

·综述·

MicroRNAs 与胚胎干细胞研究

曾英¹, 蒋星军², 李贵妃¹, 任彩萍^{1*}

(1. 中南大学 肿瘤研究所, 中国湖南 长沙 410078; 2. 中南大学 湘雅医院 神经外科, 中国湖南 长沙 410008)

摘要: MicroRNAs (miRNAs) 是一种大小约 20~25 个碱基的非编码小分子 RNA, 一般通过特异性抑制靶蛋白翻译或降解靶基因 mRNA 发挥负调控基因表达的作用。胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)是从植入前早期胚胎内细胞团或原始生殖细胞中分离得到并能在体外长期培养的高度未分化的多能细胞系, 在揭示胚胎早期发育机理、药物筛选、临床再生医学等领域具有广泛的应用前景。最近研究发现 miRNAs 在 ES 细胞自我更新和分化过程中均发挥着重要的调控作用, 但具体调控机制尚未完全阐明。进一步深入研究 miRNAs 在 ES 细胞中的作用, 全面了解 ES 细胞自我更新和定向分化的机制是实现 ES 细胞广阔临床应用前景的基础。

关键词: MicroRNAs; 胚胎干细胞; 基因调控

中图分类号: Q28

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2010)01-0073-07

MicroRNAs and Embryonic Stem Cell Research

ZENG Ying¹, JIANG Xing-jun², LI Gui-fei¹, REN Cai-ping^{1*}

(1. Cancer Research Institute of Central South University, Changsha 410078, Hunan, China; 2. Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) represent a novel class of small endogenous non-coding RNAs with 20~25nt which can negatively regulate gene expression by inhibiting translation of target mRNAs or cleaving target mRNAs. Embryonic stem (ES) cells are pluripotent cells derived from inner cell mass of the blastocyst-stage embryo before implanting or isolated from primordial germ cells, which can be cultured indefinitely in undifferentiated state *in vitro*. ES cells have a broad application in studying mechanisms underlying early embryonic development, pharmaceutical research, clinical regenerative medicine, and so on. Recently, it has been found that miRNAs should play a crucial role in the self-renewal and differentiation of ES cells, while the accurate regulatory mechanisms have not been completely elucidated. Further studying the role of miRNAs in ES cells and comprehensively understanding the mechanisms underlying ES cell self-renewal and directed differentiation are the bases for wide applications of ES cells in the clinical regeneration medicine in the future.

Key words: MicroRNAs; embryonic stem cells; gene regulation

(*Life Science Research*, 2010, 14(1): 073~079)

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)是由植入前早期胚胎内细胞团(inner cell mass, ICM)或胚胎原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)分离得到并能在体外长期培养的高度未分化多能细胞系, 在认识细胞分化、胚胎发育机理、基因功能研究、动物模型制备、药物开发与

收稿日期: 2009-06-17; 修回日期: 2009-10-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30871246; 30200140); 湖南省自然科学基金资助项目(07JJ3038); 中南大学研究生创新课题(2340-74335000006; 2009ssxt224)

作者简介: 曾英(1982-), 女, 四川富顺人, 硕士研究生, 主要从事干细胞研究, Tel: 0731-84805451, E-mail: fightingzy@126.com; 蒋星军(1972-), 男, 湖南衡阳人, 主治医师, 博士, 与曾英并列为本文第一作者, 主要从事干细胞和神经外科研究, Tel: 0731-84327019, E-mail: jiangxingjun@sina.com; *通讯作者: 任彩萍(1972-), 女, 湖南浏阳人, 中南大学研究员, 博士, 博士生导师, 主要从事干细胞及鼻咽癌分子机制研究. Tel: 0731-82355066, E-mail: rencaiping@vip.sina.com

筛选、肿瘤研究、细胞组织和器官的修复和移植治疗等方面有着极其诱人的应用前景。1998年,美国 Thomson^[1]和 Shambloott^[2]两个研究小组分别从 ICM 和 PGCs 建立了人 ES 细胞系。最近,干细胞研究领域又获得了重大突破,多个研究小组报道通过在成体细胞中表达多个 ES 细胞自我更新相关的基因可逆转成体细胞的分化状态,诱导其转变成多潜能的干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS 细胞)^[3-6]。这些研究为干细胞临床移植治疗开辟了新的道路。一直以来,ES 细胞自我更新和定向分化的机制研究是生命科学领域的研究热点和重点之一。ES 细胞自我更新和定向分化能力受外部信号通路、转录因子、miRNAs、染色体稳定性及 DNA 甲基化等多种因素调控。最近的研究显示,miRNAs 可以通过特异性抑制靶基因 mRNAs 翻译或切割靶基因 mRNA 发挥负调控基因表达作用,在调控 ES 细胞自我更新和分化中起着重要作用^[7]。

