

· 综 述 ·

## microRNA 和 T 细胞发育研究进展

钟国成, 李小红 综述, 朱 波<sup>△</sup>校审

(第三军医大学新桥医院全军肿瘤研究所, 重庆 400037)

关键词: 微 RNA; 淋巴 T 细胞; 发育

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.06.038

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)06-0612-03

随着现代免疫学向分子水平的研究不断深入, T 淋巴细胞 (T-lymphocyte, 简称 T 细胞) 在免疫系统中发挥的作用也越来越受到重视。T 细胞是淋巴细胞的主要组分, 在抗感染、抗肿瘤及自身免疫应答中均发挥着关键作用。T 细胞的发育成熟是一个反复筛选与淘汰的复杂过程, 受到多种因素的精细调控。近年来, 微 RNA (microRNA, miRNA) 的功能和作用正逐渐成为学者们关注的重点。借助对 miRNA 基因水平的研究, 将有力地促进阐明 T 细胞发育的调控机制<sup>[1]</sup>。本文就 miRNA 调控 T 细胞发育的相关研究进展做一综述, 并探讨 miRNA 对 T 细胞发育调控的特点和应用前景。

## 1 T 细胞发育概述

T 细胞源于骨髓造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs)。HSCs 首先分化为多能祖细胞, 然后经淋巴途径向淋巴祖细胞分化。淋巴祖细胞中 T 细胞祖细胞 (Pro-T) 经血循环进入胸腺发育成 T 细胞前体细胞 (Pre-T), 随后发育成胸腺细胞。胸腺是 T 细胞主要的发育器官, 摘除胸腺将导致严重的免疫缺陷。T 细胞发育的胸腺依赖性提示胸腺为 T 细胞提供了适宜的微环境和发育信号<sup>[2]</sup>。

胸腺细胞始于 CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> 双阴性 T 细胞 (double negative, DN), 此时细胞表面已表达 CD3 和 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR), 然后经 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 双阳性细胞 (double positive, DP) 发育为成熟的 CD4<sup>+</sup> 或 CD8<sup>+</sup> 单阳性 (single-positive, SP) 细胞。发育过程中不能与自身主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 结合的 T 细胞将被诱导凋亡, 即阳性选择, 它赋予 T 细胞 MHC 限制性 (识别由自身 MHC 呈递的抗原而不识别其他 MHC 呈递的抗原); 而与自身 MHC 或自身抗原结合过强的 T 细胞也会被诱导凋亡, 即阴性选择, 它赋予 T 细胞对自身抗原的耐受性<sup>[3]</sup>。胸腺每天能产生约  $1 \times 10^7$  个胸腺细胞, 最终仅有 1%~3% 的胸腺细胞能发育成 SP 细胞。

由此可见, T 细胞发育是一个十分复杂的过程, 需要一个庞大的调控网络参与, 以确保成熟 T 细胞在数量上保持动态平衡, 同时正确执行免疫功能, 不会忽视抗原或是攻击自身组织, 维持适宜的免疫强度。miRNA 是调控 T 细胞发育的一个重要因素, 其调控作用已引起了研究者的浓厚兴趣。

## 2 miRNA 概述

miRNA 是一组进化保守的调控性小分子 RNA, 无编码蛋白质作用, 能通过干扰靶向信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 的稳定或翻译而调节基因表达。miRNA 先由 RNA 聚合酶 II 转录成含帽子结构和多聚腺苷酸尾巴的初始 RNA (pri-miRNA)。pri-miRNA 经胞核内 RNA 聚合酶 III (RNase III) Droscha 在双链 RNA-结合蛋白 DGCR8/Pasha 的作用下加工成长约 70 核苷酸 (nt) 的 pre-miRNA。转运蛋白 Exportin5 依赖 Ran-GTP 将 pre-miRNA 从细胞核转运至细胞质, RNase III 酶

Dicer 将 pre-miRNA 剪切成约 22 nt 的双链 miRNA。两条链迅速解螺旋, 其中一条很快降解, 而另一条链作为成熟 miRNA 形成 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 而发挥调节作用。当 miRNA 与靶向 mRNA 的 3' UTR 完全互补时, RISC 中的 Argonaute2 会降解 mRNA 而起到调节作用; 如果部分互补将通过抑制 mRNA 翻译来发挥调节功能<sup>[4]</sup>。

