

miRNA 的非经典作用机制研究进展

李潇凡^{1, 2} 耿丹丹^{1, 2} 毕瑜林² 江勇² 王志秀² 常国斌^{1, 2} 陈国宏^{1, 2}
白皓¹

(1. 扬州大学农业科技发展研究院 教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室, 扬州 225009; 2. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘要: microRNA (miRNA) 是一类在进化上较为保守的内源性非编码单链 RNA 分子 (ncRNAs), 包含大约 20-22 个核苷酸, 通过与靶基因 mRNA 互补作用参与调控基因表达及多种生理生化过程。目前研究主要集中于 miRNA 通过剪切 mRNA 或抑制翻译负调控基因表达的经典作用机制上, 但是针对 miRNA 非经典作用机制的研究较少。本文综述了近年来包括 miRNA 前体可编码多肽、miRNA 可与其他功能蛋白相结合、miRNA 可直接激活 TLR 受体蛋白、miRNA 可提高蛋白表达水平、miRNA 靶向调控线粒体相关基因 mRNA 以及 miRNA 可直接调控基因转录过程等 6 种 miRNA 的非经典作用机制, 旨在能够更加深入和系统地理解 miRNA 的非经典作用模式, 为解析 miRNA 在生物体内复杂的分子调控机制提供新的思路和方法。

关键词: miRNA; 非经典作用机制; 分子调控

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2022-0014

Research Progress in Unconventional miRNA Functions

LI Xiao-fan^{1, 2} GENG Dan-dan^{1, 2} BI Yu-lin² JIANG Yong² WANG Zhi-xiu² CHANG Guo-bin^{1, 2}
CHEN Guo-hong^{1, 2} BAI Hao¹

(1. Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-Product Safety, the Ministry of Education of China, Institutes of Agricultural Science and Technology Development, Yangzhou University, Yangzhou 225009; 2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract: microRNAs (miRNAs) are a class of evolutionarily conserved endogenous small noncoding RNAs (ncRNAs), containing approximately 20-22 nucleotides, are involved in the regulating gene expressions and multiple physiological and biochemical processes by complementary functions with target gene mRNAs. Current studies mainly focus on the conventional functions of miRNAs negatively regulating the expressions of specific target genes by cleaving their mRNAs or otherwise inhibiting their translation into proteins. However, there are few studies on the unconventional functions of miRNAs. In this review, we emphatically summarized the 6 unconventional miRNA functions, including pri-miRNAs coding for peptides, miRNAs interacting with non-AGO proteins, miRNAs directly activating Toll-like receptors, miRNAs upregulating protein expression, miRNAs targeting mitochondrial transcripts, and miRNAs directly activating transcription, aiming to understand the unconventional miRNA functions more deeply and systematically, and provide novel ideas and methods for revealing the complex molecular regulation mechanism of miRNA *in vivo*.

Key words: miRNA; unconventional functions; molecular regulation

microRNA (miRNA) 是一类在进化上较为保守的内源性非编码单链 RNA 分子, 包含大约 20-22 个核苷酸, 是基因表达的重要调控因子^[1-2]。自发现以来, 人们对其生物学功能进行了大量的研

收稿日期: 2022-01-05

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31902140), 国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-41), 扬州市“绿扬金凤计划”

作者简介: 李潇凡, 女, 硕士研究生, 研究方向: 家禽遗传育种; E-mail: ylccoco@126.com

通讯作者: 白皓, 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 家禽遗传育种; E-mail: bhowen1027@yzu.edu.cn

究,截至2021年12月,miRNA数据库(miRBase, <http://mirbase.org/>)的最新版本包含了近300个物种中超过38 000个潜在miRNA的信息。随着人们对miRNAs的结构特征和成熟机制认识逐渐深入,它们在细胞中的主要功能和相关蛋白因子的范围被确定。目前,科学界公认其功能是在细胞质中负调控基因表达^[1],即编码miRNA的基因通过细胞核中的RNA聚合酶II或III转录为包含5'帽子结构和3'端polyA尾的miRNA的前体(pri-miRNA)^[3],随后pri-miRNA由RNase III酶Drosha和辅助因子DGCR8共同组成的复合体进一步加工以形成茎环或发夹结构前体miRNA(pre-miRNA)^[4-5],并通过exportin-5^[6]从细胞核运输到细胞质,后通过Dicer酶和RNA结合蛋白TRBP进一步加工成miRNA双链。miRNA双链解开后,引导链与Argonaute(AGO)蛋白形成RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC),其中成熟的miRNA通过靠近5'端的种子区与同源mRNA 3'端的碱基配对结合,进而抑制靶标mRNA翻译或者影响mRNA稳定性,对转录后基因表达水平进行负调控,该过程主要由AGO的合作伙伴-功能蛋白GW182介导完成^[7],而双链的另一条链则立即降解,这就是miRNA在生物体内的经典作用机制。

如今越来越多的证据阐明了miRNA在细胞核中的亚细胞定位^[8],并研究了其在细胞稳态中的各种新功能是通过非经典作用机制进行调控^[9],主要包括miRNA前体可编码多肽、miRNA可与其他功能蛋白相结合、miRNA可直接激活TLR受体蛋白、miRNA可提高蛋白表达水平、miRNA靶向调控线粒体相关基因mRNA以及miRNA可直接调控基因转录过程等6种非经典作用机制。本文针对近年来miRNA的6种非经典作用机制进行总结,旨在能够更加深入和系统地理解miRNA的非经典作用模式,为解析miRNA在生物体内复杂的分子调控机制提供新的思路和方法。

