

miRNA 的研究进展*

李继霞 周克元**

(广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 湛江 524023)

摘要 近来, 人类发现了一些不同种类的小 RNA 分子, 其中 miRNA 是人类新发现的一类小 RNA, 它在进化上具有保守性, 在数量、序列、结构、表达和功能上具有多样性. 目前, 大约已发现了 100 多种 miRNA, 它们存在于不同的生物中, 从四膜虫、线虫、植物、动物到人都已发现了不同的 miRNA. miRNA 的主要功能是调节内源基因表达, 它在基因活动调控网络中扮演了重要的角色. miRNA 与 siRNA 关系密切, 它们既具有相似性, 又具有差异性. 小 RNA 分子研究将是今后分子生物学的研究热点之一.

关键词 miRNA, siRNA, 小 RNA

学科分类号 Q786

近些年来, 人类发现了许多不同种类的 RNA 分子, 其中最为重要的是小 RNA 分子的发现. 据报道有些小 RNA 能直接调控某些基因的开关, 从而控制细胞的生长发育, 并决定细胞分化的组织类型. 小 RNA 分子本身又包含了若干类 RNA, 根据小 RNA 的生成、结构和功能大约可分为三类: a. miRNA (micro RNA); b. siRNA (short interfering RNA); c. 其他小 RNA. 其中, miRNA 是新近发现的一类小 RNA 分子, 其在生命活动中发挥了重要调控作用, 而且将是继 siRNA 之后新的研究热点之一, 因此, 本文对 miRNA 分子的研究进展做一综述^[1,2].

1 miRNA 的生成和结构

miRNA 广泛地存在于多种真核生物中, 从低等生物到人类都有其存在的痕迹. 它是一类长度为 21 ~ 25 nt 的单链 RNA 分子片段, 属于非蛋白编码 RNA, 其生成与 siRNA 相似, 同样也需核糖核酸酶 III (Dicer) 和 Argonaute (PIZ/PIWI) 家族蛋白质的存在. 关于 miRNA 的生源论所知甚少, 一些 miRNA 间的联系密切, 因此推测这些 RNA 可能是作为一个转录单位而被转录的. 据体内外实验研究表明 miRNA 的生成至少需要两个步骤: a. 由长的内源性转录本 (pri-miRNA) 生成 70 nt 的 miRNA 前体 (pre-miRNA); b. 将 pre-miRNA 加工为成熟的 miRNA. 此外, 亚细胞定位研究证明这两个生物过程分别局限于细胞核和细胞质内, 因此, 细胞中一定还存在一转运体系, 将 pre-miRNA 从细胞核运送至细胞质. 由此可见, miRNA 的表达可从上

述三个方面进行调控^[3]. miRNA 的表达具有组织特异性和阶段特异性. 在不同组织中表达有不同类型的 miRNA, 在生物发育的不同阶段里有不同的 miRNA 表达. 例: mir-1 专一地表达于人类的心肌组织, 在其他组织中检测不到; mir-1 的表达还具有阶段性, 只在小鼠的胚胎形成阶段可以探测到其存在^[4]. pre-miRNA 是由内源性基因间区的 DNA 反向重复序列转录而来, 它是一种长约 70 nt 的非编码 RNA, 据推测其结构可能为茎-环结构也即发夹状结构. pre-miRNA 在 Dicer 的作用下可被剪切成 miRNA, miRNA 也只是 pre-miRNA 茎中的一个臂. Dicer 可以剪切 pre-miRNA 5'端的一个臂, 也可以剪切 3'端的一个臂或者是同时剪切两个臂. 例如 lin4、let7 及 miR84 是定位于 pre-miRNA 5'端的序列; miR1 是定位于前体 3'端的序列; miR56 和 miR56* 是同一折叠结构的产物, 分别从这一结构的两个臂剪切而来^[5].

miRNA 和 siRNA 都是经 Dicer 作用而形成的产物, 也称为 Dicer 产物. miRNA/siRNA 与其他的寡核苷酸相比, 主要有三点不同: a. 产物长度约为 22 nt; b. 5'端是磷酸基; c. 3'端是羟基. 通过对比从 *E. coli* 中克隆的 RNA 片段发现, miRNA 有独特的长度和序列特征, 这在其他小 RNA 中是尚未发现的. 通常 miRNA 的长度与 Dicer 产物一致, 约

* 广东省重大攻关项目 (2KM04205S) 和广东省重点学科经费资助项目 (9906).

