

文章编号: 1007-4627(2009)02-0172-05

# MicroRNA发现的研究现状及重离子辐照相关应用前景<sup>\*</sup>

丁楠, 周光明<sup>#</sup>

(中国科学院近代物理研究所, 甘肃兰州 730000)

**摘要:** MicroRNA(miRNA)是一类大小为19—24个核苷酸的非编码RNA, 它们通过与靶基因的信使RNA(mRNA)结合在转录后水平调节靶基因的表达, 因而在广泛的生物学过程中发挥重要作用。首先从miRNA的获得和鉴定两方面对目前miRNA发现工作进行了概括, 然后分析和总结了近年来人源miRNA发现工作的现状, 最后提出有关新miRNA发现工作的新想法。

**关键词:** microRNA(miRNA); 新miRNA发现; 重离子辐照

**中图分类号:** Q522      **文献标识码:** A

## 1 引言

MicroRNA(miRNA)是一种内源性非编码小分子RNA, 由19—24个核糖核苷酸组成。miRNA广泛存在于拟南芥、线虫以及人类等多种动植物的细胞中<sup>[1]</sup>, 甚至在病毒的基因组中也有miRNA基因编码<sup>[2]</sup>。miRNA的主要功能是微调基因的表达, 它们不影响信使RNA(mRNA)的转录, 而是以碱基互补配对的方式结合到靶mRNA的3'非翻译区(3'UTR), 从而调节靶mRNA的翻译。miRNA最早发现于1993年, Lee等<sup>[3]</sup>在秀丽线虫(*C. elegans*)中发现了控制着线虫时序性发育的*lin-4*。随后的几年里, 许多研究相继发现了这类小分子RNA<sup>[4]</sup>, 并证明它们为一类非编码基因<sup>[5]</sup>, 他们将这些具有时空表达特异性的非编码小分子RNA命名为miRNA<sup>[6]</sup>。由于miRNA在基因转录后水平上的重要调控功能, 这类新发现的小分子RNA受到国内外学者的极大关注。目前, 在多种物种中共发现8419种miRNA(miRBase Release 12.0: 2008.9)<sup>[7-10]</sup>。这些miRNA的功能主要是调节细胞分化、增殖、凋亡、肿瘤形成以及疾病发生过程有关的基因表达。而且据推测, 人类中三分之一的基因都受到miRNA的调控。因此, 对miRNA的深入研究, 势必有利于人们对生物体尤其是人类的生理、病理机制的理解, 并为疾病的诊断和治疗提供理论基础。

迄今为止, 发现并得到实验证实的人源miRNA有695种(miRBase Release 12.0: 2008.9)<sup>[7-10]</sup>, 并且发现它们的序列高度保守; 再加上通过生物信息学分析推测出的miRNA, 其数量已在1000以上<sup>[5, 11]</sup>, 但目前仍然很难准确估算人类和其它哺乳类动物中到底有多少miRNA<sup>[12]</sup>。因而, 尽管已有大量的人源miRNA被鉴定, 但是miRNA新基因的发现仍然是miRNA领域的研究重点之一。由现有人源miRNA基因的发现经验来看, 新思路的开拓和新技术的应用是新miRNA发现的关键。

由于miRNA的调节功能, 理论上它应该会响应外界刺激而发生表达改变, 其中表达上调的miRNA有较大可能被直接克隆得到。因此, 借助外界刺激可能有助于发现新的miRNA。根据辐射生物学研究结果, 重离子辐照会对生物造成强烈的电离辐射损伤<sup>[13]</sup>, 是一种相当激烈的外界刺激, 一些在正常生境中不表达或表达量极低的miRNA极有可能在其刺激下表达或提高其表达量。因此, 考察重离子辐照处理后生物的miRNA表达情况, 将极有可能发现新的miRNA。

本文对miRNA发现与鉴定等研究现状特别是人源miRNA的发现与研究进展进行了综述, 并对重离子辐照在miRNA新基因发现领域的应用做出展望。

\* 收稿日期: 2008-10-10; 修改日期: 2008-11-19

\* 基金项目: 中国科学院百人计划资助项目(O760140BR0)

