

MicroRNA 与免疫反应及脓毒症

杜林林(综述) 马中富(审校)

【关键词】 MicroRNA; 免疫反应; 脓毒症

微小 RNAs (MicroRNAs) 又简称 miRNAs, 是一类长约 21~25 个核苷酸的小分子 RNA, 广泛存在于动物、植物、病毒和单个细胞生物体中。miRNAs 存在于基因组的非编码区, 属于非编码基因, 不能编码蛋白。但它是一类重要的转录后调节基因, 具有调节细胞增生、分化、凋亡等过程的功能, 已经发现其参与肿瘤、血液性疾病、风湿性疾病和内分泌代谢等的调控。近年来还发现, miRNAs 可以调节免疫系统的发育和免疫应答, 包括抗原呈递、Toll 样受体 (TLR) 信号途径、细胞因子和淋巴细胞受体信号等^[1]。现就 miRNAs 调节免疫系统的作用及其在脓毒症中的作用进行综述。

1 miRNAs 的生物合成和作用机制

1993 年 Lee 等在秀丽新小杆线虫中利用遗传分析的方法发现了第 1 个 miRNA 基因 lin-4, 并发现其与靶基因 mRNA 结合后可以抑制靶基因的翻译, 且不影响其转录。2000 年 Reinhart 等又在线虫内发现了第 2 个 miRNA 基因 lin-7。此后几年里有大量的 miRNAs 被发现, 科学家们对 miRNAs 的基因序列、表达和生物功能进行了研究。

1.1 miRNAs 的生物合成: 细胞核内编码 miRNAs 的基因由 RNA 聚合酶 I (RNAPol I) 转录生成初级转录产物, 即长度约 100~1 000 个核苷酸的初级 miRNA (pri-miRNA), 在 RNA 聚合酶 II Droscha-DGCR8 复合体下剪切成长度约 70 个核苷酸且有茎环结构的 miRNA 前体 (pre-miRNA), pre-miRNA 在 Ran (核内小分子 GTP 结合蛋白) 依赖的转运蛋白 5 (exportin 5) 作用下转运至细胞质, 再被 RNA 聚合酶 III-核酸内切酶

(Dicer 酶) 剪切成长度约为 21~25 个核苷酸的 miRNA, 成熟的 miRNA 有一条链结合到 RNA 诱导的基因沉默复合物 (RISC) 中一起组成复合体, 该复合体会结合到靶基因 mRNA 上发挥作用。

1.2 miRNAs 的作用机制: miRNA 通过识别靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区 (3' UTR) 并与之结合, 当结合方式完全互补时, 靶基因 mRNA 被降解, 此方式在植物中多见; 在动物中, miRNA 与靶基因 mRNA 的 3' UTR 以不完全互补配对方式结合, 从而抑制靶基因翻译表达。但存在 3' UTR 的作用位点可能不止一个时才能发挥抑制作用; miRNA 与靶基因的序列互补取决于种子区域即 miRNA 的 5' 端第 2~8 个核苷酸序列。

2 miRNAs 在免疫反应中的作用

虽然目前大部分 miRNAs 的功能尚不甚清楚, 但少数 miRNAs 已被证实参与免疫系统发育、分化及非特异性和特异性免疫反应调节中起重要作用。

2.1 miR-155: miR-155 位于 B 细胞受体诱导基因 (BIC 基因) 的第 3 个外显子内, 表达水平受 BIC 基因的转录水平和 miRNAs 加工等调控; 最初发现是在白血病病毒诱导的 B 淋巴细胞瘤的反转录整合位点上, 与 c-myc 共同控制细胞的生长。研究发现, 在人白血病和淋巴瘤中 miR-155 表达显著升高, miR-155 转基因鼠可致 B 细胞恶变^[2], 随后又发现造血干细胞也表达 miR-155; 近来发现 miR-155 在免疫细胞的免疫应答中起调控作用。miR-155 通过细胞控制因子的产生可以控制 B 细胞生发中心的形成和免疫反应; 基因敲除 miR-155 的小鼠可出现生发中心形成障碍及 B 细胞、T 细胞和树突细胞功能障碍; 基因敲除 miR-155 的小鼠 B 细胞产生抗原特异性抗体的水平降低, 如 IgG、IgM, 而 T 细胞激活后产生的白细胞介素-2 (IL-2)、IL-4 和 γ -干扰素 (IFN- γ) 也减少^[3-4]; 缺乏 miR-155 的小鼠缺乏保护性免疫反应, 对外界免疫刺激反应减弱。

