

血液循环和植物来源 miRNA 的研究进展

杨中保 综述, 彭 军 审校

(中南大学药学院药理学系, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 循环 miRNA; 植物来源 miRNA; 疾病标记物; 中药机制

[摘要] miRNA 是一类 19~25 个核苷酸大小的非编码 RNA, 参与了基因的转录与翻译的调节, 广泛参与了哺乳动物体内肿瘤和心脑血管疾病等的发生、发展过程。最近研究表明, 外周血液中存在 miRNA, 具有良好的稳定性。循环中某些 miRNA 水平变化与某些疾病的发生、发展和预后密切相关, 可能是一种新的疾病生物标记物。植物来源的 miRNA 可以稳定地存在于动物的血液, 并参与了机体多种靶蛋白的调控。检测血液中植物源性 miRNA 水平的变化, 对于评估中药的疗效和阐明其作用机制具有重要意义。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

The Advance in Research on Circulating and Plant-Driven miRNA

YANG Zhong-Bao, and PENG Jun

(Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Science, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China)

[KEY WORDS] Circulating miRNA; Plant-derived miRNA; Disease Biomarker; Mechanisms of Chinese Medicine

[ABSTRACT] MiRNA are non-coding RNAs with 19~25 nucleotides in length, which play an important role in regulation of gene transcription and translation and greatly contribute to the development of tumor and cardiocerebral vascular diseases. Recently studies show that miRNAs stably exist in the peripheral blood. Changes of miRNA levels in the circulation are closely related to the occurrence, development and prognosis of multiple diseases. Therefore miRNAs may be a novel class of biomarkers for diseases. Plant-derived miRNAs can also stably exist in the blood and participate in the regulation of many target proteins of animals. It is of great significance to assess the efficacy of traditional Chinese medicine and to clarify the underlying mechanisms through examining the changes of plant-derived miRNA levels in the blood.

miRNA 是一类 19~25 个核苷酸大小的非编码的 RNA, 通过与靶基因 mRNA 3'UTRs 完全或不完全配对沉默哺乳动物体内大约 30% 蛋白编码基因。研究表明, miRNA 在哺乳动物体内的血清和血浆中稳定存在, 参与调节体内诸多生物学过程如细胞分化、凋亡、增殖等, 是一种重要的疾病标记物^[1]。miRNA 也存在植物中, 某些 miRNA 非常保守, 仅在植物中发现。新近发现, 服用天然药物或食物可引起人血液中 miRNA 表达谱的改变, 这为判断中药疗效和解释药物作用机制提供了新思路。

1 miRNA 简介

miRNA 是一类全长为 19~25 nt 的单链小分子

RNA, 由茎环结构的转录前体加工而成^[2]。miRNA 编码基因经 RNA 聚合酶 II 转录出初级转录本 (pri-miRNA), 经过 RNase III Droscha 的剪切和 Exportin-5/Ran-GTP 转运等过程, 最后在胞浆加工和解链形成成熟的 miRNA 分子。单链的 miRNA 与含 Argonautes 的 RNA 沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 形成 RISC-miRNA 复合物, 然后结合到靶基因 mRNA 的 3'UTR, 通过 Ago 蛋白序列特异性地与靶基因 mRNA 互补配对使其变得不稳定或抑制它的转录后翻译, 从而调控靶标基因的表达 (图 1)^[3,4]。同一个 miRNA 分子可以调控多个基因的表达, 而同一个基因可同时受到多种 miRNA 调控。目前人类基因组中已经确定的 miRNA 有几百

[收稿日期] 2012-04-27

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30971194)

[作者简介] 杨中保, 博士研究生, 主要从事心血管药理学研究, E-mail 为 yangzhongbao1984@163.com。通讯作者彭军, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心脑血管药理学研究, E-mail 为 junpeng@csu.edu.cn 或 junpeng168@yahoo.com。

