

# microRNAs 及其功能的研究进展

王丽丽 章平\*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

**摘要** microRNAs (miRNAs) 是一类高度保守的、非编码的小分子 RNA, 通过与靶基因转录的 mRNA 互补配对在转录后水平调节靶基因的表达。miRNAs 对多种生物学过程起必要调控作用。现对 microRNAs 的合成、作用机制及功能的最新研究进展作一综述。

**关键词** microRNAs; 功能; 生物合成; 作用机制

生物体中含有丰富的 RNA, 它们具有重要的生物学功能。RNA 在基因表达调控中的作用越来越受到人们的重视。

microRNAs (miRNAs) 是一类长度为 21~25 nt 的单链 RNA, 属于非编码蛋白 RNA, 广泛存在于生物界, 从低等生物到人类都有其存在的痕迹, 甚至在古细菌和真细菌中也发现 miRNAs 的组成。其表达具有组织和时期特异性, 其中一些 miRNAs 在进化上有很高的保守性。miRNAs 能在转录后水平调控基因表达<sup>[1]</sup>, 在多种生物活动中起重要作用。

## 1 microRNAs 的生物合成

miRNAs 并不是由其相应基因直接转录形成的。它的成熟来源于两个主要加工事件, 分别由 RNase-III 酶 Drosha 和 Dicer 剪切完成(图 1)<sup>[2]</sup>。在细胞核内编码 miRNAs 的基因通过 RNA 聚合酶 II 的作用转录产生 pri-microRNAs。pri-microRNAs 的大小通常只有几个 kb, 它与编码蛋白质的 mRNAs 的结构相似, 具有 3' 端多聚腺苷酸化和 5' 端帽<sup>[3]</sup>。Drosha 与 Drosha 相关结合蛋白 Pasha(也被称为 DGCR8)组成的复合物剪切 pri-microRNAs, 使之形成具有茎环结构长度约 70 个核苷酸的 miRNA 前体(pre-miRNAs)<sup>[4]</sup>。pre-miRNAs 在 Ran-GTP 依赖的核质/细胞质转运蛋白 Exportin5 的作用下, 从核内运输到胞质中。在 Dicer 酶<sup>[5]</sup>的作用下, miRNA 前体被剪切成 21~25 个核苷酸长度的双链 miRNA。miRNA 两条链的 3' 端均有 2 个游离核苷酸<sup>[6]</sup>。最初, 成熟 miRNA 与其互补序列互相结合成 miRNA: miRNA\* 双螺旋结构(miRNA\* 是 miRNA 的互补序列)。随后, 双螺旋结构解旋, 其中一条成熟的单链以不对称的方式结合到 RNA 诱导的基因沉默复合

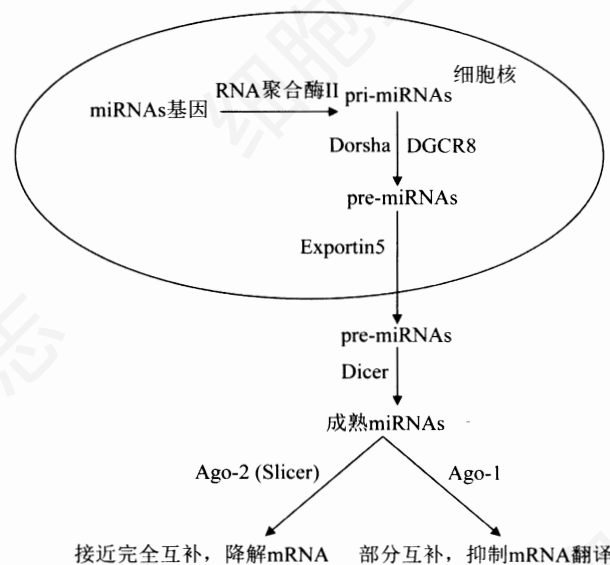


图 1 miRNAs 生物合成及作用机制示意图<sup>[2]</sup>

物(RNA-induced silencing complex, RISC)<sup>[7]</sup>上。该复合物会结合到有互补序列的 mRNAs 上, 通过调整转录本的稳定性或靶 mRNAs 的翻译而调节基因表达。

