

DOI: 10.13376/j.cblls/2016084

文章编号: 1004-0374(2016)06-0655-08



汪阳明, 北京大学分子医学研究所研究员。主要研究方向为非编码 RNA 在多能干细胞中的功能与分子机制。研究组近年来的工作系统解析了 miR-294/302 家族对胚胎干细胞自我更新、糖酵解代谢及原始态多能性退出过程的调控作用和分子机制。发现: (1) miR-294/302 抑制 Rb 家族蛋白, 导致胚胎干细胞如同癌细胞一样, 在生长因子缺失或接触抑制的情况下仍然强劲生长 (*Cell Rep*, 2013); (2) miR-294/302 通过抑制表观遗传调控因子 Mbd2 上调 Myc 等基因的表达, 从而促进胚胎干细胞的糖酵解代谢效率 (*EMBO J*, 2015); (3) miR-294/302 通过对上皮-间充质转化通路和细胞凋亡通路的共抑制促进胚胎干细胞的自我更新, 首次揭示了 miRNA 可以通过靶标抑制的协同效应起作用 (*Cell Death Differ*, 2015); (4) miR-294/302 通过调控 ERK 和 AKT 通路的活性促进多能干细胞由原始态 (Naive) 向始发态 (Prime) 转变 (*Cell Res*, 2016)。

胚胎干细胞中微小RNA功能与机制研究进展

王绍华, 汪阳明*

(北京大学分子医学研究所, 北京 100871)

摘要: 胚胎干细胞自问世之初便承载了人们对于治疗各种疾病的期望。其来源于早期胚胎发育囊胚的内细胞团, 这些细胞具有快速增殖和分化为所有其他体细胞的特性。由于这些特性, 胚胎干细胞必须被小心加以控制才不至于在治疗过程中产生不受限制的生长 (即致瘤性) 和不必要的细胞污染。控制胚胎干细胞的增殖和分化的前提是人们尽可能多地掌握其内在调控的关键分子机制。对胚胎干细胞的增殖和分化的调控发生在多个层面, 包括细胞信号通路、染色质高级结构、转录因子、微小 RNA 和长非编码 RNA。简要综述胚胎干细胞中微小 RNA 的调控功能和机制研究进展, 并展望这一领域未来的发展方向。

关键词: 胚胎干细胞; 微小 RNA; 自我更新; 细胞周期; 代谢

中图分类号: Q522; Q253

文献标志码: A

MicroRNA as important regulators in embryonic stem cells

WANG Shao-Hua, WANG Yang-Ming*

(Institute of Molecular Medicine, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Embryonic stem cells (ESCs) hold great promises for regenerative medicine that may cure a variety of diseases including diabetes and neurodegenerative diseases. Derived from the inner cell mass of preimplantation blastocyst, this cell culture artifact can undergo rapid self-renewal indefinitely while keeping the ability to differentiate into any cells in the body. The key to harness their potential for regenerative medicine is to control their proliferation and differentiation. For this reason we need to understand the molecular mechanisms governing the self-renewal and differentiation of ESCs. Multiple layers of regulation imposed by signaling pathways, chromatin

收稿日期: 2015-09-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471222)

*通信作者: E-mail: yangming.wang@pku.edu.cn

modifications and high-order chromatin structures, transcription factors, microRNAs and large noncoding RNAs have been shown to be important for the self-renewal and differentiation of ESCs. In this short review, we will briefly summarize the current understanding of microRNA functions in ESCs, we will also discuss the major future directions of the field.

Key words: embryonic stem cells; microRNAs; self-renewal; cell cycle; metabolism

胚胎干细胞是从囊胚期胚胎的内细胞团分离得到的干细胞,其最主要的特性为自我更新和多能性,前者指可以无限增殖的能力,后者指可以分化成三个胚层中所有体细胞的能力 (<http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics3.aspx>)。因为可以作为模拟早期胚胎发育的细胞模型,并为再生医学提供细胞材料,胚胎干细胞的研究从其发现伊始便得到持续的重视。无论是自我更新还是分化,胚胎干细胞都受到严密而有序分子调控网络的调控。这些调控网络涵盖信号通路、转录因子和表观遗传调控因子如 DNA 甲基化和组蛋白修饰。近些年来研究又发现,非编码 RNA 特别是微小 RNA 在胚胎干细胞的自我更新和分化中起着重要的作用。