个以上,它们参与细胞发育、分化、增殖、凋亡等病理生理过程,具有重要的病理生理学意义^[5]。

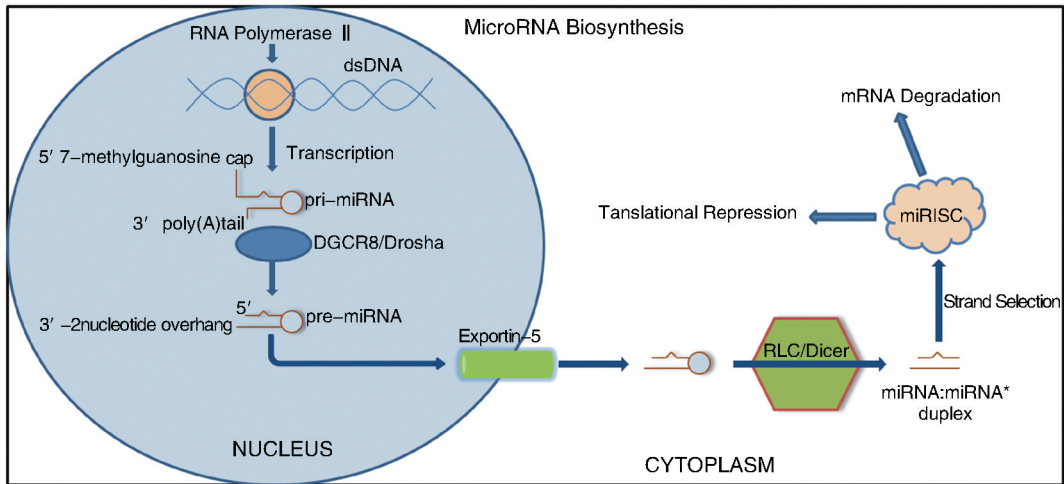


图 1. miRNA 的生物合成、转运及功能模型

Figure 1. Model of miRNA biogenesis, transportation and function

2 血液循环中的 miRNA: 一种新的疾病标志物?

2.1 外周血中 miRNA 的特性

Mitchell 等首先报道 miRNA 存在于外周血液中。血液中的 miRNA 通常包裹于外核体、微粒和凋亡小体,参与囊内运输,或存在于脂蛋白等复合物(如 HDL-miRNA、Ago2/miRNA)中参与囊外运输^[6]。有趣的是,虽然血液中存在大量的核糖核酸酶,但动物和人外周血中的 miRNA 相当稳定^[7]。Zhang 等发现 miRNA 具有很强的抗 RNase A 水解能力,经历 3 h 的 RNase A 消化后,一半以上的 miRNA 分子是完整的,而对照的大分子 RNA 完全降解。采用其它不同的极端条件(如高温、延长保存期、反复冻融等)处理,发现 miRNA 的稳定性没有明显改变^[8],可能是因其与膜或者蛋白结合而受到很好的保护^[9]。除了内源性 miRNA 外,外周血也能检测到天然药物或食物来源的 miRNA。Zhang 等发现大米来源的 miRNA 可以通过老鼠的胃肠道进入血循环^[8],而且同样具有很好的稳定性。即使用过碘酸钠氧化处理血清或者血浆,仍然能检测到相当量的植物来源的 miRNA。植物来源 miRNA 的超强稳定性可能与它具有 2'-O-甲基化-3'末端有关^[10,11]。

2.2 外周血中 miRNA 的临床意义

2.2.1 外周血 miRNA 与癌症 血清中的 miRNA 在多种疾病中具有指纹作用,可能是一类新的生物标记物,可用于癌症的诊断。miRNA 在肿瘤的发生发展中起着重要的作用。Lodes 等^[12]证明乳腺癌、

