

①

MicroRNA 与淋巴增殖性疾病

徐 卫, 李建勇

(南京医科大学第一附属医院, 江苏省人民医院血液科, 南京 210029)

李建勇(1963-), 男, 医学博士、主任医师, 现任南京医科大学第一附属医院血液科主任, 中华医学会血液学会委员, 江苏省血液学会副主任委员, 《中华血液学杂志》、《中国实验血液学杂志》等杂志的编委。江苏省优秀医学重点人才、有突出贡献的中青年专家, 获第六届江苏省青年科技奖、国务院政府特殊津贴。江苏省“333 工程”第二层次和江苏省六大高峰人才培养对象。发表论文 200 余篇, SCI 引用 10 篇, 参编论著 6 部。目前承担 863 子课题、江苏省自然科学基金重大招标课题等 15 项。获省、部级科技进步奖 7 项。主要从事恶性血液病/干细胞基础与临床的研究。主要代表作: High incidence of t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. *Cancer Res*, 1998; Detection of t(11;14)(q13;q32) in MCL by FISH. *Am J Pathol*, 1999; Monosomy 13 is associated with the transition of MGUS to MM. *Blood*, 1999。

[摘要] 在动植物基因组中广泛存在一类非编码蛋白的小 RNA, 即 microRNA(miRNA)。miRNA 在肿瘤的形成和转录后调节基因表达中起重要作用。miR-15a 和 miR-16-1 表达水平的改变与慢性淋巴细胞白血病(CLL)有关, 原癌基因 bcl-2 可能是 miR-15a 和 miR-16-1 的靶基因; 活化 B 细胞型弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)、儿童 Burkitt 淋巴瘤等肿瘤细胞 miR-155 的拷贝数明显增高, 认为 miR-155 表达水平可以作为 DLBCL 诊断和预后的重要指标; miR-17-92 簇(miR-15a, miR-16-1, miR-155, miR-17-92 cluster, miR-142)是一组可能的肿瘤相关基因。

[关键词] miRNA; 淋巴增殖性疾病; 发病机制

[中图分类号] R733

[文献标识码] A

[文章编号] 1001-1773(2007)01-0001-05

MicroRNA gene expression in lymphoproliferative disorders

XU Wei, LI Jian-yong

(Department of Hematology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu Province Hospital, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Plant and animal genomes contain an abundance of small genes, known as microRNAs (miRNAs), which play an important role in the pathogenesis of tumors and negatively regulate the expression of protein-encoding genes at the post-transcriptional level. The miR-15a-miR-16-1 cluster is frequently deleted and/or downregulated in the majority of CLL cases, miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. High expression of precursor miR-155 was detected in activated B cell phenotype diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) and Burkitt's lymphoma (BL). The miR-155 level may be useful diagnostically and prognostically in DLBCL. The miR-17-92 cluster (miR-15a, miR-16-1, miR-155,

①收稿日期:2006-11-06 修回日期:2006-12-05

通讯作者:李建勇, E-mail: lijianyonglm@medmail.com.cn

基金项目:江苏省 135 工程医学重点人才基金(RC2002044) This work was supported by the 135 Foundation of Jiangsu Province (RC2002044)

miR-17-92 cluster, miR-142) acts as an oncogene under one set of conditions and as a tumor suppressor under another.

[**Key words**] miRNA; lymphoproliferative disorders; pathogenesis

[Int J Pathol Clin Med, 2007, 27(1):0001-05]

1 概述

真核生物中存在 2 种非编码 RNA (non-coding RNA), 一类为小干扰 RNA (siRNA), 另一类为微小 RNA (microRNA, miRNA)。miRNA 是一种 19 ~ 25 个核苷酸的单链小分子 RNA, 由具有发夹结构的 70 ~ 90 个核苷酸的前体 miRNA (pre-miRNA) 经过 Dicer 酶剪切加工而成, 其本身不具有开放阅读框 (ORF)。人们对 miRNA 的研究起始于时序调控小 RNA (stRNAs)。1993 年在秀丽新小杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中发现了第 1 个 miRNA 基因——*lin-4*, 2000 年又在线虫 *C. elegans* 中发现第 2 个 miRNA 基因——*let-7*, 以后几年里随着大量的 miRNA 被发现, 对这些小分子 RNA 的基因序列、加工表达方式、生理功能等方面的研究表明, miRNA 发挥着重要的基因表达调节作用。到目前为止, 通过分子生物学和分子信息学的方法 (mirScan), 已经有 4 098 个 miRNA 在人类、果蝇、植物等多种生物物种中被发现, 其中人类已经发现 474 个 miRNA (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/>)。

