

肿瘤相关微小 RNA 基因表达的表现遗传调控机制

郭俊明* 肖丙秀 钟久昌

(宁波大学医学院, 宁波 315211)

摘要 表现遗传是指非基因序列改变且可以遗传的基因表达水平变化。微小 RNA 为长度大约 22 个核苷酸的、在转录后水平下调基因表达的小分子 RNA。最近研究表明, 微小 RNA 与肿瘤发生有关, 其表达谱可用于人类肿瘤的分类。尽管有大量事实证明了微小 RNA 在肿瘤发生中的重要性, 但人们对其基因表达调控的机制了解很少。基于对表现遗传、微小 RNA 和肿瘤三者关系的认识, 本文主要从 DNA 甲基化和组蛋白修饰等方面重点介绍了肿瘤相关微小 RNA 基因表达的表现遗传调控机制的最新进展。

关键词 表现遗传; 微小 RNA; 肿瘤; 基因表达调控

表现遗传(epigenetics)是指非基因序列改变且可以遗传的基因表达水平变化^[1]。表现遗传主要包括 DNA 甲基化和组蛋白修饰, 这两种调控模式单独或相互作用可导致 DNA 印记丢失(loss of imprinting)、染色质重塑、基因的异常活化或抑制等。对肿瘤研究的不断深入使人们认识到人类肿瘤是由表现遗传异常或/和基因改变引起并促进其演变的^[2]。肿瘤的表现遗传研究对于肿瘤的诊断、治疗和预防都具有重要的指导意义。

微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一类长度大约为 22 个核苷酸的不编码蛋白质的单链小分子 RNA。它们通过诱导目标 mRNA 的降解或干扰蛋白质的翻译过程下调特异性基因的表达, 在控制细胞的生长、分化和凋亡等方面起着非常重要的作用。微小 RNA 在肿瘤发生、发展过程中起着非常关键的作用, 已成为肿瘤细胞与分子生物学研究领域中最受关注的生物分子之一^[3]。微小 RNA 表达谱还可用于人类肿瘤的分类。Lu 等^[4]通过比较不同类型肿瘤组织和正常组织标本中 217 种微小 RNA 表达谱的不同, 结果发现微小 RNA 表达谱可有效地应用于肿瘤组织的聚类分析, 区分出不同来源的肿瘤组织。miR-141 是一种具有上皮组织细胞特异性的微小 RNA, 在上皮性肿瘤细胞中该微小 RNA 的表达水平明显高于非上皮性肿瘤细胞^[5,6]。实验发现, 定量检测外周血 miR-141 有利于辅助诊断前列腺癌等上皮性肿瘤患者^[6]。由于 miR-181a 的表达水平在急性髓细胞性白血病各亚型中有明显的差异, 所以 miR-181a 被认为是区分这类白血病相关亚型(M₁/M₂ 或 M₄/M₅)的良好分子标志^[7]。

目前已在人类基因组中发现了近 700 种微小 RNA, 但大多数微小 RNA 基因的表达调控机制仍然不太清楚。由于表现遗传控制着许多编码蛋白质基因的表达, 而大多数微小 RNA 基因和全部蛋白质基因的转录由 RNA 聚合酶 II 催化, 所以表现遗传调控被认为在微小 RNA 基因表达调控中起着最基本的作用^[8]。与编码蛋白质基因的表现遗传调控相似, 调控微小 RNA 基因表达的主要方式也是 DNA 甲基化和组蛋白修饰。肿瘤相关微小 RNA 基因表达的表现遗传调控的主要机制是: DNA 过度甲基化下调肿瘤抑制性微小 RNA 基因的表达、DNA 低甲基化上调致癌性微小 RNA 基因的表达, 或者通过组蛋白修饰影响微小 RNA 基因的表达等引起肿瘤的发生^[9-11]。有关微小 RNA 基因表达与表现遗传调控的关系已成为肿瘤研究的一个新方向。

1 通过 DNA 甲基化修饰调控微小 RNA 基因的表达

甲基化修饰是目前关于微小 RNA 基因表达调控的表现遗传研究中最常见的。国际著名的表现遗传学专家、德国癌症研究中心表现遗传学研究室主任 Frank Lyko 领导的研究小组于 2007 年 5 月提出了肿瘤相关微小 RNA 基因甲基化程度与该类微小 RNA 表

收稿日期: 2009-05-11 接受日期: 2010-01-06

浙江省自然科学基金(No.Y207244、No.Y207240)、浙江省科技计划(No.2008C33020、No.2008F70052)和宁波市自然科学基金(No.2009A610134、No.201001A6010002)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0574-87600758, Fax: 0574-87608638, E-mail: junmingguo@yahoo.com

