

miR-21 的研究进展

张英楠 汤华

【摘要】 小 RNA 或微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是内源性的非编码小 RNA, 对基因表达进行转录后的负向调控。目前已发现数以千计的 miRNA, 其中只有少数 miRNA 功能得到了确定, 而绝大部分还是未知。相对于其他生物, 人类 miRNA 功能的研究更为复杂。miR-21 是较早发现的人类 miRNA 之一, 因其较为明确的存在背景, 而成为人类 miRNA 功能研究中的重要工具。通过研究 miR-21, 人们对 miRNA 的理解不断深入。

【关键词】 小 RNA; miR-21; 靶; 反义寡核苷酸

Advance in the Research of miR-21 ZHANG Ying-nan, TANG Hua. (Tianjin Life Science Research Center, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Corresponding author: TANG Hua. E-mail: htang2002@yahoo.com

【Abstract】 miRNAs are a class of small noncoding RNAs consisting of 19-to 25- nucleotides, which negatively regulate target mRNA on post-transcriptional level. At present, more than a thousand of miRNAs have been cloned. Except some pioneer miRNAs, the function of most miRNAs still left unknown. Compared with other species, the function of human miRNA is more complex. miR-21, one of the early discovered miRNAs in human cells, over-expressed in HeLa cells, is a popular model applied in functional study of human miRNAs. By further study, we have a more extensive view on miRNAs.

【Key words】 miRNA; miR-21; Target; Antisense oligonucleotide

miRNAs 是一种广泛存在的调控基因表达的小分子 RNA, 在细胞生长、发育、代谢等重要生命过程中扮演重要角色。miRNA 发挥作用的方式是作为一种引导性分子通过碱基配对与靶 mRNA 结合从而在转录后水平引起靶 mRNA 的剪切或是翻译的抑制。1993 年 Ambros 等^[1]发现了第一个 miRNA——lin-4 并证明其对线虫的发育时序起调控作用。在过去的几年中, miRNA 在多种生物体中的存在得到不断的证实, 同时研究者用克隆、生物信息学和基因表达等手段发现了大量的未知 miRNAs, 并将它们归类编号。随着越来越多的 miRNA 不断被发现, 人们的研究焦点转移到 miRNA 的功能研究。然而, miRNA 的表达水平、分子的大小、在基因组中丰富的重复拷贝以及行使功能的方式都为研究其具体功能提出了独特的挑战。miR-21 作为人类细胞或组织中发现较早的、存在较为广泛的 miRNA, 在人类 miRNA 的功

能研究中发挥了不容忽视的作用。现将对 miR-21 的相关研究进展作一综述。

1 miR-21 及其编码基因的验证

miR-21 是由两个实验室分别独立发现的。2001 年, Lagos-Quintana 等^[2]证实了在非脊椎动物和脊椎动物中存在类似于 lin-4 和 let-7 的小 RNA, 其中已经包括 miR-21。此后, Mourelatos 等^[3,4]从人类和小鼠的神经元细胞以及人类宫颈癌细胞系 HeLa 细胞中分别检测到了 miR-21。2005 年, Fu 等^[5]的研究提示, 许多 miRNA 参与了肝细胞的基因表达。他们采用实时 PCR (real time-PCR, RT-PCR) 和 TA 克隆的方法验证了在胚胎肝组织中存在 50 种 miRNA, miR-21 又是其中之一。

miR-21 在多种生物及哺乳动物多种组织中的广泛存在, 使其生物发生、作用机制的研究方法更具普遍意义。此外, HeLa 细胞是非常有代表性的人类肿瘤细胞系, 具备了肿瘤细胞的多种重要特性, 可以在研究中充当有说服力的模型。在 HeLa 中检测到了 miR-21 的高表达, 使人类 miRNA 的研究更为可行。

基金项目: 天津市科委计划资助项目 (033182911)
作者单位: 300070, 天津医科大学 天津市生命科学中心
通讯作者: 汤华 (E-mail: htang2002@yahoo.com)

2 miR-21 与 miRNA 的作用机制的研究

miRNA 发现后,其作用机制成为人类关注的重大问题,有待揭示。小干扰 RNAs (small interference RNA, siRNA) 与 miRNA 相似,也属于 ~22nt 的小非编码 RNA,大量的研究表明它们在真核基因表达调控的过程中起到了关键的作用。在对 siRNA 的特点和作用已经有所研究时,miRNA 才开始走进人们的视线。最初,人们对于 miRNA 作用机制的认识来自于线虫和植物的研究,在人类细胞中,miRNA 以怎样的机制发挥作用以及这种机制与 siRNA 有怎样的关系还是未知。

