

## · 综述

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2007 )04-0397-04

**MicroRNAs 的研究方法学及其与肿瘤发生发展关系的研究进展****Methodology of MicroRNA research and its correlation with tumorigenesis: recent progress**

宋 莉,王泽剑 综述;殷 明 审阅(上海市交通大学药学院药理课题组,上海 200240)

**[ 摘 要 ]** MicroRNAs( miRNAs )是一类新的、非编码的、内源性小 RNAs,可以通过抑制蛋白质翻译、剪切 mRNA 调节靶基因的表达。通过应用 RNA 反义抑制剂、点突变、转基因和特异性引物,研究特定 miRNA 在肿瘤发生中的作用;应用 Northern blotting 分析、Real-time PCR、miRNA 芯片比较表达谱差异,了解特异性 miRNAs 的表达是上调还是下调,可以对 miRNA 在肿瘤发生中的作用进行研究。越来越多的研究表明,miRNAs 参与了包括肝癌、肺癌、乳腺癌、结肠癌、脑肿瘤及白血病在内的多种肿瘤的发生、发展。MiRNAs 在肿瘤发生、发展中的作用主要表现为 3 个方面:①有些 miRNA 基因可能起着癌基因的作用,调节细胞的增殖、凋亡;②有些 miRNA 基因则可能起到抑癌基因的作用;③一些致癌病毒编码的 miRNA 也可能参与相关肿瘤的发生,细胞 miRNA 可能在致癌病毒生命活动周期中扮演重要角色,而病毒自身为了在宿主细胞中成功存活,也必定会反过来调节细胞 miRNA 的表达,参与肿瘤发生。

**[ 关键词 ]** MicroRNAs; 肿瘤;原癌基因;肿瘤抑制基因;方法学**[ 中图分类号 ]** R734 **[ 文献标志码 ]** A

肿瘤是目前世界上危害最严重的疾病之一。科学家多年来努力工作,在原癌基因、抑癌基因、相关信号转导通路研究等方面做出了不懈的努力,取得了不少成果,但是肿瘤形成的机制仍未完全阐明。近些年一类新的非蛋白质编码 MicroRNAs ( miRNAs )的出现,为肿瘤研究提供了新的思路。

MicroRNAs 是一类内源性非蛋白质编码的 RNA 分子,长约 20 ~ 25 个核苷酸<sup>[1]</sup>。miRNAs 通过直接剪切靶 mRNAs,或者通过完全/不完全与靶 mRNAs 3'非翻译区互补结合抑制靶 mRNAs 的翻译。这些靶 mRNAs 进一步调控多种生物学行为,如发育的进程<sup>[2]</sup>、干细胞分化<sup>[3]</sup>、细胞凋亡<sup>[4]</sup>、疾病<sup>[5]</sup>、以及肿瘤发生<sup>[6]</sup>。通过计算机分析显示 30% 以上的蛋白编码基因可能成为 miRNAs 的靶基因<sup>[7]</sup>。研究显示,50% 的 miRNA 位于肿瘤相关基因组的区域或者脆弱的位点<sup>[8]</sup>,提示 miRNA 可能在部分肿瘤发生中发挥了人们原来所不了解的重要作用。

本综述简要介绍 miRNAs 研究的方法学,以及 miRNAs 作为原癌基因或者肿瘤抑制因子参与人类肿瘤发生的研究,并对人类现有 miRNAs 作为肿瘤治疗的生物靶标及其潜在的应用价值作一介绍。

**1 miRNAs 研究的方法学概况****1.1 上调或者下调 miRNAs 的表达**

上调或者下调候选 miRNAs 的表达是研究 miRNAs 在肿瘤发生中作用的一个好方法。通过特异性抑制 miRNAs 的表达,研究这个 miRNA 在肿瘤发生和发展中的特殊作用。为了实现这一目的,有以下一些方法可以采用:

**1.1.1 反义抑制剂** 通过人工合成反义 RNA 复合物,在体内与 mRNAs 竞争抑制 miRNAs,反义 RNA 与 miRNA 相匹配,抑制 miRNA 的功能。目前,世界上有两个独立的研究小组主要采用这种方法抑制特异性 miRNA,研究其在肿瘤发生中的作用<sup>[9-10]</sup>。

