

基因调控

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000042

MicroRNA-21 在器官纤维化中的研究现状

文 利¹, 张 政²

(重庆医科大学 1. 基础医学院细胞生物学教研室; 2. 基础医学院遗传学教研室)

【摘 要】器官纤维化是多种因素引起的急性或慢性病理变化,如若得不到有效治疗最终会导致器官功能衰竭。近年来,关于 microRNA 的研究越来越受到重视,尤其是 microRNA-21(miR-21),作为一种小分子调节 RNA,在多种疾病包括癌症、心血管疾病、器官纤维化等的发生过程中发挥重要作用。本文就 miR-21 在各种纤维化疾病中的作用作一综述。

【关键词】microRNA-21; 小分子; 纤维化

【中图分类号】R394.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-03-09

MicroRNA-21 in organ fibrosis

Wen Li¹, Zhang Zheng²

(1. Teaching and Research Section Cell Biology; 2. Teaching and Research Section of Genetics, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Organ fibrosis is acute or chronic pathological changes caused by a variety of factors. Lack of effective treatment will eventually lead to organ failure. In recent years, the study of microRNA receives more and more attention. Especially microRNA-21, as a small molecule regulating RNA, plays an important role in the occurrence of a variety of diseases, including cancer, cardiovascular disease, organ fibrosis. This paper reviewed microRNA-21 in various fibrotic diseases.

【Key words】microRNA-21; small molecules; fibrosis

纤维化是指由于各种急性或慢性刺激因素导致器官实质细胞发生坏死,纤维结缔组织包括细胞成分和细胞外基质异常增多和过度沉积的病理过程,将会导致器官结构破坏和功能减退,如若得不到有效控制,最终会导致器官衰竭。纤维化可发生在多种器官,例如心脏、肾脏、肺、肝脏等^[1-4]。细胞成分的增多包括组织实质细胞、成纤维细胞和单核巨噬细胞的过度增殖,细胞外基质主要含有胶原、蛋白聚糖和弹性纤维等。目前发生纤维化的机制主要涉及炎症反应、创伤、组织微环境改变、细胞因子作用等^[5],但具体机制尚不明确。

MicroRNA 是一类大小约 21~23 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,可通过与靶基因 mRNA 的特定位点结合,抑制该蛋白的合成或诱导该 mRNA 的降解,从而参与基因的表达调控。每个 microRNA 可以调控多个靶基因,而特定靶 mRNA 也可以同时被多

个 microRNA 调节,由此形成复杂的调控网络。目前已经有一千多个人类被发现,这些 microRNA 调控至少 30% 以上的基因表达,参与多种生理病理过程。

国内外研究发现 microRNA 参与了纤维化疾病的发生与发展,所以 microRNA 可作为一种新型基因表达调控因子并有可能成为新的治疗靶点^[6]。大量实验证明在多种器官的纤维化中 microRNA-21(miR-21)的表达都出现显著异常,因此探索 miR-21 在器官纤维化中的作用机理,对于阐明器官纤维化的发病机制及对它的诊断和治疗有一定的启示作用。

1 miR-21 的生物学特性

编码人 pri-miR-21 的基因位于 17q23.2,这个区域也是跨膜蛋白 49(transmembrane protein 49, TMEM49)基因的含子区。尽管 pri-miR-21 是位于 TMEM49 基因内含子区的重叠基因,但 pri-miR-21 有自己独立的启动子和多聚 A 尾,它的启动子区位于转录起始位点上游的 900 bp 处,该区域存在活化蛋白 1(activator protein-1, AP-1)、Ets/PU.1、增强子结合蛋白 α (CCAAT enhancer binding protein α , C/EBP α)、核因

作者介绍:文 利,Email:cqwenli@sina.com,

研究方向: microRNA 与糖尿病肾病。

通信作者:张 政,Email:zhangzheng92@163.com。

基金项目:重庆市教委基金资助项目(编号:KJ110304)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000042.html>

子 I (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、血清应答因子、p53 和信号传导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription factor 3, STAT3) 以及其它转录因子的可能结合位点, 并且有文献报导 AP-1 和 STAT3 促进 miR-21 的转录, NF- κ B 和 C/EBP α 则是抑制 miR-21 的转录^[6-7]。