肺癌、直肠癌、卵巢癌、前列腺癌患者血清中的 miRNA 能精确地区分患者和正常者。循环中的 miRNA 在不同癌症中的表达水平不同,表现出一定的特异性。在肺癌患者中,肺部肿瘤特异的 12 个 miRNA,如 hsa-miR-17-3p、hsa-miR-21、hsa-miR-106a、hsa-miR-146、hsa-miR-155、hsa-miR-191、hsa-miR-192、hsa-miR-203、hsa-miR-205、hsa-miR-210、hsa-miR-212 及 hsa-miR-214 在外周血中的表达比正常者明显要高。在前列腺癌患者中,血清中的 miR-21、miR-141 和 miR-221 表达丰富,更有趣的是,3 种 miRNA 的表达水平在发生转移和局部晚期的前列腺癌患者中存在明显差异,与局部晚期的患者相比,在已转移的患者中表达水平明显要高^[13]。此外,血浆中的 miR-141 的表达水平与前列腺癌特异的抗原存在正向相关性,它在癌症检测方面表现出高达 60% 的敏感性和 100% 的特异性^[14]。由此可见,循环中的 miRNA 可以作为癌症筛查和鉴定的潜在指标^[13,14]。

2.2.2 外周血中 miRNA 与心脏疾病 循环中的 miRNA 还参与了心脏疾病的发生发展。Jeyaseelan 等^[15]发现进行脑中动脉封闭再灌注 24 h 和 48 h 的 SD 大鼠的血浆中分别能检测到 20 个和 25 个 miRNA 转录本,miRNA 的表达以及表达水平随灌注时间的不同存在差异,表明 SD 大鼠血浆中 miRNA 的表达水平与缺血损伤的程度存在相关性。循环中的 miRNA 同样与人类心肌损伤的程度相关。Corsten 等^[16]发现心肌相关的 miR-208b 和 miR-499 在不同心肌损伤患者中表达呈现以下特点:在急性心肌梗死患者血浆中

miR-208b 和 miR-499 的表达水平分别是正常者的 1600 倍和 100 倍,且与血浆中的肌钙蛋白 T 存在相关性;在病毒性心肌炎患者的血浆中二者的表达水平分别是正常者的 30 倍和 6 倍;在急性心力衰竭患者的血浆中只有 miR-499 显著升高;在舒张期功能失常患者的血浆中二者与正常者相比差异不显著。血浆中 miR-126 的表达水平与充血性心力衰竭和冠心病相关,Fukushima 等^[17]研究发现,充血性心力衰竭患者循环中的 miR-126 水平与脑钠素、年龄及心力衰竭的等级负相关,Fichtlscherer 等^[18]发现冠心病患者血浆中 miR-126 显著下降。可见,循环中的 miRNA 是心力衰竭和冠心病等疾病诊断和预后的检测指标^[17-19]。

2.2.3 外周血中 miRNA 与动脉粥样硬化 动脉粥样硬化的病因十分复杂,它的发生发展与载脂蛋白的多态性、脂蛋白脂肪酶的多态性、遗传易感性及高胆固醇血症等有关,其机制均涉及内皮损伤^[20]。miRNA 在血管内皮功能调节中发挥重要作用。近来的研究表明,miR-92a、miR-145、miR-217、miR-223 等可以稳定地存在于血浆中,这些 miRNA 的靶基因大多涉及对血管内皮功能的调节作用,其水平变化与动脉粥样硬化发生和预后存在一定相关性,可能成为动脉粥样硬化症新的诊断和预后标记物。例如,有研究发现,与正常受试者相比,家族性高脂血症患者血浆中 miR-223 水平增加了 3780 倍^[21],已知 miR-223 具有调节高密度脂蛋白水平,促进动脉硬化的发生发展作用,因此,外周血 miR-223 水平变化可能对于评估和解释动脉硬化的发生发展具有重要参考价值。又如,在动脉粥样患者中,miR-217 的表达显著上调,可抑制 SirT1 的表达,加速了血管内皮细胞的衰老,促进了动脉粥样硬化的发生^[22],但外周血 miR-217 水平变化是否与动脉硬化发生发展密切相关还有待进一步证实。