1 miRNAs 概况

miRNAs 来源于 miRNA 基因转录和内含子剪接。经典的 miRNAs 生物合成途径是 miRNA 基因经 RNA 聚合酶 (RNAPol^{II}) 或 RNA 聚合酶 (RNAPol^{III}) 转录形成具有帽子结构(7MGpppG)和多聚腺苷酸尾巴(poly A)的原始 miRNA(pri-miRNA), pri-miRNA 经核糖核酸酶 Drosha (RNase Drosha) 和其辅助因子 Pasha/DGCR8(一种双链 RNA 结合蛋白)结合形成的微处理器处理成长约 70 个核苷酸、具有发夹结构的前体 miRNA (pre-miRNA)。pre-miRNA 经 Exportin5-RanGTP 输出进入细胞质。RNase Dicer 将 pre-miRNA 剪切成约 22 个核苷酸长度的 miRNA:miRNA* 双链。miRNA:miRNA* 双螺旋结构解旋,其中一条链被降解,另一条成熟的 miRNA 进入 RNA 诱导的基因沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)中。成熟的 miRNA 以不完全匹配方式结合到其互补的 mRNA 靶位(常常位于 mRNA 3'-UTR)抑制翻译和影响 mRNAs 的稳定性^[8],但也存在对翻译进行激活的少数情况^[9]。Mirtrons 是来自于内含子的发夹结构,其生物生成过程避开了 RNase Drosha 的剪切,通过套索脱支酶(lariat-branching enzyme)产生带发夹结构的类 miRNA 前体。通过 Exportin-5 融入到经典的 miRNA 途

径过程中,由 Dicer-1 / loqs 处理成成熟的 miRNAs。研究显示, Mirtrons 至少部分是通过 RNA 诱导的沉默复合物效应子 Ago1 行使生物学功能的^[10]。迄今为止在灵长类动物中共找到 16 种 mirtrons,然而只有 3 种可在哺乳动物中产生直系同源 miRNA,因此相对于经典的 miRNAs 来说,各个物种之间的 mirtrons 并不相同,说明 mirtrons 在进化过程中是独立产生的^[11]。与人 ES 细胞相关的 miRNAs 更可能位于基因组簇而较少可能来自于内含子。通过转染 miRNA 和降低内源性 miRNA 表达水平,采用高通量检测技术发现,一个 miRNA 能直接或间接地影响数千基因的蛋白合成,可见 miRNA 对基因表达调控的强大作用^[12]。

2 ES 细胞特异性 miRNAs

Houbaviy 等^[13]通过构建 miRNA 文库发现 miR-290、miR-291、miR-292、miR-293、miR-294、miR-295 在小鼠 ES 细胞中高表达,随着 ES 细胞分化而表达下调或不表达。多序列比对发现这 6 个 miRNAs 的 pre-miRNAs 具有相关的序列,位于小鼠基因组中一段长约 2.2 kb 的区域内。表达序列标签 (EST) 数据库搜寻含有这 6 个 pre-miRNAs 序列的 2.2 kb 片段,发现其仅存在于植入前胚胎或 ES 细胞中,提示这些 miRNAs 是 ES 细胞特异性的,可能对维持细胞多潜能状态起重要作用。miR-21 和 miR-22 在自发性分化的 ES 细胞中表达,提示 miR-21 和 miR-22 与 ES 细胞分化有关。Suh 等^[14]对人 ES 细胞进行了相似的研究,也是通过克隆的方法发现 14 个 miRNAs 在人 ES 细胞特异性表达,在 ES 细胞发育为拟胚体(embryoid bodies, EBs)的过程中表达下调,这 14 个 miRNAs 分别是:miR-302b*、miR-302b、miR-302c*、miR-302c、miR-302a(又称 miR-302)、miR-302a*、miR-302d、miR-367、miR-200c、miR-368、miR-154*、miR-371、miR-372、miR-373*。对 12 个 miRNAs 基因组定位分析发现它们集聚成两簇,8 个 miRNAs(miR-302b、miR-302b*、miR-302c、miR-302c*、miR-302a、miR-302a*、miR-302d 和 miR-367,其中前面 7 个 miRNAs 组成了 miR-302 簇,所有 8 个 miRNAs 组成了 miR302-367 簇)位于 4 号染色体上约 700 bp 的区域,另外 4 个 miRNAs(miR-371、miR-372、miR-373、miR-373*)位于 19 号染