1 miRNA前体 pri-miRNA 编码调节肽 miPEPs

成熟的miRNA是由编码基因(MR基因)转

录后经过一系列加工后所得。在转录过程中, pri-miRNA易被剪切为pre-miRNA,且存在时间较短,因此有关于miRNA的机制研究主要集中于miRNA成熟体方向。近期研究表明,miRNA的前体pri-miRNA可能具有潜在的编码功能。pri-miRNA序列的5'UTR包含短的开放阅读框架(small open reading frames, smORFs),能被翻译成大小4-60个氨基酸的功能短肽(microRNA-encoded peptides, miPEP),过表达或外用miPEP可通过增强其相关MR基因的转录,影响相应miRNA的转录水平,对成熟miRNA进行正向调控^[10-11]。一般情况下miPEP通过被动扩散和胞吞作用相关过程进入细胞进行调控,合成的miPEP(无额外的修饰和加工)也能产生相同的自动调节效果,这与通常作为配体被相关受体识别的前体衍生肽不同^[12-14]。

2015年,Lauresergues等^[15]首次发现蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)的pri-miR176和拟南芥的pri-miR165a能分别编码短肽miPEP176和miPEP165a,这两个短肽增加了相应miRNA的积累和靶基因的下调,导致侧根发育迟缓并能刺激主根生长。目前通过人工合成miPEP,在大豆、葡萄等农作物上miPEP的调节功能都得到了验证^[11, 16]。由于在人类、动物和植物中miRNA序列都很保守,因此研究pri-miRNAs在哺乳动物细胞中是否编码miPEP具有重要的价值。目前已证明在人类细胞中可以编码miPEP-200a和miPEP-200b^[17-18]。2020年,Niu等^[19]研究报道人树突状细胞(dendritic cells, DCs)中miR-155可以编码多肽miPEP-155,其可以特异性地与DC细胞的互作蛋白HSC70的ATPase功能域绑定,降低炎症环境中DC细胞MHC-II的表达和转运水平,调控其抗原提呈功能。

如今多项研究表明动植物细胞中的pri-miRNA具有潜在的编码功能,能编码出具有调控功能的短肽miPEP,miPEP其能影响相应的miRNA的转录水平,可通过增强其相关MR基因的转录,对成熟miRNA进行正向调控。

2 miRNA可与多种功能蛋白相结合

几十年来,RNA互作结合蛋白(RBPs)在前

体 mRNA (pre-mRNA) 剪接、mRNA 移动、mRNA 分解和翻译中的作用均被广泛研究^[20-22]。一般认为,成熟的 miRNA 与 AGO 蛋白复合体组成一个 RISC 复合物,结合并调节含有相关顺式调控元件的靶标 mRNA 的表达^[23]。在此过程中,AGO2 蛋白及其家族蛋白 (AGO1、AGO3 和 AGO4) 被认为是专门处理和装载具有独特结构特征的 miRNA 的 RBP^[24]。近期研究表明,有少数功能蛋白 (miRBPs) 与 AGO2 蛋白功能相似,也可以与成熟的 miRNA 结合^[25-26]。

2012 年有研究报道,在 HeLa 细胞中 miRNA 的表达量是 AGO 家族蛋白的 13 倍,而 miRNA 与 mRNA 的结合量是 AGO 家族蛋白的 7 倍^[27],这种“过量”miRNA 分子在细胞中的作用仍不清楚,而维持 miRNA 的浓度和稳定性已被证明涉及许多 RNA 结合蛋白,例如 HuR 和 AUF1^[28]。这些研究结果表明除 AGO 蛋白家族外,miRNA 还可与其他功能蛋白结合发挥非经典调控途径。Mukherjee 等^[29]研究发现,HuR 可以从 AGO2 中竞争性结合 mir-122,并在自身泛素化作用下从结合状态中脱离,来调节 mir-122 的胞外输出。Eiring 等^[30]研究发现,mir-328 除了发挥正常负调控功能,还可以竞争性结合 hnRNP E2 蛋白来阻碍其与 CEBPA 蛋白的 mRNA 结合,导致了 CEBPA 核转录因子表达量上升。除了竞争性结合,也有一些研究支持 miRNA 与 AGO 和 miRBPs 三者之间存在合作性结合:如 UFI 与 let-7 的直接结合有助于其在体外以单分子水平转移至 AGO2^[31-32],HuR 可以增加 let-7 与 AGO2 的结合量^[31]。Song 等^[33]研究发现 mir-346 的中间序列基序 (CCGCAU) 可以与 GRSF1 相结合,再与 hTERT 3'UTR 结合时形成“鼓包环”,促进 hTERT mRNA 向核糖体的聚集从而上调 hTERT 的表达,以独立于 AGO2 调节的方式促进翻译。另外,除了成熟的 miRNA,pre-miRNA 也可以与功能蛋白相结合^[34]。

可以看出,成熟 miRNA 和 pri-miRNA、pre-miRNA 能与多种功能蛋白相结合,并存在多种结合方式,如可逆性结合、竞争性结合和合作性结合等,发挥非经典调控途径,展现出 miRNA 调控细胞命运的双重控制能力。

3 miRNA 可作为信号分子直接激活 TLR 受体蛋白

如今普遍认为,miRNA 能够感知 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR),特别是核内受体 TLR7 可以被大脑中存在的 miRNA 直接激活,miRNA 作为信号分子在不影响受体蛋白量的情况下发挥作用。早期研究报道,细胞外的 let-7 能激活 TLR7,并通过神经元 TLR7 诱导神经变性^[35]。游离的细胞外 miRNA let-7b 可以激活小鼠巨噬细胞和小胶质细胞中的 TLR7 信号,诱导肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) 的产生导致神经元死亡,这种效应在 TLR7 缺乏的细胞中并不存在^[35]。

