

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00423

## miR-34 家族——肿瘤抑制蛋白 p53 高度相关的 microRNA

娄文加, 陈青, 刘立, 钱程

浙江理工大学生命科学学院, 新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018

**摘要:** 若干微小 RNA(microRNA, miRNA)与肿瘤抑制蛋白 p53 高度相关, 其中 miR-34 家族最具代表性。一方面 p53 可通过对 miR-34 家族的调控实现对多个原癌基因如 *Bcl-2*、*c-myc* 以及细胞因子如 cyclinE2、cyclinD1 和 c-Met 的抑制, 进而发挥抑癌作用; 另一方面 miR-34 家族也可以通过抑制沉默信息调节子 SIRT1 来进一步增强 p53 的活性。p53 与 miR-34 家族之间形成的正反馈调节网络对抑制肿瘤的发生发展及恶化均起着重要的作用。文章对 p53 高度相关的 miR-34 家族在肿瘤发生发展及治疗的最新进展作一论述。

**关键词:** miR-34 家族; p53; 反馈调节

## miR-34s—a tumor suppression protein p53 highly related microRNA

LOU Wen-Jia, CHEN Qing, LIU Li, QIAN Cheng

Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

**Abstract:** Several microRNAs, most representatively the miR-34, are highly related to tumor suppression protein p53. p53 exerts its tumor suppression function known as inhibiting multiple-oncogenes, such as *Bcl-2*, *c-myc* and cell cytokines such as cyclinE2, cyclinD1 and c-Met through the regulation of miR-34. On the other hand, miR-34 enhances the activities of p53 by inhibiting silence information regulator I (SIRT1). The positive feedback regulatory network based on p53 and miR-34 families play an important role in suppression of oncogenesis and deterioration. This paper summarizes the latest advances of p53 highly related miR-34 families in oncogenesis and treatment.

**Keywords:** miR-34s; p53; feedback regulation

miRNA 是一种包含 21~25 个核苷酸的内源性非编码小 RNA, 具有很强的组织特异性。自 Lee 等<sup>[1]</sup>在线虫中发现了第一个 miRNA—Lin-4 之后, 已陆续在动植物体内发现了多种 miRNA。迄今为止, miRNA 基因序列数据库 miRBase(<http://microrna.sanger.ac.uk/>)已收录了 10 883 种 miRNA。尽管 miRNA 的具体功能还不是很明确, 但目前普遍认为其与靶基因 mRNA 结合, 在转录后水平调控基因表达。

miRNA 具有独特的形成方式: 首先在核内通过 RNA 聚合酶 II 转录生成前体 miRNA, 接着在 DGCR8 的辅助下由 RNA 内切酶 Drosha 剪切形成 60~70 个核苷酸大小的具有茎环结构的 pre-miRNA。绝大多数 pre-miRNA 在 Exportin-5 和 Ran GTPase 共同作用下从细胞核运送到细胞质, 并在细胞质中被另一种核酸内切酶 Dicer 切割, 形成成熟体 miRNA。最终成熟的 miRNA 同 Ago2 结合, 进

收稿日期: 2009-09-24; 修回日期: 2009-11-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30872984)和浙江省重中之重学科开放基金项目(编号: SWYX0816)资助

作者简介: 娄文加(1983-), 男, 在读硕士研究生, 专业方向: 肿瘤基因治疗。Tel: 0571-86843555; E-mail: wj83418@163.com

通讯作者: 刘立(1969-), 女, 助理研究员, 研究方向: 肿瘤基因治疗。Tel: 0571-86843555; E-mail: liuli7001@yahoo.com.cn;

钱程(1963-), 男, 研究员, 研究方向: 肿瘤基因治疗。Tel: 0571-86843182; E-mail: cqian3184@yahoo.com.cn

入 RNA 诱导沉默复合体(RNA induced silence complex, RISC)调节或沉默靶 mRNA。在正常细胞中, miRNA 通过靶向不同的目的 mRNA, 在不同程度上调节蛋白表达水平, 进而在生物的生长发育中起重要作用<sup>[2]</sup>。

最新研究发现 miR-34 家族(简称 miR-34s)在被称作“基因组守护者”的 p53 的调控通路中发挥着不可忽视的作用<sup>[3~11]</sup>。多项研究发现, miR-34s 的转录受 p53 蛋白调节, 并参与 p53 作用通路<sup>[4~11]</sup>; 此外, miR-34s 还通过对 SIRT1 和 E2F3 的抑制进而对 p53 活性产生正反馈调节作用<sup>[3, 12, 13]</sup>。鉴于 miR-34s 与肿瘤抑制蛋白 p53 之间存在的正反馈调节关系, 本文就近年来 miR-34s 的生物学特点、功能及其与肿瘤发生发展之间的关系作一详细阐述, 其目的是全面介绍 miR-34s 在肿瘤中的作用以及与 p53 之间存在的反馈调节关系, 以期为恶性肿瘤治疗提供新的思路。