** 通讯联系人.

Tel: 0759-2388581, E-mail: Kyzhou@gdmc.edu.cn

收稿日期: 2003-03-10, 接受日期: 2003-05-12

21 ~ 24 nt, 其 5' 端第一个碱基对 U 有强烈的倾向性, 而对 G 却有抗性, 但第二到四个碱基缺乏 U, 一般来讲, 除第四个碱基外, 其他位置碱基通常都缺乏 C. 这些参数变化并不存在于所有的 RNA 片段中, 是 miRNA 特有的碱基组成结构.

miRNA 的研究起始于小短暂 RNA (small temporal RNAs, stRNA) 的发现. 人类首先在线虫中发现了 stRNAs, 之所以如此命名是因为 miRNA 的表达具有阶段性也就是时间性. 当时发现了两种 miRNA, 一种是 lin4 和另一种是 let7. stRNAs 是 miRNAs 的一个亚类, 其来源、长度和生成过程等都类似于 miRNAs. stRNAs 也是来源于内源转录本, 长度约为 22 nt, 同样是通过核糖核酸酶 III (Dicer) 作用于 miRNA 前体而生成. lin4 和 let7 均来源于非编码蛋白基因, 其功能是结合靶 mRNA 3' 端的非翻译区来阻抑靶基因的翻译. lin4 和 let7 是线虫发育的时间调节点, 属于负性调节因子. 22 nt 的 lin4 RNA 使线虫发育状态由第一幼虫期转变为第二幼虫期, 21 nt 的 let7 RNA 使线虫发育状态由幼虫后期转变为成虫期. let7 还存在于其他动物种系中, 远比 lin4 的存在范围广.

2 miRNA 的功能

miRNA 基因是一类高度保守的非编码基因大家族, 各种 miRNA 都能在其他种系中找到同源体. miRNA 对与其互补的 mRNA 表达水平具有调节作用, 它在基因调节方面具有巨大的潜力. 据其作用模式的不同可以分为三类: 第一类如 lin4, 与 mRNA 不完全互补, 当 miRNA 与靶 mRNA 不完全配对结合时, 主要影响其翻译过程而对 mRNA 的稳定性并无任何影响. 第二类如 miR39/miR171, 与其靶 mRNA 完全互补, 当其与 mRNA 完全配对结合后, 类似与 siRNA 和靶 mRNA 结合后的情况, 分裂切割靶 mRNA. 在所发现的 miRNA 中, let7 的作用模式最特别, 上述的两种模式它都具备. 线虫中的 let7 与 lin4 的作用模式相同, 它与靶 mRNA 3' 端的非翻译区不完全配对结合后, 调节基因的翻译, 而果蝇和 HeLa 细胞中的 let7 与 siRNA 相似, 直接介导 RNA 干扰特异性复合物 (RISC) 分裂切割靶 mRNA. 因此, 第三类作用模式如 let7, 当其与靶 RNA 完全互补配对时, 直接靶向切割 mRNA, 而不完全互补配对时起调节基因表达的作用^[6]. 最近, 有人提出 miRNA 的作用途径及功能与其长度有关. 例如, 21 nt 的 miRNA 与 RISC 相结合,

起到类似 siRNA 的作用; 较长的 miRNA 排除与 RISC 结合, 而以核酸序列特异性的方式与其他复合物相结合, 从而起到调控基因活动的功能. 最近发现 miRNA 与其他物质能组成一类新型的核蛋白复合物 (RNP), 这类复合物被命名为 miRNP. 那么, 很有可能是较长的 miRNA 通过 miRNP 发挥基因调节功能.

