

gia, 2006, 49(5): 937-944.

[10] Chien KL, Hsu HC, Su TC, et al. Apolipoprotein B and non-high density lipoprotein cholesterol and the risk of coronary heart disease in Chinese[J]. J Lipid Res, 2007, 48(11): 2499-2505.

[11] Pischon T, Girman CJ, Sacks FM, et al. Non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in the prediction of coronary heart disease in men[J]. Circulation, 2005, 112(22): 3375-3383.

[12] Hsia SH, Pan D, Berookim P, et al. A population-based, cross-sectional comparison of lipid-related indexes for symptoms of atherosclerotic disease[J]. Am J Cardiol, 2006, 98(8): 1047-1052.

[13] McQueen MJ, Hawken S, Wang X, et al. Lipids, lipoproteins, and

• 综 述 •

apolipoproteins as risk markers associated with myocardial infarction in 52 countries (the interheart Study): a case-control study [J]. Lancet, 2008, 372(9634): 224-233.

[14] Kastelein JJ, van der Steeg WA, Holme I, et al. Lipids, apolipoproteins, and their ratios in relation to cardiovascular events with statin treatment[J]. Circulation, 2008, 117(23): 3002-3009.

[15] de Graaf J, Couture P, Sniderman A. A diagnostic algorithm for the atherogenic apolipoprotein B dyslipoproteinemias[J]. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2008, 4(11): 608-618.

(收稿日期: 2010-04-02)

微小 RNA 在结直肠癌中的研究进展

姜昌丽 综述, 王惠莹 审校

(成都军区昆明总医院检验科, 昆明 650032)

关键词: 微 RNAs; 结直肠肿瘤; 研究

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 03. 032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)03-0355-03

结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,随着中国生活条件和饮食习惯的改变, CRC 发病率呈明显上升趋势。因此,对 CRC 发生、发展的机制以及早期诊断标志物的研究是目前 CRC 研究的重点。自研究者在秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)中发现了第 1 个定时调控胚胎后期发育的微小 RNA(microRNA, miRNA)(lin-4)以来,与人类疾病相关 miRNA 的研究相继被报道,使得对基因表达调控有了新的认识。miRNA 是 1 类长度约 22 个核苷酸的非编码单链小分子 RNA,这类小分子 RNA 通过调节基因表达,在细胞增殖、凋亡、生长发育、细胞分化、代谢等过程中发挥重要作用,并且广泛参与肿瘤的发生和发展。

1 miRNA 的产生及其作用机制

在 RNA 聚合酶 II 或 III 的作用下,基因组 DNA 的部分区域被转录成初级 miRNA 分子(primary miRNA, pri-miRNA), pri-miRNA 进一步被核内内切酶 III-Drosha 及其辅助因子 DGCR8 剪切并加工成长度约 70 个核苷酸并具有茎环结构的前体 miRNA(pre-miRNA)。pre-miRNA 被输出蛋白 5 (exportin-5)从细胞核运输至细胞质中,在 Dicer 酶的作用下, pre-miRNA 的茎环结构被剪切成为 miRNA 双链体。然后双链体降解成为单链的成熟 miRNA,结合到 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)发挥生物功能。目前认为 miRNA 主要通过以下 2 方面的机制介导转录后基因调节: mRNA 的降解和翻译抑制。具体选择哪种作用方式取决于 miRNA 和靶 mRNA 互补配对的程度。完全或接近完全互补配对时导致 mRNA 剪切,随后 RNA 降解,这种机制多见于植物中;不完全互补配对时 miRNA 就会通过特异性识别靶 mRNA 的 3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR),并与之结合,从而抑制靶 mRNA 的翻译,这种机制多见于动物中,正是由于这种不完全互补配对模式,1 个 miRNA 可以有多个作用靶点。关于 miRNA 对靶 mRNA 翻译抑制的作用机制现在已成为研究的一大热点,研究者们推测抑制可能发生在翻译的起始和延伸阶段。

