

- proliferation and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma by directly targeting Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Liver Int*, 2012, 32(5): 752-760.
- [8] Li C, Wang Y, Wang S, et al. Hepatitis B virus mRNA-mediated miR-122 inhibition up regulates PTTG1-binding protein, which promotes hepatocellular carcinoma tumor growth and cell invasion [J]. *J Virol*, 2013, 87(4): 2193-2198.
- [9] Zhao L, Li F, Taylor EW. Can tobacco use promote HCV-induced miR-122 hijacking and hepatocarcinogenesis? [J]. *Med Hypotheses*, 2013, 80(2): 131-133.
- [10] Li J, Wang Y, Yu W, et al. Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(1): 70-73.
- [11] Callegari E, Elamin BK, Giannone F, et al. Liver tumorigenicity promoted by microRNA-221 in a mouse transgenic model [J]. *Hepatology*, 2012, 56(3): 1025-1033.
- [12] Rong M, Chen G, Dang Y. Increased miR-221 expression in hepatocellular carcinoma tissues and its role in enhancing cell growth and inhibiting apoptosis in vitro [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 21.
- [13] Chen G, Dang YW, Luo DZ, et al. Effect of miR-221 on the viability and apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2011, 19(8): 582-587.
- [14] Luo J, Chen M, Huang H, et al. Circulating microRNA-122a as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2013, 6: 577-583.
- [15] Qi P, Cheng SQ, Wang H, et al. Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28486.
- [16] Gui J, Tian Y, Wen X, et al. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2011, 120(5): 183-193.
- [17] Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, et al. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2012, 56(1): 167-175.
- [18] Li L, Guo Z, Wang J, et al. Serum miR-18a: a potential marker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma screening [J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(11): 2910-2916.
- [19] Qu KZ, Zhang K, Li H, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2011, 45(4): 355-360.
- [20] Liu AM, Yao TJ, Wang W, et al. Circulating miR-15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study [J]. *BMJ Open*, 2012, 2(2): e000825.
- [21] Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9798-9807.
- [22] Abdalla MA, Haj-Ahmad Y. Promising candidate urinary microRNA biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma among high-risk hepatitis C virus egyptian patients [J]. *J Cancer*, 2012, 3: 19-31.
- [23] Xu J, Wu C, Che X, et al. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis [J]. *Mol Carcinog*, 2011, 50(2): 136-142.
- [24] Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, et al. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development [J]. *Pathol Int*, 2010, 60(5): 351-357.
- [25] Bihrer V, Waidmann O, Friedrich-Rust M, et al. Serum microRNA-21 as marker for necro inflammation in hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26971.

(收稿日期: 2014-10-18 修回日期: 2014-12-16)

• 综述 • doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2015.08.044

miRNA 与结核分枝杆菌感染的研究进展

杨静综述, 董剑[△]审校

(重庆市大足区人民医院检验科 402360)

[关键词] microRNA; 结核分枝杆菌; 结核病

[中图分类号] R37

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)08-1132-03

microRNA(miRNA)是一类长度为 19~22 个核苷酸、在转录后水平对基因的表达起调控作用的单链非编码 RNA^[1]。1993 年起, Lee 等^[2]和 Reinhart 等^[3]先后在秀丽隐杆线虫中发现 lin-4 和 let-7 可以负向调控靶基因的表达, 迄今, 已有 24 000 多个 miRNA 被收录并注释, 而且数量逐年递增。研究表明, miRNA 在细胞死亡与增殖、癌症发生与发展及疾病转归中发

挥着重要的作用。尽管现代医学和诊断技术不断进步, 结核病仍然是一个重大的挑战。据世界卫生组织(world health organization, WHO)最新统计, 目前, 全球结核感染者约占总人口的 1/3, 每年有 800 多万人发展为活动性结核病, 并有 140 多万人死于该病。虽然结核分枝杆菌和宿主环境之间的相互作用已广泛研究, 但对相关 RNA 的了解仍然非常有限。阐明