## 2 miRNAs: 转录后基因沉默的机制

目前认为 miRNAs 通过抑制 mRNA 翻译或降解 mRNA 来调节基因表达。在植物中, miRNAs 沉默基因的主要机制是含有 Slicer 的具有切割功能的 RISC 降解 mRNA<sup>[8]</sup>。当 miRNAs 和靶 mRNA 完全配对结合或几乎完全配对结合后, 与 siRNA 作用机制相似, miRNAs 直接介导 RNA 干扰特异性复合物 RISC 切割靶 mRNA<sup>[9]</sup>; 同时可能引发 Slicer 在 mRNA

收稿日期: 2006-03-03 接受日期: 2006-04-04

\* 通讯作者。Tel: 021-62232747, Fax: 021-62601953, E-mail: pzhang@bio.ecnu.edu.cn

5' 端第 10 个和第 11 个核苷酸之间切割<sup>[10]</sup>。Slicer 的哺乳类同源物是 argonaute 2 (Ago2) 内源核酸酶, 是 siRNA 双螺旋解旋和 siRNA 组成 RISC 所必需的<sup>[11]</sup>。

在动物中, 大多数 miRNAs 通过不具备切割功能的 RISC 抑制翻译而发挥作用<sup>[8]</sup>, 当 miRNA 和靶 mRNA 不完全配对结合时, miRNA 主要影响翻译过程而对 mRNA 的稳定性并无任何影响。大多数 miRNAs 和靶 mRNA 的 3' 非编码区(UTRs)结合, 也有些 miRNAs 可以和开放阅读框(ORF)或 5' UTR 结合<sup>[12]</sup>, 抑制的程度和 miRNAs 结合位点的数目有关。哺乳动物中只有少数 miRNAs 通过类似于 RNA 干涉的方式发挥作用。例如 *homeobox (HOX)* 基因簇是一组相关的转录因子基因, 对动物的发育是至关重要的。哺乳动物有 4 个 *HOX* 基因簇, *HOXA*、*HOXB*、*HOXC* 和 *HOXD*。miR-196 和 *HOX* 基因的 3' UTRs 互补配对。miR-196 指导 *HOXB8* 转录物的切割<sup>[13]</sup>。Liu 等<sup>[14]</sup>的实验发现, Ago2 基因剔除小鼠致死表明, Ago2 是发育所需的, 切割功能完全的 RISC (cleavage-competent) 是哺乳动物必需的。Ago2 基因剔除小鼠致死的表型和切割功能完全 RISC 的进化保守性也提示存在更多的 microRNAs 以 RNA 干涉的方式发挥作用。

### 3 miRNAs 的生物功能

到目前为止, 约有 2 000 多种 miRNAs 已经被鉴定出来, 存在于脊椎动物、果蝇、线虫、植物甚至病毒中<sup>[15]</sup>。由于其序列、结构、丰度与表达方式的多样性, miRNA 与生物体的物质代谢、细胞周期、细胞分化、凋亡、干细胞的多能性、发育等一系列重要生命活动的调节息息相关。

#### 3.1 miRNAs 和信号转导

miRNAs 在信号通路调节等方面起到重要作用。例如 miRNA 可以调节胰岛素分泌信号。Poy 等<sup>[16]</sup>通过 Northern 杂交实验发现 miR-375 是胰岛特异性的, 仅在小鼠胰腺  $\beta$  细胞 MIN6、小鼠胰腺  $\alpha$  细胞 TC1 细胞和小鼠胰岛表达。它能够抑制葡萄糖刺激小鼠胰腺  $\beta$  细胞分泌胰岛素。胰岛素是调节血糖浓度、促进合成代谢、调节细胞分裂分化和生长发育的重要激素, 其释放过程受到严格而精确的调节。调节胰岛素分泌的因子有两大类: 第一类为葡萄糖、氨基酸和脂肪酸等营养物质; 第二类是神经递质和激素。 $\beta$  细胞整合这两大类调节因子的信号作用, 使机体的胰岛素水平能适应机体各种不同状态的需要

