为了更详尽地了解整个过程，研究人员又以重排激活基因缺陷小鼠为对象进行研究，这种小鼠敲除Rag1或Rag2基因，只能产生天然免疫反应，缺少适应性免疫反应。按照同一实验流程对这些小鼠进行处理，即注射MCA后再以相关单克隆抗体进行处理，发现几乎没有小鼠会长出迟发性肿瘤，绝大多数小鼠的肿瘤在200天内就已经发生恶性增殖。而对于形成迟发性肿瘤的极少数小鼠，其肿瘤的生长速度比经过相同处理的野生型小鼠慢。免疫抑制的野生型小鼠其肿瘤生长速度更快，意味着这些肿瘤可能已经拥有了完全变异的细胞，能够在适应性免疫缺失的情况下快速增殖。这一推测也得到了进一步的证明：将MCA诱导野生型小鼠产生的非恶性肿瘤外部所生长的异常成纤维样细胞注射到Rag2基因缺失小鼠中会导致肿瘤的形成。

有趣的是，一些对照组的野生型小鼠也会长出迟发性肉瘤，这可能是由逃脱免疫系统控制的变异细胞发展而来。依据肿瘤免疫编辑假说进行推理，若将上述成功逃脱免疫系统监控的肿瘤植入同源小鼠体内，它们将可以躲避机体的免疫反应，而不像MCA诱导产生的肿瘤实质细胞一样具有免疫原性。研究人员继而证明了这一推测，他们将对照组迟发性肉瘤细胞植入小鼠体内，绝大多数小鼠都长出了肿瘤，而注射稳定肿瘤实质细胞的小鼠中只有49%产生了肿瘤。

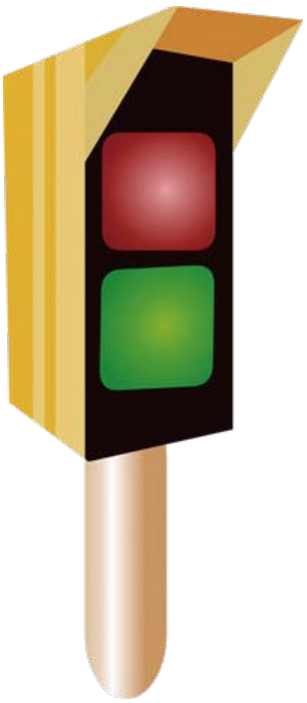
这些研究成果明确地表明了免疫系统的确能够将肿瘤细胞控制在稳态之下，而那些逃脱了免疫监视的变异细胞可能具有躲避机体的免疫反应的能力。

原文检索：Nature Reviews Cancer

Sirius/编译

IV 扩展阅读

P53信号通路中另一个重要成员——miRNA



人们在最近几项研究中发现了一个保守的miRNA家族——miR-34家族。miR-34家族是p53直接的转录靶标。miR-34的激活可以诱导细胞周期停滞和细胞凋亡，这些都是p53的活性效应。此外，miR-34的缺失会减少p53介导的细胞死亡。上述发现再一次告诉我们：miRNA是肿瘤抑制网络中的核心角色之一，非编码RNA同样是肿瘤发生过程中的关键分子。

过去数十年里对p53的深入研究使我们了解到，p53在负责调节多种与癌症相关应激状态的生理应答的复杂分子网络中，处于核心地位[1,2]。直至最近几年，人们仍然认为，p53网络完全由蛋白质编码基因构成，这些基因包括上游启动p53活性的基因、下游介导p53效应的基因以及组成调节性反馈环的基因。

新近的几项研究中，人们发现了一种组成p53网络的“新面孔”——miR-34，它是一种miRNA。这是研究人员第一次发现在关键性的肿瘤抑制通路中，还存在蛋白质与非编码RNA的相互作用[3~7]。miRNA是一类介导特异靶向mRNA发生转录后沉默的小分子调节RNA。miR-34家族中在进化上相当保守的miRNA可以直接在p53诱导下对DNA损伤及肿瘤发生做出应答[3~7]。研究人员发现，异位表达的miR-34可以产生与p53相同的生物学效应，如诱导细胞生长停滞及细胞凋亡，miR-34则是通过减少促增殖基因及抗凋亡基因的表达来发挥上述作用的[3~7]。以上研究结果表明，miRNA——或者从更广泛的角度来讲——非编码RNA是癌基因及肿瘤抑制网络中的重要分子，这是通过最近的研究发现才认识到的。

癌症中的miRNA

人们首次在线虫中发现miRNA，它们是小的非编码RNA，在幼虫发育的时间选择方面具有重要作用。随后，几乎在所有多细胞生物中都发现了大量miRNA。大部分动物miRNA具有相同的生成和作用机制（图1）。通常在经过接连两次的加工处理后，形成由18-25个核苷酸组成的成熟的miRNA，这些miRNA是由其具有茎环结构的前体剪接而来[8,9]。然后，这些成熟的miRNA便会与RISC结合，从而介导特异mRNA靶标的转录后基因沉默[8,9]。miRNA主要通过不完全的碱基配对来识别靶标，其中miRNA 5′端的序列在靶向识别中具有关键作用，5′端的序列因此被命名为“seed”[10]。由于miRNA的靶标识别以不完全配对为基础，这种特性使得miRNA具有对多种基因表达进行调节的能力。也正是由于主导miRNA进行识别的seed序列在许多基因中都存在，使得单独分析基因序列难以深入研究生理性相关miRNA靶标之间的关系。