染色体上 1 050 bp 的区域. 4 号染色体上的 miRNAs 簇 (miR-302b、miR-302c、miR-302a 和 miR-302d) 彼此高度同源, 它们的序列在 5' 端最为相似. 随后, Chen 等^[15]使用 TaqMan MicroRNA Assays 检测 13 株小鼠 ES 细胞系, 21 个分化的 EBs, 6 个小鼠成体组织, 报道了涵盖 425 个 miRNAs 的小鼠基因组范围 miRNAs 表达谱. miRNAs 表达水平的统计分析显示, miRNAs 具有对小鼠 ES 细胞、EBs、成体组织进行分类的独特表达特征. Lakshminpathy 等^[16]采用芯片和定量 PCR 方法比较了未分化和分化的人 ES 细胞 miRNAs 的差异性表达, 证实 miRNAs 在人 ES 细胞维持自我更新和分化中起重要作用. Morin 等^[17]采用大规模平行测序方法对人 ES 细胞和 EBs 的小 RNA 比较分析, 发现 171 个已知 miRNAs 和 23 个新发现的 miRNAs 在二者间存在差异表达, 这些 miRNAs 调控的靶基因主要参与细胞分化、程序性细胞死亡、细胞周期调控及基因转录调节等生物过程. Laurent 等^[18]采用新的 miRNAs 芯片平台, 对人 ES 细胞和多种干细胞及分化细胞的 miRNAs 表达谱进行研究, 发现与分化细胞相比, 人 ES 细胞中有 150 个 miRNAs 存在差异表达 (76 个 miRNAs 表达上调, 74 个 miRNAs 表达下调), 其中特异性调控人 ES 细胞的 miRNAs 多位于基因组簇中, 较少位于编码基因的内含子内, 同时许多在人 ES 细胞中表达上调的 miRNAs 具有一致的种子序列, 例如 mir-302、hsa-mir-371/372/373 和 19 号染色体上的 miRNAs 簇均具有 AAGTGC 序列, 提示它们作用于相似的靶 mRNAs. Ren 等^[19]发现在人 ES 细胞、EBs、成体细胞中 104 个 miRNAs 差异表达, 其中 38 个在人 ES 细胞表达上调, 31 个在 EBs 细胞中表达上调, 35 个在成体细胞中表达上调; 鉴定了 12 个 miR-520 簇新成员 (miR-515-5p、miR-517a、miR-517b、miR-517、miR-519e、miR-520b、miR-520d、miR-520f、miR-520h、miR-521、miR-525-3p 和 miR-526b*), 加上以前鉴定的 9 个 miR-520 簇成员 (miR-518、miR-518c、miR-519b、miR-519c、miR-520a、miR-520c、miR-520e、miR-520g 和 miR-524*)^[17,18,20], 使 miR-520 簇成员增加到 21 个. miR-520 簇定位于 19 号染色体, 和位于 4 号染色体的 miR-302 簇一样在未分化的人 ES 细胞高表达, 这两簇 miRNAs 大部分成员在 5' 端具有相似序列, 其中 miR-302a、miR-

302b、miR-302c、miR-302d、miR-519b、miR-519c、miR-520a、miR-520b、miR-520c、miR-520d 和 miR-520e 具有一致的种子序列: AAGUGC. 用 miRNAMap 2.0 软件预测发现 miR-302 簇、miR-520 簇分别具有 2 436、4 691 个靶基因, 其中 2 284 个靶基因因为二者共有, 表明二者具有相似的功能. 基因分类 (gene ontology, GO) 分析证实 miR-302 簇、miR-520 簇在细胞生长、负向调节细胞代谢、负向调控基因转录及小 GTPase 介导的信号转导功能方面重叠. 虽然这些研究采用的方法不同, 但它们均提示 ES 细胞中存在一系列特异性表达的 miRNAs, 这些 miRNAs 可能参与维持胚胎干细胞的自我更新及多向分化潜能.

3 miRNAs 在 ES 细胞中的功能

miRNAs 与 ES 细胞自我更新转录因子相互调控, 对维持 ES 细胞自我更新起重要作用. 在干细胞分化进程中, miRNAs 可下调细胞内维持干细胞未分化状态的基因表达水平, 同时激活干细胞谱系特异性基因, 从而促进 ES 细胞的定向分化. 对 miRNAs 在 ES 细胞中的功能研究始于敲除 miRNAs 生物合成中的酶和蛋白对 ES 细胞生物学的影响, 以下分别简述敲除 *Dicer* 和 *DGCR8* 对 ES 细胞的影响, 以及 miRNAs 在维持 ES 细胞自我更新和定向分化中的作用.

3.1 敲除 *Dicer* 对 ES 细胞的影响

Dicer 是 RNase Ⅲ 超家族中一员, 参与 miRNAs 和 siRNAs 的生物合成. 组成性 (constitutive) 缺失 *Dicer* 会引起胚胎死亡, 所以条件性缺失 *Dicer* 可以更好地研究 miRNAs 在动物体内的作用. Bernstein 等^[21]发现 *Dicer* 对小鼠早期发育是必需的, 组成性缺失 *Dicer* 导致胚胎在 7.5 d 死亡. Kanellopoulou 等^[22]通过条件性基因打靶技术成功构建了 *Dicer*^{-/-} ES 细胞. 这种 ES 细胞中 pre-miRNAs 聚集, 但不能被加工为成熟的 miRNAs. 形态上, 这种 ES 细胞与野生型相同, 但它们的增殖速度减慢, 不能分化形成正常的 EBs, 检测发现内胚层标记物 (*Hnf4*) 和中胚层分化标志物 (*Brachyury*、*BMP4*、*Gata1*) 的缺失, 而多潜能性标志物 *Oct4* (又称 *POU5F1*) 表达仍维持在较高水平, 与野生型 ES 细胞的表现相反. *Dicer* 缺陷的 ES 细胞分化能力缺失的原因可能是由于不能下调 *Oct4* 的表达. 此外, *Dicer* 缺陷的 ES 细胞内

