

microRNAs 在血液细胞分化及相关肿瘤中的作用

杨桂花, 王 芳, 张俊武

中国医学科学院 北京协和医学院 基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005

通信作者: 张俊武 电话: 010-65296423, 传真: 010-65240529, 电子邮件: junwu_zhang@pumc.edu.cn

摘要: microRNAs (miRNAs) 是一类普遍存在的长度约为 21 ~ 25 个核苷酸的小分子 RNA, 通过与靶 mRNA 3'端非编码区互补结合在转录后水平抑制靶基因的表达。血细胞形成是一个包括多个基因有序的开启和关闭, 复杂而又精密的调控过程, 调控异常会导致各种血液病的发生。miRNA 参与了造血调控并与某些血液系统肿瘤的发生相关。

关键词: miRNAs; 血细胞分化; 血液系统肿瘤

中图分类号: Q522 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2007)03-0425-05

Roles of microRNAs in Hematopoietic Cell Differentiation and the Related Tumors

YANG Gui-hua, WANG Fang, ZHANG Jun-wu

National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China

Corresponding author: ZHANG Jun-wu Tel: 010-65296423, Fax: 010-65240529, E-mail: junwu_zhang@pumc.edu.cn

ABSTRACT: MicroRNAs (miRNAs) are a family of 21-25 nucleotide small nonprotein-coding RNAs. They regulate gene expression at post-transcriptional level by mRNA degradation or translation repression. Hematopoiesis is one of the most important highly regulated multistage process, which includes orderly turn-on and turn-off of many genes; any wrong modulation may result in blood diseases. Several miRNAs have been found to be involved in hematopoiesis and hematopoietic tumor genesis.

Key words: microRNA; hematopoietic cell differentiation; hematopoietic tumors

Acta Acad Med Sin, 2007, 29(3): 425-429

小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一类普遍存在的长度约为 21 ~ 25 个核苷酸的小分子 RNA。迄今已在植物、斑马鱼、果蝇、老鼠、人类中发现了 2 000 多种小 RNA, 其特征是在序列上具有高度的进化保守性, 表达上具有发育阶段性和组织特异性。已有报道其参与了生长发育、细胞增殖、胰岛素分泌和脂肪代谢等多种生理过程^[1]。

血细胞形成是生物体发育和生命维持的重要环节之一, 机体内血细胞形成过程的调控包含两个方面: (1) 多能造血干细胞的自我更新; (2) 造血干细胞向至少 8 个血细胞系的分化决定并继续发育、

分化为成熟的血细胞。这些过程是涉及多个基因有序开启和关闭的复杂而又精密的调控过程。调控异常可导致多种血液病发生。近年研究证明, miRNA 在正常造血过程中发挥了重要作用, 并与血液系统肿瘤的发生、发展密切相关。

miRNA 的生成和作用机制

miRNA 的生成 miRNA 的生成主要包括 2 个过程, 分别在细胞质和细胞核中进行。在细胞核内编码 miRNA 的基因由 RNA 聚合酶 II (RNAPol II) 转

录生成单顺反子或多顺反子初级转录物 (Pri-miRNA)^[2], 其长度在 100~1000 个核苷酸。Pri-miRNA 随后被 Drosha RNase 和 DGCB8 构成的复合体剪切成长度约 70 个核苷酸并具有茎环结构的 miRNA 前体 (pre-miRNA)。Drosha 行使 RNase III 核酸内切酶的功能, DGCB8 则能够直接结合 Pri-miRNA, 稳定发夹结构, 指导 Drosha 的定向剪切^[3,4]。pre-miRNA 在 Ran-GTP 依赖的核质/细胞质转运蛋白 Exportin 5 的作用下, 从细胞核运送到细胞质中^[5], 然后被另外一种 RNase III 核酸内切酶复合物剪切成长度约 21~25 个核苷酸长的 miRNA: miRNA* 双体。此复合物由 Dicer 与反向激活的 RNA 结合蛋白 [trans-activating region (Tar) RNA-binding protein, TRBP] 和干扰素诱导的依赖 RNA 双链的蛋白激酶组成^[6~8]。双体中一条链结合到 RNA 诱导的基因沉默复合物^[9], 另一条链被降解。哪一条链结合到 RISC 并不是完全随机的。miRNA: miRNA* 双螺旋中两条链并不是完全配对的, 两条链的 3'端均有 2 个游离的核苷酸。miRNA 链上靠近 5'端有一个不与 miRNA* 配对的突起, 显著减弱了 miRNA 5'端的稳定性, 所以成熟的 miRNA 总是偏向于选择不稳定的 5'端^[10]。

