

微小核糖核酸在中药研究中的应用

李沧海, 姜廷良*

(中国中医科学院中药研究所唐氏中药研究中心, 北京 100700)

[摘要] 对微小核糖核酸(miRNA)研究文献进行分析和综评。以 miRNA 为主题词检索 MEDLINE 和 CNKI 数据库, 选取其中代表性文献 21 篇, 分析、评述 miRNA 研究的新进展及其在中医药研究中的应用。结果显示 miRNA 在诊断和疗效评价上既是一类新的生物标记物, 在治疗和药物干预上也是一类新的作用靶标, 在中药作用的物质基础上又是一类新的活性成分。利用微小核糖核酸技术多个视角探讨研究中医药具有广阔的前景。

[关键词] 微小核糖核酸; 疾病; 靶标; 活性成分; 中医药研究

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0279-03

Application of MicroRNA to Research in Traditional Chinese Medicine

LI Cang-hai, JIANG Ting-liang*

(Tang Center for Chinese Herbal Research, Institute of Chinese Materia Medica,
China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] To analyze and review on the literature regarding miRNA research. 21 literature was retrieved and selected from MEDLINE and CNKI database using miRNA as subject heading, then after the new progress on miRNA research and application in traditional Chinese medicine was reviewed. miRNA was a new kind of biomarker in diagnosis and therapeutic effect evaluation, and an emerging target in treatment and drug intervention, meanwhile a new active component of Chinese herb. Broad prospects of miRNA application will be of significance for promotion of traditional Chinese medicine research.

[Key words] microRNA; disease; target; active component; traditional Chinese medicine research

作为抑制基因 mRNA 翻译的微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是近 10 余年来生物学研究的热点, 曾被美国《Science》杂志列为 2002 年度的十大“重大突破”, 有人将对其作用功能的揭示认为是“当今世纪生物学的里程碑”。2011 年 9 月, 南京大学张辰宇教授等在《Cell Research》上发表的关于源自谷物的 miRNA-168a 可通过动物胃肠道进入血液和组织, 作用于低密度脂蛋白接头蛋白(LDLRAP1), 降低血浆低密度脂蛋白清除的研究报告^[1], 更引起学术界的重视。

1 miRNA 定义

在生物体的整个基因组中, 可分为编码蛋白基因和非编码蛋白基因, 人类的编码蛋白基因约 2.5 万个, 占基因组总量

的 2% ~ 3%。前者可经转录和翻译, 形成相应的蛋白质, 后者可经转录, 但不能翻译形成相应的蛋白质, 约占基因组总量的 95% 以上。miRNA 就属于后者的一类转录产物。1993 年, Lee R C 等^[2]和 Wightman B 等^[3]分别从一种被称为秀丽隐杆线虫中首次发现 lin-4 基因转录产生的短小 RNA 可抑制另一基因产生的 mRNA 的翻译, 从而抑制幼虫的发育。7 年后, Reinhart B J 等^[4]在线虫中又发现被称为 let-7 的短小 RNA, 可抑制相应 mRNA 的翻译。就此引起了生物学界爆发性地广泛关注。2001 年, 国际学术界将这类短小 RNA 统称为“miRNA”, 并以发现的次序编号命名。

miRNA 基因, 约 1/4 位于编码蛋白质基因的内含子之中, 与所寄生的编码蛋白质基因共转录, 然后从其内含子中剪切出来, 并与内含子转录方向一致; 但大多数 miRNA 基因位置与编码蛋白质基因距离较远, 有的成簇存在, 具有单独的或共同的启动子。

miRNA 基因转录的初产物(pri-miRNA)被 III 型核糖核酸酶(Drosha)加工成前体(pre-miRNA), 通过转运蛋白(exportin-5), 从核内转运到胞质, 经另一类 III 型核糖核酸酶(Dicer)剪切为成熟的 miRNA, 并与其他蛋白质组成 RNA 诱导的基因沉默复合体(RISC), 与靶 mRNA 的 3' 末端非翻译区(UTR)互补配对的位点, 进行识别结合, 也可与靶

[收稿日期] 20111114(001)

[基金项目] 国家“重大新药创制专项”课题(2009ZX09301-005)