DNA 甲基化和组蛋白修饰也发生改变,提示 *Dicer* 以及它所合成的 miRNAs 参与 ES 细胞内异染色质结构的维持. 当 *Dicer* 重新表达后,分化表型可随之恢复,这充分说明 miRNAs 在 ES 细胞分化中起重要作用. 与正常 ES 细胞(G0、G1 期时间较短,大部分处于 S 期)不同, Murchison 等^[23]发现条件性缺失 *Dicer* 的 ES 细胞(包括 *Dicer*^{+/+}、*Dicer*^{-/-})虽然可以存活,但表现出严重的生长和分化缺陷,细胞周期 G1 和 G0 期延长, G2 和 M 期缩短,提示 miRNAs 参与细胞周期的调控. Sinkkonen 等^[24]对缺失 *Dicer* 的 ES 细胞分化能力缺陷的机制进行了研究. 通过对缺失 *Dicer* 的 ES 细胞转录组学进行分析,他们发现 ES 细胞特异性 miR-290 簇在未分化 ES 细胞中发挥着重要调节作用. 在正常 ES 细胞内, miR-290 簇 miRNAs 表达水平较高,它们可以直接作用于靶基因如肿瘤抑制基因 *Rbl2*(*retinoblastoma-like 2*),导致其表达下调. *Rbl2* 等靶蛋白可以作为抑制因子负调控从头 (*de novo*)DNA 甲基化转移酶 *Dnmts* 的表达. 在缺失 *Dicer* 的 ES 细胞中 miR-290 簇 miRNAs 表达缺失,导致 *Rbl2* 等靶基因的表达上调,进而抑制 *Dnmts* 的表达,继而不能使 *Oct4* 等基因启动子稳定地被甲基化失活,从而导致缺失 *Dicer* 的 ES 细胞失去分化能力. 转染 miR-290 簇 miRNAs 和甲基化转移酶 *Dnmts* 可以逆转缺失 *Dicer* 的 ES 细胞的许多缺陷,纠正异常的甲基化,提示 miRNAs 亦调控着 ES 细胞的 DNA 甲基化状态. 转染 miR-290 簇 miRNAs 也可以逆转缺失 *Dicer* 的 ES 细胞的增殖缓慢的缺陷. 有研究表明,细胞周期蛋白 E-Cdk2 复合物调节小鼠 ES 细胞从 G1 期向 S 期转换,而 *Cdkn1a* (也称 *p21*, 编码 P21) 和 *Cdkn1b* (也称 *p27*, 编码 P27) 是细胞周期蛋白 E-Cdk2 复合物的抑制子. ES 细胞特异性 miRNAs (如 miR-290 簇) 可以通过直接与细胞周期抑制子 *Cdkn1a* 3'-UTR 匹配,抑制 *Cdkn1a* 表达,从而促进 ES 细胞由 G1 期向 S 期转换,使 ES 细胞增殖加速^[25],这可能也是转染 miR-290 家族可以逆转缺失 *Dicer* 的 ES 细胞增殖缓慢缺陷的重要原因^[25].

3.2 敲除 DGCR8 对 ES 细胞的影响

DGCR8 是双链 RNA 结合蛋白,与 RNase Droscha 结合将 pri-miRNAs 处理成 pre-miRNAs,因此敲除 *DGCR8* 的 ES 细胞 pri-miRNAs 堆积, miRNA 成熟受阻. 敲除 *DGCR8* 的小鼠 ES 细胞

和 *Dicer* 缺失的小鼠 ES 细胞表型相似:增殖能力下降,细胞周期异常,阻滞在 G1 期,缺乏分化能力^[26]. 但这些缺陷不如在 *Dicer* 敲除的突变体内明显. 维甲酸诱导的分化过程中, *DGCR8* 缺失的 ES 细胞不能完全下调多潜能标记物(如 *Oct4*、*Rex1*、*Sox2* 和 *Nanog*),但能表达一些分化标记物,而 *Dicer* 缺失的 ES 细胞不能表达任何分化标记物^[22]. 另外,敲除 *Dicer* 引起的增殖缺陷可以随着时间延长而自发恢复,但 *DGCR8* 突变体没有类似的现象^[23,26]. 与敲除 *Dicer* 的 ES 细胞情况相似,ES 细胞特异性 miR-290 家族也可能通过相似的分子作用机制恢复缺失 *DGCR8* 的 ES 细胞的增殖缺陷,使细胞不再停留在 G1 期^[22].

总之,敲除 *DGCR8* 和 *Dicer* 的研究证实 miRNAs 参与调控 ES 细胞的增殖、细胞周期和分化. *DGCR8* 和 *Dicer* 敲除突变体的差异表明 *Dicer* 产生的 siRNAs 和其他小 RNA 也可能在 ES 细胞中发挥重要的调节作用.