**1.1.2 点突变** 这一研究方法的优点在于可以直接研究 miRNAs 与靶基因的相互作用。一些研究显示 miRNAs 上有一些“种子序列”对于 miRNAs 和靶基因的结合是非常重要的,这种种子序列如果错配,miRNAs 对 mRNA 的调控就会受到严重影响。基于这一理论,可以设计 miRNAs 及其靶目标的点突变。这种“种子序列”上一二个核苷酸的变化,可以显著降低 miRNA 与靶 mRNA 的结合,从而造成所研究 miRNAs 的过度表达。如果这些 miRNAs 或者它们的靶 mRNA 参与肿瘤形成的话,这种点突变可以显著影响肿瘤的生物特性。

**1.1.3 其他研究方法** 主要有转基因、特异性引物等。

**1.2 Northern blotting 分析方法**

Northern blotting 是研究基因在 mRNA 水平表达的可靠手段,在基因表达的研究中被广泛应用。从 1993 年开始,Northern Blotting 就被用于 miRNA 基因的研究中,现在作为肿瘤细胞中 miRNA 表达的研究方法之

**[ 基金项目 ]** 上海市科学技术委员会重大项目( No. 05JC14044 )。Supported by Shanghai Science and Technology Commission ( No. 05JC14044 )

**[ 作者简介 ]** 宋 莉( 1977- ),女,安徽省寿县人,硕士研究生,主要从事肿瘤药理学方面的研究

\* Corresponding author. E-mail: myin@ sjtu. edu. cn

一。Hayashita 等<sup>[11]</sup>用这种方法比较正常细胞和肺癌细胞中 miRNA 的表达情况,发现 miR-17-92 在肺癌中表达明显增高。

### 1.3 实时定量 PCR

实时定量 PCR (real-time PCR) 同样可以用作研究 miRNAs 在肿瘤中的表达及功能研究。2005 年 real-time PCR 被用于 222 种 miRNAs 在人类肿瘤细胞系中的表达研究,而在一些肿瘤中,确实有特异性的 miRNAs 存在<sup>[12]</sup>。该方法可以定量分析前体 miRNAs 和非活化的、成熟的 miRNAs,但是对于前体 miRNAs 和成熟 miRNAs 之间的表达关系,并不是很清楚。

### 1.4 miRNAs 基因芯片

尽管 Northern Blotting 被广泛应用于 miRNAs 的分析研究,Northern Blotting 仍有一些不足之处,如个别探针不能够有效杂交匹配,难以同时研究多个 miRNAs 的作用等等。对于肿瘤研究,非常需要大规模比较肿瘤细胞系和正常细胞系中 miRNAs 的表达谱差异,而基于荧光标记的基因芯片技术 (microarray technology, DNA microarray) 提供了大量检测多种 miRNAs 表达的平台。这一技术可以有效快捷地同时比较大量基因的表达情况,已在诸多实验室被用于 miRNAs 的研究。Lu 等<sup>[13]</sup>研究出一种新的、包括人类肿瘤在内的不同细胞系中检测大量 miRNAs 表达的方法,为了克服 miRNAs 芯片检测中探针特异性的问题,他们首次采用了溶解杂交的方法,然后用流式细胞仪筛选杂交的 miRNAs,来了解低分化肿瘤中的 miRNAs 表达谱。

miRNAs 芯片分析是一种复杂的技术,可以帮助我们了解肿瘤组织和正常组织中 miRNAs 表达的关系。Murakami 等<sup>[14]</sup>通过肝癌组织和邻近非肿瘤组织 miRNAs 表达谱的分析比较发现,miR-18 和 miR-224 在肝癌组织中的表达明显上调,而 miR-199a, miR-195, miR-200a 和 miR-125a 在肝癌组织中的表达明显下降。基于此技术,一些作为原癌基因和肿瘤抑制基因的 miRNAs 被分离鉴定出来,这将有助于理解 miRNAs 在肿瘤发生中的作用,同时也为寻找肿瘤特异性诊断的标志物提供了依据。

## 2 miRNAs 与肿瘤发生的关系

目前认为,miRNA 在肿瘤发生中的作用主要在于 3 个方面:(1)有些编码 miRNA 的基因可能起着癌基因的作用;(2)有些 miRNA 基因则可能起到抑癌基因的作用;(3)一些致癌病毒编码的 miRNA 也可能参与相关肿瘤的发生。

