

文章编号: 1004-0374(2010)03-0229-03

MicroRNAs 与疾病和发育

Victor Ambros
(美国麻省大学医学院)

摘要: 作为模式生物实验系统, 线虫可用于研究控制动物发育和人类疾病遗传机制。研究发育缺陷的线虫突变体有助于在动物中发现对发育和生理过程有重要调控作用的基因。其中一些基因编码一类小RNA, 如microRNA (miRNA), 通过作用于特定基因信使RNA来调控其蛋白质表达。一些在线虫发育过程中有功能的miRNA在人体中也存在。它们参与调控与疾病相关的生物学过程, 如癌症、糖尿病和神经退行性疾病。通过分析miRNA在临床样品、哺乳动物细胞和模式生物线虫中的表达, 从而揭示miRNA调控途径在相关人类疾病中的功能。

关键词: miRNA; Drosha (核蛋白); 发育; 种子; 疾病; 线虫

中图分类号: Q52; R730.231.3 **文献标识码:** A

MicroRNA regulatory pathways in development and disease

Victor Ambros
(University of Massachusetts Medical School, USA)

Abstract: We employ the nematode worm *C. elegans* as a model experimental system for studying the genetic mechanisms underlying the control of animal development and human disease. The study of worm mutants with developmental defects has led to the identification of genes that encode regulators of developmental and physiological processes important to all animals. Some of these regulatory genes encode a class of small RNAs, known as microRNAs that regulate the production of protein from the messenger RNAs of specific target genes. MicroRNAs are evolutionarily ancient, and some of the same microRNAs that function in *C. elegans* development are also present in humans, where they appear to regulate processes related to diseases such as cancer, diabetes, and neural degenerative diseases. Our work includes exploring the functions of microRNA regulatory pathways in these human diseases, through the analysis of microRNA expression in clinical samples, and the application of mammalian cell and *C. elegans* genetic models.

Key words: microRNA; Drosha; development; seed; disease; *C. elegans*

1 MicroRNA 简介

MicroRNA (miRNA) 基因通常是由 RNA 聚合酶 II 转录, 最初产物为大的具有帽子结构(7MGpppG)和多聚腺苷酸尾巴(AAAAA)的 pri-miRNA。在 RNase III Drosha 和其辅助因子 Pasha 的作用下, pri-miRNA 被加工成 70 个核苷酸组成的 pre-miRNA 前体产物。RAN 蛋白和 exportin 等将 pre-miRNA 输送到细胞质, 茎环结构被 RNase III Dicer 剪切产生约为 22 个核苷酸长度的双链, 随后成熟的单链 miRNA 和 Argonaute 蛋白形成 miRNP 复合体。成熟的 miRNA

结合到与其互补的 mRNA 的位点通过两种依赖于序列互补性的机制负调控基因表达。与靶 mRNA 不完全互补的 miRNA 在蛋白质翻译水平上抑制其表达, miRNA 结合在 mRNA 的 3' 端非翻译区也有可能影响 mRNA 的稳定性。迄今为止, 在无脊椎动物和脊椎动物中发现的 miRNA 基因分别大约有 150 种和 700 种。

MiRNA 基因广泛存在植物和动物细胞中, 有些 miRNA 基因在进化过程中保留了同源性极高的被称为“seed”的序列。目前从线虫到人已发现 33 个新 pan-bilaterian 家族成员, 其中 mir-125、lin-4

和 let-7 高度保守, 并含有 7 个核苷酸“seed”序列。通过“seed”可以用计算生物学方法在基因组中找出受 miRNA 调控的多个潜在靶基因, 但这些潜在的靶基因存在大量的假阳性。目前很多实验室采用实验生物学 miRNP 复合物 pull-down 技术从细胞内找到受 miRNA 调控的靶基因。MiRNA 的调控机制具有多样性, miRNP 与其相互作用的蛋白辅因子一起对 mRNA 翻译进行调控, 该过程是可逆的, 然而对 mRNA 稳定性调节的可逆性较差。

