

与肿瘤相关的 MicroRNA 研究进展

姚绛 罗玉萍 李思光

(南昌大学生命科学学院,南昌 330031)

摘要: MicroRNAs(miRNAs)是一类进化上保守的单链非编码小分子 RNA,它作为基因表达调控因子在转录后水平调节基因表达。最近研究发现,miRNA 能够控制细胞生长、凋亡及分化,miRNA 的表达与癌症相关,并在肿瘤的形成过程中发挥着重要的作用。因此,miRNA 的研究对于揭示基因表达的调控机理、人类疾病防治及生物进化探索具有重要意义。

关键词: miRNA 肿瘤 基因表达调控

Progresses of the Study on MicroRNA and Cancer

Yao Jiang Luo Yuping Li Siguang

(The College of Life Science Nanchang University Nanchang 330031)

Abstract: microRNAs (miRNAs) have been known as kind of evolutionarily conserved single-strand noncoding small RNA molecules that function as posttranscriptional gene regulators. Recent evidences have shown that miRNA could control cell growth, apoptosis and differentiation and miRNA expression correlates with cancers and have a crucial function in tumor progression. Thus, the research on miRNAs is important for revelation of regulation mechanisms of gene expression, human diseases and biological evolution.

Key words: microRNAs Cancer Gene expression regulation

癌症是对人类威胁最大的疾病之一,影响其形成的因素很多,有些抑制肿瘤形成,有些则促进肿瘤形成。虽然目前已经在人类和其它模式动物基因组中发现了许多与肿瘤形成相关的基因,但癌症形成的机制至今仍未阐明。近年来,一类在转录水平上调控基因表达的非蛋白编码小分子 RNA-microRNA 的发现,给癌症的研究带来了新的启示。研究显示,超过 50% 的 microRNA 基因是位于癌症相关的基因组区域或脆性位点上^[1],这表明 miRNA 在人类癌症的发病机理中发挥着比以往想象中更重要的作用。

1 MicroRNA 的生物合成

MicroRNA (miRNAs) 是一类进化上保守的,长度约 22 个核苷酸的内源性单链非编码 RNA。miRNA 基因是以单个基因或基因簇的形式离散地分布于基因组上,它们中大多数位于基因间隔区,

但也有相当数量的 miRNA 位于转录单元内含子或外显子上。大多数 miRNA 基因在 RNA 聚合酶的作用下被转录成 pri-miRNA,很少一部分则由 RNA 聚合酶 转录。在动物体内,pri-miRNA 转化为成熟的 miRNA 经历了 2 次连续的剪切^[2,3]。在细胞核内,pri-miRNA 经 Drosha 酶(一种 RNase 酶)剪切,形成约 70nt 的茎环结构,即 pre-miRNA。随后,pre-miRNA 由转运蛋白 Exportin5 运输至细胞质中,在 Dicer 酶的作用下剪切为成熟 miRNA。成熟 miRNA 随即结合到 RNA 诱导的沉默复合体中,抑制基因表达。

最近,在无脊椎动物中报道了由一种短小的内含子发夹结构形成的 miRNA 合成途径中的另一种前体-mirtron^[4,5]。这些发夹内含子避开对一般动物 miRNA 的产生所必需的 Drosha 酶剪切,采用剪接

收稿日期:2008-09-01

基金项目:国家自然科学基金(30660042),江西省自然科学基金(0630136)

作者简介:姚绛(1985-),女,硕士,研究方向:微生物分子生物学

通讯作者:李思光,E-mail:siguangli@163.com

和脱支的方式,切割形成前体 miRNA 发夹类似物。在出核时期,脱支的 mirtron 又回到 miRNA 的一般途径,最后形成沉默复合体发挥作用。通过计算机和实验相结合的策略,Eugene 等^[6]证实 mirtrons 不仅仅存在于线虫和果蝇中,也同样存在于哺乳动物中。然而果蝇等无脊椎动物和哺乳动物各自含有许多不同的 mirtrons。通过对这些生物的多个分化特异性特征的研究分析表明,不同动物可能独立演化出了产生这种小分子途径的能力。

2 MicroRNA 功能的研究方法

近来,几乎所有与 miRNA 相关的肿瘤研究都是以癌细胞和正常细胞中不同的 miRNA 表达图谱为依据。因此,用于探测 miRNA 表达的方法同样也能运用于癌症中 miRNA 功能的研究。