miRNA的生成及转录

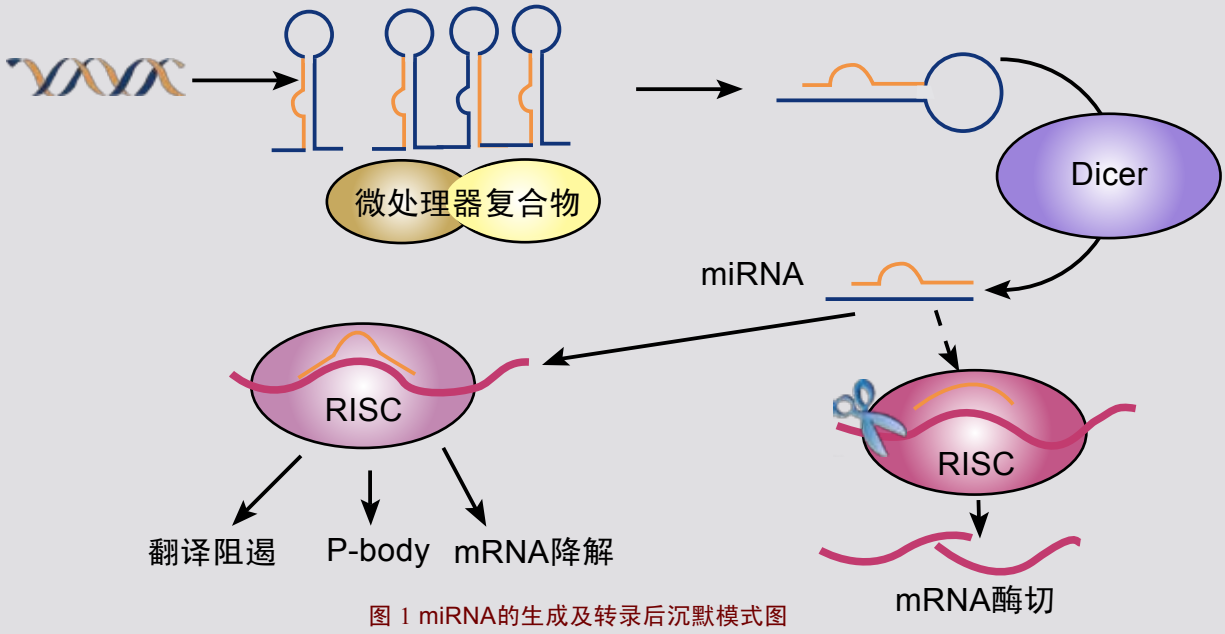


图 1 miRNA的生成及转录后沉默模式图

新生miRNA基因转录产物首先经过微处理器复合物处理后形成茎环结构的miRNA前体，之后在Dicer酶处理下形成成熟的miRNA双链结构，这种结构通常以不完全配对形式与靶标结合。miRNA双链中的一条链与RISC结合，通过不完全碱基配对识别靶标，并诱导转录后基因沉默。针对这样的调节模式，已经出现了若干机制：miRNA可以通过脱腺苷化阻遏翻译起始或降解靶标mRNA，又或者使靶标基因形成胞质中的 P-body。

miRNA的前体通常是RNA聚合酶II的作用产物。和蛋白质编码基因一样，miRNA也具有复杂的组织特异性表达的模式，而且对多种靶标具有不同的调节能力，从而可对许多生长发育过程中的关键步骤及生理功能进行调控[8,9]。由此，miRNA对许多生理过程会产生重要影响，如细胞增殖[11]、细胞凋亡、应激应答、干细胞分化潜能的维持以及新陈代谢等，而这些生理过程往往会在细胞发生恶性转化的过程中受到干扰。从miRNA的表达模式[12,13]、循环扩增以及肿瘤中miRNA基因的缺失[14,15]，都可以推断出miRNA与癌症之间的关联。已有研究人员利用小鼠模型和培养的肿瘤细胞对miRNA在肿瘤发生及发展中的功能予以了功能性证实。一些miRNA确实是癌基因和肿瘤抑制网络中的组成部分。miR-17-92聚体[16~18]、miR-372-373[19]及miR-155/BIC[20]都被认为是B细胞淋巴瘤和睾丸癌的促癌基因。另一方面，研究者发现许多CLL患者缺失miR-15-16[21]。

更重要的是，来自蛋白表达研究及功能研究的结果表明，let-7在多种癌症中具有强大的肿瘤抑制作用[22,23]，这可能与它对癌关键基因，如Ras和HMGA2的抑制功能有关。

除了上述所提到的在肿瘤发生及发展过程中具有关键作用的一些miRNA之外，miRNA表达模式

的完全改变是肿瘤细胞的共同特征[13,24]。通常而言，与发生分化了的细胞类型有关的miRNA在肿瘤细胞中的表达减少，而那些在早期发育及干细胞中便有所表达的miRNA却保留下来[24,25]。与此现象一致的是，人们发现癌细胞中miRNA生成机制中的关键组分的抑制作用会促进细胞转化的发生，这一现象在体内及体外试验中都已得到证实[26]。

miRNA通路在肿瘤发生过程中到底在多大程度上起着抑制肿瘤生成的作用仍然有待研究。然而，可以确定的是这个家族的基因的确参与了调节细胞转化的过程。而且，通过用已知功能的癌基因或肿瘤抑制因子去替代miRNA，已经开始逐步解开miRNA神秘通路之谜了。

