
microRNA研究进展

作者：writer 来源：本站

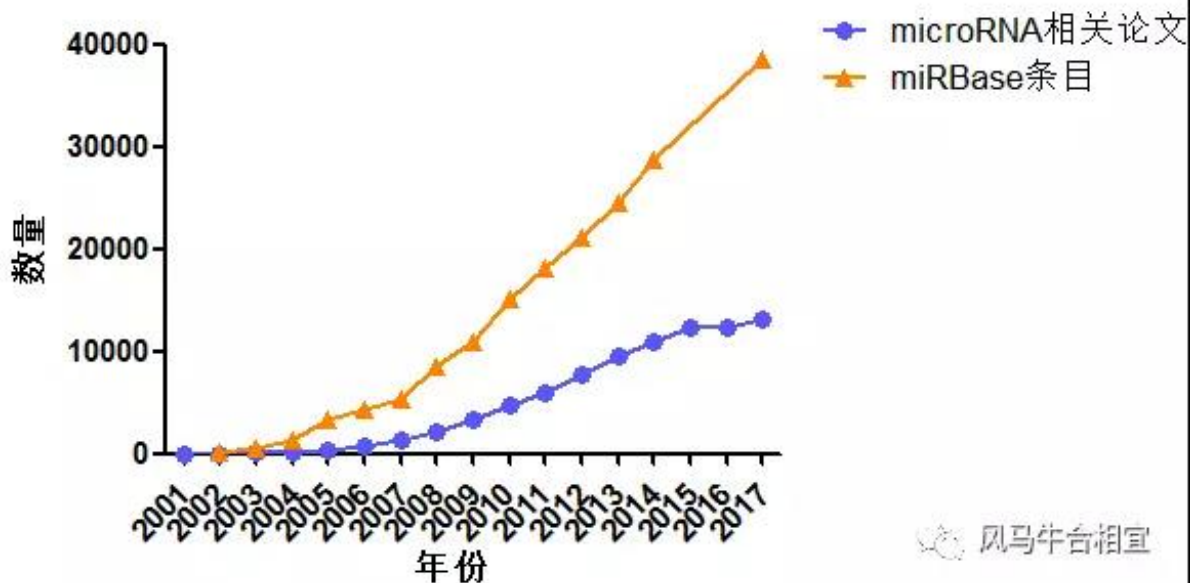
本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/314.html>

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

实验室的领导张辰宇教授是长江学者、国家杰青，现担任南京大学校务委员会副主任、生命科学学院院长。张辰宇教授



我们实验室最大的一个研究方向是microRNA。近十年来在国际上开拓了许多前沿领域，一直处于国内最顶尖小RNA研究实验室行列。特别值得注意的成果包括：



在讨论microRNA之前，有必要介绍与之紧密相关的RNAi现象。早在1990年，Napoli等人在对矮牵牛(petunia)色素表达的研究中，首次观察到RNAi现象[1]。作者向矮牵牛中导入外源色素合成基因，试图加深矮牵牛的紫色。然而，观察到的实验结果不是紫色加深，而是减弱了。进一步研究表明色素基因的mRNA水平发生了下调，而且这种抑制正是源于导入的外源同源基因，作者称之为“共抑制(co-suppression)”。当时作者并不清楚其真实机理，推测可能与甲基化有关。

之后Cogoni等人在粗糙脉孢菌(1994)[2]、Guo等人在线虫(1995)[3]中的研究也都观察到类似的外源核酸引起内源基因表达抑制的现象，但都不能合理解释这些结果。

到了1998年，Andrew Z. Fire和Craig C. Mello证明了上述现象中起作用的其实并非引入的单链RNA，而是双链RNA[4]。向线虫人为注入单链RNA只能引起靶基因微弱的抑制，而注入双链RNA则可以引起高效特异的抑制效果。作者将这种现象命名为“RNA干扰(RNA interference, RNAi)”。这一研究解决了一直以来的争论，开创了一片全新的研究领域。

随后的几年里，RNAi现象在真菌、拟南芥、水螅、斑马鱼甚至哺乳动物中被重现，而Fire和Mello也凭借这一重大发现获得了2006年度诺贝尔生理学或医学奖。

microRNA(简称为miRNA)的发现同样不是一片坦途。1993年，Victor Ambros和Gary Ruvkun分别领导的两个实验室在线虫中发现了一种名为lin-4的基因[5, 6]。这种基因并不编码蛋白，而是表达一种长度为22nt的小RNA，并且这种小RNA可以抑制一种核蛋白LIN-14基因的表达从而调节线虫的发育。他们推测这种抑制的机制在于lin-4能够与LIN-14 mRNA的3'-UTR上独特的重复区域相互补。发生在线虫第一幼虫期末尾的这种抑制作用将启动线虫从第一幼虫期向第二幼虫期的发育转变，因此这种小RNA又被称为“小分子时序RNA(small temporal RNA, stRNA)”。

然而这一发现并未得到科学界的重视，只是被当做一个特例存在。下一个类似现象的报道，是在七年之后的2000年。第二个被发现的miRNA被命名为let-7，长21nt，由Gary Ruvkun在对线虫的研究中发现[7]。同lin-4类似，let-7也能通过结合在一些靶基因(lin-14,lin-28,lin-41,lin-42以及daf-12)的mRNA的3'-UTR上，从而调节线虫的发育。Let-7的发现，以及当时RNAi领域的兴起，让人们意识到这种调节性小RNA可能是一种广泛存在的基因表达调控机制。在2001年10月，Thomas

Tuschl、David Bartel和Victor Ambros三人分别领导的三个研究组在《Science》杂志同期发文，将这种小RNA命名为microRNA(微小核糖核酸)，简称miRNA[8-10]。随后的几年里，成千上万的miRNA在各种物种(包括人类、小鼠、大鼠、斑马鱼、果蝇、水稻、拟南芥等几乎所有类群的动植物)中被发现，开辟了一片全新而广阔的科学研究领域。

鉴于miRNA的迅速发现以及功能的阐明，迫切需要一个统一的命名规则与使用规范。来自Sanger研究所的科学家们在2002年开发了microRNA Registry，后更名为miRBase，为miRNA的研究提供了规范和方便[11]。miRBase数据库的发展，可以从一个角度反映miRNA领域的研究进展。miRBase从2002年到2018年，总共22个大版本共计35个小版本;收录的miRNA条目数从2001年的218个增加到2018年的38589个，增加了100倍(如下图1.1)。而仅仅人类基因组所编码的miRNA前体已经达到1881个，成熟体则达到了2588个。现在依然不断有新的miRNA被发现。另外，我们利用Web of science梳理了miRNA在2001年重新被发现后该领域所发表的论文，如下图1.1所示，年论文量从2001年的5篇增加到了2017年的13179篇，增加了2000多倍。

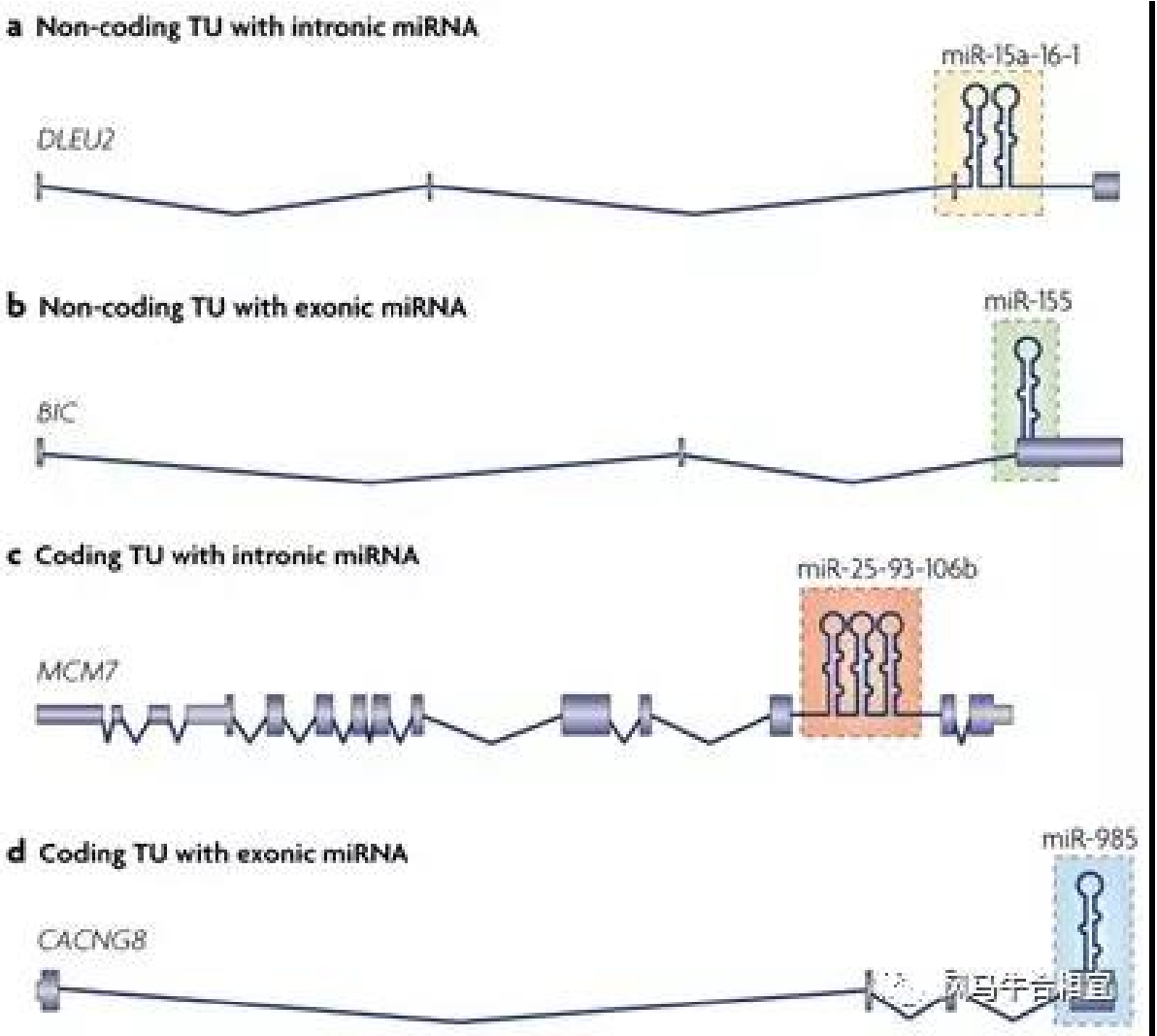


图1.1 miRNA自发现以来种类和相关论文的数量变化。Web of science和miRBase数据库的记录显示：2001年以来，miRNA研究的相关论文数量和被发现的miRNA数量逐年递增。

miRNAs是一类长约22nt的单链小RNA，由细胞内源产生的发卡(hairpin)结构转录本加工而来[12]

。miRNAs的加工成熟是一个经历了细胞核到细胞质空间转变、多种酶和辅助蛋白协调完成的受到多层次调节的多步骤精密反应[12]。以下主要介绍动物miRNA的成熟过程。

动物miRNA是一类在进化上非常保守的基因。线虫55%的miRNAs在人体内有同源分子，提示miRNA在进化上高度保守，可能有着重要的生物学功能[13]。约有40%的miRNA的基因位于编码蛋白的基因的内含子区域(内含子miRNA)，与宿主基因(host gene)共享启动子和调节元件[14]。约50%的miRNA拥有独立的非编码转录本，其中约40%位于这些转录本的内含子区域，10%位于外显子区域[12]。(图1.2)

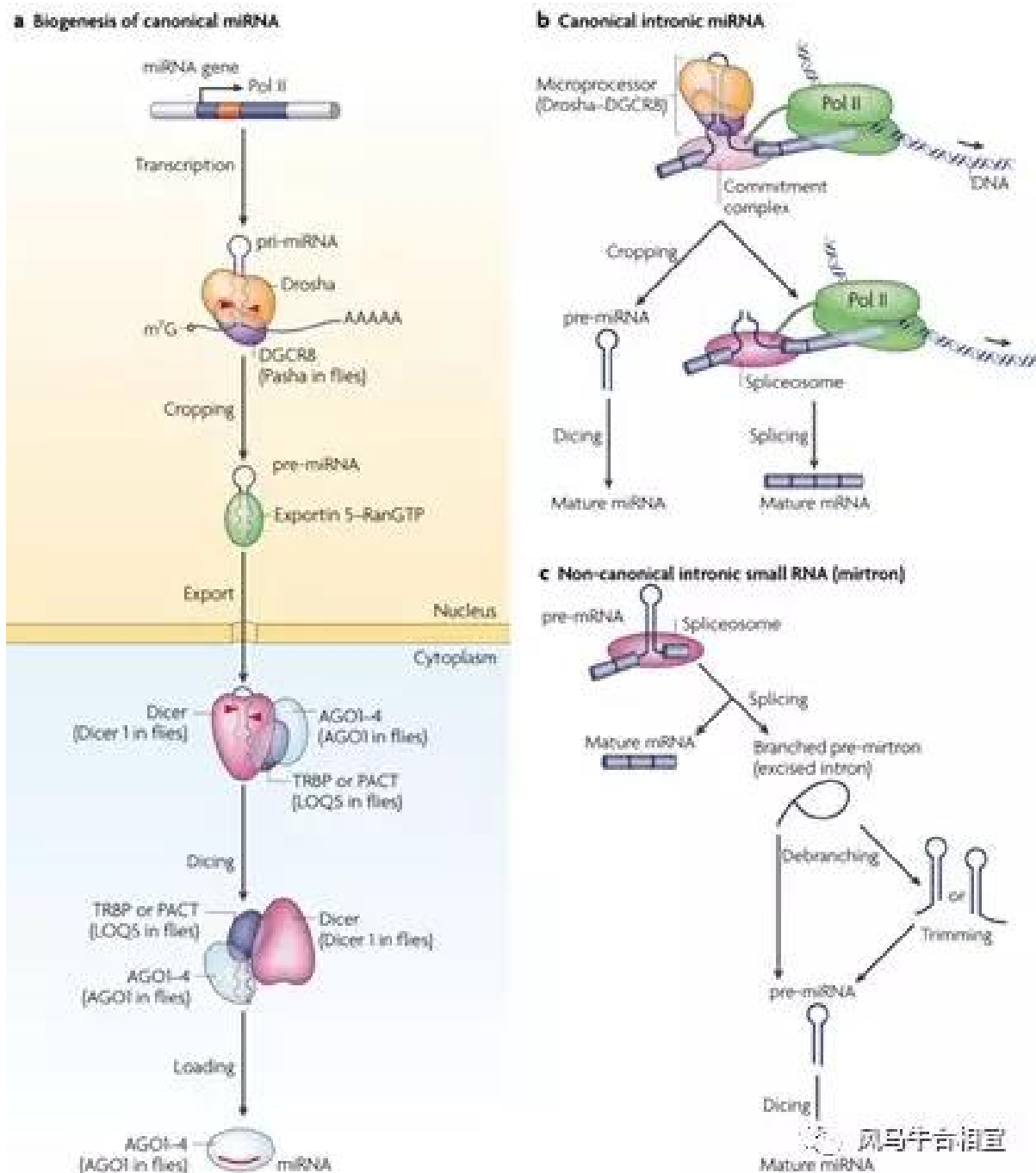
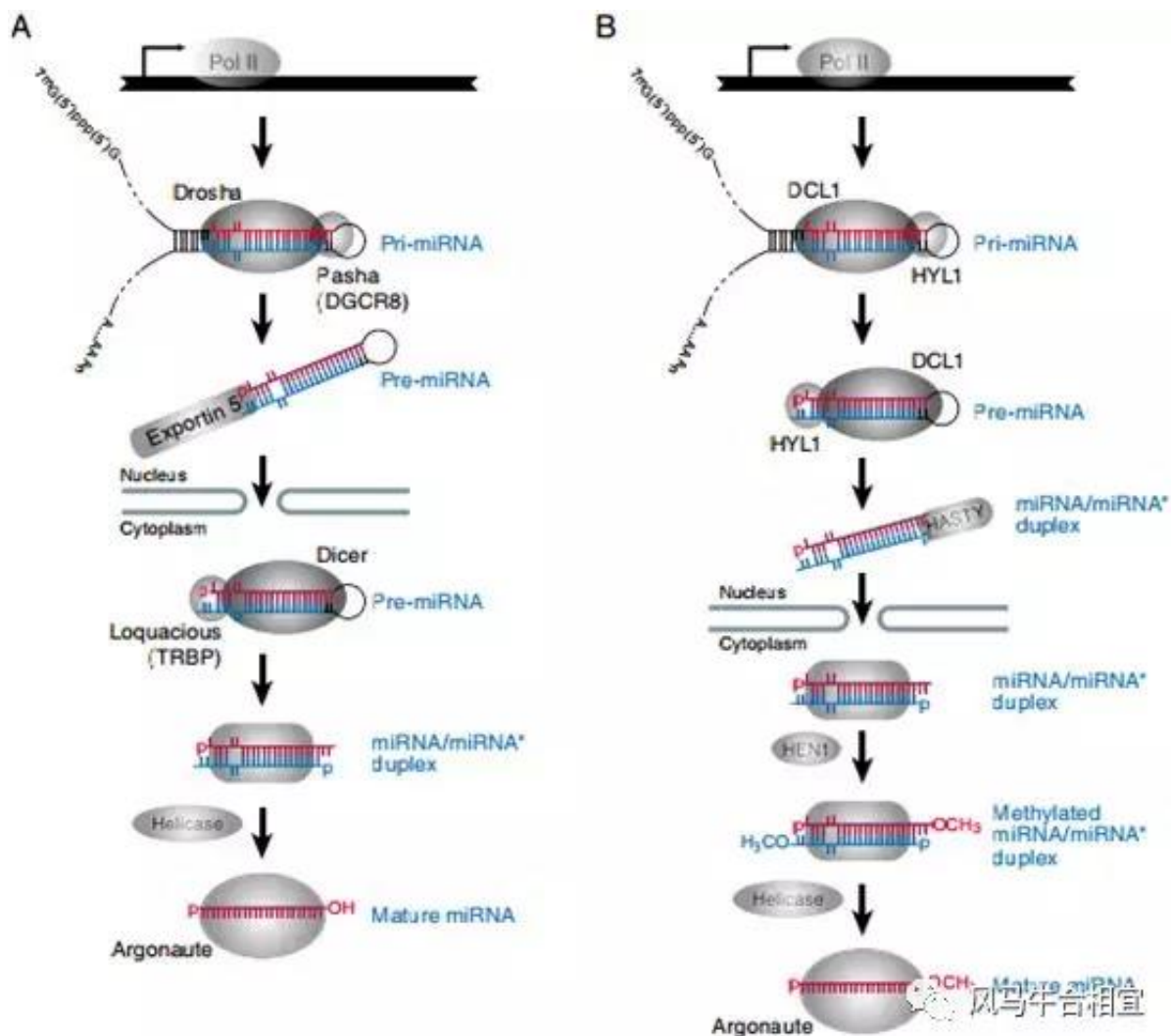


