

## miR-126 调控前列腺癌机制研究\*

李尧 徐丹枫<sup>△</sup> 崔心刚 刘玉杉 任吉忠 姚亚成 高轶

(第二军医大学附属长征医院泌尿外科 上海 200003)

**摘要** miR-126 通过靶向作用于表皮生长因子域 7(EGFL7)、同源框 A9(HOXA9)、胰岛素受体底物 -1(IILS-1)、p85-B 基因等,在转录后水平调控靶基因表达,在肿瘤形成中起重要作用。前列腺癌细胞中高表达 miR-126,能明显下调 VEGF-A、EGLF7、HOXA9、VCAM-1 等与肿瘤生长、转移密切相关的蛋白分子。miR-126 作为抑癌因子,在多种肿瘤中均下调。其抑癌作用及机制在肺癌、白血病、乳腺癌、宫颈癌等中均已得到证实。本课题拟对 miR-126 调控前列腺癌机制做一综述。

**关键词**: miR-126 前列腺癌 靶蛋白

**中图分类号**: R737.25 **文献标识码**: A **文章编号**: 1673-6273(2011)17-3393-04

## miR-126 Regulation Mechanism of Prostate Cancer\*

Li Yao, XU Dan-feng<sup>△</sup>, CUI Xin-gang, LIU Yu-shan, REN Ji-zhong, YAO Ya-cheng, GAO Yi

(Department of Urology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

**ABSTRACT**: miR-126 has effect on the epidermal growth factor domain 7 (EGFL7), homeobox A9 (HOXA9), insulin receptor substrate -1 (IILS-1), p85-B genes by regulation of target levels gene expression. And it plays an important role in tumor formation in the transcriptional. miR-126, as a tumor suppressor factor, reduced in a variety of tumors. The role and mechanism of tumor suppressor in lung cancer, leukemia, breast cancer, cervical cancer have been confirmed. There was highly expression of miR-126 in prostate cancer, and it significantly reduced VEGF-A, EGLF7, HOXA9, VCAM-1, etc. and tumor growth and metastasis of protein molecules. This study will give a review on miR-126 regulation mechanism of prostate cancer.

**Key words**: miR-126; Prostate cancer; Target proteins

**Chinese Library Classification(CLC)**:R737.25 **Document code**:A

**Article ID**:1673-6273(2011)17-3393-04

## 前言

前列腺癌(prostate cancer, PCa)最常见的癌症之一,在美国是导致男性致死的第二大疾病<sup>[1]</sup>。近十年来,前列腺癌在我国的发病率呈明显上升趋势,已经成为发病率增长最快的肿瘤之一。随着诊断技术的不断提高,越来越多的前列腺癌早期得到诊治。然而超过 50%的 80 岁左右美国男性的前列腺组织中有癌细胞的出现,其中大多数无症状表现,并不需治疗<sup>[2]</sup>。但一些前列腺癌细胞分化程度差,表现出较高的增殖能力,且具有很高的转移潜能。雄激素撤除法(Androgen ablation therapy)一直是治疗前列腺癌的主要手段,前列腺癌细胞在雄激素浓度降低后停止生长,为雄激素依赖性前列腺癌。雄激素撤除治疗仍无法彻底治愈,没有经过外科根治手术的前列腺癌都存在潜在复发的风险,最终进展为雄激素非依赖敏感性前列腺癌<sup>[3]</sup>。前列腺癌发生、发展的机制十分复杂,阻碍了前列腺癌的有效治疗。miRNA 是细胞内强有力的调控因子,很多 miRNA 都和癌症相关。一直以来,临床医学和生物学专家都在致力于寻找前列腺癌相关的 miRNA,希望能以此拓展对前列腺癌机制的认识和寻找新的有效治疗手段。本课题组前期的研究通过采用 miRNA 芯片分析了 50 余例确诊为前列腺癌的穿刺标本,在前列腺

