

表观遗传与 microRNA 相互调控机制以及在抗肿瘤领域内的应用*

徐艳敏 郭艳合 刘立 蔡荣** 钱程**

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

摘要 DNA 甲基化和组蛋白修饰等表观遗传机制是恶性肿瘤发生发展的重要原因之一。然而近年来研究发现, microRNA 表达水平改变也参与恶性肿瘤的形成。最新研究资料揭示, 表观遗传可调控 microRNA 表达, 而一些种类的 microRNA 也可调节表观遗传, 并且二者之间相互作用可调控组织细胞内基因表达以及诱导体内恶性肿瘤产生。研究资料还显示, 表观遗传主要通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰等方式调控 microRNA 表达, 而 microRNA 则通过调节 DNA 甲基化转移酶、维持细胞中 DNA 甲基化水平或改变组蛋白修饰等途径调控表观遗传。对 microRNA 与表观遗传之间的调控关系以及在抗肿瘤领域内的应用进行全面而系统的论述。

关键词 miRNA, 表观遗传, 肿瘤发生

学科分类号 R730.5

表观遗传(epigenetic)是指 DNA 序列并不发生变化而基因表达却发生了可遗传的改变。其主要机制是由细胞内除遗传信息以外的其他可遗传物质所诱发且在细胞发育和增殖过程中能够稳定传递^[1]。表观遗传现象种类很多, 但 DNA 甲基化和组蛋白修饰等表观遗传现象与恶性肿瘤发生发展密切相关, 特别是 CpG 岛甲基化所致抑癌基因转录失活和 N 端结构域转录后修饰使 DNA 甲基化和组蛋白修饰成为目前表观遗传学和表观基因组学在肿瘤研究领域内重要分支。MicroRNA(miRNA)是一类长大约为 19~23 个核苷酸(nt)的非编码单链小分子 RNA。由于 miRNA 在机体整个生命活动过程中具有广泛调节功能, 对生长发育、生理功能, 尤其在恶性肿瘤的发生发展等过程中, 产生重大影响, 从而使 miRNA 成为目前生命科学领域的研究热点^[2,3]。目前, 人们针对某些种类 miRNA 在肿瘤研究领域内的研究工作主要集中在其表达水平改变是否可诱发肿瘤发生发展, 但对 miRNA 相关表达调控机制的研究尚处于初级阶段。研究已经证实, 染色体上某些区域 DNA 分子受到表观遗传调控后能够诱发肿瘤产生, 然而最新文献报道一些种类的 miRNA, 如 miR-34b 和 let-7a-3 等基因表达也受到 DNA 甲基化等表观遗传机制调控^[4,5], 另外许多种类的

miRNA 定位于 CpG 岛周围或位于其中, 同时研究发现, 此类 miRNA 表达受到表观遗传调节, 而且组织细胞内具有肿瘤抑制功能的 miRNA 通常被 DNA 过度甲基化所沉默从而导致一些肿瘤发生^[6]。另外在恶性肿瘤中某些种类的 miRNA 发生了甲基化改变, 说明 miRNA 甲基化与肿瘤发生发展密切相关。诸多现象提示, 表观遗传在一定程度上对 miRNA 表达方式以及诱发肿瘤产生起着重要的调控作用。许多研究揭示, miRNA 受甲基化和组蛋白修饰等经典表观遗传机制调控, 另一方面, 人们还发现 miRNA 对表观遗传也产生一定调节作用, 从而吸引许多科学家逐渐关注并探索 miRNA 与表观遗传机制之间的相关性^[7]。鉴于 miRNA 调节表观遗传以及同时又受到表观遗传调控及其二者在肿瘤发生发展过程中的作用, 本文将详细阐述 miRNA 与表观遗传之间相互关系在基因表达调控、

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2004CB518804)和国家高技术发展计划(863)(2006AA02Z126)资助项目, 浙江省科技厅重点项目(2006C23006)。

** 通讯联系人。

蔡荣. Tel: 0571-86843185, E-mail: cairong801@hotmail.com

钱程. Tel: 0571-86843182, E-mail: cqian3184@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-05-25, 接受日期: 2008-09-22

肿瘤形成以及在抗肿瘤领域内的应用研究。

1 表观遗传与 miRNA 之间相互调控诱发肿瘤形成

基因决定生命过程中各种蛋白质表达以及表型。但人们却发现，具有完全相同基因组的个体在同样环境中转变为成体后各自在性格特征以及功能等方面将会出现较大差异，一些特征只由一个亲本基因决定而源自另一亲本基因却保持沉默状态。近年来表观遗传学的研究合理地解释了这些问题。然而表观遗传也是细胞恶性转化的一个重要原因。许多种类癌细胞均出现异常 DNA 甲基化行为，肿瘤抑制基因通常被过度地甲基化而失去活性。表观遗传修饰除 DNA 甲基化方式外，还有一种较为常见的方式即染色质结构修饰，通过乙酰化或磷酸化等化学方法，对组蛋白进行修饰引起染色质结构变化，从而导致基因活性改变使细胞产生恶性转化。研究证实，DNA 甲基化和组蛋白修饰对基因表达具有重要调控作用，同时亦可诱发肿瘤形成。DNA 甲基化主要包括整个基因组去甲基化和部分区域高度甲基化，其中 DNA 去甲基化在肿瘤发生发展中的作用尤为明显，另外组蛋白修饰也是基因表达调控以及诱发肿瘤形成的重要表观遗传机制之一。已有文献报道在某些恶性肿瘤中组蛋白修饰通过关闭抑制细胞异常生长的基因促进细胞恶性转化。