3.3 miRNAs 参与维持 ES 细胞的自我更新

ES 细胞中高表达的 miRNAs 与 ES 细胞内重要的转录因子相互调控的分子机制研究仍处于探索阶段. miR-302-367 簇在 ES 细胞中高表达,但在其他成体干细胞和成体或胚胎的分化细胞中不表达. Barroso-delJesus 等^[27]对 miR302-367 簇转录起始位点和功能性核心启动子区域进行了鉴定. miR302-367 簇基因位点 (locus) 包含 3 个外显子和 2 个可变剪切的内含子,这两个成熟的剪切体 mRNA 均不编码任何蛋白. 人 miR302-367 簇位于基因的第一内含子. miR302b* 是 miR-302-367 簇的第一个 miRNA, miR302-367 簇原始转录本的转录起始位点位于 miR302b* 编码序列上游 153 位的胸腺嘧啶. 转录起始位点上游 525 bp 范围的序列具有启动子活性. miR302-367 启动子在 ES 细胞中具有活性,一旦 ES 细胞分化其活性便减退,表明 miR302-367 启动子仅在 ES 细胞具有活性,推测 miR302-367 启动子只在早期胚胎发育阶段具有活性. 转录因子结合位点预测和功能研究表明 *Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* 和 *Rex1* 结合到 miR302-367 启动子上游促进 miR302-367 簇转录激活,即 miR302-367 基因位于 *Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* 和 *Rex1* 调控网络下游. miR302-367 簇能够调节 ES 细胞周期,促进其自我更新和多能性,是维持 ES 细胞干性 (Stemness) 的主要调节因子. Card 等^[28]也发现

Oct4 和 Sox2 结合到 miR-302 保守启动子区域。在人 ES 细胞, miR-302a 的表达依赖于 Oct4/Sox2。在胚胎发育过程中, miR-302a 和 Oct4 的表达发生在同一发育阶段和同一组织。miR-302a 在人 ES 细胞中靶向作用于抑制 G1 期调节子—细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1), 抑制其表达, 促进 ES 细胞增殖; 而抑制 miR-302 表达使人 ES 细胞停滞于 G1 期, 表明 miR-302 可以通过调节细胞周期维持 ES 细胞自我更新。Marson 等^[29]也发现 ES 细胞重要转录因子 (Oct4、Sox2、Nanog 和 Tcf3) 能够结合到 ES 细胞特异性表达的 miRNAs 的启动子, 如 miR-290 簇。Oct4、Sox2、Nanog 和 Tcf3 结合到 *Let-7g* 和 *Lin28* 的启动子, 促进 *pri-Let-7g* 和 *Lin28* 的转录。Lin28 是 ES 细胞中 *pri-let-7g* 的一个结合蛋白, 能够特异性阻止 *pri-let-7g* 转录本处理为 pre-let-7g, 使 let-7 家族 miRNAs 在 ES 细胞中低水平表达, 维持 ES 细胞自我更新^[30]。Heo 等^[31]发现 Lin28 诱导 pre-let-7 3' 端尿苷化, Dicer 不能识别 3' 端尿苷化的 pre-let-7, 阻止 pre-let-7 成熟, 使 let-7 低表达。let-7 家族成员 let-7g 可以与 LIN28 3'-UTR 匹配抑制 LIN28 表达, 而 Lin28 能够阻止 *pri-Let-7* 转录本成熟, 二者形成精细的调控环路维持 ES 细胞特性^[32]。ES 细胞分化后, let-7 表达水平升高, 与 *HMGA2* 的表达水平负相关, 而已有研究表明 *HMGA2* 是一个在人和小鼠 ES 细胞中调节细胞分化和增殖的基因。这些充分说明 ES 细胞重要转录因子参与 miRNAs 的调控, 维持 ES 细胞自我更新。

近来研究发现, miRNAs 也参与调控 ES 细胞重要转录因子的表达。Xu 等^[33]采用 Taqman real-time multiplex RT-PCR 方法比较 466 个 miRNAs 在未分化的 H9 人 ES 细胞系和分化的 EBs 的表达特征, 他们发现 miR-145 在未分化的人 ES 细胞表达相当低而在 EBs 中显著上调。TargetScan、miRBase、Miranda 3 个软件预测结果显示, miR-145 能够与人 ES 细胞重编程因子 Oct4、Sox2 和 Klf4 序列匹配。荧光素酶报告基因系统分析进一步证实 miR-145 可以直接与 Oct4、Sox2 和 Klf4 3'-UTRs 靶向匹配并抑制 Oct4、Sox2 和 Klf4 的表达。转染 miR-145 于人 ES 细胞中可以下调 Sox2 mRNA 水平而不影响 Oct4 和 Klf4 的 mRNA 水平, 但是可以导致 Oct4 和 Klf4 蛋白质水平的下降, 说明 miRNAs 作用于一些靶位可以直接降低靶基因 mRNA 水平, 而作用于其他

靶位则可以降低靶蛋白水平; 下调 miR-145 在人 ES 细胞中的表达, Sox2 mRNA 水平和 Oct4、Sox2 和 Klf4 蛋白水平都上升, 这表明 miR-145 参与人 ES 细胞内源性因子转录后水平的调控。研究发现, 在人 ES 细胞内单独上调 miR-145 的水平对 ES 细胞表现出很强的抑制效应, 能充分阻止 ES 细胞自我更新的维持, 并诱导 ES 细胞向中胚层和外胚层分化; Oct4 可以结合到 miR-145 启动子区并抑制其活性, 将 Oct4 和 Sox2 表达载体导入过表达 miR-145 的细胞中, 能恢复由 miR-145 过表达引起的分化表型。由此, Xu 等^[33]提出这样的模式: ES 细胞内 miR-145 低表达, Oct4, Sox2, Klf4 高表达, Oct4 作用于 miR-145 启动子抑制 miR-145 表达使 miR-145 维持在低水平, 彼此互相调控, 维持 ES 细胞自我更新; 当 miR-145 表达升高时, Oct4、Sox2、Klf4 表达受到抑制, 诱导 ES 细胞向中胚层和外胚层分化。由此可见, 低水平的 miR-145 对于维持 ES 细胞的自我更新起重要作用。

