

长链非编码 RNA 在结核病中的研究进展

时翠林 叶志坚 虞忻 徐俊驰 沈洁 唐神结 王霞芳

[关键词] 长链非编码 RNA; 结核分枝杆菌; 结核病; 结核免疫

2018 年世界卫生组织 (WHO) 报告显示, 全球结核病估算新发病例约 1 010 万例, 死亡病例约 160 万例^[1]。全球约有 1/3 的人群遭受结核潜伏感染, 在结核感染过程中, 约有 90% 的感染群体处于潜伏期阶段, 仅有 10% 会进入活动性结核发病阶段。结核病的发生、发展和转归除了与感染的细菌量及其毒力等因素有关, 机体的免疫功能也是非常重要的因素^[2]。长链非编码 RNA (lncRNA) 是一类长度大于 200 nt, 但缺少编码蛋白质能力的 RNA^[3-4]。lncRNA 主要位于细胞核内, 在真核生物中普遍表达, 但在不同物种之间的序列保守性不高, 很多研究表明, lncRNA 的表达具有细胞类型特异性^[5-6]。根据 lncRNA 在基因组上相对于蛋白编码基因的位置, 可将其分为 5 种类型^[7]: 正义、反义、双向、基因内及基因间。lncRNA 自身不编码蛋白质, 但可调节多种重要的细胞活动。lncRNA 在多种基本生物过程中发挥关键作用, 如基因组印记、染色体修饰、肿瘤发生、细胞发育和代谢、免疫应答等^[8-12]。已有多项研究发现, 异常表达的 lncRNA 存在于结核患者的巨噬细胞、外周血单核细胞 (PBMC) 和外周血血清中^[13-15], 这些证据表明 lncRNA 在机体应对结核分枝杆菌 (MTB) 感染的免疫应答过程中发挥重要的调控作用。

一、lncRNA 的作用机制

由于 lncRNA 发挥功能的作用机制十分复杂, 其功能的研究十分困难, 目前仅有少数 lncRNA 的功能被阐明。lncRNA 自身不编码蛋白质, 但是可调节多种重要的细胞活动, 其作用机制包括^[4, 16-18]: (1) 编码蛋白的基因上游启动子区转录或抑制 RNA 聚合酶 II 或

介导染色质重构及组蛋白修饰, 从而干扰下游基因的表达; (2) 与编码蛋白基因的转录本形成互补双链, 干扰 mRNA 的剪切; (3) 与编码蛋白基因的转录本形成互补双链, 产生内源性小干扰 RNA (siRNA); (4) 发挥顺式调节因子作用, 通过招募蛋白复合物到其转录位点, 从而激活或抑制邻近基因的表达; (5) 通过反式作用, 招募蛋白质复合物到远处的染色质位点而调控远处的基因; (6) 与特定蛋白质结合, 改变该蛋白质的细胞定位, 调节相应蛋白的活性; (7) 作为结构组分与蛋白质形成核酸蛋白质复合体; (8) 通过结合或隔离作用, 使转录因子远离其作用的染色质区域; (9) 作为分子海绵 (molecular sponge), 吸附微小 RNA (microRNA), 抑制后者对靶基因转录后水平的调节效应; (10) 作为小分子 RNA 的前体分子。

二、lncRNA 在结核感染中的调控作用

当机体受到 MTB 感染后, 体内的免疫系统会被激活, 巨噬细胞、T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞等发挥细胞免疫功能, 对于机体有效清除 MTB 起到关键作用。而免疫细胞功能的有效发挥也会受到很多物质的调控, 包括 lncRNA。

1. lncRNA 在 MTB 感染的 T 淋巴细胞中的研究

MTB 是胞内寄生菌, 机体抗结核免疫主要是细胞免疫, 决定细胞免疫强弱的主要因素是 T 淋巴细胞亚群数量及功能。结核感染诱导产生的免疫以 CD4⁺T 淋巴细胞免疫为主^[19], CD4⁺T 淋巴细胞接受单核巨噬细胞递呈的抗原后被激活并增殖, 产生细胞因子; 产生的细胞因子转而激活巨噬细胞使之抑制细胞内 MTB 的生长。Yi 等^[20]采用基因芯片技术检测结核潜伏感染者、活动期结核病患者和健康对照人群 CD4⁺T 淋巴细胞 lncRNA 和 mRNAs 的表达谱, 结果表明结核感染人群较健康对照人群 CD4⁺T 淋巴细胞的 lncRNA、mRNAs 出现明显表达差异, 提示 lncRNA 可能在调节宿主抗结核的免疫应答中发挥重要作用。有关 CD8⁺T 淋巴细胞在 MTB 感染免疫应答中的作用存在争议, 但近期的研究结果均证实 CD8⁺T 淋巴细胞的免疫反