使其稳定在一定的水平。营养物质、神经递质和激素调节胰岛  $\beta$  细胞的作用部位有两个: 一是对细胞内的第二信使水平的调节(近端步骤); 二是对胞吐机制本身的调节(末端步骤)。Myotropin (Mtpn, 也被称为 V-1) 在葡萄糖刺激胰岛素分泌的末端调节步骤中起作用。Mtpn 是胞质蛋白, 诱导胰岛素颗粒的胞吐。miR-375 通过抑制 Mtpn 的表达发挥作用。miR-375 过表达抑制葡萄糖诱导小鼠胰腺  $\beta$  细胞分泌胰岛素; 内源 miR-375 不表达则胰岛素的分泌增强。siRNA 干涉 Mtpn 的效应和 miR-375 的效应是相似的, 表明 Mtpn 是 miR-375 的靶 mRNA。miR-375 可能是潜在的糖尿病治疗的药物靶点。

#### 3.2 miRNA 和细胞凋亡、分化

Brennecke 等<sup>[17]</sup>发现, 果蝇 *bantam* 基因与细胞凋亡和生长调控有关。*hid* 是与细胞凋亡有关的基因, 它受表皮生长因子(EGF)信号通路的控制, 通过抑制抑制凋亡蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)的表达而抑制细胞凋亡。*bantam* miRNA 与靶基因 *hid* 的 3' UTR 序列部分互补, 通过抑制 *hid* mRNAs 的翻译抑制细胞凋亡, 促进组织生长<sup>[17]</sup>。*bantam* miRNA 在果蝇翅膀成虫盘的表达揭示 *bantam* miRNA 活性和细胞增生有关。细胞停止有丝分裂后如果表达 *bantam*, 那么细胞重新进入 S 期。这与 *bantam* 促进细胞增生是一致的。

Xu 等<sup>[18]</sup>的实验表明果蝇的 miR-14 也能抑制细胞凋亡, 但与 *bantam* 不同的是 miR-14 不促进细胞增生。miR-14 表达抑制细胞凋亡, miR-14 突变后, 促凋亡蛋白 Reaper 诱导的凋亡增多。大多数缺失 miR-14 的果蝇寿命缩短, 在蛹期就死亡。调节凋亡的大多数基因在果蝇和人类都是保守的, 凋亡异常会引起多种疾病, 因此 miRNAs 和凋亡有关的发现是非常重要的。

miR-143 是脂肪细胞分化的重要调节因子。反义寡聚核苷酸抑制 miR-143 从而抑制了脂肪细胞分化, 脂肪细胞特定基因 GLUT4、HSL、脂肪酸结合蛋白 aP2 和 PPAR- $\gamma$ 2 表达水平降低, 不能积累甘油三酯。miR-143 的下调导致 ERK5/BMK1 的水平增加, 而 ERK5 促进细胞生长和增生, 这和观察到的表型(分化的抑制)是一致的。这些发现确立了 miRNAs 在脂肪细胞分化中的作用<sup>[19]</sup>。

#### 3.3 miRNAs 和干细胞的多能性

小鼠干细胞与已分化细胞 miRNAs 的比较发现, 一些 miRNAs 是干细胞所特有的, 因此推测

miRNAs 可能是维持干细胞全能性所必需的<sup>[20]</sup>。miR-296 在小鼠胚胎干细胞中表达, 在分化的细胞和成体组织中则不表达<sup>[20]</sup>。相反, 另外的一些 miRNAs 在胚胎干细胞和成体组织中都表达, 如 miR-15a、miR-16 和 miR-19b<sup>[20]</sup>。Houbaviv 等<sup>[20]</sup>克隆了人胚胎干细胞特定 miRNAs, 发现有几个新的 miRNAs 基因与小鼠 ES 细胞中克隆得到的是同源的。这些 miRNAs 的特定表达谱表明 miRNAs 在保持哺乳动物干细胞的多能性中起着重要作用。