## 1 miR-34 家族的生物学特征

miR-34 家族是进化中一类高度保守的 miRNA 家族, 广泛存在于节肢动物、线虫纲动物及哺乳动物中。在无脊椎动物中仅有一个 miR-34 成员, 而在几乎所有的脊椎动物中却均存在 miR-34s 所包含的 3 个成员: miR-34a、miR-34b 以及 miR-34c。目前发现的 miR-34s 基因 80% 位于基因间隔区, 少数位于蛋白编码基因的内含子区和 3'UTR 上<sup>[14]</sup>。不同动物物种中 miR-34s 基因的同源性很高, 其中成熟序列的同源性为 68%(表 1), 前体序列的同源性为 38.89 %<sup>[11]</sup>。已发现的人、黑猩猩、狗、牛、小鼠、大鼠、斑马鱼和原鸡 8 个物种中, miR-34b 基因和 miR-34c 基因均紧密相连, 存在于同一条染色体上。人类 miR-34s 序列最初即是利用 miR-34s 序列同源性, 通过计算比对的方式预测出的, 后来在实验中得以证实。在人体内共有两个基因编码 miR-34 基因家族, 其中 miR-34a 基因位于 1p36, 单独转录表达, 而 miR-34b 和 miR-34c 则是作为一个基因簇共同转录表达<sup>[14, 15]</sup>。或许是由于 miR-34a 是由无脊椎动物 miR-34 突变后直接进化而来, 在大多数人体组织中 miR-34a 表达量大于 miR-34b/c, 只有在肺中 miR-34b 和 miR-34c 的表达量才远远大于 miR-34a<sup>[10, 15]</sup>。

## 2 miR-34 家族生物学功能及分子机制

### 2.1 miR-34 家族的生物学功能

作为一类高度保守的 miRNA, miR-34s 在细胞中发挥重要作用。在正常动物细胞中, miR-34s 的主要功能有: (1)细胞周期阻滞。Tarasov 等<sup>[16]</sup>将 miR-34a 全长转录体导入骨肉瘤细胞 U-2OS 48 小时后, 发现导入细胞组相对对照组停滞在 G<sub>1</sub> 期的细胞数目增加, 同时伴随 S 期细胞的减少, 说明 miR-34a 可使细胞周期阻滞在 G<sub>1</sub> 期。(2)促进细胞衰老。研究发现, 将 miR-34a 及 miR-34b/c 导入人类成纤维细胞中将导致细胞老化<sup>[9, 17]</sup>。Tazawa 等<sup>[13]</sup>将 miR-34a 转染入 HCT116 细胞、RKO 细胞和 p53 突变的 SW480 细胞后, 发现细胞体积增大且衰老, 相关半乳糖苷酶 (Senescence-associated-galactosidase, SA-gal) 呈阳性, 表明 miR-34a 可以诱发细胞衰老。(3)诱导细胞凋亡。miR-34s 在癌细胞中重新激活可促使 caspase3 和 PARP 的裂解, 诱发 caspase 调控的凋亡途径<sup>[4, 6, 12, 18]</sup>。(4)阻止细胞迁移。在黑色素瘤和肝癌组织中, miR-34 的再活化能够抑制 c-Met 蛋白, 阻止肿瘤细胞的迁移和浸润<sup>[19]</sup>。

### 2.2 miR-34s 直接受 p53 调节

多项研究表明: miR-34s 直接受 p53 的调节。Raver-Shapira 等<sup>[6]</sup>通过对比 p53 激活的肺癌细胞与非 p53 激活肺癌细胞中的 688 个 miRNA, 发现前者 miR-34s 的表达量较后者显著增高。在另一项研究中, Tarasov 等<sup>[16]</sup>通过 p53 基因受损组织的 miRNA 基因图谱分析时发现 miR-34s 的表达量明显下降。此外, Tarasov 等人还发现, 在 miR-34s 的 3 个成员中, miR-34a 同 p53 的活力联系最为紧密。在直肠癌的研究中, Tazawa 等<sup>[11]</sup>发现, p53 野生型肿瘤细胞经阿霉素(adriamycin)处理后, miR-34a 和 p53 调控网络下游蛋白 p21 含量均有显著下调; 而 p53 突变或缺失肿瘤细胞经阿霉素处理后, miR-34a 和 p21 含量无明显变化。上述研究均表明 miR-34s 与 p53 关系密切并呈现出正相关, 为 miR-34s 受到 p53 调节提供了直接依据。

在此基础上, He 等<sup>[9]</sup>对 miR-34s 直接受到 p53 调节的具体机制做了进一步的探索。他们通过结合表达序列框数据库、帽式分析基因表达(Cap-analysis

表 1 各物种 miR-34 序列比较(信息来源: <http://microrna.sanger.ac.uk/>)