达程度的关系^[12]:有些微小RNA基因的低甲基化可引起微小RNA基因表达的增加;相反,另一些微小RNA基因的高甲基化可引起该微小RNA基因表达的减少。这两种情况单独或同时存在均可能是导致肿瘤发生的起始原因^[12]。下面以研究DNA甲基化的三种主要方法为线索介绍受甲基化修饰的微小RNA。

1.1 用甲基化抑制剂筛选出第一种受甲基化修饰的微小RNA

尽管第一种微小RNA(lin-4)是1993年发现的,但关于微小RNA基因的表现遗传调控的报道还是近三年的事情。2006年6月,Saito等^[13]最先观察到表现遗传改变能影响微小RNA基因的表达。他们发现,用甲基化抑制剂5-杂氮脱氧胞嘧啶核苷(5-aza-2-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)和组蛋白脱乙酰抑制剂4-苯基丁酸(4-phenylbutyric acid, PBA)同时处理人T24膀胱癌细胞和LD419正常纤维细胞后,一些微小RNA基因的表达在癌细胞中被上调而在正常细胞中的表达则无明显变化,其中变化最明显的是定位于CpG岛中的miR-127^[13]。

随后,Iorio等^[14]使用5-Aza-CdR发现了三种受甲基化修饰的微小RNA。他们发现用5-Aza-CdR处理卵巢癌细胞株OVCAR3后,miR-21、miR-203和miR-205等3种微小RNA的表达量显著增加,说明这3种微小RNA基因的表达受到DNA甲基化修饰的调控^[14]。这些实验结果表明,使用甲基化抑制剂确实是一种筛选受甲基化调控的微小RNA的有效方法。

1.2 用基因敲除方法筛选受甲基化修饰的微小RNA

基因敲除是一种使特定基因失活或缺失的分子生物学技术,已成功地应用于特定基因的细胞生物学活性研究。最近,基因敲除技术也被运用于研究微小RNA的功能。Lujambio等^[15]使用微阵列技术比较微小RNA表达谱在含有DNA甲基化转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)基因的野生型结肠癌HCT-116细胞与DNMT1和DNMT3B基因双敲除(double knockout, DKO)的结肠癌细胞间的差异。结果发现:在HCT-116细胞中,5.63%(18/320)微小RNA基因的表达水平高出DKO的3倍;其中最有意义的发现是,观察到miR-124a通过CpG岛过度甲基化而引起转录失活^[15]。

1.3 用联合亚硫酸氢钠限制性内切酶分析法(COBRA)筛选受甲基化修饰的微小RNA

联合亚硫酸氢钠限制性内切酶分析法(combined bisulfite restriction analysis, COBRA)是一种定量测定

DNA甲基化的敏感方法,由Xiong和Laird于1997年首次报道^[16]。其基本原理是^[16]:先对样本DNA行亚硫酸氢钠处理;然后用PCR技术扩增目的片段;最后用识别序列中包含CG序列的限制性内切酶消化扩增产物,如BstUI(CGCG)。由于DNA扩增产物经亚硫酸氢钠处理后使非甲基化的胞嘧啶残基(C)成为胸腺嘧啶(T),而已被甲基化修饰的胞嘧啶残基(5mC)仍维持胞嘧啶(C)状态,所以,若其识别序列中的C发生完全甲基化(5mCG5mCG),则PCR产物保留为CGCG, BstUI能够识别并进行切割;若待测序列中,C未发生甲基化,则PCR产物转变为TGTG,此时BstUI不能切割此PCR扩增产物。这种酶切产物再经电泳分离、探针杂交、扫描定量后即可得出原样本中甲基化的比例。

目前COBRA已成功筛选出14种受甲基化修饰的微小RNA。上面提到的德国表现遗传学专家Frank Lyko课题组用该方法从宫颈癌HeLa细胞和结肠癌HCT-116细胞中共鉴定出9种受甲基化修饰的微小RNA^[12]。Lehmann等^[17]用该方法从乳腺癌组织中筛选出5种受甲基化修饰的微小RNA(miR-9-1、miR-124a3、miR-148a、miR-152和miR-663)。