科学家预测 miRNA 可调控哺乳动物基因组中约 30% 基因表达，然而迄今为止大量研究资料证实，组织细胞内 miRNA 异常表达而诱发恶性肿瘤的概率远高于 miRNA 的正常表达水平。目前，针对 miRNA 调控肿瘤发生发展的研究已经成为在肿瘤研究领域内一个重要分支，国际上一些从事肿瘤发病机制以及治疗研究的著名实验室纷纷转向这一研究领域，许多国际著名杂志连续报道肿瘤相关 miRNA 潜在功能以及抗癌效应的研究。let-7 在肺癌发生发展过程中属于肿瘤抑制基因，其靶标是 Ras 基因，let-7 表达降低可使 Ras 表达增加从而促进肿瘤生长^[8]；具有肿瘤抑制功能的 miR-127 在正常前列腺和膀胱组织细胞中高表达而在肿瘤组织中显著下调或沉默，miR-127 下调导致致瘤基因 BCL6 表达增加进而促进肿瘤发生发展^[9]；miR-17-92 基因簇被证明为在肿瘤发生中起致瘤作用且可被 c-myc 激活在 B 细胞淋巴瘤和肺癌中呈高表达^[10]。实验已充分说明，miRNA 在调控肿瘤

发生发展过程中发挥着重要作用，miRNA 异常表达可导致恶性肿瘤发生发展^[11~13]，但 miRNA 表达如何被诱导改变导致组织细胞内整体表达模式变化而诱发机体产生肿瘤的机制尚不完全清楚。

最近人们逐渐认识到表观遗传对 miRNA 分子也产生重要的调控且直接参与肿瘤发生发展等过程，同时 miRNA 分子也可调控表观遗传而诱发恶性肿瘤生成。研究已经证实 miRNA 自身也受其他多种因素调控，例如染色质结构异常、miRNA 加工受损甚至表观遗传状态改变等因素均可影响 miRNA 表达。最新研究发现 DNA 甲基化不足、CpG 岛过度甲基化以及组蛋白修饰等因素均可影响具有肿瘤抑制功能的 miRNA 表达^[14, 15]。在 miRNA 成熟过程中发挥重要作用的 Ago 蛋白也受到 DNA 甲基化和组蛋白修饰等机制调控而影响自身 miRNA 成熟过程。另外，N 端尾部结构域转录后修饰也是调控 miRNA 表达而诱导肿瘤发生发展的重要表观遗传机制^[7]。另一方面资料还显示 miRNA 也可通过调节 DNA 甲基转移酶表达、维持细胞中 DNA 甲基化或改变组蛋白修饰等多种途径而调节表观遗传。因此 miRNA 与表观遗传之间存在着复杂的相互调控，一方面可对组织细胞产生更加精确调控，另一方面可能是诱发肿瘤产生的一个重要原因。针对 miRNA 与表观遗传相关性的研究必将对探索基因表达调控机制以及肿瘤发生发展机制产生重大影响。

2 表观遗传调控 miRNA 表达方式及其机制

目前研究认为，DNA 甲基化和组蛋白修饰是调控 miRNA 表达的主要方式和手段。该类调控模式的主要机制是调节细胞内一些关键基因表达，尤其是在癌细胞中一些具有肿瘤抑制功能的 miRNA 被 DNA 过度甲基化所沉默，并关闭该 miRNA 启动子区域的染色质结构从而影响 miRNA 表达^[16]。用遗传学方法突变癌细胞中 DNA 甲基化关键酶 DNMT3A 或 DNMT3B 基因组碱基，发现 CpG 岛过度甲基化是导致 miRNA 在肿瘤细胞中被下调机制之一^[17, 18]，这也说明表观遗传在一定程度上对 miRNA 表达水平发挥着精确调节作用。

为了探讨 miRNA 表达是否受表观遗传修饰调控，最近 Saito 等^[9]使用染色质重塑药物 5-氮-2-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)和 4-苯基丁酸(PBA)同时诱导 T24 人类膀胱癌细胞和 LD419 正常纤维细胞株后观察 miRNA 表达情况，结果显示，在 T24 细胞