名称	编号	序列	物种
hsa-miR-34a	MIMAT0000255	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	人( <i>Homo sapiens</i> )
Has-miR-34b	MIMAT0004676	CAAUCACUAAACUCCACUGCCA	人( <i>Homo sapiens</i> )
Has-miR-34c-5p	MIMAT0000686	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	人( <i>Homo sapiens</i> )
Mmu-miR-34a	MIMAT0000542	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	小鼠( <i>Mus musculus</i> )
Mmu-miR-34b	MIMAT0000382	AGGCAGUGUAAUUAGCUGAUUGU	小鼠( <i>Mus musculus</i> )
Mmu-miR-34c	MIMAT0000381	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	小鼠( <i>Mus musculus</i> )
Bta-miR-34a	MIMAT0004340	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	牛( <i>Bos Taurus</i> )
Bta-miR-34b	MIMAT0003549	AGGCAGUGUAAUUAGCUGAUUG	牛( <i>Bos Taurus</i> )
Bta-miR-34c	MIMAT0003854	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUG	牛( <i>Bos Taurus</i> )
Cfa-miR-34a	MIMAT0006690	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	狗( <i>Canis familiaris</i> )
Cfa-miR-34c	MIMAT0006693	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	狗( <i>Canis familiaris</i> )
Dre-miR-34	MIMAT0001269	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	斑马鱼( <i>Danio rerio</i> )
Dre-miR-34b	MIMAT0003346	UAGGCAGUGUUGUUAGCUGAUUG	斑马鱼( <i>Danio rerio</i> )
Dre-miR-34c	MIMAT0003759	AGGCAGUGCAGUUAGUUGAUUAC	斑马鱼( <i>Danio rerio</i> )
Gga-miR-34a	MIMAT0001173	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUU	原鸡( <i>Gallus gallus</i> )
Gga-miR-34b	MIMAT0001179	CAGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUG	原鸡( <i>Gallus gallus</i> )
Gga-miR-34c	MIMAT0001180	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	原鸡( <i>Gallus gallus</i> )
ggo-miR-34a	MIMAT0002494	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	大猩猩( <i>Gorilla gorilla</i> )
Lla-miR-34a	MIMAT0002501	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	兔猴( <i>Lagothrix lagotricha</i> )
Mdo-miR-34a	MIMAT0004096	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUU	南美负鼠( <i>Monodelphis domestica</i> )
mml-miR-34a	MIMAT0002499	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	猕猴( <i>Macaca mulatta</i> )
mml-miR-34b	MIMAT0006174	CAAUCACUAAACUCCACUGCCA	猕猴( <i>Macaca mulatta</i> )
mml-miR-34c	MIMAT0006175	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	猕猴( <i>Macaca mulatta</i> )
Mne-miR-34a	MIMAT0002502	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	豚尾猴( <i>Macaca nemestrina</i> )
Ppa-miR-34a	MIMAT0002496	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	矮黑猩猩( <i>Pan paniscus</i> )
Ppy-miR-34a	MIMAT0002497	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	猩猩( <i>Pongo pygmaeus</i> )
Ptr-miR-34a	MIMAT0002498	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	黑猩猩( <i>Pan troglodytes</i> )
Ptr-miR-34b	MIMAT0008113	CAAUCACUAAACUCCACUGCCA	黑猩猩( <i>Pan troglodytes</i> )
Ptr-miR-34c	MIMAT0008114	AAUCACUAAACCACACGCCAGG	黑猩猩( <i>Pan troglodytes</i> )
Rno-miR-34a	MIMAT0000815	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	大鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )
Rno-miR-34b	MIMAT0000813	UAGGCAGUGUAAUUAGCUGAUUG	大鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )
Rno-miR-34c	MIMAT0000814	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	大鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )
Sla-miR-34a	MIMAT0002500	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	红腹狨( <i>Saguinus labiatus</i> )
Ssc-miR-34a	MIMAT0007757	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	家猪( <i>Sus scrofa</i> )
Xtr-miR-34a	MIMAT0003578	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUU	非洲爪蟾( <i>Xenopus tropicalis</i> )
Xtr-miR-34b	MIMAT0003579	CAGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUG	非洲爪蟾( <i>Xenopus tropicalis</i> )
Cel-miR-34	MIMAT0000005	AGGCAGUGUGUUAGCUGGUUG	线虫( <i>C. aenorhabditis elegans</i> )
Dme-miR-34	MIMAT0000350	UGGCAGUGUGUUAGCUGGUUGUG	果蝇( <i>Drosophila melanogaster</i> )
Cbr-miR-34	MIMAT0000466	AGGCAGUGUGUUAGCUGGUUG	线虫( <i>Caenorhabditis briggsae</i> )
Dps-miR-34	MIMAT0001223	UGGCAGUGUGUUAGCUGGUUG	果蝇( <i>Drosophila pseudoobscura</i> )
Bmo-miR-34	MIMAT0004197	UGGCAGUGUGUUAGCUGGUUG	家蚕( <i>Bombyx mori</i> )
Ame-miR-34	MIMAT0004430	UGGCAGUGUUGUUAGCUGGUUG	蜜蜂( <i>Apis mellifera</i> )
Aga-miR-34	MIMAT0005526	UGGCAGUGUGUUAGCUGGU	冈比亚按蚊( <i>Anopheles gambiae</i> )
Oan-miR-34	MIMAT0007108	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	鸭嘴兽( <i>Ornithorhynchus anatinus</i> )
Cin-miR-34	MIMAT0006094	AGGCAGUGUAGUUAGCUAGUUG	海鞘( <i>Ciona intestinalis</i> )
Csa-miR-34	MIMAT0006122	AGGCAGUGUAGUUAGCUAGUUG	海鞘( <i>Ciona savignyi</i> )
Tca-miR-34	MIMAT0008364	UGGCAGUGUGUUAGCUGGUU	赤拟谷盗( <i>Tribolium castaneum</i> )
Dan-miR-34	MIMAT0008439	UGGCAGUGUGUUAGCUGGUUG	嗜凤梨果蝇( <i>Drosophila ananassae</i> )
Der-miR-34	MIMAT0008508	UGGCAGUGUGUUAGCUGGUUG	果蝇( <i>Drosophila erecta</i> )
Dgr-miR-34	MIMAT0008619	UGGCAGUGUGUUAGCUGGUUG	果蝇( <i>Drosophila grimshawi</i> )
Dmo-miR-34	MIMAT0008656	UGGCAGUGUGUUAGCUGGUUG	果蝇( <i>Drosophila mojavensis</i> )
Dpe-miR-34	MIMAT0008715	UGGCAGUGUGUUAGCUGGUUG	果蝇( <i>Drosophila persimilis</i> )
Dse-miR-34	MIMAT0008787	UGGCAGUGUGUUAGCUGGUUG	果蝇( <i>Drosophila sechellia</i> )
Dsi-miR-34	MIMAT0008840	UGGCAGUGUGUUAGCUGGUUG	拟果蝇( <i>Drosophila simulans</i> )
dvi-miR-34	MIMAT0008955	UGGCAGUGUGUUAGCUGGUUG	黑果蝇( <i>Drosophila virilis</i> )
Dwi-miR-34	MIMAT0008983	UGGCAGUGUGUUAGCUGGUUG	果蝇( <i>Drosophila willistoni</i> )
Dya-miR-34	MIMAT0009081	UGGCAGUGUGUUAGCUGGUUG	果蝇( <i>Drosophila yakuba</i> )

