·基础研究·

MicroRNA-4279 通过靶向核心启动子区域上调 Notch-1 基因表达进而抑制细胞凋亡

彭 高，黄卓琼，罗海华，刘 超，张意军*
（中山大学人类病毒学研究所//“热带病防治研究”教育部重点实验室，广东 广州 510080）

摘 要：【目的】寻找与 Notch-1 基因核心启动子结合的 microRNA（miRNA）并阐明其调控功能，研究免疫细胞肿瘤的发生发展机制。【方法】首先使用生物信息学手段筛选与 Notch-1 基因核心启动子区域结合的 miRNA，进而利用荧光素酶报告系统对其调控作用进行实验验证；通过突变核心启动子上的结合位点进一步确定该 miRNA 特异性靶向基因核心启动子区域。检测转染该 miRNA 后 H9 细胞中 Notch-1 的 mRNA 与内源蛋白表达水平。另外通过转染该 miRNA 并用 H_2O_2 诱导凋亡，研究该 miRNA 对 H9 细胞凋亡的影响。进一步在上述实验条件下，使用 siRNA 降低靶基因（Notch-1）的表达，然后检测 miRNA 对 H9 细胞系的凋亡的影响。【结果】首先通过软件预测，我们发现了 miR-4279 可以与 Notch-1 的核心启动子序列结合。荧光素酶报告实验表明 miR-4279 可以增强 Notch-1 启动子的转录活性；而在 miR-4279 的靶位点引入突变后，该增强作用消失。RT-qPCR 和 Western Blot 实验表明 miR-4279 能够显著增强内源 Notch-1 mRNA 与蛋白的表达。H_2O_2 诱导凋亡实验表明，miR-4279 可以抑制 H9 细胞的凋亡。siRNA 干扰实验表明，当 Notch-1 通路被抑制后，miR-4279 导致的细胞凋亡抑制的效果消失。【结论】miR-4279 通过靶向 Notch-1 基因核心启动子区域，特异性增加 Notch-1 基因的表达，进而增强 H9 细胞对 H_2O_2 诱导的凋亡的抗性。

关键词：miR-4279；核心启动子；Notch-1 基因；凋亡；H9 细胞系
中图分类号：R733.7 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2015)05-0641-09

MicroRNA-4279 Inhibits Cell Apoptosis through Upregulating Notch-1 Expression by Targeting the Core Promoter Region

PENG Gao, HUANG Zhuo-qiong, LUO Hai-hua, LIU Chao, ZHANG Yi-jun*
(Institute of Human Virology//Key Laboratory of Tropical Disease Control of Ministry of Education, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)
Corresponding to: ZHANG Yi-jun; E-mail: zhyijun@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】To investigate the regulation of Notch-1 expression by miRNAs through targeting the core promoter region and get insight into the role of miRNA mediated transcriptional regulation in the carcinogenesis of the lymphocytes. 【Method】First, miRNA binding sites in the core promoter region of Notch-1 gene were predicted. Then the dual-luciferase assay was conducted to determine whether the miRNA(s) could induce Notch-1 promoter activation. Furthermore, mutations were introduced to the putative binding site of the miRNA in Notch-1 promoter to confirm the target site of miRNA. Next, RT-qPCR and Western Blot assay were used to determine whether the miRNA could modulate the endogenous mRNA and protein expression of Notch-1 gene. Then we transfected miRNA into H9 cell and determined its effect on cell apoptosis under the condition of H_2O_2 treatment. By knocking down Notch-1, we further determined whether the miRNA induced anti-apoptosis is dependent of the Notch-1 pathway. 【Results】 We found that miR-4279 had a putative binding site on the core promoter region of Notch-1 gene; and miR-4279 could increase the promoter activity of Notch-1. Furthermore, mutation assay suggests that this site is the actual target of miR-4279 for promoter activation. Overexpressing miR-4279 significantly increased Notch-1 mRNA and protein expressions in H9 cells. Moreover, miR-4279 could readily inhibit H9

收稿日期：2015-01-10
基金项目：国家自然科学基金青年科学基金(81301431)，中国博士后基金(2013T60824)
作者简介：彭高，学士，研究方向：小分子 RNA 调控，E-mail：527821592@qq.com；* 通信作者：张意军，博士，讲师，研究方向：小分子 RNA 调控，E-mail：zhyijun@mail.sysu.edu.cn

cells' apoptosis induced by H_2O_2. The knock-down assay of Notch-1 showed that the miR-4279 induced anti-apoptosis effect is dependent on the Notch-1 signaling pathway.【Conclusion】MiR-4279 upregulates Notch-1 gene expression through targeting the core promoter region, which confers the anti-apoptosis ability to lymphocytes.

Key words: miR-4279; core promoter region; Notch-1; apoptosis; H9 cell line

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2015,36(5):641-649]

