

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00695

## 乳腺发育及泌乳相关 miRNA 研究进展

金晓露, 杨建香, 李真, 刘红云, 刘建新

浙江大学动物科学学院奶业科学研究所, 杭州 310058

**摘要:** MicroRNA(miRNA)是一种重要的转录后调控的非编码 RNA, 参与调控哺乳动物乳腺发育和泌乳。文章总结了乳腺发育和泌乳过程中 miRNA 表达的时空特异性, 综述了个别 miRNA 对乳腺发育和泌乳的调节作用, 旨在为乳腺 miRNA 的研究提供指导, 为利用 miRNA 促进乳腺健康发育和调控高质高效产乳提供理论基础和研究思路。

**关键词:** miRNA; 乳腺发育; 泌乳

## Progress on the miRNA related with mammary gland development and lactation

JIN Xiao-Lu, YANG Jian-Xiang, LI Zhen, LIU Hong-Yun, LIU Jian-Xin

Institute of Dairy Science, College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

**Abstract:** MicroRNAs (miRNAs) are non-coding RNAs that play important roles in post transcriptional regulation. They are involved in the regulation of mammary gland development and lactation. In this paper, we summarized the expression pattern of miRNAs which varied with tissues and lactation stages, and the functions of several miRNAs are also briefly reviewed. The objective of this work is to give reference for further study on miRNAs in mammary gland, and to provide theoretical basis and ideas for the use of miRNAs in improving healthy development of mammary gland and regulating the efficiency of lactation and the quality of milk.

**Keywords:** miRNA; mammary gland development; lactation

自1993年科学家首次在线虫中发现了 *lin-4* 及 *let-7*, 并确定了其在线虫发育中的时间控制作用后<sup>[1-3]</sup>, MicroRNA(miRNA)作为一种基因转录后水平的调控因子受到了科学工作者的广泛关注。乳腺作为雌性哺乳动物重要器官, 它的发育和正常泌乳除了受到了激素、生长因子和一些蛋白质的严格调控<sup>[4]</sup>外,

miRNA 也起到一定的调节作用。当前对于哺乳动物乳腺发育和泌乳相关的 miRNA 的研究主要集中在: miRNA 表达的乳腺组织特异性、乳腺发育和泌乳过程中的 miRNA 表达的阶段特异性; 个别 miRNA 对乳腺发育和泌乳的调节作用; 乳腺 miRNA 的表达调控。本文对近年来乳腺发育及泌乳相关的 miRNA 的

收稿日期: 2012-10-20; 修回日期: 2012-12-30

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号: 2011CB100801)资助

作者简介: 金晓露, 博士研究生, 研究方向: 泌乳生理学。Tel: 0571-88982081; E-mail: chnfhx1@163.com

通讯作者: 刘建新, 博士, 教授, 研究方向: 反刍动物营养。E-mail: liujx@zju.edu.cn

网络出版时间: 2013-4-15 10:43:39

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130415.1043.001.html>

研究进行了综述。

## 1 乳腺 miRNA 表达的物种差异和组织特异性

许多 miRNA 在动物体内具有固定的表达模式,但这种固定的表达模式在不同物种和组织中存在差异<sup>[5]</sup>。通过哺乳动物不同组织 miRNA 表达谱的比较发现,很多 miRNA 在乳腺中存在特异性表达,这一现象在人、小鼠等物种中普遍存在<sup>[6]</sup>,且不同的物种中乳腺表达的 miRNA 存在种类和量上的差异。Liu 等<sup>[6]</sup>利用基因芯片技术对人不同组织中 161 个 miRNA 的表达情况进行了研究,并用 Northern blot 和 Real-time PCR 技术对结果进行验证,结果证实 miRNA 的表达具有组织特异性,且在人的乳腺组织中检测到 23 种乳腺特征性 miRNA 的表达。利用 Northern blot 技术在小鼠中仅发现了其中 9 个的表达<sup>[7]</sup>(表 1)。Gu 等<sup>[8]</sup>利用克隆和测序技术发现,奶牛乳腺组织中有 54 个 miRNA 与脂肪组织存在表达差异。

随着生物学的发展,研究者利用生物信息学、高通量测序技术以及 miRNA 表达谱分析等从乳腺组织中发现了新的 miRNA,这将有助于进一步发现乳腺组织特异性表达的 miRNA。Gu 等<sup>[8]</sup>利用克隆和测序技术在牛乳腺组织中发现了 3 个新的 miRNA;通过核糖核酸酶保护实验,验证了 13 个克隆测序高表达的 miRNA 在乳腺中有 10 个得以表达,且表达量与别的组织存在差异。Sdassi 等<sup>[9]</sup>通过克隆技术和构建小鼠乳腺组织 cDNA 文库,发现了 33 个新的 miRNA;对其中 24 个进行了 Real-time PCR 验证,发现有 6 个为小鼠所特有,但 24 个 miRNA 中未发现乳腺组织特异性表达 miRNA。Li 等<sup>[10]</sup>应用 Solexa 高通量测序技术在奶牛乳腺组织中发现了 96 条中尚未被检测到的、但与其他物种保守的 miRNA,另有 505 条可能是 miRNA 的候选序列。