中一些 miRNA 被上调而在 LD419 细胞中 miRNA 表达水平则无明显变化, 其中定位于 CpG 岛中的 miR-127 变化尤为显著. miR-127 位于染色体 14q32.31 位点上的一个 miRNA 家族中, 该家族还包括 miR-136、miR-431、miR-32 和 miR-433 等成员. 为了阐明 miR-127 调控机制, 该研究小组使用微阵列技术分析发现: 经 5-Aza-CdR 和 PBA 同时诱导 T24 和 LD419 细胞株后, 在 T24 细胞株中可检测出 313 种 miRNA, 其中 17 种 miRNA 表达显著上调且超出原有的 3 倍, 在 LD419 细胞中也可观察到类似情况, 但 miRNA 表达变化主要机制与 T24 细胞株有着明显差异, 其根本原因是 miR-127 在 T24 细胞中存在 3 个不同的转录起始位点而在 LD419 细胞中仅有一个. 该研究小组进一步将研究对象扩展到结肠癌、宫颈癌、胚胎瘤、白血病、乳腺癌、胰腺癌以及肺癌等恶性肿瘤, 在 HCT116、HeLa、NCCIT、Ramos、CFPAC-1、MCF7 和 CALU-1 等 7 种人类癌细胞株和 LD98、CCD-1070SK 等 2 种正常人成纤维细胞株内研究发现: miR-127 在所有癌细胞中均被沉默, 但经 5-Aza-CdR 和 PBA 处理后可被诱导表达且在 HCT116、HeLa、NCCIT 和 Ramos 癌细胞株中以剂量依赖方式被诱导. 在通常情况下 miR-127 在 LD98 和 CCD-1070SK 细胞株中可显著表达, 经 5-Aza-CdR 和 PBA 同时诱导后表达无显著差异. 将 5-Aza-CdR 或 PBA 各自单独处理 T24 和 LD419 细胞株后均不能诱导 miR-127 表达, 但两种药物协同处理则诱导其表达显著增加且在 T24 细胞株中变化尤为显著, 说明 miR-127 在正常细胞和癌细胞中均受到染色质修饰药物诱导, 其表达直接由 DNA 去甲基化和组蛋白去乙酰化抑制剂协同效应所调控^[9].

miR-127 在 T24 和 LD419 细胞中存在着不同数量转录起始位点. 研究 5-Aza-CdR 和 PBA 同时诱导该基因上游启动子区域 DNA 甲基化和组蛋白修饰程度时发现: 调控 miR-127 表达的启动子已被表观遗传所修饰, 因此其表达是由表观遗传修饰的启动子所启动. 使用重亚硫酸盐基因组测序方法, 分析经 5-Aza-CdR 和 PBA 所诱导的 miR-127 启动子区域 DNA 甲基化状态, 发现在两种细胞中该区域甲基化程度均有显著变化, 说明 miR-127 由自身启动子活化所引起的表达增强依赖于 DNA 甲基化和组蛋白抑制剂的诱导, 受 DNA 甲基化和组蛋白修饰调控. 通过进一步分析 T24 细胞中 miR-127

基因转录起始位点周围 4 个区域的染色质结构发现: 伴随染色质重塑药物处理, 在该区域内出现 DNA 甲基化水平降低而组蛋白标记增加. 经 5-Aza-CdR 或 PBA 诱导后乙酰化组蛋白 H3 和甲基化组蛋白 H3K4 水平均高于诱导前, 说明组蛋白修饰水平增加能够开放染色质结构从而促进基因表达. Bruceckner 等^[19, 20]研究小组在对位于人类染色体 22q13.31 上的 let-7a-3 基因研究中亦得到类似结果. 根据实验结果可以推测 miRNA 与表观遗传之间可能存在以下调控关系: 在癌细胞中具有肿瘤抑制功能的 miRNA 通常被 DNA 过度甲基化所沉默且关闭其启动子区域的染色质结构而抑制基因转录. 染色质修饰药物如 DNA 甲基化抑制剂和 HDAC 抑制剂, 可降低启动子区域 DNA 甲基化水平并开放染色质结构从而激活 pri-miRNA 转录, 使其经过一系列加工过程生成成熟 miRNA 后整合到 RNA 诱导沉默复合物中发挥其基因表达调控作用(如图 1 所示).