2.1 上调或下调 miRNA 的表达

上调或下调候选 miRNA 的表达是研究癌症发病机理中 miRNA 功能的好方法。特定 miRNA 的敲除或过表达可用于研究 miRNA 在癌症发生和发展过程中的作用。反义抑制、转基因、特异性启动子调控、点突变等方法能实现这方面的研究^[7]。利用反义抑制剂阻碍目标 miRNA 的功能就是一个很好的例子。在这一策略中,人造反义 RNA 与细胞中的 mRNA 竞争结合到 miRNA 上,抑制 miRNA 的功能。两个独立的研究小组采用这种方法均实现了序列特异性地抑制 miRNA 和 siRNA 诱导的 RNA 沉默^[8,9],此外 Krutzfeldt 等^[10]利用修饰的反义 RNA 在体内成功地抑制了 4 个 miRNA。

miRNA 或其靶基因的点突变同样能用于癌症中 miRNA 功能的研究,其优势在于它能够用于研究 miRNA 与其靶基因之间的直接相互作用。许多研究发现“种子序列”对于 miRNA 识别靶基因很重要,并且增加种子序列中的错配将会大大地减少 miRNA 的基因调控功能^[11]。因此,可以运用这种策略来设计 miRNA 或其靶基因的点突变,即某一特定候选 miRNA 的种子序列中 1 个或 2 个核苷酸的变化将会极大地减少 miRNA 与其靶基因结合的可能性,进而导致此 miRNA 靶基因的过表达。

2.2 Northern 杂交

Northern 杂交是在 RNA 水平上探测基因表达的一种可靠技术,它广泛地应用于基因表达分析领

域。目前,该技术也被用于探测癌细胞中 miRNA 表达^[12,13]。例如,通过正常细胞与癌细胞中 miRNA 表达的比较,Hayashita 等^[14]发现 *miR-17-92* 基因簇在肺癌患者体内过量表达。

2.3 Real-time PCR

Real-time PCR 用于定量分析 miRNA 表达图谱及研究癌症发病机理中 miRNA 可能存在的一些功能。近年来,有人用 Real-time PCR 测定 miRNA 前体及研究 6 个细胞系中 23 个 miRNA 前体的表达^[15]。最近,Real-time PCR 的应用范围已经扩展到人类癌细胞系中 222 个 miRNA 前体的表达分析。研究表明,人类癌症中 miRNA 前体的表达图谱确实存在差异^[16]。因此,Real-time PCR 技术是研究癌症中 miRNA 表达水平,进而研究其功能的理想方法。

2.4 microRNA 微阵列

miRNA 微阵列(miRNA microarray)是一种能同时探测癌细胞中大量 miRNA 表达的方法。它被广泛地用于研究 miRNA 在癌症发生中的作用,同时已经成为帮助我们更好地理解癌组织与正常组织之间关系的一种综合性的技术。例如一些实验室采用一种双泳道 miRNA 微阵列技术对 124 个哺乳动物 miRNA 的表达水平进行分析,发现 miRNA 的表达模式在成年小鼠的组织 and 胚胎干细胞中是不同的^[17,18]。Lu 等^[19]运用微阵列技术在不同类型的细胞中探测到了丰富的 miRNA 表达图谱。

3 microRNA 与肿瘤发生

最近研究表明,MicroRNA 能够作为肿瘤抑制剂或致癌因子行使功能,因此与癌症相关的 miRNA 也被称为 oncogenic miRNAs (oncomiRs)^[20]。Calin 等^[21]证实 miR-15 和 miR-16 位于染色体 13q14 (B-细胞型慢性淋巴细胞白血病 B-CLL 的缺失位点)上,首次将 microRNAs 与癌症联系起来。Bottoni 等^[22]发现,miR-15a 和 miR-16-1 在垂体瘤中的表达水平比正常垂体组织低。而且,它们的表达与肿瘤直径及精氨酸-tRNA 合成酶表达成负相关,但却与 p43 分泌正相关,从而说明这些 miRNAs 很可能影响肿瘤的生长。此外,Cimmino 等^[23]还证实了 miR-15a 和 miR-16-1 的表达与 Bcl2 在 CLL 中的表达成负相关,miRNA 对 Bcl2 的抑制作用诱导了细胞凋亡。因此,miR-15a 和 miR-16-1 是天然的反义 Bcl2 作用因

子。O'Donnell 等^[24]报道来自 miR-17-92 簇的 miRNA 能够调控肿瘤形成,其通过影响 E2F1 mRNA 的翻译来行使类似抑癌基因的功能。Welch 等^[25]发现,miR-34a 通过抑制其靶 mRNA 翻译 E2F3,降低 E2F3 蛋白水平,对成神经细胞瘤的发生起抑制作用。深入探讨 miRNA 对肿瘤发生的调控机制,对于将来进行肿瘤的临床诊断、分型、治疗及预后判断具有重要意义。