迄今为止, 在不同生物中大约已发现了 100 多种 miRNA, 但尚有许多 miRNA 未被发现, 关于其生成及功能等也尚不十分明了. 人们发现不同生物具有不同种类的 miRNA, 但总的趋势是高等生物中 miRNA 的种类比低等生物多, 高等生物的 miRNA 所具功能也比低等生物广泛和复杂. 现已知线虫的 miRNA 在合适的幼虫发育期能直接抑制靶 mRNA 的翻译. 因此, 当在动植物内发生相同的情况时, 我们则认为动植物的 miRNA 也有与线虫 miRNA 相同的功能. 据推测, miRNA 的靶基因一般为动植物中发育基因, 这些基因变异需要 miRNA 的作用. 如在植物中控制分裂组织同一性的转录因子就是 miRNA 的一个靶点, 这都表明 miRNA 在控制生物发育方面有不容忽视的作用. 某些 miRNA 与 RISC 相关, 能导致靶 mRNA 的裂解, 产生基因沉默. 还有些 miRNA (如 miR171/miR39) 的靶 RNA 所编码的蛋白质, 是与植物分生组织识别和细胞分裂相关的, 说明 miRNA 也具有调节植物生长发育的功能. miRNA 很可能与人类的某些疾病也有关联. miR15 和 miR16 基因定位于淋巴细胞染色体的 13q14.3 位置上, 在慢性淋巴细胞白血病人中发现这两个基因的表达有缺失或下调现象存在. 这提示 miRNA 的某些功能可能与人类肿瘤有关. 在各类小 RNA 中, miRNA 具有最广泛基因调节功能, 它能对基因活动的各个层面进行调节^[7~9].

3 miRNA 与 siRNA 的联系与区别

RNAi 沉默是真核细胞的监控机制, 它能识别、清除 dsRNA 或与细胞同源的单链 RNA, 对外源入侵的核酸如病毒、转座子和转基因提供了一种防御措施. siRNA 是 RNAi 途径的中间产物, 也是 RISC 的组分之一, 主要起导向作用即利用 siRNA 选择合适的的作用底物, 其所选择的底物是与 siRNA 完全互补的靶 mRNA, 从而使 RISC 裂解 mRNA, 起到沉默基因的作用. siRNA 是 RNAi 发挥效应所必需的中介因子, 无论是 dsRNA 或短发夹状 RNA

(shRNA) 引发的 RNAi, 都最终需要通过 Dicer 的作用剪切成 siRNA 而发挥效应。

最新发现 RNAi 有助于引导控制表型遗传 (epigenetics)。表型遗传是指生物体内由非基因改变而引起基因表型变化的现象——DNA 序列无改变而基因表达有变化, 且这种表型变化具有可遗传性。它是遗传学上一种特殊而又普遍存在的现象。调整核染色质复合物的形态是后生调控基因表达的方式之一, 通过改变染色质的紧密度就可起到调控基因表达的作用。现有人发现小 RNAs 通过 RNAi 可控制染色质的形态, 从而能持久地封闭基因表达或删除某些 DNA 片段。在多细胞真核生物中, 后生修饰 (epigenetic modifications) 与 siRNA 之间的关系密切, 二者相互联系相互影响。如在链孢菌属 (*Neurospora*) 中, H3 K9 下游的 DNA 甲基化可能是异染色质 siRNA 介导的 H3 K9 甲基化的结果。序列特异性靶组蛋白修饰可能是小 RNA 介导沉默基因的另一种保守模式。