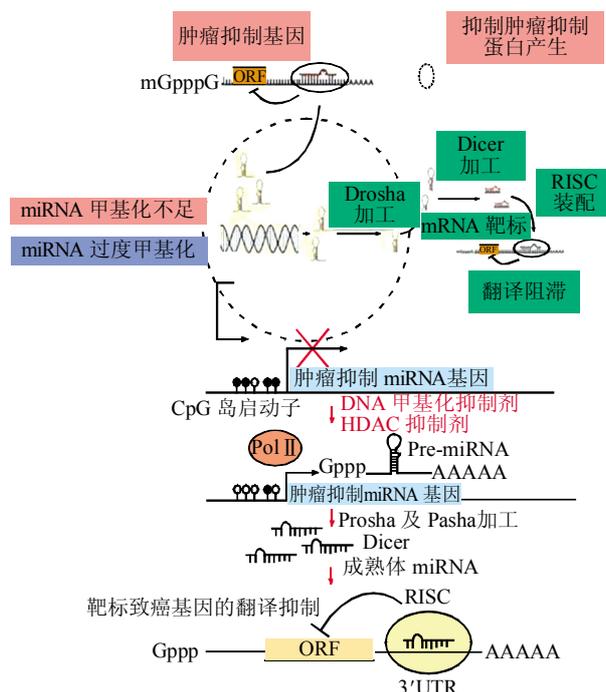


Fig. 1 Effects of epigenetics modification on miRNA expression

图 1 表观遗传修饰对 miRNA 表达变化的影响

另外, 在结直肠癌细胞中人们通过 5-Aza-CdR 诱导或单敲除结直肠癌 HCT116 细胞株中 *DNMT1* 和 *DNMT3B* 基因后观察 miRNA 表达情况, 发现主要调控 p53 基因的 miR-34b 和 miR-34c 受表观遗传调控而诱导其表达沉默^[21]. 对此, 双敲除 *DNMT1*

和 *DNTM3B* 基因可进一步加以证实. Lujambio 等^[22]在不同类型的肿瘤中使用微阵列技术分析 320 种 miRNA 表达谱时发现: 18 种 miRNA 表达上调且超出原有 3 倍, 其中 miR-124a 则通过 CpG 岛过度甲基化而引起转录失活. 研究人员在卵巢肿瘤细胞中发现, miR-21、miR-203 和 miR-205 在卵巢癌细胞中表达上调, 而且这些 miRNA 在卵巢癌细胞株 OVCAR3 经 5-Aza-CdR 诱导后表达显著增加, 推测其过度表达是由 DNA 甲基化不足导致, 暗示 miR-21、miR-203 和 miR-205 的异常表达受 DNA 甲基化等表观遗传机制调控^[23]. 人们在分析 *let-7a-3* 甲基化状态和 *let-7a* 表达水平时发现: *let-7a-3* 甲基化与胰岛素样生长因子表达呈负相关, 但与胰岛素样生长因子结合蛋白 3 表达呈正相关, 且该基因甲基化后可降低患者死亡率^[24]. 在利用口腔鳞状细胞癌(OSCC)细胞开展的研究中, 研究者在 18 种 OSCC 细胞系中观察 148 种 miRNA 表达谱时发现: 与对照组永生化口腔角化细胞系 RT7 相比, 54 种 miRNA 常被下调, 其中定位在 CpG 岛周围的 miR-34b、miR-137、miR-193a 和 miR-203 通常被异常 DNA 甲基化所沉默, 说明在口腔鳞状细胞癌中也存在表观遗传调控 miRNA 表达现象. 在胆管细胞癌中 IL-6 过度表达可导致 *DNMT1* 和 *HASJ4442* 表达增加, 而经 5-Aza-CdR 诱导后其表达可降低, IL-6 过度表达后下调 miR-370 表达, 致使 miR-370 靶位点致癌基因 *MAP3K8* 表达增加, 从而诱导肿瘤发生, 表明机体可通过一些炎症相关细胞因子调控 miRNA 表达^[25].

除 DNA 甲基化介导 miRNA 表达调控外, 组蛋白修饰也可介导 miRNA 表达调控. 最近 Scott 等^[26]研究小组报道, 在 SKBr3.72 乳腺癌细胞株中 miRNA 表达变化与羟氨酸 HDAC 抑制剂 LAQ824 抑制程度相关. 使用微阵列技术分析经 LAQ824 处理前后 SKBr3 细胞株中的 60 多种不同 miRNA 表达情况发现, 约 40% 的 miRNA 表达水平发生显著变化, 其中 22 种 miRNA 表达呈下调, 5 种 miRNA 表达呈上调, 说明组蛋白修饰对 miRNA 表达也具有重要调节作用. 另外一些由转录因子或细胞因子介导的表观遗传修饰也可间接调控 miRNA 表达, 例如 miR-223 的表达调控通过急性骨髓白血病相关融合蛋白(AML1/ETO)介导的表观遗传沉默机制而实现, 研究发现, 在 pre-miR-223 基因序列上存在着 AML1 蛋白结合位点, 该位点序列能招募染色质重塑酶使染色质结构产生局部改变从而介

导对 miR-223 转录调控^[27]. 另外, 染色质异常也是影响 miRNA 表达的原因之一, 通过染色质构型改变可对 miRNA 表达产生调控作用. 有证据表明 miRNA 定位和染色质异常密切相关^[28]. 使用微阵列比较基因组杂交分析技术对 227 例卵巢癌、乳腺癌和黑素瘤标本进行检测, 结果表明, 在癌细胞中有异常表达的 miRNA 在其染色质区域内均出现高频基因组变异, 说明该类基因组变异与肿瘤发生可能具有一定相关性.