1.1 在转录水平的调控

Lin 等^[8]在研究 miRNA 对活性氧簇处理的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 的作用时发现, 经过过氧化氢处理过的 VSMC 中, miR-21 的表达上调, 并且能降低过氧化氢诱导的 VSMC 凋亡。程序性凋亡蛋白 4 (programmed cell death 4, PDCD4) 是 miR-21 的直接靶基因, miR-21 能抑制其表达, AP-1 是 PDCD4 的下游信号分子, 同时 AP-1 也是 miR-21 的转录因子促进 miR-21 的表达。故可通过 PDCD4 和 AP-1 形成 1 条自反馈调节通路, 在转录水平调节 miR-21 的表达。

1.2 在转录后水平的调控

Davis 等^[9]证明了 VSMC 中的 miR-21 可被骨形态发生蛋白 4 (bone morphogenetic protein-4, BMP-4) 及转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 迅速诱导表达, 敲除 R-Smad 后可阻止 BMP-4 及 TGF- β 对成熟的 miR-21 及 pre-miR-21 表达的上调作用, 但对 pri-miR-21 的转录并没有影响。进一步研究表明 BMP-4 及 TGF- β 可在转录后水平通过促进 Drosha 酶的加工步骤增加 pre-miR-21 及成熟 miR-21 的表达。有趣的是 BMP6, TGF- β 超家族的另一成员, 在乳腺癌组织中可以通过 E2-box 和 AP-1 结合位点抑制 miR-21 启动子活性, 从而抑制 miR-21 的表达^[10]。表明 BMPs 既可以正向也可以负向调控 miR-21 的表达, 在不同疾病或组织中呈现疾病特异性或组织特异性。

2 miR-21 在纤维化疾病中的作用

2.1 参与心肌纤维化

心肌纤维化主要是表现在心肌成纤维细胞的异常增殖和过多的细胞外基质沉积在心肌间质。Liang 等^[11]研究证实 TGF- β III 型受体负性调控 TGF- β 信号通路, 同时发现在小鼠心肌梗死边缘区的 TGF- β 和 miR-21 表达上调, 而 TGF- β III 型受体表达下调, 且证实 TGF- β III R 是 miR-21 的靶基因, 过表达 TGF- β III R 能抑制 miR-21 的表达和降低成纤维细胞合成胶原蛋白。表明在 miR-21 与 TGF- β III R 存在一个循环通路在心肌纤维化过程中发挥重要作用。Yang 等^[12]的研究也表明调节 TGF- β 信号通路和 miR-21 的表达能增强 PI3K α 信号通路, 降低心肌纤维化。TGF- β 也能诱导内皮细胞向间质转化 (endothelial to mesenchymal transition, EndMT), Kumarswamy 等^[13]研究证实 TGF- β 诱导的 EndMT 部分是通过 miR-21 介导磷酸化酶和张力蛋白同源物/Akt 信号途径实现的。

Thum 等^[14]研究显示在正常心肌组织中 miR-21 弱表达而衰竭的心肌中表达升高, 同时研究表明 Spry1, 负性调控细胞外调节蛋白激酶-丝裂原活化蛋白激酶 (extracellular

regulated protein kinases-mitogen activated protein kinases, ERK-MAPK) 信号通路, 是 miR-21 的靶基因。注射特定作用于 miR-21 的化学修饰的反义寡核苷酸到小鼠体内在横向主动脉缩窄导致的左心室压力超载的条件下, Spry1 表达水平升高, 丝裂原活化蛋白 (mitogen activated protein, MAP) 激酶活化以及纤维化^[14]。进一步研究表明 miR-21 尤其是在心脏成纤维细胞中过度表达, 在衰竭心脏的成纤维细胞表达最高^[15]。心肌成纤维细胞中 miR-21 的抑制诱导的凋亡效应对 ERK-MAPK 信号通路敏感, 过度表达 miR-21 极大程度上增加了 ERK-MAP 激酶的活化表明 miR-21 是 ERK-MAPK 信号通路的调节子, 这对成纤维细胞的存活和活化非常重要, 也在许多疾病里发挥作用^[16]。

Patrick 等^[17]研究病理性心肌重塑中 miR-21 的作用时, 注射 miR-21 抑制剂到有横向主动脉缩窄的小鼠体内 6 星期, 他们观察到经横向主动脉缩窄处理的心肌中 miR-21 的表达增强, 然而, 他们用短寡核苷酸抵抗 miR-21 与用长的寡核苷酸效应不同, 并且不能闭锁心肌重塑效应。此外, 研究人员还观察到敲除 miR-21 的小鼠仍显示出在心脏压力作用下心肌肥大和纤维化, 也许可以通过发展过程中的遗传补偿机制来解释^[18]。

