微小 RNA-140 及其与颌面部发育

李灵综述 石冰审校
（四川大学华西口腔医院唇腭裂外科 成都 610041）

[摘要] 微小 RNA-140 是参与脊椎动物胚胎颌面部发育的分子之一，具有重要的生物学功能。本文比较了微小 RNA-140 在成熟和靶标识别方面相对于其他微小 RNA 的异同，并进一步就微小 RNA-140 对颌面部发育的调控作用作一综述。

[关键词] 微小 RNA-140； 成熟； 靶标识别； 颌面部发育
[中图分类号] Q 786 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2011.04.014

MicroRNA-140 and its function in craniofacial development *Li Ling, Shi Bing.* (*Dept. of Cleft Lip and Palate Surgery, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu* 610041, *China*)

[Abstract] MicroRNA-140 is one of the factors that regulate craniofacial development of vertebrates, and thus has important biological functions. Here we compared the differences of maturation and target recognition between general microRNA and microRNA-140. Moreover, we reviewed the craniofacial development regulation of microRNA-140.

[Key words] microRNA-140； maturation； target recognition； craniofacial development

微小 RNA 是一种约有 22 个核苷酸单位，可调节蛋白表达的内源性单链 RNA 分子。在生长发育的生理过程和疾病发生的病理过程中，诸多细胞信号通路都受其调节。1993 年，微小 RNA 在线虫体内被发现。随着研究的深入，人们了解了微小 RNA 的成熟通路，并发现微小 RNA 通过识别靶标 mRNA 发挥生物学功能。微小 RNA-140 是调节脊椎动物胚胎颌面部发育的重要分子，微小 RNA-140 的成熟和靶标识别受若干因素的调控。本文就微小 RNA-140 的成熟和靶标识别以及微小 RNA-140 在颌面部发育中的作用等研究进展作一综述。

1 微小 RNA-140 的成熟

经典的微小RNA成熟途径分为细胞核和细胞质 2个阶段：在细胞核内，微小 rna 基因在 RNA 聚合酶Ⅱ或Ⅲ的作用下，转录形成具有发夹结构的初级转录产物原始微小RNA（primary miRNA，pri-miRNA），pri-miRNA 在核酸内切酶Drosha、迪格奥尔格综合征结构域-8 蛋白（DiGeorge syndrome critical region-8，DGCR-8）、双链RNA结合蛋白构成的微处理复合体作用下，形成约 70 个核苷酸的发夹结构：前体微小RNA（precursor miRNA，pre-miRNA）。pre-miRNA 输出蛋白-5与鸟苷三磷酸酶（guanosine triphosphatase，GTPase）大鼠肉瘤相关核蛋白酶Ran（Ran-GTP）转运至细胞质，然后被微小RNA 沉默复合体识别并结合，再被核糖核酸酶Ⅲ Dicer 剪切形成 22个核苷酸左右的双链微小 RNA。经典的微小 RNA 的成熟受诸多因素的调节，其中包括诸多转录因子[1-2]，微小 RNA启动子的甲基化[3-4]，微处理复合体对某些微小RNA 的特殊剪切和某些特殊的剪接机制[5-7]。

目前，还没有研究显示微小RNA-140 的成熟不遵循经典的微小RNA 成熟途径，但是微小RNA-140 的成熟受一些因素的调节。首先，微小RNA-140 受到其前体茎结构上的单核苷酸多态性（rs7205289）的调节：这一单核苷酸多态性位点的A等位基因可使成熟微小RNA-140的表达下降[8]。此外，在核内加工完毕后，pre-miRNA 由输出蛋白-5 和 GTPase大鼠肉瘤相关核蛋白酶 Ran 运载到细胞质中[9]，输出蛋白-5 与 pre-miRNA是否结合取决于pre-miRNA 的双链茎结构和 3’端悬臂结构[10-12]。pre-miRNA-140 无 2 个核苷酸的 3’端

[收稿日期] 2010-08-04； [修回日期] 2011-01-20
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目（81070816）
[作者简介] 李灵（1982—），女，四川人，博士
[通讯作者] 石冰，Tel：028-85501462

悬臂，但仍可被正确加工。推测这可能系输出蛋白-5与GTPase大鼠肉瘤相关核蛋白酶Ran可运载的小发夹RNA的种类较已经发现的更多，也可能有其他因子参与了无悬臂的pre-miRNA的转运过程[6]。