gene expression, CAGE) 数据库和 5'cDNA 末端快速扩增等技术, 得出 miR-34s 的预测结构, 即人源 miR-34a 的编码序列位于转录前体的第 2 外显子内, miR-34b 和 miR-34c 的编码序列分别位于第 1 内含子和第 2 外显子中。此外, 还发现在这些编码 miR-34s 序列上游约 30 kb 的启动子区域还存在一段极为保守的序列, 染色质免疫沉淀反应(Chromatin immunoprecipitation, Chip)和位点突变实验表明, 该序列即为 p53 蛋白结合位点。该保守 p53 结合序列前还存在一 CpG 岛(图 1)<sup>[9]</sup>。在某些肿瘤细胞中, 正是由于该 CpG 岛被甲基化阻碍了 p53 对 miR-34s 的激活, 从而使 p53 通过 miR-34s 对细胞增殖的调控出现了障碍<sup>[20]</sup>。这一现象已在多种癌细胞中被发现, 如肺癌、乳腺癌、前列腺癌、直肠癌和黑色素瘤等<sup>[21, 22]</sup>。

### 2.3 miR-34s 参与 p53 调控网络的功能

p53 的两个重要功能为促进细胞凋亡和促进细胞周期阻滞。然而 miR-34s 究竟是通过怎样的途径来介导 p53 的上述功能呢? 根据 miRNA 靶位点推定法则, 每个 miRNA 只要同 mRNA 存在部分互补(seed 区), 就可能同上百个蛋白 mRNA 发生作用。到目前为止, 经确认的 miR-34s 作用靶蛋白有细胞因子 CDK4、CDK6、Cyclin E2、E2F3、E2F5、Met、BCL-2 及原癌基因 *c-myc* 等<sup>[7, 10]</sup>, 这些蛋白绝大部分都参与 p53 的细胞凋亡或细胞周期调控网络, 在细胞的正常活动中起重要作用。具体体现在: (1)miR-34s 具有促进细胞凋亡功能。在细胞凋亡通路中 BCL-2 是 caspase 途径的一个重要的抗凋亡基因, Bommer 等<sup>[20]</sup>将 miR-34s 转染进入结肠癌细胞 SW-480 后, 发现 BCL-2 的表达受到抑制。之后, 他们用构建的 WI38 细胞系将 miR-34a、miR-34b 和 miR-34c 同时沉默, 发现 BCL2 的表达在 36 小时之内明显上升, 而 WI38 细胞在经过促凋亡试剂处理后, 未凋亡细胞仍多于凋亡细胞和死亡细胞。此外, Qi 等<sup>[23]</sup>还通过荧光素酶活性实验进一步证实, BCL-2 mRNA 就是 miR-34a 的靶向 mRNA。以上实验均证明 miR-34s 是通过抑制 BCL2 的作用来促进细胞凋亡<sup>[16, 20]</sup>。(2)miR-34s 具有促进细胞周期阻滞功能。多项研究发现细胞中 p53 参与 E2F/RB 信号通路来阻滞细胞周期和促进细胞衰老。Tazawa

等<sup>[13]</sup>发现细胞内 miR-34a 的导入可以下调 E2F 通路中多个基因如 *E2F1*、*E2F2*、*E2F3*、*DHFR*、*MCM3* 以及 *MCM10*, 进而抑制细胞增殖。其中, *E2F3* 是 miR-34a 的预测靶基因(<http://www.targetscan.org>), 且可以通过调节 *E2F1* 以调控整个 E2F 信号通路。因此, 很多学者认为 miR-34s 主要是通过靶向转录因子 *E2F3* 来阻滞细胞周期进而参与 p53 调控网络发挥抗肿瘤的作用<sup>[13, 16, 18]</sup>。Sun 等<sup>[24]</sup>也通过细胞周期试验和免疫杂交检测试验证明: miR-34a 造成的细胞循环在 G<sub>1</sub> 期终止是通过其对细胞内 cyclinD1、CDK6 以及其他一些 miR-34a 的靶蛋白的抑制来实现的。

