

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 21620121152395

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

FoxO 通过表观遗传机制调控肺癌细胞 EMT 重编程

FoxO regulates epithelial-mesenchymal transition reprogramming in non-small lung cancer cell through epigenetic modification

查 俊 敏

指导教师姓名: 尤 涵 教 授

专 业 名 称: 细 胞 生 物 学

论文提交日期: 2015 年 04 月

论文答辩时间: 2015 年 05 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015年 05月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

- () 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。
- () 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要	I
Abstract	II
第一章 前言	1
1.1 FoxO 蛋白	1
1.1.1 概述.....	1
1.1.2 FoxO 蛋白表达及活性的调控	1
1.1.3 FoxO 蛋白的功能	4
1.2 MicroRNA	5
1.2.1 概述.....	5
1.2.2 MicroRNA 在细胞核内的转录、加工及出核	6
1.2.3 MicroRNA 在细胞质内的加工成熟及功能	8
1.2.4 MicroRNA 与 EMT.....	9
1.3 上皮细胞向间质细胞转变	10
1.3.1 EMT 概述.....	10
1.3.2 EMT 的分类.....	10
1.3.3 EMT 的特征	11
1.3.4 参与调控 EMT 过程的转录因子	13
1.3.5 参与调控 EMT 过程的信号通路.....	17
1.3.6 EMT 与肿瘤转移	19
1.4 立题背景、内容及意义	20
第二章 材料和方法	22
2.1 材料	22
2.1.1 菌株.....	22
2.1.2 细胞.....	22
2.1.3 主要试剂.....	22
2.1.4 主要仪器.....	24
2.2 DNA 相关实验方法	25

2.2.1 Inoue 法制备超级感受态	25
2.2.2 质粒转化大肠杆菌.....	26
2.2.3 质粒 DNA 的提取.....	27
2.2.4 基因组 DNA 提取.....	29
2.2.5 PCR 反应.....	29
2.2.6 shRNA 构建.....	30
2.2.7 MicroRNA 表达质粒构建	30
2.3 RNA 相关实验方法.....	31
2.3.1 RNA 的提取	31
2.3.2 反转率合成 cDNA.....	32
2.3.3 实时荧光定量 PCR.....	32
2.4 蛋白相关实验方法	33
2.4.1 全细胞裂解物的制备.....	33
2.4.2 蛋白浓度测定 (BCA 法).....	33
2.4.3 蛋白质 SDS-PAGE 电泳以及 Western-blotting 分析	34
2.5 细胞相关实验方法	35
2.5.1 细胞的培养及传代.....	35
2.5.2 细胞转染及病毒感染.....	36
2.5.3 免疫荧光实验.....	37
第三章 结果与讨论	39
3.1 结果	39
3.1.1 敲低 FoxO 能促使 A549 细胞发生 EMT	39
3.1.2 在 A549 细胞中 FDT 介导了 FoxO 对 EMT 的调控.....	41
3.1.3 FoxO 通过影响 miR-A 调控 FDT 的表达.....	43
3.2 讨论与展望	45
参考文献	47
致谢.....	56

Table of content

Abstract (In Chinese)	I
Abstract (In English)	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 FoxO	1
1.1.1 Overview	1
1.1.2 Regulation of the expression and the transcriptional activity of FoxO	1
1.1.3 Biological functions of FoxO.....	4
1.2 MicroRNA	5
1.2.1 Overview	5
1.2.2 MicroRNA processing in nuclear: from transcription to export ...	6
1.2.3 MicroRNA maturation in cytoplasm.....	8
1.2.4 MicroRNA and EMT	9
1.3 Epithelial-mesenchymal transition	10
1.3.1 Overview of EMT	10
1.3.2 Classification of EMT.....	10
1.3.3 Characteristics of EMT	11
1.3.4 The transcription factors involved in EMT.....	13
1.3.5 The signaling pathways involved in EMT	17
1.3.6 EMT and tumour metastasis.....	19
1.4 Background, content and significance of this thesis	20
Chapter 2 Materials and methods	22
2.1 Materials	22
2.1.1 Bacterial strains.....	22
2.1.2 Cell lines	22
2.1.3 Chemicals and reagents.....	22
2.1.4 Equipments	24