### 3.4 miRNA 的表达和发育

许多 miRNAs 的表达具有组织特异性或发育阶段特异性, 这提示它们和发育相关。miR-223 主要存在于小鼠骨髓的粒细胞和巨噬细胞中<sup>[21]</sup>。Sempere 等<sup>[22]</sup>用 Northern 杂交发现一些 miRNAs, 如 miR-9, miR-124a, miR-124b 和 miR-135 是脑部特异性表达, 这就表明这些 miRNAs 在哺乳动物神经元发育中起调节作用。Kim 等<sup>[23]</sup>克隆了 86 个 miRNAs, 在大鼠皮质初级神经元表达, 暗示它们可能调节哺乳动物神经元内的翻译。器官特异性 miRNAs 也在肺、脾脏、肝脏、心脏和肾脏中发现<sup>[22,24]</sup>, 表明 miRNAs 可能在组织特异性细胞系确定中起作用。Watanabe 等<sup>[25]</sup>克隆了爪蟾 miRNAs, 发现 miR-427 在囊胚中期后瞬时表达。

miRNAs 的正常表达是植物正常发育生长所必需的。拟南芥 *dcl* (编码植物中 Dicer 酶) 突变体表表现为分裂组织的过度增殖, 花的时序发生延迟等发育异常。在对其他 miRNAs 发挥作用必需的基因如 *ago-1* 进行突变, 同样发现了类似 *dcl* 突变的表征及其他的一些形态变化如叶子的极性改变。植物 miRNAs 的很多靶基因编码转录因子。miR-172 通过抑制转录因子 APETLA2 的表达而影响花的发育, miR-165/miR-166 通过调节转录因子 PHV/PHB 的表达决定其叶子近轴与离轴细胞的分化方向。类似这些受 miRNAs 调控的与细胞分裂、器官分化有关的转录因子还有 CUC1、CUC2 等。这些都表明 miRNAs 作为调控因子参与了植物的发育过程。

### 3.5 miRNAs 和人类疾病的发生

最近的研究发现 miRNAs 与癌症和其他疾病的发生有关。越来越多的证据表明在人类肿瘤中 miRNAs 突变或表达量降低, 暗示 miRNAs 可能是肿瘤抑制因子或癌基因。

正常情况下, *let-7* 在多种组织中表达, 其在肺的表达丰度最高<sup>[26]</sup>。而人类肺癌组织中 *let-7* miRNA

表达水平大多降低<sup>[27]</sup>, *let-7* 不表达的病人生存率显著降低。体外实验研究表明 *let-7* 过表达可抑制 A549 肺癌细胞系的生长。Johnson 等<sup>[28]</sup>发现 *let-7* 负调节 *let-60/RAS*, *let-60/RAS* 的 3' UTR 含有大量的 *let-7* 互补位点 (LCSs), 是 *let-7* 调节 *RAS* 的基础。在肺癌中, *let-7* 表达降低, 而 *RAS* 表达水平显著增高, 可能是 *let-7* 在癌症中起作用的机制。

在结肠癌的癌前期和癌期, miR-143 和 miR-145 成熟 miRNA 水平降低<sup>[29]</sup>。miR-143 和 miR-145 的靶 mRNA 可能包括 RAF1 激酶, G 蛋白  $\gamma 7$ , 这些都是和肿瘤的发生有关。

肿瘤发生过程中基因过表达的普遍机制是染色体扩增, 鉴定扩增区域的癌基因以及描述其特征有助于深入了解癌症的发病机制。荧光原位杂交 (FISH) 和比较基因组杂交 (ISH) 实验表明在造血恶性肿瘤中 13q31-q32 区域扩增是频发的。扩散 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL)、外膜细胞淋巴瘤、滤泡淋巴瘤、原发 B 细胞淋巴瘤、鼻型自然杀伤/T 细胞淋巴瘤中都报道过 13q31-q32 区域的扩增。Ota 等<sup>[30]</sup>鉴定出命名为染色体 13 开放阅读框 (Chromosome 13 open reading frame, *c13orf25*) 的新基因, *c13orf25* 基因很可能是 13q31-q32 扩增区域的癌基因。*c13orf25* 基因有两大转录本, 转录物 A 是 *ba121j7.2*, 编码 32 个氨基酸, 在物种间是保守的; 转录物 B 编码 70 个氨基酸, 它的非编码区有 7 个成熟的 miRNAs (miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18, miR-19a, miR-20, miR-19b-1 和 miR-92-1)。比对人 *c13orf25* 位点和鼠同源基因发现仅 *mir-17-92* 多顺反子区域的序列高度保守。13q31-q32 扩增主要引起 *mir-17-92* 簇成熟的 miRNA 丰度增高。He 等<sup>[31]</sup>通过荧光定量 PCR 证实 *C13orf25* 的 miRNAs 确实在 13q31-q32 区域扩增的淋巴细胞过表达。他们用形成人 B 细胞淋巴瘤的转基因小鼠模型证实 *mir-17-92* 簇可能和肿瘤的进程有关。转基因小鼠携带免疫球蛋白重链增强子 ( $E_{\mu}$ ) 驱动的 *c-myc* 癌基因, 在 4~6 个月形成人 B 细胞淋巴瘤。携带 miRNA 簇的逆转录病毒感染转基因小鼠的造血细胞后, 回植到易生成淋巴瘤的小鼠体内, 和注射不含 miRNA 簇的空逆转录病毒对照小鼠相比, 白血病形成的潜伏期显著缩短, 从 3~6 月缩短到 51 天; 同时肿瘤的发生率增多, 从 30% 增加到 100%。目前机制尚不明确, 并不清楚这一 miRNA 簇的哪个组分在发挥作用。O'Donnell 等<sup>[32]</sup>也发现 miRNAs 和 *myc* 癌基因之间的联系。*myc* 基