### 2.4 miR-34s 对 p53 具有正反馈调节作用

作为 p53 细胞调控网络的一个重要成员, miR-34s 不但受 p53 的直接调控, 还能够通过对某些 p53 活性调节基因的调控进而参与 p53 通路的反馈调节。例如沉默信号调节子(Silent information regulator1, SIRT1)是一个具有 NAD<sup>+</sup>依赖性去乙酰化酶活性的核内蛋白, 能使 p53 蛋白去乙酰化从而降低 p53 在细胞中活性。最近, Yamakuchi 等<sup>[12]</sup>发现 SIRT1 的 3'UTR 存在 miR-34a 的结合位点, 他们通过荧光素酶实验确认其为 miR-34a 的靶序列, 通过该序列 miR-34a 可以降解 SIRT1 mRNA 下调 SIRT1。研究者还发现将 miR-34a 分别转染入 p53 野生型直肠癌细胞和 p53 缺失的直肠癌细胞, 前者中可检测出乙酰化 p53 含量增加, p53 下游基因 *PUMA* 和 *p21* 上调, 并出现大量细胞凋亡; 而后者无乙酰化 p53、*PUMA*、*p21* 蛋白被检测到且细胞凋亡数量有限。上述研究证实 miR-34a 可通过沉默 SIRT1, 进而正反馈作用于 p53 构成 p53-miR-34s 正反馈调节循环(图 2)。此外, 多项研究表明 miR-34s 还通过对 E2F3 的调节对 p53 产生正反馈调节作用。研究人员在细胞中敲除 *E2F3* 可以诱发细胞内 p53 和其下游基因上调, 证明 E2F3 对 p53 有正反馈调节的作用<sup>[25~27]</sup>。Tazawa 等将 miR-34a 转染入 p53 野生型直肠癌细胞后, 发现 E2F3 含量显著下降而 p53 和 p21 的含量都有所增加。因此, Tazawa 等<sup>[13]</sup>认为这是由于 miR-34a 通过对 E2F3 的抑制从而作用于 p53 调节网络形成了 p53-miR-34s 正反馈调节循环。

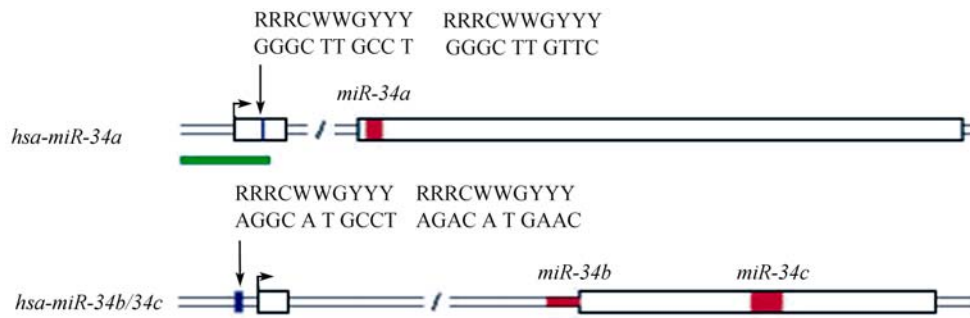


图 1 *miR-34s* 基因及 p53 结合位点示意图<sup>[9]</sup>

miR-34a 和 miR-34b/c 的启动子区域都包括了一个 p53 结合区(用蓝色表示); 绿色部分表示一个 CpG 岛; 红色表示编码 miRNA 基因序列。

### 3 MiR-34 家族与恶性肿瘤的关系

#### 3.1 MiR-34s 与结肠癌

Tazawa 等<sup>[13]</sup>检测了 25 份结肠癌样品中的 miRNA, 发现其中 36% 的 miR-34a 较癌旁组织有所下调。随后他们用化疗药物阿霉素(Adriamycin)处理野生型和 *p53* 缺陷型结肠癌细胞系 HCT116 后, 发现野生型细胞中 p53 蛋白明显上调, 同时 miR-34a 含量也有显著增加。相比之下, *p53* 缺陷型 HCT116 中 p53 与 miR-34a 含量均无变化。这一结果说明结肠癌中 miR-34a 与 p53 含量正相关。而体外实验也表明, miR-34a 的上调可抑制结肠癌细胞的增殖, 他们将 miR-34a 注射入裸鼠的结肠癌细胞 HCT116 及 RKO 移植瘤, 两周后肿瘤明显消退, 这进一步说明 miR-34a 对结肠癌细胞具有杀伤作用, 可望成为一

个重要的治疗基因。此外他们还发现, 当 miR-34a 含量增加后, HCT116 中 E2F3 出现下调。由于 E2F3 是 miR-34a 的靶蛋白, 该结果表明 miR-34a 对结肠癌细胞增殖的阻碍与 E2F3 的抑制密切相关。

另外, Toyota 等<sup>[22]</sup>发现 miR-34 家族的另两个成员 miR-34b 和 miR-34c 也在结肠癌的发生发展过程中起着重要作用。该研究显示 miR-34b 和 miR-34c 启动子附近的 CpG 岛在结肠癌中常被甲基化, 促使 miR-34b 和 miR-34c 基因的沉默, 诱发结肠癌细胞增殖。然而该启动子被重新激活后结肠癌细胞内可检测出大量 miR-34b 和 miR-34b, 同时细胞增殖却被抑制。因此 miR-34b 和 miR-34c 显示出潜在的抑癌作用。