图1.2 miRNA在基因组上的位置[12]。miRNA在基因组上分布位置广泛，既可以在非编码单元(ab)，又可以在编码单元(cd);既可以在内含子区域(ac)，又可以在外显子区域(bd)。

绝大多数miRNA的转录是由RNA polymerase II (Pol II)介导的[15]，少数由RNA polymerase III (Pol III)介导(图1.3)[16]。RNA Pol II有着多种多样的互作调节蛋白，这使得miRNA在转录这一步骤可以受到精密调控。RNA聚合酶最先合成的是miRNA的初始转录本(primary transcript)，称为primary miRNA(pri-miRNA)。Pri-miRNA一般长达数千nt，内部有茎环结构(stem-loop structure，见图1.3)。Pri-miRNA到最终的成熟体miRNA，需要经历“切两刀”。首先，pri-miRNA上的茎环结构会在细胞核中被RNase III型的核酸内切酶Drosha从初始转录本上切割下来[17]，得到的长约65nt的小发卡结构称为pre-miRNA。目前的研究表明，这第一刀切割是一个共转录(co-transcriptional)过程，也即发生在初始转录本尚未与基因组DNA相分离的时候，并且对于内含子miRNA而言，这个过程并不影响其余内含子的共转录切除[18]。随后，pre-miRNA被一个细胞核转运蛋白exportin 5(EXP5)转运到细胞质中[19]。来到细胞质的pre-miRNA会被细胞质中另一种核酸内切酶Dicer切第二刀，形成一个22nt左右的双链RNA[20]。需要指出的是，Drosha酶和Dicer酶的切割都具有RNase III的一个特性，那就是会在切口的3端留下2nt的悬垂(overhang)结构[21]，这一结构有助于miRNA接下来被装载到RISC(RNA - induced silencing complex，RNA介导的沉默复合体)上。特别地，Drosha和Dicer切割miRNA前体时，并不是单独在起作用，而是有许多辅助蛋白(如DGCR8之于Drosha[22]以及TRBP和PACT之于Dicer[23, 24])参与，使得切割过程可以受到精确的调控。接下来，这个双链RNA会被装载到Ago蛋白中，以便形成最终发挥作用的RISC复合物。这一装载过程需要Dicer、TRBP(和/或PACT)以及Ago形成的RISC装载复合物(RISC loading complex，RLC)的帮助[25, 26]。之后会发生一个链选择(strand selection)的过程：选择哪一条链被保留在RISC中去行使功能，哪一条链被丢弃。这个选择的基本原则是：两条链里，双链5端相对更不稳定的那一条链倾向于被保留，而另一条链则会被丢弃然后降解。当然，这一规则并不严格，导致有的双链的两条链都可能被保留下来，这种时候需要在miRNA的序号后面加上5p或者3p加以区分[27, 28]。



植物miRNA和动物miRNA进化上是独立进行的，导致的结果是两者在序列、前体以及成熟过程等方面都有所区别[29, 30]，这里略述如下。首先是植物miRNA的序列在动物体内很少有同源物。其次植物miRNA的前体pre-miRNA的茎环结构比动物的更长(动物的一般在65-70nt，而植物的可以长达数百nt)，长度也更多变[31]。另外，动物的Drosha酶在植物体内缺乏同源蛋白，所以植物pri-miRNA的两刀都是在细胞核中由Dicer-like 1(DCL1，同样是一种RNase III型核酸内切酶)所完成。另外，植物miRNA的3端会被HEN1甲基转移酶甲基化[32]，而动物miRNA则不会被甲基化修饰(图1.4[33])。

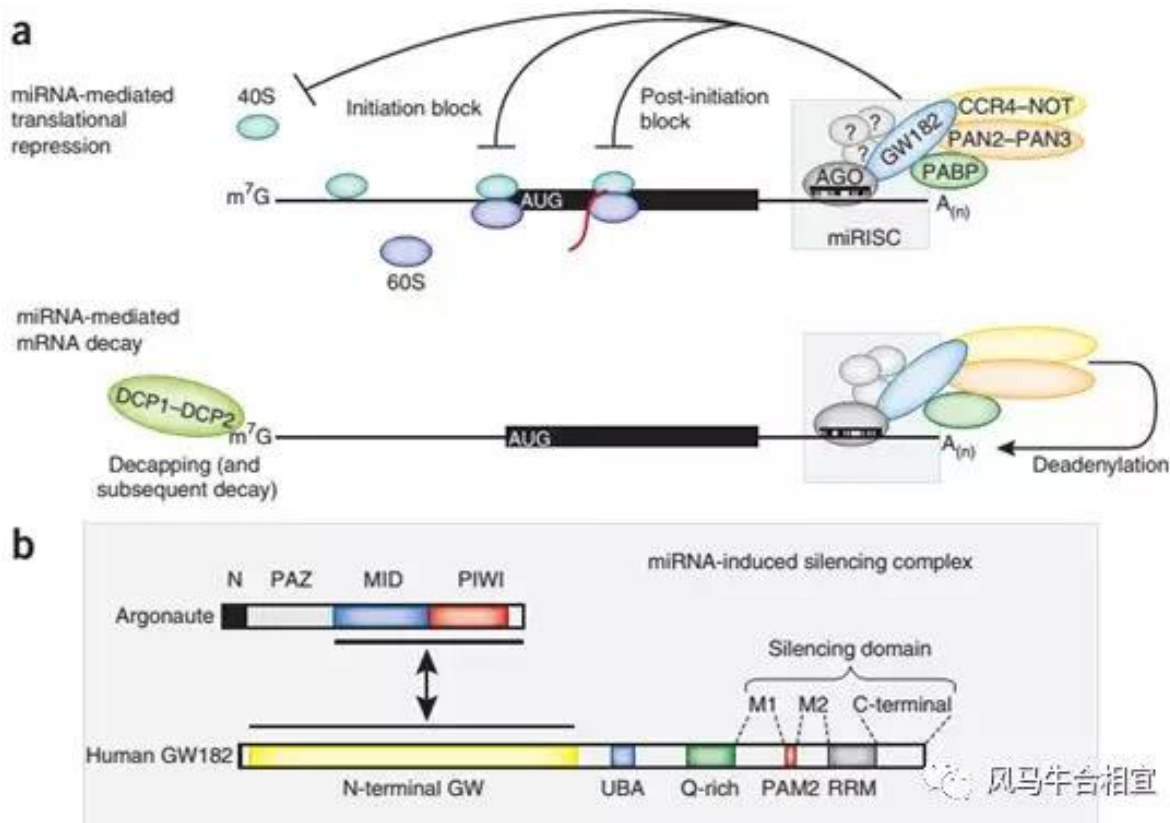


图1.4动植物miRNA的加工成熟途径的比较[33]。两者在前体结构、酶学和转录后修饰等方面有所区别。

转录抑制涉及到一个重要的蛋白GW182。RISC有两个核心组件：AGO蛋白和AGO结合蛋白GW182。GW182可以通过N端的GW结构域结合AGO蛋白，而它的C端的沉默结构域(silencing domain)可以形成一个大的平台用以招募其它辅助蛋白，比如PABP、CCR4-NOT等。通过这些结合蛋白，可以在两个层面抑制mRNA的翻译。第一可以在转录起始之前，抑制40S核糖体小亚基和60S核糖体大亚基结合成80S的核糖体，从而阻止翻译的起始。第二可以在翻译延伸阶段，阻止核糖体的前进，导致翻译中止[34-36](如图1.5)。

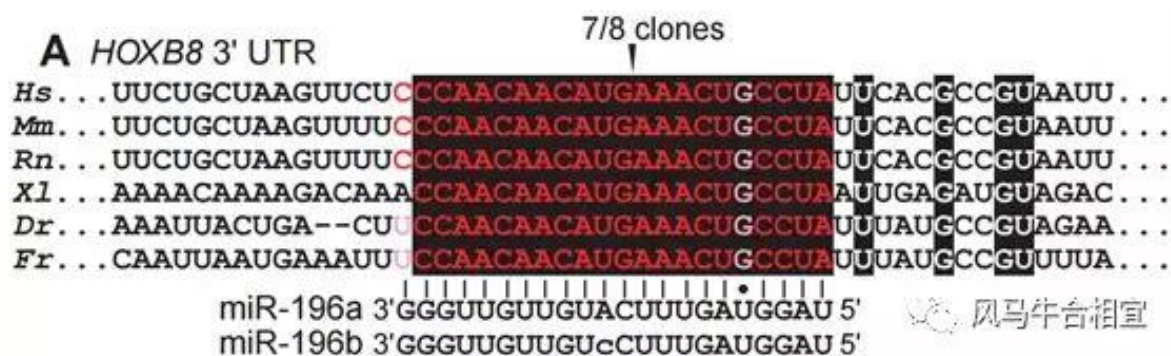


图1.5动物miRNA的作用机制(a)及AGO蛋白和辅助蛋白GW182的结构(b)[35]。

mRNA的切割在动物中并不常见。因为动物体内的miRNA一般与靶基因匹配程度不高(除种子序列之外)，而mRNA的切割需要miRNA与靶基因尽可能地完美匹配。切割作用的执行者是AGO蛋

白。哺乳动物有四种AGO蛋白，分别是AGO1-4，其中有切割功能的只有AGO2[37]。由于miRNA A装载到四种AGO蛋白的概率一致，所以要发生切割mRNA的反应，必须满足两个条件：miRNA被AGO2包裹并且能与靶基因很好的配对。动物体中一个miRNA介导的mRNA切割作用的例子是miR-196和HOXB8[38]。如图1.6所示，miR-196与HOXB8有近乎完全的匹配，导致了mRNA切割的发生。

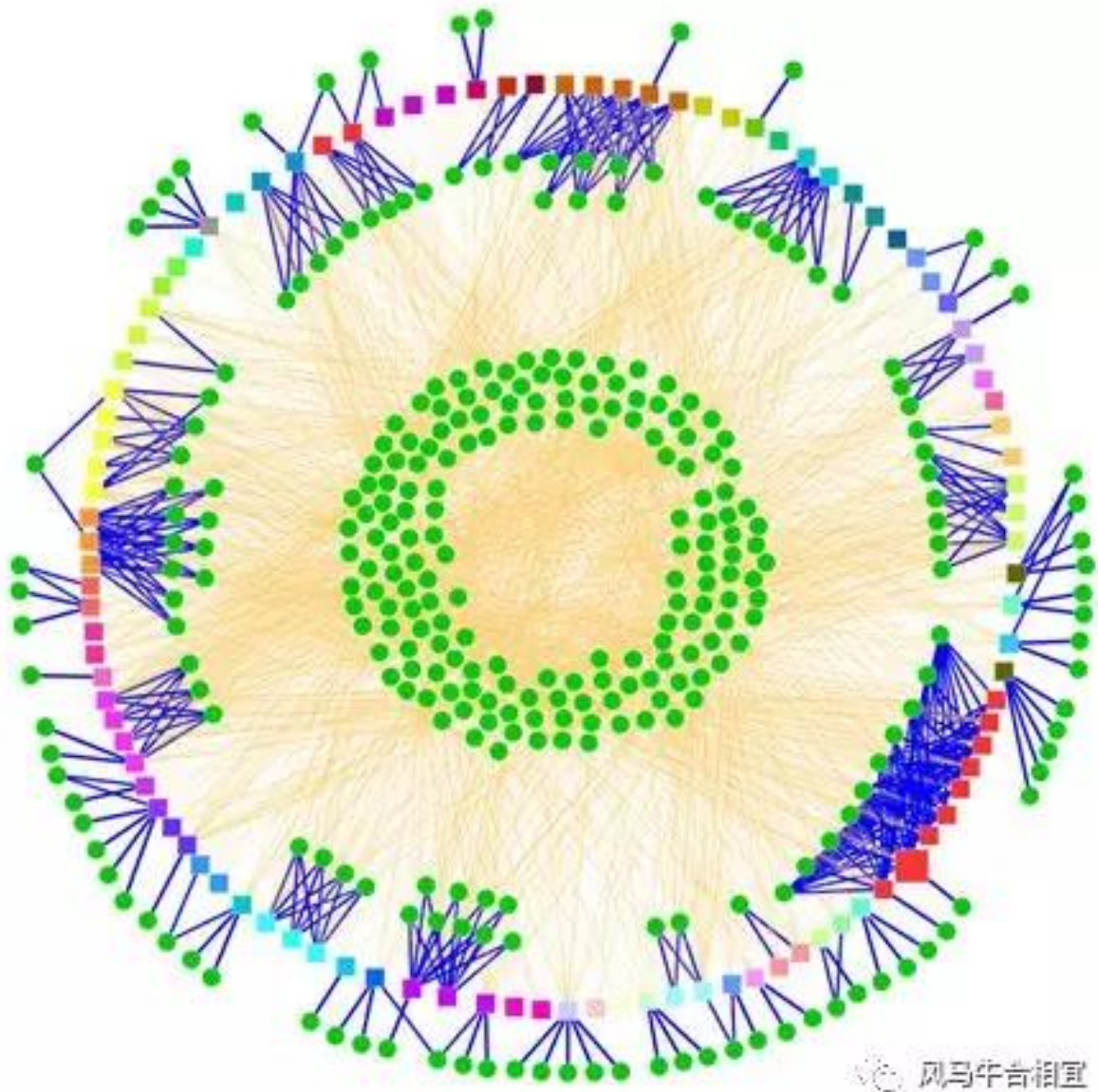


图1.6 miR-196与HOXB8结合位点示意图[38]。miR-196与靶基因HOXB8的相互作用是动物里少有的高度匹配的例子，将导致靶基因mRNA被切割。

另外一种影响mRNA水平的作用方式是miRNA介导的mRNA降解。如图1.5所示，当mRNA的正常转录受到抑制时，可能引发mRNA的脱帽、脱尾反应，然后引起mRNA从5端或者3端开始降解。这可能是动物细胞中miRNA造成mRNA水平降低的主要方式[39-41]。而被切割的mRNA也可以触发降解机制。

需要指出的是，关于miRNA在mRNA上的结合位置，主要认为是在3' -UTR上。但是后来的研究

表明，有的miRNA也能结合到5' -UTR甚至CDS区上行使功能[42, 43]。目前已有的证据综合来说，结合到5' -UTR的miRNA常常起到转录激活的作用，这有可能是RISC复合物“撑”开了折叠的mRNA，方便转录起始因子或核糖体的进入。比如miR-10a可以结合到核糖体蛋白的mRNA的5' -UTR上，增强核糖体蛋白的翻译及核糖体的合成，从而提高全局性的蛋白合成[42]。而结合到CDS区的miRNA则跟结合到3' -UTR的经典负调控方式相同。比如Tay et al找到多个miRNAs可以结合到Nanog、Oct4和Sox2的CDS区，并且抑制这些蛋白的表达[43]。

当然，miRNA介导的转录抑制与mRNA降解有时候并不是两种互相排斥的机制，有可能是一个前后相继的过程。在2000年左右发现的p小体(p-body)可能是这种推测的证据[44-46]。有研究表明，受到miRNA抑制的mRNA并不马上被降解，而是聚集在p小体里。这可能是一种临时而经济的状态。当外界需要重新利用这些mRNA时，它们可以从p小体被释放，可以迅速解除抑制翻译出蛋白质。当外界的确不再需要这些mRNA，它们可以由p小体转移到核糖体中彻底降解[47-49]。植物miRNA的作用方式与动物miRNA有差别，主要在于植物miRNA要求与靶基因mRNA完全匹配，然后AGO蛋白会切割靶基因mRNA导致其降解，类似于动植物的siRNA系统。这大概是由于动植物AGO蛋白的结构存在差异。这样的结合一方面可以提到基因的抑制效率：mRNA的切割将彻底使靶基因不能翻译；另一方面提高了靶基因调节的精确性，降低了脱靶概率。但是，这样又可能破坏类似于动物miRNA和p小体的抑制平衡，当需要受抑制的基因重新表达时，只能重新合成，不够经济；另外这样一对一的作用方式，会增加植物miRNA系统的基因组成本：基因组上必须对不同基因保留不同的miRNA序列[30]。

另外，关于miRNA的作用场所，主要细胞质，也有报道在细胞质加工成熟的miRNA可以重新进入细胞核发挥调节作用[50]。

miRNA行使功能主要依靠上述方式抑制下游基因表达，减弱或消除下游基因的功能，以这种间接方式来实现对生理病理状态的调节。据估计，miRNA能调节人类近1/3的基因[14, 51-54]。而一个基因往往受到数个甚至数百个miRNA的调控(而这些估计主要是基于miRNA通过种子序列结合到靶基因mRNA的3' -UTR这一基础，如果考虑不依赖种子序列的结合方式，这一数字将更为可观[51])。因此，miRNA的基因调控作用将是一个复杂的网络状结构，如图1.7所示[55]。这样的结构会带来两个结果：首先一个具体的miRNA的功能将非常广泛，通过直接或者间接的调控，可以影响到很多下游靶基因表达及相应生物学功能；而不同miRNA之间的相互配合又可以加强这种效果。但是，这样又会造成miRNA功能的稀释，使得每一个具体靶点能受到某个miRNA的影响可能会变得很小；而不同miRNA之间也可能存在功能的抵消。鉴于此，有的研究者认为miRNA是基因表达的“微调器(micromanagers of gene expression)”，主要作用是维持全身基因表达的稳态(homostasis)[56, 57]。如图1.8所示，作者将miRNA比喻为电阻(resistance)--可以抑制基因表达；又比作变阻器(rheostat)--其抑制效果可以调节。又如图1.9所示，作者区分了三类miRNA的靶点：“switch targets”、“tuning targets”以及“neutral targets”。其中miRNA对于switch targets作用很强，抑制效率很高，为的是使这些靶点的表达维持在很低的水平。这些基因往往是特定时期需要表达的基因，一旦异常表达，危害很大。miRNA对于tuning targets只有较弱的抑制效果，为的是使这些靶点表达在一个合适的范围内，既不太高也不太低。miRNA对于neutral targets作用不明显，这些基因类似于管家基因，倾向于避免受到miRNA的调控。