2.3 外周血中 miRNA 的检测

Mitchell 通过分离血浆构建 miRNA 文库并测序检测,发现许多 miRNA 稳定存在于血浆中^[23]。此后,如何高效而准确的检测 miRNA 成为人们关注的热点。聂宇等^[24]对常规 TRIzol 法提取血清 miRNA 进行改良,证明此法可以提高目的 miRNA 的检出水平。高通量测序技术(Solexa 技术)常用于血清中 miRNA 的分析^[25]。Laterza 等^[26]使用 qPCR 对 miRNA 分析发现,许多 miRNA 在人和老鼠中具有组织特异性,如 miR-122、miR-124 和 miR-133a 分别是肝脏、脑和肌肉特异性的 miRNA。利用 Solexa 测序,有人发现 miRNA-168a 作为一植物外源微小 RNA 稳定地存在于人的血浆中并参与了低密度脂蛋白

的清除^[8]。张晓娟等^[27]成功的建立了一套运用实时荧光定量 PCR 技术检测血清/血浆 miRNA 的方法^[27]。除上述方法外,还有 miRNA 芯片、深度测序等检测方法。

3 植物来源的 miRNA:中药作用的新机制?

根据中药现代药理学研究,主要有两大类抗肿瘤中药:一类是细胞毒药物,即对肿瘤细胞具有直接杀伤作用,主要包括天然抗肿瘤活性成分,可直接抑制肿瘤细胞的生长。第二类是具有免疫增强作用、生物反应调节剂样作用的药物,通过调节脏腑气血阴阳的失衡,改善机体全身的病理状态,增加机体自身的抗病力^[28]。中药丹参对人宫颈癌细胞株(ME180)具有较好的诱导分化作用;当归补血汤(黄芪、当归等)能明显诱导 p53 蛋白高度表达;六味地黄汤能保护血红蛋白、白细胞、血小板功能,保护 NK 细胞活性,增强 T、B 淋巴细胞转化,提高肿瘤细胞内 cAMP 含量,增强机体单核巨噬细胞系统的吞噬功能,促进脾淋巴细胞的增殖能力,提高血中淋巴细胞数量等^[28]。中医药如此多的功能,是不是仅由某些化学成分的作用产生呢? miRNA 的出现,让我们对中药有了一个新的认识。Zhang 等^[8]发现过半数的植物 miRNA 存在于血清和血浆中的 MVs,这些 miRNA 可以通过食物等被胃肠道吸收,特异性地包入 MV,从而作用于靶细胞或靶组织,充当细胞间通讯的信号分子,促进或抑制疾病的发生。中药复方小柴胡汤对鼻咽癌高分化鳞癌细胞株 1(CNE-1)和鼻咽癌低分化鳞癌细胞株 2(CNE-2)的生长具有抑制作用^[29],但其作用机制并没有完全弄清楚。潘运宝等^[30]用复方小柴胡汤处理高分化鼻咽癌细胞 CNE-1 和低分化鼻咽癌细胞 CNE-2,用 miRNA 芯片检测,结果发现处理的 CNE-2 细胞中,所检测的 326 个 miRNA 中,有 10 个 miRNA 上调,1 个 miRNA 下调,其中检测量绝对值在 1000 以上的 miRNA 有 hsa-miR-513、hsa-miR-498、hsa-miR-210 和 hsa-miR-602^[30]。随着对植物中 miRNA 研究的深入,人们会逐渐意识到,miRNA 不仅是一类新的疾病标记物,而且还是一种新型的药物组分,作为中医药的成分之一,可能是某些中医药疗效作用机制的新解释。

4 结 语

血液循环中内源性 miRNA 的稳定存在和可检

测性,为许多疾病,如癌症、动脉粥样硬化等疾病的诊断和预后判断提供了新的指标,而植物可作为血液循环中外源性 miRNA 的补充者则为探讨我国中药作用机制提供了新思路。中药是中国几千年来文化精髓,但其作用机制远未阐明。自从 Zhang 等发现外源植物的 miRNA 可以吸收进入体内稳定存在并产生调控作用后,提示中药的调控机制可以从 miRNA 角度去解释。大多天然药物具有很好的血管内皮保护作用,是寻找抗动脉硬化新药的有效途径,阐明其作用机制,将为开发抗动脉硬化新药提供新思路。鉴于目前 miRNA 的研究还处于初级阶段,许多物种特异性的 miRNA 还未曾建立文库,同时检测 miRNA 的费用也很昂贵,这些都限制了该领域的研究进展。如果我们能建立每个物种的 miRNA 文库,并阐明其功能,这对于中药作用机制的研究和中药的发展无疑具有重要意义。