作者简介: 丁楠(1982-), 男(汉族), 河南洛阳人, 硕士, 从事辐射生物学研究; E-mail: dn@impcas.ac.cn

# 通讯联系人: 周光明, zhougm@impcas.ac.cn

## 2 新miRNA发现

### 2.1 直接克隆法

miRNA的大小一般为19—24个核苷酸, 实验中很容易丢失, 常规方法建立的cDNA文库中不包含这种基因。针对这些特点, 可从组织总RNA中富集大小在16—28个核苷酸的小分子RNA, 利用T4连接酶直接将人工合成的引物连接到RNA上, 然后用PCR反转录扩增这些序列, 构建cDNA文库, 再将这些cDNA克隆并测序。将克隆序列用NCBI中的Blast软件在该物种基因组数据库中进行同源性搜索, 然后用mfold程序进行二级结构预测分析, 印迹杂交具有发夹结构的小分子RNA<sup>[14, 15]</sup>以检测其表达水平, 最终将符合miRNA标准的小分子RNA鉴定为新的miRNA。这种方法的应用比较普遍, 大部分miRNA都是用这种方法发现的。但是, miRNA的表达大多具有组织和时相特异性, 只在特定的组织和发育阶段出现; 另外, 由于mRNA和其他内源性非编码RNA降解产物的干扰, 通过构建文库寻找新miRNA具有一定的局限性<sup>[16, 17]</sup>。

### 2.2 生物信息学方法

直接克隆法获得的大量miRNA特征信息及多种模式生物基因组测序工作的相继完成, 使得全基因组搜索miRNA成为可能<sup>[18]</sup>。目前, 人们依据已知miRNA的特征信息及其与靶分子的作用方式建立了多种计算机识别方法。

#### 2.2.1 根据miRNA的序列和结构保守性进行分析的方法

在不同物种中成熟miRNA均是从具有茎环状二级结构的前体加工而来, 具有较高的序列同源性, 并且多数miRNA基因在进化上高度保守, 这些特点构成了生物信息学筛选的基础。该方法依照比较基因组学原理结合生物信息软件在已测序基因组中进行搜索比对, 根据同源性的高低再进行RNA二级结构预测, 将符合条件的候选miRNA与已经通过实验鉴定的miRNA分子进行比较分析, 最终确定该物种miRNA的分布及数量<sup>[16]</sup>。目前, 国际上使用较为普遍的两个计算机分析工具是miRseeker<sup>[19]</sup>和miRscan<sup>[20]</sup>, 利用这两个工具已成功鉴定出大量的miRNA基因。由于miRseeker和miRscan的高灵敏度和成功率, 它们已被用于人源miRNA基因的寻找。

#### 2.2.2 根据靶基因的序列和结构保守性进行分析的方法

同源性搜索主要是在相近物种间搜索同源的miRNA, 如果想要找出新miRNA就必须采用其他搜索策略, 例如根据靶序列的保守性搜索miRNA。

在生物体内, 多个miRNA可能作用于同一个mRNA靶分子; 另一方面, 同一个miRNA也可能调控多个靶分子的表达。目前, 一些实验室利用靶序列潜在的保守性作为识别miRNA的一个重要的依据<sup>[21]</sup>。在成熟miRNA中, 5'区域2—8位的7个核苷酸被称为种子序列, 它们在miRNA与靶mRNA结合过程中起着非常重要的作用<sup>[22]</sup>。通过基因组系统比较分析法, Xie等<sup>[23]</sup>对多个物种的基因组进行对比分析, 最后在它们mRNA的3'UTR区发现了106个保守的短序列, 其中72个与大约一半已知miRNA的5'端能够结合, 组成6—8个碱基对的“种子”双螺旋。根据这一结果, 他们利用mRNA上完整的保守短序列在人类基因组中预测到了129个新miRNA。同样的靶序列预测miRNA方法也被成功应用于拟南芥、果蝇和线虫。

生物信息学方法只能用于已完成基因组测序的物种, 对序列未知的物种无能为力; 而且, 由于miRNA前体长度的可变性, 借助计算机寻找新基因有一定的遗漏, 所以大多数实验室将计算机分析与实验方法结合使用, 使得miRNA的发现量呈几何级数增长。

#### 2.2.3 使用miRNA芯片进行分析的方法

2004年, Nelson等<sup>[24]</sup>报道了一种基于RNA引物阵列的Klenow酶分析方法——RAKE (RNA-primed Array-based Klenow Enzyme)。该方法在miRNA microarray的基础上, 利用DNA聚合酶I的Klenow片段, 使miRNA与固定的DNA探针杂交, 可以灵敏、特异地检测miRNA, 有助于高通量快速筛选所有已知miRNA。Berezikov等<sup>[25]</sup>对这种方法巧妙地加以改进, 根据生物信息学预测结果, 在每个可能包含新miRNA的茎环结构上按步移的方式设计了44个可能的miRNA探针, 以此来辨别新miRNA的3'末端。由于新miRNA的5'末端可以使用软件预测, 因此结合RAKE芯片分析以及生物信息学预测, 可以得到可能的miRNA。

