

· 综 述 ·

微小 RNA 和衰老

高琴琰, 房静远

(上海交通大学医学院附属仁济医院消化疾病研究所, 上海 200001)

【摘 要】微小 RNA (miRNA) 是一类非编码的单链小分子 RNA, 不仅是机体有目的编码 RNA 的重要调控分子, 并且参与生长、发育、衰老的调控。本文主要描述了 miRNA 参与的有关衰老调控的一些可能通路和相关机制, 如调控端粒酶的表达、p53 信号通路、Rb 通路; 另外, 本文还综述了通过调控 miRNA 合成的酶而影响衰老的一些特殊途径, 以阐明当前 miRNA 与衰老关系的研究成果。

【关键词】微小 RNA; 衰老; 机制

【中图分类号】R 592

【文献标识码】A

【doi】10.3724/SP.J.1264.2012.00120

MicroRNA and aging

GAO Qinyan, FANG Jingyuan

(Institute of Digestive Diseases, Affiliated Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200001, China)

【Abstract】 MicroRNA(miRNA) is one of small non-coding single-stranded RNAs, which, not only is an important regulatory molecule, but also participates in regulation of growth and aging. In this paper, we review some possible pathways and the related mechanisms of aging in which miRNA may be involved, such as the regulation of telomerase expression, p53 signaling pathway, Rb pathway, and the abnormal expression of the enzyme which directly regulates the synthesis of miRNA. This article provides an overview of research achievements in the relationship of miRNA and aging.

【Key words】 micro RNA; aging; mechanism

随着社会逐步步入老龄化, 衰老问题日益受到人们的重视。机体各系统的功能会随着年龄的增长而不断下降, 直至最终衰老、死亡, 在这个复杂的生物过程中, 衰老始终受到多个因素的共同作用。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类大小约 21~23 个碱基的非编码单链小分子 RNA, 它们广泛存在于从植物、线虫到人类的细胞中^[1]。既往研究表明, 它们在生物体内不仅仅是代谢的产物, 而且是机体有目的编码 RNA 的重要调控分子, 参与生物体的生长、发育、衰老和死亡的调控。2005 年, 耶鲁大学的研究小组以线虫作为研究对象, 利用 lin-4 以及 lin-4 的调控靶基因敲除实验发现, 突变型线虫的寿命要明显短于正常线虫, 并且过量表达 lin-4 也可以延长线虫的寿命。这一研究除了说明 miRNA 在阻止细胞过早死亡过程中能发挥作用, 同时也为 miRNA 调控生长发育和衰老的生物钟机制提供了强有力的证据^[2]。目前已经认识到 miRNA 能调节干

细胞分化, 促进组织再生, 并在体外调控细胞衰老^[3], 而且也明确了在不同物种, 包括蠕虫、果蝇、小鼠和人类中存在着很多相同的进化保守的 miRNA^[4], 但是却不清楚在人类的衰老和相关疾病中这些 miRNA 是否与在蠕虫中发挥的作用一致。

那么究竟有哪些 miRNA 参与了衰老这个过程, 它们又是通过那些途径来调控衰老的呢? 本文将对相关内容作一综述。

1 miRNA 和 h-TERT 表达

人类染色体端粒由进化上高度保守的重复序列 TTAGGG 组成, 由端粒酶合成, 是维持染色体稳定的重要因素。随着细胞分裂次数的增加, 端粒不断缩短。这就是细胞衰老的端粒假说。端粒酶是一种核蛋白, 能够利用其自身的 RNA 亚基作为模板, 端粒酶逆转录酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 将端粒核苷酸重复序列加到染色体末端, 从而维持

端粒的结构和长度。

随着miRNA成为基因表达调控中研究热点, miRNA在端粒酶表达调控中的作用也逐渐被认识。Mitomo等^[5]在研究中发现, miR-138表达与h-TERT的表达呈负相关, 在低分化甲状腺癌细胞中, 外源性过表达miR-138可明显下调h-TERT表达, 并且转染miR-138前体分子可抑制连接有h-TERT 3'非翻译区(untranslated regions, UTR)的报告载体的荧光素酶表达活性, 由此他们推测, miR-138与h-TERT的mRNA 3'UTR靶点结合可以阻碍mRNA的有效翻译, 从而下调h-TERT表达, 最终抑制低分化甲状腺癌细胞端粒酶活性。该项研究尽管没有达到显著性差异, 但还是为这一途径提供了新的研究方向。同样, Miura等^[6]研究发现, 在胶质母细胞瘤A172细胞、中度分化肝细胞癌HMc-Li7细胞和低分化肝癌HLF细胞中, RGM249(编码miRNA前体基因)的表达可抑制h-TERT基因转录, 降低h-TERT mRNA水平。另外, Bonifacio等^[7]在人类包皮成纤维细胞BJ以及能稳定表达人端粒酶逆转录酶亚基h-TERT的永生化成纤维细胞BJ-hTERT中使用miRNA基因芯片进行分析, 结果提示, miR-143在年轻的成纤维细胞中存在异位表达, 能够诱导细胞生长停滞。值得注意的是, miR-143不能诱导BJ-hTERT细胞的生长停滞。该小组同样报道了miR-146a也是一个独立的、通过分泌途径来调控细胞衰老的因素^[7]。