在进化中序列高度保守的 microRNA 基因是否意味着保守的生物学功能? 从线虫到果蝇再到人类, 序列上高度保守的 dme-miR-1 在不同的物种中只存在很少一部分相同的作用靶点, 表明功能的保守性不高。既然如此, microRNA 在模式生物中的功能研究对人类有何意义? 一些 microRNA 作用靶点在进化过程中是很保守的, 如 let-7 家族的 mir-48、mir-241 和 mir-84 抑制对发育有重要调控作用的转录因子 hbl-1 的功能, 而 hbl-1 既有正调控功能又有负调控功能; 同时 let-7 家族成员对癌基因 *Ras* 也有调控作用。Let-7 可以通过抑制 lin-41 调控细胞周期和分化。在果蝇中, let-7 通过转录因子 Abrupt 调控幼虫和成虫的神经发生。Let-7 在人类对肿瘤发生有调控作用, 可以通过调控 HMG A 2 来影响细胞增殖。以上研究表明, 进化上 let-7 虽然在序列上有很高的保守性, 但在功能上却存在多样性。

2 MicroRNA 与疾病

不少 miRNA 分子已被证实与癌症的发生有关。Let-7 在人体作为肿瘤抑制子, 通过 3' 非编码区存在的 7 个相互作用位点可有效抑制原癌基因 HMG A 2, 如果缺失这些结合位点, let-7 就不能抑制 HMG A 2 的表达。Let-7 也可以通过与 KRAS 的 3' 非编码区的相互作用位点结合抑制 Ras 基因的表达, 通过生物信息学方法找到特异相互作用的位点, 并对这些位点作点突变, 也可有效解除 let-7 对 KRAS 的抑制功能。MiR-15 和 miR-16 负调控抗凋亡基因 BCL2, 它们的缺失会促使 BCL2 表达升高, 从而抑制细胞凋亡, 促进白血病和淋巴瘤的发生。因此, 增强具有抑癌功能的 microRNA 活性, 成为一种潜在的癌症治疗方法。在散布的 B 细胞淋巴瘤、滤泡型淋巴瘤、套细胞淋巴瘤等肿瘤中常存在 13q31 位点的扩增。而在这一扩增区域的惟一的基因就是一个非编码蛋白的 RNA, 这个转录本编码了 miR-17-92 基因簇, 其中包含了 7 个 miRNAs: miR-17-5p、miR-

17-3p、miR-18a、miR-19a、miR-20a、miR-19b-1 和 miR-92-1。在 65% 的 B 细胞淋巴瘤细胞样品中, mir-17-92 的前体分子表达增加, 这个基因簇的过表达可能与肿瘤形成有关。miR-21 在胶质母细胞瘤中表达增加, 在肿瘤组织中表达量比正常组织高 5~100 倍, 具有癌基因的功能。miR-21 不是一个大脑特异性基因, 在乳腺癌中表达也增加, 可能在肿瘤发生中起到广泛的作用。因此, 抑制有致癌功能的 microRNA 活性是一种潜在的治疗方式。

最新的研究表明, 在与 X 染色体相关的精神分裂症患者中发现了一些极为罕见的 microRNA 基因突变, 将 microRNA 与精神疾病联系起来。在慢性淋巴细胞白血病中发现多种 microRNA 基因发生突变, 单个 microRNA 基因的这一特征可以作为生物标志物, 在疾病预防和诊断中具有非常重要的作用。人类和其他哺乳动物体内存在稳定水平的血清 microRNA, 疾病状态下血清 miRNAs 的表达异常。血清 miRNA 表达谱可以构成识别癌症与其他疾病的“指纹”, 能够作为癌症或其他疾病的生物标志物, 其重要意义在于创造性地提供了一种非损伤性的癌症预防和诊断方法。