Plasterk等<sup>[25]</sup>选取了259个已知的小鼠miRNA

及687个在人和鼠中保守的可能miRNA,设计制作一个包含44000个探针的miRNA芯片,结合Northern blot鉴定,发现了81种新的人源miRNA和348种新的小鼠miRNA。

### 3 miRNA的鉴定

miRNA的判定标准包括以下几条<sup>[26]</sup>: (1) 表达能够与特定大小的总RNA样品杂交得到22个碱基对(~22nt)的产物(即需要Northern杂交或引物延伸反应验证); (2) 结构 前体存在发夹状的二级结构,并且成熟miRNA序列在发夹的一条臂上; (3) 保守性 成熟miRNA序列与二级结构在不同物种间有保守性; (4) 在Dicer突变体系中,前体的积累增多。由于Dicer突变对于一些细胞系来说技术难度较高,最后一条并不常用。

只符合一条上述标准是不足以判定为新miRNA的。通常来说,第一条标准加上第二条标准或者第一条加上第三条就足够了。当小分子RNA的表达量太低不足以使用杂交检测,只符合第三条标准时也可以被认定。然而,当小分子RNA的序列并不是由cDNA克隆获得时,前三条标准必须同时满足。如果小分子RNA仅是被预测到而不能被实验检测到,那么应该标明其在Dicer突变系统中前体的积累增多,而不是前体发卡结构保守性(即第三、四条标准)。miRNA与其在其他物种中的保守前体序列高度相似,可认为同源序列而不必通过实验验证。

具体来说,miRNA的检测方法主要有以下几种:第一种,Northern blot是现在检测miRNA表达最主要的手段,所有克隆和生物信息学分析得到的miRNA都需要经过Northern blot来验证。这种方法的缺点在于不能进行高通量检测。第二种,RT-PCR也被用来检测miRNA前体的表达水平,但miRNA前体的表达水平并不一定和成熟miRNA的表达水平一致。因此,在RT-PCR的基础上,人们进行了一些技术改进,使之能够检测低表达量的miRNA。实时荧光定量PCR(real-time PCR)可以很精确地定量分析miRNA的表达<sup>[27, 28]</sup>,也经常用于验证预测的miRNA。第三种,芯片技术(microarray)也被更广泛运用于miRNA表达的研究<sup>[29, 30]</sup>。Liu等<sup>[31]</sup>最先使用芯片技术研究了miRNA的组织特异性表达,而且通过Northern blot和real-time PCR进行了验证。芯片技术固然以

其高通量和并行处理的特点在基因表达分析中占据重要地位,但稳定性和可重复性比较差,且无法实现定量检测,因此后来又出现了多种改进的芯片技术。Luminex公司研制出的新一代生物芯片技术——液相芯片(liquichip)在悬浮溶液中进行,反应速度快而且检测指标多,不但为后基因组时代科学研究提供强大的技术支持,而且提供了高通量的新一代分子诊断的技术平台<sup>[32]</sup>。

### 4 人源miRNA发现研究现状

自从2002年发明了两端加接头克隆小片段RNA的方法<sup>[17]</sup>以来,先后已有695种人源miRNA被发现和鉴定(图1)。对人类基因组序列的分析推测,人类约有1000种miRNA<sup>[5, 11, 33]</sup>;最新的实验数据也显示,人源miRNA的总数量至少在800种以上<sup>[34]</sup>,因而还有很多的miRNA未被发现。

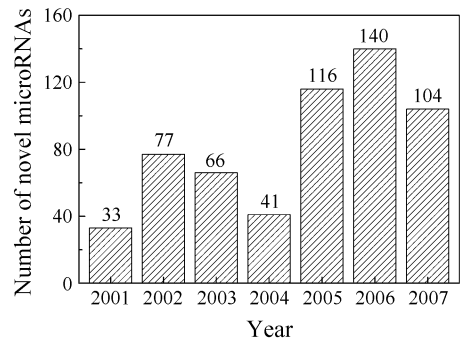


图1 每年新miRNAs的发现情况<sup>[7-10]</sup>

随着miRNA发现工作的进行,表达量较高的miRNA基本上已被克隆鉴定,由于已知miRNA的反复出现以及其它小分子RNA(如rRNA等)的干扰,利用克隆法进行人类新miRNA的发现越来越困难,因此2003年至2004年间发现的新miRNA数量明显下降。由于miRNA的表达具有较高的组织特异性,人们将目光转向特异的组织(包括肿瘤组织)以及个体生长发育的不同阶段,2005年,Pfeffer等<sup>[35]</sup>使用传统方法在人胚胎干细胞中找到了36个miRNA基因。时至今日,这种方法依然非常有效,2008年,Westermann等<sup>[36]</sup>从成神经细胞瘤中克隆到29个新miRNA。生物信息学分析结合实验的验证和生物芯片技术的应用促进了新miRNA的发现。Berezikov等<sup>[25]</sup>在2006年9月利用RAKE技术发现并鉴定了81个新的人源miRNA。总体来说,新思路的开拓和新技术的应用是人源新miRNA发现