2 微小RNA对靶标的识别

过去认为，微小RNA调控靶标的机制主要是微小RNA的引导链，通过碱基配对来引导微小RNA沉默复合体结合到与引导链部分或完全互补的靶标mRNA的3'端非翻译区上，然后通过翻译抑制，加速的核酸外切或限制性核酸内切来实现靶向抑制，调节mRNA及其蛋白水平。近来认为，微小RNA靶标不一定位于mRNA的3'端非翻译区。对微小RNA靶标的寻找，通常要经过软件预测和试验验证等阶段。过去，大多数预测靶标的软件都将靶标的寻找简单地定位到3'端非翻译区，但是，至今没有任何证据证明微小RNA只能作用于3'端非翻译区；相反却有试验证明，微小RNA介导的抑制对于3'和5'端非翻译区的靶标同样有效[13]。当研究者们采用不限于3'端非翻译区的微小RNA靶标预测软件[14]时，他们找到并验证了多个位于小鼠转录物开放读码框区的微小RNA靶标[15]；然而，微小RNA靶标预测软件的假阳性率和假阴性率是不可忽略的。虽然已有研究中得以验证的靶标绝大多数位于3'端非翻译区，但这缘于许多生物信息软件只针对3'端非翻译区设计，而忽略了基因组的其他区域所导致的偏差。例如，Nicolas等[16]在中度表达微小RNA-140的小鼠间充质干细胞系C3H10T$_{1/2}$中，分别转染微小RNA-140的模拟物和抑制物，结果发现了49个基因可能是微小RNA-140的靶标。在这49个基因中，有21个含有微小RNA-140的种子序列，但这49个基因均不在已有的靶标预测软件中。

种子序列是位于微小RNA的5'端、约6个核苷酸的碱基序列，与靶标严格的连续互补。过去认为，种子序列与靶标的配对对靶标识别非常重要[17-19]，但是却没有研究证实其是微小RNA发挥功能所必须。近来发现，微小RNA与靶标的相互作用常常悖离种子序列的规则：某些微小RNA的靶标上除了种子样靶标外，还有诸多具有功能的非种子靶标[15,20-22]。此外，即便某些微小RNA通过种子序列识别了靶标并调节了蛋白水平，但是当将靶标上的个别碱基突变后，微小RNA与靶标的结合也并未受到影响[23-24]。迄今，还没有研究证明种子序列的作用规则是微小RNA发挥功能的充分必要条件。微小RNA-140与靶标的相互作用是否遵循种子序列的规则还有待进一步的研究。

3 微小RNA-140与颌面部发育

2002年，微小RNA-140在小鼠的小肠组织中被发现[25]。接下来，Cai等[26-27]根据微小RNA在物种间高度同源的原理，在人类的肿瘤组织中也找到了微小RNA-140。通过检测数百个微小RNA在各个细胞系中的表达情况发现，微小RNA-140最常见的成熟序列为cagugguuuuacccuaugguag（http://www.mirbase.org）。微小RNA-140的编码基因位于遍在蛋白联结酶-2基因的内含子区，这一内含子在包括人类的各种脊椎动物之间具有同源性，故推测微小RNA-140的功能可能在这些物种间高度保守[28]。

微小RNA-140即特异性地表达于硬骨鱼类胚胎的头部、下颌、腮弓和鳍部[29-30]，也特异性地表达于鸡胚头部的额突、中鼻突、侧鼻突、上颌突以及体部的脊索[31]，还在包括小鼠胚胎颅颌面部的胚胎软骨组织中特异性地高表达[32]。以上研究提示，微小RNA-140可能对脊椎动物的颌面部发育，尤其是颌面部成骨具有调控作用。Tuddenham等[32]还发现，将与微小RNA-140碱基序列相同的小干扰RNA-140转染到小鼠3T3细胞系中，可抑制组蛋白去乙酰化酶基因的表达。他们认为，微小RNA-140通过靶向作用于组蛋白去乙酰化酶基因，可能促进肥大前软骨细胞向肥大软骨细胞转化。