miRNA 的作用机制 人类 RISC 由 eIF2C2、解旋酶 Gemin 3 和 Gemin 4 构成。eIF2C2 属于 Argonaute 家族成员, 能够在 miRNA 和靶 mRNA 完全互补时特异降解 mRNA, Gemin 3 和 Gemin 4 的功能目前尚不明确。miRNA 参与的基因调控主要有两种方式, 即靶 mRNA 的降解和翻译抑制^[11]。当 miRNA 和靶 mRNA 接近完全互补时多采取第一种方式, 在植物中多见。而在动物中, 多数情况下 miRNA 和靶 mRNA 3'非翻译区不完全互补配对, 通过翻译抑制靶 mRNA 的表达。最近 Wu 等^[12]又提出另外一种去腺苷酸化机制也参与了 miRNA 的基因调控, 已知 Lin-28 mRNA 的 3'非翻译区与 miR-125b 不完全互补, 他们把 miR-125b 转入人类胚胎肾细胞 293T 后, 观察到连接了 Lin-28 的 β -球蛋白 mRNA 明显缩短, 这种缩短又与 3'腺苷酸尾的清除有关。

miRNA 的靶基因 基于最初发现的 lin-4、let-7 miRNA 与其靶基因相互作用特点得出了目前的 miRNA 与靶基因作用的规律: (1) miRNA 作用位点位于靶基因的 3'UTR; (2) miRNA 的作用位点很可能不止一个, 才能发挥充分的抑制作用; (3) miRNA 和靶 mRNA 往往并不完全互补。在寻找靶基因时观察到 miRNA 5'端的 2~8 个核苷酸几乎无一例外地与靶

mRNA 3'的 UTR 区完全互补^[13], 这一序列被称为“seed”序列。靶位点在不同的物种间往往是保守的, 同时结合小 RNA 与靶基因形成二聚体的热力学稳定性和二级结构分析等可以预测小 RNA 靶基因^[14]。

miRNA 与血细胞分化

有关 miRNA 在血液系统形成中的作用, 最初研究是发现几个特定的 miRNA 选择性地特异的血细胞中表达。例如: 鼠 miR-181 在 B 淋巴细胞中高表达, miR-142 在 B 淋巴细胞和髓系细胞中高表达, miR-223 在髓系中高表达^[15]。其中 miR-181 在鼠骨髓造血干细胞中中等程度的表达, 随着向 B 系分化的过程明显增加, 而在向其他系分化过程中没有变化。体外实验说明, miR-181 的过表达能够促进 B 细胞分化, 使 B 细胞数量明显增加。用高表达 miR-181 的重组逆转录病毒感染致死剂量紫外线照射后的小鼠骨髓, 4 周半后外周血中 B 细胞从对照的 32% 提高到 80%, 同时伴随着 T 淋巴细胞减少 80%。这些提示 miR-181 可能在血细胞分化过程中起着重要作用。Naguibneva 等^[16]发现在肌肉分化过程中 miR-181 表达明显升高, 在用软件预测及随后的双荧光报告实验证明了 miR-181 的靶基因为 *Hox-A11*, 在肌肉分化成熟中发挥重要作用。由于同一个 miRNA 可有不同的靶基因, 那么根据 miR-181 在 B 系分化中重要作用, 推测很可能在 B 系分化的信号途径中有其他基因是 miR-181 的靶基因, 或者 *Hox-A11* 本身在 B 系分化中发挥重要作用。

