

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.01233

哺乳动物乳汁 miRNA 的研究进展

宋雪梅, 姜俊芳, 蒋永清

浙江省农业科学院畜牧兽医研究所, 杭州 310021

摘要: 作为真核生物体内重要的调控分子, miRNA 可存在于包括血清、血浆、唾液、尿液在内的多种动物体液之中。最近的研究表明哺乳动物的乳汁中也分泌 miRNA, 表明 miRNA 有可能通过哺乳传递给新生个体, 从而调控新生个体发育过程中的某些关键生理、生化途径, 协助其正常发育。这一发现很可能揭开了哺乳动物世代间 miRNA 进行功能基因表达调控的研究序幕。文章对哺乳动物乳汁中 miRNA 的发现过程, 这些 miRNA 在乳汁中的存在形态及其分离技术, 以及其中数个重要 miRNA 的已知功能作简要概述, 并探讨了相关的后续研究任务及其面临的挑战。

关键词: miRNA; 乳汁; 体液; 微泡; 牛奶

Progress on miRNA in mammal breast milk

SONG Xue-Mei, JIANG Jun-Fang, JIANG Yong-Qing

Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China

Abstract: As an important regulator in eukaryote, miRNAs could be in the animal body fluids, including serum, blood plasma, saliva, urine and so on. More recently, it was reported that miRNAs were also in the breast milk of human or cow, which indicates that miRNAs could probably be transferred into the body of the next generation by lactation and play their key roles. This might be the prelude of studies on the regulation function of miRNAs in generations. Here, we introduced the process of finding miRNAs in mammal milk, the format of miRNAs in milk and the method for isolating miRNAs, and reviewed the main functions of several miRNAs in milk. We also discussed the research task and challenge associated with miRNAs in milk at the next.

Keywords: miRNA; milk; body fluids; microvesicle; cow milk

miRNA是真核生物体内由Dicer酶切割非编码RNA, 通过互补方式与靶基因转录物结合调控基因表达的小分子, 参与机体细胞发生、发展的多个物质及能量代谢环节^[1,2]。这种小分子不但在细胞内起

到至关重要的调控作用, 也在血清、血浆、唾液、尿液等各种体液中执行某些目前尚不明确的功能。近年研究发现, 哺乳动物乳汁也存在miRNA, 该研究结果扩展了人们对于miRNA调控功能范围的理

收稿日期: 2012-01-30; 修回日期: 2012-04-06

基金项目: 浙江省重大科技专项(编号: 2010C12007)和浙江省重点科技创新团队项目(编号: 2010R50027)资助

作者简介: 宋雪梅, 博士, 助理研究员, 研究方向: 动物分子育种。Tel: 0571-86400465; E-mail: songxuemei@yeah.net

通讯作者: 蒋永清, 硕士, 研究员, 研究方向: 反刍动物营养与繁育。E-mail: jyq61@sohu.com

网络出版时间: 2012-7-10 10:27

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120710.1027.001.html>

解,表明miRNA有可能通过哺乳从母体传递给新生儿,进而调控新生儿发育过程中的某些关键生理、生化途径,以助于新生个体的正常发育^[3,4]。该发现很可能揭开了哺乳动物世代间miRNA进行功能基因表达调控的研究序幕。本文对哺乳动物乳汁中miRNA的发现过程、这些miRNA在乳汁中的存在形态及其分离技术、以及其中几个重要miRNA的已知功能作简要概述,并探讨了相关的后续研究任务及其面临的挑战。

1 乳汁中 miRNA 的发现

自2008年以来,人们陆续发现miRNA存在于血清、血浆、唾液、尿液等多种体液之中^[3]。在此研究背景下,2010年,日本科学家分析发现,miRNA也同样存在于人类乳汁中,并且哺乳期的前6个月乳汁内一些与免疫相关的miRNA含量较高,随着时间的推移,其含量逐步下降^[4]。值得一提的是,这些miRNA可耐受RNA酶处理、反复冻融、以及强酸性pH处理,表明这些miRNA具有非常好的稳定性。同年,我国科学家在前期发现miRNA存在于血清的基础上,发现miRNA不但存在于不同哺乳期的新鲜牛奶中,也存在于出售的液态奶制品、以及奶粉制品之中^[5]。说明这些miRNA能以较为稳定的方式存在于牛奶及其衍生制品。

比较人和牛乳汁中发现的miRNA类别可以看出检测到的miRNA大多与免疫系统、神经系统等组织发育相关(表1),其中与免疫系统相关的miRNA最为丰富。

表1 分别从人乳和牛乳中检测到的miRNA及其类型^[3-5]

类型	miRNA 名称	
	人乳	牛乳
免疫相关	miR-92a	miR-181a
	miR-155	miR-223
	miR-181	miR-155
	let-7i miR-146b	miR-150
	miR-223	miR-142-5p
	miR-125b	miR-146a
组织相关	miR-17	miR-122
		miR-183
		miR-96
		miR-1
		miR-206
		miR-184
		miR-451
	miR-124	miR-9