P53调节的miRNA的鉴别

最近，有5个相互独立的研究小组相继发现并报道了miRNA在肿瘤抑制网络中的作用，他们的发现将miR-34家族与p53联系起来[3~7]。一直以来，p53网络扮演着多种癌症相关应激信号的感应器的角色，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[2]。这些信号可以通过p53的序列特异性转录调节功能，启动细胞增殖、细胞死亡、DNA修复、血管生成等生理过程。尽管在过去的三十年间，研究人员一直致力于探讨p53下游靶标分子与具体的生物学效应之间的关系，但仍然存在许多尚未解答的谜团。例如，有研究表明，p53可以通过还没有被完全阐明的机制抑制靶标基因[27,28]。此外，对p53调控的蛋白编码基因的遗传学研究，也还没有能够为我们完整展示这些靶标的调控如何最终产生p53激活后我们所观察到的生物学效应，比如G1细胞周期停滞或细胞凋亡等，这些现象可在所有组织中发生[29]。考虑到p53激活后，miRNA的表达被激活，我们可以推论非编码RNA有可能对p53的功能效应具有重要作用。因此，多位科学家开始努力寻找p53和miRNA之间的联系，也因而最终发现了一个令人兴奋的结果：miR-34正是p53的直接转录靶标，具有调控细胞增殖和死亡的功能[3~7]。

大部分相关研究集中于对miRNA表达情况的全面研究，以及与p53水平相关的表达模式的研究。He等人在野生型和p53缺失型小鼠胚胎成纤维细胞（MEFs）中研究了miRNA的功能，这些MEFs中同时包含多种额外的癌基因损伤[5]。Raver-Shapira等人对携带有温度敏感性TP53等位基因的肺癌细胞株进行了相关研究[6]。Chang等人则发现在遗传物质被破坏的压力下，会出现p53依赖性的miRNA表达增加[4]。此外，Tarasov等人采用可被四环素诱导的TP等位基因筛选p53调控的miRNA[7]。

而Bommer等人则利用生物信息学方法，分析了先前一项全基因组p53染色质免疫共沉淀（ChIP）的研究[30]。结果发现，所有推定的p53结合位点都位于蛋白质编码基因附近[3,30]。综合上述研究结果，miR-34家族成员是p53调控的miRNA中的主要组成成员。

人们最初在在线虫（*Caenorhabditis elegans*）中发现mir-34，它负责编码进化上十分保守的miRNA，在若干类无脊椎动物内仅存在一种它的直系同源物。脊椎动物中，mir-34家族由三个同源miRNA分子组成——mir-34a、mir-34b和mir-34c。成熟的mir-34a序列位于其非编码宿主基因的第二个外显子内，距离其上游的第一个外显子约30kb。推论的p53结合位点就位于第一个外显子中[3~7]。mir-34b和mir-34c位于同一个非编码前体（mir-34b/c）中，其转录起始位点在推论的p53结合位点附近[3,5]。上述两个p53结合位点在进化上都相当保守，且与p53调控的蛋白质编码靶标一致[30]。

为了证实miR-34家族的miRNA受到p53的调控，研究人员进行了更为深入的研究，并采用了体内和体外实验。来自外界的压力和生理学应激都可以诱导miR-34在多种培养细胞中及动物组织内以p53依赖的方式进行表达。miR-34在p53调控下的诱导表达并不依赖新蛋白的合成[6]，而是依赖其启动子区域的p53结合位点[3,5,6]。对miR-34的实验发现，其作用的动力学和作用强度都表明miR-34的确是p53的靶标，同时ChIP实验也证实CDK抑制剂p21可能与p53相结合[5,7]，从而启动miR-34表达[3,5,6]。

综上所述，这些研究为我们提供了令人信服的证据，也即miR-34家族的miRNA确实是p53的靶标。因此，p53是通过正向和负向两个方面调节基因表达，从而发挥肿瘤抑制功能；在一定程度上，负向调节通过p53对非编码RNA表达的正向调节效应而发挥作用。

miR-34模拟p53功能

在证实miR-34与p53之间有着确定的作用关系之后，研究人员的目光开始转向这样一个关键性的生物学问题——对于p53的生物学效应而言，miR-34究竟是必需条件还是仅仅是充分条件？到目前为止，对p53的效应研究最为深入的要数细胞生长停滞和细胞凋亡了。