DOI:10.3969/j.issn.1001-9057.2019.11.001

基金项目: 苏州市科技局指导性项目吴门医派课题 (SYS2018193); 苏州市科技发展规划 (民生科技) 项目 (SYS2019111)

作者单位: 215013 江苏省苏州市第五人民医院 苏州大学附属传染病医院结核科 (时翠林、叶志坚、虞忻、徐俊驰、沈洁、王霞芳); 首都医科大学附属北京胸科医院 北京市结核病胸部肿瘤研究所 (唐神结)

通讯作者: 唐神结, E-mail: tangsj1106@sina.com; 王霞芳, E-mail: ml18168725548@163.com

应和 CD4⁺T 淋巴细胞一样,在机体受结核抗原刺激后提供保护性免疫反应^[21]。CD8⁺T 淋巴细胞亚群抗结核免疫的机制之一是产生大量干扰素 (IFN)- γ 和自然杀伤细胞 (NK 细胞),通过调节 IFN- γ 的产生影响 CD8⁺T 淋巴细胞抗结核感染的免疫功能。Wang 等^[22]研究发现,lncRNA-CD244 可抑制 CD8⁺T 淋巴细胞表达 IFN- γ 和肿瘤坏死因子 (TNF)- α ,敲除 CD8⁺T 淋巴细胞的 lncRNA-CD244 可显著降低小鼠的死亡率和减缓 MTB 感染的发病过程,提示 lncRNA-CD244 作为 CD8⁺T 淋巴细胞中 IFN- γ 和 TNF- α 表达的表观遗传调节因子,调节结核感染个体 CD8⁺T 淋巴细胞的免疫应答。Fu 等^[23]研究采用基因芯片的方法检测肺结核患者与正常对照人群外周血 CD8⁺T 淋巴细胞的 lncRNA 表达,基因芯片的结果用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 验证,下调的 mRNA 的功能研究采用变化预测分析,结果发现,328 条 lncRNAs 和 356 条 mRNAs 差异表达。上调的 mRNAs 富集于 cAMP、Ca、转化生长因子 (TGF)- β 信号通路,下调的 mRNAs 富集于抗原加工和提呈及 NK 细胞介导的细胞毒性反应。进一步研究发现,HMOX1 在肺结核患者的 CD8⁺T 淋巴细胞中表达下调,而其相关 lincRNA (XLOC_014219) 上调,提示 lncRNA 可能与 CD8⁺T 淋巴细胞功能紊乱有关,并参与活动性肺结核的病理生理过程。

2. lncRNA 在 MTB 感染 B 淋巴细胞中的研究

B 淋巴细胞与结核感染的关系目前尚未明确,但文献报道 B 淋巴细胞在结核感染的过程中仍发挥一定作用,虽然这种作用机制尚未完全明确。Ulrichs 等^[24]比较了手术切除的不同临床表现肺结核患者 (结核球和空洞型结核) 组织中 B 淋巴细胞的分布和数量,提示 B 淋巴细胞可能与肺结核保护性免疫有关。Maglione 等^[25]借助 B 淋巴细胞表达敲低小鼠结核感染模型发现 B 淋巴细胞在结核病中起保护作用,主要是因为 B 淋巴细胞对炎症反应的抑制。但是,Ordway 等^[26]对豚鼠 MTB 感染模型的研究结果显示,B 淋巴细胞与肺结核的免疫病理有关。目前,lncRNA 在人类对结核感染获得性免疫方面的研究也是新的方向,Fu 等^[27]采用基因芯片方法检测结核病患者和健康人群对照 B 淋巴细胞 lncRNA、mRNAs 的表达谱,结果发现 844 条 lncRNAs 和 597 条 mRNAs 差异表达。进一步通过生物信息方法预测 lncRNAs 可能通过与 Toll 样受体 (TLR) 信号通路、TGF- β 信号通路发挥调节作用。并且发现与 lncRNA (XLOC_012582) 邻近的 SOCS3 (对结核感染重要的负性调控因子) 在活动性肺结核患者 B 淋巴细胞中高表达,而调节上下游邻近基因的表达是 lncRNA 的作用机制之一。是否为 lncRNA (XLOC_

