

DOI: 10.13376/j.cbbs/2015173

文章编号: 1004-0374(2015)10-1246-09

miR-302/367家族研究进展

马腾¹, 李敬², 李炯¹, 周西坤^{1*}

(1 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室/生物治疗协同创新中心, 成都 610041;

2 四川大学华西口腔医学院口腔疾病研究国家重点实验室, 成都 610041)

摘要: MicroRNAs (miRNAs) 是一类长度约为 22 nt 的内源性小分子非编码 RNA, 几乎参与了机体生命活动的所有过程。MicroRNA-302/367 (miR-302/367) 家族, 包括 miR-302a/b/c/d 和 miR-367 等成员。近些年, 人们对 miR-302/367 家族在胚胎干细胞的自我更新与多能干细胞的诱导机制进行较为深入的研究。此外, 该家族在肿瘤和炎症反应等方面调控作用也日益受到关注。现就 miR-302/367 的功能研究进展作一综述。

关键词: 微小 RNA; miR-302/367; 干细胞; 肿瘤; 免疫

中图分类号: Q522 **文献标志码:** A

Current progress in understanding the function of miR-302/367 cluster

MA Teng¹, LI Jing², LI Jiong¹, ZHOU Xi-Kun^{1*}

(1 State Key Laboratory of Biotherapy/Collaborative Innovation Center for Biotherapy,

West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2 State Key Laboratory of Oral Diseases,

West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a class of ~22 nt endogenous small regulatory non-coding RNAs, which have been implicated in almost all the life processes. The microRNA-302/367 (miR-302/367) cluster contains several members such as miR-302a/b/c/d and miR-367. The molecular mechanism of miR-302/367 involved in embryonic stem cell self-renewal and induced pluripotent stem cells has been well investigated in the past few years. Moreover, its regulating role in tumor and inflammation is also getting more attention. This paper reviews the progress in understanding the function of miR-302/367.

Key words: microRNAs; miR-302/367; stem cells; tumor; immunity

微小 RNA (microRNA) 是一类非编码、具有基因表达调控功能、长约 22 nt 的小 RNA, 能够在转录后水平上抑制翻译或诱导 mRNA 的降解。miRNA 基因首先在核内由 RNA 聚合酶 II 转录成 pri-miRNA, 在 Drosha 剪切下生成 pre-miRNA, 并由核内的转运蛋白 Exportin 5 转运到细胞质中; 在细胞质中, 核糖核酸酶 Dicer 切割 pre-miRNA 生成双链成熟 miRNA (mature-miRNA)。miRNA 可与 AGO 等多个蛋白一起形成 RISC 复合体来发挥生物学功能, 其主要作用机制是 miRNA 通过与目标 mRNA 分子的 3' 端非编码区域结合后, 引起靶点 mRNA 的降解和翻译抑制。现有研究发现, miRNAs 在肿瘤、心血管疾病、神经系统疾病和免疫性疾病的发生发

展过程中发挥着重要的作用, 扩展了对机体发育、分化和重要疾病发生机制的认识, 是近年来生物医学研究领域的研究前沿和热点^[1-3]。

miR-302/367 家族属于目前被研究得最多 micro-RNAs 之一^[4-6]。人源 miR-302/367 家族位于 4 号染色体 q25 区, 包括 miR-302a/b/c/d 和 miR-367 等成员。不同成员间的种子序列稍有差异 (表 1)。先前研究主要集中于 miR-302/367 可以作为关键调节因子在胚胎干细胞更新和多能性的维持中起重要

收稿日期: 2015-08-17; 修回日期: 2015-09-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(81202324)

*通信作者: E-mail: xikunzhou@scu.edu.cn

表1 miR-302/367家族序列

miRNAs	Sequence	Seed	Species
miR-302a	uaagugcuuccauguuuugguga	aagugcu	hsa、mmu
miR-302b	uaagugcuuccauguuuaguag	aagugcu	hsa、mmu
miR-302c	uaagugcuuccauguuucagugg	aagugcu	hsa、mmu
miR-302d	uaagugcuuccauguuugagugu	aagugcu	hsa、mmu
miR-367	aaugcacuuagcaauugguga	auugcac	hsa、mmu

作用^[7], 其靶点涉及细胞周期、上皮间质转化和囊泡运输等多种生物学过程^[4]。越来越多的研究表明, miR-302/367 在肿瘤、免疫性疾病和心血管等疾病中也具有重要的调控功能, 其不同疾病中可以通过靶向调节不同靶基因发挥不同的生物学作用。

本文综合近年来国内外文献报道, 对 miR-302/367 家族的作用机制研究进展进行阐述。

1 miR-302/367与细胞发育分化

多项研究证实, 与体细胞相比, 胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESC) 和多能干细胞 (pluripotent stem cells, piPSCs) 中 miR-302/367 家族的表达量很高, miR-302/367 现在被认为是干细胞的一种标志物^[8-9]。干细胞特异性转录因子 Nanog (nanog homeobox)、OCT4 (octamer-binding transcription factor 4)、SOX2 (SRY-related HMG box 2) 和 REX1 (reduced expression 1) 可以与 miR-302/367 启动子区域结合, 促进 miR-302/367 在干细胞中的转录^[10-11]。丁酸钠可以抑制 HADCs (histone deacetylases) 与 OCT4 转录激活结构域的结合, 释放出 OCT4 作为启动子促进 miR-302/367 簇的表达^[12]。AhR (aryl hydrocarbon receptor) 与 miR-302 启动子区域有两个结合位点, AhR 活化后依赖 miR-302 途径促进细胞重编程^[13]。低氧和 FGF2 (fibroblast growth factor 2) 处理可以通过诱导 miR-302 的表达发挥促进间充质干细胞重编程的作用^[14]。而 Wnt 信号通路下游分子 TCF3 (transcription factor 3) 与 miR-302/367 启动子区域结合后抑制其转录^[15]。另有报道发现, JMJD1C (jumonji domain containing 1C) 是 miR-302 上游负调控因子^[16]。上述研究表明在细胞发育分化过程中 miR-302/367 的表达受多种因子的精细调控。