的关键。

## 5 重离子辐照在新miRNA发现研究中的应用前景

根据辐射生物学研究结论, 电离辐射能够通过直接作用或间接作用, 致使细胞产生膜结构损伤、核酸断裂、代谢紊乱等伤害<sup>[13]</sup>, 伤害达到一定强度后能够致使细胞死亡, 因而被广泛应用于癌症的治疗。其中, 重离子辐照不仅能够产生自由基, 而且能够利用其能量直接打断DNA双链。在相同辐射剂量下, 重离子辐照对细胞的胁迫作用最强, 是一种相当激烈的外界刺激。

最早有关电离辐射诱导miRNA表达变化的研究见于2006年, Ishii等<sup>[37]</sup>发现<sup>137</sup>Cs辐照的小鼠胚胎原纤维细胞中miRNA水平下降, 但是辐照后小鼠胚胎干细胞中的miRNA水平上升。但是Marsit等<sup>[38]</sup>使用 $\gamma$ 射线辐照人淋巴母细胞, 并没有检测到明显的miRNA表达改变。之后, 数篇文献都肯定了电离辐射改变生物体内miRNA的表达水平。例如, Xuefeng Zhou等<sup>[39]</sup>发现在UV-B辐照后在拟南芥中有11个家族的21个miRNA表达上调, Maes等<sup>[40]</sup>使用X射线辐照人成纤维细胞, 发现miRNA的表达随着辐照剂量以及辐照后时间而变化。但迄今为止, 国内外有关电离辐射诱导miRNA表达变化的研究仍旧很少, 而且研究集中于考察已知miRNA对辐照的响应, 并没有将电离辐射应用于新miRNA识别的研究。而重离子辐照致使细胞产生的损伤会激活一系列的修复机制<sup>[13]</sup>, 作为基因表达的重要调控因子, 一些在正常生境中不表达或表达量极低的miRNA极有可能在此时出现或提高其表达量。因此, 考察重离子辐照处理后活体动物或细胞的miRNA表达情况, 将极有可能发现新的miRNA。

## 6 展望

miRNA在基因表达调控方面发挥着重要作用, 是近年来分子生物学研究的一大热点。作为深入研究其功能与调节机制的基础, miRNA的发现工作极其重要。就人源miRNA而言, 虽然已经发现了大量miRNA基因, 但是人源miRNA的总数仍不明了, 新人源miRNA基因的发现工作依然非常重要。而今, 表达量较高的miRNA基本上都被克隆鉴

定, 新miRNA的发现越来越困难。我们课题组另辟蹊径, 尝试克隆鉴定电离辐照(尤其是重离子辐照)诱导表达的miRNA, 证明借助外界刺激细胞有助于新miRNA的发现, 这有可能成为miRNA发现领域新的发展方向之一。

### 参考文献 (References):

- [1] Bartel D P. *Cell*, 2004, 116: 281.
- [2] Pfeffer S, Zavolan M, Grässer F A, *et al.* *Science*, 2004, 304(5671): 734.
- [3] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. *Cell*, 1993, 75: 843.
- [4] Reinhart B J, Slack F, Basson M, *et al.* *Nature*, 2000, 403: 901.
- [5] Pasquinelli A E, Reinhart B J, Slack F, *et al.* *Nature*, 2000, 408: 86.
- [6] Zhou D G, Luo Y P, Li S G. *Biotechnology Bulletin*, 2005, 5: 20(in Chinese).  
(周冬根, 罗玉萍, 李思光. *生物技术通报*, 2005, 5: 20.)
- [7] Sanger Institute. <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>.
- [8] Griffiths-Jones S, Saini H K, Dongen S V, *et al.* *Nucleic Acids Research*, 2008, 36: D154.
- [9] Griffiths-Jones S, Grocock R J, Dongen S V, *et al.* *Nucleic Acids Research*, 2006, D34: 140.
- [10] Griffiths-Jones S. *Nucleic Acids Research*, 2004, 34: D109.
- [11] Tsuchiya S, Okuno Y, Tsujimoto G. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2006, 101(6): 267.
- [12] Berezikov E, Cuppen E, Plasterk R. *Nature Genetics*, 2006, 38(6): 261.
- [13] Xia Shouxuan. *Radiobiology(The First Edition)*. Beijing: Military Medicine Science Press. 1998, 1—21(In Chinese).  
(夏寿萱, *放射生物学(第一版)*. 北京: 军事医学科学出版社, 1998, 1—21.)
- [14] Gao J, Yang T T, Qiu X C, *et al.* *Chinese Journal of Cancer*, 2007, 26(6): 561(in Chinese).  
(高杰, 杨彬涛, 裘秀春等. *癌症*, 2007, 26(6): 561.)
- [15] Beuvink I, Kolb F A, Budach W, *et al.* *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(7): 52.
- [16] Wang J F, Zhou H, Chen Y Q, *et al.* *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(5): 1688.
- [17] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendecke W, *et al.* *Science*, 2001, 294(5543): 853.
- [18] Berezikov E, Plasterk R H. *Hum Mol Genet*, 2005, 14: 183.
- [19] Lai E C, Tomancak P, Williams R W, *et al.* *Genome Biol*, 2003, 4(7): 42.
- [20] Lim L P, Glasner M E, Yekta S, *et al.* *Science*, 2003, 299(5612): 1540.
- [21] Park W, Li J, Song R, *et al.* *Current Biology*, 2002,

