

miR-34a 在辐射损伤效应中的作用

李磊 陈秋 崔凤梅 涂彧

(苏州大学医学部放射医学与防护学院 苏州 215123)

摘要 miR-34a 位于染色体 1p36.23 区, 作用于多种靶基因。miR-34a 的异常表达可诱发细胞凋亡、周期阻滞和细胞分化, 也可降低肿瘤细胞的转移, 被认为是一种肿瘤抑制因子。抑癌基因 p53 可以激活 miR-34a, miR-34a 也可反馈调节 p53 表达。电离辐射诱导的 miR-34a 异常表达在 DNA 损伤修复、细胞凋亡、细胞周期调节和细胞辐射敏感性中发挥重要作用。本文综述电离辐射诱导 miR-34a 的产生及其参与的生物学反应和调控机制。

关键词 miR-34a, 电离辐射, 细胞凋亡, 细胞周期调节

中国分类号 R818.74, R811.5

miRNAs 是一类由内源基因编码, 长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子, 参与动植物转录后基因表达的调控, 在早期发育, 细胞增殖、分化、细胞凋亡、死亡和脂肪代谢等生物学过程发挥作用, 与多种疾病的发生发展密切相关。研究发现, 电离辐射可诱发多种包括 miR-34a 在内的 miRNAs 改变, 并利用其多种生物学功能调节作用参与辐射损伤后的生物学反应, 这种调节作用具有一定的细胞和组织学特异性。

1 miRNAs 的作用方式和机制

编码 miRNAs 的基因在 RNA 聚合酶 II 或 III 的作用下, 生成 pri-miRNA (primary miRNA)。pri-miRNA 具有颈环二级结构, Drosha and DGCR8/Pasha 酶酶切颈环结构而形成 pre-miRNA。exportin5 (转运蛋白-5) 可将 pre-miRNA 由细胞核转运到细胞浆。在胞浆中, pre-miRNA 再经过 Dicer 酶酶切后, 成为长约 20–24 nt 的成熟 miRNA。成熟的 miRNA 在解螺旋酶的作用下解旋, 并参与 RISC (RNA-induced silencing complex) 的形成。RISC 复合物中, miRNAs 通过不完全互补结合到目标靶基因 mRNA 3'-UTR 区(3'非编码区端), 阻断 mRNA 的翻译或降解 mRNA^[1]。每个 miRNA 可以作用多个靶基因, 而几个 miRNAs 也可以调节同一个靶基因。研究表明, 大约 70% 的哺乳动物 miRNAs 基因位于 TUs 区(Transcription units), 且其中大部分位于内含子区。在不同物种中, 一些内含子 miRNAs

基因的位置高度保守, 不仅在基因位置上保守, 在序列上也呈现高度同源性。序列(特别是种子序列)高度同源的 miRNAs 被划分为同一 miRNA 家族, 但这些 miRNA 并不一定成簇表达。miR-34 家族包括 miR-34a、miR-34b 和 miR-34c 3 个成员。其中, miR-34a 位于 1 号染色体 1p36 基因座位, 单独表达; 而 miR-34b 和 -34c 位于 11 号染色体 11q23 基因座位, 成簇表达, 但它们都具有相同的种子序列, 并且都受到转录因子 TP53 的调控。同一 miRNAs 家族成员功能相似, 但靶基因并非完全相同。

miRNAs 的高度保守性与其功能的重要性有着密切的关系^[2]。因此, miRNAs 作用的靶基因和活化机制一直是研究的热点。miRNAs 参与早期发育、细胞增殖、分化、细胞凋亡、死亡和脂肪代谢等^[3], 与多种疾病的发生发展密切相关。在肿瘤发生和发展中, 不同 miRNAs 分别发挥抑制或促进肿瘤的作用^[4,5]。基于 miRNAs 在肿瘤发生发展过程中的重要作用, 通过调节特定 miRNAs 进行肿瘤治疗显示出良好的应用前景。D'Urso PI 等发现胶质瘤中 miR-155 表达上调, 上调的 miR-155 可抑制靶基因 GABRA1 (γ -氨基丁酸 A 受体 1) 的表达, 进而解除 GABRA1 对细胞增值的抑制作用^[6]。Liu 等^[7]研究发现, 在前列腺癌, 特别是 p53 突变的前列腺癌中, miR-34a 表达下调, 导致 CD44 高表达。而 miR-34a 过表达可靶向抑制前列腺癌干细胞 CD44 表达, 进而抑制前列腺癌干细胞的生长和肿瘤转移。肿瘤发生时, 肿瘤细胞常表现为全基因组低甲基化