1.1 胚胎干细胞的自我更新与分化

胚胎干细胞通过调控其所处微环境中的相关细胞因子、胞外基质与胞内特异分子表达的平衡来维持自我更新状态。BMP (bone morphogenetic protein) 信号是调控胚胎发育的重要信号通路之一, 在体内稳态的维持中发挥着重要的调控作用。研究发现

miR-302 可以下调 BMP 信号抑制基因 TOB2 (transducer of ERBB2,2)、DAZAP2 (DAZ associated protein 2) 和 SLAIN1 (sLAIN motif family, member 1) 而促进 BMP 信号的活化^[17]。Kang 等^[18] 进一步发现, BMP 信号可以下调 miR-302 的表达, 而 miR-302 通过靶向调控 BMPRII 的转录负反馈抑制 BMP 信号。Kang 等^[19] 研究发现, BMP2/RUNX2 (bone morphogenetic protein 2/Runt-related transcription factor 2) 信号簇可以调控 miR-302a 的启动子活性而促进其表达。NR2F2 为经典 Wnt 信号通路的靶基因。miR-302a 通过靶向下调 NR2F2 的 mRNA 和蛋白水平, 促进 BMP2 诱导的成骨细胞分化, 提示在不同细胞类型与体系中 BMP 与 miR-302/367 复杂的相互调控作用。

SWI/SNF 染色体重塑复合物由 ATPase (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2, SMARCA2/Brm 或 SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4, SMARCA4/Brg1) 和多个 BAFs (brg1-associated factors) 组成, 其可以打开染色体和重定位核小体, 在细胞重编程过程中起着非常重要的作用。Wade 等^[20] 发现, miR-302 还可通过靶向抑制 BAF53a 和 BAF170 亚基的表达来调控 Brg1 染色体重塑复合物的组成, 以此影响干细胞的细胞周期和增殖, 维持干细胞自我更新和多能性。

另有一些研究者发现, miR-302/367 参与了干细胞的凋亡调节。Pernaute 等^[21] 报道, miR-302 可以与 miR-20 和 miR-92 共同作用调节促凋亡蛋白 BIM/BCL2L11 (BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)) 的表达, 微调干细胞的凋亡阈值。miR-302d 还可靶向抑制 CDKN1A 促进间充质干细胞增殖, 并通过靶向抑制 CCL5 (chemokine (C-C motif) ligand 5) 保护氧化应激诱导的细胞死亡^[22]。Zhang 等^[23] 通过 TALE 技术 (transcription activator-like effectors) 构建了 miR-302/367 的转录抑制子来抑制 hESC 中内源性 miR-302/367 的表达, 结果显示 miR-302/367 可抑制 BNIP3L/Nix (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like) 而促进 BCL-xL (BCL2-like 1) 的表达, 同时参与调节胚胎干细胞的自我更新和凋亡过程。

神经管的形成对于神经系统发育和胚胎存活是至关重要的, 出生缺陷中一种比较常见的类型就是神经管发育失败^[24]。Parchem 等^[25] 报道, miR-302 在胚胎发育时高表达, 与神经细胞的发育密切相关,

其在神经上皮细胞的分化过程中扮演着至关重要的角色,以影响神经管的形成。miR-302 敲除小鼠神经管无法闭合,导致胚胎死亡。进一步研究发现 miR-302 敲除小鼠中,miR-302 已知相关靶点 mRNAs 表达量上调,功能验证表明 Fgf15 (fibroblast growth factor 15) 是其直接作用靶点。

1.2 多能干细胞的诱导

在体细胞中,miR-302/367 具有诱导体细胞重编程为多能干细胞的功能(图1)^[4,14,26-27]。Subramanyam 等^[4]鉴定了 miR-302 在此过程中所调控的靶基因可以分为以下几类:(1)细胞周期调节基因(cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, cDKN1A; retinoblastoma-like 2, RBL2; cyclin-dependent kinase 19, CDK19);(2)表观遗传调节基因(methyl CpG binding protein 2, MECP2; methyl-CpG binding domain protein 2, MBD2; SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2, SMARCC2);(3)囊泡运输相关基因(member RAS oncogene family 5C, RAB5C; RAB11 family interacting protein 5 (class I), RAB11FIP5);(4)细胞信号通路基因(v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, AKT1; Rho GTPase activating protein 26, ARHGAP26);(5)上皮间质转化相关基因(ras homolog family member C, RHOC; transforming growth factor β receptor II, TGF β R2)。

Parchem 等^[28]通过研究小鼠胚胎发育分化过程中 mir-290 家族和 mir-302/367 家族的时空表达规律,发现 miR-302/367 主要在重编程过程的中后期发挥调控作用。Zhang 等^[12]发现丁酸钠促进重编程过程,主要机制是通过解除 HADCs 与 Oct4 的聚合,上调的 Oct4 转录活性促进 miR-302/367 的表达。Anokye-Danso 等^[29]报道,利用慢病毒在小鼠胚胎成纤维细胞和人成纤维细胞中过表达 miR-302/367,同时用丙戊酸辅助处理细胞可以使得上述细胞重编程为 iPSCs,其诱导效率高于用 SOX2、OCT4、KLF4 (Kruppel-like factor 4) 和 MYC (v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog) 等 Yamanaka 因子诱导方法的效率。Ghasemi-Kasman 等^[30]利用丙戊酸辅助促进 miR-302/367 诱导星形胶质细胞成神经细胞,在体内并未观察到肿瘤形成。miR-302/367 可以调节 MBD2、OCT4、SOX2 和 KLF4 等转录因子表达,促进体细胞的去分化过程^[4,7,31],同时,通过靶向抑制 KDM1A (lysine (K)-specific demethylase 1A)、NR2F2 (nuclear receptor subfamily 2,