miR-155 调控机制可能通过靶基因 PU1 (Ets 家族转录因子) 调控 B 细胞产生免疫抗体; 通过转录因子 c-Maf 调节辅助性 T 细胞 (Th), 使其分化偏向 Th2^[5]。miR-155 在调节性 T 细胞 (Treg) 上可以高表达, 与 Treg 特异性转录因子 Foxp3 结合在 BIC 编码基因的启动子区域相关。这些研究说明 miR-155 在特异性免疫中有至关重要的作用。

miR-155 在非特异性免疫中发挥同样重要的作用。吞噬细胞是人体第一免疫防线, 如粒细胞、树突细胞和巨噬细胞, 其 TLR 则可以直接识别外来微生物产物, 尤其是细菌或病毒产生的病原相关分子, 然后激活各类途径蛋白激酶活化转录因子, 如激活蛋白 1 (AP-1)、核转录因子- κ B (NF- κ B) 等, 同时可以上调吞噬细胞的 miR-155; 免疫调节因子如肿瘤坏死因子 (TNF) 和 IFN 诱导也可以调控 miR-155 的表达, IFN 可以上调单核/巨噬细胞的 miR-155^[5]。Tili 等^[6]观察到脂多糖 (LPS) 刺激巨噬细胞后 miR-155 表达上升, 而且在小鼠体内实验中 LPS 同样可以使巨噬细胞 miR-155 表达升高, TNF- α 可以在 30 min 内下调巨噬细胞 miR-155 表达, 随后表达上升; 预先使用 MG-132 (NF- κ B 核转位抑制剂) 处理 30 min 后 miR-155 表达无变化, 故认为其作用途径可能与 NF- κ B/抑制因子- κ B (IkB) 途径有关; LPS 作用于 miR-155 转基因小鼠 B 细胞比野生型小鼠更能高表达 TNF- α , 且 miR-155 转基因小鼠更容易形成内毒素性休克。LPS 诱导的 TLR 激活后下游途径中 Fas 相关死亡域结构蛋白 (FADD)、IkB 激酶 ϵ (IKK ϵ) 和受体相互影响丝氨酸-苏氨酸激酶 1 (Ripk1) 也可能是 miR-155 的靶基因, miR-155 在其中发挥反馈调节作用, 但机制复杂。

2.2 miR-146: 多数的脊椎动物有 2 个基因位点编码, 即 miR-146-miR-146a 和 miR-146b, 分别在 5 号和 10 号染色体上, 均仅在 3' 区有 2 个核苷酸不同, 它们可能有相同靶基因, 但不一定有相同的

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.

2009.08.021

基金项目: 广东省科技计划项目 (2004 B30601002)

作者单位: 510080 广东广州, 中山大学附属第一医院普内科

通信作者: 马中富, Email: ma_zf@tom.com

生物功能。目前研究发现 miR-146 与非特异性免疫有关,可调节细菌、病毒引起的急性炎症反应。细菌等病原微生物可以通过激活 TLR2、TLR4 和 TLR5 上调单核细胞 miR-146,但 TLR3、TLR7 和 TLR9 的激活对单核细胞 miR-146 表达无影响^[7];Th1 细胞的 miR-146 表达较 Th2 细胞要高,在 Treg 上有高表达。LPS 可以使人树突细胞 miR-146a 表达增加。Taganov 等^[7]发现,LPS 作用于 TLR 是依赖 NF- κ B 途径上调 miR-146 的,IL-1 β 和 TNF- α 可上调单核细胞 miR-146;研究还发现 IL-1 β 只有在高浓度才可以诱导 miR-146 表达增加,说明 miR-146 只在严重炎症反应时才参与调节。因而,miR-146 表达受 TNF- α 、IL-1 β 和 NF- κ B 调节。为了更好地说明调节炎症介质的作用,Perry 等^[8]发现 IL-1 β 上调肺上皮细胞 miR-146 表达,通过转染 miR-146 模拟物进入肺上皮细胞可抑制 IL-1 β 诱导的 IL-8 释放,而 miR-146 抑制剂可使 IL-1 β 诱导 IL-8 的释放增加。而增加 miR-146a 活性可以显著抑制 LPS 诱导的鼠脾淋巴细胞 IFN- γ 和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达^[9]。转染带有 miR-146 的巨细胞病毒(CMV)质粒进入人胚肾 293 细胞(HEK293 细胞)可以下调标有荧光 IL-1 受体的相关激酶(IRAK)和 TNF 受体相关因子 6 (TRAF6)活性^[7]。TargetScan database 分析目前 miR-146 的靶基因 IRAK 和 TRAF6,它们都含有多个 miR-146 的 miRNA 识别元素(MREs)。IRAK 和 TRAF6 与 TLR 和 IL-1 的受体激活途径相关,miR-146 通过下调下游途径的 IRAK 和 TRAF6 基因表达,可以负反馈调节免疫炎症反应。