MicroRNA (miRNA, 微小 RNA)是真核生物中一类调控基因表达的小分子非编码 RNA, 它的长度大约为 22 nt。1993 年, 在秀丽隐杆线虫(C. elegans)幼虫发育过程的研究中,Ambros 实验室首次发现 lin-4 基因能够产生一种长约 22 nt 的小分子 RNA[1]。很长时间内都未发现类似功能的小分子 RNA,因此该现象一直未引起人们足够的重视。直至 2000 年第二个 miRNA 分子 let-7 的发现[2],该领域的研究才逐渐引起人们的重视。目前普遍认为,miRNA 是一类隶属于非编码 RNA 大家族并可在转录后水平调控基因表达的重要小分子 RNA[3]。miRNA 基因首先转录成 pri-miRNA[4],进一步通过 Drosha 蛋白剪切成 pre-miRNA。pre-miRNA 由 Exportin -5 蛋白运输出细胞核[5],在细胞质中由 Dicer 切成 18-25 个核苷酸长度的不完全配对的双链 miRNA[6]。成熟 miRNA 双链结构很快解旋,其中一条发挥功能,而另一条链一般很快降解。当 miRNA 与靶 mRNA 序列特异性结合时, 靶 mRNA 被完全降解或翻译受到抑制[7-8]。miRNA 广泛地参与了生命过程的各个方面,包括细胞凋亡[9]、发育时序调控[10]、脂肪代谢、心脏发育[11]和细胞分化[12]等等。Notch 信号通路是细胞信号传导通路的重要通路之一,其在生物进化过程中高度保守,广泛存在与各种真核生命中[13]。Notch 蛋白主要通过调节细胞分化、存活、凋亡来调控细胞、组织和器官的生长发育[14]。Notch 信号通路在肿瘤中有广泛作用,在 T 淋巴细胞系统肿瘤中,Notch-1 可以抑制细胞凋亡[15]。目前人类细胞中已经发现几千种 miRNA,其发挥功能的经典通路已经研究的比较清楚。而我们实验室发现了 miRNA 发挥功能的一种新的通路[16]。与经典的通路不同,该新的通路为 miRNA 通过靶向到特定基因的核心启动子 TATA box 上,从而增强靶基因的转录,进而影响细胞功能。作为一种新的基因表达调控方式, 其可能会帮助我们发现一些未知的由 miRNA 介导的癌症发生途径,为癌症发生发展和诊断治疗提供新的理论依据。因此,我们详细研究其对淋巴肿瘤细胞功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验室保存的 293T,H9,Jurkat ,HeLa 以及 Sup-T1 细胞系。主要试剂 :RPMI1640 培养基(Gibco,USA),RT-qRCR 试剂盒(TakaRa, Japan),H_2O_2(TakaRa,Japan),Notch-1 抗体(Abcam ab27526, USA), 荧光素酶报告系统检测试剂盒(Promega RG009, USA),凋亡检测试剂盒(凯基生物 KGA 105)。Notch-1 启动子与对应突变克隆的相关引物由上海英俊公司合成,Notch-1 miRNA mimic 与 siRNA 均购自苏州吉玛(GenePharma)公司。表 1 显示的是实验所用的引物与 siRNA 的序列。

1.2 分子克隆

1.2.1 *Notch-1 启动子的克隆* 确定 Notch-1 基因在基因组的位置, 设计针对其转录起始位点上游 500 bp 左右序列的引物,并在引物的 5'端设计 *Kpn*I(上游引物)和 *Bam*HI(下游引物)的限制性酶切位点,用 PCR 扩增目的序列,然后将得到的序列连接到 pMIR-Report 质粒载体上,测序鉴定克隆。

1.2.2 *Notch-1 核心启动子与 miR-4279 结合位点突变的克隆* 设计突变 Notch-1 结合位点序列的引物(图 1C),利用 PCR 方法在 Notch-1 启动子序列引入突变。得到的产物连接到 pMIR-Reporter 质粒载体上,测序鉴定克隆。

1.3 荧光素酶双报告检测

共转染 miRNA mimic(20 nmol/L)与克隆质粒(10 ng)的 293T 细胞培养 30 h 后,用 PBS 对样品洗两次。去上清,加 100 μL 的细胞裂解液,剧烈震荡 30 min,离心,取 20 μL 的上清进行荧光素酶活性检测。

1.4 实时定量 RT-PCR

收集需要检测的样品,提取细胞的总 RNA,使用试剂盒进行反转录, 所得的产物采用 SYBR green I 染料法进行下一步的实时荧光定量 PCR

表 1　引物与 siRNA 序列

Table 1　Primer and siRNA sequence

Name		Sequence
Notch-1 promoter	Upstream	CGGGATCCCCGGCTCAAACTTTTG
	Downstream	GGGGTACCAGCAGCGCCAGGCA
Notch-1 promoter mutation	Upstream	GGCACGGCCTGGGGACCG
	Downstream	CGGTCCCCAGGCCGTGC
Notch-1 mRNA	Upstream	AGCAAGGAGGCCAAGGACC
	Downstream	GACCCGCCCACAGTGAAA
β-actin mRNA	Upstream	CTCCATGGCCTCGCTGT
	Downstream	AGCAAGGAGGCCAAGGACC
miR-4279 miRNA	Upstream	GCCTCTCTCTCTCCTCCC
	Downstream	GTGCAGGGTCCGAGGT
	RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGAAGCC
Notch-1 siRNA sequence		UGGCGGGAAGUGUGAAGCG
Negative control (si-NC) sequence		UUCUCCGAACGUGUCACGU

实验。mRNA 及 miRNA 表达水平用 β-actin 基因作为内参进行校正。

1.5　Western blot 实验

收集转染的细胞并用细胞裂解液裂解细胞,加入上样缓冲液,100 ℃加热变性 5 min。离心取上清,经 10%SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,转至硝酸纤维素膜(NC 膜)。将 NC 膜用 5%脱脂奶粉封闭 1 h。分别加入 Notch-1 抗体以及 β-actin 抗体,置于摇床 4 ℃孵育过夜。冲洗后,加入荧光标记的二抗孵育 1 h; 洗涤, 用双色红外激光成象系统(Odyssey)进行扫描成象。