国家自然科学基金(81172706)、江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)资助

第一作者: 李磊, 女, 1987 年 4 月出生, 2010 年毕业于苏州大学医学部放射医学与防护学院, 现为苏州大学医学部放射医学与防护学院在读研究生, E-mail: lileisuda@gmail.com

通讯作者: 涂彧, E-mail: tuyu@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2012-10-09, 修回 2012-11-12

而局部区域基因高甲基化,包括肿瘤抑制基因、细胞周期调节基因、DNA 修复基因等。现在了解到,某些 miRNAs 表达状态受癌细胞中 DNA 甲基化和组蛋白修饰等表观遗传学改变的控制^[8]。Saito 等^[9]发现,在膀胱癌组织中,肿瘤抑制因子 miR-127 DNA 启动子区甲基化导致 miR-127 表达下降,加入 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-Aza (5-氮胞苷)后,可使膀胱癌细胞中 miR-127 表达升高。Zhang 等^[10]也发现胰腺癌中 miR-132 表达下调与 miR-132 启动子区甲基化有关。在 miR-34a 低表达的前列腺癌组织中,79.1%存在编码 miRNAs DNA 的甲基化。这种甲基化在乳癌、肺癌、结肠癌、肾癌、膀胱癌、黑色素瘤 分别占 25%、29.1%、13%、21.4%、33.3%和 43.2%^[11]。可见,编码 miRNAs 基因的甲基化与肿瘤发生密切相关。在其他疾病中 miRNAs 也发挥重要作用,如 Eva van Rooij 等发现,miR-1、miR-195、miR-208、miR-133 与靶基因结合,参与心血管系统血管内皮的再生和血管的重塑^[12];在一些代谢性疾病中,miRNAs 参与脂质维持、氨基酸和葡萄糖的稳定等作用^[13];在自身免疫性疾病中同样发现 miRNAs 发生异常改变^[14]。

2 miR-34a 的生物学功能

miR-34a 位于染色体 1p36.23 区,通常在结肠癌、前列腺癌、胰腺癌、心血管疾病等多种癌症和疾病中异常表达。肿瘤细胞中异常表达的 miR-34a 可作为一种肿瘤抑制因子,诱发凋亡通路。抑癌基因 p53 可以激活 miR-34a,miR-34a 也可反馈调节 p53 表达。Jain 等^[15]比较野生型和突变型 p53 的人胚胎干细胞 miR-34a 表达,发现突变型 miR-34a 表达比野生型低。SIRT1 是一种 NAD-依赖的去乙酰酶,可使 p53 去乙酰化而降低 p53 的活性。Yamakuchi 等^[16]发现,miR-34a 可以抑制 SIRT1 表达,降低 p53 的活性。也有研究表明,miR-34a 表达活性与 p53 之间可能存在正反馈调节机制^[17]。Ichimura 等^[18]发现,phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)可以不依赖 p53 通路而激活 miR-34a 的表达。说明,除了 p53 激活 miR-34 这条通路外,miR-34a 也存在不依赖 p53 的激活通路。

miR-34a 作用于多种靶基因,参与细胞周期、凋亡、分化和增殖的过程。Sun 等^[19]发现,miR-34a 可作用于 CCND、CCNE2、CDK4、CDK6、c-MYC 多个细胞周期相关基因,诱导细胞 G1 期阻滞。用荧光素酶活性实验证实,Bcl-2 是 miR-34a 的直接靶基因,p53/miR-34a/Bcl-2 也是公认的诱导细胞凋亡

的信号通路。同时,miR-34a 也可作用于 Nochl、YY1、CREB、MAP3K9 和 MAP3K10 多个靶基因诱导细胞凋亡,作用于 BCL6、IGFBP3、UHRF2、CDK6、MYCN 和 E2F3 参与细胞的增殖等^[20-23]。与 miR-145 一样,miR-34a 还可通过抑制干细胞因子 OCT4、KLF4、LIN28A、SOX2 促进干细胞的分化^[15]。SIRT1 是一种涉及 DNA 修复和基因组稳定性的脱乙酰酶,最初在非哺乳动物模型系统中作为一种寿命调控因子被发现。Tabuchi 等^[24]发现,miR-34a 作用于 SIRT1 参与调控人内皮细胞衰老。