因表达增强引起 6 个 miRNAs 表达增强。其中两个是由 *c13orf25* 簇编码, 其他由 7 号染色体上两个相联的基因簇编码。他们证实 *c-Myc* 和 *c13orf25* 上的某个调节位点结合。

遗传性智障的常见形式——脆性 X 综合征由 Fragile X mental retardation protein (FMRP) 不表达引起的。FMRP 和脆性 X 相关蛋白 FXR1P、FXR2P 组成脆性 X 相关基因家族。FMRP、FXR1P 和 FXR2P 的氨基酸的相似性超过 60%, 含有两类 RNA 结合模体: 核糖核蛋白 K 同源结构域(KH domains) 和精氨酸、苄氨酸簇(RGC box)。FMRP 是选择性 RNA 结合蛋白, 和多聚核糖体形成信使核糖核蛋白复合物。在果蝇中, RISC 的组分, argonaute 1 (AGO1) 是神经突触发生和发育中 FMRP 功能正常所必需的<sup>[33]</sup>。体内发现哺乳动物 FMRP 和含有 mi-RNAs、Dicer 和 AGO1 同源物的复合物相互作用。这些结果暗示 miRNAs 可能参与 FMRP 调节神经元内的 mRNA 翻译<sup>[33]</sup>。

#### 4 展望

miRNAs 的发现, 是 RNA 研究领域的重要突破, 为人们提供了一种全新的视角来认识生物基因和基因表达调节的本质。在利用传统方法研究基因时, 注意力不能再仅仅局限在蛋白质上。

对 miRNAs 调控基因的错综复杂的网络的认识才刚刚开始。了解 miRNAs 生物合成的基本机制是阐明基因调控网络的关键。必须进一步详细的了解生物合成过程, 解析已知的参与生物合成的因子, 比如 Dorsha 等的结构, 认识其生物活性的分子基础, 鉴定出参与生物合成通路的新因子。

生物信息学最近的研究显示 miRNAs 调节的基因在整个基因组中所占的比例要远远多于以前所想的。Lewis 等<sup>[34]</sup>提出人类大约 30% 的基因受到 miRNAs 的调节。传统的计算机方法在预测新的 miRNAs 方面虽然已经取得巨大的进展, 然而目前计算机方法和 EST 分析策略的基础都是 miRNAs 的进化保守性。相当一部分 miRNAs 不是保守的和/或物种特异性的。如何去鉴定这些非保守 miRNAs 仍

是个问题。

miRNAs 靶点的研究要远远落后于 miRNAs 的鉴定。大量的 miRNAs 靶点没有被找到, 或预测的靶点没有得到实验的证实。miRNAs 靶点的鉴定将提高人们对 miRNAs 作用机制的认识, 进一步认识 miRNAs 的功能。

