

MicroRNA 研究进展

史传兵 郑杰*

(东南大学基础医学院, 病理与病理生理学系, 分子病理研究所, 南京 210009)

摘要 近年来, 在许多真核生物中发现了一类能时序调控发育的、长度约为 22 个核苷酸(nt)的非编码小分子 RNA, 称为 microRNA(miRNA)。它由 RNase III 蛋白 Drosha 和 Dicer 共同酶解作用产生, 由 Exportin-5 转运出核, 通过与 small interfering RNA(siRNA)相似的机制, 导致 mRNA 降解。或者与 mRNA 的 3' 端非翻译区结合, 阻遏转录后翻译。miRNA 在发育和某些人类疾病发生中有着重要作用。

关键词 microRNA; siRNA; 发育; 肿瘤

最近几年来, 科学家在线虫(*C.elegans*)中相继发现了能时序性调控发育的基因 *lin-4* 和 *let-7*^[1,2], 将这类基因所编码的能时序调控发育进程、长度约为 22 个核苷酸(nt)的小分子 RNA 称为 small temporal RNA(stRNA)。后来, 科学家又相继在线虫、果蝇、鼠、人等生物中共发现了 300 多种类似的基因^[3], 将其统称为 microRNA(miRNA)。各个器官的 miRNA 还不清楚, 但总数约占所有基因 1%。据估计, 人类大约有 200~250 个左右的 miRNA 基因^[4]。尽管许多问题还未完全阐明, 但对这些 miRNA 的基因序列、加工方式、生理功能等方面的研究表明, 它们具有重要的调控功能, 与生物体的生长发育和某些疾病的发生密切相关。

1 miRNA 的概念

miRNA 是一些长度约为 22 nt 的非编码调控 RNA 家族。它有 3 个显著的特点: (1)广泛存在于真核生物中, 是一组不编码蛋白质的短序列 RNA, 本身并不具有开放阅读框; (2)通常的长度为 20~24 nt, 但在 3' 端可以有 1~2 个碱基的长度变化; (3)成熟的 miRNA 5' 端有一磷酸基团, 3' 端为羟基。另外, 大多数 miRNA 还具有高度保守性、发育时序性和器官组织特异性。为了便于交流, 现在 miRNA 普遍用 miR-# 来表示, miR 代表 miRNA, # 代表序号, 而用斜体的 *mir-#* 表示相应的编码基因。例如 miRNA-155 用 miR-155 来表示, 其编码基因用 *mir-155* 来表示。

2 miRNA 的功能

2.1 miRNA 的加工机制

一般认为 miRNA 的形成需要 Dicer 酶的参与。

Dicer 酶是一种多结构域的 RNase III 蛋白。但近来研究发现, Dicer 酶与另一个 RNase III 蛋白 Drosha 酶共同作用产生了 miRNA。Drosha 酶定位在核内, 而 Dicer 酶则在细胞质起作用。miRNA 基因在核内主要转录产生 pri-miRNA, 它在核内再加工成约 70 nt 的 pre-miRNA。后者被转运出核, 在细胞质中被 Dicer 酶作用, 加工成 22 nt 的 miRNA^[5]。一类小 GTP 酶 Ran(Ras-related nuclear protein)在出核转运中的作用已经被证实^[6]。最新研究发现, pre-miRNA 的转运出核就是 RanGTP 依赖性的, 由转运蛋白 Exportin-5 协助转运的过程。Exportin-5 也可以转运其他小的双链 RNA 出核, 包括短的发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA), small interfering RNA siRNA (siRNA)^[7-9](图 1)。一般认为, siRNA 为双链 RNA, 而 stRNA 为单链 RNA^[10]。

在人体细胞中这些成熟的 miRNA 与 Argonaute 家族蛋白 eiF2C2 结合。Argonaute 家族蛋白为 100 kDa 左右, 如 PAZ 和 PIWI, 作用机制还不十分清楚。人至少有 7 个 Argonaute 家族蛋白, 它们在 RNA 干扰和 stRNA 形成和作用过程中, 以及在发育过程