012582) 上调致 SOCS3 过表达导致 B 淋巴细胞激增的相关机理仍需进一步探索。

3. lncRNA 在 MTB 感染的巨噬细胞中的研究

巨噬细胞是机体重要的免疫细胞,通过吞噬和清除病原体及将抗原提呈给 T 淋巴细胞以启动保护性的获得性免疫应答,在宿主抗感染免疫中起关键作用。但巨噬细胞同时也是 MTB 的主要宿主细胞,MTB 可通过多种免疫逃逸机制逃避巨噬细胞的清除,从而长期寄生在巨噬细胞内。自噬是巨噬细胞清除 MTB 的策略之一,在卡介苗 (BCG) 感染的巨噬细胞中,下调 lncRNA-MEG3 的表达可诱导细胞自噬和促进细胞清除细胞内病原体^[28]。Yang 等^[29]研究发现,H37Ra 或 H37Rv (MTB 强毒株) 感染巨噬细胞可诱导大量 lncRNA 出现差异表达,H37Rv 诱导下调的 lncRNA 和 mRNA 数量均远大于 H37Ra,提示 lncRNA 在 MTB 感染免疫中可能发挥重要作用。进一步使用 GO 分析和 KEGG 通路分析对差异表达的 mRNA 进行功能富集发现,H37Ra 组和 H37Rv 组上调的 mRNA 所富集的 GO 条目和 KEGG 通路条目绝大部分是相同的。相比之下,H37Ra 组和 H37Rv 组中下调的 mRNA 显著富集的 GO 条目和 KEGG 通路条目之间存在很大差异,表明 MTB 强毒株逃避巨噬细胞的杀伤机制可能是通过抑制宿主特定的代谢通路:通过调控丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路而抑制机体对 MTB 的免疫应答;脂质代谢和鞘脂代谢及核因子 (NF)- κ B 途径受到抑制等。

三、lncRNA 在结核感染中的诊断意义

目前诊断结核病的方法主要包括痰 MTB 检测、TST、干扰素释放试验 (IGRA)、影像学检查等,但上述方法存在诊断准确性和灵敏度低、耗时长、费用高等缺点,因此,开发快速、灵敏的诊断方法是有效控制结核病传播的关键。多项研究表明,结核病患者外周血单核细胞和血清中 lncRNA 表达水平有明显差异。He 等^[30]研究应用基因芯片的方法检测肺结核患者、社区获得性肺炎患者和健康人群外周血中的 lncRNA,筛选出的 2 个特异表达的 lncRNAs (ENST00000354432 和 ENST00000427151),认为外周血中 lncRNAs 可能作为结核病快速诊断的分子标志物。lncRNA (AC079767.4) 是结核病高度易感基因,Zhao 等^[31]研究进一步探讨了 lncRNA (AC079767.4) 基因多态性与中国汉族人群易感性的关系,发现该基因 rs12477677 C 等位基因携带者患肺结核的易感性明显降低 ($P < 0.05$),且其临床发热症状明显缓解 ($P < 0.05$)。lncRNA (AC079767.4) 基因多态性可能是结核治疗效果评估的潜在分子生物

标志物。欧青叶等^[32]筛选出了 3 个在结核潜伏感染者外周血中特异性差异表达的 lncRNA,提示 lncRNA 参与结核潜伏感染的分子调节过程。Yang 等^[29]发现了 2 个可能作为结核病诊断标志物的潜在 lncRNA,分别是 MIR3945HG V1 和 MIR3945HG V2。将核酸作为诊断标志物,使用 PCR 技术作为检测手段,具有快速、敏感、费用低等优点。目前尚无可以检测潜伏感染的发病预警生物标志,寻找具有结核潜伏感染发病预警诊断潜能的 lncRNA,对结核病的防治具有重大意义。

综上所述,lncRNA 作为诊断结核病的生物学标志物,不仅可及早对活动性结核进行诊断,同时也能给结核病的临床免疫治疗提供新思路。目前对于 lncRNA 在结核发病机制的研究刚起步,主要是集中在对其表达差异的分析上。在今后的研究中,综合应用分子生物学、蛋白质组学、基因杂交技术、细胞实验及动物实验等手段从多个方面研究 lncRNA 的功能及其在结核感染发病的调控机制,将有助于提高对结核病的认识水平,并积极推动结核病早期诊断和临床治疗的发展。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2018 [R]. Geneva:WHO/CDS/TB,2018.
- [2] Houben RM, Dodd PJ. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling [J]. PLoS Med,2016,13(10):e1002152.
- [3] Ulitsky I, Bartel DP. lincRNAs: Genomics, Evolution, and Mechanisms [J]. Cell,2013,154(1):26-46.
- [4] Hung T, Chang HY. Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms [J]. RNA Biol,2010,7(5):582-585.
- [5] Washietl S, Kellis M, Garber M, et al. Evolutionary dynamics and tissue specificity of human long noncoding RNAs in six mammals [J]. Genome Res,2014,24(4):616-628.
- [6] Johnsson P, Lipovich L, Grander D, et al. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function [J]. Biochimica Et Biophysica Acta,2014,1840(3):1063-1071.
- [7] Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome [J]. Nat Genet,2015,47(3):199-208.
- [8] Landskron L, Steinmann V, Bonnay F, et al. The asymmetrically segregating lncRNA cherub is required for transforming stem cells into malignant cells [J]. Elife,2018,7:pii:e31347.
- [9] Moran VA, Perera RJ, Khalil AM. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs [J]. Nucleic Acids Res,2012,40(14):6391-6400.
- [10] Satpathy AT, Chang HY. Long Noncoding RNA in Hematopoiesis and Immunity [J]. Immunity,2015,42(5):792-804.
- [11] Aune TM, Spurlock CF 3rd. Long non-coding RNAs in innate and adaptive immunity [J]. Virus Res,2016,212:146-160.
- [12] Necse A, Sournillon M, Wamefors M, et al. The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods [J]. Nature,2014,505(7485):635.
- [13] Zhao Z, Peng W, Wu L, et al. Correlation between lncRNA AC079767. 4 variants and liver injury from antituberculosis treatment in West China