近年来, 通过基因芯片和深度测序技术对 T 细胞成熟过程中不同阶段 miRNA 的鉴定表明: 确实有部分 miRNA 在 T 细胞发育过程中出现显著的变化, 这种特定 miRNA 丰度的动态变化可以作为界定各个发育阶段的特异性指标。

## 3 miRNA 对 T 细胞发育过程的调控

miRNA 对 T 细胞发育的调控可大致分为胸腺内调控和胸腺外调控, 其中前者是主要调控场所, 是调控的上游, 决定 T 细胞发育的命运。在胸腺内, 参与 T 细胞发育调控的 miRNA 构成了一个复杂的调控网络, 彼此调节与制约, 与胸腺内环境形成紧密联系, 在适当的时间精确控制 T 细胞的发育过程。miRNA 在胸腺内的调控将参与产生 SP 细胞的数目, T 细胞的 MHC 限制性、自身抗原耐受性、对抗原的亲合力、存活时间以及增殖和应答潜能; 而 miRNA 在胸腺外的调控相对于胸腺内简单, 影响因素较少, 可视为对胸腺内调控的补充或细化, 主要参与调控外周 T 细胞的增殖、分化方向以及执行免疫功能的强弱。

**3.1 Dicer 酶** Dicer 酶是一种类似 RNase III 的生成关键酶, 它对于小分子干扰 RNA 和 miRNA 的产生是不可或缺的, Dicer 酶能将 miRNA 前体 (发夹 RNA) 加工为成熟的 miRNA。缺乏 Dicer 酶将导致 miRNA 锐减 (包括 miRNA-150、miRNA-21、miRNA-103、miRNA-29、miRNA-155 等)。研究发现 T 细胞特异性 Dicer 酶的缺乏会显著减少 T 细胞数量, 尽管 CD4<sup>+</sup> 与 CD8<sup>+</sup> T 细胞的比例变化不大; Muljo 等<sup>[5]</sup>发现, 在小鼠的胸腺组织中去掉 Dicer 酶, 将导致外周血 T 细胞发育严重障碍, 细胞内 miRNA 加工缺陷, 面对抗原的刺激难以正常增殖, 而且会迅速凋亡。缺乏 Dicer 酶的 Th 细胞会偏向分泌 IFN- $\gamma$ , 倾向 Th1 方向分化, 这提示 Dicer 对于抑制 Th1 细胞的分化是必需的。Dicer 酶能够有效诱导 Foxp3 (forkhead box P3) 转录因子的生成, 对于胸腺中调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 的发育具有重要作用。缺乏 Dicer 酶将因为无法正常产生 Foxp3 而抑制转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- $\beta$  介导的 Treg 的产生, 丧失抑制性调控功能, 促使 Treg 高表达效应性 T 细胞的表面分子, 最终诱发致死性的自身免疫<sup>[6]</sup>。在这个过程中, 具体有哪些 miRNA 参与的机制还不清楚, 但可以明确 miRNA-155 和 miRNA-27b 在其中发挥了主要作用。此外, 缺乏 Dicer 酶还会导致 Th17 (一种不同于 Th1、Th2 和 Treg 的 CD4<sup>+</sup> 亚群细胞, 主要分泌 IL-17, 参与自身免

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: zgc005@yahoo.com.cn.

疫性脑脊髓炎的发生)无法诱导产生<sup>[7]</sup>。

**3.2 miRNA-17~92 簇** miRNA-17~92 簇由一组多顺反子性 miRNA 组成,位于人类染色体 13q31,包括 miRNA-17, miRNA-18a, miRNA-19a, miRNA-20a, miRNA-196-1 和 miRNA-92 这 6 个 miRNA,在组织结构中高度保守。miRNA-17~92 已被证实了在肿瘤发生中发挥重要作用。在淋巴细胞系中,miRNA-17~92 于前体 T 细胞高表达,成熟之后表达减少。实验发现,miRNA-17~92 转基因小鼠外周几乎所有的淋巴细胞亚群都有扩增,其中以 CD4<sup>+</sup> T 细胞增生最为显著<sup>[8]</sup>。miRNA-17~92 高表达转基因小鼠的 T 细胞在体外的增殖和存活能力都明显提高,敲除 miRNA-17~92 将导致严重的 T 细胞发育障碍和迅速凋亡。进一步研究发现,miRNA-17~92 作用的靶点(负调控)可能是 PTEN(一种肿瘤抑制基因)和 Bim(促凋亡因子),在 miRNA-17~92 高表达的 T 细胞中 Bim 明显下调,但是联合 PTEN 和 Bim 还不足以完全模拟 miRNA-17~92 过表达的实验模型,因此分析在调控 T 细胞发育过程中可能有其他不同的靶位参与<sup>[9]</sup>。另外,miRNA-17~92 对 CD8T 细胞的具体调控机制目前尚不清楚。