目前研究表明,游离 miRNA 进入细胞并到达核内体诱导信号传导主要受两方面因素影响:一方面是 miRNA 需要被包裹在某些类型的载体里以保护它们在到达核内体的过程中免受降解,有研究发现,猿猴免疫缺陷病毒诱导的脑炎模型脑中的细胞外囊泡 (EVs) 中 miR-21 水平升高,并且 miR-21 可以通过 TLR7 发出信号诱导神经毒性^[35]。通过将 miRNAs 与阳离子脂质体如 1, 2-二油酰-3-三甲基铵-丙烷 (DOTAP)、lipofectamine 或 LyoVec 络合物来模拟 EVs 的作用,将细胞暴露于这些络合物中,能发现 miRNAs 位于 TLR7/8 附近的核内体中。研究表明在巨噬细胞中,与 DOTAP 复合的 miR-21 和 miR-29a 通过小鼠 TLR7 和人 TLR8 发出信号,诱导 TNF- α 和 IL-6 的产生^[28],而未与 DOTAP 结合的游离 miRNA 在体外不会诱导 TNF- α 的产生。另一方面研究发现,miRNA 序列特定位置的某些核苷酸会影响 TLR 的激活^[28]。Wu 等^[36]认为具有特定序列基序和长度的细胞外 miRNA 是有效的 TLR7 激活剂,可以触发先天免疫反应。其中 U 和 C 对 TLR7 活化起到关键作用,并鉴定出两个由 10 个核苷酸组成的 miRNA 序列 UGCUUAUAGU 和 GUGCUUAUAG,可以刺激 TNF- α 的产生,这是已知激活 TLR7 的最短 ssRNA 序列。

TLR7 是导致中枢神经系统损害扩散的途径中的一个基本要素,miRNA 的这种作用机制与肿瘤-免疫系统的通讯有关,在肿瘤生长和扩散中起到关键作用,具有重要的研究意义。

4 miRNA 可上调蛋白表达水平

基因表达调控是一个复杂而有序的过程,包括有多种水平的调控,其中转录后水平的调控起着不可忽视的作用。在该过程中,miRNA 主要作为抑制剂来影响 mRNA 稳定性及翻译效率,下调蛋白表达水平。但最近的一些研究揭示了 miRNA 在翻译过程中对 mRNA 稳定性及翻译效率起到积极作用,达到上调蛋白表达水平的效果^[37-38]。

研究发现,位于一些 mRNA 3'UTR AU 富含元件(AU-rich element, ARE)是能在转录后水平调节 mRNA 稳定性的元素之一,它兼具介导相关因子 mRNA 衰变及增强某些 mRNA 稳定性的作用。Vasudevan 等^[39]首先发现在细胞周期停滞时,miRNAs 可以通过招募 AGO 和 FXR1 到靶标 mRNAs 的 ARE 区域来激活翻译。而 let-7 可以和人工合成的 mircxcr 4 在细胞周期阻滞中协同促进靶标 mRNA 的翻译上调,但在细胞增殖过程中抑制翻译,即其翻译调控随细胞周期的变化在抑制和激活之间波动。与此相似,AGO2-miR369-3p 复合物可以结合 TNF- α ARE 招募 FXR1,从而刺激 TNF- α 的翻译^[39],而 miR-125b 可以通过防止 ARE 降解来增强 κ B-Ras2 mRNA 的稳定性和表达^[40]。除了与 3'UTR 的 ARE 的结合之外,miRNA 还可以通过与 mRNA 的 5'UTRs 相互作用来促进 mRNA 翻译。如 miR-10a 通过与核糖体蛋白 mRNA 的 5'UTRs 相互作用来增强 mRNA 的翻译^[41];miR-346 除了与 3'UTR 结合激活翻译之外^[42],还可以通过靶向 RIP140 mRNA 的 5'UTR 来提高 RIP140 蛋白水平^[43];miR-483-5p 也被证明可以通过与 IGF2 mRNA 的 5'UTR 结合来促进 IGF2 转录^[44]。此外,在实际生产中有研究结论表明 miRNA 可能在 mRNA 转录后调节过程中起到作用,如 gga-miR-222a 能上调两个蛋氨酸合酶基因 Odosp_3416 和 BF9343_2953 的表达,增加蛋氨酸浓度^[45],在植物中,干旱胁迫条件下 miRNA-156 能上调花青素基因表达,形成多酶复合物,该复合物将在粗面的内质网(RER)的胞质面合成更高水平的花青素,从而提高抗干旱胁迫能力^[46]。

miRNA 在发挥抑制剂作用的同时,也能够在翻译过程中起到上调靶向 mRNA 表达作用,其可以通

过招募功能蛋白到靶标 mRNAs 3'UTR 的 ARE 区域或 5'UTRs 来激活翻译,上调蛋白表达水平。

5 miRNA 靶向调控线粒体相关基因 mRNA

Mitochondrial microRNA (mitomiRs) 指位于线粒体内部的 miRNA,它们绝大部分由核基因组编码并转移至线粒体的 miRNA,在线粒体内转录并调节线粒体基因表达。还存在少部分由线粒体基因组直接编码合成的 miRNA^[47-48],这些 mitomiRs 的功能与细胞质定位的 miRNA 存在差异。