[第一作者] 李沧海, 副研究员, 从事中药解热抗炎药理学研究, Tel: 010-64041008, E-mail: leechnn@yahoo.com.cn

[通讯作者] *姜廷良, 研究员, 博导, 从事中药药效物质基础及其作用机制的研究, Tel: 010-64041008, E-mail: jiangt2005@sohu.com

mRNA 的开放阅读框(ORF)结合,阻滞靶基因 mRNA 翻译的启动或延伸,还可对靶 mRNA 脱腺苷而使之降解,从而抑制靶蛋白的表达。

其主要生物学特性为:①广泛存在,系不编码蛋白的短序列 RNA,本身不具有开放阅读框;②长度通常为 20~22 个核苷酸,在 3' 末端可有 1~2 个碱基的长度变化;③成熟 miRNA 的 5' 末端有一磷酸基团、3' 末端为羟基,这一特点可与寡核苷酸和功能 RNA 的降解片段相区别;④高度保守性、时序性和组织特异性^[5]。

据最近资料,迄今已从动物、植物、微生物中鉴定出 miRNA 10 000 余个,其中,在人类的组织中鉴定出 940 个,估计超过 60% 的编码基因 mRNA 的 3' UTR 上存在其作用位点^[6]。

2 miRNA 表达与疾病和生理功能的相关性

已有研究资料表明,miRNAs 通过抑制靶 mRNA 翻译而降低相应蛋白合成,从而在生命活动中起着广泛和超乎想象的重要作用,对生长发育、器官形成、基因表达、基因重组、细胞周期、应激等生理生化活动以及疾病发生发展过程,具有深远和复杂的效应。

不同组织细胞中表达不同的 miRNA 具有不同的丰度。如在神经系统中 miR-9 (miRNA 的简写,下同),miR-124, miR-125, miR-128, miR-129 的表达丰度高(每个细胞上丰度最高的可达 1 万个拷贝数以上),或是独特的^[7];miR-133a/b, miR-30a/b/c, miR-26a/b 和 miR-1 在心脏呈高表达^[8];miR-122 在肝脏的表达丰度高,又是对肝具有一定特异性,与肝内稳态和胆固醇代谢有关^[9]。

在组织器官分化成熟过程中有 miRNA 的时序性参与。如造血系统的 3 类祖细胞中的髓系-单核祖细胞(GMP),可因 miR-223 高表达而分化为单核母细胞,再因 miR-17~92 簇,miR-21, miR-196b 表达降低而分化为单核细胞,而其成熟的巨噬细胞则有 miR-146 和 miR-155 的高表达;GMP 也可因 miR-223 低表达而分化为髓母细胞,再因 miR-21 和 miR-196b 低表达而进一步分化成嗜中性、嗜酸性和嗜碱性白细胞。巨核-红系祖细胞(MEP)可因 miR-221/miR-222, miR-223 低表达而分化为红母细胞,再因 miR-44, miR-451 高表达而使之分化为网织细胞和红细胞;MEP 在分化为巨核母细胞后,因 miR-150 高表达而分化为巨核细胞和血小板。淋巴系祖细胞(CLP)在分化成 pro-B 细胞后,可因 17-92 高表达而分化成 pre-B,继而因 miR-181, miR-150 高表达而分化成 B-淋巴细胞,再因 miR-155 高表达而成熟为浆细胞;CLP 在分化成 CD4⁺ CD8⁺ 细胞后,因 miR-181, miR-150 高表达而成单一的 CD4⁺ 或 CD8⁺ 细胞,再因 miR-155 高表达、miR-181 低表达和 miR-146 高表达,分别分化成调节性 T(Treg)淋巴细胞和辅助性 T(Th1, Th2)淋巴细胞^[6]。

不同疾病和病理过程常可见不同 miRNA 的表达改变(近年来国内外有许多综述)。如心肌缺血再灌注损伤后,miR-1, miR-21, miR-24, miR-29, miR-92a, miR-126, miR-133, miR-195, miR-199a, miR-208, miR-320, miR-499 等参与调节,

在急性心肌梗死和心脏病变后组织破坏,miR-1, miR-126, miR-208, miR-499 等释放入血,被认为是新的、敏感的生物标记物^[10]。在神经变性疾病时,如巴金森氏病(miR-133b, miR-433)、早老性痴呆(miR-29a/b, miR-298/miR-328, miR-107, miR-29a/miR-106b/miR-101, miR-15a/miR-1e),舞蹈病(miR-9)、脊髓小脑失调(miR-19/miR-101/miR-130)、习惯性痉挛和抽搐(miR-189)等有 miRNA 表达异常;在糖代谢性疾病时,有 miR-375, miR-124a, miR-34a, miR-30d, miR-9 等表达异常;在自身免疫性疾病时,有 miR-146(系统性红斑性狼疮), miR-155, miR-146a, miR-132, miR-16(类风湿性关节炎), miR-326(多发性硬化症)等表达异常^[11]。