miRNA 的主要功能是调节生物体生长、发育和疾病发生过程中有关基因的表达^[1-3], 推测这种小分子调节着人类近 1/3 的基因, 平均每个 miRNA 调节人类 200 种不同的 mRNA, 并且多个 miRNA 能够协调它们的活动以调节一些特殊的靶基因^[4]。miRNA 基因是一类高度保守的基因家族, 成簇分布^[5], 表达具有时序特异性和组织特异性^[6-7]。miRNA 对靶基因进行转录后调节, 按其作用模式不同可分为 3 种: (1) miRNA 与靶基因不完全互补结合, 进而抑制靶基因的翻译而不影响 mRNA 的稳定性^[8]; (2) 与目标靶基因完全互补结合, 作用方式和功能与 siRNA 非常类似, 最后切割靶 mRNA^[9]; (3) 具有以上 2 种作用模式, 当与靶基因不完全互补结合时, 抑制靶基因的翻译; 当与目标靶基因完全互补结合时, 直接靶向切割 mRNA^[10]。

随着短短几年内 miRNA 研究的迅速进展, 人们开始注意 miRNA 在疾病发生过程中所扮演的角色。

虽然对 miRNA 功能的研究才刚刚开始, 只有极少数 miRNA 的功能被证实, 但 miRNA 在恶性疾病中的作用已引起很大关注, 认为 miRNA 在基因表达调节和肿瘤的发生机制中起重要作用^[11-12]。Calin 等^[13]研究发现 50% 以上的 miRNA 基因定位于与肿瘤相关的区域或脆性区域, 与人类多种癌症有关。Lu 等^[14]研究 217 个 miRNA 在 334 个不同标本 (包括多种人类肿瘤) 中的表达情况, 结果发现不同的肿瘤具有各自不同的 miRNA 表达模式。

miRNA 可视为潜在的原癌基因或肿瘤抑制物^[15]。当 miRNA 表达上调, 抑制靶抑癌基因的翻译, 导致靶抑癌基因的表达下降; 相反, miRNA 的表达下调, 抑制靶原癌基因翻译作用减弱, 导致靶原癌基因的高表达。一旦这种假设成立, 可为肿瘤发生过程中基因调节提供重要线索, 为肿瘤治疗开辟一条新的道路。耶鲁大学癌症中心的 Johnson 等^[16]研究发现一个与肺癌有关的染色体区域上的 miRNA——*let-7* 是原癌基因 *Ras* 表达的一种调节因子, 并抑制 *Ras* 蛋白的翻译, *Ras* 是 *let-7* 的目标靶基因。在肺癌组织中, *let-7* 表达低于其他正常肺组织, 而 *Ras* 蛋白则明显增加。

2 miRNA 与淋巴增殖性疾病

2.1 miRNA 与慢性淋巴细胞白血病 (CLL)

第一个被发现的与肿瘤相关的 miRNA 是 miR-15a 和 miR-16-1。在 CLL 中, 大约 40% 的 CLL 中有染色体 13q14 的缺失^[17], 而 miR-15a 和 miR-16-1 两个基因定位于染色体的 13q14 位置上, 在约 68% 的 CLL 患者中发现这两个基因的表达缺失或下调^[18], 提示 miR-15a 和 miR-16-1 表达水平的改变可能与 CLL 有关。

Calin 等^[19]运用基因芯片技术对人类 CLL 标本中数百个 miRNA 前体和 miRNA 进行检测, 与正常淋巴细胞 (CD5⁺ B 细胞) 进行比较, 结果发现有两种特殊的遗传表达模式, 其中一种 miRNA 基因表达模式与 13q14 的缺失有关 (13q14 的缺失是 CLL 预后良好的指标), 另一种表达模式与免疫球蛋白重链

