microRNA - 7 - 5p 及 Raf - 1 在结直肠癌治疗中的研究价值

耿 婷 南 琼

摘 要 虽然我国医疗卫生水平在不断提高,但结直肠癌患者发生率和病死率仍然居高不下。西妥昔单抗等靶向药物丰富了晚期转移性结直肠癌患者的治疗手段,然而对于 KRAS 突变患者治疗效果不佳。探索新的针对包括 KRAS 突变患者在内的结直肠癌治疗靶点对降低结直肠癌总体病死率意义重大。本文就 miR - 7 - 5p、Raf - 1 研究进展及两者在结直肠癌治疗中的潜在价值做一综述。

关键词 结直肠癌 miR - 7 - 5p Raf - 1 靶向治疗

中图分类号 R574.6;R735.3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.04.006

结直肠癌是全球性的健康问题,约占世界年度诊断所有癌症和癌症相关死亡人数的 10%^[1]。研究显示,预计在 2030 年全球结直肠癌新发病例将超过 220 万例,将有近 110 万结直肠癌患者死亡^[2]。我国结直肠癌的发生率和病死率也居高不下,严重影响人民的健康和和生活质量。除非可以早期诊断并进行手术干预,否则结直肠癌预后很差。但结直肠癌发展过程缓慢,许多患者直到转移后才会出现下消化道出血或腹痛等症状,而且在有症状的患者中,约有 60% ~ 70% 确诊病例是在疾病的晚期被发现的^[3]。失去手术治疗机会的患者只能选择药物治疗,标准化疗方案主要包括氟尿嘧啶类药物,联合奥沙利铂或伊立替康。针对血管内皮生长因子(VEGF)和内皮生长因子受体(EGFR)的单克隆抗体也被批准用于治疗晚期转移性结直肠癌。目前抗 EGFR 单克隆抗体治疗已经成为结直肠癌标准治疗的一部分。

越来越多的研究表明,KRAS 突变的结直肠癌患者对抗 EGFR 单克隆抗体如西妥昔单抗会产生耐药,在治疗过程中 KRAS 的后续突变也会使患者对其反应性下降,影响治疗效果。因此对计划使用西妥昔单抗治疗的结直肠癌患者进行 KRAS 基因突变检测十分有必要^[4]。虽然许多研究都表明 KRAS 基因突变

的结直肠癌患者对抗 EGFR 单克隆抗体的治疗耐药且强调了使用前检测并剔除这类患者的必要性,但是目前对于该人群的治疗尚无较好的方法,开发新的治疗方法对降低结直肠癌病死率有重大意义。本文主要综述了 miR - 7 - 5p、Raf - 1 在疾病中的研究进展及两者在结直肠癌发生、发展、治疗中的作用,为进一步研究两者在治疗包括 KRAS 突变患者在内的结直肠癌患者中的潜在作用提供依据。

一、miR - 7 - 5p 研究进展

microRNAs(miRNAs)是一类全长约为 22 个核苷酸的内源性非编码 RNA,其通过与靶 mRNA 的 3'非编码区(3'untranslated region,3'UTR)中特定位点结合负向调节基因表达,参与各类病理生理过程^[5]。越来越多的研究证实,正常组织与肿瘤组织中 miRNAs 的表达存在显著差异,miRNAs 在肿瘤的发生、发展中起着重要的调控作用。microRNA - 7 - 5p(miR - 7 - 5p)作为 miRNAs 中的一员,在许多疾病中均存在差异表达,例如在黑色素瘤、膀胱癌等疾病中作为肿瘤抑制基因,表达下调,而在小肠神经内分泌肿瘤表达上调^[6-8]。

Giles 等^[6]研究发现,与原发性黑色素瘤细胞比较,转移性黑色素瘤细胞中 miR - 7 - 5p 表达量降低,在体外增强 miR - 7 - 5p 的表达可显著降低肿瘤细胞的存活率、集落形成和诱导细胞周期阻滞。此外,异位表达 miR - 7 - 5p 可减少黑色素瘤细胞在体外的迁移和侵袭,减少体内转移。他们证明了 miR - 7 - 5p 是一种有效的黑色素瘤生长和转移抑制剂,且部分是通过失活 RELA/NF - κ B 信号来实现,miR -

基金项目:云南省教育厅科学研究基金资助项目(研究生类)(2020Y0124);云南省卫生健康委员会医学学科带头人培养计划项目(D-2018023)