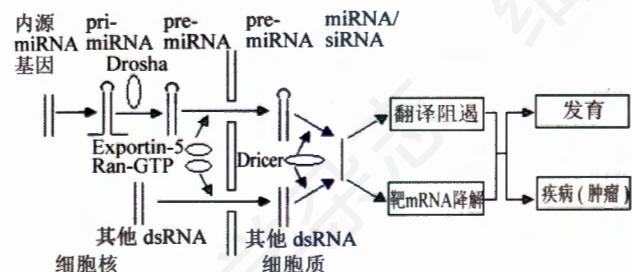


图 1 miRNA 的功能与生物学意义

收稿日期: 2004-03-29 接受日期: 2004-07-21

* 通讯作者。Tel: 025-83272358, E-mail: jiezheng54@hotmail.com

中都有重要的作用。Argonaute 家族蛋白也是 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)的核心成分,人 RISC 中包含 Argonaute 家族蛋白中的 eiF2C1 和 eiF2C2^[3]。

2.2 miRNA 作用方式

miRNA 与靶 mRNA 的作用方式有两种。当两者完全互补时,miRNA 的作用方式与 RNA 干扰相似,即与完全互补的同源 mRNA 配对结合,导致靶 mRNA 降解。而当 miRNA 与靶 mRNA 不完全互补时,miRNA 则通过与靶 mRNA 的 3' 端非翻译区结合,阻遏转录后翻译(图 1)。由于许多动物中 miRNA 与靶 mRNA 并不完全互补,所以主要的作用模式是转录后的翻译阻遏^[11]。

3 miRNA 的生物学意义

3.1 miRNA 与发育

3.1.1 *lin-4* 与 *let-7* 一些 miRNA 的表达与发育有着密切的关系。例如,在线虫发育过程中,早期幼虫表达的是 *lin-14* 和 *lin-28*,在幼虫的第一期末,*lin-4* 呈高表达,抑制了 *lin-14* 和 *lin-28* 的表达,使其继续发育。而在幼虫的第三期和后期,*let-7* 抑制了 *lin-41* 的表达,从而解除了 *lin-41* 对 *lin-29* 的抑制,使细胞向成虫转变(图 2)。LIN-29 是幼虫向成虫转化的一个关键的转录因子,LIN-41 是一个 RNA 结合蛋白。这些 miRNA 特定的表达具有重要的生物学意义,过早或过迟表达都会导致虫体发育异常。如过早表达 *let-7* 会导致虫体早熟,而成虫如缺乏 *let-7* 基因活性则会出现幼虫的特征^[2]。近来研究发现,*hunchback/hbl-1* 在该调控路径中起重要作用^[12-14]。*Hunchback* 编码一个具有锌指结构的转录因子,时序性地调节果蝇的胚胎发育,与中枢神经系统的发育也有一定的关系。在发育异常的线虫突变体中,找到了与 *hunchback* 功能相似的基因 *hbl-1*。研究发现,*let-7* 和 *lin-41* 并不能完全调控 *lin-29* 基因的活性。而缺少了 *lin-41* 和 *hbl-1* 基因的突变体比缺乏其中一个基因的突变体有更多的发育缺陷。*lin-41* 和 *hbl-1* 的 3' 端非翻译区都有与 *let-7* RNA 互补的区域,似乎可以认为 *let-7* miRNA 是通过抑制 *lin-41* 和 *hbl-1* 的表达,进而释放 *lin-29* 进行发育的时序性调控的。对线虫未分化的皮肤细胞的研究发现,*hbl-1* RNA 的翻译阻遏并不是依赖 *let-7* 的,



图 2 *lin-4* 与 *let-7* 及其调控路径^[12]

lin-4 通过抑制 *lin-28* 和 *lin-14* 的表达,使细胞继续发育;*let-7* 通过抑制 *lin-41* 和 *hbl-1* 的表达,解除对 *lin-29* 的抑制,使细胞向成虫转化。“?”表示未知途径对 *hbl-1* 的调控。

提示可能还有其他未知的基因调控 *hbl-1*(图 2)。通过对果蝇和线虫的研究发现,两者对发育的时序性调控有很大的相似性。但 *hunchback* 在果蝇中是否受 miRNA 的调控,以及 *hunchback/hbl-1* 具体的调控通路还有待进一步研究。