注:各miRNA按其乳汁中的浓度自上到下排列;黑体为本文着重介绍的miRNA。

2 乳汁中 miRNA 的存在形态及其分离方法

微泡(Microvesicle)是一种直径30 nm~1 μm的膜泡状结构,包括被称为外泌体(Exosome,直径40~100 nm)的膜泡状结构,通常由机体多种类型的细胞分泌而来,存在于细胞间隙乃至多种体液如血液、尿液等之中,可通过膜受体融合的方式将其包裹的信息传递给受体细胞,介导细胞间的信号传递^[6-9]。近年来,人们已经发现微泡内可包裹miRNA或mRNA。被包裹的miRNA或mRNA可通过微泡的运动,到达邻近细胞,并在该细胞内执行功能。目前,哺乳动物的乳汁中也检测到这种微泡,并在其内部发现了mRNA或miRNA,说明乳汁中的miRNA也是以被微泡包裹的形态存在^[4,9-11]。最近发现,在miRNA上可能还同时结合有某些具有保护作用的蛋白质^[12]。有这些结构的帮助可能是乳汁miRNA能够耐受酶和酸性pH处理及反复冻融等原因之一。

乳汁微泡的分离需要先经过粗提,以去除乳脂球和细胞碎片等体积较大的物质,因此新鲜乳汁首先需在4、5 000 r/min离心力情况下离心30 min以去除乳脂肪颗粒,再经4、12 000 r/min离心力离心1 h,重复3次,以彻底去除脂肪颗粒、酪蛋白和细胞碎片,从而得到含有较高浓度微泡的乳清。接下来的步骤是通过超速离心来纯化乳清中的微泡。将上述获得的乳清经4、100 000 r/min离心力离心1 h后收集沉淀;然后将沉淀重悬于PBS,并加置在含有5%~40%连续蔗糖密度梯度的离心管上层,超速200 000 r/min离心18 h;超速结束后,将分层的沉淀分别采集后重悬于PBS,再经超速100 000 r/min离心1 h以沉淀膜泡,最后的沉淀小心重悬于小体积的PBS^[10]。这些提纯的微泡可用于电镜检测、微泡内的核酸提取以及微泡结构中蛋白质的提取等。

虽然上述步骤需要多次的高速和超速离心,但是这些繁复的步骤对于获取完整的微泡颗粒,开展微泡结构和分子组成的研究是必不可少的。若研究的目的是为了分析乳汁中的miRNA,则无需上述操作步骤,只要进行一般的体液总RNA提取操作即可。但由于乳汁具有较高的乳蛋白和乳脂,一般的体液总RNA提取操作获取的总RNA纯度通常不高^[4]。另外一种折中的miRNA提取方法是先粗提微泡,再纯化miRNA,可以取得较高质量的总RNA。此种方法

是基于分析发现多数包裹miRNA的微泡结构中存在CD63 蛋白。该方法首先通过CD63 抗体将微泡吸附下来, 然后对吸附沉淀(主要是微泡免疫沉淀)进行总RNA的提取纯化, 可以获得较高质量的总RNA, 也会降低乳汁中上皮细胞总RNA的污染^[4]。

3 乳汁 miRNA 在细胞内的功能

尽管人们猜测乳汁微泡内的miRNA可能通过哺乳过程进入新生个体体内, 并执行某些功能, 但是目前人们尚未开展相关的实验工作, 相信这会成为miRNA研究领域内新的研究热点。现阶段人们对这些miRNA功能的理解仍建立在其细胞或组织水平的功能分析基础之上。细胞或组织水平的研究表明, 这些miRNA决定着免疫系统的建成和组织器官的正确分化, 因此在机体内发挥着至关重要的作用^[2]; 同时, 目前在乳汁微泡内也并未检测到在机体内发现的全部miRNA, 其类别仅限于免疫、细胞分化的部分miRNA, 因此, 这些miRNA存在于乳汁应该不是一个偶然情况, 很可能对于新生个体相关发育过程也起到了某些作用。要想理解这些miRNA通过哺乳在新生个体体内的作用, 则必须首先了解这些miRNA在细胞本身内的功能。以下对于乳汁中存在的几个在免疫系统建成和组织分化过程中起关键作用、目前研究结果也较丰富的miRNA在细胞水平上的功能作简要介绍。

3.1 miR-181

miRNA是控制小鼠造血系统分子循环的重要组成部分, 其中miR-181 发挥了关键作用^[13, 14]。起初, 人们发现miR-181 在小鼠骨髓B-淋巴细胞中的大量表达, 可促进B细胞的分化, 而其在造血干细胞中的异常表达则会导致B型细胞碎片增加、破坏B细胞分化的过程^[15]。miR-181 在这一过程的表达紊乱会影响其靶基因*TCLI*(T-cell leukemia/lymphoma 1)的表达, 进而导致慢性B淋巴细胞白血病(B-cell chronic lymphocytic leukemia, B-CLL)的恶性发作^[16]。也正因为miR-181 在B-CLL中的特异表达, 使其有可能作为B-CLL的标记物以检测疾病的发生^[17]。因与淋巴等免疫细胞的分化过程相关, miR-181 在其他与免疫系统相关的疾病中也可能具有某些作用, 有证据表明miR-181 与miR-186和miR-590-3p调控了50%以上的