2 结直肠癌相关的 miRNA

人类基因组中大约有 1 000 个 miRNA,这些 miRNA 的表达具有时间及空间特异性。miRNA 既可能是致癌基因又可能是抑癌基因,与正常组织相比较在肿瘤组织中表达下调即为抑癌基因,表达上调即为致癌基因。miRNA 在不同谱系来源及不同病理分期的肿瘤中具有特定的表达模式,这为肿瘤基因诊断开拓了 1 条新思路。研究表明,miRNA 表达谱分析不仅可以反映肿瘤的组织来源,而且还能反映肿瘤的分化状态,通过它们的来源和分化背景可以成功划分肿瘤亚型,与常用的 mRNA 表达谱相比较,miRNA 表达谱可能是划分肿瘤亚型更为精确的方法。不但肿瘤组织中存在 miRNA 表达的异常,而且有文献报道肿瘤患者的血清或血浆中也存在 miRNA 表达量的异常。所以,这些 miRNA 在多种疾病特别是在肿瘤中扮演着生物标志物的角色。迄今为止,研究发现有多种 miRNA 与 CRC 的发生、发展以及病理分期具有相关性,部分高表达扮演着原癌基因的角色,促进 CRC 的发展;另一部分低表达扮演着抑癌基因的角色,抑制 CRC 的发展。

2.1 发挥原癌基因功能的 miRNA (1)miR-92、miR-92a 和 miR-20: miR-92、miR-92a 和 miR-20 均是 miR-17-92 家族的成员,miR-17-92 家族是定位于人类染色体 13q31 的多顺反子 miRNA。作为原癌基因 miRNA,miR-17-92 家族具有促进细胞增殖、抑制细胞凋亡,从而诱导肿瘤的生成并加速其恶化的作用。miR-92 在 CRC 患者血清中显著升高,手术后明显下降^[1]。miR-92a 在 CRC、肺癌、肝细胞癌、B 细胞淋巴瘤、甲状腺癌、卵巢癌以及鼻咽癌中均呈高表达。有学者首次报道血浆 miR-92a 的检测是 CRC 诊断的 1 个很好的分子标志,具有 89% 的敏感性和 70% 的特异性。研究者发现 miR-17-92 家族在微卫星稳定(microsatellite stability, MSS)和高频率微卫星不稳定不同病理特征和临床疗效的 CRC 中的表达不同,在 MSS CRC 中明显上调,从而可更准确区分 MSS 和高频率微卫星不稳定 CRC 组织。(2)miR-18a: miR-18a 也是 miR-17-92 家族的成员,在人类染色体上定位于 13q31. 3。关于 miR-18a 究

竟具有癌基因的作用还是具有抑癌基因的作用目前还有争论。Motoyama 等^[2]研究显示,在 CRC 中 miR-18a 显著提高,并且 miR-18a 高表达的患者预后较差,说明 miR-18a 具有癌基因的功能。然而,Tsang 和 Kwok^[3]的研究结果却显示,miR-18a 通过靶向 K-RAS 抑制了肿瘤细胞的生长和转移,因此具有抑癌基因的功能。(3)miR-96、miR-182 和 miR-183:miR-96、miR-182 和 miR-183 位于同 1 个染色体的同一基因座位 7q32.2,在 CRC 组织中均升高。转录因子 CHES 1 是 miR-96、miR-182 和 miR-183 的作用靶点。CHES 1 是叉头状转录因子家族的 1 个成员,这个家族的其他成员 FOXF2、FOXK2、FOXO1A、FOXO3A 和 FOXQ1 也是 miR-182、miR-183 及 miR-96 的假定靶点。(4)miR-135a 和 miR-135b:腺瘤样息肉基因(adenomatous polyposis gene, APC)表达活性的降低是 CRC 癌变的 1 个主要诱发因素,Nagel 等^[4]研究显示,miR-135a 和 miR-135b 通过与 APC 的 3'-UTR 靶向结合抑制了 APC 基因的表达,促进下游的 Wnt 信号通路的活性,从而促进了 CRC 的发生。该研究小组还证实了结直肠癌和 CRC 中 miR-135a/b 的高表达与 APC 的低表达具有相关性。(5)miR-31:miR-31 在人类染色体上位于 9p21.3,在绝大部分 CRC 中表达量增加,尤其是在进展期和转移癌中增加更加明显。有研究显示 miR-31 的表达水平与 CRC 的不同病理分期具有相关性,其在Ⅲ、Ⅳ期 CRC 的表达显著高于Ⅰ、Ⅱ期^[5]。此外,CRC 肿瘤组织中的 miR-31 表达水平明显高于 CRC 细胞系,说明 miR-31 在肿瘤形成及获得浸润性表型的过程中发挥重要的作用。Wnt 信号通路分子 AXIN1 及叉头状转录因子 FOXC2 和 FOXP3 是 miR-31 的靶基因。(6)miR-21:miR-21 在多种肿瘤组织中稳定高表达,具有癌基因的功能。程序性细胞死亡因子 4(programmed cell death 4, PDCD4)作为 CRC 手术切除后的预后指标,是 miR-21 的靶基因,miR-21 可以靶向抑制 PDCD4 的表达。miR-21 基因敲除后,PDCD4 的表达量增加,肿瘤的侵袭能力下降,所以 miR-21 的过表达增加了肿瘤的浸润和转移^[6]。Yamamichi 等^[7]应用原位杂交技术分析了不同病理分期的 CRC 组织切片中 miR-21 的表达水平,结果显示,由癌前病变发展至晚期 CRC 的过程中,miR-21 的表达水平明显提高。