2003 年,Zeng 等^[6,7]的研究证明,293T 细胞内源表达的 miR-21 或外源过表达的 miR-30 可以使与其完全互补的靶 mRNA 降解,而人工合成的 siRNA 能抑制细胞中与其不完全互补靶 mRNA 的翻译。由此,关于 miRNA 作用机制的研究得到了进一步推广,从简单的模式生物线虫和植物扩大到更为复杂高级的人类细胞。这项研究采用了建立在荧光素酶基因基础上的报告基因载体,8 个拷贝的靶序列串连排列于 3'-非编码区 (3'-untranslated region, UTR)。报告基因载体中报告基因的下游是推测的靶基因 3' UTR 靶序列,将此载体转染含有兴趣 miRNA 的细胞中,同时含有突变靶序列的载体也被转染。如果野生型载体的报告基因表达水平有所降低,则说明兴趣 miRNA 是有活性的。在转染并检测荧光素酶活性的实验中,设立了内部对照、特异性对照、阴性对照。这里的内部对照是指构建含有不同荧光素酶基因的两种靶基因载体,共转染后,用两种检测指标推断 miRNA 的活性,以排除因 miRNA 可能改变染色体中含有同源序列的基因组成而引起的误差^[8]。在转染靶序列表达载体的同时,转染一种非特异性对照载体,表达的序列不与任何已知 miRNA 互补,排除了因非特异性结合而引起的误差。这一实验还转染了序列已知的、确定不与靶序列结合的 miRNA,作为阴性对照。此外,值得一提的是文章对 Northern 印迹的结果进行阐述时,巧妙的利用了一个有关荧光素酶 mRNA 的发现。荧光素酶基因在报告基因载体中的编码序列为 ~2.3 kb,如果 siRNA 或 miRNA 作用于其后的 3'UTR 靶位点,它的 5'端就会形成 ~1.8 kb 的降解产物。如果 siRNA 或 miRNA 与靶序列完全互补,这种降解产物就一定能被检测到,而在不完全互补的情况下,从未发现过等大小的片段。

此研究中,在实验方法上使用了目前最为流行的报告基因载体,通过对报告基因表达水平的检测,估计 miRNA 与靶序列的结合情况。在实验设计上充分体现了对照的思想,严密的逻辑性使实验的结论更为可靠。这项研究为 miRNA 功能研究提供了重要的参考。

3 miR-21 与 miRNA 靶基因的验证方法

大量 miRNA 序列不断被验证汇集,与 miRNA 靶基因被验证的报道数目之少形成了鲜明的对比。目前,miRNA 靶基因确定的方法主要是结合建立在 miRNA 作用机制上的数学算法^[9~13]和相应的实验验证。一般来讲,这些预测程序的基础是 miRNA 和靶基因 UTR 序列的,包括 miRNA 5'端是否存在一串被称为“种子”或“核心”的碱基序列,以及不同物种之间,这一序列的保守性。目前为止,有几种研究 miRNA 与所预测靶基因关系的方法得到了大家的认可。除了上面提到的报告基因载体,另一个重要的方法是功能缺失试验,即用 2'-羟基甲基化 (2'-O-Me) 的反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO) 阻断 miRNA 的功能。最为直接的证据,仍然是借助于 ASO 的功能缺失试验。以往的研究证明,单链 ASO 或双链 siRNA 可以通过靶定细胞中 miRNA 的编码基因,在高通量的细胞实验中对 miRNA 的功能进行筛选^[14,15]。能提高这类 ASO 活性的修饰,涉及到改善杂交亲和力和对内源核酸内切酶的耐受力等多方面的因素。最近,靶定成熟 miRNA 的 ASO 也被用来研究不同物种中 miRNA 的功能^[16~18]。与优化靶定 miRNA 编码基因的 ASO 相比,优化靶定 miRNA ASO 的研究并不是很多。其中大部分的研究采用了 2'-羟基甲基化 (2'-O-Me) 修饰的 RNA ASO^[19~20], DNA 或 LNA (locked nucleic acid) 与 DNA 混合的 ASO^[21],以及 2'-羟基甲氧乙基化 (2'-O-MOE) 的 ASO^[14]。