3.1.2 *bantam* 与 *mir-14* *bantam* 是位于果蝇 (*Drosophila*)3 号染色体上的一个基因,缺乏 *bantam* 基因的个体比正常果蝇体积小,说明 *bantam* 基因调控果蝇的生长和发育^[15]。*bantam* 基因编码一个 miRNA,称 *bantam* miRNA^[16]。凋亡基因 *hid*(head involution defective)3'端非翻译区有 *bantam* miRNA 的互补结合区,*bantam* miRNA 通过阻遏 *hid* mRNA 的翻译而降低 Hid 蛋白的水平。Hid 蛋白通过抑制凋亡蛋白抑制剂(inhibitor of apoptosis protein, IAP)的表达产生凋亡。故 *bantam* miRNA 在凋亡中起负调控作用^[17]。除了调控凋亡外,*bantam* miRNA 还通过目前未知的途径调控细胞的增殖和分化。在对果蝇的研究中发现,缺乏 *bantam* 活性的个体长出的翅膀比正常个体小,但这些细胞的体积并没有变化,只是细胞个数的减少。由于这当中并无依赖 *hid* 的凋亡证据,可能是 *bantam* 抑制了一个抑制增殖的基因,从而正性调控增殖和发育^[18](图 3A)。

与 *bantam* 相似的另一个调控凋亡的 miRNA 基因 *mir-14* 也被发现^[19]。*Drice* 是一个引起凋亡的信号,miR-14 通过直接或间接抑制 *Drice* 而抑制凋亡。与 *bantam* 不同的是,*mir-14* 不能促进细胞的增殖。但 *mir-14* 与脂肪代谢有关,*mir-14* 失活的果蝇能够产生更多的脂肪,但具体的作用途径还有待进一步研究(图 3B)。

3.2 miRNA 与肿瘤

研究表明,miRNA 与血液系统疾病有很大的关系。在慢性淋巴细胞白血病(CLL)中,常常伴随着 13q14 的丢失,在多发性骨髓瘤、套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma)、前列腺癌中也经常有此区段的缺失,似乎提示此区段有抑癌基因的存在^[20]。最近的研究发现,*mir-15* 和 *mir-16* 就定位在此区段。在慢性淋巴细胞白血病中常常伴随着 *mir-15* 和 *mir-16* 丢失或失活^[21]。但对于 miR-15 和 miR-16 的作用靶序列目前还不清楚,相应的作用机制也还有

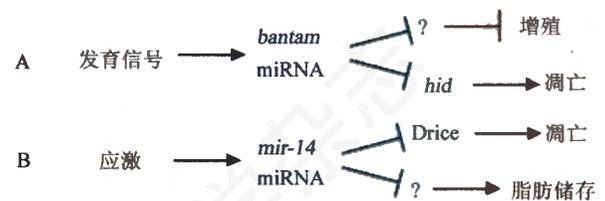


图 3 *bantam* 与 *mir-14* 的作用^[12]

bantam 通过抑制 *hid* 抑制凋亡,通过未知途径促进增殖。*mir-14* 通过抑制 *Drice* 抑制凋亡,通过未知途径抑制脂肪储存。“?”表示未知途径。

待研究。

BIC 基因首先在禽白血病病毒引起的 B 细胞淋巴瘤(avian leukosis virus-induced B cell lymphomas)中被发现^[22]。人 *BIC* 基因编码 miR-155^[23]，最近有学者用 SAGE(serial analysis of gene expression)技术研究发现，霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma, HL)中 *mir-155/BIC* 高度表达(达 91%)，作为对照，其在非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)中几乎不表达^[24]。RS(Reed-Sternberg)细胞是 HL 中特异性瘤细胞，具有诊断意义。*mir-155/BIC* 在 RS 细胞核内转录，呈特异性高表达。但很快又有人发现，*mir-155/BIC* 在 Burkitt 淋巴瘤细胞中也高度表达，但在其他造血系统肿瘤中未发现。这可能与 RS 细胞和 Burkitt 淋巴瘤细胞均为 B 细胞起源有关，提示 *mir-155/BIC* 在 B 细胞分化发育中起着重要作用。对于 miR-155 的研究还不是很清楚，目前认为，*BIC* 基因编码 miR-155 的前体 RNA，后者转运出核，在 Dicer 酶作用下，变成成熟的 miR-155。miR-155 可能与 *MAD1*、*MX11*、*ROX/MNT* 等基因互补，抑制这些基因(一个或多个)的表达。而这些基因的表达可以抑制 *MYC* 基因的活性，故高表达的 *mir-155/BIC* 能增强 *MYC* 基因的活性，促进细胞增殖，可能有癌基因的作用^[23]。在鸡胚的成纤维细胞中，共表达 *MYC* 与 *BIC* 基因能加速细胞生长，部分证实了这种猜想^[25]。

