一现象还伴随着 Sox2 蛋白的上调表达。这表明 Sox2 可能作为 miRNA-21 功能的关键介质。此外,miRNA-21 也上调了 β -连环蛋白的蛋白表达水平,而抗 miRNA-21 和 Sox2 敲除显著降低 β -连环蛋白表达。

上述研究结果表明:miRNA-21 与多种细胞信号通路和因子相互作用、调节与被调节。如能抑制 miRNA-21 在胶质瘤中的表达,就可通过多种通路同时抑制胶质瘤细胞的增殖、侵袭与细胞周期。因此 miRNA-21 是治疗胶质瘤的有希望的靶标。

3 miRNA-21 对神经胶质瘤的诊断意义

Miele^[15]通过比较儿童高级别胶质瘤 (pediatrics high grade glioma, pHGG)、成人高级别胶质瘤 (adult high grade glioma, aHGG) 和正常脑组织中的高通量 miRNA,发现致癌 miRNA-17-92 簇和 miRNA-21 在 pHGG 中呈现上调趋势。袁平等^[16]通过荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测探索脑脊液中 miRNA 的表达差异,结果显示 miRNA-21 在神经胶质瘤中表达显著高于对照组 ($P < 0.05$),而 miRNA-128 在神经胶质瘤中表达显著低于对照组 ($P < 0.05$),miRNA-128 和 miRNA-21 联合诊断神经胶质瘤的灵敏度和特异度均为 100%,即脑脊液中 miRNA-128 和 miRNA-21 可能是神经胶质瘤潜在的早期诊断标志物。赵保等^[17]收集临床确诊的胶质瘤患者和健康人群的血浆标本,通过实时定量 PCR 检测,结果表明相对于健康对照人群,miRNA-21 在胶质瘤患者血浆中呈高水平状态,ROC 分析表明血浆 miRNA-21 水平作为诊断胶质瘤标志物具有较高的灵敏度和特异度。Qu 等^[12]在其研究中,对 35 例神经胶质瘤患者进行 15 种癌症相关 miRNA 表达水平的检测,发现其

中 23 例神经胶质瘤患者 miRNA-21 高表达 (65.7%),与非癌组织的平均值相比,至少有高达 1.5 倍的变化。此外,脑脊液样本和癌症组织中 miRNA-21 的表达水平之间存在很强的相关性 ($r = 0.506$, $P = 0.002$),表明脑脊液中 miRNA-21 的表达具有同步性,胶质瘤患者的脑脊液中呈现高水平的 miRNA-21^[18]。

4 miRNA-21 的潜在治疗意义

目前,欧洲神经肿瘤学协会指南^[19]中对神经胶质瘤的一般治疗仍推荐显微手术治疗、放射治疗和药物治疗,值得注意的是,指南更加重视神经胶质瘤的组织学分类和分子诊断,认为 IDH 突变、1q/19q 杂合子、组蛋白 H3-K27M 突变和 O6-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶 (O6-methylguanine DNA methyltransferase, MGMT) 启动子甲基化四种分子生物标志物是诊断和治疗胶质瘤的核心标志物,并以此为基础推荐治疗策略。研究表明^[20],miRNA-21 作为基因转录后调节剂与 MGMT 的表达和 GBM 患者的生存期息息相关。我们有理由认为,miRNA-21 对神经胶质瘤具有潜在的治疗意义。

miRNA-21 是一种抗凋亡因子,可抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤细胞增殖,影响胶质瘤细胞的增殖,调节肿瘤细胞对化疗药物的敏感性和耐药性^[11]。Chan^[7]在实验中发现,在培养的胶质母细胞瘤细胞系中敲除 miRNA-21 可引发半胱天冬酶活化和相关的凋亡细胞的死亡,提示 miRNA-21 具有抗细胞凋亡的功能。周旋等^[21]通过原位注射 miRNA-21 反义寡聚核苷酸 (AS-miRNA-21) 治疗裸鼠皮下荷 U87 人脑胶质瘤,肿瘤生长曲线显示 AS-miRNA-21 治疗组肿瘤生长速度及体积明显小于对照组与无义序列,且 miRNA-21 表达下调,肿瘤恶性度降低。可见以 miRNA-21 作为胶质瘤的治疗靶点,其结果是令人满意的。随后,陈波等^[22]采用 miRNA 海绵技术构建人源 miRNA-21 (has-miRNA-21) 反义片段 (miRNA-21 AS),并串联重复 8 个构建至真核表达载体 (pCMV),转染脑胶质瘤细胞 U251,结果显示 U251 细胞转染重组 pCMV-miRNA-21 AS 质粒后显著下调了 miRNA-21 的水平,降低了细胞增殖能力,同时提高了 TPM1、PTEN、TGF- β 、hMSH2 和 PDCD4 的 mRNA 水平,降低了肿瘤细胞学效应。