#### 3.2 MiR-34s 与肝癌

miR-34s 在肝癌发生发展中所起的作用存在争

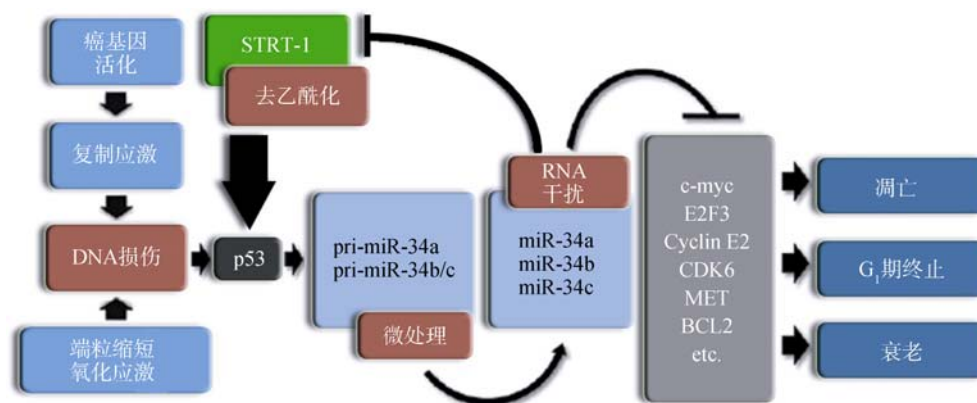


图 2 miR34s 与 p53 形成抗肿瘤正反馈网络

p53 在致癌基因激活, 端粒酶缺失和缺氧等因素导致的 DNA 损伤后被激活。活化的 P53 促进 miR-34s 表达, 从而抑制蛋白 c-myc、E2F3、Cyclin E2、CDK6、MET、BCL-2 等蛋白, 促进细胞凋亡, 细胞终止以及衰老。miR-34s 的产生进一步抑制组蛋白去乙酰酶 SIRT1, 从而使更多的 p53 因乙酰化而活化, 形成 p53/miR-34s 正反馈通路, 增强其对肿瘤的抑制和杀伤作用<sup>[7]</sup>。

议。Pogribny 等<sup>[28]</sup>指出 miR-34s 参与肝癌的发生。他们利用化疗药物三苯氧胺(Tamoxifen)喂养小鼠,发现小鼠肝脏中 miR-34s 的表达量显著提高,因此,认为 miR-34s 在肝癌中可能是一个原癌基因。与之相悖, Li 等<sup>[29]</sup>通过 qRT-PCR 分析多份肝癌患者的肝癌组织及癌旁组织发现 76% 的癌组织中 miR-34a 表达量大大低于相对癌旁组织,由此可以推断, miR-34a 可能与肝癌的发生发展负相关。得出相同结论的还有 Tryndyak 等<sup>[30]</sup>,他们采用甲基缺乏饮食喂养大鼠来模拟人体肝癌的生成,在喂养低甲基饮食的 9~18 周大鼠肝脏中 miR-34s 含量较正常饮食的对照组大鼠降低 80%~90%,同时 miR-34a 靶向促进细胞凋亡及衰老蛋白 E2F3、NOTCH1 及 Bcl-2 等含量均明显上升。Tryndyak 等人就此推断 miR-34a 的下降是肝癌生成的原因之一。为了证明这一推论,他们将 miR-34a 的反义核酸转染细胞后利用促细胞凋亡的药物处理细胞,发现不表达 miR-34a 的细胞较正常细胞更不易凋亡,更符合癌组织细胞的特性,从而证实 miR-34a 在肝细胞中并不是一个原癌基因而很有可能是抑癌基因。

近来又有研究证实 miR-34a 同肝癌的转移、扩散也具有高度的相关性。Li 等<sup>[29]</sup>发现在发生迁移扩散的肝癌组织中 miR-34a 表达量大大低于没有发生迁移扩散的肿瘤组织,说明 miR-34a 在肝癌中可能与肝癌的迁移扩散有关。Western blotting 实验证实肝癌组织中的 miR-34a 同细胞因子 c-Met 含量成负相关且 miR-34a 可以抑制 c-Met 的表达。由于肝癌细胞内 miR-34a 的导入与 c-Met 反义 RNA 的导入都可以阻止肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)诱发的细胞分散(Cell scattering),表明 miR-34a 是通过对细胞内 c-Met 的抑制进而促进癌细胞转移和扩散的,因而可以作为转移性肝癌的一个标识。

### 3.3 MiR-34s 与其他恶性肿瘤

近期研究显示,近 30% 神经胶质瘤染色体 1p 缺失,位于 1p36 区的 miR-34a 也因此许多神经胶质瘤细胞中表达量较正常偏低<sup>[31]</sup>。但当在神经胶质瘤细胞中重塑 miR-34a 后细胞循环却被阻滞在 G<sub>1</sub> 期,细胞出现严重的生长停滞现象。同时,细胞内 miR-34a 的靶蛋白 BCL-2、MYCN 和 E2F3 表达量都出现不

同程度的下降。从而证明 miR-34a 是神经胶质瘤中的抑癌 miRNA。

另有研究报道, miR-34a 还与人乳头状瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)诱发的宫颈癌相关。miR-34a 在宫颈癌组织内表达量的降低是由于 HPV 病毒的 E6 蛋白引发的,该蛋白可以破坏肿瘤抑制蛋白 p53 的稳定性,由于 p53 对 miR-34a 有激活作用,所以该病毒可以间接抑制组织中 miR-34a 的表达,从而诱发癌症的生成<sup>[32]</sup>。但采用 RNA 干扰沉默 HPV 阳性宫颈癌细胞中的 E6 蛋白,可以促使该细胞中 p53 和 miR-34a 的再激活<sup>[32]</sup>。此外,在 HPV 阳性的宫颈癌细胞 Hela 中表达 miR-34a,可促使细胞生长阻滞并出现细胞凋亡。这一研究证实 miR-34a 同样是 HPV 阳性的宫颈癌中的抑癌 miRNA。