### 2.1 miRNAs 参与肿瘤发生、发展的证据

当细胞出现异常增殖或者凋亡功能受损时,就会形成肿瘤。最近一些研究<sup>[15]</sup>显示,miRNAs 参与了细

胞增殖和凋亡的调节。例如 miR-15 和 miR-16 可以靶向性针对抗凋亡基因 Bcl-2 的 mRNA,从而诱导细胞凋亡,在人类白血病、淋巴瘤等多种肿瘤中发挥抑制作用。Nairz 等<sup>[16]</sup>发现果蝇中 miR-278 的异常表达可以导致眼细胞的无限增殖、抑制凋亡。以上研究说明,miRNA 的具体作用可能是通过调节细胞增殖和凋亡的靶基因,参与肿瘤的发生、发展。

最早对于 miRNAs 参与肿瘤发生发展的证据来自人慢性淋巴细胞白血病<sup>[17]</sup>。人们发现定位于 13q14 的 miR-1a5 和 miR-16a 在 50% 慢性淋巴细胞白血病患者中缺失或者表达下降,认识到 miRNAs 在肿瘤组织和正常组织中表达的差异,有助于确定哪些 miRNAs 参与了肿瘤的发生,进一步为明确它们在肿瘤发生发展中的作用打下基础。近期的研究<sup>[18]</sup>显示,Bcl-2 是 miR-1a5 和 miR-16-1 的靶基因。miR-1a5 和 miR-16-1 的表达与慢性淋巴细胞白血病中 Bcl-2 的表达水平密切相关,这两个 miRNAs 可以从转录后水平负性调控 Bcl-2 的表达,这一研究同时也为白血病的细胞模型提供了依据,提示 miR-1a5 和 miR-16-1 可以被用来治疗过度表达 Bcl-2 的肿瘤。

### 2.2 miRNAs 作为原癌基因

一些实验和临床研究证据都显示,miRNAs 可以作为一类新的肿瘤癌基因或者肿瘤抑制基因。当这些 miRNAs 的表达在肿瘤中增高的时候,就被看作癌基因,它们通过促进肿瘤增殖或者抑制肿瘤抑制基因,调控肿瘤细胞的分化和凋亡。目前研究已经发现很多 miRNAs 在不同的肿瘤中过度表达,它们都作为原癌基因促进肿瘤增殖,但是只有其中少数部分的功能研究比较清楚。

miR-17-92 是原癌 miRNAs 的一个典型例子。miR-17-92 是定位于人 13q31 的多顺反子 miRNAs,这一区域的基因参与了弥漫性 B 细胞淋巴瘤、肺癌在内的多种肿瘤的发生。生物信息学分析提示,miR-17-92 有很多的靶基因,其中肿瘤抑制基因 PTEN 和 RB2 都被预测为 miR-17-92 簇的靶分子<sup>[19]</sup>,PTEN 可以通过 PI3K-Akt-PKB 信号转导通路促进细胞凋亡。但是,目前还没有明确实验证据证明 PTEN 和 RB2 为 miR-17-92 簇的靶分子。同时近期研究显示,miR-17-92 与 c-Myc 基因的表达密切相关,它们同时可以调节细胞周期转录因子 E2F1。c-Myc 是最著名的原癌基因之一,错误表达 c-Myc 或者当其功能异常的时候,通常就会引起恶性肿瘤的发生。O'Donnell 等<sup>[20]</sup>阐明了 c-Myc 可以同时激活 E2F1 和 miR-17-92 的转录。然而,miR-17-15p 和 miR-20a 这两个 miR-17-92 簇中的 miRNAs 却可以抑制 E2F1 的翻译。在 HeLa 细胞中顺式表达 miR-17-92 后使 E2F1 的蛋白表达降低 50%,但是没有

改变 E2F1 mRNA 的表达。此外,miR-20a 发生突变后, E2F1 的蛋白表达增加 4 倍,但是 mRNA 的表达没有改变。这些研究结果说明, c-Myc 可以通过调控 miR-17-92 进一步调节 E2F1 的表达——miR-17-92 通过 ARE-p53 信号转导通路抑制了 c-Myc 诱导的凋亡。miR-372 和 miR-373 是另外两个原癌 miRNAs 的例子,这两个 miRNAs 可以通过中和 p53 介导的 CDK 抑制,直接抑制肿瘤抑制基因 LATS2 的表达,进一步促进人精细管肿瘤细胞的增殖和发展<sup>[21]</sup>。