作者单位:650032 昆明医科大学第一附属医院消化内科

通讯作者:南琼,主任医师,硕士生导师,电子信箱:nanqiong75@163.com

7-5p 替代疗法可能在黑色素瘤的治疗中发挥重要作用。Dong 等^[9]研究发现, miR-7-5p 在结直肠癌患者组织和 HCT116、SW480、SW620 细胞系中均表达下调,低表达的 miR-7-5p 与结直肠癌临床分期晚、组织学分化差、预后不良均有关系, miR-7-5p 的低表达能够预测结直肠癌患者较差的 5 年总生存率。他们还通过体外实验研究表明, miR-7-5p 过表达可抑制结直肠癌细胞增殖和迁移。

此外,结直肠癌中的癌基因 KLF4 (krüppel-like factor 4) 也被证实是 miR-7-5p 的直接靶点。KLF4 的过表达可挽救 miR-7-5p 对大肠癌细胞增殖和迁移的抑制作用。这些实验结果均提示了 miR-7-5p 是治疗人结直肠癌的潜在分子靶点。另一个研究通过在人结直肠癌细胞系 SW480 中过表达 miR-7-5p 后,发现其可抑制结直肠癌细胞增殖和迁移,而且敲除 lncRNA ZFAS1 减弱其对 miR-7-5p 的海绵作用可以抑制肿瘤的生长、迁移和侵袭,并诱导结直肠癌细胞凋亡, miR-7-5p 抑制剂会增强 SW480 细胞的侵袭和迁移能力,降低结直肠癌细胞凋亡率^[10]。类似的,另外一个研究也表明抑制 miR-7-5p 表达会促进结直肠癌的发展^[11]。以上研究均提示了 miR-7-5p 在结直肠癌发展过程中发挥着重要的抑制作用,是十分有价值的治疗靶点。

笔者课题组在前期研究中也利用 Miseq 高通量测序分析发现与癌旁正常组织比较,结直肠癌组织中 miR-7-5p 低表达,并且通过 qRT-PCR 实验也证实了其下调趋势,细胞实验还表明上调 miR-7-5p 可抑制结肠癌细胞 CaCo-2 的增殖,并促进其凋亡^[12]。因此深入研究 miR-7-5p 抑制结直肠癌发展的作用机制可为治疗结直肠癌提供新的治疗靶点和研究方向。

二、Raf-1 研究进展

Raf-1 是 Ras-Raf-MEK-ERK 信号转导途径中的重要成员,在细胞增殖、分化及凋亡中起着重要作用。Raf-1 位于 Ras 下游,由生长因子激活特异的受体酪氨酸激酶而激活,激活的 Raf-1 可以磷酸化活化的蛋白激酶 MEK1 和 MEK2,从而磷酸化激活丝氨酸/苏氨酸特异的蛋白激酶 ERK1 和 ERK2,这些蛋白激酶在调控细胞分裂、凋亡、分化和迁移相关基因的表达中发挥重要作用^[13]。Raf-1 已经被报道在多种人类癌症中具有致癌作用,在包括前列腺癌、肺癌、甲状腺癌、结直肠癌等多种疾病中被发现与肿瘤

细胞的侵袭、迁移能力相关^[14-17]。

研究证实,FBXL19-AS1 沉默可通过靶向 miR-431-5p/Raf-1 来抑制肺癌的进展和血管生成,提示 FBXL19-AS1/miR-431-5p/Raf-1 轴有可能成为抑制肺癌血管生成、改善预后的新的生物学诊断/治疗靶点^[15]。有研究者发现与对照组中未敲除 Raf-1 的结直肠癌细胞比较,大多数包括 KRAS 突变在内的敲除 Raf-1 的癌细胞具有大空泡和杯状等形态,这表明敲除 Raf-1 的一组肿瘤细胞有更明显的分化。MUC2 和 PAS 染色也证实 Raf-1 敲除的癌细胞呈现出杯状表型。在其余实验中还观察到的 Raf-1 敲除的细胞有更高程度的聚集和附着,且极性恢复。微阵列数据也进一步支持 Raf-1 敲除使肿瘤组织正常化。引人注目的是,Raf-1 敲除后改变的基因还可以完全将健康的结肠组织与肿瘤组织区分开来。这些数据均证实 Raf-1 的敲除可以恢复结直肠癌细胞的极性并使组织结构正常化。抑制 Raf-1 激酶活性可抑制肿瘤生长,恢复结直肠癌细胞的极性。这些结果都表明在结直肠癌细胞中敲除或抑制 Raf-1 可抑制癌细胞的增殖并使癌细胞正常化。这为治疗包括 KRAS 突变患者在内的结直肠癌提供了一条新的思路^[17]。