肿瘤组织和非肿瘤组织中发现包括 miR-126、miR-21、miR-222、miR-141、miR-191 等十余条 miRNA 差异性表达。其中 miR-126 在恶性程度高的前列腺细胞中表达量下降,而 miR-222 在前列腺癌高分级组织内表达呈明显高水平。通过合成这些 miRNA 成熟体,采用 Interplus 转染雄激素受体(AR)依赖的前列腺癌 LNCaP(AR 依赖的前列腺癌细胞株)细胞株,发现 miR-126 可促进 AR 封闭后 LNCaP 细胞凋亡。miR-126 通过靶向作用于表皮生长因子域 7(EGFL7)、同源框 A9(HOXA9)、胰岛素受体底物 -1(IILS-1)、p85-B 基因等,在转录后水平调控靶基因表达,在肿瘤形成中起重要作用<sup>[4]</sup>。miR-126 是近年来研究热点之一,作为抑癌因子,在多种肿瘤中均下调。其抑癌作用及机制在肺癌、白血病、乳腺癌、宫颈癌等中均已得到证实。现从 miR-126 作用机制、肿瘤研究等方面对其进行阐述,进一步探索存在但尚未发现的调控靶蛋白,为前列腺癌生物学治疗提供有效指导。

1 目前研究情况 miR-126 调控前列腺癌机制研究现状

1.1 miR-126 的作用机制与肿瘤

最初 miRNA 被发现在线虫的发育中起调控作用,在正常

\* 基金项目 国家自然科学基金(30973006)

作者简介 李尧,硕士,主要研究方向 泌尿肿瘤系统肿瘤 E-MAIL 邮箱 diyao1982-426@hotmail.com

<sup>△</sup>通讯作者 徐丹枫,博士 E-MAIL 邮箱 xu-danfeng@hotmail.com

(收稿日期 2011-02-04 接受日期 2011-02-28)

的生物发育和分化中起关键调控作用的基因,往往在病理条件下和肿瘤发生相关,很有可能是癌基因或抑癌基因。miRNA 在个体发育的重要性引导科学家探索 miRNA 在肿瘤领域的作用。研究发现在许多癌组织和癌细胞系中 miRNA 异常表达<sup>[5]</sup>,这些表达失调与恶性肿瘤的发生、发展、诊断、预后相关的 miRNA 被称为 oncomir。miR-126 基因定位于表皮生长因子样结构域 7(epidermal growth factor-like domain 7,EGFL7)基因 7 号内含子内<sup>[6]</sup>(图 1)。Suito Y 等研究表明,成熟的 miR-126 可由 3 个不同的 EGFL7 基因的转录本产生,且每个转录本都有自己的启动子<sup>[7]</sup>。而 miR-126 是作为 EGFL7 基因转录本的一部分而被转录的,而非由本身的启动子启动转录。大部分 miRNA 都广泛表达于各种组织,但对具有组织特异性的 miRNA 进行研究后发现,miR-126 对于心血管系统特异性最高,对于胚胎组织、呼吸系统、生殖系统、造血系统等也有一定特异性<sup>[8]</sup>,同时 miR-126 与上述系统的肿瘤关系密切。miR-126 能够作用于多个与肿瘤细胞增殖、转移有关的靶点,而发挥抑癌作用。Tava-zoic SF 等通过 miRNA 筛选,发现 miR-126 与乳腺癌转移高度相关。首先给小鼠注射人类恶性肿瘤细胞 CN34<sup>[9]</sup>。然后从转移灶中分离肿瘤细胞-CN34-LM1 细胞(来源于鼠肺组织)、CN34-BoM1(来源于鼠骨组织)。两种细胞的 miR-126 表达缺失,这与 CN34 细胞相同。实验表明 miR-126 能显著降低 CN34-LM1、CN34-BoM1 分别向肺组织与骨组织转移。使远处转移的细胞重新表达 miR-126,则可抑制其转移能力。通过比较癌组织高表达与低表达 miR-126 的患者,发现原发灶癌细胞低表达 miR-126 的患者,转移复发的中位时间较短,两组差异有统计学意义,而且 miR-126 的表达与肿瘤远处转移复发呈相反关系。肿瘤细胞高表达 miR-126,能明显下调 VEGF-A、EGFL7、HOXA9、VCAM-1 等与肿瘤生长、转移密切相关的蛋白分子,从而达到抑制肿瘤细胞增殖转移的效果。利用临床标本与细胞、动物实验模型相结合的模式,明确 miR-126 作用于 AR 信号转导通路的靶基因与相关蛋白表达。