但是目前的研究结果仅仅提示我们, miRNA可能对h-TERT起到调控, 但还没有研究阐明miRNA是通过怎样的机制来发挥调控作用的, 而且, 大部分的研究尚局限于肿瘤细胞内进行, 并没有太多来自于正常细胞的研究。因此, 对于miRNA如何通过h-TERT来调控端粒酶从而进一步调节衰老还有待于后续的研究。

2 miRNA 和 p53 信号通路

既往研究已知, 肿瘤抑制因子p53和其相关网络能够对多种癌症相关应激信号产生应答, 这些信号包括DNA损伤、端粒酶缺失、癌基因激活、细胞因子信号亢进及缺氧等^[8]。p53激活的结果取决于应激的类型和应激强度, 可能导致细胞周期停滞、细胞衰老和凋亡。由于p53激活后, miRNA的表达也被激活, 所以miRNA有可能对p53的功能效应具有重要作用, 由此通过该信号通路来调节细胞的衰老。

近几年来研究相对较多, 且最为代表性的miRNA

应属miR-34。Tarasov等^[9]在骨肉瘤细胞中发现miR-34可以使细胞停滞在G1期, 同时S期细胞减少, 起到细胞周期阻滞作用。之后的学者也通过细胞周期和免疫杂交检测证明, miR-34造成的G1期阻滞是通过其对细胞内细胞周期蛋白(cyclin D1)、细胞周期素依赖激酶(cyclin dependent kinase 6, CDK6)以及其他一些miR-34a的靶蛋白的抑制来实现的^[10]。另一些研究发现, 将miR-34a及miR-34b/c导入人类成纤维细胞中进行异位过表达时, 约60%的受转染细胞会出现形态学和分子水平细胞老化^[11,12]。同样, Tazawa等^[13]将miR-34a转染入人类结肠癌HCT116细胞、RKO细胞和p53突变的SW480细胞后, 发现细胞体积增大且衰老, 衰老相关的半乳糖苷酶试验呈阳性, 表明miR-34a可以诱发细胞衰老。但是在大多数肿瘤细胞系中, miR-34a的过表达效应表现为细胞凋亡的增多^[14-16]。Dalgard等^[17]在视网膜母细胞瘤细胞中进行了细胞生长实验和活化的caspase3细胞凋亡的活性分析, 发现miR-34s的抑制生长功能可以在肿瘤细胞中重新激活, 促使caspase3和PARP的裂解, 诱发caspase调控的凋亡途径。有趣的是, 在结肠癌HCT116细胞系中, miR-34a过表达的主要效应是在转染48h后出现细胞生长停滞^[11], 但在转染72h后则发生细胞凋亡^[11,18]。

多数研究表明miR-34与p53呈现正相关, 而在该家族中, 当属miR-34a与p53关系最为密切。miR-34参与p53介导的细胞凋亡或细胞周期调控网络可能是通过相关的靶蛋白, 细胞因子CDK4, CDK6, Cyclin E2, E2F3, E2F5, Met, Bcl-2 及原癌基因c-myc等发挥作用的^[9,19-23], 由这些靶蛋白参与p53调控网络从而调控细胞的生长和凋亡。但值得注意的是, 这些调控机制并不是简单的线性相关, 而是可以形成反馈机制来进行调节。例如Timmers等^[24]发现, 转录因子E2F1, E2F2, E2F3的激活是由依赖p53的反馈轴控制, 间接调节E2F所介导的转录抑制和细胞增殖; Sharma等^[25]也证实, E2F1-3因子通过负反馈调节p53-p21轴, 从而对细胞周期和转化进行调节。

因此, 尽管对于miR-34家族在p53通路中下游的靶蛋白的认识比较多, 也初步描绘了调控的机制和网络, 但是由于细胞周期调控的复杂性, 我们还不能全面地阐明整个调控网络的结构, miR-34如何通过靶蛋白从而进一步调控衰老仍然处于探索阶段。