2.2 DNA experiments	25
2.2.1 Preparation of <i>E.coli</i> competent cells	25
2.2.2 Transform plasmid into <i>E.coli</i> competent cells.....	26
2.2.3 Plasmid DNA preparation	27
2.2.4 Genomic DNA extraction	29
2.2.5 PCR reactions.....	29
2.2.6 shRNA construction	30
2.2.7 MicroRNA expression plasmid construction	30
2.3 RNA experiments	31
2.3.1 RNA extraction	31
2.3.2 Reverse transcription	32
2.3.3 qRT-PCR	32
2.4 Protein experiments	33
2.4.1 Preparation of cell lysate.....	33
2.4.2 Measure protein concentration	33
2.4.3 SDS-PAGE and Western blotting analysis.....	34
2.5 Cell experiments	35
2.5.1 Cell culture and passage.....	35
2.5.2 Transfection and infection.....	36
2.5.3 Immunofluorescence	37
Chapter 3 Results and discussion	39
3.1 Results	39
3.1.1 Knockdown FoxO in A549 cells induces EMT	39
3.1.2 FoxO regulated EMT by targeting FDT	41
3.1.3 MiR-A mediated the regulation of FoxO to FDT	43
3.2 Discussion and prospects	45
Reference	47
Acknowledgement	56

摘要

FoxO 是 Forkhead 转录因子 O 亚家族成员,它能够通过调控一系列下游靶基因的表达参与调控细胞周期停滞、细胞凋亡、新陈代谢和抗氧化应激等多个生物学过程,研究表明 FoxO 作为一个肿瘤抑制因子参与调控肿瘤形成和转移过程。上皮细胞-间质细胞转变 (EMT) 作为肿瘤形成和转移过程中的关键环节,最近的研究发现 FoxO 能参与调控 EMT 过程,然而具体的机制还未得到全面的阐述。本论文以人非小细胞肺癌细胞株 A549 为研究体系,探索 FoxO 与 EMT 之间的关系,实验结果表明在 A549 细胞中敲低 FoxO 能诱导 EMT 的发生,在此过程中上皮细胞标记蛋白 E-cadherin 表达下降而间质细胞标记蛋白 Vimentin 表达上升; FoxO 对 EMT 的调控有赖于 EMT 相关转录因子 FDT 的变化, FDT 蛋白会因 FoxO 的敲低而上升,在敲低 FoxO 的基础上进一步敲低 FDT 蛋白则能逆转由 FoxO 表达缺失引发的 EMT; 进一步的研究发现 FoxO 对 FDT 蛋白的调控是由 miR-A 来介导的,敲低 FoxO 后 miR-A 的表达下降,在敲低 FoxO 的细胞中重新表达 miR-A 则能回复 FDT 的变化。综上所述, FoxO 通过调节 miR-A 的表达,引起 FDT 蛋白的变化,从而调控 A549 细胞的 EMT 过程。我们的研究初步探究了 FoxO 调控 EMT 的分子机制,这对全面解析 FoxO 影响肿瘤形成及转移的分子机理提供了新的实验依据和理论基础。

关键词: FoxO; 上皮细胞-间质细胞转变; 小非编码 RNA; 非小细胞肺癌

Abstract

FoxO belongs to the O subfamily of forkhead box proteins, and is involved in the regulation of metabolism, oxidative stress resistance, cell cycle arrest and apoptosis by regulating diverse gene expression programmes. Recent studies have shown that the tumor suppressor FoxO participates in the regulation of tumor progression and metastasis. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays a key role in tumor progression and metastasis, recent findings revealed that FoxO is related to the EMT process. However, the underlying mechanism has not been fully understood. Here, we explored the relationship between FoxO and EMT in human non-small lung cancer cell A549. We demonstrated that suppresses the expression of FoxO can induce EMT in A549 cells, which is accompanied by reducing the level of E-cadherin (epithelial marker) and increasing the expression of Vimentin (mesenchymal marker). FDT, an EMT related transcription factor, was also upregulated after FoxO knockdown. Moreover, silencing FDT was associated with reversal of EMT that was caused by downregulation of endogenous FoxO expression. Further mechanistic investigations showed that miR-A mediated the regulation of FoxO to FDT, the reintroduction of miR-A in FoxO knockdown cells resulted in attenuated FDT expression. Taken together, FoxO positively regulates miR-A/FDT signaling and therefore inhibits the EMT of A549 cells. Our work conducted a preliminary explore about the mechanism that FoxO regulated EMT, and this provides new insights into the mechanisms of FoxO in the regulation of EMT.