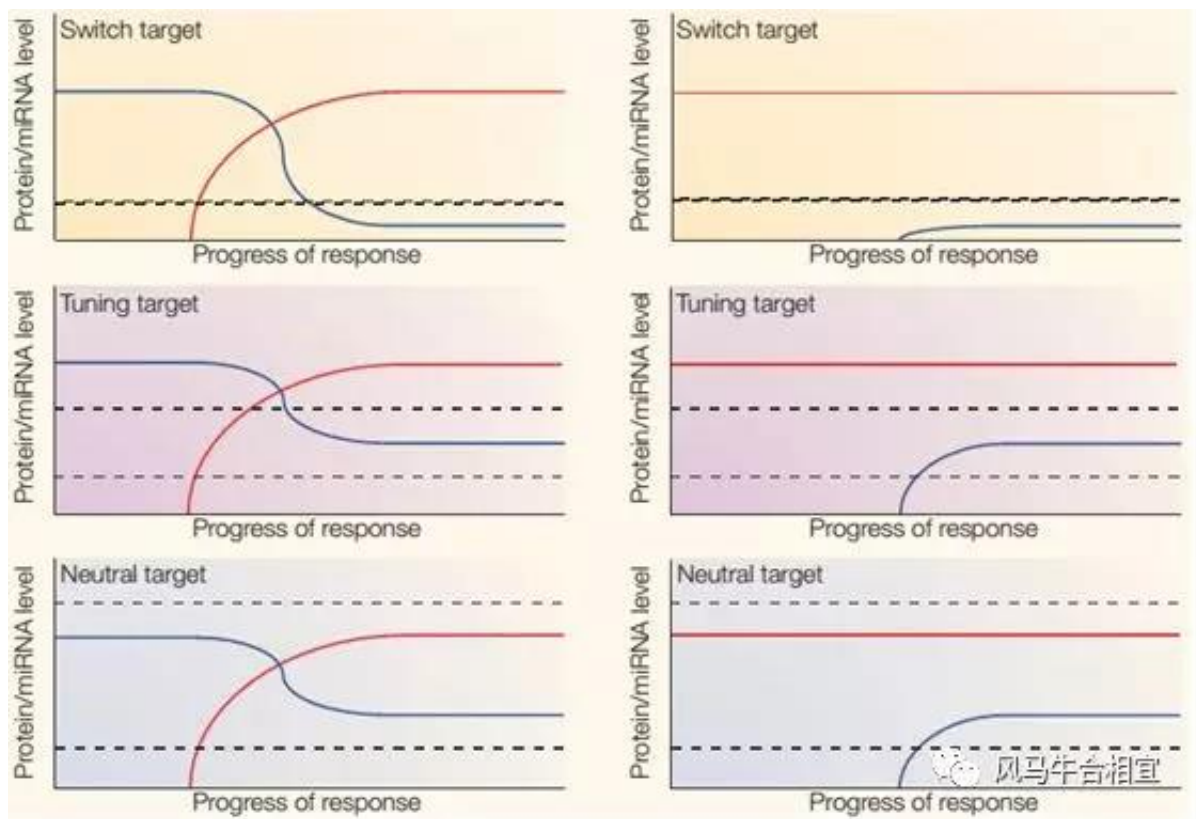
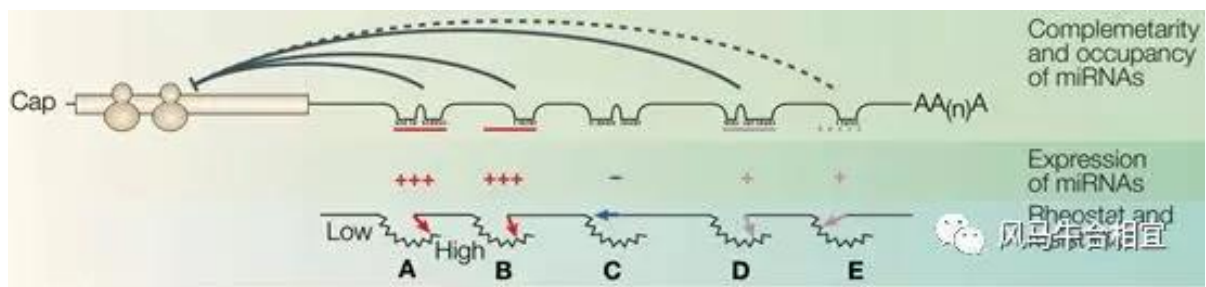
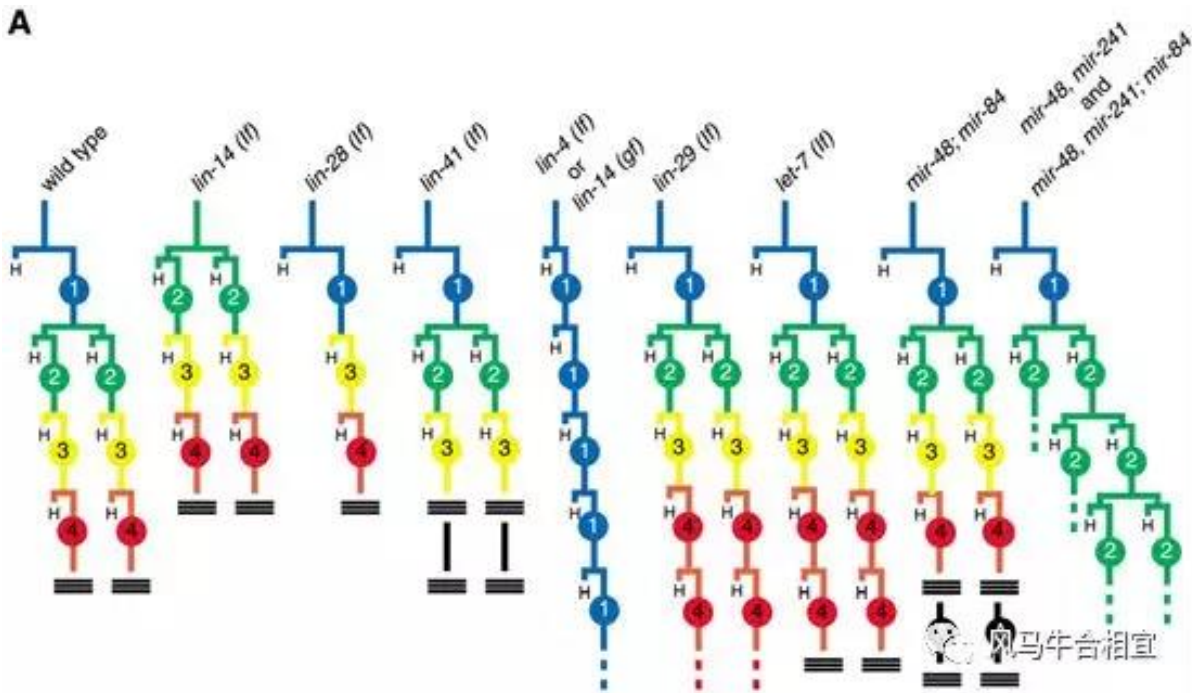


图1.8 miRNA的作用方式就像电阻(阻止靶基因的表达)或变阻器(调节靶基因的表达水平)[56]。



miRNA的功能涉及到各种生理病理过程，包括：发育过程调节、抵抗病毒入侵、动物免疫功能调节、各器官/系统疾病以及肿瘤(因其重要性与复杂性，单列为第三节进行综述)等。简要综述如下。

miRNA最初就是在研究线虫发育过程中被发现的。第一个miRNA，也是miRNA调节发育过程的经典案例就是lin-4对它的靶基因lin-14的调节。线虫早期发育的一个关键步骤是侧线细胞(seam cell)的分化。在线虫发育的第一幼虫期(first larval stage, L1)，侧线细胞都是同步进行分裂，但是并不分化。只有当发育进行到成熟期，侧线细胞才开始结束分裂，开始分化。Lin-4就可以通过抑制lin-14来促进线虫从L1期进入L2期。在lin-4突变的幼虫中，侧线细胞会不断分裂，重复L1期的状态，不能进行分化，就仿佛发育始终被静止在了L1期，导致发育迟滞。而如果恢复lin-4的表达或者下调lin-14蛋白，则可以解除这种静止，使发育继续进行[58]。在线虫发育过程中，另外有许多miRNA参与，包括著名的let-7，miR-48，miR-84和miR-241等等[59, 60](图1.10)。

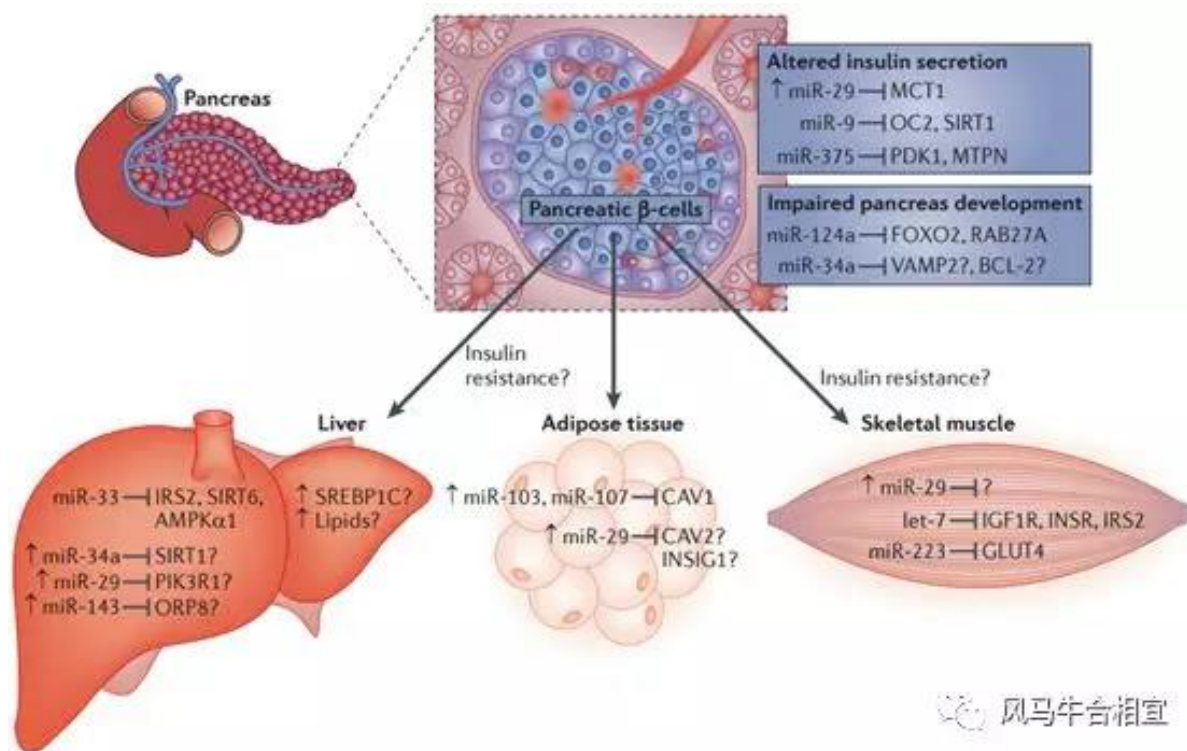


图1.10线虫发育过程中miRNA控制发育时序[58]。线虫发育过程中众多miRNAs参与了发育时序的调节，包括lin-4、let-7等。

Dicer敲除的小鼠在发育的第7.5天会死亡，提示miRNA在发育中有重要作用[61]。而在T细胞发育过程中，敲除Dicer之后，会阻碍CD8⁺T细胞的发育。然而CD4⁺T细胞尽管数量会减少，但依然可以存活。但是一旦受到刺激，这些CD8⁺T细胞增殖会减少，然后加速发生凋亡[62]。

在西红柿里，MIR319可以调节转录因子TCP，从而控制叶片等的发育[63]。过量的MIR319或者减少的TCP，会导致叶片细胞过度的增殖从而造成褶皱的单叶。相反，MIR319不足或者过量的TCP，会导致叶片和花瓣体积的减小，最终导致叶片和花瓣的死亡。

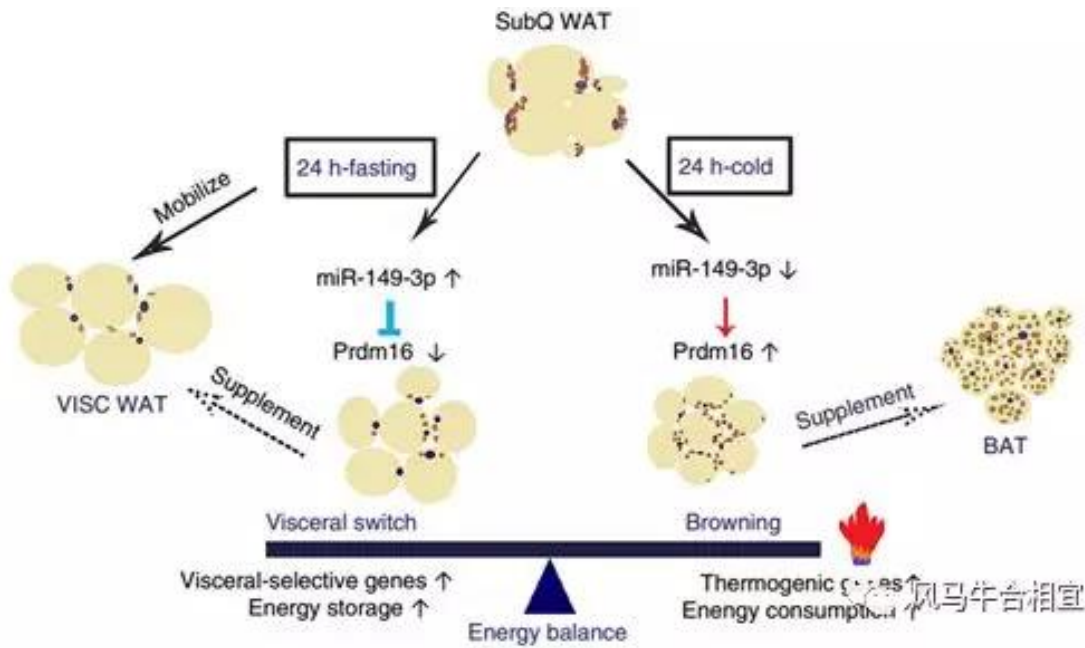
在长期进化过程中，有的生物体发展出利用miRNA抵抗病毒入侵的功能。而作为对手，某些病毒也进化出自己的miRNA系统或者利用宿主现成的miRNA系统，来帮助自己感染、增殖或者潜伏。miR-122是肝特异性表达的一种miRNA，它在抵抗HBV中有重要作用。miR-122可以直接结合到HBV的前基因组RNA上，抑制HBV的复制与翻译[64]。然而，miR-122却能结合到HCV RNA的5' -UTR，促进HCV的增殖[65]。有的病毒本身可以编码miRNA，然后在宿主细胞内调节自身病毒基因或者宿主基因表达。如在伯基特淋巴瘤中潜伏感染的EBV可以编码几条miRNAs，这些miRNAs可以调节宿主基因表达[66]。又如人类巨细胞病毒HCMV可以编码miRNA--miR-UL148D来抑制宿主细胞的IER5基因，从而促进自身的潜伏感染[67]。以上可以视为病毒与宿主共进化的一些实例。

miRNA在神经系统正常功能的维持以及疾病的发生中也有相关作用。Mao等人[68]发现在小鼠皮层发生过程中，miR-17可以调节神经前体细胞的增殖和分化。另外，他们还发现：在神经炎症性环境下，miR-17-92可以促进移植的神经干细胞的分化[69]。Chen等人[70]发现在小鼠脑的发育过程中，miR-23a/b和miR-27a/b表达会逐渐上升，这种上升会抑制它们的靶基因Apaf-1的表达。而Apaf-1能够促进神经细胞的凋亡，因此miR-23a/b和miR-27a/b可以减弱神经细胞的凋亡。在神经退

行性疾病(neurodegenerative diseases, ND)比如帕金森病(Parkinson's disease, PD)和阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)中, miRNA均有重要作用。miR-133b的表达异常可能造成PD的发生, 因为miR-133b和它的靶基因Pitx3所组成的反馈环路对于维持脑中多巴胺神经元很重要[71]。在另一项研究中, AD患者脑内miR-29a, miR-29b-1和miR-9的表达显著下降, 这将导致它们的靶基因BACE1异常增高。而BACE1是产生 β 淀粉样肽的关键基因, 它的升高将增加AD的发病率[72]。

miRNA在免疫系统的正常功能和疾病中同样具有重要作用。比如: 受p53调节的miR-34a可以通过抑制Foxp1而调控B细胞的发育[73]。在淋巴细胞发育过程中, miR-150的含量有一个动态变化的过程。miR-150在成熟的B细胞和T细胞中有较高的表达, 然而在它们的前体细胞中却含量不高。而在随后T细胞分化为Th1和Th2细胞的过程中, miR-150含量又会下降, 提示它在淋巴细胞分化过程中起作用。研究表明, miR-150的含量改变会导致它的靶基因c-Myb含量发生相反的变化, 而c-Myb正是调节细胞分化的一个重要转录因子[74]。Cheng等[75]发现在克罗恩病(Crohn's disease)中, miR-19b含量下降, 导致它的靶基因SOCS3升高, 加重了肠道炎症反应。而人为增加肠道细胞的miR-19b含量, 可以改善这种状况。相似地, Dai等人[76]发现miR-193a-3p可以通过抑制Pept1来减轻肠道在应对肠道内微生物时的炎症反应。

人体代谢反应的正常进行是生命活动得以发生的保障。miRNA在这一重要生命活动中也发挥着多种多样的重要功能。上文提及的肝脏特异性miRNA--miR-122是第一个发现与代谢调控有关系的miRNA, 它可以调节肝脏胆固醇和脂质的代谢。在一项研究中, 研究人员人为降低小鼠肝脏miR-122的水平, 观察到几个基因的表达发生改变, 其中包括参与胆固醇合成的Hmgcr、Hmgcs1和Dhcr7。相应地, 他们观察到血浆胆固醇含量的显著下降[77]。在另一项研究里, 在高脂喂食的肥胖小鼠里下调miR-122后, 小鼠肝脏胆固醇和脂肪酸的合成减少, 脂肪的 β 氧化增加, 循环系统的胆固醇和甘油三酯也发生减少, 脂肪肝情况有所改善[78]。随后一些研究也证实这一结论[79, 80]。以上结果提示miR-122可能是一个潜在的治疗胆固醇偏高的靶点。然而也有结果显示, miR-122的减少也会造成LDL和HDL的下降[81], 这不得不让人对miR-122的治疗应用产生疑虑。miRNA在胰岛素和糖代谢方面也有重要作用。miR-375是斑马鱼胰岛发育所必须的[82], 在小鼠中能够维持胰岛的 α 和 β 细胞的质量[83]。有趣的是, miR-375还有另外一个作用, 那就是通过抑制Mtpn来减少胰岛素的分泌[84]。另外, 它也可能通过抑制PDK1来影响下游的胰岛素通路[85]。另外一个miRNA--miR-124a是和miR-375共表达的, 它也可以调节Mtpn[86]。另外, miR-124a也可以调节胰岛的发育。它一方面可以抑制参与胰岛 β 细胞分化的转录因子FOXA2[87], 另一方面可以调节胰岛素分泌所必须的GTPase RAB27A[88]。