早期研究表明,Raf-1 在结直肠癌组织中高表达,并且结直肠管状腺瘤癌变过程中的 Raf-1 阳性表达率呈逐渐升高趋势,提示 Raf-1 在腺瘤发生及癌变过程中发挥着一定作用^[18]。而后越来越多的证据表明,Raf-1/MEK/ERK 信号通路的激活可通过调节细胞周期,影响细胞增殖;促进血管内皮生长因子的表达进而促进血管生成;诱导基质金属蛋白酶等蛋白水解酶促进细胞的迁移和侵袭等多种方式参与结直肠癌的发生、发展。Raf-1 激酶抑制蛋白(RKIP)是一种内源性 Raf-1 抑制剂,可抑制肿瘤细胞的转移扩散,在许多人类恶性肿瘤中均能观察到 RKIP 表达降低。在结直肠癌患者中,胞质 RKIP 的丢失与肿瘤进展、远处转移和低生存率有关^[19]。

除此之外,还有研究指出 Raf-1 在促进细胞增殖、侵袭,抑制细胞凋亡等过程中发挥重要作用可通过多条途径,并不仅仅依赖于 MEK-ERK 途径。凋亡信号调节激酶 1(ASK1)是一种应激诱导的促凋亡蛋白,其过表达可通过线粒体依赖的 caspase 激活途径引起许多细胞系的凋亡。研究发现 ASK1 可被未激活的 Raf-1 抑制。即 Raf-1 阻断 ASK1 的功能不需要通过 MEK-ERK 通路^[20]。有趣的是,研究还表

明在结直肠癌中 Raf-1 是维持人结直肠癌细胞克隆形成和致瘤能力所必需的,包括 KRAS 突变的结直肠癌细胞。抑制 Raf-1 能显著提高 MEK 抑制剂在 KRAS 突变肿瘤中的效率,导致永久性的 MEK-ERK 抑制和凋亡。Raf-1 抑制还能以不依赖 MEK-ERK 的方式恢复肿瘤细胞顶面-底侧极性和紧密连接,抑制肿瘤生长^[17]。另一研究结果也显示当沉默 Raf-1 时,具有 KRAS 突变(G13D)的 HCT116 细胞表现出更明显的凋亡^[21]。以上研究均提示,在寻求新的结直肠癌(尤其是 KRAS 突变患者)治疗方法时,抑制 Raf-1 似乎是一个不错的选择。

三、miR-7-5p 与 Raf-1 及结直肠癌

靶基因预测网站 (<http://www.targetscan.org>; <http://mirdb.org>) 显示 Raf-1 是 miR-7-5p 的靶基因之一。且有研究发现与正常脑毛细血管比较,胶质母细胞瘤微血管中 miR-7-5p 明显下调,且与 Raf-1 蛋白水平呈显著负相关。该团队利用人脐静脉内皮细胞行双荧光素酶报告基因实验验证了两者的靶向关系。miR-7-5p 作为肿瘤抑制基因可能通过靶向 Raf-1 癌基因抑制胶质母细胞瘤微血管内皮细胞增殖,在胶质母细胞瘤的发病机制中起重要作用。这对抗肿瘤血管生成药物的开发具有一定的指导意义^[22]。

另一项研究也证实了 Raf-1 是 miR-7-5p 的靶点,并确定 CIRC_0006528 可海绵化 miR-7-5p 促进 Raf-1 的表达并激活 MAPK/ERK 通路来促进乳腺癌细胞的生长、侵袭和迁移。该研究首次提供了 CIRC_0006528/miR-7-5p/Raf-1/MEK/ERK 调控网络参与乳腺癌发生、发展的证据,提示 CIRC_0006528 是乳腺癌潜在的治疗靶点和预后预测指标^[23]。

在 H295R 异种移植实验中,通过纳米粒将 miR-7-5p 和 miR-NC 通过静脉给药发现其可抑制细胞系和患者来源的异种移植瘤中人肾上腺皮质腺癌细胞的生长,这说明抑制 miR-7-5p 实现疾病治疗是可以实现的。同时在 H295R 细胞中过表达 miR-7-5p 可降低细胞中 Raf-1 的表达水平,且在该细胞系内使用双荧光素酶报告基因实验也证实了两者的靶向关系^[24]。然而 miR-7-5p 与 Raf-1 在结肠发生、发展中的关系及机制尚未有相关报道。