### 1.2 miRNA 与前列腺癌的发生、发展的研究进展

microRNA (miRNA) 是近年来研究最活跃的细胞调控因子。和传统的蛋白因子不同,miRNA 是一种 19 到 22 个核苷酸之间的非编码 RNA,能在转录和翻译水平上调控基因表达。其作用机理为:在细胞核内,miRNA 基因经 RNA 聚合酶 II 转录出具有帽子结构和多聚腺苷酸尾巴(AAAAA)的原初 miRNA (pri-miRNA),pri-miRNA 被核酸酶 Droscha 切断,生成 70 个核苷酸的具有茎环结构的 miRNA 前体(pre-miRNA)。转运蛋白 exportin-5 将 pre-miRNA 转运出核。在细胞质中,pre-miRNA 被 Dicer 蛋白切割为成熟的双链的 miRNA。其中与靶 mRNA 互补的链在其他蛋白(RNA 沉默复合物,RNA-induced silencing complex,RISC)的帮助下与 mRNA 结合,并降解或抑制该 mRNA 的翻译。miRNA 是细胞内最大的基因家族之一,约为全基因组的 1%,每个细胞中的 miRNA 分子拷贝数在 50000 左右。Ozen M 等采用基因芯片技术,对手术后 5 年内没有生化复发和 1 年内就生化复发的前列腺癌患者和正常的前列腺对照组的前列腺标本进行 miRNA 的研究发现:在被研究的 480 个 miRNAs 中大约有 85 个 miRNAs 在前列腺组织中被检测到,其中有 76 个 miRNAs 在前列腺癌中是下调的<sup>[10]</sup>。其中包括:

let-7 家族 miR-26a-b,miR-29a-c,miR-30a-e,miR-99a-b,miR-125a-b 和 miR-200a-b 等。同时他们还鉴别了下调的 miRNAs 相关的目的基因,发现这些基因在前列腺癌中是上调的,包括:癌基因蛋白 RAS 和 E2F3 以及抗凋亡蛋白 BCL-2 和 MCL-1。进一步研究发现,早期生化复发的前列腺癌中总体 miRNAs 下调更为显著。目前认为前列腺癌的激素非依赖性转化主要与 AR 信号通路发生下述改变有关<sup>[11-14]</sup>:(1)雄激素受体基因的改变:主要表现为 CAG 核苷酸序列多态性和雄激素受体基因点突变。LNCaP 细胞 AR 的 cDNA 序列分析表明,密码子 868 点突变导致 AR 配基结构域(LBD,T877A)发生改变,导致 AR 与配基的结合表现为非雄激素特异性。AR 突变体 T877A 与肾上腺雄激素脱氢表雄酮(DHEA)的亲合力比野生型 AR 高 7 倍,使癌细胞在雄激素撤除下仍具有选择性生长优势。(2)雄激素受体表达上调:研究证实 22%~30%的激素非依赖性前列腺癌的 AR 基因发生了扩增,癌细胞能更好地适应并利用低浓度雄激素,这可能是传统去势治疗失败的重要原因。(3)影响 AR 信号通路的辅助活化因子表达上调:辅助活化因子包括 CBP/P300 蛋白、P160/SRC (steroid receptor coactivator) 蛋白家族、AR 相关蛋白(AR associated protein,ARA)。它们以配基依赖性方式,通过和 AR 受体 LBD 区域的 AF2 相互作用,提高了 AF2 转录活动。其它分子,如 Caveolin-1、E6-AP、BRCA1、8-Catenin、Cyclin-E、FHL2、Gelsolin、BAG-1L、ANPK 等,主要通过作用于 AR 不同位点发挥其辅助活化作用。多种辅助活化因子在 AR 信号与其它信号通路之间形成串联,使前列腺癌细胞在无雄激素条件下仍然能维持生长。(4)AR 的配体非依赖性激活:如生长因子 IGF、EGF、KGF 等与受体酪氨酸激酶 RTK 结合,激活下游信号通路,细胞因子 IL-6 信号可同时激活 STAT3 和 MAPK 两条信号通路。STAT3 可以作为共激活子直接与 AR 的 NTD 区域结合,发挥转录激活作用,而 MAPK 可能介导了 Her2/Neu 对 AR 的激活作用。Schaeffer EM 等的研究发现,早期前列腺的发育程序与前列腺癌的发展程序很相似,决定于新的雄激素调节因素,包括 miRNA(microRNA)调控下的基因表达、特异转录子表达及其预期靶点等<sup>[15]</sup>,尤为重要的是,在前列腺发育过程中早期雄激素调控的相关基因和及其功能程序同样驱动前列腺癌的发生、进展,提示前列腺癌与胚胎发育重激活过程存在镜像关联<sup>[11,15]</sup>。因此,近几年有关 miRNA 调控作用的研究进展也为前列腺癌基因调控研究提供了新思维和新方法<sup>[16]</sup>。

