

文章编号: 1004-0374(2011)04-0364-05

let-7 microRNA调控动物器官发育的研究进展

王虹, 滕鸿琦, 施珏平, 张彦定, 张明凤*

(福建省发育与神经生物学重点实验室, 福建师范大学生命科学学院, 福州 350108)

摘要: 微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类在进化上高度保守、长度约 20~24 nt 的小分子非编码 RNA, 能与靶基因 3' 非翻译区相结合从而抑制靶基因的翻译或降解靶基因。let-7 microRNA 是发现较早的一类 miRNA, 最早在线虫中发现能调控细胞分裂的时序。此后大量证据表明, let-7 参与动物多个器官发育的调控过程, 并与人类疾病发生密切相关。该文综述了近年来 let-7 调控动物脑、神经及心肺系统等器官发育的研究成果, 初步阐述了 let-7 调控动物器官发育可能的作用机制, 以期为进一步深入研究 let-7 的功能奠定基础。

关键词: microRNA; let-7; 器官发育; 调控机制

中图分类号: Q522.2; Q954.48 **文献标识码:** A

Progress of animal organs development regulated by let-7 microRNA

WANG Hong, TENG Hong-Qi, SHI Jue-Ping, ZHANG Yan-Ding, ZHANG Ming-Feng*

(Fujian Key Laboratory of Developmental and Neurobiology, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNAs, about 20~24 nucleotides in length. They can inhibit target genes translation or degrade them directly through combination with the complementary sequences in the 3'-UTRs of target mRNAs. The let-7 miRNAs were originally found in the nematode *Caenorhabditis elegans*, where they mainly regulated the timing of cell division. Increasing evidences indicate that let-7 miRNAs are associated with animal organs development and human diseases. This review summarized the recent progresses about the function of let-7 miRNAs in the development of brain, neuron, lung and cardiovascular system. Meanwhile, we elucidated the possible mechanism of let-7 miRNAs regulating the developmental processes of animal organs that might provide the basis for further illustrating the function of let-7 miRNAs.

Key words: microRNA; let-7; organ development; regulation mechanism

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度约 20~24 nt 的小分子单链 RNA, 最早在秀丽新小杆线虫中被发现, 并在进化上高度保守^[1], 随后掀起了 miRNA 的研究热潮。近年来, 大量研究证实 miRNA 参与了细胞的增殖、分化、凋亡等过程, 对生物体的器官发育起着重要的调控作用。目前已经发现的 miRNA 约有 500 多种^[2], 其中 let-7 基因编码的小时空 RNA (small temporal RNA, stRNA) 则被认为是 miRNA 的代表^[3,4]。最早在线虫中发现 let-7 能调控细胞分裂的时序, 是线虫发育的时间调控器^[5], 此后大量文献证实 let-7 参与了动物器官发育的调控过程。本文综合了近年来关于 let-7 调控

动物脑、神经及心肺系统等器官发育的主要研究成果, 重点阐述了 let-7 调控动物器官发育可能的作用机制, 以期为进一步深入研究 let-7 的功能及为相关疾病的防治奠定基础。

收稿日期: 2010-09-17; 修回日期: 2010-10-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871422); 国家自然科学基金青年基金项目(31000643); 卫生部科学研究基金—福建省卫生教育联合攻关计划资助项目(WKJ2008-2-51)