miRNA 在结核分枝杆菌感染中扮演的角色,有助于更透彻地了解结核病的发生、发展,为制订有效的控制策略提供新思路。

1 miRNA 基因结构、生物合成和基本功能

pri-miRNA 在多种酶的剪切作用下生成具有生物活性的、长度约 22 个核苷酸的成熟 miRNA。大多数 miRNA 基因位于基因间隔区,与靶基因相距大于 1 kb,被称为基因间 miRNA,少部分被称为内含子 miRNA 的 miRNA 位于内含子区域、蛋白编码区或非编码区^[4]。基因间 miRNA 由 RNA 聚合酶 II 或 III 在独立的启动子和调节子作用下转录而来,约 50% 的基因间 miRNA 紧邻其他 miRNA,形成 miRNA 集群^[5]。内含子 miRNA 可能与宿主基因的表达和剪接体剪切过程相关^[6]。基因间 miRNA 的转录由独立的启动子启动编码,生成几 kb 长具有帽结构和 polyA 尾的 pri-miRNA,而内含子 miRNA 的转录由宿主基因启动子控制,且必须从 mRNA 中被剪切出来并加工为成熟的 miRNA^[7]。

RNA 聚合酶 II / III 在细胞核内聚合游离碱基形成大于 1 kb 的 pri-miRNA, pri-miRNA 被 RNase III Drosha 和双链 RNA 结合蛋白 Pasha 剪切成约 70 个核苷酸组成的呈不完全茎环结构的 pre-miRNA^[8]。pre-miRNA 经 Ras 相关核蛋白和 exportin5 输送到细胞质中后^[9],被 Dicer 剪切成约 22 个核苷酸长度的 miRNA 双链。解旋酶打开 miRNA 双链,其中,一条单链很快整合到 miRISC 复合体中,降解 mRNA、阻遏翻译或使 mRNA 脱腺苷酸化。

在植物、动物和多种真核生物以及 DNA 病毒中均发现 miRNA 可以负向调控靶基因的表达。在植物和秀丽隐杆线虫中观察到的转录后抑制现象说明这种抑制并不是完全阻断翻译,而是 miRNA 对蛋白的合成进行微调^[10-11]。尽管假说推测 miRNA 整合到 miRISC 复合体中后,通过与靶 mRNA 的 3'-UTR 区互补结合而阻遏翻译或使靶 mRNA 降解,从而干扰基因的表达^[12]。但是,miRNA 介导的调控并不需要 miRNA 全长与目标结合区域完全匹配,只需要 5' 端的 2~8 位核苷酸称为“种子区域”的碱基序列与 mRNA 完全配对即可。因此,一个 miRNA 可能影响多种蛋白质的合成,多个 miRNA 也可能同时靶向一个 mRNA 而达到增强翻译抑制的效果。

2 miRNA 与结核分枝杆菌感染

结核病发生、发展确切的分子机制尚未完全清楚,这是控制结核病的主要难点之一。结核分枝杆菌生长缓慢等特性,使其难以诊治,且多耐药和泛耐药结核分枝杆菌的出现给世界范围内卫生安全带来极大的威胁。一般情况下,宿主基因复杂的调控对疾病的发展至关重要,因此,深入了解 miRNA 调控真核基因表达的功能将为疾病的诊断及治疗提供新思路。

存在于组织、血清和血浆以及其他体液中的 miRNA 能有效抵抗内源性 RNase 的分解而以稳定形式存在。Fu 等^[13]首次把循环 miRNA 作为研究对象,采用 miRNA 芯片揭示了 miRNA 与活动性肺结核的相关性。该研究表明,与正常人相比,肺结核患者血清中有 92 个 miRNA 变化显著,其中,59 个 miRNA 表达下调,33 个 miRNA 表达上调;当用 qRT-PCR 验证时,miR-29a 和 miR-93* 表达上调不仅存在于血清中,痰液标本中二者表达也增多。随后的研究中,活动性肺结核患者的痰液上清中差异表达的 miRNA 也被筛选出。与健康人相比,结核病患者痰液中发现 95 个差异表达的 miRNA,其中 miR-3179 和 miR-147 过表达,miR-19b-2* 表达受到抑制。因此,有望把循环 miRNA 作为疾病诊断的生物标志物和治疗的靶标。