无论是通过注入合成的成熟miRNA或是miRNA前体的异位表达，miR-34a都可在各种生物系统中被激活。多数情况下，p53以环境依赖的方式发挥关键效应。miR-34a在初级成纤维细胞中及某些肿瘤细胞系中的过表达，会促使细胞周期停滞的发生，这一点可以通过处于G1期的细胞数量的增多获得证明[3,5]。值得注意的是，当miR-34在IMR90人肺成纤维细胞中异位过表达时，约60%的受转染细胞会出现形态学和分子水平细胞老化。在另一种细胞环境中——大多数为肿瘤细胞系——尽管细胞的死亡程度不同，miR-34a的过表达效应表现为细胞凋亡的增多。有趣的是，在HCT116大肠癌细胞系中，miR-34a过表达的主要效应是在转染48小时后出现细胞生长停滞[5]，但在转染72小时后则发生细胞凋亡[4,5]。成熟的miR-34b和miR-34c与miR-34a效应相似，在一些增殖实验中呈现出类似的生物学活性[3,5]。由于miRNA通过不完全的碱基配对可以识别多种靶标，miRNA的这种多效性对于miRNA调节通路的研究具有重要意义。

尽管miR-34a的促凋亡效应不是很强，但是在某些情况下，miR-34a却是p53介导的细胞凋亡所必需的分子。有关p53诱导的细胞死亡中miR-34a的关键性角色，其直接支持数据来自Raver-Shapira等人的研究。研究中，他们通过一种类寡核苷酸衍生物——锁核酸（LNA）强烈抑制了在U2OS细胞中由于遗传物质损坏引起的p53依赖的细胞凋亡[6]。由于LNA位于3'端，因而增加了分子间杂交所需能量。值得注意的是，在这项研究中，miR-34a过表达的促凋亡效应虽然发生在MCF7和H1299细胞中，而非U20S细胞，其效应强度却较为温和。另外，小鼠胚胎干细胞内mir-34a的缺失，减弱了分化刺激如加入维甲酸，或白血病抑制因子（eukaemia inhibitory factor, LIF）的撤退引起的细胞凋亡效应[3]。上述研究并未解答有关miR-34是否为p53介导的G1期细胞停滞所必需的因子这一问题。由于细胞周期调节通路及miR-34家族组成的复杂性，要想回答上述问题，恐怕还需要在所有三个mir-34的同源物中都建立遗传损伤，进行深入研究才能够得出结论。

miR-34活性的机制

miRNA通过抑制基因表达发挥作用。因此，通过鉴别其调节靶标，就可以揭示miR-34激发p53活性的准确机制。研究人员已经通过生物信息学的方法和实验方法对此问题进行了深入研究[31]，他们所得的结论与p53－miR-34通路的推测一致，即某些miR-34调控的基因在p53激活后受到抑制[32]。芯片分析表明，诱导miR-34s可使数百种mRNA表达下调——细胞周期调节因子因此也增加了很多。而一些基因如CDK4、CDK6、细胞周期蛋白2及E2F都已通过western blotting被证明是miR-34的靶标。多数情况下，通过给待研究基因（包含miR-34核心区互补序列的基因）的3' UTR连接上一个荧光基团并揭示miR-34介导的抑制机制有助于构建更为

直观的调节关系模型[3~7]。与增殖基因不同的是，抗凋亡基因在miR-34抑制的环境中或通过生物信息学预测得到的miR-34靶向基因处并未见富集现象。然而，抗凋亡蛋白BCL2在某些细胞类型中会被miR-34下调，这与miR-34在p53介导的细胞凋亡中的功能相一致[3]。

在经典的用蠕虫和果蝇研究miRNA功能的实验中，仅需一个或少数几个miRNA靶标就可以阐明对一个特异性生化过程的调控机制[33,34]。虽然任何一个miR-34的抑制都可以模仿它的生物学效应，但似乎miR-34对多基因的集合调控才是复杂调控整个生物学效应的关键因素（图2）。