2.2 miR-21 在肾脏中的作用

2.2.1 调控肾小球系膜细胞肥大 肾小球系膜细胞的肥大和细胞外基质增生是导致肾小球硬化的重要原因之一。Zhang 等^[19]在早期糖尿病肾病中即观察到 miR-21 的表达下降, 而过度表达 miR-21 可抑制小鼠系膜细胞的增殖, 并且在糖尿病小鼠体内过度表达 miR-21 可减少蛋白尿, 人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN) 是 miR-21 的直接底物并受其负性调节。同时, Dey 等^[20]在研究 TGF- β 诱导人系膜细胞肥大的过程中发现, 加入 TGF- β 能刺激 miR-21 利用肿瘤抑制基因 PTEN 作为它下游的靶基因来调控 AKT/mTORC1 信号通路从而对系膜细胞里的 TGF- β 作出反应。高表达的 miR-21 在 TGF- β 的作用下降低 PTEN 蛋白水平, 从而使 Akt 激酶磷酸化水平增高, mTORC1 活化, 促进了纤维连接蛋白和胶原蛋白的表达增加。提示 miR-21 参与调控肾小球系膜细胞肥大, 但不同物种, 不同疾病均呈不同的表达模式。

2.2.2 调控肾小管纤维化 肾纤维化是许多肾脏疾病终末期的病理表现并会导致肾功能衰竭。在人和动物的肾纤维化模型中, 与 TGF- β 结合的 Smad 被活化, 从而增加了多种胶原基因的转录, 并且 miR-21 也参与了纤维化进程^[9]。敲除小鼠的 Smad3 可以避免肾纤维化, 而 Smad2 负性调节 TGF- β 诱导的纤维化, 起保护肾脏的作用^[21]。Zhong 等^[22]研究发现, TGF- β 作用于肾小管上皮细胞时, miR-21 表达上调, 敲除 Smad3 阻止了细胞内的 miR-21 上调, 同时, 敲除 Smad3 的单侧输尿管小鼠模型能避免 miR-21 上调以及肾纤维化, Smad3 增加了 miR-21 的表达水平, 并且 miR-21 通过依赖 TGF- β 正向调控肾小管上皮细胞的细胞外基质和 α -平滑肌肌动蛋白的表达发挥作用, 但是孤立的 miR-21 并不能使肾小管纤维化。

Zarjou 等^[23]在单侧输尿管梗阻模型中也发现,在 TGF- β 或 TNF- α 的作用下, microRNA 呈现异常,其中上调的 miR-21 最为显著,进一步研究发现闭锁单侧输尿管梗阻小鼠体内 miR-21 的表达衰减了小鼠肾纤维化的程度,猜测可能是通过减少肾脏中纤维蛋白的合成和降低炎症巨噬细胞浸润达到的。Smad7 在 TGF- β 信号通路中起负性调控的作用, Chung 等^[24]在研究 Smad7 抑制肾纤维化的过程中发现,在梗阻性肾病的肾细胞里过表达 Smad7 抑制了 miR-192 和 miR-21 的表达,并且解除了 miR-21 和 miR-192 对 miR-29b 的抑制,阻断了肾脏纤维化。相反的,敲除小鼠的 Smad7 基因,使 miR-21 和 miR-192 表达上调,导致肾脏纤维化,用抗 miR-21 和 miR-192 的模拟物在肾小管上皮细胞过度表达解除了 Smad7 抑制肾纤维化的功能,表明 microRNA 在 Smad7 蛋白的下游发挥作用。另有研究表明,尿液中 miR-21 水平的升高与肾纤维化相关并有可能成为新的诊断标志物^[25]。