对于核来源 mitomiRs,普遍认为核编码的 miRNA 成熟后进入线粒体抑制线粒体转录物的翻译^[47, 49]。研究发现,miR-181c 作为核来源 miRNA 定位于新生大鼠心室肌细胞线粒体中,可以与来自线粒体基因组的细胞色素 c 氧化酶亚基 1(mt-COX1) mRNA 的 3'UTR 相结合,过表达 miR-181c 可以显著降低 mt-COX1 蛋白水平^[50]。Fan 等^[51]研究发现,核来源的 miR-2392 可以穿梭到线粒体中并与 mtDNA 杂交,下调调控癌症中氧化磷酸化、代谢重编程和化学抗性的基因。此外,有研究发现在肌肉分化过程中,miR-1 可以通过与特异性 mRNA 碱基互补配对来促进线粒体基因组转录物的翻译,在该过程中 miR-1 只需要与 AGO2 结合,功能蛋白 GW182 并没有参与^[52]。随着研究进一步深入,发现这些 mitomiRs 在缺乏线粒体 DNA 的细胞中不表达,如在针对人正常前列腺上皮细胞(PNT1A)的野生型(WT)和 mtDNA 缺失型(Rho0)细胞中 mitomiRs 的表达水平研究发现,mitomiRs 在 Rho0 型 PNT1A 细胞中的表达水平显著低于其在 WT 型 PNT1A 细胞中的表达水平^[53]。对于线粒体来源的 miRNA 研究相对较少,目前在人类和哺乳动物中已检测到线粒体来源 miRNA^[53-54],在人类和小鼠的线粒体基因组也存在编码类似 miRNAs 的 mitomiRs^[55]。尚未检测到线粒体内存在由 miRNAs 介导的翻译抑制过程中必须的功能蛋白 GW182,这与前文中的研究结果相照应^[52-53],miRNA 加工蛋白 Drosha 和 DGCR8 也未检测出;Dicer 酶同样被证实不存在于线粒体中^[53],该结论在小鼠心肌细胞也被证实^[56]。但 Vargas 等^[57]研究报道 pre-miR-338 和 Dicer 酶可以在 SCG 神经元轴突线粒体中共定位。

多项研究表明线粒体功能障碍与心脑血管疾病及癌症等有关，miRNA 在细胞特异性表达表明他们有可能参与线粒体相关疾病，这无疑为线粒体 ncRNA 调控网络的研究指明了方向，有助于更全面的理解线粒体生物学，未来对 mitomiRs 分布和功能的具体机制的研究可以确定新的药物递送途径和线粒体生物标志物，有助于更好地理解线粒体功能障碍相关疾病的诊疗和治疗方法。

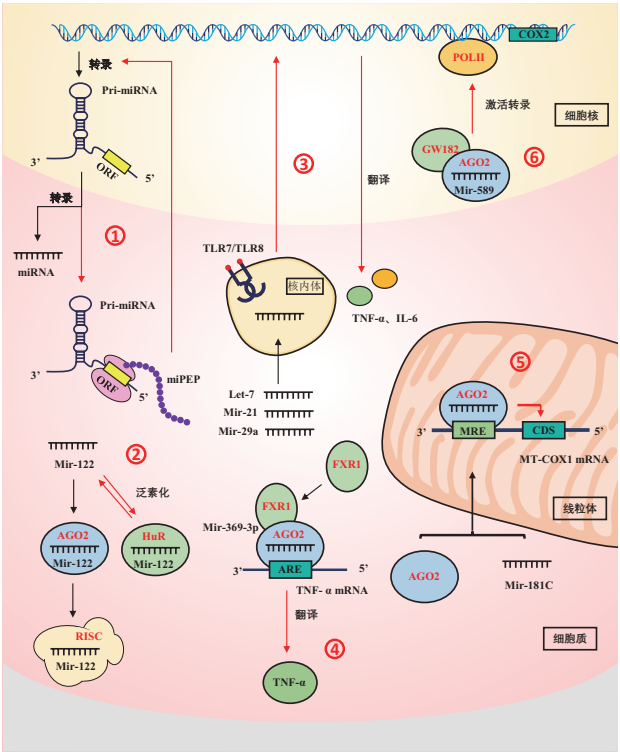
6 miRNA 可直接调控基因转录过程

在 miRNA 经典调控途径中，成熟的 miRNA 通常在细胞质中形成 RISC，与靶标 mRNA 的 3'UTR 碱基配对，靶点选择主要由 miRNA 5'UTR 序列决定，对细胞质中的蛋白质合成进行抑制^[58-59]。有不同研究表明，miRNA 包含的额外序列元素可以改变它们的亚细胞定位进而调控它们的转录后行为，即 miRNA 也可以在细胞核中发挥作用，来自高通量测序的数据甚至预测了核 miRNA 的基因组 DNA 结合位点，这可能在 miRNA 转录调控研究中发挥作用^[60]。

在细胞核中已证实存在 miRNA 作用机制所需的成分，比如 AGO2 和 Dicer 酶，但在细胞核和细胞质之间的机制不同。其中，核 RISC 蛋白分子量 158 kD，相较于核 RISC 平均 3 MD 的分子量要小很多，成分有所缺失，仅由 AGO2 和一个短 RNA 形成^[61]。因此普遍认为 AGO2/miRNA 复合物可以在细胞核外构成，形成的 RISC 复合物可进入细胞核内^[62]。核-细胞质运输也由 Exportin-1 介导^[63]，由 miRNA 序列中特定核定位信号(AGUGUU 基序、5'-UUGCAUGU-3' 和 5'-AGGUUGKSUG-3' 基序等)指导富集^[64-65]，再由核孔蛋白泵入到细胞核内进行修饰^[66]，与靶基因启动子区域相互作用直接激活转录过程，如在 AGO2 和 GW182 作为支架参与的情况下，miR-589 可结合环氧化酶 -2 (COX-2) 启动子并激活基因转录^[67]；miR-744 和 miR-1186 通过靶向 cyclinB1 基因启动子上调 Ccnb1 基因的表达^[68]，这种小 RNA 参与的通过结合启动子区域在转录水平激活基因的现象被称为 RNA 激活 (RNAa)。此外 miRNA 也可以靶向负调控其他非编码 RNA 的前体 RNA，如 miR-709 可以与 pri-miR-15a 和 pri-miR-16-1 结合，阻止它们的进一步加工以调节小鼠细胞的凋亡^[69]。miR-