miRNA 的组织特异性表达,对于研究不同器官和系统中 miRNA 的功能具有重要的参考价值。到目前为止,大部分研究侧重于检测了个别功能性 miRNA

在不同组织中的表达情况,而乳腺 miRNA 研究有必要更为系统全面地检测哺乳动物发育过程中乳腺特异性表达的 miRNA。

## 2 乳腺 miRNA 表达的阶段性特异性

哺乳动物乳腺发育大致可分为胚胎期、幼年期、青春期、性成熟期、妊娠期、泌乳期和退化期几个阶段,随着哺乳动物的受精、妊娠、产仔、哺乳和断奶的过程,乳腺可重复经历妊娠期、泌乳期和退化期<sup>[11]</sup>。对于乳腺发育和泌乳的各个阶段,不同动物又有一些更为细致的划分,在此不作赘述。在乳腺发育的不同阶段,乳腺 miRNA 表达模式,即表达的 miRNA 种类和量上存在差异,其正确表达模式是乳腺正常发育和泌乳的重要保障。目前对于乳腺发育过程中 miRNA 的阶段性特异性表达的研究较多,不同研究所用动物不一,所检测的乳腺发育时期或泌乳阶段不尽一致,采取的主要实验方法也各有差异(表 2)。这些研究中以 Avril-Sassen 等<sup>[12]</sup>对小鼠乳腺发育和泌乳过程中 miRNA 表达模式的工作最为全面系统。

小鼠乳腺发育过程中 miRNA 的表达具有明显的阶段性特异性,多个研究发现鼠乳腺 miRNA 在幼年期、青春期、性成熟期、妊娠期、泌乳期、退化早期、退化晚期的表达存在差异。Wang 等<sup>[13]</sup>通过基因芯片及 Real-time PCR 对小鼠从妊娠到泌乳的过程中乳腺组织 miRNA 表达情况进行了检测,发现乳腺发育的不同时期 miRNA 表达模式不同。其数据分析结果发现,miR-138、miR-413、miR-133、miR-133a 和 miR-133b 具有明显的阶段性表达特点,miR-138、miR-413 在青春期和退化期比妊娠期和泌乳期高,miR-133、miR-133a 和 miR-133b 则呈现相反的表达模式。Avril-Sassen 等<sup>[12]</sup>利用基于微球的流式细胞表达图谱,对小鼠出生后 16 个时期的乳腺组织进行了 miRNA(318 个)表达分析和相应时期的全基因组 mRNA 表达分析,结果发现在小鼠乳腺发育过程中 1/3 的小鼠 miRNA(102 个)得以表达,并呈现为 7 个

表 1 乳腺特征性表达的 miRNA

物种	乳腺特征性 miRNA	总计	文献
人	miR-let-7a-1, miR-let-7b, miR-23a, miR-23b, miR-24-2, miR-26a, miR-26b, miR-30b, miR-30c, miR-30d, miR-92-1, miR-92-2, miR-100-1/2, miR-103-1, miR-107, miR-146, miR-191, miR-197, miR-205, miR-206, miR-213, miR-214, and miR-221	23	[6]
小鼠	miR-let-7a, miR-let-7b, miR-let-7c, miR-26a, miR-26b, miR-24-2, miR-145, miR-30b, miR-30d	9	[8]

表 2 乳腺发育过程中 miRNA 表达模式相关研究的总结

物种	比较对象	方法	结果	文献
小鼠	青春期、妊娠期、泌乳期、妊娠期乳腺组织 miRNA 表达差异	克隆, miRNA 文库构建, Real-time PCR	发现 33 个新 miRNA, 验证了 24 个 miRNA 中 11 个仅在退化期表达	[9]
小鼠	幼年期、青春期、性成熟期、妊娠期、泌乳期、退化早期、退化晚期中 16 个时间点的乳腺组织 318 个 miRNA 表达差异及 mRNA 表达差异	基于微球的流式细胞表达阵列分析 (miRNA 和 mRNA)	发现 318 个 miRNA 中 102 个在乳腺中表达, 并呈现出 7 个瞬时共表达簇	[12]
小鼠	青春期、妊娠期、泌乳期、退化期的乳腺组织 miRNA 表达差异	基因芯片, Real-time PCR	38 个 miRNA 在妊娠期和泌乳期的表达量是青春期和退化期的 2 倍以上, 17 个下调, 21 个上调	[13]
奶牛	泌乳期和非泌乳空怀奶牛乳腺组织 miRNA 表达差异	Solexa 高通量测序, 基因芯片, Real-time PCR	56 个 miRNA 的表达在泌乳期与非泌乳期存在显著差异	[10]
奶牛	奶牛泌乳 3 个阶段乳腺中与细胞增殖、脂肪代谢和先天免疫相关的 13 种 miRNA 的差异表达	Real-time PCR	12 个在泌乳初期乳腺中的表达量高于干奶期	[14]
奶山羊	泌乳高峰期和泌乳后期乳腺组织 miRNA 表达差异	Solexa 高通量测序, Real-time PCR	697 个 miRNA 的表达在泌乳高峰期与泌乳后期存在显著差异	[15]