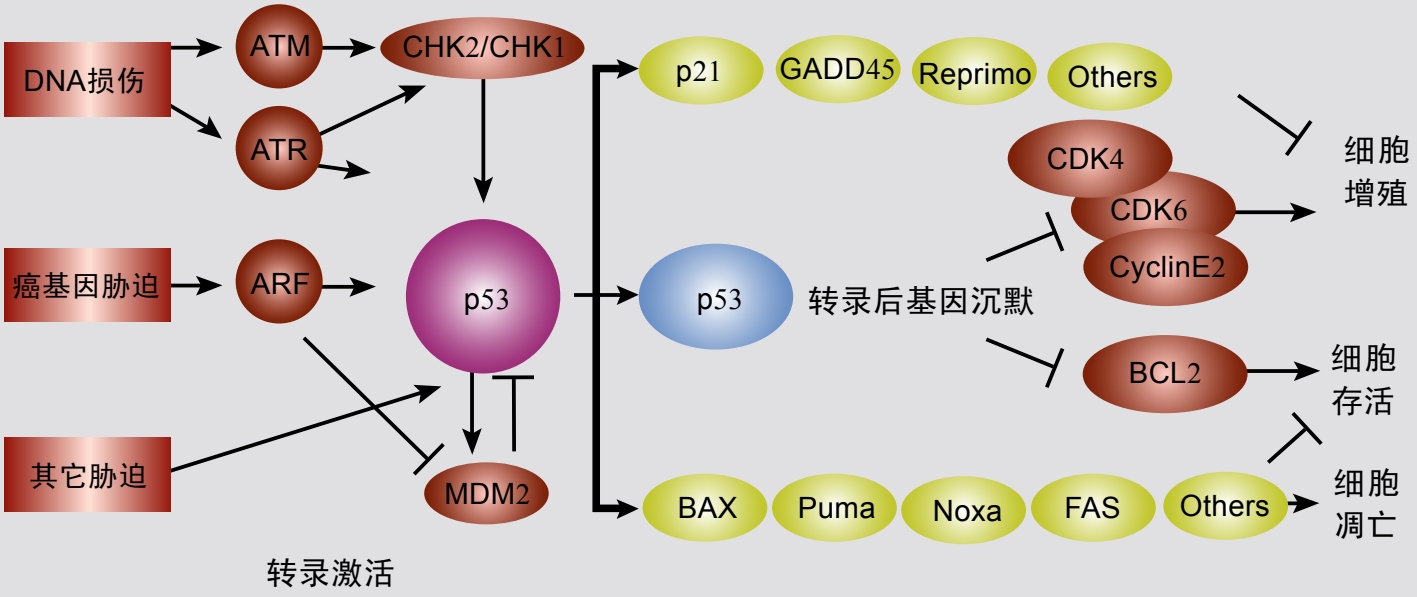


图 2 p53－miR-34调节细胞增殖及死亡的信号通路模式图

miR-34是p53的直接转录靶标，它可以下调细胞增殖和生存所需的基因表达。miR-34家族的miRNA可以和p53的其它靶标，如p21和BAX一起，在可促使恶性肿瘤发生的应激条件下促进细胞生长停滞和死亡的发生。

ATM：毛细血管扩张型共济失调型突变；ATR:毛细血管控制性共济失调及RAD3相关性突变；

CDK:细胞周期素蛋白依赖激酶；

CHK：细胞周期检测点激酶。

注：毛细血管扩张型共济失调为辐射因素造成的损伤。

癌症中的miR-34

已有研究报道在人类恶性肿瘤中观察到mir-34家族的缺失。mir-34a位于1号染色体短臂3区6带（1p36），在许多肿瘤类型中，都会出现这一区域的杂合缺失[35]。CHD5也是一种新近发现的准肿瘤抑制因子，也位于1p36，可以通过由CDKN2A编码ARF的介导而激活p53[36]。因此，1p36的缺失可以从上游及下游两个方向影响p53信号通路的完整性。在乳腺癌和肺癌组织中也观察到了mir-34b和mir-34c的缺失[15]，这与非小细胞肺癌细胞株中miR-34b/c的显著下降这一观察结果相一致[3]。在人类肿瘤中，miR-34的选择性丢失的压力可以因p53的突变而缓解。因此，mir-34的改变更多地出现在含有野生型p53的肿瘤细胞中。例如，Welch等人曾报道，mir-34a在成神经瘤细胞株中往往缺失或下调[37,38]。

p53通路中的miR-34

早在十年前，研究人员就已经发现一种CDK抑制因子p21可以介导p53诱导的细胞生长停滞。然而，研究发现阻断小鼠体内p21的传导途径并不能完全中断p53的信号传导[29]。这一结果提示我们，在p53途径中还存在着其它参与者，这在之后的十余年的寻找中一直没有被发现。另一个可能是人们一直将目光聚集于蛋白质编码基因上，而忽略了那些非编码RNA与蛋白质编码基因在p53信号通路中存在相互作用的可能性。在p53通路中将miRNA进行置换的研究也可以帮我们解开这个谜团。一项p53反应性转录机制的研究解释了一大批在p53被激活后即迅速被抑制的基因[27,28]。如今看来，上述研究结果至少有一部分可以被看作是抑制性小RNA被诱导产生的次级效应（图 2）。

前文提到的新近发表的相关研究报告，提出了有可能存在着与p53相互联系的miRNA的推论——这些miRNA可以是p53的下游效应分子，也可能作为p53的调节子或修饰基因。寻找p53调控的miRNA的研究早于最近出现的有关miR-34的研究[39]。有许多miRNA表现出p53依赖性调控的表达模式。在几项不同的研究中，所发现的以p53为靶标的miRNA之间没有重叠，这可能是研究所用的生物学系统的不同以及采用了不同的检测方法的缘故。最近，研究人员在多个相互独立的研究中发现了一小部分miRNA，包括miR-26a和miR-182，但它们的生物学功能还有待进一步探究[4,6,7]。令人惊讶的是，p53和miRNA之间的相互作用可能并不是一个简单的线性关系。miR-372和miR-373的过表达可以避免癌基因Ras诱导而产生的衰老（这个衰老过程以p53通路为基础）[19]。这一效应通过抑制p53的一个靶标LATS2[19]，从而不仅抑制了细胞增殖，还形成了与p53之间的正反馈[40]。

结语

目前，我们对于非编码RNA世界的了解才刚刚开始，但我们已经认识到，这些非编码基因在基因组错综复杂的功能中同样扮演着重要的角色。而保守的miRNA家族在关键的p53肿瘤抑制通路中占据着重要位置这一事实，有可能反映了由来已久的在非编码RNA和控制细胞发育生长调控机制之间的联系，其调控机制的破坏可以导致肿瘤的发生。单独一个miRNA可以调控多个下游靶标，这提示我们，适当地加以利用这些非编码RNA，则可以调控细胞生命过程中的多个分子。至于小RNA和肿瘤发生之间的普遍联系是否会揭示出某种生物学机制，或者仅仅表明这些miRNA可以作为基因表达程序中一个多效性的调节因子，则有待进一步研究。