### 2.3 miRNAs 作为肿瘤抑制基因

在肿瘤的发生中,一些 miRNAs 的表达在肿瘤细胞中有所降低。肿瘤抑制 miRNAs 通常通过抑制原癌基因控制细胞分化和凋亡,进一步抑制肿瘤的发展。近年来,一些 miRNAs 被发现具有肿瘤抑制基因的特性,其中的代表分子就是 let-7。

let-7 是最早发现的 miRNAs 分子之一,最早于线虫中发现,它在线虫由幼虫发育为成虫的过程中发挥了重要作用。let-7 的表达异常时,会导致分化的丢失,不能进入正常的细胞周期,从而不能在正确的时间终止分化,这也是肿瘤细胞的特性之一。在人体染色体中,let-7 所在的区域为经常发生肿瘤突变的染色体区,它在肺癌中的表达降低,患者的生存期缩短。这说明 let-7 可能是一个肿瘤抑制基因。为了验证这一点, Takamizawa 等<sup>[22]</sup> 在人 A549 肺癌细胞系中过度表达 let-7 后发现,它可以在体外抑制肺癌细胞的增殖。近期的研究显示, RAS 原癌基因是 let-7 miRNAs 的一个靶基因,let-7 通过配对结合 RAS 基因 mRNA 的 3' 非翻译区,抑制 RAS 的翻译,从而负性调节 RAS 的表达<sup>[23]</sup>。肺癌细胞内 let-7 的表达明显降低,而 RAS 的蛋白表达明显升高,提示 let-7 可能通过负性调节 RAS,参与肺癌的发生、发展。

### 2.4 miRNA 与致癌病毒

人类肿瘤的 20% 与病毒有关。最近几项研究显示,一些病毒可在自身基因组中编码 miRNA,也可利用宿主细胞编码的 miRNA 在感染细胞中控制自身和宿主基因表达。Omoto 等<sup>[24]</sup> 在 HIV-1 感染细胞内分离出一种 miR-N367,并证明它是病毒基因组 Nef 基因的编码产物,miR-N367 能降低 HIV-1 LTR 启动子活性,从而抑制了 HIV 转录。HCV 的 5' 和 3' 非翻译区各有一段区域能够与肝细胞特异性的 miRNA-122 种子区域部分配对。Jopling 等<sup>[25]</sup> 发现与 miRNA-122 互补的 2'-O-甲基化的反义寡核苷酸能够抑制 HCV 的复制,表明 miRNA-122 是病毒复制的正调控因子。刘妍等<sup>[26]</sup> 采用哺乳动物 miRNA 表达谱芯片技术检测了转染 HBV 全基因组的人成肝细胞瘤细胞系 HepG<sub>2</sub> 细胞中 miRNA 的表达,结果显示与未转染 HepG<sub>2</sub> 细胞间差异表达的

miRNA 共 27 个(占 5.3%),其中 7 个表达上调,20 个表达下调。可差异性上调 miR-181d 和下调 miR-15a,表明肝细胞中存在与 HBV 复制相关的 miRNA。由此可见,细胞 miRNA 可能在病毒生命活动周期中扮演重要角色。而病毒自身为了在宿主细胞中成功存活,也必定会反过来调节细胞 miRNA 的表达。

## 3 结 语

抑癌与致癌 miRNAs 的发现,引发了人们对 miRNAs 与肿瘤发生之间关系的思考。迄今为止,除了 lin-4 和 let-7 以外,其他 miRNAs 的作用机制至今还不很清楚。miRNAs 参与肿瘤调节的一个可能机制就是 miRNA 既可作为抑癌基因,下调原癌基因的活性;也可作为癌基因,下调抑癌基因的活性,调控肿瘤的生物特性,因此,利用反义核酸(antisense miRNAs)或者小干扰 RNA(RNAi)技术有效抑制某个原癌 miRNA 的表达或者提高某个 miRNA 的表达水平,用于肿瘤的生物治疗具有重要的意义和价值。但是目前的实验只能说明 miRNA 是一个作用靶点,是否 miRNAs 也像原癌基因或者抑癌基因一样,直接调节肿瘤的各种特性还有待于深入探讨。

## [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 [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [2] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403(6772): 901-906.
- [3] Zhang BH, Pan XP, Anderson TA. MicroRNA: a new player in stem cells [J]. *Cell Physiol*, 2006, 209(2): 266-269.
- [4] Tanno B, Cesi V, Vitali R, et al. Silencing of endogenous IGFBP-5 by micro RNA interference affects proliferation, apoptosis and differentiation of neuroblastoma cells [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(3): 213-223.
- [5] Alvarez-Garcia I, Miska EA, MicroRNA functions in animal development and human disease [J]. *Development*, 2005, 132(21): 4653-4662.
- [6] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(13): 2257-2261.
- [7] Berezikov E, Guryev V, vande Belt J, et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes [J]. *Cell*, 2005, 120(1): 21-24.
- [8] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, 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.
- [9] Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, et al. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing [J].