寒冷(cold)和饥饿(fasting)是人类进化历程中常常遇到的两种生存危机。皮下白色脂肪据报道能在寒冷刺激下发生“棕色化(browning)”，以应对严寒[92]。而Ding等[93]发现了一个有趣的现象：在饥饿刺激下，皮下脂肪可以发生“内脏脂肪化”，以提高能量的储备。而这两个现象都受到miR-149-3p的调节(图1.12)。PRDM16是一个锌指蛋白，在肌肉和褐色脂肪分化过程中有重要作用[94, 95]。miR-149-3p被发现可以抑制PRDM16的表达。当小鼠经过寒冷处理之后，皮下脂肪的miR-149-3p含量降低，导致PRDM16表达增加，皮下白色脂肪发生browning。而当小鼠经过饥饿处理之后，皮下脂肪的miR-149-3p含量升高，导致PRDM16表达减少，皮下白色脂肪发生内脏脂肪化。因此，miR-149-3p能起到不同应激状态的转换开关的作用。

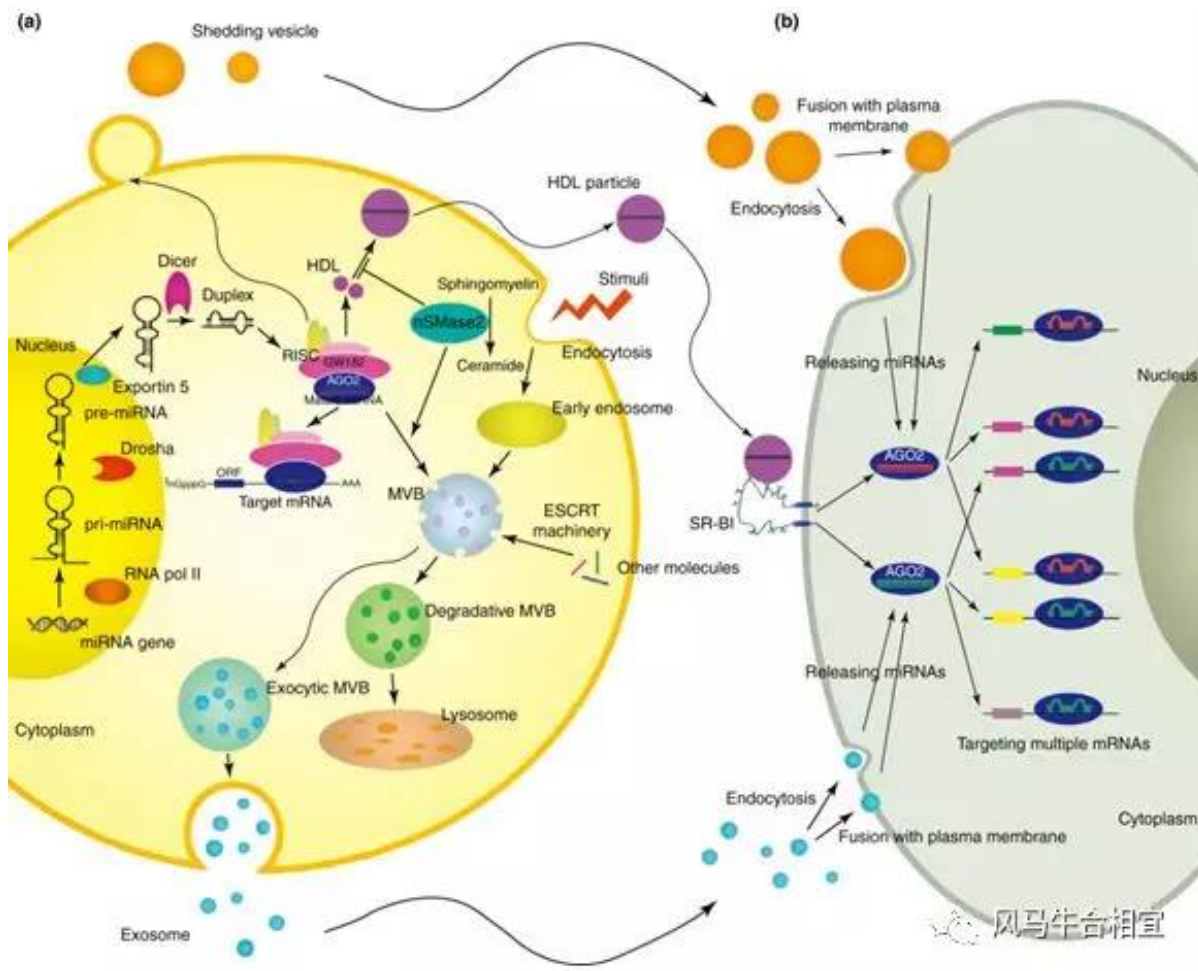
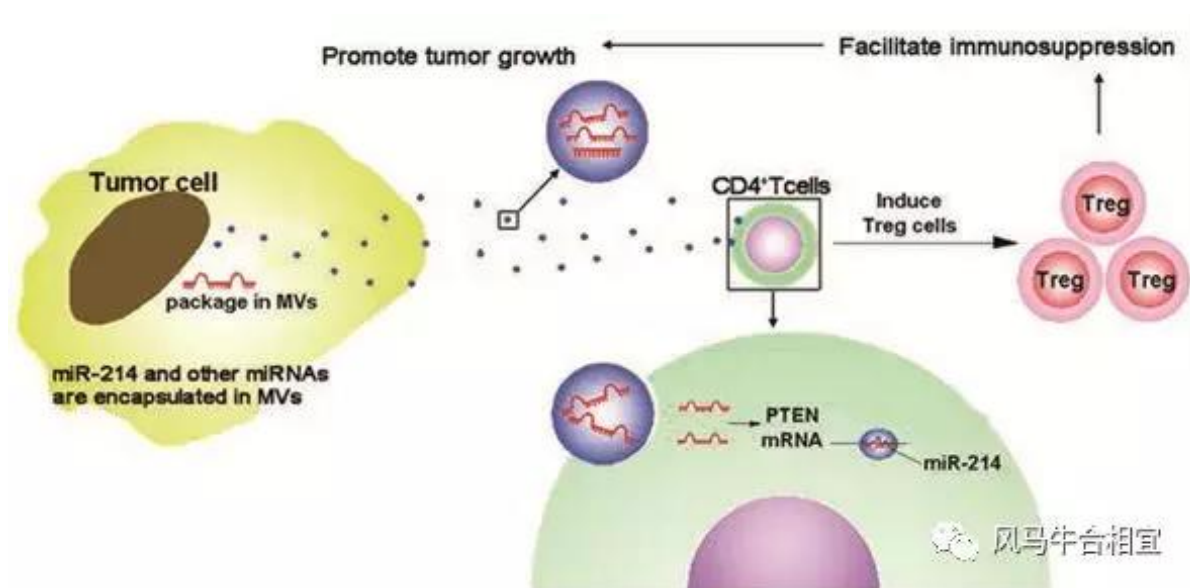


图1.12 miR-149-3p调节皮下白色脂肪的内脏脂肪化和棕色脂肪化，是机体适应饥饿或寒冷刺激的一种手段[93]。

miRNA的上述功能，均是发生在细胞内，由该细胞自身产生的miRNA进行调控的。然而，miRNA的调控范围远不局限在local cell。2008年，国际上几个研究团队独立地在血清中发现了稳定存在的miRNA[96-99]。其中，来自南京大学的Chen等人[96]在一项先驱性的研究中，发现在血清和血浆中稳定存在着大量miRNA，是构成血清中循环核酸的主要部分。这些miRNA对于不同的温度、pH、储存时间或者反复冻融都有很好的耐受性。研究人员比较了非小细胞肺癌、结直肠癌、II型糖尿病患者血清和正常人血清中miRNA的表达谱，发现疾病患者中miRNA呈现出特异性的表达谱，利用这些差异表达的miRNA可以实现对这些疾病的检测。这些miRNA被称作“循环miRNA(circulating miRNA)”，而这项研究也开启了miRNA研究的一项全新领域。随后人们在血浆[97]，唾液[100]，尿液[101]等体液，甚至牛奶[102]中发现了循环miRNA的存在。

如图1.13所示，循环miRNA的来源主要有三种：(1)破裂的细胞或受损的组织被动释放(release);(2)经由外泌体(microvesicle, MV)主动分泌(secret);(3)不被外泌体包裹，与RNA结合蛋白(RNA binding protein, RBP)结合被分泌[103-106]。这些miRNA进入循环系统或体液之后，可以被受体细胞吸收，吸收的方式包括：内吞、膜融合或者配体-受体结合等。



风马牛不相宜

循环miRNA可以作为一种细胞间的通讯方式，携带信息在不同细胞、组织与器官之间传递，传递的方式主要是借助外泌体进行。外泌体是许多细胞外囊泡的统称，是一些由细胞主动分泌的、有磷脂双分子层包被的囊泡，膜上可以嵌有蛋白，囊泡内可以包裹蛋白质、mRNA或者miRNA，其代表为exosome和shedding vesicle(SV)[107]。人体几乎所有细胞或组织都可以向外分泌外泌体，而miRNA可以利用外泌体作为交通工具被运输到靶细胞、靶组织或者靶器官，起到基因调节、细胞通讯的作用，类似于内分泌系统。Mao等人[108]发现：在脂多糖(LPS)的刺激下，星形细胞分泌的SV可以提高多巴胺能神经元对于神经毒素的敏感性。进一步研究表明，这些SV里面包裹有来自星形细胞的miR-34a。LPS刺激星形细胞后，分泌的SV里miR-34a含量增高。携带miR-34a的SV被多巴胺能神经元吸收后，miR-34a释放，可以抑制多巴胺能神经元里的抗凋亡蛋白Bcl-2，增加多巴胺能神经元在受到刺激之后的凋亡。另一项研究表明，树突状细胞可以释放含有炎症关键miRNA--miR-146a和miR-155的外泌体。这些外泌体可以被邻近细胞摄取。在受体细胞，miR-146a可以减弱而miR-155可以增强炎症相关基因的表达。这一现象也被证明发生在体内的免疫细胞之间[109]。Zhang等人[110]发现：在人类血细胞和培养的THP-1细胞中，miR-150可以被选择性包裹到外泌体中并被释放入血。THP-1来源的外泌体可以被HMEC-1吸收，外泌体带来的miR-150可以减弱受体细胞c-Myb的表达，并增强受体细胞的迁移能力。从动脉粥样硬化患者血浆中收集的外泌体比正常人的外泌体包含更多的miR-150。用这些外泌体处理HMEC-1细胞，也可以比正常人外泌体更有效地促进HMEC-1的迁移，进一步说明外泌体中包含的miRNA可以被受体细胞吸收，并调节受体细胞中相应蛋白的表达，影响受体细胞的表型。Yin等人[111]的研究发现：人类多种肿瘤和小鼠肿瘤模型中血清miR-214含量升高。肿瘤细胞可以用外泌体包裹miR-214释放入血，然后被外周CD4⁺ T细胞所吸收。miR-214可以抑制T细胞中PTEN的表达，促进Treg细胞分泌更多的IL-10从而促进裸鼠体内肿瘤的生长。体内实验表明，肿瘤细胞分泌的miR-214可以促进Treg细胞的扩增，从而增强免疫抑制和肿瘤的生长。人为下调循环miR-214的含量，可以逆转这一过程。Li等人[112]发现：母体的循环miRNA甚至可以穿过胎盘进入子代体内，调节子代的生长发育(图1.14)。这种循环miRNA的代际传递无疑极大扩充了miRNA的可能功能与应用前景。

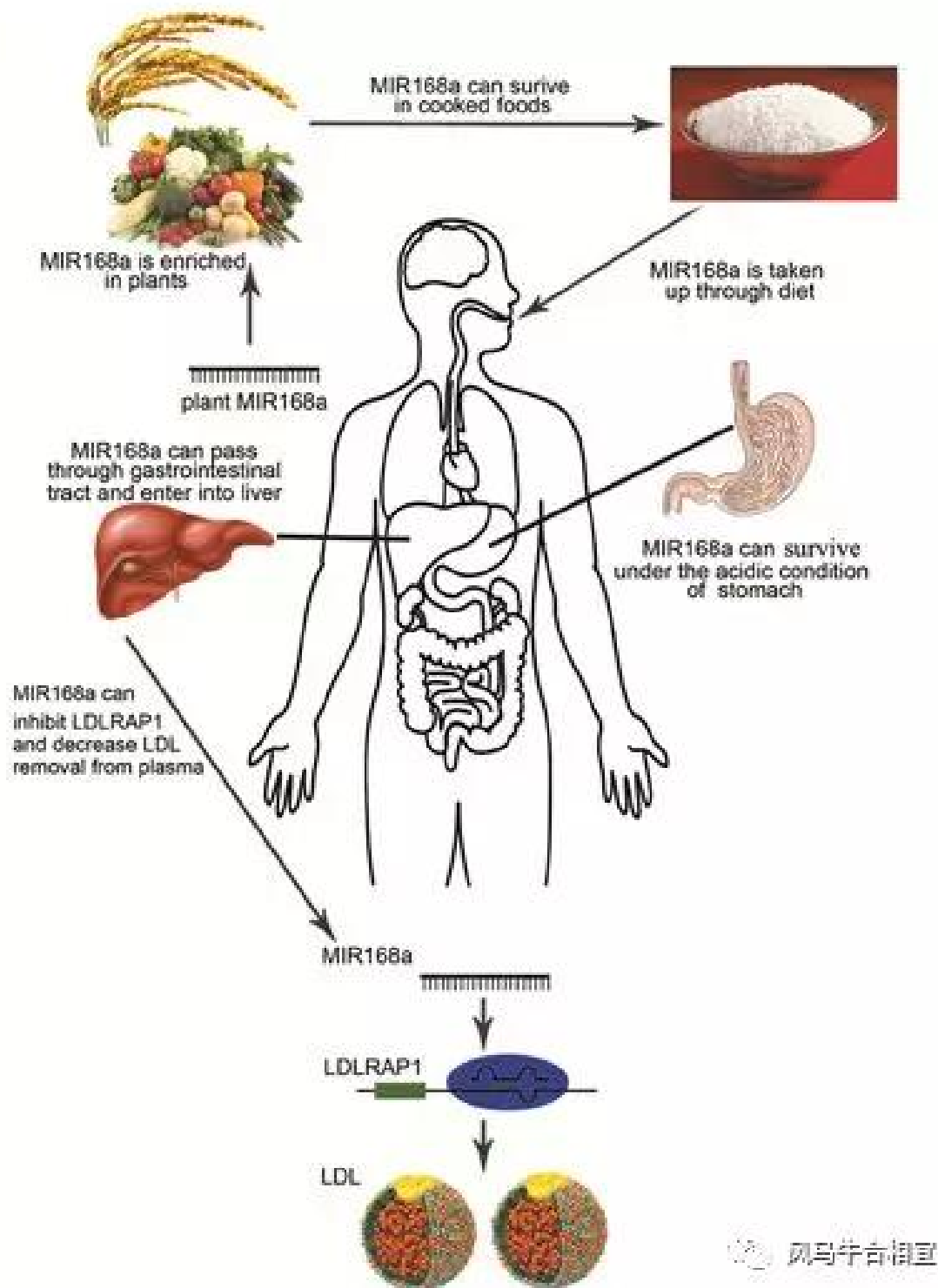


图1.14肿瘤细胞分泌miR-214诱导Treg细胞的产生[111]。肿瘤细胞分泌的miR-214可以抑制CD4+ T细胞中PTEN的表达，促进Treg细胞的扩增，行使免疫抑制功能。

鉴于miRNA可以被机体某部位的细胞分泌，经由循环系统去往其它器官发挥功能，我们可以利用这一特性进行给药或者治疗。这些内容将在后面“miRNA的应用价值”一部分讨论。

不同生理病理状态，循环miRNA的表达谱有差异。根据这一原理，我们可以利用循环miRNA进

行疾病诊断、治疗效果评估以及疾病预后判断等。这些内容将在后面“miRNA的应用价值”一部分讨论。

如上所述：miRNA不仅可以在细胞内(local)发挥作用，还可以循环miRNA的形式进行远程通讯(cross-cell、tissue or organ regulation)，甚至可以穿过胎盘调节子代的发育(cross-generation regulation)。而在2012年的一项经典研究，更是揭开了miRNA另外一项重要功能：跨界调控(cross-kingdom regulation)。2012年南京大学张辰宇教授所领导的研究团队，惊人地发现：在人和动物的血清以及多种器官中检测到植物miRNA的存在[113]。他们的结果表明，在汉族人的各种脏器比如心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、脑以及血清中，稳定地检测到了如MIR156a、MIR166a和MIR168a在内的多种植物miRNA，并且这些miRNA非常稳定，能一定程度上抵抗高碘酸钠的氧化。作者进一步证明：这些植物miRNA是源自日常饮食。也即：食物中的植物miRNA可以抵抗食物收集、储存、运输、加工、烹饪过程的降解以及胃酸的消化，然后被胃肠道摄取入血，然后被各种器官所吸收。事实上，作者在给小鼠喂食大米之后，的确检测到血清和器官中植物miRNA含量的升高。作者选择了MIR168a作为对象，探索植物miRNA在人体内可能的功能。他们鉴定出MIR168a的一个靶基因--低密度脂蛋白受体配体蛋白1(low-density lipoprotein receptor adapter protein1, LDLRAP1)。LDLRAP1是一种肝内高表达的蛋白，在促进循环系统中LDL的清除过程中有重要作用[114]。MIR168a可以结合到LDLRAP1 mRNA的第四外显子上，这种结合与植物体内miRNA-mRNA结合相类似，miRNA和靶mRNA之间呈现出很高的匹配性。这种结合将导致LDLRAP1蛋白的表达受到抑制。肝细胞LDLRAP1的缺失，会阻碍LDL的清除，导致血液中胆固醇含量的上升，影响正常脂蛋白的代谢。而在食物中加入MIR168a的抑制剂后，可以逆转这种现象，进一步表明植物来源的MIR168a能够影响肝脏正常功能(图1.15)。这一发现至少在几个方面是划时代的：(1)它颠覆了以往的消化吸收观念。以往认为：食物中的核酸都会在胃肠道被消化为单个的核苷酸而被吸收，而这项研究却发现被吸收的也可以是具有生物学功能的miRNA片段；(2)提示了miRNA可能是植物中第七类营养元素(其余六类是：水、蛋白质、油脂、碳水化合物、维生素和矿物质)；(3)这可能是动植物长久以来共进化的一个重要证据。因其创新性与颠覆性，这项研究甫一问世，便引起了学术界巨大的震动和广泛的讨论，也带来了一些争议[115]。而发现者们也在随后的工作反驳了这些质疑[116, 117]。Liang等人[117]在定时定量引用西瓜汁或混合果汁的被试者血清中检测到多种植物miRNA含量的升高，直接证明了上述关于植物miRNA能被吸收入血理论的正确。