Ambros 和 Ruvkun 课题组在 1993 年发现 *lin-4* 这个小 RNA 可以通过调控蛋白基因的表达来影响线虫发育^[1-2],第一次揭示了有生物学功能的微小 RNA 的存在。之后 *let-7*^[3] 及其在哺乳动物中的同源物^[4] 的发现进一步揭示了微小 RNA 可能在包括人类在内的多种生命体中具有重要作用。事实上,在海绵动物 (Poriferans) 和腔肠动物 (Cnidarians) 这些低等的简单多细胞生物^[5] 中就已经出现了微小 RNA,并一直进化保留到高等动物中。许多微小 RNA 在跨物种之间具有高度的保守性,如线虫中约 55% 的微小 RNA 都可以在人类中找到相应的同源基因^[6]。成熟的微小 RNA 通常是 22 nt 的单链 RNA,它们通过碱基配对的方式与 mRNA 相结合,进而抑制 mRNA 的翻译或者介导 mRNA 去腺苷化直至降解^[7]。一个微小 RNA 可能调控很多个 mRNA,一个 mRNA 也可能受多个微小 RNA 调控,在哺乳动物中超过 60% 的蛋白基因受到微小 RNA 的调控^[8-9],因而微小 RNA 几乎参与包括发育和疾病在内的所有生命活动过程。本文就胚胎干细胞中的微小 RNA 及其作用进行综述,与这些研究相关的诱导多能干细胞重编程过程中的微小 RNA 的作用参看本课题组以前发表的综述^[10],此处不再赘述。

1 微小RNA的生物合成途径

微小 RNA 在基因组上位置较为多样,既可以

在蛋白编码基因内,也可以在非编码 RNA 上,既可以在外显子上,也可以在内含子中。大约 50% 的微小 RNA 在基因组上和其他微小 RNA 距离很近,它们组成一个家族,转录产生一个多顺反子转录本 (miRNA cluster)。植物和动物独立演化出各自的微小 RNA 系统,本文主要讲述动物中的微小 RNA 合成途径^[11-12]。在动物中,绝大部分的微小 RNA 由 RNA 聚合酶 II 转录产生,它们位于一个含有颈环结构的 pri-miRNA 的转录本中; pri-miRNA 在核内被 III 型核糖核酸酶 Drosha 及其辅助因子 DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) 所组成的 Microprocessor 复合物加工剪切,释放出拥有发卡结构的 pre-miRNA。这一过程一般被认为是共转录的,即与转录是同时发生的。pre-miRNA 形成后,经由转运蛋白 Exportin5 转运出核,在细胞质中由另一个 III 型核糖核酸酶 Dicer 在辅助因子 TRBP/PACT 的帮助下进一步加工剪切而形成约 22 nt 的双链配对微小 RNA。双链微小 RNA 中的其中一条即向导链 (guide strand) 将进入 Argonaut (Ago) 所在的 RISC 复合物 (RNA-induced silencing complex) 成为成熟的微小 RNA,而另一条 passenger strand 则通常被降解。成熟微小 RNA 5' 端 2~8 位的碱基对于其识别靶标 mRNA 至关重要,因而被称为种子序列^[7]。除了极少数的例外情况^[13],微小 RNA 一般借助种子序列与其靶标 mRNA 配对,并引导 RISC 复合物的结合,进而在转录后水平调控靶标 mRNA: 首先抑制其翻译,进而降解靶标 mRNA^[14]。微小 RNA 在 mRNA 上的结合区域主要为 3' 非翻译区 (3'UTR)^[7],但是近年也发现了通过 5'UTR^[15] 和 CDS 区^[16] 发挥作用的例子。除了经典的抑制基因表达的作用,微小 RNA 也被发现可以作为翻译激活因子^[17] 和转录调控因子^[18] 以及作为蛋白质的拮抗剂^[19] 而发挥作用。

以上描述的是经典的微小 RNA 生成途径,大多数的微小 RNA 通过这一途径生成,然而还有很多微小 RNA 可以通过其他途径产生。比如一些和 Alu 重复序列相关的微小 RNA 可以由 RNA 聚合酶 III 转录产生^[20]。另外一些位于内含子的被称为

Mirtron 的微小 RNA 前体被剪切复合体剪切后自己即可形成发夹结构, 因而不需要 Microprocessor 的加工^[21]。而 pre-miRNA-451 可以不用 Dicer 的加工而直接由 Ago2 加工成为成熟的微小 RNA^[22]。