时期性共表达簇, 这些共表达簇中的 miRNA 在乳腺发育过程中具有相似的表达变化趋势。除此之外, 总 miRNA 和 mRNA 的表达量在泌乳期和退化早期显著下降, miRNA 与靶基因 mRNA 的负相关性只在部分 miRNA 中发现。Sdassi 等<sup>[9]</sup>发现的 33 个新的小鼠 miRNA 中, 有 11 个仅在退化期表达。

对于人的乳腺 miRNA 表达模式的研究多集中于乳腺病理状态, 例如乳腺癌组织的发生和发展过程中的 miRNA 表达特点。

乳用动物作为重要的乳产品来源动物, 其乳腺发育和泌乳过程中 miRNA 表达也存在着差异。Li 等<sup>[10]</sup>利用高通量测序和基因芯片技术研究泌乳期和非泌乳空怀奶牛乳腺组织 miRNA 的差异表达, 发现了泌乳期有 56 个 miRNA 的表达量与非泌乳期存在显著差异。Wang 等<sup>[14]</sup>利用 Real-time PCR 技术检测了奶牛乳腺组织中与细胞增殖、脂肪代谢和先天免疫相关的 13 种 miRNA(miR-10a、miR-15b、miR-16、miR-21、miR-31、miR-33b、miR-145、miR-146b、miR-155、miR-181a、miR-205、miR-221 和 miR-223)在 3 个泌乳阶段的表达情况, 发现除了 miR-31, 其他 miRNA 在泌乳初期乳腺中的表达量均高于干奶期。Ji 等<sup>[15]</sup>利用高通量测序技术检测了奶山羊泌乳高峰期和泌乳后期乳腺组织中 miRNA 的表达情况, 发现泌乳高峰期有 697 个 miRNA 的表达量与泌乳后期存在显著差异, 其中 272 个表达上调,

425 个表达下调。

目前对于乳腺 miRNA 阶段特异性表达研究主要集中在不同发育阶段乳腺组织样品中 miRNA 的表达谱分析, 多采用基因芯片技术或高通量克隆测序等方法, 高通量数据结果用 Real-time PCR 进行验证。也有一些研究通过比较正常乳腺和病理乳腺组织或细胞中的 miRNA 表达情况, 以此来寻找功能性 miRNA 和乳腺疾病的新分子标记。但不管是通过屠宰取样还是活体取样, 获得的组织都与 miRNA 在体实际表达模式存在着一定的差异, 不能动态反映乳腺的 miRNA 表达状况, 且样本量有限, 有待研究者去发现更加合理的方法来检测乳腺 miRNA 的表达模式。Boutinaud 等<sup>[16]</sup>通过比较羊乳汁体细胞和乳腺组织表达谱发现, 可以用乳汁体细胞中的 RNA 来动态反映乳腺的基因表达状况。有必要比较分析乳腺组织与乳汁体细胞中 miRNA 的相关性, 以探索利用乳汁体细胞中 miRNA 来动态反映乳腺 miRNA 表达的可能性。

### 3 乳汁所含 miRNA 的阶段差异性

乳汁含有水、蛋白质、脂肪、糖、无机盐和维生素等初生幼仔生长发育所必需的营养物质, 是哺育初生后代的理想食物, 其组成成分随物种、食物、季节、年龄、泌乳阶段和个体特性等因素发生变化。2010 年, Kosaka 等<sup>[17]</sup>发现和证实了人乳汁中存在

miRNA, 而且这些 miRNA 分子存在于微泡内, 可以耐受酸性等恶劣环境。通过对人哺乳期和断奶期乳汁中 miRNA 的表达分析发现, 泌乳 6 个月内乳汁中与免疫相关的 miRNA 高表达。目前人与牛乳汁中发现的高表达 miRNA 存在着差异, 这些高表达 miRNA 大多与免疫系统及神经系统等组织发育相关<sup>[18]</sup>。

乳腺在不同阶段分泌的乳汁中所含的 miRNA 量存在着差异。Chen 等<sup>[19]</sup>通过比较牛初乳和常乳中的 miRNA 表达差异发现个别 miRNA 随泌乳阶段发生改变, 筛选出 7 个合适的乳品质生物标记 miRNA(miR-26a、miR-26b、miR-200c、miR-21、miR-30d、miR-99a 和 miR-148a)。Izumi 等<sup>[20]</sup>利用芯片分析, 更为全面系统地比较了奶牛初乳与常乳所含 miRNA 的差异, 发现 100 个仅存在于初乳中, 53 个仅存在于常乳中, 而 51 个在两者中均被检测到; 然后利用 Real-time PCR 对 miR-15b、miR-27b、miR-34a、miR-106b、miR-130a、miR-155 和 miR-223 进行定量检测, 发现它们在初乳中的含量均高于常乳。Gu 等<sup>[21]</sup>利用高通量测序技术检测了猪整个泌乳阶段乳汁中的 miRNA 表达情况, 也发现免疫相关的 miRNA 在初乳中的含量高于常乳。此外, 他们还发现 3 个 miRNA(miR-17、miR-107、miR-103)适合作为猪不同泌乳阶段乳汁 miRNA 检测的内参基因<sup>[22]</sup>。