3 miRNA 调控表观遗传方式及其机制

miRNA 可通过多种途径影响表观遗传, 例如调节 DNA 甲基化转移酶表达、直接维持细胞中 DNA 甲基化或改变组蛋白修饰等途径. 为了研究 miRNA 对表观遗传调控, Fabbri 等^[29]利用肺癌细胞中 miR-29 家族为研究对象观察 miRNA 是否可通过调节 DNA 甲基转移酶间接影响细胞甲基化. 该研究小组首先验证了 miRNA 表达谱改变与癌基因组甲基化类型异常之间的相关性, 通过多种靶基因预测从非小细胞肺癌(NSCLC)细胞中克隆 *DNMT3A* 和 *DNMT3B* 基因 mRNA 的 3'-UTR 序列, 将该序列插入到 pGL3-promotor 载体上荧光素酶基因下游从而形成融合蛋白, 与 miR-29a、miR-29b 或 miR-29c 共转染 A549 细胞以观察 miRNA 与靶标基因之间的相互作用. 从已转染 miR-29 的 A549 和 H1299 细胞中提取 RNA 进行定量 RT-PCR, 实验结果证实, miR-29 家族单个成员过表达均可导致内源性 *DNMT3A* 或 *DNMT3B* 的 mRNA 显著降低, 相反用反义寡核苷酸(ASO)沉默 miR-29 家族单个成员则诱导 *DNMT3A* 或 *DNMT3B* 的 mRNA 表达水平上调. 将 *DNMT3A* 或 *DNMT3B* 基因 mRNA 的 3'-UTR 克隆至报告载体 QBI-GFP25 的 GFP 序列下游, 表达一个包含 *DNMT3A* 或 *DNMT3B* 的 3'-UTR 融合 GFP 蛋白. 将克隆载体 GFP-3A 或 3B-3'-UTR 和 miR-29a、miR-29b、miR-29c 共转染 A549 细胞, 在已转染 miR-29 的细胞中发现 GFP 蛋白表达水平显著降低, 说明 miR-29 过表达可导致 *DNMT3A* 或 *DNMT3B* 蛋白翻译水平显著降低, 其中 GFP-3B-3'-UTR 降低尤为显著, 其可能的原因是 miR-29 和 *DNMT3B* 的 3'-UTR 匹配程度更高. 进一步检测 *DNMT3A* 或 *DNMT3B* 与 miR-29a、miR-29b 或 miR-29c 之间相关性时发现二者之间存在着显著负相关, 说明 miR-29 表达状况改变可导致 DNA 表观遗传修饰的变化. 通过液相色谱 - 串

联质谱法 (LC-MS/MS) 分析转染 miR-29a、miR-29b、miR-29c 的 A549 细胞基因组总体 DNA 甲基化水平, 发现在转染 48 h 和 72 h 后 miR-29 家族中任何成员与对照组相比其总体 DNA 甲基化水平均显著下降, 其中以转染 miR-29b 效果最为显著^[30]. 若进一步增强外源性 miR-29 在肺癌细胞中的表达则可导致细胞整体甲基化水平降低, 肿瘤抑制基因可恢复表达从而抑制肿瘤生成. 利用 MassARRAY 系统检测肿瘤抑制基因 *FHIT* 和 *WWOX* 上游调节区域甲基化状态, 发现 miR-29 可通过改变启动子甲基化水平调节 *FHIT* 和 *WWOX* 表达.

miRNA 表达水平变化不仅可间接影响细胞中 DNA 甲基化水平, 而且部分 miRNA 还直接参与维持细胞中 DNA 甲基化. Bao 等^[31]以拟南芥植物为研究对象探索 miRNA 与 *PHABULOSA (PHB)* 基因甲基化之间的关系时发现, miR-165 和 miR-166 是该植物中 *PHB* 甲基化所必需, miR-165 和 miR-166 与 *PHB* 的 mRNA 相互作用以至改变 *PHB* 基因染色质构型从而诱导染色质结构发生改变. 根据研究结果提出 miRNA 诱导 *PHB* 甲基化模型: miRNA 在细胞质中成熟, 胞浆中成熟 miRNA 可重新进入核内与 *PHB* 的 mRNA 互补配对并进一步结合其他因子而导致结合位点处形成染色质重塑复合体, 该复合体可诱导 *PHB* 基因甲基化. miRNA 可能作为该复合体中的一个组成部分间接地促进该复合物形成从而促进 DNA 甲基化. 另外, 在哺乳动物细胞中 miR-290 可靶向调节 *Rbl2*, *DNMT* 活性依赖于 *Rbl2* 表达程度, miR-290 可通过对 *Rbl2* 调节从而间接影响 *DNMT* 表达, 最终诱导 DNA 甲基化和延伸端粒, 该类 miRNA 调控 DNA 甲基化和端粒活性在 *Dicer1* 缺陷细胞中得以充分证实, 说明 miR-290 直接调控 *Rbl2* 依赖的 *DNMT* 途径从而控制细胞整体 DNA 甲基化^[32]. 另一方面, miRNA 也可通过调控组蛋白修饰从而调节染色质结构, 例如在小鼠体内软骨特异性的 miR-140 以组蛋白去乙酰酶为靶标, 通过调节组蛋白去乙酰酶的水平进而影响到组蛋白修饰并最终影响一些癌相关基因表达状态^[33].