2 胚胎干细胞中的微小RNA表达及调控

微小 RNA 的表达受到精细而复杂的调控, 不同的细胞拥有不同的微小 RNA 表达谱。在胚胎干细胞中, 核心转录因子, 如 Oct4、Sox2、Nanog 和 Tcf3 会结合到一些微小 RNA 基因的启动子区域, 进而激活或者抑制微小 RNA 的表达^[23]。同时, miR-290 家族的启动子受到超级增强子的调控而呈极高表达状态。胚胎干细胞也调控 miRNA 转录后加工成熟的过程。微小 RNA *let-7* 在分化的体细胞中高表达但在胚胎干细胞中的表达量很低, 有意思的是它们的前体 *pri-let-7* 在胚胎干细胞中的表达量与分化细胞中的表达量相当, 这是因为 Lin28-Zcchc11-Dis3l2 通路抑制了胚胎干细胞中 *pri-let-7* 的成熟^[24]。目前对微小 RNA 的生物合成途径调控方面的研究还不是很完善, *let-7* 生成调控方面及相关的研究成果显示, 这方面的研究不仅可以帮助人们发展方法调控微小 RNA 来控制细胞的行为, 而且也可能像 Lin28 的研究一样开启一个全新的研究方向。

受这些精细的调控, 胚胎干细胞具有一个独特的 miRNA 表达谱。多个课题组通过高通量测序检测了小鼠胚胎干细胞^[25]、小鼠上胚层干细胞^[26] 和人胚胎干细胞^[23, 27] 等多能干细胞的微小 RNA 表达谱。每种细胞中大约有几百种微小 RNA 的表达量在 10 个拷贝以上。有趣的是, 几乎每种细胞都有一个或者几个微小 RNA 家族占主导地位 (即表达量占总微小 RNA 表达量的一半以上)。在所有多能干细胞中, 拥有 AAGUGCU 或者 AAAGUGC 种子序列的超家族的表达量是最高的。在小鼠胚胎干细胞中, 来源于 miR-290 和 miR-302 家族的多个微小 RNA 具有 AAGUGCU 种子序列, 而来源于 miR-17 和 miR-106 家族的多个微小 RNA 具有 AAAGUGCU 种子序列。miR-290 家族在小鼠胚胎干细胞中表达量最高, 几乎占到了所有微小 RNA 的一半以上, 并随着分化而降低。敲除 miR-290 家族后, 小鼠在胚胎期部分死亡, 而存活下来的雌性小鼠不孕^[28]。miR-302 家族则在人胚胎干细胞和小鼠上胚层干细胞中表达量最高, 同样占到了微小 RNA 总量的 60% 以上。它们被报道对多个生物学过程起重要的

调控作用, miR-302 敲除小鼠在神经系统分化上表现出多种缺陷^[29]。由于种子序列相同, miR-290 和 miR-302 之间有功能上的冗余性, 因此, miR-290/302 双敲除的小鼠有很明显的胚胎致死表型, 比其中任何一个微小 RNA 单敲除的表型都剧烈。miR-17、miR-106b 家族在多种组织以及癌症中均高表达, miR-17 家族敲除的小鼠围产期死亡, miR-106b 家族敲除的小鼠没有明显的缺陷, 但是 miR-17 和 miR-106b 双敲除的细胞在 E15.5 之前即胚胎致死, 这些研究证明了它们之间也存在冗余性^[30]。值得一提的是, 具有 AAGUGCU 种子序列的微小 RNA 在低等的脊椎动物, 如斑马鱼和爪蟾的早期胚胎中, 也高表达并有重要的生物学功能, 而在更低等的生物中则不表达, 表明这类微小 RNA 可能与脊椎动物的起源有关^[31]。