### 1.3 miR-126 与前列腺癌关系及研究意义

肿瘤相关的 miRNA 在肿瘤发生、发展中具有重要的作用,近年来有多项研究发表在顶级专业杂志上。美《科学》杂志将 miRNA 列为 2008 年全球的科研热点(排名第二)<sup>[17-18]</sup>。因此,miRNA 的基因调控作用引起肿瘤学家的极大关注。miRNA 在肿瘤发生、发展中的作用形式包括两种:一种是在肿瘤细胞中高表达,具有促癌作用,如 miR-17-92;另一种则在肿瘤组织中低表达,具有抑癌作用,如 miR-126、let-7 等。miRNA 调控方前列腺癌方面的研究并不少,然而截止 2011 年 1 月,经 PubMed 检索 miR-126 调控前列腺癌的研究仅有 1 篇。miR-126 也被类似的细胞生化实验确定与前列腺癌细胞增殖密切相关<sup>[19]</sup>。和其它癌基因作用的 miRNA 不同,miR-126 在恶性程度高的前列

腺细胞中表达量下降,因而被怀疑是抑制前列腺癌的 miRNA。miR-126 与 EGFL7 在基因结构上的密切关系,使得有关二者的实验变得复杂。在对 EGFL7 基因敲除小鼠的研究中, Schmidt M 等发现部分胚胎致死、血管发育延迟以及异常的胚胎干细胞聚集<sup>[20]</sup>。相反, Kuhnert F 等在 EGFL7 基因敲除小鼠模型中并未发现类似表现。提示 Schmidt 等观察达到的血管缺陷的表现,可能是由于实验中敲除 EGFL7 基因的同时,其 7 号内含子内编码 miR-126 的基因也被敲除的缘故<sup>[21]</sup>。miR-126 编码基因位于 EGFL7 基因内,EGFL7 蛋白与肿瘤血管生成密切相关<sup>[22]</sup>,加之 miR-126 既能调控 EGFL7 蛋白,又可调控 VEGF-A 信号通路,说明在前列腺癌中以 miR-126 为中心的相关信号通路在肿瘤生长增殖中具有重要作用,而 miR-126 是基因水平与蛋白水平调控机制的关键环节。采用 Interplus 转染雄激素受体 (AR) 依赖的前列腺癌 LNCaP (AR 依赖的前列腺癌细胞株) 细胞株,发现 miR-126 可促进 AR 封闭后 LNCaP 细胞凋亡。

## 2 研究方法

应用生物信息学软件 (miRBase、TargetScan、PicTar、mi-

Randa) 初步筛查 miR-126 的相关靶基因,再用双荧光酶报告基因法进行生化实验确认,确定 miR-126 分子治疗靶点的潜力。

双荧光酶报告基因法确定 miR-126 靶基使用萤火虫荧光素酶 (图 2), 结合氯霉素乙酰转移酶 (CAT),  $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -Gal), 或葡萄糖酸糖苷酶 (GUS) 的双报告基因已被普遍使用。但这些双报告基因组合削弱了荧光素酶操作的优势,比如荧光素酶测试和定量可在几秒钟内进行,但 CAT,  $\beta$ -Gal 和 GUS 测试法,则在定量前需要长时间的保温。另外,这些报告基因受限于它们的灵敏度和线性应答范围,须注意不要超过这些范围,内源性细胞活力也会干扰这类报告基因的使用。许多类型的细胞有内源  $\beta$ -Gal 或 GUS 表达,不利于准确定量报告基因表达,胞内去乙酰酶活力干扰 CAT 活力测试。尽管在高温下预处理细胞裂解液 (1,2), 会降低内源性  $\beta$ -Gal 和 CAT 测试的干扰,但这些处理也会快速失活荧光素酶。因此,在此类双报告基因检测中,必须以不同的步骤分别处理共转染的细胞裂解液。理想的双报告基因方法应该使用户能够以萤火虫荧光素酶所具有的速度、灵敏和线性范围对同一样品中的两个报告基因同时测定。这在传统的报告基因,如 CAT,  $\beta$ -Gal 和 GUS 是不