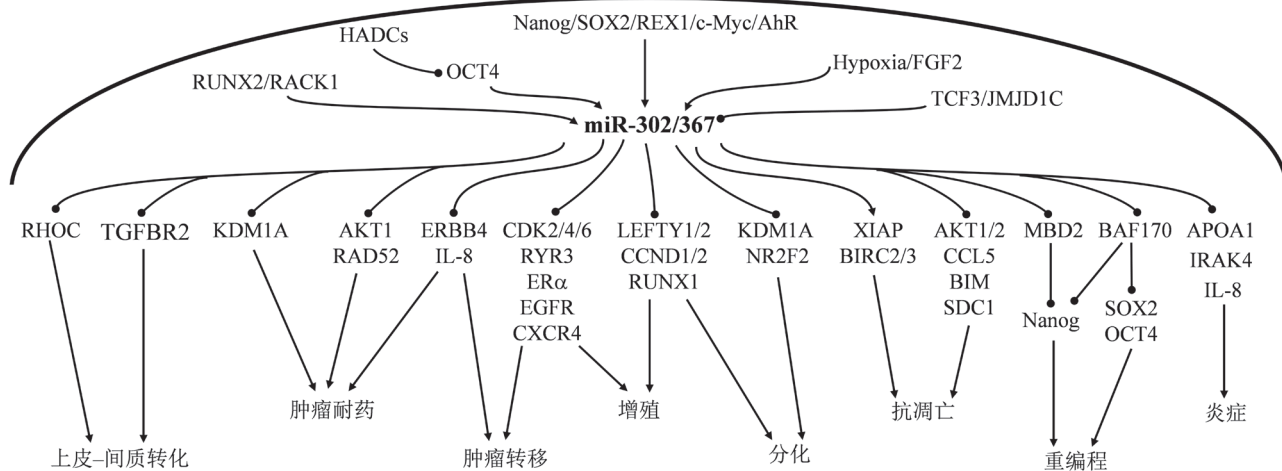
group F, member 2)、CCND2 (Cyclin D2) 和 LEFTY1/2 (left-right determination factor 1) 的表达从而抑制 ESC 的早期分化,维持其多能性^[32-36];通过抑制 CDK2 (cyclin-dependent kinase 2) 和 CDK4/6 (cyclin-dependent kinase 4/6) 等细胞周期相关基因的表达抑制其致癌性^[37-39]。芯片检测发现,此类 miRNAs 诱导细胞的基因表达水平与胚胎干细胞基因表达的相似度达到 86% 以上^[7]。以上研究结果提示,利用 miR-302/367 诱导 iPSCs 可能是一种比较安全和高效的方法。

2 miR-302/367与肿瘤

肿瘤发生是一个多阶段、多因素参与的复杂生物学过程。现有研究结果表明,miRNAs 几乎参与肿瘤发生发展的整个过程,其中 miR-302/367 在多种肿瘤中扮演着重要的角色(图1,表2)。

miR-302a 在前列腺癌和结肠癌组织中表达量显著下调,体内外研究发现其可以通过靶向抑制 AKT1 的表达引起肿瘤细胞的 G₁/S 细胞周期阻滞,从而抑制肿瘤细胞的增殖^[40-41]。Cai 等^[42]报道,miR-302/367 下调 Cyclin D1 (CCND1) 和 AKT1 的表达而抑制宫颈癌肿瘤细胞增殖。Guo 等^[43]发现,miR-302a 在卵巢癌组织中表达量增加,可以通过抑制 SDC1 (syndecan 1) 的表达抑制肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡。Liang 等^[44]报道,miR-302a 在乳腺癌中的作用靶点是 CXCR4 (chemokine (C-X-C motif) receptor 4),通过 CXCR4 可抑制肿瘤的侵袭迁移。在睾丸癌中,顺铂处理后的肿瘤细胞 miR-302a 表达量上调,同时,miR-302a 可以显著提高顺铂对肿瘤细胞的杀伤活性^[45]。Costa 等^[46]报道,人 ESC 培养后产物可以逆转黑色素瘤肿瘤细胞的恶性表型,机制之一是 miR-302a 抑制 Notch4 信号活性。

Zhang 等^[47]报道,食管鳞状细胞癌组织中 miR-302b 的表达明显下降,miR-302b 在该模型中的作用靶点是 ERBB4 (Erb-b2 receptor tyrosine kinase 4),通过抑制 ERBB4 的表达,miR-302b 可以在体内下调肿瘤生长和淋巴结转移,在体外抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭迁移能力。miR-302b 在肝细胞癌临床样本中表达下调,可通过靶向 EGFR/AKT2/CCND1 信号通路抑制肿瘤细胞增殖和体内肿瘤生长^[48-49]。不同的是,miR-302b 靶向下调 RUNX1 (runt-related transcription factor 1) 的表达和 STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) 信号通路,