Kato 等<sup>[33]</sup>发现, miR-34s 同乳腺癌细胞对 DNA 损伤的反应也存在相关性, miR-34s 突变缺失的细胞对辐射敏感性增加,而外源加入 miR-34s 则可提高细胞受到辐射之后的存活率。此外,在 p53 缺失的鼻咽癌<sup>[34]</sup>、胃癌<sup>[35]</sup>、胰腺癌<sup>[36]</sup>、前列腺癌<sup>[4]</sup>、眼癌<sup>[37]</sup>和白血病细胞<sup>[38]</sup>中均发现 miR-34s 表达显著下调。而与白血病相关的血小板增多症、真红细胞增多症及原发性骨髓纤维变性细胞内也可检测出 miR-34a 明显下降。上述现象均证明 miR-34s 与多种肿瘤的发生有密切关系,很可能是多种肿瘤的抑癌基因。

## 4 miR-34 家族在治疗中的应用及展望

随着人们对 miRNA 的逐步认识,越来越多对肿瘤有抑制作用的 miRNA 进入人们的视野并被尝试着作为新型基因药物用于癌症治疗。由于 miR-34s 在多种肿瘤细胞内呈低表达,因此可以用于肿瘤预测。Gallardo 等<sup>[39]</sup>证明 miR-34a 可以作为一种标记,在外科手术中用于对非小细胞肺癌的检测。另外, miR-34s 由于具有可通过调节多种蛋白来抑制肿瘤生长这一生物学功能使之成为治疗肿瘤的新的研发药物之一。Tazawa 等<sup>[13]</sup>利用端胶原(Atelocollagen)载体携带 miR-34a 注射入小鼠内结肠癌细胞 HCT116 及 RKO 移植瘤 14 天内肿瘤出现显著生长抑制,这一研究为 miR-34a 成为抗癌新药提供了依据。目前,将 miR-34s 成员开发成能应用于临床治疗的抗肿瘤药物还存在以下几点问题有待研究:首先,正常细胞内是何种机制来调节 miR-34s 与 p53

的正反馈调节呢?研究者认为一种可能性是 miR-34a 还可以靶向一种蛋白对 p53 进行负调控;另一种可能就是 p53 会促进某些其他蛋白或 microRNA 的表达而对这种正反馈调节进行控制<sup>[3]</sup>。其次,如何将 miR-34s 带入生物体肿瘤内部发挥正常功能也仍然是一个难题。已用于携带 miR-34s 进入裸鼠植瘤的端胶原是一种新型的非病毒载体,尽管非病毒型载体具有安全、易于制备等优点,但却存在转移效率不高,不能高效的表达治疗基因的缺点,影响了其进入临床治疗的应用。目前虽已有采用慢病毒载体携带 miR-34s 开展研究的报道,但由于其生产滴度较难达到体内治疗需要,因此现有的慢病毒载体运载 miR-34s 仅能用于体外实验。而我们自主研发的新型慢病毒载体是利用四环素调控系统来调控的单一慢病毒载体 SindLuc-S,其特点是采用将外源基因整合入血管内皮细胞的方法,利用内皮细胞对肿瘤组织的亲和性运载外源基因到达肿瘤组织,通过四环素诱导基因表达从而达到肿瘤靶向治疗的目的。研究结果显示该载体系统携带的外源基因能克服目前基因治疗载体中存在的外源基因在体内表达量不高,易于诱发免疫反应,难以到达肿瘤内部发挥药效等缺陷,并在体内外实验中取得了较好的治疗效果。我们已利用该系统运载肿瘤相关 miRNA 的研究工作,试图为肿瘤研究与治疗提供一条新的途径。

#### 参考文献(References):

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 1993, 75(5): 843–854.
- [2] 陈荣新, 叶胜龙. MicroRNAs 与肿瘤的研究进展. 国际外科学杂志, 2007, 34(3): 171–173.
- [3] Yamakuchi M, Lowenstein CJ. MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop. *Cell Cycle*, 2009, 8(5): 712–715.
- [4] Rokhlin OW, Scheinker VS, Taghiyev AF, Bumcrot D, Glover RA, Cohen MB. MicroRNA-34 mediates AR-dependent p53-induced apoptosis in prostate cancer. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(8): 1288–1296.
- [5] Paris R, Henry RE, Stephens SJ, McBryde M, Espinosa JM. Multiple p53-independent gene silencing mechanisms define the cellular response to p53 activation. *Cell Cycle*, 2008, 7(15): 2427–2433.
- [6] Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, Bentwich Z, Oren M. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell*, 2007, 26(5): 731–743.
- [7] Hermeking H. p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell*, 2007, 12(5): 414–418.
- [8] He L, He X, Lowe SW, Hannon GJ. microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(11): 819–822.
- [9] He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 2007, 447(7148): 1130–1134.
- [10] Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res*, 2007, 67(18): 8433–8438.
- [11] Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell*, 2007, 26(5): 745–752.
- [12] Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(36): 13421–13426.
- [13] Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(39): 15472–15477.
- [14] 高佳莉, 罗玉萍, 李思光. miR-34 基因家族的分子进化. 动物学研究, 2007, 28(3): 271–278.
- [15] He X, He L, Hannon GJ. The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. *Cancer Res*, 2007, 67(23): 11099–11101.
- [16] Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, Meister G, Hermeking H. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*, 2007, 6(13): 1586–1593.
- [17] Kumamoto K, Spillare EA, Fujita K, Horikawa I, Yamashita T, Appella E, Nagashima M, Takenoshita S, Yokota J, Harris CC. Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence. *Cancer Res*, 2008, 68(9): 3193–3203.