MicroRNA 研究在目前还面临很多问题: 为何一些 microRNA 在序列、相互作用靶点及 RNA 结合蛋白等方面非常保守; microRNA 在转录水平、生物发生及蛋白辅助因子方面又是如何被调控的; 在临床上, 如何进行基于特定 microRNA 活性的治疗方案, 如输送到感兴趣的组织或是针对目的靶点的特异性; microRNA 基于血清或质膜在疾病方面的预防和诊断, 其机制是什么; 如何进行医学上的开发应用; 在基因组水平如何进行 microRNA 基因和作用靶点的遗传学研究。以上问题都极其需要模式生物和人类疾病的交叉研究。

3 MicroRNA 与发育

MicroRNA 在细胞命运决定过程中有重要的调控功能。线虫细胞命运决定有四个主要的阶段, 受时序基因的调控。

第一阶段到第二阶段受 lin-4 的调控, lin-4 是一个时序调控基因, 它的突变体不能从第一期幼虫进入第二期。lin-4 转录形成两种长度的 RNA, 分别长 61 个碱基和 22 个碱基, 其中较小的 RNA 通过与 lin-14 的 mRNA 互补配对, 抑制 LIN-14 蛋白的翻译, 从而影响发育进程。

第二阶段到第三阶段受 let-7 家族的调控, let-7

家族成员(miR-48、miR-84、miR-241和let-7)参与决定了线虫侧线细胞L3时期的细胞命运,功能性缺失会导致侧线细胞L2的细胞命运在L3时期重复出现。Hbl-1是已知的一个参与L2/L3细胞命运转换的调控因子,let-7家族成员通过调节hbl-1的时序表达来影响线虫发育。由于这一阶段受多个microRNA基因调控,如果只突变miR-48,并不影响线虫从L2时期进入L3时期;但如果同时突变miR-48和miR-241,就会出现一部分线虫不能从L2时期进入L3时期;如果同时突变miR-48、miR-84和miR-241,线虫全部不能从L2时期进入L3时期,导致发育迟缓。在正常的培养环境中,同时突变三个microRNA基因会导致发育迟缓;但如果是在有压力的环境中培养(如饥饿),即使突变三个microRNA基因,线虫发育依然正常。研究发现,在压力环境条件下,有一些调节因子(如NHL-2)参与了对hbl-1的调控,从而影响线虫的发育。NHL-2能与RISC复合物中CGH-1/RCK相互作用,在压力条件下,NHL-2表达上调,进而稳定microRNA-RISC复合物,增强microRNA的活性。在结构上,NHL-2、NHL-3、NHL-1和LIN-41有TRIM motif和NHL结构域,并发现其在果蝇和人类中的同源基因*Brat*和*TRIM32*。它们除了在转录后修饰的调控,在转录水平也存在对let-7家族的调控。在线虫L2时期进

入L3时期过程中,发育信号、受营养和群体密度等因素调控的类固醇激素配体和核受体DAF-12等都对let-7家族在转录水平有调控作用。研究发现,核受体DAF-12对let-7家族的调控存在正负调控作用,并受let-7家族成员负反馈调控。在发育信号诱导下,多种microRNA与类固醇激素受体存在负反馈调节,如miR-14负反馈调控蜕皮激素受体EcR,参与细胞命运决定;miR-206负反馈调控雌激素受体ER α ,抑制乳腺癌发生。以上研究表明,在线虫细胞命运决定中,microRNA、microRNA-RISC复合物辅因子NHL-2及类固醇激素核受体DAF-12参与了对线虫L2时期进入L3时期的调控。

第四阶段到成体受let-7的调控,let-7在线虫幼虫的L3/4期出现,它一出现便会抑制Lin-41蛋白的表达,进而解除对Lin-29蛋白表达的抑制,使线虫进入成虫期。如果let-7发生突变,就可使线虫永远停留在幼虫期。

从模式生物线虫等的研究可以预测microRNA在人类同源物(如TRIM32)的生物学功能,并可能作为一种潜在的药物靶标,对相关疾病的治疗具有重要意义。

(中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所
朱万渠 编译)