狼疮(一种免疫系统疾病)致病相关基因的表达^[18]。同时, miR-181 还通过抑制同源框转录因子*Prox1*(Prospero-related homeobox 1)的表达调控胚胎发育过程中血管系统的建成^[19]。

除免疫系统相关之外, 人们还发现miR-181 也参与了其他组织的癌变过程。研究发现, miR-181 家族在上皮细胞粘附分子呈阳性的侵染性肝癌细胞以及肝癌干细胞中都上调表达; 抑制它们的表达可降低肝癌细胞增殖数量、肿瘤增长速度、癌细胞运动能力及侵染性; 而外源miR-181 的大量表达可导致肝癌细胞的大量增殖。在肝细胞癌变过程中, miR-181 可能靶向调控了肝细胞分化转录调控因子的表达来体现其功能^[20, 21]。另外miR-181 涉及神经胶质瘤的发生过程。研究发现, miR-181a和miR-181b在人神经胶质瘤中表达下调, 而它们的表达可抑制胶质瘤细胞的浸润性, 并且miR-181b的抑制作用要强于miR-181a, 说明这两个miRNA是胶质瘤形成的重要因子^[22]。

由上述研究结果可以看出, miR-181 在细胞分化、细胞增殖过程执行关键作用, 在发育过程中的组织建成(如淋巴免疫系统细胞分化、血管系统建成)和癌变(癌细胞增殖)机制中体现出重要功能。有研究表明, 它促进分化的作用有可能是通过靶向性下调表达的分化抑制蛋白*Hox-A11*(Homeobox protein-A11)来实现的^[23]。

3.2 miR-155

miR-155 由B细胞整合簇(B-cell intergration cluster, BIC)RNA剪接产生, BIC RNA是多聚腺苷酸化的非编码蛋白RNA, 在淋巴瘤细胞内大量积累。包括ERK(Extracellular signaling-regulated kinase)和JNK (c-Jun N-terminal kinase)途径在内的B细胞受体耦合途径能够诱导BIC的上调表达^[24]。分析发现, B细胞淋巴瘤(B cell lymphoma, DLBCL)内该miRNA的表达量上调 10~30 倍, 同时, 过表达该miRNA的转基因小鼠, 从第 9 个月开始表现出急性淋巴细胞白血病症状^[25~27]。因而miR-155 被认为是一种致癌miRNA, 可作为临床诊断的标记物。进一步分析发现, miR-155 不但通过调控细胞白介素 6(interleukin-6)信号途径的两个调控因子SHIP(Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase)和C/EBPβ

(CCAAT enhancer-binding protein beta)的表达而实现促进淋巴细胞癌化的作用^[26,27]。同时, miR-155 还可下调表达HGAL(Human Germinal-center Associated Lymphoma), 促进瘤细胞的迁移^[28]。HGAL是扩散性巨型B细胞淋巴瘤和典型霍奇金淋巴瘤(classical Hodgkin lymphoma, cHL)的标记物, 可抑制淋巴细胞和瘤细胞的迁移。

除了可导致淋巴细胞癌化之外, 在胰腺癌(Pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)研究中也发现, 该miRNA通过下调具有抑制细胞形成腹腔、皮下和胰腺内肿瘤作用的关键基因TP53INP1(Tumor protein 53-induced nuclear protein 1)的表达以促进癌细胞的转移^[29]。因而该miRNA的上调表达也是胰腺癌早期发生的特征之一, 也可作为该病诊断标记物^[30]。

近年来的研究还发现, miR-155 可在多个致癌病毒如卡波氏肉瘤相关病毒(Kaposi's-sarcoma-associated herpes virus, KSHV)和人类疱疹病毒(Epstein-Barr virus, EBV)的诱导下上调表达。KSHV能够编码产生一个miRNA, 称为miR-K12-11, 它与miR-155 序列相似度很高, 种子序列也完全一样。人们推测该miRNA起到了与miR-155 相似的作用, 促使KSHV阳性B细胞肿瘤的发生^[31-33]。EBV感染的B细胞内miR-155 同样存在上调表达的现象^[34]。分析发现, miR-155 在启动子区有NF-kappaB(Nuclear factor-kappaB)结合位点。进一步分析发现, 单独表达该病毒的潜伏性膜蛋白 1(Latency membrane protein 1, LMP1)即可导致了miR-155 的上调表达, 而如果NF-kappaB结合位点发生突变, 则LMP1 诱导miR-155 上调表达的现象消失, 说明LMP1 通过上调NF-kappaB的表达调控了miR-155 的上调表达, 进而促进肿瘤发生^[35-37]。最近又有研究发现, 埃博拉病毒编码的LMP2A也具有促进miR-155 表达上调的作用, 进一步表明该病毒通过调控miR-155 表达促进了细胞癌变^[38]。鉴于miR-155 的上调表达是此类疾病发生的关键环节, 设计合适的、控制其上调表达的策略有可能成为有效治疗此类疾病的手段之一^[39]。