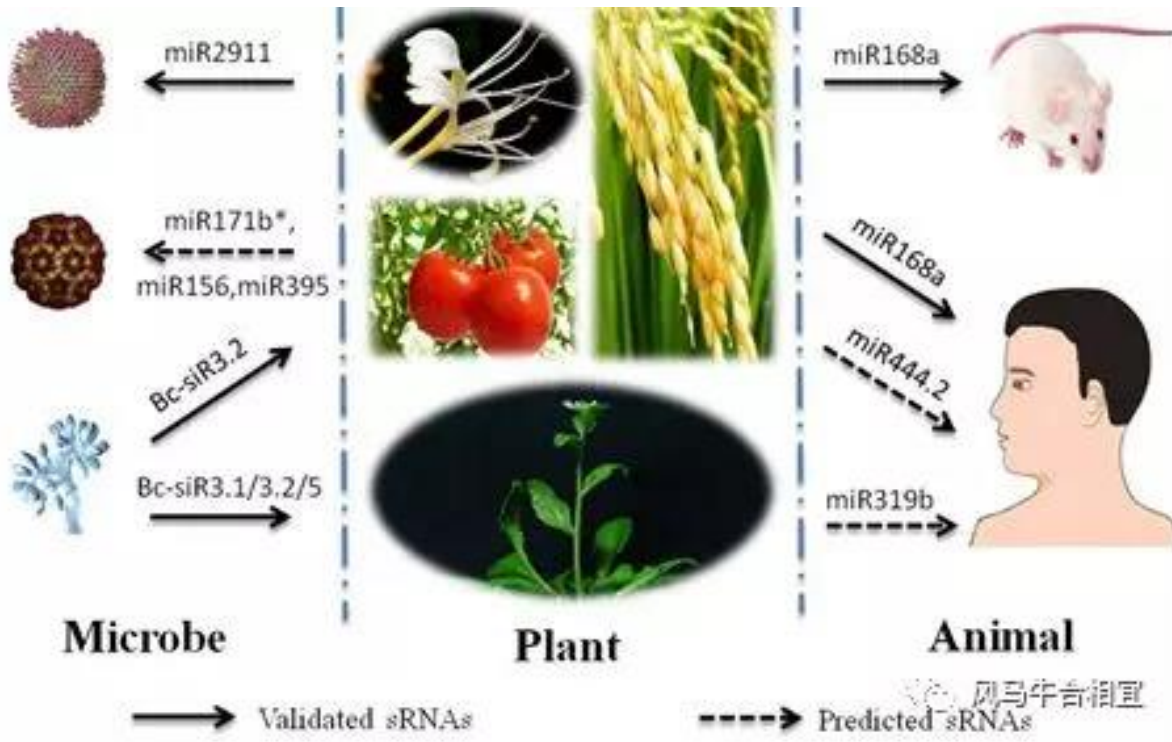


图1.15食物中MIR168a被吸收到肝脏抑制LDCRAP1蛋白的表达，调节脂蛋白代谢[130]。

一个正确的理论不应止于个例。中草药是我国中医体系的重要组成部分，许多经典的药物已经经受千百年无数患者的检验，表明了其有效性。但是其中的活性成分或作用机制却鲜有阐明。植物miRNA跨界调控动物基因表达现象的发现，提示了植物miRNA可能是一些中草药的活性成分。金银花(Honeysuckle, HS, *Lonicera japonica*)是一种著名的草药，在数千年里被使用来治疗流感。多项研究表明，金银花煎煮后的汁液能有效抑制流感病毒的复制，然而其作用机理尚待揭示[118,119]。在2014年，Zhou等人[120]在金银花里发现了一种非典型的miRNA—MIR2911。这种植物miRNA在金银花煎煮之后的汤汁中也能稳定存在。接下来的实验证明了小鼠口服金银花煎煮汁可以有效吸收其中的MIR2911，在血液和肺中能检测到。并且MIR2911能够靶向流感病毒(H1N1, H5N1和H7N9)的mRNA，抑制两个重要蛋白(PB2和NS1)的翻译，从而抑制病毒的复制。

2015年，国外一个研究组的两篇论文报道了在小鼠血清和尿液中检测到植物miRNA的结论，加强了上述结论[121,122]。而Jia等人[123]利用微滴式数字PCR技术结合转录组分析，发现家蚕可以摄取桑叶中的植物miRNA。到了2016年，一系列独立的研究开阔了跨界调控的领域。有两项研究再一次确认了植物miRNA能够被动物所吸收。Chen等人[124]研究了油菜花粉中的植物miRNA，发现在喂食油菜花粉的小鼠血清里检测到了高表达的MIR166a和MIR159。而Yang等人[125]的结果则为MIR2911的吸收提供了解释。Chiara Pastrello等人在人血清里检测到了来自甘蓝的植物miRNA，并且为它们寻找到了众多可能的靶基因[126]。另外一项基于西方人群的研究发现：在西方人群的血清中检测到植物MIR159的存在，支持了上述Chen等人的结论，并且其含量与乳腺癌的发病率和进程负相关，这提示了MIR159可能在人体发挥抑癌miRNA的功能[127]。在小鼠体内的实验证实了这一猜想：喂食的MIR159能显著抑制小鼠异种移植的乳腺癌的发展。作者进一步探究MIR159的抑癌机理。他们发现：血清中的MIR159主要位于外泌体中，并且能够抵抗高碘酸钠的氧化，表现出相当的稳定性。他们找到了MIR159的一个可能靶基因--一种能够编码Wnt信号通路转录因子的TCF7基因。MIR159能够靶向TCF7，进而下调原癌蛋白MYC的表达，实现抑制肿瘤的作用。有趣的是，科学家们在西兰花里发现了高表达的MIR159。而西兰花又是广泛被接受的抗癌

食物，这项研究无疑为西兰花的抗癌机理提供了一种解释，也为植物miRNA跨界治疗疾病提供了有力的支持。

小RNA的跨界调控不仅局限于miRNA，也包括其余多种小RNA。鉴于这些小RNA将各种不同物种联系在了一起，就像各物种进行社会交往的媒介物，因此有人将它们称作“Social RNA” [128]。

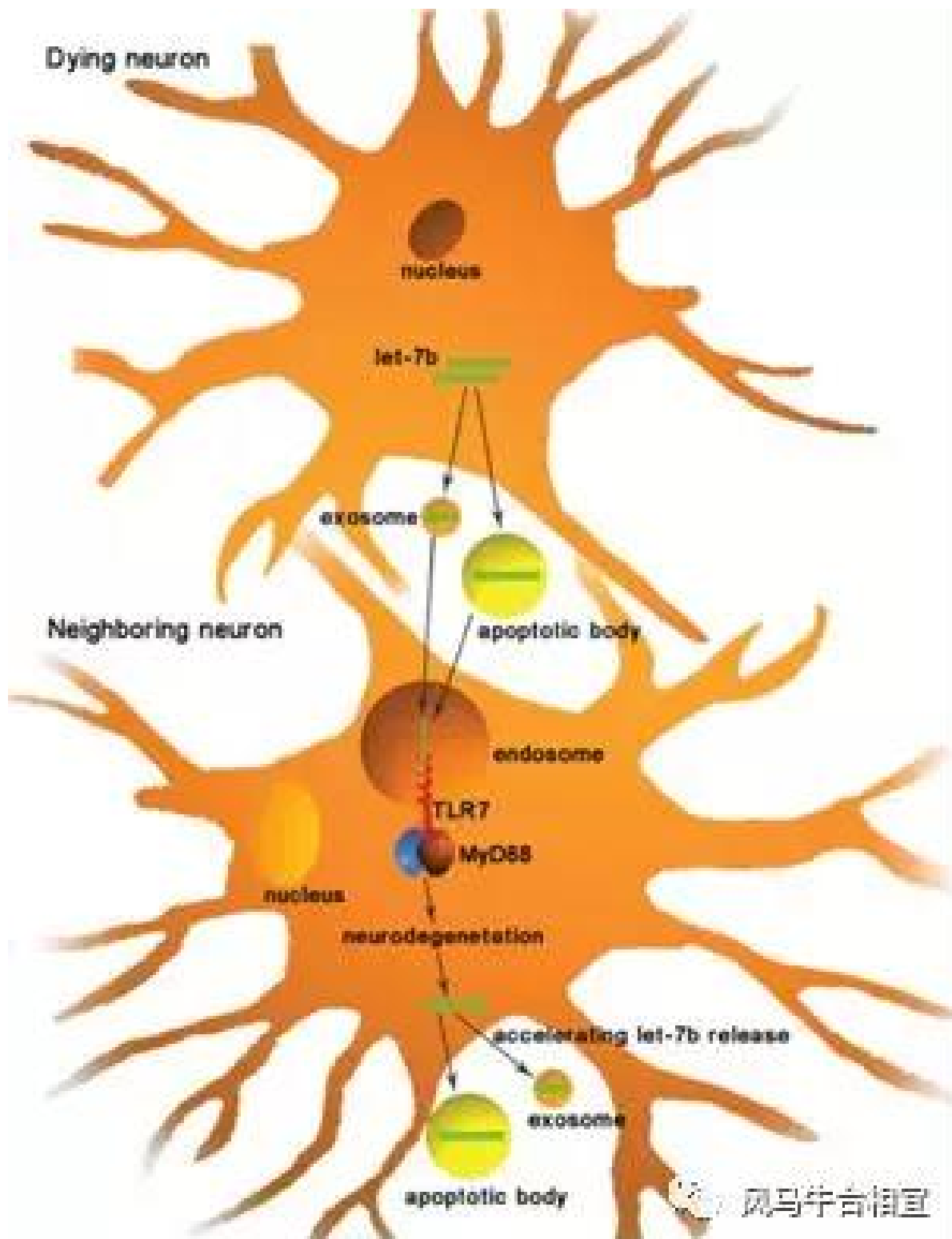


图1.16小RNA参与跨界调控的实例[129]。这里列举了部分已经被报道的或可能存在的跨界调控方式。

综上，miRNA的跨界调控现象，是一项振奋人心的发现，同时也是一项需要审慎思考的问题。它既开拓了miRNA的功能，又为miRNA的应用提供了新的途径，但同时我们也需要清醒地意识到：这个领域刚刚起步，目前依然存在很多的未知和需要解决的问题。哪些物种间还存在怎样的跨界调控关系？动物的miRNA是否也能够影响到植物的生长发育？miRNA在共进化中发挥了怎样的作用？动物之间是否也能通过摄食关系实现跨个体的miRNA转移和调控？是否亲缘越近的生物更容易发生这种跨个体miRNA传递？miRNA介导的跨界/跨个体调控是否是各门类生物表型上巨大的分歧之下掩藏着的紧密的亲缘联系？不同文化地区饮食结构有很大差异，这种差异会否导致跨个体miRNA调节作用的不同？而miRNA的不同对于不同人种特性的塑造有何影响？植物中哪些miRNA能够被人所吸收？吸收过程的细节如何？植物miRNA何以能抵抗人消化道的极端环境？吸收的部位发生在哪里？什么蛋白参与了吸收过程的调控？被吸收后的miRNA如何能够被AGO蛋白所结合？又如何进入循环系统？是否需要一定需要外泌体的包裹？动物细胞会不会区分内源产生的miRNA与外源吸收的植物miRNA？这些被分泌的植物miRNA的目的地有没有器官特异性？动物体的AGO蛋白利用植物miRNA产生基因抑制与动物miRNA有无不同？是否一定需要miRNA和靶点的完美配对？植物miRNA的3端甲基化修饰对于以上所有过程有何影响？对于中草药活性成分的寻找，哪些中草药的活性成分是miRNA？植物miRNA是否能针对其它病毒感染起效果？能否参与其它生理病理过程？对于营养与烹饪而言，哪些食物中有哪些miRNA还能有作用？我们如何利用跨界调控这一现象来为人类服务？另外一个不可回避的问题是：跨界调控对于转基因技术的开发有何提示和警示？科学家们任重道远，只能继续负重前行。

以上所描述的各种miRNA的功能，基本是通过miRNA与靶基因mRNA结合来调节靶基因的表达——这也是绝大多数miRNA的作用方式。然而，miRNA也可以通过不依赖miRNA-mRNA的结合来行使功能。Toll-like receptors (TLRs) 是天然免疫系统中宿主用以识别外来入侵抗原的一个蛋白家族[130,131]。miRNA因其独特的序列结构，可以在不依赖经典的与靶mRNA结合的方式充当TLRs的配体，激活TLRs[132]。Lehmann等人[133]发现：miRNA let-7b和HIV的ssRNA40相似，都含有一个GU-rich的结构域，而该结构域正好是TLR7的识别位点[134]。后续实验表明，let-7b的确能够激活TLR7，并且促进小胶质细胞和巨噬细胞分泌TNF- α ，并且促进神经元的退化。科学家们推测这种现象的意义在于：死亡的神经元可能通过外泌体包裹let-7b运输到临近神经元，激活TLR7，促进邻近细胞的退化凋亡(图1.17)。Fabbri等人[135]发现：肺癌细胞可以通过外泌体分泌miR-21和miR-29a到肿瘤组织——正常组织的交界面，然后被位于该处的巨噬细胞所摄取，然后激活巨噬细胞里的TLR8(小鼠是TLR7)。TLR8被激活后将引起巨噬细胞释放促炎症因子(TNF- α 和IL-6等)，最终促进肿瘤的生长和迁移(图1.18)。miRNA的这一非经典作用方式，值得在未来miRNA研究过程给予相应的关注，也为利用miRNA作为疾病治疗靶点提供了新的思路。

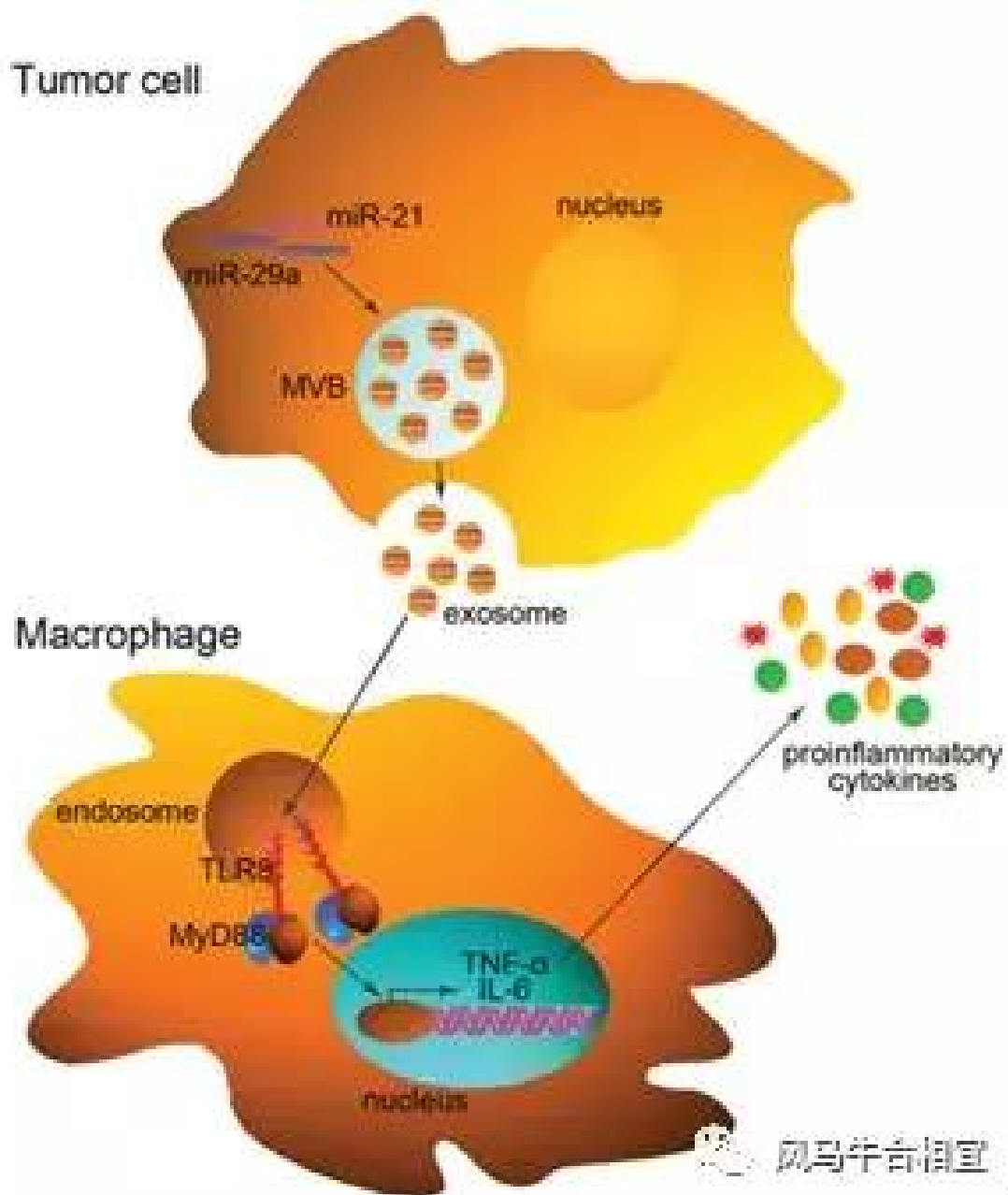


图1.17 let-7b激活神经元的TRL7，促进小胶质细胞和巨噬细胞分泌TNF- α ，并且促进神经元的退化[132]。



既然miRNA有着如此广泛而重要的作用，那么利用miRNA来造福人类便成为题中应有之义。当前miRNA的应用主要有以下几个方面：

疾病发生时，病变组织或器官的miRNA表达谱会发生改变，呈现出疾病特异性的表达谱。利用这一点，我们可以做到诊断疾病的发生。例如不同肿瘤发生时，相应器官的miRNA表达谱显示出独特的类型[136]。国外一个实验室研究了来自22种肿瘤的400个样本里miRNA的表达情况。最终选出了48种miRNA用于预测肿瘤的类型[137]。在一项针对多个肿瘤患者的双盲实验中，利用这一miRNA诊断谱进行诊断，准确率可以高达89%。miRNA的这一应用在循环miRNA发现后，更加得到重视。Chen等人[138]对比了非小细胞肺癌患者和正常人血清miRNA表达谱，发现了一个由十种miRNA组成的非小细胞肺癌诊断标准。利用这一体系，可以高效而特异地将非小细胞肺癌患者和正常对照区分开来。有趣的是牛奶中也有特殊的miRNA表达谱，可以用于牛奶品质的鉴定[139]。