但是，上述研究为体外研究，而微小RNA及其靶标在体内的表达情况，是检验微小RNA是否与靶标在体内结合的重要标准[19]，因此这些研究并未确定组蛋白去乙酰化酶基因是否微小RNA-140的靶标。而后Eberhart等[28]在对斑马鱼的研究中，否定了组蛋白去乙酰化酶基因是微小RNA-140的靶标。即便微小RNA-140在小鼠细胞中是组蛋白去乙酰化酶基因的靶标，其功能也不抑制肥大前软骨细胞向软骨细胞转化。这缘于在Dicer酶缺失的小鼠细胞中，微小RNA均无法正常成熟，而此时的软骨细胞肥大化反而被促进，而非被抑制[33]。

血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor，PDGF)受体(PDGF receptor，PDGFR)-α是微小RNA-140 的体内靶标[28]。在斑马鱼的胚胎发育过程中，将微小 RNA-140过表达，会导致其唇腭裂；将微小RNA-140 抑制，会导致其唇腭畸形；在过表达微小RNA-140 时，斑马鱼的表型与敲除pdgf 基因通路的表型一致。通过生物信息软件发现，在PDGF 通路中，仅PDGFR-α含微小RNA-140 的结合位点，而且在各种脊椎动物间高度保守。将微小 RNA-140的模拟物与阻遏物分别同带有绿色荧光蛋白的 PDGFR-α 的3'端非翻译区的转录物直接注射到斑马鱼胚胎中，证实其3'端非翻译区的确是微小 RNA-140 的靶标；微小RNA-140 通过下调神经脊细胞膜上PDGFR-α 的质量分数，使神经脊细胞在经过视柄(视茎)周围时不会被 PDGFR-α-a 吸引，从而正常地迁移到口腔外胚层，形成腭部。

虽然微小 RNA-140 的编码序列在物种间高度保守，但是以人类为对象的研究还比较少。迄今，仅有 Miyaki等[34]以人类膝关节软骨组织为研究对象发现，健康的人类关节软骨组织表达微小RNA-140 的量显著高于患骨关节病的软骨组织，诱发骨关节病的关键因子白细胞介素-1β 可下调微小 RNA-140，微小 RNA-140 可改变数个骨关节病相关基因的转录物表达量。遗憾的是，此研究仅限于转录水平检测微小 RNA-140 对数个骨关节病相关基因的影响，缺乏蛋白水平的证据。颞下颌关节的发育和疾病可能也受到微小 RNA-140 的调节，但这一推测需要进一步地研究给予证实。

4 展望

微小 RNA-140 是参与胚胎发育的重要分子，但由于其生物学过程复杂、多变，人们对微小RNA-140 的认识并不完全。虽然已有多项研究证实，微小 RNA-140 在胚胎发育过程中特异性地表达于骨发生部位，并且在颌面部发育中不可或缺，但也有研究显示微小 RNA-140 在小鼠肺部表达并受环境调控[35]；所以，微小 RNA-140 在胚胎发育中是否仅仅作用于成骨部位，在颌面部是否仅仅调节骨发育，以及在成体内如何发挥作用还需要进一步的研究。期待对微小 RNA-140 更深入的研究，为将来颌面部发育性疾病的基因治疗带来福音。

5 参考文献

[1] He L, He X, Lim LP, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network[J]. Nature, 2007, 447(7148):1130-1134.

[2] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression[J]. Nature, 2005, 435(7043):839-843.

[3] Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells[J]. Cancer Cell, 2006, 9(6):435-443.

[4] Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(36):13556-13561.

[5] Okamura K, Hagen JW, Duan H, et al. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila[J]. Cell, 2007, 130(1):89-100.

[6] Berezikov E, Chung WJ, Willis J, et al. Mammalian mirtron genes[J]. Mol Cell, 2007, 28(2):328-336.

[7] Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing[J]. Nature, 2007, 448(7149):83-86.

[8] Li L, Meng T, Jia Z, et al. Single nucleotide polymorphism associated with nonsyndromic cleft palate influences the processing of miR-140[J]. Am J Med Genet A, 2010, 152A(4):856-862.

[9] Yi R, Qin Y, Macara IG, et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs[J]. Genes Dev, 2003, 17(24):3011-3016.

[10] Lund E, Güttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors[J]. Science, 2004, 303(5654):95-98.

[11] Lund E, Dahlberg JE. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006, 71(1):59-66.

[12] Zeng Y, Cullen BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(16):4776-4785.

[13] Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5'UTR as in the 3'UTR[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(23):9667-9672.

[14] Miranda KC, Huynh T, Tay Y, et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes[J]. Cell, 2006, 126(6):1203-1217.