四、展 望

近年来多项研究已经表明,miR-7-5p 及 Raf-

1 各自在结直肠癌研究中发挥的重要性,而结直肠癌发生率、病死率依然居高不下,且西妥昔单抗等抗 EGFR 单克隆抗体临床使用后的耐药性缺陷也逐渐显露出来,大量临床试验表明患者的耐药性与 KRAS 突变有关。而 Raf-1 是 RAS 的下游因子,通过抑制 Raf-1 进行结直肠癌的临床治疗可避开 KRAS 突变引起的耐药性,同时 miR-7-5p 也是结直肠癌潜在诊断标志物和治疗靶点。目前已有研究在其他疾病中证明了 miR-7-5p 与 Raf-1 存在靶向关系。因此在未来研究中,阐明两者在结直肠癌中的作用机制,确定结直肠癌细胞中 miR-7-5p 是否可以靶向抑制 Raf-1 表达从而影响疾病进展,进一步探索两者对于结直肠癌的治疗作用对提高包括 KRAS 突变在内的结直肠癌患者 5 年生存率、降低病死率具有重要意义。

参考文献

- 1 Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, *et al.* Colorectal cancer[J]. *Lancet*, 2019, 394(10207): 1467-1480
- 2 Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality[J]. *Gut*, 2017, 66(4): 683-691
- 3 Maida M, Macaluso FS, Ianiro G, *et al.* Screening of colorectal cancer: present and future [J]. *Exp Rev Anticancer Ther*, 2017, 17(12): 1131-1146
- 4 耿婷, 张晓红, 南琼. 外泌体检测 KRAS 突变在结直肠癌中的研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(12): 122-126
- 5 Pu M, Chen J, Tao Z, *et al.* Regulatory network of miRNA on its target: coordination between transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression[J]. *Cell Mol Life Sci; CMLS*, 2019, 76(3): 441-451
- 6 Giles KM, Brown RA, Ganda C, *et al.* microRNA-7-5p inhibits melanoma cell proliferation and metastasis by suppressing RelA/NF- κ B[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 31663-31680
- 7 Li J, Qiu M, An Y, *et al.* miR-7-5p acts as a tumor suppressor in bladder cancer by regulating the hedgehog pathway factor Gli3[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(3): 2101-2107
- 8 Heverhagen AE, Legrand N, Wagner V, *et al.* Overexpression of microRNA mir-7-5p is a potential biomarker in neuroendocrine neoplasms of the small intestine[J]. *Neuroendocrinology*, 2018, 106(4): 312-317
- 9 Dong M, Xie Y. miR-7-5p regulates the proliferation and migration of colorectal cancer cells by negatively regulating the expression of Krüppel-like factor 4[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(3): 3241-3246
- 10 Mo D, Liu W, Li Y, *et al.* Long non-coding RNA zinc finger antisense 1 (ZFAS1) regulates proliferation, migration, invasion, and apoptosis by targeting MiR-7-5p in colorectal cancer[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 5150-5158

(下转第 27 页)

- cancer mortal - ity in the cancer prevention study II [J]. Environ Health Perspect, 2017, 125(8): 087013
- 16 Cong X. Air pollution from industrial waste gas emissions is associated with cancer incidences in Shanghai, China [J]. Environ Sci Pollut Rese, 2018, 25(1): 13067 - 13078
- 17 Soheylzad M, Khazaei S, Jenabi E, *et al.* The Relationship between human devel - opment index and its components with thyroid cancer incidence and mortality: using the decomposition approach [J]. Int Endocrinol Metab, 2018, 16(4): e65078
- 18 Goodarzi E, Moslem A, Feizhadad H, *et al.* Epidemiology, incidence and mortality of thyroid cancer and their relationship with the human development index in the world: an ecology study in 2018 [J]. Adva Human Biol, 2019, 9(2): 162 - 167
- 19 Sprague BL, Andersen SW, Tren - tham - Dietz A. Thyroid cancer incidence and socioeconomic indicators of health care access [J]. Cancer Causes Control, 2008, 19(6): 585 - 593
- 20 Hanley JP, Jackon E, Morrissey LA, *et al.* Geospatial and temporal analysis of thyroid cancer incidence in a rural population [J]. Thyroid, 2015, 25(7): 812 - 822
- 21 Zimmermann MB, Galetti V. Iodine intake as a risk factor for thyroid cancer: a comprehensive review of animal and human studies [J]. Thyroid Resea, 2015, 8(1): 8
- 22 Zhang YL, Li P, Liu ZY, *et al.* Does rela - tively low iodine intake contribute to thyroid cancer? An ecological comparison of epidemiology [J]. Medicine: Baltimore, 2019, 98(41): e17539
- 23 Wu Q, Rayman MP, Lv H, *et al.* Low population selenium status is associated with increased prevalence of thyroid disease [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(11): 4037 - 4047
- 24 Xie L, Mo M, Jia HX, *et al.* Association between dietary nitrate and nitrite intake and site - specific cancer risk: evidence from observational studies [J]. Oncotarget, 2016, 7(35): 56915 - 56932
- 25 Aglago EK, Bray F, Zotor F, *et al.* Tem - poral trends in food group availability and cancer incidence in Africa: an ecological analysis [J]. Public Health Nutrition, 2019, 22(14): 2569 - 2580
- 26 Ahn HS, Kim HJ, Kim KH, *et al.* Thyroid cancer screening in South Korea increases detection of papillary cancers with no impact on other subtypes or thyroid cancer mortality [J]. Thyroid, 2016, 26(11): 1535 - 1540
- 27 Rahman S, Mcleod D, Pandeya N, *et al.* Understanding pathways to the diagnosis of thyroid cancer: are there ways we can reduce overdiagnosis? [J]. Thyroid, 2019, 29(3): 341 - 348