1.4 通过研究甲基化修饰解释微小RNA与癌基因和抑癌基因的关系

在关于微小RNA功能的研究中,人们关注其与癌基因和抑癌基因的关系。同样,在研究甲基化修饰时,作为微小RNA靶基因的癌基因或抑癌基因的表达情况也引起了人们的重视。

let-7是第二种被发现的微小RNA,它的发现比第一种微小RNA的发现晚了近7年,是由Reinhart等^[18]于2000年在秀丽线虫中发现。正是由于let-7的发现,掀起了人们寻找微小RNA的热潮。随后在短短的几年内,人们在多种生物中发现了大批微小RNA,并注意到它们与肿瘤发生、发展的密切关系。因let-7的靶基因之一是与多种肿瘤有关的ras癌基因而备受肿瘤研究工作者关注^[19]。该微小RNA家族的DNA甲基化修饰情况也受到了人们的重视,并在多种类型的癌细胞中发现了let-7基因家族的表达受到甲基化修饰调控。如:上文述及的用COBRA方法在宫颈癌细胞和结肠癌细胞中筛选到的受甲基化修饰的9种微小RNA就包括let-7a-3^[12]。Brueckner等^[20]用甲基化抑制剂处理和基因敲除方法均在肺腺癌细胞中鉴定出let-7a-3基因位点为低甲基化区域;而脱甲基化研究显示,let-7家族在肺癌发生过程中具有癌基因的特性。另外,人们在分析上皮性卵巢癌组织

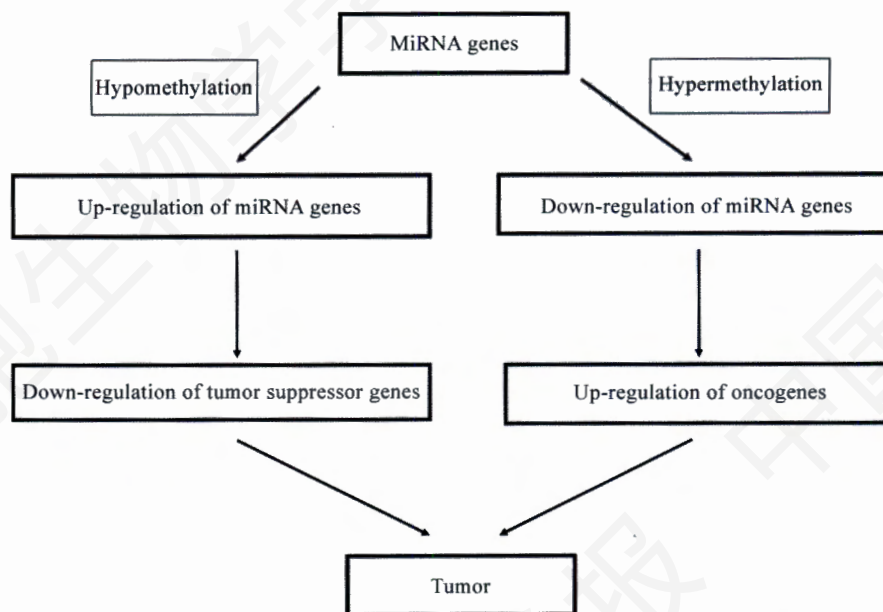


Fig.1 The relationship between methylation of miRNA genes and tumorigenesis [12]

中 *let-7a-3* 基因甲基化状态和 *let-7a-3* 表达水平时也发现, *let-7a-3* 基因甲基化后可降低卵巢癌患者的死亡率^[21]。

除 *let-7* 基因家族的靶基因为癌基因外, 还有多种微小 RNA 的靶基因也是癌基因。Meng 等^[22]在胆管癌细胞中发现白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 可促进 DNMT1 的表达, 而 5-Aza-CdR 则可降低其表达。这些变化引起多种微小 RNA 基因表达的改变, 其中最明显的改变为引起了 miR-370 基因的表达下调。miR-370 的靶基因之一为具有致癌活性的有丝分裂活性蛋白激酶 8 基因 (mitogen activated protein kinase kinase 8, MAP3K8)。实验证明, MAP3K8 参与了诱导肿瘤的发生过程^[22]。

与 *let-7* 和 miR-370 相似, miR-127^[13] 和 miR-124a^[15] 的靶基因也是癌基因。这些微小 RNA 在肿瘤细胞中受甲基化沉默后分别导致它们的靶基因——B 细胞/淋巴瘤 6 基因 (B-cell/lymphoma 6, BCL6)^[13] 和细胞周期蛋白 D 激酶 6 基因 (cyclin D kinase 6, CDK6)^[15] 等的表达增强, 而这些靶基因均具有癌基因的特性, 它们表达程度的增加可促进肿瘤的发生。

上述实验通过研究微小 RNA 与其靶基因 (癌基因) 的关系, 解释了一条肿瘤发生的信号转导途径: DNA 高度甲基化 → 微小 RNA 基因表达下调 → 癌基因表达上调 → 诱导肿瘤发生 (图 1, 右边)。