原文检索：Nature Reviews Cancer

筱玥/编译

参考文献

1. Lowe, S. W., Cepero, E. & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 432, 307–315.
2. Vogelstein, B. B., Lane, D. D. & Levine, A. A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*. 408, 307–310.
3. Bommer, G. T. *et al.* (2007). p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr.Biol*. 17, 1298–1307.
4. Chang, T. C. *et al.* (2007). Transactivation of miR 34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol.Cell*. 26, 745–752.
5. He, L. *et al.* (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 447, 1130–1134.
6. Raver-Shapira, N. *et al*. (2007). Transcriptional activation of miR 34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol.Cell*. 26, 731–743.
7. Tarasov, V. *et al.* (2007). Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing:miR 34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*. 6, 1586–1593.
8. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis,mechanism, and function. *Cell*. 116, 281–297.
9. Zamore, P. D. & Haley, B. (2005). Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science*. 309, 1519–1524.
10. Doench, J. G. & Sharp, P. A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*.18, 504–511.
11. Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U.Closs, E. I. & Filipowicz, W. (2006). Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P body localization in human cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*.71, 513–521.
12. Iorio, M. V. *et al.* (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res. 65,7065–7070.
13. Volinia, S. et al. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc.Natl Acad. Sci. USA*. 103, 2257–2261.

14. Akao, Y., Nakagawa, Y. & Naoe, T. (2006). MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol. Rep*. 16, 845–850.
15. Calin, G. A. *et al*. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 101, 2999–3004.
16. Dews, M. *et al*. (2006). Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nature Genet*. 38, 1060–1065.
17. He, L. *et al*. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435, 828–833 (2005).
18. O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang,C. V. & Mendell, J. T. (2005). c Myc regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 435, 839–843.
19. Voorhoeve, P. M. *et al*. (2006). A genetic screen implicates miRNA 372 and miRNA 373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*. 124, 1169-1181.
20. Tam, W. & Dahlberg, J. E. (2006). miR 155/BIC as an oncogenic microRNA. *Genes Chromosomes Cancer*. 45, 211–212.
21. Calin, G. A. *et al*. (2002). Frequent deletions and downregulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 99, 15524–15529.
22. Johnson, S. M. *et al*. (2005). RAS is regulated by the let 7 microRNA family. *Cell*. 120, 635–647.
23. Mayr, C., Hemann, M. T. & Bartel, D. P. (2007). Disrupting the pairing between let 7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*. 315, 1576–1579.
24. Lu, J. *et al*. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 435, 834–838.
25. Thomson, J. M. *et al*. (2006). Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev*. 20, 2202–2207.
26. Kumar, M. S., Lu, J., Mercer, K. L., Golub, T. R. & Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nature Genet*. 39, 673–677.
27. Yu, J. J. *et al*. (1999). Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 96,14517–14522.
28. Zhao, R. R. *et al*. (2000). Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev*. 14, 981–993.
29. Brugarolas, J. *et al*. (1995). Radiation-induced *cell cycle* arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*. 377,552–557.
30. Wei, C. L. *et al*. (2006). A global map of p53 transcriptionfactor binding sites in the human genome. *Cell*. 124,207–219.
31. Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 120, 15–20.
32. Spurgers, K. B. *et al*. (2006). Identification of *cell cycle* regulatory genes as principal targets of p53-mediated transcriptional repression. *J. Biol. Chem*. 281, 25134–25142.
33. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. (1993). The *C.elegans* heterochronic gene lin 4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin 14. *Cell*. 75, 843–854.
34. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin 14 by lin 4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans.Cell*. 75, 855–862.
35. Versteeg, R. *et al*. (1995). 1p36: every subband a suppressor?*Eur. J. Cancer*. 31A, 538–541.
36. Bagchi, A. *et al*. (2007). CHD5 is a tumor suppressor athuman 1p36. *Cell*. 128, 459–475.
37. Welch, C., Chen, Y. & Stallings, R. L. (2007). MicroRNA 34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene*. 26, 5017–5022.
38. Gaur, A. *et al*. (2007). Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 67, 2456–2468.
39. Xi, Y., Shalgi, R., Fodstad, O., Pilpel, Y. & Ju, J. (2006). Differentially regulated micro-RNAs and actively translated messenger RNA transcripts by tumor suppressor p53 in colon cancer. *Clin. Cancer Res*. 12, 2014–2024.
40. Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G. & Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans. Science*. 294, 858–862.

可作为癌症生物标记的microRNA

miRNA可鉴定癌症起始组织

随着全球范围内测量miRNA的高通量技术的出现，这些转录后调节分子逐渐成为一类新的癌症生物标记。人们做了大量的研究工作以试图揭示出癌症与miRNA间的关联。Aharonov等人[1]根据多原发癌和转移癌中的miRNA的表达水平构建了一个miRNA分类器，以发现因其位点差异而发生的不同的癌转移。

miRNA最初于1993年在线虫中被发现，然后于2001年正式命名[2]，目前为止，在所有动植物中都发现有miRNA的存在。它们是一类18-25个核苷酸长度的非编码的RNA，起着调节细胞中基本生理过程的作用，包括调节细胞分化、增殖、凋亡以及代谢平衡等等。绝大部分miRNA的功能和靶点还有待研究。然而，现已发

