

· 综 述 ·

微小 RNAs 在乙型肝炎病毒感染中的研究进展*

张 技¹, 李白雪¹, 张传涛^{2△}, 张权生¹, 陈 建¹

(1. 成都中医药大学基础医学院, 成都 610072; 2. 成都中医药大学附属医院, 成都 610075)

关键词: 微 RNAs; 肝炎病毒, 乙型; 感染; RNA 干扰

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.08.034

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)08-0987-02

目前, 全球估计有 20 亿人口遭受过乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的感染, 3.5 亿以上人口患有慢性肝脏感染疾病^[1]。HBV 感染引起的急慢性肝炎, 严重威胁着人类的健康, 并阻碍了社会经济的发展及社会的和谐稳定。但到目前为止, 尚无药物能够达到理想的抗病毒效果或彻底清除病毒。因此, 迫切需要研究和开发新的抗 HBV 的策略及方法。

微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 在转录后对基因表达起到负性调控作用, 进而影响到相关信号通路。目前的研究已经证实, miRNAs 作用非常广泛, 在器官增殖分化、个体发育、物质代谢等生理过程, 以及病毒感染、肿瘤发生等病理过程中均发挥了重要作用^[2]。基于 miRNAs 对机体能够发挥广泛作用, 以及目前 HBV 感染在临床治疗中的局限性, 针对 miRNAs 在 HBV 感染中的作用机制、作用靶点、作用效应等成为了目前研究的热点之一。

1 miRNAs 简介

miRNAs 是一类长度约为 22 个核苷酸的小分子、非编码单链 RNA, 在动植物以及部分病毒中存在^[3]。人类基因组中, 用于编码 miRNAs 的序列约有 2%^[4], 保守估计编码蛋白质的基因 60% 以上受到 miRNAs 的调控^[5]。在细胞核内, miRNAs 编码序列转录生成的 pri-miRNAs, 接着经过 RNase III Drosha 和双链 RNA 结合蛋白 Pasha 的加工, 形成 3' 端含茎环结构的 pre-miRNAs; 接着 pre-miRNAs 在蛋白 Exportin-5 等的携带下进入细胞质, 在 Dicer 酶等的加工下成为成熟的 miRNAs; 成熟的 miRNAs 与蛋白 Argonaute 等结合, 形成 RNA 诱导的基因沉默复合物 (RISC), 再由 RISC 与靶 mRNA 结合而发挥作用^[6-7]。其作用形式主要有 3 种: (1) 当 miRNAs 与靶 mRNA 完全互补配对时, 常会引起靶 mRNA 的降解; (2) 而当 miRNAs 与靶 mRNA 不完全配对时, 则会抑制以 mRNA 为模板翻译生成蛋白质的过程; (3) 此外, 有的 miRNAs 还兼具有上述 2 种作用形式^[3]。总的来说, miRNAs 通过调节靶基因的表达水平, 进而影响到细胞分化、增殖、凋亡等过程, 从而在个体的生长发育和疾病的发生发展中发挥重要作用。

2 miRNAs 与 HBV 感染

HBV 感染引起的急、慢性 HBV 严重威胁人类健康, 而目前临床上以重组干扰素和核苷酸类似物为主要治疗手段的疗效并不理想。miRNAs 能够对靶基因表达发挥调控作用, 这使其成为 HBV 感染研究领域的一个新热点。2011 年的研究显示, 在 HBV 感染宿主后, 并没有发现 HBV 基因组编码的 miRNAs^[8], 但发现宿主细胞 miRNAs 及宿主的免疫应答会发生一些改变, 这些研究为揭示 HBV 作用于宿主的分子机制提供了新思路, 并可以通过该思路来探寻治疗 HBV 感染的新靶点、新方法。

2.1 HBV 编码的 miRNAs 病毒基因组自身可以编码 miRNAs, 用于对抗宿主的抗病毒反应^[9]。有研究者于 2004 年首次报道 EB 病毒组编码了 5 条 miRNAs^[10]。目前研究已经发现一些人乳头瘤病毒、疱疹病毒、多瘤病毒、腺病毒、逆转录病毒等病毒基因组能够编码 miRNAs^[11]。然而, 在 HBV 感染宿主后, 并未发现 HBV 基因组编码的 miRNAs。为研究 HBV 基因组编码的 miRNAs, Jin 等^[12] 利用计算机分析软件发现一种备选的 pre-miRNA, 并推导出成熟的 miRNA, 但发现该 miRNA 对任何一个宿主细胞的翻译过程都没有抑制作用, 但对一种病毒自身的 mRNA 发挥作用, 从而推测 HBV 利用自身 miRNAs 调节自身基因的表达。Lam 等^[13] 在假设 HBV 感染性的产生是由于病毒自身编码的 miRNAs 或影响宿主细胞的 miRNAs 前提下进行实验, 但在 HepG 2.2.15 细胞系中并未发现 HBV 基因组编码的 miRNAs。