3 微小RNA通过多种途径调控胚胎干细胞

早期研究发现, 微小 RNA 生成途径相关的酶在胚胎发育中具有重要作用。Dgcr8 敲除的小鼠在 E6.5 就表现出严重的畸形, 在 E10 就已经检测不到胚胎了, 说明 DGCR8 的缺失会导致早期胚胎致死^[32]。而 DGCR8 敲除的胚胎干细胞也表现出细胞增殖变慢、诱导分化时分化延迟等缺陷。小鼠 Dicer 敲除在 E8.5 之前就导致胚胎死亡^[33]。Dicer 敲除的胚胎干细胞同样也表现出细胞增殖变慢、不能正常分化等缺陷, 表型比 DGCR8 敲除的胚胎干细胞更为严重; 而且, 其着丝粒附近重复序列的表观遗传调控受损^[34-35]。Ago2 敲除的小鼠同样在 E7.5 之前即表现出胚胎致死^[36], 而 Ago1~4 全敲除的胚胎干细胞也表现出细胞增殖变慢、诱导分化时分化延迟等缺陷^[37]。这些都说明, 微小 RNA 对于胚胎早期发育和胚胎干细胞的维持与分化具有非常重要的作用。这些敲除细胞的表型指引了胚胎干细胞中微小 RNA 的研究方向, 下面将具体讲述和各表型相关的微小 RNA 调控。

3.1 微小RNA对胚胎干细胞的细胞周期的调节

正常的细胞周期由 G₁/S/G₂/M 期组成, 其调控主要由 cyclin dependent kinase (Cdk) 控制。不同时期不同的 Cdk 表现出活性, 调控相应的 E2F 转录因子, 从而调控相关基因的表达, 以保证正常细胞周期的进行。和体细胞相比, 胚胎干细胞具有独特的细胞周期。胚胎干细胞几乎不具有 G₁/S restriction point, 从而促使其迅速从 G₁ 期进入 S 期, 导致其 G₁ 期很短, 以此确保其快速增殖。微小 RNA 对此

具有重要的调控作用。Dgcr8^[32]、Dicer1^[34]和Ago1-4^[37]敲除的胚胎干细胞都表现出细胞增殖变慢、细胞周期增长、聚集在G₁期的细胞增多等特点。本课题组将约260个微小RNA转染到DGCR8敲除的细胞中,筛选出了14个微小RNA可以回复这种增殖缺陷^[38]。而这14个微小RNA中的11个都具有种子序列AAGUGCU或者AAAGUGC,且都是在胚胎干细胞中高表达的微小RNA,其中miR-290家族表达量最高。通过靶标预测和双荧光报告体系证明,这些胚胎干细胞细胞周期调控微小RNA可以直接作用于p21/Rbl2/Lats2这三个G₁期向S期转换的抑制性调控因子,从而促进G₁期向S期的转换。在DGCR8和Rb家族敲除的胚胎干细胞中,本课题组进一步证明,miR-290/302在正常情况下通过不依赖于Rb家族的方式促进G₁期向S期的转变,而在营养缺陷和细胞接触抑制时通过依赖于Rb家族的方式抑制胚胎干细胞在G₁期的聚集来促进细胞增殖^[39]。与小鼠胚胎干细胞相似,在人胚胎干细胞中敲低Dicer或者Drosha也会导致细胞生长变慢,而加入miR-372或者miR-195可以修复此缺陷^[40]。miR-372是miR-290在人类中的同系物,也可以直接靶向p21。而miR-195则靶向CyclinB/CDK复合物的抑制性调控蛋白Wee1,从而促进G₂期向M期的转换。另外,在人胚胎干细胞中转染anti-miR-92b会导致p57蛋白的升高^[41],这说明miR-92b可以通过抑制p57促进G₁期向S期的转变。类似地,在人胚胎干细胞中通过反义RNA干扰miR-302会增加G₁期细胞的聚集^[42],而用TALE-KRAB [transcription activator-like effector (TALE)-based transcriptional repressor]抑制miR-302的表达也会导致细胞聚集在G₀/G₁期,并且生长变慢^[43]。多个课题组的研究表明,miR-302可以通过多个靶标来调控胚胎干细胞细胞周期,如cyclin D1^[42]、p21^[44]。有意思的是,Dicer1敲除的细胞比Dgcr8敲除的细胞增殖速度更慢,在G₁期的聚集也更多^[45]。其可能的原因之一是,Dicer除了参与微小RNA的生成,还参与siRNA的生成;另一种可能的解释是,一些不依赖于Dgcr8但是依赖于Dicer加工的非经典微小RNA,如miR-320和miR-702对细胞周期也具有调控作用。事实上,将这两个微小RNA加入到Dicer敲除的细胞中,其细胞增殖速度和G₁期细胞比例都恢复到Dgcr8敲除细胞的水平。进一步靶标验证说明,它们可以直接作用于p21和p57以调控细胞周期。