2.3 miR-181a;miR-181a 在造血器官尤其在胸腺有高表达,与 B 细胞和 T 淋巴细胞的发育与分化有关。体外实验表明,miR-181a 过度表达可使 B 细胞数量增多 2 倍,对 T 细胞系却无影响;但是当 miR-181a 转染到鼠骨髓细胞内时发现其不仅能使 B 细胞分化,还可使循环 T 细胞的数量降低 2~3 倍,CD8⁺ 亚群降低 90%,说明 miR-181a 是独立作用于这两个淋巴细胞系,可能作用于不同靶基因^[10]。

miR-181a 在免疫中起作用,调节 T 细胞受体(TCR)信号的强度和阈值,因而影响 T 细胞对抗原的敏感性,它在细

胞信号途径中不是简单的开关作用。Li 等^[11]发现过度表达 miR-181a 使成熟 T 细胞对敏感性抗原增加,弱抗原就能有效诱导 TCR 信号,敲除 miR-181a 可以降低 TCR 信号强度;miR-181a 对 TCR 信号强度的调节不仅导致 TCR 信号强度和阈值改变,还能使 T 细胞将拮抗剂识别为激动剂,利用拮抗剂 MCC 99R 作用于 miR-181a T 细胞,激动细胞钙内流增加,却发挥了激动剂的作用,使 T 细胞表达 IL-2 上升和 T 细胞增生。miR-181a 在 T 细胞发育和成熟过程中的表达调节是动态的,从双阴 T 细胞的高表达至单阳 T 细胞低表达是逐渐下调的,抑制不成熟 T 细胞的 miR-181a 会降低其敏感性和破坏细胞双阳性的选择;T 细胞敏感性使其识别外来抗原避免自身抗原,miR-181a 在免疫反应和免疫耐受中居中心地位。miR-181a 还可调节抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 CD69。miR-181a 的这些功能与 miR-181a 调节淋巴细胞的多个磷酸酶[如酪氨酸蛋白酪氨酸磷酸酶(SHP-2)、蛋白酪氨酸磷酸酶非受体 22(PTPN22)、双特异性磷酸酶 5 (DUSP5)]有关,增强了 TCR 信号分子 lck 和 erk 的基本活性。因此,miR-181a 不仅可以影响 T 细胞和 B 细胞的发育,还可以影响 T 细胞的活化。

2.4 miR-150;miR-150 主要表达在脾和淋巴结上,在分化成熟的 T 细胞和 B 细胞有高表达,原始 T、B 细胞无表达,虽然在成熟的淋巴细胞有高表达,但是 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞活化时有所下降,且 CD4⁺ 的下降更多^[12]。但目前对 miR-150 在 T 细胞中的功能还不甚清楚。而关于 miR-150 在 B 细胞中的作用,Zhou 等^[13]研究反转录病毒转染 miR-150 进入造血干细胞和原始细胞可导致循环中成熟 B 细胞水平下降,过度表达 miR-150 还可以抑制 B 细胞增生。Xiao 等^[14]发现 miR-150 转基因小鼠 B 细胞发育被破坏,在 B 细胞早期发育几乎没有 B1 细胞,而敲除 miR-150 后 B1 细胞数上升。IgM 特异性抗体和 LPS 使 B 细胞上 miR-150 下调。这些功能预测与靶基因 c-Myb 有关,c-Myb 是原始淋巴细胞高表达的一种转录因子,随着细胞成熟而下调,然而当细胞活化时则有上调,缺乏 c-Myb 转基因鼠与 miR-150 异位表达对 B 细胞发育影响相似。