各类肿瘤有不同的 miRNA 表达变化,有的与其临床表现具一定相关性。如以乳腺癌为例,let-7 低表达以及 miR-146a, miR-21, miR-92, miR-93, miR-126, miR-29a 等高表达有助于诊断,miR-9, let-7i 低表达以及 miR-223, miR-213 高表达可能与复发或耐药性有关,miR-200a/b/c, miR-214, miR-141, miR-18a, miR-9 等高表达以及 miR-429, let-7, miR-199a, miR-377, miR-368, miR-495 等低表达与预后有关^[12]。

miRNA 对靶基因 mRNA 的调控是复杂的,多个 miRNA 可以通过多个途径作用于同一靶 mRNA 的效应,靶 mRNA 产物也可以影响 miRNA,形成综合的调控网络。如以前炎症基因产物 NFκB(p50, p65 和 IκB 的复合物)为例,miR-9, miR-218 可抑制 p50, miR-301a 通过抑制 NKRF 而抑制 p50; miR-223, miR-15, miR-16 通过抑制 IKKα 而抑制 IκB, miR-146 可通过 IRAK1 和 TRAF6 而抑制 IKKβ 而抑制 IκB, miR-199a 通过抑制 IKKβ 抑制 IκB, miR-520 可通过抑制 PP2A/C 而抑制 IKKβ 再抑制 IκB, miR-124a 可抑制 IKKζ 而抑制 IκB, miR-155 通过抑制 IKKε 而抑制 IκB。同样, p50 可抑制 let-7 和 miR-29, 可诱导 Lin-28 和 miR-301a; p65 可诱导 miR-143, miR-146, miR-21 表达^[13]。

3 miRNA 的临床应用

由于 miRNA 广泛地参与了编码蛋白基因 mRNA 的翻译而影响相应蛋白质的功能,它们的表达变化与正常生理生化状态和疾病发生发展过程又有联系和相关,既成为生物学家作为新的生物标记物进行研究的对象,又是医药学家认识和干预疾病的一类新的靶标,受到高度关注。国际上已有企业研发 miRNA 的拮抗剂,拟用以治疗心肌梗塞(抗 miRNA-15、抗 miRNA-195)、纤维化(抗 miRNA-21)、动脉硬化(抗 miRNA-33)、丙型肝炎(抗 miRNA-122)、炎症(抗 miRNA-155)、肿瘤(抗 miRNA-21)、真性红细胞增多症(抗 miRNA-451);研发 miRNA 的补充剂,拟用于治疗恶性肿瘤(miR-16、miR-34)、肺癌(let-7)、前列腺癌(miR-23a)和心肌纤维化(miR-29)^[14]。

近年来,miRNA 也受到我国医药工作者的关注。成都中医药大学王米渠、韩玉萍用 miRNA 芯片探讨糖尿病肾虚血瘀证患者的 miRNA 表达差异,发现糖尿病候选差异 miRNA 3 条(其一为 miR-32),肾血血瘀证候选差异 miRNA 2 条^[15]。潘运宝等用 miRNA 芯片探讨了小柴胡汤体外对低分化鼻咽癌 CNE-2 细胞的作用,发现在被检测的 326 个

miRNA 中,有 10 个上调、1 个下调,其中差异较显著是 miR-513, miR-498, miR-210 和 miR-602^[16]。冯明光、莫寅元、江琼用西洋参提取物体外处理人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,随着细胞增殖的抑制,有 miR-145, miR-205 表达升高, miR-196a 表达的下降^[17]。唐妮等和莫曾南、刘红军等分别用姜黄素体外处理人肺癌 A549/DDP 细胞或人膀胱癌 T24 细胞,随着细胞增殖的抑制,有 miR-186 表达降低^[18],或 miR-181b, miR-138, miR-149, miR-339-5p, miR-193b, miR-455-3p, miR-744 的上调^[19]。骆丹、周炳荣发现黄芩苷能减轻紫外线照射小鼠皮肤所致光产物和炎症反应的同时,可使 1 个 miRNA 上调、3 个下调,这些差异表达 miRNA 的靶点与 DNA 损伤修复通路相关^[20]。方中英等探讨了王不留行增乳活性单体邻苯二甲酸二丁酯对牛泌乳中期乳腺上皮细胞 miRNA 表达的影响,发现它能抑制 miR-21 表达以外,也与催乳素一样能抑制 miR-143, miR-125, miR-195 等的表达^[21]。