3.3 miR-146

哺乳动物先天免疫和获得性免疫的启动和终止在生物体内都是受到精细调控的, miRNA在这个过

程中起到了重要的作用, 其中就包括miR-146。分析发现, miR-146a和miR-146b的表达受到多种微生物组分和促炎细胞因子的诱导, 而这种诱导表达依赖于NF-kappaB蛋白, 该蛋白可能结合于miR-146 启动子区域而调控miRNA的表达。miR-146 的靶基因包括了TNF受体相关因子 6(TNF receptor-associated factor 6)和IL-1 受体相关激酶 1 基因(IL-1 receptor-associated kinase 1)。推测miR-146 通过负反馈途径调节上述两个基因来控制Toll-like受体和细胞因子信号传递, 参与免疫系统应答调节^[40-42]。

另外也有研究发现, miR-146 在抑制肺癌细胞转移过程中也发挥着一定作用。肺癌转移抑制因子 1(Breast cancer metastasis suppressor 1, BRMS1)能够促进miR-146 的上调表达, 而上调表达的miR-146 能够抑制癌细胞的转移, 这也为miRNA技术治疗肺癌提供了思路^[43]。

3.4 miR-223

miR-223 分别与两个转录因子NFI-A和C/EBPalpha相互作用, 参与人类粒性白细胞的分化调控。在这一过程中, 两个转录因子可竞争性地结合miR-223 启动子, 分别起到抑制和促进miR-223 的表达, 其中NFI-A与miR-223 启动子结合可维持miR-223 的低水平表达; 而C/EBPalpha与miR-223 启动子结合促使了miR-223 的上调表达, 导致维甲酸(Retinoic acid)诱导的细胞分化。在上述回路中, miR-223 还能通过负反馈方式抑制NFI-A的翻译, 从而帮助C/EBPalpha与其结合, 促进粒性细胞分化^[44]。进一步研究发现, C/EBPalpha还能够抑制细胞周期调控因子E2F1(the master regulator of cell-cycle progression)的表达, 而E2F1 也是miR-223 的靶作用对象^[45]。因此, C/EBPalpha与miR-223 的协同作用可能通过抑制与细胞增殖有关的E2F1 而进一步促进了细胞的分化。有趣的是, E2F1 在急性骨髓白血病细胞中也能结合miR-223 启动子区域, 抑制其转录, 表明在细胞中存在一个miR-223--C/EBPalpha--E2F1--miR-223 的调控回路^[45]。除了通过与相关转录因子协调作用促进粒性白细胞分化之外, miR-223 还同时抑制与骨髓原细胞增殖相关的Mef2c, 达到抑制原细胞增殖的目的, 从而与上述促进分化的作用相配合。因此, 该miR-223 是粒性细胞分化的精细调控分

子^[46]。

临床上, 造血相关的转录因子在白血病发生过程中参与染色质置换, 导致某些致病相关融合蛋白的表达, 其中AML1/ETO是白血病细胞中最常见的致病融合蛋白。研究发现, 在白血病细胞中, AML1/ETO直接抑制miR-223 的表达, 阻断了细胞分化过程, 进而促进细胞癌化过程。因此, 在白血病发生过程中存在一条致病相关融合蛋白通过miR-223 的表观沉默而阻断白血病细胞分化的途径^[47]。由于miR-223 在该过程中的作用, 使其在慢性淋巴细胞白血病(Chronic lymphocytic leukemia)细胞中的表达水平可以作为该病预后的评价指标之一^[17, 48, 49]。

3.5 miR-122

miR-122 由肝脏特异性转录基因HCR编码产生, 它的靶基因包括阳离子氨基酸转运蛋白(Cationic amino acid transporter, CAT-1 或SLC7A1)和多种促肿瘤发生因子如去整合素样金属蛋白酶 10(A disintegrin and metalloprotease family 10, ADAM10)、血清应答因子(Serum response factor, SRF)和胰岛素样生长因子 1 受体(Insulin-like growth factor 1 receptor, Igf1R)等^[50, 51]。该miRNA在肝癌细胞中表达量急剧下降, 而在肝癌细胞的异源表达会抑制癌细胞的肿瘤特征如增长速度、迁移、侵染等; 相反, 表达下调会促进细胞表现出肿瘤特征^[51]。miR-122 对肝癌细胞的抑制作用可能是由于它对促肿瘤发生因子ADAM10、SRF和Igf1R的抑制作用^[51]。因此, 既可以借助肝癌细胞下调miR-122 的表达将miR-122 作为肝癌发生的标记物^[52, 53], 还可通过某种适宜的手段提高其在肝癌细胞中的表达量, 以使其成为肝癌miRNA疗法的突破口^[54, 55]。最近的研究表明, miR-122 在肝脏内可能发挥着更为复杂及重要的功能。miR-122 与肝脏病变相关的百余个基因存在互作, 并形成了一个分子网络, 进而影响了肝脏代谢、病变和癌化进程^[56]。对该网络的解析对揭示肝脏相关病变的分子机制, 发现肝癌的有效治疗靶点均具有重要价值。

miR-122 还可影响丙肝病毒(Hepatitis C virus, HCV)生命周期。HCV基因组 5'末端存在miR-122 的靶结合位点, 表明该病毒在肝细胞内的生命活动也会受到miR-122 的某种作用。该位点的突变可导致