2.5 其他 miRNAs;Tili 等^[6]在研究注

射 LPS 的小鼠时发现,体内单核细胞 miR-125b 显著下调,说明 miR-125b 在 LPS 信号途径中也起重要作用,过度表达 miR-125b 降低 TNF- α 转录,LPS 下调 miR-125b 可能与 Tpl2/细胞外信号调节激酶(ERK)1/2 途径活性有关;另外,miR-125b 加速靶基因去腺苷酸反应,因此 miR-125b 是通过不同方式进行转录后调节的^[15]。miR-132 与非特异性免疫有关,LPS 能使单核/巨噬细胞 miR-132 上调,miR-132 参与调节 TLR 途径的急性炎症反应^[7]。miR-223 主要表达在骨髓细胞上尤其是粒细胞系上,调节粒细胞系和 T 细胞分化,敲除 miR-223 鼠粒细胞增加 2 倍,且这些粒细胞对活化刺激敏感性增加;敲除 miR-223 鼠更容易被内毒素致肺损伤和更多组织破坏,相关靶基因可能为核转录因子 I-A (NF I-A) 和肌细胞增强子 2c (Mef2c)^[16]。miR-223 调控 LPS 诱导脾细胞的 IFN- γ 表达^[9]。Moschos 等^[17]用 LPS 刺激鼠肺上皮细胞,结果有 12 个 miRNAs (miR-21、miR-25、miR-27b、miR-100 和 miR-140 等)快速短暂表达上调,这些 miRNAs 功能还有待进一步研究。还有 miR-142 与 T 细胞分化有关,miR-424 与单核/巨噬细胞分化有关;还有与病毒感染相关的 miRNAs,即 miR-122、miR-32、miR-17-92 族等^[18]。

3 miRNAs 和脓毒症

脓毒症是由病原微生物感染引起的全身炎症反应,主要病理生理机制是机体失控的炎症反应和免疫功能障碍所致,涉及细胞内多条信号转导通路的活化。革兰阴性菌 LPS 与其受体结合后再与 TLR 结合,通过 TLR 传递信息,TLR 有两条信号途径,即 TLR-髓系分化蛋白(MyD88)/IRAK-NF- κ B 诱导激酶(NIK)/NF- κ B 途径和 TLR-MyD88/IRAK-丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)途径。前一途径主要包括:MyD88、IRAK、TRAF-6、NIK、IKK、NF- κ B 和 I κ B 等;后一途径的 MAPK 家族成员有 ERK、c-jun N-末端激酶(JNK)、蛋白激酶 p38 等,作用于 AP-1。还有 Janus 激酶/信号转导和转录激活因子(JAK/STAT)途径,被认为是 LPS 诱导炎症又一机制,参与因子有 JAK 家族、STAT 家族、细胞因子信号转导抑制蛋白(SOCS)家族、iNOS、IL-10 等,JAK/STAT 途径除了致炎作用外还有负反馈调节炎症反应作

用,SOCS 为负反馈调节因子,可抑制细胞因子信号转导;这些信号途径共同调控 TNF- α 、NF- κ B、IL-1、IL-6、IL-10、IFN- γ 等因子。脓毒症免疫功能障碍表现为 T 细胞反应降低或无反应状态, Th2 细胞免疫增强,树突细胞发生凋亡或无能、无法呈递抗原不能产生效应因子,循环中出现 CD4⁺ 细胞和 B 细胞数量减少,中性粒细胞处于免疫麻痹状态^[9,19]。