Monticelli 等^[17]用 miRNA 芯片和 Northern 杂交方法分析了小鼠造血细胞不同分化阶段 181 个 miRNAs 的表达变化。miR-150 在成熟的脾 B 细胞表达而在前 B 细胞中不表达, 在早期的 Th 细胞中表达, 随着向 Th1、Th2 分化的过程中明显降低。miR-223 在多能干细胞中表达很高, 而在以后的分化阶段几乎不表达。miR-26a、miR-27a 在多能干细胞中低表达而在髓系干细胞中表达明显升高。miR-146b 在早期的 Th 细胞中呈中等程度表达, 而在向 Th1 分化时升高, 向 Th2 分化时降低。最近研究表明, miR-146a 是通过作用于肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TNF receptor-associated factor 6, TRAF6) 和白介素 1 受体相关激酶 1 (IL-1 receptor-associated kinase 1, IRAK1) 基因 3'非翻译区而发挥作用^[18]。miRNA 在不同的造血

细胞分化阶段表达不同可能是由于 miRNA 转录生成 pri-miRNA 时受到控制特异细胞分化的关键转录因子调控,也可能是 miRNA 在转录后调控某些链系特异表达的基因,参与造血分化决定。比较在造血分化过程中不同链系分化时转录因子及特异基因的变化,与相应的 miRNA 的变化相联系,再根据 miRNA 靶基因预测的结果和 miRNA 上游转录因子结合序列可能进一步揭示 miRNA 调控网络。Garzon 等^[19]有关巨核细胞分化过程中 miRNA 研究就是一个很好的例子。他们分离了 CD34⁺多能干细胞,体外诱导向巨核细胞分化后,miR-10a、miR-126、miR-106、miR-10b、miR-10b 和 miR-20 明显减少,通过巨核细胞分化前后蛋白因子的比较,发现 miR-130a 可能的靶基因 *MAFB* 蛋白在向巨核细胞分化过程中表达明显增加,但其 mRNA 只是轻微增加。通过体外荧光报告基因的方法,转染 *miR-130a* 的荧光强度较对照组下降了 60%,证明 miR-130a 是通过作用于 *MAFB* 参与了巨核细胞的分化。用同样方法证明了 *HOX1* 是 miR-10 的靶基因。Felli 等^[20]分离 CD34⁺细胞后在红系分化培养基中培养,观察到 miR-221、222 明显降低,kit 蛋白在 CD34⁺细胞向红系分化的过程中,前 12d 逐渐升高,但其 mRNA 表达几乎没有变化。miR-221 和 miR-222 的变化与 kit 蛋白的表达正好相反。用双荧光报告基因方法证明了高表达 miR-221、222 后能够使得带有 kit 蛋白 3'UTR 的质粒荧光明显降低。在高表达 kit 蛋白的 TF-1 细胞系转染 miR-221 和 miR-222 后,kit 蛋白明显降低。在功能方面发现转染 miR-221 和 miR-222 后细胞的增殖速度减慢,有核红细胞的成熟速度增加;培养后期,转染细胞死亡率增加。而在不表达 kit 蛋白的 HL-60 细胞系中,高表达 miR-221 和 miR-222 并不影响细胞增殖速度,进一步说明了 miR-221 和 miR-222 是通过 kit 蛋白起作用的。

近来研究已证明 miR-223 在粒细胞分化过程中的重要作用^[21]。最初发现急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 患者用维甲酸 (RA) 治疗后 miR-223 明显升高,APL 细胞系 NB-4 体外 RA 诱导后 miR-223 也明显升高。RA 具有能够促进髓系细胞向粒系细胞分化的作用,推测有可能通过 miR-223 发挥作用。同时在 *miR-223* 基因上游鉴别到 C/EBP α 和 NFI-A 的结合位点,在通常情况下 NFI-A 结合在 *mir-223* 基因上游,抑制 *miR-223* 的转录,当用 RA 诱导向粒细胞分化时,C/EBP α 取代了