**3.3 miRNA-142 和 miRNA-223** miRNA-142 定位于 17 号染色体中一个和侵袭性 B 淋巴细胞白血病相关的位点。Ramkissoon 等<sup>[10]</sup>研究发现,miRNA-142 在胸腺、脾脏及骨髓中高表达,而在其他组织中表达很低,其调控作用似乎仅限于造血细胞。目前研究认为,miRNA-142 对 T 细胞发育的调控主要发生在 SP 阶段向初始 T 细胞发育的过程中,而在其他阶段未发现调控作用。过量表达的 miRNA-142 能显著改变 T 细胞的分化发育,促进初始 T 细胞增殖 30%~40%以上,而对 B 淋巴细胞则无明显影响<sup>[11]</sup>。miRNA-223 主要表达于骨髓,单核细胞、粒细胞,在 T 细胞中低表达,它主要参与调控粒细胞的发育,但过表达的 miRNA-223 也能促进 T 细胞的发育和增殖<sup>[12]</sup>。

**3.4 miRNA-181a** miRNA-181a 在调控 B 淋巴细胞方面发挥重要作用,同时也参与 T 细胞的发育。研究发现,miRNA-181a 在骨髓、胸腺以及富含 T 细胞的一级淋巴组织中高表达。如果造血干细胞和祖细胞中高表达 miRNA-181a,将导致外周 CD8<sup>+</sup> T 细胞的明显下降。在小鼠移植模型中,高表达的 miRNA-181a 将导致外周 T 细胞减少 50%以上,其中 CD8<sup>+</sup> T 细胞减少 88%,这提示 miRNA-181a 对 T 细胞发育发挥重要作用。

Neilson 等<sup>[13]</sup>系统研究了 T 细胞在 DN1、DN2、DN3、DN4、DP、SP 等不同发育阶段 miRNA-181a 的表达情况,结果发现 miRNA-181a 在 DN 和 DP 阶段表达量最高,而在之后其他阶段逐渐下调。miRNA-181a 在胸腺细胞 DP 阶段的丰度,是成熟 T 细胞中的 10 倍以上。高表达的 miRNA-181a 能增强 TCR 的信号转导,促进 DN、DP 阶段不成熟 T 细胞与胸腺 MHC 分子结合,保证阳性选择和阴性选择的顺利完成。荧光素酶实验显示,在 DP 阶段,miRNA-181a 能够抑制一些淋巴细胞成熟过程中参与阳性选择的基因表达,比如 bcl-2、CD69 和 TCR。Li 等<sup>[14]</sup>发现,在成熟 T 细胞高表达 miRNA-181a 会提高 TCR 与抗原的亲合力,如果抑制未成熟 T 细胞 miRNA-181a 的表达将降低 T 细胞对抗原肽的敏感性,并破坏 T 细胞阳性选择和阴性选择,这与 miRNA-181a 在 DN 和 DP 高表达,而在 T 细胞成熟过程中下调一致。事实上,miRNA-181a 对 TCR 与抗原的亲合力具有重要的调节作用,它能调控多个靶标,主要包括抑制 TCR 信号通路中在下游起负性调节作用中的酪氨酸蛋白磷酸酯酶(如 SHP-2、PTPN22、DUSP5 和 DUSP6),通过磷酸化作用激活两个 TCR 信号通路分子,即淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(lymphocyte-specific tyrosine

kinase, LCK)和细胞外信号调控激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)进而增强 TCR 的信号强度。另一方面,TCR 的信号通路能负反馈抑制 miRNA-181a 的表达,TCR 与抗原结合后 1 h 内,miRNA-181a 的表达会迅速下调。通过 miRNA-181a 对胸腺 T 细胞发育的这种精细调控机制,使成熟初始 T 细胞的 TCR 针对不同抗原具有适宜的亲和力<sup>[15]</sup>。