miR-34a 的异常表达受多种因素的影响,异常表达的 miR-34a 参与多种疾病的发生、发展过程。研究发现,与慢性或亚慢性致癌物接触的组织中 miR-34a 表达升高。Chen 等^[25]发现给 C57BL/6 小鼠腹腔注射 ENU(N-乙烷基-N-亚硝基脲)120 mg/kg1d 后,小鼠脾脏 miR-34a 表达水平是正常对照组的 5.5 倍。在脂多糖诱导的炎症反应中发现,miR-34a 过表达,这种过表达对抑制炎症具有意义^[26]。前列腺癌病人的组织中 miR-34a 表达减少,下游靶基因 AR (雄激素受体)表达增加。AR 和 PSA (前列腺特异性抗原)升高是易患前列腺癌的因素之一。用 5-aza-dC 处理前列腺癌细胞,可使 miR-34a 基因的启动子区去甲基化而增加 miR-34a 表达。过表达的 miR-34a 对 AR 的转录起抑制作用,提示 5-aza-dC 可作为治疗前列腺癌的手段^[27]。另外,miR-34a 与肿瘤的转移也密切相关,其作用的靶基因 CCNE2、CTNND1、R-RAS、VCL 参与肿瘤的转移^[28]。胰腺癌病人 miR-34a 表达水平降低与生存期限也显著相关^[29]。

3 miR-34a 参与辐射损伤后的生物学反应

细胞受电离辐射后将启动复杂的生物学反应,包括 G1、G2 期阻滞、凋亡及 DNA 损伤修复。电离辐射可直接或间接的作用于 DNA 分子,损伤的 DNA 可以激活 ATM (The ataxia telangiectasia mutant) 和 DNA-PK (the DNA-dependent protein kinase) 酶。活化的 ATM 和 DNA-PK 激活 p53,进而启动细胞周期阻滞。作为转录因子,p53 蛋白调节多种细胞周期因子,使受损的细胞阻滞在 G1 期。p53/miR-34a/Bcl-2 是公认的诱导细胞凋亡的信号通路。

研究证实,外周血 miRNAs 受照射剂量和照后时间发生变化。通过外周血 miRNAs 的检测可快速且有效估算 ARS 患者的受照剂量。用外周血 miRNAs 的改变估算全身受照 0.5、2 和 10 Gy 小鼠

的正确率、灵敏度和特异度都在 90%以上^[30]。Liu 等^[31]发现 miR-34a 的表达与动物的品系、年龄及同一个体不同脏器的辐射敏感性有关。7 Gy 分别照射 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠, BALB/c 小鼠 miR-34a 表达量较 C57BL/6 小鼠高。7 Gy 照射 BALB/c 3-4w 小鼠表达较 6-8w 的为高。7 Gy 照射 BALB/c 小鼠的不同脏器, miR-34a 表达量的从高到低的顺序依次是胸腺、脾脏和肝脏。2.5 Gy 全身照射 C57BL/6 雄性和雌性小鼠, 发现雄性小鼠脾脏中 15 种上调 miRNAs 和雌性中 9 种上调的 miRNAs 中, 只有 miR-34a 是共同上调的^[32]。这将提示辐射诱发 miR-34a 上调作为一种保护机制, 抑制癌基因的过表达和促进辐射损伤细胞的凋亡。此外, Ilnytsky 等^[32]也发现 C57BL/6 小鼠淋巴和骨髓受到电离辐射作用后, miR-34a 和 miR-7 表达上升。

Ghawanmeh 等^[33]发现, 照射恶性间皮瘤 ZL34 和 M28K 两种细胞系, M28K 细胞中 miR-34a 表达上调而 ZL34 细胞无改变。辐射后两种细胞中处于 G0/G1 期的细胞增多, 但比较辐射诱导的细胞死亡, M28K 较 ZL34 多。两种细胞在 miR-34a 表达量和细胞死亡数方面, 放疗和化疗综合应用并没有起到相加效应。可见, 辐射诱发 miR-34a 表达增加是特异的。John-Aryankalayil 等^[34]报道分次照射前列腺癌细胞 LNCaP (p53 阳性型) 和 PC3 (p53 缺陷型) 后, miR-34a 表达均增高, 提示辐射诱发 miR-34a 表达增加或许不依赖于 p53。Zenz 等^[35]发现辐照 CLL (chronic lymphocytic leukemia) 细胞后, miR-34a 表达增加。miR-34a 在 CLL 细胞中的低表达与肿瘤细胞化疗抗性、凋亡抗性和受损的 DNA 损伤修复相关。鉴于癌症患者 miR-34a 普遍存在下调的趋势, miR-34a 不仅可用来诊断和预后癌症患者的指标, 也可尝试将 miR-34a 作为治疗手段, 应用于临床癌症病人的治疗。研究已发现, 接受放疗的肿瘤病人 miR-34a 表达有所提高, 表达增高的 miR-34a 肿瘤组织更容易发生死亡。