病毒RNA丰度降低, 而miR-122 的下调表达也可极大降低HCV RNA的自我复制量, 这说明miR-122 在肝细胞内起到了协助病毒复制的作用^[57-60]。分析结合有miR-122 病毒RNA 5'二级结构发现, 除了miRNA种子序列外, 其他序列也都和病毒RNA配对, 这种较强的互作关系可能强化了miRNA对病毒基因组复制的影响^[61]。有研究表明, miR-122 以一种不依赖于RNA合成的方式、通过促进核糖体与病毒RNA的结合, 协助病毒在细胞内翻译、表达和增殖而起到有利于病毒复制的作用^[62]。而miR-122 对病毒翻译的调控依赖于无帽子结构的RNA结构、HCV基因组上的核糖体进入位点(Internal ribosome entry site, IRES)和miR-122 的 3'末端^[63]。

3.6 miR-124

miR-124 在脑组织、神经细胞大量表达, 在包括视神经在内的多个神经系统形成过程中起关键作用^[64-67]。MiR-124 的异源大量表达会促进神经细胞神经突的生长、促进神经元的分化和成熟, 而阻断miR-124 的功能或使其表达量下降, 则会抑制神经突的生长, 导致细胞增生, 推迟神经系统的形成^[66, 68, 69]。在miR-124 执行功能过程中, 至少有 3 个靶基因受到了其调控: SRY-box transcription factor Sox9, Cdc42 和成神经管细胞瘤(Medulloblastoma)标记物cyclin dependent kinase 6 (CDK6)。Sox9 的过表达会抑制神经系统形成, 而下调表达则促进神经系统成熟^[68, 69]。Cdc42 的过表达会减缓miR-124 促进神经突生长的作用^[66]。CDK6 的表达促进成神经管细胞瘤细胞的生长^[70]。

miR-124 调控神经系统建成的功能还体现在, 它与另外两个转录因子(MYT1L和 BRN2)的共表达足以使成人初级真皮纤维原细胞向有功能的神经元细胞分化。这些诱导分化的神经元细胞具有典型的神经元形态、标记基因表达谱、可激发动作电位, 并能产生有功能的神经突触^[71, 72]。上述结果进一步体现了miR-124 在神经系统分化和建成过程中的重要作用。

4 展望

细胞或组织水平的研究已经证实, 乳汁微泡内发现的miRNA在机体内, 尤其是在免疫细胞诱导、

分化,以及包括神经系统在内的组织器官的分化等过程中均发挥着至关重要的作用。虽然据此可以推测这些miRNA很可能通过哺乳传递给新生儿,进而在新生儿体内执行与免疫系统、组织器官建成相关的重要功能,但是尚未获得明确的实验研究结果。其原因一方面可能是由于发现乳汁中存在miRNA的时间还不长,相关研究正在进行之中;另一方面,一些可以预见的技术难题可能也限制了相关实验的开展,如很难在不影响其他组分和miRNA的情况下,从乳汁中剔除某种特定miRNA,并与全乳喂养进行比较。针对此技术难题,是否可以用以下两种思路去尝试解决?首先,能否在乳汁中人为包装含有某一种miRNA的微泡,并进行批量的模式生物试验以统计相关指标是否存在显著性差异?这一实验的实施依赖于成熟的微泡包装技术。由于水稻miRNA能够通过消化系统进入人体内并稳定存在,因此在乳汁中直接添加miRNA也有可能获取一些有用的信息^[73]。其次,是否能够利用某种miRNA缺失或敲除的小鼠突变体开展工作,然后分析补充含有miRNA的乳汁后是否有缓解突变体表型的作用?当然,在开展实验过程中肯定还会有其他困难,也会有其他各种解决方案,相信技术层面的困难不会限制相关研究的开展,或者说不会限制太长时间。

乳汁存在miRNA研究另外一个核心研究内容应该是乳汁中miRNA如何被吸收、转运到靶细胞的问题。在哺乳动物其他体液miRNA上相关研究获得的结论也只是发现miRNA在细胞间的转运可能需要能量的供给^[12]。因此,目前还不清楚乳汁中的miRNA是以微泡包裹的方式被吸收、进入到新生儿循环系统,然后进入到靶组织或细胞,还是以裸露的形式被吸收、转运;也不清楚miRNA是特异性地进入靶组织或细胞,还是以组成型地进入所有组织或细胞。如果是前者,那保证它特异性的机制又是什么。相信这将是随后几年相关研究领域里有吸引力的研究内容之一。