另有学者对人 ES 细胞高表达的 miRNAs 下游的靶位进行了研究。Li 等^[34]比较未分化的人 ES 细胞系 hES-T3、hES-T3 来源的 EB(T3EB)、hES-T3 分化而来的类成纤维细胞 T3DF 的 miRNA 和 mRNA 表达谱, 发现 4 个人 ES 细胞特异 miRNAs (miR-302d、miR-372、miR-200c 和 miR-367) 有 58 个靶位基因, 并通过荧光素酶报告基因系统证实 miR-302d 和 miR-372 能结合到 *Trps1*、*Klf13* 和 *Mbnl2* 等 3 个在细胞分化和胚胎发育中起重要作用的基因 3'-UTR, 使这 3 个靶 mRNA 失去稳定性并抑制其翻译, 从而降低它们在细胞内的表达水平, 这提示 ES 细胞特异性 miRNAs 可能通过抑制分化相关基因的表达来维持 ES 细胞特性。2003 年, Houbaviy 等^[13]发现 miR-21 在小鼠 ES 细胞分化过程中水平升高。2008 年, Singh 等^[35]发现 miR-21 通过降低自我更新调节因子 Oct4, Nanog, Sox2 和 c-Myc 表达抑制自我更新, RE1 沉默转录因子 (RE1-silencing transcription factor, REST) 直接与 miR-21 基因上游的顺式作用元件结合, 抑制 miR-21 的表达, 维持小鼠 ES 细胞自我更新和多能性。然而, Buckley 等^[36]研究发现, 在单倍体不足 (haplodeficient) *Rest*^(+/-) ES 细胞中并没有检测到多潜能标记物的变化和分化的神经标记物表达, 也没有发现 REST 和 miR-21 之间存在相互影响

因此, REST 和 miR-21 之间是否存在相互作用还存在争议, 仍需进一步研究证实。

总之, 一方面, ES 细胞重要转录因子可以通过调控 ES 细胞特异性 miRNAs 的表达水平来维持 ES 细胞的自我更新。例如, Oct4 可以结合到 ES 细胞特异性 miRNAs 的启动子上促进其表达维持 ES 细胞自我更新, 也可以结合到 ES 细胞分化相关的 miRNAs 的启动子上抑制其表达维持 ES 细胞自我更新。另一方面, ES 细胞特异性 miRNAs 也可以通过调控 ES 细胞重要转录因子的表达, 抑制 ES 细胞分化、维持 ES 细胞特性。此外, ES 细胞特异性 miRNAs 还可以通过抑制分化相关基因的表达来维持 ES 细胞的自我更新。

3.4 miRNAs 在 ES 细胞定向分化中的作用

在干细胞分化进程中, miRNAs 可下调细胞内维持干细胞未分化状态的某些基因, 同时激活干细胞谱系特异性基因, 促进干细胞的定向分化。Krichevsky 等^[37]证实特异的 miRNAs 在决定 ES 细胞向神经细胞分化的过程中起重要作用。在小鼠 ES 细胞向神经细胞分化过程中检测到许多 miRNAs 在神经祖细胞向神经元和星形胶质细胞分化过程中同时被诱导表达。进一步研究显示, 在神经前体细胞中过表达两个大脑特异性 miRNAs(miR-9 和 miR-124a)可以引起星形胶质细胞数量减少, 而单独降低 miR-9 表达或者联合降低 miR-124 表达可以导致神经元数量的下降, 这些结果显示大脑特异性 miRNAs 可以影响 ES 细胞来源的神经前体细胞是向神经胶质细胞还是向神经元方向分化。Visvanathan 等^[38]研究发现 miR-124 结合到 *SCPI*(small C-terminal domain phosphatase gene) 基因 3'-UTR, 可以抑制 *SCPI* 的表达, 促进胚胎神经系统发育。

最近 Ivey 等^[39]证实 miR-1 和 miR-133 在 ES 细胞分化形成的心肌细胞中表达丰富。在 ES 细胞表达 miR-1 或者 miR-133 可以增加 EBs 中胚层基因的表达, 抑制向外胚层和内胚层分化。Tay 等^[40]发现 miR-134 在小鼠 ES 细胞经维甲酸诱导 4 d 和 N2B27 诱导 2 d 时表达水平最高。在小鼠 ES 细胞中单独增加 miR-134 的表达水平可促进 ES 细胞向外胚层分化, 但这种效应可被 miR-134 阻断剂所阻断。miR-134 促进分化的部分原因在于靶向抑制 *Nanog* 和 *LRH1*, 降低 *Nanog* 和 *LRH1* 的表达水平, 而这两者是 Oct4 和小鼠 ES 细胞生长的正向调节子。Tay 等^[41]还发