2.3 在其他器官中的作用

肺纤维化的主要病变特征为肺上皮细胞损伤、上皮细胞-间充质转化、成纤维母细胞灶形成、大量细胞外基质积聚。Liu 等^[26]研究结果表明 miR-21 在用博来霉素诱导的肺纤维化小鼠模型的肺中以及特发性肺间质纤维化病人的肺中呈高表达状态。TGF- β 1 可以促进初级成纤维母细胞内 miR-21 表达上调,同时上调的 miR-21 可以增强 TGF- β 1 的促纤维化作用,而沉默小鼠肺中的 miR-21 有效的衰减了博来霉素诱导的纤维化,表明 miR-21 能增强 TGF- β 1 信号导致肺纤维化。此外还有文献报导 miR-21 与 TGF- β /Smad 信号通路在肝纤维化过程中也发挥作用^[4], Wang 等研^[27]究发现大鼠肝硬化时, miR-21 表达上调 3 倍以上,体外上调肝星状细胞中 miR-21 的表达,可抑制 Smad7 活性,促进 TGF- β 介导的 HSC 活化和肝纤维化发展。另有研究表明, TGF- β 可在转录后水平通过促进 Droscha 酶的加工步骤增加 pre-miR-21 及成熟 miR-21 的表达^[9], Marquez 等^[28]认为, miR-21 通过抑制 TGF- β 信号通路中的负调节子 Smad7, 在肝纤维化过程中形成一个正反馈调节机制。

3 展 望

综上所述, miR-21 在器官纤维化的发展过程中发挥着重要作用。随着研究的深入,今后可着重于 miR-21 的转录后修饰加工、对靶基因的作用机制、单核苷酸多态性以及与其它 microRNA 共同调一个靶基因的协同效应等方面,全面深入地剖析 microRNA 的作用机制和功能,将为更深层次的认识器官纤维化的发病机制及诊断治疗铺平道路。

参 考 文 献

- [1] Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez SA. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders[J]. Am J Pathol, 2011, 179(3):1074-1080.
- [2] Chapman HA. Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary

fibrosis[J]. Annu Rev Physiol, 2011, 73:413-435.

- [3] Lan HY. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation[J]. Int J Biol Sci, 2011, 7(7):1056-1067.
- [4] Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches[J]. Chem Biol Interact, 2011, 193(3):225-231.
- [5] Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease[J]. Nat Med, 2012, 18(7):1028-1040.
- [6] Fujita S, Ito T, Mizutani T, et al. MiR-21 gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism[J]. J Mol Biol, 2008, 378(3):492-504.
- [7] Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer[J]. Blood, 2007, 110(4):1330-1333.
- [8] Lin Y, Liu XJ, Cheng YH, et al. Involvement of microRNAs in hydrogen peroxide-mediated gene regulation and cellular injury response in vascular smooth muscle cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(12):7903-7913.
- [9] Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, et al. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation[J]. Nature, 2008, 454(7200):56-61.
- [10] Du J, Yang S, An D, et al. BMP-6 inhibits microRNA-21 expression in breast cancer through repressing deltaEF1 and AP-1[J]. Cell Res, 2009, 19(4):487-496.
- [11] Liang HH, Zhang C, Ban T, et al. A novel reciprocal loop between microRNA-21 and TGF β R III is involved in cardiac fibrosis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(12):2152-2160.
- [12] Yang KC, Ku YC, Lovett M, et al. Combined deep microRNA and mRNA sequencing identifies protective transcriptome signature of enhanced PI3K α signaling in cardiac hypertrophy[J]. J Mol and Cell Cardiol, 2012, 53(1):101-112.
- [13] Kumarswamy R, Volkmann I, Jazbutyte V, et al. Transforming growth factor- β -induced endothelial-to-mesenchymal transition is partly mediated by microRNA-21[J]. Arterioscler thromb vasc biol, 2012, 32(2):361-369.
- [14] Thum T, Galuppo P, Wolf C, et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure[J]. Circulation, 2007, 116(3):258-267.
- [15] Roy S, Khanna S, Hussain SR, et al. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction; miR-21 regulates fibroblast-metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue[J]. Cardiovasc Res, 2009, 82(1):21-29.
- [16] Kim EK, Choi E J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1802(4):396-405.
- [17] Patrick DM, Montgomery RL, Qi X, et al. Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice[J]. J Clin Invest, 2010, 120(11):3912-3916.
- [18] Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, et al. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition[J]. J Cell Biol, 2005, 171(6):1023-1034.
- [19] Zhang Z, Peng HM, Chen JX, et al. MicroRNA-21 protects from mesangial cell proliferation induced by diabetic nephropathy in db/db

基因调控

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000151

杆状病毒介导肝生长因子在兔骨髓间充质干细胞中的调控表达

郑超¹, 戴闽¹, 潘志敏¹, 郭菲², 涂以济³, 程细高³, 唐丽梅⁴

(1. 南昌大学第一附属医院骨科, 南昌 330006; 2. 南昌大学第一附属医院烧伤研究所, 南昌 330006;