Key words: FoxO; EMT; microRNA; non-small lung cancer

第一章 前言

1.1 FoxO 蛋白

1.1.1 概述

Forkhead Box (Fox) 蛋白是指一类具有 Forkhead/winged-helix 状 DNA 结合域的转录因子, 这个 DNA 结合域在进化上高度保守, Fox 蛋白家族庞大由 19 个亚家族 (FoxA 到 FoxS), 100 多个成员组成。FoxO 蛋白是 Forkhead 转录因子家族 O 亚家族成员, 在哺乳动物中 FoxO 家族由 FoxO1 (又称 FKHR), FoxO3 (又称 FKHL1), FoxO4 (又称 AFX1) 和 FoxO6 组成。FoxO 蛋白可以分为以下几个主要的功能域 (图 1.1): DNA 结合域 (FKH, forkhead domain), 核定位信号 (NLS, nuclear localization signal), 核输出信号 (NES, nuclear export signal) 以及转录激活结构域 (TA, transactivation domain), 其中的 DNA 结合域能特异性识别并结合 DNA 上的 TTGTTTAC 序列。



图 1.1 FoxO 蛋白的主要结构域

Fig.1.1 The main structural domains of FoxO

1.1.2 FoxO 蛋白表达及活性的调控

1.1.2.1 FoxO 的转录及转录后调节

目前关于对 FoxO 在转录水平上调节的具体机制还尚未得到完全的阐明, 有研究显示 E2F1 和 p53 等能参与 FoxO 的转录调节^[1, 2], 此外也有报导指出 FoxO 蛋白本身也能参与同家族蛋白的转录调节^[3]。microRNA 作为转录后调控基因表达的机制之一, 已经有越来越多的研究指出 microRNA 能在转录后水平对 FoxO 蛋白进行调控。在乳腺癌细胞 MCF7 中 miR-182, miR-27a 和 miR-96 能调控 FoxO1 蛋白的表达^[4]; 在子宫内膜癌及其相关细胞系中 miR-182, miR-183, miR-186,

miR-153, miR-27, miR-96 和 miR-9 也能调控 FoxO1 蛋白的表达^[5], 此外 miR-139, miR-486, miR-155 和 miR-499-5p 则能调控 FoxO 蛋白家族其他成员的表达^[6]。

1.1.2.1 FoxO 蛋白翻译后修饰

当细胞处于正常的生长状态时细胞内的 FoxO 蛋白是处于抑制状态的, 这一状态的维持是基于胰岛素生长因子信号通路的负调控作用。胰岛素或生长因子与细胞表面的受体结合后能激活磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase), PI3K 活化后能磷酸化磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP₂) 生成磷脂酰肌醇三磷酸 (PIP₃), 后者作为第二信使可以募集并活化蛋白激酶 B (PKB, protein kinase B, 又称 AKT), 活化的 AKT 能进入核内对 FoxO 蛋白上三个保守的磷酸化位点进行磷酸化, 磷酸化后的 FoxO 与其调控蛋白 14-3-3 的结合增强并被转移至细胞质中。PTEN (phosphatase and tensin homologue) 作为 FoxO 蛋白转录活性的正调控因子, 是通过逆转 PIP₂ 形成 PIP₃ 的过程调节 FoxO 蛋白的磷酸化状态而影响其活性的。当细胞处于压力状态尤其在活性氧 (ROS) 升高时, FoxO 蛋白则会从细胞质转移至细胞核中加强转录活动, 这一过程是由 JNK (Jun N-terminal kinase) 介导 FoxO 蛋白的磷酸化引起的。JNK 对于胰岛素信号通路的拮抗主要是通过降低胰岛素受体底物蛋白和促使 FoxO 蛋白从 14-3-3 上脱离下来这两方面实现的^[7]。