3.2 微小RNA通过调节信号通路控制胚胎干细胞命运

胚胎干细胞具有独特的信号通路系统,一些微小RNA可以通过调控信号通路来调控胚胎干细胞的命运。NF- κ B信号通路可以通过促进EMT (epithelial to mesenchymal transition)导致胚胎干细胞分化,在胚胎干细胞中过表达NF- κ B会导致其向中胚层分化。而miR-290家族可以直接靶向NF- κ B的一个亚基p65^[46],这可能对于保持胚胎干细胞的多能性具有重要作用。Wnt信号通路在胚胎发育、细胞分化以及组织器官形态发生中起着重要的作用。miR-290家族被报道也可以直接靶向Wnt通路的抑制剂DKK1,从而促进Wnt信号以维持胚胎干细胞的自我更新^[47]。与此一致,在癌症细胞中同样发现miR-372家族可以靶向DKK1^[48]。

TGF- β 超家族是一类重要的细胞因子,对细胞的增殖、分化、发育和凋亡等多种生命活动具有重要调节作用,包含接近40个成员,根据氨基酸序列的相似性可以分为4类:TGF- β s、活化素(activin)和抑制素(inhibins)、骨形态发生蛋白(BMP),以及其他组分散成员。Nodal/Activin信号通路对于各胚层的分化具有重要作用。此信号通路包括激活剂Nodal和抑制剂Lefty。Nodal信号抑制胚胎干细胞向神经外胚层分化而促进其向中胚层分化,Lefty则相反。Rosa等^[31]证明,在人胚胎干细胞中,miR-302可以直接靶向Lefty,从而促进Nodal信号,进而抑制人胚胎干细胞向神经外胚层的分化。而有意思的是,miR-302在斑马鱼中的同源基因miR-430^[49]以及爪蟾中的同源基因miR-427都是既靶向Lefty也靶向Nodal,以此平衡Nodal信号通路。从斑马鱼到哺乳动物,这种调控方式的改变是否对物种进化也有意义尚未可知。Betel课题组通过AGO2的PAR-CLIP (photoactivatable ribonucleoside-enhanced cross-linking and immunoprecipitation),在人胚胎干细胞中一共找到了146个miR-302的靶标^[44],其中就包括Lefty1/2;同时还包括Tob2、Dazap2和Slain1,而它们都可以抑制BMP信号通路。这些靶标很好地解释了miR302还可以通过促进BMP信号抑制人胚胎干细胞向神经的分化。Zhang课题组发现,miR-200也可以通过靶向另一个BMP信号通路的抑制剂ZEB来抑制胚胎干细胞向神经的分化^[50]。同时,他们还发现,miR-96可以直接靶向神经分化决定性转录因子PAX6。PAX6在神经分化中可以激活一系列神经分化因子的表达,从而促

进神经外胚层的分化。与之相似的是, 在小鼠胚胎干细胞中, miR-290 家族也被证明可以直接靶向 PAX6^[51]。另一个神经分化的激活因子 NR2F2 也被证明是 miR-302 的靶标^[52]。由此可以看出, 微小 RNA 可以通过参与重要细胞信号通路来调控干细胞的自我更新和分化。

TGF- β 信号通路对于修复 DNA 损伤也有重要作用。胚胎干细胞快速的自我增殖导致基因组长时间处于复制的过程中, 且缺乏检测点, 这可能导致胚胎干细胞拥有更多的 DNA 损伤。而事实上, 胚胎干细胞也的确拥有更高频率的 DSB 和 SSB。所幸, miR-590 可以直接靶向 Acvr2a 而调节 TGF- β 信号通路的活性, 并以此促进 Rad51b 的活性^[53], 从而促进胚胎干细胞对 DSB 和 SSB 的修复, 并减慢胚胎干细胞的增殖速度。但 miR-590 在胚胎干细胞中的这种作用还需要进一步的验证, 毕竟 miR-590 在胚胎干细胞中的表达量并不高。