箭头表示正向调节, 圆点表示负调控。

图1 miR-302/367主要生物学功能示意图

表2 miR-302/367介导的相关信号通路

KEGG Pathway	Genes	Count	P-Value
癌症相关信号通路	EGFR, AKT1, CDKN1A, E2F3, CCND1, PTGS2, PPARG, TGFBR2, CDK6, CDK4, CDK2, AKT2	12	1.8E-06
细胞周期	CDK1, CDKN1A, E2F3, CCND1, RBL2, CCND2, CDK6, CDK4, CDK2	9	5.2E-07
神经胶质瘤	EGFR, AKT1, CDKN1A, E2F3, CCND1, CDK6, CDK4, AKT2	8	6.6E-08
黑色素瘤	EGFR, AKT1, CDKN1A, E2F3, CCND1, CDK6, CDK4, AKT2	8	1.5E-07
胰腺癌	EGFR, AKT1, E2F3, CCND1, TGFBR2, CDK6, CDK4, AKT2	8	1.7E-07
慢性粒细胞白血病	AKT1, CDKN1A, E2F3, CCND1, TGFBR2, CDK6, CDK4, AKT2	8	2.3E-07
小细胞肺癌	AKT1, E2F3, CCND1, PTGS2, CDK6, CDK4, CDK2, AKT2	8	5.0E-07
非小细胞肺癌	EGFR, AKT1, E2F3, CCND1, CDK6, CDK4, AKT2	7	6.5E-07
p53 信号通路	CDK1, CDKN1A, CCND1, CCND2, CDK6, CDK4, CDK2	7	2.6E-06
前列腺癌	EGFR, AKT1, CDKN1A, E2F3, CCND1, CDK2, AKT2	7	1.3E-05
TGF-β 信号通路	RBL2, SMAD7, LEFTY2, TGFBR2, BMPR2, LEFTY1	6	1.6E-04
内吞作用	EGFR, RAB11FIP5, ERBB4, RAB5C, CXCR4, TGFBR2	6	4.6E-03
膀胱癌	EGFR, CDKN1A, E2F3, CCND1, CDK4	5	1.1E-04
结直肠癌	EGFR, AKT1, CCND1, TGFBR2, AKT2	5	1.6E-03
ErbB 信号通路	EGFR, AKT1, CDKN1A, ERBB4, AKT2	5	1.8E-03
黏着斑	EGFR, AKT1, CCND1, CCND2, AKT2	5	3.2E-02
细胞因子-细胞因子受体相互作用	EGFR, CXCR4, TGFBR2, BMPR2, CCL5	5	7.3E-02
子宫内膜癌	EGFR, AKT1, CCND1, AKT2	4	3.7E-03
黄体酮介导的卵母细胞成熟	AKT1, CDK1, CDK2, AKT2	4	1.5E-02
Toll 样受体信号通路	IRAK4, AKT1, CCL5, AKT2	4	2.5E-02
Jak-STAT 信号通路	AKT1, CCND1, CCND2, AKT2	4	6.7E-02
急性髓性白血病	AKT1, CCND1, AKT2	3	4.8E-02
VEGF 信号通路	AKT1, PTGS2, AKT2	3	7.6E-02

从而抑制上皮性卵巢癌肿瘤细胞的增殖^[50]。在神经胶质瘤中, 全反式维甲酸发挥作用的机制之一就是可以上调 miR-302b 的表达, miR-302b 进一步抑制 E2F3 的表达, 诱导肿瘤细胞凋亡^[51]。表阿霉素 (epirubicin) 处理骨肉瘤细胞也会诱导 miR-302b 的表达, 通过活化 Caspase-3、抑制 Cyclin D1 和 CDKs 的表达以及 AKT 信号通路发挥抗肿瘤作用^[52]。De Cecco 等^[53]发现 miR-302b 的表达与顺铂化疗后卵巢癌患者的预后密切相关, 其发挥作用的机制是下调顺铂敏感基因 HDAC4 的表达。

miR-302c 在不同的肿瘤中扮演着不同的角色。血清中 miR-302c 的表达与胃食管交界处腺癌患者的生存期密切相关^[54]。在肝细胞癌中, miR-302c

可以通过调节内皮-间质转化 (endothelial-mesenchymal transition, EndMT) 抑制血管生成过程。脐静脉内皮细胞过表达 miR-302c 后, 其运动能力和 β-catenin 和 α-SMA 等 EndMT 标志物显著变化, 上述生物学作用是通过 miR-302c 的直接功能靶点 MTDH (metadherin) 介导的^[55]。雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 是一种配体依赖性的转录因子, 主要介导乳腺癌的增殖、分化、侵袭和转移等过程。miR-302c 可以调控 ER 的转录发挥抗肿瘤作用^[56]。也有一些研究者发现, miR-302c 在不同模型中可以促进肿瘤的进展。Min 等^[57]报道, miR-302c 高表达肿瘤细胞对 NK 细胞 (natural killer cells) 的敏感性下降。RACK1/ GNB2L1 (guanine nucleotide binding protein (G protein), β

polypeptide 2-like 1) 是一个经典的支架蛋白, 参与了细胞信号转导、增殖、迁移和分化等多种生物学过程^[58]。Chen 等^[59]报道, 体内外 RACK1 丧失可以引发包括 miR-302c 在内一系列 microRNAs 的表达, 导致 IL-8 的自分泌增加从而促进胃癌转移。

研究显示, miR-367 通过靶向 Smad7 来调节胰腺导管癌的体外侵袭和体内转移, 且其表达量与胰腺导管癌患者的预后成负相关^[60]。miR-367 可以抑制 RYR3 (ryanodine receptor 3 gene) 介导的乳腺癌肿瘤细胞增殖、迁移和表型, RYR3 基因序列上与 miR-367 结合的种子序列 SNP 位点突变后, miR-367 的调控功能失活^[61]。Chen 等^[62]发现, miR-367 在紫杉醇敏感卵巢癌细胞中表达升高, 敲除 miR-367 后的肿瘤细胞耐药性增加。另外, miR-367 和 miR-367* 还可以分别作为室管膜细胞瘤和非小细胞肺癌分类的潜在标志物^[63-64]。