*通讯作者: E-mail: biozmf@fjnu.edu.cn

1 miRNA的研究概述

miRNA 是一类无开放阅读框及无蛋白质编码功能的基因,但在表达上具有时间和空间的特异性。由于 miRNA 的长度很短并且作用时间很短暂,所以开始被称为小时空 RNA (stRNA)^[6],后来科研人员又相继在果蝇、斑马鱼、拟南芥等真核模式生物中找到了相应的 miRNA。miRNA 相对应的基因来源于染色体非编码区,在细胞核内由 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, RNAPol II) 转录生成长度约为 100~1 000 nt 的初级 miRNA (primary miRNA, pri-miRNA)。pri-miRNA 在双链 RNA 特异的核酸酶 Droscha 以及 DGCR8 (DiGeorgecritical region-8) 结合蛋白作用下,被剪切成为长约 70~90 nt 的具有茎环结构的前体 miRNA (precursor miRNA, pre-miRNA)。pre-miRNA 在 GTP 依赖的核质/细胞质转运蛋白 Exportin5 的作用下,从细胞核运送到细胞质;在细胞质中,ATP 依赖的核酸内切酶 Dicer 将 pre-miRNA 剪切成长约 19~22 nt 的双链 miRNA。其中, DICER-LIKE1a 蛋白促进 miRNA 成熟, DICER-LIKE1b 蛋白则转而控制 miRNA 的靶位调控作用^[7]。随后双链 miRNA 解旋,其中一条链被降解,另一条链被 PPD (PAZ and Piwi domain) 蛋白家族成员识别,形成 RNA-蛋白质复合物,并最终进入 RNA 诱导的基因沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 中,形成非对称 RISC 复合物^[3]。

目前已明确的 miRNA 参与基因调控的方式主要有两种:一种是与靶基因的非编码区 3'-UTR 区域不完全互补,阻止转录后的翻译,此过程并不影响靶基因的稳定性;另一种是与靶基因完全互补配对结合,其作用方式类似于小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA),将其靶基因降解。此外,最近的研究发现,一种 miRNA 能与多种 mRNA 相互作用^[8]。不仅如此, Kedde 等^[9] 针对一个进化上保守的 RNA 结合蛋白 Dnd1 进行了研究,发现其通过 miRNA 靶向的 mRNAs 上尿嘧啶富集区域介导,结合在 mRNAs 上,抑制 miRNAs 与其靶位点相互作用,进而阻碍人类细胞和斑马鱼原代生殖细胞中几种 miRNAs 功能的发挥。这一研究结果不仅揭示了 Dnd1 在保护某些 mRNAs 免受 miRNA 介导的抑制中的新作用,也揭示了 miRNA 调控中的一条新途径,即 miRNAs 这种非编码 RNAs 不仅可以抑制基因表达,还具有转录激活这一完全相反的作用。

let-7 是 miRNA 家族中的重要成员,在软体动物、环节动物、斑马鱼体内均有表达^[5],并且在脊椎和无脊椎动物中高度保守。2000 年 Reinhart 等^[6] 在线虫中首次发现 let-7,它存在于幼虫的第 3 期、第 4 期及成虫期,调控细胞的分化和增殖时序。目前已发现人 let-7 家族成员主要有 let-7a-1、let-7a-2、let-7a-3、let-7b、let-7c、let-7d、let-7e、let-7f-1、let-7g、let-7i 以及 miR-98,这 11 个家族成员主要定位于人类 9、11、12 号染色体上。与其他 miRNA 一样,let-7 的表达具有组织特异性。Johnson 等^[10] 通过 Northern blot 发现相对于小鼠心脏、大脑等组织,let-7 在鼠肺中的表达最高,用原位杂交技术检测小鼠胚胎发育第 12.5 d 时 let-7 的表达情况,发现在胎肺中,let-7 亦有强烈表达。除此之外,let-7 的表达还具有时间特异性,当细胞开始分化时,let-7 的表达量也开始迅速增加^[11]。目前已有许多关于 let-7 miRNAs 参与动物组织器官发育调控的研究报道,下面就 let-7 miRNAs 调控细胞分裂分化、脑和神经发育、心肺发育等方面的研究进展进行概述。