尽管微泡是乳汁乃至其他体液中miRNA的存在形态,但最近的研究表明,miRNA也可以不包装的形式稳定存在于血浆和细胞培养液中,只是这些miRNA还结合有沉默机制关键蛋白Ago2^[74]。据此科研人员推测,这类miRNA可能是死亡细胞的降解产物。虽然尚未有人在哺乳动物乳汁中发现此类

miRNA,但不能排除乳汁中也有此种形态miRNA存在的可能。

从上述研究进展来看,不管以何种形态,miRNA在人乳、牛奶,甚至牛奶制品中均可稳定存在,并可能通过哺乳过程对新生个体发育发挥重要作用。既然如此,是否能够将miRNA认定为新发现的乳汁功能性成分之一?最近,基于miRNA不仅在细胞中发挥作用、还通过体液循环在机体内执行功能,有科研人员提出miRNA很可能像激素一样在机体内发挥作用。这种miRNA激素概念的提出体现了miRNA在机体内的系统性作用,确实是名副其实。但不管是何种名称或概念,目前最重要的工作应该还是用更坚实的实验证据证明这些miRNA在包括乳汁在内的各种体液中确实发挥了系统性的功能,以证实目前的这些推测和设想。伴随着miRNA研究热度在生命科学领域的持续增强,相信此类证据会在短时间内陆续被发现。

参考文献(References):

- [1] 彭杰军, 燕飞, 陈海如, 陈剑平. Dicer结构和功能研究进展. 遗传, 2008, 30(12): 1550–1556. DOI
- [2] 盛熙晖, 杜立新. MicroRNA及其在人和动物上的研究进展. 遗传, 2007, 29(6): 651–658. DOI
- [3] Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 2010, 56(11): 1733–1741. DOI
- [4] Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 2010, 1(1): 7. DOI
- [5] Chen X, Gao C, Li H, Huang L, Sun Q, Dong Y, Tian C, Gao S, Dong H, Guan D, Hu X, Zhao S, Li L, Zhu L, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Res*, 2010, 20(10): 1128–1137. DOI
- [6] Simpson RJ, Jensen SS, Lim JWE. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics*, 2008, 8(19): 4083–4099. DOI
- [7] Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(36): 13368–13373. DOI
- [8] Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*, 2005, 17(7): 879–887. DOI

- [9] Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, Filen JJ, Lahesmaa R, Norman M, Neve EP, Scheynius A, Gabrielsson S. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol*, 2007, 179(3): 1969–1978. [DOI](#)
- [10] Hata T, Murakami K, Nakatani H, Yamamoto Y, Matsuda T, Aoki N. Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(2): 528–533. [DOI](#)
- [11] Zhou Q, Li M, Wang X, Li Q, Wang T, Zhu Q, Zhou X, Gao X, Li X. Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(1): 118–123. [DOI](#)
- [12] Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(20): 7248–7259. [DOI](#)
- [13] Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004, 303(5654): 83–86. [DOI](#)
- [14] Spierings DC, McGoldrick D, Hamilton-Easton AM, Neale G, Murchison EP, Hannon GJ, Green DR, Withoff S. Ordered progression of stage-specific miRNA profiles in the mouse B2 B-cell lineage. *Blood*, 2011, 117(20): 5340–5349. [DOI](#)
- [15] Chen CZ, Lodish HF. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Semin Immunol*, 2005, 17(2): 155–165. [DOI](#)
- [16] Efanov A, Zanasi N, Nazaryan N, Santanam U, Palamarchuk A, Croce CM, Pekarsky Y. CD5+CD23+ leukemic cell populations in TCL1 transgenic mice show significantly increased proliferation and Akt phosphorylation. *Leukemia*, 2010, 24(5): 970–975. [DOI](#)
- [17] Visone R, Rassenti LZ, Veronese A, Taccioli C, Costinean S, Aguda BD, Volinia S, Ferracin M, Palatini J, Balatti V, Alder H, Negrini M, Kipps TJ, Croce CM. Karyotype-specific microRNA signature in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2009, 114(18): 3872–3879. [DOI](#)
- [18] Vinuesa CG, Rigby RJ, Yu D. Logic and extent of miRNA-mediated control of autoimmune gene expression. *Int Rev Immunol*, 2009, 28(3–4): 112–138. [DOI](#)
- [19] Kazenwadel J, Michael MZ, Harvey NL. *Prox1* expression is negatively regulated by miR-181 in endothelial cells. *Blood*, 2010, 116(13): 2395–2401. [DOI](#)
- [20] Ji J, Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Jia HL, Li C, Deng C, Wauthier E, Reid LM, Ye QH, Qin LX, Yang W, Wang HY, Tang ZY, Croce CM, Wang XW. Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells. *Hepatology*, 2009, 50(2): 472–480. [DOI](#)
- [21] Meng F, Glaser SS, Francis H, DeMorrow S, Han Y, Passarini JD, Stokes A, Cleary JP, Liu X, Venter J, Kumar P, Priester S, Hubble L, Staloch D, Sharma J, Liu CG, Alpini G. Functional analysis of microRNAs in human hepatocellular cancer stem cells. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(1): 160–173. [DOI](#)
- [22] Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z, You Y. hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res*, 2008, 1236: 185–193. [DOI](#)
- [23] Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Polesskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Souidi M, Cuvellier S, Harel-Bellan A. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(3): 278–284. [DOI](#)
- [24] Yin Q, Wang X, McBride J, Fewell C, Flemington E. B-cell receptor activation induces BIC/miR-155 expression through a conserved AP-1 element. *J Biol Chem*, 2008, 283(5): 2654–2662. [DOI](#)
- [25] Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci US A*, 2005, 102(10): 3627–3632. [DOI](#)
- [26] Costinean S, Sandhu SK, Pedersen IM, Tili E, Trotta R, Perrotti D, Ciarlariello D, Neviani P, Harb J, Kauffman LR, Shidham A, Croce CM. Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase and CCAAT enhancer-binding protein beta are targeted by miR-155 in B cells of Emicro-MiR-155 transgenic mice. *Blood*, 2009, 114(7): 1374–1382. [DOI](#)
- [27] O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(17): 7113–7118. [DOI](#)
- [28] Dagan LN, Jiang X, Bhatt S, Cubedo E, Rajewsky K, Lossos IS. miR-155 regulates HGAL expression and increases lymphoma cell motility. *Blood*, 2012, 119(2): 513–520. [DOI](#)
- [29] Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, Garcia S, Nowak J, Yeung ML, Jeang KT, Chaix A, Fazli L, Motoo Y, Wang Q, Rocchi P, Russo A, Gleave M, Dagorn JC, Iovanna JL, Carrier A, Pebusque MJ, Dusetti NJ. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci*