3.3 微小RNA调控胚胎干细胞的分化

Dicer1^[35] 和 Dgcr8^[32] 敲除的细胞不能有效地进行分化, 体外诱导其分化成拟胚体时, 他们的多能性基因如 Oct4 都不能正常降低, 而内胚层和中胚层的分化基因几乎不表达。造成这种现象的部分原因可能是 Dicer1 敲除的细胞中从头合成 DNA 甲基化所需要的基因 Dnmt3a 和 Dnmt3b 不能被有效激活, 从而导致包括 Oct4 启动子在内的很多基因组位点上的 DNA 甲基化缺陷^[54-55]。而将 miR-290 家族放回到 Dicer1 敲除的细胞可以有效纠正这种缺陷。有报道认为, miR-290 可以通过靶向 Rbl2 而抑制其对 Dnmt3a 和 Dnmt3b 的负调控, 从而保证细胞正常的 DNA 甲基化。但新近的研究提出了不同的观点^[56], 因此 miR-290 如何调控甲基化还尚未定论。另外有研究发现了多个诱导分化的微小 RNA^[57]: miR-134、miR-296 和 miR-470 可以直接靶向 Oct4、Sox2 和 Nanog; miR-200c、miR-183、miR-203 和 miR-145 则可以抑制 Sox2 和 Klf4; *let-7* 家族直接调控 cMyc、Lin28、Sall4; miR-125 和 miR-181 可以靶向胚胎干细胞所特有的 PRC1 的亚基 Cbx7。更为复杂的是, 最近利用 Dgcr8 敲除细胞的筛选实验显示, 多达几十种微小 RNA 可能在胚胎干细胞分化过程中起作用^[39, 58], 一个合理的解释是这些微小 RNA 可能分别调控胚胎干细胞向不同的谱系分化, 具体如何有待进一步的实验验证。

3.4 微小RNA调控胚胎干细胞的凋亡

微小 RNA 缺失的胚胎干细胞自我更新有缺陷,

除了细胞周期的影响, 另一个可能的原因是细胞凋亡的增加。Ago1~4 敲除的胚胎干细胞凋亡显著增加, 而诱导凋亡的基因 Bim 显著上升^[59]。在人胚胎干细胞中用 TALE-KRAB 抑制 miR-302 的表达, 除了出现上面提到的细胞周期的变化, 还会导致显著增加的细胞凋亡, 且这种细胞凋亡对于其降低的自我更新能力可能负有主要责任^[43]。进一步的研究证明, miR-302 可以直接靶向 BNIP3L/Nix 这个细胞凋亡诱导基因, 并上调 BCL-xL, 从而抑制人胚胎干细胞的细胞凋亡。相似地, 在小鼠胚胎干细胞中敲除 miR-290 家族, 虽然本底水平的细胞凋亡并没有增加, 但细胞遇到伽马射线或者阿霉素处理时, 凋亡显著增加^[60]。在此系统中促进细胞凋亡的 Caspase2 和 Ei24 可能是其直接的靶标。本课题组最近的实验也证明, miR-294/302 可以抑制细胞凋亡, 并以此对抗 *let-7* 而保持胚胎干细胞的自我更新^[61]。在上胚层干细胞中敲除 Dicer1, 细胞凋亡的比例也显著增加, 而转染 miR-20、miR-92、miR-302 这些具有 AAGUGCU 或 AAAGUGC 种子序列的微小 RNA 可以部分抑制细胞凋亡^[62]。

3.5 微小RNA调控胚胎干细胞的能量代谢

与很多分化细胞相比, 胚胎干细胞更倾向于利用糖酵解而非有氧呼吸进行能量代谢, 这种能量代谢的方式似乎对其多能性具有重要作用。本课题组发现, 在 Dgcr8 敲除的小鼠胚胎干细胞中, 糖酵解效率显著降低^[63], 氧化磷酸化的效率显著升高。而转染 miR-290 到 Dgcr8 敲除的细胞, 可以上调 Pkm2 和 Ldha 而促进糖酵解。进一步的研究发现, miR-290 可以抑制 Mbd2 这个抑制性转录因子, 从而促进其靶标 Myc 的表达, 而 Myc 在多个系统被证明可以促进糖酵解的发生。胚胎干细胞的代谢是目前广受关注的研究领域, 本课题组这一研究的重要发现是 Mbd2 在其中的调控作用, 事实上受 Mbd2 调控的基因至少有好几百个, 其他的基因是否参与胚胎干细胞的代谢调控是一个亟待发掘的课题。另外, 对代谢的调控是否和微小 RNA 对胚胎干细胞其他特征如细胞周期、凋亡和分化等的调控紧密联系也值得探讨。

4 展望

微小 RNA 从发现至今已历经二十多年, 胚胎干细胞中的微小 RNA 研究也即将跨越十年。尽管已有诸多发现, 但是还有很多问题尚待解决。多能性干细胞并非是一种单一的状态, 目前已发现有多