- [18] Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene*, 2007, 26(34): 5017–5022.
- [19] Yan D, Zhou X, Chen X, Hu D, Dong XE, Wang J, Lu F, Tu L, Qu J. MicroRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and migration through downregulation of c-Met. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(4): 1559–1565.
- [20] Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB, MacDougald OA, Cho KR, Fearon ER. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol*, 2007, 17(15): 1298–1307.
- [21] Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Korner H, Knyazev P, Diebold J, Hermeking H. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle*, 2008, 7(16): 2591–2600.
- [22] Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. 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.
- [23] Qi R, An H, Yu Y, Zhang M, Liu S, Xu H, Guo Z, Cheng T, Cao X. Notch1 signaling inhibits growth of human hepatocellular carcinoma through induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Res*, 2003, 63(23): 8323–8329.
- [24] Sun F, Fu H, Liu Q, Tie Y, Zhu J, Xing R, Sun Z, Zheng X. Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS Lett*, 2008, 582(10): 1564–1568.
- [25] Timmers C, Sharma N, Opavsky R, Maiti B, Wu L, Wu J, Orringer D, Trikha P, Saavedra HI, Leone G. E2f1, E2f2, and E2f3 control E2F target expression and cellular proliferation via a p53-dependent negative feedback loop. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(1): 65–78.
- [26] Sharma N, Timmers C, Trikha P, Saavedra HI, Obery A, Leone G. Control of the p53-p21CIP1 Axis by E2f1, E2f2, and E2f3 is essential for G1/S progression and cellular transformation. *J Biol Chem*, 2006, 281(47): 36124–36131.
- [27] Wu L, Timmers C, Maiti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT, Nuckolls F, Giangrande P, Wright FA, Field SJ, Greenberg ME, Orkin S, Nevins JR, Robinson ML, Leone G. The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature*, 2001, 414(6862): 457–462.
- [28] Pogribny IP, Tryndyak VP, Boyko A, Rodriguez-Juarez R, Beland FA, Kovalchuk O. Induction of microRNAome deregulation in rat liver by long-term tamoxifen exposure. *Mutat Res*, 2007, 619(1–2): 30–37.
- [29] Li N, Fu H, Tie Y, Hu Z, Kong W, Wu Y, Zheng X. miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett*, 2009, 275(1): 44–53.
- [30] Tryndyak VP, Kovalchuk O, Muskhelishvili L, Montgomery B, Rodriguez-Juarez R, Melnyk S, Ross SA, Beland FA, Pogribny IP. Epigenetic reprogramming of liver cells in tamoxifen-induced rat hepatocarcinogenesis. *Mol Carcinog*, 2007, 46(3): 187–197.
- [31] Wei JS, Song YK, Durinck S, Chen QR, Cheuk AT, Tsang P, Zhang Q, Thiele CJ, Slack A, Shohet J, Khan J. The MYCN oncogene is a direct target of miR-34a. *Oncogene*, 2008, 27(39): 5204–5213.
- [32] Wang X, Wang HK, McCoy JP, Banerjee NS, Rader JS, Broker TR, Meyers C, Chow LT, Zheng ZM. Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6. *RNA*, 2009, 15(4): 637–647.
- [33] Kato M, Paranjape T, Muller RU, Nallur S, Gillespie E, Keane K, Esquela-Kerscher A, Weidhaas JB, Slack FJ. The mir-34 microRNA is required for the DNA damage response *in vivo* in *C. elegans* and *in vitro* in human breast cancer cells. *Oncogene*, 2009, 28(25): 2419–2424.
- [34] Chen HC, Chen GH, Chen YH, Liao WL, Liu CY, Chang KP, Chang YS, Chen SJ. MicroRNA deregulation and pathway alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer*, 2009, 100(6): 1002–1011.
- [35] Ji Q, Hao X, Meng Y, Zhang M, Desano J, Fan D, Xu L. Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres. *BMC Cancer*, 2008, 8: 266.
- [36] Ji Q, Hao X, Zhang M, Tang W, Yang M, Li L, Xiang D, Desano JT, Bommer GT, Fan D, Fearon ER, Lawrence TS, Xu L. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS ONE*, 2009, 4(8): e6816.
- [37] Dalgard CL, Gonzalez M, deNiro JE, O'Brien JM. Differential microRNA-34a expression and tumor suppressor function in retinoblastoma cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(10): 4542–4551.
- [38] Zenz T, Mohr J, Eldering E, Kater AP, Buhler A, Kienle D, Winkler D, Durig J, van Oers MH, Mertens D, Dohner H, Stilgenbauer S. miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2009, 113(16): 3801–3808.
- [39] Gallardo E, Navarro A, Vinolas N, Marrades RM, Diaz T, Gel B, Quera A, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Ramirez J, Monzo M. miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis*, 2009, 30(11): 1903–1909.