1.6　流式分析

经 H_2O_2 处理的 H9 细胞用 PBS 洗两次。然后用 Annexin-V 与 7-ADD 标记细胞 15 min,进行用流式细胞仪检测细胞凋亡的比例。

1.7　细胞转染

1.7.1　小分子 RNA 转染 H9 细胞系　转染试剂用 RNAimax。将小 RNA 和 RNAimax 试剂分别与 opti-MEM 混合, 然后将两者混匀, 室温放置 20 min,加入到 H9 细胞培养液中。

1.7.2　转染 293t 细胞　待细胞生长旺盛处于对数生长期时将细胞接种到 48 孔板, 接种后 12 h,加入转染混合物。每个孔使用转染试剂 0.3 μL,启动子报告质粒 (FL)10 ng 及海肾荧光素酶对照质粒 (RL)2 ng 和 20 nmol/L (终浓度) 的 miRNA mimics。转染试剂为 Lipofectamine 2000,根据试剂使用说明进行操作。

1.8　统计学分析

采用 SPSS13.0 分析软件进行统计学分析。计量资料所有结果均用均数 ± 标准差表示。两组数据时实验组与对照组比较采用 t 检验, 多组数据时采用 F 检验,$P < 0.01$ 视为有统计学差异。

1.9　生物信息学分析

对基因的核心启动子区域结合的 miRNA 进行软件预测,我们使用的软件是 RNA-hybrid。首先进入 BiBiServ 的网站 (http://www.BiBiServ.techfak.uni-bielefeld.de/), 点击 RNA Studio 目录下的 RNA-hybrid 选项中的 Submission 选项,将人类(小鼠)所有的成熟 miRNA 序列和预测基因的核心启动子序列分别提交到网站上,并将 MFE 值设置为小于-25.0 kcal/mol,获得预测结果。

2　结　果

2.1　靶向 Notch-1 基因核心启动子序列的 miRNA 的预测与实验验证

首先使用 RNA-hybrid 软件预测 Notch-1 核心启动子区域结合的 miRNA,我们发现 miR-4279 有较好的结合位点。图 1A 显示了软件预测的 miR-4279 与 Notch-1 核心启动子序列的结合情况。为了进一步确认生物信息学预测的结果,我们将 Notch-1 基因启动子克隆到 pMIR-report 报告系统上, 同时转染 miR-4279 mimic 与 Notch-1 基因启动子荧光素酶报告质粒到 293T 细胞中,30 h 后检测发现转染了 miR-4279 的样品相对于阴性对照(NC)或随机对照(miR-346),Notch-1 基因启

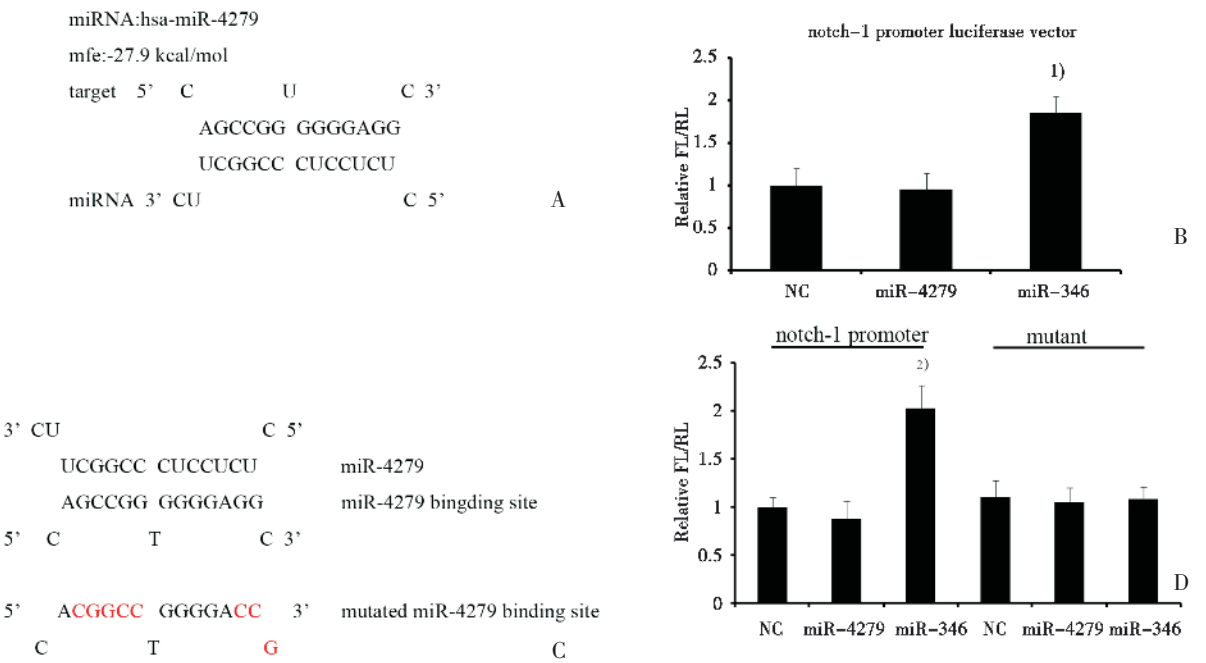
动子的活性显著增加(图 1B)。该结果表明 miR-4279 可以增强 Notch-1 启动子的转录活性。为了验证 miR-4279 是否通过结合到我们预测的 Notch-1 核心启动子区域上的靶位点发挥功能,我们突变了 Notch-1 该区域上 miR-4279 的结合位点(图 1C)。将正常 Notch-1 启动子报告质粒与该突变的报告质粒分别与 miR-4279 共转染到 293T 细胞中,结果显示 miR-4279 可以显著增强正常 Notch-1 启动子活性,而不影响突变的 Notch-1 启动子活性(图 1D)。综合上述实验结果可以得到以下结论,miR-4279 通过与 Notch-1 核心启动子区域上的靶位点作用进而增强 Notch-1 启动子的转录活性。