在卡介苗感染的小鼠巨噬细胞中,miR-21 表达显著上调,

miR-142-3p 表达显著下调,miR-203 在 24 h 内表达下调,24 h 后表达上调,说明这些 miRNA 可能通过调控免疫相关基因在巨噬细胞抗结核分枝杆菌的免疫应答中发挥着重要的作用^[14]。此外,结核分枝杆菌感染人巨噬细胞后,结核分枝杆菌脂质及菌体可诱导巨噬细胞 miR-125b 表达上调和 miR-155 表达下调,伴随 TNF- α 表达下降^[15]。然而,耻垢分枝杆菌脂质及菌体可诱导巨噬细胞 miR-125b 表达下调和 miR-155 表达上调,伴随 TNF- α 表达增加。2 种不同分枝杆菌引起 TNF- α 生物合成的差异,可以理解为 miR-125b 的靶标为 TNF- α 的 mRNA,而 miR-155 则通过延长 TNF- α mRNA 的半衰期,从而间接增强 TNF- α 的表达^[16]。因此,结核分枝杆菌引起的 miR-125b 高表达,阻断 TNF- α 的生物合成,使结核分枝杆菌颠覆宿主免疫,并增加其毒力。通过研究结核分枝杆菌感染后 miRNA 参与调控宿主细胞免疫反应的机制,有利于结核病的早期诊断和治疗。

近期研究发现^[17],在结核分枝杆菌感染的树突状细胞和巨噬细胞中,表达上调的 miR-99b 能够抑制 IL-6、IL-12 和 IL-1 β 等前炎性细胞因子的表达,敲减树突状细胞中的 miR-99b 导致 TNF- α 及前炎性细胞因子表达增加,且结核分枝杆菌存活率降低。因此,研究并利用 miR-99b 作为结核病诊断的生物标志物或治疗手段具有重要意义。

颗粒溶素是迄今为止发现的能够直接杀灭结核分枝杆菌的一种抗菌肽,已有研究证实颗粒溶素无论在细胞水平还是在小鼠体内都表现出良好的抗结核分枝杆菌活性^[18-19]。然而,结核病患者体内颗粒溶素的表达却显著下降,成功治疗后则持续回升^[20-21]。表明在机体受到结核分枝杆菌感染后,某种机制抑制体内颗粒溶素的表达,使其不能有效发挥灭菌作用。前期研究证实 miR-218 可以负向调控巨噬细胞中颗粒溶素的表达,且敲减 miR-218 能增加颗粒溶素的表达量,因此,进一步研究 miR-218 对颗粒溶素的调控机制会为结核病的诊断和治疗提供新思路^[22]。

另有研究表明,在 PPD 刺激后的活动性肺结核患者外周血单个核细胞中检测到高表达的 miR-155 和 miR-155*^[23],且结核分枝杆菌特异性分泌抗原 ESAT-6 在 miR-155 的诱导和其后续影响中发挥了关键作用,可以抑制 Bach1 和 SHIP1 的表达^[24]。已知 Bach1 对血红素加氧酶 1(结核分枝杆菌休眠的活化剂)的转录起阻遏作用,而 SHIP1 抑制丝氨酸/苏氨酸激酶 AKT(结核分枝杆菌的存活所需)的激活。因此,miR-155 对机体固有免疫和抗结核分枝杆菌感染的调节是至关重要的,关注 miR-155 及其在机体感染结核分枝杆菌后介导的细胞内反应能为结核病的诊断和治疗提供新方向。

3 miRNA 在诊断和治疗中的作用

近几年,研究者发现多种 miRNA 参与了结核病的发生、发展,考虑到结核病对全球公共卫生造成的影响及其难以诊治的问题,仍需进一步研究以筛选出能高效诊断和治疗结核病的 miRNA。与健康对照组相比,结核病患者外周血单个核细胞^[23]、血清^[13]和痰液中均可检测出表达水平发生改变的 miRNA,在不同 miRNA 中,miR-29a、miR-155、miR-155*、miR-125b、miR-3179a 和 miR-147 可能是结核病诊断的潜在生物标志物。

如果 miRNA 可以作为结核病诊断的标志物,那么,这些 miRNA 是结核病特有,还是与其他疾病共享,至少要考虑那些病理相似,但病因不同的疾病。最近一项研究将结核病患者全血 miRNA 与病理类似的结节病患者的全血 miRNA 表达谱进