4 microRNA 与肿瘤诊断

Lu 等^[19]根据基于微珠流式细胞术建立的 miRNA 表达图谱,针对人类癌症样本,包括直肠癌、肝癌、胰腺癌以及胃癌,提出了一种关于 microRNA 的系统表达分析,显示了 miRNA 图谱在癌症诊断中的发展潜力。通过微点阵和 RT-PCR 的方法分析垂体瘤和正常垂体样本中的 miRNA 组(miRNAome),Bottoni 等^[26]指出 miRNA 表达能够区分微腺瘤与大腺瘤,处理过的患者样本与未处理样本。许多 miRNAs 参与了细胞增殖和细胞凋亡过程。miRNAs 将很可能成为非常有用的诊断标记,同时还能改进垂体瘤的分类。通过原位 RT-PCR 的应用,Lee 等^[27]在胰腺癌细胞中发现表达异常的 miR-221、miR-301 和 miR-376a,而在基质、正常的腺泡或腺管中却未能找到它们。miRNA 的异常表达为胰腺肿瘤的研究提供了新的线索,同时也可能会给胰腺癌的诊断提供生物标记。目前,尽管 miRNA 有助于临床肿瘤的诊断,但是距离真正应用于临床仍有很大距离,仍需大量临床病例资料的系统研究。

5 microRNA 与肿瘤预后

利用人恶性肿瘤中 oncomiRs 的表达图谱鉴定出了许多癌症诊断和预测相关的信号。Takamizawa 等^[28]报道了人肺癌中 let-7 miRNA 的表达率下降,且减少的 miRNA 表达与更低的术后存活率十分相关。此外,A549 肺腺癌细胞系中 let-7 的过表达抑制了体内肺癌细胞生长。他们的研究表明 let-7 miRNA 的改变具有潜在的临床和生物学作用。Yanaihara 等^[29]证实 miRNA 表达图谱能够将发生癌变的肺组织与正常肺组织区分开来,同时在研究中发现不同于肿瘤组织学中的分子信号。另外,研究还发现 hsa-miR-155 前体 miRNA 高表达和 hsa-let-7a-2 前体 miRNA 低表达与肺腺癌的低存活率相

关,说明 miRNA 表达图谱不仅是诊断标记,同时也是肺癌的预后标记。

6 microRNA 与肿瘤治疗

miRNAs 参与癌症发生和发展过程给新型抗癌药物的开发带来了希望。目前,许多能够直接影响致癌基因产物的新药物、小分子和单克隆抗体已经制得,更多类似的产品将会继续研制^[30]。根据 miRNA 与其靶基因的互补性,一些人造 miRNAs (artificial miRNAs, amiRNAs) 相继制得,它们能够下调致癌基因并抑制癌症的形成^[7]。He 等^[31]发现,在转基因小鼠体内表达 mir-17-92 能够有效抑制 c-myc 诱导的细胞凋亡,从而加快肿瘤形成。由于大多数致癌基因能够引发癌症,因而可以设计一些人造 miRNA 阻碍其表达,从而达到抑制癌症形成的目的。尽管目前在肿瘤治疗方面已取得了一些成绩,但仍面临许多难题。首先,只有鉴定出某种癌症中特定 miRNA 及其在该癌症发生过程中的作用机理,才能将这些 miRNAs 运用到癌症治疗当中。如何将这些特定的 miRNAs 转移到目的组织上并保证其正常行使功能是随之而来的另一难题。

参考文献

- 1 Calin GA, Sevignani C, Dumitru C, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(9): 2999-3004.
- 2 Kim VN. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(5): 376-385.
- 3 Du T, Zamore PD. Cell Res, 2007, 17(8): 661-663.
- 4 Okamura K, Hagen JW, Duan H, et al. Cell, 2007, 130(1): 89-100.
- 5 Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Nature, 2007, 448(7149): 83-86.
- 6 Berezikov E, Chung WJ, Willis J, et al. Mol Cell, 2007, 28(2): 328-336.
- 7 Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. Dev Biol, 2007, 302(1): 1-12.
- 8 Hutvagner G, Simard MJ, Mello CC, et al. PLoS Biol, 2004, 2(4): 465-475.
- 9 Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, et al. RNA, 2004, 10(3): 544-550.
- 10 Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Nature, 2005, 438(7068): 685-689.
- 11 Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, et al. Cell, 2003, 115(7): 787-798.
- 12 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. Cell, 1993, 75(5): 843-854.
- 13 Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Cell, 1993, 75(5): 855-862.
- 14 Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, et al. Cancer Res, 2005, 65(21): 9628-9632.