122 可以通过与核蛋白结合来阻止 pri-miR-21 的成熟^[70]，近年来有研究发现，NamiRNAs (核激活 miRNAs) 能够激活增强子，如 miR-24 可以改变增强子位点的染色质状态，使组蛋白修饰 H3K27ac 富集在 miR-24 靶向的增强子区域，该过程依赖增强子的完整性；miR-26a-1 在 400 kb 的窗口中被蛋白质编码基因 ITGA9 和 VILL 包围，过表达的情况下能激活其转录^[71]。综上可以看出 miRNA 与增强子相互作用能调节基因表达和细胞稳态，然而 miRNA 增强子相互作用机理和功能的分子机制仍有待进一步挖掘。

除却自细胞核转移至细胞质发挥作用的经典调控途径，部分 miRNA 还可以依照自身额外的序列改



①：miRNA 前体 pri-miRNA 编码调节肽 miPEPs；②：miRNA 与多种功能蛋白相结合；③：miRNA 作为信号分子直接激活 TLR 受体蛋白；④：miRNA 上调蛋白表达水平；⑤：miRNA 靶向调控线粒体相关基因 mRNA；⑥：miRNA 直接调控基因转录过程

①：pri-miRNAs coding for peptides miPEPs；②：miRNAs interacting with non-AGO proteins；③：miRNAs as signals molecules activating TLR receptors；④：miRNAs upregulating protein expression；⑤：miRNAs regulating the gene mRNA related to mitochondria in target；⑥：miRNAs directly regulating gene transcription

图 1 miRNA 非经典作用机制

Fig. 1 Unconventional miRNA functions

变亚细胞定位从而调控自身的转录后行为，即在细胞核内调控基因转录过程，发挥非经典调控作用。

7 问题与展望

本文重点阐述了 6 种 miRNA 非经典作用机制及其研究进展，在实际研究中仍有其他的非经典调控途径被科学家们所关注，如 miRNA 可以与细胞核中的 pri-miRNA 结合来阻止它们的进一步加工^[69, 72]，但其作用机制仍需深入研究，是今后 miRNA 研究的一个重要方向；还有研究发现在细胞内同一条信号转导通路上，miRNA 可以同时通过其种子区序列和非种子区序列与靶基因 / 转录因子的 3' 端结合^[73-74]，

这种功能机制可以达到更加有效且稳定的基因调控作用，对以 miRNA 为靶点的多种疾病治疗提供了新的思路和方法。另外，通过对 miRNA 的亚细胞定位，在内质网^[75]和无细胞质膜的小室（如 SGs）^[76]中都检测到了 miRNA，这些 miRNA 可能是调节特定生物过程和肿瘤发生所必需的，对研究细胞适应性具有重要意义。然而，由于相关研究较少，位于不同亚细胞区室的 miRNA 的组织、运输和功能在很大程度上是未知的，在本文中并未详细阐述。

近年来，miRNA 在许多重要生物过程中得到了研究者的广泛关注。miRNA 的结构、基因组编码、表达和成熟方式等方面的许多具体特征已被阐明，

表 1 miRNA 非经典作用机制主要研究进展

Table 1 Research progresses in unconventional miRNA functions

作用机制 Functions	物种 Species	性状 Traits	相关 miRNA Related miRNAs	参考文献 Reference
miRNA 前体 pri-miRNA 编码调节肽 miPEPs	植物	根系发育	pri-miR176、pri-miR165a	[15]
			pri-mir171d	[16]
			pri-mir858a	[77]
	植物	叶片发育	mir-165a	[78]
	植物	大豆根瘤结瘤	mir-172c	[11]
miRNA 与多种功能蛋白相结合	人类	前列腺癌	miR-200a、miR-200b	[18]
	人类	类银屑病与多发性硬化症（EAE）	mir-155	[19]
	人类	饥饿应激反应	mir-122	[29]
	人类	慢性骨髓性白血病	mir-328	[30]
	人类	癌细胞发育调节	mir-346、mir-138、pri-let-7	[33]
miRNA 作为信号分子直接激活 TLR 受体蛋白				[79]
	动物	哺乳动物胚胎发育	let-7	[80]
	小鼠	阿尔茨海默病	let-7	[35]
	小鼠	中枢神经系统疾病	mir-20a-5p、mir-148b-3p	[36]
	人类	丙型肝炎病毒（HCV）	mir-122	[37]
miRNA 上调蛋白表达水平	人类	巨噬细胞调节	mir-125b	[40]
	人类	宫颈癌	mir-346	[42]
	人类	小儿癌症	mir-483	[44]
	动物	肠道菌群调节	gga-miR-222a	[45]
	植物	干旱胁迫	mir-156	[46]
miRNA 靶向调控线粒体相关基因 mRNA	人类	骨骼肌线粒体调节	pre-mir-302a、pre-let-7b、mir-365	[47]
	大鼠	心脏线粒体调节	mir-181c	[50]
	人类	肿瘤细胞代谢和化学耐药性	mir-2392	[51]
	小鼠	心肌线粒体调节	mir-1	[52]
	人类	神经发育	mir-338	[57]
F : miRNA 直接调控基因转录过程	小鼠	肿瘤生长调节	mir-744、mir-1186	[68]
	小鼠	细胞凋亡调节	mir-709	[69]
	人类	肿瘤生长调节	miR-24、miR-16a-1	[71]