NFI-A, C/EBP α 具有转录活化作用,促进了 miR-223 基因的转录,所以在 RA 治疗后 3 d 内 miR-223 明显升高。同时 *NFI-A* 还是 miR-223 的靶基因,表达增加的 miR-223 进一步在转录后水平抑制 *NFI-A* 的表达,从而以正反馈途径促使细胞不断地向粒细胞分化。

miRNA 与血液系统肿瘤

有关 miRNA 参与血液系统肿瘤发生和发展的第 1 个直接证据是发现 miR-15、16 正好处于慢性淋巴细胞性白血病 (chronic lymphocyte leukemia, CLL) 基因缺失区 13q14 的 30 kb 内,而在大多数 ($\approx 68\%$) B 淋巴细胞性白血病 (B-cell chronic lymphocyte leukemia, B-CLL) 患者的 miR-15、16 表达下调^[22]。Cimmino 等^[23]又发现,在 B-CLL 细胞中 miR-15a 和 miR-16-1 的表达与 BCL2 蛋白表达呈负相关,实验证明它们直接与 BCL2 mRNA 的 3'UTR 序列相互作用调控 BCL2 蛋白的表达。BCL2 本身具有抗凋亡作用,能够使肿瘤细胞逃避细胞凋亡。因此推测,miR-15a 和 miR-16-1 表达下调导致的 BCL2 过表达可能在人类大部分 B 细胞 CLL 发病中起重要作用。之后,Calin 等^[24]又发现,约有一半以上的 miRNAs 处于肿瘤发生相关的区域即脆性位点、杂合性丢失区、扩增区或断裂位点,这为 miRNAs 与造血系统肿瘤的关联提供了间接证据。在以上证据的基础上,Calin 等^[25]利用 miRNA 芯片方法对 CLL 患者和正常人 B 细胞中的 miRNAs 比较发现,有 13 种 miRNAs (miR-15a、195、221、23b、155、223、29a-2、24-1、29b-2、146、16-1、16-2、29c) 表达明显不同,其中 9 种 (miR-15a、195、221、23b、155、24-1、146、16-1、16-2) 在预后差 (ZAP-70 高表达,无免疫球蛋白 IgV_H 的突变) 组中高表达。用 PMA 生存分析得到 9 个 miRNAs (miR-181a、155、146、24-2、23b、23a、222、221、29c) 的表达与从诊断到初次治疗时间相关,除 miR-29c 外其他 8 个在间隔时间短、预后差的组中都高表达。

在弥漫性大 B 淋巴细胞瘤中 (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL), miR-155 在激活的 B 细胞亚型中高表达而在幼稚 B 细胞亚型中几乎没有表达,而前者比后者的侵蚀性强,临床预后也差。由于对 DLBCL 的激活 B 细胞亚型还没有合适的临床诊断指标,miR-155 可能填补这个空缺。在 Birkitt's 淋巴瘤

(BL)中, *miR-155* 的表达也比正常人高出 100 倍左右, 提示 *miR-155* 可能在 BL 的发生和发展过程中起作用, 其机制可能是通过间接抑制某些抑癌基因的表达而实现^[26-30]。

miR-17-92 基因簇 (包括 *miR-17-5p*、*miR-17-3p*、*miR-18a*、*miR-19a*、*miR-20a*、*miR-19b-1* 和 *miR-92-1* 基因) 定位于常见的 B 淋巴细胞瘤异常扩增区域 13q31, 已在 B 淋巴细胞瘤中检测到成熟的小 RNA 表达水平明显增加^[31]。已有实验证明 *miR-17-5p*、*miR-20a* 的靶基因是转录因子 E2F1, 后者的作用是促进细胞凋亡。*miR-17-92* 基因簇的表达是由原癌基因 *c-Myc* 调节, *c-Myc* 作用一方面促进细胞周期的进程, 同时激活 *miR-17-92* 基因簇的表达, 转录后抑制 E2F1 的表达, 促使细胞逃离正常的凋亡途径, 获得永生性。*miR-17-92* 基因簇和 *c-Myc* 协同表达可以促使小鼠造血干细胞提前形成肿瘤, 且肿瘤的恶性程度增加^[32]。

浸润性淋巴瘤白血病中常有 t(8;17) 号染色体的异位, *miR-142* 基因正好位于这个区域。异位的结果是 *miR-142* 基因与截短的 *c-Myc* 基因形成融合基因, 导致 *c-Myc* 在 *miR-142* 基因启动子控制下高表达和 *miR-142* 下游剪切信号的缺失而不能被 Dicer 酶识别产生成熟的 *miR-142* 分子^[33]。组织和原位杂交实验结果也证明 *miR-142* 在造血细胞中特异表达, 提示它可能在浸润性淋巴瘤白血病中发挥着重要的作用, 具体的作用机制尚需进一步研究。