miRNA 与 siRNA 之间存在许多相同点和不同点。其相同之处是: a. 二者的长度都约 22 nt 左右; b. 二者同是 Dicer 产物, 因此具有 Dicer 产物的特点; c. 二者的生成都需 Argonaute 家族蛋白的存在; d. 二者同是 RISC 的组分, 因此在 siRNA 和 miRNA 介导的沉默机制上有重叠。其不同之处有: a. siRNA 是在 RNAi 过程中形成的中间体, 也即 siRNA 是在病毒感染或人工插入 dsRNA 后诱导而成的, 而 miRNA 则是细胞内 RNA 的固有组分之一; b. 二者的来源不同, siRNA 来源于转基因或病毒 RNA, miRNA 来源于内源转录本; c. siRNA 是由长 dsRNA 转变而来的, miRNA 是由具有发夹状结构的 pre-miRNA 转变而来的; d. siRNA 主要以双链形式存在, 其 3' 端存在 2 个非配对的碱基通常为 UU, miRNA 主要以单链形式存在; e. siRNA 与靶 mRNA 完全互补配对结合, miRNA 与靶 RNA 并不完全互补, 存在错配现象; f. 对靶 RNA 的特异性不同。siRNA 的靶序列有一个核苷酸突变, 就会影响到 RNAi 的沉默效应, 如果靶 RNA 有一个位点突变, 那么 miRNA 是不能完全识别的, 也不会影响到 miRNA 途径的调节效应; g. siRNA 通过 RNAi 途径发挥功能; miRNA 通过 miRNA 途径发挥作用。原始的 RNAi 功能主要是抑制转座子活性和病毒感染, 它有些类似于基因组的免疫系统, miRNA 主要在发育过程中发挥作用, 调节内源基因的表达。RNAi 主要在转录后水平发挥作用, 影

响 mRNA 的稳定性, miRNA 主要在蛋白质合成水平发挥作用, 与 mRNA 的稳定性无关。

miRNA 可能比 siRNA 的功能更加广泛, 它能在 RNA 代谢的多个层面上对与其同源的底物进行调控。尽管它们之间有许多差异, 但不可否认的是 siRNA/miRNA 在发挥各自功能的机制上有一些共同的步骤, 这是需要我们进一步探讨的关键。现已有实验证明: 在植物中调控发育的 miRNA 途径与抗病毒 RNA 沉默途径有部分相同的元件和机制, 内源性的 miRNA 能直接介导 RNAi, 靶向裂解 mRNA, 从而起到控制植物生长发育的作用^[10~14]。

4 其他小 RNA 的概述

在生物体中, 还存在有一类不同于 miRNA/siRNA 的小 RNA, 其长度大约在 25 ~ 27 nt 之间。这类 RNA 的来源、生成和功能尚未可知。有实验表明这类 RNA 可能来源于长 dsRNA 的两极, 因其不仅具有 5' 磷酸基结构, 而且这类 RNA 的聚集水平与长 dsRNA 的数量成正比。有人推测这类 RNA 和 siRNA/miRNA 是不同 RNA 酶 III 的产物。这类小 RNA 是 dsRNA 经不同于 Dicer 的 RNA 酶降解而成的, 虽它也具有 siRNA 的某些特征, 但与 siRNA 的功能不同, 与 mRNA 的降解无关。在一过性的植物肥大菌渗入鉴定实验中, 探测到这类小 RNA 来源于报告基因。但在非转基因植物中, 探测到这类基因来源于内源性的逆转录元件。目前, 对小 RNA 的生源论尚不十分清楚。在一过性检测体系中发现这类 RNA 与相应靶 mRNA 的降解无关, 而与体系沉默及来源于逆转录元件的同源 DNA 甲基化有关。例如在酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 分裂生殖过程中, 某些小 RNA 能删除某些基因, 而这些基因恰恰是编码 RNAi 途径中沉默复合体某些组成元件的基因, 结果导致基因沉默活性的丧失。小 RNA 似乎还能重组基因组, 例: 四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 是有纤毛的原生动物, 它的细胞内有两个核, 其中相对较大的细胞核在细胞发育过程中大约会丢失 15% 的 DNA, 而这一过程似乎是受小 RNA 的影响发生的。最近还有报道, 小 RNA 能影响酵母和四膜虫的细胞分裂。他们认为如果没有小 RNA, 那么细胞分裂就会发生错误。我们假设如果在人类也存在此现象, 那么这类 RNA 就很可能与癌症也有关联^[9,13]。