此外, 针对 miR-302/367 具有诱导体细胞重编程和维持细胞多能性的能力, 研究者已在多种肿瘤模型中探讨了 miR-302/367 调控作用和治疗效果。miR-302 可以将结肠癌细胞诱导为干细胞样形态, 诱导后细胞体内外增殖能力均明显下降, CDKN1A 和 CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) 等肿瘤抑制基因的表达量升高^[65]。而在 miR-302 转染的肝细胞癌肿瘤细胞中, H3K4 甲基化和 MYC 表达水平下调, 导致 KDM1A 的表达水平下降从而提高耐药细胞株的敏感性^[66]。肿瘤细胞可以通过 AKT1 和 RAD52 等分子对放疗产生耐药性, Liang 等^[67]发现放疗后乳腺癌细胞中 miR-302 表达量下调, 且与 AKT1 和 RAD52 表达成负相关。进一步研究发现, miR-302a 可以抑制 AKT1 和 RAD52 的表达从而促进肿瘤细胞对放疗的敏感性。Farehd 等^[6]报道 miR-302/367 在胶质瘤中靶向抑制 CXCR4 的转录, 使得胶质瘤起始细胞 (Glioma-initiating cells, GICs) 干性标志物表达水平、自我更新能力和肿瘤浸润能力显著下降。Yang 等^[68]在神经胶质瘤细胞株 U87MG 中过表达 miR-302/367, 可促进神经分化相关基因的表达, 下调 PI3K/AKT 和 STAT3 信号, 从而抑制细胞克隆形成、肿瘤生成和转移, 达到“deprogram”肿瘤细胞的目的。也有研究者在不同的研究体系中得出了相反的结果。Bourguignon 等^[69]发现 miR-302 在头颈鳞癌干细胞功能维持中具有重要调控作用。OCT4-SOX2-Nanog 信号诱导 miR-302 的表达, miR-302 可以靶向抑制 KDM1A/B 和 DNMT1 (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1) 的

表达, 同时, 上调细胞存活相关蛋白 (baculoviral IAP repeat containing 2, BIRC2; X-linked inhibitor of apoptosis, E3 ubiquitin protein ligase, XIAP) 的表达。ASCL2 (achaete scute-like 2) 是一个碱性螺旋-环-螺旋转录因子, 与小肠干细胞“干性”密切相关。ASCL2 可以上调结肠癌前体细胞 miR-302b 的表达; 在结肠癌前体细胞中干扰 ASCL2 的同时, 过表达 miR-302b 可以恢复结肠癌前体细胞的成球能力, 部分“干性”相关基因表达出现上调, 同时, 细胞的克隆形成、迁移和侵袭能力均增强^[70]。上述研究表明, miR-302/367 家族在不同细胞类型和肿瘤中通过不同的机制发挥着重要的调控作用。

3 miR-302/367与免疫

巨噬细胞源性泡沫细胞的形成是动脉粥样硬化的一个典型特征。Meiler 等^[71]报道, miR-302a 可以影响胆固醇稳态和动脉粥样硬化的形成。低密度脂蛋白处理原代巨噬细胞后, miR-302a 明显变化。过表达 miR-302a 可以显著下调胆固醇与载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A-I, APOA1) 的结合, 从而降低了高密度脂蛋白形成。荧光素酶等实验证实 ABCA1 (ATP-binding cassette, sub-family A, member 1) 是 miR-302a 作用靶点。给予抗 miR-302a 治疗, 可以明显上调小鼠高密度脂蛋白的表达水平、下调动脉粥样硬化板块的形成以及稳定其板块形态。此研究表明, miR-302a 可能是胆固醇释放的调节器和动脉粥样硬化的治疗靶点。

本课题组在研究中首次发现, miR-302/367 家族在呼吸系统细菌感染引发的宿主抗感染免疫反应过程中也具有重要的调控作用^[72]。条件致病菌铜绿假单胞杆菌感染肺泡巨噬细胞和上皮细胞后, TLR/NF- κ B 信号通路诱导 miR-302b 的表达, miR-302b 反过来负反馈调控 TLR 信号通路, 抑制由 TLR 触发的促炎细胞因子生成, 从而维持了适度免疫反应的平衡。作为 miR-302 家族的代表, miR-302b 可以通过显著抑制 IRAK4 (interleukin-1 receptor-associated kinase 4) 的 mRNA 和蛋白表达来影响细菌感染后的细胞和小鼠免疫反应。生物信息学分析和实验结果表明, IRAK4 是 miR-302b 的功能靶点, miR-302b 与 IRAK4 的表达具有一定的时空依赖性。另外, miR-302 家族其他 5 个成员在 IRAK4 mRNA 序列上具有相同的种子序列, 实验结果表明, miR-302 家族除 miR-302b 外的其他成员也具有类似的功能活性。本课题组的研究提供了一个新的细菌感染免

疫机制模型, 可为寻找新的细菌感染免疫治疗策略和方法提供新思路。

4 miR-302/367与其他疾病

尽管 miR-302/367 被报道主要在干细胞和肿瘤方面具有重要的调控作用, 但不断有研究者发现 miR-302/367 可能广泛参与了多种疾病的发生发展过程。

近年研究显示, 颗粒物污染与心血管病发病率和死亡率密切相关, 颗粒物大气污染已被明确提出是心血管疾病的一个可控制的独立危险因素。Bollati 等^[73] 研究证实体内、体外模型中, 颗粒物处理后可以显著提高血浆和细胞培养上清中 miR-302c 的表达, 并进一步分析发现 miR-302c 与冠状动脉疾病、心肌肥大和心力衰竭相关信号通路有关。

子宫内膜异位是一种妇科常见疾病。Lin 等^[74] 研究发现, IL-1、TNF- α 和 TGF- β 可以诱导 miR-302a 的表达, miR-302a 靶向作用于 NR2F2 并抑制 NR2F2 的表达, NR2F2 与 COX-2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2/COX-2) 的启动子区域结合抑制 COX-2 表达, NR2F2 表达水平下降后导致 COX-2 表达升高, 促进了子宫内膜异位的发生。

脂肪形成是从脂肪来源间充质干细胞分化为脂肪前体细胞, 再分化为作为脂肪仓库的脂肪细胞的生物学过程, 脂肪组织功能出现障碍可以导致肥胖和 2 型糖尿病。现有研究显示, PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) 在脂肪前体细胞转化为脂肪细胞的过程中起着关键的作用^[75]。Jeong 等^[76] 研究发现, miR-302a 在脂肪细胞分化过程中表达量下调, 其可靶向抑制 PPAR γ 的表达, 从而调节脂滴的形成和脂肪细胞相关基因的表达。