(IgH)基因突变有关(IgH突变也是CLL预后良好的指标),miRNA基因在CLL中的表达模式有助于CLL的诊断和预后判断。两种模式中miR-16基因的表达水平均降低,故认为可以通过miR-16基因的检测来预测CLL的发展和预后。此后该研究小组又发现有13种miRNA的表达与ZAP-70和IgVH突变(两种B-CLL预后因素)密切相关^[20]。

最近该小组研究认为:原癌基因**bcl-2**可能是miR-15a和miR-16-1的靶基因^[21],miR-15a和miR-16-1的表达与原癌基因**bcl-2**的表达呈负相关。在正常情况下,bcl-2的水平很低,但当这2种miRNA缺失时,bcl-2表达水平上升,导致凋亡受抑制,从而导致肿瘤的发生。研究还发现,2个CLL病人的miR-16-1前体的下游7个碱基中有一个C突变为T,导致miR-16-1表达水平下降,进一步证明其具有肿瘤抑制基因的作用。miR-16-1表达水平的下降多发现在各种白血病中,而在其他组织来源的肿瘤中并不多见。说明此miRNA在免疫系统和B细胞分化中的作用,且miR-15a和miR-16-1可能成为bcl-2过表达肿瘤的靶向治疗目标。

2.2 miRNA与淋巴瘤 在淋巴瘤中,包括弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL),肿瘤细胞miR-155的拷贝数是正常B细胞的10~30倍^[22]。儿童Burkitt淋巴瘤患者的miR-155/BIC RNA表达高度增加,是其他儿童白血病的100倍^[23],提示miR-155在B细胞淋巴瘤的发生中可能起重要作用。进一步研究发现活化B细胞型DLBCL的miR-155表达量明显高于生发中心型DLBCL,且前者预后较差,故认为miR-155表达水平可以作为DLBCL诊断和预后的重要指标^[22]。Kluiver等^[24]研究发现在霍奇金淋巴瘤(HL)、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)中BIC的表达与miR-155的水平一致,提示BIC可能为miR-155的前体。Eis等^[22]的研究也验证了此观点。依据生物信息学规则已报道了一些miR-155可能的靶基因,但是没有一个在体内或体外实验中被证实。转录因子PU.1 mRNA是B细胞的分化过程中所必需的,哺乳动物细胞中发现PU.1 mRNA的3'端非编码(3'-UTR)区存在类似miR-155的靶序列,因此推测PU.1 mRNA可能是miR-155的靶基因^[25]。miR-155另一个可能的靶基因是ICOSL^[26],ICOSL在T细胞活化、增殖中发挥重要作用,其缺乏可能会影响

机体的免疫反应。

在DLBCL、滤泡型淋巴瘤(FL)和套细胞淋巴瘤(MCL)等肿瘤中常有13q31-32位点的扩增。而在这一扩增区域的唯一的基因就是一个非编码蛋白的RNA:C13orf25,这个转录本编码了miR-17-92基因簇,其中包含miR-91,miR-17,miR-18,miR-19a,miR-20,miR-19b和miR-92七个miRNA^[27]。He等^[28]运用基因芯片技术,发现前体miR-17-92簇和成熟miR-17-92簇在B细胞淋巴瘤患者样本和细胞系中均过度表达,推测miR-17-92基因簇过度表达与淋巴瘤的发生发展有关。他们还利用一个逆转录病毒系统在带有Myc转基因的小鼠造血干细胞(HSC)中表达miR-17-19-b1(miR-17-92基因簇的一部分)基因。野生型小鼠接受了一个亚致死剂量的射线照射,然后移植那些逆转录病毒转染的HSC。移植了带有miR-17-19-b1和Myc基因的HSC小鼠更快地(约51 d)发展为淋巴瘤,而移植了仅含有Myc的HSC小鼠需要3~6个月。O'Donnell等^[29]证明了miR-17-92基因簇是一组可能的肿瘤相关的基因,发现Myc诱导了miR-17-92的表达,染色体免疫共沉淀实验表明,Myc结合于C13orf25第一个内含子区域,说明Myc直接调节了前体miR-17-92的转录。转录因子E2F1是miR-17-5p和miR-20a的靶基因。Myc可以诱导E2F1和miR-17-92的转录,而miR-17-5p和miR-20a可以抑制E2F1的翻译。因此,Myc对于细胞生长的调节是通过miR-17-92基因簇严格控制的,在Myc存在的情况下,miR-17-92基因簇中的miRNA限制了E2F1的活性,通过阻断Myc和E2F1的正反馈循环削弱了Myc对于细胞增殖的影响。miR-17-92基因簇所起的作用是抑癌基因的作用,这与He等^[28]的发现相反。然而,当E2F1的表达水平超过一阈值,它也可以引起细胞凋亡,在此情况下,miRNA对于E2F1的负调控可能是通过阻断E2F1的诱导凋亡活性,促进Myc介导的细胞增殖,又支持了He等^[28]提出的模型。