5 展望与前景

由于 siRNA、miRNA 及其他小 RNA 的发现使

得 RNA 转变为当今世界的研究热点. 现已发现非编码 RNA 参与了生命活动的多个步骤, 其中包括转录、染色体的形成、RNA 的剪切和修饰、mRNA 的稳定和翻译、蛋白质的稳定和转运. 目前, 我们已发现了大量的小 RNA 分子, 它们在序列、结构、含量、表达及功能等方面都不同程度地展现出了多样性, 其中 miRNA 的表现尤为突出. 如果 miRNA 基因正如所发现的 miRNA 一样多, 那么它很可能在生命活动中具有十分广泛的调节功能, 对基因表达、生长发育和行为等都具有十分深远和复杂的效应. 当前我们所面临的挑战是: 这些 miRNA 到底具有何功能, 它们是如何识别潜在反义的靶 mRNA, 这些 miRNA 间相互调节作用的结果是什么. 总之, 未来的世界是 RNA 的世界, 它将是生命科学领域里新的研究热点.

参 考 文 献

- 1 Cousin J. Breakthrough of The Year. Small RNAs make big splash. *Science*, 2002, **298** (5602): 2296 ~ 2297
- 2 Mallory A C, Reinhart B J, Bartel D, *et al.* A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (23): 15228 ~ 15233
- 3 Lee Y, Jeon K, Lee J T, *et al.* MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO*, 2002, **21** (17):

4663 ~ 4670

- 4 Lee R C, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, **294** (5543): 862 ~ 864
- 5 Lau N C, Lim L P, Weinstein E G, *et al.* An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, **294** (5543): 858 ~ 862
- 6 Baulcombe D. An RNA microcosm. *Science*, 2002, **297** (5589): 2002 ~ 2003
- 7 Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (24): 15524 ~ 15529
- 8 Kidner C A, Martienssen R A. Macro effects of microRNAs in plants. *Trends Genet*, 2003, **19** (1): 13 ~ 16
- 9 Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, *et al.* Small RNAs: the genome's guiding hand? *Nature*, 2002, **420** (6917): 732
- 10 Zeng Y, Cullen B R. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA*, 2003, **9** (1): 112 ~ 123
- 11 Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, *et al.* Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA*, 2003, **9** (2): 180 ~ 186
- 12 Caudy A A, Myers M, Hannon G J, *et al.* Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev*, 2002, **16** (19): 2491 ~ 2496
- 13 Kasschau K D, Xie Z, Allen E, *et al.* P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev Cell*, 2003, **4** (2): 205 ~ 217
- 14 Reinhart B J, Bartel D P. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science*, 2002, **297** (5588): 1831

Recent Advance of Micro RNA *

LI Ji-Xia, Zhou Ke-Yuan **

(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract MicroRNAs (miRNA) belong to a novel large family of short single-stranded conserved noncoding regulatory RNAs that include the small temporal RNAs lin4 and let7. They exhibit a diversity in sequence, structure, abundance, and expression profile. There are similarities and differences between miRNAs and another class of RNAs called short interfering RNAs (siRNA). The recent advance of miRNAs is reviewed.

Key words miRNA, siRNA, tiny RNA

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major Research Program of Guangdong Province (2KM04205S) and the Special Funds for Major Subject Program of Guangdong Province (9906).

** Corresponding author. Tel: 86-759-2388581, E-mail: Kyzhou@gdmc.edu.cn

Received: March 10, 2003 Accepted: May 12, 2003