- USA, 2007, 104(41): 16170–16175. [DOI](#)
- [30] Habbe N, Koorstra JB, Mendell JT, Offerhaus GJ, Ryu JK, Feldmann G, Mullendore ME, Goggins MG, Hong SM, Maitra A. MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(4): 340–346. [DOI](#)
- [31] Gottwein E, Mukherjee N, Sachse C, Frenzel C, Majoros WH, Chi JT, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Ohler U, Cullen BR. A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature*, 2007, 450(7172): 1096–1099. [DOI](#)
- [32] Skalsky RL, Samols MA, Plaisance KB, Boss IW, Riva A, Lopez MC, Baker HV, Renne R. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155. *J Virol*, 2007, 81(23): 12836–12845. [DOI](#)
- [33] Boss IW, Nadeau PE, Abbott JR, Yang Y, Mergia A, Renne R. A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded ortholog of microRNA miR-155 induces human splenic B-cell expansion in NOD/LtSz-scid IL2R γ^{null} mice. *J Virol*, 2011, 85(19): 9877–9886. [DOI](#)
- [34] Linnstaedt SD, Gottwein E, Skalsky RL, Luftig MA, Cullen BR. Virally induced cellular microRNA miR-155 plays a key role in B-cell immortalization by Epstein-Barr virus. *J Virol*, 2010, 84(22): 11670–11678. [DOI](#)
- [35] Gatto G, Rossi A, Rossi D, Kroening S, Bonatti S, Mallardo M. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 trans-activates miR-155 transcription through the NF-kappaB pathway. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(20): 6608–6619. [DOI](#)
- [36] Lu F, Weidmer A, Liu CG, Volinia S, Croce CM, Lieberman PM. Epstein-Barr virus-induced miR-155 attenuates NF-kappaB signaling and stabilizes latent virus persistence. *J Virol*, 2008, 82(21): 10436–10443. [DOI](#)
- [37] Thompson RC, Herscovitch M, Zhao I, Ford TJ, Gilmore TD. NF-kappaB down-regulates expression of the B-lymphoma marker CD10 through a miR-155/PU. 1 pathway. *J Biol Chem*, 2011, 286(3): 1675–1682. [DOI](#)
- [38] Du ZM, Hu LF, Wang HY, Yan LX, Zeng YX, Shao JY, Ernberg I. Upregulation of MiR-155 in nasopharyngeal carcinoma is partly driven by LMP1 and LMP2A and downregulates a negative prognostic marker JMJD1A. *PLoS ONE*, 2011, 6(4): e19137. [DOI](#)
- [39] Fabani MM, Abreu-Goodger C, Williams D, Lyons PA, Torres AG, Smith KG, Enright AJ, Gait MJ, Vigorito E. Efficient inhibition of miR-155 function *in vivo* by peptide nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(13): 4466–4475. [DOI](#)
- [40] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(33): 12481–12486. [DOI](#)
- [41] Ma X, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Li Y. MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J Mol Cell Biol*, 2011, 3(3): 159–166. [DOI](#)
- [42] O'Connell RM, Zhao JL, Rao DS. MicroRNA function in myeloid biology. *Blood*, 2011, 118(11): 2960–2969. [DOI](#)
- [43] Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS, Welch DR. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Res*, 2009, 69(4): 1279–1283. [DOI](#)
- [44] Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C, Bozzoni I. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell*, 2005, 123(5): 819–831. [DOI](#)
- [45] Pulikkan JA, Dengler V, Peramangalam PS, Peer Zada AA, Muller-Tidow C, Bohlander SK, Tenen DG, Behre G. Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2010, 115(9): 1768–1778. [DOI](#)
- [46] Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, Brummelkamp TR, Fleming MD, Camargo FD. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*, 2008, 451(7182): 1125–1129. [DOI](#)
- [47] Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, Starnes LM, Mancini M, Travaglini L, Diverio D, Ammatuna E, Cimino G, Lo-Coco F, Grignani F, Nervi C. Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell*, 2007, 12(5): 457–466. [DOI](#)
- [48] Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, Saussoy P, Van Den Neste E, Michaux L, Heimann P, Martiat P, Bron D, Lagneaux L. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has *in vivo* significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood*, 2009, 113(21): 5237–5245. [DOI](#)
- [49] Li S, Moffett HF, Lu J, Werner L, Zhang H, Ritz J, Neuberg D, Wucherpennig KW, Brown JR, Novina CD. MicroRNA expression profiling identifies activated B cell status in chronic lymphocytic leukemia cells. *PLoS ONE*, 2011, 6(3): e16956. [DOI](#)
- [50] Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, Taylor JM. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the