现一些特殊的miRNA在器官发育的不同阶段，在组织特异性细胞以及器官生成和肿瘤生成过程中的表达都会发生改变[3]。

miRNA最初在细胞核内进行转录，然后经历了一个加工过程后成为成熟miRNA，该过程包括：（1）形成一个初级miRNA（pri-miRNA），然后形成一个前体（pre-miRNA）；（2）输出到细胞质；（3）进一步加工形成成熟的miRNA；（4）与argonaute蛋白催化剂一起结合到RNA-诱导沉默复合体（RISC）上（图1）。这个miRNA-RISC复合物通过碱基配对与mRNA 3'UTR中的互补序列结合，并抑制蛋白合成或降解靶mRNA[4]。较之人类基因大约20000个的基因数量，目前发现的miRNA只有541个，而之前预测的数量大约是1000个左右[5]。

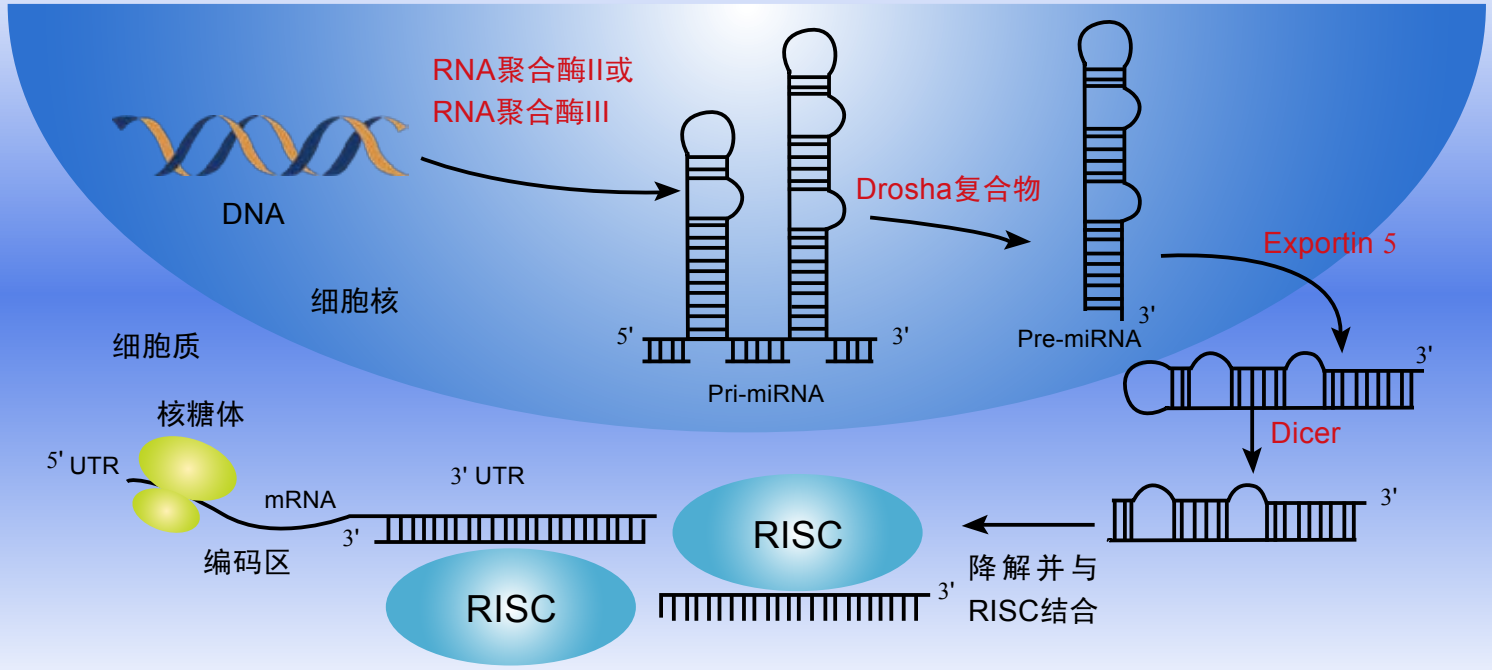


图1 miRNA的加工过程

在细胞核内，DNA先由RNA聚合酶Ⅱ或Ⅲ转录成初级miRNA（pri-miRNA）。其中长的pri-miRNA转录子（0.5-7kb）折叠成单个或一簇多发夹结构。然后pri-miRNA被一个由酶Drosha、细胞核RNAeⅢ以及RNA结合蛋白辅因子Pasha（也称作为DGCR8）组成的复合物所降解。而短的茎环结构（约60-70个核苷酸长度）则称为前体miRNA（pre-miRNA），随后pre-miRNA被Exportin 5运送到核膜上。在细胞质内，pre-miRNA进一步被一种名为Dicer的二级RNAe酶加工。而发夹环则被RNA解旋酶降解成双链RNA，留下一个短的miRNA二聚体，该双链RNA即为成熟的miRNA（约18-25个核苷酸长度），并与argonaute蛋白催化剂一起结合到RNA-诱导沉默复合体（RISC）上。这个miRNA-RISC复合物通过碱基配对与mRNA 3'UTR中的互补序列结合，从而负调控转录后的基因表达，并抑制蛋白翻译或降解mRNA本身。