笔者运用基于核酶保护分析的液相杂交方法,将同位素标记好的小分子RNA探针和待检测样品混合杂交,通过变性胶电泳放射自显影检测4种B细胞淋巴瘤细胞系中miR-28的表达^[30],此方法可以半定量检测少至10 ng总RNA模板中的小分子RNA,还可以在同一个样品中同时检测多个小分子

RNA 和长的 RNA 模板。应用 PCR 和 DNA 序列测定技术对 Rec1, G519 和 Z138 三个 MCL 细胞系中染色体 13q31-32 上 miR-17-92 基因簇进行研究,发现 MCL 细胞系中 miR-17-92 基因簇在基因组 DNA 水平上没有异常改变,不是 miR-17-92 基因簇的过度表达原因。miR-28 在 8 个 DLBCL 细胞系中均有表达,表达强度由高到低依次为:K231, CTB-1, MD903, HRC57, MD901, RCK8, OC1-LY8 和 BEVA。

3 miRNA 表达谱与诊断

Lu 等^[14]研究发现,相对较少的 miRNA (约 200 个)表达谱就可以对人类癌症进行分类。他们设计了一种基于微珠的流式细胞术来研究正常和癌症细胞 miRNA 的表达。多种组织来源的肿瘤通过 miRNA 表达谱进行归类,最终发现这些结果与肿瘤组织的胚胎来源一致。例如,内皮起源的如直肠、肝、胰腺、胃癌被分成一类,血液系统来源的也被归为一类,miRNA 特征可以成功地对于组织学上难以诊断的癌症样品进行分类。有趣的是,利用大约 16 000 编码蛋白的 mRNA 表达谱对同一批样品进行分类,分级聚类分析却不能得到一致的结果。因此,肿瘤的 miRNA 表达特征反映了其发育起源,这也与 miRNA 指导组织特异性发育功能相一致。

由于 miRNA 可以从福尔马林固定的石蜡包埋的样品中分离出来,这使得 miRNA 表达谱特征库建立成为可能。某些特定的 miRNA 表达差异已经被证明可以用于精确地预测病人的预后。从治疗的角度看,miRNA 表达谱可能为临床上确定一个治疗方案提供一个强有力的工具。

4 miRNA 与治疗

miRNA 具有重要的原癌基因或肿瘤抑制基因的功能,与特异的靶 mRNA 结合,使其失活,从而导致相应的蛋白质合成减少,可能对肿瘤的基因治疗产生很大的影响。未来,引入与具有原癌基因特性的 miRNA 互补的合成反义寡聚核苷酸——抗 miRNA 寡聚核苷酸 (AMO)——可能有效地灭活肿瘤中的 miRNA。临床上,可以通过经常的或者持续的 2'-O-甲基化或者锁核酸 (LNA) 等修饰的反义寡聚核苷酸给药使 miRNA 失活。这些修饰使得寡聚核苷酸更稳定,比其他治疗手段毒性更低。使用 antagomirs (与胆固醇偶联的 AMO) 注射小鼠后可以在不同器官有效抑制 miRNA 活性^[31],因而可能成为

一种有希望的治疗药物。相反的,过表达那些具有肿瘤抑制基因作用的 miRNA,如 let-7 家族也可以用于治疗某些特定的肿瘤。利用病毒或者脂质体的表达系统可以瞬时引入大量 miRNA。这些技术可以保证在某些组织特异性的启动子控制之下,表达 pre-miRNA 及其两侧序列,并且刺激内源性的 miRNA 加工,产生正确的 miRNA,抑制特定基因表达。