与上述信号途径相反, Toyota 等^[23] 的研究则通过研究 miR-34b/c 与其靶基因 (抑癌基因) 的关系, 解释

了另一条肿瘤发生的信号转导途径: DNA 低度甲基化 → 微小 RNA 基因表达上调 → 抑癌基因表达下调 → 诱导肿瘤发生 (图 1, 左边)。他们采用的方法仍然是上面提到的使用甲基化抑制剂和基因敲除方法。他们通过 5-Aza-CdR 诱导或单敲除结直肠癌 HCT-116 细胞株中 DNMT1 和 DNMT3B 基因后发现, miR-34b 和 miR-34c 受表观遗传调控, 这 2 种微小 RNA 的过表达导致了著名的抑癌基因 *p53* 的沉默^[23]。

2 通过组蛋白修饰及其他表观遗传方式调控微小 RNA 基因的表达

2.1 组蛋白修饰调控微小 RNA 基因的表达

组蛋白是核小体的重要组成成分。组蛋白修饰 (包括乙酰化、甲基化、磷酸化、腺苷酸化和泛素化等) 是除 DNA 甲基化以外的另一种表观遗传学调控基因表达的重要方式。

由于乙酰化是组蛋白修饰中最重要的方式之一, 所以研究组蛋白修饰主要是研究组蛋白的乙酰化和脱乙酰化状态对基因表达的影响。组蛋白脱乙酰化酶抑制剂通过抑制该酶的活性, 诱导靶细胞中组蛋白的乙酰化, 而乙酰化修饰可以改变组蛋白与 DNA 链间的结合状态, 使染色质结构变得疏松, 有利于转录因子与 DNA 链的结合, 启动某些特异性基因的表达。根据此原理, Scott 等^[24] 通过用组蛋白脱乙酰化酶抑制剂 LAQ824 处理 SKBr3.72 乳腺癌细胞来研究微小 RNA 基因表达的变化, 结果发现, 约 40% 的微小 RNA 的

Table 1 Tumor-related microRNAs controlled by epigenetic mechanisms

Tumor types	MicroRNAs	References
Colorectal cancer	miR-9-3, miR-24-1, miR-126, miR-187, miR-200c, miR-296, miR-299, miR-323, let-7a-3	[12]
	miR-124a	[15]
	miR-34b, miR-34/c	[23]
Cervical cancer	miR-9-3, miR-24-1, miR-126, miR-187, miR-200c, miR-296, miR-299, miR-323, let-7a-3	[12]
Bladder cancer	miR-127	[13]
Ovarian cancer	miR-21, miR-203, miR-205	[14]
	let-7a-3	[21]
Lung cancer	let-7a-3	[20]
Breast cancer	miR-9-1, miR-124a3, miR-148a, miR-152, miR-663	[17]
	miR-27	[24]
Cholangiocarcinoma	miR-370	[22]

表达水平发生了显著变化,包括 22 种微小 RNA 的表达下调和 5 种微小 RNA 的表达上调。说明组蛋白修饰对微小 RNA 的表达也具有重要的调节作用。

2.2 染色质异常影响微小 RNA 基因的表达

通过染色质构型改变调控微小 RNA 基因的表达是新发现的另一种微小 RNA 基因表达的表观遗传调控方式。Calin 等^[25]使用微阵列比较基因组杂交技术对 227 例卵巢癌、乳腺癌和黑色素瘤组织中的微小 RNA 进行了检测。结果发现,在这三类癌细胞中有异常表达的微小 RNA 在其染色质区域内均出现高频率基因组变异^[25]。这些结果说明,通过染色质构型改变引起的基因组变异可造成微小 RNA 表达的异常,而后的异常将有可能引起肿瘤的发生。

3 小结

综合分析上述微小 RNA 的基因序列,我们可以发现一个共同特点:在 miR-127^[13]、miR-205^[14]、miR-124a^[15]、let-7a-3^[12, 20, 21]、miR-370^[22]和 miR-34b/c^[23]等基因中均含有 CpG 岛。事实上,从微小 RNA 数据库(<http://mircorrna.sanger.ac.uk/>)中的微小 RNA 基因序列中可以发现,大约 46.98% 的微小 RNA 基因序列的上游或下游 2 000 bp 处含有 CpG 岛^[26]。从现有的资料中也可知,微小 RNA 基因的异常甲基化或组蛋白修饰比较普遍地存在于多种类型的实体肿瘤细胞和血液系统恶性肿瘤细胞中(表 1)。因此,深入开展微小 RNA 基因的表观遗传调控机制研究,揭示这些调控机制与临床病理因素的关系,对于肿瘤的预防、诊断和治疗将有积极意义。

参考文献(References)

1 Lopez J, Percharde M, Coley HM, Webb A, Crook T. The

context and potential of epigenetics in oncology. *Br J Cancer* 2009; 100(4): 571-7.