上述两条典型的信号通路对 FoxO 蛋白的调控在进化上均是保守的, 除此之外还存在其他的通路也能调控 FoxO 蛋白的活性, 如腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK, Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase) 信号通路。AMPK 在细胞能量平衡调控中起着关键性的作用, AMPK 能磷酸化多种底物从而调控细胞生长和能量消耗过程, 其中包括 FoxO 蛋白在内。AMPK 能磷酸化 FoxO 蛋白的 Ser413, Ser588 和 Ser626 位点^[8], 然而 AMPK 引起的 FoxO 蛋白的磷酸化并不改变它在细胞内的核质定位, 这也是目前为止发现的唯一一条在细胞因子缺失或氧化压力条件下激活 FoxO 蛋白而不影响其定位的信号。此外, 当 AMPK 激活 FoxO 蛋白与上游其他信号相结合时也会引起 FoxO 蛋白作用于不同的靶基因, 如当 FoxO3a 蛋白与 CBP-p300 结合后 AMPK 在 FoxO3a 蛋白 Ser626 上的磷酸化则能加强 FoxO3a 蛋白与 CBP-p300 的相互作用, 这种相互结合能大大促进

FoxO 蛋白的转录活性^[9]。

除磷酸化修饰能改变 FoxO 蛋白的活性外，乙酰化，泛素化，甲基化和糖基化也能调控 FoxO 蛋白的活性。

FoxO 蛋白能与多种组蛋白乙酰转移酶 (HATs, histone acetyltransferases) 相互结合，在哺乳动物中 FoxO 蛋白能被 p300, CREB (cyclic-AMP responsive element binding) 结合蛋白 CBP (CREB-binding protein) 或 CBP 相关因子 P/CAF 乙酰化，而 SIRT1 (silent information regulator 1) 是主要的去乙酰化酶。目前关于乙酰化和去乙酰化对 FoxO 蛋白活性的调控结果存在一些争议，部分研究结果显示乙酰化抑制而去乙酰化激活 FoxO 蛋白的转录活性，另一部分研究证明乙酰化激活而去乙酰化抑制 FoxO 蛋白的转录活性^[10]。

关于 FoxO 蛋白的多聚泛素化以及随之而来的蛋白酶体途径降解已有许多报导，PI3K-AKT 信号通路以及 IKK β 都能引起 FoxO 蛋白的多聚泛素化。SKP2 被普遍认为是 FoxO 蛋白的 E3 连接酶引起 FoxO 蛋白的多聚泛素化，在过表达 PI3K 或 AKT 的鸡胚胎成纤维细胞中，血小板源生长因子的刺激能明显缩短 FoxO1 蛋白的半衰期^[11]，可能的原因是 SKP2 蛋白在这一过程中的表达加强促进了 FoxO1 的多聚泛素化过程，这也表明了 PI3K 信号通路通过 AKT 抑制 FoxO 蛋白功能的同时也能促进它的降解。与多聚泛素化相比，单泛素化能引起 FoxO 蛋白的核定位并刺激 FoxO 蛋白的转录活性，然而这种核定位转变机制尚不清楚。研究发现去泛素化酶 USP7 能结合到 FoxO 蛋白上并抑制其活性，这表明 USP7 只能去除 FoxO 蛋白的单泛素化而对多聚泛素化无影响^[12]。

精氨酸 N-甲基转移酶 PRMT1 和 PRMT6 能对 FoxO 蛋白进行甲基化修饰，由于 PRMT1 在 FoxO 蛋白上的甲基化位点与 AKT 在 FoxO 蛋白上的磷酸化位点相同，因此 PRMT1 引起的甲基化修饰能抑制 AKT 对 FoxO 蛋白进行磷酸化修饰^[13]。赖氨酸甲基转移酶 SET9 能在 FoxO3a 的 DNA 结合区域对其进行甲基化修饰阻止了 FoxO3a 的功能发挥^[14]。与磷酸化相似，O-连接的糖基化也是发生在丝氨酸或苏氨酸残基上，但在 FoxO 蛋白中这两种修饰并不会发生在同一位点上，因此糖基化对 FoxO 蛋白的影响与磷酸化作用可能刚好相反，在氧化压力条件下 O-连接的糖基化往往伴随着 FoxO 蛋白的活性增强^[15]。