虽然以 miRNA 的调节作用为基础而设计的药物作为肿瘤的靶向治疗可能性极大,但是若要实现,还存在不容忽视的障碍,如:增强治疗因子的效果,评价治疗因子的稳定性及如何作用于特定组织中调节靶 miRNA 达到治疗疾病的目的等。miRNA 治疗从实验室到临床应用还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Chen C Z, Li L, Lodish H F, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation [J]. *Science*, 2004, 303 (5654): 83-86.
- [2] Xie X, Lu J, Kulbokas E J, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals [J]. *Nature*, 2005, 434 (7031): 338-345.
- [3] Lim L P, Lau N C, Garrett-Engle P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs [J]. *Nature*, 2005, 433 (7027): 769-773.
- [4] Krek A, Grun D, Poy M N, et al. Combinatorial microRNA target predictions [J]. *Nat Genet*, 2005, 37 (5): 495-500.
- [5] Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33 (8): 2697-2706.
- [6] Sun Y, Koo S, White N, et al. Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32 (22): e188.
- [7] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. *Science*, 2001, 294 (5543): 853-858.
- [8] Seggerson K, Tang L, Moss EG. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation [J]. *Dev Biol*, 2002, 243 (2): 215-225.
- [9] Carrington J C, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development [J]. *Science*, 2003, 301 (5631): 336-338.
- [10] Hutvagner G, Zamore P D. A microRNA in a multiple turnover RNAi enzyme complex [J]. *Science*, 2002, 297 (5589): 2056-2060.
- [11] McManus M T. MicroRNAs and cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2003, 13 (4): 253-258.
- [12] Gregory R I, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer [J].

- Cancer Res, 2005, 65(9): 3509-3512.
- [13] Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(9): 2999-3004.
- [14] Lu J, Getz G, Miska E A, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435(7043): 834-838.
- [15] Chen C Z. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. N Engl J Med, 2005, 353(17):1768-1771.
- [16] Johnson S M, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family[J]. Cell, 2005, 120(5): 635-647.
- [17] 徐卫,李建勇,潘金兰,等. 慢性淋巴细胞白血病的分子遗传学特点[J]. 中华肿瘤杂志,2006,28(5):349-352.
XU Wei, LI Jian-yong, PAN Jin-lan, et al. Molecular cytogenetic characteristics of chronic lymphocytic leukemia[J]. Chin J Oncol, 2006, 28(5):349-352.
- [18] Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(24):15524-15529.
- [19] Calin G A, Liu C G, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(32): 11755-11760.
- [20] Calin G A, Ferracin M, Cimmino A, et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia[J]. N Engl J Med, 2005, 353(5): 1793-1801.
- [21] Cimmino A, Calin G A, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(39): 13944-13949.
- [22] Eis P S, Tam W, Sun L, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(10): 3627-3632.
- [23] Metzler M, Wilda M, Busch K, et al. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma[J]. Genes Chromosome Cancer, 2004, 39(2): 167-169.
- [24] Kluiver J, Poppema S, de Jong D, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas[J]. J Pathol, 2005,207(2): 243-249.
- [25] John B, Enright A J, Aravin A, et al. Human microRNA targets [J]. PLoS Biol, 2004, 2(11): 1862-1879.
- [26] Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, et al. Identification of virus-encoded microRNAs[J]. Science, 2004, 304(5671): 734-736.
- [27] Ota A, Tagawa H, Karman S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma[J]. Cancer Res, 2004,64(9): 3087-3095.
- [28] He L, Thomson J M, Hemann M T, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene[J]. Nature, 2005, 435(7043): 828-833.
- [29] O'Donnell K A, Wentzel E A, Zeller K I, et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression [J]. Nature, 2005, 435(7043): 839-843.
- [30] 徐卫,李建勇,陆凤翔. 液相杂交检测 B 细胞淋巴瘤细胞系 miR-28 的表达[J]. 中国实验血液学杂志, 2006,14(2):289-292.
XU Wei, LI Jian-yong, LU Feng-xiang. Expression of miR-28 in B cell lymphoma cell lines detected by solution hybridization[J]. J Exp Hematol, 2006, 14(2):289-292.
- [31] Krü tzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with antagomirs[J]. Nature, 2005,438(7068): 685-689.