4 问题与展望

miRNAs 的异常表达与多种疾病相关。电离辐射可引起 miR-34a 表达的增加, 增加的 miR-34a 作为抑癌因子可以诱导细胞凋亡、G1 期阻滞来抵抗辐射产生的潜在致癌效应, 有些实验也证实这也可能是一种保护机制。而 miR-34a 的表达量依不同射线类型、不同细胞株而不同, 电离辐射后 miR-34a 在一种细胞表达增加, 在另一种细胞中却未必增加。miR-34a 也表现出可能的组织、细胞特异性。这些

因素使得评价 miRNAs 的生物学意义需要科学和谨慎。目前大部分研究工作集中在 miR-34a 作为抑癌因子, 在各种肿瘤组织中发挥作用的机制, 以及作为治疗手段的可能性方面。在电离辐射对 miR-34a 的影响, 以及 miR-34a 在电离辐射后效应中的作用和机制, 目前尚缺乏较详细、全面的研究。随着研究的深入及 miR-34a 在临床上应用的可能, miR-34a 可能会给辐射损伤的标志物检测和放疗患者的防护提供新的思路。

参考文献

- 1 Victor Ambros. MicroRNA Pathways in Flies and Worms: Growth, Death, Fat, Stress, and Timing. *Cell*, 2003, **113**(6): 673-676
- 2 Zhang B, Wang Q, Pan X. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *J Cell Physiol*, 2007, **210**(2): 279-289
- 3 Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, **431**(7006): 350-355
- 4 Serrano N A, Xu C, Liu Y, *et al*. Integrative analysis in oral squamous cell carcinoma reveals DNA copy number-Associated miRNAs dysregulating target genes. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2012, **147**(3): 501-508
- 5 Esquela-Kerscher A, Slack F J. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6**(4): 259-269
- 6 D'Urso P I, D'Urso O F, Storelli C, *et al*. miR-155 is up-regulated in primary and secondary glioblastoma and promotes tumour growth by inhibiting GABA receptors. *Int J Oncol*, 2012, **41**(1): 228-234
- 7 Liu C, Kelnar K, Liu B, *et al*. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med*, 2011, **17**(2): 211-215
- 8 Guil S, Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, **41**(1): 87-95
- 9 Saito Y, Liang G, Egger G, *et al*. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*, 2006, **9**(6): 435-443
- 10 Zhang S, Hao J, Xie F, *et al*. Downregulation of miR-132 by promoter methylation contributes to pancreatic cancer development. *Carcinogenesis*, 2011, **32**(8): 1183-1189
- 11 He L, He X, Lim L P, *et al*. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 2007, **447**(7148): 1130-1134