2.2 宿主细胞 miRNAs 与 HBV 感染 既然在 HBV 基因组编码的 miRNAs 对宿主感染的作用方面, 研究并没有太大突破, 那对于宿主细胞自身编码的 miRNAs 在 HBV 感染后的变化情况又是如何呢? 宿主细胞编码的 miRNAs 通过多条途径发挥作用, 它有可能作用于异己基因 (如侵入的病毒), 也有可能作用于宿主细胞自身的基因, 起到抑制异己繁殖, 稳定自身内环境的作用。因此, 目前 HBV 感染宿主细胞后引起宿主细胞 miRNAs 的变化情况是一个研究热点。2011 年, Wu 等^[14] 首次报到了人类 miRNAs 能够对 HBV 的关键基因发挥作用, 实验利用 4 种可靠的目标预测软件对 miRNAs 进行筛选, 最终发现 miR-7、miR196b、miR433 和 miR511 对 HBV 的聚合酶或 S 基因起作用, miR205 对 X 基因发挥作用, miR345 对 pre-C 基因发挥作用。Wang 等^[15] 对肝细胞中浓度最多的 miRNA——miR-122 进行了研究, 发现和健康人相比, HBV 感染者肝细胞内 miR-122 的表达量明显下降, 并且其表达水平的高低与肝内病毒载量和肝脏严重程度呈负相关; 进一步研究, 发现这一现象的原因在于 HBV 感染引起的 miR-122 下调, 继而下调细胞周期蛋白 G1 (cyclin G1) 的表达, 从而阻断了 cyclin G1 与 p53 之间的相互联系, 解除了 p53 对 HBV 复制的抑制作用, 同时这一作用机理可能与 HBV 持续感染及癌变有关。Xu 等^[16] 在小鼠肝细胞性肝癌 (HCC) 模型中发现, HBx 可抑制 miR-148a 的表达, 从而促进肿瘤的生长和转移。miR-15a 和 miR-16-1 是 2 种重要的对人类肿瘤起抑制作用的 miRNAs, Wang 等^[17] 发现在 miRNAs 和 HBV 感染的相互作用中, miR-15a/miR-16-1 起到了关键作用, 同时意外发现 HBx 的转录本通过 miRNA 作用于病毒 RNA 序列, 直接引起了 miR-15a/miR-16-1 的下调, 从而考虑对肿瘤有明确抑制作用的 miRNAs 受到病毒 RNA 的调节而下调, 这可能会影响 HBV 感染引起

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202624, 81102720, 81072902)。 作者简介: 张技 (1981—), 在读博士, 主要从事中医证候的分子生物学研究。 △ 通讯作者, Tel: 13568907974; E-mail: 664958917@qq.com。

的 HCC 的转归。HBV 感染后, 宿主细胞 miRNAs 变化情况的研究, 以及两者之间相互作用关系的研究, 在不断地深入进行, 以期能找到治愈 HBV 感染的突破口。

2.3 外源性 miRNAs 与 HBV 感染 RNA 干扰作为一种潜在的抗病毒治疗途径, 已有大量的研究报道。过去的研究主要针对小干扰 RNA 进行, 而近年来, 利用 miRNAs 介导的 RNA 干扰技术, 将针对靶基因的外源性人工合成的 miRNAs 导入细胞内, 从而起到抑制靶基因作用的研究, 也有了大量报道^[18]。Gao 等^[19]利用 Invitrogen 公司的 miRNAs 设计软件, 针对 HBV S 区设计了特异的 miRNA 表达序列, 并构建了 3 个人工 miRNA(amiRNA)-HBV 质粒转染 HepG 2.2.15 细胞株, 发现 HBV 的复制和表达均受到了该 amiRNAs 的抑制, 提示针对靶基因设计的 amiRNAs 有可能成为治疗慢性 HBV 感染的一种潜在方法。Pu 等^[20]针对病毒保护区域, 分别构建了含独立序列 amiRNA-HBV1、amiRNA-HBV2、amiRNA-HBV3、amiRNA-HBV4 的 4 个载体, 以及 1 个含串联序列 amiRNA-HBV3-HBV4 的载体, 分别转染 HepG 2.2.15 细胞株, 结果显示他们对 HBV mRNA 表达的抑制率分别为 29.3%、14.9%、61.2%、75.6% 和 87.2%, 也提示 amiRNAs 可能成为治疗慢性 HBV 感染的一种方法。