[15] Tay Y, Zhang J, Thomson AM, et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation[J]. Nature, 2008, 455(7216):1124-1128.

[16] Nicolas FE, Pais H, Schwach F, et al. Experimental identification of microRNA-140 targets by silencing and overexpressing miR-140[J]. RNA, 2008, 14(12):2513-2520.

[17] Mallory AC, Reinhart BJ, Jones-Rhoades MW, et al. MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: Importance of pairing to the microRNA 5'region[J]. EMBO J, 2004, 23(16):3356-3364.

[18] Brennecke J, Stark A, Russell RB, et al. Principles of microRNA-target recognition[J]. PLoS Biol, 2005, 3(3): e85.

[19] Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression[J]. Genes Dev, 2004, 18(5):504-511.

[20] Stern-Ginossar N, Elefant N, Zimmermann A, et al. Host immune system gene targeting by a viral miRNA[J]. Science, 2007, 317(5836):376-381.

[21] 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.

[22] Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation[J]. Mol Cell, 2008, 30(4):460-471.

[23] Johnston RJ, Hobert O. A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 2003, 426(6968):845-849.

[24] Didiano D, Hobert O. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions[J]. Nat Struct Mol Biol, 2006, 13(9):849-851.

[25] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse[J]. Curr Biol, 2002, 12(9):735-739.

[26] Cai X, Lu S, Zhang Z, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(15):5570-5575.

[27] Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, et al. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer [J]. Cancer Res, 2007, 67(13):6031-6043.

[28] Eberhart JK, He XJ, Swartz ME, et al. MicroRNA Mirn-140 modulates Pdgf signaling during palatogenesis[J]. Nat Genet, 2008, 40(3):290-298.

[29] Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, et al. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development[J]. Science, 2005, 309(5732):310-311.

[30] Ason B, Darnell DK, Wittbrodt B, et al. Differences in vertebrate microRNA expression[J]. PNAS, 2006, 103(39):14385-14389.

[31] Darnell DK, Kaur S, Stanislaw S, et al. MicroRNA expression during chick embryo development[J]. Dev Dyn, 2006, 235(11):3156-3165.

[32] Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, et al. The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells[J]. Febs Letters, 2006, 580(17): 4214-4217.

[33] He X, Eberhart JK, Postlethwait JH. MicroRNAs and micromanaging the skeleton in disease, development and evolution[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(4):606-618.

[34] Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, et al. MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(9):2723-2730.

[35] Zzotti A, Calin GA, Arrigo P, et al. Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke[J]. Faseb J, 2009, 23(3):806-812.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第418页)

[21] van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, et al. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans[J]. Nat Genet, 2000, 24(4): 342-343.

[22] Lidral AC, Reising BC. The role of MSX1 in human tooth agenesis[J]. J Dent Res, 2002, 81(4):274-278.

[23] Mostowska A, Biedziak B, Jagodzinski PP. Axis inhibition protein 2(AXIN2) polymorphisms may be a risk factor for selective tooth agenesis[J]. J Hum Genet, 2006, 51(3):262-266.

[24] 袁林天, 文玲英, 陈金武, 等. 多数牙先天缺失可能与MSX1上的3个SNPs相关[J]. 实用口腔医学杂志, 2009, 25(1):47-50.

[25] Lammi L, Arte S, Somer M, et al. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer[J]. Am J Hum Genet, 2004, 74(5):1043-1050.

[26] Tao R, Jin B, Guo SZ, et al. A novel missense mutation of the EDA gene in a Mongolian family with congenital hypodontia[J]. J Hum Genet, 2006, 51(5):498-502.

[27] Tarpey P, Pemberton TJ, Stockton DW, et al. A novel Gln358Glu mutation in ectodysplasin A associated with X-linked dominant incisor hypodontia[J]. Am J Med Genet A, 2007, 143(4):390-394.

[28] Han D, Gong Y, Wu H, et al. Novel EDA mutation resulting in X-linked non-syndromic hypodontia and the pattern of EDA-associated isolated tooth agenesis[J]. Eur J Med Genet, 2008, 51(6):536-546.

[29] Song S, Han D, Qu H, et al. EDA gene mutations underlie non-syndromic oligodontia[J]. J Dent Res, 2009, 88(2):126-131.

(本文编辑 汤亚玲)