4 在肿瘤治疗领域内的应用前景

miRNA 与表观遗传相互作用与肿瘤发生之间的相关性提示人们, 可借助一定方法和手段调节二者之间特性从而达到治疗肿瘤的目的. 实验已证明

miRNA 表观遗传调控是影响 miRNA 表达水平变化的重要途径之一, 因此 miRNA 表观遗传调控将成为肿瘤治疗研究的重要方向. 许多研究小组使用与 miRNA 互补、经修饰的 ASO 抑制有致癌特性的 miRNA, 结果显示抑癌效果较显著. Krützfeldt 等^[34, 35]开发了两类经化学修饰的 ASO, 该类小分子已被成功用于抑制小鼠肝特异性的 miR-122. 该研究小组又使用静脉注射方法将与胆固醇共轭的 2', -O- 甲基修饰的 ASO 注射到小鼠体内, 结果显示不同组织中相应 miRNA 显著降低且靶基因表达水平提高. Esau 等^[36]研究小组采用非结合 2', -O- 甲氧基乙酯磷硫酰修饰的 ASO 针对 miR-122 抑制也获得了较好疗效, 实验结果均证明内源 miRNA 可能是药物筛选较为理想的靶标.

表观遗传的一个显著特征是通过特定药物逆转这种效应, 如 DNA 甲基化导致基因沉默可由 DNA 去甲基化试剂加以逆转, 该类药物不仅可用于细胞培养而且可用于疾病治疗中, 特别是抗肿瘤效果明显. 目前 5- 氮胞苷 (5-AzaC) 和 5-Aza-CdR 已通过 FDA 认证用于选择性治疗脊髓发育不良综合症^[36]. 在 DNA 甲基化过程中甲基化酶与胞嘧啶第 6 位碳共价结合, 从 S- 腺苷甲硫氨酸 (SAM) 上转移甲基基团至胞嘧啶第 5 位之后酶便脱离 DNA. 当 5-AzaC 和 5-Aza-CdR 嵌入 DNA 甲基化位点后因其嘧啶环第 5 位 N 不能接受甲基, 所以当甲基化酶与此嘧啶的第 6 位碳结合后, SAM 上甲基便不能被酶转移到嘧啶环第 5 位碳原子上, 甲基化酶不能从胞嘧啶第 6 位碳原子上脱离. 嵌入 5-AzaC 和 5-Aza-CdR 的 DNA 便与甲基化酶形成稳定共价复合物, 从而导致甲基化酶活性下降使基因组甲基化相应降低^[37].

另一方面, 在癌细胞中具有肿瘤抑制功能的 miRNA 一般被下调或沉默, 活化具有肿瘤抑制功能的 miRNA 将有利于癌症治疗, 通过 5-Aza-CdR 和 PBA 诱导具有肿瘤抑制功能的 miR-127 高表达从而导致癌基因 *BCL6* 下调^[9]. *BCL6* 为一编码含有 BTB/POZ 锌指结构的转录抑制因子, 该转录因子是胚胎发育所必需且与 B 细胞淋巴瘤发病相关. 此外, *BCL6* 还抑制 p53 表达并调节 DNA 损伤诱导的凋亡效应^[38]. 因此活化具有肿瘤抑制功能的 miRNA 既可影响胚胎发育, 又关系到肿瘤发病机理及肿瘤治疗.

目前, 使用染色质修饰药物如 DNA 甲基化和 HDAC 抑制剂针对肿瘤表观遗传途径的治疗具有良

好的应用前景, 其中 5-Aza-CdR 和 PBA 已被普遍应用. 该类药物不仅能激活可以编码蛋白质的肿瘤抑制基因, 而且能活化有肿瘤抑制功能的 miRNA, 该类 miRNA 活化也能导致靶标癌基因表达下调(如

图 2 所示). 随着针对 miRNA 研究的不断深入, 更多种类 miRNA 将被相继发现从而提供更多的潜在治疗靶点.

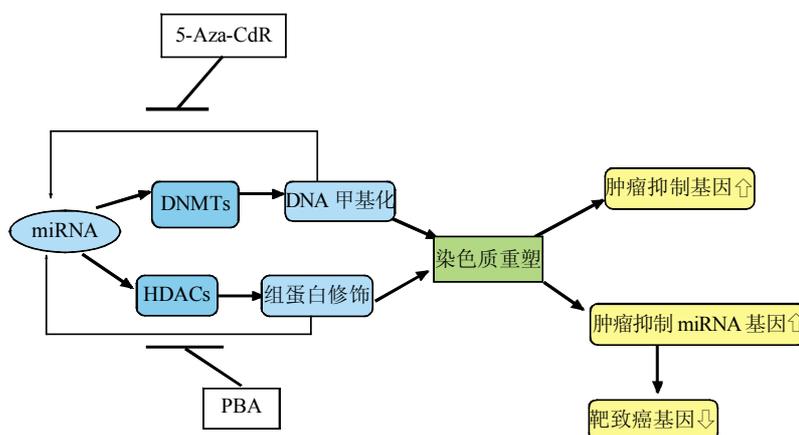


Fig. 2 The reciprocal modulation between epigenetic and miRNA and the application for treatment of malignant tumors