- 15 Schmittgen TD ,Jiang J ,Liu Q ,et al. *Nucleic Acids Res* ,2004 , 32(4) :e43.
- 16 Jiang J ,Lee EJ ,Gusev Y ,et al. *Nucleic Acids Res* ,2005 ,33(17) : 5394~5403.
- 17 Thomson JM ,Parker J ,Perou CM ,et al. *Nat Methods* ,2004 ,1(1) : 47~53.
- 18 Babak T ,Zhang W ,Morris Q ,et al. *RNA* ,2004 ,10(11) :1813~ 1819.
- 19 Lu J ,Getz G ,Miska EA ,et al. *Nature* ,2005 ,435(7043) :834~838.
- 20 Cho WC. *Mol Cancer* ,2007 ,6 :60.
- 21 Calin GA ,Dumitru CD ,et al. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2002 ,99 (24) :15524~15529.
- 22 Bottoni A ,Piccin D ,Tagliati F ,et al. *J Cell Physiol* ,2005 ,204 (1) :280~285.
- 23 Cimmino A ,Calin GA ,Fabbri M ,et al. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2005 ,102(39) :13944~13949.
- 24 O'Donnell KA ,Wentzel EA ,Zeller KI ,et al. *Nature* ,2005 ,435 (7043) :839~843.
- 25 Welch C ,Chen Y ,Stallings RL. *Oncogene* ,2007 ,26(34) :5017~ 5022.
- 26 Bottoni A ,Zatelli MC ,Ferracin M ,et al. *J Cell Physiol* ,2007 ,210 (2) :370~377.
- 27 Lee EJ ,Gusev Y ,Jiang J ,et al. *Int J Cancer* ,2007 ,120(5) : 1046~1054.
- 28 Takamizawa J ,Konishi H ,Yanagisawa K ,et al. *Cancer Res* ,2004 , 64(11) :3753~3756.
- 29 Yanaihara N ,Caplen N ,Bowman E ,et al. *Cancer Cell* ,2006 ,9 (3) :189~198.
- 30 Carlo M ,Croce MD. *E Engl J Med* ,2008 ,358(5) :502~511.
- 31 He L ,Thomson JM ,Hemann MT ,et al. *Nature* ,2005 ,435(7043) : 828~833.

(上接第19页)

否对植物的生长发育和营养价值产生影响^[19]; (3) 鉴定复杂代谢途径中的元件,如转录因子和结合元件对表达的影响。研究代谢途径中类胡萝卜素的合成、分解和积累之间的相互关系; (4) 对转基因植物营养价值和农艺学上的表型应该有更加规范,严格的标准; (5) 由于类胡萝卜素是在质体中合成的,如何增加靶器官或组织中的质体数量或大小,组织或器官特异性表达启动子的选择也是关键。

随着生物学技术的发展,先进仪器的使用和新 技术、方法的采用,将逐步解决以上的问题,类胡萝卜素的基因工程将进入一个全新的时代。

参考文献

- Cunningham Jr FX ,et al. *Plant Cell* ,1996 ,8(9) :1613~1626.
- 刘石泉,余庆波,等. *贵州林业科学* ,2004 ,32(2) :13~18.
- Ausich RL. *Pure Appl Chem* ,1997 ,69 :2169~2173.
- Ralley L ,et al. *Plant J* ,2004 ,39 :477~486.
- Morris WL ,et al. *Metab Eng* ,2006 ,8 :253~263.
- Jayaraj J ,et al. *Transgenic Res* ,2007.
- Shewmaker CK ,et al. *Plant J* ,1999 ,20 :401~412.
- Ducreux LJ ,et al. *J Exp Bot* ,2005 ,56 :81~89.
- Diretto G ,et al. *PLoS ONE* ,2007 ,2 :e350.
- Morris WL ,et al. *J Exp Bot* ,2006 ,57 :3007~3018.
- Romer S ,et al. *Metab Eng* ,2002 ,4 :263~272.
- Fray RG ,et al. *Plant J* ,1995 ,8 :693~701.
- Shewmaker CK ,et al. *Plant J* ,1999 ,20 :401~412.
- Suzuki S ,et al. *Plant Cell Rep* ,2007 ,26 :951~59.
- Havaux M ,Niyogi KK. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1999 ,96 :8762~ 767.
- Johnson MP ,et al. *J Biol Chem* ,2007 ,282 :22605~2618.
- Dall'Osto L ,et al. *J Biol Chem* ,2007 ,282 :35056~5068.
- Wu S ,et al. *Nat Biotechnol* ,2006 ,24 :1441~447.
- Davidovich-Rikanati R ,et al. *Nat Biotechnol* ,2007 ,25 :899~901.