3. 南昌大学第二附属医院骨科, 南昌 330006; 4. 中国中医科学院针灸研究所, 北京 100007)

【摘要】目的:建立转染高效可控的携带肝生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)为目的基因的重组杆状病毒 vAc^{rTA2s-P_{hgh}-HGF}, 并探寻其在转染骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)后的最佳诱导浓度。**方法:**用转基因的方法构建重组杆状病毒 vAc^{rTA2s-P_{hgh}-HGF}, 随后转染 BM-MSCs, 用 ELISA 和 Western blot 检测不同浓度强力霉素(doxycycline, DOX)诱导体外培养兔 BM-MSCs 分泌的 HGF 浓度。**结果:**构建了高效可控重组杆状病毒 vAc^{rTA2s-P_{hgh}-HGF}, 并且成功转染兔 BM-MSCs, 用系列浓度 DOX 诱导时 ELISA 和 Western blot 均检测到 BM-MSCs 中 HGF 的表达有 DOX 诱导剂量依赖关系并且连续 7 d 持续表达, 且实验组的 HGF 的表达量明显高于对照组($P < 0.001$)。**结论:**成功构建一次性转染、高效可控的重组杆状病毒 vAc^{rTA2s-P_{hgh}-HGF}, 并实现对 HGF 表达的调控, 当 DOX 诱导浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ 时为其体外最佳诱导浓度。

【关键词】骨髓间充质干细胞; 杆状病毒; 转染; 肝生长因子; 强力霉素; 调控表达**【中图分类号】**R318.04**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-03-01

Controllable HGF expression in bone marrow mesenchymal stem cells through baculovirus system

Zheng Chao¹, Dai Min¹, Pan Zhimin¹, Guo Fei², Tu Yiji³, Cheng Xigao³, Tang Limei⁴

(1. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Nanchang University;

2. Institute of Burn, the First Affiliated Hospital of Nanchang University;

3. Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University;

4. Institute of Acupuncture, China Academy of Chinese Medical Sciences)

【Abstract】Objective: To construct an efficient and controllable recombinant baculovirus vAc^{rTA2s-P_{hgh}-HGF} and to investigate the optimum**作者介绍:** 郑超, Email: 649090483@qq.com,**研究方向:** 骨与关节。**通信作者:** 程细高, Email: cxgyaf1004@sina.com。**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81060147)。**优先出版:** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000151.html>dose of doxycycline (DOX) for the induction of hepatocyte growth factor (HGF) expression in bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) infected with vAc^{rTA2s-P_{hgh}-HGF}. **Methods:** vAc^{rTA2s-P_{hgh}-HGF} was built by gene recombination. BM-MSCs of New Zealand white rabbits were isolated and cultured by adhe-

mice[J]. FEBS Lett, 2009, 583(12): 2009-2014.

[20] Dey N, Ghosh-Choudhury N, Kasinath BS, et al. TGF β -stimulated microRNA-21 utilizes PTEN to orchestrate AKT/mTORC1 signaling for mesangial cell hypertrophy and matrix expansion[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42316.[21] Meng XM, Huang XR, Chung AC, et al. Smad2 protects against TGF- β /Smad3-mediated renal fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(9): 1477-1487.

[22] Zhong X, Chung AC, Chen HY, et al. Smad3-Mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(9): 1668-1681.

[23] Zarjou A, Yang SZ, Abraham E, et al. Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: role of miR-21[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2011, 301(4): F793-F801.

[24] Chung AC, Dong Y, Yang WQ, et al. Smad7 suppresses renal fibrosis via altering expression of TGF- β /Smad3-regulated microRNAs

[J]. Mol Ther, 2013, 21(2): 388-398.

[25] Wang G, Kwan BC, Lai FM, et al. Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: novel biomarkers of fibrosis[J]. Am J Nephrol, 2012, 36(5): 412-418.

[26] Liu G, Friggeri A, Yang YP, et al. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis[J]. J Exp Med, 2010, 207(8): 1589-1597.

[27] Wang J, Sun SB, Sun TW. Expression and possible function of microRNA-21 in cirrhotic liver tissues[J]. Chinese Journal of Hepatology, 2009, 17(1): 74-75.

[28] Marquez RT, Bandyopadhyay S, Wendlandt EB, et al. Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans[J]. Lab Invest, 2010, 90(12): 1727-1736.

(责任编辑: 唐秋姗)