2.2 具有抑癌基因功能的 miRNA (1)miR-143 和 miR-145:miR-143 和 miR-145 在 CRC 中表达量降低。编码这 2 个 miRNA 的基因均定位于人类染色体 5q23,可能来源于同 1 个初始 miRNA。Michael 等^[8]研究了 28 种 miRNA 在 CRC 组织中的变化,结果发现与正常组织相比,CRC 中 miR-143 和 miR-145 表达稳定下降。Akao 等^[9]研究了 22 例 CRC 和正常黏膜中 miR-143 和 miR-145 表达变化,结果显示 20 例患者的表达明显下降,提示其在 CRC 的发生中具有抑制作用。Ng 等^[10]报道 DNA 甲基转移酶 3A 是 miR-143 的靶基因。此外,K-RAS 的 3'-UTR 区域也是 miR-143 的结合位点,抑制细胞系中 miR-143 的表达可以明显促进细胞增殖。抑癌基因 p53 通过促进 miR-145 成熟增加 miR-145 的蛋白水平^[11]。miR-145 除了作用于 c-myc 外,在结肠癌中还靶向作用于人胰岛素受体底物-1 和 I 型胰岛素样生长因子受体并使其下调^[12],从而抑制 CRC 细胞生长。2010 年 Gregersen 等^[13]研究显示在 CRC 中 Src 酪氨酸激酶家族成员 YES 和转录因子 STAT1 也是 miR-145 的靶基因。(2)let-7:let-7 最早在线虫中被发现,它在线虫由幼虫发育为成虫的过程中发挥了重要作用。人类 let-7 所在

的染色体区域恰为经常发生肿瘤相关基因突变的染色体区。let-7 表达异常,会导致细胞去分化。let-7 发生突变的细胞不能进入正常的细胞周期,最终不能在正确的时间进行分化,这也是肿瘤细胞的特性之一。Akao 等^[14]发现 let-7a 在结直肠肿瘤组织中低表达,将 DLD-1 人 CRC 细胞株转染 let-7a-1 pre-miRNA,结果显示癌细胞生长受到明显抑制。原癌基因 Ras 是 miRNA let-7 的直接作用靶点,通过与 Ras 的 3'-UTR 互补结合抑制 Ras 的翻译。最近研究发现了 let-7 的另一靶癌基因 HMGA2,HMGA2 作为 1 种原癌基因在良性和恶性间充质肿瘤等多肿瘤的形成中发挥作用。

3 展 望

综上所述,多种 miRNA 在 CRC 的发生、发展以及诊断和预后中扮演着重要的角色,所以对 CRC 组织及 CRC 患者血清中异常 miRNA 分子的探索在不断深入。由于 CRC 在中国具有高发病率和高死亡率的特点,已成为中国癌症重点防治内容之一。对 CRC 尤其是癌前病变的早期诊断与及时治疗仍然是降低死亡率的 1 个主要措施^[15]。目前,CRC 的筛查方法主要包括粪便潜血试验、结肠镜检查以及粪便 DNA 检查,但是这些方法都不是早期筛查的理想工具。一个理想方法应具备高敏感性和高特异性,能够诊断微小病变以及癌前病变,并且具有易行性和安全性的特点,容易被广大患者接受。肿瘤标志物在癌症的诊疗中发挥了重要作用,寻找具有早期诊断价值的肿瘤标志物一直是癌症研究的热点之一。目前比较公认的 CRC 标记物有癌胚抗原、糖链抗原 19-9、糖类抗原 242、糖链抗原 72-4、糖链抗原-125、甲胎蛋白等,这些标志物的检查对 CRC 的诊断已显示出一定程度的指导意义。然而,miRNA 作为新的肿瘤标志物不但可以为 CRC 的早期诊断提供有利的证据,还为 CRC 的生物治疗提供了广阔的前景。