种状态的存在。比如小鼠的胚胎干细胞被认为是 naive 状态, 对应于着床前的上胚层细胞; 而人的胚胎干细胞和小鼠的上胚层干细胞被认为处于 primed 状态, 对应于着床后的上胚层细胞。它们都具有广义上的多能性, 但是具有不同的分子特性, 受到不同的调控, 在再生医学的应用中以及作为早期胚胎发育的模型各有优势^[64-65]。随着研究的继续深入, 更多精细的差别和分类也将被发现。作为重要的调控分子, 微小 RNA 对于决定不同的多能性状态是否有功能? 它们是如何起作用的? 由于这些多能性状态的很多差异表现在表观遗传状态以及转录因子的结合位点和转录复合物的成分上, 微小 RNA 是否以及如何影响这些方面的差异是一个尚未解决的问题, 亟待研究^[66]。最后, 与再生医学紧密联系的问题是, 人们是否能够利用微小 RNA 达成对胚胎干细胞最初的期望, 即用微小 RNA 促成干细胞向特有谱系, 如肝脏、心肌细胞等的分化, 或者利用微小 RNA 来纯化相关的功能细胞。对上述这些问题的研究也许将造就胚胎干细胞中的微小 RNA 研究的另一个黄金十年。

[参 考 文 献]

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75: 843-54
- [2] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993, 75: 855-62
- [3] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403: 901-6
- [4] Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 2000, 408: 86-9
- [5] Grimson A, Srivastava M, Fahey B, et al. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*, 2008, 455: 1193-7
- [6] Ibanez-Ventoso C, Vora M, Driscoll M. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS One*, 2008, 3: e2818
- [7] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136: 215-33
- [8] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 2009, 19: 92-105
- [9] Farh KK, Grimson A, Jan C, et al. The widespread impact of mammalian microRNAs on mRNA repression and evolution. *Science*, 2005, 310: 1817-21
- [10] Guo WT, Wang XW, Wang Y. Micro-management of pluripotent stem cells. *Protein Cell*, 2014, 5: 36-47
- [11] Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 126-39
- [12] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116: 281-97
- [13] Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, 2004, 304: 594-6
- [14] Gurtan AM, Sharp PA. The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *J Mol Biol*, 2013, 425: 3582-600
- [15] Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 9667-72
- [16] Tay Y, Zhang J, Thomson AM, et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 2008, 455: 1124-8
- [17] Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 2007, 318: 1931-4
- [18] Kim DH, Saetrom P, Snove O Jr, et al. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 16230-5
- [19] Eiring AM, Harb JG, Neviani P, et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*, 2010, 140: 652-65
- [20] Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13: 1097-101
- [21] Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 2007, 448: 83-6
- [22] Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, et al. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, 2010, 465: 584-9
- [23] Marson A, Levine SS, Cole MF, et al. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*, 2008, 134: 521-33
- [24] Faehnle CR, Walleshauser J, Joshua-Tor L. Mechanism of Dis3l2 substrate recognition in the Lin28-let-7 pathway. *Nature*, 2014, 514: 252-6
- [25] Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific microRNAs. *Dev Cell*, 2003, 5: 351-8
- [26] Jouneau A, Ciaudo C, Sismeiro O, et al. Naive and primed murine pluripotent stem cells have distinct miRNA expression profiles. *RNA*, 2012, 18: 253-64
- [27] Suh MR, Lee Y, Kim JY, et al. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol*, 2004, 270: 488-98
- [28] Medeiros LA, Dennis LM, Gill ME, et al. Mir-290-295 deficiency in mice results in partially penetrant embryonic lethality and germ cell defects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 14163-8