除了miR-34家族之外,还有很多miRNA与p53通路有关。2010年,Wang等^[26]在人胚肺二倍体成纤维细胞WI-38中,通过电离辐射诱导细胞早衰,通过基因芯片确定有8个miRNA在这些早衰细胞中表达,分别是4个上调的miRNA(miR152, miR410, iR431和miR493)和4个下调的miRNA(miR155, miR20a, miR25和miR15a)。而这些miRNA可能是通过调节p53和p38下游丝裂原活化蛋白激酶通路,从而调节p53诱导核蛋白1发挥作用的^[26]。Sharma等^[27]研究发现在肝细胞中,miR221可以高度上调并存在异位表达,由此保护肝细胞和肝癌细胞,防止其凋亡。这一功效是通过Bcl2蛋白家族预凋亡成员,p53上调凋亡控制器PUMA蛋白所发挥的。Ory等^[28]在人类和小鼠鳞癌细胞中均发现miR193a受到p53的相关转录因子,p63和p73基因的调控,可被p63抑制,被预凋亡p73基因亚型激活,从而改变细胞的化疗敏感性和细胞增殖及存活能力。而Afanasyeva等^[29]提出,在神经母细胞瘤细胞中miR885-5p的表达可以抑制细胞增殖,从而引起细胞生长周期停滞、衰老和(或)凋亡。miR885-5p可以导致p53蛋白的聚集并激活该途径,最终上调p53的靶向目标。Xiao等^[30]发现miR605是p53基因网络的一个新成员。在细胞应激反应中,p53基因逃逸的p53-Mdm2的负反馈迅速积累可以引起细胞周期停滞和细胞凋亡,而miR605的转录与后转录和p53与Mdm2相关,并且可以干扰p53-Mdm2的互相作用,形成一个正反馈以促进p53快速聚集。其他可能与p53有关的miRNA还包括miR372, miR373, miR125等^[31,32]。但是对于这些通过芯片筛选得到的miRNA或者是新近研究发现的可能与衰老有关的miRNA究竟是如何通过p53通路来最终起到调控细胞周期,并由此改变细胞衰老、凋亡的过程还未得到完全的阐明。

3 miRNA 和视网膜母细胞瘤(Rb)肿瘤抑制通路

诱导细胞衰老的途径,除了P53信号通路之外,另一条较为重要的信号通路是p16^{INK4A}-Rb通路^[33]。近几年,也有一些学者开始对miRNA如何影响该通路进行了研究。

来自美国的Martinez研究组相继报道了一些在Rb诱导产生的衰老过程中存在差异表达的miRNA。该小组在HeLa宫颈癌细胞中发现,在细胞衰老的既定模式中,miRNA的表达可以抑制人类乳头状瘤

病毒癌基因E7,从而快速抑制Rb依赖的衰老。在他们的研究中发现,在Rb依赖并且诱导的衰老过程中共25个miRNA上调,24个miRNA下调^[34-36]。miR29和miR30家族属于在衰老过程中上调的miRNA,而且这一上调过程需要Rb通路的激活。2010年,该小组在进一步研究中提出,对miR29和miR30表达进行干扰可以抑制衰老。miR29和miR30通过结合至B-Myb mRNA(也被称为MYBL2,可以编码转录因子从而影响细胞周期)的3'UTR来调节该蛋白表达,在Rb驱动细胞衰老过程中发挥重要作用^[37]。

Noonan等^[38]证实miR499a在人类前列腺癌细胞中下调,而它所介导的前列腺癌细胞的生长停滞正是依赖Rb蛋白。同时该小组对3'UTR区域进行了分析,确定了细胞周期蛋白D1(CCND1)是miR499a的直接下游靶标,从而证实miR499a是Rb通路的一个重要的miRNA组成成员。

但是关于miRNA和Rb通路的研究目前还不是很多,虽然已经找到了一些明确的靶蛋白,但是今后还需对miRNA如何通过该通路进行衰老的调控进行更深入的研究,方能阐明整个真相。

4 miRNA 和一些特殊途径

迄今为止,很多研究都集中于探讨miRNA通过降低mRNA的稳定性和(或)影响翻译过程从而调控mRNA的表达,最终控制不同的细胞衰老过程。但是在miRNA合成过程中也有一些重要的酶参与其中,例如Dicer和核糖核酸酶内切酶III。通过这些酶的调节同样也可以调控miRNA从而影响衰老。