随着研究的深入, miRNAs 将在生命起源和早期进化、基因复杂性、疾病原理、疾病诊断等方面产生更为重要的影响, 将人类对自然的认识提高到新的高度。

#### 参考文献(References)

- [1] Bartel DP. *Cell*, 2004, **116**: 281
- [2] Kim VN. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**: 376
- [3] Lee Y et al. *EMBO J*, 2004, **23**: 4051
- [4] Landthaler M et al. *Curr Biol*, 2004, **14**: 2162
- [5] Lund E et al. *Science*, 2004, **303**: 95
- [6] Bernstein E et al. *Nature*, 2001, **409**: 363
- [7] Schwarz DS et al. *Cell*, 2003, **115**: 199
- [8] Tang G. *Trends Biochem Sci*, 2005, **30**: 106
- [9] Rhoades MW et al. *Cell*, 2002, **110**: 513
- [10] Liu CG et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 9740
- [11] Okamura K et al. *Genes Dev*, 2004, **18**: 1655
- [12] Doench JG et al. *Genes Dev*, 2004, **18**: 504
- [13] Yekta S et al. *Science*, 2004, **304**: 594
- [14] Liu J et al. *Science*, 2004, **305**: 1437
- [15] Griffiths-Jones S et al. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**: D140
- [16] Poy MN et al. *Nature*, 2004, **432**: 226
- [17] Brennecke J et al. *Cell*, 2003, **113**: 25
- [18] Xu P et al. *Curr Biol*, 2003, **13**: 790
- [19] Esau C et al. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 52361
- [20] Houbaviy HB et al. *Dev Cell*, 2003, **5**: 351
- [21] Chen CZ et al. *Science*, 2004, **303**: 83
- [22] Sempere LF et al. *Genome Biol*, 2004, **5**: R13
- [23] Kim J et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 360
- [24] Lagos-Quintana M et al. *Curr Biol*, 2002, **12**: 735
- [25] Watanabe T et al. *FEBS Lett*, 2005, **579**: 318
- [26] Pasquinelli AE et al. *Nature*, 2000, **408**: 86
- [27] Takamizawa J et al. *Cancer Res*, 2004, **64**: 3753
- [28] Johnson SM et al. *Cell*, 2005, **120**: 635
- [29] Michael MZ et al. *Mol Cancer Res*, 2003, **1**: 882
- [30] Ota A et al. *Cancer Res*, 2004, **64**: 3087
- [31] He L et al. *Nature*, 2005, **435**: 828
- [32] O'Donnell KA et al. *Nature*, 2005, **435**: 839
- [33] Jin P et al. *Nat Neurosci*, 2004, **7**: 113
- [34] Lewis BP et al. *Cell*, 2005, **120**: 15

## Progress in microRNAs and Their Function

Li-Li Wang, Ping Zhang\*

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

**Abstract** microRNAs (miRNAs) are highly conserved, non-coding RNAs that powerfully regulate gene expression at the post-transcriptional level. These fascinating molecules play essential roles in many biological processes. This review tries to have a brief introduction on the progresses on miRNAs study, such as the biosynthesis, processing and the function.

**Key words** microRNAs; function; biosynthesis; mechanism

Received: March 3, 2006 Accepted: April 4, 2006

\*Corresponding author. Tel: 86-21-62232747, Fax: 86-21-62601953, E-mail: pzhang@bio.ecnu.edu.cn

### 中华医学会生殖医学分会和中国动物学会生殖生物学分会 2007(联合)年会征文通知

由中华医学会生殖医学分会和中国动物学会生殖生物学分会联合主办的 2007(联合)年会, 定于 2007 年 4 月在浙江省杭州市召开。此次会议由浙江大学主办, 复旦大学、南京医科大学、上海交通大学协办。现将会议征文通知如下: (1) 征文内容包括生殖生物学基础研究; 男性生殖医学的基础和临床研究; 女性生殖医学的基础和临床研究; 男、女性生殖内分泌学; 生殖医学的伦理和心理; 生殖医学的法规和政策管理等。(2) 征文要求: 论文全文(限 4 000 字以内)及 800 字以内论文摘要, 论文题目要求中英文。具体可登陆会议网站([www.csrmeeting.org](http://www.csrmeeting.org))注册后通过“网上征文”项录入。(3) 截止日期: 2006 年 12 月 31 日。(4) 参加会议者可授予国家继续教育 I 类学分。(5) 会务秘书处联系方式: 地址: 浙江省杭州市学士路 2 号浙江大学医学院附属妇产科医院, 邮政编码: 310006。联系人: 张艳玲。电话: 0571-87061501-1812。传真: 0571-87061878。E-mail: ylzn@zju.edu.cn。