2 Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell* 2009; 136(4): 586-91.

3 Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* 2008; 27(45): 5959-74.

4 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435(7043): 834-8.

5 Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 2008; 36 (Database issue): D154-8.

6 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(30): 10513-8.

7 Debernardi S, Skoulakis S, Molloy G, Chaplin T, Dixon-McIver A, Young BD. MicroRNA miR-181a correlates with morphological sub-class of acute myeloid leukaemia and the expression of its target genes in global genome-wide analysis. *Leukemia* 2007; 21(5): 912-6.

8 Guil S, Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(1): 87-95.

9 Garzia L, Andolfo I, Cusanelli E, Marino N, Petrosino G, De Martino D, et al. MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma. *PLoS One* 2009; 4(3): e4998.

10 Noonan EJ, Place RF, Pookot D, Basak S, Whitson JM, Hirata H, et al. miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer. *Oncogene* 2009; 28(14): 1714-24.

11 Lee KH, Lotterman C, Karikari C, Omura N, Feldmann G, Habbe N, et al. Epigenetic silencing of microRNA miR-107 regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer. *Pancreatol* 2009; 9(3): 293-301.

12 Weber B, Stresemann C, Brueckner B, Lyko F. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle* 2007; 6(9): 1001-5.

- 13 Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, *et al.* Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 2006; 9(6): 435-43.
- 14 Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, *et al.* microRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007; 67(18): 8699-707.
- 15 Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, *et al.* Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67(4): 1424-9.
- 16 Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(12): 2532-4.
- 17 Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Müller M, Römermann D, Länger F, *et al.* Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol* 2008; 214(1): 17-24.
- 18 Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403(6772): 901-6.
- 19 Kumar MS, Erkland SJ, Pester RE, Chen CY, Ebert MS, Sharp PA, *et al.* Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(10): 3903-8.
- 20 Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, Mund C, Musch T, Meister M, *et al.* The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res* 2007; 67(4): 1419-23.
- 21 Lu L, Katsaros D, de la Longrais IA, Sochirca O, Yu H. Hypermethylation of let-7a-3 in epithelial ovarian cancer is associated with low insulin-like growth factor-II expression and favorable prognosis. *Cancer Res* 2007; 67(21): 10117-22.
- 22 Meng F, Wehbe-Janek H, Henson R, Smith H, Patel T. Epigenetic regulation of microRNA-370 by interleukin-6 in malignant human cholangiocytes. *Oncogene* 2008; 27(3): 378-6.
- 23 Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, *et al.* Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; 68(11): 4123-32.
- 24 Scott GK, Mattie MD, Berger CE, Benz SC, Benz CC. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res* 2006; 66(3): 1277-81.
- 25 Calin G A, Croce C M. microRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene* 2006; 25(46): 6202-10.
- 26 Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(Database issue): D140-4.

Control of Tumor-related-microRNA Gene Expression by Epigenetic Mechanisms

Jun-Ming Guo*, Bing-Xiu Xiao, Jiu-Chang Zhong

(Ningbo University School of Medicine, Ningbo 315211, China)

Abstract Epigenetics is defined as the heritable changes in gene expression without any alteration in DNA sequence. MicroRNAs (miRNAs) are small RNA molecules of approximately 22 nucleotides in length. They negatively regulate gene expression in posttranscriptional level. Recently, miRNAs have been definitively linked to cancer development. And their expression profiles can be used to classify human cancers. Despite the growing evidences for miRNAs' importance in carcinogenesis, little is known about the expression-regulation mechanisms of their genes. Based on the considering the relationships among epigenetics, miRNAs and tumors, this review introduces the progresses of the epigenetic control of gene expression of miRNA, mainly including DNA methylation and histone modification.

Key words epigenetics; microRNAs; tumor; control of gene expression

Received: May 11, 2009 Accepted: January 6, 2010

This work was supported by the Zhejiang Natural Sciences Foundation (No.Y207240, No.Y207244), Zhejiang Provincial Research Project (No.2008C33020, No.2008F70052), and Ningbo Natural Sciences Foundation (No.2009A610134, No.201001A6010002)

*Corresponding author. Tel: 86-574-87600758, Fax: 86-574-87608638, E-mail: junmingguo@yahoo.com