- 12(17): 1484.
- [22] Lewis B P, Shih I H, Jones-Rhoades M W, *et al.* *Cell*, 2003, 115(7): 787.
- [23] Xie X, Lu J, Kulbokas E J, *et al.* *Nature*, 2005, 434(7031): 338.
- [24] Nelson P T, Baldwin D A, Scearce L M, *et al.* *Nature Methods*, 2004, 1(2): 1271.
- [25] Berezikov E, Tetering G V, Verheul M, *et al.* *Genome Research*, 2006, 16(10): 1289.
- [26] Kim V N. *Nature Reviews*, 2005, 6: 376.
- [27] Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, *et al.* *Cancer Research*, 2007, 67(13): 6092.
- [28] Moschos S A, Williams A E, Perry M M, *et al.* *BMC Genomics*, 2007, 8(1): 240.
- [29] Wassarman K M, Repoila F, Rosenow C, *et al.* *Genes Development*, 2001, 15(13): 1637.
- [30] Yan N, Lu Y, Sun H, *et al.* *Reproduction*, 2007, 134(1): 73.
- [31] Liu C G, Calin G A, Meloon B, *et al.* *Proc Nat Acad Sci USA*, 2004, 101(26): 9740.
- [32] Lu J, Getz G, Miska E A, *et al.* *Nature*, 2005, 435(7043): 834.
- [33] Negrini M, Ferracin M, Sabbioni S, *et al.* *Journal of Cell Science*, 2007, 120: 1833.
- [34] Bentwich I, Avniel A, Karov Y, *et al.* *Nature Genetics*, 2005, 37(7): 766.
- [35] Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, *et al.* *Nature Methods*, 2005, 2: 269.
- [36] Westermann F, Afanasyeva E A. *BMC Genomics*, 2008, 9: 52.
- [37] Ishii H, Saito T. *Med Chem*, 2006, 2: 555.
- [38] Marsit C J, Eddy K, Kelsey K T. *Cancer Res*, 2006, 66: 10843.
- [39] Zhou Xuefeng, Wang Guandong, Zhang Weixiong. *Molecular Systems Biology*, 2007, 3: 103.
- [40] Maes O C, An J, Sarojini H, *et al.* *Journal of Cellular Biochemistry*, 2008, 105(3): 824.

## Progress on Finding Novel MicroRNAs and Expectation of Heavy Ion Irradiation Application in This Field<sup>\*</sup>

DING Nan<sup>1</sup>, ZHOU Guang-ming<sup>#</sup>

(*Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China*)

**Abstract:** MicroRNAs(miRNAs) are one kind of small non-coding RNAs of 19—24 nucleotides that transcriptionally regulate the expression of target genes by binding to their mRNA and thus play a central role in gene regulation in a wide arrange of biological processes. In this paper, we reviewed the clone and identification of novel miRNAs, summarized recent work on novel human miRNA recognition, and proposed a potentially feasible way to discover more human miRNAs.

**Key words:** microRNA(miRNA); identification of novel miRNA; heavy ion irradiation

\* **Received date:** 11 Oct. 2008; **Revised date:** 19 Nov. 2008

\* **Foundation item:** Century Program of Chinese Academy of Sciences(O760140BR0)

# **Corresponding author:** Zhou Guang-ming, E-mail: zhougm@impcas.ac.cn