综上所述, miRNAs 在正常血细胞分化过程中发挥着重要作用, 因此 miRNAs 的异常表达很可能涉及到血液系统疾病的发生和发展。目前对于 miRNAs 的研究还在初级阶段, 生物信息学的发展和靶基因的实验确定将有助于揭示 miRNAs 在调控正常血细胞分化以及相关血液系统肿瘤中的详细分子机制, miRNAs 的检测有望成为某些血液系统肿瘤的诊断手段, miRNAs 及其靶基因的表达控制也将可能成为治疗某些血液系统肿瘤的手段。

参 考 文 献

- [1] Harfe BD. MicroRNAs in vertebrate development [J]. *Opin Genet Dev*, 2005, 15(4):410-415.
- [2] Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR, et al. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs [J]. *RNA*, 2004, 10(12):1957-1966.
- [3] Han J, Lee Y, Yeom KH, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha - DGCR8 complex [J]. *Cell*, 2006, 125(5):887-901.
- [4] Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, et al. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs [J]. *Nature*, 2004, 432(7014):235-240.
- [5] Lund E, Guttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursor [J]. *Science*, 2004, 303(5654):95-98.
- [6] Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing [J]. *Nature*, 2005, 436(7051):740-744.
- [7] Patel RC, Sen GC. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR [J]. *EMBO J*, 1998, 17(15):4379-4390.
- [8] Lee Y, Hur I, Park SY, et al. The role of PACT in the RNA silencing pathway [J]. *EMBO J*, 2006, 25(3):522-532.
- [9] Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex [J]. *Science*, 2002, 297(5589):2056-2060.
- [10] Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias [J]. *Cells*, 2003, 115(2):209-216.
- [11] Du T, Zamore PD. MicroPrimer: the biogenesis and function of microRNA [J]. *Development*, 2005, 132(21):4645-4652.
- [12] Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103(11):4034-4039.
- [13] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. *Cell*, 2005, 120(1):15-20.
- [14] Hmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, et al. Fast and effective prediction microRNA/target duplexes [J]. *RNA*, 2004, 10(10):1507-1517.
- [15] Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation [J]. *Science*, 2004, 303(5654):83-86.
- [16] Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Poleskaya A, et al. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation [J]. *Nature Cell Biology*, 2006, 8(3):278-284.
- [17] Monticelli S, Ansel KM, Xiao C, et al. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system [J]. *Genome Biology*,

- 2005, 6(8):R71.
- [18] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, *et al.* NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses [J]. PNAS, 2006, 103(33):12481-12486.
- [19] Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, *et al.* MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis [J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103(13):5078-5083.
- [20] Felli N, Fontana L, Pelosi E, *et al.* MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation [J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102(50):18081-18086.
- [21] Fazi F, Rosa A, Fatica A, *et al.* A microcircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBP α regulates human granulopoiesis [J]. Cell, 2005, 123(2):819-831.
- [22] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu, *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, 2002, 99(24):15524-15529.
- [23] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, *et al.* MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 [J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102(39):13944-13949.
- [24] 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, 2004, 101(9):2999-3004.
- [25] Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, *et al.* A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia [J]. N Eng J Med, 2005, 353(17):1793-1801.
- [26] Van den Berg A, Kroesen BJ, Kooistra K, *et al.* High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma [J]. Genes, 2003, 37(1):20-28.
- [27] Metzler M, Wilda M, Busch K, *et al.* High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2004, 39(2):167-169.
- [28] Eis PS, Tam W, Sun L, *et al.* Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas [J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102(10):3627-3632.
- [29] 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.
- [30] Kluiver J, Haralambieva E, de Jong D, *et al.* Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2005, 45(2):147-153.
- [31] He L, Thomson JM, Hemann MT, *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene [J]. Nature, 2005, 435(7043):828-833.
- [32] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, *et al.* c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression [J]. Nature, 2005, 435(7043):839-843.
- [33] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, *et al.* Identification of tissue-specific microRNAs from mouse [J]. Curr Biol, 2002, 12(9):735-739.

(2007-01-15 收稿)