参考文献

- [1] Ng EK, Chong WW, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening[J]. Gut, 2009, 58(10): 1375-1381.
- [2] Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, et al. Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer[J]. Int J Oncol, 2009, 34(4): 1069-1075.
- [3] Tsang WP, Kwok TT. The miR-18a* microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-Ras[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(6): 953-959.
- [4] Nagel R, le Sage C, Diosdado B, et al. Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(14): 5795-5802.
- [5] Wang CJ, Zhou ZG, Wang L, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer[J]. Dis Markers, 2009, 26(1): 27-34.
- [6] Selcuklu SD, Donoghue MT, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes[J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(Pt 4): 918-925.
- [7] Yamamichi N, Shimomura R, Inada K, et al. Locked nucleic acid in situ hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(12): 4009-4016.

- [8] Michael MZ, Sm OC, van Holst Pellekaan NG, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia[J]. Mol Cancer Res, 2003, 1(12): 882-891.
- [9] Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. MicroRNA-143 and -145 in colon cancer[J]. DNA Cell Biol, 2007, 26(5): 311-320.
- [10] Ng EK, Tsang WP, Ng SS, et al. MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer[J]. Br J Cancer, 2009, 101(4): 699-706.
- [11] Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, et al. Modulation of microRNA processing by p53[J]. Nature, 2009, 460(7254): 529-533.
- [12] La Rocca G, Badin M, Shi B, et al. Mechanism of growth inhibition

by microRNA 145; the role of the IGF-I receptor signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2009, 20(2): 485-491.

- [13] Gregersen LH, Jacobsen AB, Frankel LB, et al. MicroRNA-145 targets YES and STAT1 in colon cancer cells[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8836.
- [14] Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. Let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells[J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(5): 903-906.
- [15] 童登武, 罗涛, 陈笃顺, 等. 58 例老年结直肠癌患者的围手术期处理分析[J]. 重庆医学, 2007, 36(19): 1968-1970.

(收稿日期: 2010-05-05)

• 综 述 •

谷氨酸信号转导与胰岛素慢分泌调节机制研究进展

陈立强 综述, 李 涛, 周克元 审校
(广东医学院, 广东东莞 523808)

关键词: 糖尿病; 谷氨酸; 胰岛素; 体内分泌物

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 03. 033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)03-0357-03

糖尿病发病率高居各类慢性疾病之首, 死亡率继肿瘤和心脑血管疾病之后, 位列第 3。全世界糖尿病患者共有 1.6 亿, 中国就有 5 000 万, 已超过欧洲与美国的糖尿病患者总数。糖尿病的发病是由多因素相互作用形成的, 对糖尿病发病机制的不明确给临床治疗带来很大的困难^[1]。研究胰岛素分泌调节的精确机制有利于进一步了解糖尿病的发生过程。现主要对谷氨酸信号和胰岛素分泌调节的分子机制方面的最新研究进展进行综述。

1 胰岛素分泌的快分泌机制

高等哺乳动物体内响应于不同的血糖浓度变化而分泌胰岛素的机制主要有 2 个: 胰岛素快分泌主要是由 ATP 依赖性钾通道(KATP)产生激发信号的, KATP 关闭抑制了质膜的去极化; 随后, Ca^{2+} 电压门控通道开放, 大量 Ca^{2+} 内流导致胞质 Ca^{2+} 浓度升高, Ca^{2+} 浓度升高激发了胰岛素的分泌, 其作用时间较快(2~5 s), 快分泌使机体对血糖的升高及时并迅速作出反应。