此外,miRNA-21 联合替莫唑胺治疗神经胶质瘤能增强替莫唑胺的细胞毒性作用,Ananta 等^[23]利

用携带反义 miRNA-21 的纳米颗粒联合替莫唑胺处理 U87MG 细胞后,神经胶质瘤细胞较单独替莫唑胺治疗组数量明显减少(24%; $p < 0.01$), G2/M 期细胞周期停滞增加 2.9 倍。Shi 等^[24]也在实验中发现 U87 肿瘤细胞系中高表达的 miRNA-21 能抵抗替莫唑胺诱导的细胞凋亡,且 miRNA-21 失调对替莫唑胺治疗神经胶质瘤的耐药性具有重要作用,其表达的增加是胶质瘤对替莫唑胺抗药性增加的潜在标志。

5 miRNA-21 对神经胶质瘤患者临床预后判断的意义

神经胶质瘤由于特征性的过度生长和扩散性侵袭,预后极差。Luo 等^[25]研究发现,miRNA-21 可以明显下调抑癌基因程序性死亡因子 4 (programmed cell death 4, PDCD4) 的表达水平,诱导上皮间质转化过程,从而导致肿瘤的发生和侵袭。虽然世界卫生组织(world health organization, WHO)分类可以作为预测患者临床结局的标准,但最近的几项研究表明,单独这一标准可能并不足以估计患者的预后^[26,27]。Lin 等^[28]采用实时荧光定量 PCR 方法对 125 例人神经胶质瘤和非肿瘤性脑组织进行评估,还分析了 miRNA-21 表达与临床病理因素的关系以及胶质瘤患者的预后。其结果显示:与相应的非肿瘤性脑组织相比,miRNA-21 在胶质瘤组织中表达更为显著($P < 0.001$),而具有低 miRNA-21 表达的患者的总生存期(Overall survival, OS)明显长于高 miRNA-21 表达的患者($P < 0.001$)。由此看来,miRNA-21 表达可作为胶质瘤患者总体生存预测的潜在生物标志物,但仍需进一步的前瞻性研究来确定其实际临床应用价值。随后一项包括 1121 例胶质瘤和 533 例 GBM 患者的 Meta 分析研究表明^[29]:miRNA-21 的高表达与胶质瘤中较差的 OS 相关。外囊泡以外泌体的形式转运胞内蛋白或核酸(包括各种 miRNA)来传递细胞间的信息。Shi 等^[30]检查了复发性胶质瘤患者的脑脊液与癌症相关 miRNA 的水平,比较脑脊液和血清外泌体中含有 miRNA-21 的测量值来评估预后,样本来源于 70 例胶质瘤术后患者,脑外伤患者作为非肿瘤对照组,研究发现胶质瘤患者脑脊液源外泌体中 miRNA-21 水平明显高于对照组,而血清源外泌体中 miRNA-21 的表达没有检测到差异。脑脊液源外泌体中 miRNA-21 的含量水平不仅与肿瘤转移有关,还与肿瘤好发部位的复发几率有关。由此可知,外

泌体中 miRNA-21 的含量水平可作为诊断胶质瘤和判断预后的一项可靠指标,特别是用于预测肿瘤复发和转移。王宏勤等^[31]对多发与单发性胶质瘤组织中 miRNA 表达谱的差异进行比较,有差异的基因有 128 个,其中上调差异倍数最显著的是 miRNA-21(差异倍数 240.11),下调差异倍数最大的是 miRNA-200a(差异倍数 0.009913)。可以推测多发胶质瘤与单发胶质瘤存在 miRNA 的差异表达,其中 miRNA-21 和 miRNA-200a 可能与胶质瘤的侵袭和迁移密切相关。

6 小结

综上所述,越来越多的证据证明 miRNA-21 在胶质瘤的发生发展、诊断、治疗和预后的判断中有重要意义。在神经胶质瘤的诊断方面,miRNA-21 具有很高的灵敏度和特异性;在治疗方面,不仅能利用 miRNA-21 控制胶质瘤细胞的增殖,还可以在联合放化疗的过程中,改善替莫唑胺的耐药性,增加患者对药物的敏感性;在预后的判断方面,miRNA-21 可以作为估计患者预后的可能性指标,并对胶质瘤的转移和复发的评估有一定的参考价值。总之,miRNA-21 可以成为诊治神经胶质瘤的新靶标,但仍存在一些问题需要解决。针对 miRNA-21 治疗胶质瘤的研究中,动物实验的疗效虽然令人满意,但在临床试验中疗效欠佳。如何发现更高效的载体,如何增加 miRNA-21 治疗中的靶向性以及如何保证治疗中的安全性,实现 miRNA-21 治疗胶质瘤向临床应用的过渡,都是我们需要探讨和努力的方向。

参 考 文 献

- [1] Liu Y, Yan W, Zhang W, et al. MiR-218 reverses high invasiveness of glioblastoma cells by targeting the oncogenic transcription factor LEF1 [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28 (3): 1013-1021.
- [2] Huang Y, Yang YB, Zhang XH, et al. MicroRNA-21 gene and cancer [J]. *Med Oncol*, 2013, 30 (1): 376-384.
- [3] Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334 (4): 1351-1358.
- [4] Ye X, Wei W, Zhang Z, et al. Identification of microRNAs associated with glioma diagnosis and prognosis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (16): 26394-26403.
- [5] Ames H, Halushka MK, Rodriguez FJ. miRNA Regulation in Gliomas: Usual Suspects in Glial Tumorigenesis and Evolving