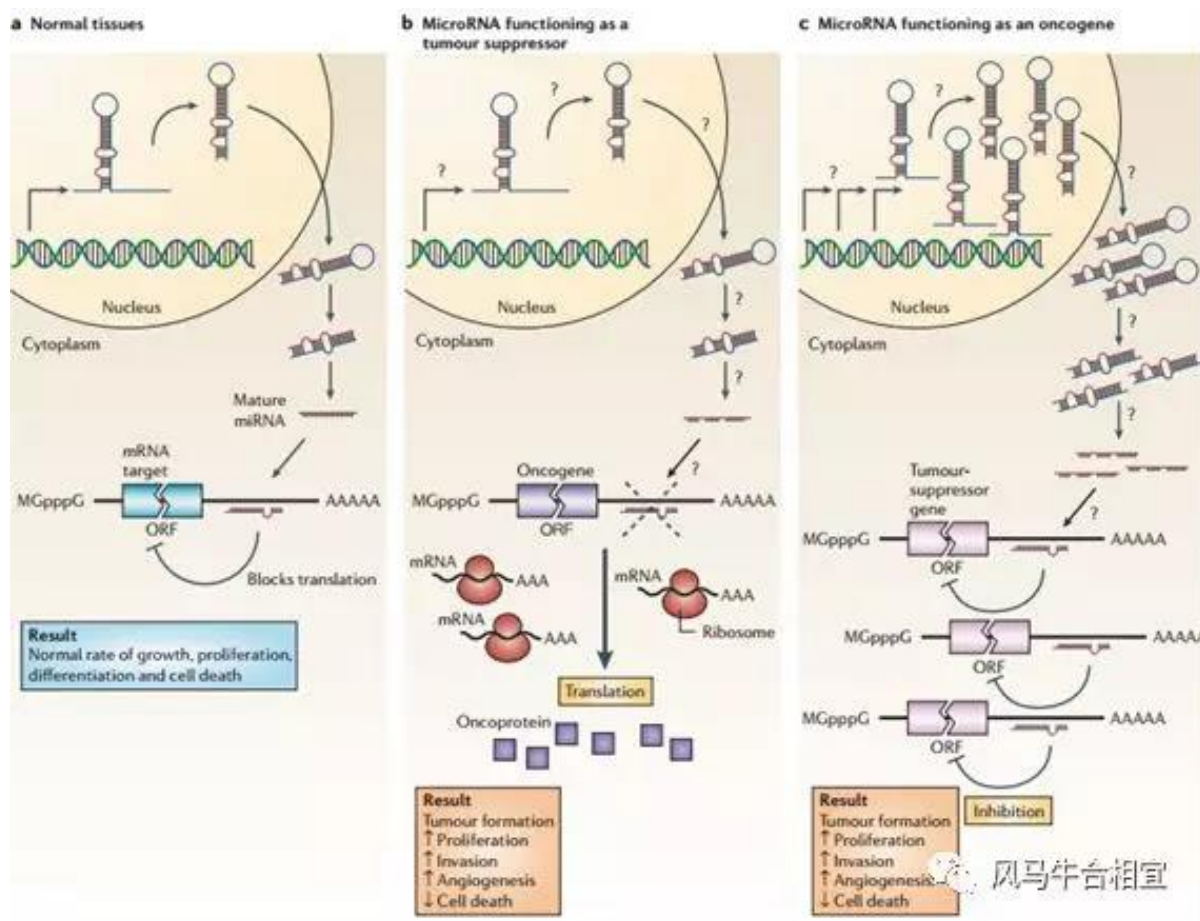
疾病发生中，miRNA的改变可能是导致或者促进疾病发展的原因而非结果，那么人为对异常改变的miRNA含量进行人为干预，就有关缓解疾病症状。干预的方法可参见下文中“人为调节microRNA表达的方法”一部分。Jin等人[140]发现：在肝癌治疗中，可以通过提高肝细胞miR-26的含量，降低其靶基因ULK1的表达，从而减小肝细胞自噬反应，增强肝细胞对于化疗药物Dox的敏感性。Miravirsen是经LNA修饰的miR-122反向互补序列。临床上它可以通过结合miR-122而降低HCV的复制，并且不会造成抗性。研究还发现：Miravirsen不仅仅结合成熟的miR-122，还能结合pre-miR-122和pri-miR-122，从而加强了治疗效果[141,142]。值得关注的是：目前关于外泌体研究的深入，为未来利用外泌体来靶向或者非靶向传递miRNA或者miRNA抑制剂提供了新途径。

利用miRNA也可以进行药物的疗效判断和疾病的预后判断。在慢性髓系淋巴瘤(chronic myeloid leukemia, CML)接受伊马替尼治疗后，具有BCR-ABL重排的细胞数量将随着时间减少。而研究发现miR-451无论在诊断时还是在治疗过程中，都与BCR-ABL呈负相关。那么就可以利用miR-451的水平来衡量伊马替尼治疗的效果[143]。而在胃癌患者中，血清中高表达的miR-451和miR-16将预示着更高的总体生存率[144]。

miRNA领域还可以开辟很多的应用。比如前述的miRNA跨界调控机制，提示我们可以从miRNA

的角度考虑中草药的活性成分，寻找到类似“植物青霉素--MIR2911”的新的天然药物，造福人类。而这对于营养学领域也是一大创新，让我们可以关注到被忽视的另一种基本营养成分--外源miRNA。

综合上面的讨论：miRNA作为基因表达调控的重要开关，能参与几乎所有生理病理活动(图1.19)。找到合适的研究miRNA的方法，鉴定miRNA的功能，将对于我们理解生理病理活动、开发应用miRNA提供巨大帮助。



miRNA作为生命过程的重要调控分子，与肿瘤有着密切的联系[145]。第一例被报道在肿瘤中发生变化的miRNA是miR-15a/16-1簇[146]。研究人员发现：在慢性淋巴性白血病(B-cell chronic lymphocytic leukemia, B-CLL)中，miR-15a和miR-16-1组成的簇经常发生缺失或者低表达，并且这种变化与B-CLL的发展相关联。在这之后，越来越多的miRNA被报道在癌症发生过程中表达发生变化，而这种变化会引起下游基因的含量改变，从而影响肿瘤的进程[147](图2.1)。

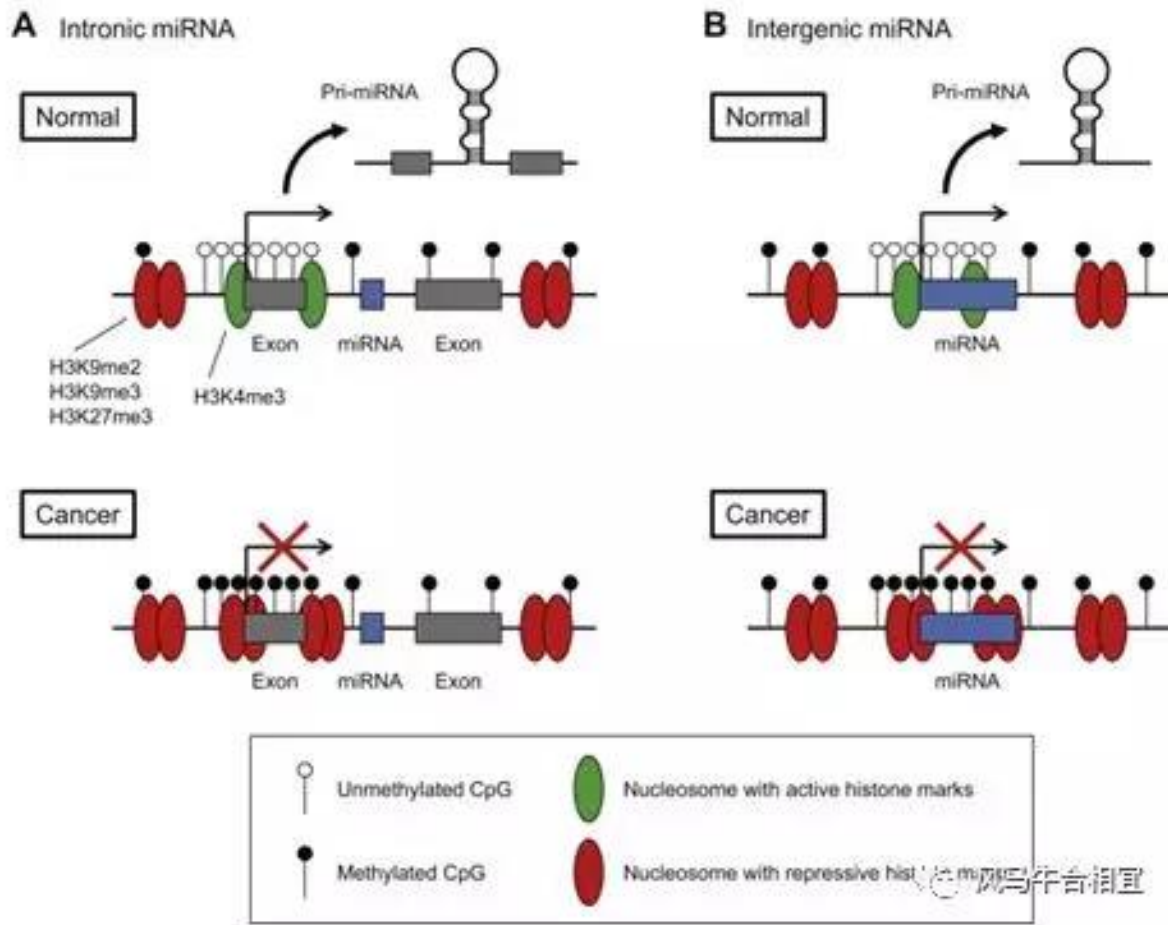


图2.2癌症中会发生表达变化的miRNA所在的染色体位点，这些位点多数属于基因组的脆性位点[149]。

(2)转录水平的调控。比如：miRNA基因位点发生甲基化，抑制miRNA转录(图2.3)[150]。在2016年，研究人员第一次发现癌症中表观遗传调节miRNA表达的实例。在T24膀胱癌细胞中，研究者使用了DNA甲基转移酶(DNMT)和组蛋白去乙酰化酶(HDAC)的抑制剂处理细胞，发现一些miRNA表达发生变化[151]。在胰腺癌中，研究人员也发现了miR-9-1的基因受到甲基化修饰，导致miR-9-1表达的下降[152]。另外一种情况是miRNA上游转录调节蛋白(转录激活因子或转录抑制因子)对pri-miRNA的调节。P53是一个著名的肿瘤抑制基因，研究发现其抑癌作用一部分来自于转录激活抑癌miRNA--miR-34a[153,154]。在肿瘤发生时，p53经常呈现低表达，导致miR-34a转录抑制。

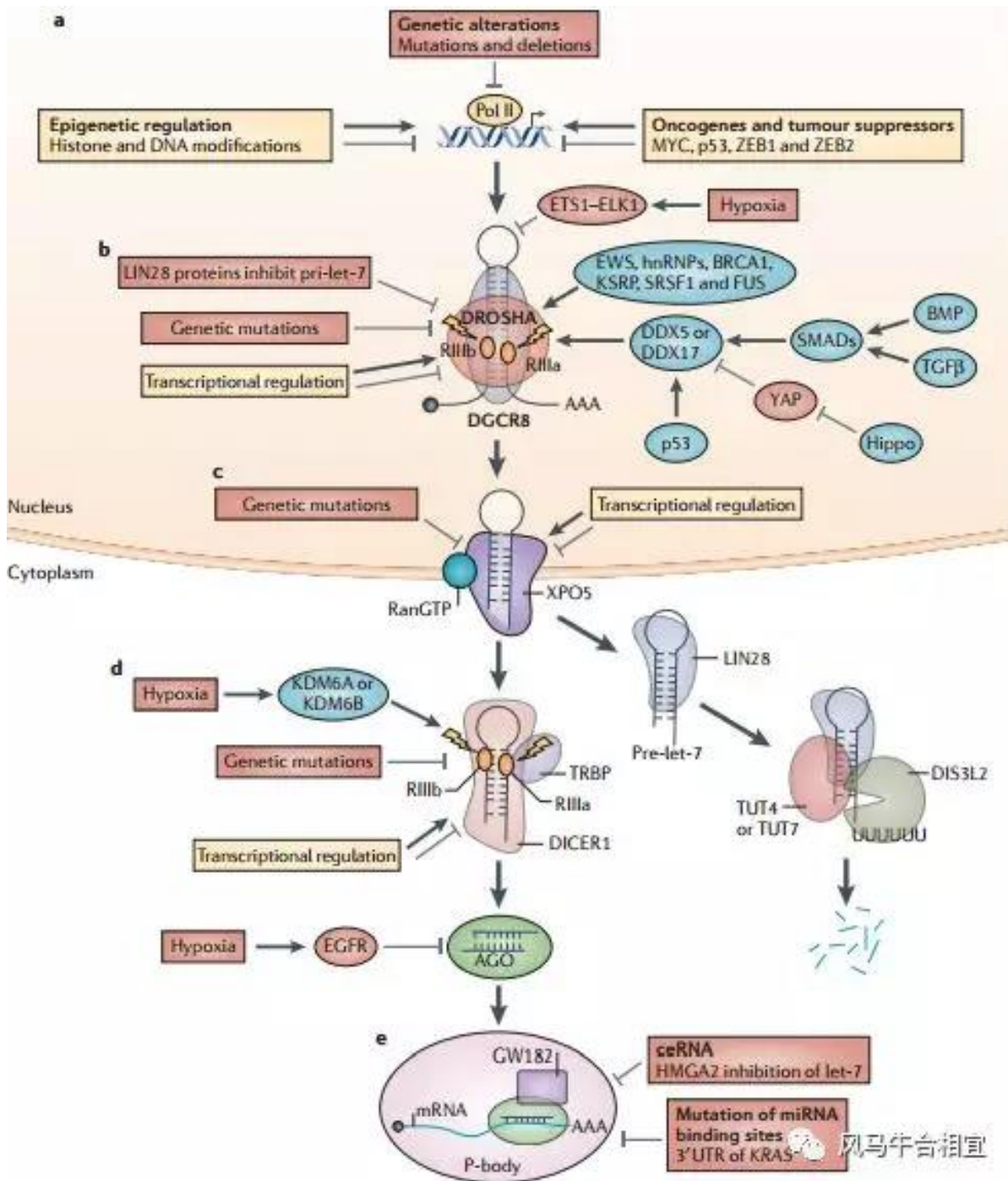


图2.3癌症中DNA甲基化调节miRNA的表达[150]。表观遗传机制也是癌症中miRNA表达改变的重要原因。

(3)加工成熟途径的调控。癌症发生时，在pri-miRNA之后的多步加工途径，miRNA都受到严密的调控(图2.4)[155]。TAp63可以结合到Dicer1的启动子，激活其表达[156]。在乳腺癌中，这种激活可以影响下游miRNA的表达，抑制乳腺癌的转移。Let-7家族是一类非常重要的抑癌miRNA[157,158]，在多种肿瘤中表达下调[159,160]。Let-7在多个层面受到LIN28的抑制[161]。LIN28表达上升，可以抑制let-7表达，在多种动物模型中导致肿瘤的发生[162,163]。甚至pre-miRNA被XPO5从细胞核运输到细胞质这一过程，在肿瘤中也会受到调节。在结肠癌、胃癌和子宫内膜癌发生时，常常会发生导致XPO5失活的微卫星不稳定性[164]。XPO5的突变导致pre-miRNAs滞留在细胞核中

，导致miRNA的生成受损，促进肿瘤的发展。另一项研究也发现：XPO5的突变及表达量与乳腺癌的发展预后有关系[165]。一个值得注意的现象是：miRNA生成途径的调节是全局性(globally)的，比如Drosha、Dicer或者XPO等酶类含量活性的改变，理论上将对所有miRNA的表达造成影响，那么其后果将是一个综合性的--毕竟有的miRNA是原癌miRNA，有的则起到抑制肿瘤的作用。有一个有趣的现象是：癌症发生时，细胞里total miRNAs的含量是降低的[136,166]，所以可以做出猜想：miRNAs，作为一个总体，是促进细胞稳态，维持细胞正常功能和运转，抑制细胞病理状况(包括癌症)的。当然，具体到某一个miRNA上，由于受到多个层面的调节，其含量变化也将是综合性的影响的结果，不能只着眼于某一个因素。