乳汁中检测出 miRNA, 我们推测一方面可能是乳腺在泌乳过程中选择性地分泌出一些 miRNA, 利用这些 miRNA 对幼儿产生一定的生物学作用; 另一方面可能是处于泌乳阶段的乳腺组织对于内环境的变化产生了反应。可以通过进一步研究病理状态或其他异常状况下的乳腺所分泌乳汁中的 miRNA, 探索获取乳腺异常状况的新型分子标记。

## 4 miRNA 对于乳腺发育和泌乳的调节作用

### 4.1 miRNA 对乳腺发育的调节作用

miRNA 对于乳腺的正常发育具有至关重要的作用, 主要表现在它可以调控乳腺干细胞的周期分化和去分化、乳导管和腺泡的正常发育以及乳腺上皮细胞的增殖和分化, 从而调控乳腺发育(表 3)。

胚胎期的乳腺发育和乳腺的周期性分化与去分化的过程中, 少量乳腺干细胞留存在乳腺基质中,

它的存在保证了乳腺在退化与泌乳之间的成功转化<sup>[23]</sup>。有研究表明, miRNA 可以调控乳腺干细胞和祖细胞的增殖和分化。鼠乳腺上皮细胞系 Comma-D 中有一定数量的有自我更新能力的祖细胞, Ibarra 等<sup>[24]</sup>已分离出这种祖细胞。比较这种祖细胞与 Comma-D 细胞系的 miRNA 表达发现, 祖细胞中 miR-205 和 miR-22 高表达, let-7 和 miR-93 低表达; 通过 let-7 沉默实验和 let-7 过表达实验, 证实了 let-7 的存在抑制了这种祖细胞在混合培养中所占的比例。其他研究表明, miR-205 在保持乳腺上皮干细胞的增殖和分化中也起着一定的作用<sup>[25]</sup>。

miRNA 对乳腺导管和腺泡的正常发育也至关重要。Ucar 等<sup>[26]</sup>通过同源重组构建了 miR-212/132 缺失小鼠, 发现 miR-212/132 缺失会导致小鼠乳导管完全无法发育, 并证实 miR-212/132 通过负调控基质金属蛋白酶 9(Matrix metalloproteinase-9, MMP-9)表达而引起上皮基质相互作用障碍而影响乳腺发育。Le Guillou 等<sup>[27]</sup>构建了乳腺上皮细胞中过表达 miR-30b 的转基因小鼠, 通过对其泌乳期乳腺组织学分析发现, 乳腺腺泡腔减小, 脂肪滴缺损, 由转基因鼠喂养的幼鼠表现出生长不良, 而且退化期乳腺组织上皮细胞保持着分化状态, 说明 miR-30b 过表达抑制了上皮细胞的去分化。这两项研究也为乳腺在体的 miRNA 过表达和沉默实验提供了参考。

乳腺在周期性去分化和分化的过程中, 其上皮细胞也发生着周期性的增殖和凋亡。miRNA 对乳腺上皮细胞增殖和分化具有一定的调节作用, 例如 miR-101a<sup>[28]</sup>、miR-126-3p<sup>[29]</sup>、miR-126<sup>[30]</sup>、miR-129-5p<sup>[31]</sup>、miR-138<sup>[32]</sup>和 miR-15a<sup>[33]</sup>均可以抑制乳腺上皮细胞增殖, miR-93 可抑制上皮细胞分化, 使乳腺细胞保持在上皮细胞的状态<sup>[34]</sup>。另一方面, miRNA 可影响上皮细胞与间充质之间的转化<sup>[35]</sup>。Eades 等<sup>[36]</sup>证实, miR-200a 通过作用于组蛋白去乙酰化酶 1(Histone deacetylase silent information regulator, SIRT1)的 3'UTR 区域而负向调控其表达, 进而减少上皮细胞非贴壁依赖性生长, 减少细胞迁移, 从而抑制乳腺上皮细胞发生上皮-间充质转分化 EMT (Epithelial to mesenchymal transition)样作用, 保持了上皮细胞的正常生长。当前, miRNA 对于 EMT 的作用的研究主要集中在乳腺癌的发生机理研究<sup>[37]</sup>。