[参考文献]

[1] Ha TY. MicroRNAs in human diseases: from lung, liver and kidney diseases to infectious disease, sickle cell disease and endometrium disease[J]. *Immune Network*, 2011, 11 (6): 309-324.

[2] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function[J]. *Cell*, 2004, 116 (2): 281-297.

[3] Winter J, Jung S, Keller S, et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 228-234.

[4] Baley J, Li J. MicroRNAs and ovarian function[J]. *J Ovarian Res*, 2012, 5: 8.

[5] 郝克红, 段涛, 王凯, 等. microRNA 的研究进展[J]. *医学综述*, 2011, 17 (19): 2 284-287.

[6] Zampetaki A, Willeit P, Drozdov I, et al. Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 93: 555-562.

[7] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. *Cell Res*, 2008, 18: 997-1 006.

[8] 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*, 2012, 22: 107-126.

[9] Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, et al. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11 (9): 1 143-149.

[10] Grimson A, Srivastava M, Fahey B, et al. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals[J]. *Nature*, 2008, 455: 1 193-197.

[11] Hartig JV, Forstemann K. Loqs-PD and R2D2 define independent pathways for RISC generation in *Drosophila*[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 3 836-851.

[12] Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, et al. Detection of cancer with

serum miRNAs on an oligonucleotide microarray[J]. *PLoS ONE*, 2009, 4: 622-629.

[13] Yaman Agaoglu F, Kovancilar M, Dizar Y, et al. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer[J]. *Tumor Biol*, 2011, 32 (3): 583-588.

[14] Mitchell PS, Parkin PK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105 (30): 10 513-518.

[15] Jeyaseelan K, Lim KY, Armugam A. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion[J]. *Stroke*, 2008, 39: 959-966.

[16] Corsten MF, Dennert R, Jochems S, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010, 3 (6): 499-506.

[17] Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, et al. Assesment of plasma miRNAs in congestive heart failure[J]. *CIR J*, 2011, 75: 336-340.

[18] Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease[J]. *Circ Res*, 2010, 107: 677-684.

[19] Rabinowitz G, Gercel-Taylor C, Day JM, et al. Exosomal microRNA: A diagnostic marker for lung cancer[J]. *Clin Lung Cancer*, 2009, 10 (1): 42-46.

[20] 杨永宗. 中国动脉粥样硬化病理生理学研究近况[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12 (4): 481-496.

[21] Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13 (4): 423-433.

[22] Menghini R, Casagrande V, Cardellini M, et al. MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1[J]. *Circulation*, 2009, 120 (15): 1 524-532.

[23] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105 (30): 10 513-518.

[24] 聂宇, 张洋, 韩变梅, 等. 常规 TRIzol 法提取血清 microRNA 的改良[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2011, 25 (5): 427-432.

[25] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. *Cell Res*, 2008, 18 (10): 997-1 006.

[26] Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW, et al. Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury[J]. *Clin Chem*, 2009, 55 (11): 1 977-983.

[27] 张晓娟, 董静, 马红霞, 等. 血清/血浆 microRNA 检测方法探讨与建立[J]. *南京医科大学学报*, 2011, 31 (4): 529-531.

[28] 肖颖, 李覃. 中医药抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. *中国医学杂志*, 2008, 6 (3): 38-40.

[29] 林子洪, 夏洪平, 傅明, 等. 小柴胡汤对鼻咽癌细胞生长的抑制作用[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33 (22): 2 670-673.

[30] 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*, 2010, 2 (5): 323-327.