1.1.3 FoxO 蛋白的功能

FoxO 蛋白是胰岛素-PI3K-AKT 信号通路的重要下游靶蛋白，胰岛素的许多细胞功能都是通过抑制 FoxO 蛋白来实现的。在机体中胰岛素的主要功能是调控血糖平衡，而 FoxO 蛋白能调控糖异生途径中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase) 和葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase) 的表达^[16]，此外 FoxO 蛋白还能抑制糖酵解，戊糖支路和脂肪合成等过程相关基因的表达，因此在低葡萄糖或禁食条件下 FoxO 蛋白的功能类似于一个代谢开关将消耗葡萄糖转化为消耗脂肪。在低糖条件下细胞通过脂肪酸分解和氧化磷酸化来维持足够的 ATP 供应，然而随着这些反应的进行细胞中的过氧化物酶体和线粒体内会产生较大的氧化压力，此时为了清除这些氧化压力，FoxO 蛋白便会激活超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的表达^[17]，此外还会上调甾醇载体蛋白 SCP2 的表达以确保对不饱和脂肪酸进行正确的处理。FoxO 蛋白除了参与胰岛素信号通路对代谢的调节外，Insulin-PI3K 信号通路维持细胞进行正常的周期运转也有赖于对 FoxO 蛋白的调节，FoxO 蛋白通过调控 p27^{kip1}, p130Rb2, 细胞周期蛋白 cyclin D 和 cyclin G2 引起的细胞周期停滞^[10]能被 Insulin-PI3K 信号通路所抑制，如果在没有胰岛素信号时 FoxO 蛋白阻止细胞周期进行使细胞进入静止期，因此在进食条件下 FoxO 蛋白除改变细胞的代谢通路外还能使细胞周期停滞以确保细胞的存活。

研究发现 FoxO 蛋白能调控一些促凋亡基因如 Fas 配体, BIM 和 BCL-6 等的表达，在过表达 FoxO 蛋白的情况下细胞会发生凋亡，这种由 FoxO 蛋白引起的细胞凋亡一般只在特定的细胞或 FoxO 蛋白被不适当的激活时才会发生，如在造血细胞中 FoxO 蛋白能引起外周造血细胞周期停滞促使这些细胞进入凋亡环节^[18]，由于外周造血细胞会由干细胞不间断补充，因此对于这些细胞来说这种凋亡机制是必要的。

FoxO 蛋白的功能一方面表现在调节上述的正常生理条件下的细胞稳态，另一方面则体现于与多种疾病的发生有关。在糖尿病中，FoxO 蛋白能下调 PDX1 (pancreatic duodenal homeobox factor-1) 的表达使得细胞对胰岛素的敏感度降低，并且在糖尿病小鼠中敲除 FoxO1 的一条等位基因便能消除这些老鼠的糖尿病症状，而如果 FoxO1 呈激活状态时则能引起糖尿病的发生，这表明糖尿病的发生

与 FoxO 蛋白活性异常有关^[19]。研究表明 FoxO 蛋白的持续失活在癌形成过程中是一个关键步骤，在肿瘤细胞中 PTEN 由于突变或等位基因缺失而失活时，AKT 则处于持续激活状态从而抑制 FoxO 蛋白的活性，如果在这些细胞中过表达不受 AKT 抑制的 FoxO 蛋白突变体时则能抑制肿瘤细胞的增殖和转化^[20]，此外在小鼠中同时敲除 FoxO1, FoxO3 和 FoxO4 时能导致胸腺淋巴瘤和血管瘤的形成^[21]。