2.2 miR-4279 增强内源性 Notch-1 的表达

为了进一步研究 miR-4279 对内源 Notch-1 基因转录与表达的影响,我们用 RT-qPCR 对 Hela、293T、Jurkat、H9、Sup-T1 五种细胞系中的 Notch-1 mRNA(图 2A)与 miR-4279(图 2B)的表达情况进行了检测。发现 293T、H9、Jurkat、Hela 和 Sup-T1 五种细胞系中,Notch-1 mRNA 与 miR-4279 的表达依次增加。这些结果表明,Notch-1 mRNA 的表达水平与 miR-4279 的表达水平在这五种细胞中有较高的一致性;暗示细胞内 miR-4279 很可能正调控 Notch-1 mRNA 的表达。我们选择 H9 细胞系进行后续实验。为了验证转染效果,我们向 H9 细胞中转染浓度为 100 nmol/L 的 miR-4279 与对照 miRNA mimic,培养 48 h 后提取 H9 细胞的总的 RNA,并用 RT-qPCR 检测 miR-4279 的表达情况(图 2C)。发现转染了 miR-4279 的 H9 细胞,miR-4279 表达显著增加,这表明我们有效地对 H9 细胞进行了转染。在转染 miR-4279 后检测 Notch-1 mRNA(图 2D)与蛋白(图 2E)的表达情况,发现 miR-4279 显著增强 H9 细胞中 Notch-1 mRNA 与蛋白的表达。上述实验表明,miR-4279 可以增强内源性 Notch-1 mRNA 与蛋白的表达。

2.3 MiR-4279 抑制 H9 细胞的凋亡

已有文献报道 Notch-1 可以保护细胞拮抗



A: The schematic diagram of the binding between miR-4279 and the core promoter region of Notch-1 gene; B: The dual-luciferase assay of Notch-1 promoter activity after co-transfected with Notch-1 promoter clone gene and miR-4279 or control mimics into the 293T cells for 30 h; C: The schematic diagram of the mutations in the miR-4279 binding site; D: The dual-luciferase activity assay after co-transfected the mimic NC、miR-346 or miR-4279 with the Notch-1 promoter vector or the Notch-1 binding site mutated vector in 293T cells. The final concentration of the transfected miRNA mimic is 20 nmol/L, the vector is 10 ng, Renila luciferase was used as transfection control. 1)P = 0.0095; 2)P = 0.008 compared with NC group; $\nu1=\nu2=3$.