(收稿日期: 2020 - 09 - 26)

(修回日期: 2020 - 09 - 29)

(上接第 23 页)

- 11 Yu S, Wang D, Shao Y, *et al.* SP1 - induced lncRNA TINCR overexpression contributes to colorectal cancer progression by sponging miR - 7 - 5p [J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(5): 1389 - 1403
- 12 张晓红, 南琼, 吴秀方, 等. MicroRNA - 7 - 5p 在人结直肠癌组织中的表达及其对 CaCo2 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 医学研究生学报, 2020, 33(1): 67 - 71
- 13 Li P, Wood K, Mamon H, *et al.* Raf - 1: A kinase currently without a cause but not lacking in effects [J]. Cell, 1991, 64: 479 - 482
- 14 Ren G, Liu X, Mao X, *et al.* Identification of frequent BRAF copy number gain and alterations of RAF genes in Chinese prostate cancer [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2012, 51: 1014 - 1023
- 15 Jiang Q, Cheng L, Ma D, *et al.* FBXL19 - ASI exerts oncogenic function by sponging miR - 431 - 5p to regulate RAF1 expression in lung cancer [J]. Biosci Rep, 2019, 39(1): BSR20181804
- 16 Wang F, Jiang C, Sun Q, *et al.* miR - 195 is a key regulator of Raf1 in thyroid cancer [J]. Onco Targets Ther, 2015, 8: 3021 - 3028
- 17 Borovski T, Vellinga TT, Laoukili J, *et al.* Inhibition of RAF1 kinase activity restores apicobasal polarity and impairs tumour growth in human colorectal cancer [J]. Gut, 2017, 66(6): 1106 - 1115
- 18 吴文新, 段银燕, 吕贵华, 等. 散发性大肠肠腺癌瘤变过程中 JNK1 Raf - 1 和 Livin 的表达及其意义 [J]. 中华肿瘤杂志, 2010, 9: 671 - 675
- 19 Mino P, Zlobec I, Baker K, *et al.* Loss of raf - 1 kinase inhibitor protein expression is associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer [J]. Am J Clin Pathol, 2007, 127(5): 820 - 827
- 20 Chen J, Fujii K, Zhang L, *et al.* Raf - 1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal - regulating kinase 1 through a MEK - ERK independent mechanism [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(14): 7783 - 7788
- 21 Subramanian RR, Yamakawa A. Combination therapy targeting Raf - 1 and MEK causes apoptosis of HCT116 colon cancer cells [J]. Int J Oncol, 2012, 41(5): 1855 - 1862
- 22 Liu Z, Liu Y, Li L, *et al.* MiR - 7 - 5p is frequently downregulated in glioblastoma microvasculature and inhibits vascular endothelial cell proliferation by targeting RAF1 [J]. Tumour Biol, 2014, 35(10): 10177 - 10184
- 23 Gao D, Qi X, Zhang X, *et al.* hsa_circRNA_0006528 as a competing endogenous RNA promotes human breast cancer progression by sponging miR - 7 - 5p and activating the MAPK/ERK signaling pathway [J]. Mol Carcinog, 2019, 58(4): 554 - 564
- 24 Glover AR, Zhao JT, Gill AJ, *et al.* MicroRNA - 7 as a tumor suppressor and novel therapeutic for adrenocortical carcinoma [J]. Oncotarget, 2015, 6(34): 36675 - 36688

(收稿日期: 2020 - 09 - 29)

(修回日期: 2020 - 11 - 27)