- Clinical Applications [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2017, 76(4):246-254.
- [6] Rolle K. miRNA Multiplayers in glioma. From bench to bedside [J]. *Acta Biochim Pol*, 2015, 62(3):353-365.
- [7] Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14):6029-6033.
- [8] Santangelo A, Imbrucè P, Gardenghi B, et al. A microRNA signature from serum exosomes of patients with glioma as complementary diagnostic biomarker. [J]. *J Neurooncol*, 2017, 136(1):51-62.
- [9] Gabrieli G, Wurdinger T, Kesari S, et al. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(17):5369-5380.
- [10] Pietro ID, Oscar FD, Cosimo DG, et al. miR-15b and miR-21 as Circulating Biomarkers for Diagnosis of Glioma [J]. *Curr Genomics*, 2015, 16(5):304-311.
- [11] Zhang KL, Han L, Chen LY, et al. Blockage of a miR-21/EGFR regulatory feedback loop augments anti-EGFR therapy in glioblastomas [J]. *Cancer Lett*, 2014, 342(1):139-149.
- [12] Qu K, Lin T, Pang Q, et al. Extracellular miRNA-21 as a novel biomarker in glioma: evidence from meta-analysis, clinical validation and experimental investigations [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23):33994-34010.
- [13] Pölajeva J, Swartling FJ, Jiang Y, et al. miRNA-21 is developmentally regulated in mouse brain and is co-expressed with SOX2 in glioma [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(1):378.
- [14] Luo G, Luo W, Sun X, et al. MicroRNA-21 promotes migration and invasion of glioma cells via activation of Sox2 and β -catenin signaling [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 15(1):187-193.
- [15] Miele E, Buttarelli FR, Arcella A, et al. High-throughput microRNA profiling of pediatric high-grade gliomas [J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16(2):228-240.
- [16] 袁平, 何晓英, 李小刚. 脑脊液中 miR-21 和 miR-128 诊断神经胶质瘤的价值 [J]. *国际检验医学杂志*, 2014(18):2464-2465.
- [17] 赵保, 吴峰, 郑林丰, 等. 胶质瘤患者血浆 miR-21 的表达水平及意义 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(15):2879-2881.
- [18] Aguirre-Gamboa R, Trevino V. SurvMicro: assessment of miRNA-based prognostic signatures for cancer clinical outcomes by multivariate survival analysis [J]. *Bioinformatics*. 2014, 30(11):1630-1632.
- [19] Weller M, Van d BM, Tonn JC, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(6):e315-e329.
- [20] Lakomy R, Sana J, Hankeova S, et al. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(12):2186-2190.
- [21] 周旋, 康春生, 浦佩玉, 等. 反义 miR-21 抑制异种移植 U87 人脑胶质瘤生长的体内研究 [J]. *中华神经医学杂志*, 2008, 7(9):881-885.
- [22] 陈波, 陈丹祎, 徐文中. miR-21 海绵吸附载体在脑胶质瘤细胞中的应用 [J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2014, 13(1):9-12.
- [23] Ananta JS, Paulmurugan R, Massoud TF. Tailored nanoparticle co-delivery of anti-miR-21 and anti-miR-10b augments glioblastoma cell kill by temozolomide: Toward a 'personalized' anti-microRNA therapy [J]. *Mol Pharm*, 2016, 13(9):3164-3175.
- [24] Shi L, Chen J, Yang J, et al. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity [J]. *Brain Res*, 2010, 1352(1):255-264.
- [25] Luo F, Ji J, Liu Y, et al. MicroRNA-21, up-regulated by arsenite, directs the epithelial-mesenchymal transition and enhances the invasive potential of transformed human bronchial epithelial cells by targeting PDCD4. [J]. *Toxicol Lett*, 2015, 232(1):301-309.
- [26] Dellaretti M, Reyns N, Touzet G, et al. Diffuse brainstem glioma: prognostic factors [J]. *J Neurosurg*, 2012, 117(5):810-814.
- [27] Johnson DR, Galanis E. Incorporation of prognostic and predictive factors into glioma clinical trials [J]. *Curr Oncol Rep*, 2013, 15(1):56-63.
- [28] Wu L, Li G, Feng D, et al. MicroRNA-21 expression is associated with overall survival in patients with glioma [J]. *Diagn Pathol*, 2013, 8(1):1-5.
- [29] Li C, Sun J, Xiang Q, et al. Prognostic role of microRNA-21 expression in gliomas: a meta-analysis [J]. *J Neurooncol*, 2016, 130(1):1-7.
- [30] Shi R, Wang PY, Li XY, et al. Exosomal levels of miRNA-21 from cerebrospinal fluids associated with poor prognosis and tumor recurrence of glioma patients [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29):26971-26981.
- [31] 王宏勤, 李晋虎, 苗旺, 等. 多发与单发性胶质瘤患者石蜡包埋组织中微小 RNA 差异表达的初步探讨 [J]. *中华神经外科杂志*, 2015, 31(5):519-523.