2006 年,Davis 等^[22]通过荧光素酶实验检测 HeLa 细胞中 miR-21 的活力变化,评价了 ASO 结构和修饰方式对其靶定 miRNA 能力的影响。研究者选择富含 miR-21 的 HeLa 细胞为转染细胞,当连有 miR-21 互补序列的荧光素酶载体转入细胞,内源的 miR-21 使荧光素酶表达明显下降,而 miR-21 ASO 的介入会阻止这种抑制的发生。研究中考察的结构变化和修饰方式包括 2'-糖基化、骨架修饰以及骨架修饰在 ASO 中的位置。研究结果概括了 ASO 有效靶定目标 miRNA 的重要影响因素。虽然与靶

miRNA 的亲合力是 ASO 活性的关键,但要成为有效靶定 miRNA 的 ASO,必须能够逃避多种因素的破坏,比如负责降解 si/miRNA* 的解旋酶。此外,在结合的过程中,错配的情况也可能发生,因此,单独使用一种 miRNA 靶定其家族的多个成员并不是有效的研究方法。关于 ASO 在哪个阶段与 miRNA 结合,不是非常明确。miR-21 ASO 的序列是与成熟 miR-21 互补的,但也可能通过与 pri 或 pre-miRNA 结合而干扰 miRNA 的加工。也不排除在 Dicer 加工之后、成熟 miRNA 进驻 Argonaute 之前,ASO 即与 miRNA 结合。少数相关研究证实,ASO 与 miRNA 的作用发生于成熟 miRNA,在 RNA 引导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 中阻断 miRNA 的功能^[20~23]。Davis 等^[22]的研究中,有两项结果也是支持这一观点的。

4 miR-21 与肿瘤的关系及其靶基因的确定

当 miR-21 作为工具来研究人类 miRNA 作用机制和功能的同时,miR-21 自身的功能研究也得到了更进一步的深入。其中,最为突出的成果表现在 miR-21 与肿瘤的关系。

2004 年,Calin 等^[24]证实,在与人类白血病相关的易位断裂点或缺失部位存在 miRNAs 的编码基因,提示 miRNA 与肿瘤的发生衍进有着潜在的联系。事实上,目前已经有研究指出,miRNA 在白血病、肺癌、结肠癌中是表达异常的^[25~27]。2005 年,Volinia 等^[28]利用基因芯片的技术平台和靶位点预测数据库,对不同系统肿瘤中 miRNA 表达谱进行研究,列出了在不同系统中表达升高或降低的 miRNA 谱,并绘出了与其对应的靶基因谱。有趣的是,研究者将在多种肿瘤中都表达升高的 miRNA 进行归纳,发现 miR-21 在几种肿瘤中都是表达升高的。此外,miRNA 靶基因数据库中被表达异常的 miRNA 所靶定的基因竟然占据了所有著名癌基因的 44% 之多。更加确定了 miRNA 与肿瘤不可忽视的关系。Schmittge 等^[29]发现,在 HeLa 细胞和结肠癌细胞系 (HCT-116) 中,miR-21 是明显高表达的,而在前髓细胞性白血病细胞 (HL-60)、慢性髓细胞白血病细胞 (K562)、前列腺癌细胞 (LNCAP) 中表达相对较低。对于这种表达的异常与功能有着怎样的关系,有关的研究正在不断地推进中。miR-21 又凭借自己明确的存在背景,为大家广为关注的研究工具。

Jennifer 等^[21]的研究表明,人类多型性恶性胶质瘤中,miR-21 是高表达的,并且在体外实验中证

实 miR-21 充当了抗凋亡因子的角色。所采用的样品包括恶性胶质瘤肿瘤组织、原代细胞、细胞系。miR-21 除在恶性胶质瘤中的表达明显升高外,在其他类型脑瘤中的表达也有不典型升高,如多形性成胶质细胞瘤、少突胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤。因此,研究者猜想,miR-21 的异常表达很可能封闭了促进神经细胞分化和凋亡所需要的某些基因,使肿瘤细胞处在原始的增殖发育阶段。为探寻 miR-21 异常表达引起的表型变化,研究者针对肿瘤细胞最基本的两个特性——增殖和凋亡的变化进行观察。结果表明,封闭 miR-21 之后,活细胞数明显减少,表现为代谢活性的降低,再次转染后,效果进一步增强。通过检测促进凋亡的半胱天冬酶-3 和半胱天冬酶-7,表明细胞数的减少并非生长速度变化的结果,而是凋亡抑制被解除的表现。同时,末端转移酶介导的缺口末端标记法 (terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling, TUNEL) 也证实封闭 miR-21 后,凋亡细胞核比例明显增多。