2 let-7 miRNA对细胞分裂分化的调控作用

细胞的分裂和分化是器官形成的起始和基础,目前已有研究证实 let-7 家族成员在调控细胞分裂及细胞分化的过程中起着重要的作用。Johnson 等^[10] 用微阵列分析经 let-7 miRNA 作用的细胞,发现 let-7 能直接或间接地作用于相关的细胞周期基因,如 A2、CDC34、E2F5、CDK8 等。Legesse-Miller 等^[12] 在人类初级纤维原细胞中添加外源性 let-7 前体,发现细胞数量减少,处于 G₂/M 期的细胞数增多。结合芯片技术分析 let-7 潜在的靶基因,发现 let-7 可直接与 CDC34 的 3' UTR 相结合。研究表明,低水平的 CDC34 蛋白会导致人干细胞生长因子 SCF 活性的下调,从而稳定 SCF 的靶基因 WEEL,使细胞处于 G₂/M 期。研究人员用 RNA 干扰技术下调 WEEL 得到的结果与 let-7 过表达相反,表明 CDC34 是 let-7 作用的靶基因,let-7 下调 CDC34,稳定 WEEL 激酶,从而导致初级纤维原细胞处于 G₂/M 期。另外,近年来有研究证明,胚胎干细胞在定向分化的过程中会关闭胚胎干细胞的自我更新程序,同时激活组织特异性的定向分化程序。当胚胎干细胞缺乏 DGCR8 蛋白,胚胎干细胞的自我更新程序无法停止,那么将对细胞定向分化产生影响,而此种蛋白对 miRNA 的生成具有重要意义。Melton 等^[13] 将 let-7 家族导入 DGCR8 蛋白缺失的

未分化的体细胞中,发现可以有效地抑制细胞的自我更新。进一步分析发现 *let-7* 可间接调控干细胞自我更新的基因,使其失活。除此之外,抑制 *let-7* 可促进未分化的体细胞生成诱导多能干细胞 (induced human pluripotent stem cells, iPSCs)^[13]。由此可见,在胚胎干细胞的自我分化与自我更新中, *let-7* 发挥着重要的调节作用,同时也揭示了 *let-7* 在细胞分化过程中的关键作用。

3 *let-7* miRNA对脑和神经系统发育的调控作用

目前已有研究证实 *let-7* 家族成员在动物的脑和神经细胞中有表达,并在神经系统中呈现明显的组织表达特异性^[14]。如 Wulczyn 等^[11]通过原位杂交技术,发现 *let-7* 在小鼠胚胎发育第 9.5 d 的中枢神经系统表达。此外, *let-7b* 在哺乳动物的大脑中表达,并在神经系统的分化过程中表达呈上升趋势^[15]。神经干细胞的自我更新和分化是脑和神经系统形成的基础,这个过程受到基因表达的精确调控, *let-7* 与其他 miRNA 一起调控着神经干细胞中靶基因的表达。Zhao 等^[15]发现, *let-7b* 通过与干细胞调控因子 Tlx 以及细胞周期调控因子 CyclinD1 相互作用调节神经干细胞的增殖和分化。在神经干细胞中过表达 *let-7b*, 发现神经干细胞的增殖下调,但分化上调;然而反义敲除 *let-7b* 能促进神经干细胞增殖。此外,在母鼠子宫内将 *let-7b* 电转入小鼠胚胎的大脑中,发现神经干细胞的增殖下调;同时在母鼠子宫内导入 Tlx 或 CyclinD1 的表达载体,表达缺少 *let-7b* 识别位点的 Tlx 或 CyclinD1, 能挽救 *let-7b* 诱导的增殖缺陷^[15]。这些结果均表明 Tlx 和 CyclinD1 是 *let-7b* 的靶基因,调控神经干细胞的增殖和分化。除此之外, Sokol 等^[16]证实 *let-7c* 存在于蛹和成虫的神经细胞中,敲除 *let-7c*, 昆虫表型正常,但是会出现行为缺陷(例如:飞行障碍或者运动障碍),同时它们的神经细胞表现出幼虫的特征。

4 *let-7* miRNA对心肺系统发育的调控作用

动物胚胎发育过程中第一个形成的器官是心脏,其对生命的维持起重要作用。相对于大部分其他器官而言,心脏对基因的微小改变更加敏感。随着对 miRNA 的深入研究,人们发现 miRNA 对心脏发育同样起着重要的调控作用。*Dicer* 是合成 *let-7* miRNA 的关键基因,在出生后特异性地敲除 *Dicer* 会导致心肌肥厚,心脏发育异常。另外,在胚胎发