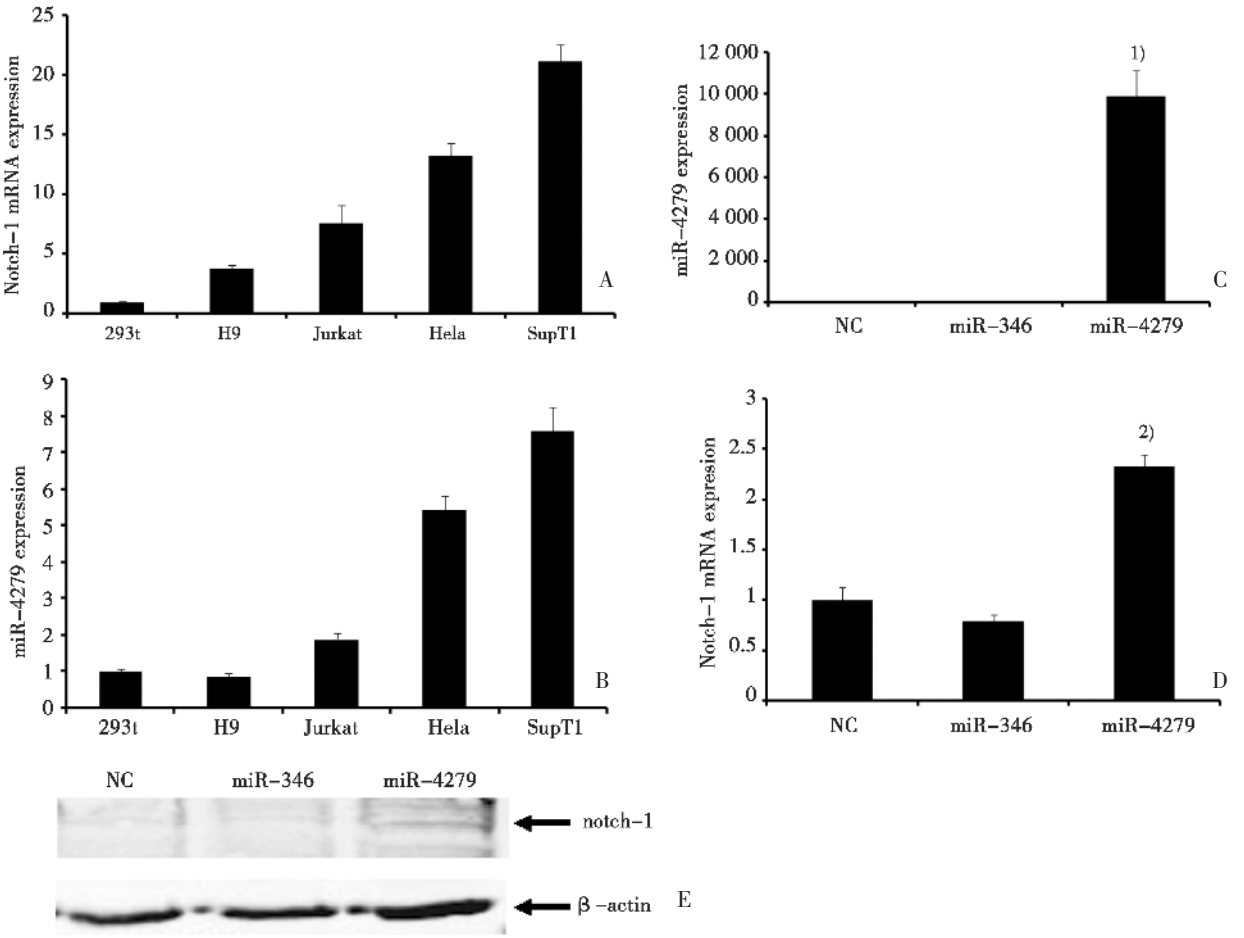
图 1 与 Notch-1 基因核心启动子结合的 miRNA 筛选与验证

Fig.1 Prediction and validation of the binding of miRNA to the core promoter region of Notch-1 gene

TCR诱导引起的细胞凋亡[15,17]。为了探寻 miR-4279 增强 Notch-1 表达的生理意义，我们检测了在 H_2O_2 诱导条件下,miR-4279 对细胞凋亡的影响。我们向 H9 细胞中转染浓度为 100 nmol/L 的 NC、miR-4279 或 miR-346 mimic，培养 24 h 后加入 H_2O_2(0.025 mL/L)处理,继续培养 24 h 用流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。所得的结果见图 3A。重复 3 次实验,进行统计学分析得到图 3B 和 3C。Annxin-V-7-ADD-、Annxin-V+7-ADD-、Annxin-V+7-ADD+和 Annxin-V-7-ADD+分别代表存活的细胞、早期凋亡的细胞、中晚期凋亡的细胞、以及死亡细胞或细胞碎片。图 3A、3B、3C 的结果显示过表达 miR-4279 的 H9 细胞中早期和中晚期凋亡的细胞比例均有显著下降。说明 miR-4279 能够抑制低浓度 H_2O_2（0.025 mL/L）长时间(24 h)作用诱发的 H9 细胞早期及中晚期凋亡。此外,当提高 H_2O_2 浓度至 0.25 mL/L,处理时间降至 3 h 后,miR-4279 仍可以抑制 H9 细胞的中晚期凋亡,并且促进 H9 细胞的存活(图 3D、E、F)。上述结果表明,miR-4279 可以抑制 H_2O_2 诱导的 H9 细胞凋亡,增加其存活率。

2.4　miR-4279 通过 Notch-1 信号通路影响 H9 细胞系对凋亡的抗性

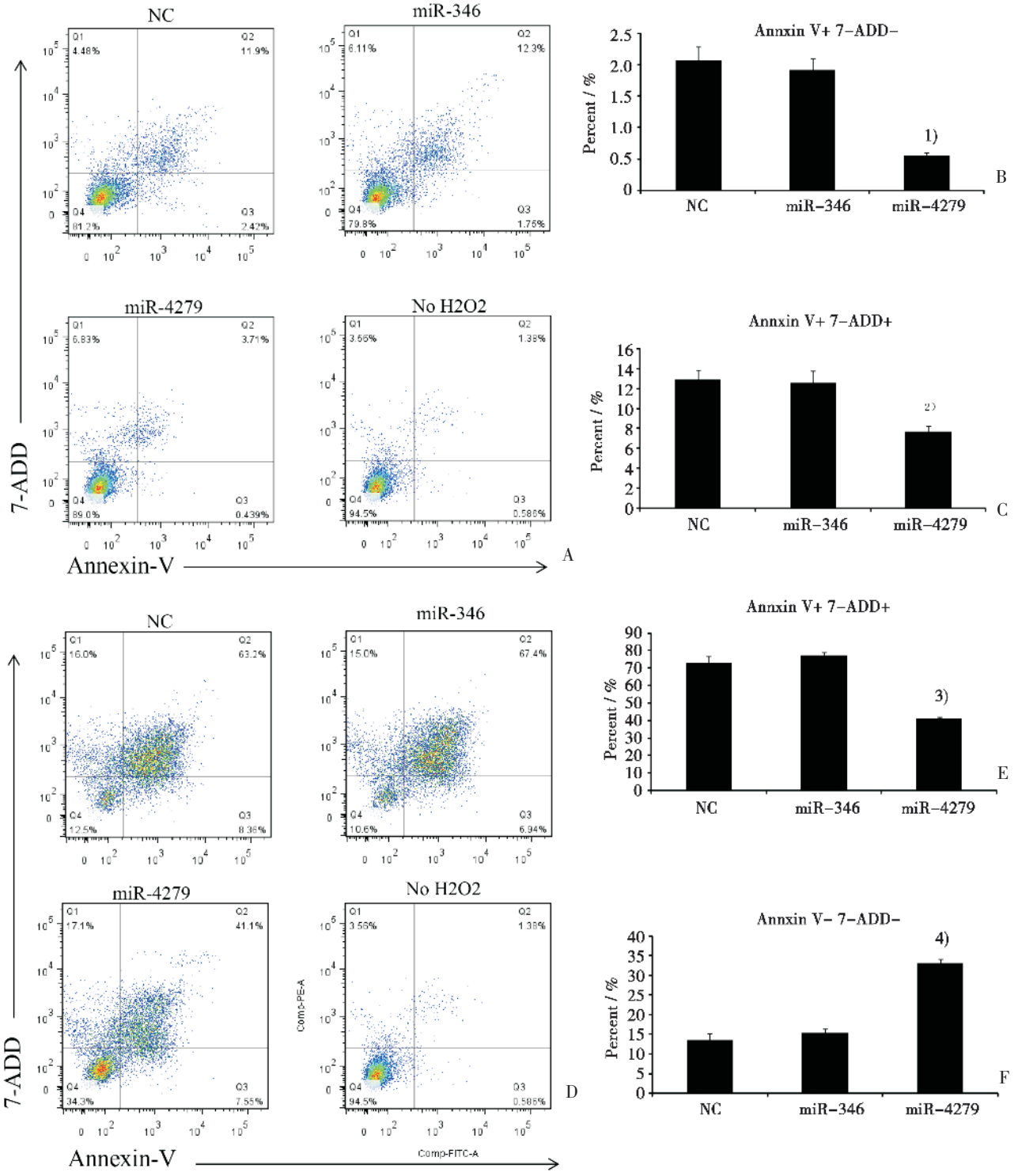
为了检测 miR-4279 是否通过 Notch-1 信号通路来抑制细胞凋亡，我们使用 siRNA 下调了内源 Notch-1 基因的表达[17],并检测 miR-4279 在该情况下对细胞凋亡的影响。向 H9 细胞中分别转染浓度为 100 nmol/L 的 Notch-1 siRNA（si-Notch-