为什么miRNA对癌症有潜在的重要作用呢？首先，miRNA在癌细胞中的表达异常。一些miRNA在早期的生长过程中过表达，在正常的分化状态下则关闭表达，而在癌细胞中却可能又再表达，进而导致细胞进入一个持续的干细胞样的去分化状态。miRNA在癌细胞中过表达所起的作用可能类似于原癌基因可以促进细胞增殖或抑制凋亡。相反地，另一些在正常组织中有肿瘤抑制调控作用的miRNA可能在癌细胞中是下调表达的，从而丧失了它们抑制肿瘤生长的能力。

其次，研究miRNA的表达可能有助于我们研究肿瘤的起始过程。虽然miRNA在正常组织中的表达量是否普遍高于癌细胞中的表达量尚存在争议。无论正常组织还是癌组织中都存在特殊标记式的miRNA，这些miRNA在不同组织中的表达量是不同的[6, 7]。最后，对于特殊的miRNA来说，无论是过表达或是表达缺失都与癌症的转移有关[8, 9]。

考虑到miRNA的表达存在组织特异性以及可以用于对肿瘤进行分类，Aharonov等人利用miRNA来对肿瘤进行定性。他们通过芯片技术平台对336个代表22种不同癌症类型的原发和转移性肿瘤中miRNA的表达水平进行了检测，并以此为依据构建了一个基于miRNA的组织分类器。他们在分开培养和检测这些肿瘤的基础之上，建立和检测了一个含有48种miRNA的分类器，这种分类器可以精确地预测86%的被检样品，其中包括77%的转移性肿瘤样本。不仅如此，这种分类器对10个转移性肿瘤样本的其中6个组织类型进行的预测，其准确率可以达到100%。研究人员认为他们构建的系统可以用于鉴别那些不明原发性的癌症，这种癌症类型大约占了侵入性恶性肿瘤总数的2-6%左右，而目前对此种癌症的治疗手段仍很有限。

此外，这项研究还是目前针对原发和转移性肿瘤中的miRNA表达水平的热点研究。它不仅证实了此前miRNA的组织特异性的相关研究报道，而且还将miRNA与肿瘤组织分类学联系在了一起。

然而，目前这项研究最大的局限在于它还不能通过miRNA分类器对不明原发性肿瘤进行检测，这可能是研究人员下一步急需解决的问题。不明原发性癌症和普通的转移性癌症在临床以及生物学的表现上是不同的。但即便它们的生物学表现相同，所有的miRNA分类器也只能针对它们各自收集到的样品分别进行检测。因此，即使Aharonov等人建议将这种系统应用到对那些来自于不同机构收集的患者的肿瘤样本的鉴定上去，那也要等到一种涵盖了所有样品信息的分类器出现了才行。

miRNA的数据和与其相似的通过分析mRNA基因表达模式得到的数据相比又如何呢？一些研究小组已经用DNA芯片技术来鉴定肿瘤起始组织[10]。起始位点的预测准确度大概有73%-78%（由已知的转移性原发性肿瘤可以判断出这一概率），同时对于不明原发性癌症的起始组织的预测准确度也有61%-85%。

癌症分类在此前一直是依赖于对mRNA表达谱的分析，而现在则可通过对miRNA的分析而获得。有研究对这两者得出的数据进行了分析比较，发现已知的乳腺癌分子的亚类型也可以通过miRNA进行鉴定，而且那些涉及miRNA合成的酶和蛋白在更为恶性的肿瘤的亚类型中是下调的。目前已经有临床实验来对那些根据mRNA的表达进行分类的不同乳腺癌分子的亚类型的治疗过程进行检测。因而，miRNA想作为临床应用上的生物标记还有待进一步的研究来检验，但无疑它的前途是光明的。

miRNA作为癌症的生物学标记毕竟还是个新生事物。而miRNA的基本特性现在还未完全被阐明，同时有关其是否存在组织特异性功能和靶点、表达的发展时间、调控和进化地位方面的问题还有待研究。但作为基因表达调控中的关键分子，特别是在细胞分化和组织的生成过程中，miRNA很可能在癌症的起始和扩散阶段起着至关重要的作用，不过目前谈论它们对于临床诊断、治疗和预测中的生物标记作用还为时过早。

原文检索：www.nature.com/naturebiotechnology

归尘/编译

参考文献

1. Rosenfeld, N. *et al*. (2008). *Nat. Biotech*. 26,462–469.
2. Ruvkin, G. (2001). Science. 294, 797–799.
3. Garzon, R. *et al*. (2006). *Trends Mol. Med*. 12, 580–587.
4. Lee, R.C., Feinbaum R.L. & Ambros, V. (1993). *Cell*. 75,843–854.
5. http://microrna.sanger.ac.uk/
6. Lu, J. *et al*. (2005). *Nature*. 435, 834–838.
7. Volinia, S. *et al*. (2006). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103, 2257–2261.
8. Ma, L., Teruya-Feldstein, J. & Weinberg, R.A. (2007). *Nature*. 449, 682–688.
9. Tavazoie, S.F. *et al*. (2008). *Nature*. 451, 147–152.
10. Pentheroudakis, G., Golfinopoulos, V. & Pavlidis, N. (2007). *Eur. J. Cancer*. 43, 2026–2036.