育时期, *Dicer* 缺失会导致在胚胎发育第 12.5 d 到 14.5 d 的小鼠死亡,而在斑马鱼的胚胎中敲除 *Dicer*, 血液循环出现障碍^[17]。Cheng 等^[18]提取正常小鼠 (C576BJ) 心脏 RNA,通过 miRNA 芯片分析,发现 *let-7* 家族成员在正常小鼠心脏中高表达。不仅如此, Thum 等^[19]亦通过 miRNA 芯片分析,发现 *let-7* 在人类心脏发育的胚胎时期高表达,在发育过程中表达量改变,并且在心血管疾病,如心力衰竭的发生过程中, *let-7* 家族成员有显著表达^[20]。除此之外, Wang 等^[21]在心肌和血管平滑肌中也发现了 *let-7* 的表达。Kuehbach 等^[22]通过 Real-time PCR,发现 *let-7* 家族在人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 中高表达;特异性地敲除 *let-7f*, 其下游靶基因血小板反应蛋白 -1 (thrombospondin-1, TSP-1) 表达量升高,导致胚胎发育初期心芽无法形成,说明 *let-7f* 可通过与抑制血管生成因子 TSP-1 相互作用促进血管的生成,从而影响心脏的发育。

肺是进行气体交换的器官,以支气管反复分支形成的支气管树为基础构成^[23],与心脏类似,同样是人体维持生命活动必不可少的器官。在肺发育过程中,基因的表达大多是通过精确地控制细胞与细胞间信号来实现的^[24]。Harris 等^[25]在小鼠胎肺初级肺芽的内胚层中特异性敲除 *Dicer* 基因,发现从小鼠胎肺发育第 12.5 d 开始,分支形态减少,表型出现异常。Reinhart 等^[6]通过芯片分析,发现至少有 20 个 miRNA 在小鼠胎肺发育时期高表达,其中 *let-7* 家族成员在小鼠胚胎发育的第 11.5 d 表达量排名第十位,到胚胎发育的第 17.5 d 已跃居第一,预示 *let-7* miRNA 在小鼠胎肺发育过程中可能起到重要作用。另外, Johnson 等^[10]发现, *let-7* 在肺部正常组织中高表达,抑制 *let-7* 会增加 A549 肺癌细胞的分裂,然而在肺癌细胞中过表达 *let-7* 会改变细胞周期进程,减少细胞分裂,这揭示出 *let-7* 可直接或间接地调控与细胞周期以及细胞分裂有关的基因,进而调控动物肺的发育过程。

5 *let-7* miRNA调控动物器官发育的研究展望

let-7 除了可调控细胞的分裂分化、神经系统及心肺的发育过程,还能调控骨骼及肌肉的发育。Harfe 等^[26]发现,在小鼠的四肢特异性地敲除 *let-7* 基因,会导致小鼠四肢发育缺陷。*let-7* 通过与靶基因相互作用,调控生物体的发育进程,然而, *let-7* 的表达同时也受到上游基因或激素的调节,例如

let-7 的积累会受到多能干细胞促进因子 Lin-28 的调控。在线虫中, Lin-28 蛋白已知可直接或间接在转录水平对 let-7 进行负调控, 敲除 *Lin-28* 可导致成熟的 let-7 增多^[27]。Sempere 等^[28]在果蝇实验中发现, 改变蜕皮激素的含量会改变 let-7 的表达量。同时, 检测了 Broad-Complex (BR-C) 的作用, 这是蜕皮激素途径中最重要的调控器, 发现 BR-C 以及蜕皮激素对 let-7 的表达至关重要, 意味着在果蝇中, 蜕皮激素途径调控了 let-7 的表达。此外, 最近研究发现, let-7 可调控 Dicer 的表达。Tokumar 等^[29]过表达 let-7, 发现在蛋白质和 mRNA 水平上 Dicer 的表达量明显降低; 相反, 敲除 let-7, Dicer 的表达量增加。过表达 let-7 同时会降低其他成熟 miRNAs 的表达量, 然而, 敲除 let-7, 它们的表达量随之提高。let-7 作为一个重要的 miRNA, 可平衡 Dicer 和其他多种 miRNA 的表达量, 从而在动物器官的发育过程中起到重要作用。