Damiani等^[39]在小鼠的视网膜上敲除Dicer后,发现部分miRNA水平下降,而且很快产生了视网膜的退行性病变,证实了miRNA与这些退行性疾病有密切关联。同样,Sand等^[40]在人类皮肤癌细胞中也证实了Dicer和Drosha的表达失调,从而影响了miRNA水平。而Srikantan等^[41]更进一步提出,这两个主要酶Dicer和Drosha不仅影响miRNA的合成水平,同时也能影响生物整体的翻译过程,Dicer水平的下降可以显著增强细胞的衰老,但是Drosha的下降却对衰老没有影响。这一发现提示,在翻译过程中Drosha/Dicer效应可能是引起衰老的独立因素,并进一步证明了miRNA可以直接或间接地增强mRNA的翻译^[41]。

Das等^[42]则发现人类多核苷酸磷酸化酶[human polynucleotide hosphorylase, hPNPase (old- 35)]是

一种进化保守的RNA加工酶,能够在调节细胞生理作用中起放大作用。hPase可能正是通过特定的mRNA或小分子非编码的miRNA对基因表达进行调控。因此,有针对性地对hPase的过度表达进行调控,可以选择性下调RNA的表达,从而参与整个病理生理过程。

诸如此类的报道尚不多见,而且仅仅局限于少数的几个器官细胞中,是否在所有的衰老脏器中均存在这样的酶合成异常,值得我们进行下一步的探讨。

综上所述,我们对 miRNA 的研究正在逐步走向更深的层次,我们已经认识到,一个 miRNA 可以调控多个下游靶标,而这些靶蛋白中有不少都参与了细胞周期的调控,从而在整个衰老体系中发挥或多或少的作用。但是,限于整个调控网络的复杂性、我们对于整个网络的构成始终是处于初窥门径、略知一二的状态,但这同样也给了我们广阔的空间可以继续研究。不可否认,这些非编码的小分子RNA在人类的生命旅程中扮演着相当重要的角色,我们如果能对 miRNA 与细胞发育生长调控机制之间的联系阐述得更加具体,不仅仅局限于某几个脏器或肿瘤细胞,可以在整个机体的任何一个脏器,甚至于动物模型中将这些机制复制出来,那么我们才算真正地对 miRNA 的机制了然于胸,豁然贯通。只有搞明白了这些错综复杂的关系,我们才有机会可以调控细胞生命过程中的多个分子,到那时,人类长生不老的美梦才会有可能实现。

【参考文献】

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Boehm M, Slack F. A developmental timing microRNA and its target regulate life span in *C. elegans*[J]. Science, 2005, 310(5756): 1954-1957.
- [3] Grillari J, Grillari-Voglauer R. Novel modulators of senescence, aging, and longevity: Small non-coding RNAs enter the stage[J]. Exp Gerontol, 2010, 45(4): 302-311.
- [4] Kashyap L. Can microRNAs act as biomarkers of aging[J]? Bioinformation, 2011, 5(9): 396-397.
- [5] Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, *et al.* Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines[J]. Cancer Sci, 2008, 99(2): 280-286.
- [6] Miura N, Sato R, Tsukamoto T, *et al.* A noncoding RNA gene on chromosome 10p15.3 may function upstream of hTERT[J]. BMC Mol Biol, 2009, 10(1): 5.
- [7] Bonifacio LN, Jarstfer MB. MiRNA profile associated with replicative senescence, extended cell culture, and ectopic telomerase expression in human foreskin fibroblasts[J]. PLoS One, 2010, 5(9): e12519.
- [8] Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network[J]. Nature, 2003, 408(6810): 307-310.
- [9] Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, *et al.* Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest[J]. Cell Cycle, 2007, 6(13): 1586-1593.
- [10] Sun F, Fu H, Liu Q, *et al.* Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest[J]. FEBS Lett, 2008, 582(10): 1564-1568.
- [11] He L, He X, Lim LP, *et al.* A microRNA component of the p53 tumour suppressor network[J]. Nature, 2007, 447(7148): 1130-1134.
- [12] Kumamoto K, Spillare EA, Fujita K, *et al.* Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induces senescence[J]. Cancer Res, 2008, 68(9): 3193-3203.
- [13] Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, *et al.* Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(39): 15472-15477.
- [14] Rokhlin OW, Scheinker VS, Taghiyev AF, *et al.* MicroRNA-34 mediates AR-dependent p53-induced apoptosis in prostate cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(8): 1288-1296.
- [15] Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells[J]. Oncogene, 2007, 26(34): 5017-5022.
- [16] Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, *et al.* Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis[J]. Mol Cell, 2007, 26(5): 731-743.
- [17] Dalgard CL, Gonzalez M, deNiro JE, *et al.* Differential microRNA-34a expression and tumor suppressor function in retinoblastoma cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(10): 4542-4551.
- [18] Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, *et al.* Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis[J]. Mol Cell, 2007, 26(5): 745-752.
- [19] Hermeking H. p53 enters the microRNA world[J]. Cancer Cell, 2007, 12(5): 414-418.
- [20] Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, *et al.* MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth[J]. Cancer Res, 2007, 67(18): 8433-8438.
- [21] Bommer GT, Gerin I, Feng Y, *et al.* p53-mediated activation