**3.5 miRNA-155** miRNA-155 具有类似癌基因的特性,与肿瘤发生关系密切,是目前人类淋巴瘤中发现的惟一独立致癌 miRNA,最初被命名为 B 细胞整合簇。Georgantas 等<sup>[16]</sup>发现,miRNA-155 在造血干细胞中有一定的表达,而成熟造血细胞的 miRNA-155 却明显下降,但在一些血液系统恶性肿瘤中高表达。研究证实,miRNA-155 高表达能使 T 细胞在小鼠骨髓内的增殖紊乱,而敲除 miRNA-155 的 CD4<sup>+</sup> T 细胞虽然在增殖方面没有明显变化,但发育的 T 细胞识别抗原后无法分泌正常的 IL-2 和 IFN- $\gamma$ ,而且容易发生凋亡,严重削弱 Treg 维持自身动态平衡的能力和增殖潜能。FOXP3 是 Treg 发育和功能所必需的转录因子,可以直接控制 miRNA-155 的表达。miRNA-155 在 Treg 中的表达水平要高于其他 T 细胞亚群,一般认为,miRNA-155 对于维持 Treg 存活、分泌抑制性细胞因子是非常重要的,它通过作用靶点细胞因子信号抑制物 1 (suppressor of cytokine signalling 1, SOCS1。该通路能通过 IL-2、信号转导、转录激活因子 5, STAT5 信号传导通路促进细胞增殖)发挥作用<sup>[17-18]</sup>。

**3.6 其他 miRNA 的调控作用** 与 miRNA-181a 相似,miRNA-350 在 T 细胞发育的 DP 阶段高表达,而在之后的发育过程中急剧下降。miRNA-16 在单核细胞、中性粒细胞和 CD8<sup>+</sup> T、CD4<sup>+</sup> T 等多数细胞和组织中高表达,推测其在调控细胞周期上具有重要的作用。miRNA-150 可能通过作用靶位转录因子 c-Myb,而参与调控 T 细胞发育。另外,miRNA-669c 和 miRNA-297 在 CD4<sup>+</sup> T 细胞阶段特异性高表达;miRNA-15b、miRNA-150、miRNA-24 和 miRNA-27 在 CD8<sup>+</sup> T 细胞特异性高表达<sup>[19]</sup>;而 miRNA-223 和 miRNA-146 在 Treg 高表达<sup>[20]</sup>,考虑这些 miRNA 更多地参与 T 细胞分化的调控,其具体的作用机制尚需要进一步探讨。

#### 4 miRNA 在对 T 细胞发育调控的特点和应用前景

miRNA 对 T 细胞发育过程的调控机制非常复杂。每一种 miRNA 具有多个潜在的作用靶点(如 miRNA-17~92 可以达到上百种),在适宜的时间发挥不同的作用;同时 miRNA 还受到其他多种分子的调控和反馈,在完成某一阶段的调控任务后会及时停止。T 细胞的发育需要多种 miRNA 在不同时间共同作用,单一 miRNA 很难与 T 细胞发育的特定阶段严格对应,参与调控的 miRNA 之间并非独立工作,而是互相影响,既可以发挥叠加作用,也可以彼此拮抗。正是由于这种多元化调控机制,才能实现 T 细胞发育的精细与准确,保证发育成熟的 T 细胞不会攻击自身组织,而是正确识别感染和肿瘤抗原后予以消灭,并在清除抗原后及时控制免疫强度,避免免疫升级而伤害自身组织,最终保持整个免疫系统的稳定和平衡。

T 细胞发育过程中获得的 MHC 限制性自身耐受、自身免疫疾病、过敏性疾病、免疫缺陷病以及肿瘤发生密切相关,深入研究 miRNA 对于 T 细胞发育的调控并进行干预将为这些疾病的防治提供良好的应用前景,如改变 miRNA-181a 的表达而调控 TCR 的亲合力,将有助于加强 T 细胞对自身抗原的耐受,有利于自身免疫病的治疗。当前,针对 miRNA 的研究需要人们了解其确切的信号通路,找到特定 miRNA 具体作用的上下游靶分子,包括不同组织不同阶段的多个靶位,各自的生物学功能并加以证实<sup>[21]</sup>。此外,鉴于 miRNA 网络调控的特