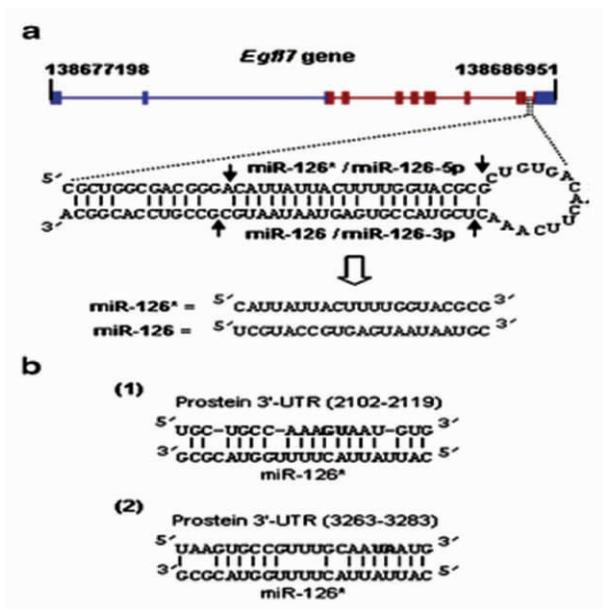


图 1 a *Egfl7* 基因及其主体内含子结构上面显示的编码区(红色)和非编码区(蓝色)。9 号染色体上的人类基因 *Egfl7*(顶部底数)。该前体的 miRNA,在切酶切割位点(箭头)和最后的 miRNA 序列。b 两个假定 3'UTR 的位置 prostein,补充了 miR-126\* 如图所示。这些数字计数后终止密码子,并在这些位置进行大胆的突变。

注释 miR-126\* 指表达水平较低的 miR-126

Fig. 1 a Structure of the *Egfl7* gene and host intron. The line diagram on top shows the coding (red) and the untranslated regions (blue) of the human *Egfl7* gene on chromosome 9 (base numbers on top). The pre-miRNA, the Dicer cutting sites (arrow) and the final miRNA sequences are shown below. b Two putative sites in the 3' UTR of prostein that recruit miR-126\* as shown. The numbers were counted after the termination codon. The bases in bold were mutated in the reporter clones as described in the Results section

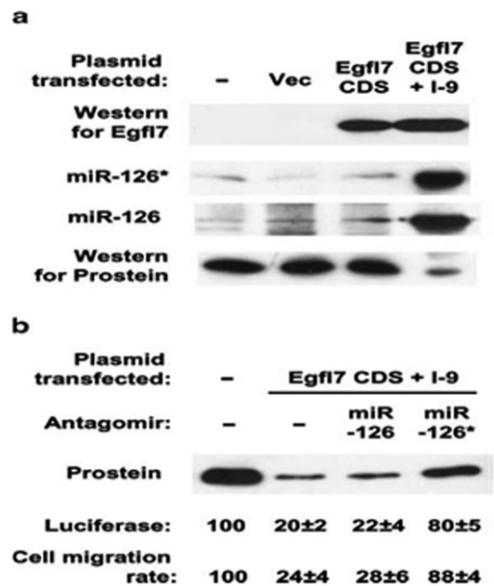


图 2 a miRNA 从 recombinantly 剪接的内含子沉默表达。单层转染前列腺癌细胞 LNCaP (左起到右)没有质粒,仅含有载体 pCAGGS, pCAGGS 包括 *Egfl7* 编码序列(CDS),或 pCAGGS 包括 *Egfl7* 编码内含子序列 -9。表达 *Egfl7* 中 miR-126\* / 126 prostein 测量如前。b 在平行培养中, LNCaP 细胞被加转,指定 antagomirs 共转染与 miR-126\* 标记荧光素酶质粒或被转移。数字表达未转染细胞百分比值

Fig. 2 Translational silencing by miRNA from a recombinantly spliced intron. a LNCaP monolayers were transfected with (from left to right) no plasmid, pCAGGS vector alone, pCAGGS containing *Egfl7* coding sequence (CDS), or pCAGGS containing *Egfl7* coding sequence with intron-9 (I-9). Expressions of *Egfl7*, miR-126\*/126 and prostein were measured as before. b In parallel cultures, LNCaP cells were additionally transfected with the indicated antagomirs and either co-transfected with miR-126\*-reporter luciferase plasmid or subjected to migration assay as described previously. Numbers were expressed as percentage of values from untransfected cells

可能的,由于它们测试化学,处理要求所固有的局限。相反,结合萤火虫 (Photinus pyralis) 和海洋腔肠 (Renilla reniformis) 双荧光素酶, Promega 的双荧光素酶报告基因测试 (DLR) 系统可满足这些要求,在单管中完成这些测试。