A and B: The Notch-1 mRNA and the miR-4279 expression in the 293T, H9, Jurkat, Hela, Sup-T1 cells. C, D, E: The miR-4279, the Notch-1 mRNA or protein expression in the H9 cell after transfected miRNA mimic NC, miR-346 or miR-4279 respectively. A and B use normal H9 cell, C, D, and E use H9 Cell which culture 48h after transfected 100 nmol/L miR-4279 or control mimic. 1) $P = 1.93E^{-05}$; 2) $P = 0.0042$ compared with NC group; $\nu_1 = \nu_2 = 3$.

图 2　过表达 miR-4279 抬高内源性 Notch-1 的表达

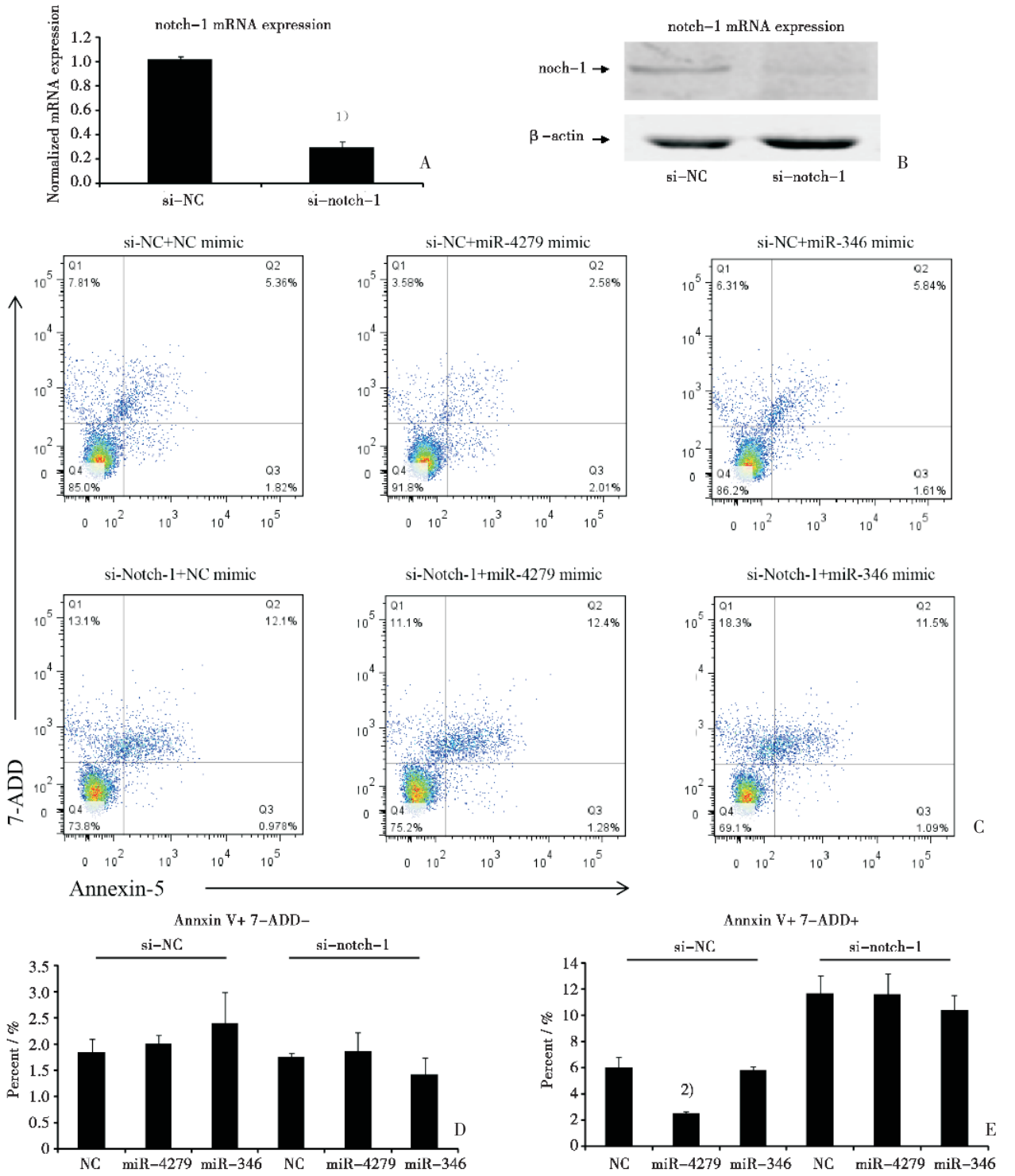
Fig.2　Overexpression of miR-4279 increases Notch-1 gene expression