转化生长因子 (transforming growth factor β , TGF β) 信号和 CTGF (connective tissue growth factor) 信号的相互作用在糖尿病性肾病进展过程中具有重要的调控作用。CTGF 重组蛋白处理肾小球系膜细胞可以诱导 miR-302 的表达, 而 miR-302d 通过靶向 TGFBR2 抑制 TGF β 诱导的上皮间质转化进程、纤连蛋白和血栓黏合素的表达。miR-302 是两条信号通路相互作用的一条纽带^[77]。

慢性酒精中毒可导致神经细胞死亡, 进而引发脑萎缩和认知障碍。Yadav 等^[78] 研究发现乙醇处理细胞使得 miR-302b 显著升高, 过表达 miR-302b 后其作用靶点 CCND2 表达水平下降, 使得 caspase 3 介导的神经细胞凋亡水平升高。

5 总结与展望

作为生物医学研究的新兴分支领域, miRNA 这 10 多年来获得了令人瞩目的关注, 也取得了快速的发展。现有研究显示, miRNAs 在不同疾病的不同阶段具有不同的表达模式, 这使得特异的 miRNAs 可能成为相关疾病潜在的早期诊断、预后标志物和治疗新靶点。目前 miRNA 临床研究已初步取得一些阶段性重要成果, 现有 200 多项 miRNAs 相关的针对肿瘤、心血管疾病、神经系统疾病等疾病的临床研究正在开展过程中 (<https://clinicaltrials.gov/>)。世界上首个进入临床的 microRNA 药物 miravirsen 治疗 HCV 感染的 II 期临床结果显示, 这种新型治疗方法在功效及安全性方面令人鼓舞^[79]。2013 年, 首个 miRNAs 模拟物药物 MRX34 也已进入 I 期临床试验阶段, 用于治疗早期肝癌和肝脏相关的癌症转移患者^[80]。由此可见, miRNAs 将是今后重大疾病治疗发展的重要方向和研究热点。

随着对 miR-302/367 调控机制和功能研究的深入, 研究者逐渐认识到 miRNAs 在生命活动过程中处于基因表达调控的核心位置, 其与 RNA 结合蛋白、编码 RNAs 和其他非编码 RNAs 分子相互作用组成了一个极其复杂的分子调控网络。目前, 对 miR-302/367 的功能、作用机制以及在疾病发展过程中的作用尚未完全阐明。miR-302/367 在不同疾病模型和同一模型不同时间阶段中的表达量如何被调节; 位于同一表达簇上的不同成员表达水平为什么不相同或不同步; 如何通过不同作用靶点来发挥作用, 甚至具有相反的作用机制; miR-302/367 如何与其他分子相互调控发挥作用, 这些问题实际上也是所有 miRNAs 研究仍需探讨的问题。可以预见, 科研人员对 miR-302/367 调控网络的了解将会越来越深入。期待在对 miR-302/367 作用分子机制充分研究的基础上, 发掘其潜在临床应用价值, 通过大样本、多中心的研究数据确定其应用前景, 转化为特异的生物学标志物或治疗靶点, 从而有力推动 miRNAs 在重大疾病的临床诊断与治疗领域中的广泛应用。

[参 考 文 献]

- [1] O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30: 295-312
- [2] Li Z, Rana TM. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov*,

- 2014, 13(8): 622-38
- [3] McManus DD, Freedman JE. MicroRNAs in platelet function and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, 2015, [Epub ahead of print]
- [4] Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, et al. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(5): 443-8
- [5] Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet*, 2008, 40(12): 1478-83
- [6] Fareh M, Turchi L, Virolle V, et al. The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. *Cell Death Differ*, 2012, 19(2): 232-44
- [7] Lin SL, Chang DC, Chang-Lin S, et al. Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA*, 2008, 14(10): 2115-24
- [8] Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell*, 2003, 5(2): 351-8
- [9] Suh MR, Lee Y, Kim JY, et al. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol*, 2004, 270(2): 488-98
- [10] Barroso-delJesus A, Romero-Lopez C, Lucena-Aguilar G, et al. Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(21): 6609-19
- [11] Card DA, Hebbbar PB, Li L, et al. Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(20): 6426-38
- [12] Zhang Z, Xiang D, Wu WS. Sodium butyrate facilitates reprogramming by derepressing OCT4 transactivity at the promoter of embryonic stem cell-specific miR-302/367 cluster. *Cell Reprogram*, 2014, 16(2): 130-9
- [13] Hu W, Zhao J, Pei G. Activation of aryl hydrocarbon receptor (ahr) by tranilast, an anti-allergy drug, promotes miR-302 expression and cell reprogramming. *J Biol Chem*, 2013, 288(32): 22972-84
- [14] Foja S, Jung M, Harwardt B, et al. Hypoxia supports reprogramming of mesenchymal stromal cells via induction of embryonic stem cell-specific microRNA-302 cluster and pluripotency-associated genes. *Cell Reprogram*, 2013, 15(1): 68-79
- [15] Brautigam C, Raggioli A, Winter J. The Wnt/ β -catenin pathway regulates the expression of the miR-302 cluster in mouse ESCs and P19 cells. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75315
- [16] Wang J, Park JW, Drissi H, et al. Epigenetic regulation of miR-302 by JMJD1C inhibits neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2014, 289(4): 2384-95
- [17] Lipchina I, Elkabetz Y, Hafner M, et al. Genome-wide identification of microRNA targets in human ES cells reveals a role for miR-302 in modulating BMP response. *Genes Dev*, 2011, 25(20): 2173-86
- [18] Kang H, Louie J, Weisman A, et al. Inhibition of microRNA-302 (miR-302) by bone morphogenetic protein 4 (BMP4) facilitates the BMP signaling pathway. *J Biol Chem*, 2012, 287(46): 38656-64
- [19] Kang IH, Jeong BC, Hur SW, et al. MicroRNA-302a stimulates osteoblastic differentiation by repressing COUP-TFII expression. *J Cell Physiol*, 2015, 230(4): 911-21
- [20] Wade SL, Langer LF, Ward JM, et al. MiRNA-mediated regulation of the SWI/SNF chromatin remodeling complex controls pluripotency and endodermaldifferentiation in human ESCs. *Stem Cells*, 2015, 33(10): 2925-35
- [21] Pernaute B, Spruce T, Smith KM, et al. MicroRNAs control the apoptotic threshold in primed pluripotent stem cells through regulation of BIM. *Genes Dev*, 2014, 28(17): 1873-8
- [22] Kim JY, Shin KK, Lee AL, et al. MicroRNA-302 induces proliferation and inhibits oxidant-induced cell death in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1385
- [23] Zhang Z, Hong Y, Xiang D, et al. MicroRNA-302/367 cluster governs hESC self-renewal by dually regulating cell cycle and apoptosis pathways. *Stem Cell Rep*, 2015, 4(4): 645-57
- [24] Greene ND, Copp AJ. Neural tube defects. *Annu Rev Neurosci*, 2014, 37: 221-42
- [25] Parchem RJ, Moore N, Fish JL, et al. miR-302 is required for timing of neural differentiation, neural tube closure, and embryonic viability. *Cell Rep*, 2015, 12(5): 760-73
- [26] Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(6): 633-8
- [27] Zhang Z, Xiang D, Heriyanto F, et al. Dissecting the roles of miR-302/367 cluster in cellular reprogramming using TALE-based repressor and TALEN. *Stem Cell Rep*, 2013, 1(3): 218-25
- [28] Parchem RJ, Ye J, Judson RL, et al. Two miRNA clusters reveal alternative paths in late-stage reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(5): 617-31
- [29] Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(4): 376-88
- [30] Ghasemi-Kasman M, Hajikaram M, Baharvand H, et al. MicroRNA-mediated *in vitro* and *in vivo* direct conversion of astrocytes to neuroblasts. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0127878
- [31] Lee MR, Prasain N, Chae HD, et al. Epigenetic regulation of NANOG by miR-302 cluster-MBD2 completes induced pluripotent stem cell reprogramming. *Stem Cells*, 2013, 31(4): 666-81
- [32] Rosa A, Brivanlou AH. A regulatory circuitry comprised of miR-302 and the transcription factors OCT4 and NR2F2 regulates human embryonic stem cell differentiation. *EMBO J*, 2011, 30(2): 237-48
- [33] Barroso-delJesus A, Lucena-Aguilar G, Sanchez L, et al. The Nodal inhibitor Lefty is negatively modulated by the microRNA miR-302 in human embryonic stem cells.