对 miR-126 表达与临床标本进行病理关联性分析和预后统计分析:采用 Linear-by-Linear Association 法、Pearson Chi-square 法对 LCMR1 表达情况与相关临床资料之间的关系进行统计;采用 Kaplan-meier 单因素生存分析对临床各项指标与前列腺癌病例组生存期相关性进行分析,数据统计学意义由 log-rank 检验来评价;建立 Cox 比例风险回归模型,综合分析临床各因素与前列腺癌病例组生存期的相关性;数据用 SPSS16.0 统计软件进行分析。P<0.05 认为有统计学意义。

综上所述,前列腺癌作为全世界男性的潜在杀手,本课题拟在前期工作的基础上深入研究 miR-126 抑制前列腺癌细胞增殖的作用和机制,进一步揭示其调控的靶蛋白,为以 miRNA 为靶点的前列腺癌治疗提供新的依据。

#### 参考文献(References)

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2009,59:225-249
- [2] Sakr WA, Ward C, Grignon DJ, et al. Epidemiology and molecular biology of early prostatic neoplasia[J]. Mol Urol, 2000,4: 109-113
- [3] Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2001,1(1):P:34-45
- [4] LIU Yong-chao, FAN Jie. MicroRNA-126 and tumor. Int Oncol [J], 2010,379(12):885-888
- [5] Visone R, Croce CM. MiRNAs and Cancer [J]. Am Pathol, 2009,174: 1131-1138
- [6] Nikolic I, Plate KH, Schmidt MH. EGFL7 meets miRNA-126: an angiogenesis alliance [J]. Angiogenesis Res, 2010,2(1):9
- [7] Suito Y, Friedman JM, Chihara Y, et al. Epigenetic therapy upregulates the tumor suppressor microRNA-126 and its host gene EGFL7 in human colorectal cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379(3): 726-731
- [8] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. Mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing [J]. Cell, 2007, 129(7):1401-1414
- [9] Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis [J]. Nature, 2008, 451(7175):147-152
- [10] Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, et al. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. [J] Oncogene, 2008,27 (12):1788-1793
- [11] Debes JD, Tindall DJ. Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer [J]. N Engl J Med, 2004,351(15):1488-1490
- [12] Cohen MB, Rokhlin OW. Mechanisms of prostate cancer cell survival after inhibition of AR expression [J]. Cell Biochem, 2009, 106(3): 363-371
- [13] Schaeffer EM, Marchionni L, Huang Z, et al. Androgen-induced programs for prostate epithelial growth and invasion arise in embryogenesis and are reactivated in cancer [J]. Oncogene, 2008, 27(57):7180-7191
- [14] Yang K, Handorean AM, Iczkowski KA. MiRNA 373 and 520c Are Downregulated in Prostate Cancer, Suppress CD44 Translation and Enhance Invasion of Prostate Cancer Cells in vitro [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2009,2(4):361-369
- [15] Schaefer A, Jung M, Kristiansen G, et al. MiRNA and cancer: Current state and future perspectives in urologic oncology [J]. Urol Oncol, 2010,28(1):4-13
- [16] John B, Enright AJ, Aravin A, et al. Human miRNA targets [J]. PLoS Biol, 2004,2(11): 363-369
- [17] To-Ha T, Dinis PC, Stefano C, et al. Regulation of the Germinal Center Response by MiRNA-155 [J]. Science, 2007, 316:604-607
- [18] Antony R, Elena V, Simon C, et al. Requirement of bic/miRNA-155 for Normal Immune Function [J]. Science, 2007, 316:608-611
- [19] Musiyenko A, Bitko V, Batik S. Ectopic expression of miR-126, an intronic product of the vascular endothelial EGF-like 7 gene, regulates protein translation and invasiveness of prostate cancer LNCaP cells [J]. Mol Med, 2008,14:313-322
- [20] Schmidt M, Paes K, De Mazitère A, et al. EGFL7 regulates the collective migration of endothelial cells by restricting their spatial distribution [J]. Development, 2007,134(16):2913-2923
- [21] Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, et al. Attribution of vascular phenotypes of the murine Egn7 locus to the microRNA miR-126 [J]. Development, 2008,135(24):3989-3993
- [22] Durrans A, Stuhlmann H. A role for Egfl7 during endothelial organization in the embryoid body model system [J]. Angiogenesis Res, 2010,2:4