表 3 个别 miRNA 对乳腺发育的作用

miRNA	功能	靶基因或调控对象	文献
let-7	阻止细胞的自我更新和促进细胞分化; 减少乳腺干细胞和祖细胞的数量	<i>RAS, HMGA2</i>	[24]
miR-205	可扩大乳腺干细胞在细胞组成中的数量和比例, 保持乳腺干细胞的存在比例	<i>PTEN, ZEB1, ZEB2</i>	[25]
miR-132/212 家族	调控上皮与基质的相互作用, 保证乳导管的正常生长	<i>MMP-9</i>	[26]
miR-30b	抑制乳腺腺泡的发育, 抑制乳腺上皮细胞退化	未知	[27]
miR-101a	抑制乳腺上皮细胞的增殖	<i>COX-2</i>	[28]
miR-126-3p	抑制乳腺上皮细胞增殖	<i>PR</i>	[29]
miR-126	抑制乳腺上皮细胞增殖	<i>PR</i>	[30]
miR-129-5p	抑制乳腺上皮细胞的增殖和活力	<i>Igf-1</i>	[31]
miR-138	抑制乳腺上皮细胞增殖	<i>PPLR</i>	[32]
miR-15a	抑制乳腺上皮细胞增殖, 降低乳腺上皮细胞的活力	<i>GHR</i>	[33]
miR-93	抑制乳腺上皮细胞的分化	<i>TGFβ</i>	[34]
miR-200a	抑制乳腺上皮细胞上皮-间充质转分化样作用	<i>SIRT1</i>	[36]

注: *RAS*(Small G protein, 小 G 蛋白); *HMGA2*(High-mobility group AT-hook 2, 高迁移率族蛋白 A1); *PTEN*(Phosphatase and tensin homolog on chromosome 10, 第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因); *ZEB1*(Zinc finger E-box binding homeobox 1, 锌指 E-盒结合同源异形盒-1); *ZEB2*(Zinc finger E-box binding homeobox 2, 锌指 E-盒结合同源异形盒-2); *COX-2*(Cyclooxygenase-2, 环氧化酶-2); *PR*(Progesterone receptor, 孕激素受体); *Igf-1*(Insulin-like growth factor 1, 胰岛素样生长因子 1); *PPLR*(Prolactin receptor, 催乳素受体); *GHR*(Growth hormone receptor, 生长激素受体); *TGFβ*(Transforming growth factor β, 转化生长因子 β)。

#### 4.2 miRNA 对泌乳的调节作用

乳腺组织中, 分泌细胞以血液中各种营养物质为原料, 在细胞中生成乳汁后分泌到腺泡, 这个过程称为乳汁分泌; 腺泡腔中的乳汁通过乳腺组织的管道系统逐级汇集, 最后经乳腺导管和乳头管流向体外, 这一过程称为排乳。乳汁分泌和排乳这两个性质不同而又相互联系的过程合称为泌乳<sup>[38]</sup>。

miRNA 对泌乳的调节作用主要在于 miRNA 可调节乳汁的相关成分在乳腺细胞中的合成过程(表 4)。miRNA 可以调节乳腺中乳蛋白的合成, 例如 let-7g<sup>[39]</sup>、miR-126-3p<sup>[29]</sup>等。miRNA 还可以调节乳腺中的乳糖代谢, 本课题组已发现 bta-miR-484 可负向调控己糖激酶 2(Hexokinase 2, HK2)蛋白的表达,

从而调控乳腺上皮细胞的乳糖代谢; 同时验证了 miR-484 可直接靶向 *HK2* mRNA 的 3'UTR 区域, 降低己糖激酶 2 酶活, 抑制葡萄糖吸收(未发表)。在小鼠乳腺上皮细胞系 HC11 和人乳腺上皮细胞 MCF-7 中, miR-214 通过直接作用于乳铁蛋白(Lactoferrin, Lf)的 3'UTR 区域来抑制其蛋白表达, 并调控细胞凋亡<sup>[40]</sup>。

最近, Javed 等<sup>[42]</sup>通过在细胞模型筛选能够有效沉默 β-乳球蛋白(β-lactoglobulin, BLG)的单个和串联的 miRNA, 发现 10 个 miRNA 中 8 个可沉默羊的 BLG, 9 个可沉默牛 BLG; 利用可表达绵羊 BLG 的小鼠乳腺模型, 证实了串联的两个 miRNA 组合可以高效(96%)沉默乳中 BLG 的表达; 他们还成功构建了

表 4 个别 miRNA 对泌乳的作用

miRNA	功能	靶基因或调控对象	文献
miR-126-3p	抑制乳腺上皮细胞增殖和 β-酪蛋白的分泌	<i>PR</i>	[29]
miR-129-5p	抑制小鼠上皮细胞的增殖和上皮细胞活力	<i>Igf-1</i>	[31]
miR-15a	抑制乳腺上皮细胞增殖和酪蛋白的分泌	<i>GHR</i>	[33]
let-7g	抑制小鼠乳腺上皮细胞增殖及 β-酪蛋白分泌	<i>TGFβR1</i>	[39]
miR-214	抑制乳铁蛋白的表达和细胞凋亡	<i>Lf</i>	[40]
miR-221	抑制乳腺上皮细胞增殖和 β-酪蛋白的分泌	<i>GHR</i>	[41]
miR-484	抑制奶牛乳腺上皮细胞的糖代谢关键酶表达, 抑制其对乳糖的吸收利用	<i>HK2</i>	未发表