A: The apoptosis assay of H9 cells transfected with the indicated miRNA mimic followed by the treatment of low concentration of H_2O_2(0.025 mL/L) for 24 h. B, C: The statistical result of the early and middle-advanced stage apoptosis level of H9 cells as indicated in A. D: The apoptosis level of H9 cells transfected with the indicated miRNA mimic followed by the treatment with high concentration of H_2O_2(0.25 mL/L) for 3 h. E, F, and G: The statistical result of the early and middle-advanced stage apoptosis level and live cell level of H9 cells as indicated in D. 1) $P = 0.0012$; 2) $P = 0.0004$; 3) $P = 0.0014$; 4) $P = 0.0019$ compared with NC group; $\nu_1 = \nu_2 = 3$.

图 3 miR-4279 在 H9 细胞中功能

Fig.3 The function of miR-4279 in H9 cell



A and B: The Notch-1 mRNA and protein expression level in the H9 cells transfected with si-NC or si-Notch-1. C: The apoptosis level of H9 cell after transfected si-NC or si-Notch-1 with one of miRNA mimics NC, miR-4279 or miR-346 respectively. D: The statistical result of the middle-advanced stage apoptosis level of H9 cells as indicated in C. The concentration of the transfected siRNA is 100 nmol/L, while the concentration of the transfected miRNA mimic is 100 nmol/L. The concentration of H_2O_2 is 0.25 mL/L. The expriment repeat three times. 1) $P < 0.01$ compared with control group; N = 3. 2) $P = 0.0031$ compared with NC group; $\nu_1 = \nu_2 = 3$.

图 4　miR-4279 通过 Notch-1 通路影响 H9 细胞系对凋亡的抗性

Fig.4　miR-4279 induces apoptosis resistance to H_2O_2 treatment is dependent on the Notch-1 pathway

1)和阴性对照(si-NC),培养 48 h 后,使用 RT-qPCR 和 western blot 检测 H9 细胞中 Notch-1 mRNA(图 4A)以及蛋白(图 4B)的表达水平。发现转染了 si-Notch-1 的样品相对于阴性对照,Notch-1 mRNA 与蛋白的表达量显著性降低,表明该 siRNA 的对 Notch-1 基因表达的抑制效果很好。进一步,我们将 si-NC、si-Notch-1 与 NC mimic、miR-4279 mimic、miR-346 mimic 分别组合后,共转染到 H9 细胞中。我们将以上六种转染组合以 si-NC、si-Notch-1 为对象分为两组。转染 24 h 后在 0.25 mL/L 浓度的 H_2O_2 存在下继续培养细胞 3 h,检测 H9 细胞的凋亡比例。图 4C 及 4D 显示,对于 si-NC 组,过表达 miR-4279 可以显著性的抑制 H9 细胞的中晚期凋亡,而对于 si-Notch-1 组,过表达 miR-4279 不能改变 H9 细胞的中晚期凋亡比例。这表明沉默 Notch-1 基因的表达确实显著影响 miR-4279 抑制 H9 细胞凋亡的作用。上述结果表明 miR-4279 通过 Notch-1 通路来抑制 H9 细胞的凋亡。

3 讨 论

本实验室前期工作发现细胞及病毒的 miRNA 可以结合到基因核心启动子 TATA box 区域并促进靶基因的表达。在此基础上,本研究发现了一条新的 miRNA 调控基因表达的通路,即 miR-4279 通过结合到 Notch-1 基因核心启动子上促进 Notch-1 基因的表达,进而抑制 H9 细胞的凋亡。Notch 信号通路在淋巴细胞癌中会激活下游的癌基因转录来抑制细胞凋亡,从而被认为是一种原癌基因。对 Notch-1 基因的调控研究可以为了解淋巴细胞肿瘤的发生发展提供新的依据。H9 细胞系是一种永生化的 $CD4^+$ T 淋巴细胞系,是一种在免疫系统肿瘤研究中广泛应用的细胞模型,因而研究 miR-4279 在 H9 细胞中的功能可以帮助我们更好地了解淋巴细胞肿瘤的发生过程。本研究表明 miR-4279 可能是淋巴细胞肿瘤中一个新的癌基因,并可作为肿瘤治疗的一个新靶点。此外,miR-4279 的表达可能作为淋巴细胞肿瘤鉴别的一个新的分子标记。

本文的研究表明,细胞内的一部分 miRNA 能够作用于基因核心启动子区域,这是一种新的基因表达调控方式。与传统 miRNA 调控作用不同的是,这种新的调控通路是通过 RNA 与 DNA 的相互结合,而非 RNA/RNA 相互作用。并且,这一基因调控是在细胞核中进行的。此外,在本研究发现的调控通路中 miRNA 正调控靶标基因的表达,而在经典的通路中 miRNA 是负调控靶标基因的表达[7]。