图 2 miRNA 与表观遗传之间的相互调控以及在抗癌治疗中的应用

DNMT, DNA methyltransferase(DNA 甲基转移酶); HDAC, histone deacetylase(组蛋白脱乙酰基酶); 5-Aza-CdR, 5-aza-2-deoxycytidine (5- 氮 -2- 脱氧胞苷); PBA, 4-phenylbutyric acid(4- 苯基丁酸).

5 结语与展望

近年来研究表明, miRNA 受表观遗传调控且与肿瘤发生关系密切, miRNA 表观遗传调控的发现开辟了肿瘤治疗的新领域, 深入探索表观遗传与 miRNA 之间的相关性已成为研究热点之一^[39]. miRNA 受表观遗传调控使人们思考 miRNA 表达调控复杂性. 目前人们对 miRNA 自身调控机制的认识仍较肤浅. 最近发现, 抑制 miRNA 加工或成熟过程均可诱导细胞恶性转化以及促进肿瘤发生^[40], 该类现象促使人们进一步研究 miRNA 在肿瘤发生发展的哪个阶段发挥作用以及是肿瘤发生诱导 miRNA 表达异常还是 miRNA 异常导致癌症发生. 有文献报道, 在鼠胚胎干细胞中 miRNA 通过调控转录抑制因子控制 DNA 重新甲基化^[41], 另有文献报道, 在胚胎干细胞时期 miRNA 发挥调控干细胞分化作用, 推测 miRNA 加工和表达异常可能是肿瘤发生早期事件而不是甲基化所致, 因为甲基化出现相对较晚, 这些现象促使人们考虑 miRNA 是否是控制 DNA 甲基化的启动因素, miRNA 调控表观遗传的确切机制如何等诸多问题, 这些问题将引导人们对 miRNA 与表观遗传调控之间关系进行深入

研究.

另外 miRNA 与表观遗传机制之间调节关系的研究还受到多种因素制约. 通常 miRNA 基因序列相对较短且整合到较大的转录单元中是 miRNA 与表观遗传调节研究的主要障碍, 除了寻找调控 miRNA 基因、miRNA 靶基因以及揭示 miRNA 具体作用机制外, 还需研究 miRNA 与表观遗传机制上下游之间调控关系, 即 miRNA 在何种阶段通过何种方式影响表观遗传机制, 表观遗传又如何调控 miRNA 表达. 鉴于 miRNA 和表观遗传相互作用研究的特殊性, 科学工作者首先必须建立一个表达外源性 miRNA 不受其内源抑制的稳定细胞系, 以便在细胞恶性转化过程中观察 miRNA 动态变化以及表观遗传变化. 深入理解二者之间的相关性既有助于理解复杂的基因调控网络, 又可引导人们深入研究恶性肿瘤发生发展的新机制.

参 考 文 献

- 1 Egger G, Liang G, Aparicio A, *et al.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 2004, **429** (6990): 457~463
- 2 Bartel D P. microRNA s: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281~297