注: *TGFβR1*(Transforming growth factor β receptor 1, 转化生长因子 β 受体 1)。

表达该串联 miRNA 的转基因小牛, 激素诱导其泌乳, 发现其乳汁中无 BLG, 同时酪蛋白含量增加。这一研究说明, 可通过调控 miRNA 来消减过敏原乳蛋白的表达, 而且这也为通过调控 miRNA 的表达来调控乳成分和家畜性状提供了新思路。

## 5 乳腺 miRNA 的表达调控

miRNA 不仅可以调节乳腺基因转录后表达, 它自身的表达也受到细胞内外相关因素的调控, 进而影响乳腺发育。目前对于乳腺 miRNA 的转录调节和转录后调节的关键步骤仍然知之甚少, 但已有试验证明一些外界因素和细胞内的转录因子可以调控 miRNA 的表达, 而且有些 miRNA 参与了其自身的表达调控循环。

研究表明, 激素可以改变乳腺细胞的 miRNA 表达状况。万中英等<sup>[43]</sup>通过 Real-time PCR 发现, 王不留行增乳活性单体邻苯二甲酸二丁酯及催乳素均抑制原代培养的泌乳中期奶牛乳腺上皮细胞 miR-143、miR-125 和 miR-195 表达; 邻苯二甲酸二丁酯也可抑制 miR-21 表达。另外, 雌激素可以与乳腺中的雌激素受体结合, 促进乳腺的发育和增生。不少乳腺癌方面的研究发现, 雌激素可以上调和下调不同的 miRNA, 从而影响乳腺的正常生长, 其中雌激素调控的一些 miRNA 可以调控雌激素对乳腺癌细胞的作用<sup>[44]</sup>。此外, miRNA 的表达还受到转录因子的调控。Feuermann 等<sup>[45]</sup>利用染色体免疫共沉淀测序方法证实, miR-17/92 的表达依赖于与 STAT5 的结合, 但 miR-17/92 对乳腺发育并非必不可少。

外界因素也可以影响 miRNA 的表达状况, 例如不同日粮可以改变奶牛皮下和内脏脂肪组织中 miRNA 的表达谱<sup>[46]</sup>, 高温可以引起乳腺上皮细胞中 miR-24 的增加<sup>[47]</sup>。可见, 饲料供给和饲养管理对动物泌乳性能的影响可能部分通过调控 miRNA 表达, 进而引起这些 miRNA 靶基因的表达变化, 调节动物乳腺的发育和泌乳。

## 6 展望

乳腺的正常发育和泌乳是新生儿营养供给和消费者乳制品需求的重要保障, miRNA 在乳腺组织发育和泌乳的各个阶段起着重要作用, 但相关研究并不很多。因此, 探索 miRNA 对正常乳腺发育和泌乳

的调控具有重要意义, 一方面可为人类和乳用动物乳腺疾病研究提供更全面的理论基础, 另一方面可为促进乳用动物乳腺发育和泌乳, 提高乳品质提供新的途径。

今后相关研究应关注乳腺发育和泌乳相关 miRNA 的表达分析和功能验证。miRNA 的表达分析应着眼于发现乳腺组织特异性表达的 miRNA, 探讨乳汁体细胞中 miRNA 与乳腺组织 miRNA 的相关性, 筛选 miRNA 的分子标记。对于 miRNA 的功能验证方面, 应该深入研究功能性 miRNA 的作用机理, 外界因素对 miRNA 的表达调控以及如何利用 miRNA 来调控乳腺健康和高质量产乳。应当在细胞水平研究基础上加强在体试验验证, 加强 miRNA 抑制和过表达方面的探索。可以预见, miRNA 的深入研究将进一步揭示乳腺正常和异常发育及泌乳的机理, 可为促进乳腺健康发育和调控高质量产乳, 治疗乳腺癌、乳腺炎等各种乳腺疾病提供新的思路。

## 参考文献(References):

- [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(5): 843–854. DOI
- [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(5): 855–862. DOI
- [3] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403(6772): 901–906. DOI
- [4] Hennighausen L, Robinson GW. Information networks in the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(9): 715–725. DOI
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297. DOI
- [6] Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(26): 9740–9744. DOI
- [7] Silveri L, Tilly G, Vilotte JL, Le Provost F. MicroRNA involvement in mammary gland development and breast