2 胰岛素分泌的慢分泌机制

胰岛素快分泌的 Ca^{2+} 信号的产生不足以维持胰岛素的持续分泌, 故一定有 1 种存在于线粒体但不同于 ATP 的信号分子存在。有研究证明这种信号分子是谷氨酸, 葡萄糖进入胰岛 β 细胞后经过三羧酸循环生成谷氨酸, 谷氨酸激发了胰岛素的慢分泌。谷氨酸信号激发慢分泌作用较 KATP 晚 5~10 min, 但其作用时间较长, 可持续激发胰岛素释放。因此, 慢分泌在维持体内血糖的稳定发挥着更为重要的作用。

2.1 谷氨酸在胰岛素慢分泌中的作用 葡萄糖在胞质通过糖酵解作用生成丙酮酸, 丙酮酸进入线粒体参与三羧酸循环并生成 α -酮戊二酸, 在谷氨酸脱氢酶(glutamic acid dehydrogenase, GDH)的催化下, α -酮戊二酸生成谷氨酸, 谷氨酸为胰岛 β 细胞内信号分子, 通过谷氨酸转运体包裹转运, 谷氨酸信号分子与相应受体结合产生信号激发胰岛素的慢分泌。

谷氨酸通过信号的输出、输入和停止来调节胰岛素分泌^[2]。葡萄糖浓度提高使胰岛 β 细胞线粒体代谢加快, 代谢产

物谷氨酸含量提高, 谷氨酸利用囊泡膜谷氨酸转运体包裹转移并释放, 与谷氨酸受体结合产生激发信号, 引起胰岛素的慢分泌反应。在细胞膜通透性增加大鼠胰岛素瘤 INS-1 细胞中, 在保持胞质 Ca^{2+} 浓度一定的情况下, 谷氨酸可直接激发胰岛素的分泌, 而未经过线粒体的代谢调节; 也有研究表明, 谷氨酸在胞质高 Ca^{2+} 和 ATP 浓度的情况下增加了胰岛素的分泌; 而利用 H^{+} -ATP 酶或囊泡膜谷氨酸转运体(vesicular glutamate transporters, VGLUTs)的抑制剂对谷氨酸转运进行干扰时, 发现胰岛素的分泌被抑制^[3]。

谷氨酸在胰岛 β 细胞中作为信号分子的角色已经被证实, 但它在细胞内如何发挥作用目前还不明确。利用膜片钳技术对小鼠胰腺 β 细胞瘤细胞株 MIN6 进行研究, 发现谷氨酸通过抑制 KATP 引起胰岛素的释放^[4]; β 细胞具有丝/苏氨酸蛋白磷酸酶(protein serine/threonine phosphatases, PPase)活性, 蛋白磷酸酶是具有催化已经磷酸化的蛋白质分子发生去磷酸化反应的一类酶分子, 与蛋白激酶相对应存在, 共同构成了磷酸化和去磷酸化这一重要的蛋白质活性的开关系统, 在 β 细胞中主要是 PPase-1 和 PPase-2A; 利用福斯高林(血小板凝集抑制剂)或佛波酯等药物可直接激活蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C 产生蛋白磷酸化作用引起胰岛素的分泌; 利用 PPase 抑制剂冈田酸可引起 Ca^{2+} 内流和胰岛素分泌; Lehtihel 等^[5]研究表明在糖代谢中生成的谷氨酸信号分子是通过抑制 PPase 的活性, 从而抑制了 PPase 的去磷酸化作用激发胰岛素的分泌, 所以谷氨酸的信号转导在胰岛维持机体血糖平衡中发挥了重要作用^[6]。

2.2 GDH 在胰岛素慢分泌中的作用 谷氨酸是由 GDH 催化生成的, GDH 由 GLUD1 基因编码, 在线粒体中以六聚体形式存在。GDH 在脑组织星形胶质细胞中高表达, 用于清除和代谢神经组织释放的谷氨酸, 肝脏和肾脏的 GDH 在氨代谢和解毒作用中也发挥了重要作用; 在胰岛 β 细胞中, GDH 是引起胰岛素分泌的关键酶, 其作用是催化生成信号分子谷氨酸, 从而激发胰岛素的分泌^[7]。

GDH 在糖酵解、谷氨酸和谷氨酰胺代谢以及氨基酸诱导