- 3 Kim V N, Nam J W. Genomics of microRNA. *Trends Genet*, 2006, **22**(3): 165~173
- 4 Weber B, Stressemann C, Brueckner B, *et al.* Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*, 2007, **6**(9): 1001~1005
- 5 Kozaki K, Imoto I, Mogi S, *et al.* Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res*, 2008, **68**(7): 2094~2105
- 6 Lehmann U, Hasemeier B, Romermann D, *et al.* Epigenetic inactivation of microRNA genes in mammary carcinoma. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 2007, **91**: 214~220
- 7 Chuang J C, Jones P A. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res*, 2007, **61**(5 Pt 2): 24R~29R
- 8 Kumar M S, Erkeland S J, Pester R E, *et al.* Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(10): 3903~3908
- 9 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. *Cancer Cell*, 2006, **9**(6): 435~443
- 10 Chang T C, Yu D, Lee Y S, *et al.* Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*, 2008, **40**(1): 43~50
- 11 Esquela-Kerscher A, Slack F J. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6**(4): 259~269
- 12 Meltzer P S. Cancer genomics: small RNAs with big impacts. *Nature*, 2005, **435**(7043): 745~746
- 13 Lu J, Getz G, Miska E A, *et al.* microRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005, **435**(7043): 834~838
- 14 Jones P A, Baylin S B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 2002, **3**(6): 415~428
- 15 Fraga M F, Esteller M. Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications. *Cell Cycle*, 2005, **4**(10): 1377~1381
- 16 Saito Y, Jones P A. Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle*, 2006, **5**(19): 2220~2222
- 17 Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, *et al.* Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res*, 2007, **67**(4): 1424~1429
- 18 Rhee I, Bachman K E, Park B H, *et al.* DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature*, 2002, **416**(6880): 552~556
- 19 Brueckner B, Stressemann C, Kuner R, *et al.* The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res*, 2007, **67**(4): 1419~1423
- 20 Yang N, Coukos G, Zhang L. microRNA epigenetic alterations in human cancer: one step forward in diagnosis and treatment. *Int J Cancer*, 2008, **122**(5): 963~968
- 21 Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, *et al.* Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res*, 2008, **68**(11): 4123~4132
- 22 Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, *et al.* Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res*, 2007, **67**(4): 1424~1429
- 23 Iorio M V, Visone R, Di Leva G, *et al.* microRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res*, 2007, **67**(18): 8699~8707
- 24 Lu L, Katsaros D, De La Longrais I A, *et al.* Hypermethylation of let-7a-3 in epithelial ovarian cancer is associated with low insulin-like growth factor- II expression and favorable prognosis. *Cancer Res*, 2007, **67**(21): 10117~10122
- 25 Meng F, Wehbe-Janek H, wei Henson R, *et al.* Epigenetic regulation of microRNA-370 by interleukin-6 in malignant human cholangiocytes. *Oncogene*, 2008, **27**(3): 378~386
- 26 Scott G K, Mattie M D, Berger C E, *et al.* Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res*, 2006, **66**(3): 1277~1281
- 27 Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, *et al.* Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell*, 2007, **12**(5): 457~466
- 28 Calin G A, Croce C M. microRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene*, 2006, **25**(46): 6202~6210
- 29 Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, *et al.* microRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(40): 15805~15810
- 30 Liu Z, Liu S, Xie Z, *et al.* Characterization of *in vitro* and *in vivo* hypomethylating effects of decitabine in acute myeloid leukemia by a rapid, specific and sensitive LC-MS/MS method. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(5): e31
- 31 Bao N, Lye K W, Barton M K. microRNA binding sites in Arabidopsis class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Dev Cell*, 2004, **7**(5): 653~662
- 32 Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, *et al.* A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination *via* Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, **15**(3): 268~279
- 33 Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, *et al.* The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS Lett*, 2006, **580**(17): 4214~4217
- 34 Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, *et al.* Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature*, 2005, **438**(7068): 685~689
- 35 Esau C, Davis S, Murray S F, *et al.* miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by *in vivo* antisense targeting. *Cell Metab*, 2006, **3**(2): 87~98
- 36 Mack G S. Epigenetic cancer therapy makes headway. *J Natl Cancer Inst*, 2006, **98**(20): 1443~1444
- 37 Ashok S, Bhagwat A S, Roberts R J. Genetic analysis of the 5-azacytidine sensitivity of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1987, **169**(4): 1537~1546
- 38 Phan R T, Dalla Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature*, 2004, **432**(7017): 635~639
- 39 Lujambio A, Esteller M. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer. *Cell Cycle*, 2007, **6**(12):

- 1455~1459
- 40 Kumar M S, Lu J, Mercer K L, *et al.* Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet*, 2007, **39**(5): 673~677
- 41 Sinkkonen L, Hugenschmidt T, Berninger P, *et al.* microRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2008, **15**(3): 259~267

The Reciprocal Modulation Between Epigenetic and microRNA and The Application for Treatment of Malignant Tumors*

XU Yan-Min, GUO Yan-He, LIU Li, CAI Rong**, QIAN Cheng**

(College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract The recent investigations have demonstrated that epigenetic such as DNA methylation and histone modification was closely associated with cell growth and malignant tumors, and epigenetic modification was responsible for an important cause of oncogenesis. However, for the recent years some observations have been also shown that the development of tumorigenesis was attributed to transformation expression in microRNA. The latest investigations have revealed that epigenetic was involved in modulation of microRNA expression, on the contrary some kinds of microRNAs could also control epigenetic, moreover, the reciprocal modulation between microRNA and epigenetic could regulate gene expression and induce tumorigenesis. At the same time the data likewise displayed that epigenetic adjusted microRNA expression principally in a way of DNA methylation or histone modification, nevertheless microRNA regulated epigenetic by way of methyltransferases expression, DNA methylation maintenance and histone modification. With regard to the reciprocal modulation between microRNA and epigenetic, a comprehensive and systemic review of reciprocal relationship in modulation of cell growth and oncogenesis was given.

Key words miRNA, epigenetics, oncogenesis

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China(2004CB518804), Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02Z126) and Zhejiang Province Grant (2006C23006).

**Corresponding author.

CAI Rong. Tel: 86-571-86843185, E-mail: cairong801@hotmail.com

QIAN Cheng. Tel: 86-571-86843182, E-mail: cqian3184@yahoo.com.cn

Received: May 25, 2008 Accepted: September 22, 2008