现 miR-134、miR-296 和 miR-470 在维甲酸诱导小鼠 ES 细胞中表达上调。miR-134、miR-296 和 miR-470 能够与 *Nanog*、*Oct4* 和 *Sox2* 的编码区匹配, 降低它们的表达, 促进 ES 细胞分化^[41], 这一研究结果也证实了 miRNAs 除了与靶基因 3'-UTR 匹配还可以与靶基因编码区匹配发挥作用。miR-17 家族成员 (包括 miR-17-5p、miR-20a、miR-93 和 miR-106a) 在胚胎早期表达, 调节 ES 细胞的分化。研究发现, 这些 miRNAs 可降低信号转导与转录激活因子 3 (*STAT3*) mRNA 水平并促进 ES 细胞分化, 说明 *STAT3* 是 miRNAs 调节细胞分化的一个重要靶位^[42]。如前所述, miR-21 在小鼠 ES 细胞诱导分化过程中水平升高^[13], 提示 miR-21 与 ES 细胞分化相关。Singh 等^[35]发现 miR-21 降低自我更新调节子 Oct4, *Nanog*, *Sox2* 和 *c-Myc* 表达抑制自我更新促进分化。这些研究均表明 ES 细胞分化相关的 miRNAs 可以通过降低 ES 细胞内自我更新相关重要蛋白的表达水平而促进 ES 细胞分化。

4 结语

综上所述, 根据现有的研究发现, 可以得出 miRNAs 参与 ES 细胞调控的模式: ES 细胞重要转录因子结合到分化相关 miRNAs 基因启动子区域抑制 miRNAs 的表达, 使 ES 细胞分化相关的 miRNAs 低水平表达以维持 ES 细胞自我更新; 同时 ES 细胞重要转录因子也可以结合到 ES 细胞特异性 miRNAs 的启动子上促进其表达维持 ES 细胞自我更新。当 ES 细胞分化时, ES 细胞转录因子表达下降失去对分化相关 miRNAs 的抑制, 分化相关 miRNAs 表达水平上升, 而 ES 细胞分化相关 miRNAs 又可以作用于重要转录因子编码区或者 3'-UTR 抑制其表达, 降低其蛋白表达水平而进一步促进 ES 细胞分化。由此可见, miRNAs 与 ES 细胞重要转录因子形成调控环路, miRNAs 在调控环路中起核心作用, 同时 miRNAs 还可能作为 ES 细胞新的标记物^[15,29]。然而, miRNAs 在 ES 细胞自我更新和定向分化中的作用及分子机制研究还存在一些尚未解决的问题, 例如是否还存在新的基因调控 miRNAs 以及 miRNAs 下游的靶位还不是非常清楚等等。这些问题仍需要深入研究, 因为只有深入了解 ES 细胞自我更新和定向分化的机制才可能实现 ES 细胞广阔的应用前景。

参考文献 (References):