- [J]. J Infect Chemother,2019. pii:S1341-321X(19)30204-1.
- [14] Yan H, Xu R, Zhang X, et al. Identifying differentially expressed long non-coding RNAs in PBMCs in response to the infection of multidrug-resistant tuberculosis [J]. Infect Drug Resist,2018,11:945-959.
- [15] Song J, Liu T, Zhao Z, et al. Genetic polymorphisms of long noncoding RNA RP11-37B2. 1 associate with susceptibility of tuberculosis and adverse events of antituberculosis drugs in west China [J]. J Clin Lab Anal,2019,33(5):e22880.
- [16] Di GF, Capaccioli S, Lulli M. A pathophysiological view of the long non-coding RNA world [J]. Oncotarget,2014,5(22):10976-10996.
- [17] Herriges MJ, Swarr DT, Morley MP, et al. long noncoding RNAs are spatially correlated with transcription factors and regulate lung development [J]. Genes Dev,2014,28(12):1363-1379.
- [18] Djebali S, Davis C A, Merkel A, et al. Landscape of transcription in human cells [J]. Nature,2012,489(7414):101-108.
- [19] Goldsack L, Kirman JR. Half-truths and selective memory: Interferon gamma, CD4(+) T cells and protective memory against tuberculosis [J]. Tuberculosis (Edinb),2007,87(6):465-473.
- [20] Yi Z, Li J, Gao K, et al. Identification of differentially expressed long non-coding RNAs in CD4(+) T cells response to latent tuberculosis infection [J]. J Infect,2014,69(6):558-568.
- [21] Serbina NV, Flynn JL. CD8(+) T cells participate in the memory immune response to Mycobacterium tuberculosis [J]. Infect Immun,2001,69(7):4320-4328.
- [22] Wang Y, Zhong H, Xie X, et al. Long noncoding RNA derived from CD244 signaling epigenetically controls CD8(+) T-cell immune responses in tuberculosis infection [J]. Proc Natl Acad Sci U S A.,2015,112(29):E3883-E3892.
- [23] Fu Y, Gao K, Tao E, et al. Aberrantly Expressed Long Non-Coding RNAs In CD8(+) T Cells Response to Active Tuberculosis [J]. J Cell Biochem,2017,118(12):4275-4284.
- [24] Ulrichs T, Kosmiadi GA, Jorg S, et al. Differential organization of the local immune response in patients with active cavitary tuberculosis or with nonprogressive tuberculoma [J]. J Infect Dis,2005,192(1):89-97.
- [25] Maglione PJ, Xu J, Chart J, et al. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with Mycobacterium tuberculosis [J]. J Immunol,2007,178(11):7222-7234.
- [26] Ordway D, Palanisamy G, Henao-Tamayo M, et al. The cellular immune response to Mycobacterium tuberculosis infection in the guinea pig [J]. J Immunol,2007,179(4):2532-2541.
- [27] Fu Y, Xu X, Xue J, et al. Deregulated lncRNAs in B Cells from Patients with Active Tuberculosis [J]. PLoS One,2017,12(1):e0170712.
- [28] Pawar K, Hanisch C, Vera S E P, et al. Down regulated lncRNA MEG3 eliminates mycobacteria in macrophages via autophagy [J]. Sci Rep,2016,6:19416.
- [29] Yang X, Yang J, Wang J, et al. Microarray analysis of long noncoding RNA and mRNA expression profiles in human macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis [J]. Sci Rep,2016,6:38963.
- [30] He J, Ou Q, Liu C, et al. Differential expression of long non-coding RNAs in patients with tuberculosis infection [J]. Tuberculosis (Edinb),2017,107:73-79.
- [31] Zhao Z, Zhang M, Ying J, et al. Significance of genetic polymorphisms in long non-coding RNA AC079767. 4 in tuberculosis susceptibility and clinical phenotype in Western Chinese Han population [J]. Sci Rep,2017,7(1):965.
- [32] 欧青叶, 顾大勇, 周俭中, 等. 潜伏性结核菌感染者血浆长链非编码 RNA 表达谱差异分析 [J]. 中华检验医学杂志,2016,39(11):857-863.

(收稿日期:2019-10-19)

(本文编辑:张一冰)