点,尝试有效进行多个 miRNA 基因操作,并建立进行体内实验的技术方法也是今后研究的重点。

## 5 展 望

目前,miRNA 的研究还处于理论和基础水平上,迄今所知 miRNA 对 T 细胞发育的调控很可能只是 miRNA 网络中的沧海一粟,而 miRNA 在调控过程中的具体分子作用机制,也有待于进一步探索<sup>[22]</sup>。这些 miRNA 的研究将是对 T 细胞发育调控理论的创新,也将为与 T 细胞发育有关的临床疾病提供新的治疗方向。

## 参考文献:

- [1] Liston A, Linterman M, Lu LF. MicroRNA in the adaptive immune system, in sickness and in health[J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30(3): 339-346.
- [2] Koelsch U, Schraven B, Simeoni L, et al. SIT and TRIM determine T cell fate in the thymus[J]. *J Immunol*, 2008, 181(9): 5930-5939.
- [3] Ashton-Rickardt PG. Studying T-cell repertoire selection using fetal thymus organ culture[J]. *Methods Mol Biol*, 2007(380): 171-184.
- [4] Anglicheau D, Muthukumar T, Suthanthiran M. MicroRNAs: small RNAs with big effects[J]. *Transplantation*, 2010, 90(2): 105-112.
- [5] Muljo SA, Ansel KM, Kanellopoulou C, et al. Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer[J]. *J Exp Med*, 2005, 202(2): 261-269.
- [6] Zhou X, Jeker LT, Fife BT, et al. Selective mRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(9): 1983-1991.
- [7] Liston A, Lu LF, O'Carroll D, et al. Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(9): 1993-2004.
- [8] Lu LF, Liston A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system[J]. *Immunology*, 2009, 127(3): 291-298.
- [9] Lykken EA, Li QJ. microRNAs at the regulatory frontier: an investigation into how microRNAs impact the development and effector functions of CD4 T cells[J]. *Immunol Res*, 2011, 49(1/3): 87-96.
- [10] Ramkissoon SH, Mainwaring LA, Ogasawara Y, et al. Hema-

topoietic-specific microRNA expression in human cells [J]. *Leuk Res*, 2006, 30(5): 643-647.

- [11] Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation[J]. *Blood*, 2006, 108(12): 3646-3653.
- [12] Merkerova M, Vasikova A, Belickova M, et al. MicroRNA expression profiles in umbilical cord blood cell lineages [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(1): 17-26.
- [13] Neilson JR, Zheng GX, Burge CB, et al. Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(5): 578-589.
- [14] Li QJ, Chau J, Ebert PJ, et al. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection[J]. *Cell*, 2007, 129(1): 147-161.
- [15] Tsitsiou E, Lindsay MA. microRNAs and the immune response[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(4): 514-520.
- [16] Georgantas RW, Hildreth R, Morisot S, et al. CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(8): 2750-2755.
- [17] Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function[J]. *Science*, 2007, 316(5824): 608-611.
- [18] O'Connell RM, Kahn D, Gibson WS, et al. microRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development[J]. *Immunity*, 2010, 33(4): 607-619.
- [19] Merkerova M, Belickova M, Bruchova H. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages[J]. *Eur J Haematol*, 2008, 81(4): 304-310.
- [20] Cobb BS, Hertweck A, Smith J, et al. A role for Dicer in immune regulation[J]. *J Exp Med*, 2006, 203(11): 2519-2527.
- [21] Pauley KM, Chan EK. MicroRNAs and their emerging roles in immunology[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1143(1): 226-239.
- [22] Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, et al. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(8): 839-845.

(收稿日期:2011-08-03 修回日期:2011-11-07)

## · 综 述 ·

# P2X7 受体与宫颈癌相关性的研究进展\*

孙 丽 综述, 韩 莉<sup>△</sup> 审校

(三峡大学医学院免疫学教研室, 湖北宜昌 443002)

关键词: P2X7 受体; ATP 门控; 宫颈肿瘤; 分子机制

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2012. 06. 039

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)06-0614-03

嘌呤类受体分为腺苷激活的 P1 受体和细胞外核苷酸激活的 P2 受体两大类。根据组织反应类型和激动剂作用的效力顺序 P2 受体又可分为配体门控的离子通道受体(即 P2X 受

体和 G 蛋白偶联受体(即 P2Y 受体)。P2X 受体家族被认为是继烟碱受体家族和谷氨酸受体家族后的第 3 类配体门控离子通道<sup>[1-2]</sup>。P2X 受体包括 7 种亚型, 即 P2X1 ~ P2X7<sup>[3]</sup>。