1.2 MicroRNA

1.2.1 概述

MicroRNA 是指一类能够调控基因表达长度约为 22 个核苷酸的内源性单链小 RNA，一般情况下它是通过与靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区 (3'UTR) 碱基互补配对引起靶向 mRNA 降解、不稳定或抑制其翻译来调控基因的表达^[22, 23]。MicroRNA 作为一个重要的调节者控制着从生理到病理的多个过程，在生物的发育过程，许多 microRNA 具有发育阶段特异性表达或组织特异性表达的特点；此外，当 microRNA 的表达异常时则会引起疾病的发生如癌症，对于 microRNA 的调控能发生在其从转录到成熟的多个环节里。

在基因组中 microRNA 的序列可以是独立的转录单位或是存在于编码蛋白基因的内含子中。哺乳动物中 microRNA 一般是由 RNA 聚合酶 II 负责转录形成含有一个或多个发卡结构的初始 miRNA (pri-miRNA)，pri-miRNA 在经过两个相继发生的加工反应后能形成一个或多个成熟的 miRNA (图 1.2)，miRNA 与 Ago (Argonaute) 蛋白形成 RNA 诱导沉默复合体 RISC (RNA-induced silencing complex) 调控靶基因转录后表达沉默^[24]。

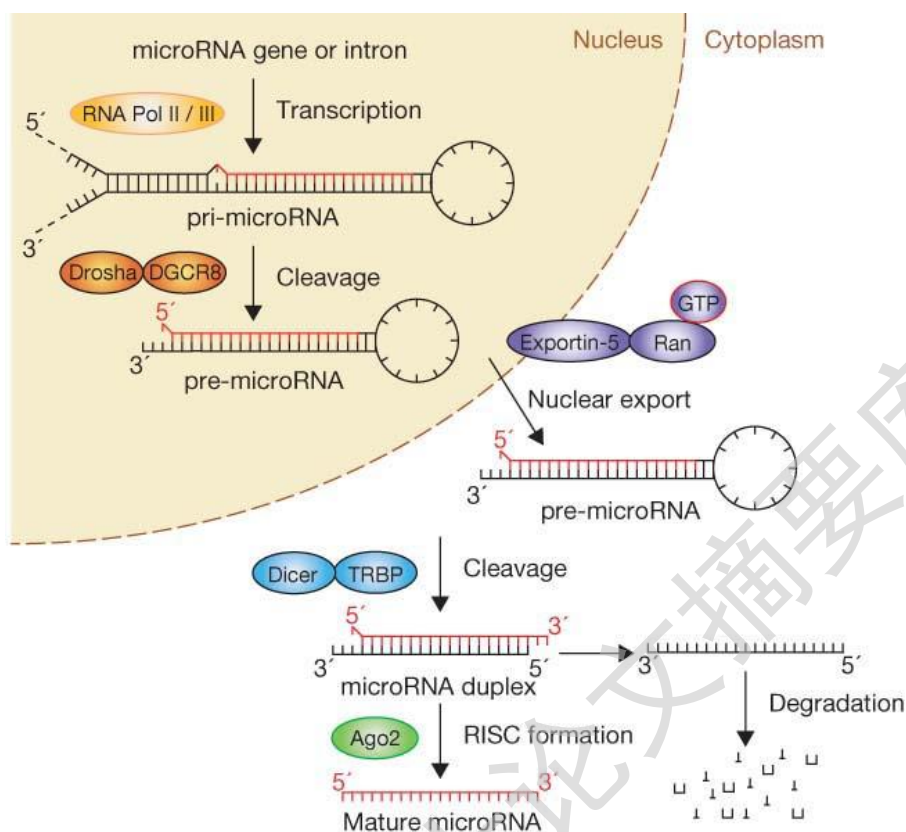


图 1.2 Micro RNA 的成熟过程

Fig. 1.2 MicroRNA processing in cells

注：本图引自 WINTER J, JUNG S, KELLER S, et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation [J]. Nature cell biology, 2009, 11(3): 228-34.