- [1] THOMSON J A , ITSKOVITZ-ELDOR J , SHAPIRO S S , *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science* , 1998 , 282(5391) : 1145-1147.
- [2] SHAMBLOTT M J , AXELMAN J , WANG S , *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. *Proc Natl Acad Sci* , 1998 , 95(23) : 13726-13731.
- [3] TAKAHASHI K , YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell* , 2006 , 126(4) : 663-676.
- [4] YU J , VODYANIK M A , SMUGA-OTTO K , *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells [J]. *Science* , 2007 , 318(5858) : 1917-1920.
- [5] TAKAHASHI K , TANABE K , OHNUKI M , *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell* , 2007 , 131(5) : 861-872.
- [6] PARK I H , ZHAO R , WEST J A , *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors[J]. *Nature* , 2008 , 451(7175) : 141-146.
- [7] BLAKAJ A , LIN H. Piecing together the mosaic of early mammalian development through microRNAs[J]. *J Biol Chem* , 2008 , 283(15) : 9505-9508.
- [8] GANGARAJU V K , LIN H. MicroRNAs : key regulators of stem cells [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* , 2009 , 10 (2) : 116-125.
- [9] VASUDEVAN S , TONG Y , STEITZ J A. Switching from repression to activation : microRNAs can up-regulate translation[J]. *Science* , 2007 , 318(5858) : 1931-1934.
- [10] OKAMURA K , HAGEN J W , DUAN H , *et al.* The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*[J]. *Cell* , 2007 , 130(1) : 89-100.
- [11] LATRONICO M V , CONDORELLI G. MicroRNAs and cardiac pathology[J]. *Nat Rev Cardiol* , 2009 , 6(6) : 419-429.
- [12] SELBACH M , SCHWANHAUSSER B , THIERFELDER N , *et al.* Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs[J]. *Nature* , 2008 , 455(7209) : 58-63.
- [13] HOUBAVIY H B , MURRAY M F , SHARP P A. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs[J]. *Dev Cell* , 2003 , 5(2) : 351-358.
- [14] SUH M R , LEE Y , KIM J Y , *et al.* Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs[J]. *Dev Biol* , 2004 , 270(2) : 488-498.
- [15] CHEN C , RIDZON D , LEE C T , *et al.* Defining embryonic stem cell identity using differentiation-related microRNAs and their potential targets[J]. *Mamm Genome* , 2007 , 18(5) : 316-327.
- [16] LAKSHMIPATHY U , LOVE B , GOFF L A , *et al.* MicroRNA expression pattern of undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells[J]. *Stem Cells Dev* , 2007 , 16 (6) : 1003-1016.
- [17] MORIN R D , O'CONNOR M D , GRIFFITH M , *et al.* Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells[J]. *Genome Res* , 2008 , 18(4) : 610-621.
- [18] LAURENT L C , CHEN J , ULITSKY I , *et al.* Comprehensive microRNA profiling reveals a unique human embryonic stem cell signature dominated by a single seed sequence[J]. *Stem Cells* , 2008 , 26(6) : 1506-1516.
- [19] REN J , JIN P , WANG E , *et al.* MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells[J]. *J Transl Med* , 2009 , 7 : 20.
- [20] BAR M , WYMAN S K , FRITZ B R , *et al.* MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries[J]. *Stem Cells* , 2008 , 26(10) : 2496-2505.
- [21] BERNSTEIN E , KIM S Y , CARMELL M A , *et al.* Dicer is essential for mouse development[J]. *Nat Genet* , 2003 , 35 (3) : 215-217.
- [22] KANELLOPOULOU C , MULJO S A , KUNG A L , *et al.* Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing[J]. *Genes Dev* , 2005 , 19(4) : 489-501.
- [23] MURCHISON E P , PARTRIDGE J F , TAM O H , *et al.* Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci* , 2005 , 102(34) : 12135-12140.
- [24] SINKKONEN L , HUGENSCHMIDT T , BERNINGER P , *et al.* MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells[J]. *Nat Struct Mol Biol* , 2008 , 15(3) : 259-267.
- [25] WANG Y , BASKERVILLE S , SHENOY A , *et al.* Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation[J]. *Nat Genet* , 2008 , 40(12) : 1478-1483.
- [26] WANG Y , MEDVID R , MELTON C , *et al.* DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal[J]. *Nat Genet* , 2007 , 39(3) : 380-385.
- [27] BARROSO-DELJESUS A , ROMERO-LOPEZ C , LUCENA-AGUILAR G , *et al.* Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster : human gene structure and functional characterization of its core promoter[J]. *Mol Cell Biol* , 2008 , 28(21) : 6609-6619.
- [28] CARD D A , HEBBAR P B , LI L , *et al.* Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells[J]. *Mol Cell Biol* , 2008 , 28(20) : 6426-6438.
- [29] MARSON A , LEVINE S S , COLE M F , *et al.* Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells[J]. *Cell* , 2008 , 134(3) : 521-533.
- [30] VISWANATHAN S R , DALEY G Q , GREGORY R I. Selective blockade of microRNA processing by Lin28 [J]. *Science* , 2008 , 320(5872) : 97-100.
- [31] HEO I , JOO C , CHO J , *et al.* Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA[J]. *Mol Cell* , 2008 , 32(2) : 276-284.
- [32] GUNARATNE P H. Embryonic Stem Cell MicroRNAs : Defining factors in induced pluripotent (iPS) and cancer (CSC) stem cells? [J]. *Curr Stem Cell Res Ther* , 2009 , 4 (3) : 168-177.
- [33] XU N , PAPAGIANNAKOPOULOS T , PAN G , *et al.* MicroRNA-145 regulates OCT4 , SOX2 , and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells [J]. *Cell* , 2009 , 137(4) : 647-658.
- [34] LI S S , YU S L , KAO L P , *et al.* Target identification of microRNAs expressed highly in human embryonic stem cells [J]. *J Cell Biochem* , 2009 , 106(6) : 1020-1030.
- [35] SINGH S K , KAGALWALA M N , PARKER-THORNBURG J , *et al.* REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells[J]. *Nature* , 2008 , 453(7192) : 223-227.
- [36] BUCKLEY N J , JOHNSON R , SUN Y M , *et al.* Is REST a regulator of pluripotency? [J]. *Nature* , 2009 , 457(7233) : E5-6.
- [37] KRICHEVSKY A M , SONNTAG K C , ISACSON O , *et al.* Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis[J]. *Stem Cells* , 2006 , 24(4) : 857-864.
- [38] VISVANATHAN J , LEE S , LEE B , *et al.* The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development[J]. *Genes Dev* , 2007 , 21 (7) : 744-749.
- [39] IVEY K N , MUTH A , ARNOLD J , *et al.* MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells[J]. *Cell Stem Cell* , 2008 , 2(3) : 219-229.
- [40] TAY Y M , TAM W L , ANG Y S , *et al.* MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells , where it causes post-transcriptional attenuation of Nanog and LRH1[J]. *Stem Cells* , 2008 , 26(1) : 17-29.
- [41] TAY Y , ZHANG J , THOMSON A M , *et al.* MicroRNAs to Nanog , Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation[J]. *Nature* , 2008 , 455(7216) : 1124-1128.
- [42] FOSHAY K M , GALLICANO G I. miR-17 family miRNAs are expressed during early mammalian development and regulate stem cell differentiation[J]. *Dev Biol* , 2009 , 326 (2) : 431-443.