- RNA, 2004, 10(3): 544-550.
- [10] Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, *et al.* Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs' [J]. *Nature*, 2005, 438(7068): 685-689.
- [11] Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, *et al.* A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(21): 9628-9632.
- [12] Jiang JM, Lee EJ, Kwak CK, *et al.* Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(17): 5394-5403.
- [13] Lu J, Getz G, Ebert BL, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834-838.
- [14] Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, *et al.* Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues [J]. *Oncogene*, 2006, 25(17): 2537-2545.
- [15] Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas [J]. *Blood*, 2003, 101(4): 1220-1235.
- [16] Nairz K, Kottig C, Kintelen F, *et al.* Overgrowth caused by misexpression of a microRNA with dispensable wild-type function [J]. *Dev Biol*, 2006, 29(2): 314-324.
- [17] 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 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(24): 15524-15529.
- [18] Cimmino A, Calin GA, 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.
- [19] Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, *et al.* Prediction of mammalian microRNA targets [J]. *Cell*, 2003, 115(7): 787-798.
- [20] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, *et al.* c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression [J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 839-843.
- [21] Voorhoeve PM, Agami R. The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(4): 311-319.
- [22] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, *et al.* Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3753-3756.
- [23] Johnson SM, Lin SY, Slack FJ. The time of appearance of the *C. elegans* let-7 microRNA is transcriptionally controlled utilizing a temporal regulatory element in its promoter [J]. *Dev Biol*, 2003, 259(2): 364-379.
- [24] Omoto S, Fujii YR. Regulation of human immunodeficiency virus 1 transcription by nef microRNA [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(Pt3): 751-755.
- [25] Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, *et al.* Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA [J]. *Science*, 2005, 309(5740): 1577-1581.
- [26] 刘妍, 张亮, 戴久增, 等. 乙型肝炎病毒基因组转录 HepG2 细胞的 microRNA 表达研究 [J]. *解放军医学杂志*, 2007, 32(2): 92-95
- [收稿日期] 2007-04-22 [修回日期] 2007-07-31  
[本文编辑] 韩丹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 化学元素和核素符号规范书写的要求

化学符号虽然是化学专业的学术交流语言,但在生物医学领域也有很广泛的使用。化学符号的书写有其特殊的规律和要求,生物医学论文中必须重视化学符号书写的规范化。根据 GB3102.8-93《物理化学和分子物理学的量和单位》的规定,把化学元素和核素符号书写的规范要求介绍如下:

- (1) 元素或核素的单字母符号均用正体大写,双字母符号首字母正体大写,第二个字母用正体小写。
- (2) 核素的核子数(质子数)应标注在元素符号的左上角,例如: $^{60}\text{Co}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{125}\text{I}$  等;过去习惯把核子数标注在元素符号右上角的写法是错误的,例如: $\text{N}^{14}$ ,  $\text{Co}^{60}$  等。
- (3) 离子价态的字符应标注在元素符号的右上角,例如: $\text{H}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{O}^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  等,不应写成  $\text{O}^{-2}$ ,  $\text{O}^{--}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Al}^{+++}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$  等。
- (4) 激发态的字符(电子激发态用 \*; 核子激发态用正体 m, 也可用 \*) 标注在元素或核素符号的右上角,例如: $^{110}\text{Ag}^{\text{m}}$ ,  $^{110}\text{Ag}^*$ ,  $\text{He}^*$ ,  $\text{NO}^*$  等。
- (5) 分子中核素的原子数标注在核素符号右下角,例如: $\text{H}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$  等。
- (6) 质子数(原子序数)标注在元素符号左下角,例如: $_{82}\text{Pb}$ ,  $_{26}\text{Fe}$  等。
- (7) 对于形状相似的元素符号、化合物的化学式符号,书写时应注意区分,如:Co(钴)—CO(一氧化碳),No(锗)—NO(一氧化氮),Ba(钡)—Ra(镭),Nb(铌)—Nd(钕)—Np(镎),HF(氟化氢)—Hf(铪)等。

(本刊编辑部)