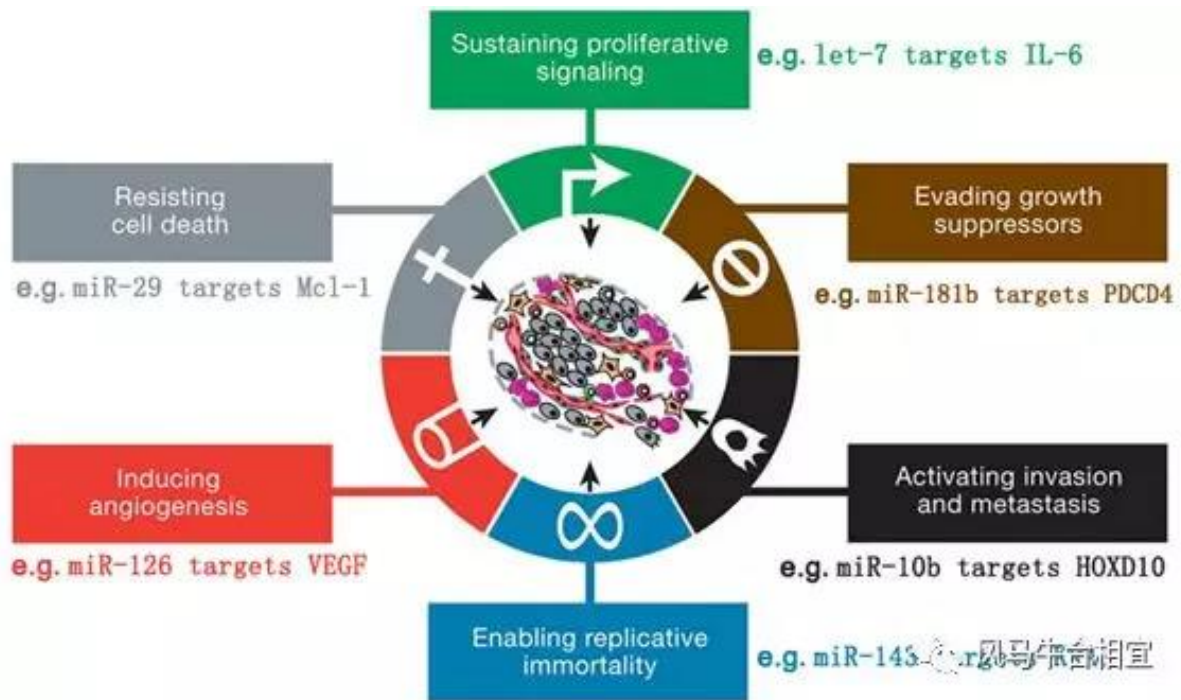


图2.4癌症中miRNA生成途径会受到广泛的调节，牵涉几乎每个步骤、各种主要酶类[155]。

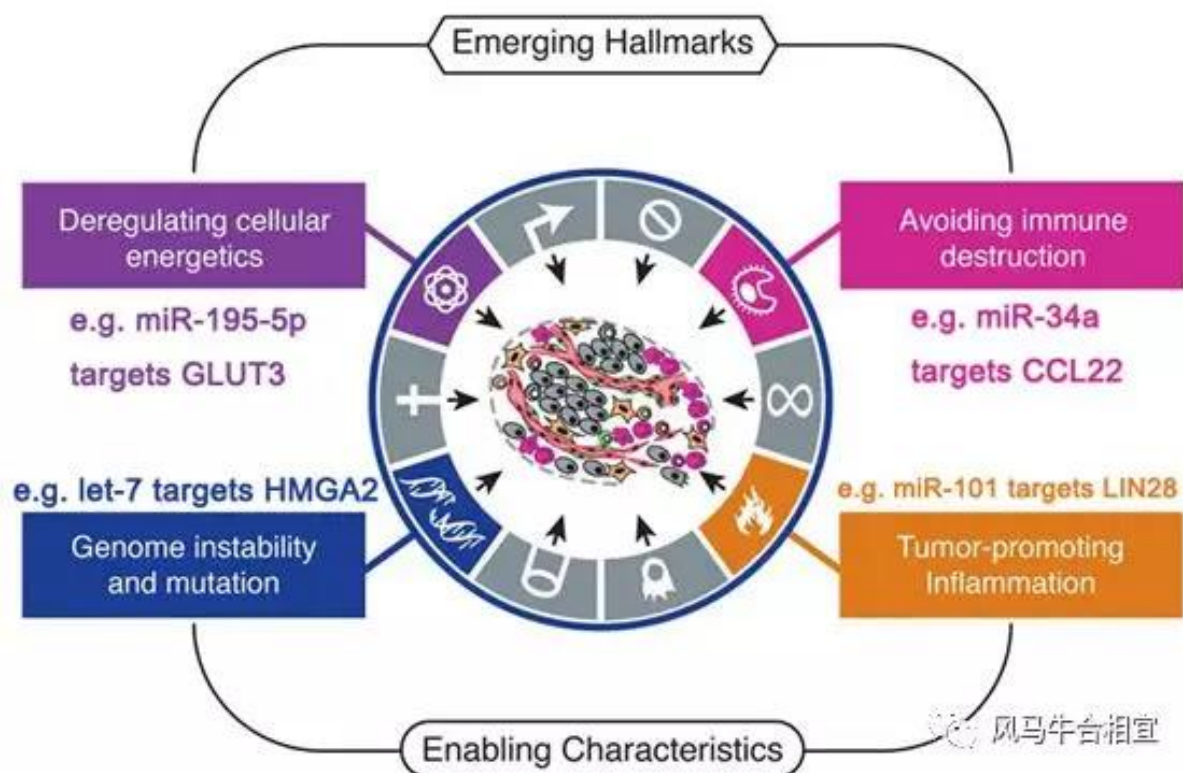
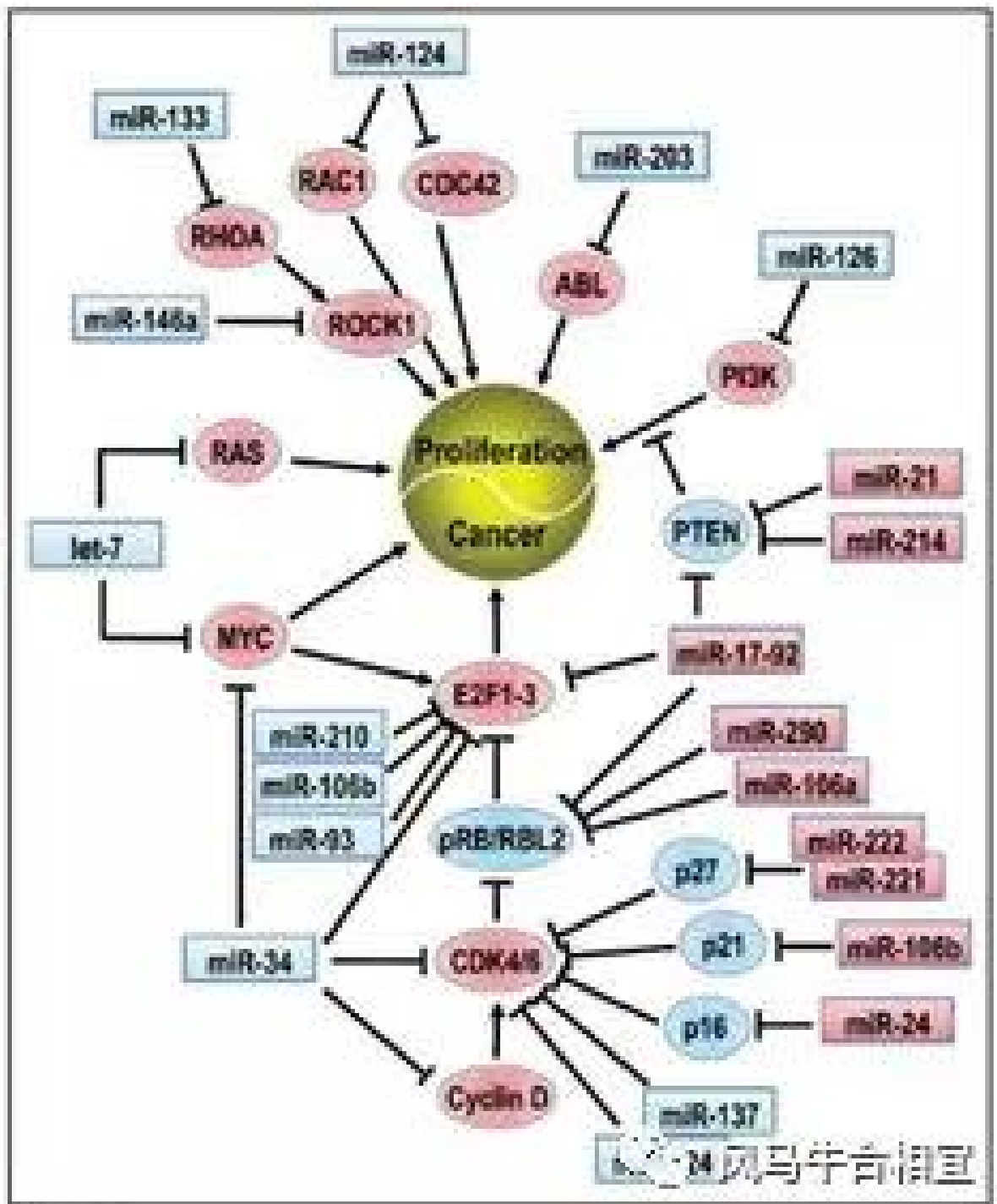


图2.5 miRNA参与癌细胞增殖、自主生长信号的产生、迁移、凋亡和血管新生的调节[172]。



癌细胞最大的特点就是拥有无限增殖的能力。miRNA在其中扮演了重要的角色[174]。如图2.7所示，miRNA可以靶向多种增殖相关的基因，例如：RAS、RB、MYC和Cyclin D等。

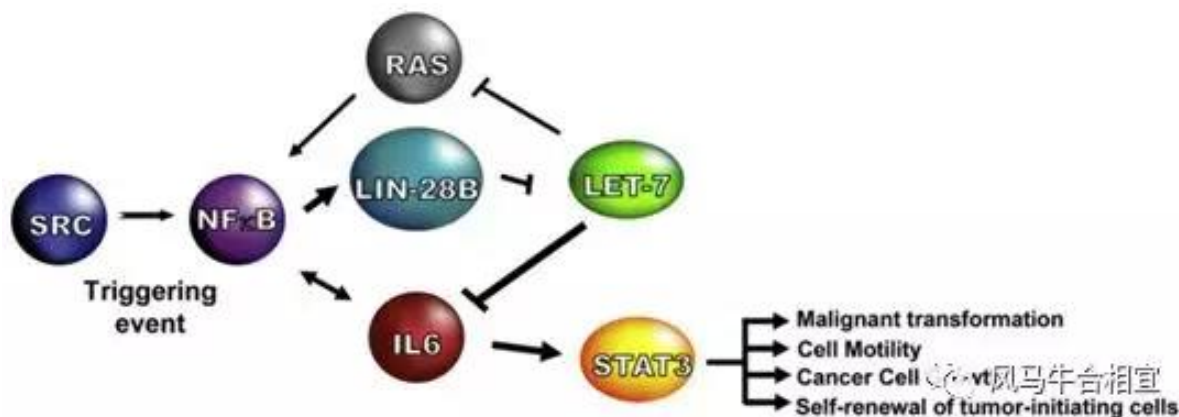


图2.7

miRNA调节肿瘤的增殖[174]。miRNA可以调节增殖相关多条重要通路，比如MYC、RAS等。

Chen等人[175]发现，在结直肠癌中，miR-143含量下降，导致其靶基因KRAS含量升高，促进癌细胞的增殖。You等人[176]发现另一个重要的抑癌miRNA--miR-16同样能通过抑制KRAS而阻碍结直肠癌的增殖。而Su等人[177]则发现与miR-143同簇表达的miR-145能和miR-143起到协同抑制GF1R，从而抑制结直肠癌细胞增殖。

癌细胞能够无限增殖有另一个重要原因，那便是能自主产生并维持生长信号，这样可以减小对外界环境的依赖。这种自主性可以通过癌细胞相关基因的突变(如结直肠癌、肺癌和胰腺癌中的KRAS基因[178])导致，也有miRNA参与其中。当癌基因SRC被激活，可以激活下游的NF-κB通路，然后引发一系列涉及表观遗传、正反馈的反应，使得促细胞生长信号能够在培养的细胞系里维持数代。这一过程的一个关键成员是let-7。如图2.8所示，let-7受到被激活的LIN-28B抑制后，它对下游重要增殖相关靶基因RAS和IL-6的抑制将被解除。而RAS和IL-6又能通过促进NF-κB进而促进LIN28B的表达，加强对let-7的抑制，形成增殖信号的正反馈调控[179]。

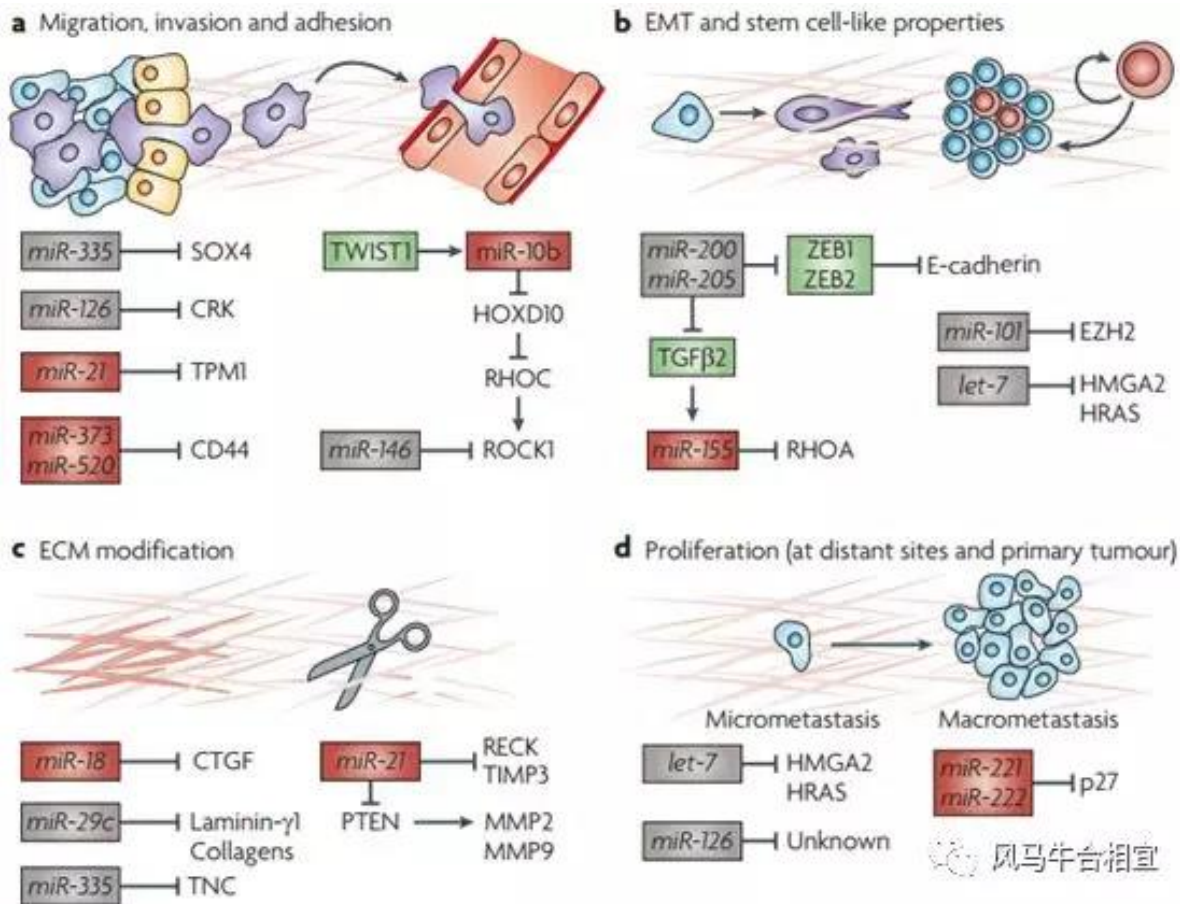


图2.8 miRNA调节肿瘤的自主生长信号[179]。癌细胞可以自身产生生长信号，从而减少对于外界生长信号的依赖。miRNA可以参与这一过程的调节。

正常细胞会经历“生老病死”，然而肿瘤细胞则可以打破生存与死亡的平衡，扩大生存信号，减弱凋亡信号，以利自己的存活。miRNA可以通过抑制凋亡相关蛋白来调节癌细胞的凋亡。miR-29可以通过调节Mcl-1来引起癌细胞的凋亡[180]。miR-29可以下调细胞内Mcl-1蛋白水平，这将导致Bim和Puma蛋白的表达，使癌细胞对TRAIL的细胞毒性敏感，容易发生凋亡。miR-21在乳腺癌、结直肠癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌和胃癌中高表达[181]，并且可以抑制肿瘤凋亡。目前已鉴定出miR-21调节凋亡的靶点有PTEN和PDCD4[182, 183]。

肿瘤生长需要消耗大量能量和营养，以致对于能量和营养的管道--血管的需求非常迫切。肿瘤可以释放信号招募静息的内皮细胞形成肿瘤微血管。内皮细胞特异性的miR-126可以响应促血管生成因子--VEGF或者bFGF等，以促进血管的发生和稳定性[184]。miR-378在多种肿瘤中表达上调，它可以通过和miR-125a竞争在VEGF上的结合位点，来促进VEGF的表达，促进肿瘤血管的生成[185]。

肿瘤发展到晚期会发生侵袭和转移，这是肿瘤致死的一个重要原因，miRNA多个层面参与其中(图2.9)[186]。miR-10b在迁移性的乳腺癌细胞中受到Twist调控而高表达，并且其含量与肿瘤的迁移性和侵袭性呈正相关[187]。在非迁移性的乳腺癌细胞中过表达miR-10b，可以诱发迁移。进一步研究发现miR-10b是通过抑制其靶基因HOXD10，从而导致一个与迁移相关的重要基因RhoC的高表达而促进肿瘤转移的(图2.10)。miR-182在多种肿瘤中表达升高，尤其是那些可以转移至肺部的肿瘤(比如肝癌)[188]。研究者发现：降低肿瘤细胞中miR-182的含量可以减少循环肿瘤细胞(cir

culating tumor cells , CTC)的数量;而增高miR-182则有相反的效果。研究者鉴定出4个miR-182的靶基因(PAI1,TIMP1,RSU1以及MTSS1),主要在抑制肿瘤迁移与维持细胞外基质方面有功能。上皮间充质转化(Epithelial – mesenchymal transition , EMT)是肿瘤转移过程的早期步骤[189]。Ward等人[190]发现：在对他莫昔芬抵抗的MCF-7中，miR-375含量大幅下降。在这些细胞中过表达miR-375可以逆转对他莫昔芬的抵抗并且改善EMT的状况。