最新研究表明，miRNA(miR-143, miR-145)的表达减少与大肠癌的发生有密切的关系。miR-143 和 miR-145 可能作用于信号转导和基因表达的一些基因(如 *RAF1* 激酶和 G 蛋白 $\gamma 7$ 的编码基因)，诱导其基因沉默。miR-143 也可能诱导肠上皮细胞 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶 α 亚基的基因沉默，与鼠大肠癌可能有一定的关系^[26]。

4 展望

近几年，对 miRNA 的研究取得了很大的进展。特别是对 miRNA 的作用机制和一些基因的研究都取得了很大的突破，如 miRNA 的加工转运机制，*lin-4* 和 *let-7* 的作用机制以及其在发育与疾病中的作用。但目前对 miRNA 的研究尚处于起步阶段，不少基因还未被发现，大多数基因的功能还不清楚，其在发育和疾病中的作用，很多还处于假设推断阶段。因此目前重要的工作就是不断发现新的 miRNA 并弄清其作用机制，这样可使人们对发育和某些人类疾病的认识不断深化。

参考文献 (References)

- [1] Lee RC *et al.* *Cell*, 1993, **75**: 843
- [2] Reinhart BJ *et al.* *Nature*, 2000, **403**: 901
- [3] Nelson P *et al.* *Trends Biochem Sci*, 2003, **28**: 534
- [4] Lim LP *et al.* *Science*, 2003, **299**: 1540
- [5] Lee Y *et al.* *Nature*, 2003, **425**: 415
- [6] Moore MS. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 22857
- [7] Yi R *et al.* *Genes Dev*, 2003, **17**: 3011
- [8] Lund E *et al.* *Science*, 2004, **303**: 95
- [9] Bohnsack MT *et al.* *RNA*, 2004, **10**: 185
- [10] Lagos-Quintana M *et al.* *Science*, 2001, **294**: 853
- [11] Finnegan EJ *et al.* *J Cell Sci*, 2003, **116**: 4689
- [12] Ambros V. *Cell*, 2003, **113**: 673
- [13] Abrahante JE *et al.* *Dev Cell*, 2003, **4**: 625
- [14] Lin SY *et al.* *Dev Cell*, 2003, **4**: 639
- [15] Hipfner DR *et al.* *Genetics*, 2002, **161**: 1527
- [16] Brennecke J *et al.* *Cell*, 2003, **113**: 25
- [17] Bergmann A *et al.* *Trends Biochem Sci*, 2003, **28**: 461
- [18] Moberg KH *et al.* *Trends Cell Biol*, 2003, **13**: 455
- [19] Xu P *et al.* *Curr Biol*, 2003, **13**: 790
- [20] Dong JT *et al.* *Prostate*, 2001, **49**: 166
- [21] Calin GA *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 15524
- [22] Clurman BE *et al.* *Mol Cell Biol*, 1989, **9**: 2657
- [23] Metzler M *et al.* *Genes Chromosomes Cancer*, 2004, **39**: 167
- [24] van den Berg A *et al.* *Genes Chromosomes Cancer*, 2003, **37**: 20
- [25] Tam W *et al.* *J Virol*, 2002, **76**: 4275
- [26] Michael MZ *et al.* *Mol Cancer Res*, 2003, **1**: 882

Progress in MicroRNA

Chuan-Bing Shi, Jie Zheng*

(Institute of Molecular Pathology, Department of Pathology, School of Basic Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China)

Abstract Recently, a class of small non-coding RNAs called microRNAs (miRNAs) has been discovered in many eukaryotes. Some studies show that they are produced by RNase III Drosha and Dicer, and are exported from the nuclear to the cytoplasm by Exportin-5. MiRNAs and small interfering RNA (siRNA) can inhibit target mRNA expression by similar mechanisms. In addition, miRNAs also act as translational repressors through binding the 3' untranslated regions of genes. So far, a large amount of studies reveal that miRNAs might play an important role in development and some human diseases.

Key words microRNA; siRNA; development; cancer

Received: March 29, 2004 Accepted: July 21, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-25-83272358, E-mail: jiezheng54@hotmail.com