4 张辰宇论文提出的问题

今年 9 月,南京大学张辰宇等^[1]在《Cell Research》上发表的论文提出:外源性的植物 miRNA 可以在多种动物的血清和组织内检测到,它们主要是通过进食的方式摄入体内。其中,miR-168a 是一种稻米中富含的同时也是中国人血清中含量最为丰富的一种植物 miRNA。它可与人或小鼠的低密度脂蛋白受体接头蛋白 1 (LDLRAP1) 的 mRNA 结合,抑制其在肝脏的表达,进而减缓低密度脂蛋白从血浆中的清除,说明食物中的外源性植物 miRNA 可以通过调控哺乳动物体内靶基因表达的方式影响摄食者的生理功能。这一发现除了拓展 miRNA 的功能、揭示动植物间相互作用的新途径以外,就中医药而论,可能提示 miRNA 是中药一类新的活性成分。

5 展望

微小核糖核酸是 20 年来、特别是近 10 年来在基因组学和转录组学中的重大进展。它通过对靶基因 mRNA 翻译过程的抑制,在生命活动和疾病发生发展中起着广泛而复杂的调节作用。就医药学而论,它在诊断和疗效评价上既是一类新的生物标记物,在治疗和药物干预上也是一类新的作用靶标,在中药作用的物质基础上又是一类新的活性成分。近年来,国内虽已开始关注它在中医药研究中的应用,但还仅仅是开始,希望有条件的单位对之开展深入和相互验证性研究,为中医药学的发展提供新的契机。

[参考文献]

[1] Zhang L, Hou D, Chen X, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA[J]. Cell Research, 2011, 10:158.

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

[3] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*[J].

Cell, 1993, 75 (5): 855.

[4] Reinhart B, Slack F, Basson M, et al. The 21-nucleotide-let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 2000, 403 (6772): 901.

[5] 王岷, 刘红宇, 陈军. 微小 RNA 研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2008, 11(4): 582.

[6] Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease[J]. Physiol Rev, 2011, 91(3): 827.

[7] Zeng Y. Regulation of the mammalian nervous system by MicroRNAs[J]. Mol Pharmacol, 2009, 75(2): 259.

[8] Wang Z, Lu Y, Yang B. MicroRNAs and atrial fibrillation: new fundamentals [J]. Cardiovasc Res, 2011, 89(4): 710.

[9] Petri A, Lindow M, Kauppinen S. MicroRNA silencing in primates: Towards development of novel therapeutics [J]. Cancer Res, 2009, 69(2): 393.

[10] Du L, Alexander Pertsemliadis A. Cancer and neurodegenerative disorders: pathogenic convergence through microRNA regulation [J]. J Mol Cell Biol, 2011, 3(3): 176.

[11] 神津知子. microRNA 异常と疾患 [J]. 医学のゆみ, 2011, 238(5): 463.

[12] Neetu Dahiya N, Morin P J. MicroRNAs in ovarian carcinomas [J]. Endocr Relat Cancer, 2010, 17 (1): F77.

[13] Ma X, Buscaglia L E B, Barker J R, et al. MicroRNAs in NF- κ B signaling [J]. J Mol Cell Biol, 2011, 3 (3): 159.

[14] 尾崎彦彦, 落谷孝广. miRNA 医药による治疗への展开 [J]. 医学のゆみ, 2011, 238(5): 524.

[15] 韩玉萍. 糖尿病双生子肾虚血瘀证的表观遗传研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2010.

[16] 潘运宝, 夏洪平, 杨惠玲, 等. 复方小柴胡汤调控 microRNA 抑制鼻咽癌细胞增殖 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(5): 323.

[17] 江琼. 细胞周期调控蛋白 cyclin D1 基因靶向 microRNAs 的预测、系统验证及西洋参提取物处理人乳腺癌细胞的表达谱分析 [D]. 杭州: 浙江大学, 2010.

[18] 唐妮, 张垠, 杜永平. 姜黄素通过下调 miR-186 促进人肺癌细胞 A549/DDP 凋亡 [J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(4): 301.

[19] 刘红军. 姜黄素对膀胱癌细胞株 T24 miRNA 表达谱的影响及其机制的探讨 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2011.

[20] 周炳荣. 黄芩苷干预 UVB 辐射后皮肤光损伤及 microRNA 表达谱的实验研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2009.

[21] 方中英, 佟慧丽, 李庆章, 等. 中药王不留行增乳活性单体及催乳素对奶牛乳腺上皮细胞特异性 miRNA 的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(8): 230.