2006 年,Meng 等^[30]确证了 miR-21 的一个靶基因是 PTEN。PTEN 是肿瘤抑制基因,其突变型在多种肿瘤中表达升高。它所编码的一种磷酸化酶,在正常情况下能够抑制磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI-3 kinase, phosphoinositide 3-kinase) 信号传导通路所介导的生长促进作用,而 PI-3 激酶信号传导通路为多种肿瘤维持生存所必须的调控通路。Meng 等^[30]在胆管癌细胞 Mz-ChA-1 中转染 miR-21 ASO 后,细胞对于化疗药物二氟脱氧胞嘧啶核苷的敏感性大大增强。此后,荧光素酶实验进一步证实了通过生物信息学方法预测的 PTEN 为 miR-21 的靶基因之一。由以上实验结果推论,miR-21 能够直接抑制 PTEN 的表达,从而激活 PI-3 激酶信号传导通路,调节二氟脱氧胞嘧啶核苷所诱导的细胞凋亡。特定 miRNA 靶基因的确定、特定调控通路中 miRNA 作用的明确为肿瘤发生和耐药机制的研究提供了重要的信息。

5 小结

miRNA 的发现,改变了由来已久的 DNA 主导生命现象的观念,带领人们走进探索生命奥秘的新领域。miRNA 巧妙的作用机制,使人们不断思索更为完美的方法和策略,重现 miRNA 发挥作用的过程,揭示它与生命现象的种种联系。miR-21 只是众多 miRNA 的一员,在它的帮助下,我们对 miRNA 有了更多的认识。也许,这些认识只是冰山一角,但揭开面纱,一角是很好的开端。希望在不久的将来,有更

多的关于 miRNA 的故事发生,一个更完整的世界将会展现在人们面前。

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: 843-854.
- 2 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001, 294: 853-858.
- 3 Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, *et al.* miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev*, 2002, 16: 720-728.
- 4 Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, *et al.* Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA*, 2003, 9: 180-186.
- 5 Fu HJ, Tie Y, Xu C, *et al.* Identification of human fetal liver miRNAs by a novel method. *FEBS Letters*, 2005, 579: 3849-3854.
- 6 Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed microRNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Molecular Cell*, 2002, 9: 1327-1333.
- 7 Zeng Y, Yi R, Cullen BR. miRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 9779-9784.
- 8 Dernburg AF, Karpen GH. A Chromosome RNAissance *Cell*, 2002, 111: 159-162.
- 9 John B, Enright AJ, Aravin A, *et al.* Human microRNA targets. *PLoS Biol*, 2004, 2: 1862-1879.
- 10 Kiriakidou M, Nelson PT, Kouranov A, *et al.* A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev*, 2004, 18: 1165 - 1178.
- 11 Krek A, Grun D, Poy NW, *et al.* Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, 2005, 37: 495-500.
- 12 Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet*, 2006, 38: S8-13.
- 13 Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, *et al.* Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 2003, 115: 787-798.
- 14 Esau C, Kang X, Peralta E, *et al.* MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 2004, 279: 52361-52365.
- 15 Kurreck J. Antisense and RNA interference approaches to target validation in pain research. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2004 7: 179-187.
- 16 Boutla A, Delidakis C, Tabler M. Developmental defects by antisense-mediated inactivation of micro-RNAs 2 and 13 in *Drosophila* and the identification of putative target genes. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 4973-4980.
- 17 Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, *et al.* A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004, 432: 226-230.
- 18 Lee YS, Kim HK, Chung S, *et al.* Depletion of human micro-RNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the down-regulation of putative targets during differentiation. *J Biol Chem*. 2005, 280: 16635-16641.
- 19 Boutla A, Delidakis C, Tabler M. Developmental defects by antisense-mediated inactivation of micro-RNAs 2 and 13 in *Drosophila* and the identification of putative target genes. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 4973-4980.
- 20 Hutvagner G, Simard MJ, Mello CC, *et al.* Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol*, 2004, 2: E98.
- 21 Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS, *et al.* MicroRNA-21 Is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 2005, 65: 6029-6033.
- 22 Davis S, Lollo B, Freier S, *et al.* Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides. *Nucl Acid Res*, 2006, 34: 2294-2304.
- 23 Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, *et al.* Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, 2005, 438: 685-689.
- 24 Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 2999-3004.
- 25 Calin GA, Liu CG, Sevignani C, *et al.* MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 11755-11760.
- 26 Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 15524-15529.
- 27 Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, *et al.* Reduced accumulation of specific micro-RNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*, 2003, 1: 882-891.
- 28 Volinia S, Calin GA, Liu CG, *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *PNAS*, 2006, 103: 2257-2261.
- 29 Schmittgen TD, Jiang J, Liu Q, *et al.* A highthroughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: e43.
- 30 Meng F, Henson R, Lang M, *et al.* Involvement of Human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell Lines. *Gastroenterology*, 2006, 130: 2113-2129.

(收稿日期: 2006-11-20)

(本文编辑: 孙岩伟)