参与的事件范围在经典调控途径的基础上逐步扩大,这为我们揭示了一片新的图景(图1)。可以看出多数非经典调控机制都涉及到 miRNA 的亚细胞定位,其中 miRNA 前体可编码多肽、miRNA 可直接激活 TLR 受体蛋白、miRNA 靶向调控线粒体相关基因 mRNA 以及 miRNA 可直接调控基因转录过程都与 miRNA 的亚细胞定位有关。自从发现 miRNA 以来,由于技术限制,它们的亚细胞定位在很大程度上被忽视。尽管在分离纯亚细胞组分和基于免疫荧光的精确定位分析方面仍存在一些技术困难,但积累的研究为 miRNA 的亚细胞定位和新的 miRNA 调控机制提供了广阔的视野,测序技术的进步已经确定大量 miRNA 富集于细胞核和多种细胞器中,他们的高丰度表明了 miRNA 在转录和转录后调节中存在重要功能作用。

但受制于目前多数动植物基因组、转录组、蛋白质等信息的匮乏以及技术手段的限制,调控机制的某些关键节点和细节仍没有得到答案,比如在 pri-miRNA 编码调节肽 miPEPs 中,miPEP 如何执行他们的生物学功能,与其对应的 pri-miRNAs 的上调是否有特异性;pri-miRNA 的细胞质翻译和 miRNA 的核成熟能否同时发生,pri-miRNA 如何协调其编码和非编码过程;在 miRNA 作为信号分子进入细胞并到达内体诱导信号传导的机制并不清楚,诱导 miRNA 激活 TLR7 激活的基序尚未确定;mitomiRs 易位进入线粒体调控的具体机制还存在争议,mtDNA 编码的 miRNAs 是否存在非典型的生物发生机制依然存疑,无法证明这些 miRNA 是否来自 mtDNA 编码,还是污染副产物,或是线粒体中存在另一套 RNA 干扰机制。另外,大多数调控机制仅停留在研发阶段,植物研究多集中在拟兰芥和苜蓿等模式植物上,其他植物上少见报道,而动物上使用人类和小鼠细胞系进行研究,未进行到临床试验阶段(表1)。相信实验技术的精进和研究的深入,miRNA 及其他小 RNA 分子参与的表达调控机制的网络会逐步明晰,这将有利于我们进一步了解生物体内部的运作机制,为研究 miRNA 在调控基因表达和功能中的作用及其机制打开了新的窗口,释放其在人类和动植物上重大的应用潜能。

参考文献

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *Lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *Lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75 (5): 843-854.
- [2] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403 (6772): 901-906.
- [3] Stavast G, Erkeland S. The non-canonical aspects of microRNAs: many roads to gene regulation [J]. *Cells*, 2019, 8 (11): 1465.
- [4] Partin AC, Zhang KM, Jeong BC, et al. Cryo-EM structures of human drosha and DGCR8 in complex with primary microRNA [J]. *Mol Cell*, 2020, 78 (3): 411-422. e4.
- [5] Rice GM, Shivashankar V, Ma EJ, et al. Functional atlas of primary miRNA maturation by the microprocessor [J]. *Mol Cell*, 2020, 80 (5): 892-902. e4.
- [6] Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs [J]. *RNA*, 2004, 10 (2): 185-191.
- [7] Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 19-53.
- [8] Wong JLL, Ritchie W, Gao DD, et al. Identification of nuclear-enriched miRNAs during mouse granulopoiesis [J]. *J Hematol Oncol*, 2014, 7: 42.
- [9] Dragomir MP, Knutsen E, Calin GA. SnapShot: unconventional miRNA functions [J]. *Cell*, 2018, 174 (4): 1038-1038. e1.
- [10] Huffaker A, Dafoe NJ, Schmelz EA. ZmPep1, an ortholog of *Arabidopsis* elicitor peptide 1, regulates maize innate immunity and enhances disease resistance [J]. *Plant Physiol*, 2011, 155 (3): 1325-1338.
- [11] Couzigou JM, André O, Guillotin B, et al. Use of microRNA-encoded peptide miPEP172c to stimulate nodulation in soybean [J]. *New Phytol*, 2016, 211 (2): 379-381.
- [12] Yamaguchi Y, Huffaker A, Bryan AC, et al. PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2010, 22 (2): 508-522.
- [13] Oh E, Seo PJ, Kim J. Signaling peptides and receptors coordinating plant root development [J]. *Trends Plant Sci*, 2018, 23 (4):