- 12 Eva van Rooij, Eric N. Olson. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest*, 2007, **117**(9): 2369-2376
- 13 Krützfeldt J, Stoffel M. MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metab*, 2006, **4**(1): 9-12
- 14 Galeazzi M, Balistreri E, Giannitti C, *et al.* MicroRNAs in autoimmune rheumatic diseases. *Reumatismo*, 2012, **64**(1): 7-17
- 15 Jain A K, Allton K, Iacovino M, *et al.* p53 Regulates Cell Cycle and MicroRNAs to Promote Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *PLoS Biol*, 2012, **10**(2): e1001268
- 16 Yamakuchi M. MicroRNA Regulation of SIRT1. *Front Physiol*, 2012, **3**: 68
- 17 Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein C J. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**(36): 13421-13426
- 18 Ichimura A, Ruike Y, Terasawa K, *et al.* MicroRNA-34a inhibits cell proliferation by repressing mitogen-activated protein kinase 1 during megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Mol Pharmacol*, 2010, **77**(6): 1016-1024
- 19 Sun F, Fu H, Liu Q, *et al.* Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS Lett*, 2008, **582**(10): 1564-1568
- 20 Ji Q, Hao X, Meng Y, Zhang M, *et al.* Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres. *BMC Cancer*, 2008, **8**: 266
- 21 Chen Q R, Yu L R, Tsang P, *et al.* Systematic proteome analysis identifies transcription factor YY1 as a direct target of miR-34a. *J Proteome Res*, 2011, **10**(2): 479-487
- 22 Pigazzi M, Manara E, Baron E, *et al.* miR-34b targets cyclic AMP-responsive element binding protein in acute myeloid leukemia. *Cancer Res*, 2009, **69**(6): 2471-2478
- 23 Ji X, Wang Z, Geamanu A, *et al.* Delta-tocotrienol suppresses Notch-1 pathway by up-regulating miR-34a in non-small cell lung cancer cells. *Int J Cancer*, 2012, **131**(11): 2668-2677
- 24 Tabuchi T, Satoh M, Itoh T, *et al.* MicroRNA-34a regulates the longevity-associated protein SIRT1 in coronary artery disease: effect of statins on SIRT1 and microRNA-34a expression. *Clin Sci*, 2012, **123**(3): 161-171
- 25 Chen D, Li Z, Chen T. Increased expression of miR-34a in mouse spleen one day after exposure to N-ethyl-N-nitrosourea. *J Appl Toxicol*, 2011, **31**(5): 496-498
- 26 Jiang P, Liu R, Zheng Y, *et al.* MiR-34a inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through targeting Notch1 in murine macrophages. *Exp Cell Res*, 2012, **318**(10): 1175-1184
- 27 Kong D, Heath E, Chen W, *et al.* Epigenetic silencing of miR-34a in human prostate cancer cells and tumor tissue specimens can be reversed by BR-DIM treatment. *Am J Transl Res*, 2012, **4**(1): 14-2
- 28 Yan K, Gao J, Yang T, *et al.* MicroRNA-34a Inhibits the Proliferation and Metastasis of Osteosarcoma Cells Both In Vitro and In Vivo. *PLoS One*, 2012, **7**(3): e33778
- 29 Jamieson N B, Morran D C, Morton J P, *et al.* MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 2012, **18**(2): 534-545
- 30 Cui W, Ma J, Wang Y, *et al.* Plasma miRNA as biomarkers for assessment of total-body radiation exposure dosimetry. *PLoS One*, 2011, **6**(8): e22988.
- 31 Liu C, Zhou C, Gao F, *et al.* MiR-34a in age and tissue related radio-sensitivity and serum miR-34a as a novel indicator of radiation injury. *Int J Biol Sci*, 2011, **7**(2): 221-233
- 32 Ilnytsky Y, Zemp F J, Koturbash I, *et al.* Altered microRNA expression patterns in irradiated hematopoietic tissues suggest a sex-specific protective mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **377**(1): 41-45
- 33 Ghawanmeh T, Thunberg U, Castro J, *et al.* miR-34a expression, cell cycle arrest and cell death of malignant mesothelioma cells upon treatment with radiation, docetaxel or combination treatment. *Oncology*, 2011, **81**(5): 330-335
- 34 John-Aryankalayil M, Palayoor S T, Makinde AY, *et al.* Fractionated Radiation Alters Oncomir and Tumor Suppressor miRNAs in Human Prostate Cancer Cells. *Radiat Res*, 2012, **178**(3): 105-117
- 35 Zenz T, Mohr J, Eldering E, *et al.* miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2009, **113**(16): 3801-3808
- 36 Brenner D J, Doll R, Goodhead D T, *et al.* Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100**(24): 13761-1376

Effects of miR-34a on ionizing radiation injuries

LI Lei CHEN Qiu CUI Fengmei TU Yu

(School of Radiation Medicine and Protection, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT miR-34a resides in the region of chromosome 1p36.23, which regulate a plethora of target genes. Ectopic miR-34a expression can induce apoptosis, cell cycle arrest and differentiation, meanwhile reduce migration of tumour cell which known as tumour inhibiting factor. p53 was shown a capability of activating miR-34a expression and miR-34a was also shown a feedback regulation to p53 gene in reverse. Ectopic expression of miR-34a induced by ionizing radiation plays an important role in DNA damage repair, apoptosis, cell cycle and cellular radiation sensitivity. This article reviews the progress in produce of miR-34a during ionizing radiation and its participation in biological response and relative mechanism in control.

KEYWORDS miR-34a, Ionizing radiation, Cell apoptosis, Cell cycle regulation

CLC R818.74, R811.5