行比较,结果表明患病个体与健康人的 miRNA 表达有显著差异,但是结核病和结节病的 miRNA 表达谱高度相似^[25]。因此,在寻找差异表达 miRNA 的同时,要着重筛选那些病理相似或密切相关病原体(如分枝杆菌属)引起疾病的 miRNA 生物标志物。

4 展 望

miRNA 是新兴基础生物学研究应用于创新治疗领域的一个代表者。机体感染结核分枝杆菌以后,miRNA 表达的改变及其参与调节机体抗结核分枝杆菌感染的信号通路,为结核病的研究提供了新思路。近年来,关于 miRNA 的研究正如火如荼,发现更多相关 miRNA 并阐明其参与机体调控结核分枝杆菌感染的机制,更好地诊断和治疗结核病带来新希望。

参考文献

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA[J]. *Trends Genet*, 2006, 22(3): 165-173.
- [5] Lee Y, Jeon K, Lee JT, et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization[J]. *EMBO J*, 2002, 21(17): 4663-4670.
- [6] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. *Science*, 2001, 294(5543): 853-858.
- [7] Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II [J]. *EMBO J*, 2004, 23(20): 4051-4060.
- [8] Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex[J]. *Nature*, 2004, 432(7014): 231-235.
- [9] 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.
- [10] Grishok A, Sinskey JL, Sharp PA. Transcriptional silencing of a transgene by RNAi in the soma of *C. elegans* [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(6): 683-696.
- [11] Baulcombe D. RNA silencing in plants[J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 356-363.
- [12] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression[J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 839-843.
- [13] Fu Y, Yi Z, Wu X, et al. Circulating microRNAs in patients with active pulmonary tuberculosis[J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(12): 4246-4251.
- [14] 张兆波,魏军,汤建中,等. BCG 对小鼠 RAW264. 7 巨噬细胞 miR-203, miR-142-3p, miR-21 表达的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(2): 125-129.
- [15] Rajaram MV, Ni B, Morris JD, et al. Mycobacterium tuberculosis lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(42): 17408-17413.
- [16] Tili E, Michaille JJ, Cimino A, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock [J]. *J Immunol*, 2007, 179(8): 5082-5089.
- [17] Singh Y, Kaul V, Mehra A, et al. Mycobacterium tuberculosis controls microRNA-99b (miR-99b) expression in infected murine dendritic cells to modulate host immunity [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(7): 5056-5061.
- [18] Yang C, He YL, Zhang L, et al. GLS/IL-12-modified Mycobacterium smegmatis as a novel anti-tuberculosis immunotherapeutic vaccine[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009, 13(11): 1360-1366.
- [19] Yi Z, Yang C, Li J, et al. Recombinant *M. smegmatis* vaccine targeted delivering GLS/IL-12 into macrophages can induce specific cellular immunity against *M. tuberculosis* in BALB/c mice[J]. *Vaccine*, 2007, 25(4): 638-648.
- [20] Di Liberto D, Buccheri S, Caccamo N, et al. Decreased serum granulysin levels in childhood tuberculosis which reverse after therapy [J]. *Tuberculosis*, 2007, 87(4): 322-328.
- [21] Sahiratmadja E, Alisjahbana B, Buccheri S, et al. Plasma granulysin levels and cellular interferon-gamma production correlate with curative host responses in tuberculosis, while plasma interferon-gamma levels correlate with tuberculosis disease activity in adults [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2007, 87(4): 312-321.
- [22] 杨静,杨春,何永林,等. GLS 3'-非编码区-荧光素酶报告质粒的构建及其活性鉴定[J]. *免疫学杂志*, 2013, 29(1): 33-37.
- [23] Wu J, Lu C, Diao N, et al. Analysis of microRNA expression profiling identifies miR-155 and miR-155* as potential diagnostic markers for active tuberculosis; a preliminary study[J]. *Hum Immunol*, 2012, 73(1): 31-37.
- [24] Kumar R, Halder P, Sahu SK, et al. Identification of a novel role of ESAT-6-dependent miR-155 induction during infection of macrophages with Mycobacterium tuberculosis[J]. *Cell Microbiol*, 2012, 14(10): 1620-1631.
- [25] Maertzdorf J, Weiner J 3rd, Mollenkopf HJ, et al. Common patterns and disease related signatures in tuberculosis and sarcoidosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(20): 7853-7858.