- 337-351.
- [14] Ormancey M, le Ru A, Duboé C, et al. Internalization of miPEP165a into *Arabidopsis* roots depends on both passive diffusion and endocytosis-associated processes [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (7): 2266.
- [15] Laressergues D, Couzigou JM, Clemente HS, et al. Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides [J]. *Nature*, 2015, 520 (7545): 90-93.
- [16] Chen QJ, Deng BH, Gao J, et al. A miRNA-encoded small peptide, vvi-miPEP171d1, regulates adventitious root formation [J]. *Plant Physiol*, 2020, 183 (2): 656-670.
- [17] Wang JZ, Zhu S, Meng N, et al. ncRNA-encoded peptides or proteins and cancer [J]. *Mol Ther*, 2019, 27 (10): 1718-1725.
- [18] Fang JB, Morsalin S, Rao V, et al. Decoding of non-coding DNA and non-coding RNA : pri-micro RNA-encoded novel peptides regulate migration of cancer cells [J]. *J Pharmaceut Sci Pharmacol*, 2017, 3 (1): 23-27.
- [19] Niu LM, Lou FZ, Sun Y, et al. A micropeptide encoded by lncRNA MIR155HG suppresses autoimmune inflammation via modulating antigen presentation [J]. *Sci Adv*, 2020, 6 (21): eaaz2059.
- [20] Gerstberger S, Hafner M, Tuschl T. A census of human RNA-binding proteins [J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15 (12): 829-845.
- [21] Lunde BM, Moore C, Varani G. RNA-binding proteins : modular design for efficient function [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8 (6): 479-490.
- [22] Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, et al. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582 (14): 1977-1986.
- [23] Meister G. Argonaute proteins : functional insights and emerging roles [J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14 (7): 447-459.
- [24] Kwon SC, Nguyen TA, Choi YG, et al. Structure of human DROSHA [J]. *Cell*, 2016, 164 (1/2): 81-90.
- [25] Yoon JH, De S, Srikantan S, et al. PAR-CLIP analysis uncovers AUF1 impact on target RNA fate and genome integrity [J]. *Nat Commun*, 2014, 5 : 5248.
- [26] Mukherjee N, Corcoran DL, Nusbaum JD, et al. Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability [J]. *Mol Cell*, 2011, 43 (3): 327-339.
- [27] Janas MM, Wang BB, Harris AS, et al. Alternative RISC assembly : binding and repression of microRNA-mRNA duplexes by human Ago proteins [J]. *RNA*, 2012, 18 (11): 2041-2055.
- [28] Zealy RW, Wrenn SP, Davila S, et al. microRNA-binding proteins : specificity and function [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2017, 8 (5): 2017 Sep ; 8 (5) .
- [29] Mukherjee K, Ghoshal B, Ghosh S, et al. Reversible HuR-microRNA binding controls extracellular export of miR-122 and augments stress response [J]. *EMBO Rep*, 2016, 17 (8): 1184-1203.
- [30] Eiring AM, Harb JG, Neviani P, et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts [J]. *Cell*, 2010, 140 (5): 652-665.
- [31] Yoon JH, Abdelmohsen K, Kim J, et al. Scaffold function of long non-coding RNA HOTAIR in protein ubiquitination [J]. *Nat Commun*, 2013, 4 : 2939.
- [32] Peredo J, Villacé P, Ortín J, et al. Human Staufen1 associates to miRNAs involved in neuronal cell differentiation and is required for correct dendritic formation [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (11): e113704.
- [33] Song G, Wang RJ, Guo JF, et al. miR-346 and miR-138 competitively regulate hTERT in GRSF1⁻ and AGO2⁻ dependent manners, respectively [J]. *Sci Rep*, 2015, 5 : 15793.
- [34] Piskounova E, Viswanathan SR, Janas M, et al. Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28 [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (31): 21310-21314.
- [35] Lehmann SM, Krüger C, Park B, et al. An unconventional role for miRNA : let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration [J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15 (6): 827-835.
- [36] Wu NM, Morsey BM, Emanuel KM, et al. Sequence-specific extracellular microRNAs activate TLR7 and induce cytokine secretion and leukocyte migration [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476 (11): 4139-4151.
- [37] Henke JL, Goergen D, Zheng JF, et al. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA [J]. *EMBO J*, 2008, 27 (24): 3300-3310.
- [38] Vasudevan S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2012, 3 (3): 311-330.
- [39] Vasudevan S, Tong YC, Steitz JA. Switching from repression to activation : microRNAs can up-regulate translation [J]. *Science*,

- 2007, 318 (5858) : 1931-1934.
- [40] Murphy AJ, Guyre PM, Pioli PA. Estradiol suppresses NF- κ B activation through coordinated regulation of let-7a and miR-125b in primary human macrophages [J] . J Immunol, 2010, 184 (9) : 5029-5037.
- [41] Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. microRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation [J] . Mol Cell, 2008, 30 (4) : 460-471.
- [42] Guo JF, Lv J, Liu M, et al. miR-346 up-regulates argonaute 2 (AGO2) protein expression to augment the activity of other microRNAs (miRNAs) and contributes to cervical cancer cell malignancy [J] . J Biol Chem, 2015, 290 (51) : 30342-30350.
- [43] Tsai NP, Lin YL, Wei LN. microRNA mir-346 targets the 5'-untranslated region of receptor-interacting protein 140(RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression [J] . Biochem J, 2009, 424 (3) : 411-418.
- [44] Liu MZ, Roth A, Yu M, et al. The IGF2 intronic miR-483 selectively enhances transcription from IGF2 fetal promoters and enhances tumorigenesis [J] . Genes Dev, 2013, 27 (23) : 2543-2548.
- [45] Xing SC, Huang CB, Wu RT, et al. Breed differences in the expression levels of gga-miR-222a in laying hens influenced H₂S production by regulating methionine synthase genes in gut bacteria [J] . Microbiome, 2021, 9 (1) : 177.
- [46] González-Villagra J, Kurepin LV, Reyes-Díaz MM. Evaluating the involvement and interaction of abscisic acid and miRNA156 in the induction of anthocyanin biosynthesis in drought-stressed plants [J] . Planta, 2017, 246 (2) : 299-312.
- [47] Barrey E, Saint-Auret G, Bonnamy B, et al. Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria [J] . PLoS One, 2011, 6 (5) : e20220.
- [48] Bandiera S, Matégot R, Girard M, et al. MitomiRs delineating the intracellular localization of microRNAs at mitochondria [J] . Free Radic Biol Med, 2013, 64 : 12-19.
- [49] Bandiera S, Rüberg S, Girard M, et al. Nuclear outsourcing of RNA interference components to human mitochondria [J] . PLoS One, 2011, 6 (6) : e20746.
- [50] Das S, Ferlito M, Kent OA, et al. Nuclear miRNA regulates the mitochondrial genome in the heart [J] . Circ Res, 2012, 110 (12) : 1596-1603.
- [51] Fan S, Tian T, Chen WX, et al. Mitochondrial miRNA determines chemoresistance by reprogramming metabolism and regulating mitochondrial transcription [J] . Cancer Res, 2019, 79 (6) : 1069-1084.
- [52] Zhang XR, Zuo XX, Yang B, et al. microRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation [J] . Cell, 2014, 158 (3) : 607-619.
- [53] Ro S, Ma HY, Park C, et al. The mitochondrial genome encodes abundant small noncoding RNAs [J] . Cell Res, 2013, 23 (6) : 759-774.
- [54] Gusic M, Prokisch H. ncRNAs : new players in mitochondrial health and disease? [J] . Front Genet, 2020, 11 : 95.
- [55] Ro S, Ma HY, Park C, et al. The mitochondrial genome encodes abundant small noncoding RNAs [J] . Cell Res, 2013, 23 (6) : 759-774.
- [56] Jagannathan R, Thapa D, Nichols CE, et al. Translational regulation of the mitochondrial genome following redistribution of mitochondrial microRNA in the diabetic heart [J] . Circ Cardiovasc Genet, 2015, 8 (6) : 785-802.
- [57] Vargas JNS, Kar AN, Kowalak JA, et al. Axonal localization and mitochondrial association of precursor microRNA 338 [J] . Cell Mol Life Sci, 2016, 73 (22) : 4327-4340.
- [58] Liu JD, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, et al. microRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies [J] . Nat Cell Biol, 2005, 7 (7) : 719-723.
- [59] Liu JD, Rivas FV, Wohlschlegel J, et al. A role for the P-body component GW182 in microRNA function [J] . Nat Cell Biol, 2005, 7 (12) : 1261-1266.
- [60] Toms D, Pan B, Bai YS, et al. Small RNA sequencing reveals distinct nuclear microRNAs in pig granulosa cells during ovarian follicle growth [J] . J Ovarian Res, 2021, 14 (1) : 54.
- [61] Vilardo E, Rossmanith W. Molecular insights into HSD10 disease : impact of SDR5C1 mutations on the human mitochondrial RNase P complex [J] . Nucleic Acids Res, 2015, 43 (13) : 6649.
- [62] Metodiev MD, Thompson K, Alston CL, et al. Recessive mutations in TRMT10C cause defects in mitochondrial RNA processing and multiple respiratory chain deficiencies [J] . Am J Hum Genet, 2016, 98 (5) : 993-1000.
- [63] Dewe JM, Fuller BL, Lentini JM, et al. TRMT1-catalyzed tRNA modifications are required for redox homeostasis to ensure proper