3 展 望

miRNAs 作为一种新近发现的非编码微小 RNA, 拓展和丰富了非编码 RNA 在基因表达中所起的作用。真核细胞中大量存在的 miRNAs, 在基因表达的调控中发挥了重要作用, 这是对经典中心法则的补充和完善。miRNAs 通过引起靶基因沉默, 进而影响到相关的信号传导通路, 影响个体的生理生化过程。因此, miRNAs 在个体生长发育、疾病发生发展等过程中扮演了重要的角色。HBV 感染宿主细胞后, 病毒基因组虽未产生病毒 miRNAs, 但是病毒的感染引起了宿主细胞相关 miRNAs 的变化, 已有大量的实验证实宿主细胞 miRNAs 的改变影响到了乙型肝炎的转归。基于此改变, 研究者也将 amiRNAs 应用于 HBV 感染的研究中, 期望找到治疗 HBV 感染的新靶点。

虽然, miRNAs 在 HBV 感染中已经有了大量的研究成果, 但 miRNAs 表达的调控机制, 多个 miRNAs 对同一靶基因的调控模式, miRNAs 在不同信号传导通路的作用情况, 以及 amiRNAs 的引入对正常宿主细胞的影响等问题, 还有待进一步研究解决。miRNAs 在 HBV 感染中的研究结果, 已经向人们展示出 miRNAs 在治疗 HBV 感染中有着良好的应用前景。相信随着对 miRNAs 研究的进一步深入, 将有助于对 HBV 引起的急慢性肝炎的分子机制的深入认识, 并为乙型肝炎的治疗提供新的治疗靶点及治疗模式, 为乙型肝炎的治愈带来新希望。

参考文献:

- [1] 世界卫生组织. 乙型肝炎: 实况报道(第 204 号)[R]. 世界卫生组织, 2012.
- [2] Friedman JM, Jones PA. MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease[J]. *Swiss Med Wkly*, 2009, 139(33/34): 466-472.
- [3] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [4] Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease[J]. *Development*, 2005, 132(21): 4653-4662.

- [5] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. *Genome Res*, 2009, 19(1): 92-105.
- [6] Lund E, Güttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors[J]. *Science*, 2004, 303(5654): 95-98.
- [7] Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing[J]. *Cell*, 2005, 123(4): 631-640.
- [8] Liu WH, Yeh SH, Chen PJ. Role of microRNAs in hepatitis B virus replication and pathogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1809(11/12): 678-685.
- [9] Sullivan CS. New roles for large and small viral RNAs in evading host defences[J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(7): 503-507.
- [10] Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, et al. Identification of virus-encoded microRNAs[J]. *Science*, 2004, 304(5671): 734-736.
- [11] Kincaid RP, Sullivan CS. Virus-encoded microRNAs: an overview and a look to the future[J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(12): e1003018.
- [12] Jin WB, Wu FL, Kong D, et al. HBV-encoded microRNA candidate and its target[J]. *Comput Biol Chem*, 2007, 31(2): 124-126.
- [13] Lam WY, Tang JW, Chan PK. Identification of hepatitis B virus encoding/affecting microRNAs [J]. *Hong Kong Med J*, 2012, 18 Suppl 6: 44-47.
- [14] Wu FL, Jin WB, Li JH, et al. Targets for human encoded microRNAs in HBV genes[J]. *Virus Genes*, 2011, 42(2): 157-161.
- [15] Wang S, Qiu L, Yan X, et al. Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G(1)-modulated P53 activity[J]. *Hepatology*, 2012, 55(3): 730-741.
- [16] Xu X, Fan Z, Kang L, et al. Hepatitis B virus X protein represses miRNA-148a to enhance tumorigenesis [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(2): 630-645.
- [17] Wang Y, Jiang L, Ji X, et al. Hepatitis B viral RNA directly mediates down-regulation of the tumor suppressor microRNA miR-15a/miR-16-1 in hepatocytes[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(25): 18484-18493.
- [18] Niu QW, Lin SS, Reyes JL, et al. Expression of artificial microRNAs in transgenic Arabidopsis thaliana confers virus resistance[J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(11): 1420-1428.
- [19] Gao YF, Yu L, Wei W, et al. Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by artificial microRNA[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(29): 4684-4689.
- [20] Pu C, Wang L, Miao X, et al. Optimized tandem amiRNA mediates stronger inhibitory effects on hepatitis B virus infection[J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2011, 20(3): 271-278.