let-7 在生物体中的发现以及对生物体生长发育的影响目前已成为发育生物学研究领域的热点, 它为生物发育过程中基因精确调控器官发生的研究提出了新的挑战和思路。let-7 与下游靶基因的关系错综复杂, 一种 let-7 miRNA 可以调节多个靶基因, 而一个靶基因又可以受到多种 let-7 miRNA 的调节。另外, let-7 miRNA 的表达还受到上游激素或生长因子的调节, 这些都使得 let-7 究竟在生物体器官发生发育过程中如何发挥调控作用成为下一步研究的重点。但是, 可以相信, 随着研究的深入, let-7 miRNA 必将在研究生命起源和物种进化、基因表达调控、疾病发生发展的机制等方面起到更为深远的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambms V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75(5): 843-54
- [2] Bentwich I, Avniel A, Karov, Y, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*, 2005, 37(7): 766-70
- [3] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001, 294(5543): 853-8
- [4] Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 294(5543): 858-62
- [5] Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 2000, 408(6808): 86-9
- [6] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403(6772): 901-6
- [7] Khraiwesh B, Arif MA, Seumel GI, et al. Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell*, 2010, 140(1): 111-22
- [8] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281-97
- [9] Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, et al. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell*, 2007, 131(7): 1273-86
- [10] Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, et al. The *let-7* microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res*, 2007, 67(16): 7713-22
- [11] Wulczyn FG, Smirnova L, Rybak A, et al. Post-transcriptional regulation of the *let-7* microRNA during neural cell specification. *FASEB J*, 2007, 21(2): 415-26
- [12] Legesse-Miller A, Elemento O, Pfau SJ, et al. *let-7* overexpression leads to an increased fraction of cells in G₂/M, direct down-regulation of Cdc34, and stabilization of Wee1 kinase in primary fibroblasts. *J Biol Chem*, 2009, 284(11): 6605-9
- [13] Melton C, Judson RL, Billelloch R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 2010, 463(7281): 621-6
- [14] Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, et al. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol*, 2004, 5(9): 68
- [15] Zhao C, Sun G, Li S, et al. MicroRNA *let-7b* regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(5): 1876-81
- [16] Sokol NS, Xu P, Jan YN, et al. *Drosophila let-7* microRNA is required for remodeling of the neuromusculature during metamorphosis. *Genes Dev*, 2008, 22(12): 1591-6
- [17] Urbich C, Kuehbach A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*, 2008, 79(4): 581-8
- [18] Cheng Y, Ji R, Yue J, et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol*, 2007, 170(6): 1831-40
- [19] Thum T, Galuppo P, Wolf C, et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation*, 2007, 116(3): 258-67
- [20] Thum T, Catalucci D, Bauersachs J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res*, 2008, 79(4): 562-70
- [21] Wang Z, Luo X, Lu Y, et al. MiRNAs at the heart of the matter. *J Mol Med*, 2008, 86(7): 771-83
- [22] Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, et al. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res*, 2007, 101(1): 59-68
- [23] White AC, Xu J, Yin Y, et al. Fgf9 and Shh signaling coordinate lung growth and development through regulation

- of distinct mesenchymal domains. *Development*, 2006, 133(8): 1507-17
- [24] Cardoso WV, Lu J. Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development*, 2006, 133(9): 1611-24
- [25] Harris KS, Zhang Z, McManus MT, et al. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(7): 2208-13
- [26] Harfe BD, McManus MT, Mansfield JH, et al. The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(31): 10898-903
- [27] Piskounova E, Viswanathan SR, Janas M, et al. Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28. *J Biol Chem*, 2008, 283(31): 21310-4
- [28] Sempere LF, Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, et al. The expression of the *let-7* small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, 2002, 244(1): 170-9
- [29] Tokumaru S, Suzuki M, Yamada H, et al. *let-7* regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis*, 2008, 29(11): 2073-7