- FASEB J, 2011, 25(5): 1497-508
- [34] Hu S, Wilson KD, Ghosh Z, et al. MicroRNA-302 increases reprogramming efficiency via repression of NR2F2. *Stem Cells*, 2013, 31(2): 259-68
- [35] Lin SL, Chang DC, Lin CH, et al. Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(3): 1054-65
- [36] Lee NS, Kim JS, Cho WJ, et al. miR-302b maintains "stemness" of human embryonal carcinoma cells by post-transcriptional regulation of Cyclin D2 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(2): 434-40
- [37] Jamshidi-Adegani F, Langroudi L, Shafiee A, et al. Mir-302 cluster exhibits tumor suppressor properties on human unrestricted somatic stem cells. *Tumour Biol*, 2014, 35(7): 6657-64
- [38] Lin SL, Ying SY. Mechanism and method for generating tumor-free iPS cells using intronic microRNA miR-302 induction. *Methods Mol Biol*, 2013, 936: 295-312
- [39] Lin SL, Chang DC, Ying SY, et al. MicroRNA miR-302 inhibits the tumorigenicity of human pluripotent stem cells by coordinate suppression of the CDK2 and CDK4/6 cell cycle pathways. *Cancer Res*, 2010, 70(22): 9473-82
- [40] Zhang GM, Bao CY, Wan FN, et al. MicroRNA-302a suppresses tumor cell proliferation by inhibiting AKT in prostate cancer. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124410
- [41] Sun S, Zhang G, Wu Z, et al. MicroRNA-302a functions as a putative tumor suppressor in colon cancer by targeting Akt. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115980
- [42] Cai N, Wang YD, Zheng PS. The microRNA-302-367 cluster suppresses the proliferation of cervical carcinoma cells through the novel target AKT1. *RNA*, 2013, 19(1): 85-95
- [43] Guo T, Yu W, Lv S, et al. MiR-302a inhibits the tumorigenicity of ovarian cancer cells by suppression of SDC1. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 4869-80
- [44] Liang Z, Bian X, Shim H. Inhibition of breast cancer metastasis with microRNA-302a by downregulation of CXCR4 expression. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 146(3): 535-42
- [45] Liu L, Lian J, Zhang H, et al. MicroRNA-302a sensitizes testicular embryonal carcinoma cells to cisplatin-induced cell death. *J Cell Physiol*, 2013, 228(12): 2294-304
- [46] Costa FF, Seftor EA, Bischof JM, et al. Epigenetically reprogramming metastatic tumor cells with an embryonic microenvironment. *Epigenomics*, 2009, 1(2): 387-98
- [47] Zhang M, Yang Q, Zhang L, et al. miR-302b is a potential molecular marker of esophageal squamous cell carcinoma and functions as a tumor suppressor by targeting ErbB4. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33: 10
- [48] Wang L, Yao J, Zhang X, et al. miRNA-302b suppresses human hepatocellular carcinoma by targeting AKT2. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(2): 190-202
- [49] Wang L, Yao J, Shi X, et al. MicroRNA-302b suppresses cell proliferation by targeting EGFR in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. *BMC Cancer*, 2013, 13: 448
- [50] Ge T, Yin M, Yang M, et al. MicroRNA-302b suppresses human epithelial ovarian cancer cell growth by targeting RUNX1. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(6): 2209-20
- [51] Chen PH, Shih CM, Chang WC, et al. MicroRNA-302b-inhibited E2F3 transcription factor is related to all trans retinoic acid-induced glioma cell apoptosis. *J Neurochem*, 2014, 131(6): 731-42
- [52] Zhang Y, Hu H, Song L, et al. Epirubicin-mediated expression of miR-302b is involved in osteosarcoma apoptosis and cell cycle regulation. *Toxicol Lett*, 2013, 222(1): 1-9
- [53] De Cecco L, Berardi M, Sommariva M, et al. Increased sensitivity to chemotherapy induced by CpG-ODN treatment is mediated by microRNA modulation. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58849
- [54] Odenthal M, Hee J, Gockel I, et al. Serum microRNA profiles as prognostic/predictive markers in the multimodality therapy of locally advanced adenocarcinomas of the gastroesophageal junction. *Int J Cancer*, 2015, 137(1): 230-7
- [55] Zhu K, Pan Q, Jia LQ, et al. MiR-302c inhibits tumor growth of hepatocellular carcinoma by suppressing the endothelial-mesenchymal transition of endothelial cells. *Sci Rep*, 2014, 4: 5524
- [56] Leivonen SK, Makela R, Ostling P, et al. Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines. *Oncogene*, 2009, 28(44): 3926-36
- [57] Min D, Lv XB, Wang X, et al. Downregulation of miR-302c and miR-520c by 1,25(OH)2D3 treatment enhances the susceptibility of tumour cells to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Br J Cancer*, 2013, 109(3): 723-30
- [58] Li J, Guo Y, Feng X, et al. Receptor for activated C kinase 1 (RACK1): a regulator for migration and invasion in oral squamous cell carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(4): 563-71
- [59] Chen L, Min L, Wang X, et al. Loss of RACK1 promotes metastasis of gastric cancer by inducing a miRNA-302c/IL-8 signaling loop. *Cancer Res*, 2015, 75(18): 3832-41
- [60] Zhu Z, Xu Y, Zhao J, et al. miR-367 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells by targeting the Smad7-TGF-beta signalling pathway. *Br J Cancer*, 2015, 112(8): 1367-75
- [61] Zhang L, Liu Y, Song F, et al. Functional SNP in the microRNA-367 binding site in the 3'UTR of the calcium channel ryanodine receptor gene 3 (RYS3) affects breast cancer risk and calcification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(33): 13653-8
- [62] Chen N, Chon HS, Xiong Y, et al. Human cancer cell line microRNAs associated with in vitro sensitivity to paclitaxel. *Oncol Rep*, 2014, 31(1): 376-83
- [63] Mairinger FD, Ting S, Werner R, et al. Different micro-RNA expression profiles distinguish subtypes of neuroendocrine tumors of the lung: results of a profiling study. *Mod Pathol*, 2014, 27(12): 1632-40
- [64] Costa FF, Bischof JM, Vanin EF, et al. Identification of microRNAs as potential prognostic markers in ependymo-