- cancer. *Reprod Nutr Dev*, 2006, 46(5): 549–556. [DOI](#)
- [8] Gu ZL, Eleswarapu S, Jiang HL. Identification and characterization of microRNAs from the bovine adipose tissue and mammary gland. *FEBS Lett*, 2007, 581(5): 981–988. [DOI](#)
- [9] Sdassi N, Silveri L, Laubier J, Tilly G, Costa J, Layani S, Vilotte JL, Le Provost F. Identification and characterization of new miRNAs cloned from normal mouse mammary gland. *BMC Genomics*, 2009, 10: 149. [DOI](#)
- [10] Li Z, Liu HY, Jin XL, Lo LJ, Liu JX. Expression profiles of microRNAs from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to lactation. *BMC Genomics*, 2012, 13: 731. [DOI](#)
- [11] Macias H, Hinck L. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2012, 1(4): 533–557. [DOI](#)
- [12] Avril-Sassen S, Goldstein LD, Stingl J, Blenkinsop C, Le Quesne J, Spiteri I, Karagavrilidou K, Watson CJ, Tavaré S, Miska EA, Caldas C. Characterisation of microRNA expression in post-natal mouse mammary gland development. *BMC Genomics*, 2009, 10: 548. [DOI](#)
- [13] Wang CM, Li QZ. Identification of differentially expressed microRNAs during the development of chinese murine mammary gland. *J Genet Genomics*, 2007, 34(11): 966–973. [DOI](#)
- [14] Wang M, Moisés S, Khan MJ, Wang J, Bu D, Loo JJ. MicroRNA expression patterns in the bovine mammary gland are affected by stage of lactation. *J Dairy Sci*, 2012, 95(11): 6529–6535. [DOI](#)
- [15] Ji ZB, Wang GZ, Xie ZJ, Wang JM, Zhang CL, Dong F, Chen CX. Identification of novel and differentially expressed microRNAs of dairy goat mammary gland tissues using Solexa sequencing and bioinformatics. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49463. [DOI](#)
- [16] Boutinaud M, Rulquin H, Keisler DH, Djiane J, Jammes H. Use of somatic cells from goat milk for dynamic studies of gene expression in the mammary gland. *J Anim Sci*, 2002, 80(5): 1258–1269. [DOI](#)
- [17] Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 2010, 1(1): 7. [DOI](#)
- [18] 宋雪梅, 姜俊芳, 蒋永清. 哺乳动物乳汁 miRNA 的研究进展. *遗传*, 2012, 34(10): 1233–1241. [DOI](#)
- [19] Chen X, Gao C, Li HJ, Huang L, Sun Q, Dong YY, Tian CL, Gao SP, Dong HL, Guan DL, Hu XY, Zhao SJ, Li L, Zhu L, Yan Q, Zhang JF, Zen K, Zhang CY. Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Res*, 2010, 20(10): 1128–1137. [DOI](#)
- [20] Izumi H, Kosaka N, Shimizu T, Sekine K, Ochiya T, Takase M. Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *J Dairy Sci*, 2012, 95(9): 4831–4841. [DOI](#)
- [21] Gu YR, Li MZ, Wang T, Liang Y, Zhong ZJ, Wang XY, Zhou Q, Chen L, Lang QL, He ZP, Chen XH, Gong JJ, Gao XL, Li XW, Lv XB. Lactation-related microRNA expression profiles of porcine breast milk exosomes. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43691. [DOI](#)
- [22] Gu YR, Liang Y, Gong JJ, Zeng K, Li ZQ, Lei YF, He ZP, Lv XB. Suitable internal control microRNA genes for measuring miRNA abundance in pig milk during different lactation periods. *Genet Mol Res*, 2012, 11(3): 2506–2512. [DOI](#)
- [23] LaMarca HL, Rosen JM. Minireview: hormones and mammary cell fate-what will I become when I grow up? *Endocrinology*, 2008, 149(9): 4317–4321. [DOI](#)
- [24] Ibarra I, Erlich Y, Muthuswamy SK, Sachidanandam R, Hannon GJ. A role for microRNAs in maintenance of mouse mammary epithelial progenitor cells. *Genes Dev*, 2007, 21(24): 3238–3243. [DOI](#)
- [25] Greene SB, Herschkowitz JI, Rosen JM. The ups and downs of miR-205: identifying the roles of miR-205 in mammary gland development and breast cancer. *RNA Biol*, 2010, 7(3): 300–304. [DOI](#)
- [26] Ucar A, Vafaizadeh V, Jarry H, Fiedler J, Klemmt PA, Thum T, Groner B, Chowdhury K. miR-212 and miR-132 are required for epithelial stromal interactions necessary for mouse mammary gland development. *Nat Genet*, 2010, 42(12): 1101–1108. [DOI](#)
- [27] Le Guillou S, Sdassi N, Laubier J, Passet B, Vilotte M, Castille J, Laloe D, Polyte J, Bouet S, Jaffrézic F, Cribiu E, Vilotte J, Le Provost F. Overexpression of miR-30b in the developing mouse mammary gland causes a lactation defect and delays involution. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45727. [DOI](#)
- [28] Tanaka T, Haneda S, Imakawa K, Sakai S, Nagaoka K. A microRNA, miR-101a, controls mammary gland development by regulating cyclooxygenase-2 expression. *Differentiation*, 2009, 77(2): 181–187. [DOI](#)
- [29] Cui W, Li QZ, Feng L, Ding W. MiR-126-3p regulates progesterone receptors and involves development and lactation of mouse mammary gland. *Mol Cell Biochem*, 2011, 355(1–2): 17–25. [DOI](#)
- [30] 崔巍, 王春梅, 李庆章, 冯丽, 丁巍. miR-126 对小鼠乳腺上皮细胞增殖及泌乳功能的影响. *中国乳品工业*, 2011, 39(3): 17–19, 45. [DOI](#)