有大量的报道表明 miRNA 是肿瘤发生过程中的重要因子,主要是通过经典的 miRNA 调控机制来作用的。miRNA 与肿瘤细胞增殖关系的研究始于 2005 年,Cheng 等[18]使用反义 miRNA 库在HeLa 和 A549 细胞系中筛选与细胞增殖功能相关的 miRNA,发现两种细胞系中均有一些 miRNA 与细胞增殖相关。在 miRNA 与细胞增殖相关的研究中,研究最多的是 let-7 家族的 miRNA。在多种癌症中,let-7 家族成员表达水平均发生了下调,将其表达水平恢复到正常后会抑制肿瘤的发生。Takamizawa 等[19]发现在非小细胞肺癌细胞系 A549 中,过表达 let-7,发现其增殖受到抑制。Johnson 等[20]发现 let-7 家族能抑制 Ras 癌基因的表达。Mayr 等[21]发现 let-7 家族能调控 Hmga2 基因。Hmga2 基因是一种研究较多的癌基因。

miRNA 与肿瘤细胞的凋亡也有密切关系,Chan 等[22]通过 miRNA 芯片发现 miR-21 在人类恶性胶质瘤细胞中高表达,进一步利用 miR-21 的反义序列抑制其表达能够激活 Caspase3 和 Caspase7 进而引起细胞的凋亡。此外,Zhu 等[23]研究进一步发现,miR-21 的作用靶点是 TPM1(tumor suppressor tropomyosin 1)。miR-15 和 miR-16 也与肿瘤细胞的凋亡相关,Calin 等[24]发现 68% 的 B 细胞慢性淋巴性白血病(B-CLL)细胞中的 miR-15 和 miR-16 表达下调,此外 Climmino 等发现 miR-15 和 miR-16 的表达水平与 B-CLL 细胞中的凋亡相关基因 Bcl-2 的表达呈负相关,Bcl-2 基因 mRNA3′UTR 中存在 miR-15 和 miR-16 的结合位点,过表达这两个 miRNA 可以抑制 Bcl-2 蛋白的表达同时也会诱导 MEG-01 细胞系的凋亡[24-25]。

在这些研究中,我们可以发现,miRNA 通常是通过抑制靶标基因的表达来调控肿瘤细胞。而新的 miRNA 调控可以进一步完善 miRNA 与肿瘤的相关关系。在新的 miRNA 通路中,miRNA 与靶基因对癌症进程的影响是一致的。因此,我们可以找出肿瘤发生中的关键基因,然后用软件预测与其核心启动子结合的 miRNA,并且用生物学实验验

证这些 miRNA 是否依照本文报道的新的作用方式调控肿瘤发生过程。此外,这些激活 miRNA 还可作为调控基因表达的工具来特异性激活目的基因的表达。

参考文献

[1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 [J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.

[2] Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA [J]. Nature, 2000, 408(6808): 86-89.

[3] Yue J. miRNA and vascular cell movement [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011, 63(8): 616-622.

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

[5] Kim VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export [J]. Trends Cell Biol, 2004, 14(4): 156-159.

[6] Jiang F, Ye X, Liu X, et al. Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in Drosophila [J]. Genes Dev, 2005, 19(14): 1674-1679.

[7] Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, et al. Prediction of plant microRNA targets [J]. Cell, 2002, 110(4): 513-520.

[8] Smalheiser NR, Torvik VI. Complications in mammalian microRNA target prediction [J]. Methods Mol Biol, 2006, 342(9): 115-127.

[9] Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, et al. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila [J]. Cell, 2003, 113(1): 25-36.

[10] Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs [J]. Science, 2006, 312(5770): 75-79.

[11] Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2 [J]. Cell, 2007, 129(2): 303-317.

[12] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis [J]. Nature, 2005, 436(7048): 214-220.

[13] Lefranc F, Sadeghi N, Camby I, et al. Present and potential future issues in glioblastoma treatment [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2006, 6(5): 719-732.

[14] Wan Z, Li Y, Banerjee S, et al. Exploitation of the Notch signaling pathway as a novel target for cancer therapy [J]. Anticancer Res, 2008, 28(6A): 3621-3630.

[15] Cuevas IC, Slocum AL, Jun P, et al. Meningioma transcript profiles reveal deregulated Notch signaling pathway [J]. Cancer Res, 2005, 65(12): 5070-5075.

[16] Zhang Y, Fan M, Geng G, et al. A novel HIV-1-encoded microRNA enhances its viral replication by targeting the TATA box region [J]. Retrovirology, 2014, 11(1): 23-27.

[17] Purow BW, Haque RM, Noel MW, et al. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation [J]. Cancer Res, 2005, 65(6): 2353-2363.

[18] Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(4): 1290-1297.

[19] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival [J]. Cancer Res, 2004, 64(11): 3753-3756.

[20] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family [J]. Cell, 2005, 120(5): 635-647.

[21] Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation [J]. Science, 2007, 315(5818): 1576-1579.

[22] Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells [J]. Cancer Res, 2005, 65(14): 6029-6033.

[23] Zhu S, Si ML, Wu H, et al. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1) [J]. J Biol Chem, 2007, 282(19): 14328-1436.

[24] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, 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 USA, 2002, 99(24): 15524-15529.

[25] Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(32): 11755-11760.

(编辑　王晓鹰)