- ma. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25114
- [65] Miyazaki S, Yamamoto H, Miyoshi N, et al. A cancer reprogramming method using microRNAs as a novel therapeutic approach against colon cancer : Research for reprogramming of cancer cells by microRNAs. *Ann Surg Oncol*, 2014, [Epub ahead of print]
- [66] Koga C, Kobayashi S, Nagano H, et al. Reprogramming using microRNA-302 improves drug sensitivity in hepatocellular carcinoma cells. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21 (Suppl 4): S591-600
- [67] Liang Z, Ahn J, Guo D, et al. MicroRNA-302 replacement therapy sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation. *Pharm Res*, 2013, 30(4): 1008-16
- [68] Yang CM, Chiba T, Brill B, et al. Expression of the miR-302/367 cluster in glioblastoma cells suppresses tumorigenic gene expression patterns and abolishes transformation related phenotypes. *Int J Cancer*, 2015, 137(10): 2296-309
- [69] Bourguignon LY, Wong G, Earle C, et al. Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. *J Biol Chem*, 2012, 287(39): 32800-24
- [70] Zhu R, Yang Y, Tian Y, et al. Ascl2 knockdown results in tumor growth arrest by miRNA-302b-related inhibition of colon cancer progenitor cells. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32170
- [71] Meiler S, Baumer Y, Toulmin E, et al. MicroRNA 302a is a novel modulator of cholesterol homeostasis and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(2): 323-31
- [72] Zhou X, Li X, Ye Y, et al. MicroRNA-302b augments host defense to bacteria by regulating inflammatory responses via feedback to TLR/IRAK4 circuits. *Nat Commun*, 2014, 5: 3619
- [73] Bollati V, Angelici L, Rizzo G, et al. Microvesicle-associated microRNA expression is altered upon particulate matter exposure in healthy workers and in A549 cells. *J Appl Toxicol*, 2015, 35(1): 59-67
- [74] Lin SC, Li YH, Wu MH, et al. Suppression of COUP-TFII by proinflammatory cytokines contributes to the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(3): E427-37
- [75] Choi JH, Banks AS, Estall JL, et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by Cdk5. *Nature*, 2010, 466(7305): 451-6
- [76] Jeong BC, Kang IH, Koh JT. MicroRNA-302a inhibits adipogenesis by suppressing peroxisome proliferator-activated receptor γ expression. *FEBS Lett*, 2014, 588(18): 3427-34
- [77] Faherty N, Curran SP, O'Donovan H, et al. CCN2/CTGF increases expression of miR-302 microRNAs, which target the TGF β type II receptor with implications for nephropathic cell phenotypes. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 23): 5621-9
- [78] Yadav S, Pandey A, Shukla A, et al. miR-497 and miR-302b regulate ethanol-induced neuronal cell death through BCL2 protein and cyclin D2. *J Biol Chem*, 2011, 286(43): 37347-57
- [79] Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med*, 2013, 368(18): 1685-94
- [80] Bouchie A. First microRNA mimic enters clinic. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(7): 577