- of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes[J]. *Curr Biol*, 2007, 17(15): 1298-1307.
- [22] Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(5): 592-601.
- [23] Sotillo E, Laver T, Mellert H, *et al.* Myc overexpression brings out unexpected antiapoptotic effects of miR-34a[J]. *Oncogene*, 2011, 30(22): 2587-2594.
- [24] Timmers C, Sharma N, Opavsky R, *et al.* E2F1, E2F2, and E2F3 control E2F target expression and cellular proliferation via a p53-dependent negative feedback loop[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(1): 65-78.
- [25] Sharma N, Timmers C, Trikha P, *et al.* Control of the p53-p21CIP1 axis by E2F1, E2F2, and E2F3 is essential for G1/S progression and cellular transformation[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(47): 36124-36131.
- [26] Wang Y, Scheiber MN, Neumann C, *et al.* MicroRNA regulation of ionizing radiation-induced premature senescence[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010, 81(3): 839-848.
- [27] Sharma AD, Narain N, Händel EM, *et al.* MicroRNA-221 regulates FAS-induced fulminant liver failure[J]. *Hepatology*, 2011, 53(5): 1651-1661.
- [28] Ory B, Ramsey MR, Wilson C, *et al.* A microRNA-dependent program controls p53-independent survival and chemosensitivity in human and murine squamous cell carcinoma[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(2): 809-820.
- [29] Afanasyeva EA, Mestdagh P, Kumps C, *et al.* MicroRNA miR-885-5p targets CDK2 and MCM5, activates p53 and inhibits proliferation and survival[J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(6): 974-984.
- [30] Xiao J, Lin H, Luo X, *et al.* miR-605 joins p53 network to form a p53: miR-605: Mdm2 positive feedback loop in response to stress[J]. *EMBO J*, 2011, 30(3): 524-532.
- [31] Voorhoeve PM, Sage CL, Schrier M, *et al.* A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors[J]. *Cell*, 2006, 124(6): 1169-1181.
- [32] Nishida N, Yokobori T, Mimori K, *et al.* MicroRNA miR-125b is a prognostic marker in human colorectal cancer[J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(5): 1437-1443.
- [33] Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors[J]. *Cell*, 2005, 120(4): 513-522.
- [34] Martinez I, Almstead LL, DiMaio D, *et al.* MicroRNAs and senescence[J]. *Aging*, 2011, 3(2): 77-78.
- [35] Goodwin EC, Yang E, Lee CJ, *et al.* Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(20): 10978-10983.
- [36] Psyrris A, DeFilippis RA, Edwards AP, *et al.* Role of the retinoblastoma pathway in senescence triggered by repression of the human papillomavirus E7 protein in cervical carcinoma cells[J]. *Cancer Research*, 2004, 64(9): 3079-3086.
- [37] Martinez I, Cazalla D, Almstead LL, *et al.* miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(2): 522-527.
- [38] Noonan EJ, Place RF, Basak S, *et al.* miR-449a causes Rb-dependent cell cycle arrest and senescence in prostate cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2010, 1(5): 349-358.
- [39] Damian D, Alexander JJ, O'Rourke JR. Dicer inactivation leads to progressive functional and structural degeneration of the mouse retina[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(19): 4878-4887.
- [40] Sand M, Gambichler T, Skrygan M, *et al.* Expression levels of the microRNA processing enzymes Drosha and Dicer in epithelial skin cancer[J]. *Cancer Invest*, 2010, 28(6): 649-653.
- [41] Srikantan S, Marasa BS, Becker KG, *et al.* Paradoxical microRNAs: Individual gene repressors, global translation enhancers[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(5): 751-759.
- [42] Das SK, Bhutia SK, Sokhi UK, *et al.* Human polynucleotide phosphorylase [hPNPase(old-35)]: an evolutionary conserved gene with an expanding repertoire of RNA degradation functions[J]. *Oncogene*, 2011, 30(15): 1733-1743.

(编辑: 任开环)