miRNAs 在脓毒症中的研究较少,但是作为转录后调节基因,其与脓毒症相关信号途径和免疫功能调控相关, LPS 诱导的信号途径中,许多信号分子为 miRNAs 的靶基因(表 1),miR-155、miR-146、miR-132 和 miR-125b 在 LPS 诱导单核/巨噬细胞 TLR 激活的非特异性免疫中起重要调控作用,细菌和病毒的感染都可以诱导 miR-155 的表达,细菌感染诱导 miR-146 表达,促炎因子 TNF 和 IFN 诱导 miR-155 和 miR-146 的表达,miR-155 和 miR-146 在 TLR 信号途径中起反馈调节作用,通过靶基因可以调节 NF- κ B、IFN- γ 、TNF- α 和 IL-1 等^[5,7]。miR-155 转基因小鼠在 LPS 作用下更易形成脓毒症。TLR 信号激活可减少 miR-125b 过度表达,下调 TNF^[20]。miR-223 调控 LPS 诱导下的脾细胞 IFN- γ 表达,敲除 miR-223 小鼠更容易被内毒素致肺损伤和更多器官组织破坏^[20]。而 miR-181a 和 miR-150 影响 T 细胞和 B 细胞活化调控特异性免疫, LPS 下调 B 细胞 miR-150 表达^[14]。目前有许多 miRNAs 在脓毒症中作用尚未发现,且 miRNAs 在脓毒症中调控作用机制也尚不甚清楚,有待继续研究。

4 总结

这些研究说明了 miRNAs 在调节免疫反应中起重要作用,对 miRNAs 的生物功能和分子控制网络的了解,帮助我们 对免疫系统的调节作用有了新的认识。miRNAs 通过调节转录后基因表达,调节免疫细胞的发育、分化和活化调节特异性免疫系统;通过调节细胞因子、转录因子和蛋白激酶等,调节非特异性免疫反应;研究发现 miRNAs 在脓毒症炎症反应和免疫功能中的可能调控作用。

参考文献

[1] Pedersen I, David M. MicroRNAs in the immune response. Cytokine, 2008, 43 (3):391-394.

表 1 miRNAs 在免疫系统中的功能和靶基因

miRNAs	功能	可能靶基因
miR-155	T 细胞分化和 B 细胞发育,非特异性和特异性免疫	PU1, FADD, IKK ϵ 和 Ripk1
miR-146	非特异性免疫	IRAK1 和 TRAF6
miR-132	非特异性免疫	NF I-B
miR-181a	T 和 B 细胞发育, T 细胞抗原敏感性	磷酸酶(SHP-2, PTPN22 等)、Bcl-2 和 CD69
miR-150	B 细胞发育和活化	c-Myb
miR-223	粒细胞分化、非特异性免疫	NF I-A 和 Mef2c

[2] Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(18):7024-7029.

[3] Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. Science, 2007, 316(5824):608-611.

[4] Thai TH, Calado DP, Casola S, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. Science, 2007, 316(5824):604-608.

[5] O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, et al. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(5):1604-1609.

[6] 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 Immunol, 2007, 179 (8):5082-5089.

[7] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling protein of innate immune responses. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(33):12481-12486.

[8] Perry MM, Moschos SA, Williams AE, et al. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1 β -induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. J Immunol, 2008, 180(8):5689-5698.

[9] 张莹, 姚咏明. 调节性 T 细胞与脓毒症关系的研究进展. 中国危重病急救医学, 2006, 18(11):695-697.

[10] Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. Blood, 2006, 108(12):3646-3653.

[11] Li QJ, Chau J, Ebert PJ, et al. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. Cell, 2007, 129(1): 147-161.

[12] Wu H, Neilson JR, Kumar P, et al. miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. PLoS One, 2007, 2(10):e1020.

[13] Zhou B, Wang S, Mayr C, et al. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(17):7080-7085.

[14] Xiao C, Calado DP, Galler G, et al. miR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. Cell, 2007, 131(1):146-159.

[15] Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103 (11):4034-4039.

[16] Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. Nature, 2008, 451 (7182):1125-1129.

[17] Moschos SA, Williams AE, Perry MM, et al. Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. BMC Genomics, 2007, 8:240.

[18] Rosa A, Ballarino M, Sorrentino A, et al. The interplay between the master transcription factor PU. 1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(50):19849-19854.

[19] 董月青, 姚咏明. 脓毒症中细胞免疫紊乱的机制. 中国危重病急救医学, 2004, 16(10):636-638.

[20] Dai R, Phillips RA, Zhang Y, et al. Suppression of LPS-induced interferon gamma and nitric oxide in splenic lymphocytes by select estrogen-regulated microRNAs: a novel mechanism of immune modulation. Blood, 2008, 112(12):4591-4597.

(收稿日期: 2009-02-22)
(本文编辑: 李银平)