- [29] 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: 760-73
- [30] Ventura A, Young AG, Winslow MM, et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*, 2008, 132: 875-86
- [31] Rosa A, Spagnoli FM, Brivanlou AH. The miR-430/427/302 family controls mesendodermal fate specification via species-specific target selection. *Dev Cell*, 2009, 16: 517-27
- [32] Wang Y, Medvid R, Melton C, et al. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet*, 2007, 39: 380-5
- [33] Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*, 2003, 35: 215-7
- [34] Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, et al. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 12135-40
- [35] Kanelloupolou C, Muljo SA, Kung AL, et al. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*, 2005, 19: 489-501
- [36] Morita S, Horii T, Kimura M, et al. One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics*, 2007, 89: 687-96
- [37] Shekar PC, Naim A, Sarathi DP, et al. Argonaute-2-null embryonic stem cells are retarded in self-renewal and differentiation. *J Biosci*, 2011, 36: 649-57
- [38] 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: 1478-83
- [39] Wang Y, Melton C, Li YP, et al. miR-294/miR-302 promotes proliferation, suppresses G₁-S restriction point, and inhibits ESC differentiation through separable mechanisms. *Cell Rep*, 2013, 4: 99-109
- [40] Qi J, Yu JY, Shcherbata HR, et al. microRNAs regulate human embryonic stem cell division. *Cell Cycle*, 2009, 8: 3729-41
- [41] Sengupta S, Nie J, Wagner RJ, et al. MicroRNA 92b controls the G₁/S checkpoint gene p57 in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2009, 27: 1524-8
- [42] Card DA, Hebbar PB, Li L, et al. Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 2008, 28: 6426-38
- [43] 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 Reports*, 2015, 4: 645-57
- [44] 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: 2173-86
- [45] Kim BM, Choi MY. Non-canonical microRNAs miR-320 and miR-702 promote proliferation in Dgcr8-deficient embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 426: 183-9
- [46] Luningschror P, Stocker B, Kaltschmidt B, et al. miR-290 cluster modulates pluripotency by repressing canonical NF- κ B signaling. *Stem Cells*, 2012, 30: 655-64
- [47] Zovoilis A, Smorag L, Pantazi A, et al. Members of the miR-290 cluster modulate *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells. *Differentiation*, 2009, 78: 69-78
- [48] Zhou AD, Diao LT, Xu H, et al. β -catenin/LEF1 transactivates the microRNA-371-373 cluster that modulates the Wnt/ β -catenin-signaling pathway. *Oncogene*, 2012, 31: 2968-78
- [49] Choi WY, Giraldez AJ, Schier AF. Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430. *Science*, 2007, 318: 271-4
- [50] Du ZW, Ma LX, Phillips C, et al. miR-200 and miR-96 families repress neural induction from human embryonic stem cells. *Development*, 2013, 140: 2611-8
- [51] Kaspi H, Chapnik E, Levy M, et al. Brief report: miR-290-295 regulate embryonic stem cell differentiation propensities by repressing Pax6. *Stem Cells*, 2013, 31: 2266-72
- [52] 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: 237-48
- [53] Liu Q, Wang G, Chen Y, et al. A miR-590/Acvr2a/Rad51b axis regulates DNA damage repair during mESC proliferation. *Stem Cell Reports*, 2014, 3: 1103-17
- [54] Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, et al. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15: 268-79
- [55] Sinkkonen L, Hugenschmidt T, Berninger P, et al. MicroRNAs control *de novo* DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15: 259-67
- [56] Ip J, Canham P, Choo KH, et al. Normal DNA methylation dynamics in DICER1-deficient mouse embryonic stem cells. *PLoS Genet*, 2012, 8: e1002919
- [57] Rosa A, Brivanlou AH. Regulatory non-coding RNAs in pluripotent stem cells. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 14346-73
- [58] Ma Y, Yao N, Liu G, et al. Functional screen reveals essential roles of miR-27a/24 in differentiation of embryonic stem cells. *EMBO J*, 2015, 34: 361-78
- [59] Su H, Trombly MI, Chen J, et al. Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. *Genes Dev*, 2009, 23: 304-17
- [60] Zheng GX, Ravi A, Calabrese JM, et al. A latent pro-survival function for the miR-290-295 cluster in mouse embryonic stem cells. *PLoS Genet*, 2011, 7: e1002054
- [61] Guo WT, Wang XW, Yan YL, et al. Suppression of epithelial-mesenchymal transition and apoptotic pathways by miR-294/302 family synergistically blocks *let-7*-induced silencing of self-renewal in embryonic stem cells. *Cell Death Differ*, 2015, 22: 1158-69
- [62] 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: 1873-8
- [63] Cao Y, Guo WT, Tian S, et al. miR-290/371-Mbd2-Myc circuit regulates glycolytic metabolism to promote pluripotency. *EMBO J*, 2015, 34: 609-23
- [64] Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 487-92
- [65] Hackett JA, Surani MA. Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 416-30
- [66] Gu KL, Zhang Q, Yan Y, et al. Pluripotency-associated miR-290/302 family of microRNAs promote the dismantling of naive pluripotency. *Cell Res*, 2016, 26: 350-66