- cellular proliferation and oxidative stress survival [J] . *Mol Cell Biol*, 2017, 37 (21) : e00214-17.
- [64] Davarniya B, Hu H, Kahrizi K, et al. The role of a novel *TRMT1* gene mutation and rare *GRM1* gene defect in intellectual disability in two azeri families [J] . *PLoS One*, 2015, 10 (8) : e0129631.
- [65] Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, et al. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders [J] . *Nature*, 2011, 478 (7367) : 57-63.
- [66] Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import [J] . *Science*, 2007, 315 (5808) : 97-100.
- [67] Matsui M, Chu YJ, Zhang HY, et al. Promoter RNA links transcriptional regulation of inflammatory pathway genes [J] . *Nucleic Acids Res*, 2013, 41 (22) : 10086-10109.
- [68] Huang V, Place RF, Portnoy V, et al. Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer [J] . *Nucleic Acids Res*, 2012, 40 (4) : 1695-1707.
- [69] Tang R, Li LM, Zhu DH, et al. Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus : evidence for a microRNA hierarchy system [J] . *Cell Res*, 2012, 22 (3) : 504-515.
- [70] Leucci E, Patella F, Waage J, et al. microRNA-9 targets the long non-coding RNA *MALAT1* for degradation in the nucleus [J] . *Sci Reports*, 2013, 3 : 2535.
- [71] Xiao M, Li J, Li W, et al. microRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger [J] . *RNA Biol*, 2017, 14 (10) : 1326-1334.
- [72] Zisoulis DG, Kai ZS, Chang RK, et al. Autoregulation of microRNA biogenesis by let-7 and argonaute [J] . *Nature*, 2012, 486 (7404) : 541-544.
- [73] Pu MF, Li CG, Qi XM, et al. miR-1254 suppresses HO-1 expression through seed region-dependent silencing and non-seed interaction with TFAP2A transcript to attenuate NSCLC growth [J] . *PLoS Genet*, 2017, 13 (7) : e1006896.
- [74] Zhao Y, Qi XM, Chen J, et al. The miR-491-3p/Sp3/ABCB1 axis attenuates multidrug resistance of hepatocellular carcinoma [J] . *Cancer Lett*, 2017, 408 : 102-111.
- [75] Yang XY, You CJ, Wang XF, et al. Widespread occurrence of microRNA-mediated target cleavage on membrane-bound polysomes [J] . *Genome Biol*, 2021, 22 (1) : 15.
- [76] Si WW, Li Y, Ye SY, et al. Methyltransferase 3 mediated miRNA m⁶A methylation promotes stress granule formation in the early stage of acute ischemic stroke [J] . *Front Mol Neurosci*, 2020, 13 : 103.
- [77] Sharma A, Badola PK, Bhatia C, et al. Primary transcript of miR858 encodes regulatory peptide and controls flavonoid biosynthesis and development in *Arabidopsis* [J] . *Nat Plants*, 2020, 6 (10) : 1262-1274.
- [78] Tatematsu K, Toyokura K, Okada K. Requirement of MIR165A primary transcript sequence for its activity pattern in *Arabidopsis* leaf primordia [J] . *Plant Signal Behav*, 2015, 10 (8) : e1055432.
- [79] Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective blockade of microRNA processing by Lin28 [J] . *Science*, 2008, 320 (5872) : 97-100.
- [80] Newman MA, Thomson JM, Hammond SM. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing [J] . *RNA*, 2008, 14 (8) : 1539-1549.

(责任编辑 张婷婷)