- high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol*, 2004, 1(2): 106–113. [DOI](#)
- [51] Bai S, Nasser MW, Wang B, Hsu SH, Datta J, Kutay H, Yadav A, Nuovo G, Kumar P, Ghoshal K. MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J Biol Chem*, 2009, 284(46): 32015–32027. [DOI](#)
- [52] Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, Jacob ST, Ghoshal K. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem*, 2006, 99(3): 671–678. [DOI](#)
- [53] Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, Hood LE, Galas DJ. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(11): 4402–4407. [DOI](#)
- [54] Haussecker D, Kay MA. miR-122 continues to blaze the trail for microRNA therapeutics. *Mol Ther*, 2010, 18(2): 240–242. [DOI](#)
- [55] Zhang G, Wang Q, Xu R. Therapeutics based on microRNA: a new approach for liver cancer. *Curr Genomics*, 2010, 11(5): 311–325. [DOI](#)
- [56] Boutz DR, Collins PJ, Suresh U, Lu M, Ramirez CM, Fernandez-Hernando C, Huang Y, Abreu Rde S, Le SY, Shapiro BA, Liu AM, Luk JM, Aldred SF, Trinklein ND, Marcotte EM, Penalva LO. Two-tiered approach identifies a network of cancer and liver disease-related genes regulated by miR-122. *J Biol Chem*, 2011, 286(20): 18066–18078. [DOI](#)
- [57] Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, 2005, 309(5740): 1577–1581. [DOI](#)
- [58] Jopling CL, Norman KL, Sarnow P. Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2006, 71: 369–376. [DOI](#)
- [59] Chang J, Guo JT, Jiang D, Guo H, Taylor JM, Block TM. Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *J Virol*, 2008, 82(16): 8215–8223. [DOI](#)
- [60] Diaz-Toledano R, Ariza-Mateos A, Birk A, Martinez-Garcia B, Gomez J. *In vitro* characterization of a miR-122-sensitive double-helical switch element in the 5' region of hepatitis C virus RNA. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(16): 5498–5510. [DOI](#)
- [61] Pang PS, Pham EA, Elazar M, Patel SG, Eckart MR, Glenn JS. Structural map of a microRNA-122: hepatitis C virus complex. *J Virol*, 2012, 86(2): 1250–1254. [DOI](#)
- [62] Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C, Junemann C, Niepmann M. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J*, 2008, 27(24): 3300–3310. [DOI](#)
- [63] Roberts AP, Lewis AP, Jopling CL. miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(17): 7716–7729. [DOI](#)
- [64] Maiorano NA, Mallamaci A. Promotion of embryonic cortico-cerebral neuronogenesis by miR-124. *Neural Dev*, 2009, 4: 40. [DOI](#)
- [65] Liu K, Liu Y, Mo W, Qiu R, Wang X, Wu JY, He R. MiR-124 regulates early neurogenesis in the optic vesicle and forebrain, targeting NeuroD1. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(7): 2869–2879. [DOI](#)
- [66] Yu JY, Chung KH, Deo M, Thompson RC, Turner DL. MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Exp Cell Res*, 2008, 314(14): 2618–2633. [DOI](#)
- [67] Smirnova L, Grafe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(6): 1469–1477. [DOI](#)
- [68] Cheng LC, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F. miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat Neurosci*, 2009, 12(4): 399–408. [DOI](#)
- [69] Farrell BC, Power EM, McDermott KW. Developmentally regulated expression of Sox9 and microRNAs 124, 128 and 23 in neuroepithelial stem cells in the developing spinal cord. *Int J Dev Neurosci*, 2011, 29(1): 31–36. [DOI](#)
- [70] Pierson J, Hostager B, Fan R, Vibhakar R. Regulation of cyclin dependent kinase 6 by microRNA 124 in medulloblastoma. *J Neurooncol*, 2008, 90(1): 1–7. [DOI](#)
- [71] Ambasudhan R, Talantova M, Coleman R, Yuan X, Zhu S, Lipton SA, Ding S. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(2): 113–118. [DOI](#)
- [72] Yoo AS, Sun AX, Li L, Shcheglovitov A, Portmann T, Li Y, Lee-Messer C, Dolmetsch RE, Tsien RW, Crabtree GR. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature*, 2011, 476(7359): 228–231. [DOI](#)
- [73] Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, Li J, Bian Z, Liang X, Cai X, Yin Y, Wang C, Zhang T, Zhu D, Zhang D, Xu J, Chen Q, Ba Y, Liu J, Wang Q, Chen J, Wang J, Wang M, Zhang Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res*, 2012, 22(1): 107–126. [DOI](#)

-
- [74] Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(16): 7223–7233. [DOI](#)
Characterization of extracellular circulating microRNA.