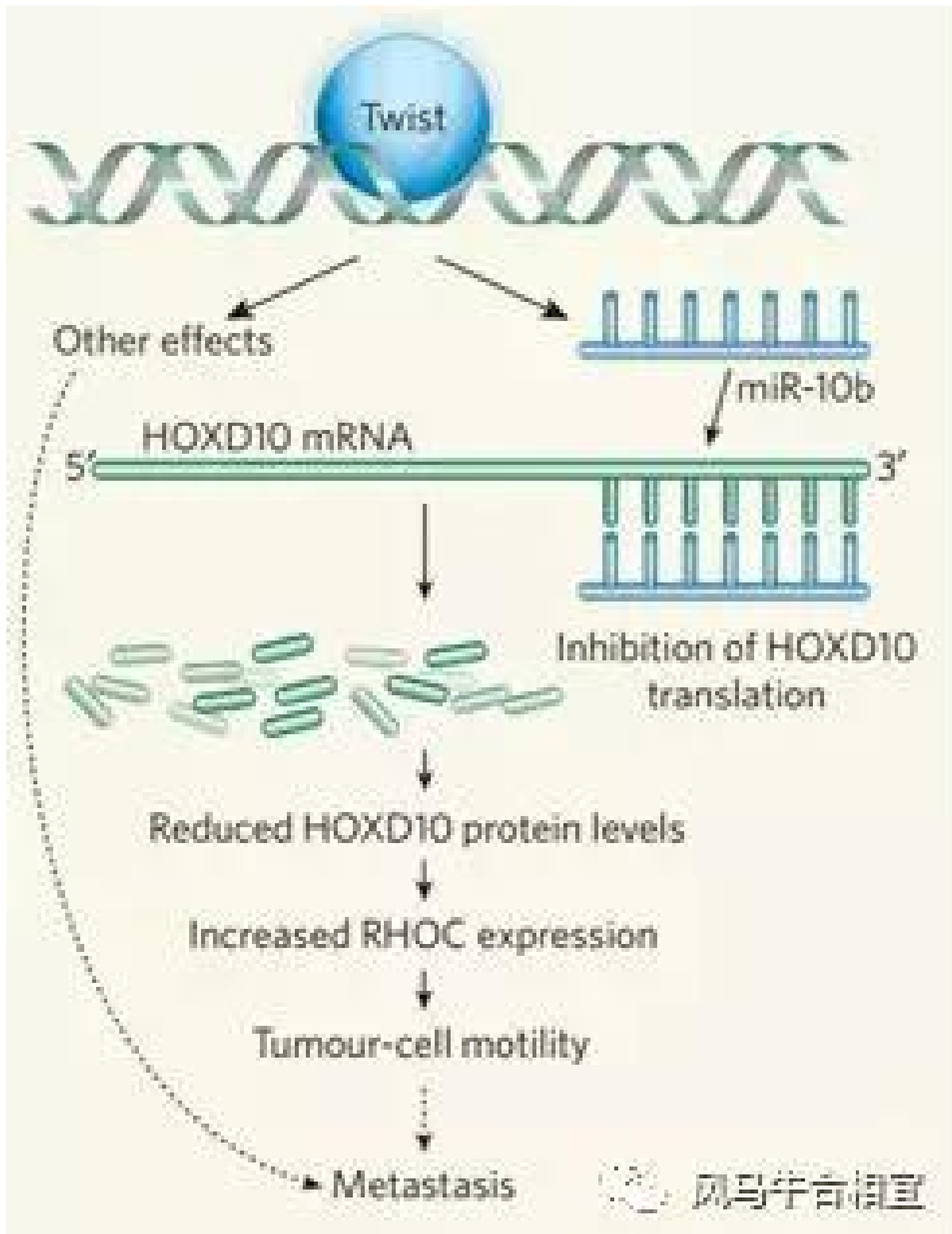


图2.9 miRNA参与肿瘤转移的调节[186]。转移是肿瘤的一项重要特征，miRNA可以调节细胞黏附、EMT和肿瘤细胞侵袭和迁移。

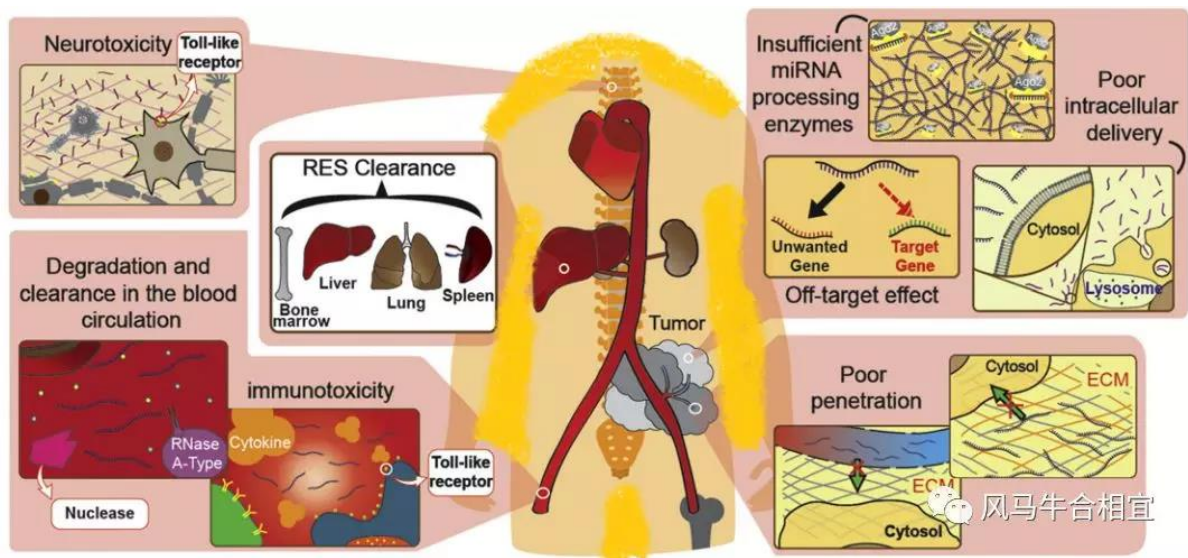


图2.10 miR-10b调节乳腺癌转移[187]。乳腺癌细胞里，Twist可以激活miR-10b表达，从而抑制HOXD10，进而影响乳腺癌细胞的转移。

肿瘤细胞代谢旺盛，为适应快速大量的增殖、迁移和侵袭等功能，需要大量的能量。而在能量代谢方面肿瘤细胞异于正常细胞最大的一点就是葡萄糖的摄取和糖酵解的大幅增加(Warburg effect)。葡萄糖并不能自由通过疏水的细胞膜，而是需要专门的葡萄糖转运蛋白(GLUT家族)。在T24膀胱癌细胞中，miR-195-5p能够抑制GLUT3，影响癌细胞的葡萄糖代谢，进而抑制其增殖，促进凋亡[191]。而另一种葡萄糖转运蛋白GLUT4，则可以被miR-223和miR-133所上调[192,193]。而miR-143则被证明可以在肺癌中调节糖酵解中关键的己糖激酶HK2，从而抑制肺癌细胞能量代谢[194]。

肿瘤细胞可以释放信号招募Treg细胞来逃避免疫系统对它们的清除。miR-34a是p53调控的一个重要抑癌miRNA。一篇研究表明：miR-34a对于肝癌细胞的增殖能力并无显著抑制作用，然而却可以抑制CCL22，而后者正是肝癌细胞招募Treg细胞的重要分子。在小鼠肝癌模型中人为提高miR-34a含量，可以抑制Treg细胞的浸润以及肝癌细胞的转移[195]。而在胶质瘤中，miR-124的下调与胶质瘤干细胞的免疫抑制活动有关[196]。

肿瘤基因组的不稳定性是造成肿瘤基因突变的一个重要原因。高迁移率族蛋白A2(HMGA2)是一种在多种肿瘤中高表达的原癌蛋白，它被证明是let-7的一个靶基因。科学家发现：肿瘤中HMGA2基因的重排使得它的ORF和3' -UTR区域发生了分离。这种分离正好导致let-7不能调节HMGA2，造成了HMGA2的高表达[158,197]。

炎症与癌症的发生有着紧密的联系。在非小细胞肺癌患者的血清中，促炎症因子IL-1 β 含量升高，并可以通过COX2-HIF1 α 通路抑制下游抑癌miR-101的表达。miR-101的下降将解除它对靶点癌基因LIN28B的抑制作用，从而促进非小细胞肺癌的发展[198]。而miR-146a、miR-155和miR-203也被证明参与了结直肠癌相关的IBD的发生发展[199,200]。

基因表达的转录后调控有多个层面、多种方式。比如mRNA的稳定性、翻译的速率、蛋白的稳定

性等等都是可能发生调控的环节。在这些方式里，miRNA无疑是非常重要且经济的一种。miRNA的发现以及其在肿瘤进程中的重要作用，极大地拓展了原癌基因和抑癌基因的范围。在多种肿瘤的起始和发展阶段，癌细胞的miRNA表达谱会发生显著的变化

鉴于miRNA在结直肠癌中的重要作用，我们有理由相信靶向miRNA是一种可能的治疗或缓解结直肠癌的途径。以miRNA为核心的癌症治疗研究已经开展了多年，取得了一定的进展。这项工作基于两个前提：(1)在癌症发生时，相比于正常组织，癌组织的miRNA表达谱发生改变;(2)降低或提高癌症中改变的miRNA可以引起癌症表型的改变。针对癌症中变化的miRNA，科学家总结了两种可能的治疗方法：降低原癌miRNA的表达(miRNA inhibition therapy)或提高抑癌miRNA的含量(miRNA replacement therapy)。要想实现这两个目的，需要克服很多阻碍，比如药物的稳定性、递送系统的效率、药物的清除速率、药物的脱靶效应等等(图3.1)。针对这些挑战，研究者也开发了多种miRNA的修饰技术(比如antagomir或LNA)以及miRNA的递送技术(比如纳米颗粒)等等，取得了初步的成效。miR-26a在多种正常组织高表达，Kota等人发现在肝细胞癌miR-26a发生下调。在培养的肝细胞系回复这种miRNA，可以导致细胞周期的中止。进一步研究表明miR-26a是通过抑制cyclin D2和cyclin E2来行使周期抑制的功能。作者构建了表达miR-26a的腺相关病毒，用以提高肝癌模型小鼠肝脏的miR-26a，发现引起了癌细胞增殖的减缓，并且能诱导肿瘤特异性的凋亡。而这些效果并未伴随明显的副作用发生，提示了这是一种可行的利用miR-26a治疗肿瘤的方法。miR-10b在转移性乳腺癌细胞系以及转移的乳腺癌患者组织里高表达，并且可以促进乳腺癌的转移，表明它可能是控制乳腺癌转移的一个靶点。Ma等人尝试用antagomir下调miR-10b，以达到抑制乳腺癌转移的目的。实验表明：针对miR-10b的antagomir能够在体内或体外有效抑制miR-10b的表达，并且提高miR-10b一个重要靶基因Hoxd10的含量。用这种antagomir处理携带高转移性乳腺癌细胞的小鼠，发现虽然不能减小始发的乳腺癌，但是可以显著抑制乳腺癌的肺转移。并且这种antagomir对正常动物没有影响，显示了一种针对乳腺癌转移的可能药物的安全性。

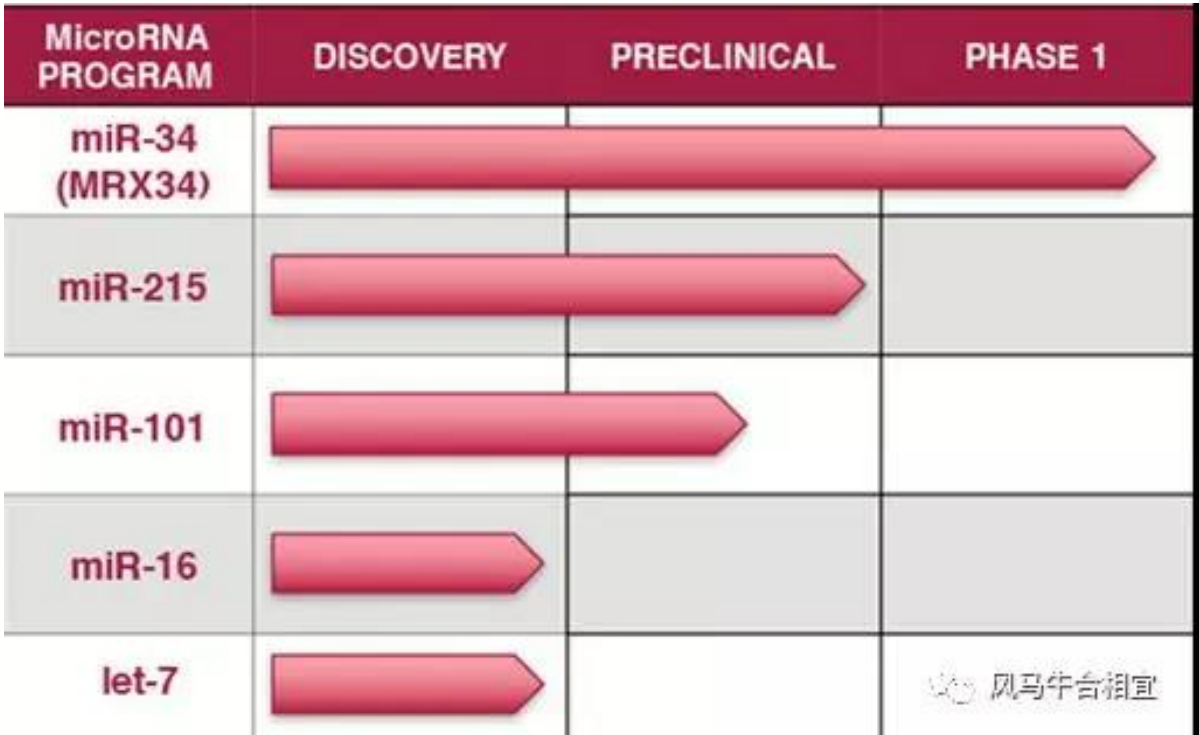


图3.2 miRNA的体内递送方法。为便于miRNA的递送，研究者开发了多种体内递送方法，包括锁核酸、病毒、脂质体等。

鉴于miRNA的治疗前景，很多生物医药公司开辟了这一领域的研发；同时，也导致许多新的公司的成立。比如著名的miRNA Therapeutics公司开发了MRX34，并在2013年4月开始进行一期临床试验。这是第一个进入临床试验的基于miRNA mimc的药物产品。MRX34是利用一种脂质体(Smarticles)来向肝脏递送重要的抑癌miRNA miR-34来治疗肝脏肿瘤或者与肝转移有关的肿瘤。它所利用的miR-34可以调节至少24种原癌基因，涉及细胞周期、增殖、凋亡、转移、化学治疗抵抗以及癌细胞的自我更新等多条通路，是一种极有希望的治疗手段。而miRNA Therapeutics公司同时也在进行另外几种miRNA的治疗潜力的探索，如图3.3所示，希望能早日用于临床治疗。

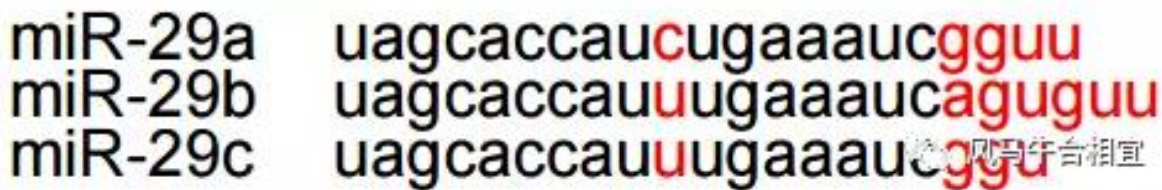


图3.3 miRNA Therapeutics公司在研发中的几种miRNA治疗项目。其中包括已进入一期临床的MRX34和其它临床前期药物。

一个miRNA家族往往有多个成员，这些成员拥有完全相同的种子序列，其余序列也极其相似，往往只是一两个碱基的区别。这表明它们可能拥有相同的靶基因以及相同的功能。比如我们这里的miR-19a和miR-19b，它们只有一个碱基的区别，在结直肠癌细胞里有相似的表达水平和变化情况。而对于这里研究的靶基因TIA1，miR-19a和miR-19b也有相同的结合能，体外实验也表明两者都能抑制TIA1的表达，并且具有相似的抑制效率。但是，很多时候也不像这么简单。有的miRNA家族成员之间序列有不小的差异，比如miR-29家族的两个成员miR-29a、miR-29b和miR-29c，它们拥有相同的种子序列，却在3端尾部的碱基有较大区别(图3.4)。研究发现，miR-29b的3端末尾6个核苷酸使得它不像miR-29a和miR-29c分布在细胞质中，而是富集在细胞核里，行使不同的功能。

而即使是序列很相近的同一家族成员，由于基因组位置不同，上下游环境不同，所受到的调节不同，也可能产生不同的表达水平、表达部位和功能。比如miR-181家族。如图3.5所示，miR-181家族有4个成员，分布在3条不同的染色体上。它们的序列有很高的相似度，但由于基因组定位不同，导致表达量不同。而对于miR-181a和miR-181b来说，各自又可以根据来源的基因组位置不同区分出-1与-2两类。这两类很可能受到不同的表达调节。若我们要深入研究，那么就不能总体上将之作为一个对象miR-181a或者miR-181b来对待，而是要区分具体的亚类，阐明它们在生命活动中的机制。

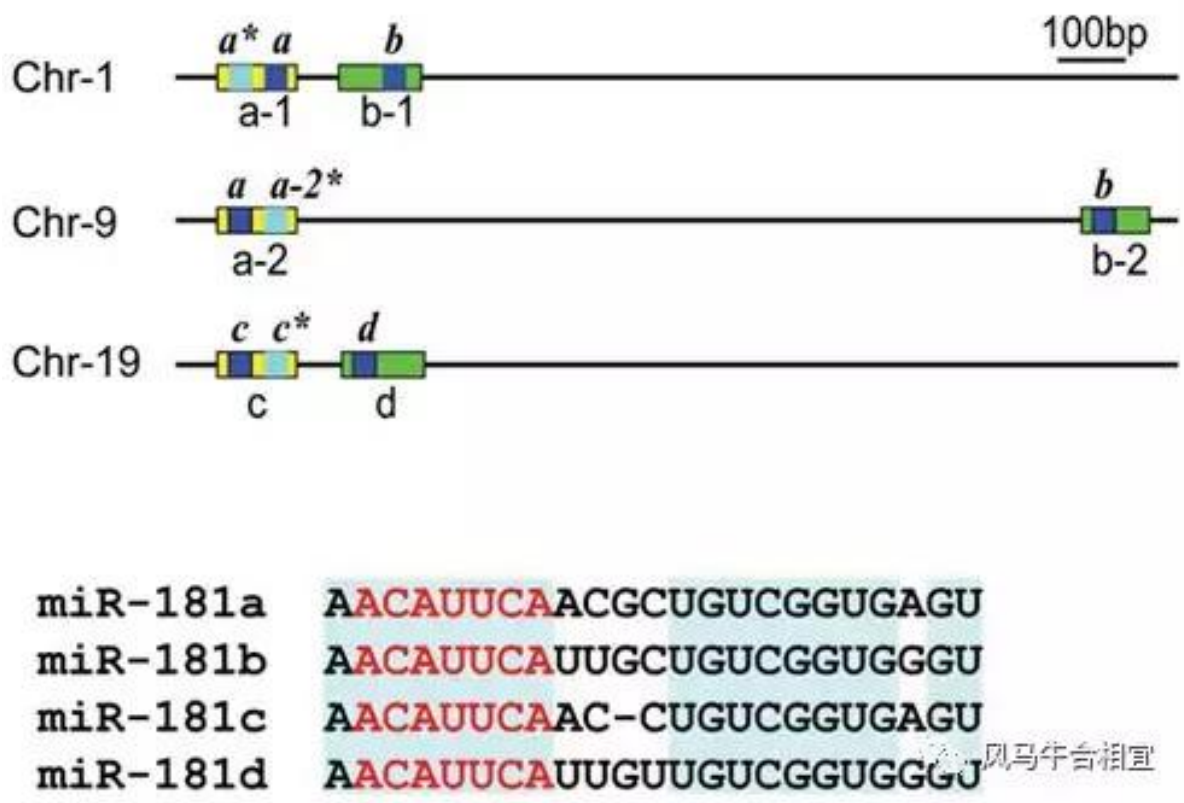


图3.5 miR-181家族基因组定位与序列。miR-181家族的4个成员在基因位置和序列上都有所区别。

许多miRNAs是以簇的形式存在于基因组，因此往往受到相似的转录调控，拥有类似的含量以及变化类型。那么，可以推想：经过漫长的进化，这些被保留下来的同一个簇的miRNAs可能有相近的功能(即使它们的种子序列差别很大)。比如在乳腺癌中，miR-23-24-27簇的三个成员miR-23、miR-24和miR-27被证明可以同时靶向调节HIC1，促进乳腺癌的发展。而在神经系统发育过程中，miR-23和miR-27可以共抑制Apaf-1，从而减弱因缺氧引起的神经细胞凋亡。回到我们研究中的miR-19a，它从属于一个著名的原癌miRNA簇：miR-17-92簇。miR-17-92簇是一个庞大的miRNA类群，连同其亲缘关系很近的miR-106b-25簇，总共涵盖了13种miRNA，它们的基因组位置如图3.43所示。这个簇是第一个被功能鉴定的原癌miRNA簇，因此被称为oncomir-1。它们在肿瘤发生中有重要作用，常常发生高表达，促进肿瘤的发展。这个家族的成员由于有相类似的表达谱，往往有相似的功能;也可以像上述miR-23-24-27家族一样，几个成员共同调节一个基因(图3.6)。比如：miR-17和miR-20a可以调节TGFBRII，从而干扰TGF-β通路。而miR-19a、miR-19b-1、miR-20a和miR-92可以共同抑制BCL2L11，从而维持B细胞的发育。

图3.7 miR-17-92及其亲缘关系很近的miR-106b-25簇上游转录因子和下游靶基因汇总。

但生物学规律往往只是“有限的普遍性”，在miRNA领域尤其如此，处处充斥着特例。对于miR-17-92簇来。

更多 科学进展 请访问 <https://www.iikx.com/news/progress/>

本文版权归作者所有，请勿用于商业用途，[爱科学iikx.com](http://iikx.com)转发