1.2.2 MicroRNA 在细胞核内的转录、加工及出核

大多数 pri-miRNA 由 RNA 聚合酶 II 转录形成，一般具有 5' 端帽子结构和 3' polyA 尾结构，也有研究发现 RNA 聚合酶 III 能转录人类 19 号染色体上的 microRNA 簇 (C19MC) [25]。由于两种 RNA 聚合酶识别不同的启动子和终止子以不同的方式转录 pri-miRNA，所以对于 miRNA 的转录调控存在着多种多样的调控方式，一些转录因子如 c-Myc 和 p53 等可以直接转录调控 miRNA 的表达 [26, 27]，表观遗传调控也是影响 miRNA 转录的重要方式 [28]，此外即使是存在于同一个基因簇中的 miRNA 也有着不同的转录调控模式 [29]。转录完毕的 pri-miRNA 会在 RNA 腺苷酸脱氨酶 ADARs (adenosine deaminases acting on RNA) 的作用下将其中的腺嘌呤转化为次黄嘌呤 (A-to-I) 称为 microRNA 编辑，这样的编辑能阻止

Drosha 的加工或者指引 RNA 分子到 Tudor 葡萄球菌核酸酶同族体 Tudor-SN (Tudor staphylococcal nuclease homolog) 中进行降解；如果编辑的部位发生在 miRNA 的核心序列上则能影响 miRNA 对靶基因的识别，因此 microRNA 编辑是调控 miRNA 合成与活性的机制之一^[30]。

Pri-miRNA 的大体结构分为一段由 33 个左右的碱基对形成的发卡茎部结构，顶端的环状结构和茎部上下游的单链侧翼部分，pri-miRNA 需经核内微处理 (microprocessor) 复合物加工后形成长度约为 70 个核苷酸的茎环结构称为前体 miRNA (pre-miRNA)。Microprocessor 复合物主要由核糖核酸酶 III Drosha 和双链 RNA 结合蛋白 DGCR8 (DiGeorge critical region 8) 组成，另外 DEAD box RNA 解旋酶 p68 (DDX5) 和 p72 (DDX17) 以及异质核糖核蛋白 hnRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) 等也能参与形成 Microprocessor 复合物^[31]。Drosha 的两个 RNase 功能域能将 pri-miRNA 互补配对的茎部分开，DGCR8 负责与 pri-miRNA 结合并指导 Drosha 作用在特定的剪切位点，其他的辅助因子则能加强 Drosha 的作用。Microprocessor 复合物中任何组分受到改变或调节时都能影响 pri-miRNA 的进一步加工成熟过程，研究发现在 p68 或 p72 敲除的小鼠体内许多 miRNA 的表达会减弱，但也存在一部分 miRNA 不受影响^[32]；肿瘤抑制蛋白 p53 在受到 DNA 损伤刺激时能与 Drosha 和 p68 形成复合物加速 pri-miR-16-1 和 pri-miR-143 的加工过程^[33]；用 BMP4 (bone morphogenetic factor 4) 或 TGF- β 刺激人血管平滑肌细胞时，能引起 SMAD 蛋白与 p68 结合从而加强了 Drosha 对 pri-miR-21 和 pri-miR-199a 的剪切作用^[34]。然而，pri-miRNA 向 pre-miRNA 转变并不是一定需要借助 Drosha-microprocessor 复合物的加工，位于编码蛋白基因内含子中的 miRNA 会在剪切作用下脱离宿主基因，如果宿主转录本在剪切和套索脱支酶的作用下形成类似于 pre-miRNA 的结构，这类 miRNA 则能避开 Drosha 的作用直接进入细胞质进行下一步加工^[24]。

Pri-miRNA 在细胞核内加工成 pre-miRNA 后，便会由 Exportin-5 和 Ran-GTP 复合物通过核孔运输至细胞质中。如果在细胞内敲低 Exportin-5 会导致大量 miRNA 的成熟体下降，然而这并不会引起 pre-miRNA 在核内累积^[35]。Exportin-5 对 pre-miRNA 的识别依赖于 pre-miRNA 的茎部和 3' 游离端的长度，而不取决于 pre-miRNA 的序列和环状结构^[36]，这确保了只有加工正确的 pre-miRNA 才能

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.