- [31] 丁巍, 李庆章, 王春梅, 李晔, 崔巍, 冯丽. miR-129-5p 调节小鼠乳腺上皮细胞内 Igf-1 的表达. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(6): 548–553. [DOI](#)
- [32] 王春梅, 李庆章, 李晔. miR-138 对小鼠乳腺上皮细胞的作用及其调控的靶序列. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(7): 834–838. [DOI](#)
- [33] Li HM, Wang CM, Li QZ, Gao XJ. MiR-15a decreases bovine mammary epithelial cell viability and lactation and regulates growth hormone receptor expression. *Molecules*, 2012, 17(10): 12037–12048. [DOI](#)
- [34] Liu SL, Patel SH, Ginestier C, Ibarra I, Martin-Trevino R, Bai SM, McDermott SP, Shang L, Ke J, Ou SJ, Heath A, Zhang KJ, Korkaya H, Clouthier SG, Charafe-Jauffret E, Birnbaum D, Hannon GJ, Wicha MS. MicroRNA93 regulates proliferation and differentiation of normal and malignant breast stem cells. *PLoS Genet*, 2012, 8(6): e1002751. [DOI](#)
- [35] Wright JA, Richer JK, Goodall GJ. microRNAs and EMT in mammary cells and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010, 15(2): 213–223. [DOI](#)
- [36] Eades G, Yao Y, Yang MH, Zhang YS, Chumsri S, Zhou Q. miR-200a regulates SIRT1 expression and epithelial to mesenchymal transition (EMT)-like transformation in mammary epithelial cells. *J Biol Chem*, 2011, 286(29): 25992–26002. [DOI](#)
- [37] Smith AL, Iwanaga R, Drasin DJ, Micalizzi DS, Vartuli RL, Tan AC, Ford HL. The miR-106b-25 cluster targets Smad7, activates TGF- $\beta$  signaling, and induces EMT and tumor initiating cell characteristics downstream of Six1 in human breast cancer. *Oncogene*, 2012, 31(50): 5162–5171. [DOI](#)
- [38] 李庆章. 乳腺发育与泌乳生物学. 北京: 科学出版社, 2009: 59. [DOI](#)
- [39] 冯丽, 李庆章, 崔巍, 丁巍. let-7g 对小鼠乳腺发育和泌乳相关功能基因 Tgfbr1 的作用及其机理. 中国兽医学报, 2012, 32(1): 103–107, 129. [DOI](#)
- [40] Liao YL, Du XG, Lönnerdal B. miR-214 regulates lactoferrin expression and pro-apoptotic function in mammary epithelial cells. *J Nutr*, 2010, 140(9): 1552–1556. [DOI](#)
- [41] 陆黎敏, 李庆章, 王春梅, 李晔, 高学军. miR-221 对小鼠乳腺上皮细胞增殖和泌乳功能的影响. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(5): 454–458. [DOI](#)
- [42] Javed A, Wagner S, McCracken J, Wells DN, Laible G. Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of  $\beta$ -lactoglobulin-free, high-casein milk. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(42): 16811–16816. [DOI](#)
- [43] 万中英, 佟慧丽, 李庆章, 高学军. 中药王不留行增乳活性单体及催乳素对奶牛乳腺上皮细胞特异性 miRNA 的影响. 中国畜牧兽医, 2010, 37(8): 230–232. [DOI](#)
- [44] Bhat-Nakshatri P, Wang GH, Collins NR, Thomson MJ, Geistlinger TR, Carroll JS, Brown M, Hammond S, Srouf EF, Liu YL, Nakshatri H. Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(14): 4850–4861. [DOI](#)
- [45] Feuermann Y, Robinson GW, Zhu BM, Kang K, Raviv N, Yamaji D, Hennighausen L. The miR-17/92 cluster is targeted by STAT5 but dispensable for mammary development. *Genesis*, 2012, 50(9): 665–671. [DOI](#)
- [46] Romao JM, Jin WW, He ML, McAllister T, Guan LL. Altered microRNA expression in bovine subcutaneous and visceral adipose tissues from cattle under different diet. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40605. [DOI](#)
- [47] 李惠侠, 王振云, 张震, 周璇, 王相臣, 韩兆玉, 王根林. 高温条件下 miRNA-24 对奶牛乳腺上皮细胞增殖与凋亡的影响. 中国农业科学, 2010, 43(22): 4732–4738. [DOI](#)